



**GABARAPs vermitteln den anterograden Transport und die
Sekretion von HIV-1 Nef durch Autophagie-basierte
unkonventionelle Sekretionsmechanismen**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Alexandra Boeske, geb. Gorgels

aus Würselen

Würselen, Dezember 2014

aus dem Institut für Physikalische Biologie
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

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

Referent: Prof. Dr. Dieter Willbold
Korreferent: Prof. Dr. Heiner Schaal

Tag der mündlichen Prüfung: 09 Dezember 2014

**In liebevoller und dankbarer Erinnerung an meinen verstorbenen Vater
Hans Gorgels (†2013)**

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	12
1.1	DIE HUMANE AUTOPHAGY-RELATED (ATG) PROTEIN 8 (ATG8)-FAMILIE	12
1.2	AUTOPHAGIE	16
1.2.1	MECHANISMUS DER AUTOPHAGIE	16
1.3	SEKRETION	20
1.3.1	KONVENTIONELLE SEKRETIONSMECHANISMEN	20
1.3.2	UNKONVENTIONELLE SEKRETIONSMECHANISMEN	24
1.4	EXOSOMEN	27
1.5	HIV	29
1.6	ERSTE HINWEISE AUF EINE MÖGLICHE INTERAKTION ZWISCHEN HIV-1 NEF UND ATG8s	31
2	MATERIAL	33
2.1	BAKTERIENSTÄMME	33
2.2	HUMANE ZELLINIEN	34
2.3	MEDIEN	34
2.3.1	BAKTERIENMEDIEN	34
2.3.2	ZELLKULTURMEDIUM	35
2.4	PUFFER UND LÖSUNGEN	35
2.4.1	ANTIBIOTIKA	35
2.4.2	ALLGEMEINE PUFFER	36
2.4.3	PRIMER	36
2.4.4	GRÖßENMARKER	37
2.4.5	CHEMIKALIEN	38
2.4.6	GERÄTE	38
2.4.7	KITS	39
2.4.8	ANTIKÖRPER	40
2.4.9	PLASMIDE	40
2.4.10	SOFTWARE	42
3	METHODEN	44

3.1 GENTECHNISCHE METHODEN	44
3.1.1 KULTIVIERUNG VON <i>E. COLI</i>	44
3.1.2 ISOLIERUNG VON PLASMID DNA AUS <i>E. COLI</i>	44
3.1.3 HERSTELLUNG CHEMISCH KOMPETENTER <i>E. COLI</i>	44
3.1.4 TRANSFORMATION VON <i>E. COLI</i>	45
3.1.5 AMPLIFIZIERUNG VON DNA	45
3.1.6 RESTRIKTIONSVERDAU	46
3.1.7 DEPHOSPHORYLIERUNG VON PLASMIDEN	46
3.1.8 EXTRAKTION VON DNA AUS DEM AGAROSEGEL	47
3.1.9 LIGATION	47
3.1.10 SEQUENZIERUNG	47
3.1.11 ORTSSPEZIFISCHE MUTAGENESE	48
3.1.12 IN-FUSION-KLONIERUNG	48
3.1.13 AGAROSEGELELEKTROPHORESE	49
3.2 PROTEINCHEMIE	50
3.2.1 EXPRESSION UND REINIGUNG VON NEFCOD ⁺	50
3.2.2 EXPRESSION UND REINIGUNG VON NEFCORE	51
3.2.3 EXPRESSION UND REINIGUNG VON GABARAPS	52
3.2.4 EXPRESSION UND REINIGUNG VON LC3S	54
3.2.5 SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE)	55
3.2.6 COOMASSIE-BLAU-FÄRBUNG	56
3.2.7 WESTERN-BLOT	56
3.2.8 STRIPPEN VON MEMBRANEN	57
3.2.9 METHANOL-CHLOROFORM-FÄLLUNG	57
3.3 SPEKTROSKOPISCHE METHODEN	57
3.3.1 ABSORPTIONSMESSUNGEN	57
3.4 ZELLKULTUR	59
3.4.1 KULTIVIERUNG VON ZELLINIEN	59
3.4.2 BESTIMMUNG DER ZELLZAHL	60
3.4.3 AUFTAUEN UND EINFRIEREN VON EUKARYOTISCHEN ZELLEN	60
3.4.4 TRANSFEKTION MITTELS POLYFECT	61
3.4.5 TRANSFEKTION MITTELS CALCIUMPHOSPHAT	61
3.4.6 STABILE TRANSFEKTION VON ZELLEN	62
3.4.7 BEHANDLUNG VON ZELLEN MIT AUTOPHAGIE-INHIBITOREN UND ANDEREN REAGENZIEN	63

3.5 IMMUNCHEMISCHE METHODEN	64
3.5.1 PULL-DOWN	64
3.5.2 KOIMMUNOPRÄZIPITATION	65
3.5.3 TET-ON-SYSTEM (GOSSEN UND BUJARD 1992)	66
3.5.4 ISOLIERUNG VON EXOSOMEN	68
3.5.5 EXOSOMEN-ANTIKÖRPER-ARRAY	68
3.5.6 siRNA TECHNOLOGIE	69
3.5.7 HERSTELLUNG VON ZELLYSATEN	70
3.6 MIKROSKOPIE	71
3.6.1 KONFOKALE LASER-SCANNING-MIKROSKOPIE	71
3.6.2 GRUNDLAGEN	71
4 ERGEBNISSE	73
4.1 DIE INDUKTION VON AUTOPHAGIE FÜHRT ZUR AKKUMULATION VESIKULÄRER STRUKTUREN IN HEK293-ZELLEN	73
4.1.1 EXPRESSIONSVEKTOREN FÜR GABARAP, GABARAPL1, GABARAPL2, LC3B ODER NEF FUSIONIERT MIT DIVERSEN FLUORESZIERENDEN PROTEINEN FÜR DIE LEBENZZELL-MIKROSKOPIE	73
4.1.2 ETABLIERUNG VON STABILEN ZELLINIEN	74
4.1.3 LEBENZZELL-FLUORESZENZMIKROSKOPIE VON ATG8-PROTEINEN IN VERSCHIEDENEN AUTOPHAGIESTADIEN	74
4.1.4 LEBENZZELL-FLUORESZENZMIKROSKOPIE VON NEF BEI VERSCHIEDENEN AUTOPHAGIESTADIEN	76
4.1.5 NEF KOLOKALISIERT MIT ALLEN ATG8S, ZEIGT ABER EINE ANDERE VERTEILUNG MIT GABARAP ALS MIT LC3B	77
4.2 NEF IMMUNOPRÄZIPITIERT SPEZIFISCH MIT DEN MITGLIEDERN DER GABARAP/GABARAPL2-FAMILIE	79
4.3 NEF BINDET DIREKT AN GABARAP, GABARAPL1 UND GABARAPL2	83
4.4 FÜR DIE BINDUNG VON NEF AN GABARAP SIND KONSERVIERTE RESTE INNERHALB DER GABARAPS VERANTWORTLICH	86
4.5 SEQUENZANALYSEN IDENTIFIZIERTEN EIN POTENZIELLES GABARAP/GABARAPL2 SUBFAMILY INTERACTING REGION (GIR)-MOTIV IN DER DIREKTEN NÄHE DES TRP13	90
4.6 DIE GABARAPS-MITGLIEDER ZEIGEN IM GEGENSATZ ZU LC3B KEINE ERHÖHTEN LIPIDIERUNGSLEVEL IN ANWESENHEIT VON NEF	93
4.7 GABARAPS SIND FÜR DIE SEKRETION VON NEF ESSENTIELL	95
4.8 DIE GABARAP-FAMILIE VERMITTELT DIE SEKRETION VON NEF ÜBER EXOSOMEN	98
4.9 GABARAPS VERMITTELT DEN TRANSPORT VON NEF ZUR PLASMAMEMBRAN	101
4.10 TRYPTOPHAN 13 IST FÜR DIE SEKRETION ESSENTIELL	102

4.11 DIE SEKRETION VON NEF IST GABARAP-ABHÄNGIG UND KANN BEREITS KURZ NACH DER INDUKTION DER EXPRESSION VON NEF NACHGEWIESEN WERDEN	104
4.11.1 ETABLIERUNG EINER STABILEN NEF TET-ON LINIE	104
4.11.2 KLONIERUNG DES EXPRESSIONSVEKTORS	104
4.11.3 ETABLIERUNG EINER STABIL TRANSFIZIERTEN TETON-ZELLINIE	105
4.11.4 OPTIMIERUNG DER NEF-MCHERRY-INDUKTION	106
4.11.5 LEBENZZELL-FLUORESCENZMIKROSKOPIE VON INDUZIERBAREN NEF UND ATG8S	108
5 DISKUSSION	112
5.1 DIE BINDUNG VON NEF AN DIE HYDROPHEN TASCHEN VON GABARAP ERFOLGT ÜBER TRYPTOPHAN	113
5.2 DIE SELEKTIVE BINDUNG DER GABARAP-FAMILIE WIRD DURCH DIE AMINOSÄUREN S53 UND W62 DES GABARAP-MOLEKÜLS BESTIMMT	114
5.3 DIE INTERAKTION VON GABARAPs UND NEF IST DIREKT UND LIPIDIERUNGSUNABHÄNGIG	115
5.4 GABARAPs AKKUMULIEREN WIE LC3B INNERHALB VON AUTOPHAGOSOMEN UND KOLOKALISIEREN ZUSÄTZLICH MIT NEF AN DER PLASMAMEMBRAN	116
5.5 GABARAPs UND LC3 WERDEN FÜR DEN TRANSPORT VON NEF ÜBER EINEN AUTOPHAGIE-BASIERTEN UNKONVENTIONELLEN SEKRETIONSMECHANISMUS BENÖTIGT	117
5.6 DIE UNKONVENTIONELLE SEKRETION VON NEF KÖNNTE ABER AUCH UNABHÄNGIG VON AUTOPHAGIE UND LC3 ABLAUFEN	120
5.7 ZWEI UNKONVENTIONELLE SEKRETIONSMECHANISMEN SIND IN DIE SEKRETION VON NEF INVOLVIERT.	124
5.8 NEF KÖNNTE AN OMEGASOMEN UND CUPS AKKUMULIEREN UND SOMIT DAS GLEICHGEWICHT ZUR UNKONVENTIONELLEN SEKRETION VERSCHIEBEN	126
5.9 DIE NEF-HCK-INTERAKTION KÖNNTE DIE UNKONVENTIONELLE SEKRETION VON NEF UNTERSTÜTZTEN	126
5.10 DIE INTERAKTION VON NEF MIT DEN GABARAPs KÖNNTE DIE HERABREGULATION VERSCHIEDENER REZEPTOREN BEEINFLUSSEN.	127
5.11 EINE INHIBIERUNG DES NEF-GABARAPs-KOMPLEX KÖNNTE DEN VERLUST VON CD4⁺-ZELLEN WÄHREND DER AIDS-PATHOGENESE REDUZIEREN	129
6 ZUSAMMENFASSUNG	132
7 SUMMARY	134
8 LITERATUR	135
9 ANHANG	151

9.1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	151
9.1.1 AMINOSÄUREN	154
9.1.2 PUBLIKATIONEN UND POSTERPRÄSENTATIONEN	155
9.1.3 DANKSAGUNG	156

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1 LAGE DER HYDROPHOBEN TASCHEN (<i>HYDROPHIC POCKETS</i> , HP1 UND HP2)	13
ABBILDUNG 2 ROLLE UND FUNKTION DER ATG8-FAMILIE	15
ABBILDUNG 3 SCHEMATA ZUM ABLAUF DER AUTOPHAGIE SOWIE DARAN BETEILIGTER MULTIPROTEINKOMPLEXE	19
ABBILDUNG 4 SCHEMA ZUR KONVENTIONELLEN SEKRETION VON LÖSLICHEN SEKRETORISCHEN PROTEINEN SOWIE TRANSMEMBRANPROTEINEN	23
ABBILDUNG 5 SCHEMATISCHER ÜBERBLICK BEKANNTER UNKONVENTIONELLER SEKRETIONSMECHANISMEN .	26
ABBILDUNG 6 BIOGENESE VON EXOSOMEN.....	28
ABBILDUNG 7 INTERAKTION ZWISCHEN NEF UND GABARAP.....	32
ABBILDUNG 8 BAFA1 HEMMT DIE FUSION VON AUTOPHAGOSOM UND LYSOSOM	63
ABBILDUNG 9 DAS TETON-3G SYSTEM	67
ABBILDUNG 10 EXOARRAY.....	68
ABBILDUNG 11 SUBZELLULÄRE LOKALISATION VON YFP-GABARAP, YFP-GABARAPL1 UND YFP-LC3B.....	75
ABBILDUNG 12 SUBZELLULÄRE LOKALISATION VON NEF	76
ABBILDUNG 13 KOLOKALISATION VON NEF MIT GABARAP,GABARAPL1 UND LC3B.....	78
ABBILDUNG 14 NEF PRÄZIPITIERT MIT ENDOGENEM GABARAP, GABARAPL1 UND GABARAPL2, ABER NICHT MIT LC3B.....	80
ABBILDUNG 15 KOIMMUNOPRÄZIPITAION VON NEF-DSRED UND YFP-FUSIONIERTEN ATG8S.....	82
ABBILDUNG 16 REINHEIT DER REKOMBINATEN PROTEINE GABARAP, GABARAPL1, GABARAPL2, LC3B, LC3A UND HIV1-NEF	84
ABBILDUNG 17 PULL-DOWN MIT GABARAP, GABARAPL1, GABARAPL2 UND LC3B UND NEF	85
ABBILDUNG 18 SEQUENZALIGNMENT DER HUMANEN ATG8-PARALOGEN	87
ABBILDUNG 19 REINHEIT DER REKOMBINANTEN PROTEINE GABARAP(S53D/F62K) UND LC3B(D56S/K65F)	88
ABBILDUNG 20 PULL-DOWN MIT GABARAP(S53D/F62K), LC3B(D56S/K65F) UND NEF.	89
ABBILDUNG 21 IDENTIFIZIERUNG EINES KONSERVIERTEN GIR-MOTIVS INNERHALB DER NEF-PROTEINE VON HIV- UND SIV-STÄMMEN.....	90
ABBILDUNG 22 REINHEIT DER NEF-KONSTRUKTE W5A, W13A UND CORE	91
ABBILDUNG 23 PULL-DOWNS MIT NEF, NEF(W5A), NEF(W13A) UND NEFCORE UND GABARAP-GEKOPPELTER SEPHAROSE.....	92
ABBILDUNG 24 LIPIDIERUNGSLEVEL VON GABARAP, GABARAPL1, GABARAPL2 UND LC3B IN ANWESENHEIT VERSCHIEDENER NEF-KONSTRUKTE	94
ABBILDUNG 25 DIE GABARAP-FAMILIE BEEINFLUSST DIE SEKRETION VON NEF.	96
ABBILDUNG 26 EFFIZIENZ DER EINGESETZTEN SIRNAS BEIM AUSSCHALTEN DER UNTERSUCHTEN ATG8S.....	97
ABBILDUNG 27 GABARAPS SIND FÜR DIE SEKRETION VON NEF IN EXOSOMEN ESSENTIELL	99
ABBILDUNG 28 NACHWEIS VON REINEN EXOSOMEN	100
ABBILDUNG 29 GABARAPS VERMITTELN DEN TRANSPORT ZUR PLASMAMEMBRAN	101

ABBILDUNG 30 SEKRETION VON VERSCHIEDENEN NEF-KONSTRUKTEN IN EXOSOMEN	103
ABBILDUNG 31 LUZIFERASE-ASSAY DER TETON-ZELLEN.....	105
ABBILDUNG 32 BESTIMMUNG DER BENÖTIGTEN DOXYCYCLIN-KONZENTRATION	107
ABBILDUNG 33 DOXYCYCLIN-ZEITREIHE	107
ABBILDUNG 34 VERGLEICH DER KOLOKALISATIONEN ZWISCHEN NEF MIT GABARAP UND LC3B.....	109
ABBILDUNG 35 KOLOKALISATION VON NEF UND MAPLC3B	110
ABBILDUNG 36 KOLOKALISATION VON NEF UND GABARAP	110
ABBILDUNG 37 KOLOKALISATION VON NEF MIT GABARAPL1 UND GABARAPL2 NACH INDUKTION VON NEF..	111
ABBILDUNG 38 MÖGLICHER EINFLUSS VON NEF IN DER AUTOPHAGIE	117
ABBILDUNG 39 MÖGLICHER ABLAUF DER AUTOSEKRETION VON NEF	120
ABBILDUNG 40 MODELL FÜR DIE UNKONVENTIONELLE SEKRETION VON NEF	123
ABBILDUNG 41 MODELL ZUR GABARAP-NEF-KOMPLEX INTERAKTION MIT MIKROTUBULI UND NSF	125
ABBILDUNG 42 MODELL WIE DER NEF-GABARAP-KOMPLEX DIE HOCH-UND HERABREGULIERUNG VON OBERFLÄCHENREZEPTOREN BEEINFLUSSEN KÖNNTE.....	129
ABBILDUNG 43 MODELL WIE DER NEF-GABARAP-KOMPLEX DIE TRANSLOKATION VON NEF BEEINFLUSSEN KÖNNTE.....	131

Tabellenverzeichnis

TABELLE 1 GENOTYPEN UND REFERENZEN DER VERWENDETEN BAKTERIENSTÄMME.....	33
TABELLE 2 LISTE DER VERWENDETEN NÄHRMEDIEN	34
TABELLE 3 LISTE DER VERWENDETEN ZELLKULTURMEDIEN	35
TABELLE 4 LISTE DER VERWENDETEN ANTIBIOTIKA	35
TABELLE 5 LISTE ALLGEMEIN VERWENDETER PUFFER.....	36
TABELLE 6 LISTE DER VERWENDETEN PRIMER.....	36
TABELLE 7 LISTE DER VERWENDETEN GRÖßENMARKER	37
TABELLE 8 LISTE VERWENDETER CHEMIKALIEN.....	38
TABELLE 9 LISTE VERWENDETER GERÄTE	38
TABELLE 10 LISTE DER VERWENDETEN KITS	39
TABELLE 11 LISTE DER VERWENDETEN ANTIKÖRPER	40
TABELLE 12 LISTE DER VERWENDETEN PLASMIDE.....	40
TABELLE 13 LISTE DER VERWENDETEN SOFTWARE	42
TABELLE 14 LÖSUNGEN FÜR DIE AGAROSE-GELELEKTROPHORESE.....	49
TABELLE 15 LÖSUNGEN ZUR REINIGUNG VON NEF	51
TABELLE 16 LÖSUNGEN FÜR DIE REINIGUNG VON NEFCORE	52
TABELLE 17 LÖSUNGEN ZUR REINIGUNG VON GABARAP, GABARAPL1 UND GABARAPL2.....	53
TABELLE 18 LÖSUNGEN ZUR REINIGUNG VON LC3B	54
TABELLE 19 LÖSUNGEN FÜR PUFFER UND GELE FÜR DIE SDS-PAGE	55
TABELLE 20 COOMASSIE-FÄRBE LÖSUNG	56
TABELLE 21 EXTINKTIONSKOEFFIZIENTEN VERWENDETER PROTEINE.....	58
TABELLE 22 LÖSUNGEN FÜR PULL-DOWN-EXPERIMENTE	64
TABELLE 23 LISTE DER GEKOPPELTEN ANTIKÖRPER DES EXOARRAYS	69
TABELLE 24 LISTE DER EINGESETZTEN SIRNAS (DHARMA CON, LAFAYETTE, USA)	70
TABELLE 25 ZELLYSEPUFFER	70

1 Einleitung

1.1 Die humane autophagy-related (Atg) Protein 8 (ATG8)-Familie

Autophagy-related 8 (Atg8)-Proteine bilden eine hochkonservierte Proteinfamilie in Eukaryoten. Während Hefen nur ein Atg8-Gen besitzen, deren Protein als *Atg8* bezeichnet wird, besitzen höhere Organismen mehrere Atg8 homologe Proteine (ATG8s), die dann für als ATG8 bezeichnete Proteine codieren (Klionsky, Cregg et al. 2003). Im Speziellen codiert der Mensch für sieben auf Proteinebene detektierbare ATG8s (Williams, Woods et al. 2009), die aufgrund ihrer Aminosäuresequenzen in zwei Unterfamilien eingeteilt werden (Mohrlüder, Schwarten et al. 2009). Dabei bilden MAP1LC3 (*microtubule-associated protein light chain 3*) A (LC3A), B (LC3B) und C (LC3C) die MAPLC3-Unterfamilie, im Folgenden als „LC3s“ bezeichnet. GABARAP (γ -aminobutyrate type A receptor associated protein), GABARAPL1 (GABARAP-like 1; auch GABARAPL1, glandular epithelial cell 1), GABARAPL2 (auch GATE-16, Golgi-associated ATPase enhancer of 16 kDa) und das von einem Pseudogen codierte GABARAPL3 die GABARAP/GATE-16-Unterfamilie, im Folgenden als „GABARAPs“ bezeichnet (Mohrlüder, Schwarten et al. 2009).

Umfassende Strukturanalysen in den letzten Jahren zeigten, dass GABARAP eine hohe Strukturähnlichkeit zu Ubiquitin aufweist. So konnte die sogenannte β -grasp Faltung, die bereits von Ubiquitin bekannt war, auch im Hauptteil von GABARAP nachgewiesen werden. Diese besteht aus einem zentralen, aus vier Strängen bestehenden, β -Faltblatt sowie zwei α -Helices auf der konkaven Seite des β -Faltblatts. Allerdings besitzt GABARAP im Unterschied zu Ubiquitin zwei weitere α -Helices am N-Terminus.

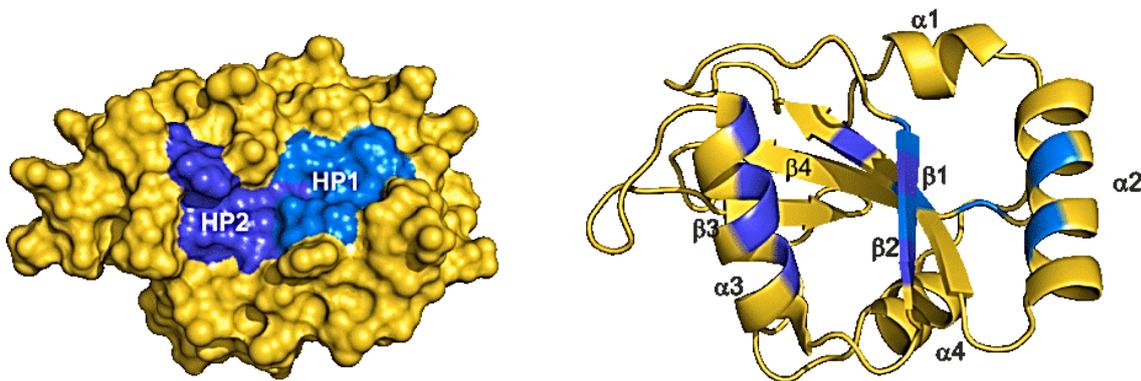


Abbildung 1 Lage der Hydrophoben Taschen (*hydrophobic pockets*, HP1 und HP2)

Oberflächendarstellung von GABARAP (links) und Bänderstruktur von GABARAP (rechts). Aminosäurereste, die die HP1 und HP2 bilden, sind hell- bzw. dunkelblau dargestellt. Sekundärstrukturelemente sind mit α (α -Helix) und β (β -Strang) und der entsprechenden Nummerierung gekennzeichnet. (PDB-Eintrag: 1kot).

Bei der Suche nach der biologischen Relevanz der ATG8s wurde eine große Anzahl von Bindungspartnern, vor allem für GABARAP, gefunden. So bindet GABARAP an NSF (*N-ethylmaleimide-sensitive factor*) (Kittler, Rostaing et al. 2001), Calreticulin (Mohrlüder, Stangler et al. 2007), Tubulin (Wang, Bedford et al. 1999), ULK1 (*unc-51-like kinase 1*) (Okazaki, Yan et al. 2000), PRIP-1 (*phospholipase C-related inactive protein typ 1* (Kanematsu, Jang et al. 2002)), GRIP (*glutamate interacting protein 1*) (*glutamate interacting protein 1*) (Kittler, Arancibia-Carcamo et al. 2004), Gephyrin (Kneussel, Haverkamp et al. 2000), DDX47 (*DEAD box polypeptid 47*) (Lee, Rho et al. 2005) und an die schwere Kette von Clathrin (Mohrlüder J 2007).

Nahezu alle ATG8-Bindungspartner besitzen eine kurze hydrophobe *LC3-interacting region* (LIR) (Mohrlüder, Stangler et al. 2007, Mohrlüder J 2007, Schwarten, Mohrlüder et al. 2009), die bei Hefen als *Atg8-binding motif* (AIM) bezeichnet wird (Pankiv, Clausen et al. 2007). Das LIR-Bindungsmotiv besitzt die Sequenzfolge WXX Ψ (Noda, Kumeta et al. 2008). Dabei ist W ein für die Bindung essentielles Tryptophan, das bereits während Phagendisplay-Experimenten mit Dodecapeptiden in über 90 % der an GABARAP gebundenen Liganden identifiziert wurde (Thielmann, Mohrlüder et al. 2008) und Ψ eine beliebige hydrophobe Aminosäure. X kann dabei jede beliebige Aminosäure sein. Neben diesem allgemein anerkannten Bindungsmotiv konnten, durch multiple Sequenzalignments der im Phagendisplay eingesetzten Peptide, weitere Präferenzen von Aminosäureresten in der Nähe des zentralen Tryptophans

identifiziert werden. Ausgehend von einem zentralen Tryptophan an Position i unterstützen aliphatische Reste an Position $i+1$ und $i+3$, ein aromatischer Rest an Position $i+2$ und ein Prolin an Position $i+4$ und $i+5$ die Bindung an GABARAP. Die Reste auf der N-terminalen Seite des Tryptophans sind weniger konserviert, wenngleich eine Präferenz für hydrophile und geladene Aminosäuren erkennbar ist (Birgisdottir, Lamark et al. 2013).

In weiterführenden Studien wurde die Interaktion von GABARAP mit niedermolekularen Liganden (Thielmann, Mohrlüder et al. 2008), aber auch Peptiden untersucht (Thielmann, Weiergräber et al. 2009). Dabei konnten zwei Indol-Bindestellen auf der Oberfläche von GABARAP charakterisiert werden, die auch als Hydrophobe Taschen „HP1“ und „HP2“ (Abb. 1) bezeichnet werden.

Alle sieben homologen ATG8-Proteine werden ubiquitär exprimiert, wenngleich für einige unterschiedliche Expressionsraten in verschiedenen Geweben beschrieben wurden (Kabeya, Mizushima et al. 2000, Sagiv, Legesse-Miller et al. 2000, Xin, Yu et al. 2001). So wurde beispielsweise für GABARAPL1 und GABARAPL2 eine erhöhte Expressionsrate vor allem im zentralen Nervensystem nachgewiesen, während LC3C verstärkt im Lungengewebe exprimiert wird (Xin, Yu et al. 2001).

Das am besten charakterisierte ATG8-Familienmitglied ist der Prototyp der LC3s, LC3B, das die Bindung von MAP1A und MAP1B (*microtubule-associated protein 1 A/B*) an Mikrotubuli vermittelt (Kuznetsov and Gelfand 1987, Mann and Hammarback 1994). Mitglieder der GABARAPs wurden ursprünglich bei der Untersuchung zellulärer Transportwege entdeckt. So sind GABARAP und GABARAPL1 in die Translokation von Transmembranrezeptoren vom Golgi-Komplex zur Plasmamembran involviert (Chen, Li et al. 2006), während GABARAPL2 den Transport vom endoplasmatischen Retikulum (ER) zum Golgi-Apparat, sowie den intra-Golgi Transport, beeinflusst (Legesse-Miller, Sagiv et al. 1998). Zusätzlich interagieren alle GABARAP-Familienmitglieder mit NSF, was einen möglichen Einfluss auf Transportvorgänge zusätzlich unterstützt (Sagiv, Legesse-Miller et al. 2000, Kittler, Rostaing et al. 2001, Chen, Li et al. 2006).

Ein Fehlen von ATG8-Paralogen in *Saccharomyces cerevisiae* führt zu einem fehlerhaften Ablauf der Autophagie (Nakatogawa, Suzuki et al. 2009), weshalb den ATG8s eine wichtige Rolle bei der Reifung der Phagophore zum Autophagosom zugesprochen wurde (Kap. 1.2). Weidberg et al. lieferten außerdem die ersten Beweise, dass die Mitglieder der beiden Unterfamilien, vornehmlich LC3B und

GABARAP, unterschiedliche Aufgaben bei der Bildung der Autophagosomen übernehmen. Mit Hilfe von siRNA-Experimenten, bei denen entweder die LC3s oder die GABARAPs ausgeschaltet wurden, konnte nachgewiesen werden, dass die LC3s eine wichtige Rolle bei der Reifung der preautophagosomalen Struktur, der Phagophore, übernehmen, während die GABARAPs das Schließen des Autophagosoms vermitteln (Weidberg, Shvets et al. 2010). Zusätzlich ist in diesem Zusammenhang relevant, dass die ATG8s durch die Ubiquitin-ähnliche Konjugationsmaschinerie reversibel lipidiert werden können (siehe Abb. 3 für Details). Somit können sie frei oder membranassoziiert vorliegen.

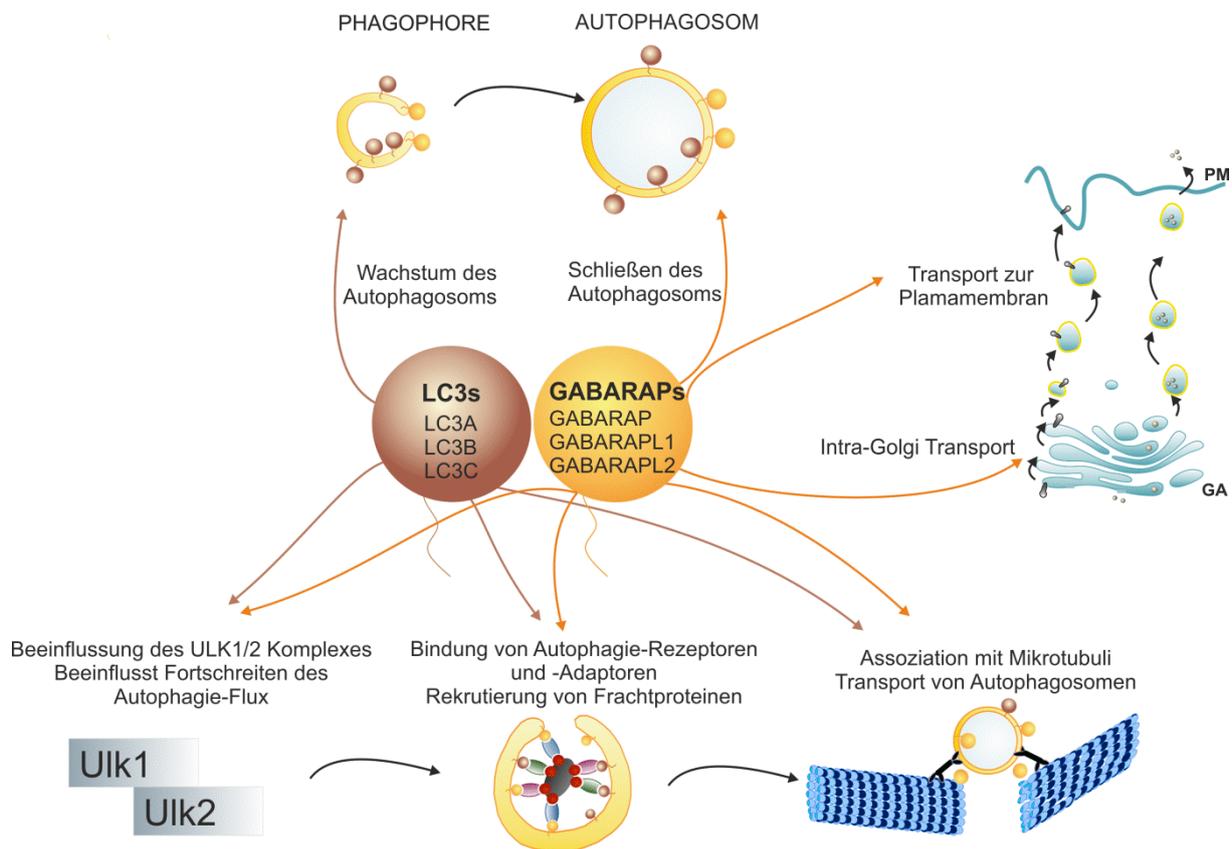


Abbildung 2 Rolle und Funktion der ATG8-Familie

GABARAPs und LC3s spielen eine wichtige Rolle bei der Reifung der Phagophore zum Autophagosom. Sie beeinflussen die Induktion der Autophagie durch Interaktion mit dem ULK1/2-Komplex. Zusätzlich werden sie für die Rekrutierung von Frachtproteinen benötigt. Beide Familien können mit Mikrotubuli interagieren. Mitglieder der GABARAPs sind zusätzlich in den Intra-Golgi-Transport und in den Transport zur Plasmamembran beteiligt.

1.2 Autophagie

Makroautophagie (ab hier als Autophagie bezeichnet) ist ein hochkonservierter katabolischer Prozess, bei dem ganze Organellen (z.B. Mitochondrien) sowie lösliche und aggregierte Zellkomponenten von Doppelmembran-Strukturen (Autophagosomen) umhüllt und nach der Fusion dieser Vesikel mit dem Lysosomen degradiert werden (De Duve and Wattiaux 1966). Autophagie läuft auf einem basalen Level in allen eukaryotischen Zellen ab und dient der zellulären Homöostase. Allerdings kann Autophagie durch physiologische und pathologische Reize, wie z.B. Nährstoffmangel, Anhäufung von Proteinaggregaten oder Infektionen, erhöht werden. Die Reifung des Autophagosoms erfolgt in mehreren Schritten, ist energieabhängig und benötigt eine ganze Reihe von molekularen Effektoren, den Atgs in Hefe oder ATGs in Säugern. In den letzten Jahren führten vor allem Studien von Ohsumi, Thumm und Klionsky dazu, dass inzwischen mehr als 32 verschiedene ATG-Proteine identifiziert werden konnten (Tsukada and Ohsumi 1993, Nakatogawa, Suzuki et al. 2009).

1.2.1 Mechanismus der Autophagie

Sowohl in Hefe als auch in Säugetieren beginnt die Bildung des Autophagosoms mit der Ausbildung einer Doppelmembran-Struktur, die in Hefe als *pre-autophagosomal structure* (PAS) bezeichnet wird (Suzuki, Kirisako et al. 2001) und vom ER abgeleitet wird. Eine einheitliche Struktur wie die PAS konnte in Säugetieren noch nicht nachgewiesen werden (Yang and Klionsky 2009). Hier werden mehrere Kompartimente, wie die Membran der Mitochondrien, die Plasmamembran und das ER als Ursprungsort einer Doppelmembran-Vorläuferstruktur diskutiert (Eskelinen 2008). Neuesten Untersuchungen zur Folge, könnte der Ursprung der Doppelmembran im ER liegen. Demnach entsteht die Phagophore aus dem Omegasom, einer kleiner Struktur, die mit dem ER in Verbindung steht und als Plattform für die Bildung der Autophagosomen dient (Axe, Walker et al. 2008, Tooze and Yoshimori 2010).

Die Induktion der Autophagie und die damit verbundene Ausbildung der Phagophore werden durch den ATG1-Komplex initiiert. Dieser setzt sich aus ULK1/2, ATG13, ATG101 und FIP200 (*focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kD*)

zusammen. Der zentrale Regulator dieses Komplexes ist das *mammalian target of rapamycin* (mTOR), das unter „Normalbedingungen“ an ULK1/2 bindet und diese sowie ATG13 phosphoryliert und dadurch inhibiert. Unter Hungerbedingungen dissoziiert inaktiviertes mTOR vom ULK1/2-Komplex ab, wodurch eine partielle Dephosphorylierung von ULK1/2 bewirkt wird. ULK1/2 sind wiederum in der Lage FIP200 zu phosphorylieren und somit den Start der Autophagosomenbildung zu induzieren (Esclatine, Chaumorcelet et al. 2009, Yang and Klionsky 2010).

Eine weitere wichtige Rolle bei der Rekrutierung der Phagophorenmembran übernimmt der Beclin1 (BECN1)-Vps34-Komplex. Er besteht aus Vps34, eine Klasse III Phosphatidylinositol 3-Kinase, Beclin1 (in Hefe Atg6), p150 (Vps15) und ATG14L (*auch als Beclin1-associated ATG key regulator* (BARKOR) bezeichnet). Vps34 phosphoryliert Phosphatidylinositol (PI) zu Phosphatidylinositol-3-Phosphat (PI3P). PI3P wird sowohl für die Induktion der Autophagie, als auch für die Bildung der Autophagosomen benötigt (Burman and Ktistakis 2010, Mehrpour, Esclatine et al. 2010). Nach aktuellem Kenntnisstand bilden sich die Autophagosomen innerhalb der Omegasomen, die besonders reich an PI3P sind (Axe, Walker et al. 2008, Burman and Ktistakis 2010). Es gibt zahlreiche Regulatoren, die die Synthese von PI3P fördern bzw. inhibieren. Zu den Aktivatoren zählen u.a. UVRAG (*UV irradiation resistance-associated gene*), Bif-1 (*Bax-interacting factor*) und Ambra (*Anti-activating molecule in Beclin 1-regulated autophagy*). Die Mitglieder der Bcl-2 Familie und RUBICON (*RUN domain and cysteine-rich domain containing Beclin-1 interacting protein*) können dagegen die Synthese von PI3P inhibieren (Burman and Ktistakis 2010, Glick, Barth et al. 2010).

Die Reifung der Phagophore wird durch zwei Ubiquitin-ähnliche Konjugationssysteme beeinflusst, die letztlich zur Lipidierung der ATG8s führen (Xie and Klionsky 2007). Das erste Konjugationssystem beginnt mit der Assoziation von ATG12 und ATG5, wobei die Bindung durch das E1-ähnliche Enzym ATG7 und das E2-ähnliche Enzym ATG10 vermittelt wird. ATG5 bindet wiederum an ATG16L. Dieser ATG5-ATG12-ATG16L-Komplex assoziiert ausschließlich mit der Außenseite der Membran und dissoziiert erst bei der Schließung der Vesikelmembran. Das zweite Konjugationssystem ist durch die Bindung von ATG8 an Phosphatidylethanolamin (PE) charakterisiert. Dafür wird ATG8, wie in Abb. 3 dargestellt, zunächst durch ATG4 in eine verkürzte Form mit einem C-terminalen Glycinrest prozessiert. Im Anschluss wird es durch das E1-ähnliche Enzym ATG7 aktiviert und auf das E2-ähnliche Enzym ATG3 übertragen. Beeinflusst durch

den ATG5-ATG12-ATG16L-Komplex erfolgt schließlich die Übertragung von ATG8 auf PE. ATG8-PE (auch ATG8-II) bindet sowohl an die Außenseite als auch an die Innenseite der wachsenden Phagophore (Noda, Kumeta et al. 2008, Mohrlüder, Schwarten et al. 2009). Während das ATG8-II, das sich auf der Innenseite der Membran befindet, nach dem Schluss des Autophagosoms dem lysosomalen System zugeführt wird, wird das ATG8-II auf der äußeren Seite durch ATG4 von PE abgespalten und steht somit für eine neue Reaktion zur Verfügung. Die ATG12- und ATG8-Konjugationssysteme sind essentiell für den Ablauf der Autophagie. Ein Ausfall eines der beiden Systeme verhindert die korrekte Ausbildung der Autophagosomen. Eine weitere Aufgabe von ATG8-II ist die Rekrutierung des Frachtgut-Adaptorproteins p62. Bei p62 handelt es sich um ein multifunktionelles Protein, das neben einer Ubiquitin-assoziierten UBA-Domäne, eine LIR- und eine PBI (*Phox and Bem1p domain*)-Domäne besitzt. Diese Domänen ermöglichen p62 ubiquitinierte Proteine einzufangen und sie zu ATG8-PE in den Autophagosomen zu transportieren. Im letzten Schritt reift das Autophagosom zum Autophagolysosom. Dazu fusioniert das Autophagosom mit einem Lysosom, wobei die innere Membran, LC3B-II und die eingeschlossenen Proteine durch Ansäuern und lysosmale Proteasen abgebaut werden.

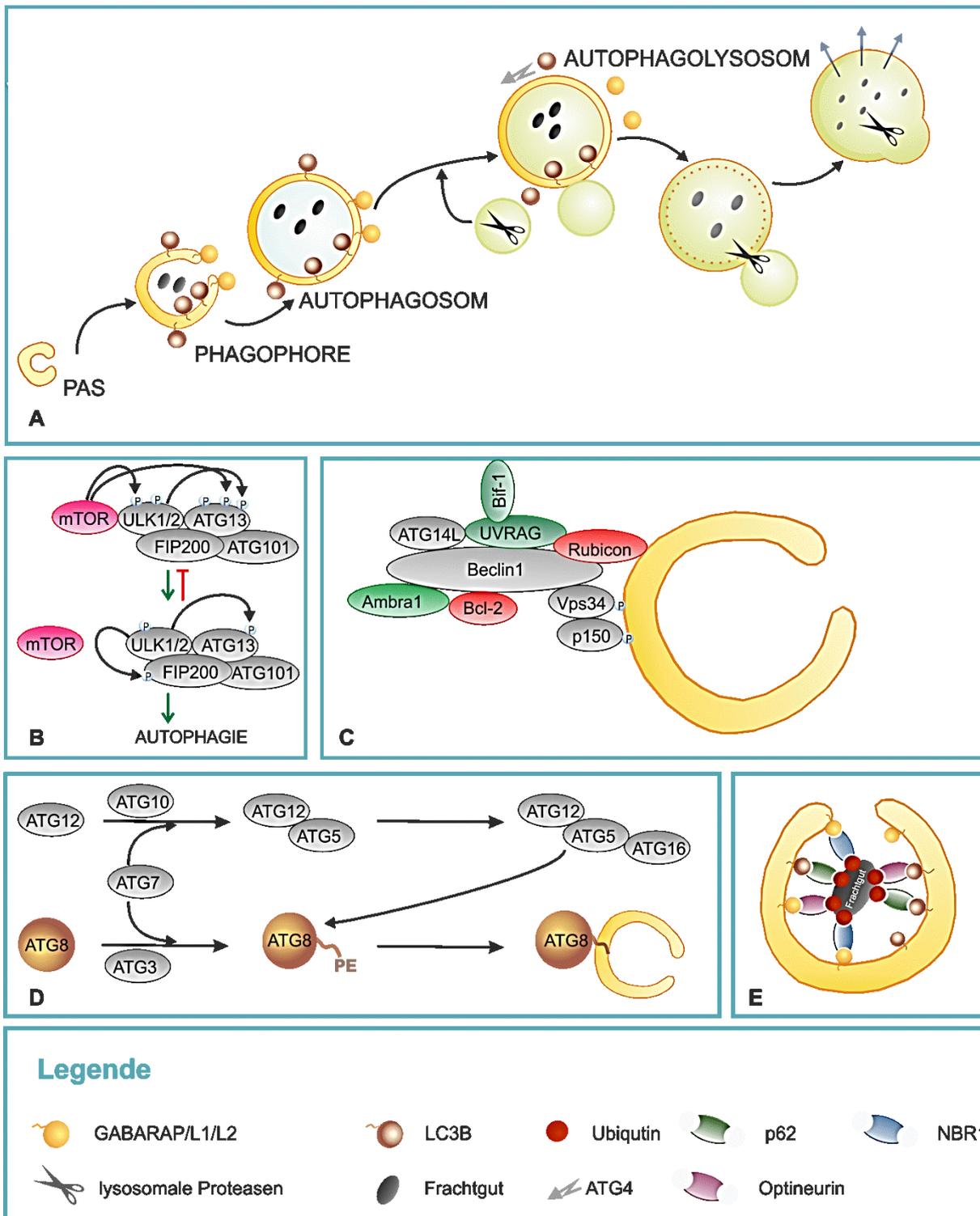


Abbildung 3 Schemata zum Ablauf der Autophagie sowie daran beteiligter Multiproteinkomplexe

A: Reifungsprozess: Die Ausbildung des Autophagosoms beginnt mit der Ausbildung einer Doppelmembran-Struktur, die in Hefe als preautophagosomale Struktur (PAS) bezeichnet wird. Daraus entwickelt sich die Phagophore, die zum Autophagosom reift. Zum Schluss fusioniert das Autophagosom mit dem Lysosom. In dem daraus entstandenen Autophagolysosom werden aufgenommene Frachtgüter durch lysosomale Proteasen degradiert. **B:** Die Ausbildung der Phagophore wird durch den ATG1-Komplex initiiert. Er besteht aus ULK1/2, ATG13, ATG101 und FIP200. Der zentrale Regulator mTOR bindet unter Normalbedingungen an ULK1/2 und phosphoryliert diese und ATG13. Unter Hungerbedingungen dissoziiert inaktiviertes mTOR ab, wodurch eine partielle Dephosphorylierung von ULK1/2 entsteht und infolgedessen FIP200 phosphoryliert wird. Dies gilt als Startsignal für die Reifung des Autophagosoms. **C:** Rekrutierung der Phagophorenmembran. Der Beclin1:Vps34 Komplex besteht aus Beclin1, Vps34, PI3K, p150 und ATG14L und ist für die Phosphorylierung von PI3P verantwortlich. Durch die Interaktion mit

Aktivatoren wie UVRAG, Bif-1 und Ambra oder mit Inhibitoren wie Bcl-2 und RUBICON kann die Synthese von PI3P reguliert werden. **D:** Reifung der Phagophore. In das Wachstum des Autophagosoms sind zwei Konjugationssysteme involviert, ATG12 und ATG8. Der gebildete ATG5/ATG12/ATG16-Komplex beeinflusst dabei die Übertragung von ATG8 auf PE. **E:** Rekrutierung von Frachtproteinen. Adaptorproteine, wie p62, Optineurin und NBR1 können ubiquitinierte Frachtgüter einfangen und werden durch die Bindung an ATG8-PE zum wachsenden Autophagosom rekrutiert.

1.3 Sekretion

Alle Proteine werden an Ribosomen im Zytosol synthetisiert. Die einzige Ausnahme bilden einige Proteine der Mitochondrien und der Plastide. Diese Proteine verbleiben in löslicher Form im Zytosol, oder aber werden co- oder posttranslational mit einer Signalsequenz ausgestattet und durch konventionelle Sekretionsmechanismen direkt an ihren Zielort transportiert (Blobel and Dobberstein 1975, Blobel and Dobberstein 1975).

1.3.1 Konventionelle Sekretionsmechanismen

Proteine, die eine N-terminale Signalsequenz besitzen, werden an die dem Zytoplasma zugewandten Seite der ER-Membran rekrutiert (Details siehe unten) und direkt während ihrer Proteinsynthese ins Lumen des ERs geschleust (Nickel W 2009). Dazu gehören nicht nur ER-residente Proteine, sondern auch lösliche und membrangebundene sekretorische Proteine. Die eigentlichen Zielorte dieser Proteine können Golgi-Apparat, Lysosomen, Exosomen oder auch die Plasmamembran (PM) sein. Während der einzelnen Sekretionsschritte werden neusynthetisierte Proteine so posttranslational modifiziert, dass der Transport zu den einzelnen membranumhüllten Kompartimenten oder zur PM gewährleistet ist. Grob lässt sich die Sekretion in vier Abschnitte einteilen: ER-Import und Qualitätskontrolle, Transport vom ER zum Golgi, intra-Golgi Transport und Rückführung vom Golgi zum ER, sowie post-Golgi-Transport zur PM. Der jeweilige Zielort eines Proteins wird durch eine bestimmte Aminosäuresequenz, der Signalsequenz, festgelegt. Diese besteht im Allgemeinen aus 15-60 Aminosäuren, wobei die Hydrophobizität eine größere Rolle als die Zusammensetzung der Aminosäuren spielt.

Im Detail erkennt das zwischen der ER-Membran und dem Zytosol zyklisierende *signal-recognition peptid* (SRP) die Signalsequenz der Proteine (Wild, Halic et al.

2004, Wild, Rosendal et al. 2004). Gleichzeitig bindet SRP an das translatierende Ribosom, wodurch die Synthese des Proteins unterbrochen wird (Walter and Blobel 1981, Walter P 1981, Walter P 1982). Der so gebildete Ribosomen-SRR-Komplex bindet über den SRP-Rezeptor an die ER-Membran. SRP und SRP-Rezeptor lösen sich ab und das Protein wird mit Hilfe eines Translokators ins ER-Lumen eingeschleust bzw. im Falle eines Transmembranproteins in die ER-Membran eingebaut (Rothblatt, Deshaies et al. 1989, Deshaies, Sanders et al. 1991). Zeitgleich werden an die Amidgruppen N-terminaler Asparagin-Reste dieser Proteine Oligosaccharide konjugiert (Kornfeld and Kornfeld 1985). Die N-Glykosylierung gewährleistet die korrekte Faltung der Proteine. Unvollständig gefaltete Proteine werden von Chaperonen am Zustand der Glykosylierung erkannt und solange im ER festgehalten, bis eine korrekte Faltung erreicht ist. Fehlerhaft gefaltete Proteine können vom USP (*unfolded protein response*)- oder ERAD (*ER-associated degradation*)-System des ER erkannt und zurück ins Zytosol geführt werden (Friedlander, Jarosch et al. 2000, Travers, Patil et al. 2000). Hier werden die fehlgefalteten Proteine nach der Deglykosylierung (Plemper and Wolf 1999, Plemper and Wolf 1999) und Ubiquitinierung (Hershko, Ciechanover et al. 1980) durch spezifische Proteasen abgebaut (Haass, Pesold-Hurt et al. 1989).

Nachdem die Proteine korrekt gefaltet und modifiziert sind, werden sie mit Hilfe kleiner Transportvesikel weitergeleitet. Die membranumhüllten Vesikel sind von einer zusätzlichen Proteinhülle (*coat protein complex*, COP) umgeben und schnüren sich nach der Ankonzentrierung der Frachtmoleküle (*cargo*) von einer Donor-Membran ab. Erreichen die Transportvesikel ihre Zielmembran fusionieren sie mit dieser. Auf diese Weise können Proteine zwischen den einzelnen Kompartimenten ausgetauscht werden, ohne dass Membranen über Translokatoren passiert werden müssen. Der anterograde Transport der Fracht-Moleküle vom ER zum Golgi-Apparat erfolgt über COPII-Vesikel (Barlowe, Orci et al. 1994). Die Ausbildung dieser Vesikel erfolgt an speziellen Abschnitten der ER-Membran (*exit sites*) und wird durch die Bildung eines charakteristischen Protein-Hüll-Komplexes initiiert, der die Vesikel-Membran umgibt. Bei COPII-Vesikeln setzt sich dieser aus der kleinen GTPase SAR1 (Barlowe, d'Enfert et al. 1993), dem heterodimeren Komplex Sec23/34 und den heterotetrameren Sec13/31 Komplex zusammen (Hicke, Yoshihisa et al. 1992, Pryer, Salama et al. 1993, Salama, Chuang et al. 1997). Die Aufnahme der Frachtmoleküle während der Vesikel-Biogenese kann entweder über direkte Interaktion der Proteine mit den Untereinheiten

der COPII-Vesikel oder indirekt über bestimmte Frachtrezeptoren erfolgen. Dabei erkennen bestimmte COPII-Untereinheiten spezifische ER-Export-Signale am zytoplasmatischen Teil transmembraner Frachtmoleküle. Der detaillierte Ablauf des ER-Austritts löslicher sekretorischer Proteine ist noch nicht eindeutig aufgeklärt. Zur Zeit werden zwei mögliche Modelle diskutiert: Das *bulk-flow*- und das *receptor-mediated*-Modell (Barlowe 2003). Nach der Abschnürung der COPII-Vesikel und der Entfernung der Proteinhülle erfolgt die Weitergabe der Frachtmoleküle an das ER-Golgi intermediäre Kompartiment (*ER-intermediate compartment*, ERGIC) durch Fusion der Membranen. Bekannte Markerproteine für das ERGIC sind das Lektin ERGIC53 (Hauri, Kappeler et al. 2000) und die GTPase Rab2 (Chavrier, Parton et al. 1990, Tisdale and Balch 1996). Das ERGIC bildet eine Schnittstelle zwischen vorwärts (anterograden) und rückwärts (retrograden) gerichteten Proteintransport (Martinez-Menarguez, Geuze et al. 1999). Im ERGIC lassen sich auch COPI-Vesikel nachweisen, die den retrograden Transport von Proteinen zurück zum ER, den anterograden Transport vom ERGIC zum Golgi-Apparat und den bidirektionalen Proteintransport innerhalb des Golgi-Apparates vermitteln. Der Golgi-Apparat besteht aus vier bis sechs Membransäcken, den sogenannten Zisternen, und wird in die Abschnitte cis-, medial- und trans-Golgi unterteilt. Sekretorische Proteine werden von der cis zur trans Seite transportiert und dabei in einer hierarchischen Abfolge durch unterschiedliche Enzyme modifiziert (O-Glykosylierung etc.). Die korrekt modifizierten sekretorischen Proteine werden schließlich im trans-Golgi in Clathrin-haltige Vesikel aufgenommen und zum Zielort transportiert.

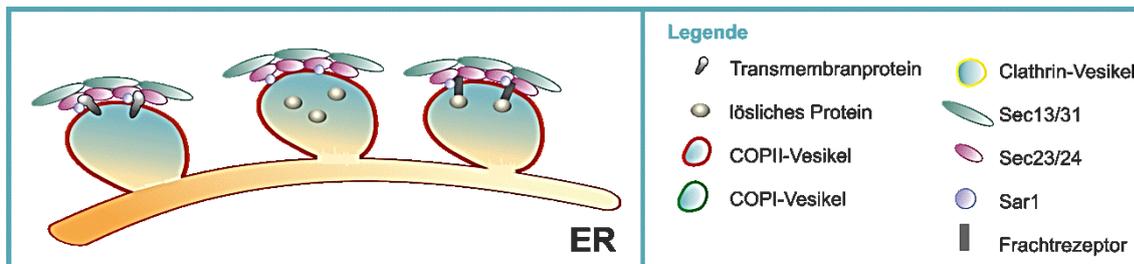
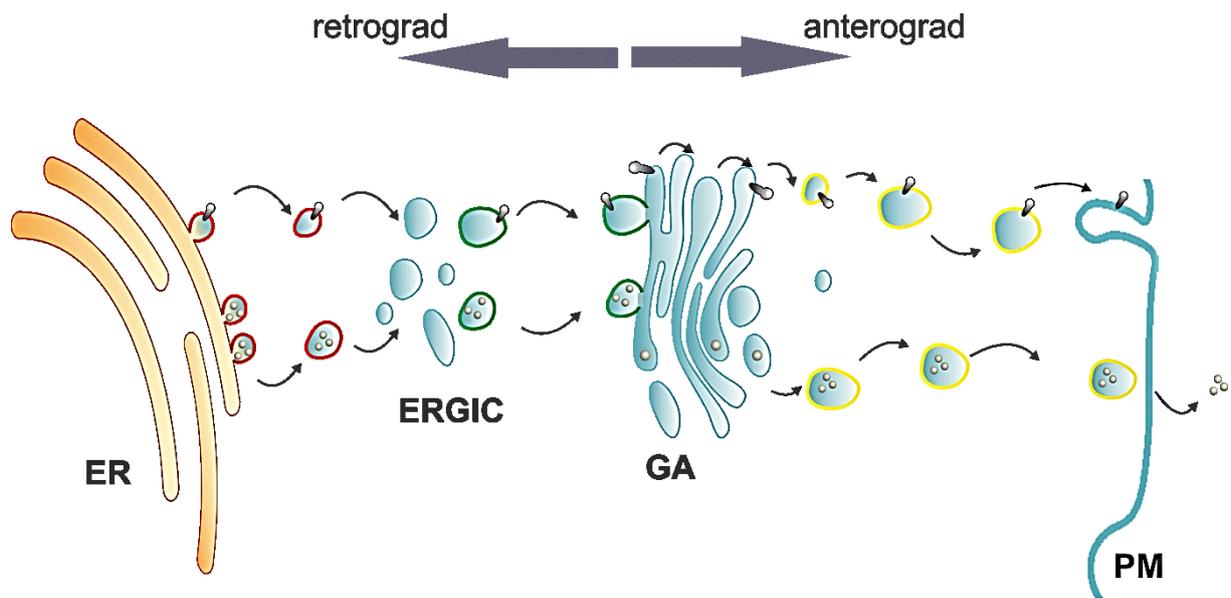


Abbildung 4 Schema zur konventionellen Sekretion von löslichen sekretorischen Proteinen sowie Transmembranproteinen

Oben: Sekretorische Proteine werden am ER synthetisiert und über das ER-Golgi intermediäre Kompartiment und den Golgi Aparat (GA) an ihren Bestimmungsort transportiert. Der Transport erfolgt in proteinumhüllten Vesikeln. COPII-Vesikeln vermitteln den Transport zwischen ER und ERGIC. COPI-Vesikel transportieren das Frachtgut vom ERGIC zum Golgi. Clathrin-Vesikel sind am Transport vom trans-Golgi-Netzwerk zur Plasmamembran beteiligt. **Unten links:** Die Aufnahme der Frachtmoleküle während der Vesikel-Biogenese in die Vesikel kann entweder über direkte Interaktion (links) der Proteine mit den Untereinheiten der COPII Vesikel, indirekt über bestimmte Frachtrezeptoren erfolgen (rechts) oder über das sogenannte *Bulk-flow-Model* (mitte).

1.3.2 Unkonventionelle Sekretionsmechanismen

Sekretierende Proteine, denen die klassische Signalsequenz fehlt und deren Sekretion unabhängig von Golgi-Apparat und ER erfolgt, nutzen Mechanismen der sogenannten unkonventionellen Sekretion (Nickel 2005). Mittlerweile ist bekannt, dass die Sekretion dieser Proteine durch Stress induziert wird, der während der Entwicklung oder durch veränderte Umgebungsbedingungen hervorgerufen wird (Nickel W., 2009). Solche unkonventionell sezernierten Proteine übernehmen eine wichtige Rolle bei der Regulation der Immunantwort, des Zellwachstums, der Zelldifferenzierung und der Angiogenese.

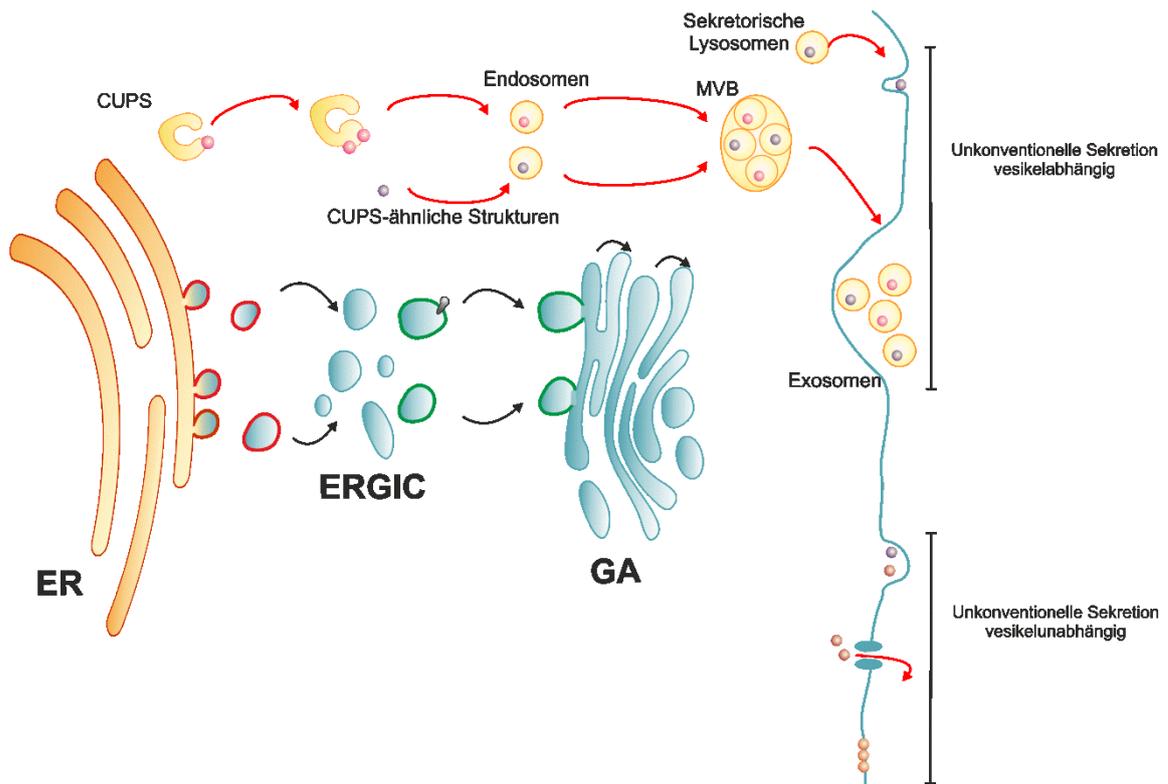
Im Allgemeinen lässt sich der Transport dieser sekretorischen Proteine in vesikelunabhängige und vesikelabhängige Mechanismen einteilen. Der einfachste Mechanismus ist die direkte Translokation der sezernierten Proteine über die Membran. Ein Beispiel hierfür ist der Fibroblasten Wachstumsfaktor 2 (*fibroblast growth factor*, FGF2), der bereits vollständig gefaltet mit Ansammlungen saurer Membranlipide der Plasmamembran interagiert. Durch die Phosphorylierung eines Tyrosins kommt es zur Oligomerisierung von FGF2 und zur Insertion des Komplexes in die Plasmamembran. Schließlich erfolgt die Freisetzung von FGF2 in den extrazellulären Raum (Temmerman, Ebert et al. 2008, Nickel W., 2011).

Ein Beispiel für einen transporterabhängigen, aber vesikelunabhängigen Sekretionsprozess ist die Translokation von lipidierten Proteinen und Peptiden über ABC-Transporter (*ATP binding cassette*) (Nickel 2005). Unter anderem werden farnesylierte Paarungspheromone, der α -Faktor von *Saccharomyces cerevisiae* und der m-Faktor von *Schizosaccharomyces pombe* unter ATP-Verbrauch über ABC-Transporter transportiert (Michaelis 1993, Christensen, Davey et al. 1997, Christensen, Davis et al. 1997). Für die Sekretion auf diesem Weg sind zum einen die Prozessierung des N-terminalen Propeptids als auch die Prozessierung des CaaX-Motivs am C-Terminus notwendig (Kjaerulff, Muller et al. 2005). Ein weiterer Hinweis, dass in vielen Eukaryoten Lipoproteine durch spezifische ABC-Transporter externalisiert werden, liefert die Tatsache, dass auch Proteine wie HASPB (hydrophobic acetylated surface protein B) aus *Leishmania* oder die Proteinkinase 1 (PfCDPK1) aus *Plasmodium falciparum* acetyliert sekretiert werden können (Rabouille, Malhotra et al. 2012). Zusätzlich konnte für das HASPB-Protein gezeigt werden, dass es ebenfalls über *membrane blebbing* sezerniert werden kann (Tournaviti, Hannemann

et al. 2007). Dabei werden mit der Plasmamembran assoziierte Proteine durch das Abschnüren von Mikrovesikeln in den extrazellulären Raum abgegeben (Hughes 1999). In Folge des infektiösen Stadiums des parasitären Lebenszyklus wird HASPB an freien Ribosomen synthetisiert, am N-terminus myristoyliert und palmitoyliert, wodurch die Verankerung an die Membran vermittelt wird (Tournaviti, Hannemann et al. 2007). Denny et al. zeigten, dass eine Mutation der Myristylierungsstelle eine zytoplasmatische Verteilung zur Folge hatte, während eine Mutation in der Palmitoylierungsstelle in einer Lokalisation am Golgi-Apparat führte (Denny, Gokool et al. 2000). Demnach könnte HASPB nach der Verankerung an der äußeren Golgi-Membran über sekretorische Vesikel an die Plasmamembran gelangen und über Transporter transloziert werden (Tournaviti, Hannemann et al. 2007, Nickel W 2009). Für die vesikelabhängige Sekretion werden verschiedene Mechanismen postuliert, bei denen sekretorische Lysosomen, Mikrovesikel und aus Endosomen gereifte MVB's eine Rolle spielen (Rabouille, Malhotra et al. 2012). Allerdings sind die Kenntnisse über die einzelnen Prozesse noch nicht ausreichend genug, um eine genaue Abgrenzung voneinander zu ermöglichen. Für das Zytokin Interleukin-1 β wird daher angenommen, dass es über alle drei Mechanismen aus der Zelle transportiert werden kann. In Folge von Stress, Toxinen oder Pathogenen kommt es in Makrophagen zur Ausbildung von Inflammosomen. Diese aktivieren die Cysteinprotease Caspase 1, welche das IL-1 β Vorläuferprotein proteolytisch in seine aktivierte Form spaltet. Beide Proteine können zum einen direkt über Mikrovesikel über die Zellmembran gelangen oder über einen noch unbekanntem Mechanismus in sekretorische Lysosomen translozieren. Nach der Fusion der Lysosomen mit der Plasmamembran, wird das aktive IL-1 β freigegeben. Zum anderen kann der Caspase-1-IL-1 β -Komplex auch von internalisierten Vesikeln in Endosomen eingefangen und über die Fusion von MVB's mit der Plasmamembran in Exosomen sezerniert werden (Nickel W 2009).

Der letzte Sekretionsweg wurde bei Studien der beiden ACBP (*Acyl coenzyme A (CoA)-binding protein*) orthologen Proteine der Amöbe *Dictyostelium discoideum* (AcbA) und der Hefe *S.cerevisiae* und *Pichia pastoris* (Acb1) entdeckt. Bei diesem unkonventionellen Sekretionsweg wurden nicht nur Faktoren der MVB-Biogenese benötigt, sondern auch Atg-Proteine, die eine wichtige Rolle bei der Autophagie spielen. Durch Nährstoffmangel kommt es zunächst zur Ausbildung sogenannter CUPS (*compartments of unconventional protein secretion*) in räumlicher Nähe zum ER. Gleichzeitig wird durch den Nährstoffmangel die posttranslationale Modifikation

von Acb1 induziert, wodurch die Verankerung an der zytoplasmatischen Seite der CUPS-Membran ermöglicht wird. An den CUPS schnüren sich Vesikel mit einer Lipiddoppelschicht ab, die mit spezifischen Endosomen fusionieren können. Dabei werden die Acb1-Moleküle durch Internalisierung in luminaire Vesikel eingeschlossen. Die Sekretion von Acb1 erfolgt in Exosomen, die durch die Fusion von MVBs und Plasmamembran freigesetzt werden (Malhotra 2013).



Legende					
● FGF2	● IL-1 β	● HASPB	● Acb1	● COPI-Vesikel	● COP-II-Vesikel

Abbildung 5 Schematischer Überblick bekannter unkonventioneller Sekretionsmechanismen

Proteine, die keine N-terminale Signalsequenz besitzen, werden mittels unkonventioneller Sekretion aus der Zelle geschleust. Dabei wird zwischen vesikelunabhängiger (FGF2, HASPB) und vesikelabhängiger Sekretion (Acb1) unterschieden. Im Gegensatz zur konventionellen Sekretion erfolgt der Transport der Proteine unabhängig vom Trans-Golgi-Netzwerk.

1.4 Exosomen

Exosomen konnten 1987 zum ersten Mal von (Johnstone, Adam et al. 1987) aus dem Überstand kultivierter Retikulozyten durch Ultrazentrifugation bei 100.000 x g isoliert werden. Exosomen sind typischerweise 40 bis 100 nm groß und besitzen eine Dichte von 1,13 g/ml bis 1,19 g/ml im Saccharosegradienten. Sie besitzen eine Lipiddoppelschicht, die in ihrer Topologie der Ursprungszelle entspricht und im Inneren Zytoplasma sowie zytoplasmatische Proteine enthält (Raposo, Tenza et al. 1997, Thery, Zitvogel et al. 2002).

In Folge der clathrinvermittelten Endozytose werden endozytotische Vesikel an der Plasmamembran gebildet. Sie werden zum endosomalen System transportiert und verschmelzen mit frühen vom Trans-Golgi-Netzwerk abstammenden Endosomen. Während der Reifung zu späten Endosomen findet eine Einwärtsstülpung der limitierenden Membran an den Endosomen statt und intraluminale Vesikel akkumulieren im Inneren der Endosomen. Da sie in ultrastrukturellen mikroskopischen Aufnahmen wie Kugeln aussehen, die mit Bläschen gefüllt sind, bezeichnet man diese Vesikel auch als multivesikuläre Körper (*multivesicular bodies*, MVBs). Gleichzeitig werden die Proteine aufgrund ihrer Modifikationen durch eine aus mehreren Proteinkomplexen bestehende ESCRT-Maschinerie (*endosomal sorting complex required for transport*) (Katzmann, Babst et al. 2001, Babst, Katzmann et al. 2002, Babst, Katzmann et al. 2002) sortiert. Eine Möglichkeit der Sortierung ist die Polyubiquitinierung, die als Signal für die Degradation über das Proteasom dient (Glickman and Ciechanover 2002). Liegen Proteine dagegen monoubiquitiniert vor, werden sie durch das Ubiquitin-bindende Protein HRS (*hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate*) erkannt. HRS bildet dann wiederum an STAM (*signal transducing adapter molecule*), Clathrin sowie über seine FYVE-Domäne an endosomenspezifisches PI3P (Misra and Hurley 1999, Raiborg, Bache et al. 2001, Bache, Raiborg et al. 2003). Dieser auch als ESCRT0 bezeichnete Komplex rekrutiert den sogenannten ESCRTI-Komplex aus dem Zytoplasma, der wiederum den ESCRTII-Komplex aktiviert, was letzten Endes zu einer Rekrutierung des ESCRTIII-Komplexes führt. Im Anschluss erfolgt die Abspaltung von Ubiquitin durch Doa4 und die Proteine werden in die entsprechenden Vesikel verpackt (Babst, Sato et al. 1997, Amerik, Nowak et al. 2000). Die MVBs können mit Lysosomen fusionieren und dienen somit der Degradation von Proteinen. Ebenso dienen sie als Speicherort für

Membranproteine, die bei Bedarf wieder zur Plasmamembran transportiert werden. Durch Fusion der MVBs mit der Plasmamembran können zudem die intraluminalen Vesikel als Exosomen freigesetzt werden.

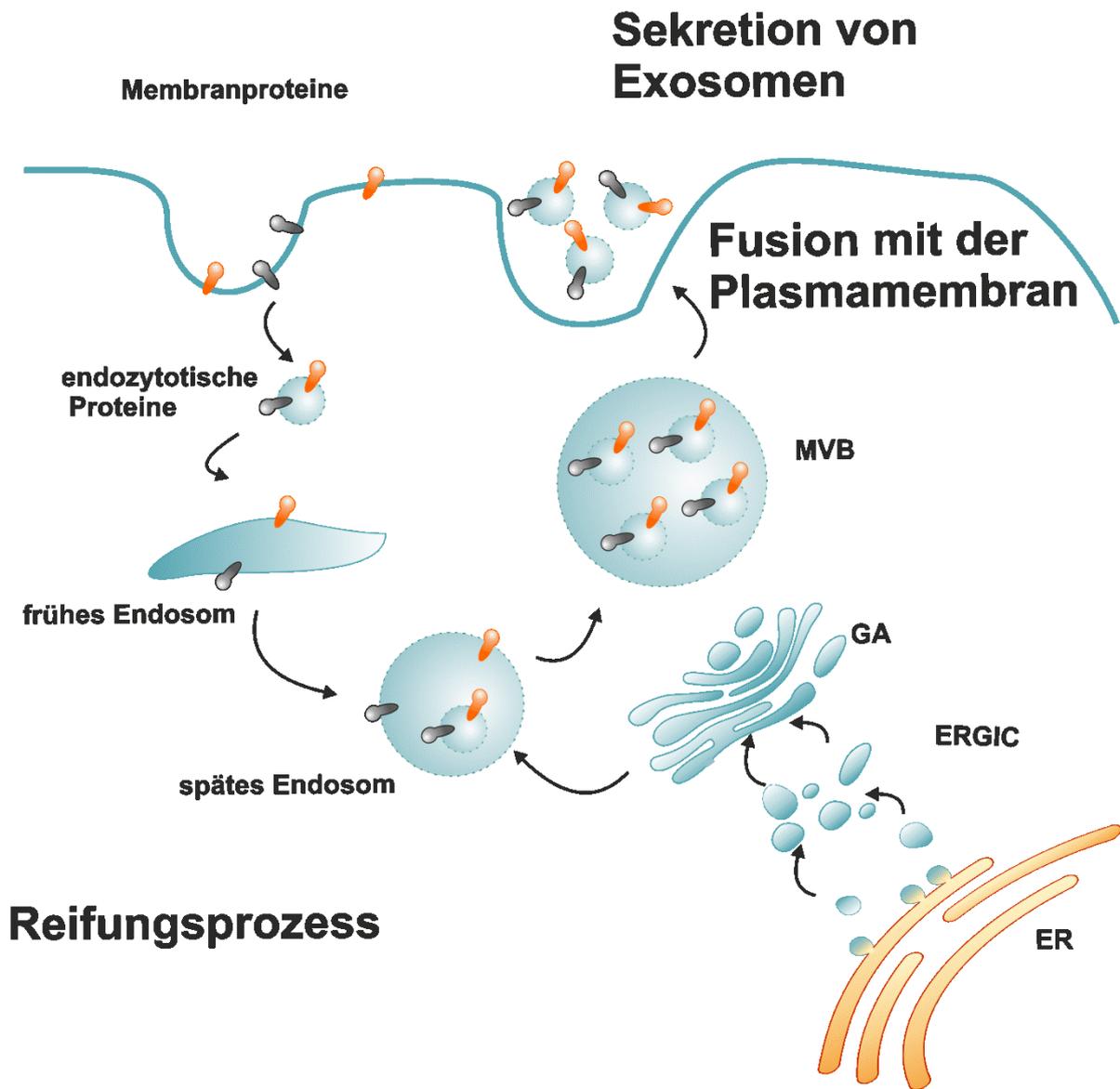


Abbildung 6 Biogenese von Exosomen

Membranproteine werden über clathrinvermittelte Endozytose in endozytotische Vesikel aufgenommen und zum endosomalen System transportiert, wo sie mit den frühen Endosomen verschmelzen. Dort findet ein Reifungsprozess zu späten Endosomen statt. Hier können auch neu synthetisierte Proteine aus dem Trans-Golgi-Netzwerk in die späten Endosomen aufgenommen werden. Durch Einschnürung der endosomalen Membran bilden sich intraluminalen Vesikel. Die so entstandenen MVBs können im Anschluss mit der Plasmamembran fusionieren und die intraluminalen Vesikel in Form von Exosomen in den extrazellulären Bereich freisetzen (ERGIC:ER-Golgi intermediäre Kompartiment, GA: Golgi Apparat, ER: Endoplasmatisches Retikulum, MVB: Multivesikuläres Körperchen).

Die molekulare Zusammensetzung der Exosomen ist vom jeweiligen Zelltyp abhängig. Da allerdings Exosomen aus Endosomen generiert werden, ist der Großteil der Proteine zytoplasmatischen Ursprungs, entstammt den endozytotischen Kompartimenten oder der Plasmamembran. Trotz der vielen zelltypischen Bestandteile finden sich allerdings auch Komponenten, die auf allen sezernierten Exosomen zu finden sind und als Marker für Exosomen dienen können. Dazu gehören an der Membranfusion beteiligte Proteine wie Rab-Proteine, Annexine und Flotillin, sowie Proteine die für die Formation von MVBs essentiell sind, wie Tsg101 und Alix (Thery, Boussac et al. 2001). Außerdem wurden MHC-Klasse-I (MHC-I)-Moleküle und Hitzeschockproteine wie Hsp70 und Hsp90 in vielen von Zellen sezernierten Exosomen gefunden (Blanchard, Lankar et al. 2002). Auch Tetraspanine wie CD9, CD63, CD81 und CD82 konnten als Marker identifiziert werden (Escola, Kleijmeer et al. 1998), Adhäsionsproteine wie z.B. ICAM-1 (Segura, Nicco et al. 2005), aber auch Integrine konnten in Exosomen nachgewiesen werden (Rieu, Geminard et al. 2000). Zusätzlich finden sich aber auch Proteine des Zytoskeletts wie Tubulin, Cofilin, Aktin oder Talin in den Exosomen (Thery, Boussac et al. 2001).

1.5 HIV

1981 wurde zum ersten Mal über eine Krankheit in New York und Los Angeles berichtet, bei der die Betroffenen an vielen opportunistischen Infektionen litten und Symptome eines defekten Immunsystems aufwiesen. Diese Krankheit wurde als AIDS *Acquired Immunodeficiency Syndrome* bezeichnet (Gottlieb, Schroff et al. 1981). 1983 gelang es das immunschwächende Virus aus den Blutproben diverser AIDS-Patienten zu isolieren (Barre-Sinoussi, Chermann et al. 2004). Erst drei Jahre später wurde das Virus der Familie der Lentiviren zugeordnet und als Humanes Immundefizienzvirus Typ1 bezeichnet (Coffin, Haase et al. 1986). Zeitgleich wurde aus Blutlymphozyten afrikanischer Patienten HIV-2 isoliert (Clavel, Guyader et al. 1986).

Der HIV-Infektionszyklus durchläuft eine akute und eine chronische Infektionsphase. Zu Beginn der Infektion penetriert das Virus durch die Schleimhäute. Dort werden die Virionen von dendritischen Zellen (DCs) aufgenommen und zu den Lymphknoten transportiert (Lai, Hida et al. 2009, Haase 2010). Dort angekommen wird die Infektion auf CD4⁺ Zellen und Antigenpräsentierende Zellen (APCs, engl. *antigen presenting*

cell) (Wu and Kewal Ramani 2006, Yu, Reuter et al. 2008) durch die Ausbildung einer virologischen Synapse oder Polysynapsen weitergegeben (Piguet, Wan et al. 2000, Sherer, Lehmann et al. 2007, Rudnicka, Feldmann et al. 2009). In dieser ersten Phase der Infektion gelingt es den HI-Viren eine hohe Anzahl zelleigener anti-retroviraler Abwehrmechanismen zu umgehen. Dazu gehören Strategien gegen die wirtseigenen Polynukleotid-Cytidin-Deaminase-RNA-editierenden APOBEC3-Proteine, indem Vif (*viral infectivity factor*) die Assemblierung der elongin-cullin Rbx Ubiquitin-Ligase induziert und dadurch die Degradation von ABOBEC3 bewirkt (Malim 2009). Als weitere virale Strategie umgeht es den humanen retroviralen Resistenzfaktor TRIM5 α (*tripartite motif-containing protein 5*), welcher den *Uncoating*-Prozess des Virus stört und somit eine reverse Transkription des viralen genetischen Materials unterbunden wird (Stremlau, Owens et al. 2004). Außerdem wirkt das virale Vpu (*Viral Protein Unique*)-Protein dem durch Tetherin-vermittelten „Festhalten“ fertiger Virionen an der Plasmamembran entgegen (Neil, Zang et al. 2008).

Die Infektion von aktivierten CD4⁺-T-Zellen führt letzten Endes zu einem starken Verlust HIV-1 infizierter Zellen (Brenchley, Schacker et al. 2004). Obwohl die Infektion durch CD8⁺-Zellen und natürliche Killerzellen kontrolliert wird, entkommt das Virus den Zellen des Immunsystems, indem es die Expression von MHC-I auf der Oberfläche herabreguliert. Zusätzlich können durch das Einbringen zusätzlicher Mutationen in die viralen Proteine, diese nicht mehr von von CD8⁺-Zellen erkannt werden (Alter and Altfeld 2009). Bleibt in diesem Stadium die Infektion unbehandelt, sinkt die Anzahl der CD4⁺-T-Zellen durch die Apoptose infizierter Zellen, die Eliminierung infizierter Zellen durch zytotoxische CD8⁺-Zellen und durch das „*Bystander Killing*“ von uninfizierten Nachbarzellen kontinuierlich ab (Muthumani, Choo et al. 2005, Nishimura, Brown et al. 2005, Perfettini, Castedo et al. 2005, Varbanov, Espert et al. 2006). Ca. 10 Jahre nach der Erstinfektion kommt es zu einem schweren Immundefekt. Zu diesem Zeitpunkt lassen sich weniger als 200 CD4⁺-Zellen pro Mikroliter Blut nachweisen. Aufgrund der frühen Beeinträchtigung der Barrierefunktion der mukosalen Immunität kommt es zu einer systemischen Immunaktivierung in dieser chronischen Phase der HIV-1 Infektion. Durch die gestörte antimikrobielle Funktion werden vermehrte Mengen an mikrobiellen Produkten, wie LPS (*Lipopolysaccharid*), aus dem Darmlumen transloziert, was schließlich zu einer chronischen Immunaktivierung führt (Brenchley, Price et al. 2006).

1.6 Erste Hinweise auf eine mögliche Interaktion zwischen HIV-1 Nef und ATG8s

In den letzten Jahren wurde eine Reihe von Studien veröffentlicht, die zeigen, dass Autophagie und Sekretion eine essentielle Rolle bei der HIV-Pathogenese übernehmen. Besonders auffällig ist in diesem Zusammenhang die ambivalente Rolle der Autophagie. So wurde Autophagie nicht nur als zellautonomer Abwehrmechanismus gegen HIV beschrieben (Espert, Varbanov et al. 2009, Kyei, Dinkins et al. 2009), sondern auch als Stoffwechselweg, der während der HIV-1 Biogenese die Assemblierung neuer Virionen erhöht (Brass, Dykxhoorn et al. 2008, Espert, Varbanov et al. 2009, Kyei, Dinkins et al. 2009) und die Sekretion verstärkt. Autophagie ist ebenfalls in den Zelltod uninfizierter Nachbar-T-Zellen involviert (Espert, Denizot et al. 2006, Varbanov, Espert et al. 2006, Molina, Grimaldi et al. 2007, Denizot, Varbanov et al. 2008) und kann der HIV-assoziierte Demenz entgegenwirken (Alirezai, Kiosses et al. 2008, Alirezai, Kiosses et al. 2008, Gougeon and Piacentini 2009). Die wichtigste Erkenntnis bisheriger Studien ist, dass die Autophagiemaschinerie prinzipiell in der Lage ist HI-Viren zu eliminieren, würde sie nicht an einen entscheidenden Punkt durch das virale Nef (*negative factor*)-Protein inhibiert werden (Kyei, Dinkins et al. 2009).

Passend dazu konnte in unserer Arbeitsgruppe bei der Durchführung eines *split-ubiquitin based membrane-associated yeast two-hybrid screens* mit membrangebundenen HIV-1 Nef als Köder GATE-16 als putativer Bindungspartner identifiziert werden (Mötter 2010, Kammula, Mötter et al. 2012). Aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeit zwischen den einzelnen Mitgliedern der GABARAPs (GABARAP & GABARAPL1: 87 % identische Aminosäuren, 97 % ähnliche Aminosäuren; GABARAP & GABARAPL2: 57 % identische Aminosäuren, 97 % ähnliche Aminosäuren) kann angenommen werden, dass alle drei Mitglieder der GABARAPs eine einheitliche Bindestelle für HIV-1 Nef besitzen. Durch ^1H - ^{15}N -(*heteronuclear single quantum coherence*) HSQC-Experimente konnte die Bindungsstelle von Nef auf GABARAP kartiert werden. Dabei konnte eine Beteiligung der Aminosäure Y31 und L50 sowie die Reste Y49, Y51, F60 und L63, die Teil der beiden kanonischen hydrophoben Taschen HP1 und HP2 sind, festgestellt werden. Ebenfalls von der Nef-Bindung beeinflusste Aminosäuren waren Y25, V29, D45, K46, S53 und F62, die in

direkter Nähe zu den hydrophoben Taschen liegen. Generell bindet Nef bevorzugt an die Hydrophobe Tasche 2 (Gorgels 2011).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Interaktion zwischen HIV-1 Nef (nachfolgend als „Nef“ bezeichnet) und den GABARAPs detaillierter/ noch intensiver untersucht werden. Dazu sollten im ersten Teil der Arbeit die an der Bindung von Nef an GABARAP beteiligten Schlüsselpositionen charakterisiert werden. Gleichzeitig sollte die GABARAP-Bindestelle von Nef bestimmt werden. Interessant wäre auch zusätzlich, ob die Bindung in diesem Fall auch über einen Tryptophanrest erfolgt, wie es bereits von anderen GABARAP-Liganden bekannt ist.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte die biologische Relevanz der Bindung mit Hilfe von Koimmunopräzipitationen, Pull-Downs und Fluoreszenzmikroskopie untersucht werden. GABARAPs sind nicht nur an Transportvorgängen beteiligt, sondern übernehmen auch eine wichtige Rolle bei der Autophagie. Da Autophagie und Sekretion, wie oben beschrieben, eine besondere Bedeutung bei der HIV-Pathogenese haben, könnte die hier beschriebene Interaktion weitere Hinweise liefern, wie das HI-Virus die beiden Mechanismen für seine eigenen Zwecke beeinflusst.

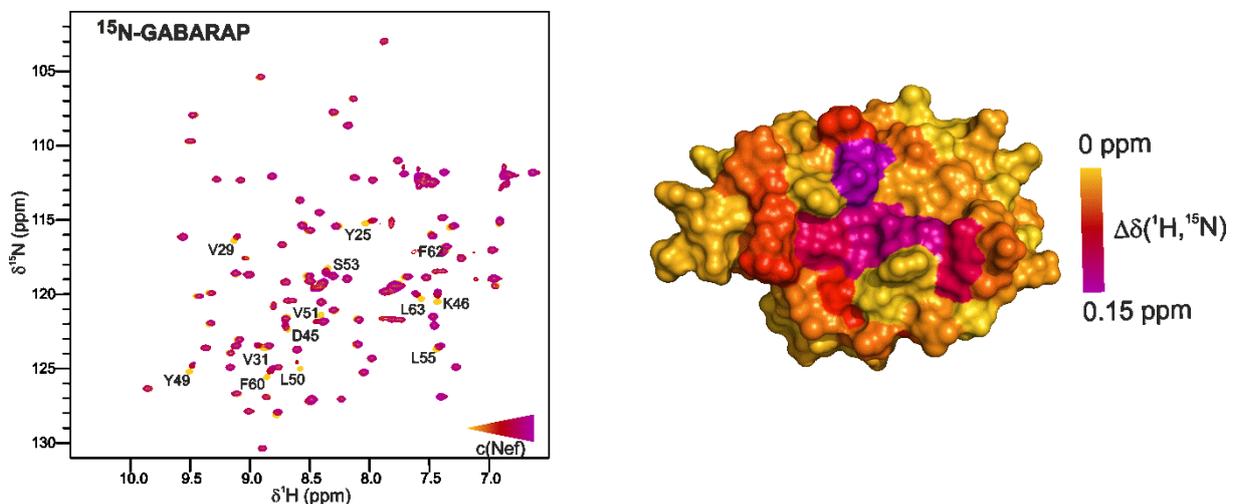


Abbildung 7 Interaktion zwischen Nef und GABARAP

Oben: ¹H-¹⁵N-HSQC-Spektren von GABARAP für zunehmende Nef-Konzentrationen. Es wurden 200 μM GABARAP (gelb) vorgelegt und Nef in folgenden Konzentrationen zugegeben: 40 μM (orange), 80 μM (rot) und 120 μM (pink). Die Zuordnung der Amidresonanzen des Protein-Rückgrats erfolgte nach Stangler et al. und ist im Einbuchstaben-Aminosäure-Code dargestellt.

Unten: Lokalisierung der Nef-Bindestelle. Oberflächendarstellung von GABARAP (PDB Code 1kot). Aminosäurereste, die bei Zugabe von Nef beeinflusst werden, sind je nach chemischer Verschiebung in orange-lila-Tönen angefärbt.

2 Material

2.1 Bakterienstämme

Bakterienstämme, die zur Klonierung und Amplifikation oder zur Expression von Proteinen verwendet wurden, sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1 Genotypen und Referenzen der verwendeten Bakterienstämme

Bakterienstamm	Genotyp	Bezugsquelle
<i>E. coli</i> BL21 DE3	F ⁻ ompT hsdS _B (r _B m _B ⁻) gal dcm (DE3)	Novagen, Darmstadt, Deutschland
<i>E. coli</i> OmniMAX™ 2 T1R	F' {proAB+ lacIq lacZΔM15 Tn10(TetR)Δ(ccdAB)} mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)Φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 endA1 recA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 tonA panD	Invitrogen, Carlsbad, USA
<i>E. coli</i> XLGOLD	Tetr ^r (mcrA)183 (mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac te[F'proABlacIqZ M15 Tn10 (Tetr)Amy Camr]	Agilent Technologies Inc, Santa Clara, USA
<i>E. coli</i> Stellar	F ⁻ , ara,Δ(lac-proAB) [Φ80d lacZΔM15], rpsL(str), thi, Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC), ΔmcrA, dam, dcm	Takara Bio Europe/Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich
<i>E. coli</i> BL21-CodonPlus(DE3)-RIL	F ⁻ ompT hsdSB(r _B -m _B ⁻) dcm TetR gal λ(DE3) endA Hte argU ileY leuW CamR]	Agilent Technologies Inc, Santa Clara, USA

2.2 Humane Zelllinien

In dieser Arbeit wurde die humane **embryonale Nierenzelllinie HEK293** (Human Embryonic kidney) verwendet. HEK293 ist seit dem Ende der 70er-Jahre eine bestehende humane Zelllinie, die als Transformationsprodukt einer menschlichen embryonalen Nierenzelle mit DNA-Segmenten des menschlichen Adenovirus 5 transfiziert wurde. Sie zeichnen sich durch ein adhärent fibroblastisches Wachsen als Monolayer aus. Unter geeigneten Bedingungen (90 % DMEM und 10 % FCS) kann eine Wachstumsverdopplung innerhalb von 20 bis 24 h erreicht werden. Die Zellen wurden von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) bezogen.

2.3 Medien

2.3.1 Bakterienmedien

Tabelle 2 Liste der verwendeten Nährmedien

Nährmedium	Zusammensetzung
LB-Medium	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl
LB-Agarplatten	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, 20 g/l Agar
SOC-Medium	20 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 0,5 g/l NaCl, 0,0019 g/l KCl, 20 g/l Glukose, 10 mM MgCl ₂
M9-Minimalmedium	0,2 % (v/v) TS2-Spurenelemente, 1 % (v/v) Thiaminhydrochlorid, 1 % (v/v) Vitamincocktail, 4 g Glukose, 9,1 g NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O, 3 g KH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O, 0,5 g NaCl, 0,5 g NH ₄ Cl, 100 µM CaCl ₂ , 2 mM MgSO ₄
Vitamincocktail (für M9 Medium)	1 g/l Biotin, 1 g/l Folsäure, 1 g/l Cholinchlorid, 1 g/l Nicotinamid, 1 g/l Natrium-D-pathothenat, 1 g/l Pyridoxalhydrochlorid, 0,1 g/l Riboflavin
TS-2 Spurenelemente (für M9 Medium)	30 mg/l MnCl ₂ x 4 H ₂ O, 58,8 mg/l ZnSO ₄ x H ₂ O, 300 mg/l H ₃ BO ₃ , 200 mg/l CoCl ₂ x 6 H ₂ O, 20 mg/l NiCl ₂ x 6 H ₂ O, 10 mg/l CuCl ₂ x 2 H ₂ O, 900 mg/l Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O, 20 mg/l NaSeO ₃

2.3.2 Zellkulturmedium

Tabelle 3 Liste der verwendeten Zellkulturmedien

Nährmedium	Zusammensetzung
DMEM	Fe(NO ₃) 0,1 mg/l, CaCl ₂ 200 mg/l, KCl 400 g/l, MgSO ₄ 97,67 mg/l, NaCl 6,4 g/l, NaH ₂ PO ₄ 125 mg/l, Glucose 4,5 g/l, Phenolrot 15 mg/l, Natriumpyruvat 110 mg/l, L-Arginin 84 mg/l, L-Cystin 63 mg/l, L-Glutamin 584 mg/l, Glycine 30,mg/l, L-Histidin 42 mg/l, L-Isoleucin 105 mg/l, L-Leucin 105 mg/l, L-Lysin 146 mg/l, L-Methionin 30 mg/l, L-Methionin 30 mg/l, L-Phenylalanin 66 mg/l, L-Serine 42 mg/l, L-Treonin 95 mg/l, L-Tryptophan 16 mg/l, L-Tyrosin 104 mg/l, L-Valin 94 mg/l, D-Calciumpantothenat 4 mg/l, Cholinchlorid 4 mg/l, Folsäure 4 mg/l, i-Inositol 7,2 mg/l, Niacinamid 4 mg/l, Riboflavin 0,4 mg/l, Thiamin 4 mg/l

2.4 Puffer und Lösungen

2.4.1 Antibiotika

Tabelle 4 Liste der verwendeten Antibiotika

Bezeichnung	Konzentration
Ampicillin	100 µg/ml in H ₂ O
Chloramhenicol	34 µg/ml in 100% Ethanol
Kanamycin	50 µg/ml in H ₂ O
Geneticin (G418)	1 mg/ml
Hygromycin B	100 µg/ml

2.4.2 Allgemeine Puffer

Tabelle 5 Liste allgemein verwendeter Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung
PBS	10 mM Na ₂ HPO ₄ , 2mM KH ₂ PO ₄ , 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, pH 7,4
PBS-T	PBS mit 0,05% Tween-20
TBS	23 mM Tris-HCl, 0,9% NaCl, pH 7,4
TBS-T	TBS mit 0,1 % Tween-20

2.4.3 Primer

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma BioTeZ (Berlin-Buch) synthetisiert und in einer Konzentration von 50 pmol/µl bei -20 °C gelagert.

Tabelle 6 Liste der verwendeten Primer

Bezeichnung	Sequenz
GABARAP_53D63K_5'	GAAATACCTGGTGCCTGATGATCTCACAGTTGGTCAGTTCTACAA GTTGATC CGGAAGC
GABARAP_53D63K_3'	GCTTCCGGATCAACTTGTAGAACTGACCAACTGTGAGATCATCAG GCACC
MAPLC3B_53S62F_5'	GTTCCCTTGTACCTTCCCATGTCAACATGAGTGAGCTCAT CTTCATAATTAGAAGGCGC
MAPLC3B_53D62F_3'	GCGCCTTCTAATTATGAAGATGAGCTCACTCATGTTGACAT GGGAAGGTACAAGGAAC
HIV-1 Nef_W13A_5'	CATATGGGTGGCAAGGCGTCAAAACGTAGTATG
HIV-1 Nef_W13A_3'	CATACTACGTTTTGACGCCTTGCCACCCATATG
HIV-1 Nef_W5A_5'	GTAGTATGGGTGGAGCGTCTGCTATAAGG
HIV-1 Nef_W5A_3'	CCCTTATAGCAGACGCTCCACCCATACTAC
mCherry_for_pDsRed_5'	GGAGGAGGATCCACCGGTCGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAG GAGG
mCherry_for_pDsRed_3'	GGAGGAGCGGCCGCTACTTGTACAGCTCGTCCATG
pDsRedN1_1431_rev_SEQ	GTTTCAGGTTTCAGGGGAGGTG
mCherry_w/o_MSCI_5'	GGAGGATAACATGGCTATCATCAAGGAGTTC
mCherry_w/o_MSCI_3'	GAACTCCTTGATGATAGCCATGTTATCCTCC
Seq-Primer Nef-mcherry (rev)_5'	GTTTCAGGTTTCAGGGGAGGTG

mCherry_IRES_MScII_5'	ACGATGATAATATGGATGGGTGGCAAGTGGTCAAAACGT
mCherry_IRES_MScI_3'	CAGTTACATTGGATCCCTACTTGTACAGCTCGTCCATGCC
pGFP-C_reverse	CCTCTACAAATGTGGTATGGC
pGFP-N_reverse	AGCTCCTCGCCCTTGCTCACC

2.4.4 Größenmarker

In dieser Arbeit wurden für die *SDS-Page* die folgenden Größenmarker verwendet. Alle Größenmarker wurden von Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA, bezogen.

Tabelle 7 Liste der verwendeten Größenmarker

Marker	Größen
Unstained Protein Molecular Weight Marker	116; 66,2; 45; 35; 25; 18,4; 14,4 kDa
PageRuler Prestained Protein Ladder	170; 130; 100; 70; 55; 40; 35; 25; 15; 10 kDa
Middle range DNA Ladder	100; 400; 850; 2000; 5000 bp

2.4.5 Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien entsprachen dem *Reinheitsgrad pro analysi* oder höher. Chemikalien, die nicht in Tabelle 8 aufgeführt sind, wurden in der Regel von den Firmen AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland), Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland) und Sigma Aldrich (St. Louis, USA) bezogen.

Tabelle 8 Liste verwendeter Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Complete Proteaseinhibitortabletten	Roche, Basel, Schweiz
Desoxyribonukleosidtriphosphate	Thermo Scientific, Waltham, USA
Ni-NTA Säulenmaterial	QiAGEN, Hilden, Deutschland
Glutathion-Sepharose 4B	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
Isopropyl- β -D-Thiogalactosid (IPTG)	Boehringer, Mannheim, Deutschland
NHS-activated Sepharose 4 FastFlow	GE Healthcare, Freiburg
Fötales Kälberserum	PAA Laboratoris

2.4.6 Geräte

Tabelle 9 Liste verwendeter Geräte

Gerät	Hersteller
GelDoc 2000	Biorad München, Deutschland
GelDoc MP	Biorad München, Deutschland
FPLC Säule	GE Healthcare, Littel Chalfont, UK
JA 25.50 Rotor	Beckman Coulter, Brea, USA
JLA 8.100 Rotor	Beckman Coulter, Brea, USA
Lyophila Alpha 1-4	Christ, Osterode am Harz, Deutschland
Multitron Pro Inkubationsschüttler	Infors-HAT, Bottmingen, Schweiz
Nanophotometer P300	Implen, München, Deutschland
pH-Meter	Mettler TOLEDO, Greifensee, Schweiz
Polyacrylamid-Gelelektrophoreseapparatur	Hoefer Scientific Instruments, UK
Polyacrylamid-Gelelektrophoreseapparatur	Biorad München, Deutschland
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Ultraschallgenerator Mikrospitze	Branson 250 mit	Branson Ultrasonics Corporation, Danbury, USA
UV-Vis Spektrometer	Lambda 25	Perkin Elmer, Waltham, USA
Zentrifuge	5417R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge	5702R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge	5804R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge	Avanti J-20 XP	Beckman Coulter, Brea, USA
Thermocycler	Biozym PTC-200	Biozym, Oldendorf, Deutschland
Olympus IX71,	Fluoreszenzmikroskop	Olympus, Hamburg, Deutschland
LSM 710,	konfokales Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Göttingen, Deutschland
Lambda 25 UV/VIS	Spektrometer	PerkinElmer, Massachusettes, USA
Thermo Spectronic	Helios	Thermo Fischer, Waltham, USA
DNA Horizontalelektrophoreseapparatur		Amersham Bioscience (GE Healthcare), Freiburg, Deutschland
Neubauer Zählkammer		Laboroptik, Bad Homburg, Deutschland
NMR Spektrometer:	Varian Unity INOVA, 600 MHz (agilent)	Varian, Palo Alto, USA
LS 55 Fluorescence Spectrometer		Perkin-Elmer, USA

2.4.7 Kits

Tabelle 10 Liste der verwendeten Kits

Bezeichnung	Bezugsquelle
QIAGEN Plasmid Midi Kit	QIAGEN, Hilden, Deutschland
NucleoBondPC 20	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
NucleoBond PC 100	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
NucleoSpin® Gel and PCR clean-up	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, La Jolla, USA
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate	Thermo Scientific, Waltham, USA
EndoFree Plasmid Midi Kit	QIAGEN, Hilden, Deutschland
ExoQuick-TC Exosome Precipitation	System Biosciences (SBI), Mountain View, USA

2.4.8 Antikörper

Tabelle 11 Liste der verwendeten Antikörper

Name	Bestellnummer	Quelle
Mouse anti-DsRed	sc-81596	Santa Cruz, Texas, USA
Mouse anti-GAPDH	Ab9484	Abcam, Cambridge, UK
Mouse anti-LC3A/B	0231-100/LC3-5F10	Nanotools, Teningen, Deutschland
Rabbit anti-GABARAP	18723-1-AP	Proteintech, Manchester, UK
Rabbit anti-GAPDH	Ab9485	Abcam, Cambridge, UK
Rabbit anti-GABARAPL2	18724-1-AP	Proteintech, Manchester, UK
Rabbit anti-GABARAPL1	18721-1-AP	Proteintech, Manchester, UK
Rabbit anti-GFP	sc-8834	Santa Cruz, Texas, USA
Rabbit anti-LC3B	18725-1-AP	Proteintech, Manchester, UK
Rabbit anti-Nef (SF2)	(eigene Herstellung)	Eurogentec, Belgien
Rabbit anti-Tubulin	Ab59680	Abcam, Cambridge, UK
Rabbit anti-CD63	EXOAB-CD63A-1	System Biosciences (SBI), Mountain View, USA
Donkey anti-mouse igG	sc-2020	Santa Cruz, Texas, USA
Goat anti-rabbit igG	sc-2030	Santa Cruz, Texas, USA

2.4.9 Plasmide

Tabelle 12 Liste der verwendeten Plasmide

Plasmid	Antibiotikaresistenz	Quelle
pCMV-TetOn3G	Kana	Clontech
pDsRed-N1_Nef ^{G2A G3A}	Kana	ICS-6, Forschungszentrum Jülich
pDsRed-N1_Nef ^{wt}	Kana	ICS-6, Forschungszentrum Jülich

pDsRed-N1_Nef_{W13A}	Kana	Eigene Arbeit
pECFP_GABARAP	Kana	ICS-6, Forschungszentrum Jülich
pECFP-C1 original	Kana	Clontech
pECFP-GABARAPL2	Kana	Eigene Arbeit
pECFP-GABARAPL1	Kana	ICS-6, Forschungszentrum Jülich
pECFP-MAPLC3B	Kana	Eigene Arbeit
pECFP-N1 original	Kana	Clontech
pET15b_kombi_MAPLC3_lang(1-124)	Amp	ICS-6, Forschungszentrum Jülich
pET15b_kombi_MAPLC3B_{D56S, K65F}	Amp	In Zusammenarbeit mit Markus Tusche
petDuet_MCS2_codon_opt_NEF_HisTag	Amp	In Zusammenarbeit mit Markus Tusche
pETDuet-1HisTag_Nef_MCS2	Amp	ICS-6, Forschungszentrum Jülich
pETDuet-1HisTag_Nef_{W13A}_MCS2	Amp	Eigene Arbeit
pEYFP-C1original	Kana	Clontech
pEYFP-GABARAP	Kana	ICS-6, Forschungszentrum Jülich
pEYFP-GABARAPL2/GATE-16	Kana	Eigene Arbeit
pEYFP-GABARAPL1/GEC1	Kana	ICS-6, Forschungszentrum Jülich
pEYFP-MAPLC3B	Kana	Eigene Arbeit
pGEX-4T-2_GABARAP	Amp	ICS-6, Forschungszentrum Jülich
pGEX-4T2_GABARAP_{S53D, F63K}	Amp	In Zusammenarbeit mit Markus Tusche
pGEX-4T2_GABARAPL2/GATE-16	Amp	ICS-6, Forschungszentrum Jülich

pGEX-4T2_GABARAPL1/GEC1	Amp	ICS-6, Forschungszentrum Jülich
pGEX-6P-2_Nef-core	Amp	ICS-6, Forschungszentrum Jülich
pmCherry-Nef _{WT}	Kana	Eigene Arbeit
pTRE3G_mCherry <i>w/o</i> MSCI	Amp	Eigene Arbeit
pTRE3G-IRES	Amp	Clontech
PTRE3G-IRES-Nef-mCherry	Amp	Eigene Arbeit
pTRE3G-Luc Control	Amp	Clontech
pTRE3G-mCherry	Amp	Clontech

Software

Tabelle 13 Liste der verwendeten Software

Funktion	Software	Referenz
Analyse von Gelen und WesternBlots	Quantity One Version 4.4.0	Biorad, München, Deutschland
Analyse von Proteinsequenzen	ProtParam Tool	http://www.expasy.org/tools/protparam.html
Darstellung von NMR-Daten	NMRView	Johnson und Nievins 1994
Multiples Sequenz Alignment	Clustal W	Chenna et al., 2003
Planung und Auswertung von Klonierungen	Clone Manager 9 Professional Edition	Scientific & Educational Software, Cary, USA
Prozessierung von NMR-Daten	VNMR-Software	Varian, Inc.; Version 6.1. B
Recherche von vorhandenen Proteinstrukturen	PDB-Datenbank	http://www.rcsb.org/pdb

**Visualisierung von
Proteinstrukturen**

PyMOL

The PyMOL Molecular Graphics System, Version
1.3, Schrödinger, LLC

3 Methoden

3.1 Gentechnische Methoden

3.1.1 Kultivierung von *E.coli*

Das Animpfen von *E.coli* erfolgte entweder aus einer Einzelkolonie, von einer Agarplatte oder aus einer Glycerinkultur. Die Bakterienkulturen wurden in einem Erlenmeyerkolben mit Schikanen über Nacht bei 37 °C und 160 rpm geschüttelt. Für das Herstellen einer Glycerinkultur wurde 1 ml Übernachtskultur abzentrifugiert, das Pellet in 1 ml 20 % Glycerin aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

3.1.2 Isolierung von Plasmid DNA aus *E.coli*

Die Isolierung von Plasmid DNA erfolgte mit Hilfe kommerziell erhältlicher Kits (Tab. 10). Dabei erfolgte die Isolierung nach dem Prinzip der modifizierten alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979). Mit Hilfe von Anionen-Austauschchromatographie konnte im Anschluss die hochreine Plasmid-DNA gewonnen werden. Die DNA wurde in 5 mM Tris-HCl pH 8,5 aufgenommen und bei - 20 °C gelagert.

3.1.3 Herstellung chemisch kompetenter *E.coli*

Chemisch kompetente Bakterienzellen wurden nach der CaCl₂ Methode hergestellt. Dazu wurden 2 ml LB-Medium mit einer Kolonie einer LB-Platte angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 300 rpm inkubiert. Mit der Übernachtskultur wurde eine 100 ml-Kultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 bis 0,8 im Schüttler weiter inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen bei 7.000 x g und 4 °C für 10 min pelletiert. Das Pellet wurde in 10 ml eiskaltem 50 mM CaCl₂ aufgenommen, pelletiert und erneut in 20 ml eiskaltem 50 mM CaCl₂ resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen erneut zentrifugiert und das Pellet nochmals in 5 ml

eiskaltem 50 mM CaCl₂ aufgenommen und für 15 min auf Eis inkubiert. Pro 2,5 ml Zellsuspension wurden 469 µl einer eiskalten 80%igen Glycerinlösung zugegeben und vorsichtig gemischt. Jeweils 100 µl Zellsuspension wurden in ein vorgekühltes Eppendorfgefäß pipettiert und die Zellen sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Zellen wurden bei -80 °C gelagert.

3.1.4 Transformation von *E.coli*

Für die Transformation der *E.coli*-Zellen wurde ein Aliquot kompetenter Zellen auf Eis aufgetaut. Zu den aufgetauten Zellen wurden 100 ng Plasmid-DNA gegeben und vorsichtig gemischt. Nach 20-minütiger Inkubation erfolgte ein Hitzeschock für 45 sec bei 42 °C. Im Anschluss wurde dem Transformationsansatz 1 ml SOC-Medium zugefügt und der Ansatz für 60 min bei 37 °C geschüttelt. Die Zellen wurden 2 min bei 300 g abzentrifugiert, das Pellet in 50 µl frischem SOC-Medium resuspendiert und auf LB-Agarplatten mit entsprechender Antibiotika-Zugabe über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.1.5 Amplifizierung von DNA

Die Polymerase-Kettenreaktion ermöglicht die exponentielle Amplifizierung von DNA-Sequenzen unter Zuhilfenahme zweier Oligonukleotide, deren Sequenzen komplementär zu Anfangs- und Endsequenzen der zu amplifizierenden DNA sind. Die Ansätze wurden in einem Volumen von 50 µl mit 1 x PCR-Puffer, 100 µM dNTPs, 1 µM 5'-Primer, 1 µM 3'-Primer und 1 U Vent-Polymerase angesetzt. Als Template wurden 100 ng Plasmid-DNA eingesetzt. Entsprechend der Schmelztemperatur der eingesetzten Primer und der Länge des zu amplifizierenden DNA-Segments wurden die einzelnen Schritte der PCR-Reaktion den jeweiligen Erfordernissen angepasst. Allen Reaktionen gemeinsam war eine anfängliche Denaturierung bei 95 °C für 5 min. Der Zyklus wurde 30mal durchlaufen und bestand aus den drei Schritten Denaturierung, Anlagerung der Oligonukleotide und Elongation. Zuletzt erfolgte eine abschließende Elongation, um die vollständige Kettenverlängerung aller Amplifikate zu gewährleisten.

3.1.6 Restriktionsverdau

Für die Linearisierung von DNA-Plasmiden und für die Klonierung von PCR-DNA-Fragmenten wurde ein Restriktionsverdau mit Hilfe von Restriktionsenzymen durchgeführt. Restriktionsenzyme sind bakterielle Enzyme, die in der Lage sind spezifische doppelsträngige DNA Sequenzen zu erkennen und hydrolytisch zu spalten. Dabei können sie glatte Enden (*blunt ends*) oder überhängende Enden (*sticky ends*) erzeugen, die in einer Ligationsreaktion miteinander verknüpft werden können. Für eine Restriktionsanalyse wurden 5 µg DNA in einem Volumen von 25 bis 50 µl mit 5 U des Enzyms in dem dazu gelieferten Reaktionspuffer inkubiert für 2 h bei 37 °C inkubiert. Darauf folgte eine Hitzeinaktivierung der Restriktionsendonukleasen bei angegebener Temperatur des Herstellers für 20 min. Die Vektoren wurden zusätzlich dephosphoryliert (siehe Kap. 3.1.7). Zur Entfernung der Reaktionskomponenten sowie zur Überprüfung des Erfolgs der Restriktionsanalyse wurde anschließend eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt (Kap. 3.1.11) und das gewünschte DNA-Fragment aus dem Agarosegel eluiert (Kap. 3.1.8).

3.1.7 Dephosphorylierung von Plasmiden

Um eine spontane Religation der überhängenden Enden des Vektors auszuschließen, wurde der Vektor im Anschluss an die Restriktionsanalyse dephosphoryliert. Dabei wurden mit Hilfe von CIP (*calf intestinal alkaline phosphatase*) oder SAP (*shrimps alkaline phosphatase*) die Phosphatgruppen am 5'-Ende entfernt. Für die Dephosphorylierung wurde der Restriktionsansatz mit 4 U SAP bzw. CIP versehen und 1 h bei 37 °C inkubiert. Durch 20-minütige Inkubation bei 65 °C wurde das Enzym inaktiviert. Anschließend konnte die DNA direkt in die Ligation eingesetzt werden.

3.1.8 Extraktion von DNA aus dem Agarosegel

Die Isolierung der DNA erfolgte mit Hilfe des „NucleoSpin Extrakt II“ Kits (Macherey und Nagel). Dazu wurde das Agarosegelstück mit der gewünschten DNA-Bande unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA nach Herstellerangaben isoliert. Die Elution erfolgte stets in Wasser.

3.1.9 Ligation

Für die Insertion eines DNA-Fragments in einen zuvor linearisierten Vektor wurde die DNA-Ligase des Bakteriophagen T4 verwendet. Dabei wurden für die Ligation 100 ng Vektor und ein sechs bis zehnfacher Überschuss an Insert-DNA mit 1 mM ATP und 1 U T4-Ligase über Nacht bei Raumtemperatur oder 16 °C inkubiert. Zusätzlich wurde jedes Mal ein Ligationsansatz ohne Insert angesetzt, um die Anzahl an religiertem Vektor bestimmen zu können. Anschließend erfolgte die Transformation von *E.coli*-Zellen (Kap. 3.1.4) mit dem Ligationsansatz.

3.1.10 Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma SeqLab (Sequence Laboratories Göttingen GmbH) durchgeführt. Dabei erfolgte die Sequenzierung nach der Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger und Coulson, 1975). Mit Hilfe eines Sequenzierprimers und einer DNA-Polymerase wird in vier getrennten Reaktionen einer der komplementären DNA-Stränge verlängert. In der PCR-Probe ist, neben den Desoxynukleotiden aller vier Basen, zusätzlich pro Reaktion eine Base als Didesoxynukleotid zugegeben. Da dem Didesoxynukleotid die 3'-Hydroxyl-Gruppe fehlt, führt ein Einbau zum Abbruch der wachsenden DNA-Kette und somit zum Abbruch der Synthese. Als Konsequenz entstehen DNA-Fragmente, die in jedem Ansatz mit der gleichen Base enden. Trennt man die vier Reaktionsansätze gelelektrophoretisch auf, kann die DNA-Sequenz des Templates abgeleitet werden. Als eine Erweiterung dieser Technik werden häufig Desoxynukleotide mit unterschiedlichen Farbstoffen für jede Base benutzt. Dies ermöglicht eine Durchführung in einem Reaktionsgefäß. Die Auftrennung der einzelnen Fragmente

erfolgt über Kapillarelektrophorese und die Fluoreszenz wird über einen Laser angeregt. Die Abfolge der Signale, die am Detektor erscheint gibt die Sequenz wieder. Für die Sequenzierung von dsDNA wurden zwischen 600 und 700 ng DNA und 20 pmol Primer in einem Gesamtvolumen von 7 µl benötigt. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit Hilfe des Programms Clone Manager 9 Professional Edition (Tab.13).

3.1.11 Ortsspezifische Mutagenese

Das Einführen von Mutationen in Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des *QuickChange II XL Site Directed Mutagenesis Kit* nach den Angaben des Herstellers. Dabei beruht das Prinzip darauf, dass lange Oligonukleotide trotz einzelner Fehlpaarungen, vorzugsweise in der Mitte, an ein Plasmid binden können. Die dafür notwendigen Primer werden so entworfen, dass die auszutauschenden Basen in der Mitte der Oligonukleotidsequenz liegen. Es werden zwei solcher Oligonukleotide benötigt, die zueinander komplementär sind und als Startpunkt für die Polymerase dienen. Das amplifizierte Plasmid trug nun die gewünschte Mutation. Um die parentale DNA zu eliminieren wurde das methylierungsspezifische Enzym *Dpn1* eingesetzt. Dabei wird sich zu Nutze gemacht, dass in *E.coli* replizierte Plasmide Methylierungen tragen, was bei synthetisch hergestellter DNA nicht der Fall ist. Danach wurden *E.coli* XLGOLD Zellen mit der amplifizierten Plasmid-DNA nach dem Herstellerprotokoll transformiert und auf LB-Platten mit entsprechender Antibiotika Resistenz ausplattiert. Fünf Klone wurden über Nacht in 5 ml LB-Flüssigmedium unter Antibiotikaselektion angezogen. Zum Schluss wurden die Plasmid DNA mit dem Nucleo Bond PC20 isoliert und, wie in Kap. 3.1.10 beschrieben, sequenziert.

3.1.12 In-Fusion-Klonierung

Bei der *In-Fusion* Klonierung werden PCR-Fragmente über eine enzymvermittelte Reaktion in einen linearisierten Vektor eingebracht. Dafür müssen bei der Amplifikation (Kap. 3.1.5) unter Zuhilfenahme von Primern am 3'- und 5'-Ende zu dem Zielvektor homologe Sequenzen eingebracht werden. Gleichzeitig können, ähnlich wie bei der konventionellen PCR, Schnittstellen eingebaut bzw. wie bei der ortsspezifischen

Mutagenese DNA-Segmente eingebaut oder eliminiert werden. Das *Infusion*-Enzym bindet an die homologen DNA-Enden und ermöglicht die Rekombination. Diese erfolgt gerichtet, was die Ausbeutung an Klonen mit korrekter Orientierung gegenüber herkömmlichen PCR-Klonierungen erhöht. Die Generierung der Oligonukleotide und die Reaktion wurden nach Herstellerangaben durchgeführt.

3.1.13 Agarosegelelektrophorese

Zur Reinigung und Identifizierung von DNA-Fragmenten wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Das Prinzip der Elektrophorese beruht auf der Wanderung von in Flüssigkeiten dispergierten oder kolloidal gelösten geladenen Teilchen im elektrischen Feld. Da die Wanderungsgeschwindigkeit und somit die Trennschärfe der Elektrophorese u.a abhängig ist von Größe, Form und Ladung der Teilchen, legen kleinere DNA-Fragmente im elektrischen Feld größere Strecken zurück als größere Fragmente.

Je nach Größe des erwarteten Fragments wurden 0,8 bis 2%ige Agarosegele verwendet und mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Die Gelelektrophorese erfolgte in Horizontalelektrophorese-Apparaturen (Amersham Biosciences) bei einer konstanten Spannung von 90 bis 100 V in TAE-Puffer. Zur Bestimmung der Fragmentgröße wurde ein Größenmarker aufgetragen. Zum Schluss konnte die DNA unter UV-Licht über das interkalierende Ethidiumbromid sichtbar gemacht und mittels Gel Doc dokumentiert werden.

Tabelle 14 Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese

Bezeichnung	Zusammensetzung
Agaroselösung	1,2 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer, 1 mg/ml Ethidiumbromid
TAE-Puffer	40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA, pH 8,0
5 x Ladepuffer	50 mM EDTA, 50 % (v/v) Glycerin, 0,15 % (w/v) Bromphenolblau, 0,15 % (w/v) Xylencyanol

3.2 Proteinchemie

3.2.1 Expression und Reinigung von Nefcod⁺

Für die Expression von HIV-1 Nefcod⁺ wurde der Expressionsstamm *E.coli* BL21 (DE3) mit dem Expressionsplasmid petDuet_MCS2_codon_opt_HIV-1Nef_HisTag transformiert (Kap. 3.1.4). Aus einer Einzelkolonie wurde über Nacht eine Vorkultur in LB mit 100 µg/ml Ampicillin angezogen und für das Animpfen von 1 x 1 l LB mit 100 µg/ml Ampicillin verwendet. Diese Expressionskulturen wurden bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 bis 0,8 inkubiert und dann mit einer Endkonzentration 1 mM IPTG induziert. Nach vier Stunden Expression bei 37 °C wurden die Zellen für 30 min bei 3500 g zentrifugiert, einmal mit PBS gewaschen und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Die Puffer, welche für die Reinigung von Nef benötigt wurden, sind in Tab.15 aufgeführt. Für die Proteinreinigung wurden die Zellen einer 1 l Kultur in 25 ml Lysepuffer resuspendiert (Tab.15) und im Anschluss mit Hilfe eines Branson 250 Sonifizierers (3 Zyklen a 30 s mit einer 90 s Pause) aufgeschlossen. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation bei 45.000 g und 14 °C für 30 min präzipitiert. Die Reinigung des Proteins erfolgte mittels einer Metallaffinitätschromatographie, welche auf der Affinität von Histidin zu zweiwertigem Nickel beruht. Nachdem das Säulenmaterial mit Lysepuffer äquilibriert wurde, wurde der Überstand aus der Zentrifugation auf das NiNTA-Säulenmaterial gegeben. Die Säule wurde mit jeweils fünf Säulenvolumina Waschpuffer gewaschen. Schließlich erfolgte die Elution des Proteins mit aufsteigender Imidazol-Konzentration. Die Fraktionen wurden mittels SDS-Page analysiert (Kap. 3.2.5). Die Fraktionen, welche Nef enthielten, wurden gegen Dialysepuffer dialysiert und das Protein mittels Größenausschusschromatographie gereinigt. Die Nef-Lösung wurde bis zu ihrer Verwendung bei 4 °C gelagert.

Tabelle 15 Lösungen zur Reinigung von Nef

Bezeichnung	Zusammensetzung
Lysepuffer	20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 15 mM β -Mercaptoethanol, DNase1, Proteaseinhibitor (EDTA-free), 0,05 % Triton-X-100, pH 8,0
Waschpuffer 1	20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 15 mM β -Mercaptoethanol, 20 mM Imidazol, pH 8,0
Waschpuffer 2	20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 15 mM β -Mercaptoethanol, 30 mM Imidazol, pH 8,0
Waschpuffer 3	20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 15 mM β -Mercaptoethanol, 40 mM Imidazol, pH 8,0
Elutionspuffer 1	20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 15 mM β -Mercaptoethanol, 200 mM Imidazol, pH 8,0
Elutionspuffer 2	20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 15 mM β -Mercaptoethanol, 500 mM Imidazol, pH 8,0
Spaltungspuffer	20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 15 mM β -Mercaptoethanol, pH 8,0
SEC-Puffer	1 x PBS, 500 mM NaCl, 15 mM β -Mercaptoethanol, pH 8,0

3.2.2 Expression und Reinigung von Nefcore

Für die Expression von HIV-1 Nefcore wurde der Expressionsstamm *E.coli* BI21 (DE3) RIL mit dem Expressionsplasmid pGEX-6P-2_Nefcore transformiert (Kap. 3.1.4). Das Protokoll für die Expression entsprach dem für HIV-1 Nefcod+, mit der Ausnahme, dass für die *E.coli* BI21 DE3 RIL Zellen dem LB Medium zusätzlich 34 μ g/ml Chloramphenicol zugesetzt wurden. Für die Reinigung wurden die Zellpellets auf Eis aufgetaut und das Pellet in 5 ml Lysepuffer pro Gramm Zellpellet resuspendiert. Nach 16-stündiger Inkubation auf dem Rollschüttler bei 4 °C, wurde das Zelllysate 45 min bei 45.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in die Affinitätschromatographie eingesetzt. Dazu wurden 3 ml GSH-Sepharose pro Liter Expressionskultur mit Bindepuffer äquilibriert und mit dem Überstand für eine Stunde auf dem Rollschüttler bei 4 °C inkubiert. Im Anschluss wurde das Säulenmaterial mit 10 Säulenvolumina Waschpuffer gewaschen und das Nefcore-Protein mit aufsteigender Glutathion-Konzentration eluiert. Die Fraktionen wurden mit Hilfe einer

SDS-Page analysiert (Kap. 3.2.5) und die Fraktionen, die NefCore enthielten, gegen Dialysepuffer dialysiert. Als letzter Reinigungsschritt wurde eine Größenausschlusschromatographie mit Hilfe einer HiLoad 26-60 Superdex 75pg - Säule durchgeführt.

Tabelle 16 Lösungen für die Reinigung von Nefcore

Bezeichnung	Zusammensetzung
Lysepuffer	1 x PBS, 0,5 % Triton-X-100, 5 mM DTT, pH 7,4, DNase, Lysozym
Bindepuffer	1 x PBS, 0,5 % Triton-X-100, 5 mM DTT, pH 7,4
Waschpuffer	1 x PBS, 0,5 % Triton-X-100, 5 mM DTT, pH 7,4
Elutionspuffer 1	50 mM Tris, 5mM DTT, 10 mM Glutathion, pH 8,0
Elutionspuffer 2	50 mM Tris, 5mM DTT, 20 mM Glutathion, pH 8,0
Elutionspuffer 3	50 mM Tris, 5mM DTT, 30 mM Glutathion, pH 8,0
Elutionspuffer 4	50 mM Tris, 5mM DTT, 40 mM Glutathion, pH 8,0
Elutionspuffer 5	50 mM Tris, 5mM DTT, 50 mM Glutathion, pH 8,0
Spaltungspuffer	50 mM Tris, 150 NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,5 mM PMSF
SEC-Puffer	50 mM Tris, 150 NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,5 mM PMSF

3.2.3 Expression und Reinigung von GABARAPs

Für die Expression von GABARAP, GABARAPL1 und GABARAPL2 wurde der Expressionsstamm *E.coli* BL21 (DE3) T1* entweder mit pGEX-4T2_GABARAP, pGEX4T2_GABARAPL1 oder pGEX4T2_GABARAPL2 transformiert (Kap. 3.1.4). Aus einer Einzelkolonie wurde über Nacht eine Vorkultur in LB mit Amp angezogen und für das Animpfen von 4 mal 1 l LB mit 100 µg/ml Ampicillin verwendet. Die Anzucht der Expressionskultur erfolgte bei 37 °C bis die Bakterien eine OD₆₀₀ zwischen 0,6 und 0,8 erreicht hatten. Die Expression wurde mit 1 mM IPTG gestartet. Nach 6-stündiger Inkubation bei 37 °C wurden die Bakterien durch Zentrifugation (30 min bei 3000 x g und 12 °C) geerntet. Nach einmaligem Waschen mit 1 x PBS wurden die Pellets bei - 20 °C gelagert.

Für den Zellaufschluss wurden die Bakterienpellets in 5 ml Lysepuffer (Tab. 15) pro g Nasszellgewicht aufgenommen und mittels Ultraschall durch dreimaliges Sonifizieren für jeweils 30 s aufgeschlossen. Nach 30-minütiger Zentrifugation bei 45.000 g und 12 °C wurde der zellfreie Rohextrakt für die weitere Reinigung verwendet. Die Reinigung der GST-Fusionsproteine erfolgte an Glutathion-Sepharose 4B. In diesem Fall erfolgt die Bindung von GST an den Liganden Glutathion, der kovalent an die Sepharose gekoppelt ist. Nachdem die Säule mit 5 Säulenvolumen Bindungspuffer gewaschen wurde, erfolgte die Elution der GST-Fusionsproteine durch reduziertes Glutathion. Alle Fraktionen wurden über SDS-PAGE (Kap. 3.2.5) analysiert. Für die Spaltung des Fusionsproteins wurden GABARAP-enhaltende Fraktionen gegen Spaltungspuffer (Tab. 14) dialysiert. Gleichzeitig erfolgte die Spaltung im Dialyseschlauch mittels Thrombin für 24 h. Dazu wurden pro Gramm Ausgangsmaterial ungefähr 125 Einheiten Thrombin zugesetzt. Die Vollständigkeit der Proteolyse wurde mittels SDS-PAGE verifiziert (Kap. 3.2.5). Zur Trennung der Spaltprodukte wurde eine Größenausschlusschromatographie mit einer HiLoad 26-60 Superdex 75pg-Säule durchgeführt. Die Elutionsfraktionen wurden mittels SDS-PAGE (Kap. 3.2.5) analysiert und die GABARAP-enhaltenden Fraktionen gegen dH₂O dialysiert. Im Anschluss wurde das GABARAP im Lyophilisator gefriergetrocknet.

Tabelle 17 Lösungen zur Reinigung von GABARAP, GABARAPL1 und GABARAPL2

Bezeichnung	Zusammensetzung
Lysepuffer	1x PBS, 5 % (v/v) Glycerin, DNase1, Proteaseinhibitor pH 7,4
Waschpuffer 1	1x PBS, 5 % (v/v) Glycerin, 10 mM Glutathion, pH 7,4
Waschpuffer 2	1x PBS, 5 % (v/v) Glycerin, 20 mM Glutathion, pH 7,4
Waschpuffer 3	1x PBS, 5 % (v/v) Glycerin, 30 mM Glutathion, pH 7,4
Elutionspuffer 1	1x PBS, 5 % (v/v) Glycerin, 50 mM Glutathion, pH 7,4
Elutionspuffer 2	1x PBS, 5 % (v/v) Glycerin, 100 mM Glutathion, pH 7,4
Spaltungspuffer	1x PBS, pH 7,4
SEC-Puffer	1x PBS, pH 7,4

3.2.4 Expression und Reinigung von LC3s

Die Bakterienanzucht zur Expression von LC3B sowie der Zellaufschluss entsprachen dem Protokoll für die Expression von GABARAP (Kap. 3.2.3). Nach dem Zellaufschluss erfolgte die Reinigung des Proteins über Affinitätschromatographie mittels Ni-NTA-Agarose, entsprechend dem Protokoll für Nef (Kap. 3.2.1). Die Fraktionen wurden mit Hilfe einer SDS-Page analysiert (Kap. 3.2.5). Fraktionen, die LC3B enthielten, wurden gegen Spaltungspuffer dialysiert. Die Abspaltung des His-tags erfolgte mit Hilfe von Thrombin im Dialyseschlauch (MWCO: 3500 Da) für 24 h. Dabei wurde für ein Gramm Ausgangszellmaterial 150 Einheiten Thrombin (Merck, Darmstadt) eingesetzt. Die Vollständigkeit der Spaltung wurde mittels SDS-Page überprüft (Kap. 3.2.5). Im Anschluss wurde für die Trennung der Spaltprodukte eine Größenausschlusschromatographie mit Hilfe einer HiLoad 26-60 Superdex 75pg-Säule durchgeführt. Zuletzt wurden die LC3B-enhaltenden Fraktionen gegen dH₂O dialysiert und im Lyophilisator gefriergetrocknet.

Tabelle 18 Lösungen zur Reinigung von LC3B

Bezeichnung	Zusammensetzung
Lysepuffer	50 mM NaPO ₄ , 300 mM NaCl, 5 mM β-Mercaptoethanol, DNaseI, Proteaseinhibitor (EDTA-free), pH 8,0
Bindepuffer	50 mM NaPO ₄ , 300 mM NaCl, 5 μM β-Mercaptoethanol, pH 8,0
Waschpuffer 1	50 mM NaPO ₄ , 300 mM NaCl, 5 μM β-Mercaptoethanol, 20 mM Imidazol, pH 8,0
Waschpuffer 2	50 mM NaPO ₄ , 300 mM NaCl, 5 μM β-Mercaptoethanol, 50 mM Imidazol, pH 8,0
Elutionspuffer 1	50 mM NaPO ₄ , 300 mM NaCl, 5 μM β-Mercaptoethanol, 100 mM Imidazol, pH 8,0
Elutionspuffer 2	50 mM NaPO ₄ , 300 mM NaCl, 5 μM β-Mercaptoethanol, 200 mM Imidazol, pH 8,0
Spaltungspuffer	1 x PBS, 5 mM β-Mercaptoethanol, pH 7,4
SEC-Puffer	1 x PBS, 5 mM β-Mercaptoethanol, pH 7,4

3.2.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese dient der analytischen Trennung von Proteingemischen. Standardmäßig wurden Gele mit 12-prozentigem oder 15-prozentigem Trenngel und 5-prozentigem Sammelgel verwendet. Für Proben, die mittels Western Blot (Kap. 3.2.7) analysiert werden sollten, wurden *precast gels any Kd* von Biorad verwendet.

Die Proben wurden vor dem Auftragen mit Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C erhitzt. Durch das Erhitzen der Probe und das im Probenpuffer enthaltene Reduktionsmittel β -Mercaptoethanol werden Quartiär-, Tertiär- und Sekundärstrukturen im Gel aufgebrochen. Das anionische Tensid SDS überdeckt die Eigenladung der Proteine, was zu einer negativem Gesamtladung der Proteine führt und ihre Trennung im elektrischen Feld anhand ihrer Größe erlaubt. Die Elektrophorese wurde pro Gel bei 40 mA für 45 min durchgeführt. Im Anschluss wurden die Gele entweder mit Coomassie-Färbelösung gefärbt oder für einen Western Blot eingesetzt.

Tabelle 19 Lösungen für Puffer und Gele für die SDS-PAGE

Bezeichnung	Zusammensetzung
Sammelgel (5 %)	4,85 % (w/v) Acrylamid, 0,15 % (w/v) N,N'-Methyldisacrylamid, 125 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,1 % (w/v) SDS, 0,1 % (v/v) APS, 0,1 % (v/v) TEMED
Trenngel (15 %)	14,55 % (w/v) Acrylamid, 0,45 % (w/v) N,N'-Methyldisacrylamid, 375 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,1 % (w/v) SDS, 0,1 % (v/v) APS, 0,1 % (v/v) TEMED
SDS-Laufpuffer	50 mM Tris-HCl, 385 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS, pH 8,3
4x Probenpuffer	200 mM Tris-HCl, 40 % (v/v) Glycerin, 8 % β -Mercaptoethanol, pH 7,4

3.2.6 Coomassie-Blau-Färbung

Die aufgetrennten Proteine wurden mit Hilfe des Farbstoffs Coomassie-Brilliant-Blau (CBB) angefärbt. Dazu wurden die Gele für 1 h in Färbelösung inkubiert. Der im sauren anionisch vorliegende Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau R250 lagert sich dabei an die basischen Seitenketten von Aminosäuren an, so dass Proteine spezifisch angefärbt werden. Im Anschluss wurde das Gel so lange in heißem Wasser aufgeköcht, bis deutliche Banden zu erkennen waren.

Tabelle 20 Coomassie-Färbelösung

Bezeichnung	Zusammensetzung
Coomassie-Färbelösung	25 % (v/v) Isopropanol, 10 % (v/v) Essigsäure, 0,5 g/l Coomassie Brilliant Blue R-250

3.2.7 Western-Blot

Bei einem Western-Blot werden Proteingemische gelelektrophoretisch getrennt, auf eine Membran überführt und dort einer Nachweisreaktion mit Hilfe von Antikörpern unterzogen, die spezifisch für das zu analysierende Protein sind. In dieser Arbeit wurden vorgepackte Trans-Blot Transfer Packs (*precast gels*) der Firma Biorad verwendet. Diese bestehen aus 2 x 3 aufeinander gestapelten mit Transferpuffer getränkten Filterpapieren, denen bereits eine durch Methanol aktivierte PVDF-Membran aufliegt.

Der Transfer erfolgte standardmäßig bei 100 mA und 25 V für 30 min. Anschließend wurde die Membran 30 min in TBST mit 5 % Milchpulver inkubiert, um freie Bindungsstellen zu blockieren. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte in der Regel über Nacht bei 4 °C in TBST-Puffer in einer 1:1.000 Verdünnung. Im Anschluss wurde die Membran dreimal für 5 min in TBST-Puffer gewaschen. Die Inkubation mit einem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper erfolgte in einer 1:10.000 Verdünnung für 1 h bei Raumtemperatur. Nach dreimaligem Waschen der Membran mit TBST-Puffer, erfolgte schließlich die Signaldetektion mittels Chemilumineszenz. Hierzu wurde das Super Signal West Dura Chemilumineszenz Substrat von Pierce verwendet. Die hierbei detektierbare Lichtemission des HRP-Substrats bei 428 nm erfolgte mit der GelDoc2000.

3.2.8 Strippen von Membranen

In einigen Versuchen war es aus Vergleichsgründen wichtig, dieselbe Membran nacheinander mit verschiedenen Antikörpern anzufärben. Daher wurden die Membranen nach erfolgter Detektion mittels Chemilumineszenz durch das Aufkochen in heißem Wasser gestrippt.

3.2.9 Methanol-Chloroform-Fällung

Die Proben aus Pull-Down-Experimenten und Koimmunopräzipitationen wurden standardmäßig einer Methanol-Chloroform-Fällung nach Wessel und Flugge (1984) unterzogen.

Dazu wurden pro 150 µl Eluat 500 µl Methanol und 150 ml Chloroform unter Zugabe von 450 µl H₂O zur besseren Phasentrennung gemischt. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation bei 10.000 x g wurde die obere Phase abgenommen und die untere Phase mit 450 µl Methanol versetzt. Nach Zugabe von 1,5 ml eiskaltem Aceton erfolgt eine erneute Zentrifugation bei 100.00 x g für 10 min. Nach Abnahme des Überstands wurde das Proteinpellet bei Raumtemperatur getrocknet bevor es in 4fach Laemmli-Probenpuffer für die SDS-Gelelektrophorese aufgenommen wurde

3.3 Spektroskopische Methoden

3.3.1 Absorptionsmessungen

3.3.1.1 Bestimmung der Bakteriendichte

Das Maß für die Zelldichte einer Bakterienkultur ist die optische Dichte. Diese wurde am Helios Spektralphotometer in Polystyrol-Halbmikroküvetten bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. Dabei entspricht eine Absorptionseinheit einer Bakteriendichte von etwa 1×10^9 Zellen/ml.

3.3.1.2 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren wurde mit einem Lambda UV/VIS-Spektrometer von PerkinElmer instruments durchgeführt. Dabei erfolgte die Messung photometrisch bei einer OD von 260 nm in Kunststoff Einmalküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm. Eine OD von 1 bei einer optischen Wellenlänge von 1 cm entspricht in etwa einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml.

3.3.1.3 Proteinkonzentrationsbestimmung mittels UV/VIS-Spektrometer

Proteinkonzentrationen wurden mit einem UV-VIS-Spektrometer durch die Absorption von ultravioletter Strahlung bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt. Dies ist möglich, da Tryptophan und Tyrosin und in geringen Maße auch Phenylalanin ultraviolettes Licht absorbieren. Es gilt das Lambert-Beersche Gesetz:

$$E = c \cdot d \cdot \varepsilon$$

Dabei steht c für die Konzentration, d für die Schichtdicke und ε für den molaren Extinktionskoeffizienten.

Der molare Extinktionskoeffizient ergibt sich aus den Extinktionsbeiträgen der Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Cystein (Gill und von Hippel 1989).

Tabelle 21 Extinktionskoeffizienten verwendeter Proteine

Protein	Extinktionskoeffizient
Nefcod ⁺	54555
Nefcore	86290
GABARAP	11920
GABARAPL1	14900
GABARAPL2	18450
MAPLC3A	5960
MAPLC3B	5960

3.3.1.4 BCA-Assay

Zur Bestimmung des Proteingehalts einzelner Proben wurde das Pierce BCA Protein Assay Kit von Thermo Scientific benutzt. Die bei der Proteinbestimmung nach Lowry und Smith ablaufende Biurettreaktion beruht auf der Bildung eines Komplexes zwischen Peptidbindungen im Protein und den Cu^{2+} -Ionen in alkalischer Lösung. Dabei wird in einem zweiten Cu^{2+} Schritt zu Cu^{1+} reduziert und mittels Bicinchoninsäure (BCA) in einen rosa Komplex umgewandelt, welcher photometrisch gemessen wird.

3.3.1.5 Luziferase-Assay

Der Luziferase-Assay wurde mit dem Luziferase Assay System mit Repoter-Lysis-Puffer von Promega durchgeführt. Dazu wurde im ersten Schritt das Zellkulturmedium entfernt und die Zellen anschließend mit 1x PBS gewaschen. Pro Well einer 6-Well-Platte wurden 400 μl Reporter-Lysepuffer zu den Zellen gegeben und auf Eis inkubiert. Nach 10 minütiger Inkubation wurde der Überstand abgenommen und jeweils 20 μl des Überstandes mit 100 μl Luziferase Assay Reagenz versetzt. Im Anschluss erfolgte die Detektion im Fluoreszenzspektrometer.

3.4 Zellkultur

3.4.1 Kultivierung von Zelllinien

Für die Passagierung der Zellen wurde zunächst das Kulturmedium entfernt, die Zellen einmalig mit PBS gewaschen und anschließend mit Hilfe von 1 % Trypsin/EDTA vom Boden der Kulturflasche gelöst. Die Zellen wurden zentrifugiert, nach Verwerfen des Überstandes in frischem Medium resuspendiert und in einem Splitverhältnis von 1:5 in neue Zellkulturflaschen überführt. Als Kulturmedium für HEK293 wurde Dulbecco's MEM verwendet, welches mit 10 % hitzeinaktiviertem FCS komplementiert wurde. Die routinemäßige Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37 °C und 5 % CO_2 . Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

3.4.2 Bestimmung der Zellzahl

Für die Kryokonservierung und Expositionsversuche war, um definierte Versuchsbedingungen zu schaffen, eine genaue Zellzahlbestimmung notwendig. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer. Dazu wurden die Zellen, wie in Kap. 5.1 beschrieben geerntet und in 5 ml frischem Kulturmedium resuspendiert. Anschließend wurden 20 µl Zellsuspension mit 80 µl Tryphtanblau versetzt und in die Neubauer-Zählkammer pipettiert. Unter dem Mikroskop wurden 16 Kleinquadrate in vier Großquadraten ausgezählt. Abgestorbene Zellen färbten sich durch Tryphtanblau blau und wurden nicht mitgezählt. Die Berechnung der Zahl der vitalen Zellen (ungefärbt) in der Suspension erfolgte unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors sowie des Volumens der Suspension. Nach der Zentrifugation der Zellsuspension wurde eine für die verschiedenen Experimente definierte Zelldichte für die Weiterkultivierung im Kulturmedium eingestellt.

3.4.3 Auftauen und Einfrieren von eukaryotischen Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen wie in Kap. 5.1 beschrieben geerntet, in DMEM resuspendiert und anschließend die Zellzahl bestimmt (Kap. 3.4.2). 1×10^6 Zellen wurden zu je 1 ml in Kryoröhrchen überführt und in einer mit Isopropanol gefüllten Einfrierbox aufbewahrt, was ein langsames und schonendes Einfrieren gewährleistet. Nach 24 h wurden die Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff bei $-196 \text{ }^\circ\text{C}$ überführt und für den weiteren Bedarf aufbewahrt.

Zum Auftauen wurden die Zellen im Wasserbad bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ aufgetaut, in Kulturmedium aufgenommen und sofort zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen einmal mit 1x PBS gewaschen. Das Pellet wurde in 5 ml frischem Kulturmedium aufgenommen und die Zellen in eine 25 cm^2 Kulturflasche ausgesät.

3.4.4 Transfektion mittels Polyfect

Eine Transfektion bezeichnet das Einbringen von Plasmid-DNA in eine eukaryotische Zelle, um diese ein bestimmtes Protein produzieren zu lassen. In dieser Arbeit wurden die Transfektionen entweder mittels PolyFect oder mit Hilfe der Calciumphosphat-Methode (Kap. 3.4.5) durchgeführt.

Die Transfektion von Plasmid-DNA in HEK293 erfolgte mit dem auf Dendrimeren basierenden kommerziellen Transfektionsreagenz Polyfect. Dazu wurden am Vortag 6×10^5 Zellen pro Well in einer 6-Well Platte ausgesät. Zur Herstellung der Transfektionslösung wurden 2 μg DNA in 100 μl serumfreiem Medium aufgenommen und mit 20 μl Polyfect-Reagenz versetzt. Nach 15-minütiger Inkubation bei RT wurde das Nährmedium von den Zellen abgesaugt und die Transfektionslösung mit 2 ml frischem Nährmedium auf die Zellen gegeben. Die darauffolgenden Experimente wurden in einem Zeitrahmen von 24 bis 96 h durchgeführt.

3.4.5 Transfektion mittels Calciumphosphat

Die Transfektion von DsRed-Konstrukten erfolgte mittels Calciumphosphat. Dazu wurden Zellen auf 5 cm Kulturschalen bis zu einer Konfluenz von ca. 70 % kultiviert und im Anschluss mit der Calciumphosphat-Methode transfiziert. In einem Reaktionsgefäß wurden je 41 μl 1 M CaCl_2 vorgelegt, zu dem das entsprechende Volumen der jeweiligen Plasmid-DNA hinzugefügt wurde. Mit RNase-freiem Wasser wurde der Ansatz auf 250 μl aufgefüllt und vorsichtig vermischt. Das Plasmid-Gemisch wurde tropfenweise zu 165 μl 2 x BBS-Puffer pipettiert, so dass sich Schlieren bildeten. Mit der Pipette wurden im Anschluss vorsichtig Luftblasen zum Vermischen der Lösung erzeugt. Nach 15-minütiger Inkubation bei RT wurden die 250 μl des Transfektionsmix tropfenweise auf die ausgesäten HEK293-Zellen gegeben, die Gewebeschale vorsichtig hin- und hergeschwenkt und die Zellen bei 37 °C für 24 bis 36 h im Inkubator kultiviert.

3.4.6 Stabile Transfektion von Zellen

Bei der transienten Transfektion (Kap. 3.4.4 und 3.4.5) befindet sich oftmals nur in einem kleinen Teil der Zellpopulation das gewünschte Plasmid. Für Koimmunopräzipitationen oder Koloalisationsstudien ist es jedoch wünschenswert, dass nahezu alle Zellen das Protein exprimieren. Zum einen damit sichere Aussagen über die Wirkung des exogenen Proteins getätigt werden können, zum anderen um die Detektion des gewünschten Proteins zu verbessern. Eine Möglichkeit dies zu erreichen, stellt die stabile Integration der Plasmid-DNA in das Wirtsgenom dar. Nahezu alle Plasmide tragen zum jeweiligen Gen noch ein Resistenzgen gegen ein Antibiotikum, das unter der Kontrolle des gleichen Promotors steht. In Folge der Selektion transfizierter Zellen im entsprechenden Selektionsmedium, können Zellkolonien isoliert werden, die das gewünschte Plasmid in ihr Genom integriert haben.

Die Transfektion erfolgte wie in Kap. 3.4.4 oder Kap. 3.4.5 beschrieben. Nach 48 h wurden die Zellen in hohen Verhältnissen (1:25 und 1:50) auf neue Kulturschalen ausgesät. Von nun an wurde dem Medium das entsprechende Antibiotikum zugesetzt. In dieser Arbeit wurde ausschließlich G418 in einer Konzentration von 1,2 mg/ml für die Selektion einfach transfizierter HEK293-Zellen benutzt. Nach erneuten 48 h wurde die Antibiotikamenge auf 1 mg/ml herabgesetzt und das Medium täglich bis zum Auftreten kleiner Zellkolonien gewechselt. Die Zellkolonien wurden mit Hilfe einer Pipettenspitze gepickt und in das Well einer 24-Well Platte ausgesät. Die Zellen wurden weiter inkubiert und beim Erreichen von Konfluenz komplett auf die nächstgrößere Kulturplattengröße passagiert (Kap. 3.4.1). In der Zwischenzeit wurde die erfolgreiche Transfektion mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht und die Expression der gewünschten Proteine mittels Western-Blot analysiert. Für weiterführende Experimente wurde schließlich die Zellkolonie ausgewählt, bei der nahezu alle Zellen fluoreszierten und die Expressionstärke ausreichend für proteinbiochemische und fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen, allerdings für die Vermeidung von Überexpressionseffekten möglichst niedrig war.

3.4.7 Behandlung von Zellen mit Autophagie-Inhibitoren und anderen Reagenzien

ATG8-Proteine können in zwei verschiedenen Isoformen vorliegen. Entweder liegen sie in ihrer unlipidierten zytosolischen Form ATG8-I oder in einer mit Phosphatidylethanolamin lipidierten und membrangebundenen Form ATG8-II vor. Anhand der Lipidierung können Rückschlüsse auf den Status der Autophagie gezogen werden. Eine erhöhte Menge an ATG8-II bedeutet ein erhöhter autophagischer Flux. Da Autophagie ein dynamischer und zeitlich sehr schnell ablaufender Prozess ist, wurde bei ausgewählten Experimenten der Autophagie-Prozess durch Zugabe von 100 nM Bafilomycin A1 (BafA1) inhibiert.

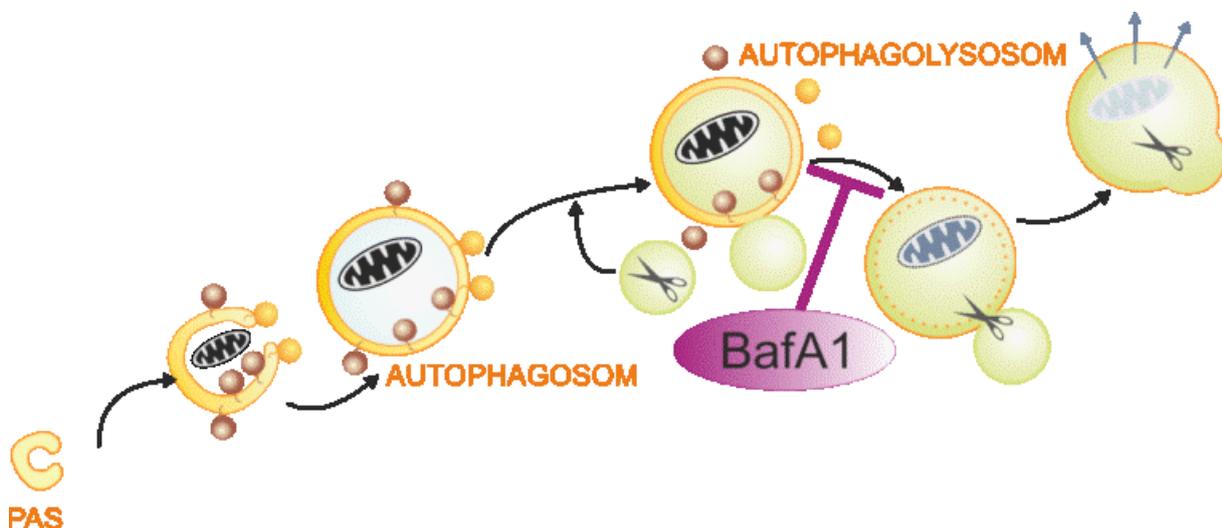


Abbildung 8 BafA1 hemmt die Fusion von Autophagosom und Lysosom

BafA1 inhibiert die vakuoläre H⁺-ATPase, sodass die Fusion von Autophagosom und Lysosom verhindert und es zu einer Akkumulation von Autophagosomen kommt.

3.5 Immunchemische Methoden

3.5.1 Pull-Down

Das Pull-Down-Experiment ist eine *in-vitro* Methode zur Bestimmung von Protein-Protein-Interaktionen. Dazu wird das Köderprotein zunächst an NHS-aktivierte Sepharose 4 fast Flow nach Herstellerangaben gekoppelt. Die NHS-Sepharose wurde mit der 10 bis 15-fachen Menge an eiskalter 1 mM HCl aktiviert und anschließend mit Kopplungspuffer äquilibriert. Daraufhin folgte eine zweistündige Inkubation mit dem Köderprotein bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurden freie NHS-Gruppen mit 100 mM Tris-HCl pH 8,8 blockiert und durch dreimaliges alternierendes Waschen mit 0,1 M Natriumacetat + 0,5 M NaCl (pH 4) und 0,5 M Ethanolamin + 0,5 M NaCl (pH 8) nicht gebundene Proteine von der Säule gewaschen. Grundsätzlich wurden pro Ansatz 25 µl NHS-Sepharose mit 50 µg Protein gekoppelt. Die Proteingekoppelte Sepharose wurde sofort weiterverwendet. Dazu folgte zunächst ein Waschschriff mit Bindepuffer, bevor die Sepharose mit der Proteinlösung inkubiert wurde. Der Ansatz wurde 4 Stunden bei 4°C inkubiert. Nach zweimaligen waschen mit 1 x PBS wurden die gebundenen Proteine mit Elutionspuffer eluiert. Das Eluat wurde sofort durch Zugabe von 10 µl 1,5 M Tris pH 8,8 neutralisiert. Zur höheren Konzentrierung wurden die Wasch- und Elutionsfraktionen einer Methanol-Chloroform-Fällung (Kap. 3.2.9) unterzogen und mittels SDS-Page überprüft (Kap. 3.2.5).

Tabelle 22 Lösungen für Pull-Down-Experimente

Bezeichnung	Zusammensetzung
Kopplungspuffer	200 mM NaPO ₄ , 50 mM NaCl, 15 mM β-Mercaptoethanol, pH 8,0
Waschpuffer	10 mM Tris-HCl, 150 mM HCl, pH 7,4
Blockierungspuffer	100 mM Tris-HCl, pH 8,0
Waschpuffer 2	100 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, pH 8,0
Waschpuffer 3	100 mM Natriumacetat, 500 mM NaCl, pH 4,5
Elutionspuffer	50 mM Glycin, pH 2,3

3.5.2 Koimmunopräzipitation

Die Koimmunopräzipitation (Co-IP) ist eine Methode zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen. Dabei werden Zielproteine in einem Gesamtzelllysat durch spezifische Antikörper gebunden und isoliert. Für die Koimmunopräzipitationsexperimente wurde das Pierce *Co-Immunoprecipitation Kit* benutzt (Tab. 10). Hierbei erfolgte im ersten Schritt die Kopplung der Antikörper über primäre Amine (-NH₂) an eine aktivierte Aldehydgruppe, die mit der Agarose verbunden war. Während der Inkubation von Antikörper und Agarose reagieren in einer reduktiven Aminierungsreaktion die Aminogruppen der Lysinreste mit den Aldehydruppen an der Agarose unter Ausbildung einer Schiff'schen Base. In einem zweiten Schritt werden diese Bindungen in Gegenwart von Natriumcyanoborohydrid in stabile sekundäre Amine umgewandelt. Für die Kopplung wurden 50 µl Agarose pro Ansatz eingesetzt. Die in Kopplungspuffer äquilibrierte Säule wurde im Anschluss mit 50 µg Antikörper, verdünnt in 200 µl Kopplungspuffer, und mit 3 µl Natriumcyanoborohydrid für 2 h inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Antikörper-Lösung abgenommen und die Säule mit Kopplungspuffer gewaschen. Um freie Bindestellen zu blockieren wurde das Säulenmaterial mit 200 µl Quenching Puffer und 3 µl Natriumcyanoborohydrid für 15 min inkubiert. Abschließend wurde das Säulenmaterial zuerst mit Quenching Puffer, dann mit Waschpuffer gewaschen. Parallel zur Antikörperkopplung wurden die Zellen mit dem Lysepuffer des Kits, lysiert. Bevor das Zellysat mit der Antikörper-gekoppelten Sepharose inkubiert werden konnte, wurde das Lysat mit *control agarose resin* inkubiert, um unspezifische Bindungen an das Säulenmaterial zu minimieren. Im letzten Schritt wurden 500 µg Gesamtproteinmenge des Lysats mit der Antikörper-gekoppelten Sepharose bei 4 °C inkubiert. Nach vierstündiger Inkubation wurde der Durchfluss aufgefangen, die Säule zweimal mit 200 µl Waschpuffer gespült und schließlich die gebundenen Komplexe mit 50 µl Elutionspuffer eluiert. Alle Proben wurden mittels Methanol-Chloroform-Fällung konzentriert (Kap. 3.2.9) und einer Western-Blot Analyse unterzogen (Kap. 3.2.7).

3.5.3 Tet-On-System (Gossen und Bujard 1992)

Ein weit verbreitetes System zur induzierten Genexpression ist das bakterielle Tet-System. Der Vorteil dieses Systems ist ein universell zellgängiger Induktor wie Doxycyclin (DOX) sowie ein Regulatorprotein, der Tet-Repressor, der seine Liganden mit hoher Affinität und Spezifität bindet. Demnach besteht das Tet-System zum einen aus dem vom Liganden DOX abhängigen und somit exogen und reversibel induzierbaren Effektor tTa und zum anderem aus dem über die TRE-CMV-Minimalpromotorkassette gesteuerten Transgen als Responder. Zum ersten Mal wurde das Tet-System in Pflanzen angewendet (Gatz & Quail 1988). Hierbei wurde die sogenannte TATA-Box eines Promotors mit drei tet-Operatoren flankiert, wodurch eine Transkription durch den konstitutiv exprimierten TetR reprimiert und erst durch Zugabe von Doxycyclin induzierbar gemacht wurde. Da die erzielte Repression bei Säugetieren oft unvollständig war, wurden die Regulatorsysteme so weiterentwickelt, dass TetR als Doxycyclin-induzierbare, spezifische DNA-Bindeeinheit fungiert, die mit eukaryotischen Regulatordomänen fusioniert wird. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten TetOn3G wurde das Transaktivatorprotein durch fünf Mutationen so verändert, dass die Induktion mit deutlich geringeren Doxycyclin-Konzentrationen möglich ist. Grundsätzlich lässt sich sagen, dass im TetOff-System (tTA) die Expression erlischt, sobald dem Medium Doxycyclin zugegeben wird, während es beim TetOn-System (rtTA) zur transkriptionellen Induktion führt.

Die Etablierung doppelt stabiler Tet-On-Zellen, die sowohl das Regulations- als auch das Response-Plasmid enthalten, erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Dazu wurden HEK293 zunächst mit 5 µg des Tet-On 3G-Plasmids transfiziert. Die Selektion transfizierter Zellklone erfolgte aufgrund der auf dem Plasmid codierenden G418-Resistenz (Kap. 3.4.6). Nach der Isolierung und Anzucht der Zellen wurden diese mit Hilfe des Tet-induzierbaren Luziferase Reporter Konstrukts auf die Induzierbarkeit des Transgens untersucht. Dazu wurden von jedem Zellklon zwischen 30 und 50 Zellklone transient mit dem Luziferase-Reporter Plasmid transfiziert. Nach 24 h wurde dem Zellkulturmedium für 2 Tage bis zur Ernte der Zellen Doxycyclin in einer Endkonzentration von 100 ng/ml zugegeben. Die Analyse der Luziferase-Aktivität erfolgte wie in Kap. 3.3.1.5 beschrieben. Drei der Zellklone, die die höchste Induktion der Reporter gen Aktivität zeigten, wurden im Anschluss mit 10 µg des Responseplasmids in Kombination mit pTRE2hygro cotransfiziert. Hierbei konnten

transfizierte Zellen anhand ihrer Hygromycin-Resistenz identifiziert werden. Nach der erneuten Isolierung und Anzucht der Zellen wurde die Expression des Transgens durch eine 24stündige Inkubation mit 100 nM Doxycyclin im Kulturmedium initiiert. Die Expression wurde mittels Western-Blot analysiert.

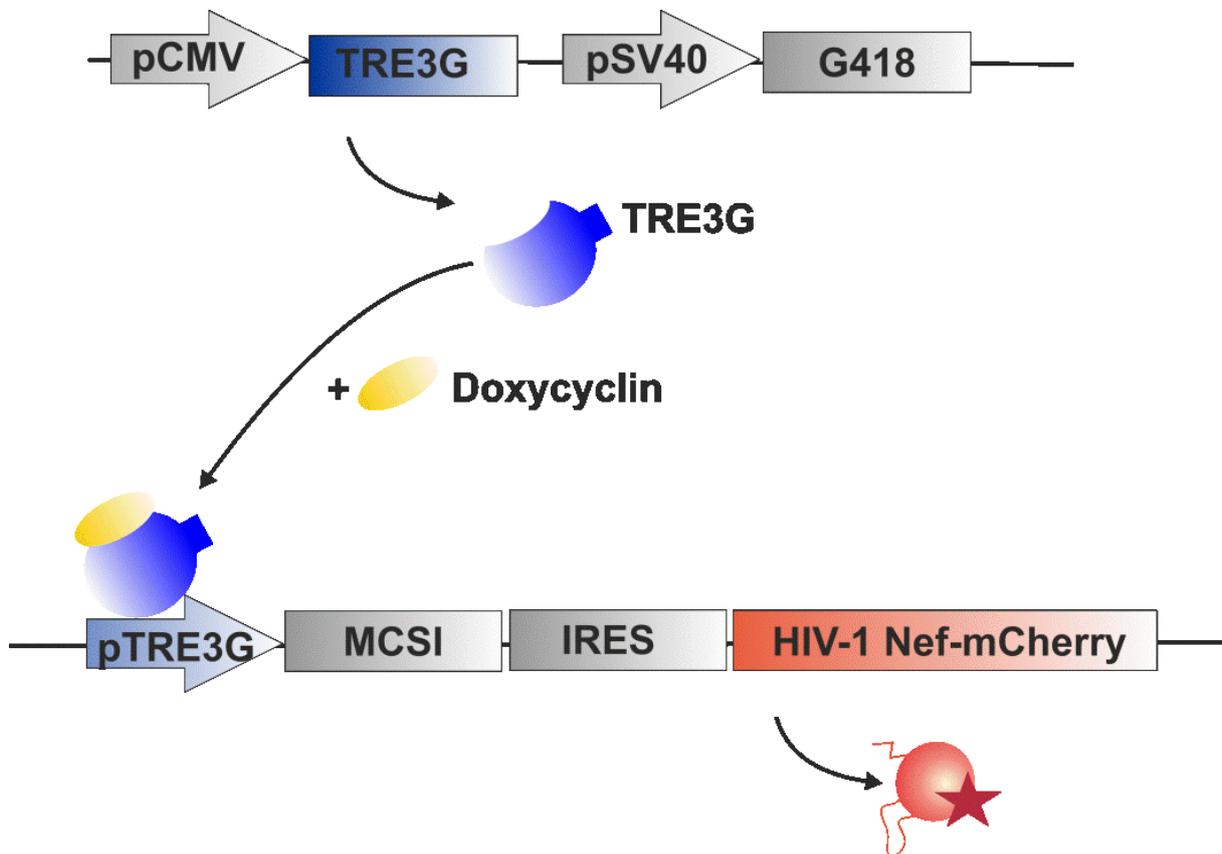


Abbildung 9 Das TetOn-3G System

Das Tet-On 3G System erlaubt die Expression des Nef-mCherry Gens nur in der Anwesenheit von Doxycyclin. Doxycyclin bindet an den Transkriptionsfaktor TRE3G, wodurch dieser eine Konformationsänderung, an den Promotor (pTRE3G) bindet und schließlich die Expression von Nef-mCherry aktiviert.

3.5.4 Isolierung von Exosomen

Für die Isolierung wurden die Zellen am Vortag mit DMEM + 10 % exosomenfreien FCS inkubiert. Dadurch wird gewährleistet, dass es während der Präparation von Exosomen zu keiner Verunreinigung von Kälber-Exosomen kommt. Im ersten Schritt wurde der Zellüberstand abgenommen und bei 3000 g für 15 min zentrifugiert, um Zellen bzw. Zellbestandteile zu beseitigen. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 63 µl ExoQuik solution je 250 µl Überstand versetzt. Nach 12-stündiger Inkubation bei 4 °C wurde die ExoQuick/Überstands-Lösung bei 1500 x g für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Exoquick-Lösung erneut bei 1500 x g für 5 min zentrifugiert. Die so gewonnen Exosomen wurden entweder via Western-Blot (Kap. 3.2.7) analysiert oder für den Exoarray (Kap. 3.5.5) eingesetzt.

3.5.5 Exosomen-Antikörper-Array

500 µg der mittels Exoquick Solution isolierten Exosomen wurden mit 600 µl Exosomen-Lysepuffer versehen und 15 s gevortext. In einem neuen Reaktionsgefäß wurden diese 600 µl in 9,4 ml Bindepuffer verdünnt. Gleichzeitig wurde die mitgelieferte Pepspot-Membran für zwei Minuten in dH₂O geschwenkt und anschließend mit der Bindepuffer/Exosomen-Lösung über Nacht inkubiert. Nachdem die Membran 3 x 5 min mit Waschpuffer gewaschen wurde, erfolgte die Detektion der Proteine. Dazu wurde die Membran zwei Stunden mit 2 ml Entwicklungslösung inkubiert und im Anschluss mittels Chemilumineszenz analysiert.

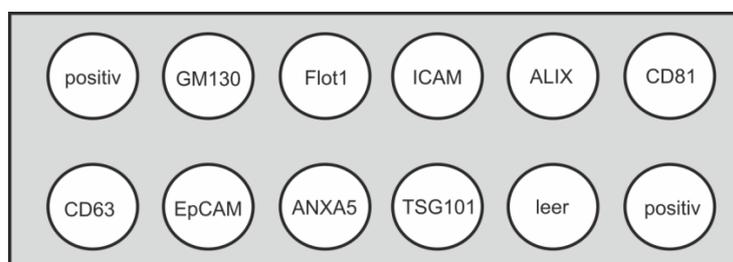


Abbildung 10 Exoarray

Anordnung der auf dem ExoArray fixierten Antikörper.

Tabelle 23 Liste der gekoppelten Antikörper des ExoArrays

Gekoppelter Antikörper	Name des Gens
Positive	Positivkontrolle für HRP-Detektion
GM130	<i>cis-Golgi matrix protein</i>
FLOT1	<i>Flotillin 1</i>
ICAM1	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i>
ALIX	<i>PDCD6IP, Programmed cell death 6 interacting protein, AIP1/DRIP4/HP95</i>
CD81	<i>IGSF8, Immunoglobulin superfamily, member 8</i>
CD63	<i>CD63, LAMP-3</i>
EpCAM	<i>Epithelial cell adhesion molecule</i>
ANXA5	<i>Annexin A5</i>
TSG101	<i>Tumor susceptibility gene 101</i>
BLANK	Leer
Positive	Positivkontrolle für HRP-Detektion

3.5.6 siRNA Technologie

Mithilfe der RNA-Interferenz (RNAi) kann in eukaryotischen Zellen die Genexpression einzelner Gene spezifisch gehemmt werden. Dabei macht man sich zu Nutze, dass kurze RNA-Stücke mit einer Länge von ca 25 Nukleotiden, welche als sogenannte *small interfering RNA* (siRNA) sehr effizient und spezifisch über Basenpaarung an einer komplementären Ziel-RNA binden und dort als Leitmotiv für eine Nuklease dienen können. Dies führt zum Abbau der komplementären mRNA-Sequenz des Zielgens, sodass die Proteintranslation unterbleibt (Elbashir, Harborth et al. 2001).

Für die Inhibierung der ATG8s wurden siSMARTPools von Dharmacon verwendet (Tab. 24). Dabei erfolgte die Transfektion nach Herstellerangaben mit Dharmafect1. Am Vortag wurden pro Well einer 6-Well Platte 1×10^4 Zellen ausgesät und in Medium ohne Antibiotikum inkubiert. Für die Transfektion wurden 10 μ l einer 5 μ M siRNA-Lösung in 190 μ l serumfreiem Medium verdünnt. In einem zweiten Reaktionsgefäß wurden gleichzeitig 5 μ l Dharmafect in 185 serumfreiem Medium aufgenommen. Beide Ansätze wurden durch mehrfaches Pipettieren vereinigt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde der gebildete siRNA-Transfektionsansatz-Komplex auf mit 1,6 ml frischen Medium versehenen Zellen gegeben, um eine finale siRNA-Konzentration von 50 nM zu erhalten. Für Experimente, bei denen zeitlich mehrere Gene ausgeschaltet werden sollten, wurden

jeweils 50 nM der entsprechenden siRNA verwendet und die Dharmafect1-Menge entsprechend erhöht.

Tabelle 24 Liste der eingesetzten siRNAs (Dharmacon, Lafayette, USA)

siGENOME	Nummer
HumanGABARAP	M-012368-01
HumanGABARAPL1	M-014715-01
HumanGABARAPL2	M-006853-02
HumanMAPLC3A	M-013579-00
HumanMAPLC3B	M-012846-01
HumanMAPLC3C	M-032399-00
Non-tarteting	D-001206-14

3.5.7 Herstellung von Zelllysaten

Zur Herstellung eines Zelllysats wurden die Zellen nach einmaligen Waschen mit warmen PBS in 1 ml Zelllysepuffer, der im Rahmen dieser Arbeit für die Detektion von von ATG8-Doppelbanden im Western-Blot optimiert wurde, (Tab. 25) aufgenommen. Die Zellsuspension wurde für zehn Minuten auf Eis inkubiert und anschließend für 45 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bis zur Verwendung auf Eis gelagert.

Tabelle 25 Zelllysepuffer

Name	Zusammensetzung
Zelllysepuffer	150 mM NaCl, 1 % Triton-X-100, 0.5 % sodiumdeoxycholat, 0.1 % SDS, 50 mM Tris pH 8.0, 1 U Lysozym, 1 x HALT-Proteaseinhibitor

3.6 Mikroskopie

3.6.1 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

3.6.2 Grundlagen

Gegenüber der Weitfeldmikroskopie, bei der auch Signale aus Gegenstandsebenen, die über oder unter der Fokusebene liegen, abgebildet werden, bietet die Entwicklung der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie entscheidende Vorteile. Da die konfokale Mikroskopie eine Detektion aus jeweils nur einer Gegenstandsebene ermöglicht und somit einen optischen Schnitt durch das Präparat legt. Dies ist besonders für Kolokalisationsstudien von Vorteil, da hier Signale, die auf einer optischen Achse, jedoch auf unterschiedlichen z-Ebenen, liegen, sauber voneinander getrennt werden müssen. Zusätzlich können mehrere Schnittebenen im Nachhinein zu einem dreidimensionalen Bild rekonstruiert werden, um eine bessere Vorstellung von der räumlichen Morphologie des Präparats zu erhalten.

Während bei einem konventionellen Mikroskop das Objekt von einer inkohärenten Lichtquelle (z.B. einer Lampe) angestrahlt wird, wird bei der konfokalen Mikroskopie eine punktförmige Lichtquelle, oftmals ein Laser, genutzt. Ausgehend von der Lichtquelle wird das Anregungslicht über einen dichroischen Spiegel auf das Objekt geleitet. Daraufhin nimmt der Fluorophor das energiereiche Anregungslicht auf und emittiert, bedingt durch den *stoke shift*, Licht einer längeren, energieärmeren Wellenlänge. Der dichroische Spiegel auf den das zurückgeleitete Emissionslicht trifft, besitzt die Eigenschaft, kurzwelliges Licht zu reflektieren und langwelliges Licht passieren zu lassen. Aufgrund dessen wirkt dieses optische Element auch als Farbverteiler. Dadurch wird das Emissionslicht nicht zum Laser reflektiert, sondern gelangt über ein System von weiteren Filtern zu einem Photomultiplier, wo bereits wenige Photonen detektiert werden können. Vor dem eigentlichen Detektor ist das sogenannte pinhole eingebaut. Diese Lochblende sorgt dafür, dass nur Licht einer Gegenstandsebene erfasst wird und somit zu einem Zeitpunkt nur ein einziger Punkt im Präparat detektiert wird. Durch ein zeilenweises Antasten (Scannen) des Präparats entsteht in kurzer Zeit ein komplettes Bild der Schnittebene.

Alle Aufnahmen und Messungen wurden am konfokalen Laser Scanning Mikroskop Zeiss LSM 710, das mit einer PeCon-Inkubationskammer (Erbach, Deutschland) war und mit einem 63 x Objektiv mit ölkorrigierter Immersionslinse unter Lebendzellbedingungen bei 37 °C durchgeführt. Dabei wurden für jedes Bild die Einstellung wie folgt gewählt: pixel dwell 3,15 μ s, maximale Bildgröße, 12 bit und ein *image averaging* von 4. Im Normalfall wurden alle Zellbilder als z-stacks aufgenommen mit einem Intervall zwischen 1 bis 12 μ m aufgenommen.

4 Ergebnisse

4.1 Die Induktion von Autophagie führt zur Akkumulation vesikulärer Strukturen in HEK293-Zellen

4.1.1 Expressionsvektoren für GABARAP, GABARAPL1, GABARAPL2, LC3B oder Nef fusioniert mit diversen fluoreszierenden Proteinen für die Lebendzell-Mikroskopie

Um das Nef-Protein und die ATG8-Proteine unter Lebendzellbedingungen untersuchen zu können, wurden entsprechende Fusionen mit verschiedenen fluoreszierenden Proteinen kloniert. Dies erfolgte mit den in den Kapiteln 3.1.5 bis 3.1.13 beschriebenen Methoden und ergab Expressionsvektoren für Nef-CFP (pNef-CFP), für N-terminale EYFP-Fusionen von GABARAP, GABARAPL1, GABARAPL2 und LC3B (pEYFP-GABARAP, pEYFP-GABARAPL1, pEYFP-GABARAPL2 und pEYFP-LC3B) und N-terminale ECFP-Fusionen von GABARAP, GABARAPL1, GABARAPL2 und LC3B (pECFP-GABARAP, pEYCFP-GABARAPL1, pECFP-GABARAPL2 und pECFP-LC3B). Im Detail wurde die kodierende Region für HIV-1 Nef (Isolat SF2) -Protein aus dem Vektor pPS-CFP2-N_Nef mit den Restriktionsenzymen *HindIII* und *BamHI* ausgeschnitten und in den Vektor pECFP-N1, der ebenfalls mit *HindIII* und *BamHI* verdaut wurde, ligiert. Vor die GABARAP bzw. GABARAPL1 kodierende Region wurde mit Hilfe der Vektoren pGEX4T2-GABARAP und pGEX4T2-GABARAPL1/GEC1 und mittels konventioneller PCR Schnittstellen für *XhoI* und *BamHI* eingefügt. Die resultierenden PCR-Produkte sowie der Zielvektor pEYFP-C1 wurden mit *BamHI* und *XhoI* verdaut und im Anschluss ligiert. Die kodierenden Regionen für GABARAPL2 und LC3B wurden als synthetische Gene mit den entsprechenden Schnittstellen (siehe oben) in einem Standardvektor erworben und anschließend in den Vektor subkloniert. Einzelheiten zu den Ausgangs- und Zielvektoren sind in Tabelle 12 zu finden.

4.1.2 Etablierung von stabilen Zelllinien

Zusätzlich wurden mehrere stabile HEK293-Zelllinien wie in Kap. 3.4.6 beschrieben etabliert, um generell unabhängiger vom Transfektionserfolg zu sein. Es wurden stabile Linien für die konstitutive Expression von Nef-CFP, YFP-GABARAP, YFP-GABARAPL1, YFP-GABARAPL2 und YFP-LC3B erstellt.

4.1.3 Lebendzell-Fluoreszenzmikroskopie von ATG8-Proteinen in verschiedenen Autophagiestadien

Zunächst sollte untersucht werden, ob die einzelnen ATG8-Familienmitglieder ähnliche Verteilungsmuster innerhalb der Zellen aufweisen. Dazu wurden für drei Ansätze jeweils 1×10^5 Zellen der stabil mit pEYFP-GABARAP, pEYFP-GABARAPL1, pEYFP-GABARAPL2 oder pEYFP-LC3B transfizierten HEK293-Zelllinien ausgesät (Kap. 4.1.2). Die Inkubation erfolgte in phenolrotfreiem DMEM mit 10 % FCS. Nach 48 h wurde pro Konstrukt ein Ansatz in DMEM mit 10 % FCS (basale Autophagie), ein Ansatz mit DMEM mit 10 % FCS und 100 nM BafA1 (basale Autophagie, Hemmung der Fusion von Lysosom und Autophagosom) und ein Ansatz mit HANKS und 100 nM BafA1 (induzierte Autophagie, Hemmung der Fusion von Lysosom und Autophagosom) für jeweils 4 h inkubiert, bevor die Zellen mittels konfokaler Laserscanningmikroskopie (Kap. 3.6.1) analysiert wurden.

Wie der Abbildung 11 entnommen werden kann, folgte LC3B den bereits bekannten Verteilungsmustern unter den untersuchten Bedingungen (Kabeya et al., 2000). Unbehandelte Zellen wiesen eine gleichmäßige, zytosolische Verteilung des Proteins auf. Nach zusätzlicher vierstündiger Inkubation mit 100 nM BafA1 lokalisierte LC3B in kleineren, über die gesamte Zelle verteilten vesikulären Strukturen. Die Anzahl dieser vesikulären Strukturen war deutlich erhöht, wenn die Zellen unter Hungerbedingungen (HANKS) inkubiert und gleichzeitig deren Fusion mit dem Lysosom durch BafA1 gehemmt wurde. Das Verteilungsmuster der einzelnen GABARAPs Mitglieder entsprach dem von LC3B. So konnte auch in diesem Fall bei Inhibierung der Autophagie durch BafA1 eine Akkumulation in vesikulären Strukturen nachgewiesen werden, die unter Hungerbedingung noch einmal verstärkt wurde. Bei den vesikulären Strukturen handelte es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um Autophagosomen, da

LC3B (und seine GFP- sowie GFP-Derivate) ein anerkannter Autophagosomenmarker ist und eine Sensitivität zu BafA1 vorlag (Kabeya, Mizushima et al. 2004).

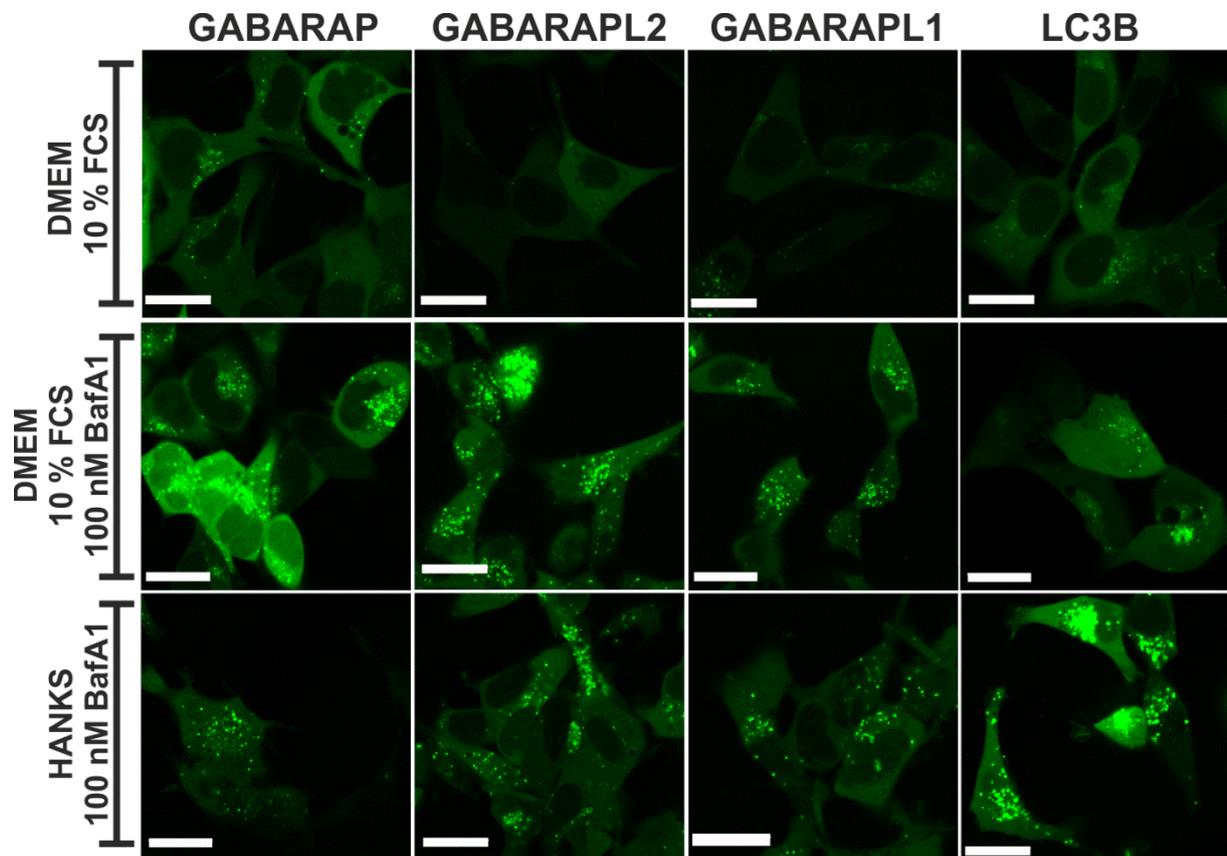


Abbildung 11 Subzelluläre Lokalisation von YFP-GABARAP, YFP-GABARAPL1 und YFP-LC3B

Stabil mit YFP-GABARAPL2, YFP-GABARAP, YFP-GABARAPL1 und YFP-LC3B transfizierte HEK293-Zellen wurden entweder in DMEM mit 10 % FCS in An- (Mitte) und Abwesenheit von BafA1 (links) oder in HANKS mit BafA1 (rechts) analysiert. Maßstabskala: 20 μ m.

4.1.4 Lebendzell-Fluoreszenzmikroskopie von Nef bei verschiedenen Autophagiestadien

Im nächsten Schritt sollte die Lokalisierung von Nef in den Zellen bei den gleichen Inkubationsbedingungen, wie in Kapitel 4.1.3 beschrieben, untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden 1×10^5 Zellen der stabil mit pNef-CFP transfizierten Zellen ausgesät. Nach 48 h wurde ein Ansatz in DMEM mit 10 % FCS, ein Ansatz mit DMEM mit 10 % FCS und 100 nM Baf A1 und ein Ansatz mit HANKS und 100 nM BafA1 jeweils für 4 h inkubiert, bevor die Zellen mittels konfokaler Laserscanningmikroskopie analysiert wurden.

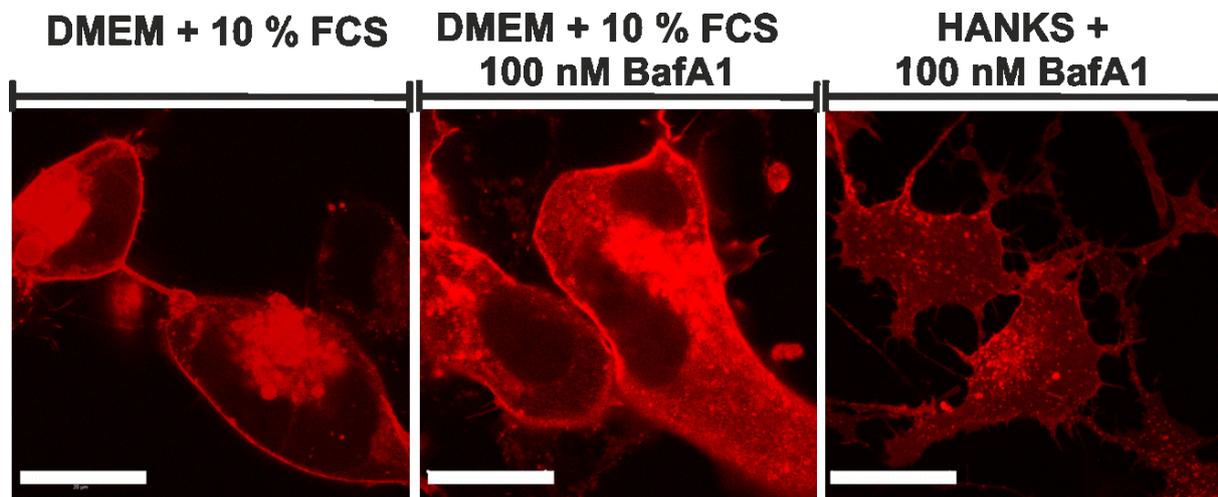


Abbildung 12 Subzelluläre Lokalisation von Nef

Stabil mit pNef-CFP transfizierte HEK293-Zellen wurden entweder in DMEM mit 10 % FCS in An-(Mitte) und Abwesenheit von BafA1 (links) oder in HANKS mit BafA1 (rechts) analysiert. Maßstabskala: 20 μm .

HEK293-Zellen, die stabil mit pNef-CFP transfiziert wurden, zeigen in DMEM und 10 % FCS, also unter Normalbedingungen, die subzelluläre Lokalisation, die für Nef bereits von anderen Systemen unter Live-Cell-Bedingungen bekannt ist. (Abb. 12) (Muratori, Cavallin et al. 2009). Dabei war eine deutliche Färbung der Plasmamembran, teils in punktförmigen Strukturen, zu erkennen. Im Zytoplasma konnte eine diffuse Verteilung von Nef nachgewiesen werden, wobei es an der Plasmamembran zu einer verstärkten Sekretion von Bläschen-ähnlichen Strukturen kam, die ihren Ursprung in der ER-Golgi-Region zu haben schienen. Zwischen den einzelnen Zellen konnte eine Lokalisation von Nef in den tubulären Zell-Zell-Kontakten nachgewiesen werden. Diese

Lokalisation von Nef konnte auch bei gleichzeitiger Inkubation mit BafA1 gefunden werden, wobei die diffuse Verteilung innerhalb des Zytoplasmas zu- und die Ausbildung der blasenförmigen Strukturen abzunehmen schien. Bei der Inkubation im Hungermedium nahm die Lokalisation des Proteins an der Plasmamembran und die Sekretion von Bläschen-ähnlichen Vesikeln noch deutlicher im Vergleich zu der Inkubation in DMEM, 10 % FCS und 100 nM BafA1 ab und die Verteilung in vesikulären Strukturen innerhalb des Zytoplasmas deutlich zu.

4.1.5 Nef kolokalisiert mit allen ATG8s, zeigt aber eine andere Verteilung mit GABARAP als mit LC3B

Für die Kolokalisationsstudien wurden 1×10^5 stabile pNef-CFP Zellen in phenolrotfreiem DMEM + 10 % FCS ausgesät (Kap. 3.4.1) und nach 24 h mit den Plasmiden pEYFP-GABARAP, pEYFP-GABARAPL1, pEYFP-GABARAPL2 und pEYFP-LC3B kotransfiziert (Kap. 3.4.4). Nach weiteren 48 h wurden die Zellen mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie analysiert (Kap. 3.6.1).

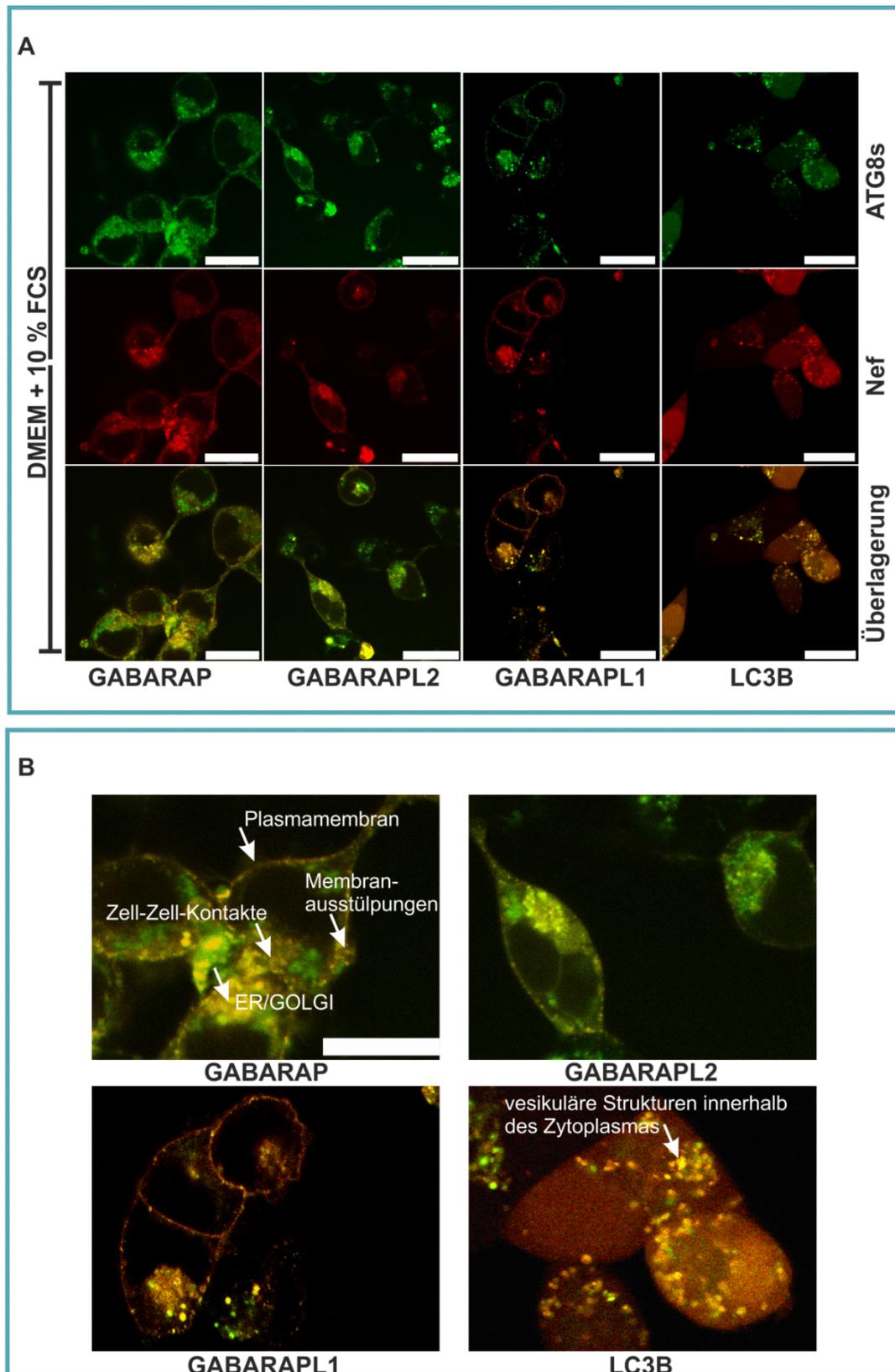


Abbildung 13 Kolokalisation von Nef mit GABARAP, GABARAPL1 und LC3B

(A) Stabil mit pNef-CFP transfizierte HEK293-Zellen wurden mit YFP-GABARAP (A), YFP-GABARAPL1 (B) und YFP-LC3B (C) kotransfiziert und 48 h später mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie analysiert. Unten ist die Kolokalisation als Überlagerung beider Fluoreszenzen dargestellt. Maßstabskala: 20 μ m. (B) Repräsentative Vergrößerungen aus A.

In Abbildung 13 sind die Ergebnisse der Kollokalisationsexperimente (A) mit entsprechenden Vergrößerungen (B) dargestellt. Dabei entsprach die Lokalisation von Nef (rot) in Zellen, die mit den verschiedenen GABARAPs Mitgliedern kotransfiziert wurden (grün), der für Nef alleine in stabil mit Nef-CFP transfizierten Zellen aus Abb. 12. Auch hier konnte eine diffuse Verteilung teils mit vesikulären Strukturen im Zytoplasma nachgewiesen werden. Besonders bei den Zellen, die mit GABARAPL2 und GABARAP kotransfiziert worden waren, konnte eine starke Ausbildung blasenförmiger Strukturen beobachtet werden. Ein völlig anderes Bild zeigte sich bei den Zellen, die mit Nef und LC3B transfiziert worden waren. Hier konnte weder eine Kollokalisierung in den blasenförmigen Strukturen, noch an der Plasmamembran beobachtet werden. Stattdessen kollokalisieren die beiden Proteine innerhalb punktförmiger vesikulärer Strukturen innerhalb des Zytoplasmas.

4.2 Nef immunopräzipitiert spezifisch mit den Mitgliedern der GABARAP/GABARAPL2-Familie

Im nächsten Schritt sollte mittels Koimmunopräzipitation untersucht werden, ob eines der ATG8-Proteine gemeinsam mit Nef aus dem Zelllysats stabil mit Nef-DsRed transfizierter HEK293-Zellen isoliert werden kann. Dazu wurden stabil mit Nef-DsRed transfizierte HEK293-Zellen nach Kap. 3.5.2 lysiert und die Proteinkonzentration des Zelllysats mit Hilfe eines BCA-Assays bestimmt (Kap. 3.3.1.4). Im Anschluss wurde die Koimmunopräzipitation, wie in Kap. 3.5.2 beschrieben durchgeführt. Als Köderantikörper wurde anti-mouse DsRed (für das Nef-DsRed Fusionsprotein) bzw. anti-rabbit GABARAP, anti-rabbit GABARAPL1, anti-rabbit GABARAPL2 und anti-rabbit LC3B eingesetzt (Tab. 11). Für die Detektion wurde jeweils der nicht in der Koimmunopräzipitation verwendete Antikörper als Primärantikörper und ein dazu passender HRP-konjugierter Sekundärantikörper eingesetzt.

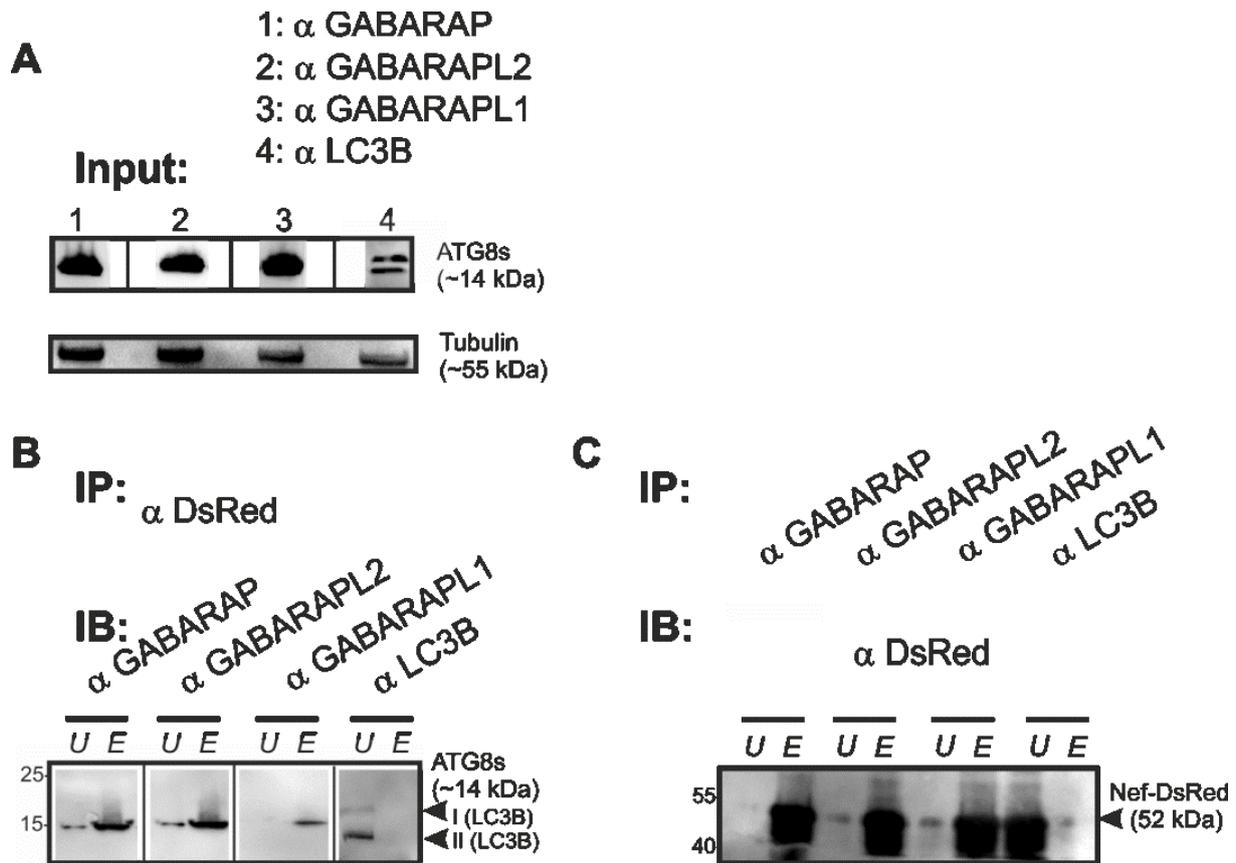


Abbildung 14 Nef präzipitiert mit endogenem GABARAP, GABARAPL1 und GABARAPL2, aber nicht mit LC3B

Koimmunopräzipitation von Nef mit endogenen GABARAP, GABARAPL1, GABARAPL2 und LC3B. (B) Präzipitation mit anti DsRed-Antikörper und Western-Blot Detektion mit spezifischen Antikörpern gegen GABARAP, GABARAPL1, GABARAPL2 und LC3B. (C) Präzipitation mit anti GABARAP, GABARAPL1, GABARAPL2 oder LC3B Antikörper und Western Blot Detektion mit anti DsRed-Antikörper. (A) Inputkontrolle.

Abbildung 14 zeigt die Ergebnisse der Koimmunopräzipitationen von Nef und endogenem GABARAP, GABARAPL1, GABARAPL2 und LC3B. Im Fall der mit dem anti-DsRed-Antikörper inkubierten Lysate, konnten sowohl endogenes GABARAP, GABARAPL1 als auch GABARAPL2 zusammen mit Nef präzipitiert werden. LC3B konnte dagegen nur im Durchfluss nachgewiesen werden. Im reziproken Experiment, bei dem das Zelllysate mit den verschiedenen ATG8-Antikörpern inkubiert wurde, konnte Nef in den Eluat-Fractionen von GABARAP, GABARAPL1 und GABARAPL2 nachgewiesen werden. Bei dem mit dem anti-LC3B-Antikörper inkubierten Zelllysate konnte Nef nur in der Durchfluss-Fraktion detektiert werden. Anhand der durchgeführten Input-Kontrolle bei der 10 % des Inputs eingesetzt wurden, konnte gezeigt werden, dass in allen Experimenten die gleiche Proteinmenge benutzt und GABARAP, GABARAPL1, GABARAPL2 und LC3B in ausreichenden Mengen exprimiert wurden.

Aufgrund der hohen Homologie zwischen den einzelnen ATG8-Proteinen, ist es schwierig spezifische Antikörper gegen die einzelnen Homologen herzustellen. Da es Hinweise gibt, dass der in dieser Arbeit verwendete Antikörper gegen GABARAPL1 nicht nur GABARAPL1, sondern auch GABARAP detektieren kann (Le Grand, Chakrama et al. 2011), wurde die Koimmunopräzipitation noch einmal mit Zellen, die mit YFP-fusionierten ATG8-Proteinen kotransfiziert wurden, wiederholt. Die Detektion der einzelnen ATG8s erfolgte in diesem Fall über deren YFP-Fusion mit einem anti GFP-Antikörper, der auch die GFP-Abwandlungen CFP und YFP detektiert.

Für die Koimmunopräzipitation wurden 1×10^5 stabil exprimierende pNef-DsRed Zellen ausgesät (Kap. 3.4.1) und nach 24 h mit den Plasmiden pEYFP-C1, pEYFP-GABARAP, pEYFP-GABARAPL1, pEYFP-GABARAPL2 und pEYFP-LC3B kotransfiziert (Kap. 3.4.4). Als Negativkontrolle wurde ein Ansatz mit nicht kotransfizierten Zellen mitgeführt. Nach 48 h wurden die Zellen mit RIPA-Puffer lysiert und die Koimmunopräzipitation mit dem CO-IP Kit (Tab. 10) durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 15 dargestellt.

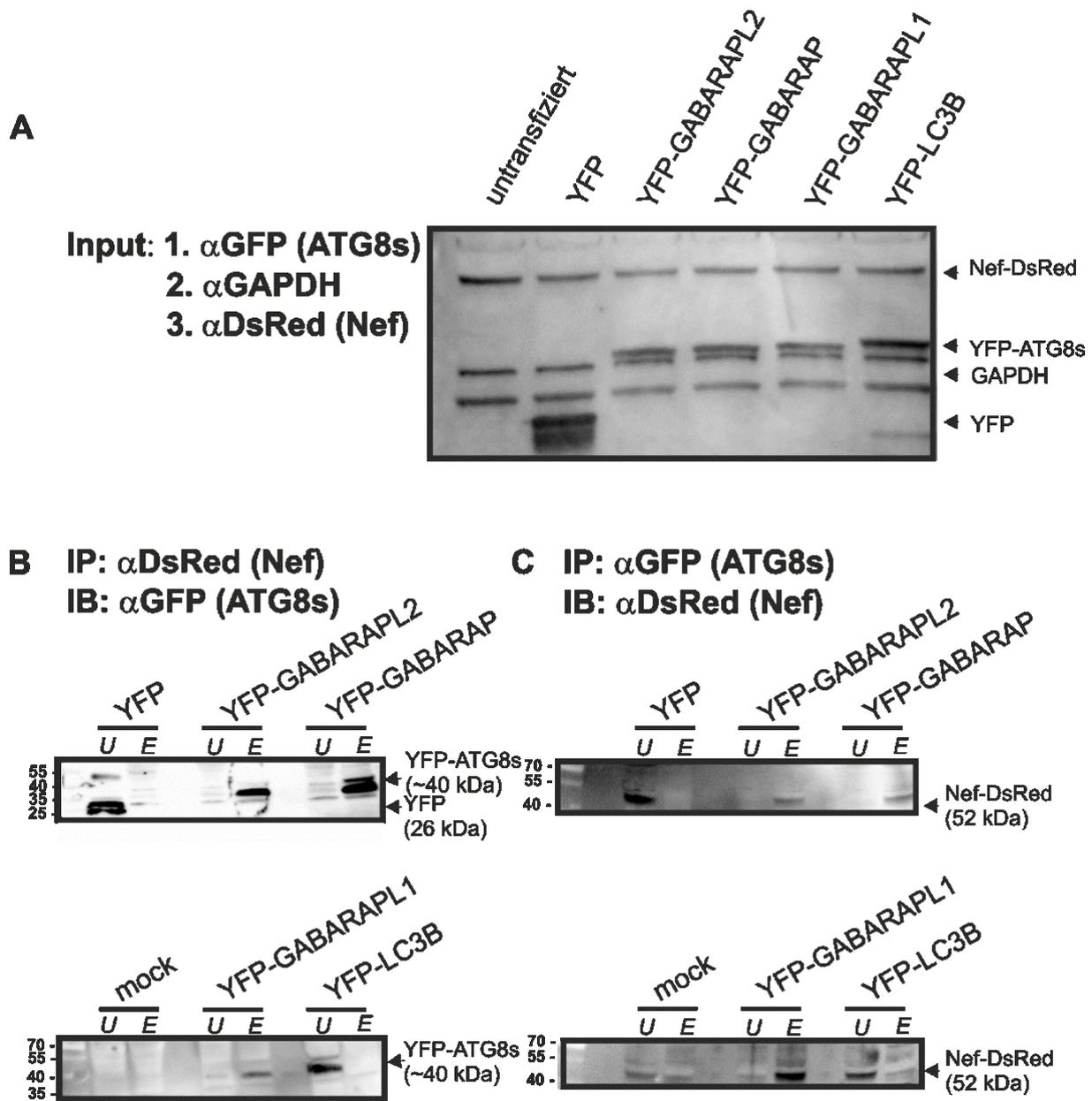


Abbildung 15 Koimmunopräzipitation von Nef-DsRed und YFP-fusionierten ATG8s

Koimmunopräzipitation von Nef mit YFP-GABARAP, -GABARAPL1, -GABARAPL2 und -LC3B. (A) Inputkontrolle. (B) Präzipitation mit anti DsRed-Antikörper und Western-Blot Detektion mit rabbit anti GFP-Antikörper. (C) Präzipitation mit anti GFP-Antikörper und Western Blot Detektion mit mouse anti DsRed.

Wie der Abbildung 15 entnommen werden kann, exprimierten alle Zellen im Vergleich mit GAPDH Nef-DsRed in gleichem Maße. Auch die Proteine der kotransfizierten Plasmide konnten in den jeweiligen Zellen mittels Western-Blot (Kap. 3.2.7) nachgewiesen werden.

Wurden die Präzipitate mit dem anti-DsRed-Antikörper präzipitiert, konnten im Western Blot GABARAPL2, GABARAP und GABARAPL1 im Eluat nachgewiesen werden. LC3B dagegen wurde nur im Durchfluss detektiert und konnte nicht über die

Bindung an Nef präzipitiert werden. Da YFP alleine ebenfalls nur in der Durchflussfraktion zu finden war, konnte eine unspezifische Bindung über YFP als Grund für das Präzipitieren von GABARAPL2, GABARAP und GABARAPL1 ausgeschlossen werden. Das reziproke Experiment bei dem die Zelllysate mit dem anti-GFP Antikörper präzipitiert wurden, bestätigte die Ergebnisse. Im Fall von GABARAPL2, GABARAP und GABARAPL1 konnte Nef-DsRed im Eluat nachgewiesen werden. Bei den nicht-kotransfizierten, mit YFP transfizierten und bei den Lysaten der mit YFP-L3B transfizierten Zellen, konnte Nef-DsRed nur im Durchfluss detektiert werden.

4.3 Nef bindet direkt an GABARAP, GABARAPL1 und GABARAPL2

Wie die Koimmunopräzipitations-Experimente zeigten, ließen sich die Mitglieder der GABARAP-Familie zusammen mit Nef aus dem Zelllysate stabil mit Nef-DsRed transfizierter Zellen bzw. aus dem Zelllysate zusätzlich mit YFP-GABARAP, -GABARAPL1 und -GABARAPL2 kotransfizierter Zellen isolieren (Abb. 14 und 15). Um zu klären, ob diese Interaktion direkt ist, oder durch einen bisher unbekanntem Bindungspartner im Zelllysate vermittelt wird, wurde ein direkter Bindungsassay (Pull-Down), wie in Kapitel 3.5.1 beschrieben, durchgeführt.

Dazu mussten die einzelnen Proteine, wie in den Kapiteln 3.2.1, 3.2.3 und 3.2.4 beschrieben, zunächst in *E.coli* exprimiert und gereinigt werden. Die gereinigten Proteine sind in Abbildung 16 dargestellt.

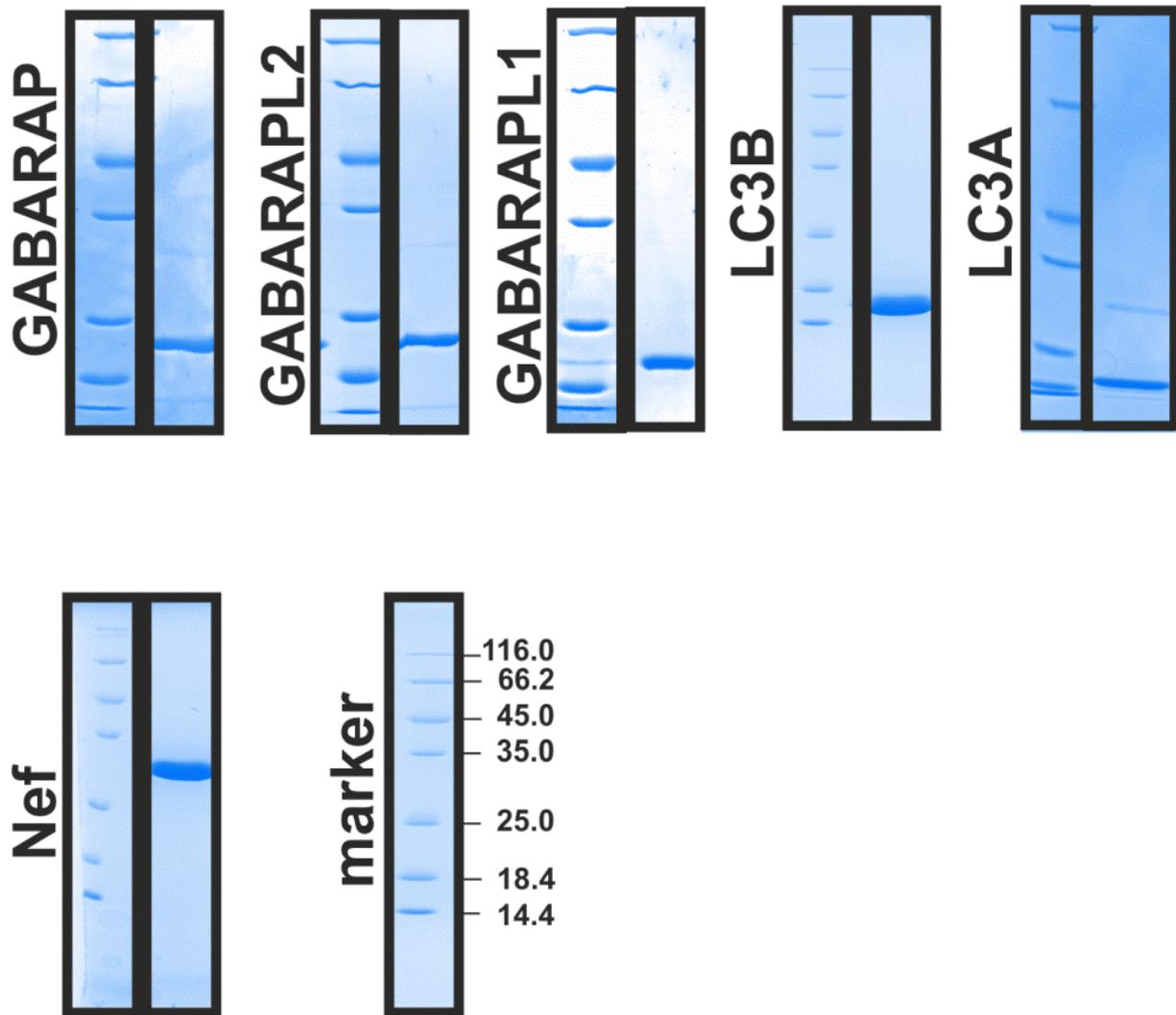


Abbildung 16 Reinheit der rekombinaten Proteine **GABARAP**, **GABARAPL1**, **GABARAPL2**, **LC3B**, **LC3A** und **Nef**

Gezeigt sind jeweils 2 µg der gereinigten Proteine nach deren gelelektrophoretischer Auftrennung (15% SDS-PAGE) und CBB-Färbung.

Für den Bindungsassay wurde Nef, wie in Kap. 3.5.1 beschrieben, über Aminkopplung an NHS-Sepharose gekoppelt und mit rekombinanten GABARAP, GABARAPL1, GABARAPL2, LC3A und LC3B inkubiert. Nach harschem Waschen des Säulenmaterials wurden die gebundenen Proteine eluiert, mittels Methanol und Chloroform gefällt (Kap. 3.2.9) und mittels SDS-PAGE (Kap. 3.2.5) analysiert.

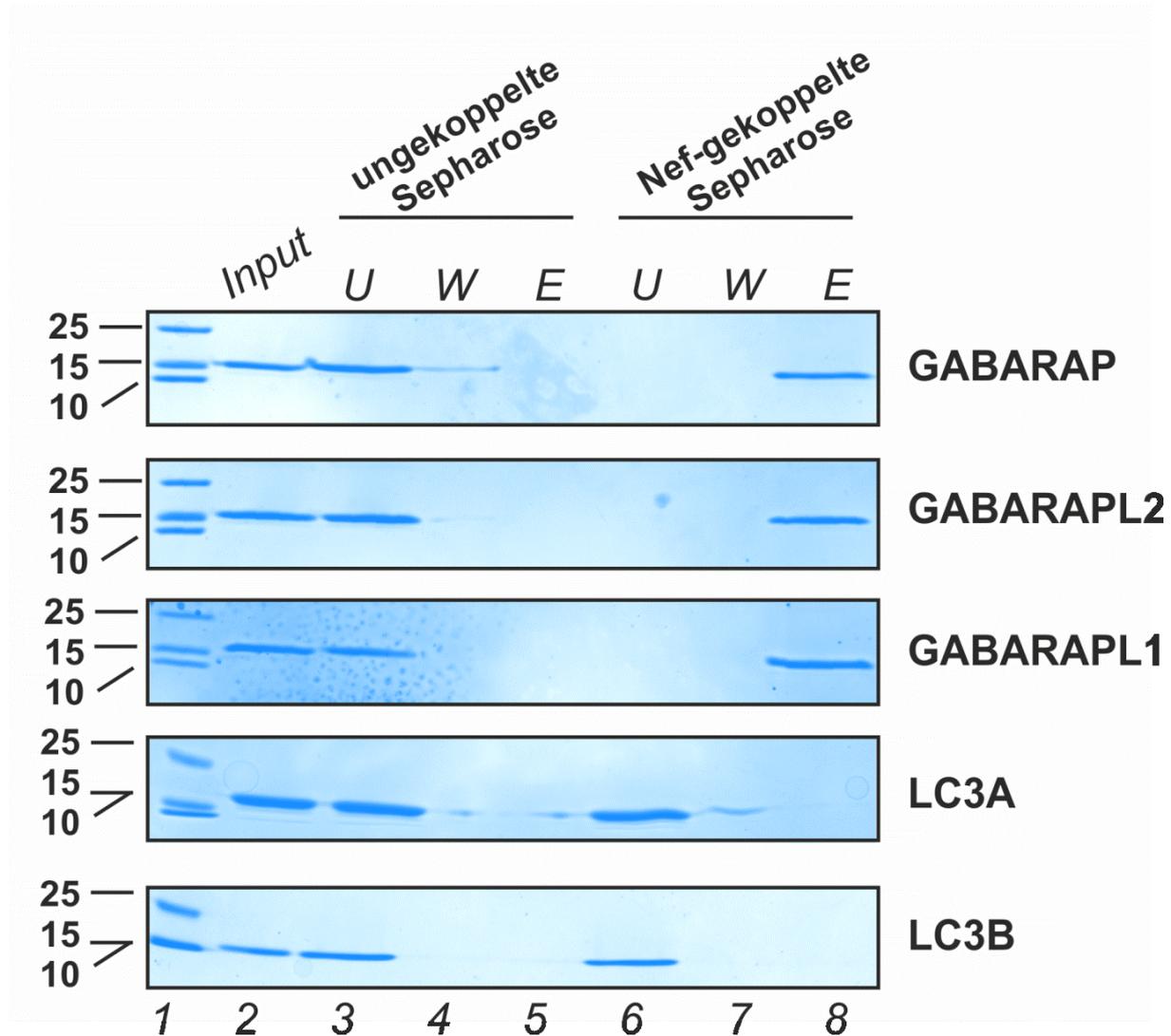


Abbildung 17 Pull-Down mit GABARAP, GABARAPL1, GABARAPL2 und LC3B und Nef

Nef-gekoppelte Sepharose und ungekoppelte Sepharose wurde mit rekombinant exprimierten GABARAP, GABARAPL1, GABARAPL2 und LC3B inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen erfolgte die Elution der gebundenen Proteine. Diese wurden mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Spur 1: Marker, Spur 2: Inputkontrolle, Spur 3: Durchfluss ungekoppelte Sepharose, Spur 4: Waschfraktion ungekoppelte Sepharose, Spur 5: Elutionsfraktion der ungekoppelten Sepharose, Spur 6: Durchfluss Nef-gekoppelte Sepharose, Spur 7: Waschfraktion der Nef-gekoppelten Sepharose, Spur 8: Elutionsfraktion der Nef-gekoppelten Sepharose

In Abbildung 17 sind die Ergebnisse des Pull-Downs dargestellt. In Spur 1 wurden die 25 µg des Inputs aufgetragen. Die Spuren 3 bis 5 zeigen die Durchfluss- (U:unbound), Wasch- (W) und Elutionsfraktion (E) der ungekoppelten Sepharose, während die Spuren 6 bis 8 die entsprechenden Fraktionen der Nef gekoppelten Sepharose zeigen. Im Fall der ungekoppelten Sepharose befanden sich alle Proteine in der Durchflussfraktion, sodass ein unspezifisches Binden der Proteine an das Säulenmaterial ausgeschlossen werden konnte. Die Proteine LC3A und LC3B befinden sich nach der Inkubation mit Nef-gekoppelter Sepharose ebenfalls im Durchfluss. Dies bestätigte die Koimmunopräzipitationsergebnisse (Kap. 4.2) und

erweitert diese, da neben dem dort untersuchten LC3B auch ein weiteres Mitglied der LC3s, nämlich LC3A, nicht mit Nef interagiert. Hingegen konnten die Proteine GABARAP, GABARAPL1 und GABARAPL2 nach Inkubation mit Nef-gekoppelter Sepharose von der Säule eluiert werden.

4.4 Für die Bindung von Nef an GABARAP sind konservierte Reste innerhalb der GABARAPs verantwortlich

Die Ergebnisse der Pull-Downs zeigten, dass Nef mit den GABARAPs, aber nicht mit den LC3s interagiert. Wird nun ein Zusammenhang zwischen den aus den NMR-Ergebnissen bekannten an der Nef-Bindung beteiligten GABARAP-Resten Y25, V29, V31, D45, K46, Y49, L50, V51, S53, L55, F60, Y62 und L63 (Abb. 18A, lila Pfeile) und deren Konservierungsgrad innerhalb der ATG8-Familie hergestellt, können potentielle Schlüsselreste ermittelt werden. Die Reste der Hydrophoben Taschen 1 (hellblau) und 2 (dunkelblau) (Abb. 18B) sind generell hoch konserviert und stellen damit keine möglichen Schlüsselpositionen dar. Schlussendlich kamen zwei der Aminosäurereste als potentielle Schlüsselpositionen in Frage. Zum einen Position 53 und zum anderen 62. Zusätzlich zeigen bekannte GABARAP-Strukturen, dass diese beiden Reste an der Oberfläche exponiert sind (Abb. 18C). Möglicherweise könnte ein Austausch dieser beiden Reste von GABARAP zu Asparaginsäure und Lysin, wie bei LC3B an den betreffenden Positionen zu finden, eine Nef-bindungsdefiziente GABARAP-Mutante generieren und möglicherweise ein umgekehrter Austausch der Position 56 und 65 in LC3B zu Serin und Phenylalanin die Bindung eines solchen LC3B-Chimären an Nef ermöglichen.

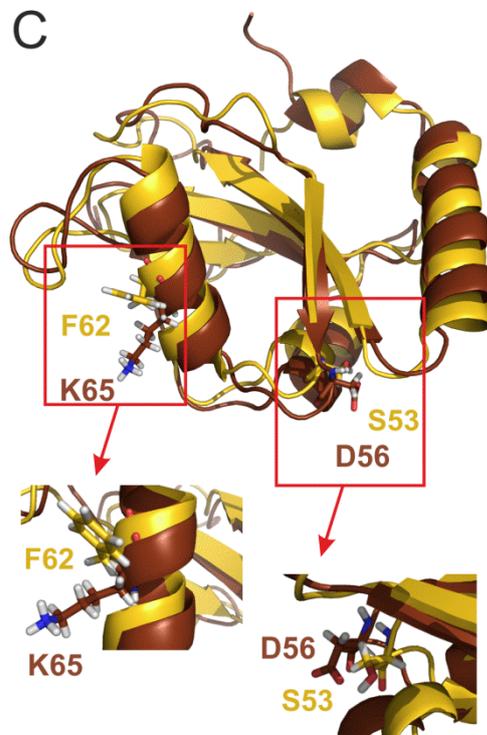
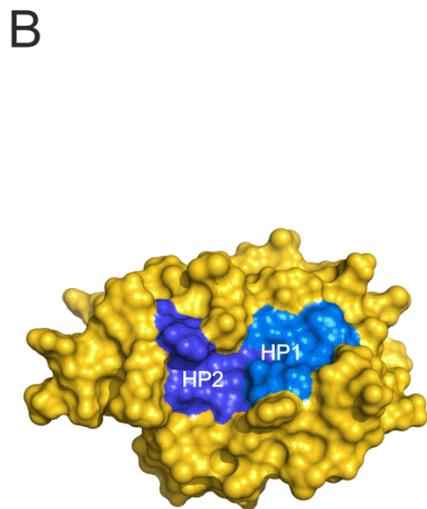
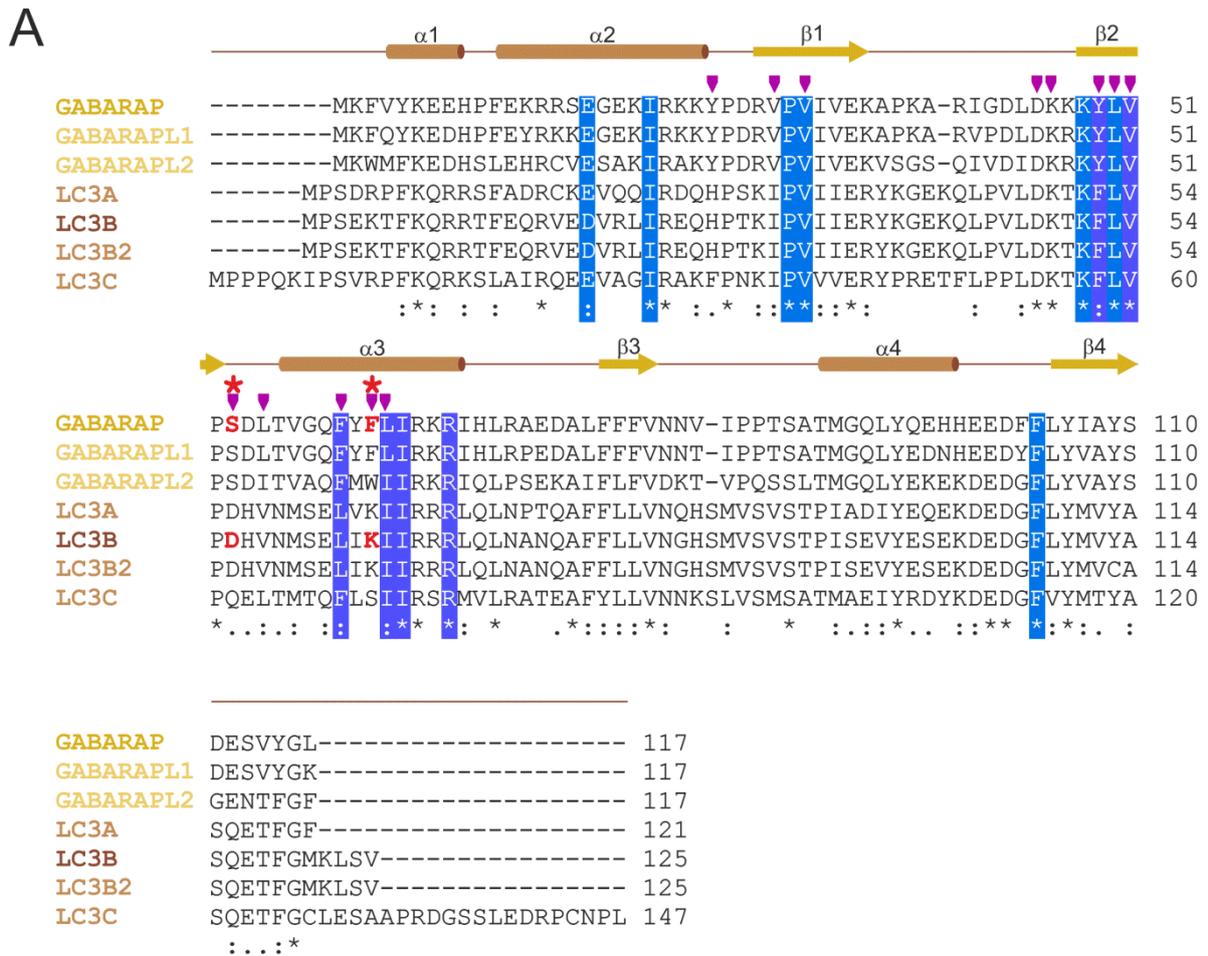


Abbildung 18 Sequenzalignment der humanen ATG8-Paralogen

A: Aminosäurereste von HP1 und HP2 wurden in hell- bzw. dunkelblau unterlegt. Reste, die durch die Bindung von Nef beeinflusst wurden, wurden mit lila Pfeilen markiert. Unter dem Alignment geben Symbole den Konservierungsgrad der Aminosäuren an der entsprechenden Position an. „*“ markieren identische Reste in allen Sequenzen, „:“ sehr ähnliche Reste und „:“ leicht ähnliche

Reste. Die aus dem Alignment resultierenden für die Bindung essentiellen Aminosäurereste sind in Rot dargestellt. (erstellt mit ClustalW). **B:** Oberflächendarstellung von GABARAP. Aminosäurereste, die die HP1 und HP2 bilden sind hell- bzw. dunkelblau dargestellt (PDB-Eintrag: 1kot). **C:** Überlagerung der Bänderstrukturen von GABARAP (gelb) und LC3B (braun) (PDB-Eintrag: 1kot und PDB-Eintrag: 2ZJD).

Um die Bedeutung der oben beschriebenen putativen Schlüsselpositionen für die Nef-Bindung zu untersuchen, wurden Pull-Downs (Kap. 3.5.1) mit rekombinant exprimierten und gereinigten GABARAP- und LC3B-Mutanten mit Nef-gekoppelter Sepharose durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die entsprechenden Mutanten mittels ortsspezifischer Mutagenese kloniert (Kap. 3.1.11).

Für die Generierung von pGEX4T2-GABARAP(S53D/F62L) wurde in der für GABARAP-kodierenden Sequenz des Vektors pGEX4T2-GABARAP mit den Primern GABARAP_53D63K_5' und GABARAP_53D63K_3' das Serincodon zu einem Asparaginsäurecodon und das Phenylalanincodon zu einem Leucincodon mutiert. Parallel dazu wurde in die für LC3B codierende Sequenz im Vektor pET15b_kombi_MAPLC3_lang(1-124) das Asparaginsäurecodon zu einem Serincodon und das Lysincodon zu einem Phenylalanincodon unter Zuhilfenahme der Primer MAPLC3B_53S62F_5' MAPLC3B_53D62F_3' mutiert, um das Plasmid pET15b_kombi_MAPLC3(D56S/F62K)_lang(1-124) zu generieren.

Nach der Transformation der resultierenden Konstrukte pGEX4T2-GABARAP(S53D/F62L) und pET15b_kombi_MAPLC3(D56S/F62K)_lang(1-124) in *E.coli* BL21 DE3 T1*, erfolgte die Reinigung von GABARAP(S53D/F62K) nach Kapitel 3.2.4 und die Expression und Reinigung von LC3B(D56S/K65F) nach Kapitel 3.2.4. Die Reinheit der Proteine ist in Abbildung 19 dargestellt.

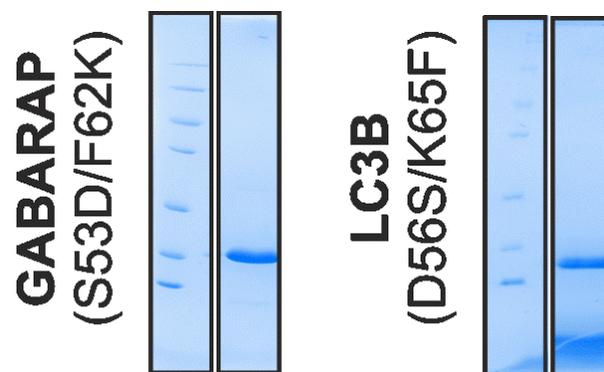


Abbildung 19 Reinheit der rekombinanten Proteine GABARAP(S53D/F62K) und LC3B(D56S/K65F)

Gezeigt sind jeweils 2 µg der gereinigten Proteine nach deren gelelektrophoretischer Auftrennung (15 % SDS-PAGE) und CBB-Färbung.

Für den *Pull-Down* wurde, wie in Kap. 3.5.1 beschrieben, Nef an aktivierte NHS-Sepharose gekoppelt und im Anschluss mit den beiden Mutanten GABARAP(S53D/F62K) und MAPLC3B(D56S/K65F) inkubiert. Wie in Abbildung 20 zu sehen ist, konnte die GABARAP-Mutante nur in der Durchfluss-Fraktion detektiert werden. Dies bestätigte eine essentielle Rolle einer oder beider mutierten Positionen für die Nef-Bindung von GABARAP. Gleichzeitig erwies sich der reziproke Austausch D56S und K65F als ausreichend, um eine Nef-Bindung in LC3B hervorzurufen. Eine unspezifische Bindung der beiden Proteine an das Säulenmaterial konnte ausgeschlossen werden, da bei einem Kontrollversuch mit ungekoppelter Sepharose die beiden Proteine im Durchfluss wiederzufinden waren.

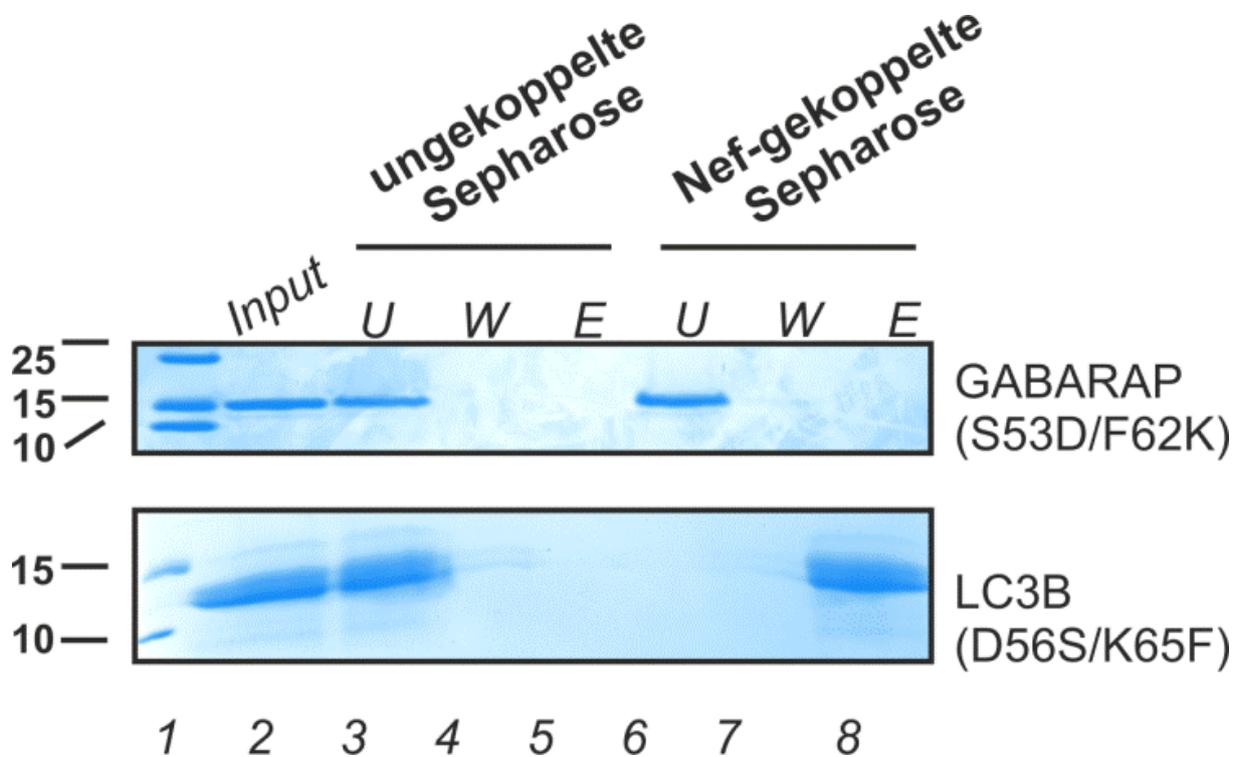


Abbildung 20 Pull-Down mit GABARAP(S53D/F62K), LC3B(D56S/K65F) und Nef.

Nef-gekoppelte Sepharose und ungekoppelte Sepharose wurden mit rekombinant exprimierten und gereinigten GABARAP(S53D/F62K) und LC3B (D56S/K65F) inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen erfolgte die Elution der gebundenen Proteine. Diese wurden mittels SDS-Gelelektrophorese ausgetrennt. Spur 1: Marker, Spur 2: Inputkontrolle, Spur 3: Durchfluss ungekoppelte Sepharose, Spur 4: Waschfraktion ungekoppelte Sepharose, Spur 5: Elutionsfraktion der ungekoppelten Sepharose, Spur 6: Durchfluss Nef-gekoppelte Sepharose, Spur 7: Waschfraktion der Nef-gekoppelten Sepharose, Spur 8: Elutionsfraktion der Nef-gekoppelten Sepharose.

4.5 Sequenzanalysen identifizierten ein potenzielles GABARAP/GABARAPL2 *subfamily interacting region* (GIR)-Motiv in der direkten Nähe des Trp13

Wie bereits in der Einleitung (Kap. 1.1) beschrieben, ist das allgemein akzeptierte Bindemotiv von GABARAP Ω -X-X- Ψ . Bei der Suche nach dieser Sequenzfolge in der Aminosäuresequenz von Nef(SF2) konnten zwei übereinstimmende Regionen gefunden werden. Die Sequenzfolge W-S-A-I (Aminosäuren 13-16) und die Sequenzfolge F-K-L-V (Aminosäuren 147-150) (Abb. 21).

	Ω xx Ψ		Ω xx Ψ	
HIV-1 SF2	1- MGGKWSKRS	MGGWSAIREM	143- FGWCFKLV	PVEPEKVEE -159
SIV CPZ_GAB1	1- MGTKWSKSSL	VGWPEVRRRI	139- FGWCFKLV	PLTEEQVEQ -155
HIV-2 RÖD	1- MGASGSKKHS	RPPRGLQER	181- FGWLWKLVP	PVDVPQ--E -196
SIV MAC_239	1- MGGAI SMRR	SRPSGDLRQ	180- FGWLWKLVP	VNVSD--E -195
	** *	::.*:.*	***:*****:	. :

Abbildung 21 Identifizierung eines konservierten GIR-Motivs innerhalb der Nef-Proteine von HIV- und SIV-Stämmen

Protein-Sequenzalignment von vier repräsentativen Nef-Sequenzen für zwei Regionen, die ein Ω -X-X- Ψ -Motiv aufweisen. Unter dem Alignment geben Symbole den Konservierungsgrad der Aminosäuren an der entsprechenden Position an. „*“ markieren identische Reste in allen Sequenzen, „:“ sehr ähnliche Reste und „.“ leicht ähnliche Reste.

Um herauszufinden ob eine der beiden Regionen als potentielle GABARAP/GABARAPL2 *subfamily interacting region* (GIR) fungieren könnte, wurden erneut Pull-Downs mit rekombinanten GABARAP und den Nef-Varianten Nef(WT), Nef(W5A), Nef(W13A) und Nefcore durchgeführt (Kap. 3.5.1). Dem Nefcore-Protein fehlt der flexible Arm (AS 1 bis 42), einschließlich der Aminosäure 43 sowie die zentrale flexible Schleife (AS 163 bis 177) der Kernregion. Nefcore besitzt somit nur das C-terminal gelegene potentielle GIR „WSAI“, nicht aber das N-terminale „FKLV“. Zusätzlich ist das C-terminale Cystein durch ein Alanin ersetzt. Bei den Konstrukten Nef(W5A) und Nef(W13A) wurde das potentielle GABARAP-bindungsrelevante Tryptophan an Position 13 oder ein nahegelegenes weiteres Tryptophan an Position 5, welches nicht Teil eines GABARAP-Bindungsmotives ist, als Kontrolle, mittels ortsspezifischer Mutagenese (Kap. 3.1.11) durch ein Alanin ersetzt. Nef(WT), Nef(W5A) und Nef(W13A) wurden, wie in Kap. 3.2.1 beschrieben, gereinigt und

exprimiert und Nefcore wurde, wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben gereinigt, und exprimiert. Die Abbildung 22 zeigt die Reinheit der Proteine.

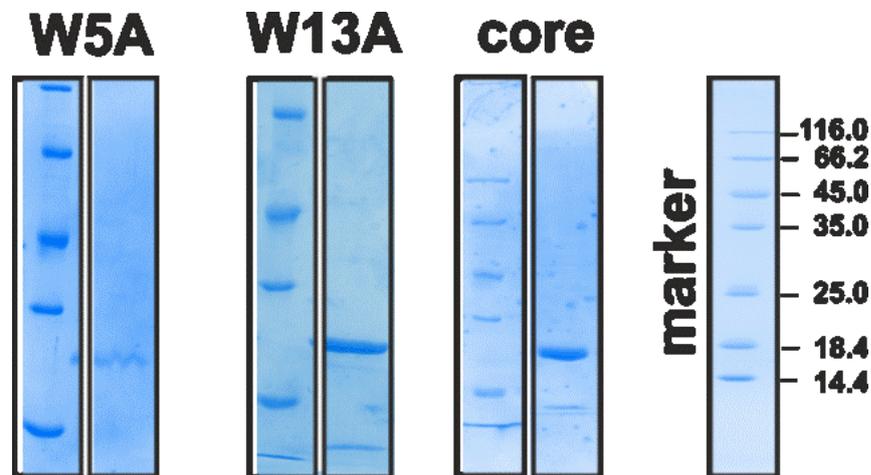


Abbildung 22 Reinheit der Nef-Konstrukte W5A, W13A und core

Gezeigt sind jeweils 2 µg der gereinigten Proteine nach deren gelelektrophoretischer Auftrennung (15 % SDS-PAGE) und CBB-Färbung.

Für die Pull-Downs wurde rekombinant exprimiertes und gereinigtes GABARAP an aktivierte NHS-Sepharose gekoppelt und im Anschluss mit den oben beschriebenen Nef-Konstrukten inkubiert. Das Ergebnis der Pull-Downs ist in Abbildung 23 dargestellt.

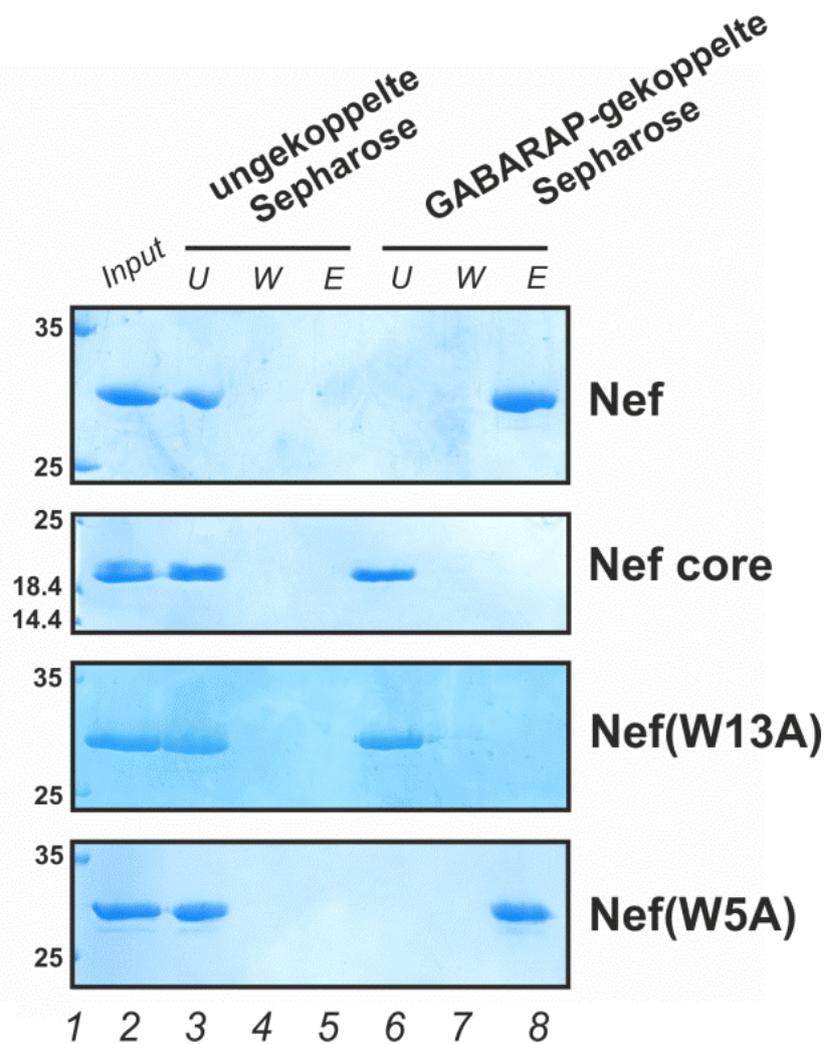


Abbildung 23 Pull-Downs mit Nef, Nef(W5A), Nef(W13A) und Nefcore und GABARAP-gekoppelter Sepharose

GABARAP-gekoppelte Sepharose und ungekoppelte Sepharose wurden mit rekombinant exprimierten Nef-Konstrukten inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen erfolgte die Elution der gebundenen Proteine. Diese wurden mittels SDS-Gelelektrophorese analysiert. Spur 1: Marker, Spur 2: Inputkontrolle, Spur 3: Durchfluss ungekoppelte Sepharose, Spur 4: Waschfraktion ungekoppelte Sepharose, Spur 5: Elutionsfraktion der ungekoppelten Sepharose, Spur 6: Durchfluss GABARAP-gekoppelte Sepharose, Spur 7: Waschfraktion der GABARAP-gekoppelten Sepharose, Spur 8: Elutionsfraktion der GABARAP-gekoppelten Sepharose.

Ebenso wie in den Pull-Downs in Kapitel 4.4, erfolgte keine unspezifische Bindung der verschiedenen Nef-Konstrukte an das Säulenmaterial, da die Proteine bei der ungekoppelten Sepharose ausschließlich im Durchfluss nachweisbar waren. Das Nef(WT)-Protein ist im Eluat der GABARAP-gekoppelten Sepharose zu finden, was die Ergebnisse in Kapitel 4.3 unterstützt, dass Nef und GABARAP direkt miteinander interagieren. Nefcore zeigte dagegen keine Bindung an GABARAP. Die Nef(W5) - Mutante konnte von der GABARAP-gekoppelten Sepharose eluiert werden, während die Nef(W13)-Mutante nur in der Durchflussfraktion nachzuweisen war. Die

Substitution von Tryptophan zu Alann an Position 13 des Nef-Proteins unterdrückte demnach die Bindung an GABARAP.

4.6 Die GABARAPs-Mitglieder zeigen im Gegensatz zu LC3B keine erhöhten Lipidierungslevel in Anwesenheit von Nef

Nachdem die Bindungsstellen zwischen GABARAP und Nef näher charakterisiert werden konnten, sollte im Folgenden die Bedeutung dieser Bindung in der Zelle untersucht werden. Wie bereits in der Einleitung beschrieben, vermitteln die ATG8-Proteine die Elongation und das Schließen des Autophagosoms. Daher lag es nahe, dass die Interaktion zwischen Nef und den verschiedenen GABARAPs die Autophagie beeinflusst.

Der wichtigste Marker für die ersten Schritte der Autophagie, wie der Biogenese der Autophagosomen, ist die Lipidierung von LC3B (Kap. 1.2). Während der Elongation der Phagophore zum Autophagosom wird die zytosolische unlipidierte Form LC3B-I zur membranassoziierten Form LC3B-II umgewandelt (Kabeya Y 2000). Das Level der LC3B-Lipidierung kann als Konversion von der LC3B-I zu LC3B-II Form im Western-Blot bestimmt werden, da die lipidierte LC3B Form eine erhöhte elektrophoretische Mobilität zeigt. Dies lässt sich ebenfalls auf die Mitglieder der GABARAPs übertragen. Um den Einfluss von Nef auf die Lipidierung der ATG8-Proteine zu testen und damit einen möglichen Einfluss auf die ersten Schritte der Autophagie nachzuweisen, wurden 1×10^5 HEK293 Zellen mit pDsRed-N1, pDsRed-Nef(WT), pDsRed-Nef(G2A) und pDsRed-Nef(W13A) (Tab.12) , wie in Kapitel 3.4.5 beschrieben, transfiziert. Als zusätzliche Kontrolle diente ein untransfizierter Ansatz. Nach 48 h wurden die Zellen lysiert, gefällt (Kap. 3.2.9) und die Proteinmenge mit dem BCA-Kit bestimmt (Kap. 3.3.5). 50 µg Gesamtproteinmenge jeder Probe wurden mittels SDS-Page (Kap. 3.2.5) getrennt und mit Hilfe entsprechender Antikörper im Western-Blot analysiert (Kap. 3.2.7).

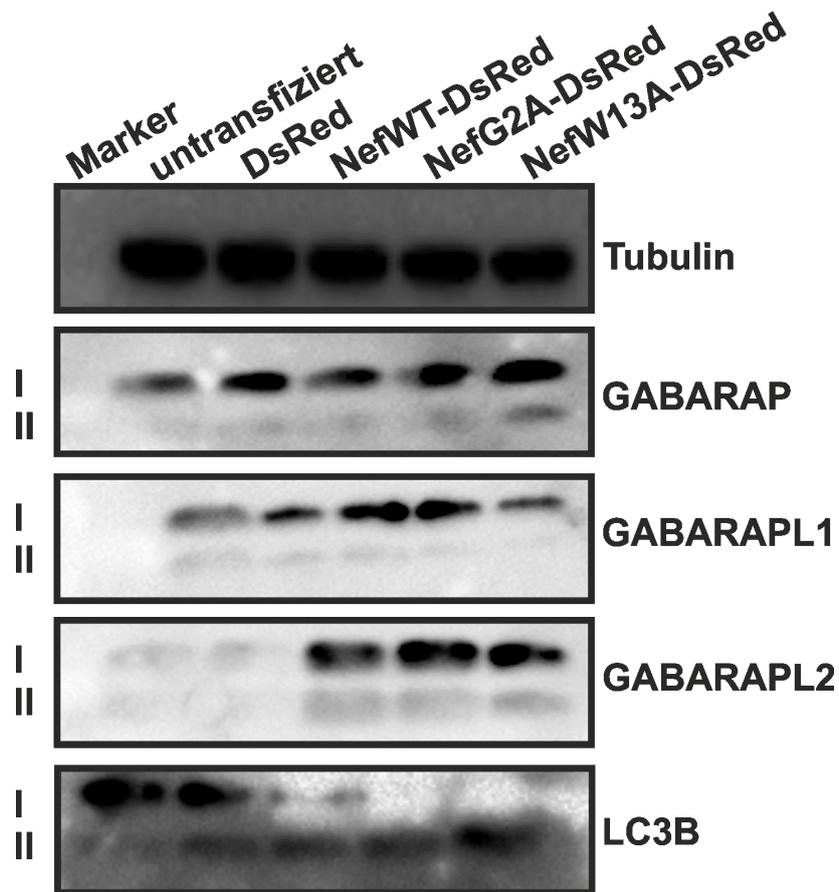


Abbildung 24 Lipidierungslevel von GABARAP, GABARAPL1, GABARAPL2 und LC3B in Anwesenheit verschiedener Nef-Konstrukte

HEK293-Zellen wurden mit den Plasmiden pDsRed-N1 (Spur 3), pNefwt-DsRed (Spur 4), pNefG2A-DsRed (Spur 5), pNefW13A-DsRed (Spur 6) transfiziert. In allen Fällen betrug der Transfektionserfolg zwischen 70 % und 90 %. Als Kontrolle diente ein untransfizierter Ansatz (Spur 2). 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und mittels der entsprechenden Antikörper (Tab. 11) analysiert. In Spur 1 wurde der *Unstained* Marker von Fermentas aufgetragen.

Wie bereits von Kyei et al. beschrieben, zeigen Nef-exprimierende Zellen eine Akkumulierung von Autophagosomen innerhalb des Zytoplasmas, begleitet von einer Anreicherung von lipidiertem LC3B. Dabei wird durch die Interaktion von Nef mit Beclin1 die Fusion des Autophagosoms mit dem Lysosom gehemmt (Kyei, Dinkins et al. 2009). Übereinstimmend dazu, lässt sich für LC3B auch im oben beschriebenen Experiment eine Anreicherung der LC3-II-Form nachweisen, wenn die Zellen mit Nef(WT) (Spur 4) oder Nef(G2A) (Spur 5) exprimierten. Auch bei Anwesenheit von Nef(W13A) konnte ein verstärktes Lipidierungslevel nachgewiesen werden (Spur 6). Im Gegensatz dazu konnte weder für GABARAP, GABARAPL1 noch für GABARAPL2 eine Akkumulierung der lipidierten Form in Anwesenheit der Nef-Konstrukte im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen werden. Trotzdem schien Nef die Expression von GABARAPL2 zu induzieren, denn bei den mit verschiedenen Nef-Konstrukten (Spur 4 bis 6) transfizierten Zellen wurde deutlich mehr GABARAPL2 detektiert als in

den untransfizierten Zellen (Spur 2). Für GABARAPL1 und GABARAP konnte zumindest unter diesen Bedingungen ein solcher Effekt nicht beobachtet werden.

4.7 GABARAPs sind für die Sekretion von Nef essentiell

Seit langem ist bekannt, dass stabil mit Nef transfizierte Zellen eine hohe Zahl von Endosomen, Lysosomen und akkumulierenden MVB's aufweisen (Sanfridson, Hester et al. 1997). Darüber hinaus konnte in der Zwischenzeit in mehreren unabhängigen Studien gezeigt werden, dass Nef selbst seine Sekretion in kleinen extrazellulären Vesikeln induziert (Campbell, Khan et al. 2008, Muratori, Cavallin et al. 2009, Lenassi, Cagney et al. 2010, Raymond, Campbell-Sims et al. 2011). Da bei den durchgeführten Kollokalisationsstudien eine Kollokalisierung der beiden Proteine nicht nur im Zytoplasma und an der Plasmamembran, sondern auch in den blasenförmigen Strukturen zwischen ER-Golgi Kompartiment und Plasmamembran detektiert wurde, könnte die Interaktion einen Einfluss auf die Sekretion von Nef haben. Sollte die Interaktion tatsächlich die Sekretion von Nef beeinflussen, so müsste durch das Ausschalten der GABARAPs in den Zellen mittels *siRNA silencing* diese deutlich reduziert werden.

Hierzu wurden in einem Experiment der Überstand von HEK293-Zellen, die stabil mit pNef-DsRed transfiziert waren und bei denen gleichzeitig die Expression einzelner ATG8s ausgeschaltet war, auf das Vorhandensein von Nef hin untersucht. Hierzu wurden 1×10^5 stabil mit pNef-DsRed transfizierte Zellen auf *glass bottom wells* ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen jeweils mit siRNAs gegen die einzelnen GABARAPs und LC3s, wie in Kapitel 3.5.6 beschrieben, transfiziert. Um die gesamte GABARAP-Familie auszuschalten, wurden in einem Ansatz die Zellen gleichzeitig mit siRNAs gegen GABARAP, GABARAPL1 und GABARAPL2 transfiziert. Parallel dazu wurde in einem weiteren Ansatz die Expression der LC3s durch die Transfektion mit entsprechenden siRNAs unterdrückt. Als Kontrollen dienten sowohl ein Ansatz ohne siRNAs sowie ein Ansatz mit *non-targeting* siRNA.

Nach 48-stündiger Inkubation mit DMEM + 10 % FCS wurde das Medium entfernt, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und die Zellen für 4 h mit serumfreien Medium inkubiert. Die Zellüberstände wurden abgenommen und 30 min bei $12.000 \times g$ zentrifugiert, um Zelltrümmer zu beseitigen. Die Überstände wurden in neue Eppendorfreaktionsgefäße überführt und einer Methanol-Chloroform-Fällung

unterzogen. Im Anschluss wurden die gefällten Proteine in 1 x Laemmli-Puffer aufgenommen und mittels Western-Blot analysiert (Kap. 3.2.7).

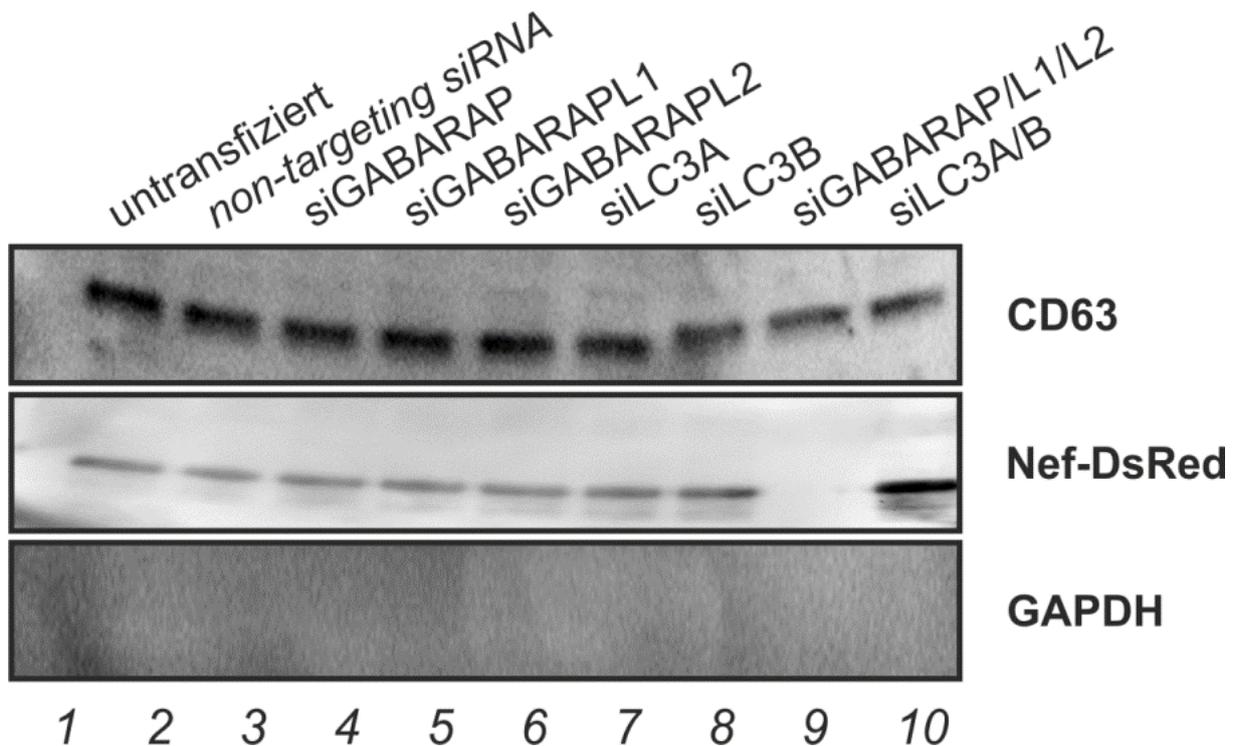


Abbildung 25 Die GABARAP-Familie beeinflusst die Sekretion von Nef.

Überstände von stabil mit NefDsRed transfizierten HEK293 Zellen, bei denen die Expression einzelner ATG8-Proteine oder beider Subfamilien unterdrückt wurde, wurden gefällt und auf das Vorhandensein von Nef hin untersucht. Spur 1: Marker, Spur 2: untransfiziert, Spur 3: non-targeting siRNA, Spur 4: siGABARAP, Spur 5: siGABARAPL1, Spur 6: siGABARAPL2, Spur 7: siLC3A, Spur 8: siLC3B, Spur 9: siGABARAP/GABARAPL1/GABARAPL2, Spur 10: siMAPLC3A/B.

Für die Überstandanalyse wurde CD63, ein etablierter Marker für Exosomen, als Standard eingesetzt. Wie Abb. 25 zeigt, wurde in allen Proben die gleiche Menge an CD63 nachgewiesen. Bei der Detektion von Nef ist kein Unterschied der sezernierten Nef-Menge bei untransfizierten, mit *non-targeting* siRNA transfizierten und bei Zellen, bei denen jeweils nur ein Gen, das für ein ATG8 codiert, ausgeschaltet wurde, zu sehen. Interessanterweise konnte bei den Zellen, bei denen die gesamte GABARAP-Familie ausgeschaltet wurde, kein Nef im Überstand detektiert werden. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei Zellen, bei denen die gesamte LC3-Familie ausgeschaltet wurde, eine leicht erhöhte Sekretion von Nef ins Kulturmedium im Vergleich mit einfach transfizierten Zellen.

Um den Nachweis zu erbringen, dass die eingesetzten siRNAs auch die geforderte Wirkung erbracht hatten, wurde zusätzlich als Kontrolle das Gesamtzellsat via

Immunoblotting analysiert. Zu diesem Zweck wurden gleichzeitig die pelletierten Zellen mit 1 x PBS gewaschen, lysiert und die Proteinkonzentration bestimmt (Kap. 3.3.1.4). 50 µg Gesamtproteinmenge wurde mittels geeigneter Antikörper (Tab. 11) im Western Blot auf die Expression der verschiedenen ATG8s hin untersucht. Als Kontrolle wurde gleichzeitig Tubulin detektiert (Abb. 26).

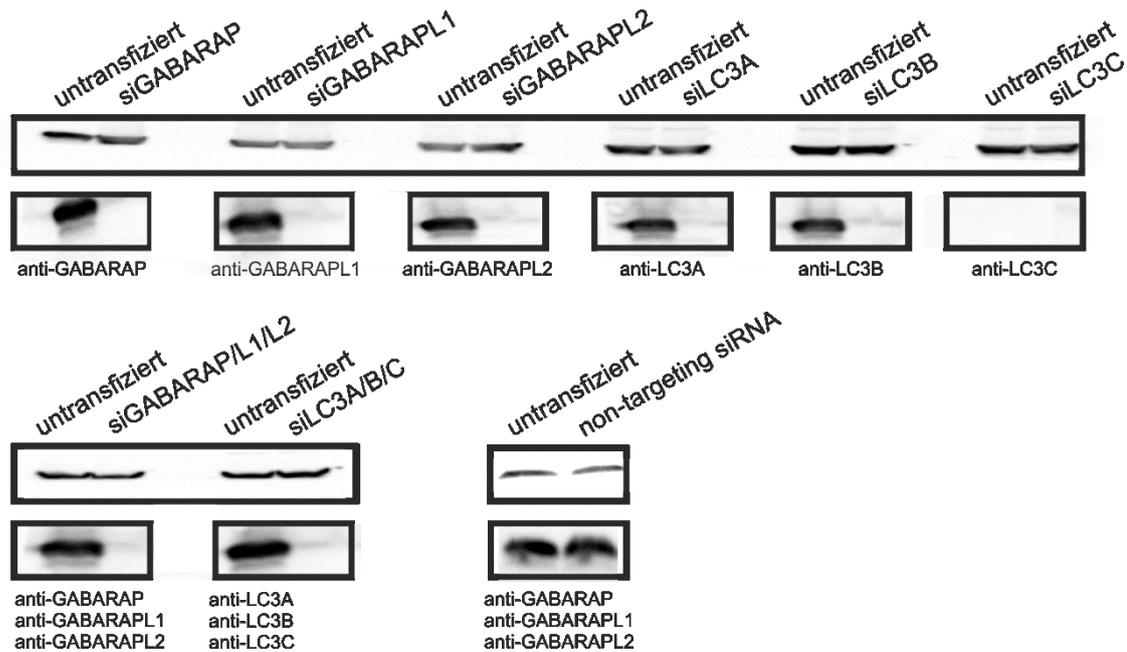


Abbildung 26 Effizienz der eingesetzten siRNAs beim Ausschalten der untersuchten ATG8s

HEK293 wurden mit siRNAs gegen GABARAP, GABARAPL1, GABARAPL2, LC3A, LC3B sowie mit Nontargeting siRNA transfiziert. In den beiden unteren Ansätzen wurden gleichzeitig LC3s (rechts) und die GABARAPs (links) ausgeschaltet. Links wurde jeweils die Probe ohne Transfektion von siRNA, rechts die mit der entsprechenden siRNA transfizierte Probe, aufgetragen. Die Detektion erfolgte mit den oben genannten Antikörpern. Als Kontrollprotein diente in diesem Fall Tubulin.

Abb. 26 zeigt die Expressionslevel der einzelnen ATG8s mit und ohne siRNAs in stabil mit Nef-DsRed transfizierten HEK293-Zellen. Die Expression von GABARAP, GABARAPL1 und GABARAPL2 konnte durch die Transfektion der entsprechenden siRNA vollständig unterdrückt werden. Somit waren die hier eingesetzten siRNAs sehr effizient. Bei LC3A und LC3B ist in der Anwesenheit der jeweiligen siRNAs, jeweils eine schwache Expressionsbande zu erkennen, was auf den ersten Blick als nicht vollständiges Ausschalten dieser beiden Gene interpretiert werden könnte. Allerdings detektiert der verwendete Antikörper sowohl LC3A als auch LC3B. Somit handelte es sich bei der detektierten Bande mit hoher Wahrscheinlichkeit, um das jeweils nicht ausgeschaltete LC3-Protein. Die gleichzeitige Transfektion von siRNAs gegen

MAPLC3A/B/C bzw. GABARAP/GABARAPL1/GABARAPL2 führte zu einem nahezu vollständigen Ausschalten der LC3s bzw. der GABARAPs.

4.8 Die GABARAP-Familie vermittelt die Sekretion von Nef über Exosomen

Für die Präparation von Exosomen aus dem Kulturüberstand wurden 1×10^5 HEK293-Zellen, die stabil mit pNef-DsRed transfiziert waren, in glass-bottom wells ausgesät und in DMEM mit 10 % exosomenfreien FCS inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit siRNAs nach Kapitel 3.5.6 transfiziert. Dabei wurden bei diesem Experiment in einem Ansatz gleichzeitig alle GABARAPs durch Transfektion mit siRNAs gegen GABARAP, GABARAPL1 und GABARAPL2 und in einem zweiten Ansatz alle LC3s durch Transfektion mit siRNAs gegen LC3A, LC3B und LC3C ausgeschaltet. Als Kontrollen dienten ein Ansatz ohne siRNA sowie ein Ansatz mit non-targeting RNA. Die Zellen wurden im Anschluss für zwei weitere Tage in DMEM mit 10 % exosomenfreien FCS inkubiert. Für die Isolierung der Exosomen wurde der Überstand der Zellen abgenommen und wie in Kapitel 3.5.4 verfahren, um die Exosomenfraktion zu präparieren. Die gefällten Exosomen wurden mit RIPA-Puffer lysiert, einer Methanol-Chloroform-Fällung (Kap. 3.2.9) unterzogen und mittels Western-Blot analysiert (Kap. 3.2.7).

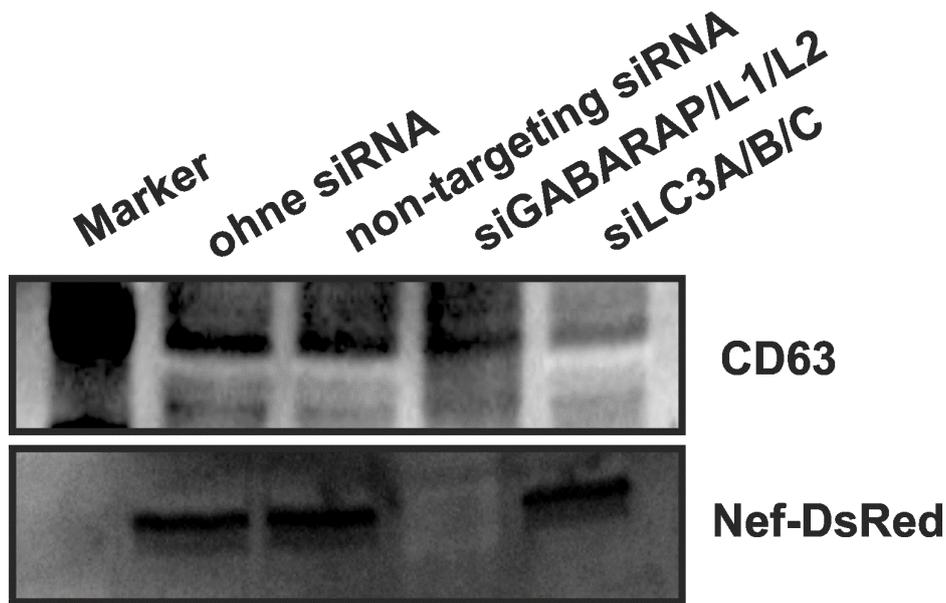


Abbildung 27 GABARAPs sind für die Sekretion von Nef in Exosomen essentiell

Die Exosomen wurden aus dem Überstand untransfizierter (Spur 2), mit non-targeting siRNA transfizierter (Spur 3), mit siGABARAP/GABARAPL1/GABARAPL2 (Spur 4) oder mit siLC3A/LC3B/LC3C (Spur 5) transfizierter Zellen isoliert. Als Exosomenmarker konnte CD63 in allen Präparationen nachgewiesen werden. In den Exosomen von Zellen, die untransfiziert, mit non-targeting siRNA oder mit siRNAs gegen die LC3s transfiziert waren, konnte Nef bei 55 kDa nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnte in den Exosomen die aus dem Überstand von Zellen, die mit siRNAs gegen die GABARAPs transfiziert worden sind, kein Nef detektiert werden.

Für die Exosomenanalyse wurde CD63, ein etablierter Marker für Exosomen, als Standard eingesetzt. In Exosomenlysaten aus Zellen, die ohne bzw. nur mit non-targeting siRNA transfiziert wurden, lässt sich Nef bei ca. 55 kDa nachweisen. Auch Exosomenlysate aus Zellen, die gleichzeitig mit siRNAs gegen LC3A, LC3B und LC3C transfiziert wurden, zeigten eine Nef-Bande bei 55 kDa. Wurden allerdings die Zellen gleichzeitig mit siRNAs gegen GABARAP, GABARAPL1 und GABARAPL2 transfiziert, so konnte kein Nef in den Exosomenlysaten nachgewiesen werden.

Parallel wurden 50 µg der gefällten Exosomen für eine Qualitätsprüfung der jeweiligen Exosomenpräparation mittels ExoArray (Kap. 3.5.5) verwendet.

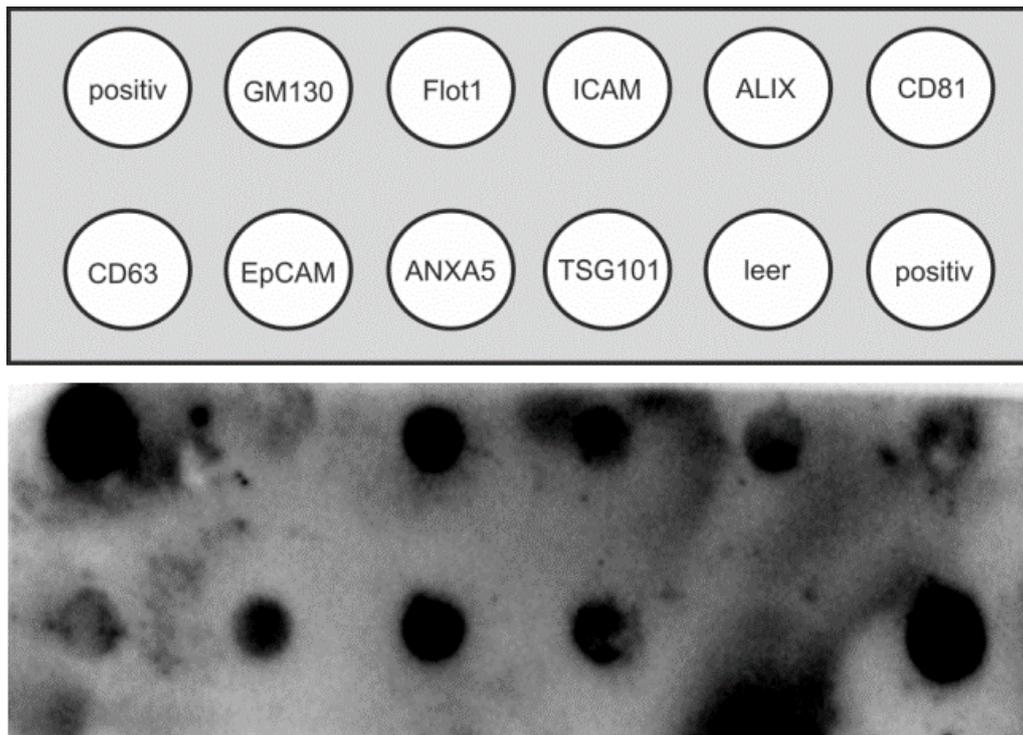


Abbildung 28 Nachweis von reinen Exosomen

Exosomen wurden aus dem Überstand von HEK293 Nef-stabilen Zellen mit siRNAs gegen die GABARAP-Subfamilie isoliert. Der Nachweis der in den Exosomen lokalisierten Proteine erfolgte mittels Chemilumineszenz.

Abbildung 28 zeigt beispielhaft, dass erfolgreich reine Exosomen aus dem Überstand von Zellen isoliert werden konnten. Dies konnte u.a. aus dem fehlenden Signal für das Protein GM130 gefolgert werden. Somit war sichergestellt, dass keine Verunreinigung durch zytoplasmatischen Bestandteile vorlag. Auch bei der Negativkontrolle konnte kein Signal detektiert werden, während eine starke Lumineszenz bei der Positivkontrolle detektiert wurde. Im Exoarrays wurde nachgewiesen, dass wie erwartet besonders Exosomenmarker wie Proteine Flot1, ANXA5, CD81, TSG101, ALIX und EpCAM in den isolierten Exosomen lokalisiert waren. Interessanterweise zeigte sich, dass gerade der Exosomen Prototypmarker CD63 eher schwach in aus HEK293-Zellen isolierten Exosomen detektiert werden konnte. Somit wird für zukünftige Untersuchungen dringend geraten, gegen ein geeigneteres Markerprotein gerichtete Antikörper, wie z.B gegen ALIX als Standard für Exosomen aus diesem Zelltyp zu verwenden.

4.9 GABARAPs vermittelt den Transport von Nef zur Plasmamembran

Die Ergebnisse der Kapitel 4.7 und 4.8 zeigten deutlich, dass Zellen mit ausgeschalteten GABARAPs nicht mehr in der Lage waren Nef zu sekretieren. Um zu sehen, wo in der Zelle unter diesen Bedingungen Nef lokalisierte, wurden 1×10^4 stabil mit Nef-DsRed transfizierte HEK293-Zellen auf glass-bottom wells ausgesät. Am Folgetag wurden die Zellen gleichzeitig mit siRNAs gegen GABARAP, GABARAPL1 und GABARAPL2 transfiziert (Kap. 3.5.6) und für 48 h in phenolrotfreiem DMEM mit 10 % FCS inkubiert, bevor sie unter Lebendzellbedingungen mikroskopiert wurden.

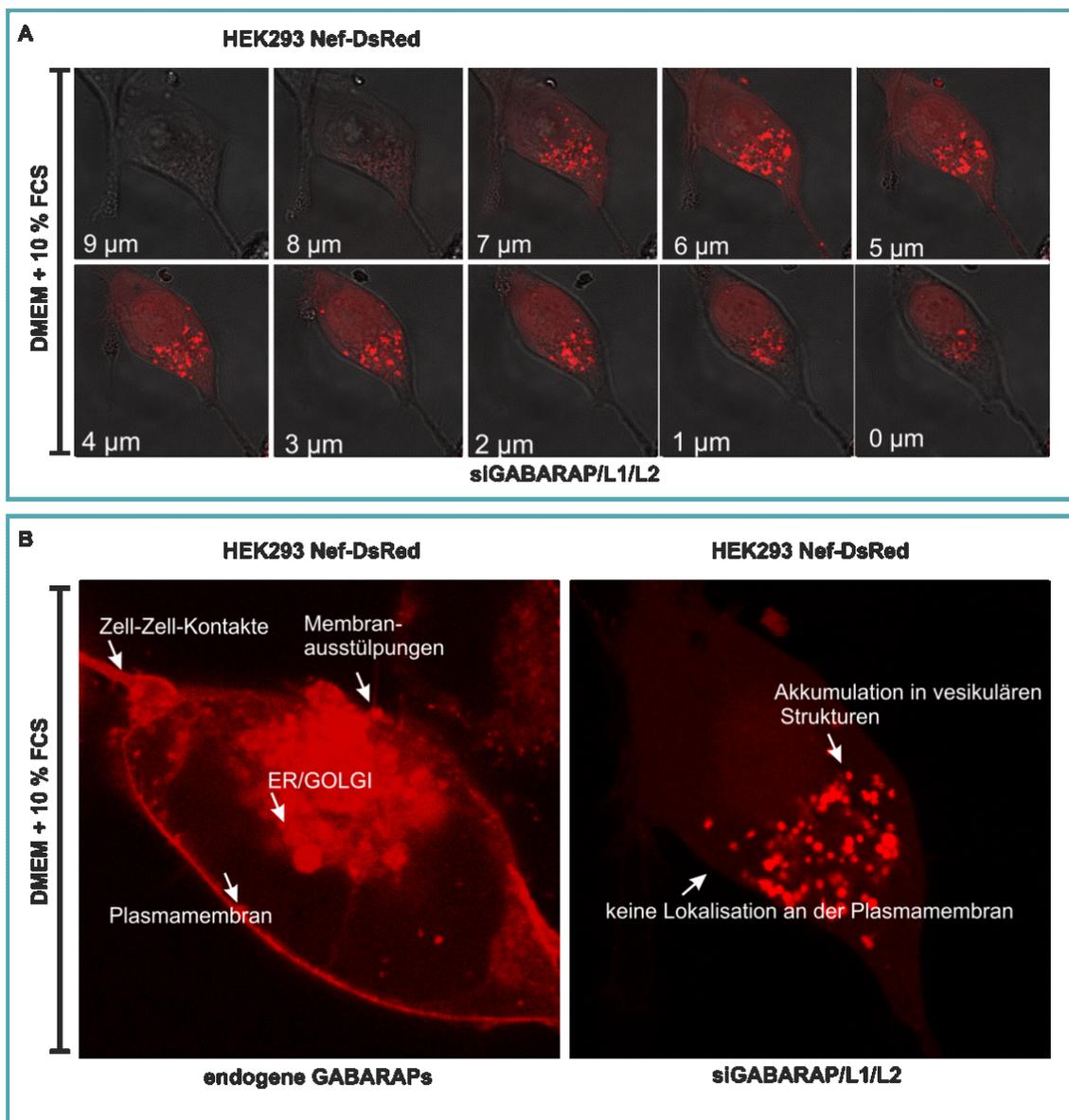


Abbildung 29 GABARAPs vermitteln den Transport zur Plasmamembran

(A) HEK293_Nef-DsRed wurden mit siRNAs gegen GABARAP, GABARAPL1 und GABARAPL2 kotransfiziert. Nach 48 h wurde die Lokalisation von Nef mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie unter Lebendzellbedingungen analysiert. (B) Vergleich der

Nef-Lokalisation innerhalb einer Vergrößerung des 6 µm z-Stacks (rechts) mit einem vergleichbaren z-Stacks einer Nef exprimierenden Zelle mit endogenen GABARAPs.

In diesem Fall lokalisierte Nef in kleinen vesikulären Strukturen innerhalb des Zytoplasmas. In keinem der aufgenommenen z-Stack-Ebenen konnte Nef an der Plasmamembran detektiert und auch die Sekretion bläschenartiger Strukturen konnte in diesen Zellen nicht detektiert werden.

4.10 Tryptophan 13 ist für die Sekretion essentiell

Unter der Annahme, dass die in vitro nachgewiesene Bindung von Nef und GABARAP, in vivo notwendig für den Nef-Sekretionsprozess ist, könnte erwartet werden, dass sich eine Mutation von Nef in Tryptophan an Position 13 zu Alanin negativ auswirkt.

Dazu wurde vorab eine entsprechende Mutante mittels ortsspezifischer Mutagenese kloniert (Kap. 3.1.11). Für die Generierung von pDsRed-N1_Nef(W13A) wurde in der für Nef-kodierenden Sequenz des Vektors pDsRed-N1_Nef(WT) mit den Primern HIV-1 Nef_NefW13A_5' und HIV-1 Nef_W13A_3' das Tryptophancodon in ein Alanincodon mutiert.

Für den Versuch wurden 1×10^5 stabil mit Nef transfizierte HEK293-Zellen mit den Plasmiden pDsRed_N1, pDsRed_Nef(WT), pDsRed_Nef(G2A) und pDsRed_Nef(W13A) kotransfiziert. Im Anschluss wurden die Zellen für zwei weitere Tage in DMEM mit exosomenfreien FCS inkubiert. Für die Isolierung der Exosomen wurde der Überstand der Zellen abgenommen und wie in Kap. 3.5.4 verfahren, um die Exosomenfraktion zu präparieren. Die gefällten Exosomen wurden mit RIPA-Puffer lysiert, einer Methanol-Chloroform-Fällung unterzogen (Kap. 3.2.9) und mittels Western-Blot analysiert (Kap. 3.2.7).

Für die Überstandsanalyse wurde CD63, ein etablierter Marker für Exosomen als Standard eingesetzt. Wie Abbildung 30 zeigt konnte eine schwache CD63-Bande nachgewiesen werden. Bei der Detektion der verschiedenen Nef-Konstrukte im Überstand konnte sowohl für den WT als auch für die G2A-Mutante eine deutliche Bande für Nef detektiert werden. Im Gegensatz dazu konnte für die W13A-Mutante nur eine sehr schwache Nef-Bande im Überstand der Zellen detektiert werden. Somit konnte die Annahme, dass sich eine Mutation des für die Bindung essentiellen

Tryptophans an Position 13 negativ auf die Sekretion von Nef auswirkt, bestätigt werden.

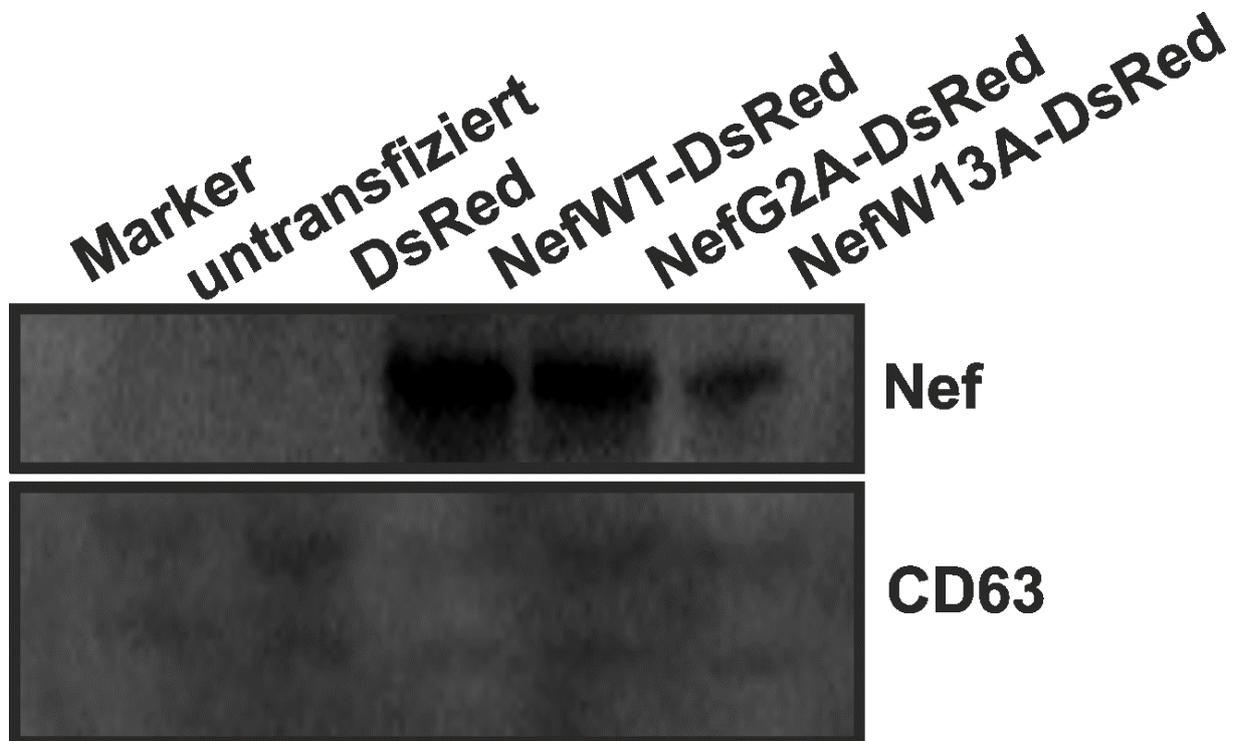


Abbildung 30 Sekretion von verschiedenen Nef-Konstrukten in Exosomen

HEK293 wurden mit den Plasmiden peDsRed-N1 (Spur 3), peNefwt-DsRed (Spur 4), peNefG2A-DsRed (Spur 5), peNefW13A-DsRed (Spur 6) transfiziert. In allen Fällen betrug der Transfektionserfolg zwischen 70 % und 90 %. Als Kontrolle diente ein untransfizierter Ansatz (Spur 2). Als Kontrollprotein diente CD63. In untransfizierten und mit peDsRed-N1 transfizierten Zellen wurde kein Nef detektiert. In allen mit Nef-Konstrukten transfizierten Zellen konnte Nef auch in den Exosomen nachgewiesen werden. Dabei ist die Sekretion von Nef(W13A) innerhalb von Exosomen deutlich schwächer als die von Nef(WT).

4.11 Die Sekretion von Nef ist GABARAP-abhängig und kann bereits kurz nach der Induktion der Expression von Nef nachgewiesen werden

4.11.1 Etablierung einer stabilen Nef Tet-On Linie

Es ist bekannt, dass die konstitutive Expression von Nef über einen längeren Zeitraum zu einer starken Veränderung bei endo- und exosomalen Signalwegen führt. Um diesen zellulären Adaptionen aus dem Weg zu gehen, wurden bereits in der Vergangenheit Nef-induzierbare Systeme eingesetzt (Muratori, Cavallin et al. 2009). Auch in dieser Arbeit sollte eine Nef-induzierbare HEK293-Zelllinie etabliert werden, um die Expression von Nef gezielt anschalten und die Auswirkungen in Echtzeit verfolgen zu können.

4.11.2 Klonierung des Expressionsvektors

Für die Klonierung des pTRE3G-IRES-mcherry Nef-Plasmids, musste im ersten Schritt eine sekundäre *MscI*-Schnittstelle im Originalvektor TetON3G-mCherry mittels ortsspezifischer Mutagenese (Kap. 3.1.11) entfernt werden, um die verbliebene *MscI*-Schnittstelle für spätere Klonierungsschritte benutzen zu können. Im Anschluss wurde Nef aus dem Plasmid pNef-DsRed mit Hilfe der InFusion Klonierung (Kap. 3.1.12) in den mit *MscI* und *BamH1* verdauten Vektor pTRE3G-mcherry(w/oMscI) eingebaut. Schließlich wurde im letzten Schritt das für NefmCherry(w/oMscI) mit Hilfe der Restriktionsenzyme *MscI* und *BamH1* ausgeschnitten und mit dem ebenfalls verdauten Vektor pTRE3G_IRES ligiert.

Das so erhaltende Plasmid pTRE3G-IRES_MCS2_NefpmCherry wurde für die Etablierung einer stabilen Tet-On Linie eingesetzt.

4.11.3 Etablierung einer stabil transfizierten TetOn-Zelllinie

Für die Etablierung der TetOn-Zelllinie wurden HEK293 Zellen mit dem Vektor pCMV-TetOn3G, wie in Kapitel 3.5.3 beschrieben, transfiziert. Nach 48 h wurde dem Zellmedium 1,2 mg/ml G418 zur Selektion transfizierter Zellen zugesetzt. Nach ungefähr 2 Wochen konnten 24 Kolonien gepickt und weiter kultiviert werden. Diese Zellen wurden dann auf die Induzierbarkeit des Transgens, in diesem Fall TetOn, unter Zuhilfenahme eines Tet-induzierbaren Luziferase-Reporter-Konstrukts hin untersucht. Dafür wurden die Zellen transient mit dem pLUC-control-Plasmid transfiziert und nach 24 h die Expression der Luziferase durch Zugabe von 100 mg/ml Doxycyclin für 48 h induziert. Die Zellen wurden lysiert (Kap. 3.3.1.5) und die Luziferase-Aktivität mit Hilfe eines Fluoreszenzspektrometers gemessen. In Abbildung 31 sind die Ergebnisse des Luziferase-Assays zusammengefasst.

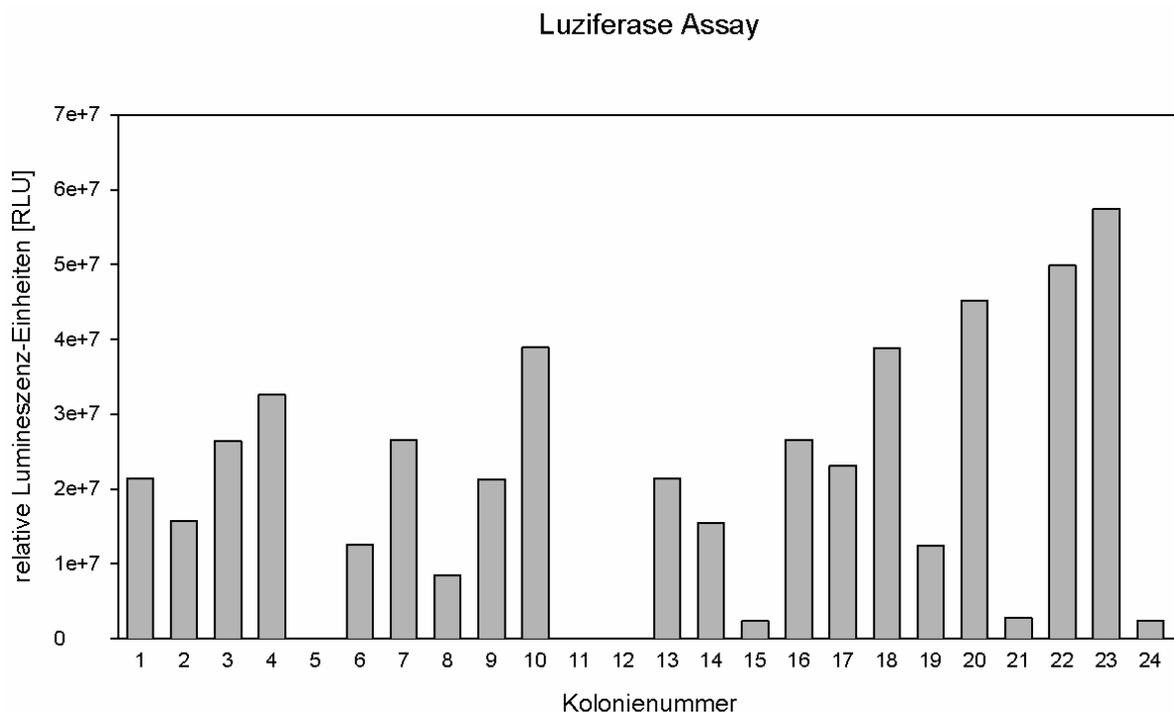


Abbildung 31 Luziferase-Assay der TetOn-Zellen

24 Kolonien der mit pCMV-TetON3G transfizierten Zellen wurden auf die Induzierbarkeit des Kontrolltransgens unter Zuhilfenahme eines Tet-induzierbaren Luziferase-Reporter-Konstrukts hin untersucht. Dafür wurden die Zellen transient mit dem pLUC-Kontrollplasmid cotransfiziert und nach 24 h die Expression der Luziferase durch Zugabe von 100 mg/ml Doxycyclin für 48 h induziert. Die Zellen wurden wie in Kap. 3.5.1.5 beschrieben lysiert und die Luziferase-Aktivität mit Hilfe eines Fluoreszenzspektrometers gemessen. Dargestellt ist die relative Luziferase-Aktivität in Lumineszenz-Einheiten als Maß für die Stärke des Promotors nach Induktion der Expression.

Schließlich wurden die Klone 20, 22 und 23 aufgrund der besten Induzierbarkeit weiter kultiviert und mit dem Plasmid pTRE3G-IRES-Nef-mCherry kotransfiziert. Die Selektion der Zellen erfolgte wie bereits oben beschrieben durch Antibiotikazugabe, in diesem Fall Hygromycin. Es stellte sich jedoch heraus, dass die Effizienz der Kotransfektion sehr gering war, sodass nach zwei Wochen nur noch transfizierte Kolonien der Ursprungskolonie 22 lebten. Diese Zellen wurden auf die Induzierbarkeit von Nef-mCherry hin getestet.

4.11.4 Optimierung der Nef-mCherry-Induktion

Für die Optimierung der Induktion von Nef-mCherry wurden 1×10^7 Zellen pro Well einer 6-Well-Platte ausgesät. Am Folgetag wurde in einem ersten Versuch die Menge an Doxycyclin optimiert, die am besten für die Induktion von Nef-mCherry geeignet war. Dazu wurden die Zellen mit DMEM + 10 % FCS inkubiert, dem gleichzeitig Doxycyclin in den Konzentrationen 0 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μ M und 10 μ M zugesetzt wurde. Nach 24 h wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit RIPA-Puffer lysiert. Pro Ansatz wurden 50 μ g Gesamtproteinmenge mittels Western-Blot auf die Expression von Nef-mCherry hin untersucht (Kap. 3.2.7).

Wie der Abb. 32 entnommen werden kann, konnte kein Nef-mCherry detektiert werden, wenn kein Doxycyclin im Medium vorhanden war. Eine Doxycyclin-Konzentration von 10 nM führte ebenfalls zu keiner Expression von Nef-mCherry. Dagegen konnte sowohl bei einer Doxycyclin-Konzentration von 100 nM als auch bei 1 μ M Doxycyclin Nef-mCherry nachgewiesen werden. Wurde dem Medium 10 μ M Doxycyclin zugesetzt, konnte nur sehr wenig Nef-mCherry detektiert werden, allerdings zeigten bei dieser Konzentration besonders viele Zellen bereits apoptotische Merkmale, wie z.B. die Auflösung des Zellkerns. Für die weiteren Experimente wurde für die Induktion immer eine Doxycyclin-Konzentration von 100 nM eingesetzt.

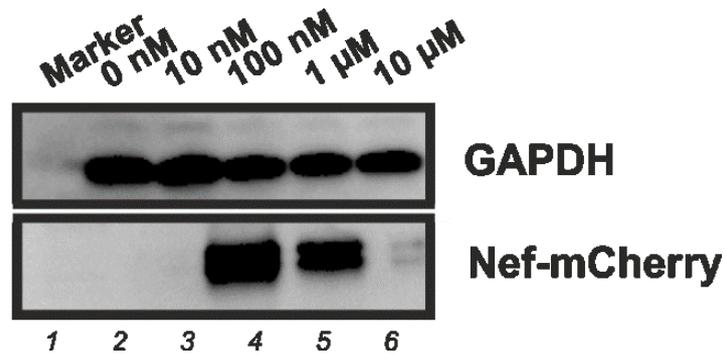


Abbildung 32 Bestimmung der benötigten Doxycyclin-Konzentration

Spur 1: Marker, Spur 2: 0 nM, Spur 3: 10 nM, Spur 4: 100 nM, Spur 5: 1 µM, Spur 6: 10 µM. Die Detektion erfolgte mit einem anti-GAPDH und einem anti-Nef-Antikörper (Tab.11).

Im nächsten Versuch wurde untersucht, wie lange die Zellen mit 100 nM Doxycyclin inkubiert werden müssen, um eine ausreichende Menge an Nef-mCherry zu exprimieren. Dazu wurden 1×10^7 Zellen pro Well einer 6-Well Platte ausgesät und nach 24 h mit Medium, dem 100 nM Doxycyclin zugesetzt wurde, für die Dauer von 0 h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 7 h, 8 h, 12 h, 24 h inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit RIPA-Puffer lysiert. Jeweils 50 µg Gesamtproteinmenge wurden mittels Western Blot auf die Expression von Nef-mCherry hin untersucht (Kap. 3.2.7).

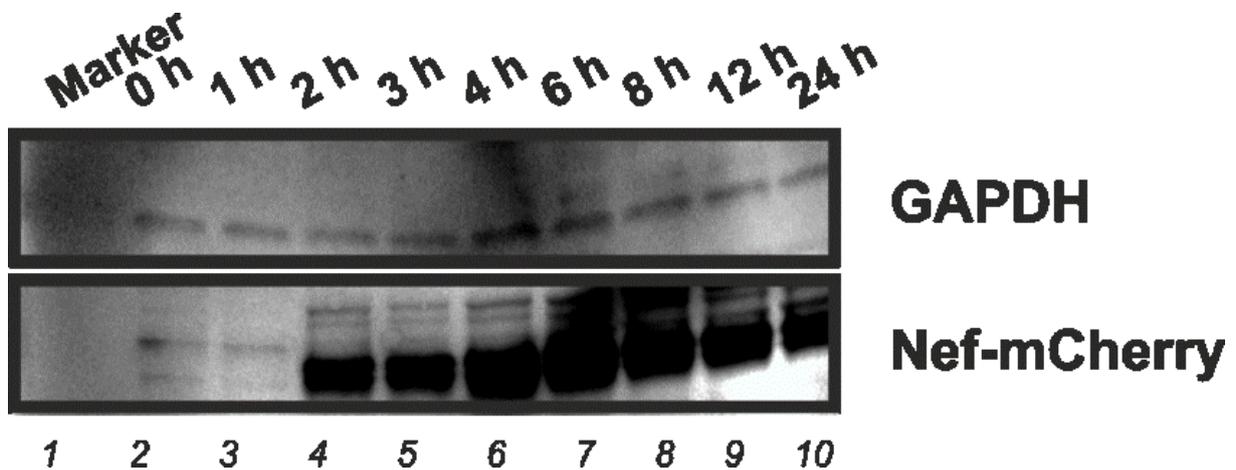


Abbildung 33 Doxycyclin-Zeitreihe

Spur 1: Marker, Spur 2: 0 h, Spur 3: 1 h, Spur 4: 2 h, Spur 5: 3h, Spur 6: 4 h, Spur 7: 6 h, Spur 8: 8 h, Spur 9: 12 h, Spur 10: 24 h. Die Detektion erfolgte mit einem anti-GAPDH und einem anti-Nef-Antikörper (Tab.11).

4.11.5 Lebendzell-Fluoreszenzmikroskopie von induzierbaren Nef und ATG8s

1×10^4 der mit pTRE3GCMV-3G und pTRE3G_IRES_MCS2_mCherryNef(w/oMSCI) kotransfizierten HEKk293-Zellen wurden auf glassbottom wells ausgesät und in phenolrotfreiem DMEM mit 10 % FCS inkubiert. Am Folgetag wurden die Zellen mit CFP-GABARAP, -GABARAPL1, -GABARAPL2 und CFP-LC3B transfiziert (Kapitel 3.4.4). Nach 48 h wurde die Expression von Nef-mCherry durch die Zugabe von 100 nM Doxycyclin ins Medium gestartet. Nach 4 h Inkubation bei 37 °C wurde das Medium abgenommen, die Zellen zweimal mit warmen 1 x PBS gewaschen und in frischem Medium weiter inkubiert. Nach 24 h wurden die Zellen mit Hilfe konfokaler Laserscanning-Mikroskopie analysiert (Kap. 3.6.1).

In Abbildung 34 sind die einzelnen Fluoreszenzkanäle eines repräsentativen z-Stacks einer kotransfizierten Zelle mit CFP-GABARAP und einer mit CFP-LC3B dargestellt. In beiden Zellen konnte sowohl GABARAP als auch LC3B in vesikulären Strukturen innerhalb des Zytoplasmas unter Normalbedingungen (DMEM und 10 % FCS) nachgewiesen werden. Zusätzlich lässt sich bei den mit GABARAP kotransfizierten Zellen eine Färbung der Plasmamembran, sowie eine Ausbildung blasenförmiger Strukturen an der Zelloberfläche beobachten. In den Vergrößerung (Abb. 35 und 36) werden die Beobachtungen noch einmal verdeutlicht.

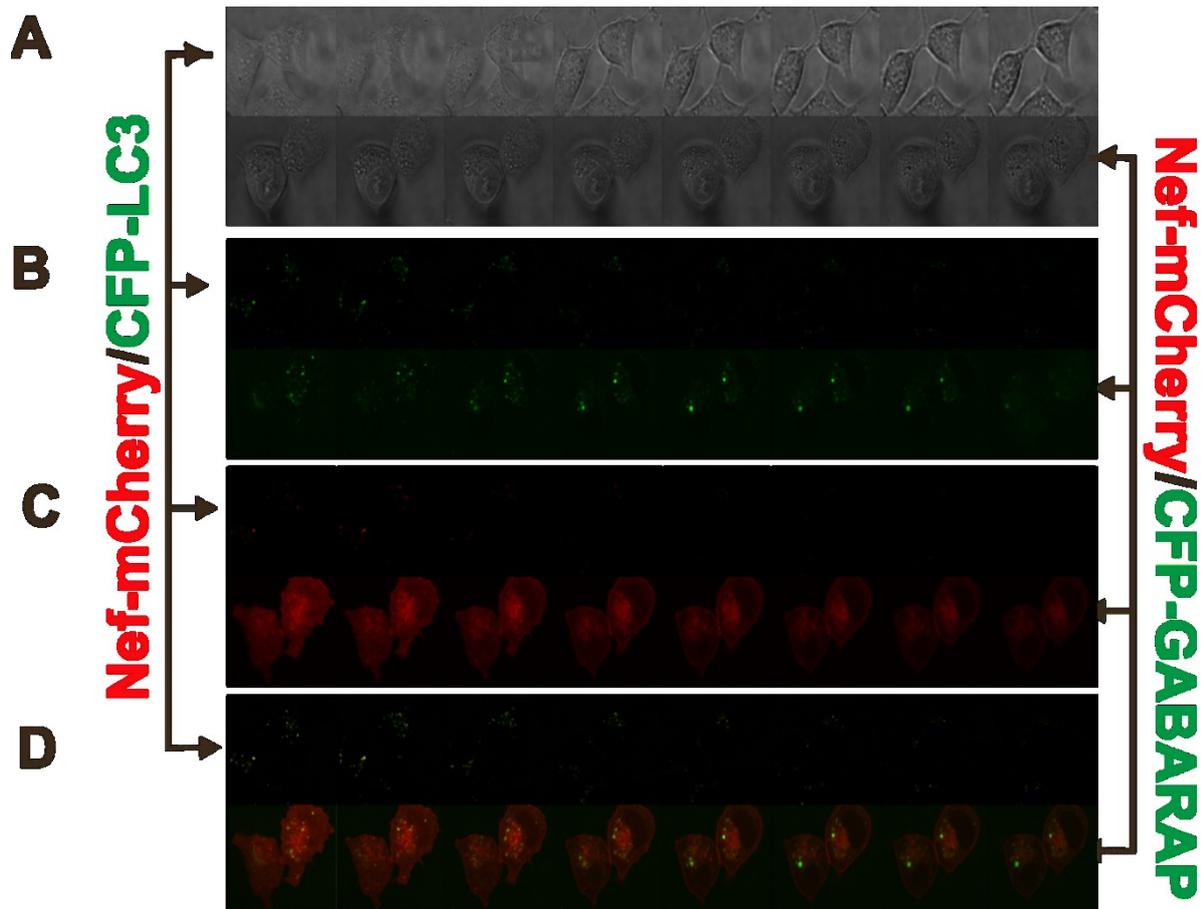


Abbildung 34 Vergleich der Kollokationen zwischen Nef mit GABARAP und LC3B

HEK293 TetOn Nef-pmCherry wurden mit CFP-GABARAP bzw. CFP-MAPLC3BLC3B cotransfiziert. 48 h nach der Transfektion wurde die Expression von Nef-mCherry durch Zugabe von 100 nM Doxycyclin für 4 h induziert. Nach weiteren 24 h wurde die Lokalisation der beiden Proteine mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie unter Lebendzellbedingungen analysiert. A: Durchlicht, B: CFP-GABARAP/LC3B, C: Nef-mCherry (induziert), D: merge.

Wie den Abb.en 35 und 36 entnommen werden kann, konnte die besondere Verteilung von Nef und GABARAP innerhalb vesikulärer Strukturen bereits kurz nach der Induktion der Nef-Expression detektiert werden (Abb. 36). So konnte Nef an der äußeren Hülle der MVB-ähnlichen Vesikel nachgewiesen werden. Innerhalb dieser Vesikel lässt sich dann wieder eine Kollokation beider Proteine in kleinen vesikulären Strukturen erkennen. Solche MVB-ähnlichen Strukturen, die ihren Ursprung in der ER-Golgi Region zu haben schienen, konnte bei den mit LC3B kotransfizierten Zellen innerhalb der oberen Zellschichten nicht gefunden werden (Abb. 35).

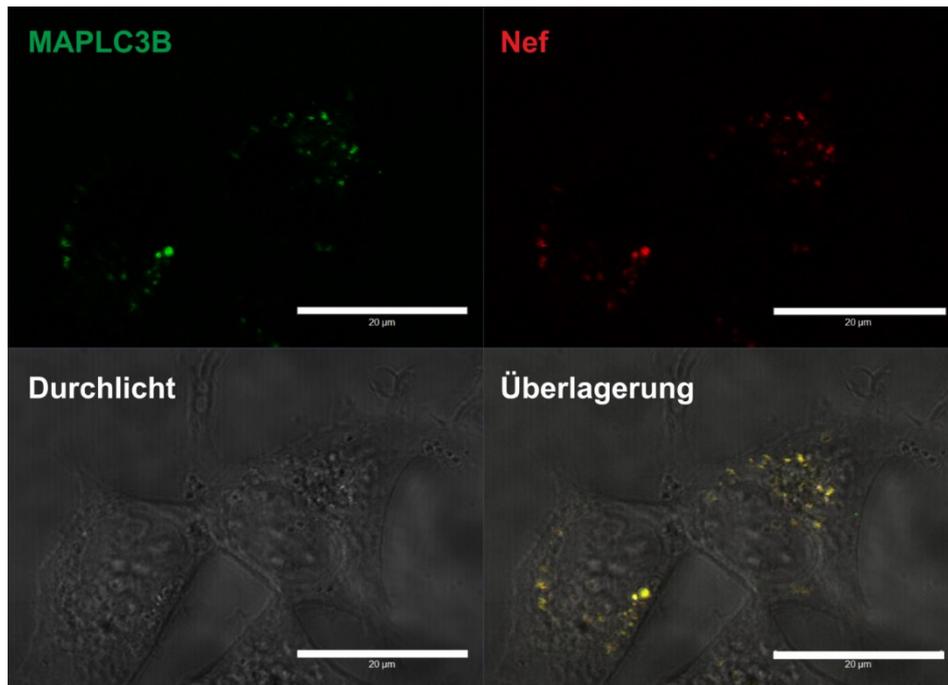


Abbildung 35 Kolokalisation von Nef und MAPLC3B

HEK293 TetOn Nef-pmCherry wurden mit dem Vektor pECFP-LC3B cotransfiziert. 48 h nach der Transfektion wurde die Expression von Nef-pCherry durch Zugabe von 100 nM Doxycyclin für 4 h induziert. Nach weiteren 24 h wurde die Lokalisation der beiden Proteine mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie unter Lebendzellbedingungen analysiert. Oben links ist die Fluoreszenz von CFP-LC3B und oben rechts die von Nef-mCherry dargestellt. Unten links ist das dazugehörige Durchlichtbild dargestellt. Die Überlagerung der beiden Fluoreszenzen und dem Durchlichtbild sind unten rechts dargestellt.

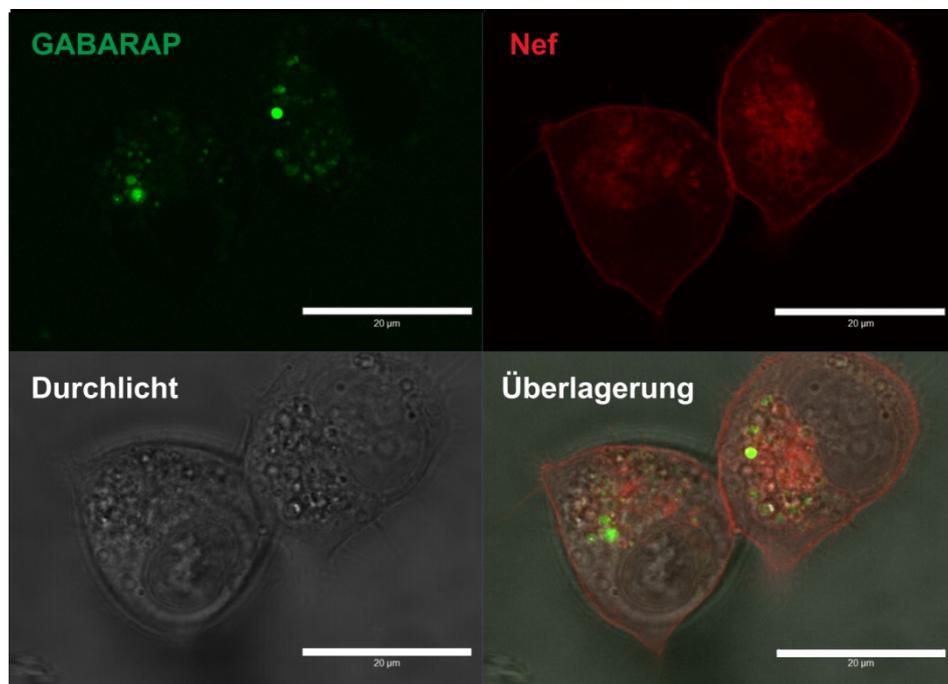


Abbildung 36 Kolokalisation von Nef und GABARAP

HEK293 TetOn Nef-pmCherry wurden mit dem Vektor pECFP-GABARAP kotransfiziert. 48 h nach der Transfektion wurde die Expression von Nef-mCherry durch Zugabe von 100 nM Doxycyclin für 4 h induziert. Nach weiteren 24 h wurde die Lokalisation der beiden Proteine mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie unter Lebendzellbedingungen analysiert. Oben links ist die Fluoreszenz von CFP-GABARAP und oben rechts die von Nef-mCherry dargestellt. Unten links ist das dazugehörige Durchlichtbild dargestellt. Die Überlagerung der beiden Fluoreszenzen mit dem Durchlichtbild ist unten rechts dargestellt.

Auch bei Zellen, die mit CFP-GABARAPL1 und GABARAPL2 kotransfiziert wurden, lässt sich eine Kolokalisation von Nef und mit GABARAPL1 bzw. GABARAPL2 in kleinen vesikulären Strukturen innerhalb der MVB-ähnlichen Strukturen nachweisen (Abb. 37).

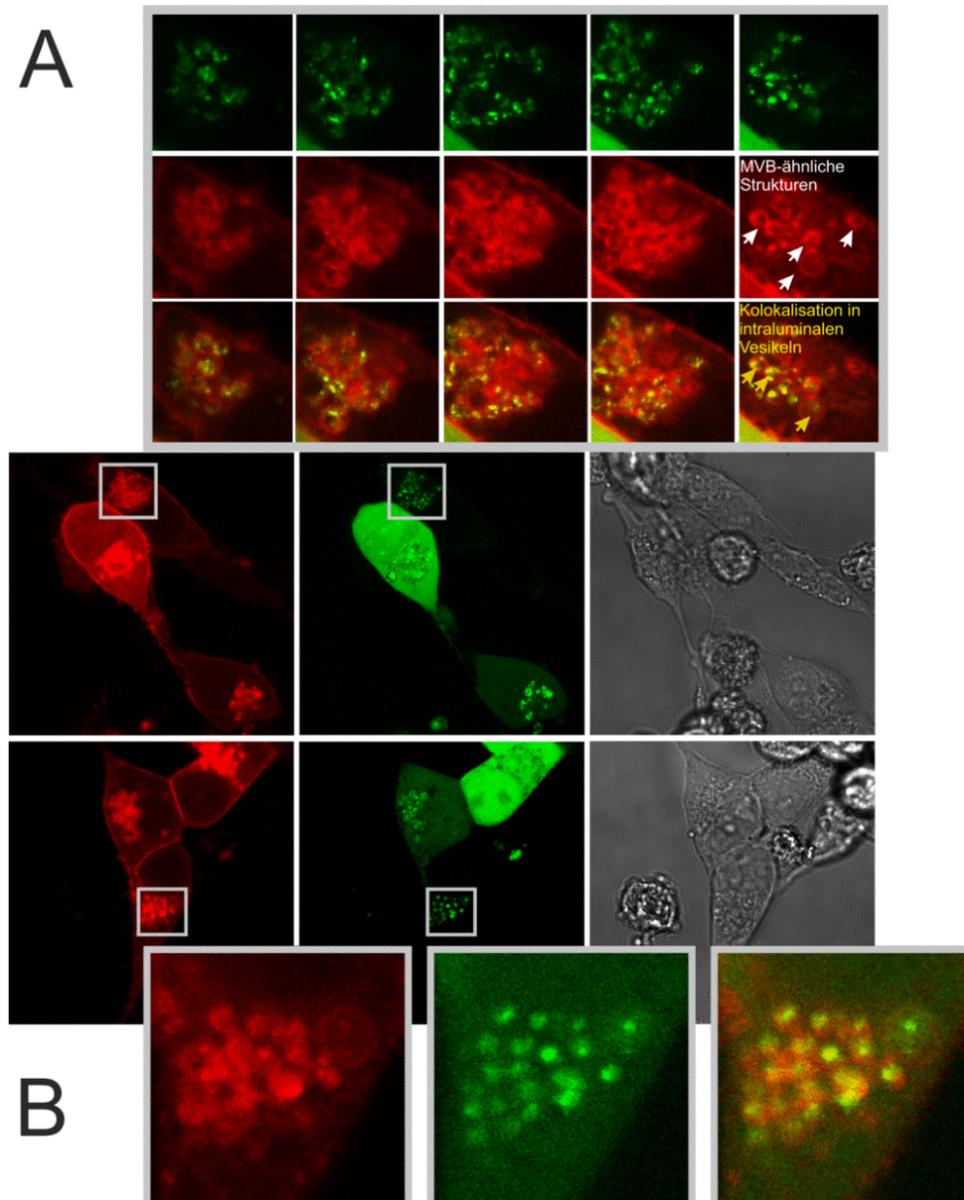


Abbildung 37 Kolokalisation von Nef mit GABARAPL1 und GABARAPL2 nach Induktion von Nef

Die einzelnen Bilder zeigen HEK293-Zellen, die mit CFP-GABARAPL1 (A) oder CFP-GABARAPL2 transfiziert wurden und die Expression von Nef durch die Zugabe von 100 nM Baf A1 induziert wurde. Die entsprechenden vesikulären Strukturen sind vergrößert dargestellt. Im Fall von mit GABARAPL1 transfizierten Zellen ist die Verteilung von vesikulären Strukturen innerhalb verschiedener Zellschichten dargestellt (rot: Nef, grün: GABARAPL1/GABARAPL2).

5 Diskussion

Aufgrund seiner vielfachen Funktionen wird das Nef-Protein als wichtigster Pathogenesefaktor für die Entwicklung der bei einer HIV-1-Infektion erworbenen Immundefizienz angesehen. Das akzessorische Nef-Protein ist ein 27 kDa myristoyliertes Protein, das vor allem in der frühen Phase der Replikation eine entscheidende Rolle spielt. Bei Langzeitüberlebenden, die aufgrund geringer Viruslast und stabiler T-Zellzahlen keine antiretrovirale Therapie benötigten, wurden Virenstämme identifiziert, die entweder Nef-defizient waren oder ein defektes Nef-Gen aufwiesen (Gorry, Churchill et al. 2007). Anhand diverser Studien konnte gezeigt werden, dass das Nef-Protein nicht nur die Sekretion von Virionen erhöht, sondern auch ihre Eliminierung durch Autophagie in den Zellen verhindert.

So rekrutiert Nef das GagPol-Vorläuferprotein zur ESCRT-Maschinerie, um die Sekretion über MVBs zu ermöglichen (Costa, Chen et al. 2006). Weiterhin erhöht es den Einbau von fusogenen Cholesterol in die viralen Partikel, wodurch die membranassoziierten Fusionsvorgänge der Knospung und die Fusion mit untransfizierten Zellen erleichtert wird (Zheng, Plemenitas et al. 2001). Außerdem reguliert Nef den CD4-Oberflächenrezeptor herunter, um die durch CD4-vermittelte Blockade der viralen Assemblierung und Knospung zu verhindern.

In den letzten Jahren wurden immer mehr Verknüpfungen zwischen HIV und Autophagie aufgedeckt. So beeinflussen 10 der 35 identifizierten ATG-Proteine die Replikation von HIV. Bei der Durchführung eines *large scale small RNAi screens* wurden 250 neue für die Replikation essentielle Wirtsfaktoren identifiziert, (Brass, Dykxhoorn et al. 2008). Darunter waren die Gene, die in Reifung und Wachstum des Autophagosoms (ATG7, MAP1LC3B, GABARAPL2, ATG12 und ATG16L2) und Gene, die wichtig für die Funktion des Lysosoms sind (CLN3 und LAPTM5), gefunden. Eekels et al. konnten nachweisen, dass ein Ausschalten der Genexpression von PIK3R4, ATG4A, ATG5 und ATG16 die Replikation CXCR4-tropischer HI-Viren in SubT1-Zellen inhibiert (Eekels, Sagnier et al. 2012). Auch das Ausschalten von Beclin1 und ATG5 in Monozyten und Makrophagen inhibiert die Replikation von HIV-1 (Kyei, Dinkins et al. 2009, Campbell and Spector 2011, Campbell and Spector 2012, Campbell and Spector 2012).

Ein Ausschalten von Genen mittels siRNAs, deren Genprodukte die Biogenese der Autophagosomen regulieren, zeigte, dass die ersten Schritte der Autophagie für die

Replikation von HIV essentiell sind. Diese These wird zum einen dadurch unterstützt, dass infektiöse Virionen nur in Zellen gefunden wurden, die eine moderate Anzahl von Autophagosomen aufwiesen (Espert, Varbanov et al. 2009) und zum anderen dadurch, dass in infizierten Makrophagen die Produktion infektiöser Virionen reduziert wurde, wenn die Reifung des Autophagosoms inhibiert wurde (Espert, Varbanov et al. 2009). Obwohl das HI-Virus Mechanismen der Autophagie für die eigene Replikation nutzt, musste es gleichzeitig Strategien entwickeln, die den Abbau durch Autophagie verhindern. Aktuelle Studien weisen darauf hin, dass HIV sowohl in CD4⁺-T-Zellen als auch in Makrophagen/Monozyten die Fusion von Autophagosom und Lysosom inhibiert (Zhou and Spector 2008, Kyei, Dinkins et al. 2009). Hierbei übernimmt Nef eine wichtige Aufgabe, indem es mit Beclin1 assoziiert und die Inhibierung der proteolytischen Schritte der Autophagie bewirkt (Kyei, Dinkins et al. 2009). Hierfür ist das gleiche ¹⁷⁴DD-Motiv verantwortlich, das auch das Herabregulieren des Oberflächenrezeptors CD4 vermittelt (Roeth and Collins 2006). Die durch Nef verursachte Inhibierung der Autophagie konnte durch Hungerbedingungen und Rapamycin aufgehoben und die virale Replikation gestoppt werden (Zhou and Spector 2008).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Nef selektiv und direkt mit den humanen ATG8-Proteinen GABARAP, GABARAPL1 und GABARAPL2 interagiert. Gleichzeitig konnte keine direkte Interaktion mit Vertretern der eng verwandten MAPLC3-Familie nachgewiesen werden.

5.1 Die Bindung von Nef an die hydrophen Taschen von GABARAP erfolgt über Tryptophan 13

Mit Hilfe von Sequenzanalysen gelang es ein mögliches GIR-Motiv im N-terminalen Arm von Nef um Tryptophan 13 zu identifizieren. So konnte in dieser Arbeit mit Hilfe von Pull-Down-Experimenten gezeigt werden, dass eine Mutation an dieser Stelle zu Alanin die Bindung an GABARAP ebenso unterdrückt (Kap. 4.5) wie die Sekretion Nef-positiver Vesikel (Kap. 4.10).

Es ist bekannt, dass für die Interaktion mit ATG8-Liganden an die hydrophoben Taschen nicht nur ein bindendes Tryptophan von Bedeutung ist, sondern auch, dass die Bindung durch elektrostatische Wechselwirkung saurer Aminosäurereste in der

Nähe des Ω -x-x- Ψ -Motivs beeinflusst wird (Ali, Huang et al. 2010). Obwohl Nef GABARAP über das klassische Bindungsmotiv im Bereich um das W13 bindet, fehlen die sonst für die Bindung benötigten sauren Aminosäurereste in der näheren Umgebung. Jedoch können zusätzliche Phosphorylierungen von Serin und Threonin-Resten, die in der Sequenz direkt vor oder hinter dem LIR-Motiv liegen, die Interaktion beeinflussen.

Da in Nef(SF2) an Position 9 ein konservierter Serin-Rest zu finden ist, könnte eine Phosphorylierung an dieser Stelle die Bindung an GABARAP beeinflussen. Da diese Modifikation in-vitro nicht vorhanden ist, könnte dies auch ein Grund sein, warum bei früheren SPR-Experimenten mit rekombinaten Nef und GABARAP-Proteinen Dissoziationskonstanten im höheren mikromolaren Bereich bestimmt wurden (Gorgels 2011).

Allerdings konnte bei einer Interaktionsstudie mit GABARAP und einem linearen Peptid, das aus den ersten 25 N-terminalen Aminosäuren von Nef besteht, keine Bindung nachgewiesen werden (Olbrich, A., 2014). Somit könnte es sich im Fall der GABARAP-Nef-Interaktion nicht um ein lineares, sondern um ein diskontinuierliches GIR-Motiv handeln. Erst kürzlich wurde ein solches Motiv für die ATG8-ATG12-Interaktion beschrieben. Hierbei bilden die Aminosäuren W139 und V62 des humanen ATG12s das diskontinuierliche WxxL-Motiv des kanonischen AIMs (Kaufmann, Beier et al. 2014). Aufgrund der hohen Flexibilität, der konformationellen Diversität und der Tendenz zur Aggregation konnte bislang keine Struktur der N-terminalen Region von Nef bestimmt werden, die als Grundlage für die Simulation der GABARAP-Nef-Bindung hätten genutzt werden können (Arold and Baur 2001, Hoffmann, Jonas et al. 2007, Gerlach, Laumann et al. 2010, Akgun, Satija et al. 2013).

5.2 Die selektive Bindung der GABARAP-Familie wird durch die Aminosäuren S53 und W62 des GABARAP-Moleküls bestimmt

Aus früheren Studien war bekannt, dass Nef, wie andere GABARAP-Liganden auch, an HP1 und HP2 an der GABARAP-Oberfläche bindet (Kap. 1.6). Wie in Kapitel 4.4 beschrieben, könnten S53 und F62 von GABARAP potentielle Schlüsselpositionen darstellen. Tatsächlich führte ein Austausch der beiden Aminosäuren zu Asparaginsäure und Lysin dazu, dass GABARAP in den Pull-Down-Experimenten

(Abb. 20) nicht mehr an rekombinantes Nef binden konnte. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass ein Austausch der entsprechenden Aminosäuren bei LC3B(D56/K65) die Bindung an Nef ermöglicht.

Zudem konnte bei ähnlichen Versuchen von Lystad et al., die mit ALFY durchgeführt wurden, gezeigt werden, dass der Austausch der drei Aminosäuren K24, Y25 und D54 bei GABARAP die Bindung an ALFY unterdrückt bzw. ein Austausch der entsprechenden Aminosäuren Q26, H27, H57 bei MAPLC3B die Bindung ermöglicht. Dabei liegen, die in dieser Arbeit identifizierten Schlüsselpositionen in GABARAP für die Nef-Bindung S53 und F62 in direkter Nähe zu den Schlüsselpositionen in GABARAP für die ALFY-Bindung.

5.3 Die Interaktion von GABARAPs und Nef ist direkt und lipidierungsunabhängig

Wie die Pull-Down-Experimente zeigten, interagiert Nef direkt mit GABARAP, GABARAPL1 und GABARAPL2, aber nicht mit LC3B (Kap. 4.3). Zusätzlich konnten in Folge der Präzipitation mit Nef nur unlipidierte GABARAPs im Western-Blot detektiert werden (Kap. 4.2), sodass eine Lipidierung der GABARAPs für die Nef-Bindung nicht notwendig ist. Bislang wurde die carboxyterminale Lipidierung durch Phosphatidylamin und die damit verbundene Verankerung von GABARAP in Membranen für die durch GABARAP-vermittelten Transportvorgänge, wie z.B. dem Transport des GABA_A-Rezeptors zur Plasmamembran, aber auch für die Fusion der Autophagosomenmembran als essentiell angesehen (Mohrlüder, 2009). Allerdings wurde erst kürzlich entdeckt, dass unlipidiertes Atg8, aufgrund seiner fusogenen Eigenschaften, eine wichtige Rolle bei der Fusion der Vakuole in der Hefe *Pichia pastoris* übernimmt (Tamura, Oku et al. 2010).

Beim Wechsel des Stoffwechsels von Glukoseabbau zum Abbau von Methanol fusionieren die vielen kleinen Vakuolen zu einer großen Vakuole. (Nakatogawa, Ichimura et al. 2007). Da in einer anderen Studie gezeigt wurde, dass Atg8 *in vitro* nicht für die Fusion der Vakuole benötigt wurde (Wickner 2010), ist Atg8 vermutlich vielmehr für die Rekrutierung der für die Fusion benötigten Faktoren zur Vakuole verantwortlich (Noda, Ohsumi et al. 2010) (Nair, Jotwani et al. 2011).

Da Nef in Säugerzellen innerhalb vesikulärer Strukturen akkumuliert, könnte es durch die gleichzeitige Bindung an unlipidierten GABARAP, wenn dieses eine ähnliche Funktion wie unlipidiertes Atg8 übernimmt, weitere Faktoren zu den Vesikeln rekrutieren und somit die Fusion mit anderen membranösen Strukturen ermöglichen.

5.4 GABARAPs akkumulieren wie LC3B innerhalb von Autophagosomen und kolokalisieren zusätzlich mit Nef an der Plasmamembran

Die Ergebnisse der Kolokalisationsexperimente zeigten, dass Nef mit GABARAP, GABARAPL1, GABARAPL2 und LC3B unter „Normalbedingungen“ innerhalb der Zelle kolokalisierte. In allen Zellen konnte eine Lokalisation von Nef und den ATG8s in Autophagosomen innerhalb des Zytoplasmas nachgewiesen werden (Abb. 12). Die bereits beschriebene gleichzeitige Lokalisation von LC3B und Nef innerhalb von Autophagosomen (Kyei, G.B. et al., 2009), konnte somit in dieser Arbeit zum ersten Mal auch für GABARAP, GABARAPL1 und GABARAPL2 nachgewiesen werden (Deretic 2005, Kyei, Dinkins et al. 2009, Deretic 2010, Dinkins, Arko-Mensah et al. 2010).

Bereits 2010 lieferten Deretic et al. erste Hinweise, dass Nef das HI-Virus vor dem Abbau durch Autophagie schützt, indem es die Reifung der Autophagosomen inhibiert und somit den Abbau von Virusbestandteilen in den Autophagolysosomen verhindert (Abb. 38). Dazu bindet Nef an Beclin1 und blockiert die Reifung von Autophagosomen in Makrophagen, was anhand einer Akkumulation der lipidierten Form von LC3B zu beobachten war. Auch in dieser Arbeit konnte eine Anhäufung von lipidierten LC3B in den Zelllysaten Nef-transfizierter HEK293-Zellen nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu, führte die Transfektion von Nef bei keinem der GABARAPs zu einer Akkumulation ihrer lipidierten Form (Abb. 24).

Dafür zeigten die mit Nef und GABARAPs-transfizierten HEK293-Zellen eine verstärkte Sekretion bläschenartiger Strukturen, die ihren Ursprung in der ER-Golgi-Region zu haben schienen, sowie eine Lokalisation beider Proteine an der Plasmamembran (Abb. 12). Aufgrund dieser Beobachtungen könnte es sein, dass die

GABARAPs-Nef-Interaktion eine wichtige Funktion bei der Sekretion bzw. dem Transport von Nef zur Plasmamembran übernimmt.

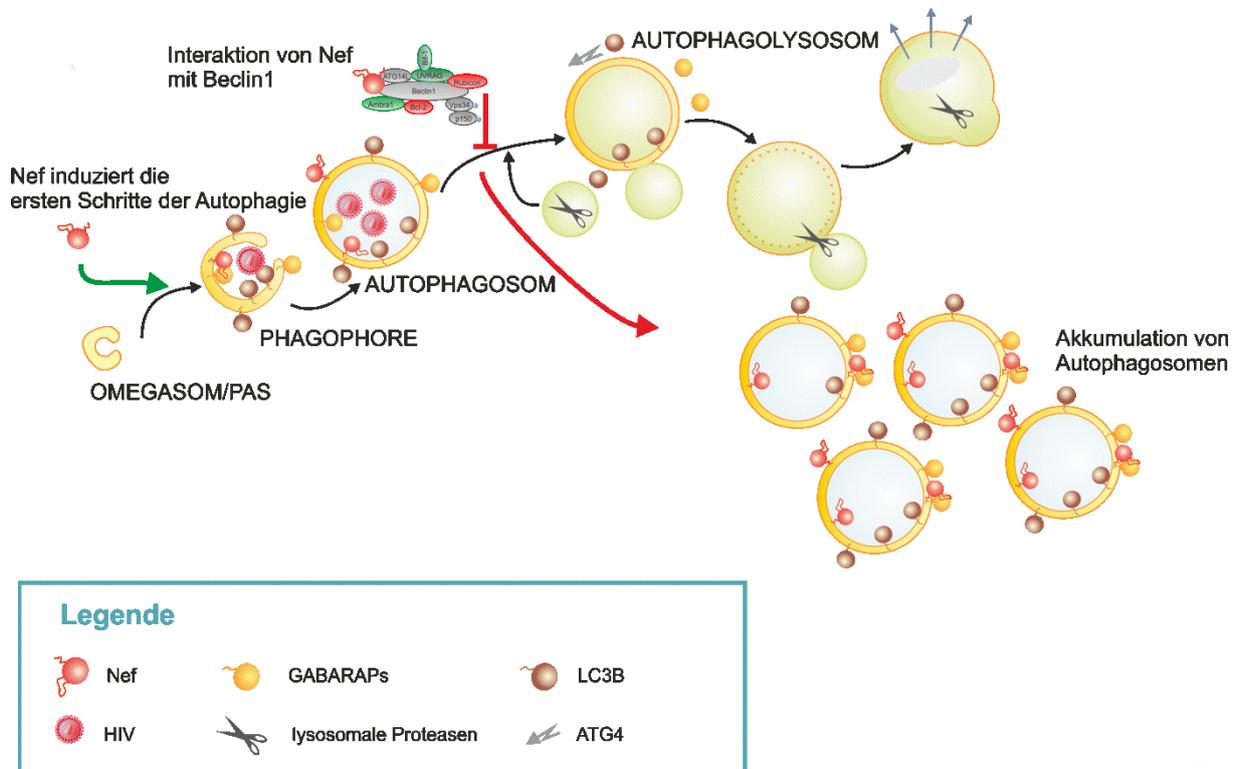


Abbildung 38 Möglicher Einfluss von Nef in der Autophagie

Nef induziert die ersten Schritte der Autophagie, um die Sythese neuer Virionen zu steigern. Gleichzeitig hemmt Nef die Fusion der Autophagosomen mit den Lysosomen durch die direkte Interaktion mit Beclin1, um so dem Abbau durch Autophagie zu entkommen. Aufgrund der Hochregulierung der Autophagie und der gleichzeitigen Inhibierung der Lysosomenfusion kommt es zu einer Akkumulation der Autophagosomen innerhalb der Zellen.

5.5 GABARAPs und LC3 werden für den Transport von Nef über einen Autophagie-basierten unkonventionellen Sekretionsmechanismus benötigt

Die vielfältigen pleiotropen Effekte von Nef werden durch seine zahlreichen Interaktionen mit Proteinen der Immunzellen vermittelt. Nef moduliert die Oberflächenexpression verschiedener Rezeptoren, um die Infektiosität zu steigern. So verhindert die Endozytose und lysosomale Degradation von CD4 eine Superinfektion der Zelle (Garcia and Miller 1991) und die Herabregulierung von MHCI von der

Zelloberfläche schützt die infizierte Zelle vor der Lyse durch zytotoxische T-Lymphozyten (Schwartz, Marechal et al. 1996). Weiterhin induziert Nef eine Aktin-Remodellierung innerhalb der Zelle, wodurch es dem HIV-Genom ermöglicht wird das Aktin-Netzwerk zu durchdringen und in Folge dessen die Virusreplikation zu steigern (Stolp, Abraham et al. 2010). Voraussetzung für die meisten Nef-Aktivitäten ist die Interaktion mit der Plasmamembran sowie die Assoziation mit endozytotischen und perinukleären Vesikeln (Aiken, Konner et al. 1994, Goldsmith, Warmerdam et al. 1995, Sawai, Baur et al. 1995, Fackler, Kienzle et al. 1997, Bentham, Mazaleyrat et al. 2006, Fackler, Moris et al. 2006, Giese, Woerz et al. 2006). Die Membranassoziation von Nef wird durch die Myristoylierung des Glycins an Position 2 sowie durch eine Argininreiche Sequenzabfolge (R17/19/21/22) vermittelt, die gemeinsam ein N-terminales Membranbindemodul bilden. Eine kürzlich veröffentlichte Studie, bei der dieses Membranbindemodul durch andere bekannte mit Membranen interagierenden Domänen ausgetauscht wurde, zeigte, dass die durch Nef vermittelten Aktivitäten unabhängig vom Ausmaß der Membranbindung, der subzellulären Verteilung oder dem anterograden Transportweg sind. Allerdings sind sie abhängig vom vesikulären Transport zur Plasmamembran (Geist, Pan et al. 2014). Der Transport zur Plasmamembran kann generell durch koventionelle (Kap. 1.3.1) oder unkonventionelle Sekretion erfolgen (Kap. 1.3.2). Da Nef allerdings keine N-terminale Signalsequenz als Transportsignal besitzt, muss Nef auf unkonventionelle Art sekretiert werden.

HEK293-Zellen, die stabil mit pNef-DsRed transfiziert wurden, zeigten unter „Normalbedingungen“ eine verstärkte Sekretion Nef- und GABARAPs-positiver bläschenartiger Strukturen an der Plasmamembran (Abb. 13). Zeitgleich konnte eine Akkumulation von Autophagosomen innerhalb des Zytoplasmas beobachtet werden. Eine Ansammlung von LC3-positiven Vesikeln konnte schon bei der Sekretion von IL-1 β beobachtet werden (Deretic et al., 2012), sodass im Fall von IL-1 β ein auf Autophagie-basierender unkonventioneller Sekretionweg vorgeschlagen wurde (Kap. 1.3.1). Aufgrund dieser Ähnlichkeiten in den Fluoreszenzaufnahmen, wäre es möglich, dass auch Nef über einen solchen Sekretionsweg sezerniert wird. Somit würde Nef, ähnlich wie IL-1 β , im Zytosol von PAS/Omegasom/CUPS eingefangen und innerhalb Autophagosomen-ähnlicher Vesikel zur Plasmamembran transportiert werden. Dort fusioniert die äußere Membran der Autophagosomen-ähnlichen Vesikel mit der Plasmamembran und Nef wird innerhalb von Mikrovesikeln freigesetzt. Das an

der Außenseite lokalisierte Nef liegt nach der Fusion assoziiert mit der Plasmamembran vor (Abb. 39).

Zusätzlich konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Sekretion von Nef unter Autophagie-induzierenden Bedingungen reduziert wurde und die zytoplasmatische Verteilung zunahm (Abb. 12).

Auf den ersten Blick scheint diese Beobachtung im Widerspruch dazu zu stehen, dass für die Sekretion von Nef Autophagosomen-ähnliche Strukturen benötigt werden. Allerdings zeigten Deretic et al. (2009), dass durch die Induktion von Autophagie die antiautophagischen Effekte von Nef aufgehoben werden. Dies würde in diesem Fall bedeuten, dass in hungernden Zellen Nef durch Autophagosomen eingefangen und nach der Fusion mit dem Lysosom abgebaut werden könnte, wenn die Fusion nicht durch die gleichzeitige Inkubation mit BafA1, wie es bei diesen Zellen der Fall, gehemmt würde.

Bisher wurde angenommen, dass durch die Inhibierung der Fusion mit dem Lysosom das Virus vor dem Abbau durch Autophagie geschützt wird. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zusätzlich Hinweise gefunden, dass Nef die lysosomalen Schritte hemmt, um seine eigene Sekretion zu verstärken.

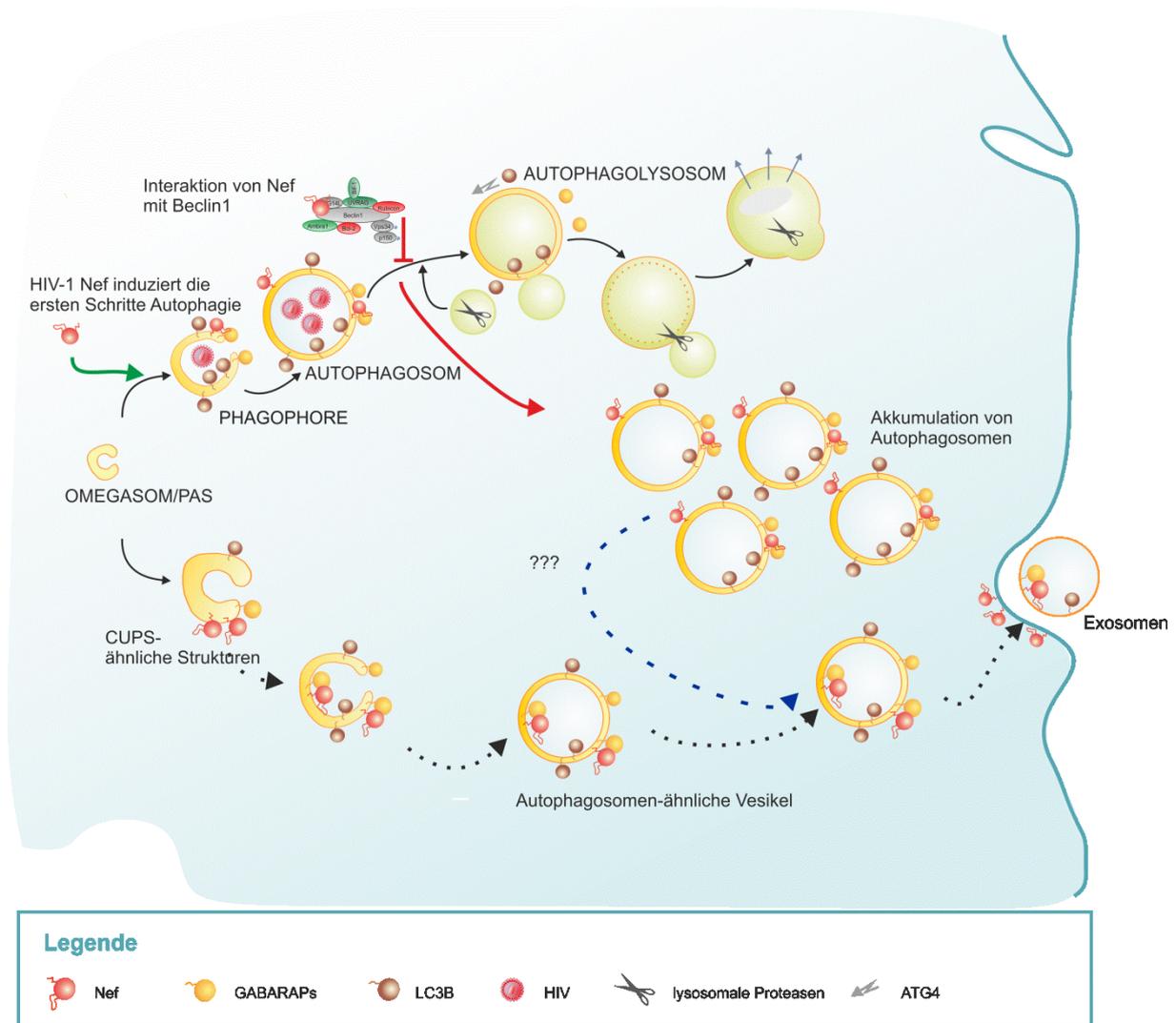


Abbildung 39 Möglicher Ablauf der Autosekretion von Nef

Freies Nef könnte, ähnlich wie IL-1 β , im Cytosol durch PAS/Omeegasomen/CUPS eingefangen und innerhalb Autophagosomen-ähnlicher Vesikel zur Plasmamembran transportiert werden. Dort fusioniert die äußere Membran der Autophagosomen-ähnlichen Vesikel mit der Plasmamembran und Nef wird innerhalb von Mikrovesikeln (Exosomen) freigesetzt. Das an der Außenseite lokalisierte Nef liegt nach der Fusion assoziiert mit der Plasmamembran vor.

5.6 Die unkonventionelle Sekretion von Nef könnte aber auch unabhängig von Autophagie und LC3 ablaufen

Nef ist eines der ersten und am häufigsten exprimierten Proteine nach der Infektion mit HIV. Obwohl Nef im Serum HIV-infizierter Patienten gefunden wurde, ist der zugrundeliegende Sekretionsweg noch weitestgehend unbekannt. Bereits 1995 entdeckten Macreadie et al., dass Nef im Kulturüberstand transfizierter Hefen nachgewiesen werden konnte. Weiterführende Studien in den darauffolgenden Jahren

zeigten, dass Nef die Proliferation von Endosomen, Lysosomen und MVBs, sowie eine massive Sekretion von Exosomen, induziert.

Auch in dieser Arbeit konnte Nef im Überstand Nef-transfizierter Zellen nachgewiesen werden (Abb. 25). Dabei änderte sich die Menge an detektiertem Nef nicht, wenn nur ein Mitglied der ATG8s ausgeschaltet wurde. Erst im Kulturüberstand der Zellen bei denen gleichzeitig die Expression der gesamten GABARAP-Familie (GABARAP, GABARAPL1 und GABARAPL2) unterdrückt wurde, konnte kein Nef mehr im Überstand Nef-exprimierender HEK293-Zellen nachgewiesen werden. Zusätzlich konnte bei den Fluoreszenzbildaufnahmen der stabil mit Nef transfizierten HEK293-Zellen, bei denen die Expression von GABARAP, GABARAPL1 und GABARAPL2 durch Transfektion mit entsprechenden siRNAs ausgeschaltet worden war, Nef in keiner der aufgenommenen Zellebenen an der Plasmamembran detektiert werden (Abb. 29). Somit konnten im Rahmen dieser Arbeit die Mitglieder der GABARAP/GABARAPL2-Familie als für den anterograden Transport sowie für die Sekretion von Nef essentielle Proteine identifiziert werden.

Da Nef seine eigene Sekretion innerhalb von Exosomen induziert, wurden in einem weiterführenden Experiment die oben beschriebenen siRNA-Experimente wiederholt und die Exosomen aus dem Kulturüberstand isoliert. Tatsächlich konnte Nef in den isolierten Exosomen nachgewiesen werden (Abb. 27). Wurde die GABARAP/GABARAPL2-Familie mittels siRNA ausgeschaltet, konnten zwar Exosomen isoliert werden, allerdings war innerhalb der Exosomen kein Nef nachzuweisen.

Wie bereits erwähnt, sind ATG8-Proteine essentielle Komponenten der Makrophagie. In Hefe wurden sie zusätzlich als Bestandteil eines neuen Kompartiments für die unkonventionelle Protein-Sekretion (CUPS) entdeckt (Kap. 1.3.2), welches eine wichtige Rolle bei der Sekretion von Acb1 übernimmt. Bisher gibt es keine Studien darüber, ob humane Proteine an CUPS-ähnlichen Strukturen akkumulieren und ob diese Strukturen für die autophagiebasierte unkonventionelle Sekretion benötigt werden. Erste Hinweise, dass ein ähnlicher Sekretionsmechanismus auch in Säugern möglich ist, lieferten Untersuchungen zur Sekretion von CFTR- Δ F58, in denen Parallelen zu der Sekretion von Acb1 sichtbar waren (Kap. 1.2.2). Zusätzlich war die Sekretion von CFTR- Δ F58 abhängig von ATG8, wenngleich in dieser Studie nicht zwischen GABARAP/GABARAPL2- und LC3-Familie unterschieden wurde (Gee, Noh et al. 2011).

Acb1 akkumuliert in MVBs und wird in Folge der Fusion von MVBs mit der Plasmamembran innerhalb von Exosomen freigesetzt (Malhotra 2013). Es ist bekannt, dass auch Nef innerhalb von MVBs akkumulieren kann (Nguyen, Booth et al. 2003). Dies konnte auch in dieser Arbeit besonders bei der Fluoreszenzmikroskopie Nef-induzierbarer HEK293-Zellen beobachtet werden (Abb.36). Da bei diesen Zellen Nef an der Membran MVB-ähnlicher Vesikel akkumulierte und zusätzlich in diesen MVB-ähnlichen Strukturen eine Kolokalisation von Nef und den GABARAPs innerhalb kleiner vesikulärer Strukturen nachgewiesen werden konnte (Abb. 37 und Abb. 40). In diesem Fall würden die großen durch Nef-begrenzten Vesikel die MVBs und die in der Überlagerung der Fluoreszenzkanäle als gelb erscheinenden punktartigen GABARAP/GABARAPL1/GABARAPL2- und Nef-Strukturen die internalisierten Vesikel, also die Vorläufer der Exosomen, darstellen.

Aus diesem Grund konnten die GABARAPs, neben der bereits im letzten Kapitel diskutierten Notwendigkeit für den Transport und die Sekretion von Nef, auch als für die Sekretion von Nef innerhalb von Exosomen essentielle Proteine in der vorliegenden Arbeit identifiziert werden.

Da ein Ausschalten der LC3-Familie mittels siRNA-Interferenz die Sekretion Nef-haltiger Exosomen nicht beeinflusst, aber für den unter 5.5 beschriebenen Sekretionsweg Autophagosomen-ähnliche Vesikel und somit LC3 benötigt wird, muss in diesem Fall ein anderer Sekretionsweg für die Sekretion von Nef innerhalb der in dieser Exosomenpräparation isolierten Exosomen verantwortlich sein.

So könnte Nef durch einen bisher unbeschriebenen Mechanismus, bei dem CUPS und Einzelmembran-Vesikel beteiligt sind, innerhalb von Exosomen sezerniert werden (Abb. 40). Dieser Prozess könnte abhängig von einer Proteinaktivität sein, die im Atg8 der Hefe präsent ist und die in höheren Eukaryoten nur in der GABARAP/GABARAPL2-Familie konserviert ist. Die Tatsache, dass der Konservierungsgrad zwischen Atg8 und den GABARAPs (Atg8 Identität/Ähnlichkeit zu GABARAP: 55/77; GABARAPL1:55/78; GABARAPL2: 56/75) höher ist als der von ATG8 zur LC3-Familie (Atg8:LC3B: 37/60), unterstützt diese Idee.

In diesem Fall würde die Sekretion von Nef auf folgende Art erfolgen: Nach der Expression von Nef würden sich die in Säugern potentiellen CUPS-ähnlichen Strukturen in der Nähe des ER bilden an denen sowohl Nef als auch GABARAPs akkumulieren. Eine Möglichkeit wäre, dass durch die Interaktion mit Nef die GABARAPs die für die Fusion benötigten Faktoren rekrutieren und die Abschnürung

von *single lipid bilayer*-Vesikel ermöglichen. Die Nef-haltigen Vesikel könnten dann mit Endosomen fusionieren. Beeinflusst durch die Proteine Vps23 des ESCRT1-Komplexes und Vps4 (*ATPase vacuolar protein sorting 4*) könnte Nef von der Außenseite der Vesikelmembran in intraluminale Vesikel internalisiert werden, wodurch ein MVBs entsteht. Der MVB könnte dann wie in Kap. 1.4 beschrieben, wahrscheinlich durch GRASP beeinflusst, mit der Plasmamembran fusionieren und dabei die intraluminalen Nef-positiven Vesikel als Exosomen freisetzen. Gleichzeitig würde das Nef, dass sich an der Außenseite des MVBs befindet in die Plasmamembran inkorporiert werden und somit auch dort die bereits im vorherigen Kapitel diskutierten Funktionen ausüben können (Levi and Glick 2007, Duran, Anjard et al. 2010, Levi, Bhattacharyya et al. 2010, Bruns, McCaffery et al. 2011, Malhotra 2013).

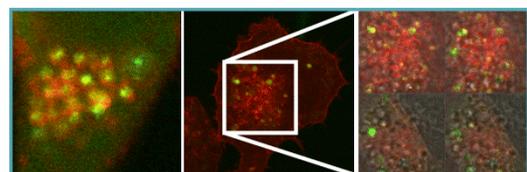
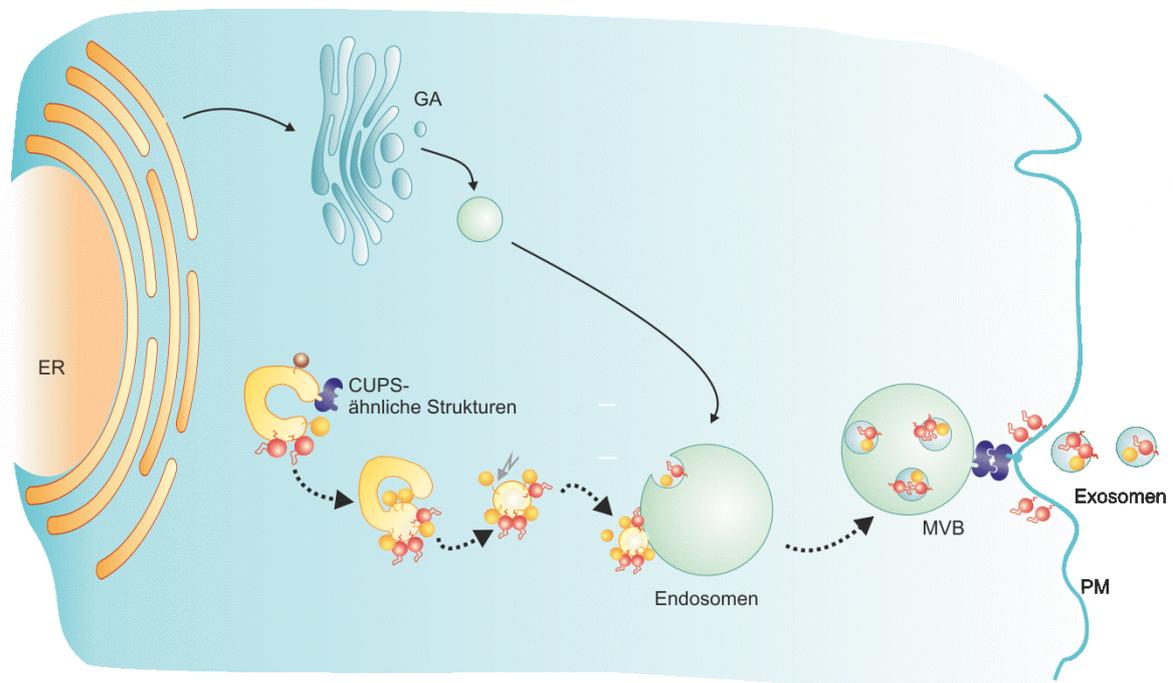


Abbildung 40 Modell für die unkonventionelle Sekretion von Nef

CUPS assemblieren unter Stressbedingungen in der Nähe des ER. Nef lagert sich an diese Strukturen an und beeinflusst wahrscheinlich die Abschnürung kleiner Nef-haltiger Vesikel. Diese Vesikel fusionieren mit speziellen Endosomen, wobei durch Internalisierung intraluminale Vesikel entstehen. Die MVBs fusionieren schließlich unter Beeinflussung von GRASP mit der Plasmamembran und geben die Nef-haltigen Exosomen frei. Unten rechts: ausgewählte Fluoreszenzbilder, die die Lokalisation von MVBs an der Plasmamembran mit intraluminalen Vesikeln darstellen.

5.7 Zwei unkonventionelle Sekretionsmechanismen sind in die Sekretion von Nef involviert.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten zwei potentielle unkonventionelle Sekretionsmechanismen für Nef charakterisiert werden: ein Autophagie abhängiger und ein unabhängiger Mechanismus. Zusätzlich konnte nicht nur gezeigt werden, dass die GABARAP-Familie für beide Sekretionswege essentiell ist, sondern auch dass Nef direkt an die Familienmitglieder binden kann. Es wäre theoretisch möglich, dass Nef durch die Interaktion mit GABARAP, GABARAPL1 und GABARAPL2 seine eigene Sekretion beeinflusst. Natürlich wäre es interessant zu wissen, an welchen Stellen der oben beschriebenen Sekretionswege die Interaktion genau und unter welchen Umständen stattfindet, allerdings ist eine experimentielle Überprüfung solcher Transportwege aufgrund des schnellen Ablaufs sehr schwierig. Außerdem gibt es noch kein einheitliches Protokoll zur exakten Differenzierung der einzelnen beteiligten Vesikel. Trotzdem können aufgrund der bereits bekannten Interaktion der GABARAP-Familie mit intrazellulären Transportvorgängen einige Rückschlüsse gezogen werden, inwieweit die GABARAP-Nef-Interaktion Sekretionsprozesse unterstützen könnte. Eine Möglichkeit wäre, dass durch diese Interaktion der Transport von Nef zur Plasmamembran entlang von Mikrotubuli gesteigert wird. Es ist bekannt, dass der anterograde Transport zur Plasmamembran durch das Motorprotein Kinesin vermittelt wird (Seitz and Surrey 2006). Kinesin ist ein ATP-Bindeprotein, das entlang der Mikrotubuli unter ATP-Verbrauch wandert. Zwar sind die GABARAPs keine Motorproteine und können somit nicht aktiv Vesikel zur Plasmamembran transportieren, allerdings könnten sie den Transport zur Plasmamembran auf andere Weise beeinflussen. Eine Möglichkeit wäre, dass sie die Prozessivität des Membrantransports erhöhen. Es ist bekannt, dass ein Kinesin-Molekül ein Vesikel im Durchschnitt 1 μm transportiert, bevor es dissoziiert und das Vesikel auf ein neues Kinesin-Molekül übertragen wird (Seitz and Surrey 2006). Hierbei könnte GABARAP, da es gleichzeitig an die Nef-assoziierten-Vesikel und an Mikrotubuli binden könnte, eine vorzeitige Dissoziation der Vesikel verhindern und so den Transport verstärken. Ähnliche Spekulationen gibt es auch bei dem Transport von AT1R (*angiotensin II type 1 receptor*) zur Plasmamembran (Kincaid and King 2006). Eine andere Möglichkeit wäre, dass Fusionsvorgänge durch gleichzeitige Interaktion des Nef-GABARAP-Komplexes mit NSF beeinflusst werden. Denn, wie die strukturellen Untersuchungen

in Kapitel 1.6 zeigten, bindet Nef bevorzugt an HP2, wodurch eine gleichzeitige Bindung eines zweiten Bindungspartners an HP1 möglich wäre. Dazu passend erfolgt die Bindung von NSF an GABARAP vornehmlich über HP1 (Thielmann, Weiergräber et al. 2009). Daher wäre es möglich, dass GABARAP gleichzeitig an NSF und Nef bindet und in Folge dessen Fusionsvorgänge sowohl zwischen einzelnen Vesikeln als auch mit der Plasmamembran verstärken kann.

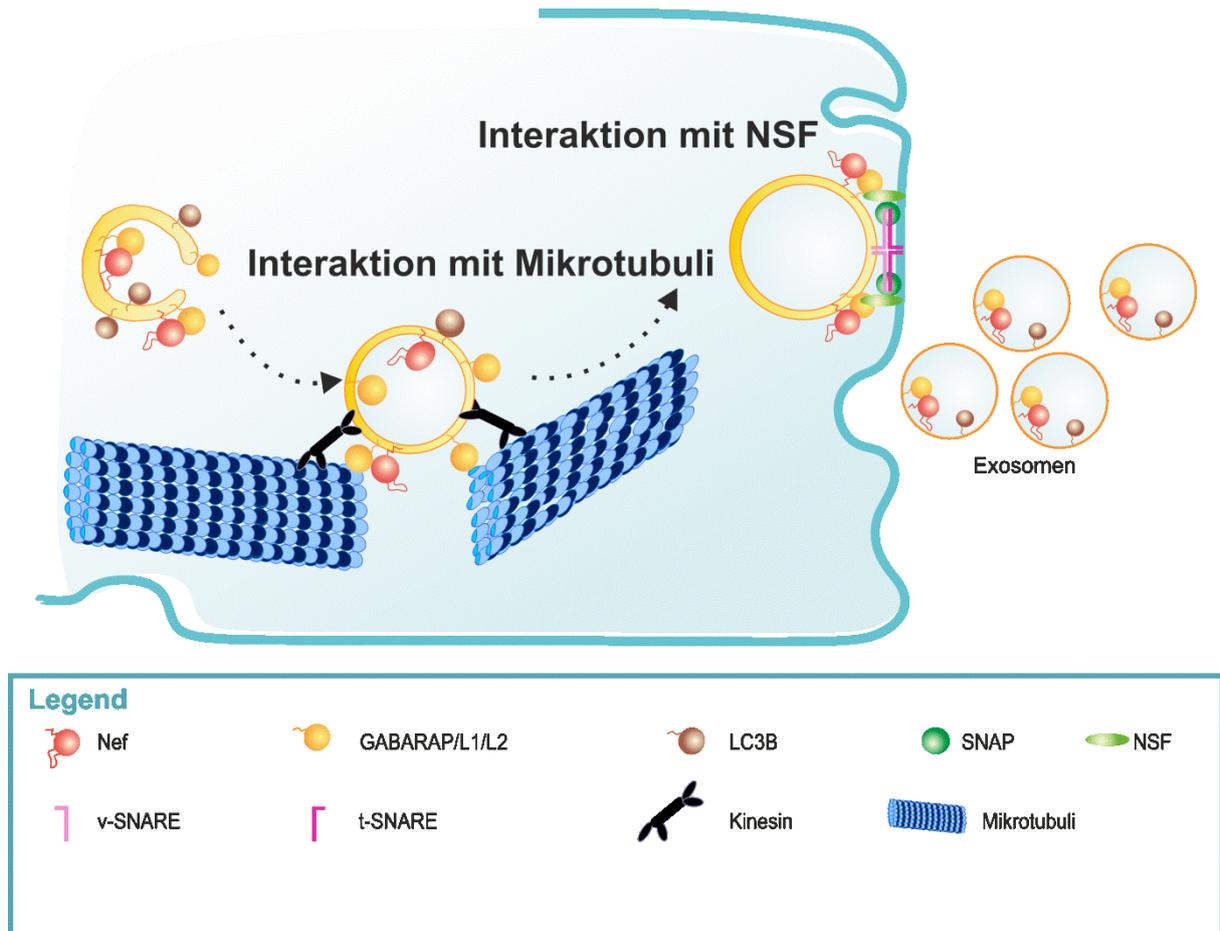


Abbildung 41 Modell zur GABARAP-Nef-Komplex Interaktion mit Mikrotubuli und NSF

Die Interaktion von Nef und den GABARAPs könnte sowohl den Transport zur Plasmamembran als auch die Fusion mit der Plasmamembran beeinflussen. Die Interaktion von Nef und GABARAP könnte die Prozessivität des Membrantransports erhöhen, indem GABARAP durch gleichzeitige Interaktion mit den Mikrotubuli ein vorzeitiges Abdiffundieren der Vesikel verhindert. Die Interaktion des GABARAP-Nef-Komplexes mit NSF könnte die Fusion der Vesikel mit der Plasmamembran beeinflussen.

5.8 Nef könnte an Omegasomen und CUPS akkumulieren und somit das Gleichgewicht zur unkonventionellen Sekretion verschieben

Die Voraussetzung aller in dieser Arbeit beschriebenen Sekretionswege ist, dass Nef an den initialen Strukturen, den CUPS bzw. Omegasomen akkumulieren bzw. an bereits eingebaute Proteine binden kann. *In-vitro* wird Nef bevorzugt in sehr stark gekrümmte und negativ geladene Liposomen eingebaut. Dabei agiert der N-terminale Arm als eine Art Sensor für den Grad der Krümmung (Gerlach, Laumann et al. 2010). CUPS beinhalten eine hohe Anzahl von PI(3)P und zeichnen sich durch eine starke Krümmung aus. Nef könnte demnach autonom mit den CUPS interagieren. In diesem Stadium könnte Nef schon an GABARAP gebunden vorliegen oder während des Wachstums des Vesikels mit GABARAP interagieren. Erst kürzlich zeigten Melia et al., dass die Lokalisation von lipidierten LC3/GABARAP am Rand der wachsenden Phagophore abhängig ist von der Membran-Krümmung-erkennenden Domäne im E2 ähnlichen Enzym ATG3 (Nath, Dancourt et al. 2014). Ob Nef auch als eine Art ATG3-Mimikry bei der Reifung der Phagophore agiert, bedarf weiterer Studien. Die aus den CUPS entstandenen Vesikel können dann entweder als Autophagie-ähnliche Strukturen oder als Einzelmembran-Vesikel zur Plasmamembran transportiert und dort mit der Plasmamembran fusionieren und Exosomen freisetzen. Den Transport und die Fusion der Vesikeln mit der Plasmamembran könnte wiederum durch die Interaktion von GABARAP und Nef, wie in Kap. 5.7 beschrieben, beeinflusst werden.

5.9 Die Nef-Hck-Interaktion könnte die unkonventionelle Sekretion von Nef unterstützten

GRASPs sind periphere Membranproteine, die für das Stapeln der einzelnen Zisternen des Golgi-Apparats mitverantwortlich sind. Vor kurzem wurden sie zusätzlich als für die unkonventionelle Sekretion von AcbA essentielle Proteine identifiziert, wenngleich die genaue Funktion noch nicht beschrieben ist (Duran, Anjard et al. 2010, Manjithaya, Anjard et al. 2010). Außerdem sind sie an der Sekretion von Integrinen beteiligt (Schotman, Karhinen et al. 2008).

Es ist bekannt, dass Nef die Struktur des Golgi-Apparats zerstören und somit die anti-inflammatorische Antwort in Makrophagen verhindern kann (Hiyoshi, Takahashi-Makise et al. 2012). Dabei interagiert Nef mit Hck und aktiviert dadurch die MAP Kinase ERK-FRASP65 Kaskade, wodurch GRASP65 phosphoryliert wird und es zum Zerfall des Golgi-Apparats kommt. Das freigesetzte GRASP65 könnte nun für die unkonventionelle Sekretion von Nef zur Verfügung stehen.

5.10 Die Interaktion von Nef mit den GABARAPs könnte die Herabregulation verschiedener Rezeptoren beeinflussen.

Viele Jahre wurde davon ausgegangen, dass Nef die Replikation neuer Viren verstärkt und die daraus resultierende hohe Viruslast im Blut HIV-infizierter Patienten zur Ausbildung von AIDS führt. Dieses Bild änderte sich, als entdeckt wurde, dass eine hohe Virenlast nicht zwangsläufig zu einer Immundefizienz führt (Silvestri, Sodora et al. 2003). So zeigten Nef-transgene Mäuse AIDS-ähnliche Symptome in Abwesenheit der viralen Replikation (Hanna, Kay et al. 1998) und die Fähigkeit die Oberflächenexpression von CD4 zu modulieren, war wichtiger als die replikationsfördernden Eigenschaften von Nef (Iafraite, Carl et al. 2000, Stoddart, Geleziunas et al. 2003). Besonders das Herabregulieren verschiedener Oberflächenrezeptoren war Schwerpunkt verschiedener Studien in den letzten Jahren. Dabei konnte neben der CD4 und MHC-I-Herabregulierung der gleiche Effekt bei den Rezeptoren CD28, CD3 (nur SIV und HIV-2), CD80, CD86, CXCR1, 2, 4, CCR1-5, CD8, dem Mannose-Rezeptor, CD1a/d und dem Hemachromatose-Protein beobachtet werden. Im Fall von CD4 bindet Nef an den zytoplasmatischen Teil von CD4, wofür drei Motive (EXXXLL₁₆₅, EE₁₅₅ und DD₁₇₅) verantwortlich sind. Gleichzeitig bindet Nef an den Adapterprotein-Komplex AP-2 der Clathrin-beschichteten Vesikel und sorgt zusammen mit V1H, der regulatorischen Untereinheit H der vakuolären ATPase, dass CD4 von der Zelloberfläche rekrutiert und in frühe Endosomen geleitet wird. Lange Zeit wurde davon ausgegangen, dass diese frühen Endosomen zu Lysosomen transportiert und dort die endozytotischen Rezeptoren abgebaut werden. Allerdings besitzen nicht alle herabregulierten Rezeptoren eine Nef-Bindestelle und zusätzlich konnte eine Akkumulation einiger dieser durch Nef internalisierten

Rezeptoren innerhalb des Trans-Golgi Netzwerks nachgewiesen werden. Dies spricht dafür, dass neben der Degradation der Rezeptoren im Lysosom, Nef in der Lage ist, die internalisierten Rezeptoren im trans-Golgi Netzwerk zurückzuhalten. Dieser als *receptor retention mechanism* bezeichneter Mechanismus und die Tatsache, dass Nef auch einige Rezeptoren, wie CD74, CCL2 und DC-SIGN hochreguliert, zeigten, dass Nef mit hoher Wahrscheinlichkeit in der Lage ist das endosomale Transportsystem auf eine viel generellere Art und Weise zu modulieren. Es gibt Hinweise, dass Nef die Endozytose von Rezeptoren durch die Modulation von ESCRT- und dem Ubiquitinierungs-System beeinflusst (daSilva, Sougrat et al. 2009, Amorim, da Silva et al. 2014, Chandrasekaran, Moore et al. 2014). Erstens kann Nef an Lysin144 ubiquitiniert werden, was gleichzeitig essentiell für die Regulation von CD4 ist und als Signal für den Transport zu MVBs dient (Jin, Cai et al. 2008). Zweitens moduliert Nef die E3 Ubiquitin-Protein-Ligase (Yang and Henderson 2005), was letztlich ebenfalls zur Herabregulation von Oberflächenrezeptoren führt. Tatsächlich scheint Nef aktiv in das endosomale Transportsystem einzugreifen, indem es die Bildung späterer Endosomen, den eigenen Transport in MVBs, die Sekretion von Chemokinen und Cytokinen von Makrophagen induziert, sowie die für die MVB-Biogenese benötigte PI3-Kinase aktiviert (Muratori, Cavallin et al. 2009). Zwar kann Nef durch die Bindung an AP2 die internalisierten Rezeptoren zum trans-Golgi Netzwerk transportieren, allerdings konnte bis jetzt kein Nef-Bindungspartner charakterisiert werden, der den anterograden Transport zur Plasmamembran ermöglichen könnte.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten mit den GABARAPs zum ersten Mal ein wirtseigenes Protein identifiziert werden, das den anterograden Transport von Nef zur Plasmamembran vermittelt. Es wäre demnach möglich, dass durch die GABARAP-Nef-Interaktion nicht nur die bislang in dieser Arbeit diskutierte Plasmamembranständigkeit und Sekretion von Nef ermöglicht wird, sondern auch dass diese Interaktion eine wichtige Rolle bei dem Transport von Rezeptoren vom trans-Golgi Netzwerk zur Plasmamembran übernehmen könnte. Unterstützt wird diese Theorie dadurch, dass GABARAPs bereits als Bindepartner einiger Rezeptoren charakterisiert wurden (Kap. 1). Es ist aber weiterhin unklar, ob Nef in diesem Fall als Adaptorprotein zwischen Rezeptor und GABARAP fungiert oder ob die Hochregulation der Rezeptoren ein Nebeneffekt der durch die GABARAP-Nef-Interaktion induzierten unkonventionellen Sekretion ist.

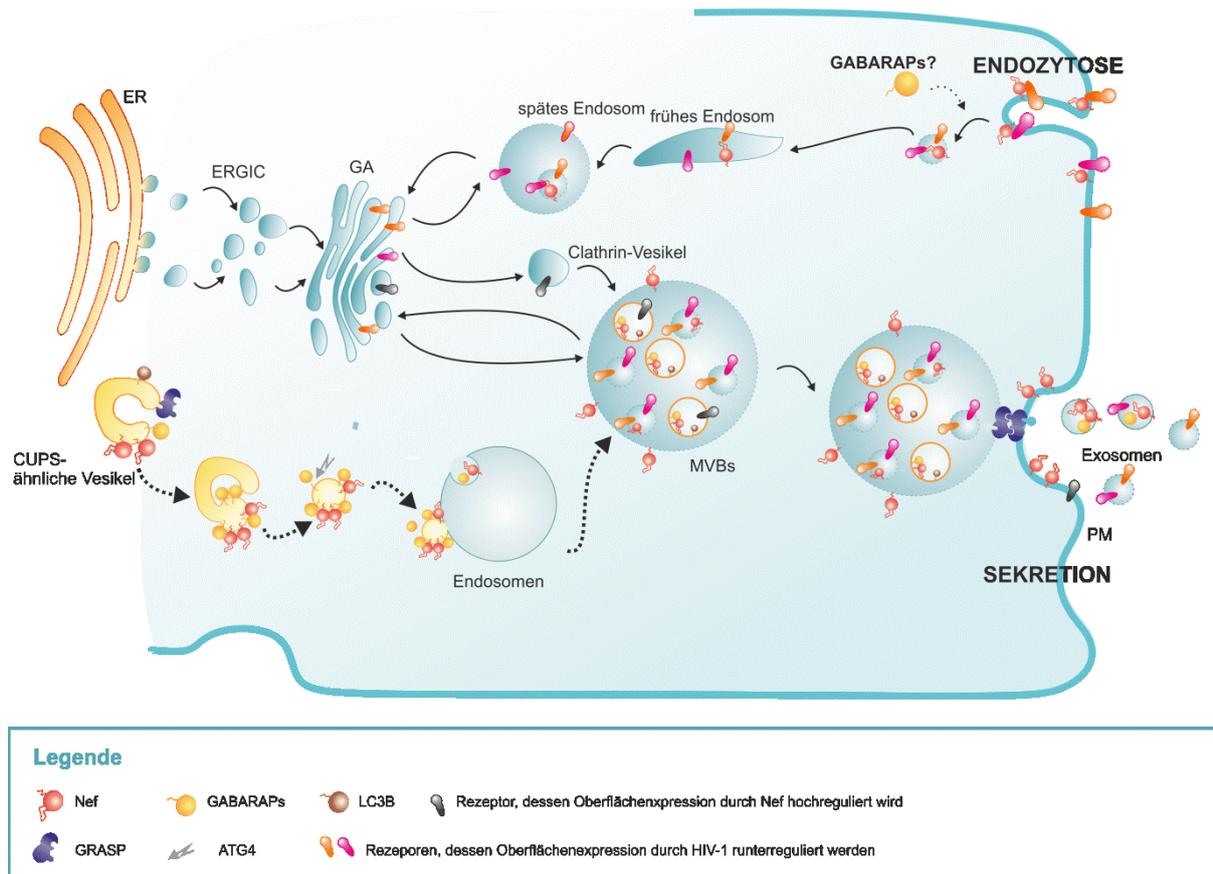


Abbildung 42 Modell wie der Nef-GABARAPs-Komplex die Hoch- und Herabregulierung von Oberflächenrezeptoren beeinflussen könnte

Nef könnte durch die Interaktion mit den GABARAPs den Transport von Vesikeln, die nach der Endozytose der Oberflächenrezeptoren entstehen, zum trans-Golgi Netzwerk beeinflussen. Zusätzlich ist der im Rahmen dieser Doktorarbeit diskutierte GABARAPs-abhängige unkonventionelle Sekretionsweg, der über CUPS, Endosomen und MVBs abläuft, eingezeichnet. Die endozytierten Rezeptoren könnten wie die an den CUPS akkumulierenden Proteine im MVB sortiert und innerhalb intraluminaler Vesikel zur Plasmamembran transportiert werden.

5.11 Eine Inhibierung des Nef-GABARAPs-Komplex könnte den Verlust von CD4⁺-Zellen während der AIDS-Pathogenese reduzieren

Bleibt eine HIV-Infektion unbehandelt, so lassen sich nach ca. 10 Jahren kaum noch CD4⁺-Zellen im Blut von HIV-Patienten nachweisen. Schon seit einigen Jahren wird diskutiert, dass das Absterben der CD4⁺-Zellen im Zusammenhang mit der durch Nef induzierten massiven Sekretion extrazellulärer Vesikel steht (Baur 2011). Innerhalb mehrerer Studien, die das Ziel hatten, die Rolle von extrazellulärem Nef zu charakterisieren, konnte gezeigt werden, dass vor allem Exosomen eine wichtige Rolle

bei der HIV-Pathogenese übernehmen (Kap. 1.5). So wurden u.a. Korezeptoren für HIV in Exosomen detektiert, welche die Endozytose des Virus in die Zelle beschleunigen können (Mack, Kleinschmidt et al. 2000, Rozmyslowicz, Majka et al. 2003). Auch die Integration des FasL-Liganden in die Hülle der Exosomen ist maßgeblich an der Apoptose benachbarter CD4⁺-Zellen beteiligt. Zusätzlich sind Exosomen auch an der Supprimierung der Immunantwort gegen HIV beteiligt (Xu, Sreaton et al. 1997, Bossi and Griffiths 1999, Peche, Renaudin et al. 2006, Kim, Bianco et al. 2007, Muratori, Cavallin et al. 2009, Lenassi, Cagney et al. 2010, Szajnik, Czystowska et al. 2010).

Im Gegensatz dazu konnte bislang kein konkreter Sekretionsweg beschrieben werden, wie Nef die Sekretion von Exosomen sowie auch seine eigene Sekretion innerhalb dieser Exosomen induziert. Bekannt war allerdings, dass die Sekretion, wie in den Kapiteln 5.5 und 5.6 bereits diskutiert wurde, Autophagie-abhängig ist und die Sekretion durch die Fusion von MVBs, in denen die Nef-Exosomen im Vorfeld akkumulierten, mit der Plasmamembran erfolgt.

Die in dieser Arbeit herausgearbeiteten unkonventionellen Sekretionswege könnten wesentlich zum Verständnis des Ablaufs der Nef-Sekretion beitragen.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass der Sekretionsmechanismus abhängig davon ist, welcher Zelltyp infiziert bzw. mit Nef transfiziert wurde (Baur, Sawai et al. 1994). So akkumuliert Nef in aktivierten CD4⁺-Zellen und in Jurkats an der Zellmembran und wird in kleinen Vesikeln sekretiert, während es in SupT1 und Helas an endosomalen Strukturen, sowie an der perinuklearen Region lokalisiert und die Freisetzung von Nef-haltigen Exosomen durch die Fusion von MVBs mit der Plasmamembran erfolgt (Lenassi, Cagney et al. 2010). Dies könnte ein möglicher Hinweis sein, dass in der Tat mehrere Sekretionswege in Frage kommen könnten. Die Beobachtungen lassen sich sogar auf die Ergebnisse dieser Arbeit übertragen. Im Fall der CD4⁺-Zellen und Jurkats würde Nef durch den Autophagie-abhängigen und im Fall der SupT1-Zellen und HeLas würde die Sekretion durch den Autophagie-unabhängigen Sekretionsweg erfolgen.

Weiterhin könnte die in dieser Arbeit identifizierte GABARAP-Nef-Interaktion sowie die Tatsache, dass die GABARAPs für die Sekretion von Nef über Exosomen essentiell sind (Kap. 4.8), Ausgangspunkt für die Entwicklung neuer Therapie-Formen, bei der die Interaktion zwischen Nef und den GABARAPs inhibiert würde, sein.

Inwieweit die GABARAP-Nef-Interaktion auch den Transfer von Nef über die Plasmamembran (Trogozytose) (Muratori, Cavallin et al. 2009) oder über die

Ausbildung von Nanoröhren (Lamers, Fogel et al. 2010) (siehe Abb. 41) beeinflusst, müssen zukünftige Experimente zeigen. Allerdings müsste für beide Sekretionsformen Nef zur Plasmamembran transportiert werden und spätestens an diesem Punkt könnte die GABARAPs-Nef-Interaktion wieder eine Rolle spielen.



Abbildung 43 Modell wie der Nef-GABARAP-Komplex die Translokation von Nef beeinflussen könnte.

Nef kann auf drei verschiedene Arten zu Nachbarzellen transloziert werden. A: HIV-1 infizierte Zellen sezernieren eine Menge von Nef-positiven Exosomen, die von Nachbarzellen mittels Endozytose aufgenommen werden. B: Nef wird durch Nanoröhren zur Nachbarzelle transportiert. C: HIV-1 infizierte Zellen bilden schlauchartige Strukturen in die Nachbarzellen aus, über die das membranständige Nef in die Zelle geschleust wird (Baur 2011). Zusätzlich wurde modellhaft der im Rahmen dieser Arbeit diskutierte Transport des GABARAPs-Nef-Komplexes innerhalb vesikulärer Vesikel eingezeichnet.

6 Zusammenfassung

Aufgrund seiner vielfachen Funktionen wird das Nef-Protein als wichtigster Pathogenesefaktor für die Entwicklung der bei einer HIV-1-Infektion erworbenen Immundefizienz (AIDS) angesehen. Eine Infektion mit einem Nef-defizienten Virenstamm führt zu deutlich schwächeren Symptomen in HIV-infizierten Patienten.

Die Expression des viralen Nef-Proteins induziert nicht nur eine massive Sekretion extrazellulärer Vesikel in mit HIV-1 infizierten oder Nef-transfizierten Zellen, sondern auch die Sekretion von Nef selbst. Mittlerweile wird vermutet, dass diesen Sekretionsvorgängen eine entscheidende Rolle bei der Etablierung der erworbenen Immundefizienz zukommt. Zusätzlich ist für die meisten bisher beschriebenen Effekte, die Nef in der Zelle auslöst, dessen anterograde Transport zur Plasmamembran obligatorisch. Das Ziel dieser Arbeit ist die detaillierte Charakterisierung der Interaktion zwischen HIV-1 Nef und den Mitgliedern der GABARAP/GABARAPL2-Familie (GABARAPs) der humanen ATG8s, die im Rahmen eines Hefe-Zwei-Hybridsystems gefunden wurde. Dabei sollte im Rahmen dieser Arbeit besonders die biologische Relevanz der Bindung untersucht werden.

In dieser Arbeit konnte die Assoziation und die Bindung zwischen Nef und den GABARAPs mit Hilfe von Koimmunopräzipitationen aus Zellysaten und Pull-Down Analysen mit rekombinant exprimiert und gereinigten Proteinen nachgewiesen werden. Dabei wird die Spezifität der Bindung durch die beiden Aminosäurereste S53 und F62 im GABARAP-Molekül vermittelt. Mittels Sequenzanalyse konnte ein potentiellles GIR (GABARAP/GABARAPL2 interaction region) -Motiv im N-terminalen Bereich von Nef identifiziert werden. Eine Mutation, des an der Interaktion beteiligten W13 von Nef, unterdrückte die die Nef-Bindung an GABARAP. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass durch den Einsatz entsprechender siRNA-Pools nicht nur eine Plasmamembranständigkeit von Nef verloren, sondern auch dessen Sekretion unterbunden wird.

Aufgrund der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse, konnte ein Modell entwickelt werden, welches beschreibt, wie Nef nicht nur zur Plasmamembran transportiert werden, sondern auch wie seine Sekretion über unkonventionelle Sekretionswege ablaufen könnte. Nach diesem Modell kämen zwei, strikt GABARAP-abhängige, Sekretionswege in Frage: ein auf Autophagie-basierender und LC3B-anhängiger Weg sowie ein Weg bei dem der anterograde Transport und die Sekretion von Nef

unabhängig von LC3s über die Ausbildung sogenannter CUPS (*compartments of unconventional protein secretion*), davon abgeschnürter Vesikel und deren Internalisierung in multivesikulären Körpern (MVBs) erfolgt.

7 SUMMARY

HIV-1 accessory protein Nef is responsible for many pathogenic effects during acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) progression because lack of intact Nef attenuates the symptoms in HIV infected patients.

Expression of the viral protein Nef induces extensive secretory activity in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infected or Nef transfected cells including its own secretion. Nef mediated secretion is suggested to explain the detrimental effect on bystander cells observed in HIV infection. In addition, anterograde transport of Nef towards the plasma membrane (PM) is thought to be obligatory for most of the cardinal Nef functions in infected cells. The aim of this work was the more detailed characterization of the selective binding between HIV-1 Nef and members of the GABARAP/GABARAPL2 subfamily (GABARAPs) of human ATG8s, recently identified during Y2H screen and preliminary described *in vitro* in our lab. During this work, major focus was put on the elucidation of putative biological consequences of the interaction of Nef with GABARAPs host factors in mammalian cells.

In this thesis association and direct binding between Nef and GABARAPs was confirmed by their coimmunoprecipitation from cell lysates and by pull-down analysis using recombinant protein samples, respectively. Thereby, GABARAP residues S53 und F62 confer specificity. Mutational analysis revealed that in Nef a GIR (GABARAP/GABARAPL2 interacting region) motif located in its flexible N-terminal domain surrounding W13 is crucial for this interaction. RNA interference revealed that secretion of Nef requires the expression of at least one of the GABARAPs, whereas LC3s are not essential for this process. GABARAPs silencing also impaired Nef's PM localization.

On the basis of the results obtained in this work, a model was provided that describes not only Nef's transport to the PM but also how it could be secreted via unconventional secretion. Based on the model two pathways that are strictly depending on GABARAP are assumed: One adapted from autophagy and LC3s and one other pathway, which is LC3 independent. During the second pathway Nef's anterograde transport and secretion relies on the formation of compartments of unconventional secretion (CUPS), CUPS-derived vesicles and the internalization of this vesicles in multivesicular bodies (MVBs).

8 Literatur

- AIKEN, C., J. KONNER, N. R. LANDAU, M. E. LENBURG AND D. TRONO (1994). "NEF INDUCES CD4 ENDOCYTOSIS: REQUIREMENT FOR A CRITICAL DILEUCINE MOTIF IN THE MEMBRANE-PROXIMAL CD4 CYTOPLASMIC DOMAIN." CELL 76(5): 853-864.
- AKGUN, B., S. SATIJA, H. NANDA, G. F. PIRRONE, X. SHI, J. R. ENGEN AND M. S. KENT (2013). "CONFORMATIONAL TRANSITION OF MEMBRANE-ASSOCIATED TERMINALLY ACYLATED HIV-1 NEF." STRUCTURE 21(10): 1822-1833.
- ALI, S. A., M. B. HUANG, P. E. CAMPBELL, W. W. ROTH, T. CAMPBELL, M. KHAN, G. NEWMAN, F. VILLINGER, M. D. POWELL AND V. C. BOND (2010). "GENETIC CHARACTERIZATION OF HIV TYPE 1 NEF-INDUCED VESICLE SECRETION." AIDS RES HUM RETROVIRUSES 26(2): 173-192.
- ALIREZAEI, M., W. B. KIOSSES, C. T. FLYNN, N. R. BRADY AND H. S. FOX (2008). "DISRUPTION OF NEURONAL AUTOPHAGY BY INFECTED MICROGLIA RESULTS IN NEURODEGENERATION." PLOS ONE 3(8): E2906.
- ALIREZAEI, M., W. B. KIOSSES AND H. S. FOX (2008). "DECREASED NEURONAL AUTOPHAGY IN HIV DEMENTIA: A MECHANISM OF INDIRECT NEUROTOXICITY." AUTOPHAGY 4(7): 963-966.
- ALTER, G. AND M. ALTFELD (2009). "NK CELLS IN HIV-1 INFECTION: EVIDENCE FOR THEIR ROLE IN THE CONTROL OF HIV-1 INFECTION." J INTERN MED 265(1): 29-42.
- 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): 3365-3380.
- AMORIM, N. A., E. M. DA SILVA, R. O. DE CASTRO, M. E. DA SILVA-JANUARIO, L. M. MENDONCA, J. S. BONIFACINO, L. J. DA COSTA AND L. L. DASILVA (2014). "INTERACTION OF HIV-1 NEF PROTEIN WITH THE HOST PROTEIN ALIX PROMOTES LYSOSOMAL TARGETING OF CD4 RECEPTOR." J BIOL CHEM 289(40): 27744-27756.
- AROLD, S. T. AND A. S. BAUR (2001). "DYNAMIC NEF AND NEF DYNAMICS: HOW STRUCTURE COULD EXPLAIN THE COMPLEX ACTIVITIES OF THIS SMALL HIV PROTEIN." TRENDS BIOCHEM SCI 26(6): 356-363.
- AXE, E. L., S. A. WALKER, M. MANIFAVA, P. CHANDRA, H. L. RODERICK, A. HABERMANN, G. GRIFFITHS AND N. T. KTISTAKIS (2008). "AUTOPHAGOSOME FORMATION FROM MEMBRANE COMPARTMENTS ENRICHED IN PHOSPHATIDYLINOSITOL 3-PHOSPHATE AND DYNAMICALLY CONNECTED TO THE ENDOPLASMIC RETICULUM." J CELL BIOL 182(4): 685-701.
- 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): 271-282.
- 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): 283-289.

- 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): 1820-1831.
- BACHE, K. G., C. RAIBORG, A. MEHLUM AND H. STENMARK (2003). "STAM AND Hrs ARE SUBUNITS OF A MULTIVALENT UBIQUITIN-BINDING COMPLEX ON EARLY ENDOSOMES." J BIOL CHEM 278(14): 12513-12521.
- BARLOWE, C. (2003). "SIGNALS FOR COPII-DEPENDENT EXPORT FROM THE ER: WHAT'S THE TICKET OUT?" TRENDS CELL BIOL 13(6): 295-300.
- BARLOWE, C., C. D'ENFERT AND R. SCHEKMAN (1993). "PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF SAR1P, A SMALL GTP-BINDING PROTEIN REQUIRED FOR TRANSPORT VESICLE FORMATION FROM THE ENDOPLASMIC RETICULUM." J BIOL CHEM 268(2): 873-879.
- BARLOWE, C., L. ORCI, T. YEUNG, M. HOSOBUCHI, S. HAMAMOTO, N. SALAMA, M. F. REXACH, M. RAVAZZOLA, M. AMHERDT AND R. SCHEKMAN (1994). "COPII: A MEMBRANE COAT FORMED BY SEC PROTEINS THAT DRIVE VESICLE BUDDING FROM THE ENDOPLASMIC RETICULUM." CELL 77(6): 895-907.
- BARRE-SINOSSI, F., J. C. CHERMANN, F. REY, M. T. NUGEYRE, S. CHAMARET, J. GRUEST, C. DAUGUET, C. AXLER-BLIN, F. VEZINET-BRUN, C. ROUZIUX, W. ROZENBAUM AND L. MONTAGNIER (2004). "ISOLATION OF A T-LYMPHOTROPIC RETROVIRUS FROM A PATIENT AT RISK FOR ACQUIRED IMMUNE DEFICIENCY SYNDROME (AIDS). 1983." REV INVEST CLIN 56(2): 126-129.
- BAUR, A. S. (2011). "HIV-NEF AND AIDS PATHOGENESIS: ARE WE BARKING UP THE WRONG TREE?" TRENDS MICROBIOL 19(9): 435-440.
- BAUR, A. S., E. T. SAWAI, P. DAZIN, W. J. FANTL, C. CHENG-MAYER AND B. M. PETERLIN (1994). "HIV-1 NEF LEADS TO INHIBITION OR ACTIVATION OF T CELLS DEPENDING ON ITS INTRACELLULAR LOCALIZATION." IMMUNITY 1(5): 373-384.
- BENTHAM, M., S. MAZALEYRAT AND M. HARRIS (2006). "ROLE OF MYRISTOYLATION AND N-TERMINAL BASIC RESIDUES IN MEMBRANE ASSOCIATION OF THE HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS TYPE 1 NEF PROTEIN." J GEN VIROL 87(Pt 3): 563-571.
- BIRGISDOTTIR, A. B., T. LAMARK AND T. JOHANSEN (2013). "THE LIR MOTIF - CRUCIAL FOR SELECTIVE AUTOPHAGY." J CELL SCI 126(Pt 15): 3237-3247.
- BLANCHARD, N., D. LANKAR, F. FAURE, A. REGNAULT, C. DUMONT, G. RAPOSO AND C. HIVROZ (2002). "TCR ACTIVATION OF HUMAN T CELLS INDUCES THE PRODUCTION OF EXOSOMES BEARING THE TCR/CD3/ZETA COMPLEX." J IMMUNOL 168(7): 3235-3241.
- BLOBEL, G. AND B. DOBBERSTEIN (1975). "TRANSFER OF PROTEINS ACROSS MEMBRANES. I. PRESENCE OF PROTEOLYTICALLY PROCESSED AND UNPROCESSED NASCENT IMMUNOGLOBULIN LIGHT CHAINS ON MEMBRANE-BOUND RIBOSOMES OF MURINE MYELOMA." J CELL BIOL 67(3): 835-851.
- BLOBEL, G. AND B. DOBBERSTEIN (1975). "TRANSFER OF PROTEINS ACROSS MEMBRANES. II. RECONSTITUTION OF FUNCTIONAL ROUGH MICROSOMES FROM HETEROLOGOUS COMPONENTS." J CELL BIOL 67(3): 852-862.
- BOSSI, G. AND G. M. GRIFFITHS (1999). "DEGRANULATION PLAYS AN ESSENTIAL PART IN REGULATING CELL SURFACE EXPRESSION OF FAS LIGAND IN T CELLS AND NATURAL KILLER CELLS." NAT MED 5(1): 90-96.

- BRASS, A. L., D. M. DYKXHOORN, Y. BENITA, N. YAN, A. ENGELMAN, R. J. XAVIER, J. LIEBERMAN AND S. J. ELLEDGE (2008). "IDENTIFICATION OF HOST PROTEINS REQUIRED FOR HIV INFECTION THROUGH A FUNCTIONAL GENOMIC SCREEN." SCIENCE 319(5865): 921-926.
- BRENCHLEY, J. M., D. A. PRICE, T. W. SCHACKER, T. E. ASHER, G. SILVESTRI, S. RAO, Z. KAZZAZ, E. BORNSTEIN, O. LAMBOTTE, D. ALTMANN, B. R. BLAZAR, B. RODRIGUEZ, L. TEIXEIRA-JOHNSON, A. LANDAY, J. N. MARTIN, F. M. HECHT, L. J. PICKER, M. M. LEDERMAN, S. G. DEEKS AND D. C. DOUEK (2006). "MICROBIAL TRANSLOCATION IS A CAUSE OF SYSTEMIC IMMUNE ACTIVATION IN CHRONIC HIV INFECTION." NAT MED 12(12): 1365-1371.
- BRENCHLEY, J. M., T. W. SCHACKER, L. E. RUFF, D. A. PRICE, J. H. TAYLOR, G. J. BEILMAN, P. L. NGUYEN, A. KHORUTS, M. LARSON, A. T. HAASE AND D. C. DOUEK (2004). "CD4+ T CELL DEPLETION DURING ALL STAGES OF HIV DISEASE OCCURS PREDOMINANTLY IN THE GASTROINTESTINAL TRACT." J EXP MED 200(6): 749-759.
- BRUNS, C., J. M. McCAFFERY, A. J. CURWIN, J. M. DURAN AND V. MALHOTRA (2011). "BIOGENESIS OF A NOVEL COMPARTMENT FOR AUTOPHAGOSOME-MEDIATED UNCONVENTIONAL PROTEIN SECRETION." J CELL BIOL 195(6): 979-992.
- BURMAN, C. AND N. T. KTISTAKIS (2010). "AUTOPHAGOSOME FORMATION IN MAMMALIAN CELLS." SEMIN IMMUNOPATHOL 32(4): 397-413.
- CAMPBELL, G. R. AND S. A. SPECTOR (2011). "HORMONALLY ACTIVE VITAMIN D3 (1ALPHA,25-DIHYDROXYCHOLECALCIFEROL) TRIGGERS AUTOPHAGY IN HUMAN MACROPHAGES THAT INHIBITS HIV-1 INFECTION." J BIOL CHEM 286(21): 18890-18902.
- CAMPBELL, G. R. AND S. A. SPECTOR (2012). "TOLL-LIKE RECEPTOR 8 LIGANDS ACTIVATE A VITAMIN D MEDIATED AUTOPHAGIC RESPONSE THAT INHIBITS HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS TYPE 1." PLoS PATHOG 8(11): E1003017.
- CAMPBELL, G. R. AND S. A. SPECTOR (2012). "VITAMIN D INHIBITS HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS TYPE 1 AND MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS INFECTION IN MACROPHAGES THROUGH THE INDUCTION OF AUTOPHAGY." PLoS PATHOG 8(5): E1002689.
- CAMPBELL, T. D., M. KHAN, M. B. HUANG, V. C. BOND AND M. D. POWELL (2008). "HIV-1 NEF PROTEIN IS SECRETED INTO VESICLES THAT CAN FUSE WITH TARGET CELLS AND VIRIONS." ETHN DIS 18(2 SUPPL 2): S2-14-19.
- CAROLINE, O. A. (2014). "BEDEUTUNG DER AMINOTERMINALEN REGION VON HIV-1 NEF FÜR DESSEN BINDUNG AN PROTEINE DER ATG8-FAMILIE ".
- CHANDRASEKARAN, P., V. MOORE, M. BUCKLEY, J. SPURRIER, J. H. KEHRL AND S. VENKATESAN (2014). "HIV-1 NEF DOWN-MODULATES C-C AND C-X-C CHEMOKINE RECEPTORS VIA UBIQUITIN AND UBIQUITIN-INDEPENDENT MECHANISM." PLoS ONE 9(1): E86998.
- CHAVRIER, P., R. G. PARTON, H. P. HAURI, K. SIMONS AND M. ZERIAL (1990). "LOCALIZATION OF LOW MOLECULAR WEIGHT GTP BINDING PROTEINS TO EXOCYTIC AND ENDOCYTIC COMPARTMENTS." CELL 62(2): 317-329.

- CHEN, C., J. G. LI, Y. CHEN, P. HUANG, Y. WANG AND L. Y. LIU-CHEN (2006). "GEC1 INTERACTS WITH THE KAPPA OPIOID RECEPTOR AND ENHANCES EXPRESSION OF THE RECEPTOR." J BIOL CHEM 281(12): 7983-7993.
- CHRISTENSEN, P. U., J. DAVEY AND O. NIELSEN (1997). "THE SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE MAM1 GENE ENCODES AN ABC TRANSPORTER MEDIATING SECRETION OF M-FACTOR." MOL GEN GENET 255(2): 226-236.
- CHRISTENSEN, P. U., K. DAVIS, O. NIELSEN AND J. DAVEY (1997). "ABC1: A NEW ABC TRANSPORTER FROM THE FISSION YEAST SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE." FEMS MICROBIOL LETT 147(1): 97-102.
- CLAVEL, F., M. GUYADER, D. GUETARD, M. SALLE, L. MONTAGNIER AND M. ALIZON (1986). "MOLECULAR CLONING AND POLYMORPHISM OF THE HUMAN IMMUNE DEFICIENCY VIRUS TYPE 2." NATURE 324(6098): 691-695.
- COFFIN, J., A. HAASE, J. A. LEVY, L. MONTAGNIER, S. OROSZLAN, N. TEICH, H. TEMIN, K. TOYOSHIMA, H. VARMUS, P. VOGT AND ET AL. (1986). "WHAT TO CALL THE AIDS VIRUS?" NATURE 321(6065): 10.
- COSTA, L. J., N. CHEN, A. LOPES, R. S. AGUIAR, A. TANURI, A. PLEMENITAS AND B. M. PETERLIN (2006). "INTERACTIONS BETWEEN NEF AND AIP1 PROLIFERATE MULTIVESICULAR BODIES AND FACILITATE EGRESS OF HIV-1." RETROVIROLOGY 3: 33.
- DASILVA, L. L., R. SOUGRAT, P. V. BURGOS, K. JANVIER, R. MATTERA AND J. S. BONIFACINO (2009). "HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS TYPE 1 NEF PROTEIN TARGETS CD4 TO THE MULTIVESICULAR BODY PATHWAY." J VIROL 83(13): 6578-6590.
- DE DUVE, C. AND R. WATTIAUX (1966). "FUNCTIONS OF LYSOSOMES." ANNU REV PHYSIOL 28: 435-492.
- DENIZOT, M., M. VARBANOV, L. ESPERT, V. ROBERT-HEBMANN, S. SAGNIER, E. GARCIA, M. CURRIU, R. MAMOUN, J. BLANCO AND M. BIARD-PIECHACZYK (2008). "HIV-1 GP41 FUSOGENIC FUNCTION TRIGGERS AUTOPHAGY IN UNINFECTED CELLS." AUTOPHAGY 4(8): 998-1008.
- DENNY, P. W., S. GOKOOL, D. G. RUSSELL, M. C. FIELD AND D. F. SMITH (2000). "ACYLATION-DEPENDENT PROTEIN EXPORT IN LEISHMANIA." J BIOL CHEM 275(15): 11017-11025.
- DERETIC, V. (2005). "AUTOPHAGY IN INNATE AND ADAPTIVE IMMUNITY." TRENDS IMMUNOL 26(10): 523-528.
- DERETIC, V. (2010). "AUTOPHAGY IN INFECTION." CURR OPIN CELL BIOL 22(2): 252-262.
- DESHAIES, R. J., S. L. SANDERS, D. A. FELDHEIM AND R. SCHEKMAN (1991). "ASSEMBLY OF YEAST SEC PROTEINS INVOLVED IN TRANSLOCATION INTO THE ENDOPLASMIC RETICULUM INTO A MEMBRANE-BOUND MULTISUBUNIT COMPLEX." NATURE 349(6312): 806-808.
- DINKINS, C., J. ARKO-MENSAH AND V. DERETIC (2010). "AUTOPHAGY AND HIV." SEMIN CELL DEV BIOL 21(7): 712-718.
- DURAN, J. M., C. ANJARD, C. STEFAN, W. F. LOOMIS AND V. MALHOTRA (2010). "UNCONVENTIONAL SECRETION OF ACB1 IS MEDIATED BY AUTOPHAGOSOMES." J CELL BIOL 188(4): 527-536.

EEKELS, J. J., S. SAGNIER, D. GEERTS, R. E. JEENINGA, M. BIARD-PIECHACZYK AND B. BERKHOUT (2012). "INHIBITION OF HIV-1 REPLICATION WITH STABLE RNAi-MEDIATED KNOCKDOWN OF AUTOPHAGY FACTORS." VIROL J 9: 69.

ESCLATINE, A., M. CHAUMORCEL AND P. CODOGNO (2009). "MACROAUTOPHAGY SIGNALING AND REGULATION." CURR TOP MICROBIOL IMMUNOL 335: 33-70.

ESCOLA, J. M., M. J. KLEIJMEER, W. STOOVVOGEL, J. M. GRIFFITH, O. YOSHIE AND H. J. GEUZE (1998). "SELECTIVE ENRICHMENT OF TETRASPAN PROTEINS ON THE INTERNAL VESICLES OF MULTIVESICULAR ENDOSOMES AND ON EXOSOMES SECRETED BY HUMAN B-LYMPHOCYTES." J BIOL CHEM 273(32): 20121-20127.

ESKELINEN, E. L. (2008). "THE MYSTERY OF THE MEMBRANES." AUTOPHAGY 4(1): 3-4.

ESPERT, L., M. DENIZOT, M. GRIMALDI, V. ROBERT-HEBMANN, B. GAY, M. VARBANOV, P. CODOGNO AND M. BIARD-PIECHACZYK (2006). "AUTOPHAGY IS INVOLVED IN T CELL DEATH AFTER BINDING OF HIV-1 ENVELOPE PROTEINS TO CXCR4." J CLIN INVEST 116(8): 2161-2172.

ESPERT, L., M. VARBANOV, V. ROBERT-HEBMANN, S. SAGNIER, I. ROBBINS, F. SANCHEZ, V. LAFONT AND M. BIARD-PIECHACZYK (2009). "DIFFERENTIAL ROLE OF AUTOPHAGY IN CD4 T CELLS AND MACROPHAGES DURING X4 AND R5 HIV-1 INFECTION." PLOS ONE 4(6): e5787.

FACKLER, O. T., N. KIENZLE, E. KREMMER, A. BOESE, B. SCHRAMM, T. KLIMKAIT, C. KUCHERER AND N. MUELLER-LANTZSCH (1997). "ASSOCIATION OF HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS NEF PROTEIN WITH ACTIN IS MYRISTOYLATION DEPENDENT AND INFLUENCES ITS SUBCELLULAR LOCALIZATION." EUR J BIOCHEM 247(3): 843-851.

FACKLER, O. T., A. MORIS, N. TIBRONI, S. I. GIESE, B. GLASS, O. SCHWARTZ AND H. G. KRAUSSLICH (2006). "FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF HIV-1 NEF MUTANTS IN THE CONTEXT OF VIRAL INFECTION." VIROLOGY 351(2): 322-339.

FRIEDLANDER, R., E. JAROSCH, J. URBAN, C. VOLKWEIN AND T. SOMMER (2000). "A REGULATORY LINK BETWEEN ER-ASSOCIATED PROTEIN DEGRADATION AND THE UNFOLDED-PROTEIN RESPONSE." NAT CELL BIOL 2(7): 379-384.

GARCIA, J. V. AND A. D. MILLER (1991). "SERINE PHOSPHORYLATION-INDEPENDENT DOWNREGULATION OF CELL-SURFACE CD4 BY NEF." NATURE 350(6318): 508-511.

GEE, H. Y., S. H. NOH, B. L. TANG, K. H. KIM AND M. G. LEE (2011). "RESCUE OF DELTAF508-CFTR TRAFFICKING VIA A GRASP-DEPENDENT UNCONVENTIONAL SECRETION PATHWAY." CELL 146(5): 746-760.

GEIST, M. M., X. PAN, S. BENDER, R. BARTENSCHLAGER, W. NICKEL AND O. T. FACKLER (2014). "HETEROLOGOUS SRC HOMOLOGY 4 DOMAINS SUPPORT MEMBRANE ANCHORING AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF HIV-1 NEF." J BIOL CHEM 289(20): 14030-14044.

GERLACH, H., V. LAUMANN, S. MARTENS, C. F. BECKER, R. S. GOODY AND M. GEYER (2010). "HIV-1 NEF MEMBRANE ASSOCIATION DEPENDS ON CHARGE, CURVATURE, COMPOSITION AND SEQUENCE." NAT CHEM BIOL 6(1): 46-53.

- GIESE, S. I., I. WOERZ, S. HOMANN, N. TIBRONI, M. GEYER AND O. T. FACKLER (2006). "SPECIFIC AND DISTINCT DETERMINANTS MEDIATE MEMBRANE BINDING AND LIPID RAFT INCORPORATION OF HIV-1(SF2) NEF." VIROLOGY 355(2): 175-191.
- GLICK, D., S. BARTH AND K. F. MACLEOD (2010). "AUTOPHAGY: CELLULAR AND MOLECULAR MECHANISMS." J PATHOL 221(1): 3-12.
- GLICKMAN, M. H. AND A. CIECHANOVER (2002). "THE UBIQUITIN-PROTEASOME PROTEOLYTIC PATHWAY: DESTRUCTION FOR THE SAKE OF CONSTRUCTION." PHYSIOL REV 82(2): 373-428.
- GOLDSMITH, M. A., M. T. WARMERDAM, R. E. ATCHISON, M. D. MILLER AND W. C. GREENE (1995). "DISSOCIATION OF THE CD4 DOWNREGULATION AND VIRAL INFECTIVITY ENHANCEMENT FUNCTIONS OF HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS TYPE 1 NEF." J VIROL 69(7): 4112-4121.
- GORGELS, A. (2011). UNTERSUCHUNG DER BINDUNG DES HIV-1 NEF PROTEINS AN GABARAP UND GABARAP-HOMOLOGE PROTEINE
- GORRY, P. R., M. CHURCHILL, J. LEARMONT, C. CHERRY, W. B. DYER, S. L. WESSELINGH AND J. S. SULLIVAN (2007). "REPLICATION-DEPENDENT PATHOGENICITY OF ATTENUATED NEF-DELETED HIV-1 IN VIVO." J ACQUIR IMMUNE DEFIC SYNDR 46(4): 390-394.
- GOTTLIEB, M. S., R. SCHROFF, H. M. SCHANKER, J. D. WEISMAN, P. T. FAN, R. A. WOLF AND A. SAXON (1981). "PNEUMOCYSTIS CARINII PNEUMONIA AND MUCOSAL CANDIDIASIS IN PREVIOUSLY HEALTHY HOMOSEXUAL MEN: EVIDENCE OF A NEW ACQUIRED CELLULAR IMMUNODEFICIENCY." N ENGL J MED 305(24): 1425-1431.
- GOUGEON, M. L. AND M. PIACENTINI (2009). "NEW INSIGHTS ON THE ROLE OF APOPTOSIS AND AUTOPHAGY IN HIV PATHOGENESIS." APOPTOSIS 14(4): 501-508.
- HAASE, A. T. (2010). "TARGETING EARLY INFECTION TO PREVENT HIV-1 MUCOSAL TRANSMISSION." NATURE 464(7286): 217-223.
- HAASS, C., B. PESOLD-HURT, G. MULTHAUP, K. BEYREUTHER AND P. M. KLOETZEL (1989). "THE PROS-35 GENE ENCODES THE 35 KD PROTEIN SUBUNIT OF DROSOPHILA MELANOGASTER PROTEASOME." EMBO J 8(8): 2373-2379.
- HANNA, Z., D. G. KAY, N. REBAI, A. GUIMOND, S. JOTHY AND P. JOLICOEUR (1998). "NEF HARBORS A MAJOR DETERMINANT OF PATHOGENICITY FOR AN AIDS-LIKE DISEASE INDUCED BY HIV-1 IN TRANSGENIC MICE." CELL 95(2): 163-175.
- HAURI, H. P., F. KAPPELER, H. ANDERSSON AND C. APPENZELLER (2000). "ERGIC-53 AND TRAFFIC IN THE SECRETORY PATHWAY." J CELL SCI 113 (Pt 4): 587-596.
- HERSHKO, A., A. CIECHANOVER, H. HELLER, A. L. HAAS AND I. A. ROSE (1980). "PROPOSED ROLE OF ATP IN PROTEIN BREAKDOWN: CONJUGATION OF PROTEIN WITH MULTIPLE CHAINS OF THE POLYPEPTIDE OF ATP-DEPENDENT PROTEOLYSIS." PROC NATL ACAD SCI U S A 77(4): 1783-1786.
- HICKE, L., T. YOSHIHISA AND R. SCHEKMAN (1992). "SEC23P AND A NOVEL 105-KDA PROTEIN FUNCTION AS A MULTIMERIC COMPLEX TO PROMOTE VESICLE BUDDING AND PROTEIN TRANSPORT FROM THE ENDOPLASMIC RETICULUM." MOL BIOL CELL 3(6): 667-676.

- HIYOSHI, M., N. TAKAHASHI-MAKISE, Y. YOSHIDOMI, N. CHUTIWITOONCHAI, T. CHIHARA, M. OKADA, N. NAKAMURA, S. OKADA AND S. SUZU (2012). "HIV-1 NEF PERTURBS THE FUNCTION, STRUCTURE, AND SIGNALING OF THE GOLGI THROUGH THE SRC KINASE HCK." J CELL PHYSIOL 227(3): 1090-1097.
- HOFFMANN, S., E. JONAS, S. KONIG, A. PREUSSER-KUNZE AND D. WILLBOLD (2007). "NEF PROTEIN OF HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS TYPE 1 BINDS ITS OWN MYRISTOYLATED N-TERMINUS." BIOL CHEM 388(2): 181-183.
- HUGHES, R. C. (1999). "SECRETION OF THE GALECTIN FAMILY OF MAMMALIAN CARBOHYDRATE-BINDING PROTEINS." BIOCHIM BIOPHYS ACTA 1473(1): 172-185.
- IAFRATE, A. J., S. CARL, S. BRONSON, C. STAHL-HENNIG, T. SWIGUT, J. SKOWRONSKI AND F. KIRCHHOFF (2000). "DISRUPTING SURFACES OF NEF REQUIRED FOR DOWNREGULATION OF CD4 AND FOR ENHANCEMENT OF VIRION INFECTIVITY ATTENUATES SIMIAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS REPLICATION IN VIVO." J VIROL 74(21): 9836-9844.
- ISHIHARA, N., M. HAMASAKI, S. YOKOTA, K. SUZUKI, Y. KAMADA, A. KIHARA, T. YOSHIMORI, T. NODA AND Y. OHSUMI (2001). "AUTOPHAGOSOME REQUIRES SPECIFIC EARLY SEC PROTEINS FOR ITS FORMATION AND NSF/SNARE FOR VACUOLAR FUSION." MOL BIOL CELL 12(11): 3690-3702.
- JIN, Y. J., C. Y. CAI, X. ZHANG AND S. J. BURAKOFF (2008). "LYSINE 144, A UBIQUITIN ATTACHMENT SITE IN HIV-1 NEF, IS REQUIRED FOR NEF-MEDIATED CD4 DOWN-REGULATION." J IMMUNOL 180(12): 7878-7886.
- JOHNSTONE, R. M., M. ADAM, J. R. HAMMOND, L. ORR AND C. TURBIDE (1987). "VESICLE FORMATION DURING RETICULOCYTE MATURATION. ASSOCIATION OF PLASMA MEMBRANE ACTIVITIES WITH RELEASED VESICLES (EXOSOMES)." J BIOL CHEM 262(19): 9412-9420.
- KABEYA, Y., N. MIZUSHIMA, T. UENO, A. YAMAMOTO, T. KIRISAKO, T. NODA, E. KOMINAMI, Y. OHSUMI AND T. YOSHIMORI (2000). "LC3, A MAMMALIAN HOMOLOGUE OF YEAST APG8P, IS LOCALIZED IN AUTOPHAGOSOME MEMBRANES AFTER PROCESSING." EMBO J 19(21): 5720-5728.
- KABEYA, Y., N. MIZUSHIMA, A. YAMAMOTO, S. OSHITANI-OKAMOTO, Y. OHSUMI AND T. YOSHIMORI (2004). "LC3, GABARAP AND GABARAPL2 LOCALIZE TO AUTOPHAGOSOMAL MEMBRANE DEPENDING ON FORM-II FORMATION." J CELL SCI 117(Pt 13): 2805-2812.
- KABEYA Y, M. N., UENO T, YAMAMOTO A, KIRISAKO T, NODA T, KOMINAMI E, OHSUMI Y, YOSHIMORI T. (2000). "LC3, A MAMMALIAN HOMOLOGUE OF YEAST APG8P, IS LOCALIZED IN AUTOPHAGOSOME MEMBRANES AFTER PROCESSING." EMBO J 19(21): 8.
- KAMMULA, E. C., J. MOTTER, A. GORGELS, E. JONAS, S. HOFFMANN AND D. WILLBOLD (2012). "BRAIN TRANSCRIPTOME-WIDE SCREEN FOR HIV-1 NEF PROTEIN INTERACTION PARTNERS REVEALS VARIOUS MEMBRANE-ASSOCIATED PROTEINS." PLoS ONE 7(12): E51578.
- KANEMATSU, T., I. S. JANG, T. YAMAGUCHI, H. NAGAHAMA, K. YOSHIMURA, K. HIDAKA, M. MATSUDA, H. TAKEUCHI, Y. MISUMI, K. NAKAYAMA, T. YAMAMOTO, N. AKAIKE, M. HIRATA AND K. NAKAYAMA (2002). "ROLE OF THE PLC-RELATED, CATALYTICALLY INACTIVE PROTEIN P130 IN GABA(A) RECEPTOR FUNCTION." EMBO J 21(5): 1004-1011.

-
- 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): 145-155.
- KAUFMANN, A., V. BEIER, H. G. FRANQUELIM AND T. WOLLERT (2014). "MOLECULAR MECHANISM OF AUTOPHAGIC MEMBRANE-SCAFFOLD ASSEMBLY AND DISASSEMBLY." CELL 156(3): 469-481.
- KIM, S. H., N. R. BIANCO, W. J. SHUFESKY, A. E. MORELLI AND P. D. ROBBINS (2007). "MHC CLASS II+ EXOSOMES IN PLASMA SUPPRESS INFLAMMATION IN AN ANTIGEN-SPECIFIC AND FAS LIGAND/FAS-DEPENDENT MANNER." J IMMUNOL 179(4): 2235-2241.
- KINCAID, M. M. AND S. J. KING (2006). "MOTORS AND THEIR TETHERS: THE ROLE OF SECONDARY BINDING SITES IN PROGRESSIVE MOTILITY." CELL CYCLE 5(23): 2733-2737.
- KITTLER, J. T., I. L. ARANCIBIA-CARCAMO AND S. J. MOSS (2004). "ASSOCIATION OF GRIP1 WITH A GABA(A) RECEPTOR ASSOCIATED PROTEIN SUGGESTS A ROLE FOR GRIP1 AT INHIBITORY SYNAPSES." BIOCHEM PHARMACOL 68(8): 1649-1654.
- KITTLER, J. T., P. ROSTAING, G. SCHIAVO, J. M. FRITSCHY, R. OLSEN, A. TRILLER AND S. J. MOSS (2001). "THE SUBCELLULAR DISTRIBUTION OF GABARAP AND ITS ABILITY TO INTERACT WITH NSF SUGGEST A ROLE FOR THIS PROTEIN IN THE INTRACELLULAR TRANSPORT OF GABA(A) RECEPTORS." MOL CELL NEUROSCI 18(1): 13-25.
- KJAERULFF, S., S. MULLER AND M. R. JENSEN (2005). "ALTERNATIVE PROTEIN SECRETION: THE MAM1 ABC TRANSPORTER SUPPORTS SECRETION OF M-FACTOR LINKED GFP IN FISSION YEAST." BIOCHEM BIOPHYS RES COMMUN 338(4): 1853-1859.
- KLIONSKY, D. J., J. M. CREGG, W. A. DUNN, JR., S. D. EMR, Y. SAKAI, I. V. SANDOVAL, A. SIBIRNY, S. SUBRAMANI, M. THUMM, M. VEENHUIS AND Y. OHSUMI (2003). "A UNIFIED NOMENCLATURE FOR YEAST AUTOPHAGY-RELATED GENES." DEV CELL 5(4): 539-545.
- KNEUSSEL, M., S. HAVERKAMP, J. C. FUHRMANN, H. WANG, H. WASSLE, R. W. OLSEN AND H. BETZ (2000). "THE GAMMA-AMINOBUTYRIC ACID TYPE A RECEPTOR (GABAAR)-ASSOCIATED PROTEIN GABARAP INTERACTS WITH GEPHYRIN BUT IS NOT INVOLVED IN RECEPTOR ANCHORING AT THE SYNAPSE." PROC NATL ACAD SCI U S A 97(15): 8594-8599.
- KORNFELD, R. AND S. KORNFELD (1985). "ASSEMBLY OF ASPARAGINE-LINKED OLIGOSACCHARIDES." ANNU REV BIOCHEM 54: 631-664.
- KUZNETSOV, S. A. AND V. I. GELFAND (1987). "18 kDA MICROTUBULE-ASSOCIATED PROTEIN: IDENTIFICATION AS A NEW LIGHT CHAIN (LC-3) OF MICROTUBULE-ASSOCIATED PROTEIN 1 (MAP-1)." FEBS LETT 212(1): 145-148.
- KYEI, G. B., C. DINKINS, A. S. DAVIS, E. ROBERTS, S. B. SINGH, C. DONG, L. WU, E. KOMINAMI, T. UENO, A. YAMAMOTO, M. FEDERICO, A. PANGANIBAN, I. VERGNE AND V. DERETIC (2009). "AUTOPHAGY PATHWAY INTERSECTS WITH HIV-1 BIOSYNTHESIS AND REGULATES VIRAL YIELDS IN MACROPHAGES." J CELL BIOL 186(2): 255-268.

- LAI, S. K., K. HIDA, S. SHUKAIR, Y. Y. WANG, A. FIGUEIREDO, R. CONE, T. J. HOPE AND J. HANES (2009). "HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS TYPE 1 IS TRAPPED BY ACIDIC BUT NOT BY NEUTRALIZED HUMAN CERVICOVAGINAL MUCUS." J VIROL 83(21): 11196-11200.
- LAMERS, S. L., G. B. FOGEL, L. C. HUYSENTRUYT AND M. S. McGRATH (2010). "HIV-1 NEF PROTEIN VISITS B-CELLS VIA MACROPHAGE NANOTUBES: A MECHANISM FOR AIDS-RELATED LYMPHOMA PATHOGENESIS?" CURR HIV RES 8(8): 638-640.
- LE GRAND, J. N., F. Z. CHAKRAMA, S. SEGUIN-PY, A. FRAICHARD, R. DELAGE-MOURROUX, M. JOUVENOT AND M. BOYER-GUITTAUT (2011). "GABARAPL1 (GEC1): ORIGINAL OR COPYCAT?" AUTOPHAGY 7(10): 1098-1107.
- LEE, J. H., S. B. RHO AND T. CHUN (2005). "GABAA RECEPTOR-ASSOCIATED PROTEIN (GABARAP) INDUCES APOPTOSIS BY INTERACTING WITH DEAD (ASP-GLU-ALA-ASP/HIS) BOX POLYPEPTIDE 47 (DDX 47)." BIOTECHNOL LETT 27(9): 623-628.
- LEGESSE-MILLER, A., Y. SAGIV, A. PORAT AND Z. ELAZAR (1998). "ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF A NOVEL LOW MOLECULAR WEIGHT PROTEIN INVOLVED IN INTRA-GOLGI TRAFFIC." J BIOL CHEM 273(5): 3105-3109.
- LENASSI, M., G. CAGNEY, M. LIAO, T. VAUPOTIC, K. BARTHOLOMEEUSEN, Y. CHENG, N. J. KROGAN, A. PLEMENITAS AND B. M. PETERLIN (2010). "HIV NEF IS SECRETED IN EXOSOMES AND TRIGGERS APOPTOSIS IN BYSTANDER CD4+ T CELLS." TRAFFIC 11(1): 110-122.
- LEVI, S. K., D. BHATTACHARYYA, R. L. STRACK, J. R. AUSTIN, 2ND AND B. S. GLICK (2010). "THE YEAST GRASP GRH1 COLOCALIZES WITH COPII AND IS DISPENSABLE FOR ORGANIZING THE SECRETORY PATHWAY." TRAFFIC 11(9): 1168-1179.
- LEVI, S. K. AND B. S. GLICK (2007). "GRASPING UNCONVENTIONAL SECRETION." CELL 130(3): 407-409.
- MA, P., M. SCHWARTEN, L. SCHNEIDER, A. BOESKE, N. HENKE, D. LISAK, S. WEBER, J. MOHRLUDER, M. STOLDT, B. STRODEL, A. METHNER, S. HOFFMANN, O. H. WEIERGRABER AND D. WILLBOLD (2013). "INTERACTION OF BCL-2 WITH THE AUTOPHAGY-RELATED GABAA RECEPTOR-ASSOCIATED PROTEIN (GABARAP): BIOPHYSICAL CHARACTERIZATION AND FUNCTIONAL IMPLICATIONS." J BIOL CHEM 288(52): 37204-37215.
- MACK, M., A. KLEINSCHMIDT, H. BRUHL, C. KLIER, P. J. NELSON, J. CIHAK, J. PLACHY, M. STANGASSINGER, V. ERFLE AND D. SCHLONDORFF (2000). "TRANSFER OF THE CHEMOKINE RECEPTOR CCR5 BETWEEN CELLS BY MEMBRANE-DERIVED MICROPARTICLES: A MECHANISM FOR CELLULAR HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS 1 INFECTION." NAT MED 6(7): 769-775.
- MALHOTRA, V. (2013). "UNCONVENTIONAL PROTEIN SECRETION: AN EVOLVING MECHANISM." EMBO J 32(12): 1660-1664.
- MALIM, M. H. (2009). "APOBEC PROTEINS AND INTRINSIC RESISTANCE TO HIV-1 INFECTION." PHILOS TRANS R SOC LOND B BIOL SCI 364(1517): 675-687.

- MANJITHAYA, R., C. ANJARD, W. F. LOOMIS AND S. SUBRAMANI (2010). "UNCONVENTIONAL SECRETION OF PICHIA PASTORIS ACB1 IS DEPENDENT ON GRASP PROTEIN, PEROXISOMAL FUNCTIONS, AND AUTOPHAGOSOME FORMATION." J CELL BIOL 188(4): 537-546.
- MANN, S. S. AND J. A. HAMMARBACK (1994). "MOLECULAR CHARACTERIZATION OF LIGHT CHAIN 3. A MICROTUBULE BINDING SUBUNIT OF MAP1A AND MAP1B." J BIOL CHEM 269(15): 11492-11497.
- MARTINEZ-MENARGUEZ, J. A., H. J. GEUZE, J. W. SLOT AND J. KLUMPERMAN (1999). "VESICULAR TUBULAR CLUSTERS BETWEEN THE ER AND GOLGI MEDIATE CONCENTRATION OF SOLUBLE SECRETORY PROTEINS BY EXCLUSION FROM COPI-COATED VESICLES." CELL 98(1): 81-90.
- MEHRPOUR, M., A. ESCLATINE, I. BEAU AND P. CODOGNO (2010). "AUTOPHAGY IN HEALTH AND DISEASE. 1. REGULATION AND SIGNIFICANCE OF AUTOPHAGY: AN OVERVIEW." AM J PHYSIOL CELL PHYSIOL 298(4): C776-785.
- MICHAELIS, S. (1993). "STE6, THE YEAST A-FACTOR TRANSPORTER." SEMIN CELL BIOL 4(1): 17-27.
- MISRA, S. AND J. H. HURLEY (1999). "CRYSTAL STRUCTURE OF A PHOSPHATIDYLINOSITOL 3-PHOSPHATE-SPECIFIC MEMBRANE-TARGETING MOTIF, THE FYVE DOMAIN OF Vps27P." CELL 97(5): 657-666.
- MOHRLÜDER J, H. Y., STANGLER T, HÄNEL K, WILLBOLD D (2007). "IDENTIFICATION OF CLATHRIN HEAVY CHAIN AS A DIRECT INTERACTION PARTNER FOR THE GAMMA-AMINO BUTYRIC ACID TYPE A RECEPTOR ASSOCIATED PROTEIN." BIOCHEMISTRY 18(46(50)): 14537-14543.
- MOHRLUDER, J., M. SCHWARTEN AND D. WILLBOLD (2009). "STRUCTURE AND POTENTIAL FUNCTION OF GAMMA-AMINO BUTYRATE TYPE A RECEPTOR-ASSOCIATED PROTEIN." FEBS J 276(18): 4989-5005.
- MOHRLUDER, J., T. STANGLER, Y. HOFFMANN, K. WIESEHAN, A. MATARUGA AND D. WILLBOLD (2007). "IDENTIFICATION OF CALRETICULIN AS A LIGAND OF GABARAP BY PHAGE DISPLAY SCREENING OF A PEPTIDE LIBRARY." FEBS J 274(21): 5543-5555.
- MOLINA, L., M. GRIMALDI, V. ROBERT-HEBMANN, L. ESPERT, M. VARBANOV, C. DEVAUX, C. GRANIER AND M. BIARD-PIECHACZYK (2007). "PROTEOMIC ANALYSIS OF THE CELLULAR RESPONSES INDUCED IN UNINFECTED IMMUNE CELLS BY CELL-EXPRESSED X4 HIV-1 ENVELOPE." PROTEOMICS 7(17): 3116-3130.
- MÖTTER, J. (2010). "IDENTIFIZIERUNG VON INTERAKTIONSPARTNERN FÜR HIV-1 NEF UND IHRE POTENTIELLE RELEVANZ BEI DER ENTWICKLUNG DER HIV-ASSOZIIERTEN DEMENZ."
- MURATORI, C., L. E. CAVALLIN, K. KRATZEL, A. TINARI, A. DE MILITO, S. FAIS, P. D'ALOJA, M. FEDERICO, V. VULLO, A. FOMINA, E. A. MESRI, F. SUPERTI AND A. S. BAUR (2009). "MASSIVE SECRETION BY T CELLS IS CAUSED BY HIV NEF IN INFECTED CELLS AND BY NEF TRANSFER TO BYSTANDER CELLS." CELL HOST MICROBE 6(3): 218-230.
- MUTHUMANI, K., A. Y. CHOO, D. S. HWANG, A. PREMKUMAR, N. S. DAYES, C. HARRIS, D. R. GREEN, S. A. WADSWORTH, J. J. SIEKIERKA AND D. B. WEINER (2005). "HIV-1 NEF-INDUCED FASL INDUCTION AND BYSTANDER KILLING REQUIRES P38 MAPK ACTIVATION." BLOOD 106(6): 2059-2068.
- NAIR, U., A. JOTWANI, J. GENG, N. GAMMOH, D. RICHERSON, W. L. YEN, J. GRIFFITH, S. NAG, K. WANG, T. MOSS, M. BABA, J. A. MCNEW, X. JIANG, F. REGGIORI, T. J. MELIA AND D. J. KLIONSKY (2011). "SNARE PROTEINS ARE REQUIRED FOR MACROAUTOPHAGY." CELL 146(2): 290-302.

- NAKATOGAWA, H., Y. ICHIMURA AND Y. OHSUMI (2007). "ATG8, A UBIQUITIN-LIKE PROTEIN REQUIRED FOR AUTOPHAGOSOME FORMATION, MEDIATES MEMBRANE TETHERING AND HEMIFUSION." CELL 130(1): 165-178.
- NAKATOGAWA, H., K. SUZUKI, Y. KAMADA AND Y. OHSUMI (2009). "DYNAMICS AND DIVERSITY IN AUTOPHAGY MECHANISMS: LESSONS FROM YEAST." NAT REV MOL CELL BIOL 10(7): 458-467.
- NATH, S., J. DANCOURT, V. SHTEYN, G. PUENTE, W. M. FONG, S. NAG, J. BEWERSDORF, A. YAMAMOTO, B. ANTONNY AND T. J. MELIA (2014). "LIPIDATION OF THE LC3/GABARAP FAMILY OF AUTOPHAGY PROTEINS RELIES ON A MEMBRANE-CURVATURE-SENSING DOMAIN IN ATG3." NAT CELL BIOL 16(5): 415-424.
- NEIL, S. J., T. ZANG AND P. D. BIENIASZ (2008). "TETHERIN INHIBITS RETROVIRUS RELEASE AND IS ANTAGONIZED BY HIV-1 VPU." NATURE 451(7177): 425-430.
- NGUYEN, D. G., A. BOOTH, S. J. GOULD AND J. E. HILDRETH (2003). "EVIDENCE THAT HIV BUDDING IN PRIMARY MACROPHAGES OCCURS THROUGH THE EXOSOME RELEASE PATHWAY." J BIOL CHEM 278(52): 52347-52354.
- NICKEL, W. (2005). "UNCONVENTIONAL SECRETORY ROUTES: DIRECT PROTEIN EXPORT ACROSS THE PLASMA MEMBRANE OF MAMMALIAN CELLS." TRAFFIC 6(8): 607-614.
- NICKEL, W. (2011). "THE UNCONVENTIONAL SECRETORY MACHINERY OF FIBROBLAST GROWTH FACTOR 2." TRAFFIC 12(7): 799-805.
- NICKEL W, R. C. (2009). "MECHANISMS OF REGULATED UNCONVENTIONAL PROTEIN SECRETION." NAT REV MOL CELL BIOL 10(3): 324.
- NISHIMURA, Y., C. R. BROWN, J. J. MATTAPALLIL, T. IGARASHI, A. BUCKLER-WHITE, B. A. LAFONT, V. M. HIRSCH, M. ROEDERER AND M. A. MARTIN (2005). "RESTING NAIVE CD4+ T CELLS ARE MASSIVELY INFECTED AND ELIMINATED BY X4-TROPIC SIMIAN-HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUSES IN MACAQUES." PROC NATL ACAD SCI U S A 102(22): 8000-8005.
- NODA, N. N., H. KUMETA, H. NAKATOGAWA, K. SATOO, W. ADACHI, J. ISHII, Y. FUJIOKA, Y. OHSUMI AND F. INAGAKI (2008). "STRUCTURAL BASIS OF TARGET RECOGNITION BY ATG8/LC3 DURING SELECTIVE AUTOPHAGY." GENES CELLS 13(12): 1211-1218.
- NODA, N. N., Y. OHSUMI AND F. INAGAKI (2010). "ATG8-FAMILY INTERACTING MOTIF CRUCIAL FOR SELECTIVE AUTOPHAGY." FEBS LETT 584(7): 1379-1385.
- OKAZAKI, N., J. YAN, S. YUASA, T. UENO, E. KOMINAMI, Y. MASUHO, H. KOGA AND M. MURAMATSU (2000). "INTERACTION OF THE UNC-51-LIKE KINASE AND MICROTUBULE-ASSOCIATED PROTEIN LIGHT CHAIN 3 RELATED PROTEINS IN THE BRAIN: POSSIBLE ROLE OF VESICULAR TRANSPORT IN AXONAL ELONGATION." BRAIN RES MOL BRAIN RES 85(1-2): 1-12.
- PANKIV, S., T. H. CLAUSEN, T. LAMARK, A. BRECH, J. A. BRUUN, H. OUTZEN, A. OVERVATN, G. BJORKOY AND T. JOHANSEN (2007). "P62/SQSTM1 BINDS DIRECTLY TO ATG8/LC3 TO FACILITATE DEGRADATION OF UBIQUITINATED PROTEIN AGGREGATES BY AUTOPHAGY." J BIOL CHEM 282(33): 24131-24145.
- PECHE, H., K. RENAUDIN, G. BERIOU, E. MERIEAU, S. AMIGORENA AND M. C. CUTURI (2006). "INDUCTION OF TOLERANCE BY EXOSOMES AND SHORT-TERM IMMUNOSUPPRESSION IN A FULLY MHC-MISMATCHED RAT CARDIAC ALLOGRAFT MODEL." AM J TRANSPLANT 6(7): 1541-1550.

- PERFETTINI, J. L., M. CASTEDO, T. ROUMIER, K. ANDREAU, R. NARDACCI, M. PIACENTINI AND G. KROEMER (2005). "MECHANISMS OF APOPTOSIS INDUCTION BY THE HIV-1 ENVELOPE." CELL DEATH DIFFER 12 SUPPL 1: 916-923.
- PIGUET, V., L. WAN, C. BOREL, A. MANGASARIAN, N. DEMAUREX, G. THOMAS AND D. TRONO (2000). "HIV-1 NEF PROTEIN BINDS TO THE CELLULAR PROTEIN PACS-1 TO DOWNREGULATE CLASS I MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEXES." NAT CELL BIOL 2(3): 163-167.
- PLEMPER, R. K. AND D. H. WOLF (1999). "ENDOPLASMIC RETICULUM DEGRADATION. REVERSE PROTEIN TRANSPORT AND ITS END IN THE PROTEASOME." MOL BIOL REP 26(1-2): 125-130.
- PLEMPER, R. K. AND D. H. WOLF (1999). "RETROGRADE PROTEIN TRANSLOCATION: ERADICATION OF SECRETORY PROTEINS IN HEALTH AND DISEASE." TRENDS BIOCHEM SCI 24(7): 266-270.
- PRYER, N. K., N. R. SALAMA, R. SCHEKMAN AND C. A. KAISER (1993). "CYTOSOLIC SEC13P COMPLEX IS REQUIRED FOR VESICLE FORMATION FROM THE ENDOPLASMIC RETICULUM IN VITRO." J CELL BIOL 120(4): 865-875.
- RABUILLE, C., V. MALHOTRA AND W. NICKEL (2012). "DIVERSITY IN UNCONVENTIONAL PROTEIN SECRETION." J CELL SCI 125(Pt 22): 5251-5255.
- RAIBORG, C., K. G. BACHE, A. MEHLUM, E. STANG AND H. STENMARK (2001). "HRS RECRUITS CLATHRIN TO EARLY ENDOSOMES." EMBO J 20(17): 5008-5021.
- RAPOSO, G., D. TENZA, S. MECHERI, R. PERONET, C. BONNEROT AND C. DESAYMARD (1997). "ACCUMULATION OF MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX CLASS II MOLECULES IN MAST CELL SECRETORY GRANULES AND THEIR RELEASE UPON DEGRANULATION." MOL BIOL CELL 8(12): 2631-2645.
- RAYMOND, A. D., T. C. CAMPBELL-SIMS, M. KHAN, M. LANG, M. B. HUANG, V. C. BOND AND M. D. POWELL (2011). "HIV TYPE 1 NEF IS RELEASED FROM INFECTED CELLS IN CD45(+) MICROVESICLES AND IS PRESENT IN THE PLASMA OF HIV-INFECTED INDIVIDUALS." AIDS RES HUM RETROVIRUSES 27(2): 167-178.
- RIEU, S., C. GEMINARD, H. RABESANDRATANA, J. SAINTE-MARIE AND M. VIDAL (2000). "EXOSOMES RELEASED DURING RETICULOCYTE MATURATION BIND TO FIBRONECTIN VIA INTEGRIN ALPHA4BETA1." EUR J BIOCHEM 267(2): 583-590.
- ROETH, J. F. AND K. L. COLLINS (2006). "HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS TYPE 1 NEF: ADAPTING TO INTRACELLULAR TRAFFICKING PATHWAYS." MICROBIOL MOL BIOL REV 70(2): 548-563.
- ROTHBLATT, J. A., R. J. DESHAIES, S. L. SANDERS, G. DAUM AND R. SCHEKMAN (1989). "MULTIPLE GENES ARE REQUIRED FOR PROPER INSERTION OF SECRETORY PROTEINS INTO THE ENDOPLASMIC RETICULUM IN YEAST." J CELL BIOL 109(6 Pt 1): 2641-2652.
- ROZMYSLOWICZ, T., M. MAJKA, J. KIJOWSKI, S. L. MURPHY, D. O. CONOVER, M. PONCZ, J. RATAJCZAK, G. N. GAULTON AND M. Z. RATAJCZAK (2003). "PLATELET- AND MEGAKARYOCYTE-DERIVED MICROPARTICLES TRANSFER CXCR4 RECEPTOR TO CXCR4-NULL CELLS AND MAKE THEM SUSCEPTIBLE TO INFECTION BY X4-HIV." AIDS 17(1): 33-42.
- RUDNICKA, D., J. FELDMANN, F. PORROT, S. WIETGREFE, S. GUADAGNINI, M. C. PREVOST, J. ESTAQUIER, A. T. HAASE, N. SOL-FOULON AND O. SCHWARTZ (2009). "SIMULTANEOUS CELL-TO-CELL TRANSMISSION OF

HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS TO MULTIPLE TARGETS THROUGH POLYSYNAPSES." J VIROL 83(12): 6234-6246.

SAGIV, Y., A. LEGESSE-MILLER, A. PORAT AND Z. ELAZAR (2000). "GATE-16, A MEMBRANE TRANSPORT MODULATOR, INTERACTS WITH NSF AND THE GOLGI V-SNARE GOS-28." EMBO J 19(7): 1494-1504.

SALAMA, N. R., J. S. CHUANG AND R. W. SCHEKMAN (1997). "SEC31 ENCODES AN ESSENTIAL COMPONENT OF THE COPII COAT REQUIRED FOR TRANSPORT VESICLE BUDDING FROM THE ENDOPLASMIC RETICULUM." MOL BIOL CELL 8(2): 205-217.

SANFRIDSON, A., S. HESTER AND C. DOYLE (1997). "NEF PROTEINS ENCODED BY HUMAN AND SIMIAN IMMUNODEFICIENCY VIRUSES INDUCE THE ACCUMULATION OF ENDOSOMES AND LYSOSOMES IN HUMAN T CELLS." PROC NATL ACAD SCI U S A 94(3): 873-878.

SAWAI, E. T., A. S. BAUR, B. M. PETERLIN, J. A. LEVY AND C. CHENG-MAYER (1995). "A CONSERVED DOMAIN AND MEMBRANE TARGETING OF NEF FROM HIV AND SIV ARE REQUIRED FOR ASSOCIATION WITH A CELLULAR SERINE KINASE ACTIVITY." J BIOL CHEM 270(25): 15307-15314.

SCHOTMAN, H., L. KARHINEN AND C. RABUILLE (2008). "DGRASP-MEDIATED NONCANONICAL INTEGRIN SECRETION IS REQUIRED FOR DROSOPHILA EPITHELIAL REMODELING." DEV CELL 14(2): 171-182.

SCHWARTEN, M., J. MOHRLUDER, P. MA, M. STOLDT, Y. THIELMANN, T. STANGLER, N. HERSCH, B. HOFFMANN, R. MERKEL AND D. WILLBOLD (2009). "NIX DIRECTLY BINDS TO GABARAP: A POSSIBLE CROSSTALK BETWEEN APOPTOSIS AND AUTOPHAGY." AUTOPHAGY 5(5): 690-698.

SCHWARTZ, O., V. MARECHAL, S. LE GALL, F. LEMONNIER AND J. M. HEARD (1996). "ENDOCYTOSIS OF MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX CLASS I MOLECULES IS INDUCED BY THE HIV-1 NEF PROTEIN." NAT MED 2(3): 338-342.

SEGURA, E., C. NICCO, B. LOMBARD, P. VERON, G. RAPOSO, F. BATTEUX, S. AMIGORENA AND C. THERY (2005). "ICAM-1 ON EXOSOMES FROM MATURE DENDRITIC CELLS IS CRITICAL FOR EFFICIENT NAIVE T-CELL PRIMING." BLOOD 106(1): 216-223.

SEITZ, A. AND T. SURREY (2006). "PROCESSIVE MOVEMENT OF SINGLE KINESINS ON CROWDED MICROTUBULES VISUALIZED USING QUANTUM DOTS." EMBO J 25(2): 267-277.

SHERER, N. M., M. J. LEHMANN, L. F. JIMENEZ-SOTO, C. HORENSAVITZ, M. PYPAERT AND W. MOTHES (2007). "RETROVIRUSES CAN ESTABLISH FILOPODIAL BRIDGES FOR EFFICIENT CELL-TO-CELL TRANSMISSION." NAT CELL BIOL 9(3): 310-315.

SHOJI-KAWATA, S., R. SUMPTER, M. LEVENO, G. R. CAMPBELL, Z. ZOU, L. KINCH, A. D. WILKINS, Q. SUN, K. PALLAUF, D. MACDUFF, C. HUERTA, H. W. VIRGIN, J. B. HELMS, R. EERLAND, S. A. TOOZE, R. XAVIER, D. J. LENSCHOW, A. YAMAMOTO, D. KING, O. LICHTARGE, N. V. GRISHIN, S. A. SPECTOR, D. V. KALOYANOVA AND B. LEVINE (2013). "IDENTIFICATION OF A CANDIDATE THERAPEUTIC AUTOPHAGY-INDUCING PEPTIDE." NATURE 494(7436): 201-206.

SILVESTRI, G., D. L. SODORA, R. A. KOUP, M. PAIARDINI, S. P. O'NEIL, H. M. MCCLURE, S. I. STAPRANS AND M. B. FEINBERG (2003). "NONPATHOGENIC SIV INFECTION OF SOOTY MANGABEYS IS CHARACTERIZED

BY LIMITED BYSTANDER IMMUNOPATHOLOGY DESPITE CHRONIC HIGH-LEVEL VIREMIA." IMMUNITY 18(3): 441-452.

STODDART, C. A., R. GELEZIUNAS, S. FERRELL, V. LINQUIST-STEPHS, M. E. MORENO, C. BARE, W. XU, W. YONEMOTO, P. A. BRESNAHAN, J. M. McCUNE AND W. C. GREENE (2003). "HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS TYPE 1 NEF-MEDIATED DOWNREGULATION OF CD4 CORRELATES WITH NEF ENHANCEMENT OF VIRAL PATHOGENESIS." J VIROL 77(3): 2124-2133.

STOLP, B., L. ABRAHAM, J. M. RUDOLPH AND O. T. FACKLER (2010). "LENTIVIRAL NEF PROTEINS UTILIZE PAK2-MEDIATED DEREGULATION OF COFILIN AS A GENERAL STRATEGY TO INTERFERE WITH ACTIN REMODELING." J VIROL 84(8): 3935-3948.

STREMLAU, M., C. M. OWENS, M. J. PERRON, M. KIESSLING, P. AUTISSIER AND J. SODROSKI (2004). "THE CYTOPLASMIC BODY COMPONENT TRIM5 α RESTRICTS HIV-1 INFECTION IN OLD WORLD MONKEYS." NATURE 427(6977): 848-853.

SUZUKI, K., T. KIRISAKO, Y. KAMADA, N. MIZUSHIMA, T. NODA AND Y. OHSUMI (2001). "THE PRE-AUTOPHAGOSOMAL STRUCTURE ORGANIZED BY CONCERTED FUNCTIONS OF APG GENES IS ESSENTIAL FOR AUTOPHAGOSOME FORMATION." EMBO J 20(21): 5971-5981.

SZAJNIK, M., M. CZYSTOWSKA, M. J. SZCZEPANSKI, M. MANDAPATHIL AND T. L. WHITESIDE (2010). "TUMOR-DERIVED MICROVESICLES INDUCE, EXPAND AND UP-REGULATE BIOLOGICAL ACTIVITIES OF HUMAN REGULATORY T CELLS (TREG)." PLoS ONE 5(7): e11469.

TAMURA, N., M. OKU AND Y. SAKAI (2010). "ATG8 REGULATES VACUOLAR MEMBRANE DYNAMICS IN A LIPIDATION-INDEPENDENT MANNER IN PICHIA PASTORIS." J CELL SCI 123(Pt 23): 4107-4116.

TEMMERMAN, K., A. D. EBERT, H. M. MULLER, I. SINNING, I. TEWS AND W. NICKEL (2008). "A DIRECT ROLE FOR PHOSPHATIDYLINOSITOL-4,5-BISPHOSPHATE IN UNCONVENTIONAL SECRETION OF FIBROBLAST GROWTH FACTOR 2." TRAFFIC 9(7): 1204-1217.

THERY, C., M. BOUSSAC, P. VERON, P. RICCIARDI-CASTAGNOLI, G. RAPOSO, J. GARIN AND S. AMIGORENA (2001). "PROTEOMIC ANALYSIS OF DENDRITIC CELL-DERIVED EXOSOMES: A SECRETED SUBCELLULAR COMPARTMENT DISTINCT FROM APOPTOTIC VESICLES." J IMMUNOL 166(12): 7309-7318.

THERY, C., L. ZITVOGEL AND S. AMIGORENA (2002). "EXOSOMES: COMPOSITION, BIOGENESIS AND FUNCTION." NAT REV IMMUNOL 2(8): 569-579.

THIELMANN, Y., J. MOHRLUDER, B. W. KOENIG, T. STANGLER, R. HARTMANN, K. BECKER, H. D. HOLTJE AND D. WILLBOLD (2008). "AN INDOLE-BINDING SITE IS A MAJOR DETERMINANT OF THE LIGAND SPECIFICITY OF THE GABA TYPE A RECEPTOR-ASSOCIATED PROTEIN GABARAP." CHEMBIOCHEM 9(11): 1767-1775.

THIELMANN, Y., O. H. WEIERGRABER, P. MA, M. SCHWARTEN, J. MOHRLUDER AND D. WILLBOLD (2009). "COMPARATIVE MODELING OF HUMAN NSF REVEALS A POSSIBLE BINDING MODE OF GABARAP AND GATE-16." PROTEINS 77(3): 637-646.

TISDALE, E. J. AND W. E. BALCH (1996). "RAB2 IS ESSENTIAL FOR THE MATURATION OF PRE-GOLGI INTERMEDIATES." J BIOL CHEM 271(46): 29372-29379.

- TOOZE, S. A. AND T. YOSHIMORI (2010). "THE ORIGIN OF THE AUTOPHAGOSOMAL MEMBRANE." NAT CELL BIOL 12(9): 831-835.
- TOURNAVITI, S., S. HANNEMANN, S. TERJUNG, T. M. KITZING, C. STEGMAYER, J. RITZERFELD, P. WALTHER, R. GROSSE, W. NICKEL AND O. T. FACKLER (2007). "SH4-DOMAIN-INDUCED PLASMA MEMBRANE DYNAMIZATION PROMOTES BLEB-ASSOCIATED CELL MOTILITY." J CELL SCI 120(Pt 21): 3820-3829.
- TRAVERS, K. J., C. K. PATIL, L. WODICKA, D. J. LOCKHART, J. S. WEISSMAN AND P. WALTER (2000). "FUNCTIONAL AND GENOMIC ANALYSES REVEAL AN ESSENTIAL COORDINATION BETWEEN THE UNFOLDED PROTEIN RESPONSE AND ER-ASSOCIATED DEGRADATION." CELL 101(3): 249-258.
- TSUKADA, M. AND Y. OHSUMI (1993). "ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF AUTOPHAGY-DEFECTIVE MUTANTS OF SACCHAROMYCES CEREVISIAE." FEBS LETT 333(1-2): 169-174.
- VARBANOV, M., L. ESPERT AND M. BIARD-PIECHACZYK (2006). "MECHANISMS OF CD4 T-CELL DEPLETION TRIGGERED BY HIV-1 VIRAL PROTEINS." AIDS REV 8(4): 221-236.
- WALTER P, B. G. (1982). "SIGNAL RECOGNITION PARTICLE CONTAINS A 7S RNA ESSENTIAL FOR PROTEIN TRANSLOCATION ACROSS THE ENDOPLASMIC RETICULUM." NATURE 299(5885): 691-698.
- WALTER, P. AND G. BLOBEL (1981). "TRANSLOCATION OF PROTEINS ACROSS THE ENDOPLASMIC RETICULUM. II. SIGNAL RECOGNITION PROTEIN (SRP) MEDIATES THE SELECTIVE BINDING TO MICROSOMAL MEMBRANES OF IN-VITRO-ASSEMBLED POLYSOMES SYNTHESIZING SECRETORY PROTEIN." J CELL BIOL 91(2 Pt 1): 551-556.
- WALTER P, I. I., BLOBEL G. (1981). "TRANSLOCATION OF PROTEINS ACROSS THE ENDOPLASMIC RETICULUM. I. SIGNAL RECOGNITION PROTEIN (SRP) BINDS TO IN-VITRO-ASSEMBLED POLYSOMES SYNTHESIZING SECRETORY PROTEIN." J CELL BIOL 91: 545-550 J CELL BIOL.
- WANG, H., F. K. BEDFORD, N. J. BRANDON, S. J. MOSS AND R. W. OLSEN (1999). "GABA(A)-RECEPTOR-ASSOCIATED PROTEIN LINKS GABA(A) RECEPTORS AND THE CYTOSKELETON." NATURE 397(6714): 69-72.
- WANG, H. AND R. W. OLSEN (2000). "BINDING OF THE GABA(A) RECEPTOR-ASSOCIATED PROTEIN (GABARAP) TO MICROTUBULES AND MICROFILAMENTS SUGGESTS INVOLVEMENT OF THE CYTOSKELETON IN GABARAPGABA(A) RECEPTOR INTERACTION." J NEUROCHEM 75(2): 644-655.
- WEIDBERG, H., E. SHVETS, T. SHPILKA, F. SHIMRON, V. SHINDER AND Z. ELAZAR (2010). "LC3 AND GATE-16/GABARAP SUBFAMILIES ARE BOTH ESSENTIAL YET ACT DIFFERENTLY IN AUTOPHAGOSOME BIOGENESIS." EMBO J 29(11): 1792-1802.
- WICKNER, W. (2010). "MEMBRANE FUSION: FIVE LIPIDS, FOUR SNARES, THREE CHAPERONES, TWO NUCLEOTIDES, AND A RAB, ALL DANCING IN A RING ON YEAST VACUOLES." ANNU REV CELL DEV BIOL 26: 115-136.
- WILD, K., M. HALIC, I. SINNING AND R. BECKMANN (2004). "SRP MEETS THE RIBOSOME." NAT STRUCT MOL BIOL 11(11): 1049-1053.
- WILD, K., K. R. ROSENDAL AND I. SINNING (2004). "A STRUCTURAL STEP INTO THE SRP CYCLE." MOL MICROBIOL 53(2): 357-363.

- WILLIAMS, R. A., K. L. WOODS, L. JULIANO, J. C. MOTTRAM AND G. H. COOMBS (2009). "CHARACTERIZATION OF UNUSUAL FAMILIES OF ATG8-LIKE PROTEINS AND ATG12 IN THE PROTOZOAN PARASITE LEISHMANIA MAJOR." AUTOPHAGY 5(2): 159-172.
- WU, L. AND V. N. KEWALRAMANI (2006). "DENDRITIC-CELL INTERACTIONS WITH HIV: INFECTION AND VIRAL DISSEMINATION." NAT REV IMMUNOL 6(11): 859-868.
- XIE, Z. AND D. J. KLIONSKY (2007). "AUTOPHAGOSOME FORMATION: CORE MACHINERY AND ADAPTATIONS." NAT CELL BIOL 9(10): 1102-1109.
- XIN, Y., L. YU, Z. CHEN, L. ZHENG, Q. FU, J. JIANG, P. ZHANG, R. GONG AND S. ZHAO (2001). "CLONING, EXPRESSION PATTERNS, AND CHROMOSOME LOCALIZATION OF THREE HUMAN AND TWO MOUSE HOMOLOGUES OF GABA(A) RECEPTOR-ASSOCIATED PROTEIN." GENOMICS 74(3): 408-413.
- XU, X. N., G. R. SCREATOR, F. M. GOTCH, T. DONG, R. TAN, N. ALMOND, B. WALKER, R. STEBBINGS, K. KENT, S. NAGATA, J. E. STOTT AND A. J. McMICHAEL (1997). "EVASION OF CYTOTOXIC T LYMPHOCYTE (CTL) RESPONSES BY NEF-DEPENDENT INDUCTION OF FAS LIGAND (CD95L) EXPRESSION ON SIMIAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS-INFECTED CELLS." J EXP MED 186(1): 7-16.
- YANG, P. AND A. J. HENDERSON (2005). "NEF ENHANCES C-CBL PHOSPHORYLATION IN HIV-INFECTED CD4+ T LYMPHOCYTES." VIROLOGY 336(2): 219-228.
- YANG, Z. AND D. J. KLIONSKY (2009). "AN OVERVIEW OF THE MOLECULAR MECHANISM OF AUTOPHAGY." CURR TOP MICROBIOL IMMUNOL 335: 1-32.
- YANG, Z. AND D. J. KLIONSKY (2010). "MAMMALIAN AUTOPHAGY: CORE MOLECULAR MACHINERY AND SIGNALING REGULATION." CURR OPIN CELL BIOL 22(2): 124-131.
- YU, H. J., M. A. REUTER AND D. McDONALD (2008). "HIV TRAFFICS THROUGH A SPECIALIZED, SURFACE-ACCESSIBLE INTRACELLULAR COMPARTMENT DURING TRANS-INFECTION OF T CELLS BY MATURE DENDRITIC CELLS." PLoS PATHOG 4(8): E1000134.
- ZHENG, Y. H., A. PLEMENITAS, T. LINNEMANN, O. T. FACKLER AND B. M. PETERLIN (2001). "NEF INCREASES INFECTIVITY OF HIV VIA LIPID RAFTS." CURR BIOL 11(11): 875-879.
- ZHOU, D. AND S. A. SPECTOR (2008). "HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS TYPE-1 INFECTION INHIBITS AUTOPHAGY." AIDS 22(6): 695-699.

9 Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ABC-Transporter	<i>ATP binding cassette transporter</i>
ACBP	Acyl-CoA-binding protein
AIDS	Aquired Immune Deficiency Syndrome
ALIX	<i>PDCD6IP, Programmed cell death 6 interacting protein</i>
ANXA5	<i>Annexin A5</i>
APC	antigen presenting cells
APOBEC3	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G
APS	Ammoniumpersulfat
ATG	autophagy related protein
ATP	adenosine triphosphate
Bif-1	Bax-interacing factor
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CCL	CC chemokine ligands
CCR5	CC-Motiv-Chemokin-Rezeptor 5
CD	cluster of differentiation
CD63	<i>CD63, LAMP-3</i>
CD81	<i>IGSF8, Immunoglobulin superfamily, member 8</i>
CIP	calf intestinal alkaline phosphatase
COP	coat protein complex
C-Terminus	Carboxy-Terminus
CTFR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CUPS	compartments of unconventional protein secretion
CXCR4	C-X-C chemokine receptor type 4
DC	dendritic cells
DC-SIGN	Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin
DDX47	DEAD box polypeptid 47
DEAD	D-E-A-D (asp-glu-ala-asp)
DMEM	Dulbecco's modified Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dnase I	Desoxyribunuklease I
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EpCAM	<i>Epithelial cell adhesion molecule</i>
ER	endoplasmatic reticulum

ERGIC	ER-intermediate compartment
ESCRT	endosomal sorting complex required for transport
FCS	fötales Kälberserum
FGF2	fibroblast growth factor 2
FIP200	focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kD
FLOT1	<i>Flotillin 1</i>
FYVE-Domäne	Fab 1 YOTB, Vac 1 and EEA1,
G	Guanin
GA	golgi apparat
GABARAP	γ -aminobutyrate type A receptor associated protein
GATE-16	golgi associated ATPase enhancer of 16 kD
GEC1	glandular epithelial cell protein 1
GM130	<i>cis-Golgi matrix protein</i>
GRASP	Golgi reassembly stacking protein
GRIP	glutamate interacting protein 1
HASPB	hydrophobic acetylated surface protein B
HEK	human embryonic kidney
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HP1	hydrophobic pocket 1
HP2	hydrophobic pocket 2
HRP	horseradish peroxidase
HRS	hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase complex
Hsp	heat shock protein
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
ICAM1	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i>
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
kb	Kilobasen
LB	lysogenic broth
LDR	LIR-docking site
LIR	LC3 interacting region
MAP1A	microtubule-associated protein 1 A
MAP1B	microtubule-associated protein 1 B
MAP1LC3A	microtubule-associated protein 1 light chain 3 A
MAP1LC3B	microtubule-associated protein 1 light chain 3 B
MAP1LC3C	microtubule-associated protein 1 light chain 3 C
mRNA	messenger RNA
mTOR	mammalian target of rapamycin
MVB	multivesicular body
MW	Molekulargewicht
NBR1	Neighbor of BRCA1 gene 1
NHS	N-Hydroxysuccinimidyl
Ni-NTA	Nickel-Nitroessigsäure

NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
NSF	N-ethylmaleimide-sensitive factor
N-Terminus	Amino-Terminus
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAS	preautophagosomal structure
PBI	Phox and Meb1 domain
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phosphatidylethanolamin
PfCDPK1	Plasmodium falciparum calcium-dependent protein kinase 1
PI	phosphatidylinositol
PI3P	phosphatidylinositol-3-phosphate
PIK3R	Phosphatidylinositol 3-kinase Regulatory Subunit
PM	plasmamembrane
PRIP-1	phospholipase C-related inactive protein typ 1
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Rab	Ras-related in brain
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RUBICON	RUN domain and cysteine-rich domain containing Beclin-1 interacting protein
SAP	shrimps alkaline phosphatase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SIV	Simianes Immundefizienz-Virus
SOB	Super Optimal Broth
SRP	signal-recognition peptide
STAM	signal transducing adapter molecule
T	Thymin
TRIM5 α	tripartite motif-containing protein 5
TSG101	<i>Tumor susceptibility gene 101</i>
UBA	ubiquitin-associated domains
ULK	unc-51-like kinase
USP	unfolds protein response
UV	Ultraviolett
UVRAG	UV irradiation resistance-associated gene
Vps	vacuolar sortin protein
wt	Wildtyp
ϵ	Extinktionskoeffizient
λ	Wellenlänge

9.1.1 Aminosäuren

Aminosäure	Dreibuchstabencode	Einbuchstabencode
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

9.1.2 Publikationen und Posterpräsentationen

Publikationen:

Kammula, E.C.; Mötter, J.; **Gorgels, A.**; Jonas, E.; Hoffmann S.; Willbold, D. „*Brain transcriptome-wide screen for HIV-1 Nef protein interaction partners reveals various membrane-associated protein*“ PLoS ONE 12, e 51578

Ma, P., Schwarten, M; Schneider, L.; **Boeske, A.**; Henke, H.; Lisak, D.; Weber, S.; Mohrlüder, J.; Stoldt, M.; Strodel, B.; Methner, A.; Hoffmann, S.; Weiergräber, O.H.; Willbold, D. “*Interaction of Bcl-2 with the autophagy-related GABAA receptor-associated protein*” (GABARAP): biophysical characterization and functional implications” J Biol Chem. 2013 Dec 27;288(52):37204-15

Posterpräsentation:

Kammula, E.C.; Mötter, J.; **Gorgels, A.**; Hoffmann S.; Willbold, D. „*New ligands of membrane-associated HIV-1 Nef*“ Poster International Symposium of the German Society for Biochemistry and Molecular Biology, Molecular Life Sciences, Frankfurt am Main 2011

9.1.3 Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die zum Zustandekommen dieser Arbeit beigetragen haben.

Prof. Dr. Dieter Willbold danke ich für die Überlassung des spannenden Themas, die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die hervorragende Laborausstattung. Außerdem möchte ich ihm für seine Betreuung und Unterstützung sowie seinen Optimismus danken.

Bei Prof. Dr. Heiner Schaal bedanke ich mich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens, sowie für die Durchführung der Transkriptomanalysen.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Silke Hoffmann für die hervorragende Betreuung meines Projektes. Die vielen Diskussionen, die guten Ratschläge, die wertvollen Anregungen und der gemeinsame Kampf mit der aktuellen Literatur haben zum wesentlichen Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Ebenfalls möchte ich mich bei Dr. Melanie Schwarten für die Hilfe bei der Auswertung der NMR-Spektren, für die Erstellung der PyMOL-Abbildung sowie den vielen aufbauenden Worten, wann immer ich sie brauchte, bedanken.

Bei Dr. Thomas Gensch möchte ich mich für die vielen wertvollen Tipps zur Fluoreszenzmikroskopie bedanken.

Ein ganz besonderer Dank gilt Dr. Arnd Baumen und Dr. Dagmar Kaschuba für die Einführung in die Etablierung stabiler Zelllinien. Ohne die stabilen Zelllinien wäre ein Großteil der Ergebnisse mit Sicherheit nicht zustande gekommen.

Bei Dr. Oliver Weiergräber, Dr. Jeanine Mohrlüder und Stephan Weber bedanke ich mich für ihre stete Hilfe, Ideen und Diskussionen zum Thema Autophagie.

Bei Dr. Ellen Kammula möchte ich mich für die fantastische Hilfe in der Zellkultur bedanken.

Ein besonderer Dank gilt auch allen TA's und „Laborfeen“ für die Herstellung von Puffern, Medien, SDS-Gelen,..... sowie für viele lustige Momente im Labor.

Ebenfalls möchte ich mich bei meinen ehemaligen und aktuellen Bürokolleginnen Dr. Marina Pavlidou, Claudia Börger und Laura Kukuk für eine unvergessliche schöne Zeit bedanken.

Zum Schluss möchte ich mich bei meiner gesamten Familie, ganz besonders bei meinem Mann Klaus, meiner Mutter Ursula, meinem Bruder Markus, meinen Omas, meinem Opa, meinem Onkel, meiner Tante und meiner Patin für die uneingeschränkte Unterstützung auf meinem bisherigen Lebensweg bedanken. Ohne Euch wäre dies nicht möglich gewesen.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Promotionsarbeit selbständig angefertigt habe. Es wurden nur die in der Arbeit ausdrücklich benannten Quellen und Hilfsmittel benutzt. Wörtlich oder sinngemäß übernommenes Gedankengut habe ich als solches kenntlich gemacht. Diese Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegen.

Ort, Datum

Unterschrift