

**Analyse der Funktion der humanen LGDs
und hLGD2^{MR} in humanen Zellen und in
*Drosophila melanogaster***

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Katharina Schulz
aus Köln

Düsseldorf, August 2015

aus dem Institut für Genetik
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Referent: Prof. Dr. Thomas Klein
Korreferent: Prof. Dr. Hermann Aberle

Tag der mündlichen Prüfung: 05. 11. 2015

When you have excluded the impossible,
whatever remains, however improbable, must be the truth.

Sherlock Holmes, Sir Arthur Conan Doyle

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
1.1 Endocytose und der endosomale Transportweg.....	1
1.2 Die ESCRT-Komplexe und ihre Funktion während der ILV Bildung.....	4
1.3 Der Notch-Signalweg	9
1.4 Das Tumorsuppressorgen <i>lethal(2) giant discs</i> und seine Orthologe.....	12
1.5 Ziele der Arbeit.....	19
2 Ergebnisse	20
2.1 Vergleich der Aminosäuresequenzen der Lgd-Familie	20
2.2 Struktur und Funktionsanalyse von hLGD1 und hLGD2	21
2.2.1 hLGD1 und hLGD2 sind funktional konserviert	22
2.2.2 Die C-terminale Verlängerung von hLGD2 verschlechtert dessen Funktionalität in <i>Drosophila melanogaster</i>	25
2.2.3 Funktion der DM14 Domänen	30
2.2.4 Funktionalität der C2 Domäne	35
2.2.5 Untersuchung des Funktionsverlustes der hLGD Δ C2s	37
2.3 hLGD2 interagiert genetisch mit hLGD1 und Lgd	45
2.4 Analyse der hLGDs und deren Deletionskonstrukte in humanen Zellen	47
2.4.1 Endogene Verteilung von hLGD2.....	48
2.4.2 Überexpression der hLGDs in HeLa Zellen.....	50
2.4.3 Ubiquitinierte Proteine scheinen vor den hLGD2 Δ DM14-HA positiven Vesikeln zu akkumulieren.....	71
2.5 Das eine mentale Retardierung auslösende Allel von <i>hLGD2</i>	77
2.5.1 hLGD2 ^{MR} ist in <i>Drosophila melanogaster</i> nicht funktional	78
2.5.2 Die Expression von Lgd ^{MR} und hLGD1 ^{MR} kann den <i>lgd</i> mutanten Phänotyp nicht retten	80

2.5.3	Das Nonsense-Peptid hat keinen Einfluss auf die Funktionalität der Proteine.....	82
2.5.4	Analyse des Funktionsverlustes der mentalen Retardierungsstrukture...84	
2.5.5	Analyse der mentalen Retardierungsstrukture in humanen Zellen.....	95
3	Diskussion.....	104
3.1	Analyse der hLGDs und ihrer Domänen.....	104
3.1.1	Funktionalität	104
3.1.2	Stabilität.....	106
3.1.3	Lokalisation.....	107
3.1.4	Genetische Interaktion der hLGDs untereinander	108
3.1.5	Einfluss der hLGDs auf den endosomalen Transportweg in humanen Zellen	109
3.2	Analyse eines mentale Retardierung auslösenden Allels von <i>hLGD2</i>	118
4	Zusammenfassung/Summary.....	124
	Summary	125
5	Material und Methoden.....	126
5.1	Material	126
5.1.1	Chemikalien.....	126
5.1.2	Geräte, Apparaturen und Zubehör	127
5.1.3	Software und Internetdatenbanken	128
5.1.4	Enzyme.....	129
5.1.5	Molekularbiologische Kits	129
5.1.6	Antikörper	130
5.1.7	Antibiotika.....	131
5.1.8	Bakterienstämme	131
5.1.9	Zelllinien	132
5.1.10	Plasmide.....	132
5.1.11	Synthetische Oligonukleotide.....	138
5.2	Methoden	142

5.2.1	Bakterienkultur	142
5.2.2	Isolierung von Plasmid DNA aus <i>E. coli</i>	143
5.2.3	Agarosegelelektrophorese von DNA	143
5.2.4	Präzipitation, Reinigung und Konzentrationsbestimmung von DNA	144
5.2.5	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	144
5.2.6	Enzymkatalysierte Modifikation von DNA	147
5.2.7	Zellkultur	148
5.2.8	<i>Drosophila melanogaster</i>	150
5.2.9	Proteinbiochemische Methoden	159
6	Literaturverzeichnis	165
7	Anhang	180
	Danksagung	200
	Erklärung	201

Abkürzungsverzeichnis

MVB	multivesicular bodies
Aki-1	Akt kinase-interacting protein 1
CC2D1	coiled-coil and conserved region 2 (C2) domain containing 1
CHMP	charged multivesicular body protein
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSL	Delta/Serrate/LAG-2
ESCRT	endosomal sorting complex required for transport
FCS	Fötale Kälberserum
Freud	five' repressor element under dual repression binding protein
Gbe+Su(H)	Grainyhead binding element + Supressor of Hairless
HRP	Horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
IHC	Immunhistochemie
ILV	intraluminale Vesikel
LAMP1	lysosomal associated membrane protein 1
LB	lysogeny broth
Lgd	lethal (2) giant discs
MBP	Maltose-Binding Protein
MCS	Multiple Klonierungsstelle
MEF	murine embryonale Fibroblasten
MR	mentale Retardierung
NECD	Notch extrazelluläre Domäne
NES	Nuklear Export Signal
NEXT	Notch extracellular truncation
NICD	Notch intrazelluläre Domäne
NSMR	nicht syndromischen mentalen Retardierung
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
Rab	Ras related in brain
RT	Raumtemperatur
TAPE	TBK-1 associated Protein in Endolysosomes
Vps	vacuolar protein sorting
WB	Western Blot
wg	wingless
β-Gal	β-Galaktosidase

1 Einleitung

1.1 Endocytose und der endosomale Transportweg

Zellen stehen in ständiger Kommunikation mit ihrer Umgebung. Diese findet an der Oberfläche der Plasmamembran statt, welche das Zellinnere von der äußeren Umgebung abgrenzt. Die präzise Kommunikation der Zelle, welche adäquat auf die Signale von außen antworten muss und auch ihrerseits die Umgebung beeinflusst, wird durch Endocytose ermöglicht. (Übersicht in Doherty und McMahon, 2009).

Die Endocytose ist an vielen Prozessen in der Zelle beteiligt. Sie spielt beispielsweise eine Rolle während der Antigen-Präsentation sowie der Zellwanderung (Übersicht in Doherty und McMahon, 2009). Des Weiteren versuchen auch Pathogene über die Endocytose in die Zelle einzutreten (Übersicht in Marsh und Helenius, 2006). Grundsätzlich dient die Endocytose der Speicherung, dem Recycling, der Sortierung und dem Abbau von Substanzen. Dabei wird sie ebenfalls bei der Regulation der Aktivität von verschiedenen Signalwegen benötigt, wie zum Beispiel im Fall des Notch-Signalweges (Übersicht in Di Fiore und de Camilli, 2001; Seto et al., 2002; Polo und Di Fiore, 2006; Sorkin und von Zastrow, 2009). Ist der Prozess der Endocytose und des endosomalen Transportes gestört, kann dies zu schweren Krankheiten führen, wie beispielsweise zu neurodegenerativen Erkrankungen, wie Morbus Alzheimer (Cataldo et al., 2008) und Chorea Huntington (Pal et al., 2008) oder zu Neoplasien (Übersicht in Polo et al., 2004).

Unter Endocytose ist die Abschnürung eines Teils der Plasmamembran in das Cytoplasma der Zelle zu verstehen (s. Abb. 1.1 ①). Dabei kann je nach Art der Aufnahme des extrazellulären Materials zwischen Phagozytose (Aufnahme von größeren Partikeln bis zu ganzen Zellen) und Pinocytose (Aufnahme von Flüssigkeiten und gelösten Substanzen) unterschieden werden (Übersicht in Soldati und Schliwa, 2006). Die Phagozytose dient in Protozoen vorwiegend als Nahrungsaufnahme, in Metazoen nutzen diese jedoch vor allem spezialisierte Zellen, wie beispielsweise Makrophagen bei Säugern, welche Mikroorganismen in sich aufnehmen, um sie zu zerstören. Durch Pinocytose werden kontinuierlich Flüssigkeiten und gelöste Substanzen von den Zellen aufgenommen. Die Rezeptor-vermittelte Endocytose, welche eine Art der Pinocytose darstellt, kann in die Clathrin-vermittelte, die Calveolin abhängige und die Clathrin- und Calveolin unabhängige Endocytose unterteilt werden (Übersicht in Doherty und McMahon, 2009). Unabhängig über welchen Mechanismus die Fracht endocytiert wurde, fusionieren mehrere primäre endocytotische Vesikel miteinander und bilden so das frühe Endosom oder sie fusionieren mit einem bereits gebildeten frühen Endosomen (Gruenberg et al., 1989). Das frühe Endosom wird als Haupt-Sortierstation angesehen, in dem die Fracht entweder recycelt oder über späte

Endosomen zum Lysosom gelangt, um dort degradiert zu werden (Übersicht in Huotari und Helenius, 2011). Es gibt in den frühen Endosomen sowohl tubuläre als auch vakuoläre Bereiche und die limitierende Membran enthält verschiedene Subdomänen, welche unterschiedlich in ihrer Zusammensetzung und Funktion sind (Übersicht in Zerial und McBride, 2001) (s. Abb. 1.1 ②). Innerhalb kürzester Zeit wird der meiste Anteil der Fracht wieder recycelt, wofür die GTPasen Rab4 und Rab11 verantwortlich sind (Rab: Ras-related in brain) (s. Abb. 1.1 ③). Der Rest akkumuliert im frühen Endosom und gelangt anschließend über die späten Endosomen in das degradative System (Übersicht in Maxfield und McGraw, 2004). In diesem erfolgt der Abbau der Fracht durch die Fusion der späten Endosomen mit dem Lysosom. Neben dem Recycling und der Degradation findet zudem ein reger Austausch zwischen den Endosomen und dem Trans-Golgi-Netzwerk statt, durch den während der endosomalen Reifung lysosomale Komponenten an die Endosomen geliefert werden und andere endosomale Komponenten entfernt werden (Übersicht in Anitei et al., 2010) (s. Abb. 1.1 ④).

Damit die Proteine überhaupt in die frühen Endosomen aufgenommen werden können, müssen sie zunächst für den Abbau markiert werden. Dies geschieht über Ubiquitinierungen, wobei die Ubiquitinierung die Degradation der Proteine sowohl über das Proteasom, das Lysosom als auch über das Autophagosom vermittelt (Übersicht in Clague et al., 2012). Für den Abbau von Transmembranproteinen genügt schon eine Monoubiquitinierung für die Internalisierung und die darauffolgende Sortierung im frühen Endosom (Katzmann et al., 2001; Reggiori und Pelham, 2001; Polo et al., 2002).

Die Reifung der späten Endosomen besteht aus diversen Prozessen, welche alle stark reguliert sind. Dies ist essentiell, damit die Endosomen nur in Richtung des Proteinabbaus gehen können. Wichtige Prozesse sind der Austausch von Membrankomponenten, die Bewegung in Richtung der perinuklearen Region entlang von Mikrotubuli, Bildung von zusätzlichen intraluminalen Vesikeln, einen Abfall des intraluminalen pH-Wertes, einem Wechsel der Morphologie und auch die Akquise lysosomaler Komponenten (Übersicht in Huotari und Helenius, 2011) (s. Abb. 1.1 ⑤). Auf einige dieser Prozesse wird im Folgenden näher eingegangen.

Die späten Endosomen entstehen aus den vakuolären Domänen der frühen Endosomen. Durch die Bildung einer Rab7 Domäne am frühen Endosom werden die späten, bzw. reifenden Endosomen generiert (Rink et al., 2005; Vonderheit und Helenius, 2005). Da die frühen Endosomen Rab5 positiv sind, kommt es so zu einer transienten Bildung eines hybriden Rab5/Rab7 Endosoms. Anschließend wird Rab5 innerhalb weniger Minuten durch Rab7 ersetzt. Durch die Konversion von Rab5 durch Rab7 wird so das frühe Endosom zu einem späten Endosom (Rink et al., 2005; Vonderheit und Helenius, 2005; Poteryaev et al., 2010).

Eine entscheidende Rolle der Rab Konversion ist auch der Austausch der Fusions-Maschinerie an der endosomalen Membran. Durch diesen können die reifenden

Endosomen nur noch mit anderen späten Endosomen oder Lysosomen fusionieren. Es gibt zwei verschiedene Komplexe, welche die Fusion der frühen Endosomen (CORVET) und späten Endosomen (HOPS) regulieren (Nickerson et al., 2009). Beide besitzen einen Kern, der aus den Proteinen Vps11, Vps16, Vps18 und Vps33 besteht (Vps: vacuolar protein sorting). Sie unterscheiden sich nur durch ihre assessorischen Proteine, CORVET besitzt zusätzlich die Proteine Vps3 und Vps8. Dem HOPS Komplex hingegen gehören außerdem die Proteinen Vps39 und Vps41 an. Es ist bekannt, dass Rab5 mit CORVET und Rab7 mit HOPS interagieren kann. Das derzeitige Modell sieht vor, dass die beiden Konversionen miteinander verbunden sind und miteinander reguliert werden (Übersicht in Balderhaar und Ungermann, 2013).

Ein anderer Bestandteil der endosomalen Reifung ist der sukzessive Abfall des luminalen pH-Wertes der Endosomen. In frühen Endosomen liegt der pH-Wert bei 6,8-6,1, in späten Endosomen bei 6,0-4,8 und in Lysosomen fällt der pH-Wert auf rund 4,5 ab (Maxfield und Yamashiro, 1987). Die Azidifizierung wird durch V-ATPasen ermöglicht. Dies sind große, komplexe Protonenpumpen, welche einen membranassoziierten V_0 -Komplex besitzen, der als Transmembranpore dient und einem cytosolischen V_1 Komplex, welcher ATP bindet und hydrolysiert (Übersicht in Forgac, 2007; Marshansky und Futai, 2008). Die saure Umgebung begünstigt unter anderem sowohl die hydrolytischen Reaktionen als auch den Membranverkehr, die Sortierung und die Weiterleitung der Fracht und das Inaktivieren von Pathogenen. (Übersicht in Huotari und Helenius, 2011).

Die Bildung von intraluminalen Vesikeln ist ebenfalls ein wichtiger Bestandteil der Endosomenreifung. Dabei werden die ubiquitinierten Membranrezeptoren vollständig ins Innere des Endosoms gebracht und dadurch inaktiviert. Dieser Prozess startet in frühen Endosomen (Raiborg et al., 2002) und wird in reifenden Endosomen fortgesetzt. Die daraus resultierenden Endosomen werden *multivesicular bodies* (MVB) genannt. Wie genau intraluminale Vesikel gebildet werden, wird im nächsten Kapitel genauer beschrieben.

Auch die Bewegung der Endosomen spielt im Reifungsprozess eine Rolle. Die Endosomen wandern während der Reifung von der Zellperipherie in Richtung des Nukleus, denn in dessen Peripherie befinden sich die Lysosomen. Mit diesen fusionieren die späten reifen Endosomen und bilden so Endolysosomen (Übersicht in Luzio et al., 2007) (s. Abb. 1.1 ©). Dort findet der größte Teil der Hydrolyse der endocytierten Fracht statt. Die Lysosomen an sich dienen als eine Art Speicher-Vakuolen für lysosomale Komponenten, die dann wieder eingesetzt werden können. Diese Komponenten bestehen aus Hydrolasen, der limitierenden Membran und anderen degradierungsresistenten Substanzen (Übersicht in Huotari und Helenius, 2011; Kornfeld, 1987).

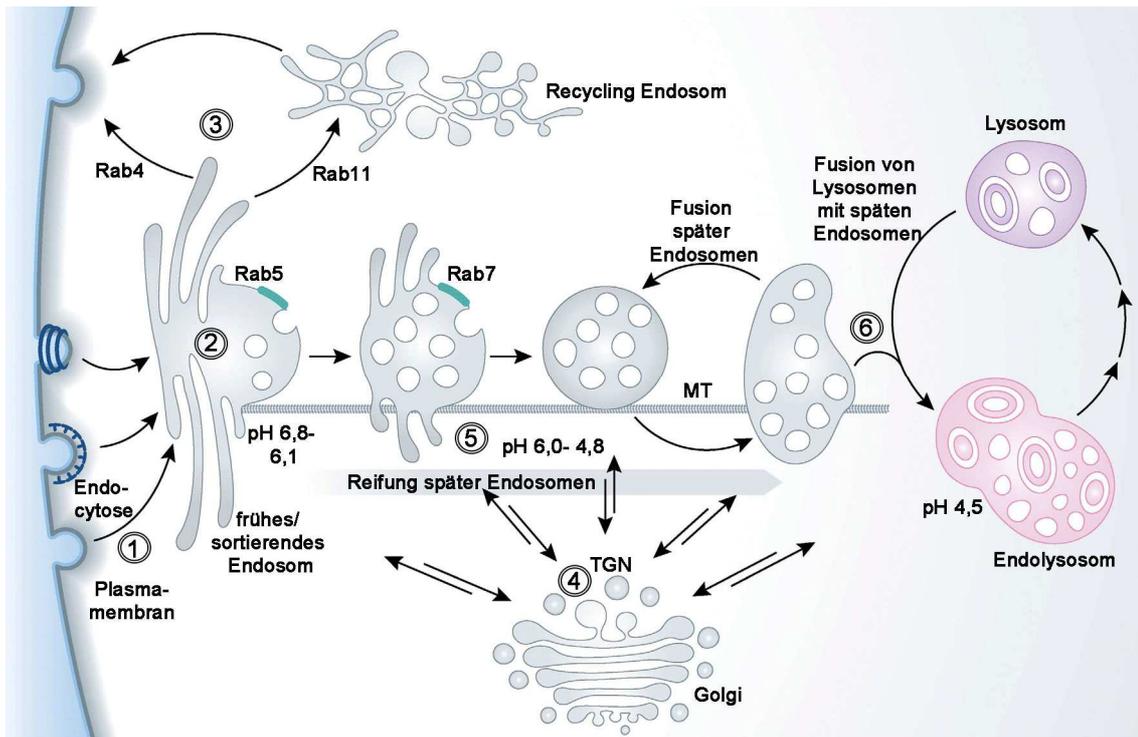


Abb. 1.1: Der endosomale Transportweg. Endocytotische Vesikel schnüren sich von der Plasmamembran ab ①. Diese Vesikel fusionieren zu einem oder mit einem frühen Endosom, in diesem wird die Fracht sortiert und die intraluminale Vesikelbildung (ILV) beginnt ②. Die Fracht wird entweder recycelt, was durch Rab4 oder Rab11 reguliert wird, ③ oder sie bleibt durch Ubiquitin markiert im frühen Endosom, um abgebaut zu werden. Um lysosomale Komponenten an die Endosomen zu liefern, besteht zwischen den Endosomen und dem *trans*-Golgi-Netzwerk ein Austausch ④. Das frühe Endosom reift zum späten Endosom ⑤. Dabei kommt es unter anderem zu einer Rab5-Rab7 Konversion, einem Abfall des pH-Wertes im Lumen der Endosomen, vermehrter ILV-Bildung und einer festeren Bindung der Endosomen an Mikrotubuli (MT). Die späten Endosomen fusionieren miteinander oder auch mit dem Lysosom. Ist letzteres der Fall entsteht ein Endolysosom und die endocytisierte Fracht wird degradiert ⑥. (modifiziert nach Huotari und Helenius, 2011).

1.2 Die ESCRT-Komplexe und ihre Funktion während der ILV Bildung

Für den reibungslosen Ablauf der Degradation der Transmembranproteine ist die Bildung intraluminaler Vesikel (ILV) essentiell, da sonst die signalisierende Domäne der Transmembranproteine auf der cytosolischen Seite des Endosoms lokalisiert wäre und möglicherweise ektopisch aktiviert werden könnte. Die ILVs werden aus der limitierenden Membran des Endosoms gebildet. In reifen Endosomen wird diese durch spezielle Membranglykoproteine, wie z. B. LAMPs (LAMP: lysosomal associated membrane proteins) vor der Degradation geschützt. In ILVs jedoch werden die Lipide und Membranproteine nach der Fusion mit dem Lysosom durch die Hydrolasen abgebaut, da ihnen der Schutz durch die Glykoproteine fehlt (Huotari und Helenius, 2011).

Die Sortierung der endosomalen Fracht in die ILVs sowie deren Bildung wird durch die aufeinander folgend arbeitenden ESCRT-Komplexe 0-III (ESCRT: endosomal sorting complex required for transport) sowie dem Vps4 Komplex vermittelt (s. Abb. 1.2). Sie erkennen und interagieren mit ubiquitinierten Membranproteinen und rekrutieren nachfolgende Komplexe. Zudem vermitteln sie die Deformation sowie die Abschnürung der Membran und abschließend auch die Dissoziation der Komplexe von der endosomalen Membran. Die ILV Bildung wiederholt sich solange bis die ubiquitinierte Fracht von der limitierenden Membran entfernt wurde (Übersicht in Henne et al., 2011; Hurley und Stenmark, 2011).

Der ESCRT-0 Komplex sortiert die ubiquitinierte Fracht, dabei bindet er an die ubiquitinierten Proteine und gruppiert sie für die Übergabe ins MVB. Zudem rekrutiert ESCRT-0 Clathrin, Ubiquitin Ligasen und deubiquitinierende Enzyme (Übersicht in Hurley, 2010). ESCRT-0 besteht aus Vps27/Hrs und Hse1/STAM (Vps: vacuolar protein sorting, Hrs: hepatocyte receptor tyrosine kinase substrate, STAM: Signal-transducing adaptor molecule) (Bilodeau et al., 2002; Bache et al., 2003; Asao et al., 1997), wobei die zuerstgenannten aus der Hefe stammen und dahinter das Ortholog aus den Metazoen angegeben ist (s. Abb. 1.2). Die beiden Komponenten bilden ein 1:1 Heterodimer (Ren et al., 2009). Sowohl Vps27 als auch Hse1 besitzen eine VHS Domäne, welche Ubiquitin bindet (Ren und Hurley, 2010). Der VHS Domäne von Vps27/Hrs folgt eine FYVE Domäne, welche an Phosphatidylinositol 3-phosphat (PI3P) bindet (Burd und Emr, 1998; Gaullier et al., 1998) und somit ESCRT-0 an die frühen Endosomen bringt (Raiborg et al., 2001). Die Vielzahl an Ubiquitin Bindedomänen, UIM genannt (UIM: ubiquitin interacting motif) (Shih et al., 2002; Fisher et al., 2003), erlaubt ESCRT-0 an Polyubiquitin-Ketten mit hoher Avidität zu binden (Ren und Hurley, 2010) und die ubiquitinierte Fracht *in vitro* zu gruppieren (Wollert und Hurley, 2010). Bei Hse1/STAM, folgt auf die VHS Domäne eine SH3 Domäne, welche für die Rekrutierung von deubiquitinierenden Enzymen verantwortlich ist (Kato et al., 2000). Vps27/Hrs scheint der Initiator für die ILV Bildung zu sein, da es sowohl ubiquitinierte Fracht und PI3P bindet als auch den ESCRT-I Komplex rekrutiert. Vps27/Hrs bindet direkt an den N-Terminus von Vps23/TSG101, einer Untereinheit des ESCRT-I Komplexes über sein C-terminal gelegenes P(S/T)XP Motiv (Katzmann et al., 2003; Pornillos et al., 2003; Bilodeau et al., 2003).

Der ESCRT-I Komplex ist ein lösliches Hetero-Tetramer und besteht aus Vps23/TSG101, Vps28, Vps37(A-D) und Mvb12(A, B) oder UBAP1 (TSG: Tumor susceptibility gene, Mvb: multi-vesicular body, UBAP: ubiquitin-associated protein) (Agromayor et al., 2012; Audhya et al., 2007). Vps23/TSG101 interagiert über seine UEV Domäne mit dem ESCRT-0 Komplex und ubiquitinierten Membranproteinen (Katzmann et al., 2003; Pornillos et al., 2003; Bilodeau et al., 2003; Katzmann et al., 2001; Sundquist et al., 2004) (s. Abb. 1.2). Vps28 auf der anderen Seite bindet Vps36/Eap45, einem ESCRT-II Protein, über dessen GLUE Domäne und vermittelt so die Interaktion des ESCRT-I Komplexes mit dem ESCRT-II Komplex (Teo et al., 2006). Die GLUE Domäne von Vps36 vermittelt nicht nur die Bindung des ESCRT-II

Komplexes mit ESCRT-I sondern zudem auch noch die Bindung an PI3P und Ubiquitin (Teo et al., 2006; Alam et al., 2004). Der ESCRT-II Komplex ist ebenfalls ein Heterotetramer, welches aus Vps36, Vps22, und zwei Vps25 Untereinheiten besteht (Babst et al., 2002b; Im und Hurley, 2008) (s. Abb. 1.2).

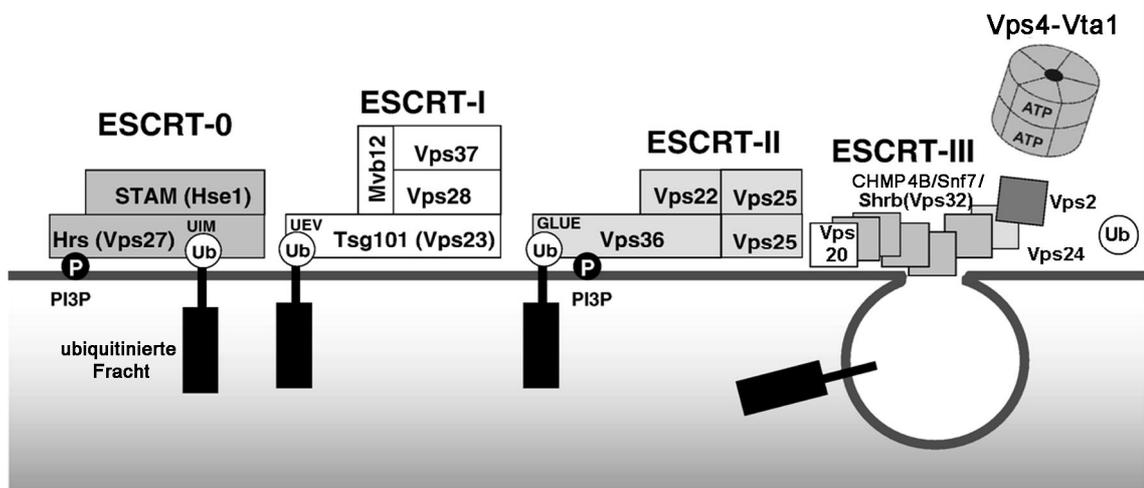


Abb. 1.2: Die ESCRT-Komplexe. Um ubiquitinierte Proteine in intraluminale Vesikel (ILV) zu sortieren, binden die ESCRT-Komplexe 0-II diese über bestimmte Motive. Deubiquitinasen werden vom ESCRT-III Komplex rekrutiert und entfernen die Ubiquitin (Ub) Markierung vor der ILV Abschnürung. Der ESCRT-III Komplex vermittelt zudem die Abschnürung intraluminale Vesikel, sehr wahrscheinlich unter anderem über polymere Filamente, welche durch die ESCRT-III Komponente CHMP4/Snf7/shrub gebildet werden. Der Vps4-Vta1 Komplex wiederum deassembliert den ESCRT-III Komplex und entlässt die einzelnen Komponenten ins Cytoplasma. (PI3P: Phosphatidylinositol-3-Phosphat) (modifiziert nach Stuffers et al., 2009).

Die ESCRT Komplexe 0-II binden ubiquitinierte Proteine und sind für die Sortierung dieser vor der ILV Bildung verantwortlich (s. Abb. 1.3 ①). ESCRT-II initiiert zudem die ILV Bildung, indem es die dafür verantwortliche ESCRT-III Untereinheit Vps20/CHMP6 rekrutiert (s. Abb. 1.3 ②) (Teo et al., 2004). Neuere Erkenntnisse deuten jedoch an, dass Vps20 mit dem ESCRT-II Komplex aus *Caenorhabditis elegans* direkt im Cytoplasma interagiert. Diese bilden dann einen Superkomplex, welcher an gekrümmte Membranen bindet und die Vps32/Snf7 Polymerisation an der entstehenden Vesikelknospe stimuliert (Schuh et al., 2015). Der ESCRT-III Komplex schließt die ILV Bildung ab, indem er die Abschnürung der Endosomenmembran vermittelt. Die ESCRT Komponenten sind nach der ILV Bildung auf der cytoplasmatischen Seite der Endosomen lokalisiert (Wollert und Hurley, 2010).

Der ESCRT-III Komplex wird im Gegensatz zu den anderen ESCRT Komplexen nur transient an der Membran der Endosomen gebildet (Babst et al., 2002a). Er besteht aus den Kernkomponenten Vps20/CHMP6, Snf7/CHMP4(A-C), Vps24/CHMP3 und Vps2/CHMP2(A, B), welche aufeinanderfolgend rekrutiert werden (Teis et al., 2008). Zudem gehören zu dem ESCRT-III Komplex noch die akzessorischen Untereinheiten Did2/CHMP1(A, B), Vps60/CHMP5, Ist1 sowie CHMP7 (Did: DOA4-independent degradation protein 2, Ist: Increased sodium tolerance protein 1)(Howard et al., 2001; Horii et al., 2006; Shim et al., 2006; Ward et al., 2005).

Die Kernkomponenten des Komplexes sind relativ klein und weisen ähnliche strukturelle Eigenschaften und einen analogen molekularen Aufbau auf (Muzioł et al., 2006; Bajorek et al., 2009; Xiao et al., 2009). Ihre N-terminale Region besteht aus zwei basischen Helices ($\alpha 1$, $\alpha 2$), welche eine Haarnadel Struktur ausbilden und wichtig für die Homo-oder Heterodimerisation sind. Darauf folgen drei saure Helices ($\alpha 3$, $\alpha 4$ und $\alpha 5$). Im Cytoplasma werden die inaktiven Monomere der Proteine durch einen autoinhibitorischen Mechanismus stabilisiert, bei dem die negativ geladene C-terminale Region ($\alpha 5$, $\alpha 6$) auf die positiv geladene N-terminale Haarnadel zurückfaltet (Muzioł et al., 2006; Zamborlini et al., 2006; Shim et al., 2007; Lata et al., 2008). Des Weiteren enthält der C-Terminus eine MIM Domäne (MIM: MIT (microtubule-interacting and transport)-interacting motifs), welche für die Interaktion mit der AAA-ATPase Vps4 benötigt wird (Kieffer et al., 2008; Obita et al., 2007; Stuchell-Brereton et al., 2007).

Obwohl der Aufbau der ESCRT-III Untereinheiten strukturell sehr ähnlich ist, hat jede dennoch eine spezifische Funktion. Der geordnete Zusammenschluss in ein aktives Filament beginnt, wenn Vps20 durch die Bindung an den ESCRT-II Komplex aktiviert wird (Teo et al., 2004). Dies wiederum führt zu einer sequentiellen Homo-Oligomerisierung von Snf7, welche durch die Bindung von Vps24 an das letzte Snf7 Protomer beendet wird. Vps24 rekrutiert zudem Vps2, welches den Zusammenschluss der ESCRT-III Filamente vervollständigt (s. Abb. 1.3 ②) (Saksena et al., 2009; Teis et al., 2008). Nachdem der Zusammenschluss des Komplexes abgeschlossen ist, induziert oder stabilisiert er die Einstülpung der Membran am wachsenden ILV, wahrscheinlich unterstützt durch ein N-terminales Insertionsmotif, welches das durch Snf7 gebildete ESCRT-III Filament an der Membran verankert (Buchkovich et al., 2013).

Die Aktivierung des ESCRT-III Komplexes benötigt eine Vielzahl von Konformationsänderungen, welche das Verlassen der Autoinhibition, Stabilisieren der Membranbindung, Ermöglichen der Interaktion mit anderen ESCRT-III Komponenten sowie Freilegen der MIM Domäne zur Folge hat (Teis et al., 2010; Teo et al., 2004; Im et al., 2009). Der wachsende ESCRT-III Komplex rekrutiert Deubiquitinasen, welche die Fracht-Deubiquitinierung und auf diese Art und Weise auch das Ubiquitinrecycling der Vesikelbildung vermitteln (Clague und Urbé, 2006; Odorizzi et al., 2003; Luhtala und Odorizzi, 2004) (s. Abb. 1.2).

Der Zerfall des ESCRT-III Komplexes in seine Einzelkomponenten wird durch den Vps4 Komplex unter ATP-Hydrolyse vermittelt, welcher aus Vps4 und seinem Co-Faktor Vta1 (Vps20-associated 1 homolog) besteht (Babst et al., 1997). Im Cytoplasma liegt Vps4 inaktiv als Monomer oder Dimer vor (Babst et al., 1998). Ein Rekrutierungskomplex reguliert den Zusammenschluss von Vps4 mit ESCRT-III. Seine zentrale Komponente ist die ESCRT-III Untereinheit Vps2/CHMP2, welche zusammen mit Did2/CHMP1, Ist1 und Vps60/CHMP5 agiert (Dimaano et al., 2008; Nickerson et al., 2006; Teis et al., 2010). Vps4 besitzt eine N-terminale MIT Domäne, welche möglicherweise zuerst an die C-terminale MIM Domäne von Vps2 bindet (Nickerson et al., 2006). Sobald Vps4 an den ESCRT-III Komplex rekrutiert wurde, schließt sich Vps4

zu einem Dodecamer zusammen, welches aus zwei gestapelten hexamerischen Ringen mit einer zentralen Pore besteht (Hartmann et al., 2008; Landsberg et al., 2009; Yu et al., 2008). Die Bindung von Vta1 resultiert in einem aktiven Vps4-Vta1 Komplex mit einer gesteigerten ATPase Aktivität (Azmi et al., 2008; Norgan et al., 2013; Shim et al., 2008). Vps4 ist ein Mechanoenzym, welches die Energie aus der ATP Hydrolyse in mechanische Kraft umsetzt, um die Membran gebundenen ESCRT-III Filamente auseinanderzubringen und dabei die freigewordenen Untereinheiten wieder ins Cytoplasma entlässt (Babst et al., 1997; Babst et al., 1998). Nachdem der ESCRT-III Komplex vollständig dissoziiert ist, zerfällt auch der Vps4 Komplex in seine inaktiven Protomere. Neuere Erkenntnisse deuten an, dass Vps4 nicht nur für die Dissoziation des ESCRT-III Komplexes benötigt wird, sondern auch für den Abschluss der ILV Biogenese. Dabei bindet Vps4 an ESCRT-III, was durch Interaktionen mit Vps2 und Snf7 koordiniert wird (Adell et al., 2014) (s. Abb. 1.3).

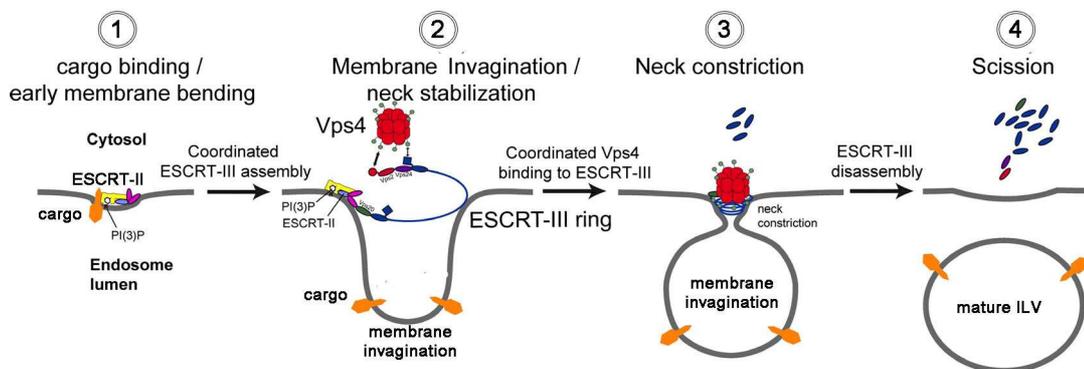


Abb. 1.3: Modell der ILV Biogenese. ESCRT-0-II binden und gruppieren ubiquitinierte Fracht und könnten die initiale Membrandeformierung initiieren ①. ESCRT-II veranlasst wiederum den Zusammenschluss des ESCRT-III Komplexes in ein ring-artiges Filament, welches die Fracht umschließt und die Membran definiert, welche in ein ILV umgewandelt wird. ESCRT-III induziert oder stabilisiert die Einschnürung des wachsenden ILVs ②. Die koordinierte Bindung von Vps4 an den ESCRT-III Komplex vermittelt eine produktive ESCRT-III Umgestaltung, welche Konformationsänderungen induziert und den ESCRT-III Ring in eine helikale Spirale konvertiert, welche wiederum irgendwie die Membraneinschnürung antreibt ③. Vps4 könnte in zwei möglichen Weisen an der ILV Bildung beteiligt sein. Einerseits könnte Vps4 dazu führen, dass sich eine entspannte ESCRT-III Spirale zusammenzieht und dadurch Kräfte auf die Membran übertragen, wodurch weitere Umgestaltungsschritte erlaubt werden. Andererseits könnte die Interaktion von Vps4 mit dem ESCRT-III Komplex zu einer destruktiven ESCRT-III Umgestaltungs-/Zerfall-Reaktion führen und einen schnellen Zusammenbruch des Zwischenproduktes der Abknospung verursachen ④. (modifiziert nach Adell et al., 2014)

Die ESCRT-Komplexe spielen nicht nur bei der Bildung der ILVs eine große Rolle, sondern übernehmen zum Teil auch Funktionen während der Cytokinese oder bei der Freisetzung von Viren (Carlton und Martin-Serrano, 2007; Henne et al., 2011). Weiter tragen Defekte der ESCRT Komplexe zu Krankheiten wie Neurodegeneration und Krebs bei (Stuffers et al., 2009). Zudem konnte in *Drosophila melanogaster* nachgewiesen werden, dass die Signaltransduktion von Transmembranrezeptoren

beeinflusst werden, wenn es zu einem Ausfall der ESCRT-Komplexe kommt. So führt beispielsweise der Verlust der ESCRT-III Funktion zu einer ektopischen Liganden-unabhängigen Aktivierung des Notch-Signalweges (Vaccari et al., 2008). (Vaccari et al., 2009).

1.3 Der Notch-Signalweg

Der endosomale Transportweg ist für viele Signalwege ein Mittel zu ihrer Regulation, so auch beim Notch-Signalweg. Dieser reguliert zahlreiche Zellprozesse, wie beispielsweise die Zellteilung, das Zellschicksal und die Determination, sowie auch den Zelltod (Artavanis-Tsakonas et al., 1999; Bray, 2006). Eine Störung der Signaltransduktion kann zu schwerwiegenden Krankheiten führen, wie z. B. akute T-Zell Leukämie, zu Entwicklungsstörungen im kardiovaskulärem System oder auch des Skelettes (Ellisen et al., 1991; Niessen und Karsan, 2007; Shifley und Cole, 2007). Der Notch-Signalweg ist abhängig von dem direkten Kontakt mit der benachbarten Zelle. So binden die DSL-Liganden (DSL: Delta/Serrate/LAG-2) der Signal-sendenden Zelle an den Notch Rezeptor der Signal-empfangenden Zelle, welches als *trans*-Interaktion bezeichnet wird (s. Abb. 1.4 ①). Die *cis*-Interaktion zwischen Ligand und Rezeptor hingegen findet an derselben Zelle statt, dabei wird der Notch-Signalweg allerdings inhibiert und nicht aktiviert (Sakamoto et al., 2002) (s. Abb. 1.4 ②).

Sowohl Notch als auch seine Liganden, wie Delta oder Serrate in *Drosophila melanogaster* oder Delta-like bzw. Jagged im Menschen, sind Transmembranproteine, deren extrazelluläre Domäne primär aus EGF-artigen Wiederholungen (EGF (epidermal growth factor)-like repeats) besteht (Wharton et al., 1985), Übersicht in (Haines und Irvine, 2003)). Die Ligandenbindung über die extrazelluläre Domäne führt zu der Abspaltung und dem Entlassen der Notch intrazellulären Domäne (NICD), welche dann in den Nukleus wandert. In diesem reguliert NICD dann transkriptionelle Komplexe. Sowohl bei der Synthese als auch zur Aktivierung wird Notch proteolytisch gespalten (Übersicht in Bray, 2006). (s. Abb. 1.4)

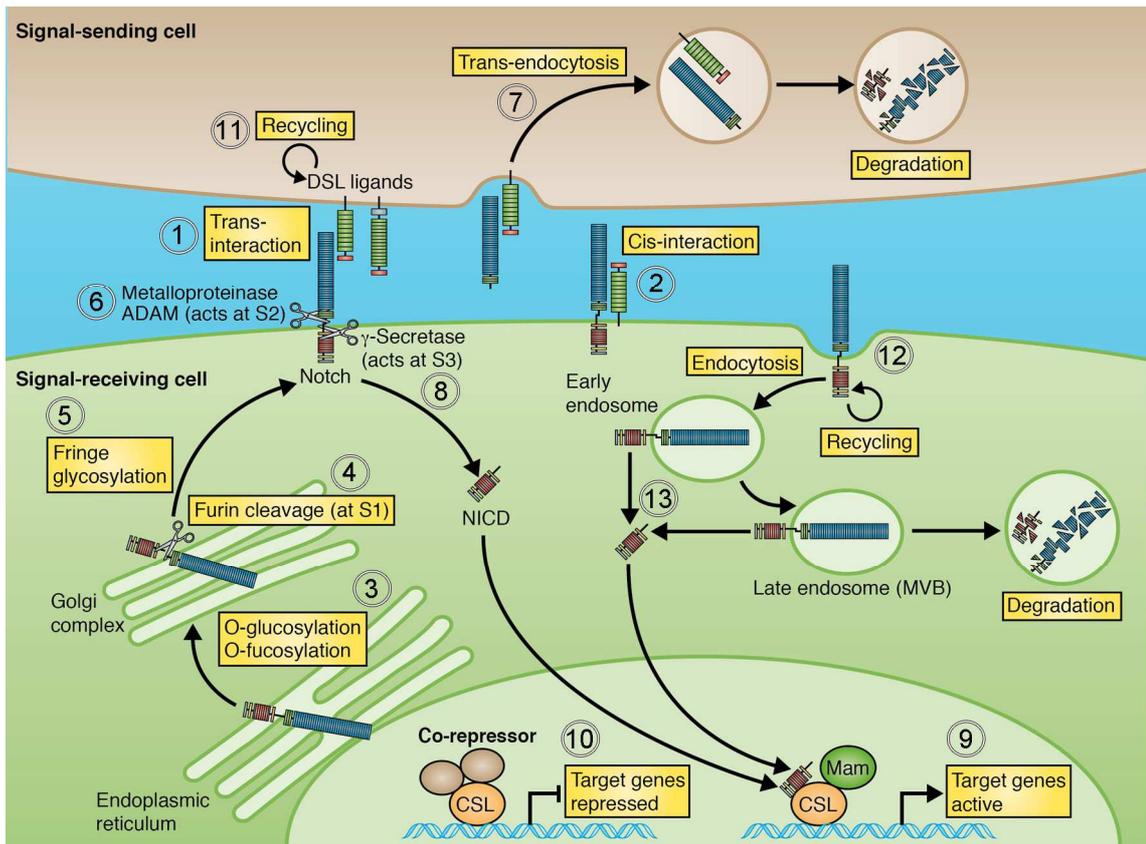


Abb. 1.4: Der Notch-Signalweg. Für die Aktivierung des Notch-Signalweges interagieren der Rezeptor und Ligand zweier benachbarter Zellen miteinander (*trans*-Interaktion) ①. Binden Ligand und Rezeptor in einer Zelle aneinander, wird der Notch-Signalweg inhibiert (*cis*-Interaktion) ②. Nach der Synthese des Notch Rezeptors finden posttranslationale Modifikationen im ER statt ③. Weitere Modifikationen erfolgen im *trans*-Golgi, so wird der Rezeptor Furin-abhängig geschnitten (S1-Schnitt) ④ oder kann z. B. durch Fringe glykosyliert werden ⑤. Anschließend wird der Rezeptor an die Plasmamembran transportiert, wo er direkt mit seinen DSL-Liganden (DSL: Delta/Serrate/LAG-2) interagieren kann ①. Nach der Aktivierung des Rezeptors durch die Bindung des Liganden schneidet die Metalloprotease Kuz den Rezeptor (S2-Schnitt) ⑥. Daraufhin erfolgt eine *trans*-Endocytose der extrazellulären Domäne von Notch (NECD) zusammen mit dem Liganden in die Signal-sending Zelle ⑦. Ein dritter Schnitt des restlichen Notch Rezeptors erfolgt durch den γ -Sekretase-Komplex ⑧. Dadurch transloziert die freiwerdende NICD (Notch intrazelluläre Domäne) in den Nucleus. Dort bindet sie an den Transkriptionsfaktor Su(H), bildet mit den Co-Aktivatoren einen aktiven Transkriptionskomplex und aktiviert so Zielgene von Notch ⑨. Co-Repressoren verhindern die Aktivierung der Zielgene, wenn die NICD abwesend ist ⑩. Durch die E3-Ligasen Neuralized oder Mind bomb werden die Liganden ubiquitiniert, wodurch eine Markierung für die Epsin-abhängige Endocytose erfolgt ⑪. Der Notch Rezeptor wird ständig neu synthetisiert. Damit die Konzentration des Rezeptors an der Plasmamembran konstant gehalten werden kann, wird er endocytiert. Er wird daraufhin entweder recycelt und gelangt an die Plasmamembran zurück oder er wird über den endosomalen Transportweg degradiert ⑫. Defekte des endosomalen Transports können zu einer Liganden-unabhängigen Aktivierung des Notch Rezeptors führen ⑬. (modifiziert nach Hori et al., 2013)

Nach der Synthese wird der Notch Rezeptor während der Exocytose durch Proteinkonvertasen an der S1-Stelle gespalten (S1-Schnitt), wodurch sein Transport

und seine Signalaktivität reguliert wird (Logeat et al., 1998; Gordon et al., 2009) (s. Abb. 1.4 ③). Dadurch entsteht ein Heterodimer, bei dem der extrazelluläre Teil des Notch Rezeptors und die membranständige intrazelluläre Domäne zusammengefügt werden. Diese Interaktion wird über Ca^{2+} vermittelt (Rand et al., 2000). Zudem justieren posttranslationale Modifikationen des Rezeptors und der Liganden den Umfang und den Zeitpunkt der Notch Aktivität und generieren so Kontext-spezifische Signale (Übersicht in Haines und Irvine, 2003). Mögliche posttranslationale Modifikationen sind zum Beispiel Glykosylierungen, welche an den zahlreichen EGF-artigen Wiederholungen in der extrazellulären Domäne des Notch Rezeptors stattfinden (Haines und Irvine, 2003). Zunächst fügt die O-fucosyl Transferase (O-Fut) den ersten Fucoserest an, was essentiell für die Herstellung eines funktionalen Rezeptors ist (s. Abb. 1.4 ④) (Shi und Stanley, 2003; Sasamura et al., 2003; Okajima und Irvine, 2002). O-Fut dient außerdem als eine Art Chaperon und unterstützt die Faltung und den Transport des Notch Rezeptors vom Endoplasmatischen Retikulum zur Plasmamembran (Okajima et al., 2005). Die fucolysierten Stellen können dann weiter modifiziert werden, indem N-Glykane von Glycosyltransferasen angehängen werden (s. Abb. 1.4 ⑤) (Haines und Irvine, 2003). So kann z. B. die Modifikation des Notch Rezeptors durch Fringe, einer Glykosyltransferase, im *trans*-Golgi bewirken, dass Notch präferenziell an Delta bindet (Fleming et al., 1997; Panin et al., 1997).

Nach der Aktivierung des Rezeptors durch die Ligandenbindung wird durch die Endocytose des Liganden die Bindungsstelle für die ADAM-Metalloprotease ADAM10 (Kuzbanian) frei und diese kann die Notch extrazelluläre Domäne (NECD) abspalten (S2-Schnitt) (s. Abb. 1.4 ⑥) (Mumm et al., 2000). Eine Theorie lautet, dass eine Zugkraft auf den Rezeptor wirkt, welche durch die *trans*-Endocytose in die Signal-sende Zelle verursacht wird (s. Abb. 1.4 ⑦) und dass dadurch die negativ regulatorische Region (NRR: negativ regulatory region) in der NECD freigelegt wird (Parks et al., 2000; Sanchez-Irizarry et al., 2004; Wang und Struhl, 2005; Meloty-Kapella et al., 2012). Deswegen kann anschließend der S2-Schnitt, vermittelt durch die Metalloprotease stattfinden. Der Prozess, bei dem die NECD zusammen mit dem Liganden in die Signal-sende Zelle *trans*-endocytiert und darauf folgend aufgebaut wird, wird als „ectodomain-shedding“, also das Abstoßen der extrazellulären Domäne, bezeichnet (Parks et al., 2000). Das Schützen der S2-Schnittstelle ist insofern notwendig, weil dadurch eine liganden-unabhängige Aktivierung des Notch Rezeptors verhindert werden kann (Greenwald und Seydoux, 1990; Sanchez-Irizarry et al., 2004; Gordon et al., 2007).

Von dem ursprünglichen Notch Rezeptor bleibt nunmehr ein in der Membran verankertes Zwischenprodukt der Signal-empfangenden Zelle übrig, welches NEXT (NEXT: Notch extracellular truncation) genannt wird. Dieses wird innerhalb seiner Transmembran-Domäne durch die γ -Sekretase geschnitten (S3-Schnitt) (s. Abb. 1.4 ⑧) (de Strooper et al., 1999; Struhl und Greenwald, 1999) und entlässt die NICD. Der γ -Sekretase-Komplex setzt sich aus Presenilin (Psn), Aph-1, Nicastrin und Pen-2 zusammen (Übersicht in Fortini, 2002).

Die durch den S3-Schnitt freigesetzte NICD transloziert, bedingt durch ihre zwei Kernlokalisierungs-Signale, in den Zellkern (s. Abb. 1.4 ⑨) (Kidd et al., 1998; Struhl und Adachi, 1998). Dort bindet sie an den Transkriptionsfaktor CSL (CSL: CBF1 in Vertebraten, Su(H) in *Drosophila*, Lag1 in *C. elegans*). Dieser ist ein DNA bindender Adapter, der mit vielen Proteinen interagiert, um entweder Repressor- oder Aktivator Komplexe zu bilden. Bindet die NICD an CSL, bilden sie zusammen mit Mastermind (Mam) einen ternären Aktivator Komplex, welcher die Transkription der Notch-Zielgene gewebespezifisch aktiviert (Furriols und Bray, 2000). In Abwesenheit der NICD bildet CSL den oben erwähnten Repressorkomplex und die Expression der Zielgene wird unterdrückt. (s. Abb. 1.4 ⑩) (Morel und Schweisguth, 2000; Furriols und Bray, 2000).

Mehrere Proteine, einschließlich E3 Ubiquitin-Ligasen, wie beispielsweise Deltex und Nedd4, Numb und α -Adaptin regulieren die Konzentration des Notch Rezeptors an der Zelloberfläche (Wilkin et al., 2004; McGill und McGlade, 2003; Jafar-Nejad et al., 2002) (s. Abb. 1.4 ⑪). In der Signal-sendenden Zelle ubiquitinieren E3 Ubiquitin Ligasen (Neuralized und Mindbomb) die intrazelluläre Domäne des Liganden und unterstützen so die Epsin-vermittelte Endocytose (s. Abb. 1.4) (Wang und Struhl, 2005; Le Borgne et al., 2005). Auch das Recycling des Liganden scheint die Akkumulation des Liganden an der Zelloberfläche zu regulieren (s. Abb. 1.4 ⑫) (Shergill et al., 2012).

Die Endocytose ist also nicht nur während der Aktivierung des Notch-Signalweges wichtig, sondern wird auch zur Regulation des Signalweges genutzt. Dabei wird der gesamte Rezeptor endocytiert und er wird entweder zurück zur Plasmamembran recycelt oder über den endosomalen Transportweg abgebaut. Somit kann eine Störung der Endocytose den Notch-Signalweg beeinflussen. Aufgrund dessen führt sowohl der Verlust der ESCRT Funktion als auch der Verlust von Lgd (*lethal (2) giant discs*), welches mit dem ESCRT-III Komplex interagiert, zu einer Liganden-unabhängigen Notch-Aktivierung (s. Abb. 1.4 ⑬) (Vaccari et al., 2008; Vaccari et al., 2009; Childress et al., 2006; Gallagher und Knoblich, 2006; Jaekel und Klein, 2006; Troost et al., 2012).

1.4 Das Tumorsuppressorgen *lethal(2) giant discs* und seine Orthologe

Der Verlust der Funktion von „*lethal (2) giant discs*“ (*lgd*) hat eine Liganden-unabhängige ektopische Aktivierung des Notch-Signalweges zur Folge und agiert somit als ein Regulator von diesem (Childress et al., 2006; Gallagher und Knoblich, 2006; Klein, 2003; Jaekel und Klein, 2006). Als erstes wurde *lgd* von Bryant und Schubinger (1971) beschrieben. Sein Ausfall ist durch eine verlängerte larvale Phase gekennzeichnet, die mit Letalität in einem frühen puppalem Stadium endet (Bryant und Schubinger, 1971). Des Weiteren führt der Verlust zu einem hyperplastischen übermäßigem Wachstum in den Imaginalscheiben, wobei die Integrität der Scheiben erhalten bleibt. Aus diesen Gründen kann Lgd den hypoplastischen

Tumorsuppressorgenen zugeordnet werden (Bryant und Schubiger, 1971). Transheterozygote Tiere, welche Igd^{d7} (amorphes Allel) und Igd^{SH495} (hypomorphes Allel) heterozygot tragen, entwickeln sich bis zum „pharate adult“ Stadium (Jaekel und Klein, 2006). Diese Fliegen weisen einen Borstenverlust auf. Außerdem kommt es zu Duplikationen oder Quadruplikationen von Socketzellen auf Kosten anderer Zellschicksale, sowie zu Venendefekten und ektopischer Bildung von Beingelenken (Jaekel und Klein, 2006). Dieser Phänotyp ist typisch für eine Überaktivierung des Notch-Signalweges (Bang et al., 1991; Bishop et al., 1999; de Celis und Bray, 2000). Des Weiteren führt der Verlust von Lgd zu einer ektopischen Aktivierung von *wingless* (*wg*), einem Zielgen von Notch (Buratovich und Bryant, 1995, 1997; Klein, 2003). Auch mit dem sensitiven Notch-Reportergenkonstrukt *Gbe+Su(H)* (Furriols und Bray, 2001) konnte bei Lgd Verlust eine Aktivierung des Notch-Signalweges in der gesamten Flügelimaginalscheibe beobachtet werden. Dies spricht dafür, dass Lgd in allen Zellen der Imaginalscheiben die Aktivität des Signalweges unterdrückt und nicht nur in Notch abhängigen Prozessen (Jaekel und Klein, 2006).

Der Ausfall von Lgd hat nicht nur Auswirkungen in der Flügelimaginalscheibe, sondern beeinflusst auch die Oogenese. So wird der Notch-Signalweg während der frühen Oogenese ektopisch aktiviert, es entwickeln sich verlängerte Stiele zwischen benachbarten Eikammern sowie einem vorzeitigem Eintritt der Follikelzellen in den Endozyklus. Zudem verdoppelt der Lgd Verlust während der Oogenese die Anzahl der Keimbahnzellen, vermutlich durch eine zusätzliche Mitose, die Anzahl der Nährzellen und der Oozyte bleiben jedoch unverändert (Morawa et al., 2015). Dieser Phänotyp ist unabhängig vom Notch-Signalweg, wird jedoch durch eine ektopische Aktivierung des Dpp-Signalweges bedingt (Morawa et al., 2015). Nicht nur während der Oogenese tritt beim Ausfall von Lgd eine ektopische Aktivierung des Dpp-Signalweges auf, sondern auch in der Flügelimaginalscheibe ist dies zu beobachten (Buratovich und Bryant, 1995, 1997).

In der Flügelimaginalscheibe führt der Ausfall von Lgd zu einer ektopischen Aktivierung des Notch-Signalweges, insofern könnte bei der Überexpression von Lgd erwartet werden, dass die Aktivität des Signalweges vermindert wird. Jedoch zeigt sich abhängig von dem Expressionslevel von Lgd eine Variation des Phänotyps von einer Inaktivierung bis hin zu einer gesteigerten Aktivierung des Notch-Signalweges (Gallagher und Knoblich, 2006; Jaekel und Klein, 2006). Die unerwartete Aktivierung könnte dadurch erklärt werden, dass negative Regulatoren der Aktivität des Signalweges durch eine hohe Konzentration von Lgd heraustritiert werden. Demzufolge würde Lgd nicht alleine die negative Regulation der Aktivität des Notch-Signalweges verursachen, sondern nur durch die Bindung anderer Proteine diese bewirken (Jaekel und Klein, 2006).

Sowohl bei der Überexpression von Lgd als auch bei Lgd Verlust treten vergrößerte intrazelluläre Vesikel auf, welche *Wg*, *DI* und sowohl die extrazelluläre als auch die intrazelluläre Domäne von Notch enthalten. Dies belegt, dass der gesamte Notch Rezeptor in diesen Vesikeln enthalten ist (Jaekel und Klein, 2006; Gallagher und

Knoblich, 2006). Diese sind ebenfalls positiv für die spät endosomalen Marker Spinster und Rab7 (Jaekel und Klein, 2006; Schneider et al., 2013). Notch akkumuliert also bei Verlust oder Überexpression von Lgd in späten endosomalen Kompartimenten. Durch seine Rolle im endosomalen Transportweg könnte Lgd die Aktivität des Notch-Signalweges beeinflussen. Elektronenmikroskopische Aufnahmen belegten, dass die vergrößerten Vesikel in *lgd* mutante Zellen vergrößerte MVBs sind (Schneider et al., 2013). Des Weiteren wurde zuvor nachgewiesen, dass eine gesteigerte Aktivität des Signalweges durch Defekte beim endosomalen Transport des Notch Rezeptors zum Lysosom auftreten kann (Moberg et al., 2005; Thompson et al., 2005; Vaccari und Bilder, 2005). Auch die ektopische Aktivierung des Notch-Signalweges durch Lgd Verlust tritt am Lysosom auf (Schneider et al., 2013). Zudem wird dafür nicht der S2-Schnitt des Notch Rezeptors durch Kuzbanien benötigt. Allerdings ist sie von der γ -Sekretase abhängig, welche die NICD abspaltet, sodass diese in den Nukleus wandern kann, um die Transkription von Notch-Zielgenen zu aktivieren (Schneider et al., 2013). Außerdem ist die Degradation der Rezeptoren durch den endosomalen Transportweg in *lgd* mutanten Zellen verzögert (Schneider et al., 2013).

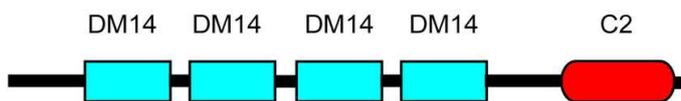


Abb. 1.5: Schematische Darstellung von "lethal (2) giant discs" (Lgd). Lgd besteht aus vier N-terminal gelegenen DM14 Domänen und einer C-terminalen C2 Domäne.

Ein weiteres Indiz, dass Lgd eine Rolle im endosomalen Transportweg hat, ist seine direkte Interaktion mit dem ESCRT-III Protein Shrub (Troost et al., 2012). Diese Interaktion findet über die Bindung von Shrub an die DM14 Domänen von Lgd statt (Troost et al., 2012). Lgd besteht aus 816 Aminosäuren und enthält vier DM14 Domänen und eine C-terminal gelegene C2 Domäne (s. Abb. 1.5) (Childress et al., 2006; Gallagher und Knoblich, 2006; Jaekel und Klein, 2006). Die DM14 Domänen sind einzigartig und nur in Lgd und seinen Orthologen zu finden (Jaekel und Klein, 2006). Ihre Entdeckung erfolgte in *Drosophila melanogaster* in einem Screen zur Identifizierung sich wiederholender Domänen innerhalb einer Polypeptidsequenz (Ponting et al., 2001). Die C2 Domäne vermittelt sowohl Protein-Protein Interaktionen als auch die Bindung von Proteinen an Phospholipide (Übersicht in Nalefski und Falke, 1996). Es wird zwischen Calcium-abhängigen und -unabhängigen Formen der C2 Domänen unterschieden, dabei sind für die Bindung der Calcium-Ionen fünf Aspartatreste wichtig (Ponting und Parker, 1996). Allerdings fehlen in der C2 Domäne von Lgd drei dieser Aspartatreste, von daher scheint diese Domäne Calcium-unabhängig zu sein (Jaekel und Klein, 2006). Lgd ist ein cytoplasmatisches Protein (Jaekel und Klein, 2006; Childress et al., 2006), welches jedoch bei Verlust der C2 Domäne in den Nukleus wandert (Troost et al., 2012). Des Weiteren ist die C2 Domäne auch für die Stabilität des Proteins verantwortlich, Lgd mit deletierter C2 Domäne ist deutlich instabiler als das komplette Lgd (Troost et al., 2012). Mithilfe eines „PIP-

Stripes“, welcher für die Untersuchung der Bindung von Proteinen an Membranen verwendet werden kann, konnte gezeigt werden, dass die C2 Domäne von Lgd für seine Bindung an monophosphoryliertes Phosphatidylinositol benötigt zu werden scheint (Gallagher und Knoblich, 2006). Auch konnte für das humane Lgd Ortholog hLGD2 in einem *in vitro* Phospholipid Bindungsassay gezeigt werden, dass die C2 Domäne an die neuronale Plasmamembran bindet und könnte dort als ein wichtiger Regulator des cAMP/PKA Signalweges dienen (Al-Tawashi et al., 2012). Jedoch konnte *in vivo* keine Bindung von Lgd an Membranen festgestellt werden (Troost et al., 2012). Möglicherweise ist nur ein geringer Teil von Lgd mit Membranen assoziiert, welcher nicht in einer Antikörperfärbung nachgewiesen werden kann.

Lgd ist ein hoch konserviertes Protein, das von den Schleimpilzen bis zum Menschen konserviert ist (Jaekel und Klein, 2006). Zudem gibt es bei Vertebraten eine zweite Lgd-Variante, welche eine Verlängerung im C-Terminus hinter der C2 Domäne aufweist. Den Lgd-Orthologen LGD1 und LGD2 in Vertebraten werden diverse Funktionen zugeschrieben. Die Orthologe wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen je nach ihrer Funktion unterschiedlich benannt, so wird LGD1 auch CC2D1B und Freud-2 genannt und LGD2 ist auch unter den Namen CC2D1A, TAPE, Freud-1 und Aki-1 bekannt. Zur besseren Klarheit werden die alternativen Namen der Lgd-Orthologen im Folgenden in Klammern angezeigt.

Zunächst wurde das Gen *LGD2* (CC2D1A: „coiled-coil and conserved region 2 (C2) domain containing 1A“) in einer Studie zur Identifizierung und Charakterisierung von Genen, welche den NF- κ B- und den MAPK Signalweg aktivieren, entdeckt (Matsuda et al., 2003). Seine Expression verursachte eine gesteigerte Transkription eines NF- κ B Luciferase-Reportergens. LGD2 aktiviert NF- κ B durch den kanonischen Signalweg, bei dem die Inhibitoren von NF- κ B degradiert werden, damit NF- κ B aktiviert werden kann (Zhao et al., 2010) (s. Abb. 1.6 ①). NF- κ B reguliert Prozesse, wie beispielsweise das Überleben der Zellen, die Entzündungsreaktion oder auch die Immunantwort. So ist LGD2 (TAPE: TBK-1 associated Protein in Endolysosomes) an der Regulation des TLR3-, TLR4- sowie des RIG-I-Signalweges beteiligt und spielt somit eine Rolle in der angeborenen Immunantwort (Chang et al., 2011; Chen et al., 2012). TLR3 gehört zu der Gruppe der endosomalen TLRs („Toll-like receptors“) und erkennt virale doppelsträngige RNA. TLR4 hingegen ist ein Zelloberflächen-TLR und detektiert hauptsächlich Liposaccharide von Gram-negativen Bakterien (Übersicht in Takeuchi und Akira, 2010). Beide Signalwege sind TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β) abhängig. Dabei vermittelt TRIF die Signalweiterleitung, welche durch eine Bindung der Liganden an die TLRs ausgelöst wurde, in dessen Folge der NF- κ B Signalweg aktiviert wird und in einer IFN- β (Interferon- β) Ausschüttung resultiert (Übersicht in Takeuchi und Akira, 2010). Ein Modell postuliert, dass LGD2 aufwärts von TRIF wirkt und möglicherweise in einem Komplex mit TRIF zusammen die Signalweiterleitung an den Endosomen reguliert und so die Immunantwort steuert (Chang et al., 2011). Auch in der Immunantwort, welche über den RIG-I-Signalweg erfolgt, scheint LGD2 eine Rolle zu spielen (Chen et al., 2012). Die RIG-I-like

Rezeptoren erkennen virale RNA und sind cytoplasmatisch lokalisiert (Übersicht in Takeuchi und Akira, 2010). Bei Verlust oder Herunterregulation von LGD2 verringert sich während einer Virusinfektion die Cytokin Produktion und antivirale Immunantwort. LGD2 scheint der erste angeborene Immunregulator zu sein, der sowohl den TLR als auch den RLR Signalweg an einem frühen Schritt reguliert (Chen et al., 2012) (s. Abb. 1.6 ②).

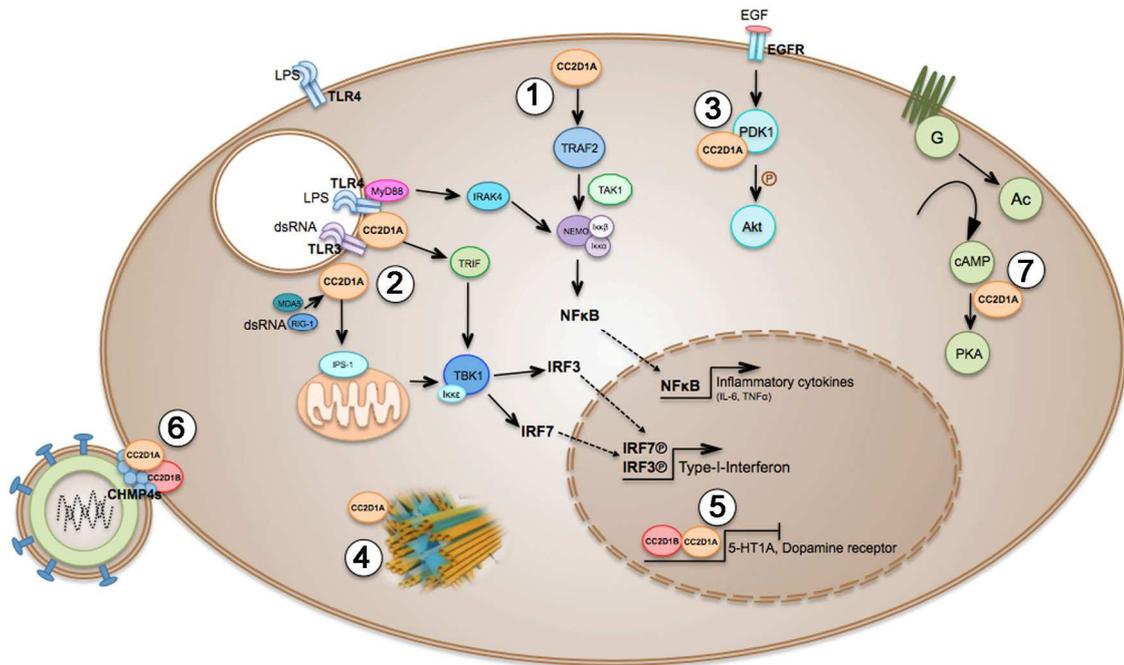


Abb. 1.6: Die Funktionen von LGD1 und LGD2. Eine Beteiligung von LGD2 wurde an diversen Prozessen beobachtet. So aktiviert es den kanonischen NF-κB Signalweg ①, agiert mit Mitgliedern des angeborenen Immunsystems ② und als Adaptorprotein im Akt Signalweg ③. Außerdem spielt es eine essentielle Rolle in der Abspaltung der Zentriolen während der Zellteilung ④ und reprimiert die Expression des Serotonin-1A- und Dopamin-Rezeptors ⑤. Zudem reguliert LGD2 die Abknospung von Viren, die aus der Zelle durch Interaktion mit den CHMP4s austreten ⑥ sowie die Synapsenplastizität durch Beteiligung am cAMP/PKA Signalweg ⑦ LGD1 wirkt ebenfalls als Repressor des Serotonin-1A Rezeptors ④ und als Regulator des Virenaustritts aus der Zelle durch die Interaktion mit CHMP4s ⑥. (modifiziert aus Tveriakhina, 2013)

Des Weiteren soll LGD2 (Aki1: Akt kinase-interacting protein 1) auch eine Rolle im PI3K/PDK/Akt Signalweg spielen und dort als ein Gerüstprotein fungieren (Nakamura et al., 2008). Die Expression von LGD2 induziert die PDK1/Akt Komplexbildung und reguliert die Akt Aktivierung (Nakamura et al., 2008). Nach Stimulation mit EGF assoziiert LGD2 zudem auch mit EGFR. Das dazugehörige Model postuliert, dass LGD2 an PDK1 gebunden ist und mit EGFR einen Komplex bildet, nachdem der Rezeptor durch die Bindung von EGF aktiviert wurde. LGD2 bindet dann an Akt und könnte so die Phosphorylierung von Akt durch PDK1 erleichtern (Nakamura et al., 2008). Dadurch, dass LGD2 in dem PI3K/PDK1/Akt Signalweg involviert ist, ist es an der Regulation diverser Funktionen, wie das Überleben der Zelle und den Fortschritt des Zellzyklus beteiligt. So konnte zudem in einem Mausmodell für Lungenkarzinome,

bei dem EGFR mutiert ist, nachgewiesen werden, dass eine Herunterregulation von LGD2 das Tumorwachstum hemmt (Yamada et al., 2013) (s. Abb. 1.6 ③).

Neben der Beteiligung von LGD2 bei der Regulation von Signalwegen, übt LGD2 vermutlich zusätzlich eine Funktion während der Zellteilung aus. Dabei ist LGD2 (Aki1) mit Zentrosomen assoziiert und reguliert die Zentriolen-Kohäsion. LGD2 könnte die Spindelpol-Lokalisation von Scc1, einer Untereinheit von Cohesin, regulieren und somit die Zentriolen-Kohäsion bis zum Beginn der Anaphase aufrechterhalten, wodurch ein vorzeitiges Trennen der Zentriolen verhindert wird (Nakamura et al., 2009). Die Phosphorylierung von LGD2 durch den CyclinB1-cdk1-Komplex vermittelt die Komplexbildung von LGD2 mit Scc1. Mit Eintritt der Zelle in die Anaphase wird LGD2 dephosphoryliert. Anscheinend übt LGD2 eine noch nicht näher charakterisierte Funktion an dem Übergang von der Metaphase in die Anaphase während der Zellteilung aus (Nakamura et al., 2010) (s. Abb. 1.6 ④).

Zudem zeigten Experimente mit Zelllinien aus Ratten, dass sowohl LGD1 (Freud-2: „five’ repressor element under dual repression binding protein-2“) als auch LGD2 (Freud-1) anscheinend als Transkriptionsfaktor fungieren (Ou et al., 2003; Hadjighassem et al., 2009). Dabei unterdrücken beide Proteine die basale Transkription des Serotonin-1A-Rezeptors, indem sie an eine spezielle regulatorische DRE-Region binden (Ou et al., 2003; Hadjighassem et al., 2009). Die DRE („dual repressor element“-)Region besteht aus den Teilelementen FRE („five prime repressive element“) und TRE („three prime repressive element“), wobei LGD2 eher an FRE (Ou et al., 2003) und LGD1 eher an das TRE Teilelement bindet (Hadjighassem et al., 2011). Eine Untersuchung depressiver Patienten konnte zeigen, dass eine Reduktion der LGD2 Proteinexpression im präfrontalen Kortex mit einem frühen Einsetzen der Depression assoziiert ist (Szewczyk et al., 2010).

Der Serotonin-1A-Rezeptor fungiert als ein somatodendritischer Autorezeptor und inhibiert nach seiner Aktivierung die serotonerge Neurotransmission (Riad et al., 2001 Übersicht in Piñeyro und Blier, 1999). Die Entstehung von schweren Depressionen und Angstzuständen wird unter anderem durch eine verminderte Ausschüttung von Serotonin verursacht. Dies wird auch dadurch unterstützt, dass eine gesteigerte Expression von Serotonin-1A Autorezeptoren, welche die Serotonin Ausschüttung negativ regulieren, zu Depressionen führen kann (Drevets et al., 2007). LGD2 reguliert nicht nur die Serotonin Ausschüttung über den Serotonin-1A-Rezeptor, sondern auch die Dopamin Neurotransmission durch die negative Regulation des Dopamin-D2 Rezeptors (Rogaeva et al., 2007) (s. Abb. 1.6 ⑤). Eine Zunahme von Dopaminrezeptoren oder eine dopaminerge Hyperaktivität können Schizophrenie auslösen, wobei diese Hypothese kontrovers diskutiert wird (Moncrieff, 2009).

Zudem könnte LGD2 wie auch Lgd eine Funktion während des endosomalen Transportes ausüben, da LGD2 (CC2D1A) mit CHMP4B, einem Shrub-Ortholog, interagiert. CHMP4B ist ein ESCRT-III Protein und wird unter anderem für die Abschnürung der ILVs in die MVBs benötigt, aber auch Retroviren nutzen ESCRT

Komponenten wie CHMP4B für den Austritt aus der Wirtszelle (Carlton und Martin-Serrano, 2007; Henne et al., 2011). Durch die Interaktion von LGD2 mit CHMP4B wird die Abknospung von HIV aus der Wirtszelle inhibiert, da CHMP4B seine Funktion nicht mehr ausüben kann (Usami et al., 2012). LGD2 bindet über seine DM14 Domänen CHMP4B und reguliert so die Polymerisierung von CHMP4B (Usami et al., 2012). Neben LGD2 interagiert auch LGD1 (CC2D1B) direkt mit CHMP4B (Usami et al., 2012; Martinelli et al., 2012). Möglicherweise dienen die LGDs als Adapterproteine für CHMP4B. Sie können CHMP4B nur binden, wenn dieses unpolymerisiert vorliegt. Eventuell verhindert die Bindung von Lgd sterisch die Polymerisation von CHMP4B im Cytoplasma (Martinelli et al., 2012) (s. Abb. 1.6 ©).

Die zuvor beschriebenen Funktionen von LGD2 beruhen auf *in vitro* Experimenten. *In vivo* konnte beobachtet werden, dass *Lgd2* defiziente Mäuse kurz nach der Geburt sterben, möglicherweise durch einen Atmungsdefekt. Es wird angenommen, dass LGD2 für die funktionale Reifung von Synapsen benötigt wird (Zhao et al., 2011). LGD2 bindet *in vitro* an mehrere Komponenten des cAMP/PKA-Signalweges und wirkt beim Entlassen der katalytischen Untereinheit von der regulatorischen Untereinheit der Proteinkinase A mit (Al-Tawashi et al., 2012). Dabei reguliert LGD2 den cAMP/PKA-Signalweges, indem es an der Feinabstimmung der negativen Rückkopplungsschleife beteiligt ist, welche über die PKA PDE4D Aktivierung agiert (Al-Tawashi und Gehring, 2013). Dieser Signalweg reguliert die Synapsenplastizität, das Lernen und das Gedächtnis (Abel et al., 1997; Nguyen und Woo, 2003) Dies zeigt, dass LGD2 an wichtigen Prozessen im Gehirn beteiligt ist (s. Abb. 1.6 ©).

So führt auch eine Mutation in *hLGD2* (CC2D1A), zu einer autosomal rezessiven, nicht syndromischen mentalen Retardierung (NSMR). Diese zeichnet sich dadurch aus, dass die Patienten grundsätzlich eine verzögerte mentale Entwicklung haben. Sie besitzen nur eine kurze Aufmerksamkeitsspanne, eine unverständliche Sprache und einen Intelligenzquotienten unter 70 (American Psychiatric Association, 2000). Die Patienten mit NSMR weisen keine schwerwiegenden physischen Abnormalitäten, Dysmorphismen oder neurologischen Abnormalitäten auf. Es wird vermutet, dass gestörte biologische Prozesse, welche an der neuronalen Differenzierung und synaptischer Plastizität, sowie an dem synaptischen Vesikeltransport und der Regulation der Genexpression beteiligt sind, eine Ursache der mentalen Retardierung sein könnten (Renieri et al., 2005).

Die NSMR, welche durch eine Mutation in *hLGD2* ausgelöst wird, tritt in einer isolierten Population in Israel auf (Basel-Vanagaite et al., 2007). Das mutierte *hLGD2* Allel hat eine Deletion von 3589 Nukleotiden, welche in Intron 13 anfängt und in Intron 16 aufhört. Dies führt zu einer Leserasterverschiebung direkt nach der dritten DM14 Domäne, welches ein Nonsense Peptid von 30 Aminosäuren mit einem vorzeitigen Stoppkodon generiert. Das entstehende Protein besitzt also nach der dritten DM14 Domäne ein 30 Aminosäuren langes Nonsense-Peptid auf das ein Stoppkodon folgt (Basel-Vanagaite et al., 2006). Es ist bisher noch unklar, wie die Mutation von *hLGD2* die nicht-syndromische mentale Retardierung auslöst.

1.5 Ziele der Arbeit

Die beschriebenen Funktionen der hLGDs sind sehr divers und beruhen zumeist auf *in vitro* Daten. So scheint hLGD2 an zahlreichen verschiedenen Prozessen in der Zelle beteiligt zu sein, wie zum Beispiel als Adapterprotein im NF- κ B-Signalweg (Zhao et al., 2010; Zhao et al., 2011) oder während der Zellteilung bei der Zentriolentrennung (Nakamura et al., 2009). Für Lgd aus *Drosophila melanogaster* wurde gezeigt, dass es mit dem ESCRT-III Protein Shrub interagiert und am endosomalen Transportweg beteiligt ist (Troost et al., 2012). Diese Funktion wurde im Säuger noch nicht näher untersucht. Allerdings ist auch hier bekannt, dass die hLGDs mit den Shrub Orthologen CHMP4A-C interagieren (Tsang et al., 2006; Usami et al., 2012). Zudem führt eine Herunterregulation von hLGD2 zu einer verringerten EGF (epidermal growth factor)- und TF (Transferrin)- Endocytose (Collinet et al., 2010). Die Charakterisierung der hLGDs und deren Relevanz im Bezug auf den endosomalen Transportweg zu ermitteln, kann helfen das Bild des endosomalen Transportes weiter zu vervollständigen, beziehungsweise der Wirkungsweise der ESCRT-Komplexe, zu formen. Da Defekte im endosomalen Transportweg zu zahlreichen Krankheiten führen, kann ein besseres Verständnis für diesen helfen die Ursachen der Krankheiten zu finden und diese zu behandeln.

In dieser Arbeit sollen deshalb zunächst grundlegende Eigenschaften

- (1) der humanen LGDs im Hinblick auf ihre funktionale Konservierung, sowie ihre Lokalisation und ihre Stabilität in *Drosophila melanogaster* analysiert werden. Zudem erfolgt
- (2) eine Analyse der hLGDs in humanen Zellen vor allem in Bezug auf den endosomalen Transportweg. Des Weiteren soll durch diese Analysen
- (3) Aufschluss über die Funktion der DM14 und C2 Domänen,
- (4) sowie über mögliche Unterschiede zwischen hLGD1 und hLGD2 erlangt werden.
- (5) Des Weiteren soll eine Mutation von *hLGD2*, welche beim Menschen eine nicht-syndromische autosomal rezessive mentale Retardierung auslöst in dieser Arbeit näher hinsichtlich ihrer Funktionalität, Lokalisation, Stabilität und ihren Effekt auf den endosomalen Transport charakterisiert werden. Dieses erfolgt sowohl in *Drosophila melanogaster*, proteinbiochemisch als auch in humanen Zellen. Diese Analysen könnten sowohl Aufschluss über die Natur des Allels als auch Einblicke in die Ursache der mentalen Retardierung geben, die durch die Mutation in *hLGD2* ausgelöst wird.

2 Ergebnisse

2.1 Vergleich der Aminosäuresequenzen der Lgd-Familie

Die humanen LGDs (hLGD) gehören einer konservierten Proteinfamilie an. Die Lgd-Orthologen, hLGD1 und hLGD2, besitzen wie auch Lgd vier DM14 Domänen und eine C-terminal gelegene C2-Domäne. hLGD2 unterscheidet sich von hLGD1 durch eine Verlängerung des C-terminalen Bereichs (Jaekel und Klein, 2006).

Bisher wurden nur die Aminosäuresequenzen der hLGDs mit Lgd verglichen. Ein Vergleich untereinander fehlte bislang. Für den Sequenzvergleich der Aminosäuren wurde auf der Internetseite von EMBL-EBI der Needleman-Wunsch Algorithmus verwendet, welcher die Aminosäuresequenz der kompletten Proteine hinsichtlich des Prozentsatzes der Übereinstimmung miteinander vergleicht (EMBL-EBI).

Da die humanen LGDs auch in *Drosophila melanogaster* analysiert werden sollten, wurden sie zunächst mit Lgd aus *D. melanogaster* verglichen. hLGD1 ist zu 35% identisch und zu 54% ähnlich zu Lgd. hLGD2 hingegen ist nur zu 30% identisch und zu 45% ähnlich zu Lgd. Demzufolge ist wie erwartet hLGD1 dem Lgd ähnlicher als hLGD2, da hLGD2 einen verlängerten C-Terminus besitzt (s. Abb. 2.1). Auch Jaekel und Klein (2006) haben bei einem Sequenzvergleich eine Identität von 34% von hLGD1 zu Lgd festgestellt, sowie eine Ähnlichkeit von 63%. Der Sequenzvergleich von hLGD2 mit Lgd zeigte, dass sie Sequenzen zu 29% identisch und zu 49% ähnlich sind (Jaekel und Klein, 2006). Die geringen Unterschiede in den Prozentangaben resultieren aus der Verwendung eines anderen Algorithmus, der Jones-Taylor-Thornton Matrix.

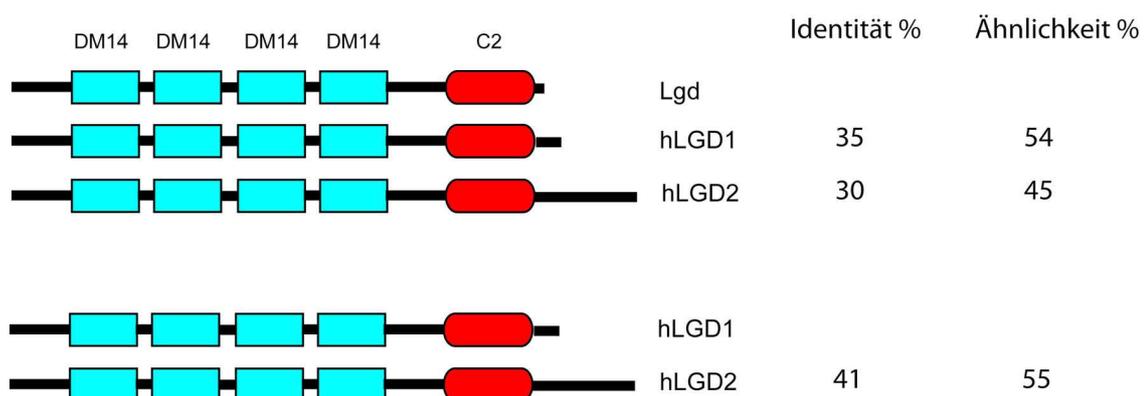


Abb. 2.1: Sequenzvergleich der hLGDs und Lgd. Schematische Darstellung der Proteine mit Prozentangabe der identischen und ähnlichen Aminosäuren. Die Analyse der Sequenzen erfolgte auf der EMBL-EBI Internetseite nach dem Needleman-Wunsch Algorithmus (EMBL-EBI).

Der Vergleich von hLGD1 mit hLGD2 zeigt, dass die Sequenz zu 41% identisch ist und eine Ähnlichkeit von 55% aufweist. Damit ist die Ähnlichkeit von hLGD1 zu hLGD2 genauso stark ausgeprägt wie die von hLGD1 zu Lgd (s. Abb. 2.1).

2.2 Struktur und Funktionsanalyse von hLGD1 und hLGD2

Ein Großteil der bisher veröffentlichten Ergebnisse von hLGD1 und hLGD2 beruhen auf proteinbiochemischen und Zellkultur-Daten. Es wurden bislang nur wenige Experimente *in vivo* durchgeführt. Der zuvor durchgeführte Sequenzvergleich belegte eine konservierte Aminosäuresequenz zwischen den hLGDs und ihrem Ortholog aus *Drosophila melanogaster* (s. Kap. 2.1). Um zu analysieren, ob diese Konservierung nicht nur strukturell sondern auch funktional ist, wurden die hLGDs in dieser Arbeit zunächst im Modellorganismus *Drosophila melanogaster* untersucht. Dazu wurde eine Struktur-/Funktionsanalyse durchgeführt, in der verschiedene Domänen der Proteine deletiert und im Anschluss auf ihre Funktionalität überprüft wurden.

Eine zuvor durchgeführte Überexpression der murinen Orthologe von Lgd, mLGD1 und mLGD2, in der Flügelimaginalscheibe wies nach, dass diese das *Drosophila* Lgd funktional ersetzen können (Jaekel und Klein, 2006). Allerdings führte eine weitergehende Struktur-/Funktionsanalyse von Lgd mittels des GAL4/UAS-Systems zu widersprüchlichen Ergebnissen (Troost, 2007), welche daraus resultierten, dass sowohl die Überexpression als auch der Funktionsverlust von Lgd zu einer ektopischen Notch-Aktivierung führen (Jaekel und Klein, 2006).

Aus diesem Grund wurde ein System verwendet, welches eine Expression der Konstrukte auf annähernd endogenem Level ohne Positioneffekte ermöglicht. Dazu wurden je circa 550 bp der flankierenden „upstream“ und „downstream“ genomischen Regionen des *lgd* Locus als regulatorische Einheiten verwendet (im Folgenden *lgdP* genannt). Diese Sequenz ist Teil eines genomischen Rettungskonstruktes, welches zusätzlich die genomische Transkriptionseinheit von Lgd enthielt. Dieses Konstrukt war ausreichend, um den *lgd* mutanten Phänotyp zu retten (Childress et al., 2006; Troost et al., 2012). Damit keine Positioneffekte die Ergebnisse verfälschen, wurde außerdem das attB/attP System für die Transgenese verwendet. Dies erlaubt eine zielgerichtete Insertion der Transgene in das Genom und somit eine gleichstarke Expressionsstärke der Konstrukte (Bischof et al., 2007) (s. Kap. 5.2.8.3). Eine Analyse des „full length“ Lgd mittels Western Blots unter Kontrolle des *lgdP* zeigte, dass dessen Expression im Vergleich zum endogenen Lgd nur halb so stark ist. Die Expression des „full length“ Lgd unter Kontrolle des *lgdP* zeigte dennoch eine vollständige Rettung des *lgd* mutanten Phänotyps. Die Fliegen sind adult und fertil (Troost et al., 2012).

In diesem zuvor beschriebenen System wurden die hLGDs und ihre Deletionskonstrukte exprimiert. Alle in dieser Arbeit verwendeten hLGD Konstrukte wurden in die attP86Fb Insertionsstelle integriert, welche auf dem rechten Arm des dritten Chromosoms lokalisiert ist. Die zunächst untersuchten Konstrukte sind in Abbildung 2.2 dargestellt.

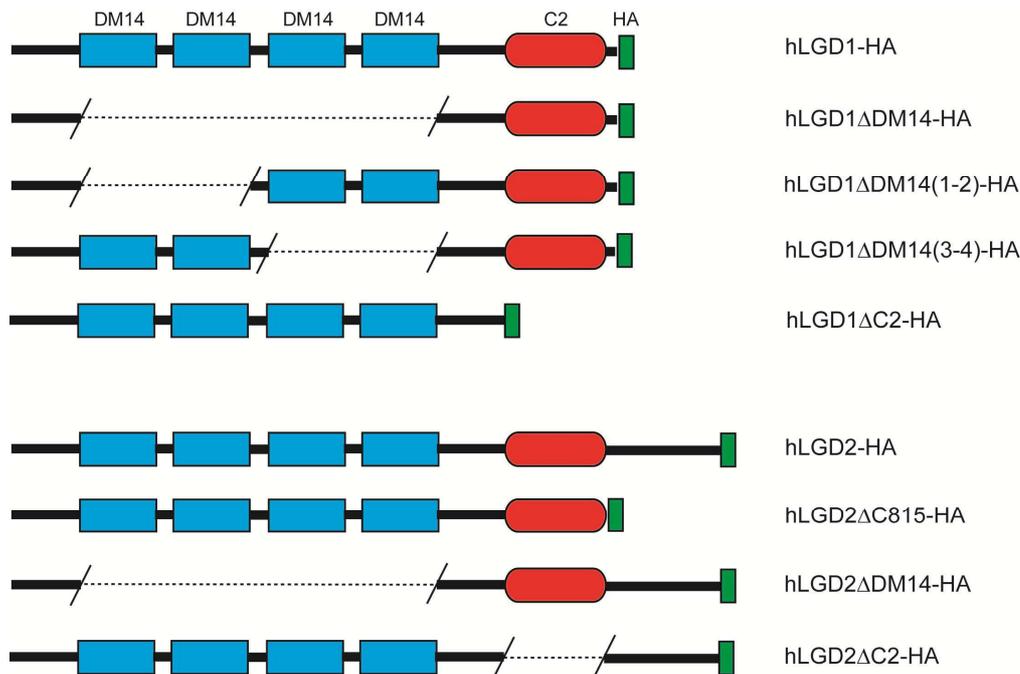


Abb. 2.2: Schematische Darstellung der hLGDs und ihrer Deletionskonstrukte. Die hLGDs bestehen aus vier DM14 Domänen und einer C2 Domäne. Bei den Deletionskonstrukten wurden einzelne Domänen deletiert, um ihre mögliche Funktion zu untersuchen.

2.2.1 hLGD1 und hLGD2 sind funktional konserviert

Die Analyse der funktionalen Konservierung der humanen LGDs erfolgte *in vivo* in *Drosophila melanogaster*. Dazu wurden Rettungsexperimente im amorphen Hintergrund des Allels *Igd^{d7}* in Flügelimaginalscheiben des dritten Larvenstadiums durchgeführt. Der Ausfall von Lgd führt zur Letalität in einem frühen puppalen Stadium. Außerdem kommt es zu einer ektopischen Aktivierung des Notch-Signalweges, welche gut durch die ektopische Expression des Notch Zielgens *Wingless (Wg)* dargestellt werden kann (Bryant und Schubiger, 1971); (Klein, 2003). Um eine Aussage über die Rettung des *Igd^{d7}* Phänotyps machen zu können, wurde sowohl die *Wg* Expression als auch die Expression des Notch-Reportergenkonstrukts *Gbe+Su(H)-lacZ* untersucht.

In wildtypischen Flügelimaginalscheiben befindet sich die Notch abhängige *Wingless*-Expressionsdomäne in einem zwei-Zell breiten Streifen entlang der dorso-ventralen (D/V) Grenze der Flügelimaginalscheibe (s. Abb. 2.3 A zwischen den weißen Pfeilen und in größerer Vergrößerung in Abb. 2.3 E, I). Zusätzlich wird *Wg* in zwei Kreisen entlang des Flügelfeldes und in einem breiten Streifen im Notum exprimiert (s. Abb. 2.3 A). Diese Expression ist allerdings von Notch unabhängig (Klein, 2001). Zusätzlich wird die Notchaktivität durch das sensitivere Reportergenkonstrukt *Gbe+Su(H)-lacZ* dargestellt (s. Kap. 5.2.8.5) (Furriols und Bray, 2001). Dabei wird die Aktivität von Notch in der gesamten Flügelimaginalscheibe angezeigt und nicht nur entlang der dorso-ventralen Grenze (s. Abb. 2.3 A und in größerer Vergrößerung in Abb. 2.3 E, M). Die Expressionsdomänen des Reporterkonstrukts welche orthogonal zu der D/V-Grenze im Flügelfeld verlaufen, kennzeichnen die Bereiche, in denen im adulten Flügel die Flügelvenen gebildet werden (Übersicht in de Celis, 2003).

Bei Lgd Ausfall hingegen ist der Wg exprimierende Streifen an der D/V Grenze stark verbreitert (s. Abb. 2.3 B zwischen den weißen Pfeilen und in höherer Vergrößerung in Abb. 2.3 F, J). Und auch der sensitivere Notch Reporter Gbe+Su(H)-lacZ ist in der ganzen Flügelimaginalscheibe aktiviert (s. Abb. 2.3 B zwischen den weißen Pfeilen und in höherer Vergrößerung in Abb. 2.3 F, N). Zudem ist bei dem Vergleich zwischen den Flügelimaginalscheiben in Abbildung 2.3 A zu 2.3 B eine Überproliferation der Scheibe in Abbildung 2.3 B zu beobachten.

Um die funktionale Konservierung der hLGDs zu analysieren, wurden die Konstrukte *IgdP hLGD1-HA* und *IgdP hLGD2-HA* verwendet. In dem Rettungsexperiment liegen die Konstrukte nur in einer Kopie vor.

Bei der Rettung des *Igd* mutanten Phänotyps sowohl mit hLGD1-HA (s. Abb. 2.3 C) als auch mit hLGD2-HA (s. Abb. 2.3 D) erscheint die Wingless Expressionsdomäne wildtypisch. Allerdings zeigt sich bei der Rettung mit hLGD2-HA in der höheren Vergrößerung eine leichte ektopische Wingless Expression (s. Abb. 2.3 L, gelber Pfeil). Außerdem ist Gbe+Su(H)-lacZ bei dem Rettungsexperiment mit *IgdP hLGD2-HA* (s. Abb. 2.3 P) im Vergleich zum Wildtyp (s. Abb. 2.3 M) oder zu der Rettung mit hLGD1-HA (s. Abb. 2.3 O) stärker aktiviert. Die Rettung mit *IgdP hLGD2-HA* ist also nicht vollständig. Zudem schlüpfen keine adulten Tiere, selbst wenn zwei Kopien von *IgdP hLGD2-HA* vorliegen. Diese Tiere sterben schon als „pharate adults“ in der Puppe. Hingegen scheint die Rettung des *Igd* mutanten Phänotyps mit *IgdP hLGD1-HA* vollständig zu sein, da selbst wenn nur eine Kopie vorhanden ist, fertile Tiere schlüpfen.

Die humanen Orthologe von Lgd sind also funktional konserviert, wobei hLGD1 stärker konserviert ist als hLGD2. Dieses Ergebnis wird auch durch die Sequenzanalyse in Kapitel 2.1 unterstützt. Da die Verlängerung des C-Terminus von hLGD2 die geringere Funktionalität in *Drosophila melanogaster* verursachen könnte, wird dies im nächsten Kapitel näher untersucht.

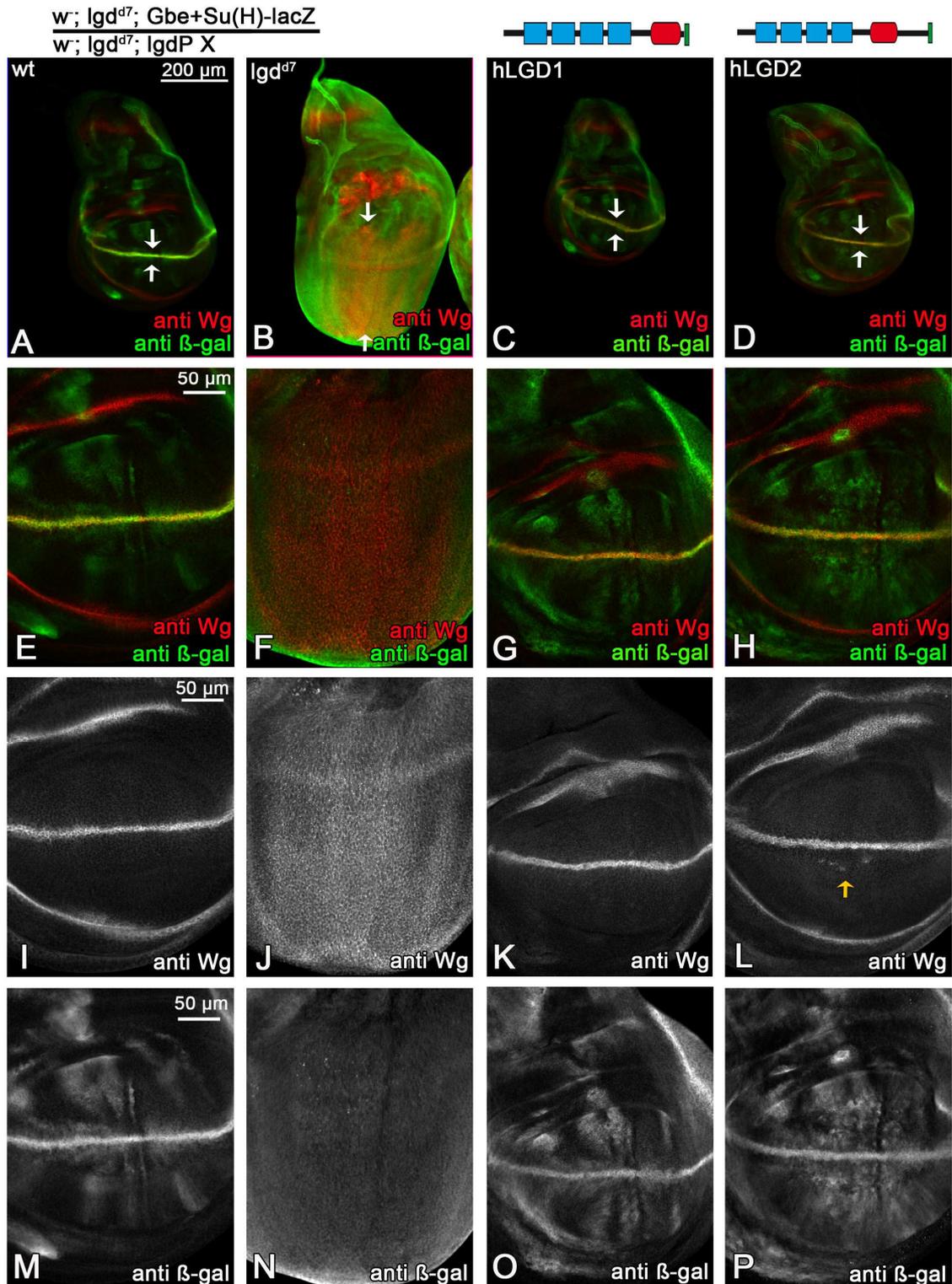


Abb. 2.3: Rettung des *lgd* mutanten Phänotyps durch die Expression von *lgdP hLGD1-HA* und *lgdP hLGD2-HA*. A-H: Antikörperfärbungen von Flügelimaginalscheiben im *lgd* mutanten Hintergrund gegen das Protein Wingless (rot) und die β -Galaktosidase (grün) zur Darstellung der Aktivität des Notch Signalweges. A-D: weiße Pfeile kennzeichnen die Grenzen der Wingless Expressionsdomäne. E-H: Aktivität des Notch Signalweges im Flügel Feld in höherer Vergrößerung. Die erste Spalte zeigt die Aktivität des Notch Signalweges in wildtypischen Flügelimaginalscheiben. In der Spalte rechts daneben ist die Aktivierung des Notch Signalwegs einer *lgd* mutanten Scheibe dargestellt. Oberhalb der Spalten, in denen die Flügelimaginalscheiben der Rettungsexperimente gezeigt werden, sind die exprimierten Rettungskonstrukte schematisch skizziert. Alle Konstrukte stehen unter Kontrolle des *lgdP* und

sind an der Position attP86Fb im Genom inseriert. Der Genotyp des Rettungsexperiments steht oben links in der Abbildung. C, G, K, O: die Expression von hLGD1-HA zeigt eine wildtypische Aktivierung des Notch Signalweges. D, H, L, P: die Expression von hLGD2-HA führt zu einer annähernd wildtypischen Aktivierung des Notch Signalweges, wobei in L und P eine leicht ektopische Aktivierung zu beobachten ist (gelber Pfeil). hLGD1 und hLGD2 sind funktional konserviert.

2.2.2 Die C-terminale Verlängerung von hLGD2 verschlechtert dessen Funktionalität in *Drosophila melanogaster*

Um zu überprüfen, ob der verlängerte C-Terminus von hLGD2-HA der Grund für eine schlechtere Funktionalität in *Drosophila melanogaster* ist, wurde ein Konstrukt (*IgdP hLGD2ΔC815-HA*) ohne diese Verlängerung hergestellt und damit das Rettungsexperiment durchgeführt (s. Abb. 2.2).

In dem Rettungsexperiment mit *IgdP hLGD2ΔC815-HA* ist die Wingless (Wg) Expressionsdomäne annähernd wildtypisch. Allerdings zeigt sich, wie bei der Rettung mit dem Konstrukt *IgdP hLGD2-HA*, (s. Abb 2.4 K) in der höheren Vergrößerung eine leichte ektopische Expression von Wg (s. Abb 2.4 L, gelber Pfeil). Zudem ist Gbe+Su(H)-lacZ stärker aktiviert als in wildtypischen Flügelimaginalscheiben (s. Abb 2.4 L im Vergleich zu M). Der Notch-Signalweg wird also ektopisch aktiviert und hLGD2ΔC815-HA kann das endogene Lgd nicht vollständig funktional ersetzen. Wenn das Konstrukt im *Igd* mutanten Hintergrund in zwei Kopien vorliegt, sterben die Tiere, ebenso wie Tiere mit zwei Kopien von *IgdP hLGD2-HA*, als „pharate adults“.

Das endogene Lgd kann also funktional weder von hLGD2ΔC815-HA noch von hLGD2-HA vollständig ersetzt werden. Wenn hLGD2ΔC815-HA im *Igd* mutanten Hintergrund exprimiert wird, konnte nicht nachgewiesen werden, dass der verlängerte C-Terminus von hLGD2 einen Einfluss auf die Funktion des Proteins in *Drosophila melanogaster* hat. Dennoch zeigen diese Ergebnisse, dass beide Proteine so stark konserviert sind, dass sie immer noch eine Teilfunktion von Lgd übernehmen können und sich die Tiere bis zum „pharate adult“ Stadium entwickeln.

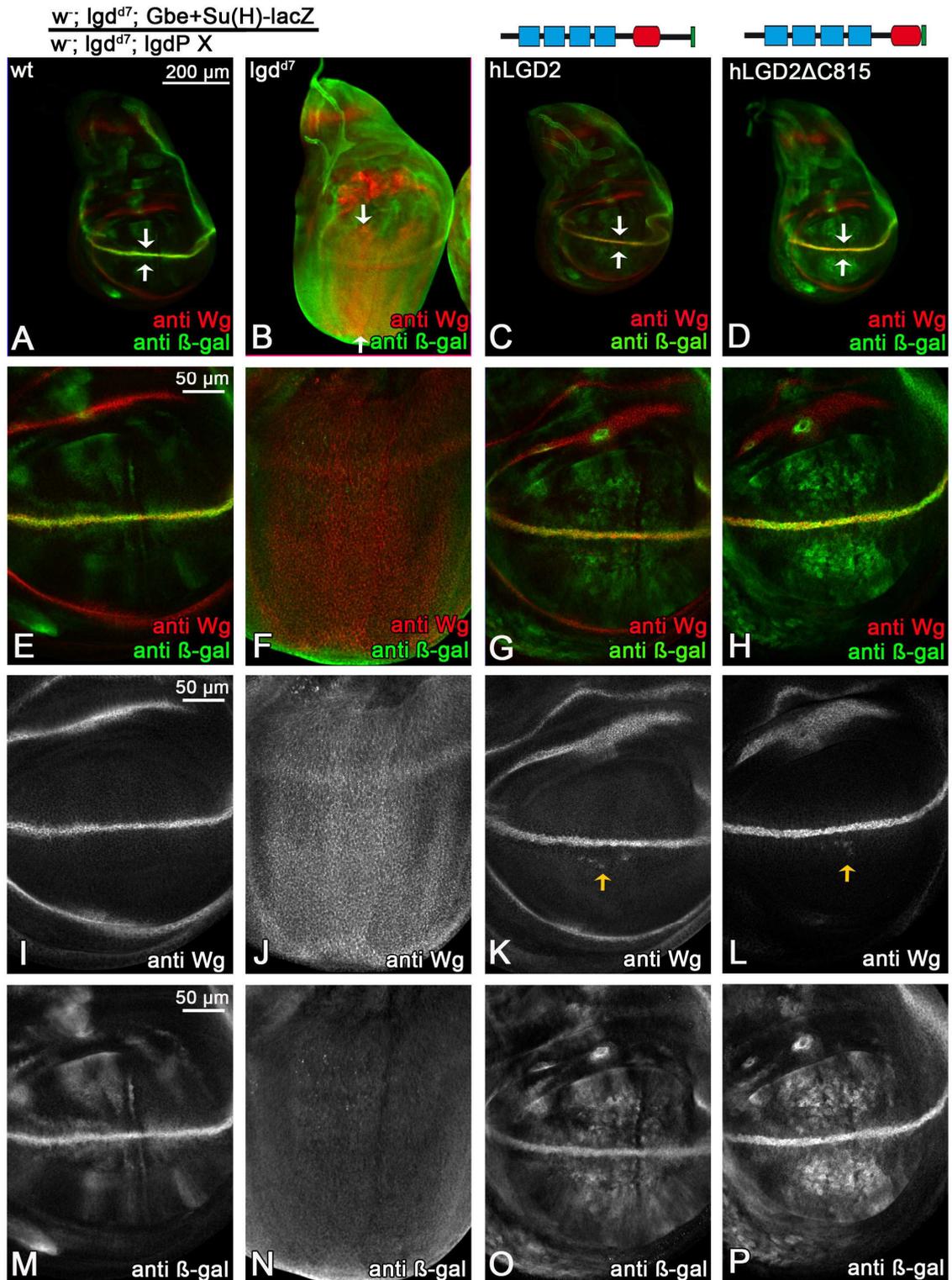


Abb. 2.4: Rettung des *Igd* mutanten Phänotyps durch die Expression von *IgdP* *hLGD2* Δ C815-HA. Neben der wildtypischen und der *Igd* mutanten Kontrolle ohne Rettungskonstrukt ist ebenfalls die Rettung von *IgdP* *hLGD2*-HA zum besseren Vergleich dargestellt. D, H, L, P: Expression von *IgdP* *hLGD2* Δ C815-HA und deren Auswirkung auf die Aktivität des Notch Signalweges. L, P: leichte ektopische Aktivierung des Notch Signalweges (gelber Pfeil). *hLGD2* Δ C815 unterdrückt den *Igd* mutanten Phänotyp genauso stark wie *hLGD2*.

Um kleinere Unterschiede in der Funktion der Rettungskonstrukte zu untersuchen, wurde die Rettung zusätzlich in einem sensitiveren mutanten Hintergrund durchgeführt. Der sensitivierte Hintergrund wird erreicht, indem zusätzlich zu dem *Igd* mutanten Hintergrund noch eine Kopie von *shrub* entfernt wird. Es ist bekannt, dass Lgd genetisch mit Shrub interagiert und dass die Interaktion der Proteine direkt erfolgt (Troost et al., 2012). Der Verlust von *shrub* ist embryonal letal, ein Verlust von *Igd* führt hingegen zu einer Letalität im frühen Puppenstadium. Wenn bei einem Verlust von Lgd zusätzlich noch eine Kopie Shrub entfernt wird, dann sterben die Larven im späten zweiten oder frühen dritten larvalen Stadium (s. Abb 2.5). In diesem Stadium sind die Imaginalscheiben noch sehr klein, da die Proliferation des Gewebes vorwiegend im dritten Larvenstadium stattfindet. Diese beginnt nachdem die Wg Expression im Flügelfeld an der D/V-Grenze durch den Notch-Signalweg kontrolliert wird (Klein, 2001). In diesem sensitivierten Hintergrund können kleinere Unterschiede in der Funktionalität der Proteine untersucht werden. Zudem kann überprüft werden, ob die exprimierten Konstrukte genetisch mit Shrub interagieren. Um die Funktionalität der Proteine zu bestimmen wurde wieder die Ausbreitung der Expression der Notch-Zielgene *Wg* und *Gbe+Su(H)-dsRed* untersucht.

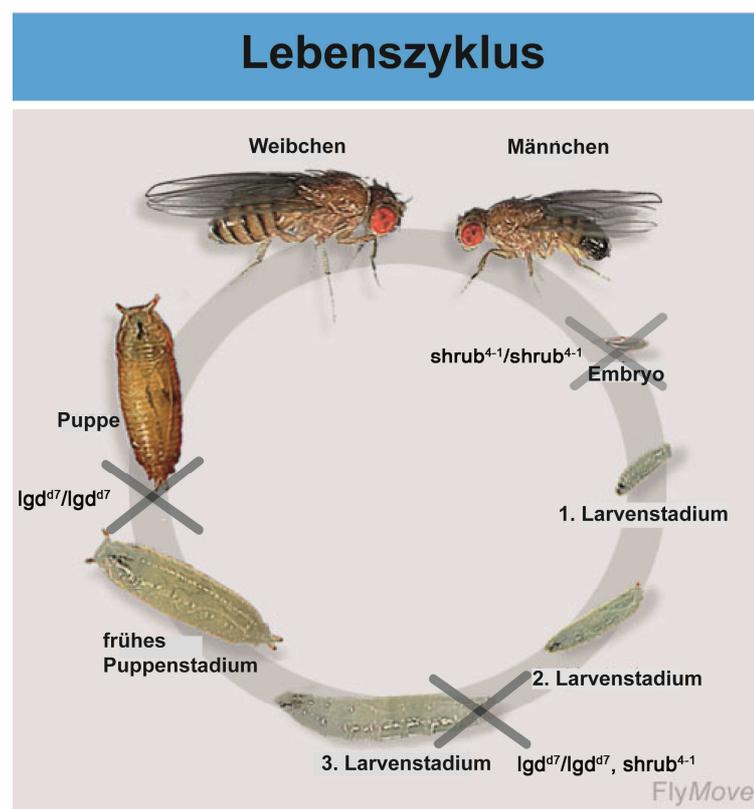


Abb. 2.5: Verfrühte Letalität von *Igd* und *shrub* mutanten Fliegen. Die Abbildung stellt den Lebenszyklus von *Drosophila melanogaster* dar. Gekennzeichnet sind die Zeitpunkte an denen die Fliegen bei Verlust von Lgd bzw. von Shrub sterben. Die *shrub* homozygote Mutation ist embryonal letal. Die *Igd* mutanten Fliegen sterben in einem frühen puppalen Stadium. Wenn jedoch *Igd* homozygot mutant und *shrub* heterozygot mutant ist, sterben sie in einem frühen dritten Larvenstadium. (modifiziert nach Weigmann et al., 2003)

Die Expression von hLGD1-HA in dem sensitivierten Hintergrund führt zu einer vollständigen Rettung des *lgd* mutanten Phänotyps. *Wg* wird wildtypisch in einem zwei-Zell breiten Streifen entlang der D/V-Grenze exprimiert (s. Abb. 2.6 B, F, J). Auch die Expression von *Gbe+Su(H)*-dsRed ist wildtypisch (s. Abb. 2.6 B, F, N). Es entwickeln sich adulte Fliegen, welche jedoch nicht fertil sind. Dies belegt eindeutig, dass hLGD1 in der Fliege funktional ist und auch mit Shrub genetisch interagiert. Jedoch kann es in diesem sensitiveren Hintergrund *Lgd* nicht vollständig ersetzen, da die adulten Fliegen nicht fertil sind. Im Gegensatz dazu ist die Rettung mit dem Konstrukt *lgdP lgd-HA* vollständig funktional, da adulte und fertile Tiere schlüpfen (Troost et al., 2012).

Allerdings zeigt das Rettungsexperiment mit *lgdP hLGD2-HA* deutlich, dass hLGD2 nicht so funktional wie hLGD1 ist. Dies ist daran zu erkennen, dass die Tiere im frühen dritten larvalen Stadium sterben und im Gegensatz dazu schlüpfen bei der Expression von hLGD1 adulte Fliegen. Zudem führt die Expression von hLGD2 im sensitiven Hintergrund zu kleineren Flügelimaginalscheiben als bei der Expression von hLGD1. Des Weiteren ist die *Wg* Expression vorhanden, aber nicht mehr auf einen zwei-Zell breiten Streifen beschränkt (s. Abb. 2.6 C, G, K) und das Reporter-genkonstrukt *Gbe+Su(H)*-dsRed wird in der gesamten Flügelimaginalscheibe exprimiert (s. Abb. 2.6 C, G, O). Die Larven sterben im frühen dritten larvalen Stadium. Sie werden allerdings älter als die Larven, die nur den sensitivierten Hintergrund besitzen, dies ist an den größeren Scheiben erkennbar (s. Abb. 2.6 G im Vergleich zu E). Dies führt zu der Annahme, dass hLGD2 noch eine Funktion besitzt und den *lgd* mutanten Phänotyp unterdrückt sowie auch genetisch mit Shrub interagiert.

Die Expression von *lgdP hLGD2ΔC815-HA* im sensitivierten Hintergrund führt zu einer Ausbreitung der Expression von *Wg* (s. Abb. 2.6 D, H, L weiße Pfeile) und auch *Gbe+Su(H)*-dsRed (s. Abb. 2.6 D, H, P). Die Larven sterben wie auch bei der Expression von hLGD2-HA im dritten Larvenstadium. Da die Flügelimaginalscheiben allerdings größer sind als bei der Expression von hLGD2-HA, ist anzunehmen, dass die Larven älter werden. Demzufolge scheint das Konstrukt *lgdP hLGD2ΔC815-HA* in der Fliege den *lgd* mutanten Phänotyp stärker zu unterdrücken als das hLGD2 „full length“ Konstrukt *lgdP hLGD2-HA*. Dies deutet auf eine Restfunktion sowohl von hLGD2 als auch hLGD2ΔC815 hin, wobei hLGD2 eine geringere Funktionalität als hLGD2ΔC815 zu haben scheint.

Die Verlängerung des C-Terminus von hLGD2 hat also einen negativen Effekt auf die Funktion von hLGD2 in *Drosophila melanogaster*. Aber zusätzlich spielen noch andere Veränderungen in der Sequenz eine Rolle, da hLGD2ΔC815 nicht in gleichem Ausmaß rettet wie hLGD1 (s. Anhang Abb. 7.1). Allerdings sind sowohl hLGD1 als auch hLGD2 so stark funktional konserviert, dass sie, wie auch *Lgd*, genetisch mit Shrub interagieren.

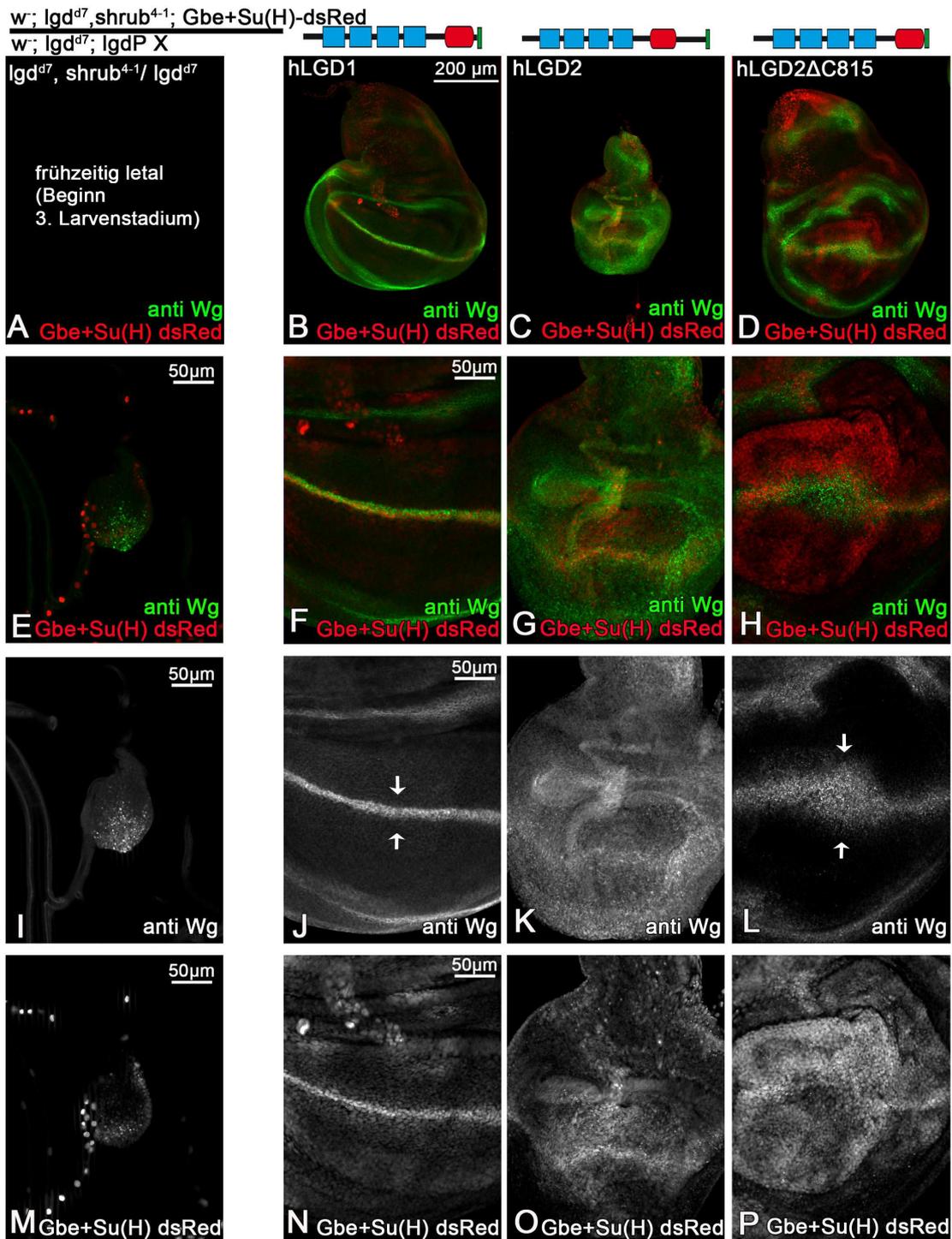


Abb. 2.6: Rettung des *Igd* mutanten Phänotyps im sensitivierten Hintergrund durch die Expression von *IgdP hLGD1-HA*, *IgdP hLGD2-HA* und *IgdP hLGD2ΔC815-HA*. A, E, I, M: Die *Igd* mutante Kontrolle ohne Rettungskonstrukt, der eine Kopie *shrub* fehlt. Die Tiere sterben im frühen dritten Larvenstadium (unveröffentlichte Daten Tobias Troost). B, F, J, N: Expression von *IgdP hLGD1-HA* und die wildtypische Aktivierung des Notch-Signalweges. C, G, K, O: Expression von *IgdP hLGD2-HA*. Die Scheibe ist deutlich kleiner als eine wildtypische Scheibe, zudem ist sowohl die Wg Expressionsdomäne (K) als auch die Expression von Gbe+Su(H)-dsRed (O) stark ektopisch aktiviert. D, H, L, P: Expression von *IgdP hLGD2ΔC815-HA*. Die Wg Expressionsdomäne ist verbreitert (L, weiße Pfeile). Auch die Expression von Gbe+Su(H)-dsRed (P) ist ektopisch aktiviert. Dennoch ist die Rettung des sensitivierten Hintergrunds mit *IgdP hLGD2ΔC815-HA* stärker als mit *IgdP hLGD2-HA*.

2.2.3 Funktion der DM14 Domänen

2.2.3.1 Die DM14 Domänen sind wichtig für die Funktion der hLGDs

Die DM14 Domänen sind für die Funktion von Lgd essentiell. Sie vermitteln die Interaktion mit Shrub und auch mit dessen Wirbeltier-Orthologen CHMP4B (Troost et al., 2012; Usami et al., 2012; Martinelli et al., 2012). Zunächst wurden Konstrukte ohne DM14 Domänen generiert, *lgdP hLGD1ΔDM14-HA* und *lgdP hLGD2ΔDM14-HA*, um die Funktion der DM14 Domänen der hLGDs analysieren zu können (s. Abb. 2.2).

Der Rettungsversuch mit den hLGD Konstrukten ohne DM14 Domäne, *lgdP hLGD1ΔDM14-HA* und *lgdP hLGD2ΔDM14-HA*, im *lgd* amorphen Hintergrund zeigt eine verbreiterte Wg Expressionsdomäne (s. Abb. 2.7 C, D). Diese ist nicht so stark verbreitert im Vergleich zu der Kontrolle des *lgd* mutanten Hintergrunds alleine (s. Abb. 2.7 B im Vergleich zu C, D). Allerdings ist die Ausprägung der ektopischen Wingless Expression stark variabel (Klein, 2003). Zudem wurde der Notch-Reporter Gbe+Su(H)-lacZ ubiquitär exprimiert (s. Abb. 2.7 C, O und D, P). Dies weist nach, dass Notch, wie bei einem Funktionsverlust von Lgd, überall aktiviert wurde und dass die Konstrukte ohne DM14 Domäne nicht mehr funktional sind. Zudem sind die Scheiben wie bei dem Verlust von Lgd stark überproliferiert (s. Abb. 2.7 C und D) und die Tiere sterben wie auch die *lgd* mutanten Tiere in einem frühen puppalem Stadium.

Die DM14 Domänen sind somit auch in den hLGDs essentiell für deren Funktion. Allerdings ist nicht geklärt, wie viele DM14 Domänen für die Funktionalität der hLGDs ausreichen. Eine Struktur-/Funktionsanalyse von Lgd hatte zuvor nachgewiesen, dass eine Kombination aus zwei DM14 Domänen ausreichend ist, um die Funktion von Lgd auszuführen (Troost et al., 2012). Um zu testen, ob dies auch auf hLGD1 zutrifft, wurden Rettungsexperimente mit hLGD1, welchem zwei DM14 Domänen fehlen, durchgeführt.

Da hLGD1 Lgd am ähnlichsten ist, wurden hLGD1 für eine weitergehende Analyse der DM14 Domänen, zwei DM14 Domänen entfernt. Es wurden zwei Konstrukte hergestellt, wobei bei einem die ersten beiden (*lgdP hLGD1ΔDM14(1-2)-HA*) und beim anderen die letzten beiden DM14 Domänen (*lgdP hLGD1ΔDM14(3-4)-HA*) entfernt wurden.

Bei dem durchgeführten Rettungsexperiment im *lgd* mutanten Hintergrund sowohl mit *lgdP hLGD1ΔDM14(1-2)-HA* als auch mit *lgdP hLGD1ΔDM14(3-4)-HA* zeigt sich sowohl eine annähernd wildtypische Expression von Wingless als auch von Gbe+Su(H)-lacZ (s. Abb. 2.8 C, D). In höherer Vergrößerung ist eine leichte ektopische Expression von Wingless an der dorso-ventralen Grenze zu beobachten (s. Abb. 2.8 K, L gelber Pfeil). Außerdem wurde Gbe+Su(H)-lacZ im Vergleich zum Wildtyp stärker aktiviert (s. Abb. 2.8 O, P). Liegen die Konstrukte in zwei Kopien vor, sterben die Tiere als „pharate adults“. Die Proteine können also den *lgd* mutanten Phänotyp zum Teil unterdrücken, aber die Funktion von Lgd nicht vollständig ersetzen.

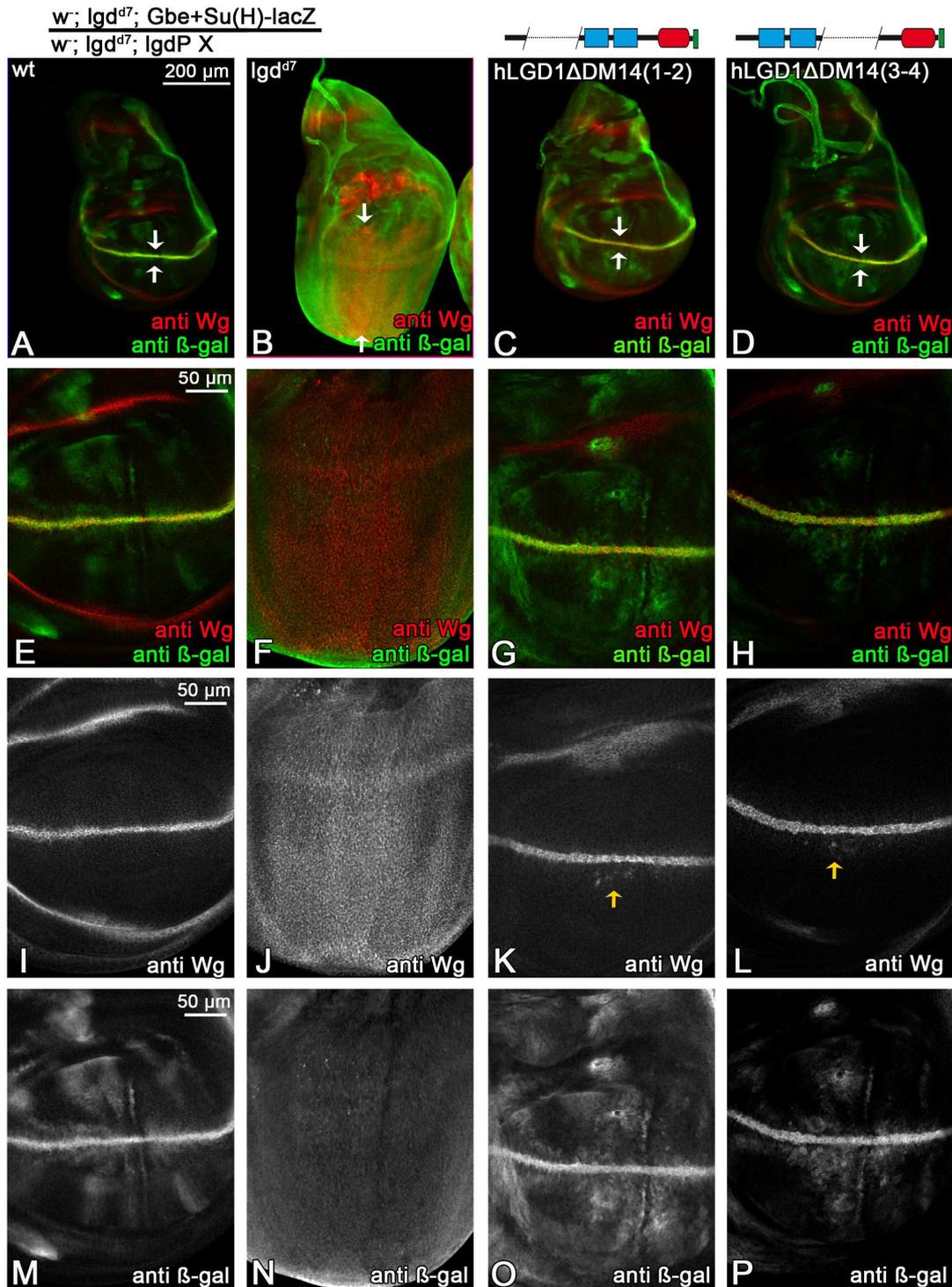


Abb. 2.8: Rettung des *Igd* mutanten Phänotyps durch die Expression von *IgdP hLGD1ΔDM14(1-2)-HA* und *IgdP hLGD1ΔDM14(3-4)-HA*. A, E, I, M: wildtypische Kontrolle. B, F, J, N: *Igd* mutanter Hintergrund ohne Rettungskonstrukt. C, G, K, O: Expression von *IgdP hLGD1ΔDM14(1-2)-HA* und deren Auswirkung auf die Aktivität des Notch Signalweges. K: leicht ektopisch aktivierte Wg Expression (gelber Pfeil). O: leicht gesteigerte Expression von *Gbe+Su(H)-lacZ* als beim Wildtyp. D, H, L, P: Expression von *IgdP hLGD1ΔDM14(3-4)-HA* und deren Auswirkung auf die Aktivität des Notch Signalweges. L: leicht ektopisch aktivierte Wg Expression (gelber Pfeil). P: leicht gesteigerte Expression von *Gbe+Su(H)-lacZ* im Vergleich zum Wildtyp. Zwei DM14 Domänen von hLGD1 sind ausreichend, um noch eine Teilfunktion auszuüben.

Zwei DM14 Domänen in hLGD1 sind also noch ausreichend, um den *lgd* mutanten Phänotyp zu unterdrücken. Dies weist auf eine Restfunktion von hLGD1 hin, wenn zwei DM14 Domänen fehlen. Allerdings konnte dadurch nicht nachgewiesen werden, ob eine der Domänen wichtiger ist als die anderen.

2.2.3.2 Keine Unterschiede zwischen den verschiedenen DM14 Domänen von hLGD1 nachweisbar

Bei Struktur-/Funktionsanalysen von Lgd wurde nachgewiesen, dass die zweite DM14 Domäne für die Funktion von Lgd bedeutsam ist (Troost et al., 2012). Bei hLGD2 hingegen spielt die dritte DM14 Domäne eine herausragende Rolle bei der Interaktion mit CHMP4B (Usami et al., 2012; Martinelli et al., 2012). Die vorhergehende Analyse im *lgd* mutanten Hintergrund zeigte keine Unterschiede zwischen den DM14 Domänen von hLGD1. Deshalb wurde die Untersuchung erneut im sensitivierten Hintergrund durchgeführt, in dem *lgd* in Homozygose und *shrub* in Heterozygose vorliegt, um mögliche kleinere Unterschiede zwischen den DM14 Domänen zu analysieren.

Bei der Untersuchung von hLGD1 Δ DM14(1-2)-HA und hLGD1 Δ DM14(3-4)-HA im sensitivierten Hintergrund ist eine Verbreiterung der Wingless Expressionsdomäne und auch eine ubiquitäre Expression von Gbe+Su(H) dsRed erkennbar (s. Abb. 2.9 C, D). Im Vergleich dazu wurde Wg bei der Expression von hLGD1-HA im sensitiveren Hintergrund wildtypisch in einem Streifen mit einer Breite von zwei Zellen an der dorso-ventralen Grenze exprimiert (s. Abb. 2.9 B). In der höheren Vergrößerung fallen bei der ektopischen Wg Expression keine Unterschiede zwischen der Expression von *lgdP hLGD1 Δ DM14(1-2)-HA* und *lgdP hLGD1 Δ DM14(3-4)-HA* auf (s. Abb. 2.9 K und L, weiße Pfeile). Zudem ist Gbe+Su(H)-dsRed in der gesamten Imaginalscheibe aktiv, wenn die Konstrukte *lgdP hLGD1 Δ DM14(1-2)-HA* und *lgdP hLGD1 Δ DM14(3-4)-HA* exprimiert werden (s. Abb. 2.9 O, P). Bei einem Vergleich zwischen den beiden Konstrukten fiel kein Unterschied in der ektopischen Aktivierung von Notch auf. Daraus lässt sich schließen, dass alle Domänen gleich wichtig für die Funktion von hLGD1 sind, zumindest wenn hLGD1 in *Drosophila melanogaster* exprimiert wird.

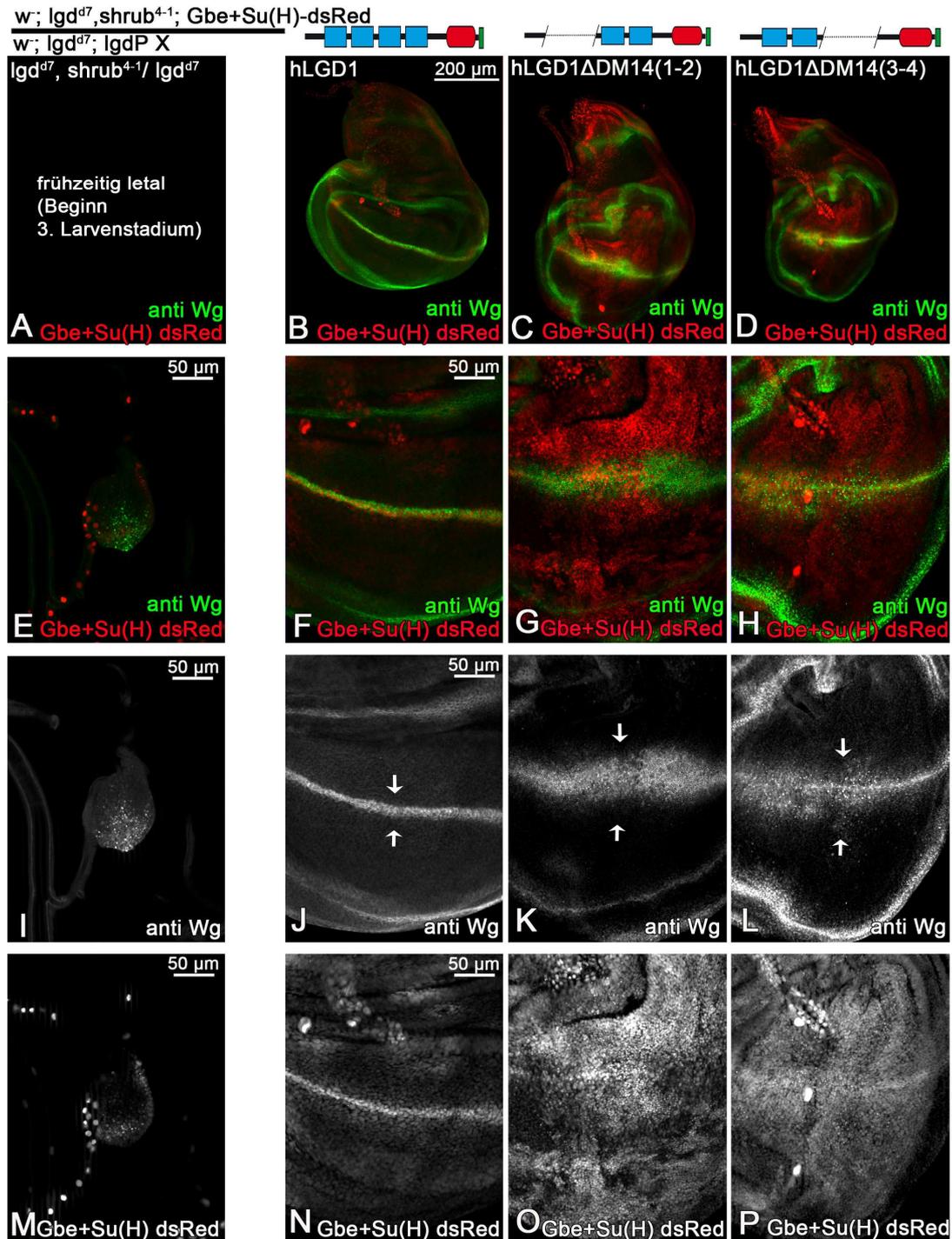


Abb. 2.9: Rettung des *lgd* mutanten Phänotyps durch die Expression von *lgdP hLGD1-HA*, *lgdP hLGD1ΔDM14(1-2)-HA* und *lgdP hLGD1ΔDM14(3-4)-HA* im sensitivierten Hintergrund. A, E, I, M: *lgd* mutante Kontrolle ohne Rettungskonstrukt, der eine Kopie *shrub* fehlt. Die Tiere sterben im frühen dritten Larvenstadium (unveröffentlichte Daten Tobias Troost). B, F, J, N: Expression von *lgdP hLGD1-HA* und eine wildtypische Aktivierung des Notch Signalweges. C, G, K, O: Expression von *lgdP hLGD1ΔDM14(1-2)-HA* und deren Einfluss auf die Aktivität des Notch-Signalweges. Die Wg Expressionsdomäne ist verbreitert (K, weiße Pfeile) als auch die Expression von Gbe+Su(H)-dsRed (O) ist stark ektopisch aktiviert. D, H, L, P: Expression von *lgdP hLGD1ΔDM14(3-4)-HA* und deren Einfluss auf die Aktivität des Notch-Signalweges. Die Wg Expressionsdomäne ist verbreitert (L, weiße Pfeile). Auch die Expression von Gbe+Su(H)-dsRed (O) ist ektopisch aktiviert. Die Rettung des sensitiveren Hintergrunds mit *lgdP hLGD1ΔDM14(1-2)-HA* und *lgdP hLGD1ΔDM14(3-4)-HA* lässt keine Unterschiede in der Funktionalität der Domänen erkennen.

2.2.4 Funktionalität der C2 Domäne

2.2.4.1 Die C2 Domäne ist essentiell für die Funktion der hLGDs

Untersuchungen der C2 Domäne von Lgd haben nachgewiesen, dass sie für die Lokalisation und Stabilität des Proteins von Bedeutung ist (Troost et al., 2012). Zur Analyse der Funktion der C2 Domäne der humanen LGDs wurde die C2 Domäne der hLGDs deletiert und zunächst ein Rettungsexperiment mit diesen Konstrukten durchgeführt.

Die Expression von *lgdP hLGD1ΔC2-HA* und *lgdP hLGD2ΔC2-HA* im *lgd* mutanten Hintergrund zeigt in beiden Fällen eine verbreiterte Wg Expressionsdomäne und eine ubiquitäre Aktivierung von Gbe+Su(H)-lacZ (s. Abb. 2.10 C, D, weiße Pfeile) im Vergleich zum Wildtyp (s. Abb. 2.10 A). Die Verbreiterung der Wg Expression ist nicht so stark ausgeprägt wie in Scheiben mit *lgd* mutantem Hintergrund in denen kein Rettungskonstrukt exprimiert wird (s. Abb. 2.10 J im Vergleich zu K, L). Dies liegt wiederum wahrscheinlich an der variablen Wg Expression (Klein, 2003). Dafür spricht zudem eine Aktivierung von Gbe+Su(H)-lacZ im gesamten Flügelfeld (s. Abb. 2.10 O, P). Des Weiteren sind andere *lgd* mutante Merkmale erkennbar. So sind die Imaginalscheiben vor allem im Bereich des Flügelfeldes stark überproliert (s. Abb. 2.10 B-D) und die Tiere sterben in einem frühen puppalem Stadium. Es gab also keine Rettung des *lgd* mutanten Phänotyps, wenn die C2 Domäne deletiert ist. Dies bedeutet, dass die Proteine ohne C2 Domäne nicht mehr funktional sind.

Die C2 Domäne ist also für die Funktion der hLGDs essentiell. Da für Lgd nachgewiesen wurde, dass die C2 Domäne für die Lokalisation und die Stabilität des Proteins eine wichtige Rolle spielt, könnten mögliche Ursachen des Funktionsverlustes eine Fehllokalisierung oder eine Instabilität der Proteine sein.

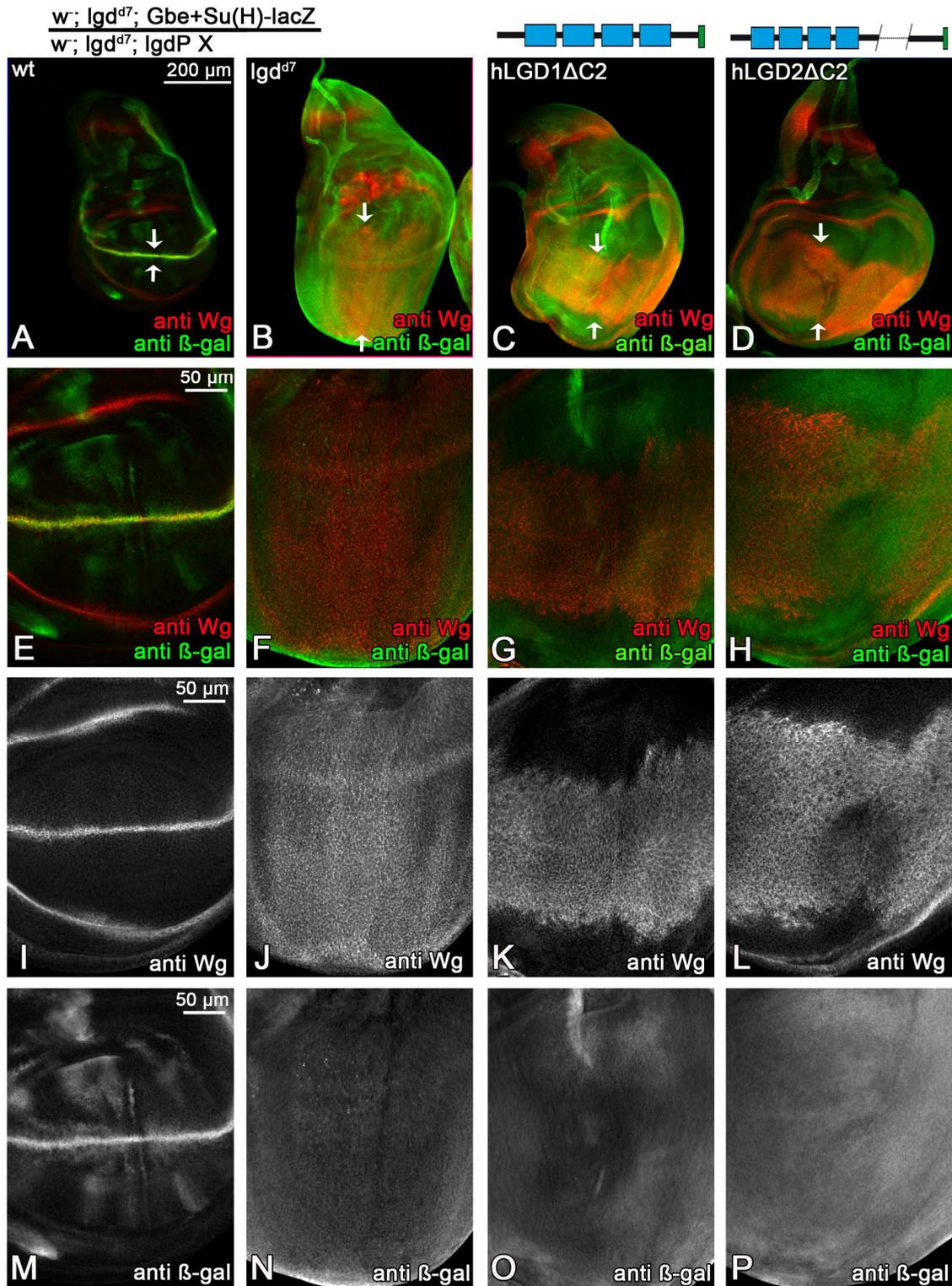


Abb. 2.10: Rettung des *Igd* mutanten Phänotyps durch die Expression von *IgdP hLGD1ΔC2-HA* und *IgdP hLGD2ΔC2-HA*. A, E, I, M: wildtypische Kontrolle. B, F, J, N: *Igd* mutanter Hintergrund ohne Rettungskonstrukt. C, G, K, O: Expression von *IgdP hLGD1ΔC2-HA* und deren Auswirkung auf die Aktivität des Notch Signalweges. K: stark verbreiterte Wg Expressionsdomäne. O: ubiquitäre Expression von *Gbe+Su(H)-lacZ*. D, H, L, P: Expression von *IgdP hLGD2ΔC2-HA* und deren Auswirkung auf die Aktivität des Notch Signalweges. L: stark verbreiterte Wg Expressionsdomäne. P: ubiquitäre Expression von *Gbe+Su(H)-lacZ*. Die hLGDs ohne C2 Domäne sind nicht mehr funktional.

2.2.5 Untersuchung des Funktionsverlustes der hLGDΔC2s

Die hLGDΔC2s zeigen wie auch LgdΔC2 keine Funktionalität. Es konnte belegt werden, dass der Grund für den Funktionsverlust bei LgdΔC2 die Instabilität und die Fehllokalisierung des Proteins in den Kern ist (Troost et al., 2012). Im Folgenden werden deswegen auch diese möglichen Ursachen der Funktionslosigkeit der hLGDΔC2s näher analysiert. Für die Untersuchung der Lokalisation wurden die Konstrukte in der Flügelimaginalscheibe überexprimiert und das Testen der Stabilität erfolgte durch die Isolation von Proteinlysaten aus Larven mit anschließender Western Blot Analyse.

2.2.5.1 Die hLGDΔC2s sind in *Drosophila melanogaster* cytoplasmatisch lokalisiert

Lgd ist ein cytoplasmatisches Protein (Childress et al., 2006; Jaekel und Klein, 2006; Gallagher und Knoblich, 2006). Troost, Jäckel *et al.* (2012) wiesen nach, dass Lgd in den Kern wandert sobald die C2 Domäne deletiert ist und dass das Protein nicht mehr funktional ist. Durch das Anhängen eines Nuklear Export Signals (NES) an LgdΔC2 konnte jedoch belegt werden, dass ohne C2 Domäne das Protein noch eine Restfunktion besitzt, wenn es wieder im Cytoplasma lokalisiert ist. Wenn die C2 Domäne von Lgd fehlt, kann also aufgrund einer Fehllokalisierung des Proteins, Lgd seine Funktion nicht ausüben (Troost et al., 2012). Dies könnte auch ein Grund sein, weshalb die hLGDs ohne C2 Domäne den *lgd* mutanten Phänotyp nicht retten können.

Um dies zu untersuchen, wurden die Konstrukte mittels des GAL4/UAS Systems überexprimiert, da die Proteine auf endogenem Level mittels einer Antikörperfärbung nicht eindeutig zu detektieren sind. Unter Verwendung des Treiberstamms *w¹¹¹⁸; ptcGAL4; tubP Rab5-CFP, tubP Rab7-YFP/SM6a-TM6b* wurde das zu untersuchende Konstrukt im *ptc*-Streifen entlang der anterior-posterioren Kompartimentgrenze exprimiert. Die Detektion der Konstrukte erfolgte über ihre HA-Markierung. Sowohl der früh endosomale Marker Rab5-CFP als auch der spät endosomale Marker Rab7-YFP wurden unter Kontrolle des Tubulin-Promotors exprimiert, wodurch eine moderate Expression der endosomalen Marker ermöglicht wird (Marois et al., 2006). Durch die Expression von Rab5-CFP und Rab7-YFP kann ein möglicher Einfluss der Konstrukte auf den endosomalen Transportweg überprüft werden. Aus diesem Grund wurde zusätzlich die extrazelluläre Domäne von Notch (N(extra)) angefärbt. Die Überexpression von Lgd führte zu vergrößerten späten Endosomen, welche positiv für N(extra) und Rab7 sind (Jaekel und Klein, 2006).

Dieses Experiment wurde in Zusammenarbeit mit Shekufe Kharabi-Masouleh während ihrer Bachelorarbeit durchgeführt (Kharabi-Masouleh, 2012). Sowohl hLGD1-HA (s. Abb. 2.12 D) als auch hLGD2-HA (s. Abb. 2.12 J) sind cytoplasmatisch lokalisiert. Bei der Expression von hLGD1-HA, aber nicht bei der Expression von hLGD2-HA, sind vergrößerte N(extra) Vesikel im Bereich des exprimierten Proteins zu beobachten (s. Abb. 2.12 F). Diese sind auch Rab7 positiv und zum Teil sowohl Rab5 als auch Rab7

positiv (s. Abb. 2.11 D, E) Allerdings zeigt die DAPI Färbung, dass die Expression von hLGD1 vermehrt zur Apoptose führt (s. Anhang Abb. 7.2). Dies könnte auch die Akkumulation der endosomalen Marker mit N(extra) erklären.

Auch bei den hLGDs, denen die C2 Domäne fehlt, ist eine cytoplasmatische Lokalisierung zu beobachten (s. Abb. 2.13 D, E). Die Überexpression von hLGD1 Δ C2 sowie von hLGD2 Δ C2 hat keinen Einfluss auf die N(extra) Verteilung in der Zelle (s. Abb. 2.13 F, L). Des Weiteren ist die Verteilung von Rab5-CFP und Rab7-YFP wildtypisch (s. Anhang Abb. 7.3). Demzufolge wird der endosomale Transport weder durch die Überexpression von hLGD1 Δ C2 noch durch die Überexpression von hLGD2 Δ C2 gestört.

Zusammenfassend lässt sich durch diese Experimente zeigen, dass sowohl hLGD1 als auch hLGD2 wie Lgd im Cytoplasma lokalisiert sind. Nur die Überexpression von hLGD1 übt einen negativen Effekt auf den endosomalen Transportweg aus. Es gibt jedoch auch Hinweise, dass er durch Apoptose ausgelöst sein könnte. Anders als bei Lgd hat die C2 Domäne der hLGDs keine Funktion in der Lokalisation der Proteine. Sie sind weiterhin cytoplasmatisch lokalisiert, wenn diese deletiert wurde. Folglich kann eine fehlerhafte Lokalisation nicht der Grund für die fehlende Funktionalität von hLGD1 Δ C2 und hLGD2 Δ C2 sein. Eine weitere Ursache für den Funktionsverlust könnte allerdings auch eine Instabilität der Proteine sein, was im folgenden Kapitel überprüft werden soll.

w; *ptc* Gal4; tubP Rab5-CFP, tubP Rab7-YFP
w; *lf*/Cyo; UAS-X

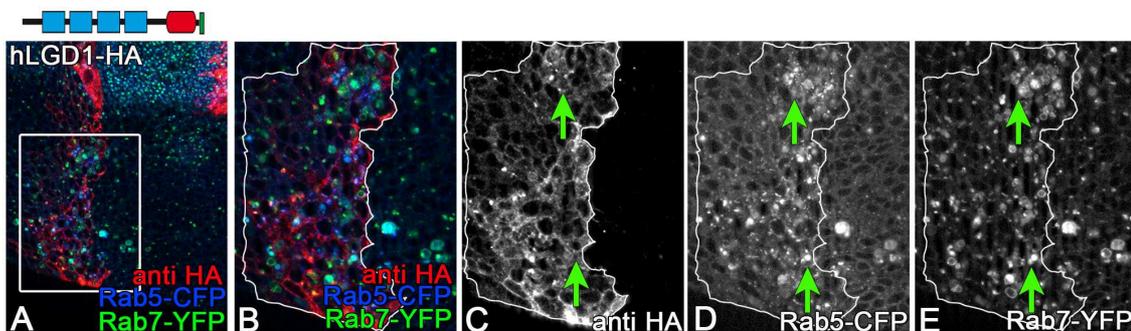


Abb. 2.11: Untersuchung des frühen und späten endosomalen Transportes bei Überexpression von hLGD1-HA. A: Übersicht der hLGD1 Expression, sowie die Färbung von Rab5-CFP und Rab7-YFP im *ptc*-Streifen. Der weiße Kasten kennzeichnet den Bereich, welcher in B vergrößert wurde. In B-E wird der Bereich des *ptc*-Streifens weiß umrandet. C: Detektion von hLGD1-HA. D: Rab5-CFP Färbung. E: Rab7-YFP Färbung. Die grünen Pfeile kennzeichnen die vergrößerten Vesikel. Die Expression von hLGD1 führt zu vergrößerten Rab5 und Rab7 Vesikeln (In Zusammenarbeit mit Kharabi-Masouleh (2012)).

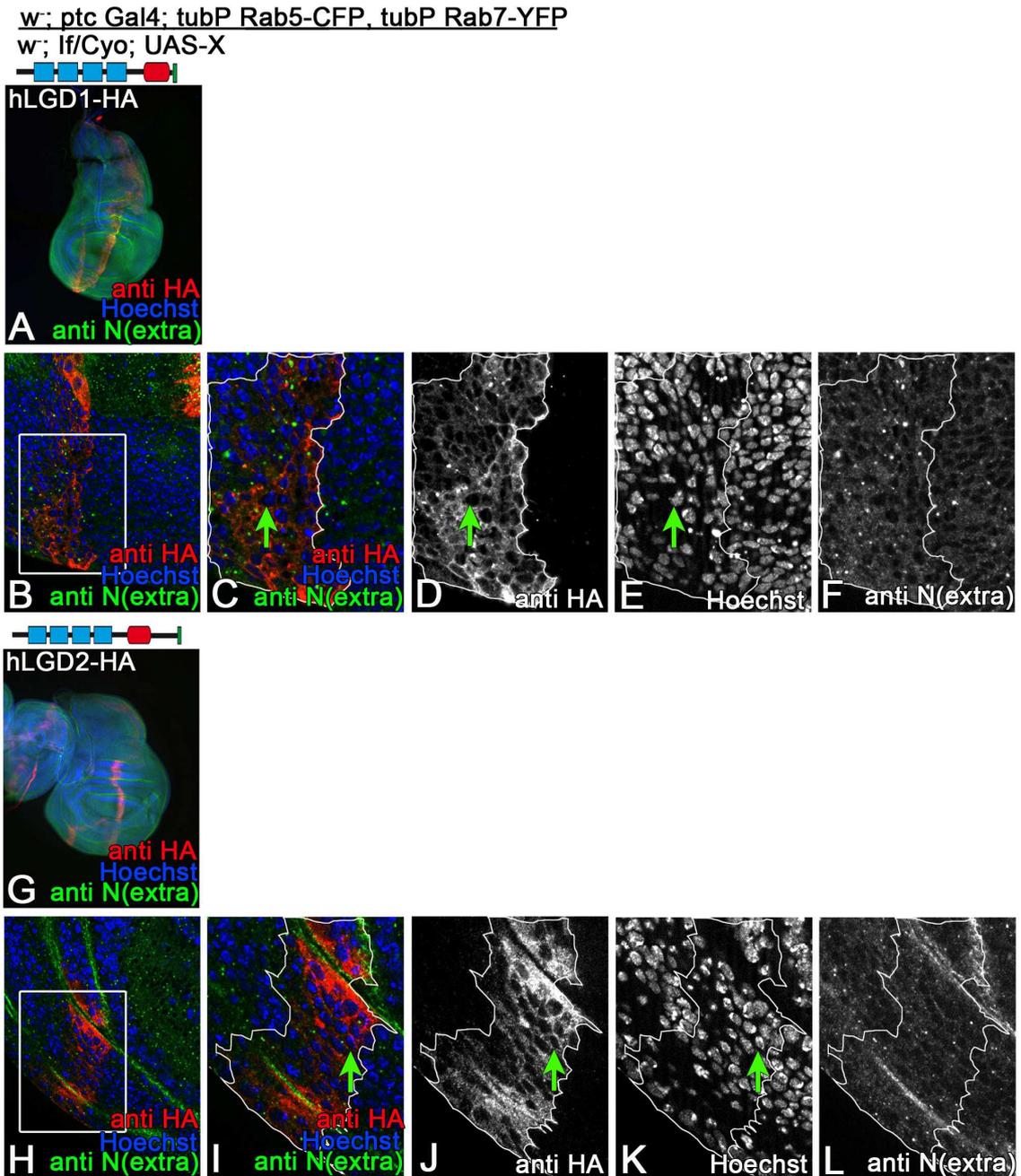
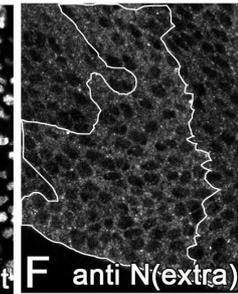
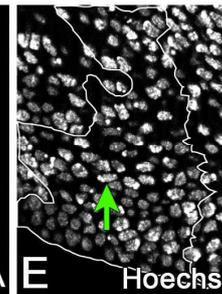
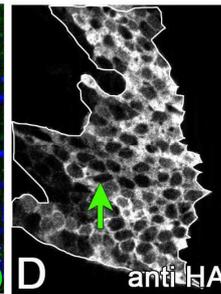
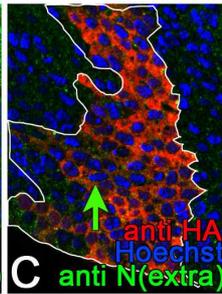
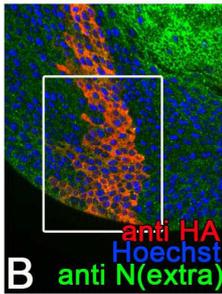


Abb. 2.12: Analyse der Lokalisation der hLGDs. Für die Bestimmung der Lokalisation wurden die Konstrukte im *ptc*-Streifen überexprimiert. Der Genotyp der analysierten Fliegen steht oben links in der Abbildung. A-C: Übersicht über die Expression von hLGD1-HA im *ptc*-Streifen in verschiedenen Vergrößerungen inklusive der Kern- und N(extra) Färbung. Der weiße Kasten in B kennzeichnet den Bereich, welcher in C-F vergrößert wurde. G-I: Übersicht über die Expression von hLGD2 im *ptc*-Streifen in verschiedenen Vergrößerungen inklusive der Kern- und N(extra) Färbung. Der weiße Kasten in H kennzeichnet den Bereich, welcher in I-L vergrößert wurde. D, J: Detektion der exprimierten Konstrukte. E, K: Kernfärbung. F, L: Färbung von N(extra). Die grünen Pfeile kennzeichnen die Lokalisation der Proteine, bzw. in der Hoechst Färbung die Lokalisation der Kerne. Die hLGDs sind cytoplasmatisch lokalisiert. Die Expression von hLGD1 führt zudem zu vergrößerten N(extra) Vesikeln. (In Zusammenarbeit mit Kharabi-Masouleh (2012))

w; *ptc* Gal4; tub Rab5-CFP, tub Rab7-YFP
 w; *lf*/Cyo; UAS-X



hLGD1ΔC2-HA



hLGD2ΔC2-HA

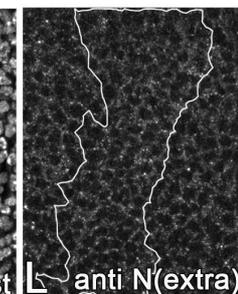
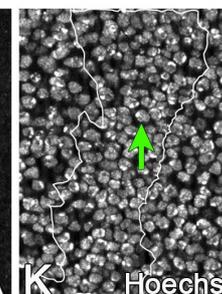
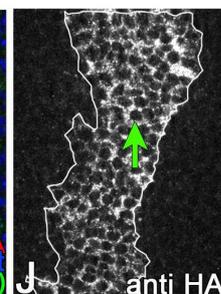
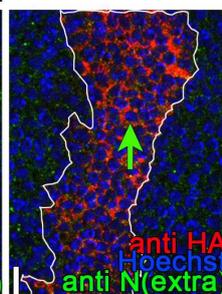
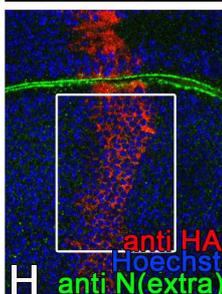
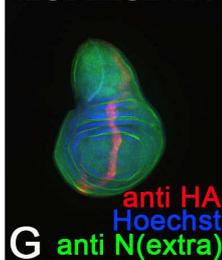


Abb. 2.13: Analyse der Lokalisation der hLGDΔC2s. Für die Bestimmung der Lokalisation wurden die Konstrukte im *ptc*-Streifen überexprimiert. Der Genotyp der analysierten Fliegen steht oben links in der Abbildung. A-C: Übersicht über die Expression von hLGD1ΔC2-HA im *ptc*-Streifen in verschiedenen Vergrößerungen inklusive der Kern- und N(extra) Färbung. Der weiße Kasten in B kennzeichnet den Bereich, welcher in C-F vergrößert wurde. G-I: Übersicht über die Expression von hLGD2ΔC2-HA im *ptc*-Streifen in verschiedenen Vergrößerungen inklusive der Kern- und N(extra) Färbung. Der weiße Kasten in H kennzeichnet den Bereich, welcher in I-L vergrößert wurde. D, J: Detektion der exprimierten Konstrukte. E, K: Kernfärbung. F, L: Färbung von N(extra). Die grünen Pfeile kennzeichnen die Lokalisation der Proteine, bzw. in der Hoechst Färbung die Lokalisation der Kerne. Die hLGDΔC2s sind cytoplasmatisch lokalisiert. (In Zusammenarbeit mit Kharabi-Masouleh (2012))

2.2.5.2 hLGD2 Δ C2 und hLGD2 Δ DM14 scheinen im Vergleich zu hLGD2 weniger stabil zu sein

Da im vorhergehenden Kapitel ausgeschlossen wurde, dass die Fehllokalisation die Ursache für den Funktionsverlust der hLGD Δ C2s ist, erfolgte als nächstes eine Analyse der Stabilität der Proteine. Neben den hLGD Δ C2s wurden auch die anderen Deletionskonstrukte auf ihre Stabilität hin untersucht.

Um die Stabilität der Proteine zu testen, wurden Proteinlysate aus L3 Larven isoliert (s. Kap. 5.2.9.11), welche die jeweiligen Konstrukte in zwei Kopien tragen. Zunächst wurden die hLGD1 Deletionskonstrukte analysiert. Diese wurden unter Kontrolle des endogenen *lgdP* und im wildtypischen Hintergrund exprimiert. Alle untersuchten Konstrukte wurden an derselben Insertionsstelle in das Genom inseriert. Somit verfälschen keine Positionseffekte die Expressionsstärke der Proteine. Das Proteinlysate von zehn Larven wurde in einem Western Blot analysiert. Die Proteine wurden mittels der HA-Markierung detektiert. Als Positivkontrolle und zum Vergleich der Expression wurde das Konstrukt *lgdP lgd-HA* verwendet

Im Vergleich zu Lgd scheinen die Banden von hLGD1 und seinen Deletionskonstrukten schwächer zu sein (s. Abb. 2.14). Aus der Ladekontrolle lässt sich schließen, dass weniger Lgd als hLGD1 aufgetragen wurde. Dies deutet auf eine geringere Stabilität von hLGD1 im Vergleich zu Lgd hin. Die untersuchten hLGD1 Konstrukte wurden annähernd gleich stark exprimiert (s. Abb. 2.14).

Zur Untersuchung der Expressionsstärke der Insertionsposition wurde von den Konstrukten *hLGD1 Δ C2-HA* und *hLGD1 Δ DM14(1-2)-HA* das Proteinlysate von zwei verschiedenen Stämmen aufgetragen. Die Indizes hinter dem Konstruktnamen in der Abbildung bezeichnen die Stammnummern. Es gibt keine Unterschiede in der Expressionsstärke der Konstrukte bei unterschiedlichen Stämmen. Dies bestätigt, dass es durch das Verwenden derselben Insertionsposition keine Unterschiede in der Expression der Proteine gibt.

Es ist auffällig, dass alle Proteine langsamer im Polyacrylamidgel laufen als errechnet (s. Anhang Tab. 7.1). Möglicherweise spielen posttranslationale Proteinmodifikationen bei der Diskrepanz zwischen der errechneten und der tatsächlichen Proteingröße eine Rolle. Diese Ergebnisse konnten ebenfalls von Daisy Moll in ihrer Bachelorarbeit bestätigt werden (Moll, 2013).

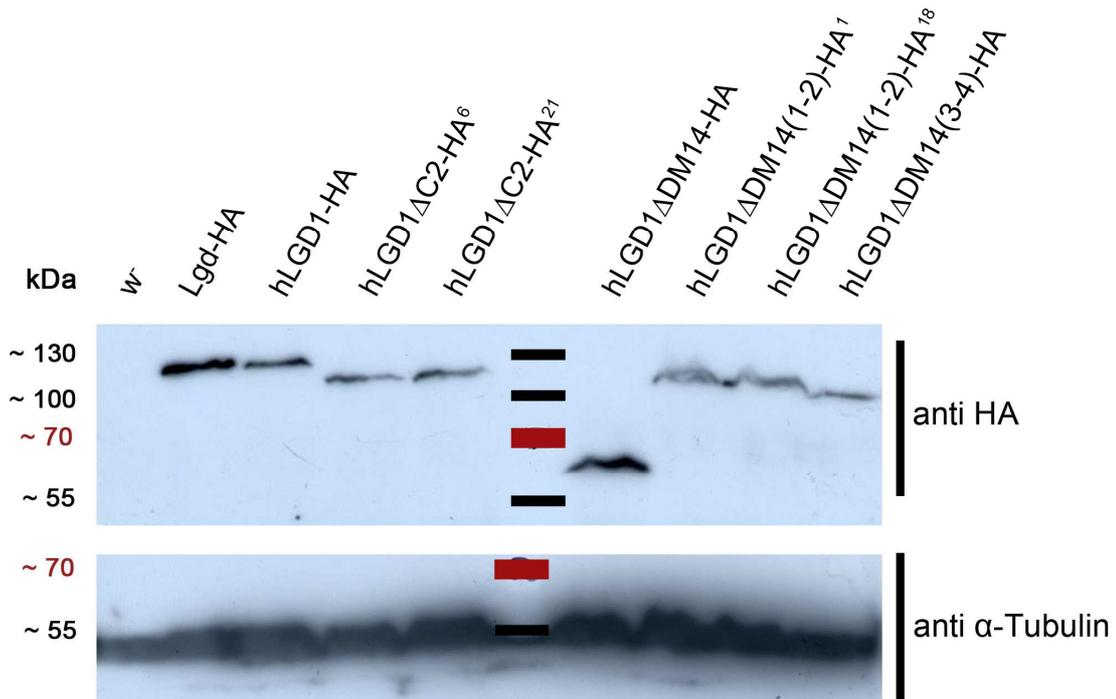


Abb. 2.14: Analyse der Stabilität der hLGD1 Deletionskonstrukte mithilfe eines Western Blots. Es wurde Proteinlysate von jeweils zehn Larven verwendet, um die Stabilität der Proteine zu testen. Die hLGD1 Konstrukte wurden mittels des HA Antikörpers (1:3000) nachgewiesen (Belichtungszeit: 2h). Als Ladekontrolle diente Tubulin (α -Tubulin: 1:10.000) (Belichtungszeit: 1 min). Das Proteinlysate von *w*-Larven wurde als Negativkontrolle verwendet. Alle detektierbaren Proteine weisen größere Proteingrößen auf als die, die errechnet wurden. Die hLGD1 Konstrukte scheinen alle ungefähr gleich stabil zu sein, scheinen jedoch alle weniger stabil als Lgd zu sein.

Als Nächstes wurde die Stabilität der hLGD2 Deletionskonstrukte analysiert. Auch diese Konstrukte wurden unter Kontrolle des endogenen *lgdP* exprimiert. Allerdings konnten nicht alle Konstrukte über die HA-Markierung detektiert werden. Aus diesem Grund fand für die Detektion der hLGD2 Konstrukte der hLGD2 Antikörper (CC2D1A von Abnova) Verwendung. Da dieser allerdings auch Lgd erkennt (s. Anhang Abb. 7.4), wurden die Konstrukte im *lgd* mutanten Hintergrund exprimiert, damit nicht zusätzlich das endogene Lgd detektiert wird. Erneut diente Lgd-HA, hier jedoch im *lgd* mutanten Hintergrund exprimiert, als Positivkontrolle und zum Vergleich der Expressionsstärke.

Zur Analyse der Stabilität wurde das Proteinlysate von je fünf Larven aufgetragen. Lgd-HA und hLGD2-HA werden gleich stark exprimiert, sowie auch hLGD2 Δ C815-HA. Das Protein hLGD2 Δ DM14-HA wurde nicht detektiert. Im Vergleich zu hLGD2-HA wurde hLGD2 Δ C2-HA deutlich schwächer exprimiert. Sowohl hLGD2 Δ C2 als auch hLGD2 Δ DM14 scheinen instabiler als hLGD2 zu sein (s. Abb. 2.15). Wie auch bei hLGD1 sind die Proteine der hLGD2 Konstrukte größer als die berechneten (s. Anhang Tab. 7.1). Auch diese Ergebnisse konnten durch Daisy Moll bestätigt werden (Moll, 2013).

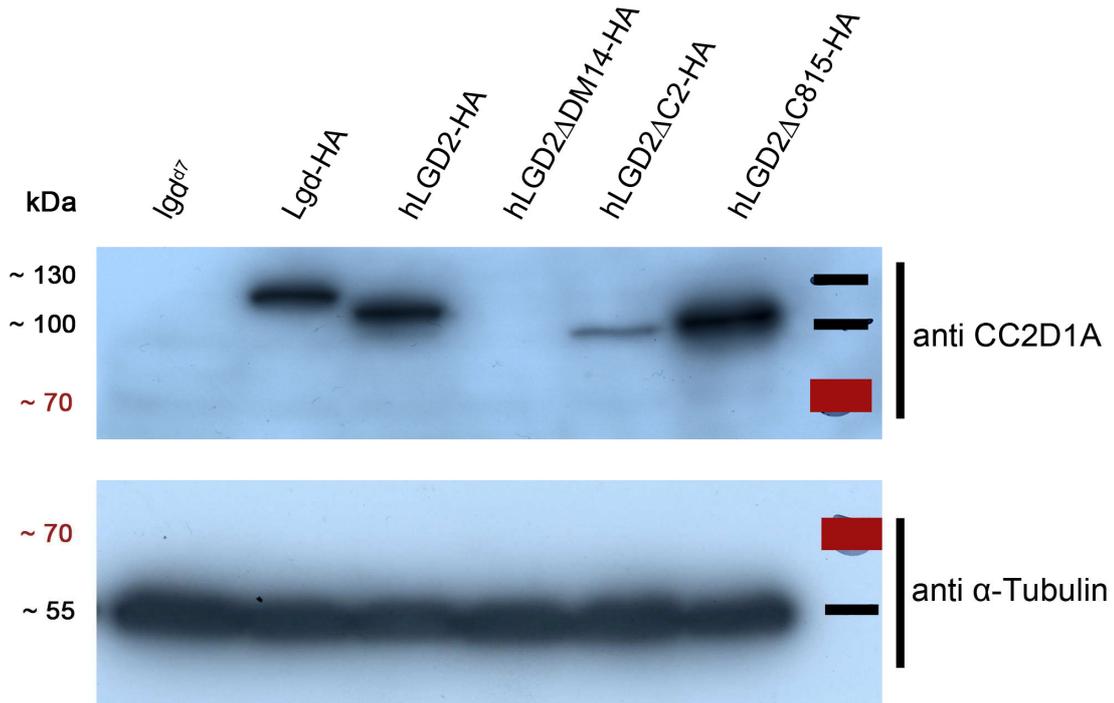


Abb. 2.15: Analyse der Stabilität der hLGD2 Deletionskonstrukte mithilfe eines Western Blots. Es wurde Proteinlysate von jeweils fünf Larven verwendet, um die Stabilität der Proteine zu testen. Der Nachweis der Konstrukte erfolgte mittels des CC2D1A Antikörpers (1:2000 von Abnova) (Belichtungszeit: 2h). Als Ladekontrolle diente Tubulin (α -Tubulin: 1:100.000) (Belichtungszeit: 30 min). Das Proteinlysate von Igd^{d7} -Larven wurde als Negativkontrolle verwendet. Alle detektierbaren Proteine weisen größere Proteingrößen auf als die berechneten. Lgd, hLGD2 und hLGD2 Δ C815 werden ungefähr gleich stark exprimiert und sind somit in etwa gleich stabil. hLGD2 Δ C2 wird deutlich schwächer als hLGD2 exprimiert und scheint instabiler als das vollständige hLGD2 zu sein. hLGD2 Δ DM14 ist nicht detektierbar.

Da hLGD2 Δ DM14-HA nicht detektiert werden konnte, wurden die Fliegen auf die Insertion des Konstruktes mittels einer Genotypisierung überprüft. Dazu wurde die DNA aus adulten Fliegen isoliert (s. Kap. 5.2.8.6) und anschließend eine Genotypisierungs-PCR durchgeführt. Die Auswahl der eingesetzten Primer erfolgte dabei in sense-Richtung aus dem Vektor in das Insert hinein, und vom Beginn des Inserts in antisense-Richtung aus dem Insert herausgehend. So konnte zudem sichergestellt werden, dass das Insert auch in richtiger Richtung in den Vektor integriert wurde. Es ist eine Bande bei ca. 1750 bp zu erkennen, also wurde hLGD2 Δ DM14-HA ins Fliegen-genom inseriert (s. Anhang Abb. 7.4). Ein weiterer Beleg für die Instabilität von hLGD2 Δ DM14-HA ist, dass es überexprimiert in einem Western Blot nachgewiesen wurden, somit kann der Antikörper auch hLGD2 Δ DM14-HA detektieren (s. Anhang Abb. 7.4). Zudem erfolgte nur eine schwache Detektion von hLGD2 Δ DM14-HA, welches zusätzlich auf eine Instabilität des Proteins hindeutet. Dies belegt, dass hLGD2 Δ DM14-HA sehr wahrscheinlich instabil ist und nicht eine mangelnde Detektion durch den Antikörper oder eine fehlerhafte Insertion ins Genom die Ursache der Nichtdetektion von hLGD2 Δ DM14-HA ist.

Bei der Analyse der Stabilität der hLGDs gibt es deutliche Unterschiede zwischen hLGD1 und hLGD2. Im Gegensatz zu hLGD2 und Lgd sind hLGD1 und seine Deletionskonstrukte alle gleich stabil. Insofern wird der Funktionsverlust von hLGD1 Δ C2 vermutlich nicht durch eine Instabilität des Proteins verursacht. Jedoch scheint hLGD1 generell instabiler als Lgd oder hLGD2 zu sein. Die exprimierte Proteinmenge ist jedoch zur Ausübung der Funktion von hLGD1 ausreichend, da bei Expression von hLGD1 im *lgd* mutanten Hintergrund adulte und fertile Fliegen schlüpfen (s. Kap. 2.2.1). Wie auch Lgd Δ C2 ist hLGD2 Δ C2 instabiler. Des Weiteren ist auch hLGD2 Δ DM14 anscheinend so instabil, dass es nicht mehr detektiert werden kann. Eine mögliche Ursache für den Funktionsverlust von hLGD2 Δ C2 und hLGD2 Δ DM14 könnte also die Instabilität der Proteine sein.

Tab. 2.1: Übersicht der Struktur-/Funktionsanalyse. Eigenschaften der hLGDs und deren Deletionskonstrukte, wobei sich die Stabilität auf das jeweilige „full-length“ Protein bezieht.

* kennzeichnet eine geringere Stabilität im Hinblick auf Lgd-HA

Konstrukte	Notch-Signalweg in <i>lgd</i> ^{d7}	Lokalisation	Stabilität	Adulte bzw. Letalität
hLGD1-HA	wildtypisch	cytoplasmatisch	stabil*	adult, fertil
hLGD1 Δ DM14-HA hLGD1 Δ C2-HA	ektopisch aktiviert, keine Rettung	cytoplasmatisch	stabil*	früh puppal letal
hLGD1 Δ DM14(1-2)-HA hLGD1 Δ DM14(3-4)-HA	ektopisch aktiviert, partielle Rettung	nicht getestet	stabil*	„pharate adult“
hLGD2-HA hLGD2 Δ C815-HA	ektopisch aktiviert, partielle Rettung	cytoplasmatisch	stabil	„pharate adult“
hLGD2 Δ DM14-HA hLGD2 Δ C2-HA	ektopisch aktiviert, keine Rettung	cytoplasmatisch	geringere Stabilität	früh puppal letal

Die Struktur-/Funktionsanalyse ist in Tab. 2.1 zusammengefasst und zeigt, dass sowohl hLGD1 als auch hLGD2 funktional konserviert sind und den *lgd* mutanten Phänotyp unterdrücken können. hLGD1 zeigt dabei eine vollständige Unterdrückung des *lgd* mutanten Phänotyps, wohingegen die Unterdrückung durch die Expression von hLGD2 nur partiell erfolgt. Zudem sind für die Funktion der hLGDs sowohl die DM14 Domänen als auch die C2 Domäne essentiell. Der Funktionsverlust von hLGD2 Δ C2 als auch von hLGD2 Δ DM14 könnte aus einer möglichen Instabilität der Proteine resultieren. hLGD1 Δ C2 hingegen scheint nicht instabiler als hLGD1 zu sein. Zudem kann eine Fehllokalisierung als Ursache für den Funktionsverlust sowohl von hLGD1 Δ C2 als auch von hLGD2 Δ C2 ausgeschlossen werden. Auch hLGD1 Δ DM14,

hLGD2 Δ DM14 und hLGD2 Δ C815 sind im Cytoplasma lokalisiert und zeigen keinen Einfluss auf den endosomalen Transportweg (s. Anhang Abb. 7.5). Demzufolge scheinen keine der Domänen der hLGDs oder die Verlängerung des C-Terminus von hLGD2 eine Rolle bei der Lokalisation zu spielen.

2.3 hLGD2 interagiert genetisch mit hLGD1 und Lgd

Ein direkter Interaktionspartner von Lgd ist Shrub (Troost et al., 2012). In Kapitel 2.2.2 konnte nachgewiesen werden, dass die hLGDs genetisch mit Shrub interagieren können. Es gibt indes auch Hinweise darauf, dass Lgd nicht nur mit Shrub interagieren kann, sondern auch mit sich selbst (unveröffentlichte Daten, Sandra Jäckel). Da es allerdings zwei humane Orthologe von Lgd gibt, könnten diese möglicherweise auch genetisch miteinander interagieren.

Um dies zu analysieren, wurde ein Rettungsexperiment im *lgd* mutanten Hintergrund durchgeführt. Dazu wurden Fliegen miteinander gekreuzt, die zum einen hLGD2-HA und zum anderen hLGD1 Δ DM14(1-2)-HA, bzw. hLGD1 Δ DM14(3-4)-HA unter Kontrolle des *lgdP* exprimierten. Das Konstrukt *lgdP hLGD1-HA* konnte nicht untersucht werden, da dessen Expression zu adulten und fertilen Fliegen führt und somit keine Aussage zu einer möglichen Interaktion gemacht werden kann. Die Expression von hLGD2-HA, hLGD1 Δ DM14(1-2)-HA oder hLGD1 Δ DM14(3-4)-HA in zwei Kopien im *lgd* amorphen Hintergrund führt zu „pharate adults“. Falls eine genetische Interaktion zwischen hLGD2 und hLGD1, bzw. Lgd vorliegt, entwickeln sich im Rettungsexperiment adulte Fliegen.

Bei dem Rettungsexperiment sowohl mit hLGD1 Δ DM14(1-2)-HA als auch mit hLGD1 Δ DM14(3-4)-HA schlüpften adulte Fliegen, die jedoch nicht fertil waren (s. Tab. 2.2). Zusätzlich wiesen die Fliegen Borstendefekte auf, wie zusätzliche Makrochaeten (s. Anhang Abb. 7.6 Pfeil). Aber dennoch zeigte sich eine genetische Interaktion zwischen hLGD1 und hLGD2, da sich adulte Fliegen entwickelten und die Tiere nicht schon als „pharate adults“ starben.

Da hLGD1 und Lgd sehr ähnlich sind, stellt sich die Frage, ob auch Lgd mit hLGD2 genetisch interagieren kann. Um dies zu überprüfen, wurde das Konstrukt *lgdP NES-Lgd Δ C2 68+86* gewählt. Die Fliegen wurden durch eine Rekombination generiert, in dem NES-Lgd Δ C2 sowohl auf dem rechten (*attP68E*) als auch auf dem linken (*attP86Fb*) Arm des dritten Chromosoms liegt (unveröffentlichte Daten Tobias Troost). Dadurch liegt NES-Lgd Δ C2 in Homozygose in vier Kopien vor. Wenn dies im *lgd* mutanten Hintergrund der Fall ist, sterben die Tiere ebenfalls als „pharate adult“.

In dem Rettungsexperiment wurde im *lgd* mutanten Hintergrund das Konstrukt *lgdP hLGD2-HA* zusammen mit *lgdP NES-Lgd Δ C2 68+86* untersucht. Aus dieser Kreuzung schlüpften adulte Fliegen, die jedoch nicht fertil waren (s. Tab. 2.2). Zusätzlich sind vermehrte Borsten zu beobachten (s. Anhang Abb. 7.6). Dies belegt die genetische Interaktion von Lgd mit hLGD2.

Die Überaktivierung von Notch durch den Verlust von Lgd, führt normalerweise im *Igd* hypomorphen Hintergrund (Lgd^{SH495}/Lgd^{d7}) zu einem Verlust von Borsten und zur Bildung von zusätzlichen Sockelzellen (Jaekel und Klein, 2006). Die Bildung von zusätzlichen Borsten trat nur bei Rettungsexperimenten im *Igd*^{d7} homozygotem Hintergrund auf. Wenn dieselbe Rettung in anderen *Igd* Kombinationen durchgeführt wurde, traten diese zusätzlichen Borsten nicht auf (Troost, 2012). Dies spricht dafür, dass die zusätzlichen Borsten in den Rettungsexperimenten durch den genetischen Hintergrund des *Igd*^{d7} Allels bedingt sind.

Tab. 2.2: Übersicht über die Rettungsexperimente zur Untersuchung der genetischen Interaktion. In der Tabelle sind nur die getesteten Konstrukte aufgelistet. Der Genotyp der Fliegen lautet: $w^+; Igd^{d7}; IgdP\ X/w^+; Igd^{d7}; IgdP\ Y$. Wobei X und Y Variablen für die Konstrukte darstellen.

getestete genetische Interaktion bzw. Kontrollen	Adulte bzw. Letalität
hLGD2/ hLGD2	„pharate adults“
hLGD1ΔDM14(1-2)/ hLGD1ΔDM14(1-2)	„pharate adults“
hLGD1ΔDM14(3-4)/ hLGD1ΔDM14(3-4)	„pharate adults“
NES-LgdΔC2 68+86/ NES-LgdΔC2 68+86	„pharate adults“
hLGD2/ hLGD1ΔDM14(1-2)	lebend, aber nicht fertil
hLGD2/ hLGD1ΔDM14(3-4)	lebend, aber nicht fertil
hLGD2/ NES-LgdΔC2 68+86	lebend, aber nicht fertil

Es findet also eine genetische Interaktion von hLGD2 sowohl mit hLGD1 als auch mit Lgd statt. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass für die Interaktion mit hLGD1 zwei DM14 Domänen ausreichend sind und für die Interaktion mit Lgd die C2 Domäne von Lgd irrelevant ist. Möglicherweise spielen die DM14 Domänen eine Rolle bei der Interaktion zwischen hLGD2 mit hLGD1, bzw. Lgd. Die Fähigkeit der DM14 Domänen Protein-Protein Interaktionen zu vermitteln zeigte sich auch schon bei der Interaktion zwischen Lgd und Shrub (Troost et al., 2012). Durch das Rettungsexperiment kann allerdings keine Aussage darüber getroffen werden, ob die Interaktion zwischen hLGD2 und hLGD1, bzw. Lgd direkt oder indirekt ist.

2.4 Analyse der hLGDs und deren Deletionskonstrukte in humanen Zellen

Wie zuvor beschrieben zeigte sich bei der Expression der humanen Proteine in *Drosophila melanogaster* nur bei der Expression von hLGD1 einen Einfluss auf den endosomalen Transport. Dieser resultiert allerdings wahrscheinlich aus der Apoptose der Zellen. Es gab keine Assoziation der humanen Proteine mit Vesikeln. Sie sind wie Lgd eher diffus im Cytoplasma verteilt (s. Kap. 2.5.2.1). Allerdings wurde auch gezeigt, dass hLGD2 mit RAB5, RAB7 und auch LAMP1 in humanen Zellen assoziiert ist (Chang et al., 2011). In diesem Experiment wurden aber sowohl die endosomalen Marker RAB5, RAB7 und LAMP1 als auch hLGD2 überexprimiert. Dies könnte ein so sensibles System wie den endosomalen Transportweg aus dem Gleichgewicht bringen. So führt zum Beispiel überexprimiertes RAB5 zu vergrößerten Endosomen (Stenmark et al., 1994). Zudem hat das Fehlen von mLGD2 in *mLgd2* defizienten MEFs („mouse embryonic fibroblasts“) keinen Effekt auf den endosomalen Transportweg gezeigt (Lindner, 2013). Da diese Ergebnisse sehr widersprüchlich sind, wurde ein möglicher Einfluss der hLGDs und deren Deletionskonstrukte auf den endosomalen Transport in dieser Arbeit näher analysiert.

Für die Untersuchung wurden hauptsächlich humane HeLa Zellen verwendet, welche Cervixkarzinomazellen sind. Auf diese Weise werden die humanen Proteine in humanen Zellen getestet, wodurch ihre natürlichen Interaktionspartner zur Verfügung stehen.

Zunächst wurde die endogene Lokalisation von hLGD2 untersucht und darauffolgend die Lokalisation der überexprimierten hLGDs und deren Deletionskonstrukte. Für die Analyse des endosomalen Transportweges und den Einfluss der überexprimierten hLGDs auf diesen wurden die Konstrukte in HeLa Zellen transfiziert und anschließend mittels der HA-Markierung detektiert. Des Weiteren wurden die endogenen endosomalen Marker über die für sie spezifischen Antikörper detektiert. Der frühe endosomale Transportweg wurde mittels RAB5, der späte endosomale Transportweg mittels RAB7 und der spät endosomale/lysosomale Transport wurde mithilfe von LAMP1 analysiert. Zusätzlich wurde noch das ESCRT-III Protein CHMP4B markiert, da bekannt ist, dass die hLGDs mit CHMP4B interagieren (Martinelli et al., 2012; Tsang et al., 2006; Usami et al., 2012).

2.4.1 Endogene Verteilung von hLGD2

Für die Analyse der endogenen Verteilung von hLGD2 wurde der in der Arbeitsgruppe generierte Cc2d1a Antikörper verwendet, welcher LGD2 spezifisch erkennt. Da es keinen spezifischen LGD1 Antikörper gibt, konnte nur die endogene Verteilung von hLGD2 analysiert werden.

Wie in Abbildung 2.16 B zu sehen, liegt hLGD2 vorrangig punktuell im Cytoplasma vor. Vereinzelt ist hLGD2 auch im Kern zu erkennen (s. Abb. 2.16 C).

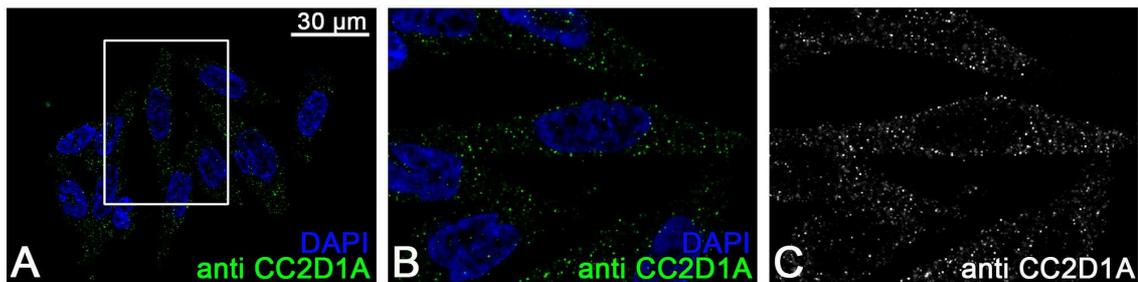


Abb. 2.16: Endogene Lokalisation von hLGD2 in HeLa Zellen. A: Übersicht der hLGD2 Färbung und der Kernfärbung. Das weiße Rechteck kennzeichnet, welcher Bereich in B und C vergrößert wurde. Der Ausschnitt wurde zusätzlich um 90° gedreht. B: vergrößerter Ausschnitt der hLGD2 und Kernfärbung. C: vergrößerter Ausschnitt der hLGD2 Färbung. Es ist zu erkennen, dass hLGD2 nicht nur im Cytoplasma sondern auch im Kern an punktuellen Strukturen lokalisiert ist.

Um diese vesikulären Strukturen besser zu definieren, wurden die Zellen zusätzlich mit endosomalen Markern gefärbt. RAB5, der Marker für frühe Endosomen, ist wie erwartet an Vesikeln im Cytoplasma assoziiert (s. Abb. 2.17 D, G). Allerdings ist RAB5 ebenfalls an Vesikeln im Kern lokalisiert (s. Abb. 2.17 G). Auch RAB7 befindet sich an Vesikeln sowohl im Cytoplasma als auch im Kern (s. Abb. 2.17 E, H). Der Marker für späte Endosomen/Lysosomen LAMP1 ist ebenfalls an Vesikeln lokalisiert, welche sich sowohl im Cytoplasma als auch im Kern befinden. (s. Abb. 2.17 F, I). Es ist zu beobachten, dass hLGD2 mit keinem der untersuchten endosomalen Markern assoziiert ist. Die punktuellen Strukturen, an denen hLGD2 lokalisiert ist, sind also weder frühe (s. Abb. 2.17 D) noch späte Endosomen (s. Abb. 2.17 E). Außerdem ist keine Assoziation mit Lysosomen erkennbar (s. Abb. 2.17 F).

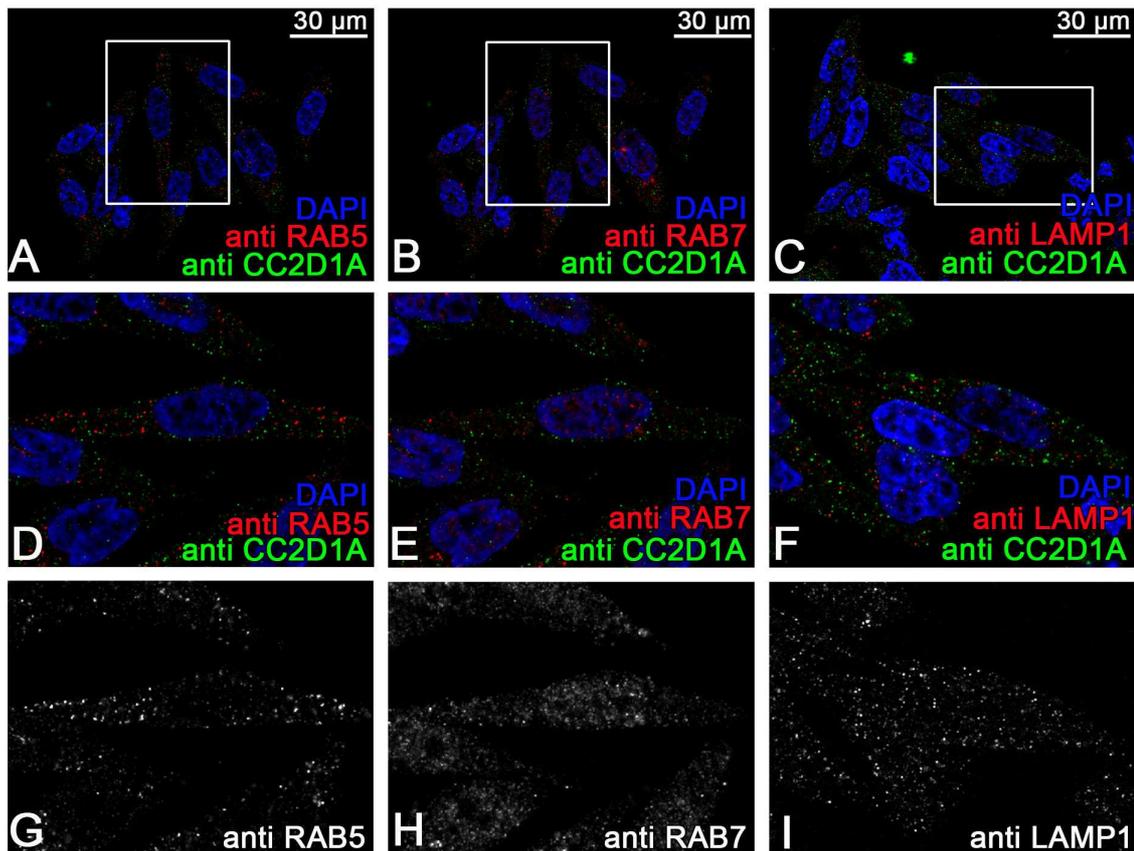


Abb. 2.17: Endogene Lokalisation von hLGD2 in HeLa Zellen mit endosomalen Markern markiert. A-C: Übersicht der hLGD2 sowie der jeweiligen endosomalen Marker Färbung. Die weißen Rechtecke kennzeichnen, welche Bereiche in D-F vergrößert wurde. Der Ausschnitt aus A und B wurde zusätzlich um 90° gedreht. D: vergrößerter Ausschnitt der hLGD2 und RAB5 Färbung. E: vergrößerter Ausschnitt der hLGD2 und RAB7 Färbung. F: vergrößerter Ausschnitt der hLGD2 und LAMP1 Färbung. G: RAB5 Färbung. H: RAB7 Färbung. I: LAMP1 Färbung. Die endosomalen Marker sind sowohl im Cytoplasma als auch im Kern lokalisiert. Es gibt keine Assoziation von hLGD2 mit endosomalen Markern.

Als nächstes wurde untersucht, ob hLGD2 mit dem ESCRT-III Protein CHMP4B assoziiert ist. Es ist bekannt, dass die beiden Proteine direkt miteinander interagieren (Lindner, 2013; Usami et al., 2012; Martinelli et al., 2012; Tsang et al., 2006). Möglicherweise findet diese Interaktion an den hLGD2 positiven punktuellen Strukturen statt. Das ESCRT-III Protein CHMP4B ist auch an Vesikeln sowohl im Cytoplasma als auch im Kern lokalisiert (s. Abb. 2.18 B, C). Allerdings ist bei der Färbung von CHMP4B und hLGD2 in HeLa Zellen keine Assoziation von endogenem hLGD2 mit endogenem CHMP4B erkennbar (s. Abb. 2.18 B). Die Interaktion scheint so nicht nachweisbar zu sein oder findet nicht an diesen Vesikeln statt.

Es gibt also keine nachweisbare Assoziation von hLGD2 mit endosomalen Markern und dem ESCRT-III Protein CHMP4B auf endogenem Expressionslevel. Möglicherweise haben allerdings die Überexpression der hLGDs und deren Deletionskonstrukte einen Effekt auf den endosomalen Transportweg.

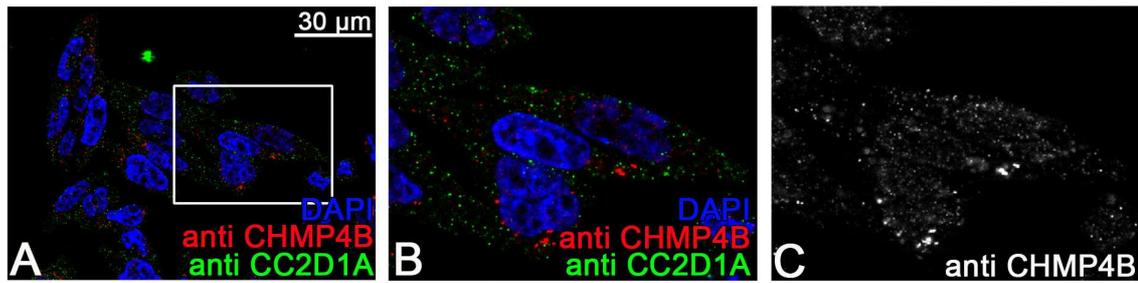


Abb. 2.18: Endogene Lokalisation von hLGD2 und CHMP4B in HeLa Zellen: A: Übersicht der hLGD2 und der CHMP4B Färbung. Das weiße Rechteck kennzeichnet, welcher Bereich in B vergrößert wurde. B: vergrößertes Ausschnitt der hLGD2 und CHMP4B Färbung. C: CHMP4B Färbung. CHMP4B befindet sich im Cytoplasma und im Kern. hLGD2 ist an vesikulären Strukturen lokalisiert, welche nicht CHMP4B positiv sind.

2.4.2 Überexpression der hLGDs in HeLa Zellen

Um zu testen, ob die hLGDs und deren Deletionskonstrukte einen Effekt auf den endosomalen Transportweg haben, wurden HeLa Zellen mit den Konstrukten transfiziert und im Hinblick auf den endosomalen Transportweg mit diversen endosomalen Markern sowie dem ESCRT-III Protein CHMP4B analysiert. Dabei ist zu beachten, dass die Konstrukte unter Kontrolle des CMV-Promotors überexprimiert wurden. Die Konstrukte sind HA markiert und werden durch diese Markierung von den endogenen Proteinen unterschieden. Die Analyse der endosomalen Marker erfolgte mittels einer Antikörperfärbung und zeigt die endogenen Proteine.

2.4.2.1 hLGD1 ist an späten Endosomen mit CHMP4B assoziiert

Exogenes hLGD1-HA ist diffus im Cytoplasma verteilt, wobei es zudem noch teilweise an vesikulären Strukturen zu erkennen ist (s. Abb. 2.19 J-L, gelber, bzw. pinker Pfeil). Diese Vesikel sind jedoch nicht mit RAB5 markiert und sind somit keine frühen Endosomen. (s. Abb. 2.19 D) In Abbildung 2.19 D ist außerdem zu erkennen, dass RAB5 mit einem vergrößerten Endosom assoziiert ist (weißer Pfeil). Solche vergrößerten Endosomen, welche positiv für endosomale Marker sind, tauchen in seltenen Fällen sowohl in transfizierten als auch in wildtypischen Zellen auf. Dieser vergrößerte Vesikel ist allerdings nicht hLGD1-HA positiv und könnte möglicherweise ein Artefakt sein.

Allerdings ist zu beobachten, dass die hLGD1 markierten Vesikel RAB7 positiv sind (s. Abb. 2.19 E). Die hLGD1 positiven Vesikel sind somit späte Endosomen.

Die LAMP1 Färbung jedoch zeigt, dass keine Assoziation der hLGD1-HA positiven Vesikel mit LAMP1 vorhanden ist (s. Abb. 2.19 F). Außerdem ist in den transfizierten Zellen erkennbar, dass sich größere LAMP1 positive Vesikel zu bilden scheinen (s. Abb. 2.19 F, I (türkise Pfeile) im Vergleich zu 2.17 D (Kontrolle)). Dies deutet auf eine Störung des spät endosomalen/lysosomalen Transportweges hin. Die hLGD1 Färbung sieht in Abb. 2.19 L zusätzlich noch membranassoziiert aus. Möglicherweise könnten diese Unterschiede durch unterschiedliche Transfektionstärken verursacht werden.

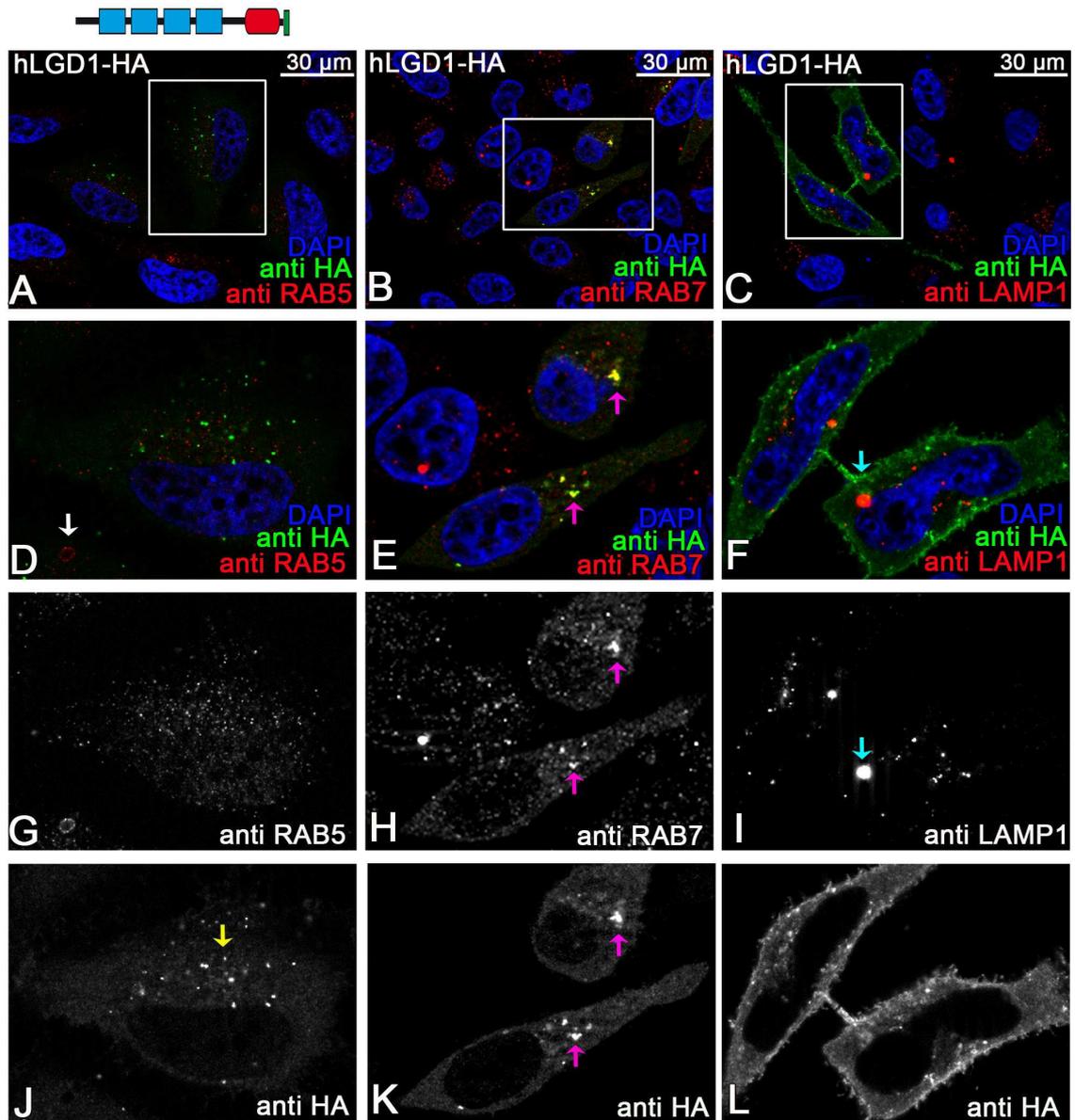


Abb. 2.19: Expression von hLGD1-HA und Markierung der endosomalen Marker in HeLa Zellen. Oben links ist das transzierte Konstrukt schematisch dargestellt. A-C: Übersicht vom exprimierten hLGD1-HA mit der jeweiligen Färbung der endosomalen Marker. Die weißen Rechtecke kennzeichnen, welche Bereiche in D-L vergrößert wurden. Die Ausschnitte aus A und C wurden zusätzlich um 90° gedreht. D-F: vergrößerter Ausschnitt, welcher die Färbung der endosomalen Marker, sowie die HA- und Kernfärbung zeigt. G: vergrößerter Ausschnitt der RAB5 Färbung. Der weiße Pfeil in D deutet auf ein stark vergrößertes RAB5 positives Endosom, welches allerdings nicht hLGD1 positiv ist. H: vergrößerter Ausschnitt der RAB7 Färbung. I: vergrößerter Ausschnitt der LAMP1 Färbung. J-L: vergrößerter Ausschnitt der HA Färbung der hLGD1-HA exprimierenden Zellen. Der gelbe Pfeil deutet auf die hLGD1 positiven Vesikel. Die pinken Pfeile in E, J und K kennzeichnen die hLGD1 markierten RAB7 positiven Vesikel. Es sind vergrößerte LAMP1 markierte Vesikel zu beobachten (F, I, türkise Pfeile). hLGD1 positive Vesikel sind mit RAB7 aber nicht mit den anderen endosomalen Markern assoziiert. Somit sind die hLGD1 markierten Vesikel späte Endosomen.

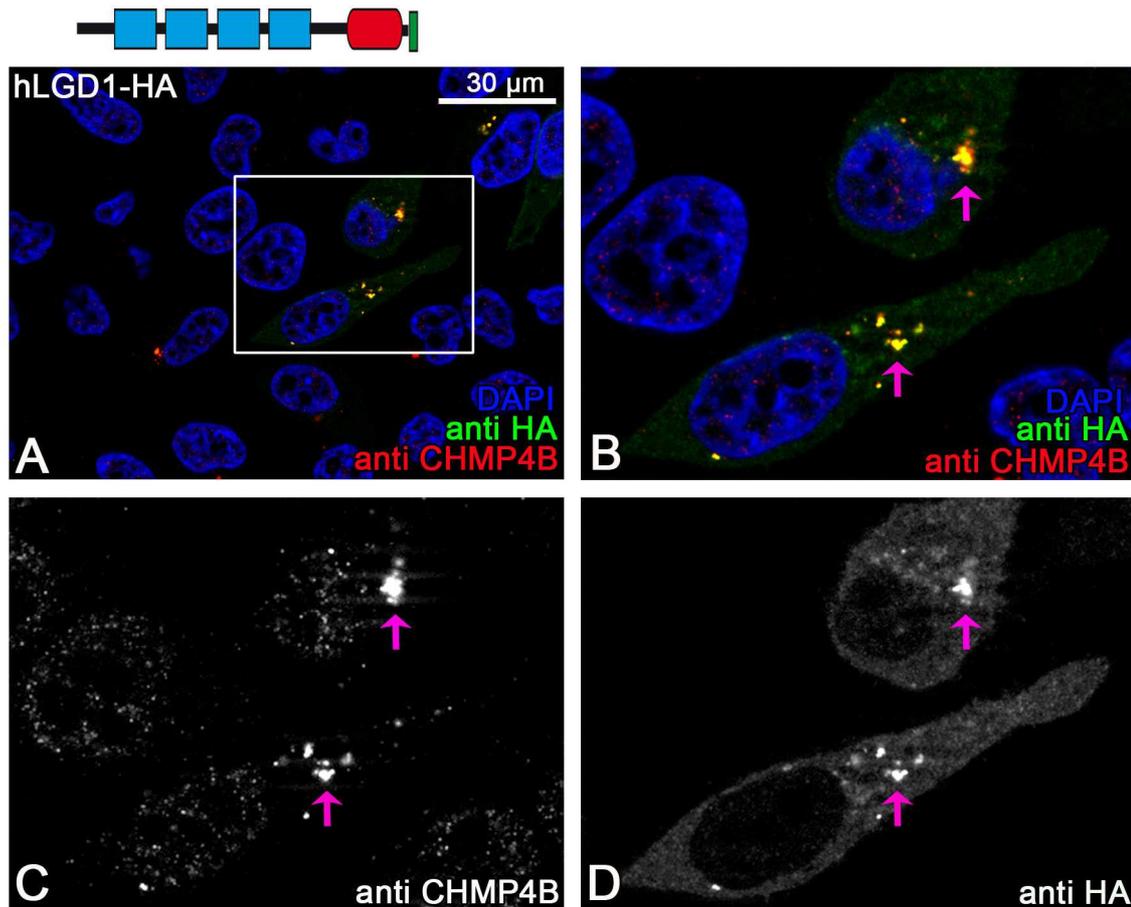


Abb. 2.20: Expression von hLGD1-HA und Markierung von CHMP4B in HeLa Zellen. A: Übersicht des exprimierten hLGD1-HA mit der CHMP4B Färbung. Das weiße Rechteck kennzeichnet den vergrößerten Bereich in B-D. B: vergrößerter Ausschnitt, welcher die CHMP4B Färbung, sowie die HA- und Kernfärbung kennzeichnet. C: CHMP4B Färbung. D: HA Färbung. Die hLGD1 positiven Vesikel sind auch mit CHMP4B markiert (pinke Pfeile).

Die Untersuchung mit der CHMP4B Färbung zeigt, dass die hLGD1-HA positiven Vesikel mit CHMP4B assoziiert sind (s. Abb. 2.20 B-D, pinke Pfeile). Die hLGD1 markierten Vesikel, die auch CHMP4B positiv sind, sind auch gleichzeitig RAB7 positiv (s. Abb. 2.20 B und Abb. 2.19 E). In den transfizierten Zellen scheint ein Teil der CHMP4B positiven Vesikel auch größer zu sein, als in nicht transfizierten Zellen (s. Abb. 2.20 C im Vergleich zu Abb. 2.18 C).

Diese Ergebnisse zeigen eine Assoziation von hLGD1 mit spät endosomalen Kompartimenten, sowie auch gleichzeitig mit CHMP4B. Die Expression mit hLGD1 scheint zudem den spät endosomalen/lysosomalen Transportweg in den Zellen zu beeinflussen.

2.4.2.2 hLGD2 ist ebenfalls an späten Endosomen mit CHMP4B assoziiert

Die Expression von hLGD2-HA in HeLa Zellen zeigt, wie auch bei der endogenen Markierung von hLGD2, dass hLGD2-HA mit Vesikeln assoziiert ist (s. Abb. 2.21 J-L). Im Gegensatz zur endogenen hLGD2 Lokalisation ist bei der Überexpression von hLGD2-HA keine Kernlokalisation von hLGD2-HA zu erkennen (s. Abb. 2.21 J-L). Die Lokalisation von hLGD2 ist je nach Zelle rein vesikulär (s. Abb. 2.21 J) oder aber auch vesikulär und diffus im Cytoplasma verteilt (s. Abb. 2.21 K, L). Möglicherweise spielt hierbei die Stärke oder die Zeit nach der Transfektion eine Rolle.

Eine Analyse der hLGD2 positiven Vesikel mit RAB5 zeigt, dass diese nicht mit RAB5 markiert sind (s. Abb. 2.21 D). Jedoch sind die hLGD2 markierten Vesikel mit RAB7 assoziiert (s. Abb. 2.21 E). Die hLGD2 positiven Vesikel sind also wie auch die hLGD1 positiven Vesikel, späte Endosomen. Die RAB7 Verteilung scheint im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen neben der vesikulären Verteilung auch diffus im Cytoplasma vorzuliegen (s. Abb. 2.21 H).

Die hLGD2-HA positiven Vesikel sind nicht mit LAMP1 assoziiert (s. Abb. 2.21 F) und somit keine Lysosomen. In der LAMP1 Färbung der transfizierten Zellen ist, wie auch bei der Expression von hLGD1-HA erkennbar, dass sich im Vergleich zu wildtypischen Zellen größere LAMP1 positive Vesikel zu bilden scheinen (s. Abb. 2.21 F, türkise Pfeile im Vergleich zu 2.17 F).

Die hLGD2 positiven Vesikel sind zudem mit CHMP4B assoziiert (s. Abb. 2.22 B-D). Diese hLGD2 und CHMP4B markierten Vesikel sind ebenfalls RAB7 positiv (s. Abb. 2.21 H, K). In diesen Zellen scheinen die CHMP4B und hLGD2-HA positiven Vesikel auch größer zu sein als die CHMP4B positiven Vesikel in wildtypischen Zellen (s. Abb. 2.22 C im Vergleich zu 2.18 C).

Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass hLGD2 mit späten Endosomen und mit CHMP4B assoziiert ist. Des Weiteren hat die Expression von hLGD2 möglicherweise auch einen Einfluss auf den spät endosomal/lysosomalen Transportweg, da vergrößerte RAB7 und LAMP1 Endosomen auftreten.

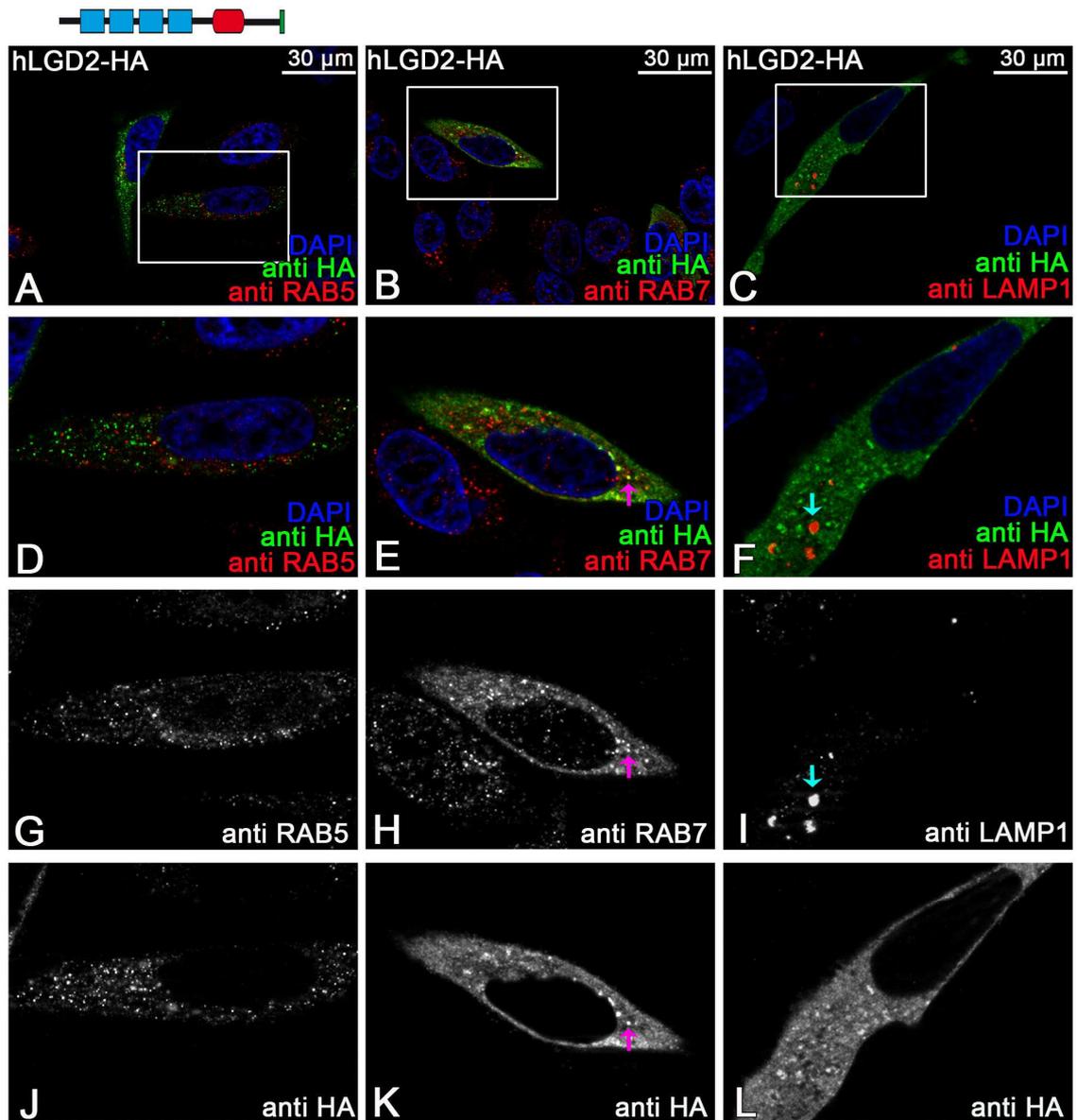


Abb. 2.21: Expression von hLGD2-HA und Markierung der endosomalen Marker in HeLa Zellen. A-C: Übersicht vom exprimierten hLGD2-HA mit der jeweiligen Färbung der endosomalen Marker. Die weißen Rechtecke kennzeichnen, welche Bereiche in D-L vergrößert wurden. D-F: vergrößerter Ausschnitt, welcher die Färbung der endosomalen Marker, sowie die HA- und Kernfärbung zeigt. G: vergrößerter Ausschnitt der RAB5 Färbung. H: vergrößerter Ausschnitt der RAB7 Färbung. Die RAB7 Färbung scheint neben der vesikulären Verteilung auch diffus im Cytoplasma verteilt zu sein. I: vergrößerter Ausschnitt der LAMP1 Färbung. LAMP1 scheint im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen mit größeren Vesikeln assoziiert zu sein (türkise Pfeile). J-L: vergrößerter Ausschnitt der HA Färbung der hLGD2-HA exprimierenden Zellen. hLGD2 positive Vesikel sind mit RAB7 assoziiert und sind somit späte Endosomen.

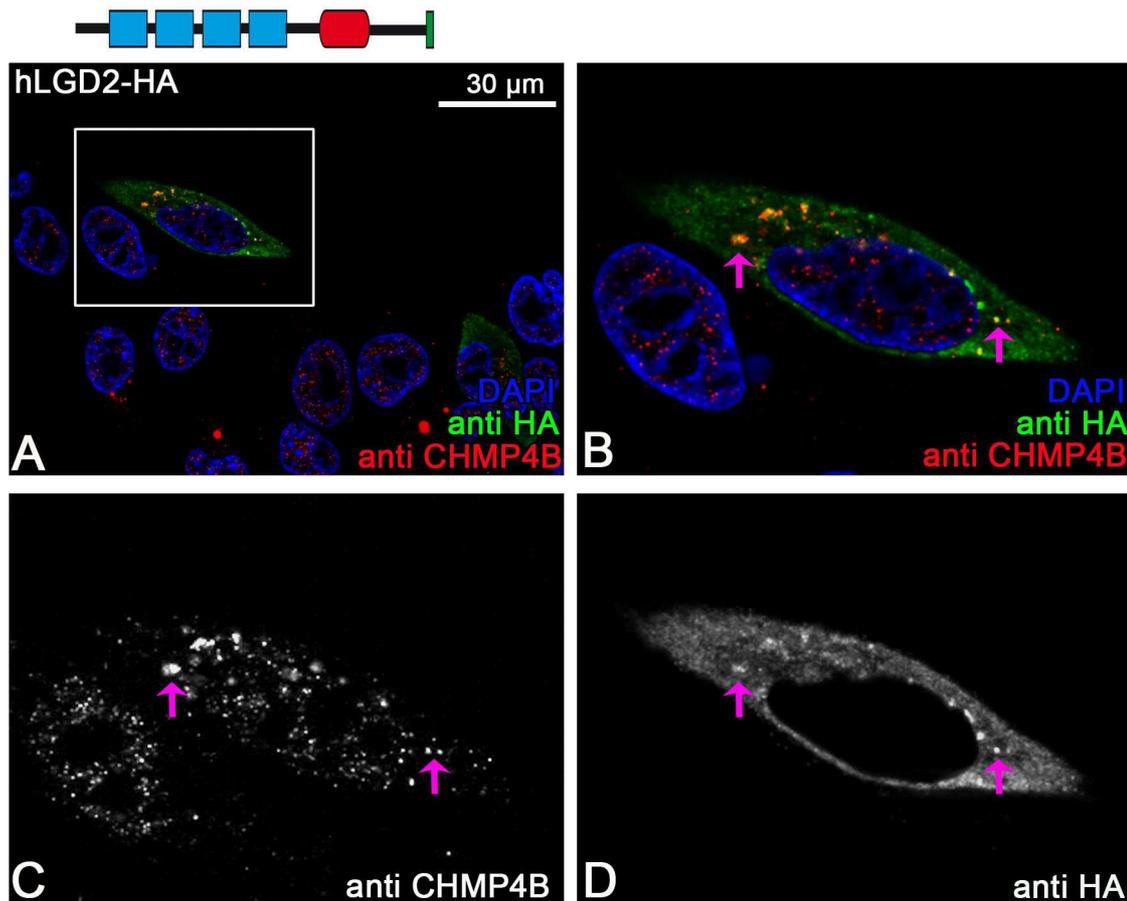


Abb. 2.22: Expression von hLGD2-HA und Markierung von CHMP4B in HeLa Zellen. A: Übersicht des exprimierten hLGD2-HA mit der CHMP4B Färbung. Das weiße Rechteck kennzeichnet den vergrößerten Bereich in B-D. B: vergrößerter Ausschnitt, welcher die CHMP4B Färbung, sowie die HA- und Kernfärbung markiert. C: CHMP4B Färbung. D: HA Färbung. Die hLGD2 positiven Vesikel sind mit CHMP4B assoziiert (pinke Pfeile).

2.4.2.3 hLGD2 ohne verlängerten C-Terminus assoziiert nicht mit CHMP4B oder endosomalen Markern

Da sowohl hLGD1 als auch hLGD2 positive Vesikel mit RAB7 und CHMP4B assoziiert sind, wurde als nächstes das Konstrukt *hLGD2ΔC815-HA* getestet. Diesem fehlt die Verlängerung des C-terminalen Bereichs von hLGD2 und nun wurde untersucht, ob es ebenfalls mit CHMP4B und RAB7 assoziiert oder ob die Verlängerung des C-Terminus irgendeinen Einfluss auf diese Assoziation hat.

hLGD2ΔC815-HA ist ebenfalls punktuell im Cytoplasma lokalisiert (s. Abb. 2.23 J-L). Diese *hLGD2ΔC815-HA* positiven Vesikel sind mit keinen der getesteten endosomalen Markern assoziiert (s. Abb. 2.23 D-F). Es ist ebenfalls keine Assoziation von *hLGD2ΔC815-HA* mit CHMP4B erkennbar (s. Abb. 2.24 F).

Die *hLGD2ΔC815-HA* positiven Vesikel sind weder mit dem frühen oder dem spät endosomalen/lysosomalen Transportweg noch mit dem ESCRT-III Protein CHMP4B assoziiert. Demzufolge verhält sich *hLGD2ΔC815-HA* anders als *hLGD2-HA* und

hLGD1-HA und die Verlängerung des C-Terminus von hLGD2 spielt möglicherweise eine Rolle bei der Assoziation von hLGD2 mit RAB7 und CHMP4B.

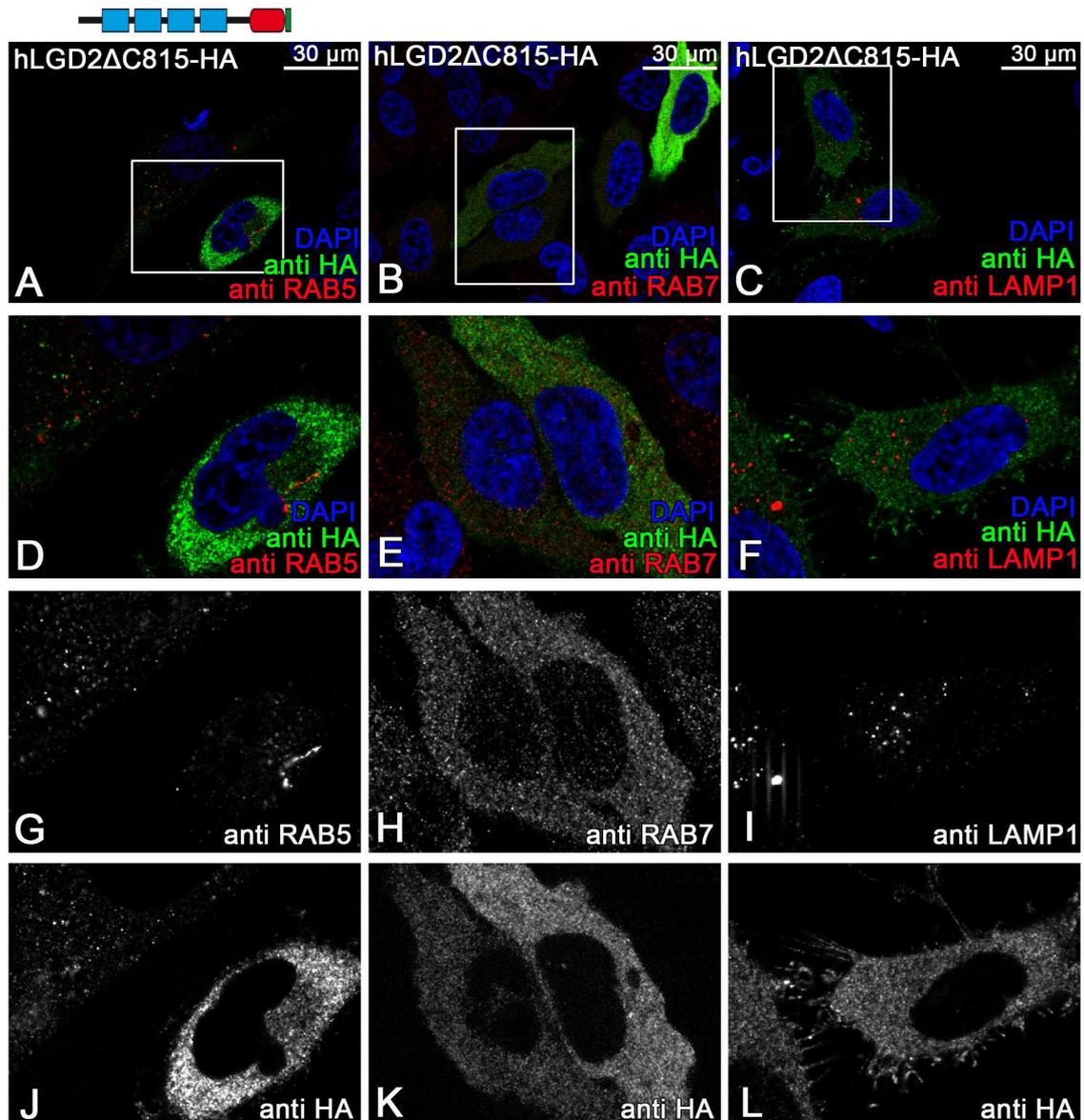


Abb. 2.23: Expression von hLGD2 Δ C815-HA und Markierung der endosomalen Marker in HeLa Zellen. A-C: Übersicht vom exprimierten hLGD2 Δ C815-HA mit der jeweiligen Färbung der endosomalen Marker. D-F: vergrößerter Ausschnitt, welcher die Färbung der endosomalen Marker sowie die HA- und Kernfärbung kennzeichnet. G: vergrößerter Ausschnitt der RAB5 Färbung. H: vergrößerter Ausschnitt der RAB7 Färbung. I: vergrößerter Ausschnitt der LAMP1 Färbung. J-L: vergrößerter Ausschnitt der HA Färbung der hLGD2 Δ C815-HA exprimierenden Zellen. hLGD2 Δ C815-HA positive Vesikel sind nicht mit endosomalen Markern assoziiert.

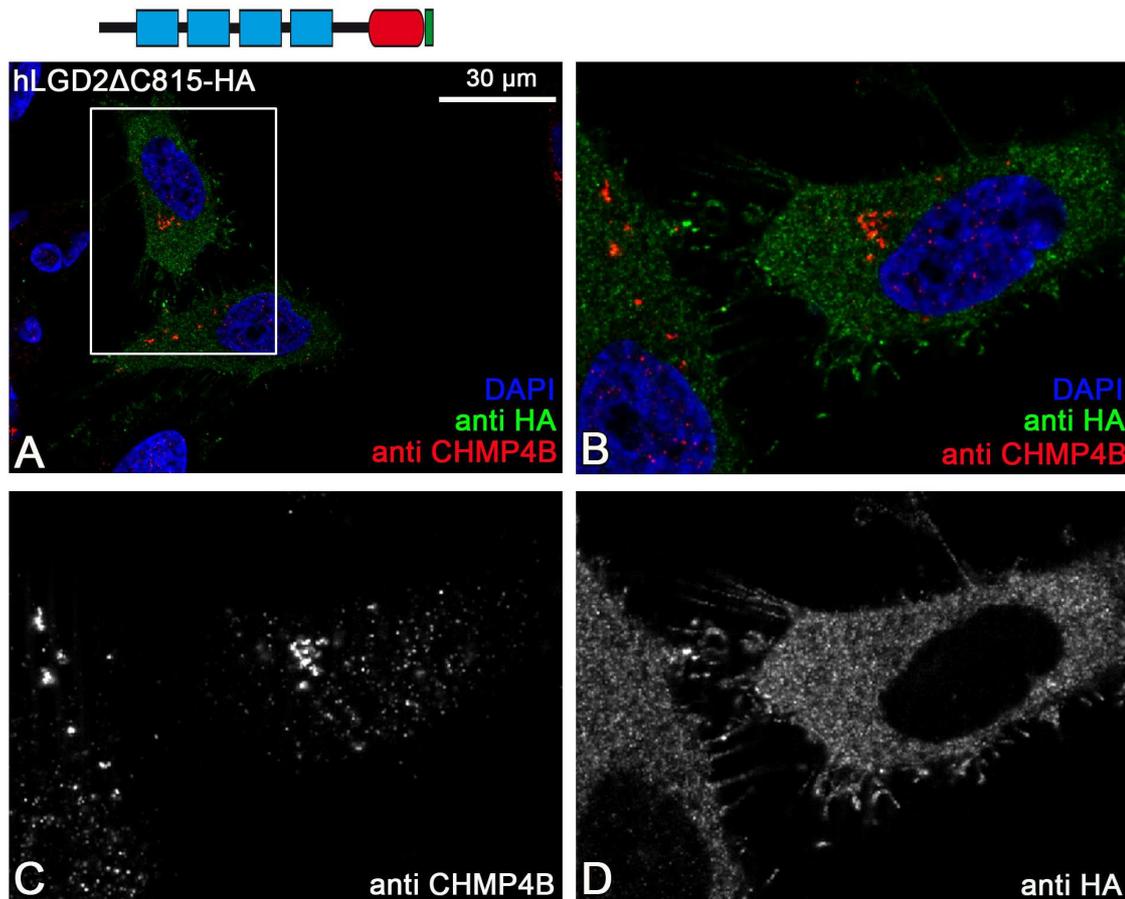


Abb. 2.24: Expression von hLGD2 Δ C815-HA und Markierung von CHMP4B in HeLa Zellen. A: Übersicht des exprimierten hLGD2 Δ C815-HA mit der CHMP4B Färbung. Das weiße Rechteck kennzeichnet den vergrößerten Bereich in B-D. Der Ausschnitt wurde um 90° gedreht. B: vergrößertes Ausschnitt, welcher die CHMP4B Färbung sowie die HA- und Kernfärbung zeigt. C: CHMP4B Färbung. D: HA Färbung. Keine Assoziation von hLGD2 Δ C815-HA CHMP4B.

2.4.2.4 Analyse der DM14 Domänen in HeLa Zellen

hLGD1 Δ DM14(1-2) und hLGD1 Δ DM14(3-4) sind mit CHMP4B assoziiert

Zur Charakterisierung der DM14 Domänen wurden zunächst hLGD1-Konstrukte untersucht, welche nur noch zwei DM14 Domänen besitzen. Dadurch konnte analysiert werden, ob zwei DM14 Domänen für eine Assoziation mit CHMP4B und RAB7 ausreichen.

Die Expression von hLGD1 Δ DM14(1-2)-HA zeigt, dass hLGD1 Δ DM14(1-2)-HA sowohl an Vesikeln als auch diffus im Cytoplasma lokalisiert ist (s. Abb. 2.25 J-L). Die hLGD1 Δ DM14(1-2)-HA positiven Vesikel sind nicht mit RAB5 markiert (s. Abb. 2.25 D). Allerdings scheinen sie an einigen Stellen sowohl mit RAB7 als auch mit LAMP1 zu assoziiert zu sein (s. Abb. 2.25 E, F, pinke Pfeile). Es sieht jedoch so aus als ob dies nur bei den größeren der hLGD1 Δ DM14(1-2)-HA positiven Vesikeln der Fall ist.

Auch hLGD1 Δ DM14(3-4)-HA sind sowohl an Vesikeln als auch diffus im Cytoplasma lokalisiert. Ebenfalls scheint auch hier eine diffuse Kernlokalisierung des Proteins vorzuliegen. (s. Abb. 2.26 J-L). Die hLGD1 Δ DM14(3-4)-HA positiven Vesikel sind weder RAB5 (s. Abb. 2.26 D), RAB7 (s. Abb. 2.26 E) noch LAMP1 (s. Abb. 2.26 F) positiv.

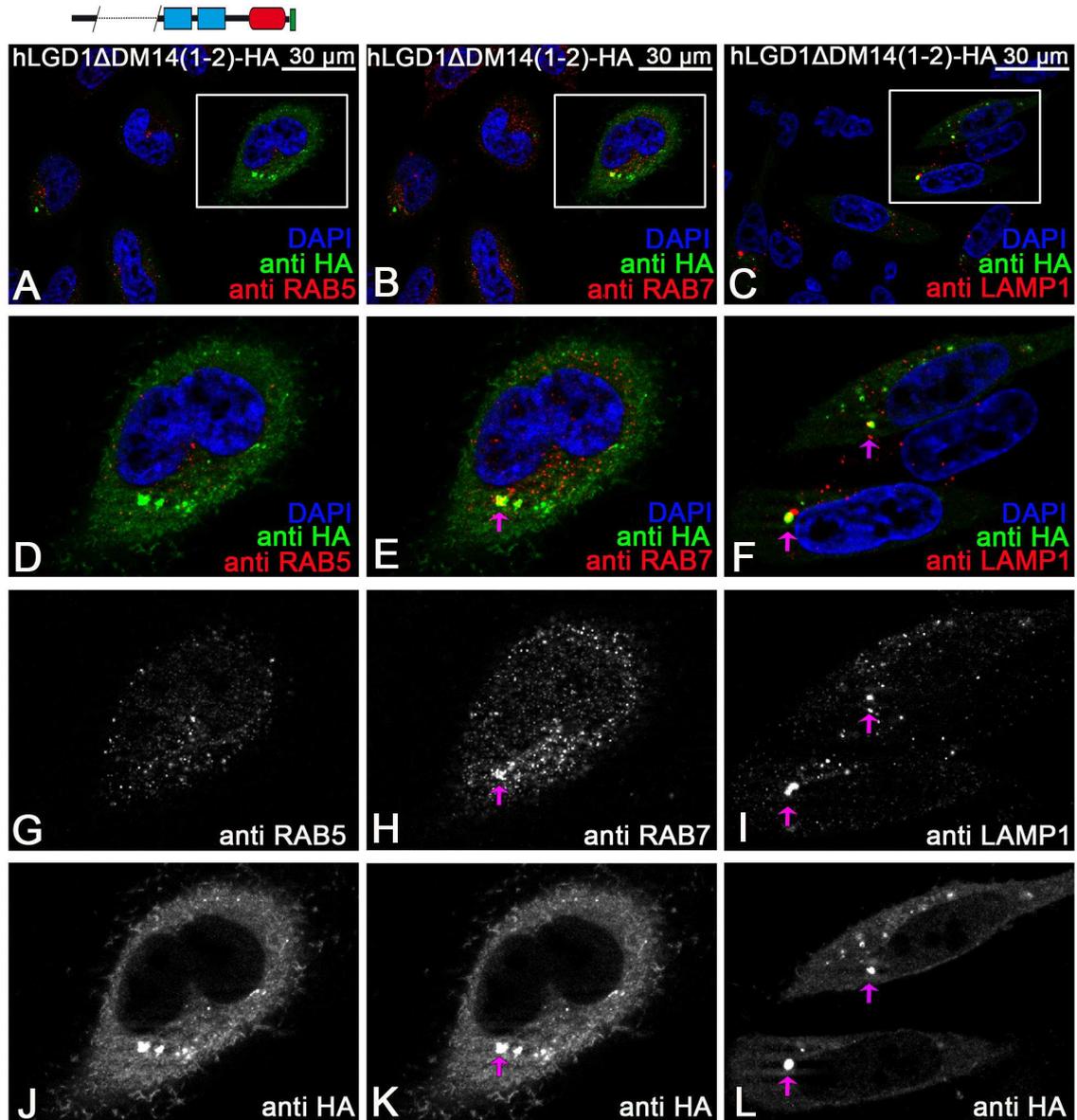


Abb. 2.25: Expression von hLGD1 Δ DM14(1-2)-HA und Markierung der endosomalen Marker in HeLa Zellen. A-C: Übersicht des exprimierten hLGD1 Δ DM14(1-2)-HA mit der jeweiligen Färbung der endosomalen Marker. D-F: vergrößerter Ausschnitt, welcher die Färbung der endosomalen Marker oder von CHMP4B sowie die HA- und Kernfärbung zeigt. G: vergrößerter Ausschnitt der RAB5 Färbung. H: vergrößerter Ausschnitt der RAB7 Färbung. I: vergrößerter Ausschnitt der LAMP1 Färbung. J-L: vergrößerter Ausschnitt der HA Färbung der hLGD1 Δ DM14(1-2)-HA exprimierenden Zellen. hLGD1 Δ DM14(1-2)-HA positive Vesikel scheinen teilweise mit RAB7 und LAMP1 assoziiert zu sein.

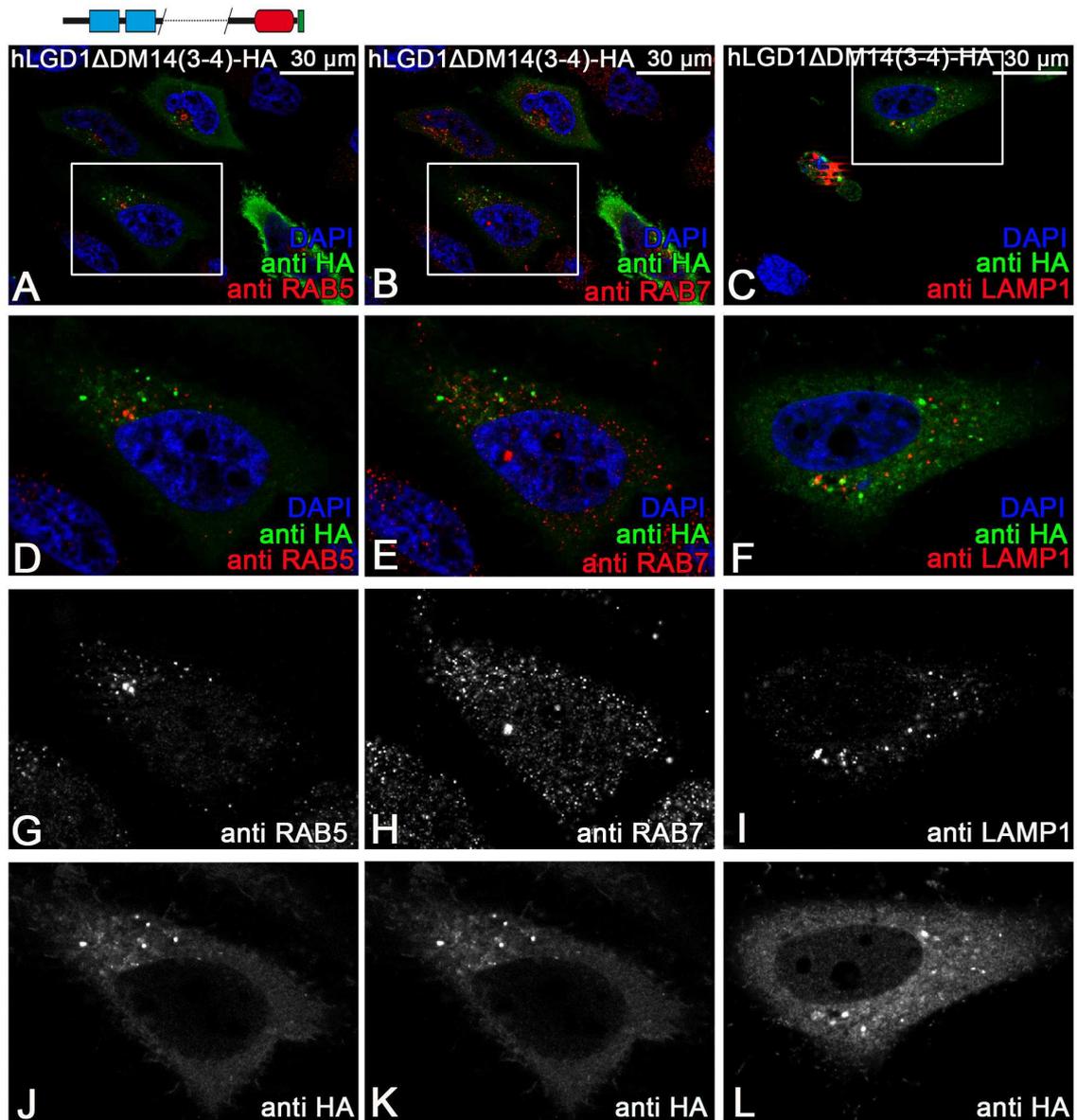


Abb. 2.26: Expression von hLGD1 Δ DM14(3-4)-HA und Markierung der endosomalen Marker in HeLa Zellen. A-C: Übersicht des exprimierten hLGD1 Δ DM14(3-4)-HA mit der jeweiligen Färbung der endosomalen Marker. D-F: vergrößerter Ausschnitt, welcher die Färbung der endosomalen Marker sowie die HA- und Kernfärbung kennzeichnet. G: vergrößerter Ausschnitt der RAB5 Färbung. H: vergrößerter Ausschnitt der RAB7 Färbung. I: vergrößerter Ausschnitt der LAMP1 Färbung. J-L: vergrößerter Ausschnitt der HA Färbung der hLGD1 Δ DM14(3-4)-HA exprimierenden Zellen. hLGD1 Δ DM14(3-4)-HA positive Vesikel sind nicht mit den untersuchten endosomalen Markern assoziiert.

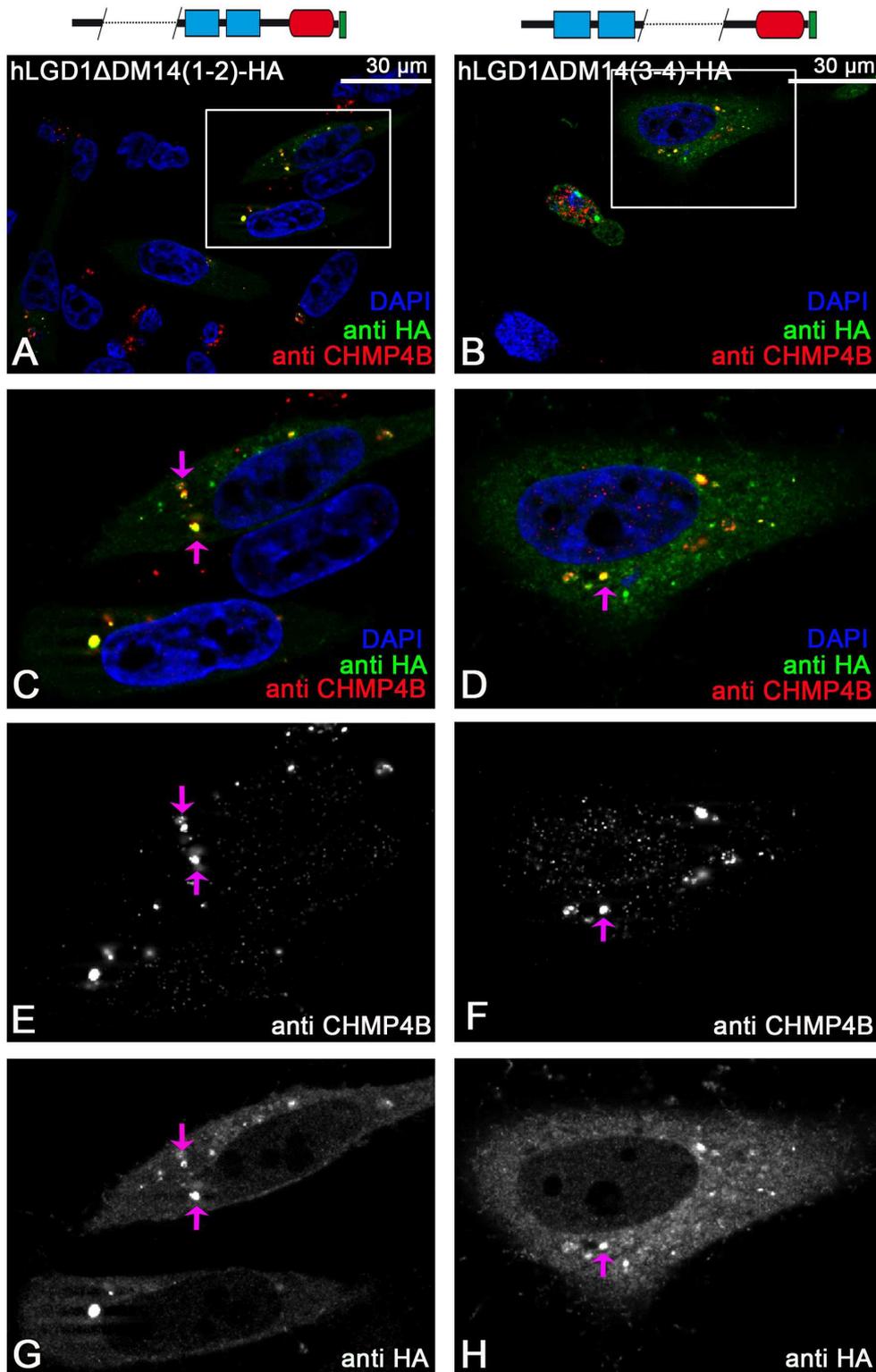


Abb. 2.27: Expression von hLGD1 Δ DM14(1-2)-HA und von hLGD1 Δ DM14(3-4)-HA sowie die Markierung von CHMP4B in HeLa Zellen. A-B: Übersicht der exprimierten hLGD1 Konstrukte mit nur zwei DM14 Domänen sowie der Kern- und CHMP4B Färbung. C-D: vergrößerter Ausschnitt, welcher die Färbung von CHMP4B sowie die HA- und Kernfärbung markiert. E-F: vergrößerter Ausschnitt der CHMP4B Färbung. G: vergrößerter Ausschnitt der HA Färbung der hLGD1 Δ DM14(1-2)-HA exprimierenden Zellen. H: vergrößerter Ausschnitt der HA Färbung der hLGD1 Δ DM14(3-4)-HA exprimierenden Zellen. Sowohl hLGD1 Δ DM14(1-2)-HA als auch hLGD1 Δ DM14(3-4)-HA markierte Vesikel sind mit CHMP4B assoziiert (pinke Pfeile).

Die Vesikel, welche mit hLGD1 Δ DM14(1-2)-HA assoziiert sind, sind auch CHMP4B positiv (s. Abb. 2.27 C, pinke Pfeile). hLGD1 Δ DM14(3-4)-HA markierte Vesikel sind ebenfalls mit CHMP4B assoziiert (s. Abb. 2.27 D, pinke Vesikel). In den transfizierten Zellen scheint es vergrößerte CHMP4B positive Vesikel zu geben im Vergleich zu der nicht transfizierten Kontrolle (s. Abb. 2.27 E, F im Vergleich zu 2.18 C).

Bei der Analyse von hLGD1 mit nur zwei DM14 Domänen fällt auf, dass je nachdem welche DM14 Domänen deletiert wurden, sich Unterschiede zwischen den DM14 Domänen gezeigt haben. Wenn die ersten beiden DM14 Domänen deletiert wurden, ist vereinzelt eine Assoziation mit späten Endosomen und Lysosomen erkennbar. Letzteres steht im Gegensatz zu der Analyse der hLGD1 positiven Vesikel, diese zeigen keine Assoziation mit Lysosomen. Fehlen hingegen die letzten beiden DM14 Domänen ist keine Assoziation mit dem endosomalen und lysosomalen Transport nachweisbar. Die Vesikel, welche mit hLGD1 Δ DM14(1-2)-HA oder hLGD1 Δ DM14(3-4)-HA assoziiert sind, sind allerdings CHMP4B positiv. In diesem Punkt verhalten sich hLGD1 Δ DM14(1-2)-HA und hLGD1 Δ DM14(3-4)-HA wie hLGD1-HA und für eine Assoziation mit CHMP4B reichen zwei DM14 Domänen von hLGD1 aus.

Die Expression von hLGD2 Δ DM14-HA führt zu stark vergrößerten Vesikeln

Die hLGD1 Konstrukte mit nur zwei DM14 Domänen assoziieren immer noch mit CHMP4B. Als nächstes wurden hLGD Konstrukte analysiert, denen alle DM14 Domänen deletiert wurden. Damit sollte festgestellt werden, ob diese auch noch mit CHMP4B assoziieren können.

Es ist zu erkennen, das hLGD1 Δ DM14-HA vesikulär und diffus im Cytoplasma lokalisiert ist (s. Abb. 2.28 J-L). Jedoch ist keine Assoziation von hLGD1 Δ DM14-HA mit RAB5 erkennbar (s. Abb. 2.28 D). Außerdem besteht weder eine Assoziation von hLGD1 Δ DM14-HA mit RAB7 oder LAMP1 (s. Abb. 2.28 E, F). Die LAMP1 Färbung sieht jedoch im Vergleich zur untransfizierten Kontrolle nicht mehr ausschließlich vesikulär aus, sondern scheint zudem diffus im Cytoplasma verteilt vorzuliegen (s. Abb. 2.28 F im Vergleich zu Abb. 2.17 H).

hLGD1 Δ DM14-HA ist möglicherweise mit CHMP4B assoziiert (s. Abb. 2.29 B). Allerdings scheint in diesen Fällen hLGD1 Δ DM14-HA eher diffus im Cytoplasma verteilt zu sein (s. Abb. 2.29 B, D, pinke Pfeile). Aus diesem Grund könnte die erkennbare Assoziation durch die Überlagerung der Färbung zustande kommen und nicht durch eine tatsächliche Assoziation beider Proteine.

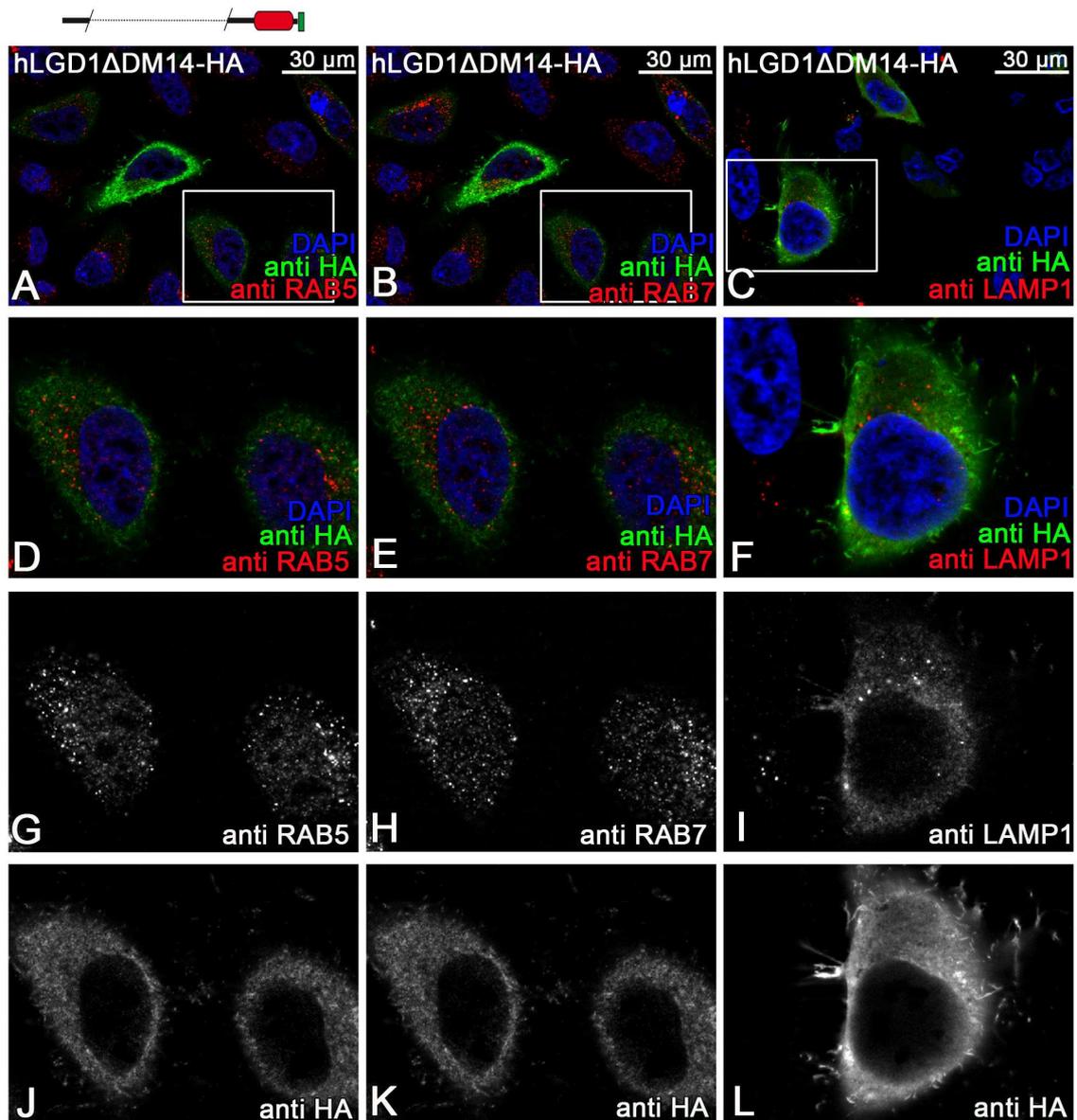


Abb. 2.28: Expression von hLGD1 Δ DM14-HA und Markierung der endosomalen Marker in HeLa Zellen. A-C: Übersicht des exprimierten hLGD1 Δ DM14-HA mit der jeweiligen Färbung der endosomalen Marker. D-F: vergrößerter Ausschnitt der Färbung der endosomalen Marker sowie der HA- und Kernfärbung. G: vergrößerter Ausschnitt der RAB5 Färbung. H: vergrößerter Ausschnitt der RAB7 Färbung. I: vergrößerter Ausschnitt der LAMP1 Färbung. J-L: vergrößerter Ausschnitt der HA Färbung der hLGD1 Δ DM14-HA exprimierenden Zellen. Die hLGD1 Δ DM14 markierten Vesikel scheinen mit keinem der endosomalen Marker zu assoziieren.

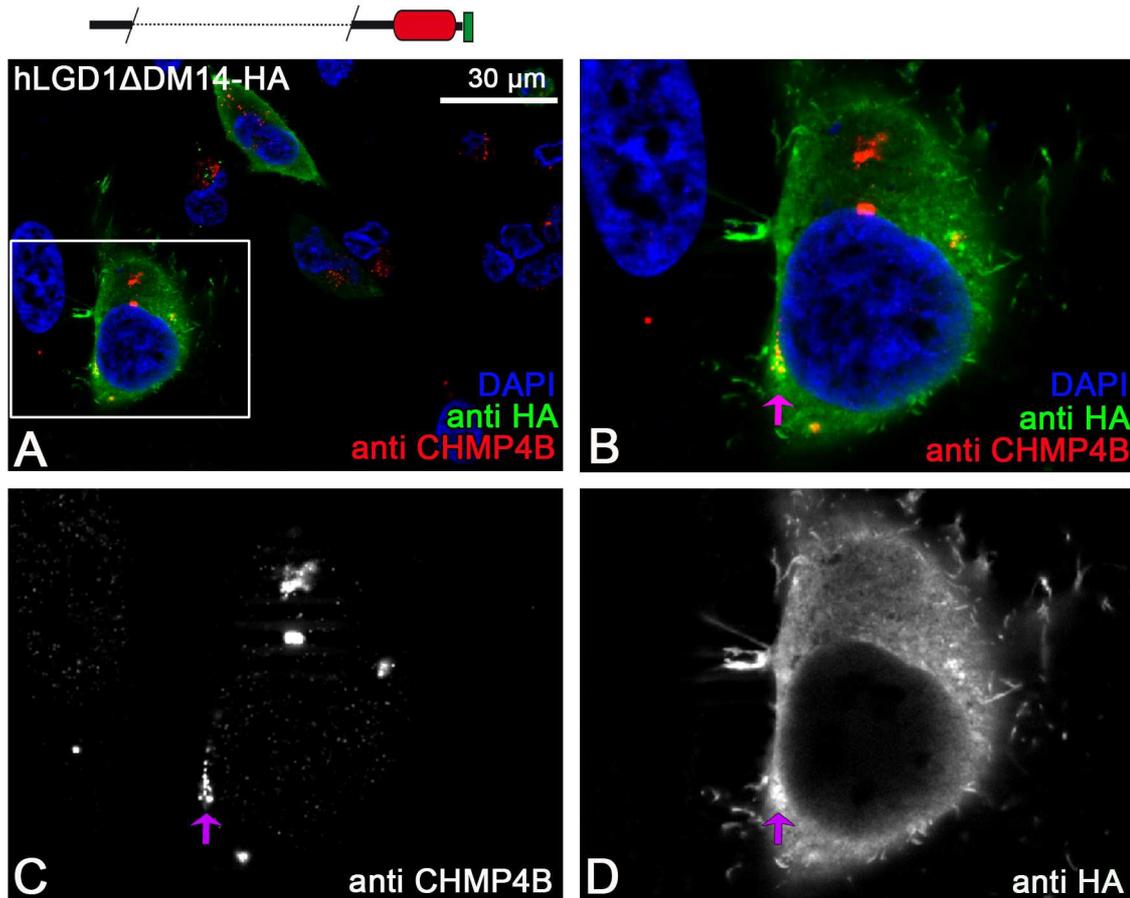


Abb. 2.29: Expression von hLGD1 Δ DM14-HA und Markierung von CHMP4B in HeLa Zellen. A: Übersicht des exprimierten hLGD1 Δ DM14-HA mit der CHMP4B Färbung. Das weiße Rechteck kennzeichnet den vergrößerten Bereich in B-D. B: vergrößertes Ausschnitt, welcher die CHMP4B Färbung sowie die HA- und Kernfärbung zeigt. C: CHMP4B Färbung. D: HA Färbung. hLGD1 Δ DM14-HA scheint nicht wirklich mit CHMP4B zu assoziieren (pinke Pfeile).

hLGD2 Δ DM14-HA ist cytoplasmatisch lokalisiert (s. Abb. 2.30 J-L). Besonders auffällig sind jedoch mehrere stark vergrößerte runde Vesikel, in denen das Lumen der Vesikel erkennbar ist und an deren Membran hLGD2 Δ DM14-HA lokalisiert ist (s. Abb. 2.30 J-L, pinke Pfeile).

Diese vergrößerten Vesikel sind nicht mit RAB5 markiert (s. Abb. 2.30 D, G, pinke Pfeile). Eine Färbung mit dem spät endosomalen Marker RAB7 zeigt auch keine Assoziation mit RAB7 an den stark vergrößerten Vesikeln (s. Abb. 2.30 E, H, pinke Pfeile). Es scheint jedoch diffus im Cytoplasma verteilt zu sein als in wildtypischen Zellen (s. Abb. 2.30 H im Vergleich zu 2.17 H). Allerdings sind die vergrößerten hLGD2 Δ DM14-HA positiven Vesikel mit LAMP1 assoziiert (s. Abb. 2.30 F, pinke Pfeile). Dabei scheint LAMP1 eher diffus im Cytoplasma verteilt zu sein, abgesehen von den vergrößerten hLGD2 Δ DM14-HA positiven Vesikeln (s. Abb. 2.30 I). Die Färbung mit CHMP4B weist keine Assoziation von hLGD2 Δ DM14-HA mit CHMP4B nach, auch nicht an den vergrößerten Vesikeln (s. Abb. 2.31 B).

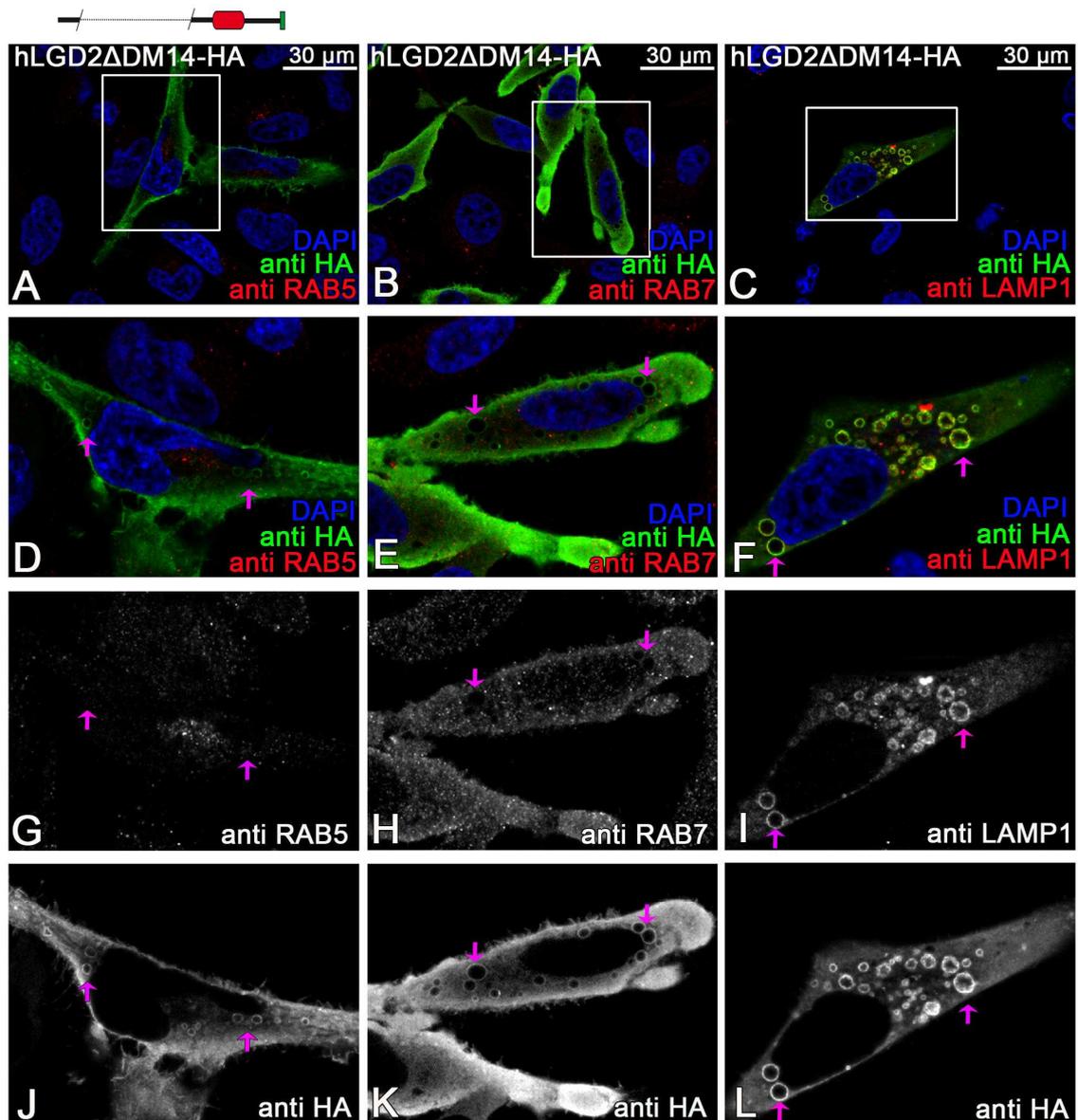


Abb. 2.30: Expression von hLGD2 Δ DM14-HA und Markierung der endosomalen Marker in HeLa Zellen. A-C: Übersicht des exprimierten hLGD2 Δ DM14-HA mit der jeweiligen Färbung der endosomalen Marker. D-F: vergrößerter Ausschnitt, welcher die Färbung der endosomalen Marker sowie die HA- und Kernfärbung zeigt. G: vergrößerter Ausschnitt der RAB5 Färbung. H: vergrößerter Ausschnitt der RAB7 Färbung. I: vergrößerter Ausschnitt der LAMP1 Färbung. J-L: vergrößerter Ausschnitt der HA Färbung der hLGD2 Δ DM14-HA exprimierenden Zellen, welche zu stark vergrößerten hLGD2 Δ DM14-HA positiven Vesikeln führt. Diese sind mit LAMP1 markiert, aber nicht mit RAB5 oder RAB7.

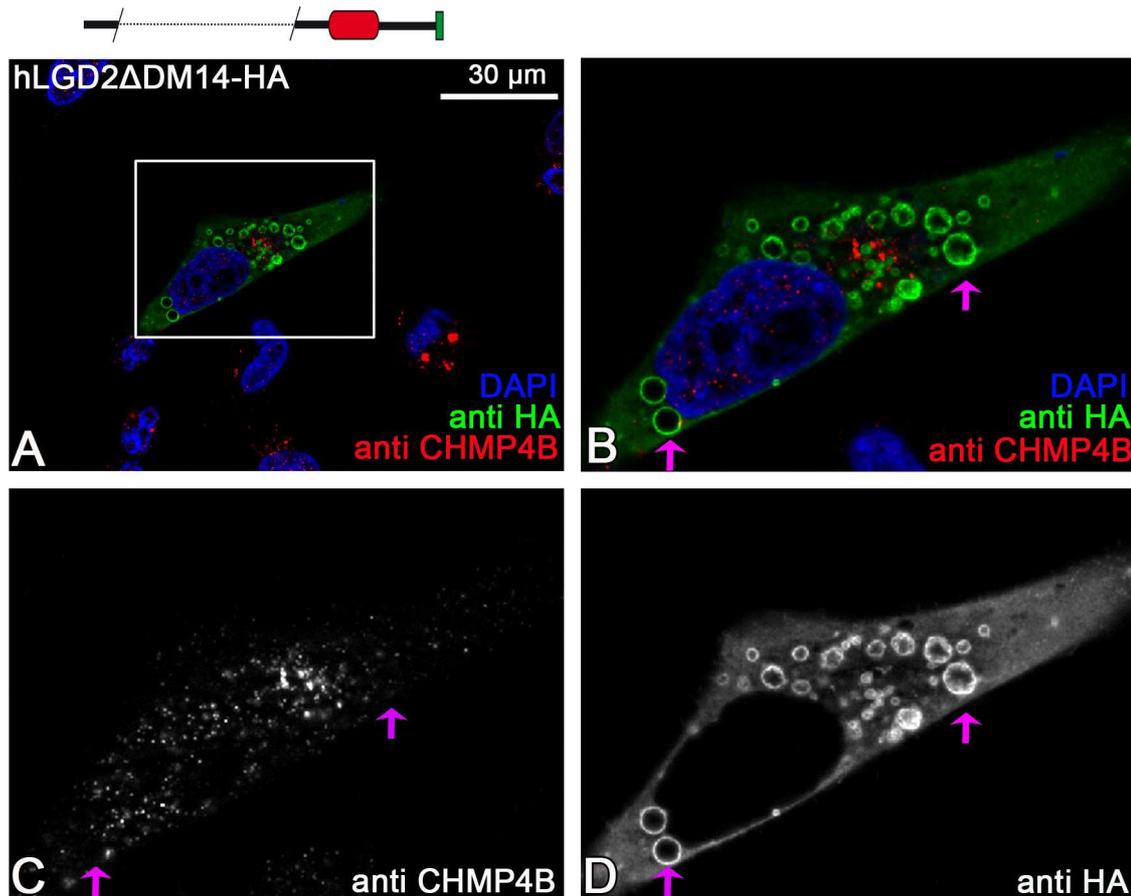


Abb. 2.31: Expression von hLGD2ΔDM14-HA und Markierung von CHMP4B in HeLa Zellen. A: Übersicht des exprimierten hLGD2ΔDM14-HA mit der CHMP4B Färbung. Das weiße Rechteck kennzeichnet den vergrößerten Bereich in B-D. B: vergrößerter Ausschnitt, welcher die CHMP4B Färbung sowie die HA- und Kernfärbung zeigt. C: CHMP4B Färbung. D: HA Färbung. Die hLGD2ΔDM14-HA positiven Vesikel sind nicht mit CHMP4B assoziiert.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Überexpression von hLGD1ΔDM14-HA und hLGD2ΔDM14-HA den spät endosomalen/lysosomalen Transport beeinflusst, da LAMP1 diffuser im Cytoplasma lokalisiert ist und bei der Überexpression von hLGD2ΔDM14-HA zusätzlich auch noch RAB7. Zudem führt die Überexpression von hLGD2ΔDM14-HA zu einem dominant negativen Effekt, welcher sich durch stark vergrößerte Vesikel zeigt. Diese stark vergrößerten Vesikel sind mit LAMP1 markiert, nicht jedoch mit RAB7, welches ein Hinweis darauf sein könnte, dass dies Lysosomen sind.

2.4.2.5 Analyse der C2 Domäne in HeLa Zellen

Die Expression der hLGDΔC2-HA Konstrukte übt einen dominant negativen Effekt auf den endosomalen Transportweg aus

Des Weiteren wurde analysiert, ob auch die hLGD Konstrukte ohne C2 Domäne einen Effekt auf den endosomalen Transportweg haben.

Die Expression von hLGD1 Δ C2-HA führt zu stark vergrößerten runden Vesikeln (s. Abb. 2.32 J-L). hLGD1 Δ C2-HA ist an der Membran dieser vergrößerten Vesikel (s. Abb. 2.32 J-L, pinke Pfeile) und sonst diffus im Cytoplasma und im Kern lokalisiert (s. Abb. 2.32 J-L).

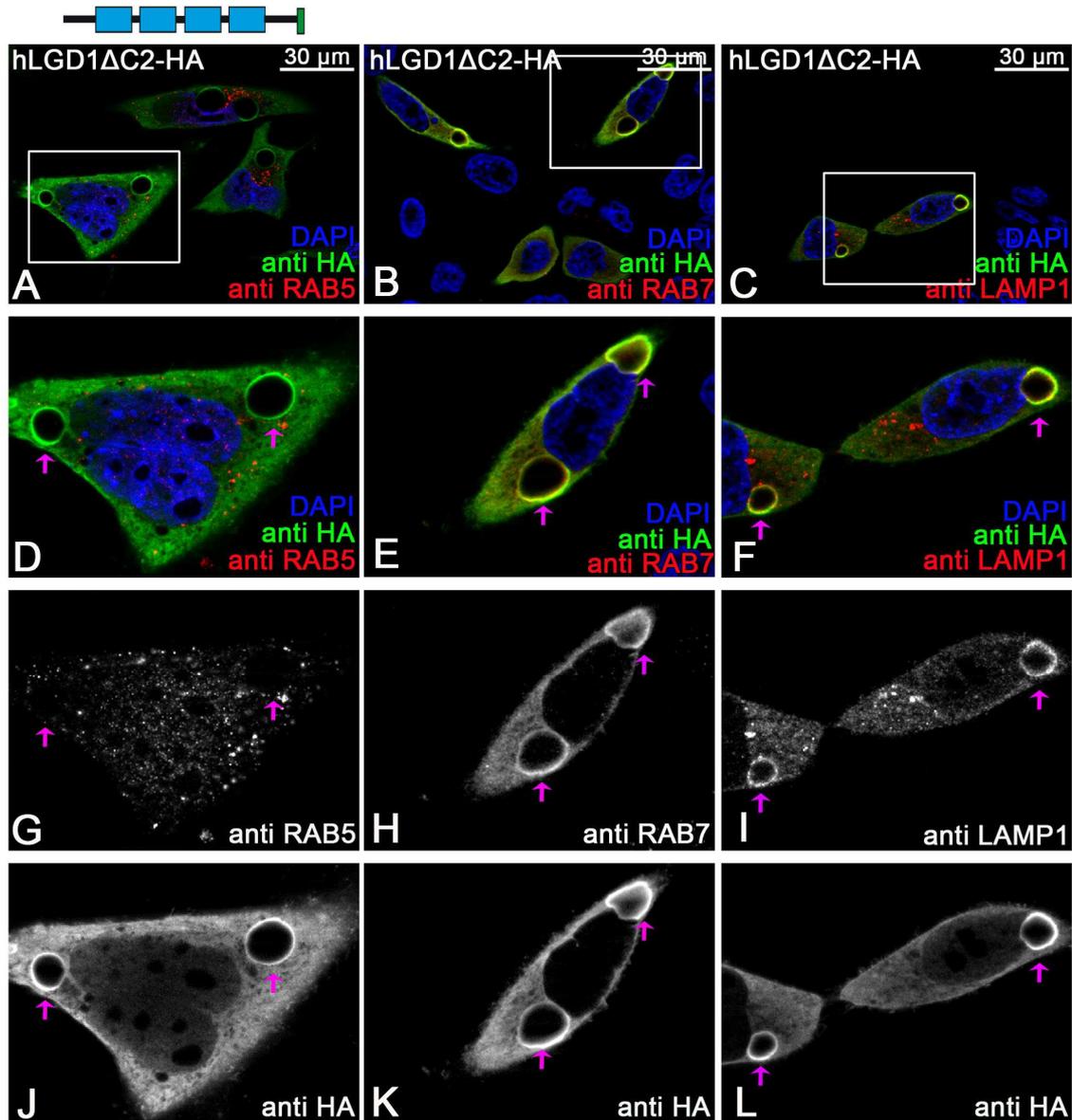


Abb. 2.32: Expression von hLGD1 Δ C2-HA und Markierung der endosomalen Marker in HeLa Zellen. A-C: Übersicht des exprimierten hLGD1 Δ C2-HA mit der jeweiligen Färbung der endosomalen Marker. D-F: vergrößerter Ausschnitt, welcher die Färbung der endosomalen Marker oder von CHMP4B sowie die HA- und Kernfärbung zeigt. G: vergrößerter Ausschnitt der RAB5 Färbung. H: vergrößerter Ausschnitt der RAB7 Färbung. RAB7 scheint diffuser im Cytoplasma lokalisiert zu sein. I: vergrößerter Ausschnitt der LAMP1 Färbung. LAMP1 scheint diffuser im Cytoplasma verteilt zu sein. J-L: vergrößerter Ausschnitt der HA Färbung der hLGD1 Δ C2-HA exprimierenden Zellen, in denen stark vergrößerte hLGD1 Δ C2-HA positive Vesikel zu erkennen sind (pinke Pfeile). Diese sind RAB7 und LAMP1 positiv und somit vermutlich späte Endosomen.

Wie auch die stark vergrößerten Vesikel von hLGD2 Δ DM14-HA sind diese Vesikel nicht RAB5 positiv (s. Abb. 2.32 D, G, pinke Pfeile). Die mit hLGD1 Δ C2-HA markierten Vesikel sind allerdings sowohl mit RAB7 als auch mit LAMP1 assoziiert (s. Abb. 2.32 E, F, H, I, pinke Pfeile). Außerdem ist auffällig, dass sowohl RAB7 als auch LAMP1 wieder diffuser im Cytoplasma verteilt zu sein scheinen (s. Abb. 2.32 H, I). Außerdem wird die Lokalisation von CHMP4B verändert, wenn hLGD1 Δ C2-HA überexprimiert wird. CHMP4B akkumuliert dann zudem in den hLGD1 Δ C2-HA positiven Vesikeln (s. Abb. 2.33 B, pinker Pfeil).

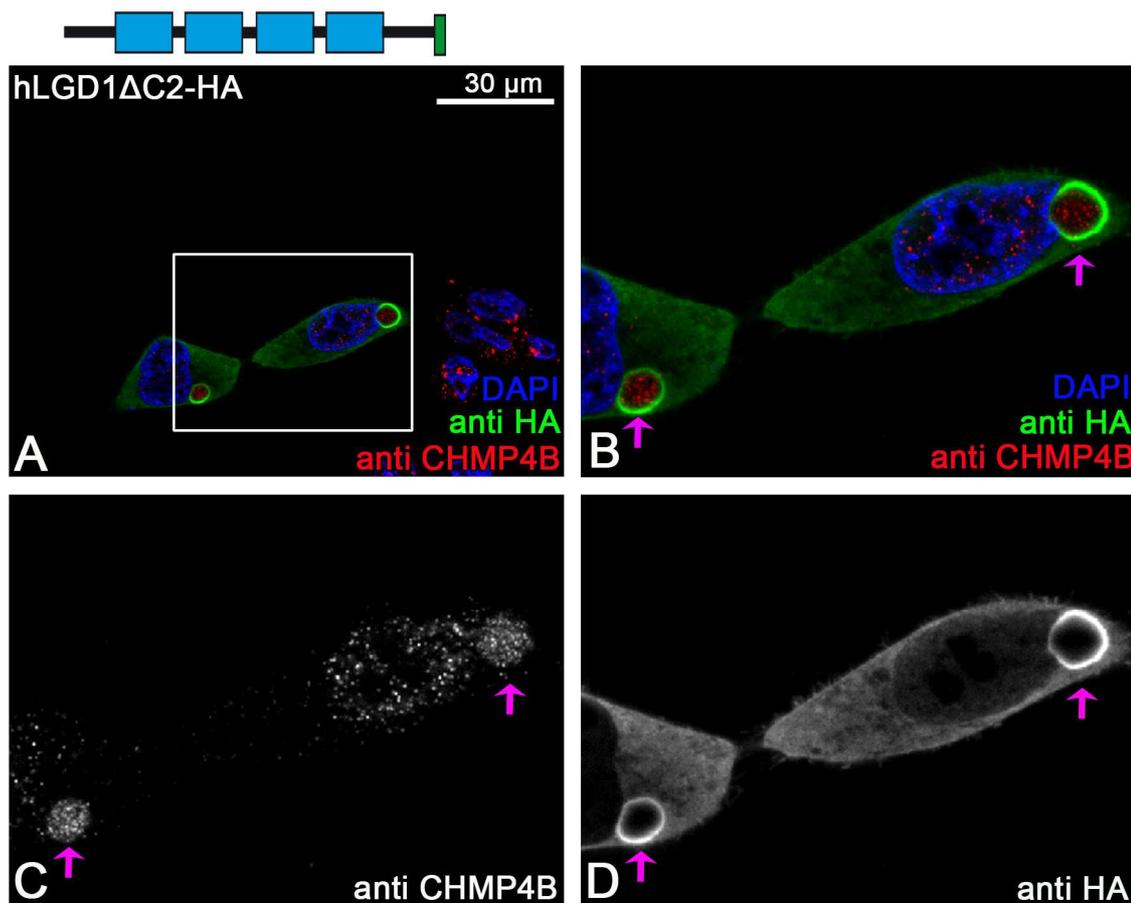


Abb. 2.33: Expression von hLGD1 Δ C2-HA und Markierung von CHMP4B in HeLa Zellen.
 A: Übersicht des exprimierten hLGD1 Δ C2-HA mit der CHMP4B Färbung. Das weiße Rechteck kennzeichnet den vergrößerten Bereich in B-D. B: vergrößerter Ausschnitt, welcher die CHMP4B Färbung sowie die HA- und Kernfärbung zeigt. C: CHMP4B Färbung. D: HA Färbung. Gelbe Pfeile deuten auf die Akkumulation von CHMP4B und die vergrößerten hLGD1 Δ C2-HA markierten Vesikel. CHMP4B akkumuliert in den hLGD1 Δ C2-HA positiven Vesikeln.

Auch wenn hLGD2 Δ C2-HA exprimiert wird, sind stark vergrößerte Vesikel zu erkennen, an deren Membran hLGD2 Δ C2-HA lokalisiert ist. Das restliche Protein ist diffus im Cytoplasma verteilt (s. Abb. 2.34 J-L).

Bei der näheren Analyse mit endosomalen Markern ist erkennbar, dass diese hLGD2 Δ C2-HA positiven Vesikel nicht RAB5 positiv sind (s. Abb. 2.34 D, G, pinke

Pfeile). Allerdings sind sie sowohl RAB7 als auch LAMP1 positiv (s. Abb. 2.34 E, F, H, I, pinke Pfeile). Die LAMP1 Verteilung sieht abgesehen von der Lokalisation an den stark vergrößerten Vesikeln wie bei den nicht transfizierten Zellen aus (s. Abb. 2.34 I im Vergleich zu Abb. 2.17 I). Jedoch scheint die RAB7 Verteilung verändert zu sein, da RAB7 diffuser im Cytoplasma verteilt vorliegt (s. Abb. 2.34 H im Vergleich zu Abb. 2.17 H).

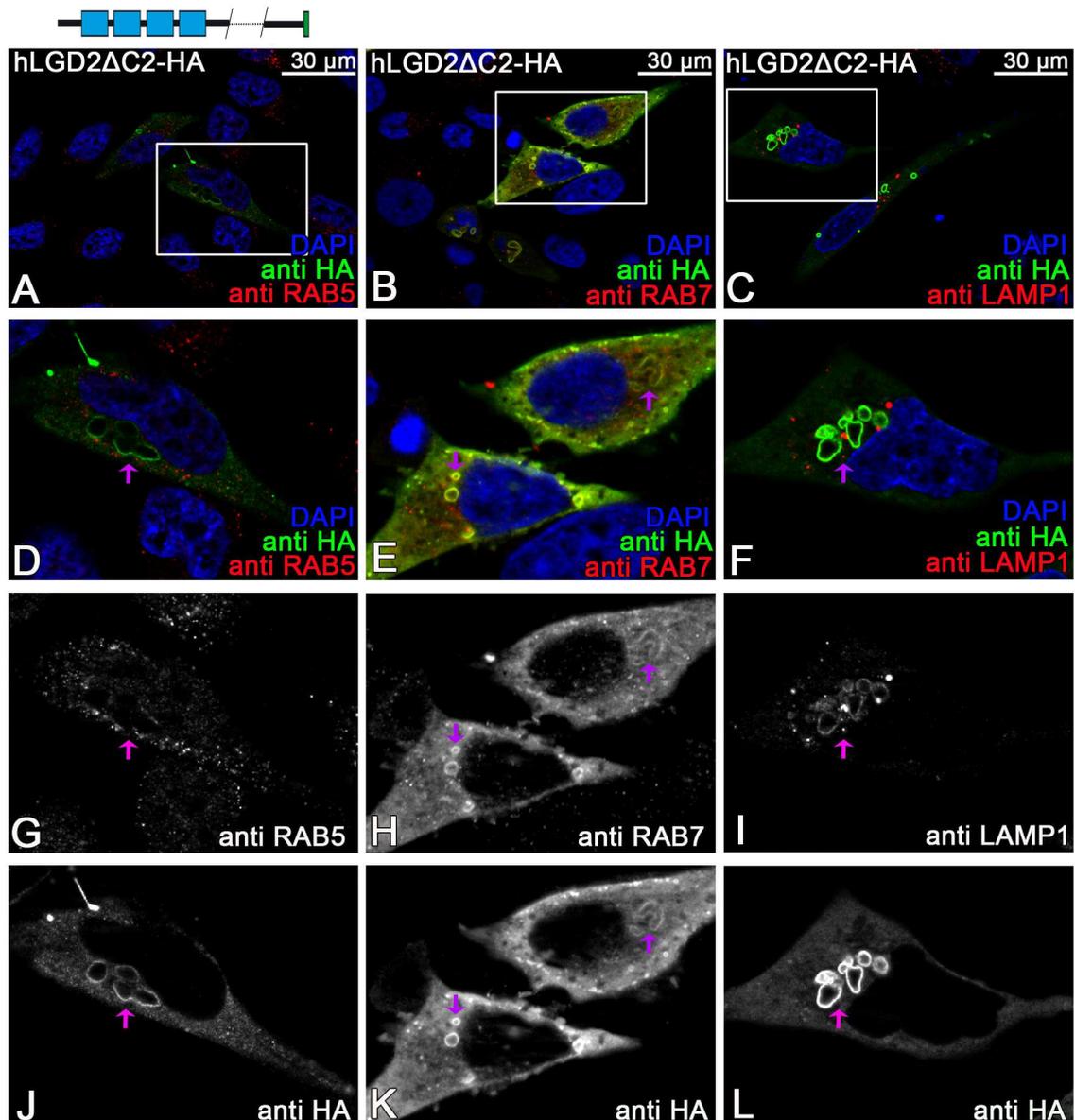


Abb. 2.34: Expression von hLGD2 Δ C2-HA und Markierung der endosomalen Marker in HeLa Zellen. A-C Übersicht des exprimierten hLGD2 Δ C2-HA mit der jeweiligen Färbung der endosomalen Marker. D-F: vergrößerter Ausschnitt, welcher die Färbung der endosomalen Marker sowie die HA- und Kernfärbung zeigt. E: vergrößerter Ausschnitt der RAB5 Färbung. F: vergrößerter Ausschnitt der RAB7 Färbung. G-H: vergrößerter Ausschnitt der HA Färbung der hLGD2 Δ C2-HA exprimierenden Zellen, welche zu stark vergrößerten hLGD2 Δ C2-HA positiven Vesikeln führt. Diese sind RAB7 und LAMP1 positiv und somit wahrscheinlich späte Endosomen.

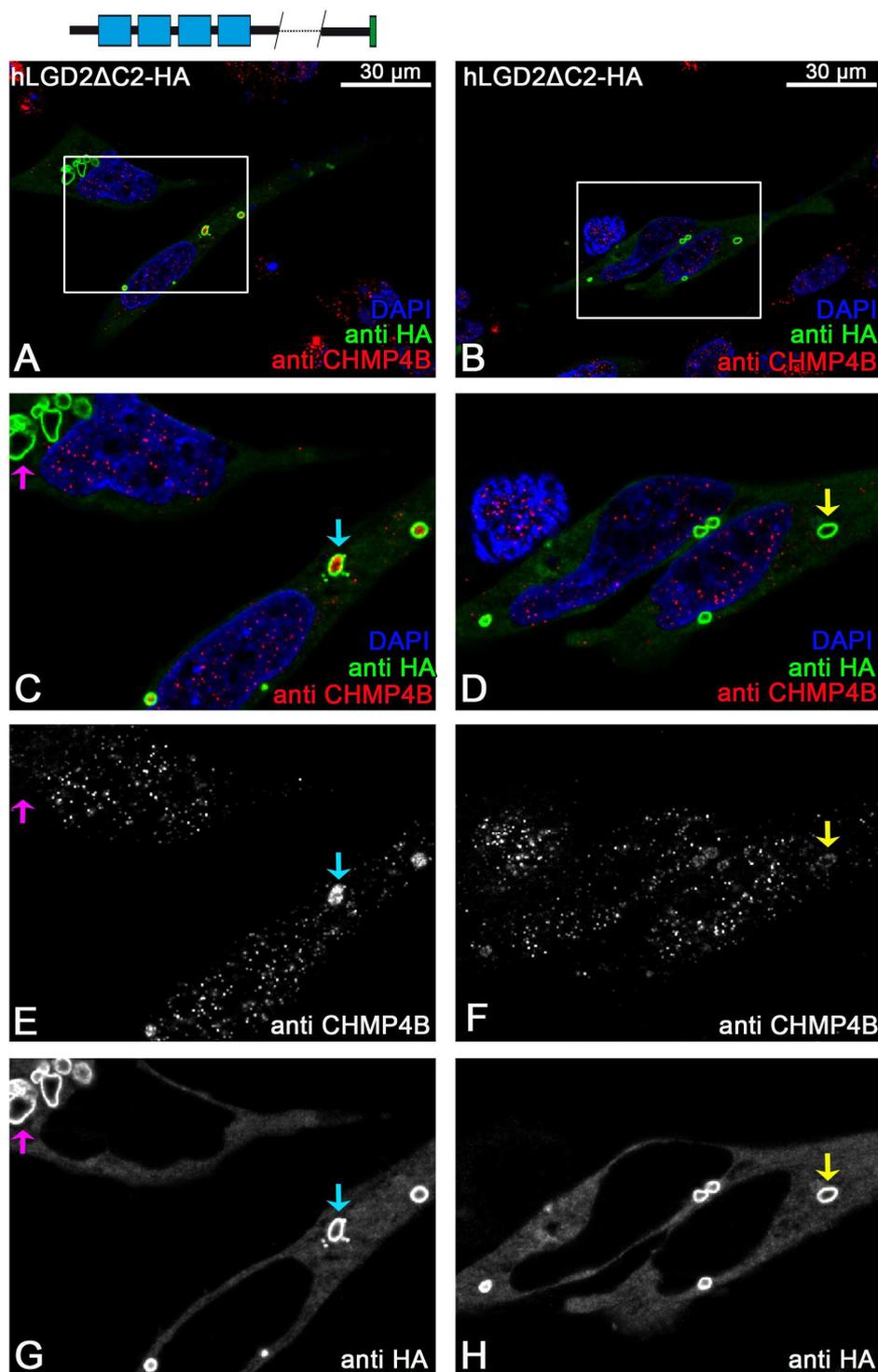


Abb. 2.35: Expression von hLGD2ΔC2-HA und Markierung von CHMP4B in HeLa Zellen.
 A-B: Übersicht des exprimierten hLGD2ΔC2-HA mit der CHMP4B Färbung. C-D: vergrößerter Ausschnitt, welcher die Färbung von CHMP4B sowie die HA- und Kernfärbung zeigt. E-F: vergrößerter Ausschnitt der CHMP4B Färbung. E: CHM4B ist nicht mit den stark vergrößerten hLGD2ΔC2-HA positiven Vesikeln assoziiert (pinker Pfeil), CHMP4B ist in den stark vergrößerten hLGD2ΔC2-HA positiven Vesikeln lokalisiert (türkiser Pfeil). F: Die stark vergrößerten hLGD2ΔC2-HA positiven Vesikel sind CHMP4B positiv (gelber Pfeil) G-H: vergrößerter Ausschnitt der HA Färbung der hLGD2ΔC2-HA exprimierenden Zellen, welche zu stark vergrößerten hLGD2ΔC2-HA positiven Vesikeln führt. Die CHMP4B Lokalisation an den vergrößerten Vesikel ist unterschiedlich, CHMP4B ist zum Teil in den Vesikeln, an der Vesikelmembran oder zeigt keine Assoziation mit den vergrößerten Vesikeln.

Die Analyse der stark vergrößerten hLGD2 Δ C2-HA positiven Vesikel mit CHMP4B zeigt, dass die Assoziation von hLGD2 Δ C2-HA mit CHMP4B nicht eindeutig ist. CHMP4B ist zum Teil wie bei der Expression von hLGD1 Δ C2-HA in diesen vergrößerten Vesikeln lokalisiert (s. Abb. 2.35 C, E, türkiser Pfeil). Allerdings ist CHMP4B auch manchmal an der Membran der vergrößerten Vesikel lokalisiert (s. Abb. 2.35 D, F, gelber Pfeil). In anderen Fällen ist es auch gar nicht mit hLGD2 Δ C2-HA oder den vergrößerten Vesikeln assoziiert (s. Abb. 2.35 C, E, pinker Pfeil).

Um die CHMP4B Lokalisierung näher zu analysieren, wurden die stark vergrößerten Vesikel ausgezählt und die CHMP4B Lokalisation im Bezug auf die Vesikel näher bestimmt. Es wurde überprüft, ob CHMP4B in den Vesikeln, an der Vesikelmembran oder ganz unabhängig von den Vesikeln lokalisiert ist. Eindeutig ist die Akkumulation von CHMP4B in den hLGD1 Δ C2-HA positiven Vesikeln, dies ist ausnahmslos der Fall (100% von 76 ausgezählten Vesikeln). Die hLGD2 Δ C2-HA positiven Vesikel besitzen einen divergenten Phänotyp, allerdings scheinen ein Großteil der Vesikel keine Assoziation mit CHMP4B zu haben (57% von 236 ausgezählten Vesikeln). In 27% der Fälle ist CHMP4B an der Vesikelmembran lokalisiert und in nur 16 % der ausgezählten Vesikel akkumuliert CHMP4B in den Vesikeln (s. Abb. 2.36).

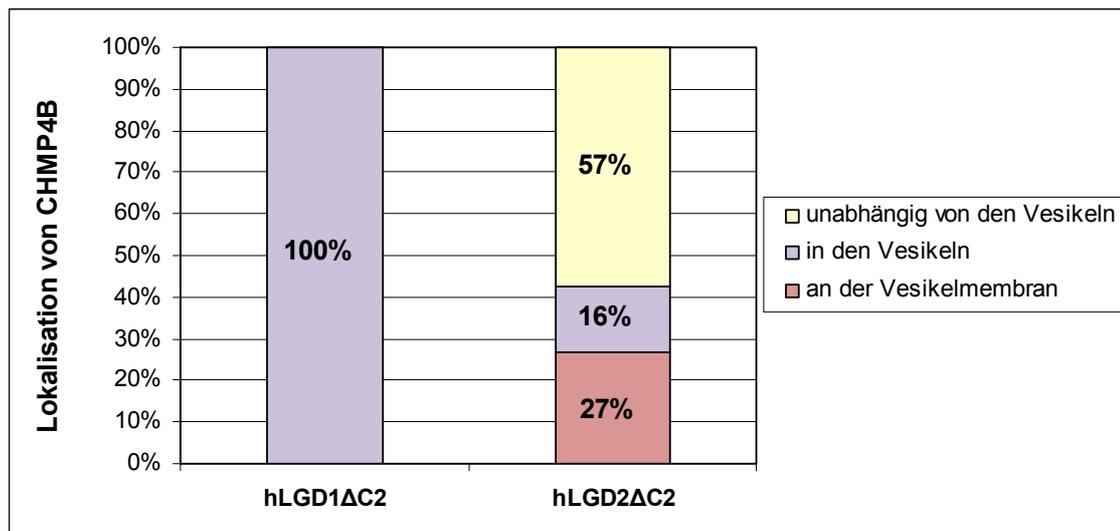


Abb. 2.36: Analyse der CHMP4B Lokalisation im Bezug auf die stark vergrößerten hLGD Δ C2-HA positiven Vesikel. CHMP4B akkumuliert zu 100% in den hLGD1 Δ C2-HA positiven Vesikeln. CHMP4B lokalisiert zu 27% an der Vesikelmembran und zu 16% in den stark vergrößerten hLGD2 Δ C2-HA positiven Vesikeln. Zu 57% liegt keine Assoziation von CHMP4B mit den hLGD2 Δ C2-HA positiven Vesikeln. Bei der Überexpression von hLGD1 Δ C2-HA wurden 76 Vesikel in 51 Zellen ausgezählt und bei der Überexpression von hLGD2 Δ C2-HA wurden 236 Vesikel in 80 Zellen ausgezählt.

Zudem wurden auch weitere Zelllinien daraufhin untersucht, ob die Expression der hLGD Δ C2-HA Konstrukte auch in diesen Zellen zu stark vergrößerten Vesikeln führt. Auch in den getesteten humanen U2OS und in den murinen Zelllinien (3T3 NIH, wt MEFs und *mLGD2*^{-/-} MEFs) wurden die stark vergrößerten Vesikel beobachtet. Diese

waren positiv für den spät endosomalen Marker RAB7 (s. Anhang Abb. 7.7, Abb. 7.8 und Abb. 7.9). Die Expression von hLGD1 Δ C2-HA führt auch in diesen Linien zu einer Akkumulation von CHMP4B in den Vesikeln (s. Anhang, Abb. 7.7 E und Abb. 7.8 G-I). Bei der Expression von hLGD2 Δ C2-HA ist auch wieder der divergente Phänotyp der CHMP4B Lokalisation erkennbar, CHMP4B zeigt zum einen keine Assoziation mit den hLGD2 Δ C2-HA positiven vergrößerten Vesikeln (s. Anhang Abb. 7.7 F), zum anderen jedoch ist es an der Vesikelmembran oder in den Vesikeln lokalisiert (s. Anhang, Abb. 7.9 I, bzw. 7.7 F).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Expression von hLGD Δ C2-HA zu einem dominant negativen Effekt auf den endosomalen Transportweg führt. Es bilden sich stark vergrößerte späte Endosomen/Lysosomen. Dieser dominant negative Effekt auf den endosomalen Transportweg tritt in verschiedenen humanen und murinen Zelllinien auf. Dies zeigt, dass die hLGD Δ C2 Konstrukte einen generellen Einfluss auf den endosomalen Transportweg haben. Zudem belegt dies wie wichtig die C2 Domäne für die hLGDs sowie deren Rolle im endosomalen Transportweg ist. Des Weiteren ist die Lokalisation von CHMP4B an den vergrößerten hLGD Δ C2 positiven Vesikeln auffällig. CHMP4B befindet sich in den mit hLGD1 Δ C2 markierten stark vergrößerten späten Endosomen. Bei der Expression von hLGD2 Δ C2 liegt keine eindeutige Lokalisation von CHMP4B vor, es ist entweder ebenfalls in den Endosomen, an der Vesikelmembran oder ganz unabhängig von den stark vergrößerten späten Endosomen lokalisiert.

2.4.3 Ubiquitinierte Proteine scheinen vor den hLGD2 Δ DM14-HA positiven Vesikeln zu akkumulieren

Es konnte in den vorhergehenden Kapiteln festgestellt werden, dass die Expression der hLGDs ohne C2 Domäne sowie die Expression von hLGD2 Δ DM14 einen dominant negativen Effekt auf den spät endosomalen/lysosomalen Transportweg hat (s. Kap. 2.4.2.5). Um diesen Effekt zu untersuchen, wurden die Konstrukte erneut in HeLa Zellen exprimiert und zudem ubiquitinierte Proteine in der Zelle mittels des FK2 Antikörpers angefärbt. Der FK2 Antikörper erkennt poly- und monoubiquitinierte Proteine, jedoch kein freies Ubiquitin. Wenn Proteine ubiquitiniert werden, dient die Ubiquitinierung unter anderem als Abbausignal und die Proteine werden zum Teil durch den endosomalen Transportweg degradiert (Übersicht in Clague und Urbé, 2010). Diese stark vergrößerten Vesikel, welche durch die Expression einiger hLGD Deletionskonstrukte verursacht werden, könnten möglicherweise die Aufnahme in die Vesikel oder den Abbau der ubiquitinierten Proteine beeinträchtigen.

Die untransfizierte Kontrolle zeigt, dass die ubiquitinierten Proteine zum größten Teil diffus im Cytoplasma und im Kern verteilt zu sein scheinen. Zum Teil sind die ubiquitinierten Proteine punktuell im Cytoplasma lokalisiert (s. Abb. 2.37 G). Diese sind jedoch nicht mit RAB5 oder RAB7 assoziiert (s. Anhang Abb. 7.10 D und 7.10 E) und somit weder frühe noch späte Endosomen.

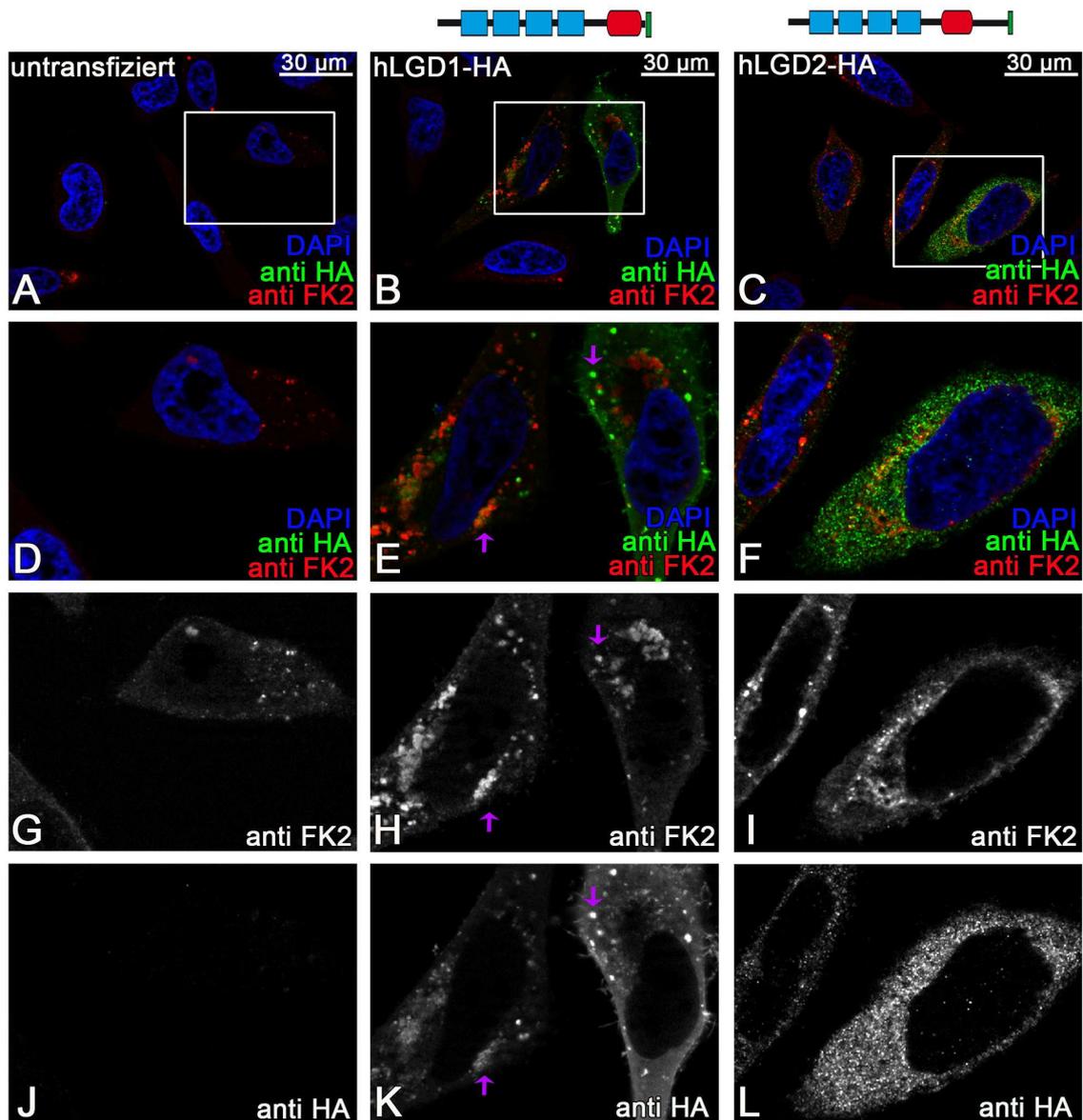


Abb. 2.37: Expression von hLGD1-HA und hLGD2-HA in HeLa Zellen und die Markierung der ubiquitinierten Proteine mittels des FK2 Antikörpers. A-C zeigen eine Übersicht der untransfizierten Zellen sowie exprimiertes hLGD1-HA oder hLGD2-HA mit der Färbung der ubiquitinierten Proteine. D-F: vergrößerte Ausschnitte, welche die Färbung der jeweiligen exprimierten Proteine sowie die FK2 Färbung und die Kernfärbung zeigen. G-I: vergrößerte Ausschnitte zeigen die Färbung der ubiquitinierten Proteine. J-L: vergrößerte Ausschnitte zeigen die HA Färbung der jeweils exprimierten Proteine. Die Expression von hLGD1-HA und hLGD2-HA führt zu einer vermehrten Akkumulation ubiquitinierten Proteine an Vesikeln. Zum Teil sind die ubiquitinierten Proteine mit hLGD1 assoziiert (pinke Pfeile).

Wenn in HeLa Zellen hLGD1-HA exprimiert wird, dann ist zu beobachten, dass die ubiquitinierten Proteine vermehrt in vesikelartigen Strukturen akkumulieren. In einigen Fällen sind die ubiquitinierten Proteine mit hLGD1-HA assoziiert (s. Abb. 2.37 E, H, K, pinke Pfeile). Auch die Expression von hLGD2-HA führt dazu, dass die ubiquitinierten Proteine vermehrt an Vesikeln lokalisiert sind (s. Abb. 2.37 F). Es gibt jedoch keine Assoziation der hLGD2-HA positiven Vesikel mit den ubiquitinierten Proteinen (s. Abb.

2.37 F). Die Akkumulation von ubiquitinierten Proteinen deutet auf einen Degradationsdefekt hin, welcher durch die Überexpression der hLGDs ausgelöst wird.

Als nächstes wurden die Deletionskonstrukte analysiert, welche den spät endosomalen Transportweg negativ beeinflussen. Wenn hLGD1 Δ C2-HA in HeLa Zellen exprimiert wird, sind die ubiquitinierten Proteine genau wie bei der Expression von hLGD1-HA vermehrt an Vesikeln lokalisiert (s. Abb. 2.38 G). Des Weiteren ist zu erkennen, dass die ubiquitinierten Proteine an der Membran der vergrößerten hLGD1 Δ C2-HA positiven Vesikeln lokalisiert sind (s. Abb. 2.38 G, türkise Pfeile). Dies ist jedoch nicht bei allen Vesikeln zu beobachten (s. Anhang Abb. 7.10 F, I). Auch die Expression von hLGD2 Δ C2-HA führt dazu, dass die ubiquitinierten Proteine vermehrt an Vesikeln lokalisiert sind (s. Abb. 2.38 F, H). Des Weiteren ist zu erkennen, dass sich ubiquitinierte Proteine an der Membran einiger vergrößerten Vesikel befinden (s. Abb. 2.38 H, türkiser Pfeil). Wie auch bei der Expression von hLGD1 Δ C2 ist dies nicht bei allen vergrößerten Vesikeln zu beobachten (s. Abb. 2.38 H, gelber Pfeil). Die Lokalisation ubiquitiniertes Proteine an der Vesikelmembran war zu erwarten, da sich ubiquitinierte Proteine an späten Endosomen befinden, bevor sie deubiquitiniert werden, um anschließend internalisiert zu werden (Übersicht in Clague und Urbé, 2010). Das Fehlen ubiquitiniertes Proteine an der Membran einiger stark vergrößerter Vesikel, könnte zum einen bedeuten, dass die Proteine schon deubiquitiniert wurden. Ein anderer Grund könnte sein, dass die Färbung zu schwach ist und sie nicht detektiert werden können.

Wenn hingegen hLGD2 Δ DM14-HA exprimiert wird, lagern sich keine ubiquitinierten Proteine an der Membran der vergrößerten Vesikel an, sondern akkumulieren anscheinend vor den Vesikeln (s. Abb. 2.38 F, I, weiße, bzw. gelbe Pfeile). Dies wird auch in der orthogonalen Ansicht des Z-Stapels ersichtlich (s. Abb. 2.39, türkise Pfeile). Jedoch ist diese Akkumulation nicht in allen Zellen zu beobachten (s. Abb. 2.39, türkise Pfeile). Möglicherweise ist die Transfektionsstärke oder die Dauer der Transfektion eine Ursache hierfür.

Diese Ergebnisse zeigen, dass durch die Expression der hLGDs oder ihrer getesteten Deletionskonstrukte die ubiquitinierten Proteine in der Zelle akkumulieren. Dies weist auf einen Abbauddefekt der ubiquitinierten Proteine hin. Auffällig ist auch, dass bei einem Verlust der DM14 Domänen von hLGD2, die ubiquitinierten Proteine um die vergrößerten Vesikel herum zu akkumulieren scheinen. Möglicherweise ist Aufnahme der ubiquitinierten Proteine verlangsamt oder ganz gestört.

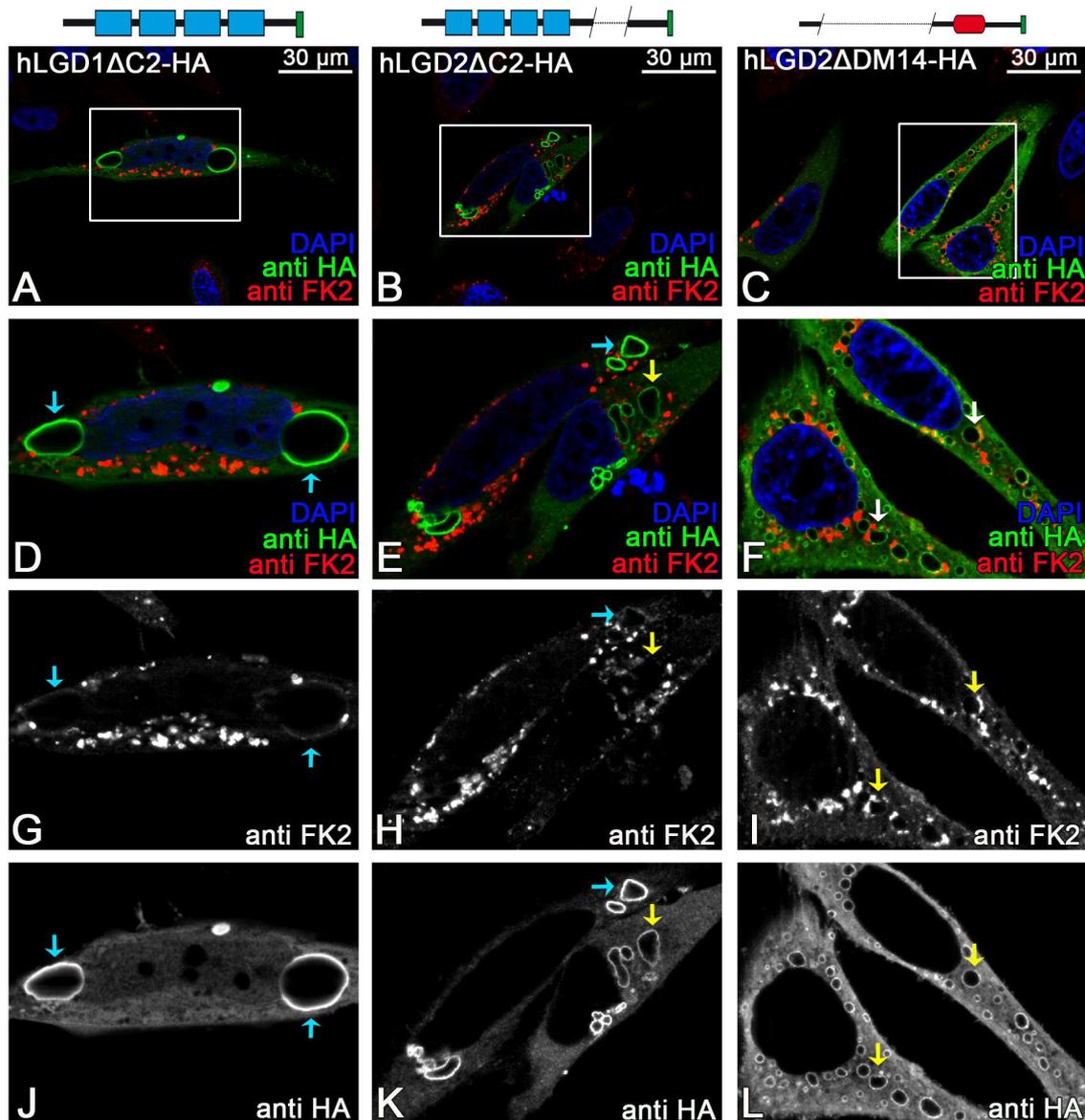


Abb. 2.38: Expression von hLGD1 Δ C2-HA, hLGD2 Δ C2-HA und hLGD2 Δ DM14-HA in HeLa Zellen und die Markierung der ubiquitinierten Proteine mittels des FK2 Antikörpers. A-C zeigen eine Übersicht der exprimierten Proteine mit der Färbung der ubiquitinierten Proteine, sowie die Kernfärbung. D-F: vergrößerte Ausschnitte, welche die Färbungen der jeweiligen exprimierten Proteine sowie die FK2 Färbung und die Kernfärbung zeigen. G-I: vergrößerte Ausschnitte zeigen die Färbung der ubiquitinierten Proteine alleine. J-L: vergrößerte Ausschnitte zeigen die HA Färbung der jeweils exprimierten Proteine. Die Expression von hLGD1 Δ C2-HA, hLGD2 Δ C2-HA und hLGD2 Δ DM14-HA führt zu einer vermehrten Akkumulation der ubiquitinierten Proteine an Vesikeln. Zum Teil scheinen die ubiquitinierten Proteine auch an der Membran der stark vergrößerten hLGD1 Δ C2-HA, bzw der hLGD2 Δ C2-HA positiven Vesikel lokalisiert zu sein (G und H, türkise Pfeile). Bei Expression von hLGD2 Δ DM14-HA scheinen die ubiquitinierten Proteine vor den vergrößerten Vesikeln zu akkumulieren (I, gelbe Pfeile).

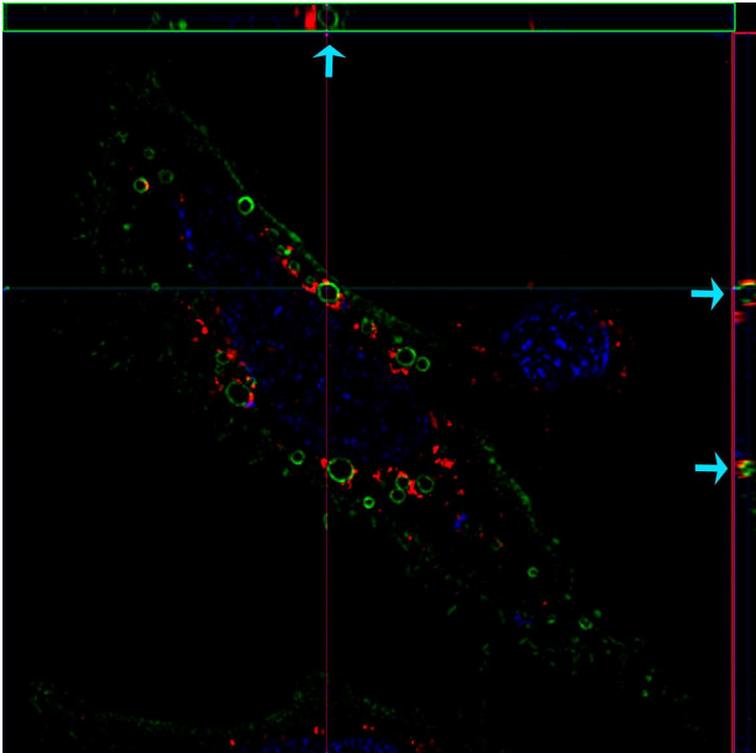


Abb. 2.39: Expression von hLGD2 Δ DM14-HA in HeLa Zellen und die Markierung der ubiquitinierten Proteine mit der orthogonalen Ansicht des Z-Stapels. In der orthogonalen Ansicht des Z-Stapels ist ersichtlich, dass sich die ubiquitinierten Proteine (rot) an den stark vergrößerten Vesikeln akkumulieren (türkise Pfeile).

Insgesamt weist die Untersuchung der hLGDs in humanen Zellen eine Beteiligung dieser am endosomalen Transportweg nach. Dies ist zum einen durch die veränderte Lokalisation der endosomalen Marker, wie die vergrößerten Vesikel oder auch eine diffusere Verteilung bei der Überexpression der hLGDs und einiger Deletionskonstrukte erkennbar (s. Tab. 2.3). Zudem übt die Expression der hLGD Δ C2s sowie hLGD2 Δ DM14 einen dominant negativen Effekt auf den endosomalen Transportweg aus, welcher zu stark vergrößerten Endosomen führt. Des Weiteren ist auch die Lokalisation des ESCRT-III Proteins CHMP4B verändert. Bei der Expression von hLGD1 Δ C2-HA gelangt CHMP4B in die Vesikel und zum Teil auch bei der Expression von hLGD2 Δ C2-HA. Allerdings variiert die Lokalisation von CHMP4B bei der Expression von hLGD2 Δ C2-HA sehr stark und es scheint am häufigsten keine Assoziation mit CHMP4B vorzuliegen. Ein weiteres Indiz für die Beteiligung der hLGDs am endosomalen Transportweg ist die Akkumulation ubiquitiniertes Proteine in der Zelle. Außerdem scheinen sich bei der Expression von hLGD2 Δ DM14 die ubiquitinierten Proteine an den stark vergrößerten Vesikeln anzulagern. Dies spricht für eine Störung oder verlangsamte Aufnahme der ubiquitinierten Proteine in die Endosomen.

Tab. 2.3: Übersicht der Analyse der hLGDs in HeLa Zellen.

Konstrukt	Lokalisation	vergrößerte Vesikel	Lokalisation endosomaler Marker
hLGD1-HA	diffus, vesikulär (positiv für RAB7, CHMP4B)	nein	LAMP1 und CHMP4B positive Vesikel vergrößert
hLGD1 Δ DM14-HA	diffus, teilweise vesikulär	nein	RAB7 vesikulär und zum Teil diffus
hLGD1 Δ DM14(1-2)-HA	diffus, teilweise vesikulär (CHMP4B positiv und zum Teil RAB7, LAMP1 positiv)	nein	wildtypisch
hLGD1 Δ DM14(3-4)-HA	diffus, teilweise vesikulär (CHMP4B positiv)	nein	wildtypisch
hLGD1 Δ C2-HA	diffus bis auf die vergrößerten Vesikel	ja, positiv für RAB7 und LAMP1	CHMP4B in den vergrößerten Vesikeln
hLGD2-HA	diffus, vesikulär (positiv für RAB7, CHMP4B)	nein	LAMP1 und CHMP4B positive Vesikel vergrößert, RAB7 diffus verteilt
hLGD2 Δ C815-HA	vesikulär	nein	wildtypisch
hLGD2 Δ DM14-HA	diffus bis auf die vergrößerten Vesikel	ja, positiv für LAMP1	RAB7 und LAMP1 diffus
hLGD2 Δ C2-HA	diffus bis auf die vergrößerten Vesikel	ja, positiv für RAB7 und LAMP1	CHMP4B nicht eindeutig lokalisiert, RAB7 diffus

2.5 Das eine mentale Retardierung auslösende Allel von *hLGD2*

Ein Allel von *CC2D1A* (*hLGD2*) führt beim Menschen zu einer autosomal rezessiven nicht syndromischen mentale Retardierung (NSMR). Bisher sind nur der Genotyp und die Sequenz des Proteins bekannt. Eine genauere Analyse der Funktion des verkürzten Proteins ist bislang noch nicht erfolgt.

Bei der zur mentalen Retardierung führenden Mutation ist ein Bereich von 3589 Nukleotiden deletiert, welcher in Intron 13 anfängt und in Intron 16 aufhört. Dabei werden die Aminosäuren 408 bis 547 entfernt. Des Weiteren erfolgt eine Leserrasterverschiebung direkt hinter der Deletionsstelle und es wird ein Nonsense Peptid von 30 Aminosäuren generiert mit einem vorzeitigen Stoppkodon an Position 438 des mutanten Proteins. Das daraus resultierende Protein besitzt nach der dritten DM14 Domäne ein aus 30 Aminosäuren bestehendes Nonsense-Peptid auf das ein Stoppkodon folgt (s. Abb. 2.40) (Basel-Vanagaite et al., 2006). Dieses verkürzte *hLGD2* besteht nur noch aus den ersten drei DM14 Domänen, demzufolge fehlen die vierte DM14 Domäne sowie die C2 Domäne.

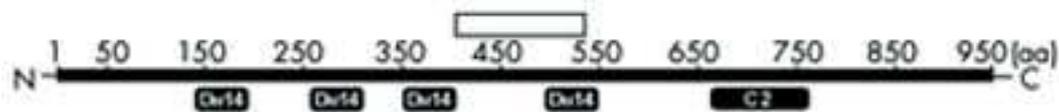


Abb. 2.40: Schematische Darstellung des mutierten *hLGD2* Allels. Der weiße Kasten deutet den mutierten Bereich an (Basel-Vanagaite et al., 2006).

In dieser Arbeit wurde diese Mutation in Hinblick auf ihre Funktionalität, Stabilität, Lokalisation in *Drosophila melanogaster* sowie in humanen Zellen analysiert. Dazu wurde zunächst ein *hLGD2^{MR}* Konstrukt generiert, welches wie das humane Allel aufgebaut ist. Für eine tiefer gehende Analyse folgten später weitere Deletionskonstrukte von *hLGD1* und *Lgd*. Es wurden Konstrukte mit und ohne Nonsense Peptid generiert. Im Folgenden werden diese verschiedenen Konstrukte unter dem Begriff mentale Retardierungskonstrukte zusammengefasst. Eine schematische Darstellung der mentalen Retardierungskonstrukte zeigt Abbildung 2.41.

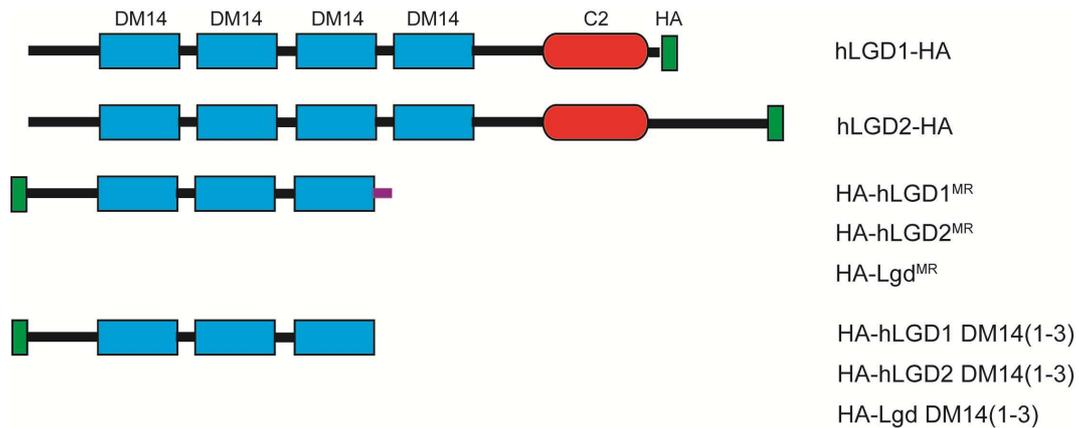


Abb. 2.41: Schematische Darstellung der hLGDs sowie der mentalen Retardierungskonstrukte. Das Non-sense Peptid ist lila gekennzeichnet.

2.5.1 hLGD2^{MR} ist in *Drosophila melanogaster* nicht funktional

Die bisherigen Analysen des Allels von *CC2D1A* (hLGD2), welches zur mentalen Retardierung führt, beschränken sich auf die Untersuchung des Phänotyps sowie die Analyse des Genotyps und des dazugehörigen Proteins. Es ist allerdings noch nicht untersucht worden, ob das Protein noch eine Restfunktion besitzt und wie es zu der mentalen Retardierung beiträgt.

Um Einblicke in die Funktionsweise des Allels zu bekommen, erfolgte die Generierung eines Konstruktes, welches wie das Allel aufgebaut ist und anschließend in Fliegen exprimiert werden kann. Dazu wurde die Leserasterverschiebung genauso wie sie in dem Allel vorkommt in die cDNA von *hLGD2* eingebaut. Das Konstrukt wurde *hLGD2^{MR}* genannt. Da es zu einem frühzeitigen Stoppkodon führt, wurde das Protein nicht C-terminal sondern N-terminal mit HA markiert. Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass weder eine N-terminale noch eine C-terminale Markierung einen Einfluss auf die Funktion von Lgd hat (Troost et al., 2012).

Zur Überprüfung der Restfunktion wurde wie in Kapitel 2.2 ein Rettungsexperiment im *lgd* mutanten Hintergrund mit dem Konstrukt *lgdP HA-hLGD2^{MR}* durchgeführt. Dabei kam es sowohl zur Aktivierung des Notchreporters Gbe+Su(H)-lacZ in der gesamten Flügelimaginalscheibe als auch zu einer Verbreiterung der Wg Expressionsdomäne (s. Abb. 2.41 C, weiße Pfeile). Wg wurde stark ektopisch aktiviert (s. Abb. 2.41 I). Wobei diese ektopische Aktivierung nicht so stark ausgeprägt ist, wie in der Kontrolle, bei der im *lgd* mutanten Hintergrund kein Rettungskonstrukt exprimiert wurde (s. Abb. 2.41 I im Vergleich zu H). Dies jedoch liegt vermutlich an der variablen Wg Expression (Klein, 2003), da zudem der Notchreporter Gbe+Su(H)-lacZ in der gesamten Flügelimaginalscheibe aktiv ist (s. Abb. 2.41 L). Die Tiere sterben in einem frühen puppalem Stadium und die Scheiben überproliferieren, wie es auch bei *lgd* mutanten Tieren der Fall ist. Dies belegt, dass HA-hLGD2^{MR} keine Funktion in der Fliege ausübt.

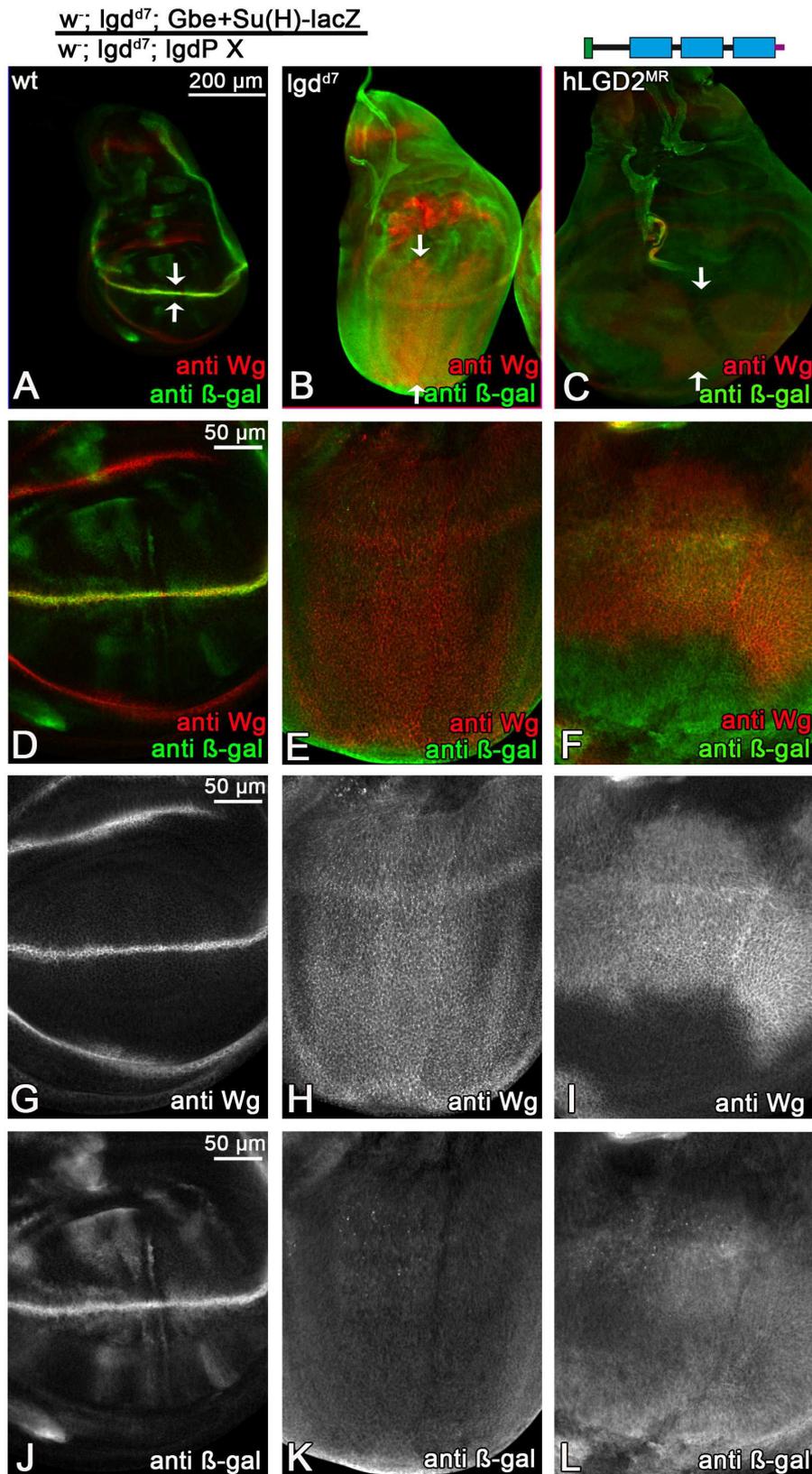


Abb. 2.41: Rettung des *Igd* mutanten Phänotyps durch die Expression von *IgdP HA-hLGD2^{MR}*. A, D, G, J: wildtypische Kontrolle. B, E, H, K: *Igd* mutanter Hintergrund ohne Rettungskonstrukt. C, F, I, J: Expression von *IgdP HA hLGD2^{MR}* und deren Auswirkung auf die Aktivität des Notch Signalweges. I: stark verbreiterte Wg Expressionsdomäne. L: ubiquitäre Expression von Gbe+Su(H)-lacZ. hLGD2^{MR} ist nicht mehr funktional.

Das Protein, welches die mentale Retardierung im Menschen auslöst, *hLGD2^{MR}* scheint zu einem kompletten Funktionsverlust zu führen. Allerdings können nur bedingt Rückschlüsse aus diesem Experiment gezogen werden, da auch *hLGD2* nicht die volle Funktion von *Lgd* in der Fliege übernehmen kann, im Gegensatz zu *hLGD1*.

2.5.2 Die Expression von *Lgd^{MR}* und *hLGD1^{MR}* kann den *Igd* mutanten Phänotyp nicht retten

Das Protein *HA-hLGD2^{MR}* übt in der Fliege keine Funktion mehr aus. Ein Grund dafür könnte die geringere Konservierung der Sequenz von *hLGD2* zu *Lgd* sein. Im Gegensatz dazu weist *hLGD1* eine stärkere Konservierung zu *Lgd* auf (s. Kap. 2.1). Um dies als Grund auszuschließen, wurden *hLGD1* und *Lgd* Konstrukte generiert, die wie das mentale Retardierungsallel aufgebaut sind (*IgdP HA-hLGD1^{MR}* und *IgdP HA-Igd^{MR}*).

Bei dem Rettungsexperiment im *Igd* mutanten Hintergrund zeigt sich sowohl mit dem Konstrukt *IgdP HA-hLGD1^{MR}* als auch mit dem Konstrukt *IgdP HA-Igd^{MR}* eine Verbreiterung der *Wg* Expressionsdomäne und eine Aktivierung von *Gbe+Su(H)-lacZ* in der gesamten Flügelimaginalscheibe (s. Abb. 2.42 D und C).

Die ektopische Aktivierung von *Wg* ist nicht so stark ausgeprägt, wie in der Kontrolle, in der kein Rettungskonstrukt im *Igd* mutanten Hintergrund exprimiert wurde (s. Abb. 2.42 K, L im Vergleich zu J). Dies ist aber eher durch die variable Ausprägung der ektopischen *Wg* Expression begründet (Klein, 2003) als durch eine mögliche Restfunktion der Proteine. Dafür spricht, dass das sensitivere Notch Reportergenkonstrukt *Gbe+Su(H)-lacZ* in der gesamten Flügelscheibe aktiviert wurde (s. Abb. 2.42 O, P). Dies belegt die ektopische Aktivierung des Notch-Signalweges, welche wiederum auf einen Verlust von *Lgd* hindeutet. Zumal auch die Flügelimaginalscheiben überproliferieren und die Tiere in einem frühen puppalem Stadium sterben, wie es bei *Igd* mutanten Tieren der Fall ist. Demzufolge sind auch die mentalen Retardierungskonstrukte von *hLGD1* und *Lgd* nicht mehr funktional und die geringere Konservierung von *hLGD2* ist nicht der Grund für den Funktionsverlust der mentalen Retardierungskonstrukte. Eine andere Ursache für diesen könnte das Nonsense-Peptid sein, welches das Protein negativ beeinträchtigen könnte.

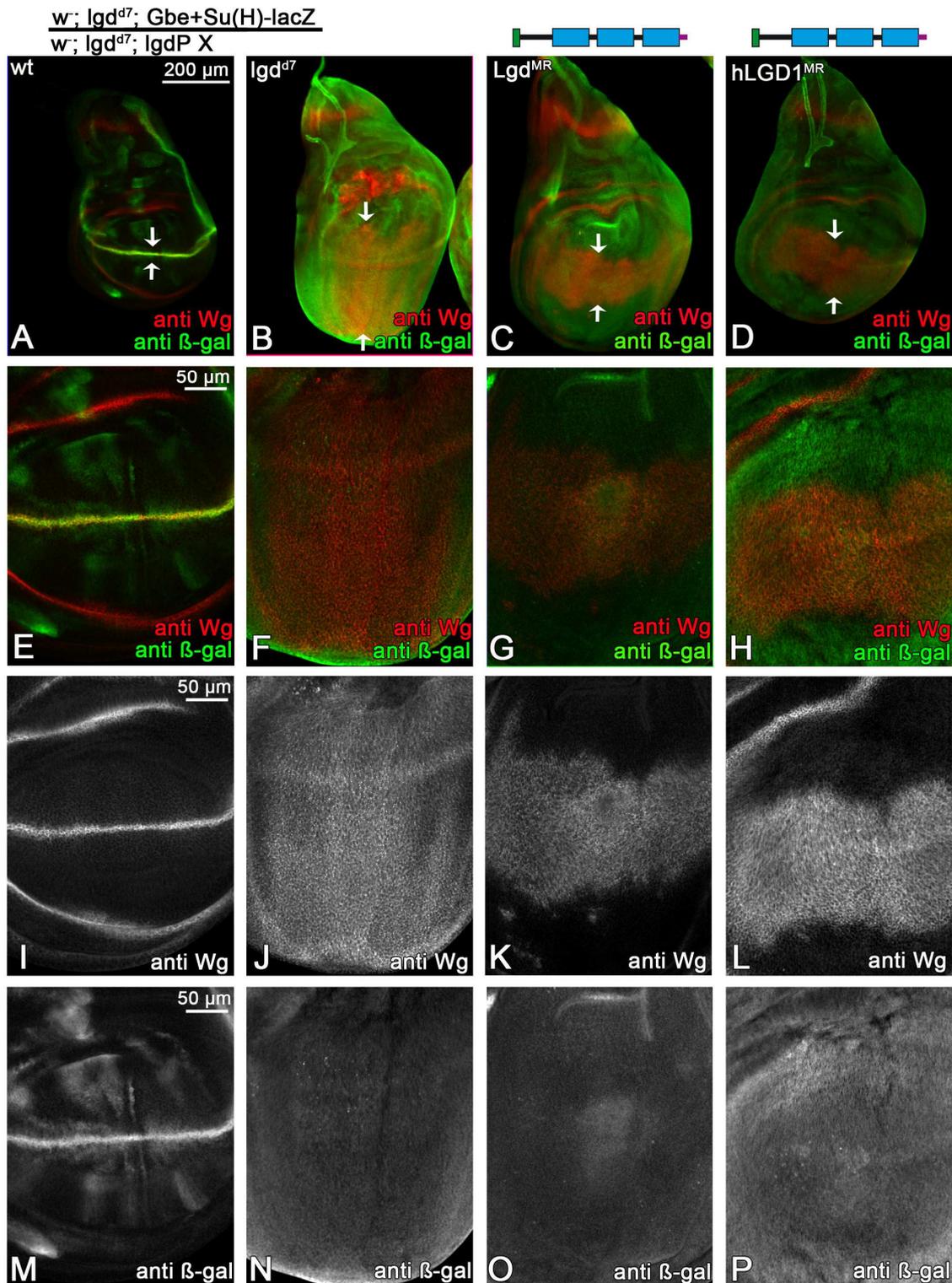


Abb. 2.42: Rettung des *Igd* mutanten Phänotyps durch die Expression von *IgdP HA-Igd^{MR}* und *IgdP HA-hLGD1^{MR}*. A, E, I, M: wildtypische Kontrolle. B, F, J, N: *Igd* mutanter Hintergrund ohne Rettungskonstrukt. C, G, K, O: Expression von *IgdP HA-Igd^{MR}* und deren Auswirkung auf die Aktivität des Notch Signalweges. K: stark verbreiterte Wg Expressionsdomäne. O: ubiquitäre Expression von Gbe+Su(H)-lacZ. D, H, L, P: Expression von *IgdP HA-hLGD1^{MR}* und deren Auswirkung auf die Aktivität des Notch Signalweges. L: stark verbreiterte Wg Expressionsdomäne. P: ubiquitäre Expression von Gbe+Su(H)-lacZ. Die mentalen Retardierungskonstrukte von hLGD1 und Lgd sind nicht mehr funktional.

2.5.3 Das Nonsense-Peptid hat keinen Einfluss auf die Funktionalität der Proteine

Es besteht die Möglichkeit, dass das Nonsense-Peptid einen Einfluss auf die Funktionalität der mentalen Retardierungskonstrukte hat. So könnte es möglicherweise zu einer geänderten Proteinfaltung kommen oder wichtige Proteinbindungsstellen blockiert werden. Zum Ausschluss eines möglichen Einflusses auf die Funktionalität der Proteine durch das Nonsense-Peptid wurden Konstrukte hergestellt, denen das Nonsense-Peptid fehlt. Dabei wurde direkt nach der dritten DM14 Domäne ein Stoppkodon generiert und zwar sowohl bei den hLGDs als auch bei Lgd.

Die Analyse der Konstrukte *IgdP HA-hLGD1DM14(1-3)*, *IgdP HA-hLGD2DM14(1-3)* sowie *IgdP HA-IgdDM14(1-3)* erfolgte in Rettungsexperimenten im *Igd* mutanten Hintergrund. Es zeigt sich bei allen drei Konstrukten eine stark verbreiterte Expressionsdomäne von Wg und auch eine Aktivität von Gbe+Su(H)-lacZ in der gesamten Flügelimaginalscheibe (s. Abb. 2.43 B, C, D). Die ektopische Aktivierung von Wg ist nicht so stark ausgeprägt, wie in der Kontrolle, in der kein Rettungskonstrukt im *Igd* mutanten Hintergrund exprimiert wurde (s. Abb. 2.43 J, K, L im Vergleich zu I). Eine Erklärung dafür ist eher die variable Ausprägung der ektopischen Wg Expression (Klein, 2003) als eine mögliche Restfunktion der Proteine. Die Annahme wird dadurch unterstützt, dass das sensitivere Notch Reportergenkonstrukt Gbe+Su(H)-lacZ in der gesamten Flügelscheibe aktiviert wurde (s. Abb. 2.43 N, O, P). Da dies auch bei Lgd Verlust der Fall ist (s. Abb. 2.43 M), kann davon ausgegangen werden, dass die Konstrukte *IgdP HA-hLGD1DM14(1-3)*, *IgdP HA-hLGD2DM14(1-3)* sowie *IgdP HA-IgdDM14(1-3)* keine Funktion mehr besitzen. Zudem sterben die Tiere, wie auch die *Igd* mutanten Tiere, in einem frühen puppalem Stadium.

Auch ohne das Nonsense-Peptid sind die mentalen Retardierungskonstrukte nicht funktional. Dieses scheint somit auf die Funktion der Proteine keinen Einfluss zu haben. Allerdings fehlt allen Konstrukten die C2 Domäne, welches ein möglicher Grund für die fehlende Funktion der Proteine sein könnte. Denn wie zuvor beschrieben, sind hLGD1 und hLGD2 ohne C2 Domäne nicht funktional, wobei bei hLGD2 Δ C2 dies durch die Instabilität des Proteins verursacht sein könnte. Mögliche Ursachen für den Funktionsverlust der mentalen Retardierungskonstrukte könnten auch wie bei Lgd ohne C2 Domäne eine Fehllokalisierung oder die Instabilität der Proteine sein.

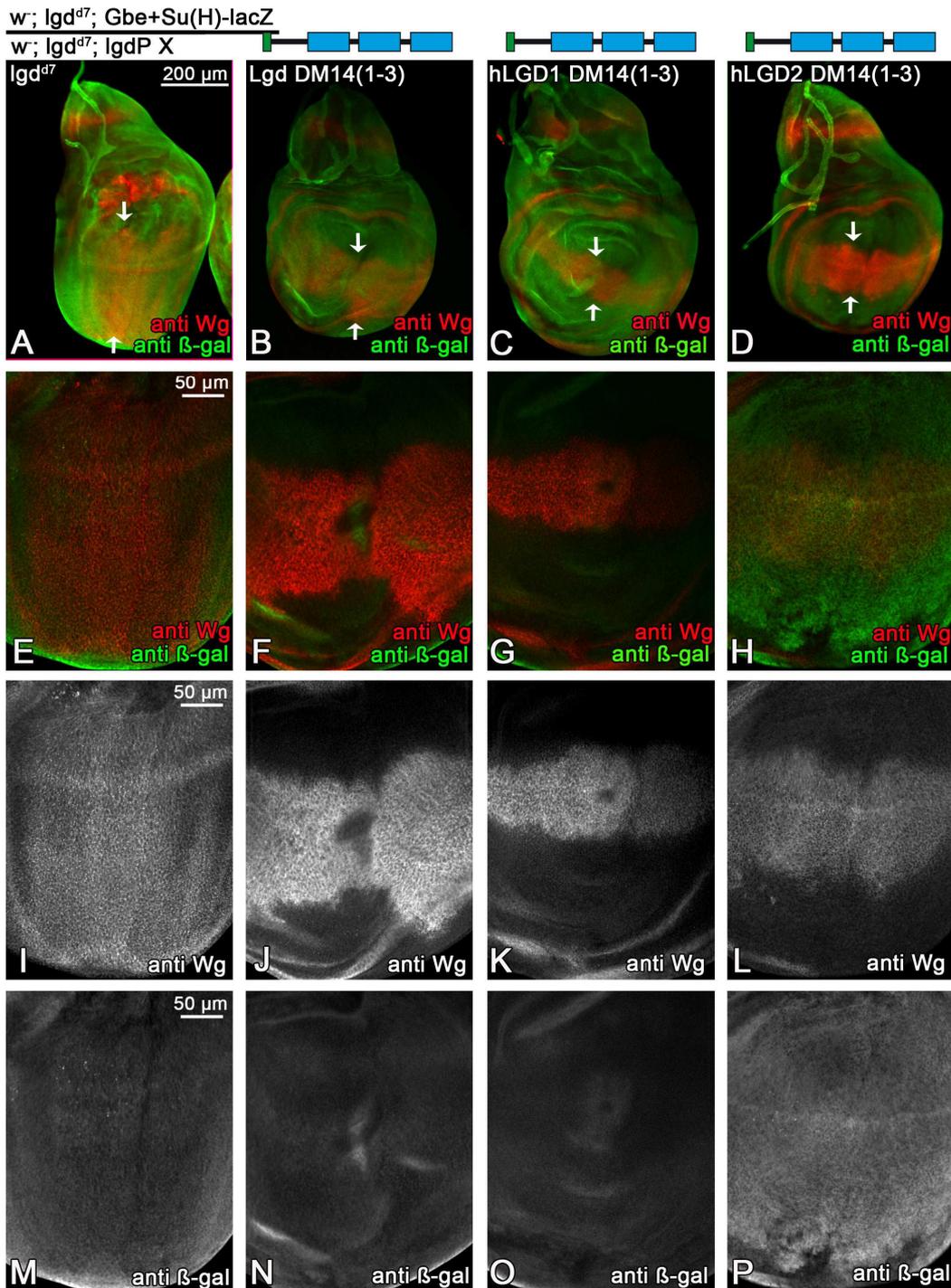


Abb. 2.43: Rettung des *Igd* mutanten Phänotyps durch die Expression von *IgdP HA-IgdDM14(1-3)*, *IgdP HA-hLGD1DM14(1-3)* und *IgdP HA-hLGD2DM14(1-3)*: A, E, I, M: *Igd* mutanter Hintergrund ohne Rettungskonstrukt. B, F, J, N: Expression von *IgdP HA-IgdDM14(1-3)* und deren Auswirkung auf die Aktivität des Notch Signalweges. J: stark verbreiterte Wg Expressionsdomäne. N: ubiquitäre Expression von Gbe+Su(H)-lacZ.. C, G, K, O: Expression von *IgdP HA-hLGD1DM14(1-3)* und deren Auswirkung auf die Aktivität des Notch Signalweges. K: stark verbreiterte Wg Expressionsdomäne. O: ubiquitäre Expression von Gbe+Su(H)-lacZ. D, H, L, P: Expression von *IgdP HA-hLGD2DM14(1-3)* und deren Auswirkung auf die Aktivität des Notch Signalweges. L: stark verbreiterte Wg Expressionsdomäne. P: ubiquitäre Expression von Gbe+Su(H)-lacZ. Auch die mentalen Retardierungskonstrukte ohne Nonsense-Peptid sind nicht mehr funktional und somit beeinflusst das Nonsense-Peptid nicht die Funktion der Proteine.

2.5.4 Analyse des Funktionsverlustes der mentalen Retardierungskonstrukte

Die mentalen Retardierungskonstrukte sind in *D. melanogaster* nicht mehr funktional. Im Folgenden wurden die möglichen Ursachen für den Funktionsverlust näher untersucht. Zum einen wurde die Lokalisation der mentalen Retardierungskonstrukte wie bei den hLGD Δ C2s auch untersucht, indem die Konstrukte in der Flügelimaginalscheibe überexprimiert werden. Zum anderen wurde ebenfalls die Stabilität der mentalen Retardierungskonstrukte analysiert. Als Letztes wurde getestet, ob die mentalen Retardierungskonstrukte noch mit Shrub interagieren können, da zuvor die genetische Interaktion zwischen den hLGDs und Shrub nachgewiesen wurde (s. Kap. 2.2.2). Ein Verlust der Interaktion könnte eventuell zu dem Funktionsverlust der mentalen Retardierungskonstrukte führen.

2.5.4.1 Die mentalen Retardierungskonstrukte von Lgd und hLGD1 sind nuklear und cytoplasmatisch lokalisiert

Zunächst wurde die subzelluläre Lokalisation der mentalen Retardierungskonstrukte in *D. melanogaster* untersucht, da dies eine mögliche Ursache für die fehlende Funktion sein könnte. Wenn bei Lgd die C2 Domäne fehlt, ist das Protein im Kern lokalisiert und deswegen ist es nicht mehr funktional (Troost et al., 2012). Allerdings führt wie oben beschrieben eine Deletion der C2 Domäne der hLGDs nicht zu einer Fehllokalisation. Aus diesem Grund wird zunächst die Lokalisation von HA-Lgd^{MR} analysiert. Dazu wird derselbe Versuchsansatz wie in Kapitel 2.2.5.1 gewählt.

HA-Lgd^{MR} befindet sich sowohl im Cytoplasma als auch im Kern und wird gleichmäßig in der gesamten Zelle exprimiert (s. Abb. 2.44 C, D, pinke Pfeile). Eine Lokalisation im Kern war zu erwarten, da sich Lgd Δ C2 ebenfalls im Kern und dem Lgd^{MR} Konstrukt die C2 Domäne fehlt. Allerdings gibt es dennoch Unterschiede in der Lokalisation, Lgd Δ C2 befindet sich hauptsächlich im Kern und Lgd^{MR} scheint zu gleichen Teilen sowohl im Kern als auch im Cytoplasma lokalisiert zu sein. Demzufolge könnte eine geänderte Lokalisation eine Rolle bei dem Funktionsverlust spielen, allerdings reicht eine geringe Menge Lgd im Cytoplasma aus, um den *lgd* mutanten Phänotyp zu retten (Troost et al., 2012). Im Expressionsbereich von HA-Lgd^{MR} sind vergrößerte N(extra) Vesikel erkennbar (s. Abb. 2.44 F, gelber Pfeil). Dies deutet auf eine Störung im endosomalen Transportweg hin. Zudem scheint es auch vergrößerte Rab7-YFP Vesikel in diesem Bereich zu geben (s. Abb. 2.44 K, gelber Pfeil). Der frühe endosomale Transport, welcher durch Rab5-CFP markiert wurde, scheint jedoch nicht betroffen zu sein (s. Abb. 2.44 J, gelber Pfeil).

w; ptc Gal4; tubP Rab5-CFP, tubP Rab7-YFP
w; lf/Cyo; UAS-X

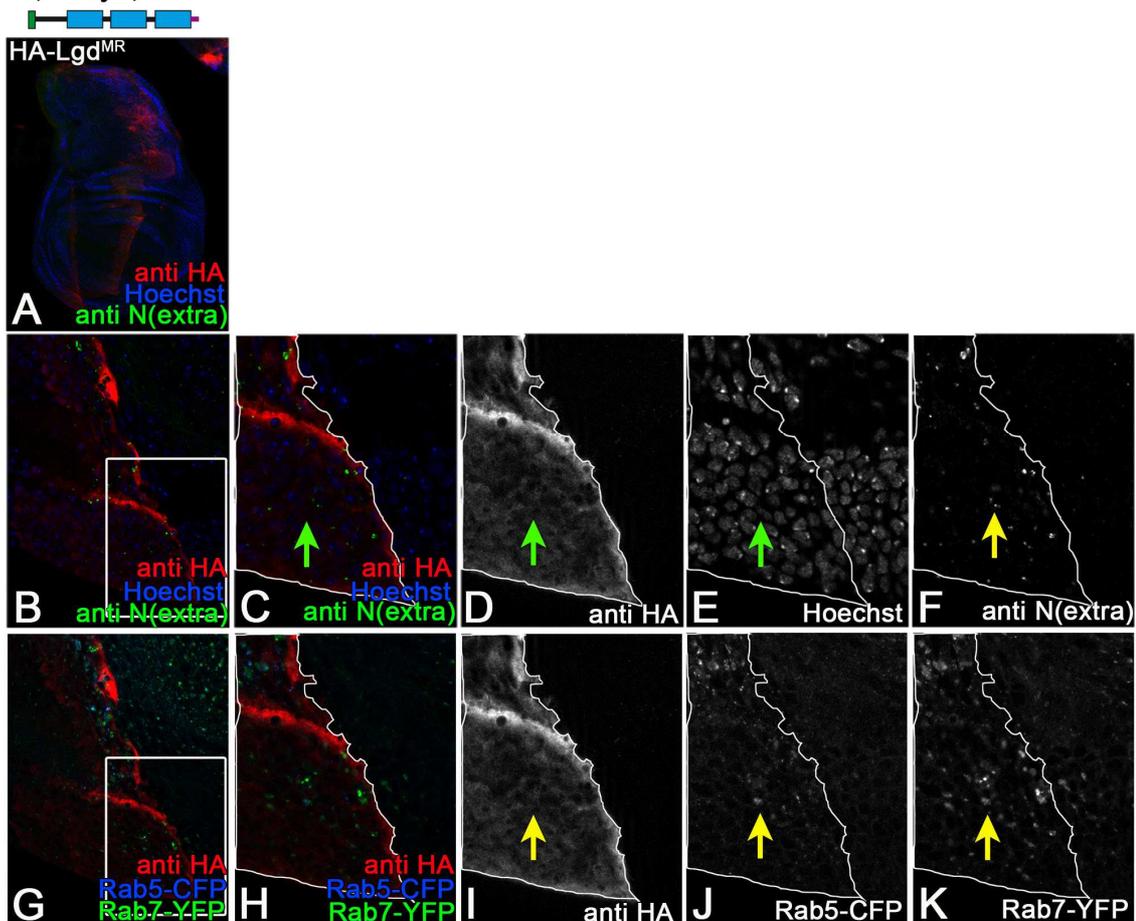


Abb. 2.44: Lokalisation von HA-Lgd^{MR}. A,B: Übersicht über die Expression von HA-Lgd^{MR} im *ptc*-Streifen inklusive der Kern- und N(extra) Färbung. Der weiße Kasten kennzeichnet den Bereich, welcher in C-F vergrößert wurde. C: Übersicht des vergrößerten Bereichs. D: Detektion von HA-Lgd^{MR}. E: Kernfärbung. F: Färbung von N(extra). G, H: Übersicht über die Rab5-CFP und Rab7-YFP Färbung. I: Detektion von HA-Lgd^{MR}. J: Rab5-CFP Färbung. K: Rab7-YFP Färbung. Die pinken Pfeile deuten auf die Lokalisation der Proteine. Die gelben Pfeile kennzeichnen die vergrößerten Vesikel. Links oben in der Abbildung ist der Genotyp der untersuchten Larven dargestellt. Des Weiteren sind über jeder Zeile die verwendeten Konstrukte schematisch dargestellt. HA-Lgd^{MR} ist sowohl cytoplasmatisch als auch nuklear lokalisiert.

Da die Lokalisation von HA-Lgd^{MR} unterschiedlich zu Lgd Δ C2 ist, spielt nicht nur die C2 Domäne bei der Lokalisation eine Rolle, sondern möglicherweise auch der Bereich zwischen der dritten DM14 Domäne und der C2 Domäne. Vielleicht ist dies auch bei hLGD1^{MR} und hLGD2^{MR} der Fall. Um dies näher zu analysieren, wurden auch diese Konstrukte im Hinblick auf ihre Lokalisation untersucht. Es zeigt sich, dass sich HA-hLGD1^{MR} genauso wie HA-Lgd^{MR} sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern befinden (s. Abb. 2.45 C, D, grüne Pfeile).

HA-hLGD2^{MR} hingegen ist weiterhin rein cytoplasmatisch lokalisiert (s. Abb. 2.45 I, J, grüne Pfeile). Die Expression der HA-hLGD^{MR} Konstrukte scheint keinen Einfluss auf den endosomalen Transportweg zu haben, da es zu keiner Veränderung der N(extra)

positiven Vesikel kommt (s. Abb. 2.45 F, L). Auch die Verteilung von Rab5-CFP und Rab7-YFP ist nicht verändert (s. Anhang Abb. 7.11).

w; *ptc* Gal4; tubP Rab5-CFP, tubP Rab7-YFP

w; *lf/Cyo*; UAS-X

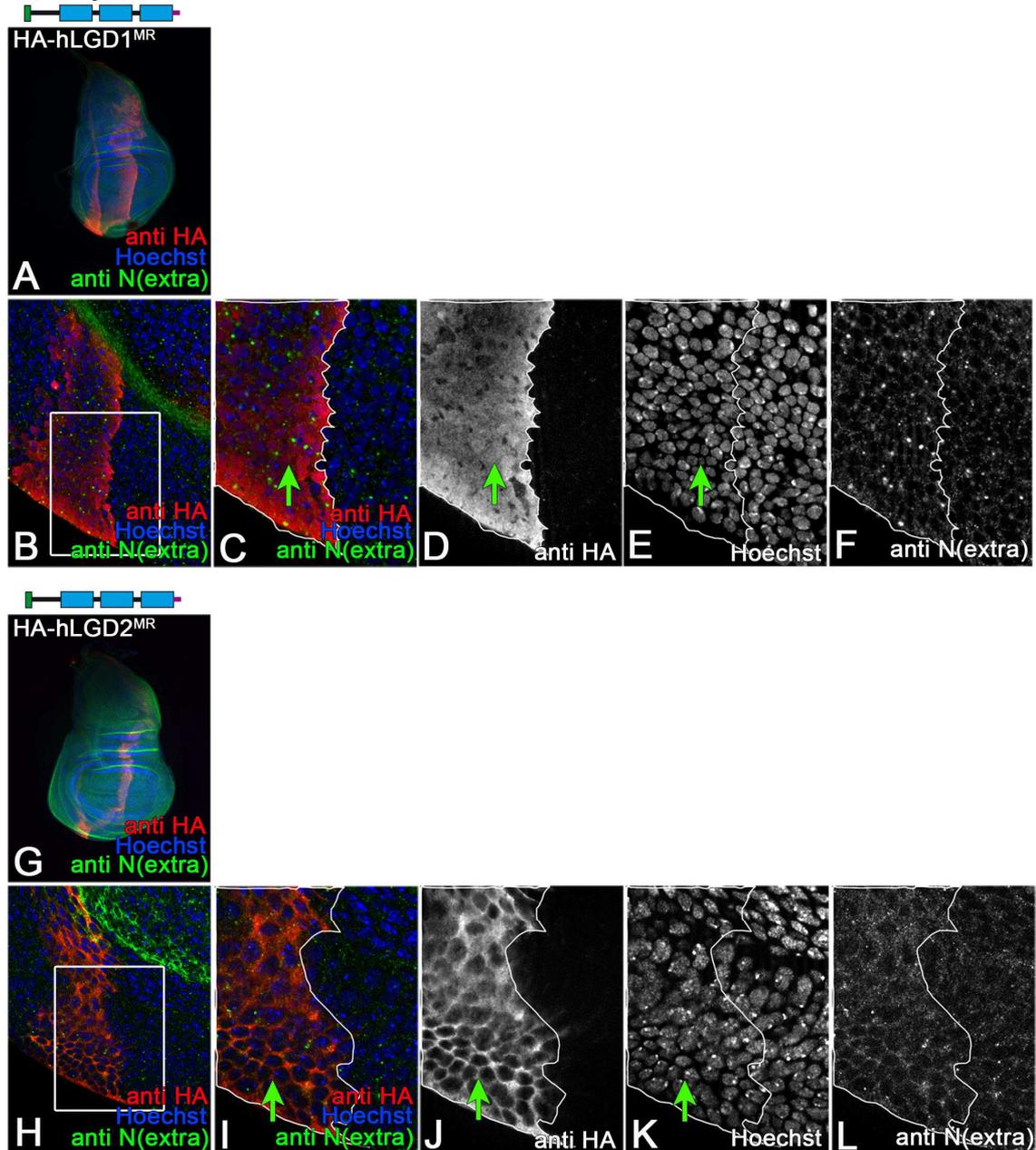


Abb. 2.45: Lokalisation von HA-hLGD1^{MR} und HA-hLGD2^{MR}. A, B G,H: Übersicht über die Expression der Konstrukte im *ptc*-Streifen inklusive der Kern- und N(extra) Färbung in verschiedenen Vergrößerungen. Die weißen Kästen in B und H kennzeichnen die Bereiche, welche in C und I vergrößert wurden. D,J: Detektion der exprimierten Proteine. E, K: Kernfärbung. F, L: Färbung von N(extra). Die grünen Pfeile deuten auf die Lokalisation der Proteine. Links oben in der Abbildung ist der Genotyp der untersuchten Larven dargestellt. HA-hLGD1^{MR} ist sowohl im Cytoplasma als auch im Kern lokalisiert. HA-hLGD2^{MR} befindet sich ausschließlich im Cytoplasma. Die Lokalisationsanalyse von HA-hLGD2^{MR} entstand in Zusammenarbeit mit Shekufe Kharabi-Masouleh (Kharabi-Masouleh, 2012).

Um auszuschließen, dass die veränderte Lokalisation von HA-hLGD1^{MR} und HA-Lgd^{MR} nicht auf das Nonsense-Peptid zurückzuführen ist, wurden auch die Konstrukte *UAS HA-hLGD1DM14(1-3)* und *UAS HA-lgdDM14(1-3)* auf ihre Lokalisation hin betrachtet. Des Weiteren wurde auch noch die Lokalisation von *UAS HA-hLGD2DM14(1-3)* getestet.

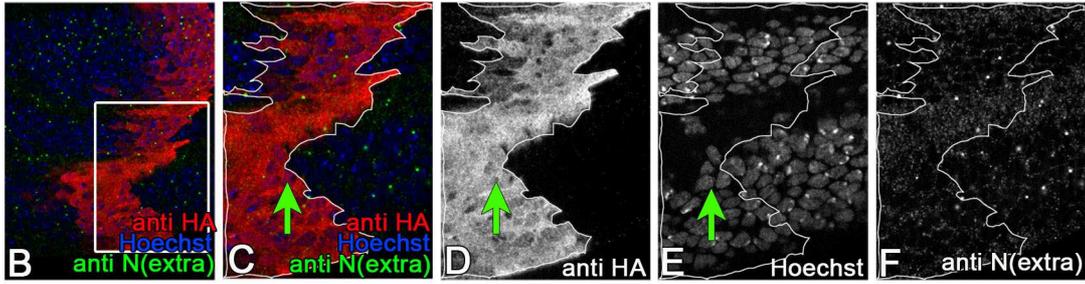
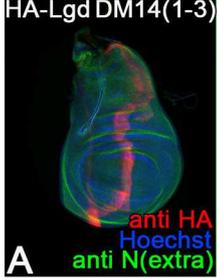
HA-hLGD1DM14(1-3) und HA-LgdDM14(1-3) befinden sich ebenfalls sowohl im Cytoplasma als auch im Nukleus (s. Abb. 2.46 C, D, I, J, grüne Pfeile). Im Gegensatz zu der Expression von HA-Lgd^{MR} sind im Expressionsbereich von HA-LgdDM14(1-3) keine vergrößerten N(extra) Vesikel erkennbar (s. Abb. 2.46 F). Außerdem ist auch keine Veränderung der Rab5-CFP und Rab7-YFP Vesikel zu beobachten (s. Anhang Abb. 7.12).

Genau wie bei HA-hLGD2^{MR} ist auch bei HA-hLGD2DM14(1-3) keine Änderung seiner Lokalisation zu beobachten. Das Protein ist weiterhin cytoplasmatisch lokalisiert. (s. Abb. 2.46 O, P). Weder die Expression von HA-hLGD1DM14(1-3) noch die von HA-hLGD2DM14(1-3) üben einen Einfluss auf den endosomalen Transportweg aus. Sowohl die N(extra) als auch die Rab5 und Rab7 Verteilung wird von der Expression nicht beeinflusst (s. Abb. 2.46 L, R, sowie Anhang Abb. 7.12).

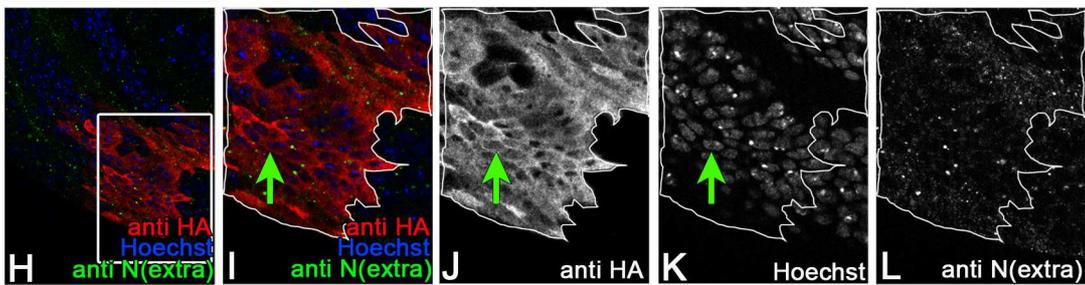
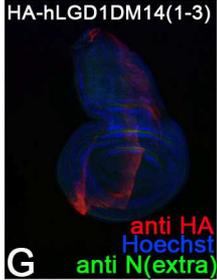
Zusammenfassend kann gesagt werden, dass das Nonsense-Peptid keinen Einfluss auf die Lokalisation der Proteine hat. Jedoch ist das Nonsense-Peptid bei Lgd^{MR} möglicherweise der Grund dafür, dass der endosomale Transportweg gestört wird, da bei der Expression von HA-LgdDM14(1-3) keine Störung des endosomalen Transportweges auftritt. Bei Lgd hat der Bereich ab dem Ende der dritten DM14 Domäne inklusive der C2 Domäne eine Funktion bei der Lokalisation des Proteins. Die Lokalisation von hLGD1 könnte hingegen nur von dem Bereich abhängig sein, welcher nach der dritten DM14 Domäne beginnt bis hin zu dem Anfang der C2 Domäne, da hLGD1ΔC2 wie hLGD1 cytoplasmatisch lokalisiert ist. Bei hLGD2 hingegen scheint keiner der untersuchten Bereiche eine Rolle bei der Lokalisation des Proteins zu spielen. Des Weiteren wurden auch zusätzlich noch die Konstrukte *UAS hLGD2ΔDM14-HA* und *UAS hLGD2ΔC815-HA* untersucht. Auch diese Konstrukte befinden sich im Cytoplasma (s. Anhang Abb. 7.5). Dies bedeutet, dass weder die DM14 Domänen, die C2 Domäne noch die Verlängerung des C-Terminus eine Rolle in der Lokalisation von hLGD2 spielen. Der einzige Bereich, welcher bisher nicht untersucht wurde, ist der N-terminale Bereich des Proteins vor den DM14 Domänen.

w; ptc Gal4; tubP Rab5-CFP, tubP Rab7-YFP
w; lf/Cyo; UAS-X

HA-Lgd DM14(1-3)



HA-hLGD1DM14(1-3)



HA-hLGD2DM14(1-3)

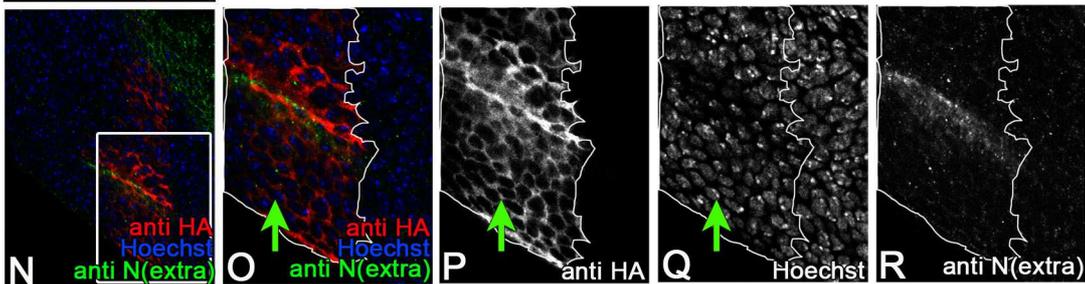


Abb. 2.46: Lokalisation der mentalen Retardierungskonstrukte ohne Nonsense-Peptid. A, B, G, H, M, N: Übersicht über die Expression der Konstrukte im *ptc*-Streifen inklusive der Kern- und N(extra) Färbung in verschiedenen Vergrößerungen. Der weiße Kasten kennzeichnet den Bereich, welcher in C, I und O vergrößert wurde. D, J, P: Detektion der exprimierten Proteine. E, K, Q: Kernfärbung. F, L, R: Färbung von N(extra). Die grünen Pfeile deuten auf die Lokalisation der Proteine. HA-LgdDM14(1-3) und HA-hLGD1DM14(1-3) sind sowohl cytoplasmatisch als auch im Kern lokalisiert. HA-hLGD2DM14(1-3) befindet sich nur im Cytoplasma.

2.5.4.2 Leichte Unterschiede in der Expressionsstärke der mentalen Retardierungskonstrukte

Zuvor konnte nachgewiesen werden, dass sich sowohl bei Lgd als auch bei hLGD2 der Verlust der C2 Domäne negativ auf die Stabilität der Proteine auswirkt (Troost et al., 2012, s. Kap. 2.2.5.2). Da bei den mentalen Retardierungskonstrukten ebenfalls die C2 Domäne deletiert ist, könnte sich dies auf die Stabilität der Proteine auswirken und möglicherweise eine Ursache des Funktionsverlustes der Proteine sein.

Die Analyse der Stabilität der mentalen Retardierungskonstrukte erfolgte in Zusammenarbeit mit Daisy Moll während ihrer Bachelorarbeit (Moll, 2013). Dazu wurden Proteinlysate aus homozygoten L3 Larven gewonnen, welche die jeweiligen Konstrukte unter Kontrolle des *lgdP* exprimierten. Außerdem wurden die Konstrukte im wildtypischen Hintergrund exprimiert. Je Konstrukt wurde Proteinlysate von zehn Larven mithilfe eines Western Blots analysiert.

Es konnten alle aufgetragenen Konstrukte über ihre HA-Markierung detektiert werden (s. Abb. 2.47). Lgd und Lgd^{MR} werden vergleichbar stark exprimiert. Lgd DM14(1-3) hingegen scheint etwas schwächer exprimiert zu werden. Dies könnte auf eine geringere Stabilität des Proteins hindeuten. Es ist auffällig, dass die mentalen Retardierungskonstrukte von hLGD1 im Vergleich zu Lgd deutlich schwächer exprimiert werden. Dies lässt eine geringere Stabilität der Proteine vermuten und konnte auch schon in Kapitel 2.2.5.2 beobachtet werden. Die mentalen Retardierungskonstrukte von hLGD2 werden unterschiedlich stark exprimiert. Im Vergleich zu hLGD2DM14(1-3) scheint hLGD2^{MR} schwächer exprimiert zu werden (s. Abb. 2.47). Dies lässt vermuten, dass das Nonsense-Peptid einen Einfluss auf die Stabilität des Proteins hat. Jedoch ist bei den mentalen Retardierungskonstrukten von Lgd genau der umgekehrte Fall zu beobachten. Dabei sieht es so aus als ob das Protein ohne Nonsense-Peptid instabiler ist. Möglicherweise übt das Nonsense-Peptid je nach Protein einen unterschiedlichen Einfluss auf die Stabilität aus.

Wie auch bei der Analyse der hLGD1 und hLGD2 Deletionskonstrukte zeigen alle mentalen Retardierungskonstrukte höhere Banden als die berechneten (s. Anhang Tab. 7.1).

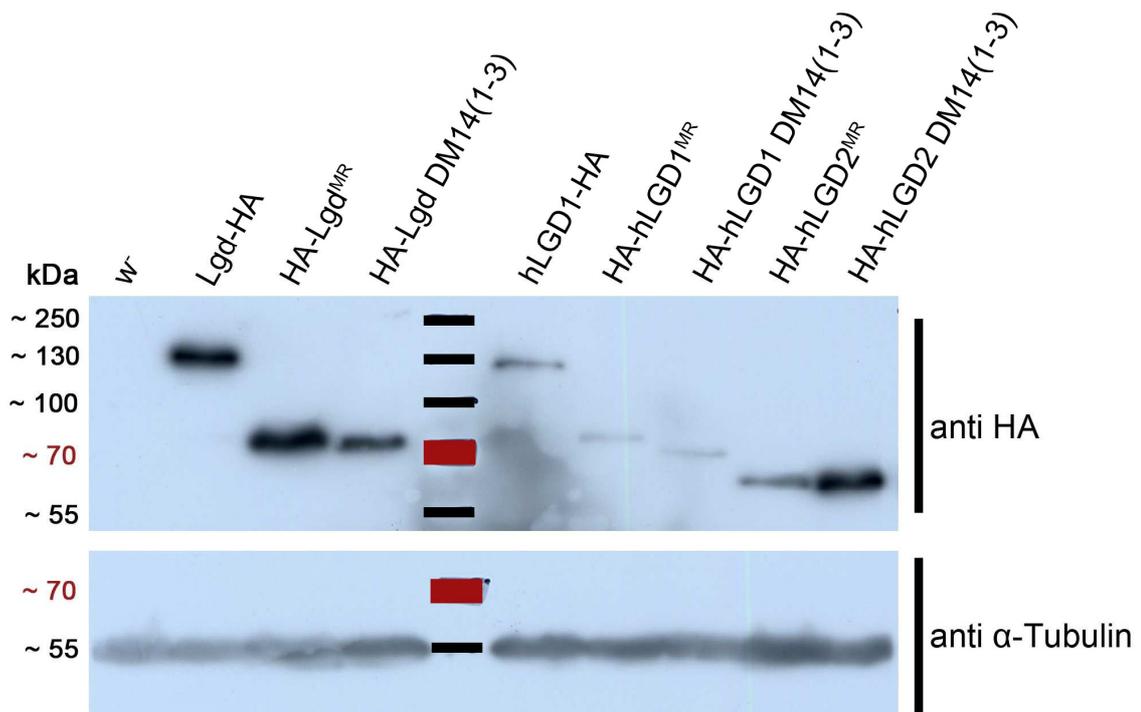


Abb. 2.47: Analyse der Stabilität der mentalen Retardierungskonstrukte mithilfe eines Western Blots. Zur Untersuchung der Stabilität der Proteine wurde Proteinlysate von zehn Larven aufgetragen. Die Konstrukte wurden durch die HA-Markierung mittels α -HA (1:3000) detektiert (Belichtungszeit: 30 min). Als Ladekontrolle diente Tubulin (α -Tubulin: 1:100.000) (Belichtungszeit: 10 min). Das Proteinlysate von w^- -Larven wurde als Negativkontrolle verwendet. Es konnten alle Konstrukte detektiert werden, wobei die hLGD1 Konstrukte deutlich schwächere Banden als die restlichen Proteine aufweisen. Die Proteine weisen alle größere Proteingrößen als die berechneten auf. Diese Analyse erfolgte in Zusammenarbeit mit Daisy Moll (Moll, 2013).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass alle mentalen Retardierungskonstrukte gebildet werden und es in der Stabilität im Vergleich zu den jeweiligen „full-length“ Proteinen zum Teil leichte Abweichungen gibt. So scheint LgdDM14(1-3) im Vergleich zu Lgd und Lgd^{MR} leicht schwächer exprimiert zu werden. hLGD2^{MR} scheint ebenfalls etwas schwächer exprimiert zu werden als hLGD2DM14(1-3). Jedoch ist die Expression immer noch stärker als die Expression von hLGD1.

2.5.4.3 Die mentalen Retardierungskonstrukte interagieren direkt mit Shrub

In den Kapiteln 2.5.1 bis 2.5.3 wurde nachgewiesen, dass die mentalen Retardierungskonstrukte in *Drosophila melanogaster* keine Funktionalität mehr besitzen. Eine Ursache könnte eine fehlende Interaktion dieser Konstrukte mit Shrub sein. Zuvor konnte allerdings mithilfe einer Co-Immunoprecipitation gezeigt werden, dass die humanen mentalen Retardierungskonstrukte noch mit CHMP4B und CHMP4C interagieren (Lindner, 2013). Zur Analyse einer möglichen Interaktion der mentalen Retardierungskonstrukte mit Shrub, dem CHMP4 Ortholog aus *Drosophila melanogaster*, wurden als Nächstes Pulldown-Experimente durchgeführt. Damit wird der Nachweis einer direkten Interaktion möglich.

Für den Pulldown wurde MBP-markiertes Shrub verwendet und die möglichen Interaktionspartner wurden His₆ markiert. Als Positivkontrolle diente His₆-Lgd, da bekannt ist, dass Shrub direkt mit Lgd interagiert (Troost et al., 2012). Als Negativkontrolle wurden die His₆ markierten Proteine nur mit MBP inkubiert, damit ausgeschlossen werden kann, dass die Proteine unspezifisch an MBP binden und nicht an den potenziellen Interaktionspartner Shrub.

Als erstes wurde der Pulldown mit den mentalen Retardierungskonstrukten von Lgd durchgeführt, da Shrub und Lgd natürliche Interaktionspartner sind. Dazu wurden jeweils His₆-Lgd, His₆-Lgd^{MR} oder His₆-LgdDM14(1-3) über MBP-Shrub präzipitiert. Im anschließenden Western Blot zeigt sich, dass His₆-Lgd, aber auch His₆-Lgd^{MR} und His₆-LgdDM14(1-3) präzipitiert werden konnten (s. Abb. 2.48, weiße Sterne). Trotz der starken Hintergrundfärbung sind die Banden deutlich erkennbar. Vor allem bei His₆-Lgd sind mehrere Banden zu erkennen, was auf eine mögliche Degradation des Proteins hindeutet. Die Banden der kompletten Proteine sind jedoch immer noch am stärksten und werden durch die weißen Sterne kenntlich gemacht. Die Spezifität der Interaktion zwischen His₆-Lgd, His₆-Lgd^{MR} oder His₆-LgdDM14(1-3) mit Shrub wurde dadurch belegt, dass in der Negativkontrolle keines der Konstrukte präzipitiert wurde (s. Abb. 2.48). Wie auch bei His₆-Lgd sind bei MBP-Shrub mehrere Banden detektiert worden.

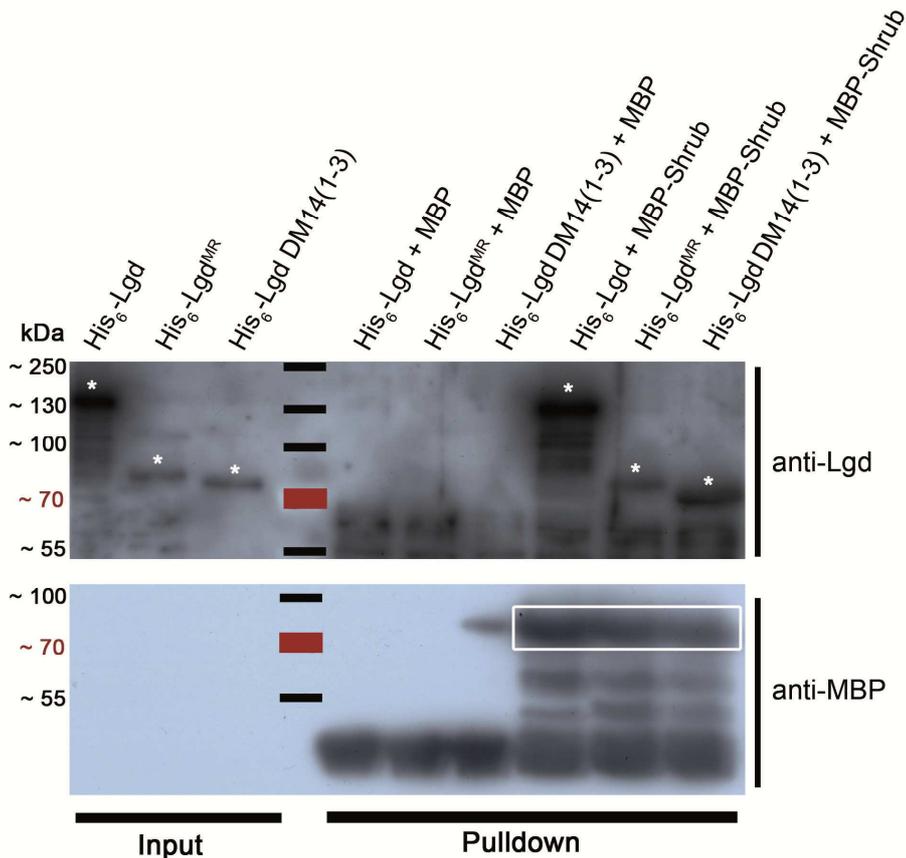


Abb. 2.48: Analyse der Interaktion von MBP-Shrub mit den mentalen Retardierungskonstrukten von Lgd mithilfe eines Pulldowns. Die Detektion der Proteine erfolgte durch einen Western Blot. Zunächst wurden die His₆-Lgd Proteine über anti-Lgd (1:3000) detektiert (Belichtungszeit 2h). Da MBP-Shrub und die mentalen Retardierungskonstrukte fast gleich groß sind, wurde vor der Inkubation mit anti-MBP (1:5000) der gebundenen Lgd Antikörper von der Membran entfernt (Belichtungszeit:1 min). Die Lgd Proteine im Input sowie die präzipitierten Lgd Proteine wurden mit weißen Sternen markiert. Besonders bei His₆-Lgd sind mehrere Banden erkennbar, was auf eine mögliche Degradation des Proteins hindeutet. Der untere Blot weist das eingesetzte MBP, bzw. MBP-Shrub nach. MBP-Shrub ist weiß umrahmt und zeigt wie auch His₆-Lgd viele Banden, auch dies könnten Abbauprodukte sein. Sowohl His₆-Lgd als auch seine mentalen Retardierungskonstrukte konnten präzipitiert werden. Die mentalen Retardierungskonstrukte interagieren also noch direkt mit Shrub.

Als nächstes erfolgte die Analyse der möglichen Interaktion zwischen His₆-hLGD1, His₆-hLGD1^{MR} oder His₆-hLGD1DM14(1-3) mit MBP-Shrub. Es konnte in Kapitel 2.2.2. nachgewiesen werden, dass hLGD1 genetisch mit Shrub interagiert. In dem Pulldown kann nun überprüft werden, ob diese Interaktion direkt ist.

Dazu wurden jeweils His₆-hLGD1, His₆-hLGD1^{MR} oder His₆-hLGD1DM14(1-3) über MBP-Shrub präzipitiert. Alle hLGD1 Konstrukte konnten im Western Blot detektiert werden (s. Abb. 2.49, weiße Sterne). Es sind jedoch viele Banden zu sehen, allerdings sind die Banden der kompletten Proteine am stärksten, welche durch die weißen Sterne gekennzeichnet sind. In der Negativkontrolle sind ganz schwache Banden auf Höhe von His₆-hLGD1 zu beobachten (s. Abb. 2.49, rote Sterne). Allerdings sind keine Banden auf der Höhe der mentalen Retardierungskonstrukte zu erkennen, deshalb ist

die Interaktion von Shrub mit den mentalen Retardierungskonstrukten von hLGD1 spezifisch. Möglicherweise hat eine unspezifische Bindung stattgefunden oder die Proben wurden mit His₆-hLGD1 kontaminiert. Es kann also nicht ausgeschlossen werden, dass His₆-hLGD1 an das MBP gebunden hat und nicht an Shrub. Die direkte Interaktion von His₆-hLGD1^{MR} oder His₆-hLGD1DM14(1-3) mit Shrub hingegen konnte nachgewiesen werden.

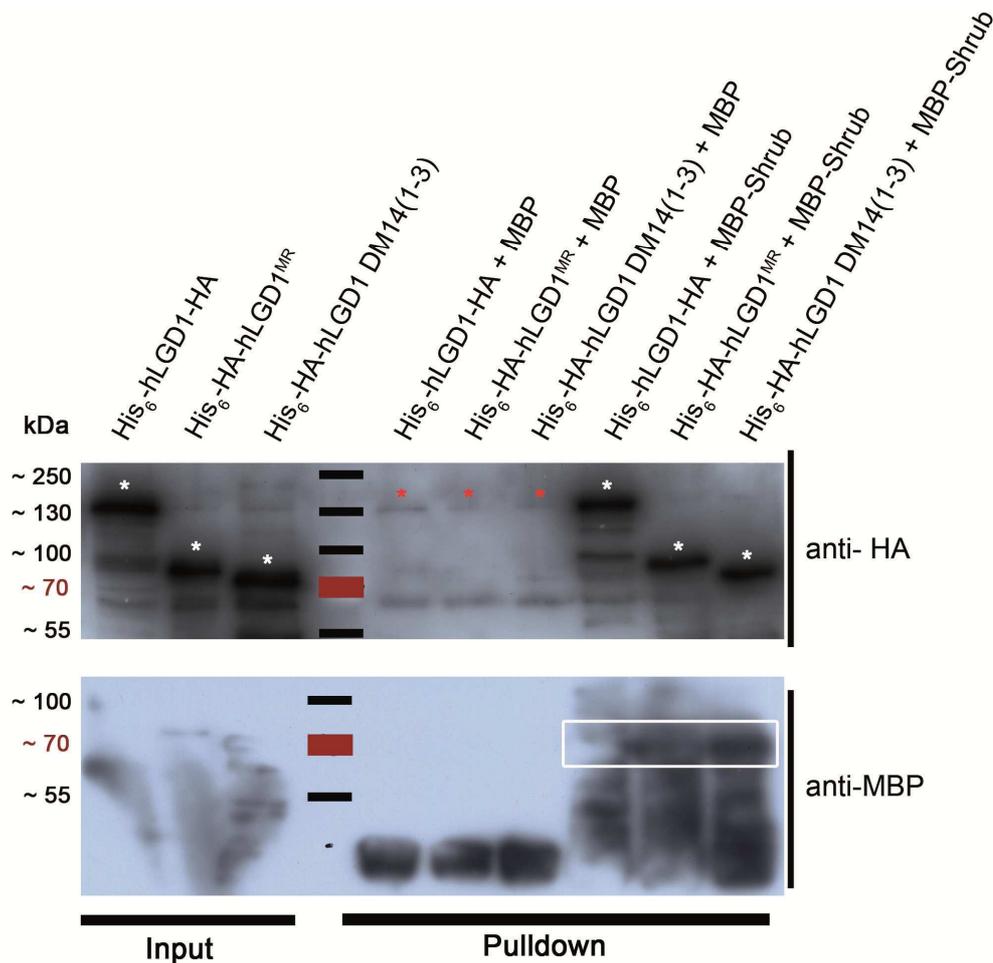


Abb. 2.49: Untersuchung der Interaktion von MBP-Shrub mit den mentalen Retardierungskonstrukten von hLGD1 mithilfe eines Pulldowns. Die Detektion der Proteine erfolgte über einen Western Blot. Zunächst wurden die His₆-hLGD1 Proteine mittels anti-HA (1:3000) detektiert (Belichtungszeit: 2h). Vor der Detektion von MBP-Shrub bzw MBP mit anti-MBP (1:5000) wurde der gebundenen HA Antikörper entfernt (Belichtungszeit: 10 min). Die hLGD1 Proteine im Input sowie die präzipitierten hLGD1 Proteine sind mit weißen Sternen markiert. Bei allen His₆ markierten Proteinen sind mehrere Banden erkennbar, was auf eine mögliche Degradation der Proteine hindeutet. In der Negativkontrolle ist bei allen drei Konstrukten eine schwache Bande auf Höhe von His₆-hLGD1 bei circa 130 kDa erkennbar (rote Sterne). Der untere Blot weist das eingesetzte MBP, bzw. MBP-Shrub nach. MBP-Shrub ist weiß umrahmt und zeigt wie die anderen Proteine viele Banden, auch dies könnten Abbauprodukte sein. Sowohl His₆-hLGD1 als auch seine mentalen Retardierungskonstrukte konnten präzipitiert werden. Die mentalen Retardierungskonstrukte interagieren also noch direkt mit Shrub.

Als letztes erfolgte die Untersuchung der möglichen Interaktion zwischen His₆-hLGD2, His₆-hLGD2^{MR} oder His₆-hLGD2DM14(1-3) mit Shrub. Zur näheren Analyse der zuvor

nachgewiesenen genetischen Interaktion zwischen hLGD2 und Shrub (s. Kap. 2.2.2) wurde ein Pulldown zum Beleg einer möglichen direkten Interaktion durchgeführt.

Dazu wurden jeweils His₆-hLGD2, His₆-hLGD2^{MR} oder His₆-hLGD2DM14(1-3) über MBP-Shrub präzipitiert. Alle getesteten hLGD2 Konstrukte konnten präzipitiert werden (s. Abb. 2.50, weiße Sterne). Allerdings sind mehrere Banden erkennbar. Jedoch sind die Banden der kompletten Proteine (weiße Sterne) deutlich stärker als die darunter liegenden Banden. In der Negativkontrolle ist eine Bande auf Höhe von His₆-hLGD2 präzipitiert worden (roter Stern), auf der Höhe von His₆-hLGD2^{MR} oder His₆-hLGD2DM14(1-3) jedoch nicht (s. Abb. 2.50). Die Interaktion von His₆-hLGD2^{MR} oder His₆-hLGD2DM14(1-3) mit Shrub ist also spezifisch und direkt. Möglicherweise hat His₆-hLGD2 an das MBP gebunden und nicht an Shrub.

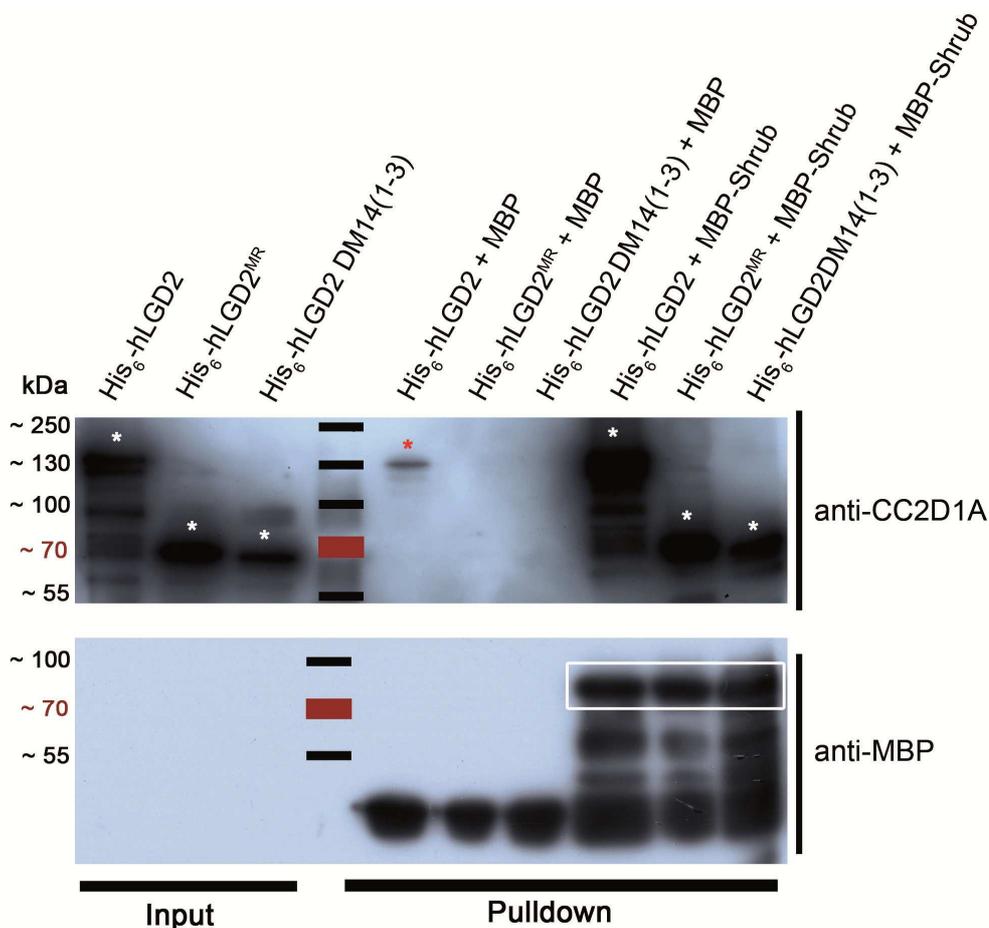


Abb. 2.50: Analyse der Interaktion von MBP-Shrub mit den mentalen Retardierungskonstrukten von hLGD2 mithilfe eines Pulldowns. Die Detektion der Proteine erfolgte über einen Western Blot. Zunächst wurden die His₆-hLGD1 Proteine mittels anti CC2D1A (1:2000) detektiert (Belichtungszeit: 30 min). Da MBP-Shrub und die mentalen Retardierungskonstrukte fast gleich groß sind, wurde vor der Inkubation mit anti-MBP (1:5000) der gebundene CC2D1A Antikörper von der Membran entfernt (Belichtungszeit: 1 min). Die hLGD2 Proteine im Input sowie die präzipitierten hLGD2 Proteine sind mit weißen Sternen markiert. In der Negativkontrolle ist bei His₆-hLGD2 eine Bande von ungefähr 130 kDa erkennbar (roter Stern). Der untere Blot zeigt das eingesetzte MBP, bzw. MBP-Shrub. MBP-Shrub ist weiß umrahmt. Bei allen His₆ markierten Proteinen sowie MBP-Shrub sind mehrere Banden zu beobachten, was auf eine mögliche Degradation der Proteine hindeutet. Sowohl His₆-hLGD2 als auch seine mentalen Retardierungskonstrukte konnten präzipitiert werden. Die mentalen Retardierungskonstrukte interagieren also noch direkt mit Shrub.

Diese Ergebnisse belegen, dass alle mentalen Retardierungskonstrukte noch direkt mit Shrub interagieren können und dass der Funktionsverlust nicht durch eine fehlende Interaktion mit Shrub bedingt ist. Das Nonsense-Peptid hat keinen Einfluss auf die Interaktion.

2.5.5 Analyse der mentalen Retardierungskonstrukte in humanen Zellen

Nach der Untersuchung der mentalen Retardierungskonstrukte in *Drosophila melanogaster* und einer proteinbiochemischen Analyse erfolgte eine weitere Untersuchung in humanen Zellen. Da diesen Konstrukten die C2 Domäne fehlt, könnten bei der Expression der mentalen Retardierungskonstrukte stark vergrößerte Vesikel auftreten, wie auch bei der Expression der hLGD Δ C2 Konstrukte (s. Kap. 2.4.2.5). Dazu wurden die Konstrukte in humanen HeLa Zellen exprimiert und anschließend mit den endosomalen Markern RAB5, RAB7 und LAMP1 sowie dem ESCRT-III Protein CHMP4B analysiert.

Zunächst wurden die mentalen Retardierungskonstrukte mit dem Nonsense-Peptid analysiert. Wie zuvor auch schon bei der Expression in der Flügelimaginalscheibe zu beobachten war (s. Kap. 2.5.4.1), ist HA-hLGD1^{MR} sowohl im Cytoplasma als auch im Kern lokalisiert (s. Abb. 2.51 J-L, pinke Pfeile). Zudem ist es mit vesikulären Strukturen assoziiert (s. Abb. 2.51 J-L). Allerdings treten keine stark vergrößerten Vesikel auf wie bei der Expression von hLGD1 Δ C2-HA. Die HA-hLGD1^{MR} positiven Vesikel sind mit keinen der endosomalen Marker assoziiert (s. Abb. 2.51 D-F). Die mit LAMP1 assoziierten Vesikel scheinen jedoch im Vergleich zu denen in untransfizierten Zellen größer zu sein (s. Abb. 2.51 F, I (türkise Pfeile) im Vergleich zu 2.17 D (Kontrolle)). Dies weist daraufhin, dass die Expression von HA-hLGD1^{MR} den spät endosomalen/lysosomalen Transportweg stört.

Es ist auch keine Assoziation mit CHMP4B erkennbar (s. Abb. 2.52 C). Da die Vesikel weder mit den endosomalen Markern noch mit CHMP4B assoziiert sind, wurde zusätzlich noch Calnexin, ein ER-Marker und Syntaxin, ein Marker des Golgi-Apparats analysiert. Weder mit Calnexin noch mit Syntaxin gibt es eine Assoziation mit hLGD1^{MR} (s. Anhang s. Abb. 7.13 und 7.15). HA-Lgd^{MR} verhält sich wie HA-hLGD1^{MR}, es ist sowohl im Cytoplasma als auch im Kern an vesikelartigen Strukturen lokalisiert und assoziiert weder mit endosomalen Markern noch mit CHMP4B, Calnexin oder Syntaxin (s. Anhang Abb. 7. 17 und 7.18)

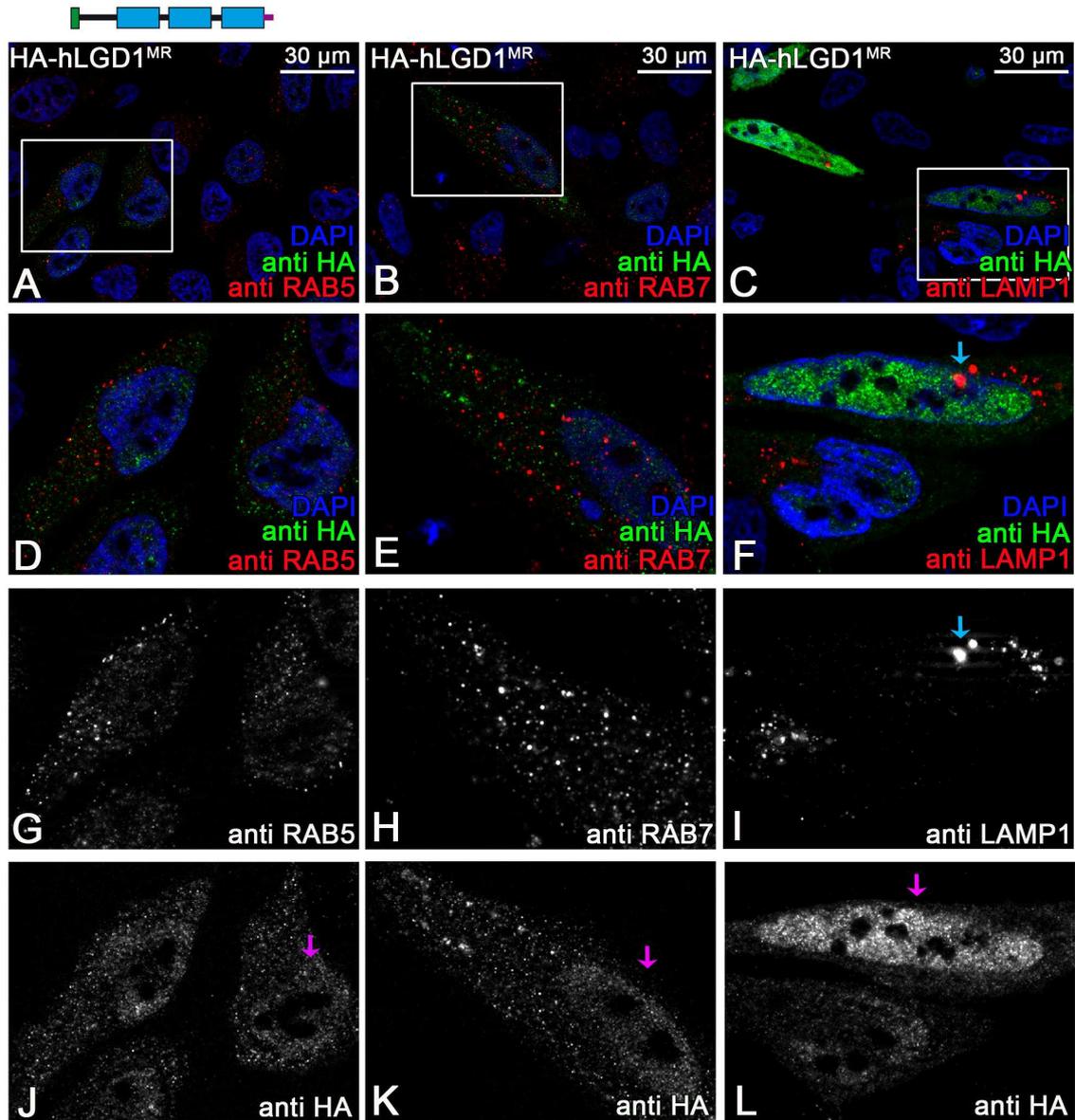


Abb. 2.51: Expression von HA-hLGD1^{MR} und Markierung der endosomalen Marker in HeLa Zellen. A-C: Übersicht des exprimierten HA-hLGD1^{MR} mit der jeweiligen Färbung der endosomalen Marker. D-F: vergrößerter Ausschnitt, welcher die Färbung der endosomalen Marker sowie die HA- und Kernfärbung zeigt. G: vergrößerter Ausschnitt der RAB5 Färbung. H: vergrößerter Ausschnitt der RAB7 Färbung. I: vergrößerter Ausschnitt der LAMP1 Färbung. J-L: vergrößerte Ausschnitte der HA Färbung der HA-hLGD1^{MR} exprimierenden Zellen. HA-hLGD1^{MR} positive Vesikel sind nicht mit endosomalen Markern assoziiert.

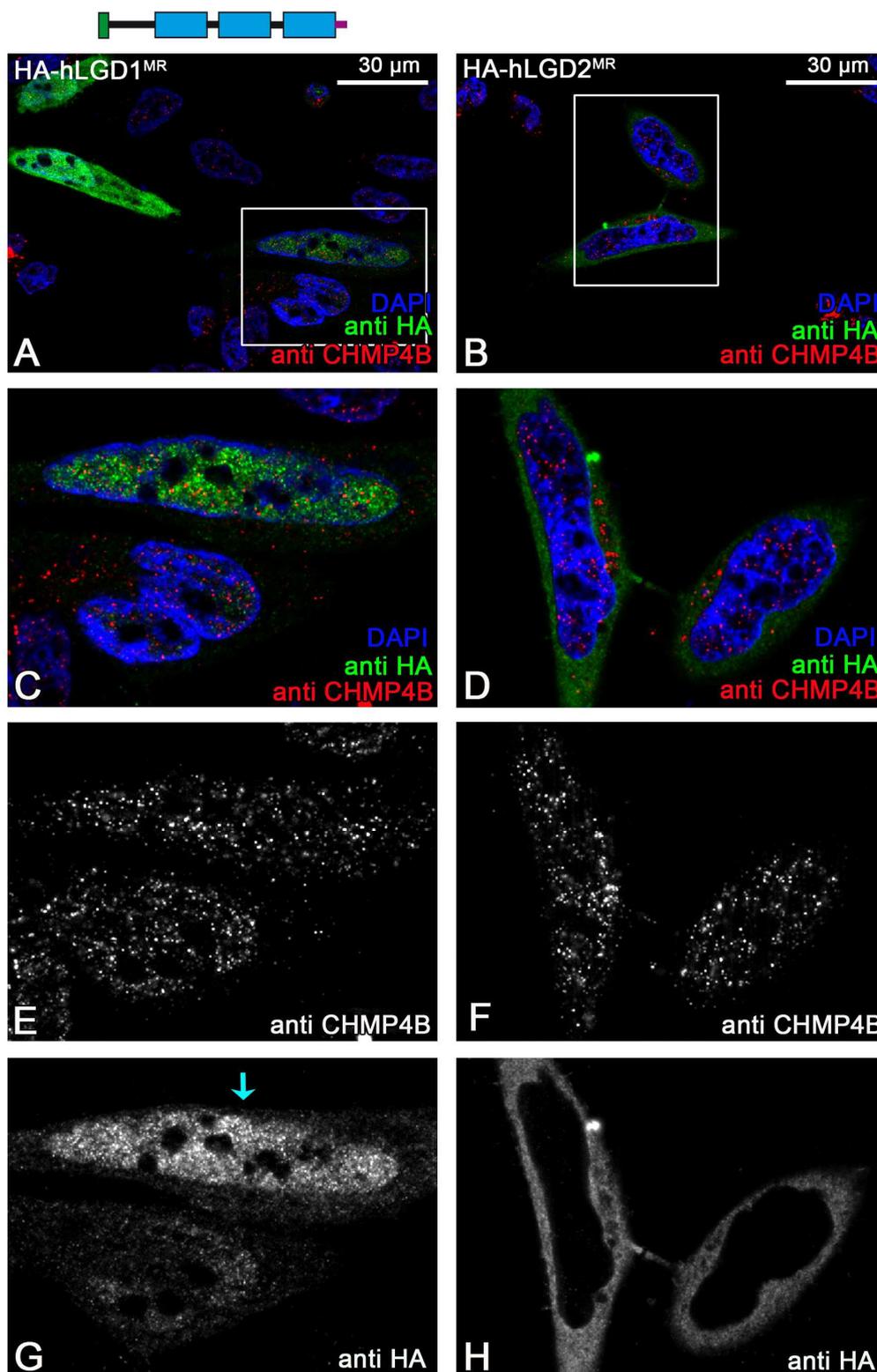


Abb. 2.52: Expression von HA-hLGD1^{MR} und von HA-hLGD2^{MR} sowie die Markierung von CHMP4B in HeLa Zellen. A-B: Übersicht der exprimierten hLGD^{MR} Konstrukte sowie der Kern- und CHMP4B Färbung. C-D: vergrößerter Ausschnitt, welcher die Färbung von CHMP4B sowie die HA- und Kernfärbung markiert. E-F: vergrößerter Ausschnitt der CHMP4B Färbung. G: vergrößerter Ausschnitt der HA Färbung der HA-hLGD1^{MR} exprimierenden Zellen. Der türkise Pfeil weist auf die Lokalisation von HA-hLGD1^{MR} im Kern. H: vergrößerter Ausschnitt der HA Färbung der HA-hLGD2^{MR} exprimierenden Zellen. Weder mit HA-hLGD1^{MR} noch mit HA-hLGD2^{MR} markierte Vesikel sind mit CHMP4B assoziiert.

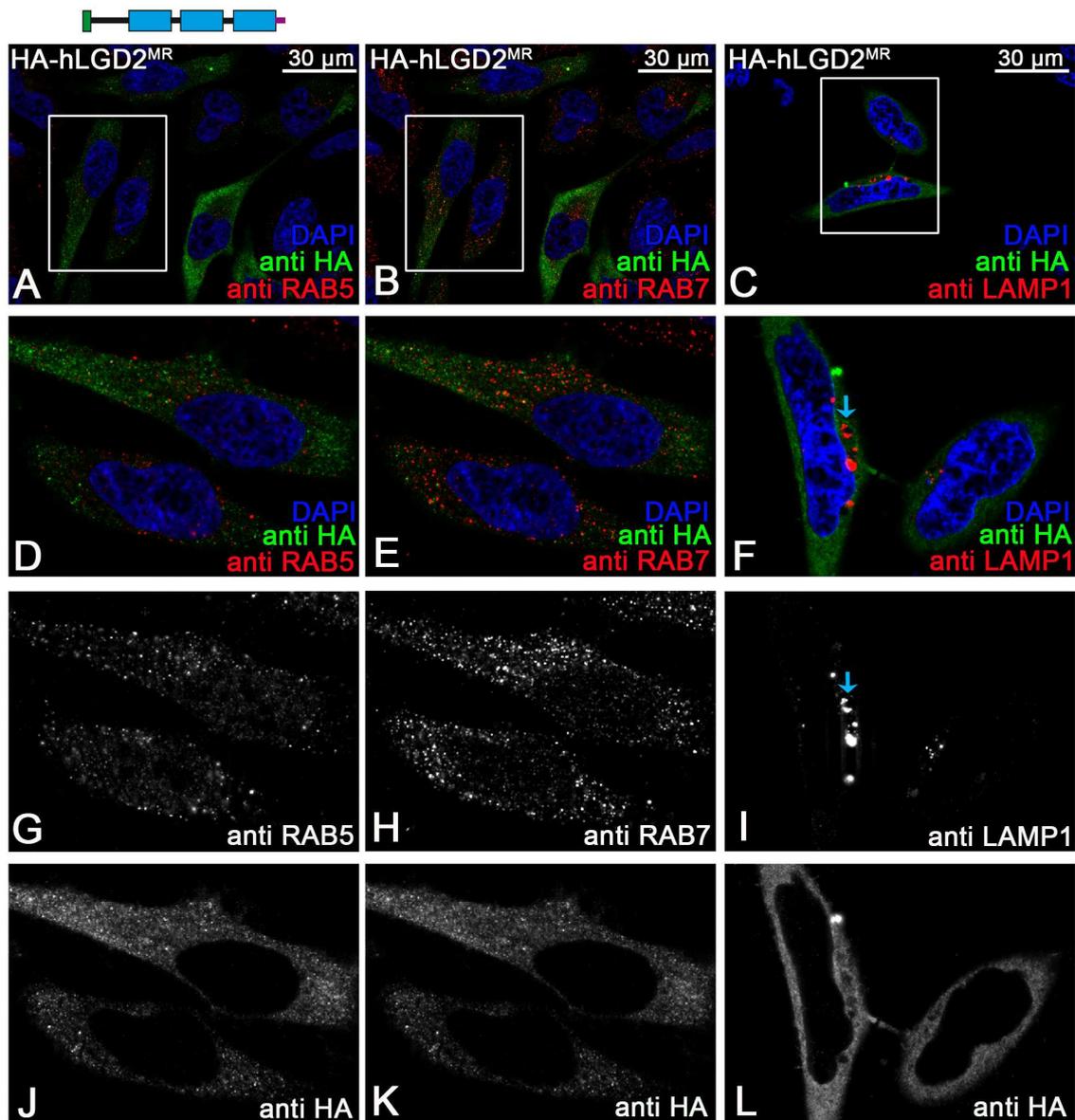


Abb. 2.53: Expression von HA-hLGD2^{MR} und Markierung der endosomalen Marker in HeLa Zellen. A-C: Übersicht des exprimierten HA-hLGD2^{MR} mit der jeweiligen Färbung der endosomalen Marker. D-F: vergrößerter Ausschnitt, welcher die Färbung der endosomalen Marker sowie die HA- und Kernfärbung zeigt. G: vergrößerter Ausschnitt der RAB5 Färbung. H: vergrößerter Ausschnitt der RAB7 Färbung. I: vergrößerter Ausschnitt der LAMP1 Färbung. J-L: vergrößerte Ausschnitte der HA Färbung der HA-hLGD2^{MR} exprimierenden Zellen. HA-hLGD2^{MR} positive Vesikel sind nicht mit den untersuchten endosomalen Markern assoziiert. Jedoch sind vergrößerte LAMP1 positive Vesikel zu beobachten (türkiser Pfeil)

Auch die Lokalisation von HA-hLGD2^{MR} ist an vesikulären Strukturen zu beobachten, welche jedoch im Gegensatz zu HA-hLGD1^{MR} nur auf das Cytoplasma beschränkt sind (s. Abb. 2.53 J-L). Dies ist konform mit den Ergebnissen der Lokalisation von HA-hLGD2^{MR} in *Drosophila melanogaster* (s. Kap. 2.5.4.1). Auch die HA-hLGD2^{MR} positiven Vesikel sind weder mit RAB5 (s. Abb. 2.53 D) oder RAB7 (s. Abb. 2.53 E) assoziiert. Des Weiteren ist HA-hLGD2^{MR} nicht mit LAMP1 (s. Abb. 2.53 F) assoziiert. Es treten allerdings vergrößerte LAMP1 positive Vesikel auf (s. Abb. 53 I, türkiser

Pfeil). Dies deutet auf eine Störung des spät endosomalen/lysosomalen Transportweges hin.

HA-hLGD2^{MR} ist auch nicht mit CHMP4B assoziiert (s. Abb. 2.52 D) und scheint zudem hier eher diffus im Cytoplasma verteilt vorzuliegen. Außerdem ist keine Assoziation von HA-hLGD2^{MR} mit Calnexin oder Syntaxin (s. Anhang Abb. 7.13 und 7.15) zu beobachten.

Die mentalen Retardierungskonstrukte mit Nonsense-Peptid sind also alle an vesikulären Strukturen lokalisiert, wobei diese jedoch nicht mit dem endosomalen/lysosomalen Transport und auch nicht mit CHMP4B assoziiert sind. Des Weiteren sind sie auch nicht mit dem Golgi-Apparat oder dem ER assoziiert. Es scheint also keine Störung in der Modifikation oder in der Bildung des Proteins vorzuliegen, weshalb sie in dem ER oder Golgi-Apparat zurückgehalten werden könnten. Die mentalen Retardierungskonstrukte mit Nonsense-Peptid üben auch keinen dominant negativen Effekt auf den endosomalen Transportweg aus, wie die hLGDs ohne C2 Domäne.

Zusätzlich wurden noch die mentalen Retardierungskonstrukte ohne Nonsense-Peptid analysiert. Denn möglicherweise übt das Nonsense-Peptid einen Einfluss auf die Funktionalität, Faltung oder Lokalisation des Proteins aus.

Die Expression von HA-hLGD1DM14(1-3) führt wie auch von HA-hLGD1^{MR}, zu einer cytoplasmatischen und nuklearen Lokalisation von HA-hLGD1DM14(1-3) an vesikulären Strukturen (s. Abb. 2.54 J-L). Diese vesikulären Strukturen sind ebenfalls weder mit RAB5, RAB7 noch mit LAMP1 assoziiert (s. Abb. 2.54 D, E). Allerdings zeigen sich wie bei der Expression von HA-hLGD2^{MR} oder HA-hLGD1^{MR} vergrößerte mit LAMP1 assoziierte Vesikel. Dies deutet auf eine Störung im spät endosomalen/lysosomalen Transportweg hin. Es ist auch keine Assoziation mit CHMP4B (s. Abb. 2.55 C), Syntaxin oder Calnexin (s. Anhang Abb. 7.14 C und 7.16 C) erkennbar.

HA-IgdDM14(1-3) ist ebenfalls sowohl im Cytoplasma als auch im Kern an vesikulären Strukturen lokalisiert (s. Anhang Abb. 7.19 J-L). Diese sind, wie auch alle anderen mentalen Retardierungskonstrukte, nicht mit endosomalen Markern assoziiert (s. Anhang Abb. 7.19 D, E). Zudem ist auch keine Assoziation mit CHMP4B (s. Anhang Abb. 7.20 C), Syntaxin (s. Anhang Abb. 7.20 E) oder Calnexin (s. Anhang Abb. 7.20 D) erkennbar.

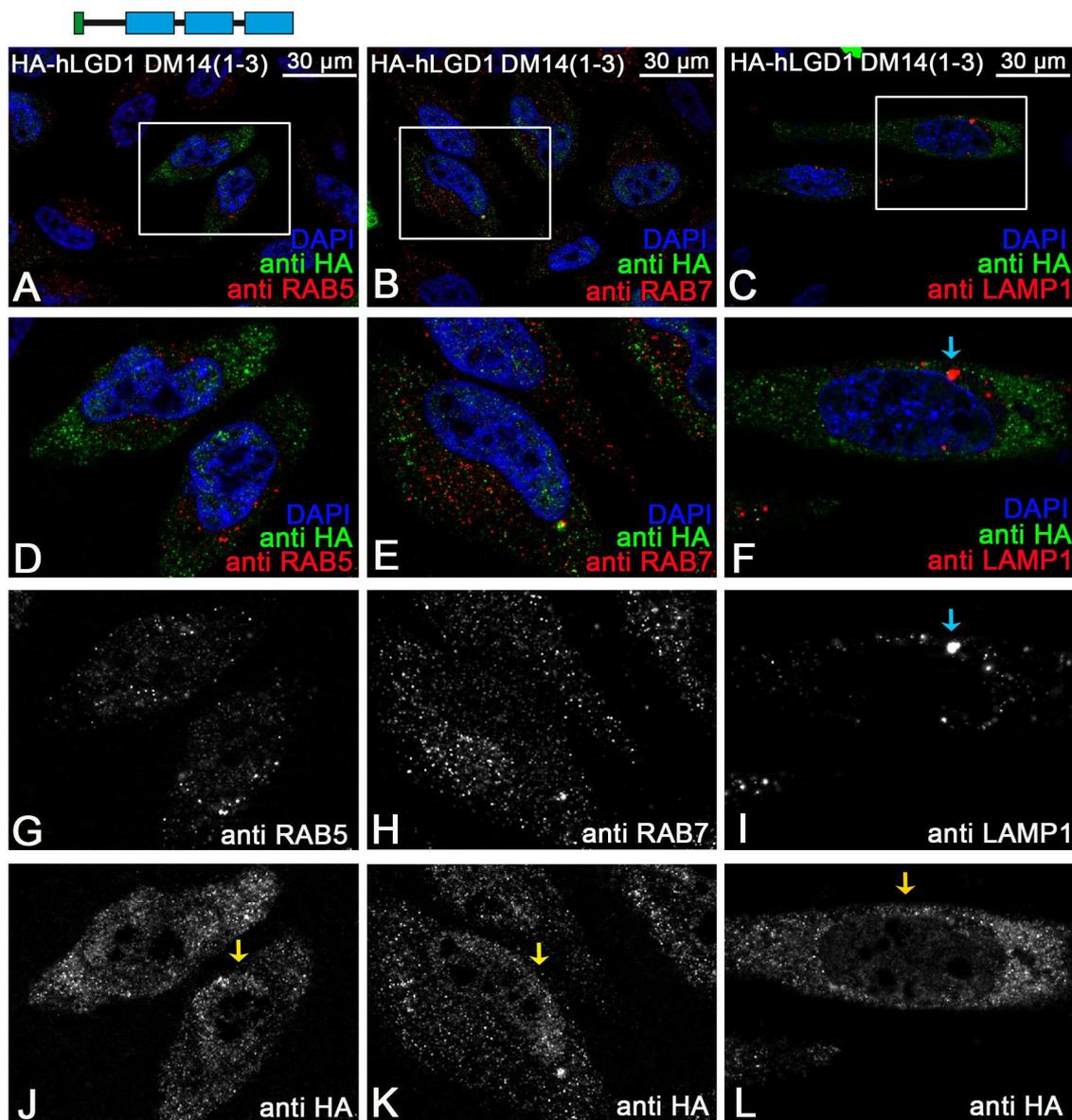


Abb. 2.54: Expression von HA-hLGD1DM14(1-3) und Markierung der endosomalen Marker in HeLa Zellen. A-C: Übersicht des exprimierten HA-hLGD1DM14(1-3) mit der jeweiligen Färbung der endosomalen Marker. D-F: vergrößerter Ausschnitt, welcher die Färbung der endosomalen Marker sowie die HA- und Kernfärbung zeigt. G: vergrößerter Ausschnitt der RAB5 Färbung. H: vergrößerter Ausschnitt der LAMP1 Färbung. I: vergrößerter Ausschnitt der CHMP4B Färbung. J-L: vergrößerte Ausschnitte der HA Färbung der HA-hLGD1DM14(1-3) exprimierenden Zellen. HA-hLGD1DM14(1-3) positive Vesikel sind nicht mit den getesteten endosomalen Markern assoziiert.

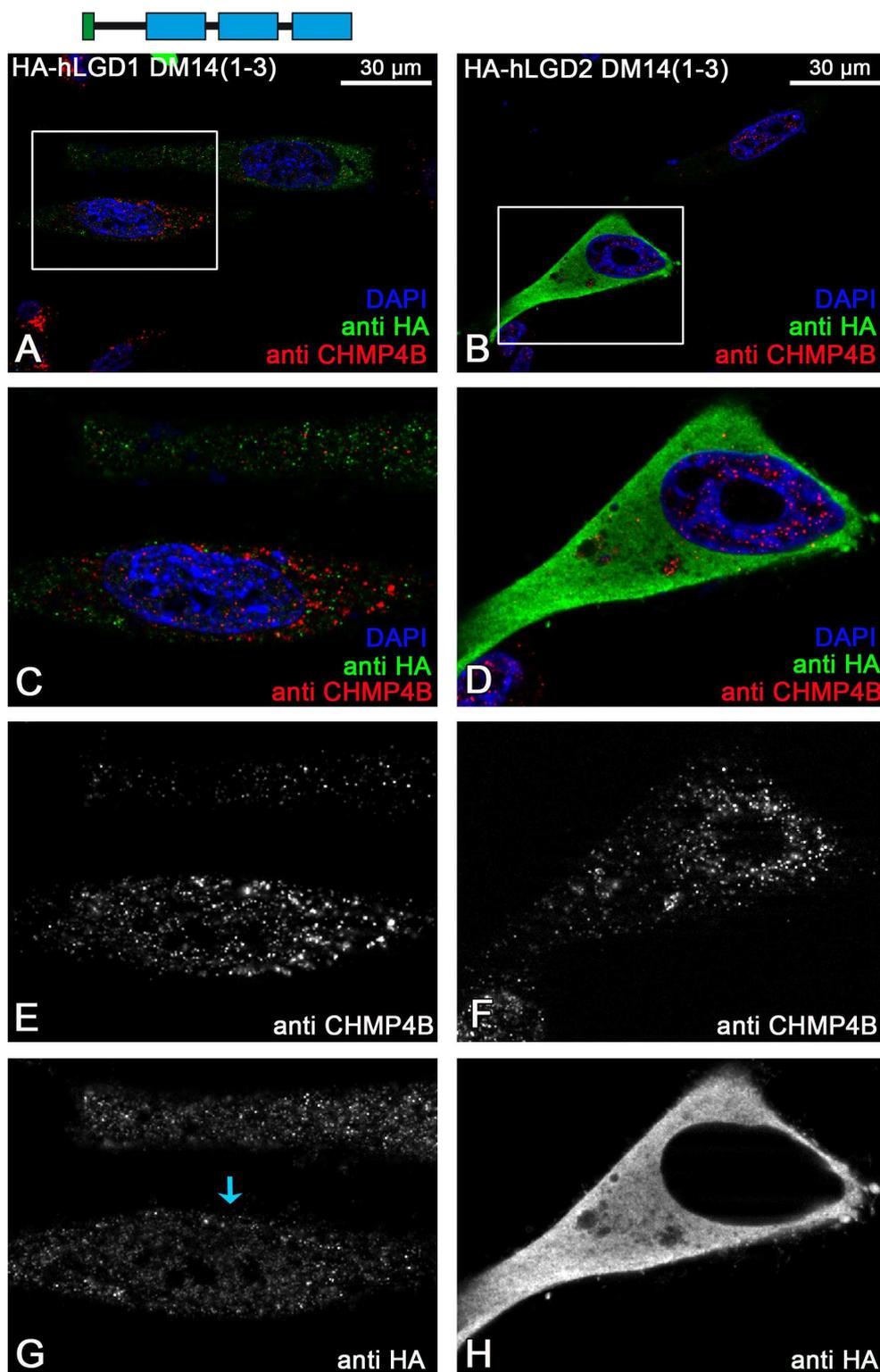


Abb. 2.55: Expression von HA-hLGD1DM14(1-3) und von HA-hLGD2DM14(1-3) sowie die Markierung von CHMP4B in HeLa Zellen. A-B: Übersicht der exprimierten HA-hLGD DM14(1-3) Konstrukte sowie der Kern- und CHMP4B Färbung. C-D: vergrößerter Ausschnitt, welcher die Färbung von CHMP4B sowie die HA- und Kernfärbung markiert. E-F: vergrößerter Ausschnitt der CHMP4B Färbung. G: vergrößerter Ausschnitt der HA Färbung der HA-hLGD1DM14(1-3) exprimierenden Zellen. Der türkise Pfeil weist auf die Lokalisation von HA-hLGD1DM14(1-3) im Kern. H: vergrößerter Ausschnitt der HA Färbung der HA-hLGD2DM14(1-3) exprimierenden Zellen. Weder mit HA-hLGD1DM14(1-3) noch mit HA-hLGD2DM14(1-3) markierte Vesikel sind mit CHMP4B assoziiert.

HA-hLGD2DM14(1-3) befindet sich im Cytoplasma (s. Abb. 2.56). Allerdings scheint es eher diffus vorzuliegen und nicht mit vesikulären Strukturen assoziiert zu sein (s. Abb. 2.56 J-L). Durch das Fehlen des Nonsense Peptids könnte möglicherweise die Lokalisation an Vesikeln gestört werden. Es liegt also weder eine Assoziation von HA-hLGD2DM14(1-3) mit RAB5, RAB7, LAMP1 oder CHMP4B vor (s. Abb. 2.56 D-F, Abb. 2.55 D). Außerdem ist auch keine Assoziation mit Syntaxin oder Calnexin erkennbar (s. Anhang Abb. 7.14 D und 7.16 D).

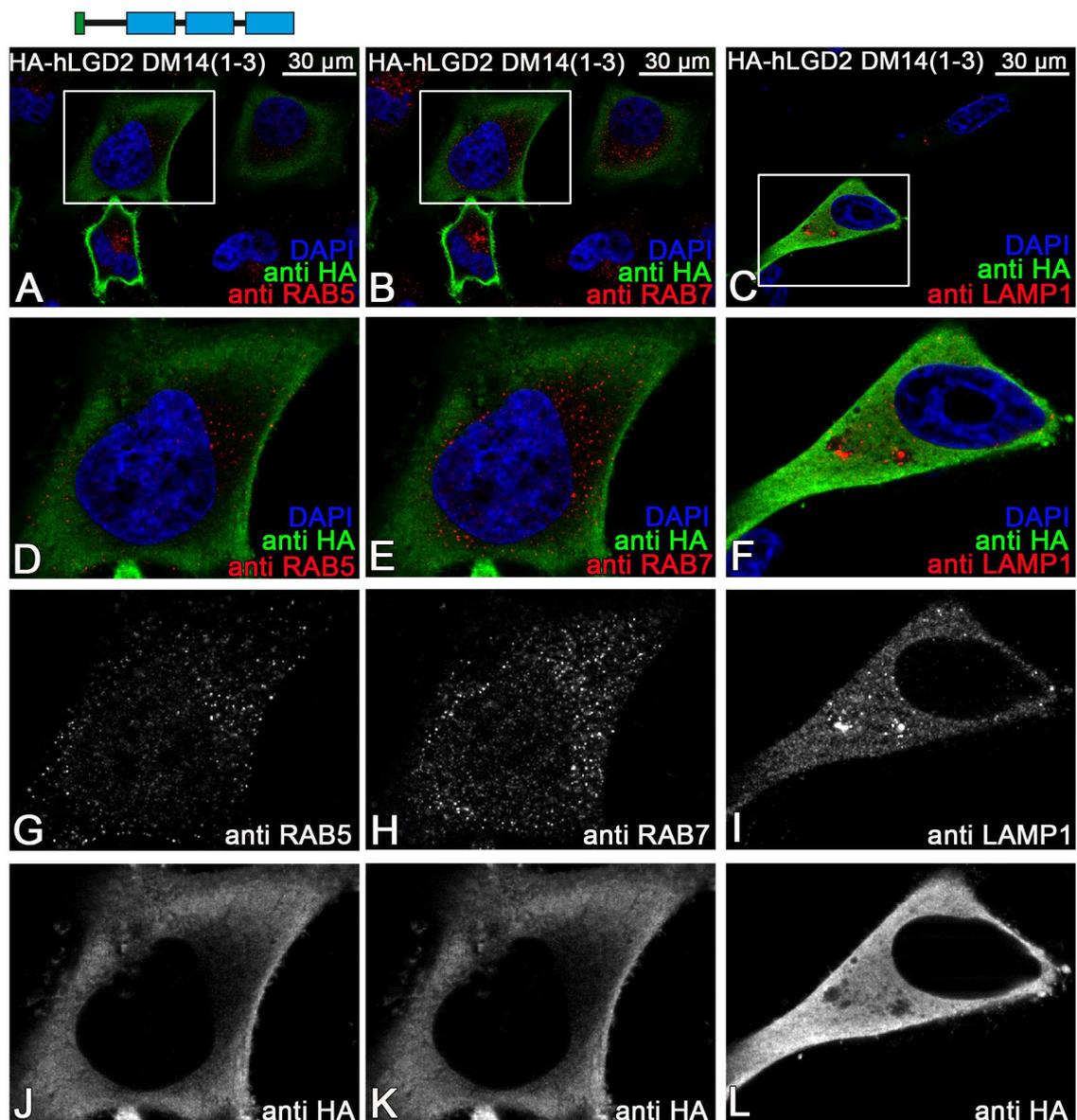


Abb. 2.56: Expression von HA-hLGD2DM14(1-3) und Markierung der endosomalen Marker in HeLa Zellen. A-C: Übersicht des exprimierten HA-hLGD2DM14(1-3) mit der jeweiligen Färbung der endosomalen Marker. D-F: vergrößerter Ausschnitt, welcher die Färbung der endosomalen Marker sowie die HA- und Kernfärbung zeigt. G: vergrößerter Ausschnitt der RAB5 Färbung. H: vergrößerter Ausschnitt der RAB7 Färbung. I: vergrößerter Ausschnitt der LAMP1 Färbung. J-L: vergrößerte Ausschnitte der HA Färbung der HA-hLGD2DM14(1-3) exprimierenden Zellen. HA-hLGD2DM14(1-3) ist diffus im Cytoplasma lokalisiert und mit keinem der analysierten endosomalen Marker assoziiert.

Aus den Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass die mentalen Retardierungskonstrukte keinen dominant negativen Effekt auf den endosomalen Transportweg ausüben, obwohl ihnen die C2 Domäne fehlt. Die Expression von HA-hLGD1^{MR}, HA-hLGD2^{MR} sowie HA-hLGD1DM14(1-3) scheinen jedoch den spät endosomalen/lysosomalen Transportweg zu stören, welches an den vergrößerten LAMP1 positiven Vesikeln zu beobachten ist. Es ist allerdings keine Assoziation der mentalen Retardierungskonstrukte mit den endosomalen Markern, dem Golgi-Apparat oder dem ER erkennbar. So könnte die vesikelartige Lokalisation der Proteine möglicherweise auf Proteinakkumulationen im Cytoplasma zurückzuführen sein. Obwohl die mentalen Retardierungskonstrukte noch mit dem CHMP4B Ortholog Shrub interagieren können (s. Kap. 2.5.4.3) und eine Interaktion der mentalen Retardierungskonstrukte mit CHMP4B in Co-IPs belegt werden konnte (Lindner, 2013), ist keine Assoziation der mentalen Retardierungskonstrukte mit CHMP4B in HeLa Zellen nachweisbar. Außerdem hat das Nonsense Peptid keinen erkennbaren Einfluss auf das Protein, nur bei HA-hLGD2DM14(1-3) scheint das Fehlen des Nonsense-Peptids die vesikelartige Lokalisation des Proteins zu verhindern.

3 Diskussion

3.1 Analyse der hLGDs und ihrer Domänen

3.1.1 Funktionalität

Die humanen LGDs gehören einer konservierten Proteinfamilie an (Jaekel und Klein, 2006). Im Laufe der in dieser Arbeit durchgeführten Struktur-/Funktionsanalyse in *Drosophila melanogaster* (*D.m.*) wurde nachgewiesen, dass die Konservierung nicht nur strukturell sondern auch funktional ist. Durch die endogene Expression von hLGD1 im *lgd* mutanten Hintergrund entwickeln sich adulte und fertile Fliegen. Im Gegensatz dazu entstehen durch die endogene Expression von hLGD2 nur „pharate adults“. Daraus kann geschlossen werden, dass hLGD1 funktional stärker konserviert ist als hLGD2 (s. Kap. 2.2.1). Dies ist durch die größere Sequenzähnlichkeit von hLGD1 zu Lgd zu erklären. Diese ist stärker ausgeprägt als die von hLGD2 zu Lgd, welches unter anderem an der Verlängerung des C-Terminus von hLGD2 liegt (s. Abb. 2.1). Diese Verlängerung fehlt sowohl hLGD1 als auch Lgd.

Diese Annahme wird auch durch die Funktionsanalyse des gekürzten hLGD2 Proteins (hLGD2 Δ C815) unterstützt, bei dem die Verlängerung des C-Terminus fehlt. Wie auch bei hLGD2 entwickeln sich diese Fliegen bis ins „pharate adult“ Stadium, wenn hLGD2 Δ C815 im *lgd* mutanten Hintergrund exprimiert wird. Im sensitivierten Hintergrund, in dem *lgd* homozygot und *shrub* heterozygot mutant vorliegt, zeigt sich, dass dieses verkürzte Protein in *D. m.* eine größere Restfunktion als das komplette hLGD2 besitzt (s. Abb. 2.6). Dieses Experiment belegt zudem, dass hLGD2 *in vivo* genetisch mit Shrub interagiert. Unter anderem Usami et al (2012) wiesen nach, dass die Interaktion zwischen hLGD2 und dem Shrub-Ortholog CHMP4B direkt ist.

Die Verlängerung des C-Terminus von hLGD2 beeinflusst somit negativ die Funktionalität von hLGD2 in *D.m.*. Jedoch ist das verkürzte hLGD2 Protein nicht wie hLGD1 voll funktional. Der Sequenzvergleich zwischen hLGD2 Δ C815 und hLGD1 zeigt auch, dass sich die beiden Sequenzen ähnlicher sind, als hLGD2 zu hLGD1, welche nur zu 41 % identisch sind. Allerdings sind dennoch Unterschiede in den Sequenzen beim Vergleich von hLGD1 mit hLGD2 Δ C815 zu erkennen. So liegt nur eine Sequenzähnlichkeit von 63% vor, welches die Ursache für die geringere Funktionalität von hLGD2 Δ C815 in *D. m.* sein könnte (s. Anhang Abb. 7.1).

Um Aufschluss über die Funktion der Domänen von hLGD1 und hLGD2 zu erlangen, wurden verschiedene Deletionskonstrukte generiert und analysiert. Wie auch bei Lgd sind die DM14 Domänen für die Funktion von hLGD1 bzw. hLGD2 essentiell, da der *lgd* mutante Phänotyp nicht unterdrückt werden kann, wenn diese fehlen (s. Abb. 2.7) (Troost et al., 2012). Da über die DM14 Domänen der hLGDs deren Interaktion mit

CHMP4B stattfindet (Usami et al., 2012; Lindner, 2013), könnte dies durch das Fehlen der DM14 Domänen unterbunden werden und daraus der Funktionsverlust resultieren.

Eine Hypothese besagt, dass Shrub und Lgd im Cytoplasma miteinander interagieren (Troost et al., 2012). So verhindern die hLGDs nach Usami et al. (2012) sowie Martinelli et al. (2012) die Polymerisierung von CHMP4B. Die Inhibition der Polymerisierung könnte dadurch verursacht werden, dass die hLGDs N-terminal an Bereiche der ersten und zweiten Helixes von CHMP4B binden (Martinelli et al., 2012). Im N-Terminus des CHMP4B-Orthologs Snf7 befindet sich ein Motiv, welches für die Membranbindung von Snf7 verantwortlich ist (Buchkovich et al., 2013). Durch die Bindung von hLGD1 oder hLGD2 an CHMP4B könnte das Motiv maskieren werden, welches für die Membranbindung zuständig ist. Um diese Annahme zu verifizieren könnte eine Kristallisation des hLGD-CHMP4B Komplexes durchgeführt werden.

Des Weiteren sind die DM14 Domänen von hLGD1 redundant, da zwei DM14 Domänen ausreichend sind, um den *lgd* mutanten Phänotyp zu unterdrücken (s. Abb. 2.8). Es liegt jedoch keine vollständige Unterdrückung des Phänotyps vor. Die daraus resultierenden Fliegen entwickeln sich nur bis zum „pharate adult“ Stadium. Ob dies auch auf hLGD2 zutrifft, bedarf noch weiterer Analyse. Allerdings sind sowohl bei Lgd als auch hLGD1 zwei DM14 Domänen für eine Restfunktion ausreichend, sodass die Vermutung nahe liegt, dass dies auch bei hLGD2 der Fall ist. Andererseits muss dabei bedacht werden, dass hLGD2 im Gegensatz zu hLGD1 in *D. m.* nicht vollständig funktional ist.

Nicht nur bei hLGD1 sondern auch bei Lgd sind die DM14 Domänen redundant (Troost et al., 2012). Während der Struktur-/Funktionsanalyse von Lgd wurden auch mehrere Kombinationen aus jeweils zwei DM14 Domänen getestet, welches den Schluss zuließ, dass für die Funktion von Lgd in *D. m.* die zweite DM14 Domäne eine größere Rolle zu haben scheint (Troost et al., 2012). Im Gegensatz dazu ist eine Differenzierung in der Funktionalität der DM14 Domänen von hLGD1 selbst im sensitiviertem Hintergrund nicht erkennbar (s. Abb. 2.9). Falls es einen Unterschied zwischen den DM14 Domänen gibt, ist dieser möglicherweise nicht erkennbar, da dies in *Drosophila melanogaster* getestet wurde und nicht in einem System, welches den Bedingungen des humanen Organismus näher steht. Zudem zeigt sich bei der Expression von hLGD1 mit nur zwei DM14 Domänen im sensitivierten Hintergrund, dass hLGD1 genetisch mit Shrub interagiert. Auch für eine Interaktion zwischen hLGD1 und dem Shrub-Ortholog CHMP4B konnte nachgewiesen werden, dass sie direkt ist (Lindner, 2013; Usami et al., 2012).

Zur weitergehenden Analyse der hLGDs wurden die C2 Domänen entfernt. Diese sind wie auch die DM14 Domänen für die Funktion der hLGDs in *D. m.* essentiell, da auch hier der *lgd* mutante Phänotyp nicht unterdrückt werden kann (s. Abb. 2.10). Auch bei Lgd ist die C2 Domäne essentiell. So wird dessen Funktionsverlust durch eine Fehllokalisierung in den Kern und Instabilität des Proteins verursacht (Troost et al.,

2012). Diese möglichen Ursachen des Funktionsverlusts wurden in Bezug auf die hLGDs ebenfalls untersucht.

3.1.2 Stabilität

In dieser Arbeit wurde die Stabilität der hLGDs und ihrer Deletionskonstrukte in *D. m.* unter Kontrolle des endogenen Promotors mittels Western Blot analysiert. Da alle Konstrukte unter demselben Promotor und an derselben Stelle im Genom integriert wurden, können die Ergebnisse nicht auf Positionseffekte zurückgeführt werden. Bei der Analyse zeigt sich ein Unterschied zwischen hLGD1 und hLGD2. So ist hLGD2 im Vergleich zu Lgd ungefähr gleich stabil (s. Abb. 2.15). hLGD1 hingegen scheint instabiler als Lgd und hLGD2 zu sein (s. Abb. 2.14). Dennoch reicht die geringere Menge an hLGD1 aus, dass sich adulte und fertile Fliegen entwickeln. So konnte mit hLGD1 unter Kontrolle des endogenen Promotors in Heterozygose ein Stamm im *lgd* mutanten Hintergrund etabliert werden. Somit reicht eine geringe Proteinmenge an hLGD1 aus, um die Funktion von Lgd in *D. m.* zu erfüllen. Im Gegensatz dazu reicht die größere Proteinmenge von hLGD2 nicht aus, um die Funktion von Lgd in *D. m.* zu ersetzen. Dies verdeutlicht die Unterschiede der hLGDs in der Funktion in *D. m.*

Zudem scheint die Verlängerung des C-Terminus von hLGD2 keinen Einfluss auf die Stabilität zu haben, da hLGD2 und hLGD2 Δ C815 eine vergleichbare Stabilität aufweisen (s. Abb. 2.15).

Es zeigen sich ebenfalls Unterschiede zwischen hLGD1 und hLGD2, wenn die DM14 Domänen deletiert wurden. hLGD1 Δ DM14 zeigt keinen Unterschied in der Stabilität im Vergleich zu hLGD1 (s. Abb. 2.14). Dies stimmt auch mit Lgd überein, dessen Verlust der DM14 Domänen keinen Einfluss auf seine Stabilität hat (Troost et al., 2012). Im Gegensatz dazu ist hLGD2 Δ DM14 im Western Blot nicht detektierbar und scheint somit instabiler als hLGD2 zu sein (s. Abb. 2.15). Es konnte ausgeschlossen werden, dass weder eine falsche Insertion des Deletionskonstruktes in den Vektor noch eine mangelnde Detektion des Proteins durch den Antikörper für die fehlende Detektion von hLGD2 Δ DM14 verantwortlich ist (s. Anhang Abb. 7.4). Demzufolge ist davon auszugehen, dass diese auf der Instabilität des Proteins beruht. Zudem war bei Überexpression der Proteine eine deutlich verringerte Detektion von hLGD2 Δ DM14 im Vergleich zu hLGD2 Δ C815 zu beobachten (s. Anhang Abb. 7.4). Die Instabilität von hLGD2 Δ DM14 könnte eine Ursache für den Funktionsverlust des Proteins sein.

Auch die C2 Domäne beeinflusst die Stabilität der hLGDs unterschiedlich. Obwohl hLGD1 strukturell und funktional ähnlicher zu Lgd ist als hLGD2, beeinflusst der Verlust der C2 Domäne von hLGD1 die Stabilität des Proteins nicht (s. Abb. 2.14). hLGD2 wird wie Lgd im Gegensatz zu hLGD1 durch das Fehlen der C2 Domäne instabiler (s. Abb. 2.15). Bei NES-Lgd Δ C2 konnte die Instabilität des Proteins durch das Expressieren mehrerer Kopien kompensiert werden und es zeigte wieder eine Restfunktion (Troost et al., 2012). Dieses könnte auch mit hLGD2 Δ C2, bzw. mit hLGD2 Δ DM14 durchgeführt

werden, um zu überprüfen, ob die Instabilität des Proteins alleine den Funktionsverlust verursacht.

Bei der Analyse der Stabilität von hLGD1 und hLGD2 sowie deren Deletionskonstrukte war die Differenz zwischen den berechneten und den tatsächlichen Proteingrößen auffällig. So sind im Western Blot alle Proteine größer als sie berechnet wurden (s. Anhang Tab. 7.1). Dies könnte auf posttranslationale Modifikationen der Proteine, wie zum Beispiel Phosphorylierungen, zurückzuführen sein. So wiesen Nakamura et al (2010) nach, dass hLGD2 durch den Cyclin B1-cyclin abhängige Kinase1 (cdk1) Komplex während der Mitose phosphoryliert wird und damit eine Rolle während der Regulation der Mitose spielen könnte. Dabei wird hLGD2 an S208 phosphoryliert, welches zwischen der ersten und zweiten DM14 Domäne lokalisiert ist (Nakamura et al., 2010). Es wurden zudem auch vier potentielle Sumoylierungsstellen sowie mehrere Phosphorylierungsstellen gefunden (Rogaeva und Albert, 2007). Da hLGD2 viele verschiedene Funktionen gezeigt wurden, könnten die verschiedenen posttranslationale Modifikationsstellen der Regulation von hLGD2 dienen und es so je nach Kontext seine Aufgabe erfüllen.

Die Ergebnisse der Stabilitätsanalyse zusammenfassend kann gesagt werden, dass hLGD1 und seine Deletionskonstrukte generell instabiler als Lgd oder hLGD2 sind. Untereinander ist die Stabilität der Proteine allerdings vergleichbar. So bewirkt weder der Verlust der DM14 Domänen noch der C2 Domäne von hLGD1 eine Instabilität von hLGD1. So kann eine Instabilität der Proteine als Ursache für den Funktionsverlust ausgeschlossen werden. Dagegen weisen hLGD2 und Lgd eine vergleichbare Stabilität auf. Sowohl die DM14 Domänen als auch die C2 Domäne von hLGD2 beeinflussen die Stabilität des Proteins negativ. Diese Instabilität könnte die Funktionalität der Proteine negativ beeinflussen und ihren Funktionsverlust in *D. m.* erklären. Die Ergebnisse zeigen Unterschiede in der Funktion der C2 Domäne bei den hLGDs. So übernimmt die C2 Domäne bei hLGD2, wie auch bei Lgd, eine Funktion in der Stabilität des Proteins, bei hLGD1 jedoch nicht.

3.1.3 Lokalisation

Neben der Stabilität beeinflusst die C2 Domäne von Lgd auch dessen Lokalisation in der Zelle (Troost et al., 2012). Lgd ist ein cytoplasmatisches Protein (Jaekel und Klein, 2006; Childress et al., 2006). So sind auch die hLGDs sowohl in *D. m.* als auch in humanen Zellen bei Überexpression im Cytoplasma lokalisiert (s. Abb. 2.12, 2.19, 2.21). Jedoch ist das endogene hLGD2 in humanen Zellen zusätzlich auch im Kern erkennbar (s. Abb. 2.16). Dies stimmt überein mit den Ergebnissen von Ou et al. (2003), welche zeigten, dass hLGD2 als Transkriptionsfaktor wirkt. Auch während der Mitose besitzt hLGD2 eine Funktion, indem es an der Zentriolentrennung beteiligt ist (Nakamura et al., 2009). Allerdings erklärt dies nicht, warum die nukleare Lokalisation nur bei endogenem hLGD2 zu beobachten ist. Eventuell ist bei einer Überexpression

von hLGD2 dieses stärker im Cytoplasma vertreten und so wird die schwächere Expression im Nukleus vom Apotome herausgefiltert und ist nicht mehr zu detektieren.

Auch hLGD2 Δ C815 befindet sich sowohl in *D. m.* als auch in humanen Zellen im Cytoplasma (s. Abb. 2.23, Anhang Abb. 7.5). Sowohl die DM14 Domänen von hLGD1 als auch von hLGD2, haben keinen Einfluss auf die Lokalisation des jeweiligen Proteins, was die cytoplasmatische Lokalisation der Proteine zeigt (s. Abb. 2.28, 2.30, Anhang Abb. 7.5).

Im Gegensatz zu Lgd beeinflusst die C2 Domäne der hLGDs die Lokalisation des Proteins nicht. So befinden sich die hLGDs auch trotz des Verlustes der C2 Domäne weiterhin im Cytoplasma (s. Abb. 2.13, 2.32, 2.34).

Hinsichtlich der Ergebnisse der Struktur-/Funktionsanalyse kann zusammenfassend gesagt werden, dass die hLGDs funktional konserviert sind. Des Weiteren beeinflusst die Verlängerung des C-Terminus von hLGD2 dessen Funktionalität negativ. Zudem sind die DM14 Domänen der hLGDs essentiell für deren Funktion und wirken in hLGD1 in einer redundanten Art und Weise. Für die fehlende Funktion könnte die fehlende Interaktion der hLGDs mit Shrub eine Rolle spielen. Bei hLGD2 Δ DM14 könnte zudem die Instabilität des Proteins eine Rolle spielen. Neben den DM14 Domänen ist auch die C2 Domäne essentiell für die Funktion der hLGDs. Der Funktionsverlust von hLGD2 Δ C2 könnte durch die Instabilität der Proteine verursacht werden. Dieses kann bei hLGD1 Δ DM14, bzw. hLGD1 Δ C2 als Ursache ausgeschlossen werden. In diesen Analysen lassen sich auch Unterschiede in der Funktion der DM14 Domänen sowie der C2 Domäne zwischen den hLGDs und Lgd erkennen. So beeinflusst bei Lgd und bei hLGD2 die C2 Domäne die Stabilität des Proteins, bei hLGD1 jedoch nicht. Nur die DM14 Domänen von hLGD2 zeigen ebenfalls eine Funktion in der Stabilität des Proteins. Weiter hat keine der untersuchten Domänen bzw. Bereiche der hLGDs einen Einfluss auf die Lokalisation und demzufolge ist die Lokalisation keine Ursache für den Funktionsverlust dieser Proteine. Da keine der untersuchten Ursachen für den Funktionsverlust bei fehlender C2 Domäne von hLGD1 verantwortlich ist, hat die C2 Domäne von hLGD1 eine andere bisher unbekannte essentielle Funktion.

3.1.4 Genetische Interaktion der hLGDs untereinander

In zuvor durchgeführten Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass Lgd mit sich selbst interagiert (Sandra Jäckel, unveröffentlichte Daten). Allerdings erfolgte diese Analyse mittels einer Co-Immunopräzipitation und daraus kann kein Rückschluss auf die Art der Interaktion gezogen werden. Betreffend einer möglichen Interaktion zwischen hLGD1 und hLGD2 gibt es bisher inkonsistente Ergebnisse. Einerseits konnte mittels einer Co-Immunopräzipitation keine Heterodimerisierung zwischen hLGD1 und hLGD2 festgestellt werden (Lindner, 2013). Andererseits belegte die FRET Analyse (FRET: Förster-Resonanzenergietransfer), dass hLGD1 und hLGD2 doch miteinander interagieren (Migdal, 2012). Im Zuge dieser Arbeit konnte eine genetische Interaktion von hLGD2 sowohl mit hLGD1 als auch mit Lgd belegt werden (s. Tab. 2.2).

So entwickeln sich adulte Fliegen bei gemeinsamer Expression von hLGD2 entweder mit hLGD1 Δ DM14(1-2), bzw. hLGD1 Δ DM14(3-4) oder NES-Lgd Δ C2. Die Expression von hLGD2 alleine hingegen führt nur zu „pharate adults“, wie auch die Expression von hLGD1 Δ DM14(1-2), bzw. hLGD1 Δ DM14(3-4) oder NES-Lgd Δ C2 alleine. Jedoch ist durch dieses Experiment nicht nachzuweisen, ob eine direkte oder indirekte Interaktion vorliegt. Da laut der FRET-Analyse beide Proteine jedoch miteinander interagieren deutet dies auf eine direkte Interaktion hin, da für eine nachgewiesene Interaktion zweier Proteine mittels der FRET-Analyse die Proteine maximal 10 nm voneinander entfernt sein dürfen (Berney und Danuser, 2003). Möglicherweise interagieren beide Proteine über ihre DM14 Domänen, da für die DM14 Domänen nachgewiesen wurde, dass sie Protein-Protein Interaktionen vermitteln (Martinelli et al., 2012; Usami et al., 2012; Troost et al., 2012). Um diese These zu verifizieren müssen weitere Untersuchungen durchgeführt werden, wie beispielsweise Co-IPs, Pulldowns oder FRET-Analysen.

3.1.5 Einfluss der hLGDs auf den endosomalen Transportweg in humanen Zellen

Für Lgd aus *Drosophila melanogaster* konnte eine Beteiligung am endosomalen Transportweg unter anderem durch seine Interaktion mit dem ESCRT-III Protein Shrub gezeigt werden (Troost et al., 2012). Es ist auch nachgewiesen worden, dass die humanen LGDs mit den Shrub-Orthologen CHMP4A-C interagieren (Tsang et al., 2006; Usami et al., 2012). Wie genau die hLGDs an dem endosomalen Transportweg beteiligt sind, ist jedoch bislang unbekannt und wurde in dieser Arbeit untersucht.

Der Bezug der hLGDs zum endosomalen Transportweg zeigt sich eindeutig bei ihrer Überexpression in humanen Zellen. So sind hLGD1 bzw. hLGD2 an späten Endosomen lokalisiert, welche auch mit CHMP4B assoziiert sind (s. Abb. 2.19-22). Es ist weder bei hLGD1 noch bei hLGD2 eine Assoziation mit frühen Endosomen erkennbar (s. Abb. 2.19, 2.21). Nur Chang *et al* (2011) beobachteten, dass hLGD2 mit RAB5 co-lokalisiert. In diesem Experiment wurden allerdings sowohl hLGD2-EGFP als auch RAB5-dsRed in HEK 293T Zellen überexprimiert. Dabei kann sowohl die Überexpression als auch die verhältnismäßig große Markierung beider Proteine die Ursache dafür sein, dass der endosomale Transportweg so stark gestört ist, dass eine Assoziation miteinander zu beobachten ist, obwohl diese unter Umständen nicht vorhanden ist.

Endogenes hLGD2 ist ebenfalls punktuell im Cytoplasma lokalisiert, zeigt jedoch im Gegensatz zur Überexpression keine Assoziation mit Endosomen, Lysosomen oder CHMP4B (s. Abb. 2.17, 2.18). Auch in *mouse embryonic fibroblasts* (MEFs) befindet sich LGD2 punktuell im Cytoplasma und ist nicht mit endosomalen Markern oder CHMP4B assoziiert, eine Assoziation mit Syntaxin und Calnexin (Marker für den Golgi-Apparat bzw. des Endoplasmatischen Retikulums) ist ebenfalls nicht erkennbar (Lindner, 2013). Zudem hat weder der Verlust von LGD1 in *mLGD1* defizienten MEFs

noch der Verlust von LGD2 in *mLGD2* defizienten MEFs einen Einfluss auf den endosomalen Transportweg (Scheider, 2014; Lindner, 2013). Möglicherweise sind die LGDs redundant und können im Bezug auf den endosomalen Transportweg die Funktion des jeweiligen anderen übernehmen. Die Analyse von MEFs, welche sowohl *mLgd1* als auch *mLgd2* defizient sind, könnte eine Auswirkung auf den endosomalen Transportweg zeigen. Allerdings ist in *mLgd2* defizienten MEFs, welche zusätzlich mit siRNA gegen mLGD1 behandelt wurden, keine Veränderungen im endosomalen Transportweg zu beobachten (unveröffentlichte Daten, Nadja Drusenheimer). Jedoch bedeutet die Behandlung mit der siRNA nur eine Herunterregulation von mLGD1 und keinen kompletten Verlust. Somit könnte die verbliebene Menge an mLGD1 ausreichen, um seine Funktion zu erfüllen. So konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine geringe Menge an hLGD1 ausreicht, um den *lgd* mutanten Phänotyp zu unterdrücken. Denn trotz einer geringeren Stabilität von hLGD1 im Vergleich zu *Lgd* entwickeln sich adulte und fertile Fliegen, wenn hLGD1 in Heterozygose in *lgd* mutanten Fliegen exprimiert wird (s. Kap. 2.2.1). Auch in der Maus ist eine Kopie *Lgd2* ausreichend. So überleben *Lgd1^{-/-}; Lgd2^{+/-}* mutante Mäuse, welche fertil sind und keinen Phänotyp zeigen. Dies zeigt, dass eine geringe Menge an LGD Protein ausreichend ist, um die Funktion *in vivo* zu erfüllen (unveröffentlichte Daten, Nadja Drusenheimer).

Die Interaktion der hLGDs mit den CHMP4s weist auf die Beteiligung der hLGDs am endosomalen Transportweg hin (Lindner, 2013; Usami et al., 2012). In humanen Zellen zeigt sich eine direkte Assoziation der hLGDs mit dem endosomalen Transportweg durch ihre Assoziation mit späten Endosomen sowie CHMP4B nur, wenn sie überexprimiert werden. Die Überexpression der LGDs könnte den endosomalen Transportweg stören. Dadurch könnte die Assoziation der hLGDs mit späten Endosomen und CHMP4B erst erkennbar werden. Eine Störung oder die verlangsamte Reifung der Endosomen kann zu einem Degradationsdefekt bzw. einer Verlangsamung der Degradation führen. Dafür spricht, dass bei Überexpression der hLGDs eine vermehrte Akkumulation ubiquitiniertes Proteine im Cytoplasma zu beobachten ist (s. Abb. 2.4.3).

Die Assoziation der hLGDs mit späten Endosomen und CHMP4B könnte entweder auf einer direkten oder indirekten Interaktion beruhen. So konnte mithilfe einer PLA-Analyse (PLA: *Proximity ligation assay*) in MEF-Zellen nachgewiesen werden, dass endogenes mLGD2 direkt mit RAB7 und CHMP4B interagiert (Fischer, 2013). Die direkte Interaktion der hLGDs mit CHMP4A-C konnte *in vitro* sowohl im Pulldown als auch mittels FRET-Analyse in 3T3 Zellen verifiziert werden (Lindner, 2013; Usami et al., 2012; Migdal, 2012). Da die PLA-Analyse ebenfalls eine Interaktion von mLGD2 mit Vps4 gezeigt hat, welche jedoch mit anderen Methoden nicht bestätigt werden konnte (Fischer, 2013), sollte eine mögliche Interaktion von hLGD2 mit RAB7 weiter mithilfe anderer Methoden, wie mittels Pulldown oder FRET-Analyse untersucht werden. Die FRET-Analysen haben den Vorteil, dass sie in humanen Zellen durchgeführt werden können, welches den Bedingungen im humanen Organismus am nächsten kommt. Der

Nachteil dieser Methode liegt allerdings darin, dass die Proteine stark überexprimiert und mit einer großen Markierung versehen werden, welches ein Einfluss auf das Verhalten der Proteine haben kann.

3.1.5.1 Analyse des verlängerten C-Terminus

hLGD2 ohne verlängerten C-Terminus (hLGD2 Δ C815) ist punktuell im Cytoplasma lokalisiert und ist im Gegensatz zu hLGD1 oder hLGD2 weder mit späten Endosomen noch mit CHMP4B assoziiert (s. Abb. 2.23, 2.24). Dies könnte darauf hindeuten, dass hLGD2 Δ C815 in Bezug auf den endosomalen Transportweg keine Funktionalität mehr aufweist. Andererseits zeigt sich bei dem Rettungsexperiment in *Drosophila melanogaster*, dass hLGD2 Δ C815 in diesem funktional ist und sogar eine größere Restfunktionalität besitzt als hLGD2. Allerdings sind dies Ergebnisse aus einem anderen Modellorganismus und somit nur bedingt auf humane Zellen oder gar den humanen Organismus übertragbar. Dabei könnte es eine Rolle spielen, dass es in *D. m.* nur ein Lgd Homolog gibt und nicht wie in humanen Zellen zwei. Möglicherweise ist der verlängerte C-Terminus wichtig für nicht redundante Funktionen von hLGD2, welche dann von hLGD2 Δ C815 nicht mehr erfüllt werden können. So ist es in *D. m.* noch funktional, andererseits kann in humanen Zellen keine Assoziation mit späten Endosomen oder CHMP4B stattfinden. So konnte in früheren Veröffentlichungen gezeigt werden, dass hLGD2 Δ C815 nicht mehr mit Zentriolen interagiert, aber dennoch in der Lage ist, sich am PDK1/Akt-Signalweg zu beteiligen (Nakamura et al., 2009).

Da hLGD2 Δ C815 nicht mit späten Endosomen assoziiert ist, könnte dies darauf hindeuten, dass die Assoziation von hLGD2 mit späten Endosomen über die Verlängerung des C-Terminus von hLGD2 vermittelt werden könnte. Möglicherweise gelangt hLGD2 durch die Interaktion mit anderen Proteinen an die späten Endosomen, wofür die Verlängerung des C-Terminus von hLGD2 von Bedeutung sein könnte. Die Analyse der Proteinsequenz von hLGD2 mittels des Programms PredictProtein zeigte, dass sich in der C-terminalen Verlängerung mehrere potentielle Protein-Bindungsstellen befinden, worüber eine mögliche Interaktion stattfinden könnte. (s. Anhang Abb. 7.21). Wahrscheinlich wurde diese Interaktion erst in höheren Organismen mit der Entstehung des zweiten LGD Homologs entwickelt, um eine stärkere Regulation des endosomalen Transports, bzw. der ILV (ILV: intraluminale Vesikel) Bildung zu ermöglichen. Diese Annahme erklärt, weshalb dieses Protein in *D. m.* eine Restfunktion besitzt, aber keine Assoziation mit dem endosomalen Transportweg in humanen Zellen zu beobachten ist.

Bei der Überexpression von hLGD2 Δ C815 ist kein Einfluss auf die wildtypische Lokalisation von RAB7 erkennbar. Im Gegensatz dazu ist bei allen anderen Überexpressionen von hLGD2 oder dessen Deletionskonstrukte die RAB7 Verteilung verändert (s. Tab. 2.3). RAB7 ist dabei diffus und weniger vesikulär im Cytoplasma vorhanden. Die veränderte RAB7 Lokalisation könnte darauf hindeuten, dass hLGD2 an der Regulation von RAB7 beteiligt ist, welches entweder über eine direkte

Interaktion oder durch andere Interaktionspartner stattfinden könnte. Falls hLGD2 über seinen verlängerten C-Terminus an der Regulation von RAB7 beteiligt ist, wäre bei dessen Verlust zu erwarten, dass es die RAB7 Verteilung beeinflusst. Möglicherweise ist dies nicht der Fall, da noch endogenes hLGD2 vorhanden ist. Um dies zu überprüfen, könnte hLGD2 Δ C815 in *mLgd2* defizienten MEFs exprimiert werden. Gegen die These einer Beteiligung von hLGD2 an der RAB7 Verteilung spricht, dass in *mLgd2* defizienten MEF Zellen die RAB7 Verteilung wildtypisch ist. Falls eine direkte Interaktion zwischen hLGD2 und RAB7 vorliegt und über die Verlängerung des C-Terminus vermittelt wird, könnte durch das Fehlen dieser, die Interaktion nicht mehr stattfinden und auch die RAB7 Verteilung nicht beeinflusst werden.

3.1.5.2 Analyse der DM14 Domänen

Die Expression der hLGD Konstrukte ohne DM14 Domänen zeigten einen unterschiedlichen Einfluss auf den endosomalen Transportweg. So beschränkte sich der Einfluss der Expression von hLGD1 Δ DM14 in humanen Zellen nur auf eine geänderte RAB7 Lokalisation, welches neben der vesikulären Verteilung auch diffus im Cytoplasma vorliegt (s. Abb. 2.28). Auch die hLGD1 Δ DM14 Lokalisation selbst ist im Vergleich zu hLGD1 weniger punktuell sondern eher diffus (s. Abb. 2.28).

Im Gegensatz dazu löst die Expression von hLGD2 Δ DM14 einen dominant negativen Effekt auf den endosomalen Transportweg aus, welcher sich in stark vergrößerten Vesikeln äußert (s. Abb. 2.30). Dies deutet darauf hin, dass hLGD2 an der Regulation des endosomalen Transportweges beteiligt ist.

hLGD2 Δ DM14 ist an der Membran der stark vergrößerten Vesikel lokalisiert. Neben der Lokalisation an der Vesikelmembran ist es diffus im Cytoplasma verteilt. Auch die späten endosomalen Marker, RAB7 und LAMP1, liegen eher diffus verteilt vor, wobei LAMP1 auch an der Membran der stark vergrößerten Vesikel lokalisiert ist (s. Abb. 2.30). Die Anwesenheit von LAMP1 und die Abwesenheit von RAB7 an der Vesikelmembran könnte darauf hindeuten, dass dieses Lysosomen sind (Chavrier et al., 1990). Diese Annahme könnte durch weitere Untersuchungen bestätigt werden, wie z. B. die Expression von hLGD2 Δ DM14 in humanen Zellen, die mit einem LysoSensor analysiert werden. Dabei würde sich der LysoSensor Yellow/Blue DND-160 von life technologies eignen, da dieser überwiegend gelb und in weniger sauren Organellen blau leuchtet (Diwu et al., 1999). Zudem könnten elektronenmikroskopische Aufnahmen diese vergrößerten Vesikel charakterisieren. So unterscheiden sich Lysosomen von späten Endosomen durch eine größere Elektronendichte (Tooze und Hollinshead, 1992). Des Weiteren könnte eine Antikörperfärbung gegen den Mannose-6-Phosphat Rezeptor durchgeführt werden, da dieser nur in späten Endosomen zu finden ist (Brown et al., 1986).

Der dominant negative Effekt auf den endosomalen Transportweg in HeLa Zellen, welcher durch die Expression von hLGD2 Δ DM14 verursacht wurde, hat anscheinend keinen Einfluss auf die CHMP4B Lokalisation. Die CHMP4B Lokalisation in den

hLGD2 Δ DM14 exprimierenden Zellen ist wildtypisch (s. Abb. 2.31). Eine Erklärung dafür, dass der Verlust der DM14 Domänen keinen Einfluss auf die CHMP4B Verteilung hat, könnte sein, dass in den Zellen noch endogenes hLGD2 und hLGD1 vorhanden ist. Eine Untersuchung von *mLgd2* defizienten MEFs mit der Expression von hLGD2 Δ DM14 könnte klären, ob trotz des Verlustes der DM14 Domänen von hLGD2 die CHMP4B Lokalisation immer noch wildtypisch vorliegt. Andererseits hat der Verlust von mLGD2 generell keinen Einfluss auf die Verteilung von CHMP4B (Lindner, 2013). Möglicherweise übernimmt mLGD1 die Funktion von mLGD2, weshalb keine Auswirkungen erkennbar sind. Trotz der wildtypischen Verteilung von CHMP4B ist keine Assoziation mit hLGD2 Δ DM14 erkennbar, wie es bei der Expression von hLGD2 zu beobachten ist (s. Abb. 2.31). Dies ist dadurch zu erklären, dass die Interaktion von CHMP4B mit hLGD2 über die DM14 Domänen stattfindet (Usami et al., 2012), welche nicht mehr stattfinden kann, sobald diese fehlen.

Die Markierung ubiquitinerter Proteine in den hLGD2 Δ DM14 exprimierenden Zellen, ließ erkennen, dass in einigen Zellen die ubiquitinierten Proteine vor den vergrößerten Vesikeln akkumulierten (s. Abb. 2.38). Dies könnte darauf hindeuten, dass die Überexpression von hLGD2 Δ DM14 einen Degradationsdefekt verursacht, sodass weniger oder gar keine ubiquitinierten Proteine in die Endosomen aufgenommen werden können oder die Aufnahme stark verlangsamt ist. Allerdings ist dieser Phänotyp nicht in allen Zellen zu beobachten. Um diese vergrößerten Vesikel, bzw. den möglichen Degradationsdefekt weiter zu charakterisieren, könnten elektronenmikroskopische Analysen zeigen, ob in den stark vergrößerten Vesikeln noch ILVs ausgebildet werden.

Im Gegensatz zur Funktion in *D. m.* sind Unterschiede in den DM14 Domänen zu erkennen, wenn sie in humanen Zellen untersucht werden. So ist hLGD1 Δ DM14(1-2), jedoch nicht hLGD1 Δ DM14(3-4), teilweise mit späten Endosomen assoziiert (s. Abb. 2.25, 2.26). Beide Proteine zeigen noch eine Assoziation mit CHMP4B, somit scheinen zwei DM14 Domänen für diese Interaktion ausreichend zu sein (s. Abb. 2.27). Diese Annahme wird durch das Rettungsexperiment unterstützt, indem nachgewiesen wurde, dass für die genetische Interaktion zwischen hLGD1 und dem CHMP4B-Ortholog Shrub zwei DM14 Domänen ausreichend sind (s. Abb. 2.9). Außerdem ist bekannt, dass für die direkte Interaktion zwischen CHMP4B und hLGD1 zwei DM14 Domänen ausreichend sind (Lindner, 2013). Möglicherweise wird die Interaktion durch das Vorhandensein von vier DM14 Domänen stabiler. Die dritte oder vierte DM14 Domäne scheint für die Assoziation mit späten Endosomen eine Rolle zu spielen. Dies steht in Übereinstimmung damit, dass Usami et al. (2012) und Martinelli et al. (2012) belegten, dass für die Interaktion von hLGD2 mit CHMP4B die dritte DM14 Domäne eine große Rolle spielt. Allerdings wurde diese Untersuchung mithilfe eines verkürzten hLGD2 Proteins durchgeführt. Nakamura et al. (2008) hingegen wiesen nach, dass für die Bindung von hLGD2 an PDK1 der Bereich rund um die vierte DM14 Domäne am bedeutendsten ist. Im Gegensatz dazu spielt bei Lgd die zweite DM14 Domäne für seine Funktion in *D. m.* eine herausragende Rolle (Troost et al., 2012). Diese

unterschiedlichen Ergebnisse sprechen dafür, dass je nach Funktion von LGD unterschiedliche DM14 Domänen wichtig sein könnten. Andererseits könnten aber auch die Unterschiede zwischen hLGD1 und hLGD2 für die differierende Bedeutung der verschiedenen DM14 Domänen eine Rolle spielen. Zumal gerade für hLGD2 viele verschiedene Funktionen nachgewiesen wurden, für hLGD1 hingegen sind zurzeit nur seine Funktion als Transkriptionsfaktor sowie seine Interaktion mit CHMP4B bekannt. Eventuell ist diese Differenzierung in den DM14 Domänen erst durch die zunehmende Komplexität und Vielfalt der Aufgaben der hLGDs in höheren Organismen entstanden.

3.1.5.3 Analyse der C2 Domäne

Die Expression von hLGD1 Δ C2, bzw. hLGD2 Δ C2 in humanen Zellen verursacht einen dominant negativen Effekt auf den endosomalen Transportweg, so sind wie auch bei der Expression von hLGD2 Δ DM14 stark vergrößerte Vesikel erkennbar. Im Gegensatz zu diesen sind die hLGD Δ C2 positiven Vesikel, sowohl mit RAB7 als auch mit LAMP1 markiert (s. Abb. 2.32 und Abb. 2.34). Dies könnte darauf hindeuten, dass die hLGD Δ C2s mit späten Endosomen assoziiert sind und nicht wie die hLGD2 Δ DM14 positiven Vesikel eher mit Lysosomen. Um diese These zu verifizieren sind weitere Untersuchungen durchzuführen. So könnten, wie bei der weiteren Analyse der vergrößerten Vesikel, welche durch die Expression von hLGD2 Δ DM14 verursacht werden, elektronenmikroskopische Aufnahmen oder eine Antikörperfärbung mit dem Mannose-6P-Rezeptor durchgeführt werden.

Sowohl hLGD2 Δ DM14 als auch die hLGD Δ C2s befinden sich an der Membran der vergrößerten späten Endosomen. Durch die Antikörperfärbung ist nicht ersichtlich, ob hLGD2 Δ DM14 bzw. die hLGD Δ C2s direkt an der Membran der Endosomen lokalisiert sind oder ob die Membranassoziation durch Interaktionspartner vermittelt wird.

Eine Membranassoziation von hLGD2 zeigten auch Al-Tawashi et al. (2012). Allerdings bindet in diesem Fall hLGD2 an die Plasmamembran und nicht an die Endosomenmembran. Dabei dient hLGD2 als Adapterprotein, welches PDK1 an die Membran führt und so die Signalweiterleitung des Akt-Signalweges stattfinden kann. Auch Chen et al. (2012) belegten eine Membranassoziation von hLGD2 durch dessen Beteiligung am RIG1-Signalweg. Dort unterstützt hLGD2 an der Endosomenmembran die Aktivierung der Immunantwort.

Auch für die C2 Domäne von Lgd wurde gezeigt, dass sie an Phospholipide in Membranen bindet (Gallagher und Knoblich, 2006). So befindet sich nach der Fraktionierung von Proteinen wildtypisches Lgd sowohl in der unlöslichen Membranfraktion als auch in der löslichen Cytoplasma Fraktion. Lgd aus *lgd⁰⁸* mutanten Fliegen, denen die C2 Domäne fehlt, ist nur in der löslichen Fraktion lokalisiert (Gallagher und Knoblich, 2006). Zudem wurde mithilfe eines „PIP-Stripes“ nachgewiesen, dass die C2 Domäne von Lgd an monophosphoryliertes Phosphatidyl inositol bindet (Gallagher und Knoblich, 2006). Lgd bindet dabei an PI3P, PI4P sowie an PI5P. Es konnte für PI3P und PI4P gezeigt werden, dass sie mit frühen Endosomen

und sekretorischen Vesikeln assoziiert sind (Czech, 2003). Allerdings konnte dies *in vivo* in Zellen der Flügelimaginalscheibe nicht nachgewiesen werden (Troost et al., 2012). Möglicherweise ist die AK-Färbung zu schwach, um dies nachzuweisen. Eventuell ist nur ein geringer Teil von Lgd mit Membranen assoziiert, welcher nicht in einer Antikörperfärbung nachgewiesen werden kann (Troost et al., 2012).

Die Membranassoziation von hLGD2 Δ DM14 könnte also über die C2 Domäne vermittelt werden, allerdings erklärt dies nicht die Membranlokalisation der hLGD Δ C2s. Möglicherweise ist die Bindung der hLGD Δ C2s an der Membran nicht direkt, sondern wird über Adapterproteine vermittelt. Da die Assoziation von hLGD2 mit späten Endosomen möglicherweise über die C-terminale Verlängerung von hLGD2 stattfindet, könnten darüber sowohl hLGD2 Δ DM14 als auch hLGD2 Δ C2 weiterhin mit der Endosomenmembran assoziiert sein. Die Assoziation von hLGD1 Δ C2 mit der Endosomenmembran könnte über seine Interaktion mit hLGD2 oder über eine mögliche gemeinsame Interaktion mit CHMP4B vermittelt werden. Die hLGDs könnten CHMP4B gemeinsam im Cytoplasma im inaktiven Zustand halten. Durch die Bindung von hLGD2 an CHMP4B könnten beide an die späten Endosomen gelangen und CHMP4B könnte in einen aktiven Zustand übergehen.

Die CHMP4B Verteilung ist bei der Expression von hLGD2 Δ DM14 in HeLa Zellen nicht gestört. Im Gegensatz dazu ist bei der Expression der hLGD Δ C2 Konstrukten die veränderte CHMP4B Lokalisation auffällig. So befindet sich CHMP4B in hLGD1 Δ C2 exprimierenden Zellen in den stark vergrößerten Vesikeln (s. Abb. 2.33). Diese Lokalisation von CHMP4B konnte bisher in anderen Untersuchungen noch nicht beobachtet werden. Die Lokalisation der endosomalen Marker RAB5, RAB7 und LAMP1 hingegen ist nicht verändert (s. Abb. 2.32).

Auch die Expression von hLGD2 Δ C2 führt zu keiner wildtypischen CHMP4B Lokalisation. Allerdings ist der Phänotyp divergenter als bei der Expression von hLGD1 Δ C2. So ist CHMP4B zum Teil wie bei der Expression von hLGD1 Δ C2 in den vergrößerten Vesikel oder an der Vesikelmembran lokalisiert oder aber zum größten Teil unabhängig von den Vesikeln wildtypisch verteilt (s. Abb. 2.36). Auch RAB7 ist, im Gegensatz zu einer normalerweise wildtypischen vesikulären Verteilung, diffus im Cytoplasma lokalisiert. Diese Phänotypen bei der Expression der hLGD Δ C2s treten nicht nur in HeLa Zellen sondern auch in murinen wt und ko MEFs, 3T3, sowie in den humanen U2OS Zellen auf (s. Anhang Abb. 7.7-9). Dies belegt, dass ein genereller Phänotyp vorliegt, welcher unabhängig von den Zelltypen ist und über verschiedene Organismen konserviert ist.

Neben ihrer Bindung an Phospholipide ist die C2 Domäne auch an Protein-Protein Interaktionen beteiligt. Dies wurde unter anderem für die C2 Domänen von Nedd4L, PKC sowie PKC- ϵ nachgewiesen (Benes et al., 2005). Auch für die C2 Domäne von hLGD2 belegten Zhao, Li et al. (2010) die Fähigkeit Protein-Protein-Interaktionen zu vermitteln, indem sie die Interaktion von hLGD2 über die C2 Domäne mit dem E2 Enzym Ubc13 während des NF- κ B Signalweges nachwiesen. Im endosomalen

Transportweg hingegen könnte über die C2 Domäne der hLGDs die CHMP4B Verteilung an, bzw. in den vergrößerten Vesikeln gesteuert werden. Möglicherweise spielt dabei eine Interaktion mit einem unbekanntem Interaktionspartner eine Rolle, wobei die Interaktion über die C2 Domäne der hLGDs vermittelt werden könnte. Diese Interaktion wiederum könnte die CHMP4B Verteilung an den späten Endosomen regulieren. Ein möglicher Interaktionspartner der hLGDs könnte CHMP5 sein (Lindner, 2013, Bernhard Migdal, unveröffentlichte Daten). CHMP5 ist Teil des Rekrutierungskomplexes, der den Zusammenschluss von Vps4 mit ESCRT-III reguliert (Shim et al., 2008). Dabei ist der Vps4 Komplex für den Zerfall des ESCRT-III Komplexes verantwortlich (Babst et al., 1997). Möglicherweise sind die hLGDs an der Regulation des Zerfalls des ESCRT-III Komplexes beteiligt. So könnte CHMP5 an die hLGDs binden, welche wiederum an CHMP4B binden und dieses dann aus der aktiven Form in die inaktive Form überführen. Allerdings interagiert CHMP5 in FRET-Analysen mit allen Deletionskonstrukten der hLGDs, also auch mit den hLGD Δ C2s (Bernhard Migdal, unveröffentlichte Daten). So sind weitere Untersuchungen dieser möglichen Interaktion notwendig, um ein dezidiertes Bild des Zusammenspiels zwischen den hLGDs, CHMP4B sowie CHMP5 zu bekommen. Mittels Pulldown Experimenten könnten erstmal die direkten Interaktionen zwischen den hLGDs und CHMP5 bestätigt werden. Falls alle Domänen der hLGDs mit CHMP5 interagieren, wären Affinitätsstudien hilfreich, um zu ermitteln, ob die C2 Domänen der hLGDs präferenziell an CHMP5 binden. Falls die Interaktion mit CHMP5 über die C2 Domänen der hLGDs stattfindet, könnte dies eine Erklärung für die Fehllokalisierung von CHMP4B in die vergrößerten Endosomen sein. Der divergente Phänotyp bezüglich der CHMP4B Verteilung in Zellen, in denen hLGD2 Δ C2 überexprimiert wurde, könnte dadurch verursacht werden, dass zwar sowohl hLGD1 als auch hLGD2 an CHMP4B binden. Dabei könnte aber zunächst die Bindung von hLGD1 erfolgen und in einem weiteren Schritt erst von hLGD2 entweder mit CHMP4B oder mit hLGD1. Es könnte sein, dass hLGD1 in diesem Fall hLGD2 besser ersetzen kann als umgekehrt.

Die stark vergrößerten Vesikel, welche bei der Expression von hLGD2 Δ DM14 sowie bei den hLGD Δ C2s auftreten, weisen auf eine Beteiligung der hLGDs an der Regulation des endosomalen Transportweges hin. Auch der Verlust oder die Expression anderer Mitwirkenden am endosomalen Transportweg, bzw. deren konstitutiv aktiven Varianten, führen zu stark vergrößerten Vesikeln. So treten bei Expression der konstitutiv aktiven Form von RAB5 in HeLa Zellen durch eine gesteigerte Endosomenfusion stark vergrößerte frühe Endosomen auf (Ceresa et al., 2001). Bei einem Regulator des spät endosomalen Transportweges Cullin-3 löst dessen Verlust eine starke Vergrößerung der späten Endosomen aus (Huotari et al., 2012). Zudem führt die Überexpression von ESCRT-III Proteinen, bei denen die autoinhibitorischen Region deletiert wurde, ebenfalls zu vergrößerten Vesikeln (Shim et al., 2007). Eventuell werden die stark vergrößerten Vesikel dadurch verursacht, dass bei Verlust der DM14 Domäne von hLGD2, bzw. bei Verlust der C2 Domäne der hLGDs CHMP4B nicht in seiner inaktiven Form gehalten werden kann und dieses dadurch wie bei der Deletion der autoinhibitorischen Region in aktiver Form vorliegt.

Um nähere Aussagen zu den vergrößerten Vesikeln, welche durch die Überexpression von hLGD2 Δ DM14 sowie der hLGD Δ C2s verursacht werden, zu treffen, müssen diese weiter charakterisiert werden. Dazu könnten mithilfe elektronenmikroskopischer Aufnahmen analysiert werden, ob noch ILV ausgebildet werden und wie generell die Morphologie dieser vergrößerten Vesikel aussieht. Zudem könnte eine Immunogold-Färbung gegen CHMP4B zeigen, wo dieses in den vergrößerten Vesikeln lokalisiert ist. Es könnte sich z. B. in oder außerhalb der ILVs befinden, falls welche gebildet werden. Da der Ausfall aber auch die Überexpression von Lgd in *D. m.* zu einer ektopischen Aktivierung des Notch-Signalweges führt, könnte ein uptake-Assay mit U2OS-N1 Zellen durchgeführt werden, um zu überprüfen, ob auch die hLGDs in humanen Zellen den Notch-Signalweg beeinflussen. Die U2OS-N1 Zellen exprimieren stabil den Notch1 Rezeptor, in dessen extrazellulären Domäne sich eine HA-Markierung befindet (Chastagner et al., 2008). So kann darüber der Notch-Rezeptor bei seinem Weg durch den endosomalen Transport verfolgt werden. Zusätzlich kann analysiert werden, wo sich der Notch-Rezeptor befindet, wenn die stark vergrößerten Vesikel auftreten.

Die Markierung ubiquitiniertes Proteine in hLGD Δ C2 exprimierenden Zellen zeigte wie auch bei der Expression von hLGD1 sowie hLGD2 vergrößerte Akkumulationen ubiquitiniertes Proteine in der Zelle, welches auf eine Verzögerung oder Störung der Proteindegradation hindeutet. Zudem waren bei einigen vergrößerten Vesikeln die ubiquitinierten Proteine an der Vesikelmembran lokalisiert (s. Abb. 2.38). Dies ist vermutlich noch unverpackte Fracht, welche noch deubiquitiniert werden muss, bevor es internalisiert wird. (Übersicht in Clague und Urbé, 2010). An anderen stark vergrößerten Vesikeln sind keine ubiquitinierten Proteine erkennbar. Möglicherweise sind diese bereits internalisiert. Zum anderen könnten aber auch nicht genügend ubiquitinierte Proteine an der Membran lokalisiert sein, um sie detektieren zu können. Für diese Begründung spricht auch die Beobachtung, dass die ubiquitinierten Proteine, welche an der Vesikelmembran ersichtlich sind, äußerst schwach zu detektieren sind.

Der Einfluss der exprimierten hLGD Konstrukte auf den endosomalen Transportweg wird auch bei der Betrachtung der endogenen endosomalen Marker ersichtlich (s. Tab. 2.3). Abgesehen von der Expression von hLGD1, welche zu vergrößerten CHMP4B und LAMP1 markierten Vesikeln führt, ist die Verteilung dieser endosomalen Marker vesikulär wildtypisch. Wobei die Lokalisation von CHMP4B bei der Expression von hLGD1 Δ C2 verändert ist, indem CHMP4B in den stark vergrößerten hLGD1 Δ C2 markierten späten Endosomen akkumuliert. Die Expression von hLGD1 und seinen Deletionskonstrukten hat nur bei der Expression von hLGD1 Δ DM14 einen Einfluss auf den spät endosomalen Marker RAB7, welcher neben der vesikulären Verteilung außerdem diffus in der Zelle lokalisiert ist. Eine veränderte RAB7 Lokalisierung ist bei der Expression aller hLGD2 Deletionskonstrukte auffällig, bis auf die Expression von hLGD2 Δ C815, bei welchem RAB7 wildtypisch verteilt ist. Bei veränderter RAB7 Lokalisation ist es vermehrt diffus verteilt. Bei der Expression von hLGD2 Δ DM14 ist neben der diffusen Lokalisation von RAB7 auch LAMP1 diffus verteilt. Auch bei der Expression von hLGD2 ist nicht nur RAB7 diffus verteilt, sondern es sind auch

vergrößerte CHMP4B und LAMP1 markierte Vesikel zu erkennen. Diese vergrößerten CHMP4B oder LAMP1 positiven Vesikel sind spezifisch für die Expression von hLGD1, bzw. hLGD2, da sie bei den anderen Deletionskonstrukten nicht auftreten. Auch bei der Expression des Leervektors sind keine vergrößerten CHMP4B markierten Vesikel erkennbar (nicht gezeigte Daten). Die experimentellen Bedingungen wurden so gut wie möglich an die endogenen Bedingungen angepasst. Da aber Markierungen, Überexpression und Tumorzelllinien biotechnologische Werkzeuge sind, kann niemals ausgeschlossen werden, dass es sich um Bedingungen handelt die die endogenen Verhältnisse nicht widerspiegeln. So ist die Kultivierung der Zellen ein sehr artifizielles System und die untersuchten Zellen sind zudem Tumorzellen. Aufgrund ihrer Rolle während der Zellteilung, kann ein Defekt der ESCRT-Komplexe zur Tumorgenese beitragen (Übersicht in Mattisek und Teis, 2014). Betrifft dies, die zur Analyse genutzten Zellen, könnten die Ergebnisse beeinflusst werden. Außerdem wird bei der hier verwendete Transfektionsmethode, der Lipofektion, der endosomale Transportweg genutzt, um die DNA in die Zelle aufzunehmen. Um auszuschließen, dass dies das Ergebnis auch beeinflussen könnte, müssten die Experimente mit einer anderen Transfektionsmethode wiederholt werden, wie z. B. durch Elektroporation. Andererseits wurden alle Experimente mit derselben Methode durchgeführt, demzufolge sind die Ergebnisse untereinander vergleichbar. Trotz dieses artifiziiellen Systems geben die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse in Zusammenhang mit der Literatur eine Reihe von Hinweisen auf die Funktion der hLGDs. Durch weitere Experimente in anderen Organismen oder Zelllinien mit andersartigen Manipulationen könnten diese Schlüsse gestützt werden.

Die in dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse in humanen Zellen bestätigen, dass die hLGDs eine regulatorische Funktion im endosomalen Transportweg besitzen. So scheint die Expression der hLGDs und ihrer Deletionskonstrukte den spät endosomalen/lysosomalen Transportweg zu stören. Des Weiteren übt die Expression der hLGD Δ C2s sowie von hLGD2 Δ DM14 einen dominant negativen Effekt auf den spät endosomalen/lysosomalen Transportweg aus, welcher sich in stark vergrößerten Vesikeln äußert und teilweise zu einer geänderten CHMP4B Verteilung führt. Zudem scheint die Expression von hLGD2 und seinen Deletionskonstrukten die RAB7 Verteilung zu beeinflussen. Die genaue Wirkungsweise der hLGDs muss in weiteren Untersuchungen weiter analysiert werden.

3.2 Analyse eines mentale Retardierung auslösenden Allels von *hLGD2*

Eine Beteiligung an der Neurodegeneration zeigt sich auch bei einem Allel von LGD2, welches im Menschen eine nicht syndromische autosomal rezessive mentale Retardierung (NSMR) auslöst. Die davon betroffenen Patienten haben grundsätzlich eine verzögerte Entwicklung. Ihr Intelligenzquotient liegt unter 70, ihre Aufmerksamkeitsspanne ist verkürzt und ihre Sprache ist unverständlich. Ab gesehen

davon, weisen die Patienten mit NSMR keine schwerwiegenden physischen Abnormalitäten, Dysmorphismen oder neurologische Abnormalitäten auf (American Psychiatric Association, 2000).

Bei dieser Mutation führt eine Leserasterverschiebung in *hLGD2* zu einem Protein, welches aus den ersten drei DM14 Domänen besteht und einem direkt daran anschließenden Nonsense-Peptid von 30 Aminosäuren (Basel-Vanagaite et al., 2006). Diesem verkürzten *hLGD2* Protein fehlt demzufolge die vierte DM14 Domäne sowie die C2 Domäne. Da die Ursache, für die mentale Retardierung unbekannt ist, wurde dieses Allel in dieser Arbeit im Hinblick auf grundlegende Eigenschaften sowie seinen Einfluss auf den endosomalen Transportweg näher analysiert.

Die dem Allel nachgebildeten Konstrukte der *hLGDs* sind sowohl mit als auch ohne Nonsense-Peptid in *D. m.* nicht funktional (s. Abb. 2.41-43). Da auch die Konstrukte von *Lgd* nicht funktional sind, spricht dies dafür, dass dieses Allel von *hLGD2* zu einem kompletten Funktionsverlust führt. Im Gegensatz dazu postulierten Zhao et al. (2010), dass dieses möglicherweise hypomorph ist, da es in einem NF- κ B Luciferaseassay immer noch circa 20% der Aktivität des kompletten *hLGD2* beibehält. Die Aktivität von NF- κ B spielt während der Entwicklung des Zentralnervensystem eine Rolle und ist auch bei Lernprozessen und im Gedächtnis involviert (Meffert und Baltimore, 2005; Kaltschmidt et al., 2005). Eine Erklärung für die mentale Retardierung könnte ein vermindert aktiviertes NF- κ B sein. Die widersprüchlichen Ergebnisse bei der Funktionalität der Konstrukte in *D. m.* und in Bezug auf die Aktivität von NF- κ B könnten damit zusammenhängen, dass noch eine Restfunktion von *hLGD2* in Bezug auf die NF- κ B Aktivität vorhanden ist, jedoch die Funktion von *Lgd* in *D. m.* nicht mehr übernehmen kann. Zudem wurden diese Ergebnisse *in vitro* gewonnen, was wiederum das Ergebnis beeinflussen kann. Im Gegensatz dazu zeigten Manzini et al. (2014), dass eine amorphe Mutation von *LGD2* denselben Phänotyp wie das Allel von *hLGD2* hat, welches die mentale Retardierung auslöst.

Mögliche Ursachen für die fehlende bzw. eingeschränkte Funktionalität könnten in der fehlenden C2 Domäne des eine mentale Retardierung auslösenden Allels liegen. Bei einem Verlust der C2 Domäne von *Lgd* ist das Protein im Nukleus und nicht mehr cytoplasmatisch lokalisiert (Troost et al., 2012). Auch bei den nachgebildeten mentalen Retardierungskonstrukten sowohl mit als auch ohne Nonsense-Peptid von *Lgd* sind diese sowohl in *D.m.* als auch in humanen Zellen im Nukleus lokalisiert (s Abb. 2.44, 2.46, Anhang Abb. 7.17, 7.19). Allerdings befinden sie sich ebenfalls im Cytoplasma, dies ist bei dem alleinigen Verlust der C2 Domäne nicht zu beobachten. Der Verlust der vierten DM14 Domäne oder dem Bereich zwischen der vierten DM14 Domäne und der C2 Domäne scheint demzufolge auch einen Einfluss auf die Lokalisation des Proteins zu haben. Da jedoch bei einem Verlust aller DM14 Domänen keine Veränderung in der Lokalisation auftritt (Troost, 2012), ist wahrscheinlich der Bereich zwischen den DM14 Domänen und der C2 Domäne für diesen Unterschied verantwortlich. Die mentalen Retardierungskonstrukte von *hLGD1* befinden sich ebenfalls wie die von *Lgd* sowohl im Cytoplasma als auch im Kern (s Abb. 2.45, 2.46,

2.51, 2.54). Da hLGD1 ohne C2 Domäne rein cytoplasmatisch lokalisiert ist, scheint auch bei hLGD1 der Bereich zwischen den DM14 Domänen und der C2 Domäne einen Einfluss auf die Lokalisation des Proteins zu haben. Bei Lgd ist in dem Bereich zwischen der letzten DM14 Domäne und der C2 Domäne eine potentielle Proteinbindungsstelle (s. Anhang Abb. 7.21). Möglicherweise wird die Lokalisation über Interaktionspartner an dieser Bindungsstelle vermittelt. Diese potentielle Proteinbindungsstelle ist bei hLGD1 jedoch nicht vorhanden (s. Anhang Abb. 7.21). Im Gegensatz zu den mentalen Retardierungskonstrukten von Lgd und hLGD1 sind die mentalen Retardierungskonstrukte von hLGD2 in *D. m.* und auch in humanen Zellen weiterhin rein cytoplasmatisch lokalisiert (s. Abb. 2.45, 2.46, 2.53, 2.55).

Die Analyse der C2 Domäne von Lgd in *D. m.* konnte zeigen, dass Lgd auch ohne C2 Domäne noch eine Restfunktion besitzt, nur die veränderte Lokalisation im Nukleus und eine Instabilität des Proteins beeinträchtigt seine Funktion (Troost et al., 2012). Jedoch zeigen die mentalen Retardierungskonstrukte im Vergleich zu ihren jeweiligen full-length Proteinen keine starken Unterschiede in der Stabilität (s. Abb. 2.47). LgdDM14(1-3) scheint eine geringfügigere Stabilität im Vergleich zum kompletten Lgd zu haben. hLGD2MR hingegen scheint etwas instabiler zu sein als das Pendant ohne Nonsense-Peptid. Aber diese geringfügigen Unterschiede in der Stabilität der Proteine scheint nicht die Ursache für ihre Funktionslosigkeit zu sein. Dies zeigt sich daran, dass Lgd Δ C2 trotz Instabilität eine Restfunktion übernehmen kann, sobald durch das Anhängen eines Nuklearexportsignals Lgd Δ C2 cytoplasmatisch lokalisiert ist. Durch das Ausgleichen der Instabilität durch mehrere Kopien von NES-Lgd Δ C2 wird die Funktionalität des Proteins erhöht (Troost et al., 2012). Wie zuvor schon beschrieben reicht eine geringe Proteinmenge von Lgd, bzw. hLGD1 oder hLGD2 aus, um deren Funktion im jeweiligen Organismus zu erfüllen. Da die mentalen Retardierungskonstrukte jedoch nur geringfügig, bzw. gar nicht instabiler sind, verursachen die leichten Unterschiede in der Stabilität vermutlich nicht alleine den Funktionsverlust oder haben gar keinen Einfluss darauf.

Durch die Analyse der mentalen Retardierungskonstrukte im Hinblick auf den endosomalen Transportweg in humanen Zellen konnte gezeigt werden, dass diese mit keinen der getesteten endosomalen Markern assoziiert sind (s. Abb. 2.51, 2.53, 2.54, 2.56, Anhang Abb. 7.17, 7.19). Eine mögliche Ursache hierfür könnte sein, dass den mentalen Retardierungskonstrukten von hLGD2 die C-terminale Verlängerung fehlt, welche möglicherweise benötigt wird, um hLGD2 an die späten Endosomen zu bringen.

Auch wenn keine Assoziation der mentalen Retardierungskonstrukte mit endosomalen Markern erkennbar ist, scheint die Expression von hLGD1^{MR}, hLGD1DM14(1-3) sowie hLGD2^{MR} den spät endosomalen/lysosomalen Transportweg zu stören, da vergrößerte mit LAMP1 markierte Vesikel auftreten (s. Abb. 2.51, 2.54, 2.53).

Obwohl keine Assoziation der mentalen Retardierungskonstrukte in humanen Zellen mit CHMP4B erkennbar ist (s. Abb. 2.52, 2.55, Anhang Abb. 7.18, 7.20), können sie

dennoch mit dem CHMP4B-Orthologen Shrub in einem Pulldown interagieren (s. Abb. 2.48-50). Auch eine Interaktion der mentalen Retardierungskonstrukte der hLGDs mit CHMP4B und CHMP4C konnten zuvor schon in einer Co-Immunopräzipitation, bzw. mittels FRET-Analysen nachgewiesen werden (Lindner, 2013; Migdal, 2012). Diese Interaktion wurde jedoch nur *in vitro* nachgewiesen und es ist bislang nicht bekannt, ob diese auch *in vivo* stattfindet.

Es könnte sein, dass CHMP4B durch die Bindung der mentalen Retardierungskonstrukte im inaktiven Zustand im Cytoplasma gehalten wird. Da die hLGDs unter Umständen nicht weiter an andere Interaktionspartner binden können, da ihnen entscheidende Domänen fehlen könnten, kann CHMP4B möglicherweise nicht in seinen aktiven Zustand übergehen und polymerisieren. Aus diesem Grund treten auch bei Expression der mentalen Retardierungskonstrukte keine stark vergrößerten Vesikel auf, obwohl die C2 Domäne deletiert wurde (s. Abb. 2.51, 2.53, 2.54, 2.56, Anhang Abb. 7.17, 7.19). Da diese möglicherweise darauf beruhen, dass CHMP4B aktiviert bleibt. Gegen diese These spricht, dass kein endosomaler Phänotyp erkennbar ist. Allerdings deuten Ergebnisse mit Knockout-Mäusen daraufhin, dass die mLGDs teilweise redundant wirken. So überleben Tiere, welche defizient für *mLgd1* sind, und zeigen keine phänotypischen Veränderungen (Scheider, 2014). Sind die Tiere hingegen defizient für *mLgd2* sterben sie kurz nach der Geburt, vermutlich aufgrund eines Atmungsdefekts (Jäckel, 2010; Zhao et al., 2010). Es gibt Hinweise darauf, dass Tiere, welche sowohl für *mLgd1* als auch für *mLgd2* defizient sind, schon früh während der Embryonalentwicklung sterben. Auch Tiere, welche Defizienzen des ESCRT-III Komplexes tragen, wie z. B. CHMP5 oder CHMP4B sterben bei E11, bzw. E8 (Übersicht in Schmidt und Teis, 2012). So ist möglicherweise kein endosomaler Phänotyp zu beobachten, weil die mentalen Retardierungskonstrukte zwar CHMP4B teilweise inaktiv halten, dies aber durch das homologe hLGD, bzw. die endogenen hLGDs kompensiert werden kann.

Die Interaktion zwischen den hLGDs und dem ESCRT-III Proteinen CHMP4s zeigt sich auch darin, dass sowohl der Verlust von Shrub (CHMP4-Ortholog) als auch der von hLGD2 zu einem vergleichbaren neurologischen Phänotyp führt. So verursacht der Verlust von Shrub ein verkleinertes abgedecktes dendritisches Feld, indem es zu verkürzten Dendriten mit einer starken Verzweigung kommt (Sweeney et al., 2006). Auch ein Verlust von hLGD2 bedingt eine Reduktion der dendritischen Komplexität und der Anzahl der Dendriten (Manzini et al., 2014), so werden weniger Dendriten gebildet und auch die totale Dendritenlänge ist geringer im Vergleich zu wildtypischen Neuronen (Al-Tawashi et al., 2012). Zudem ist die Anzahl der gebildeten Synapsen in *Lgd2* mutanten Neuronen geringer als in wildtypischen Neuronen (Al-Tawashi et al., 2012). Dieser neuronale Phänotyp könnte die mentale Retardierung verursachen. Möglicherweise ist dafür ein Defekt im endosomalen Transportweg verantwortlich, da sowohl der Ausfall von Shrub als auch von hLGD2 sich phänotypisch ähneln. Andererseits zeigten Manzini et al. (2014), dass der neuronale Phänotyp bei einem Verlust von LGD2 durch eine gesteigerte NF- κ B Aktivierung verursacht wird.

Eine andere oder weitere Ursache wie die mentale Retardierung ausgelöst werden könnte, ist die Beteiligung von hLGD2 am NF- κ B Signalweg. So führt sowohl der Verlust als auch die Überexpression von hLGD2 zu einer gesteigerten NF- κ B Aktivierung (Manzini et al., 2014). Der NF- κ B Signalweg spielt eine Rolle bei der Gehirnentwicklung (Meffert und Baltimore, 2005; Kaltschmidt et al., 2005). So könnte ein Defekt im NF- κ B Signalweg die Symptome der mentalen Retardierung erklären. Ein weiterer Aspekt, welcher die mentale Retardierung auslösen könnte, ist die Beteiligung von hLGD2 am Akt-Signalweg (Nakamura et al., 2008). Dieser ist im zentralen Nervensystem involviert, indem er an der Regulation des neuronalen Zellüberlebens und der synaptischen Plastizität beteiligt ist (Dudek et al., 1997; Wang et al., 2003). Für die Bindung von hLGD2 an PDK1 ist die vierte DM14 Domäne wichtig, welche jedoch bei dem mentale Retardierung auslösenden Allel fehlt.

Die ausgelöste mentale Retardierung beim Menschen belegt, dass die Funktion von LGD2 im Gehirn eine wichtige Rolle spielt, die nicht durch LGD1 ersetzt werden kann. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass dieses untersuchte Allel von *hLGD2* wahrscheinlich einen kompletten Funktionsverlust des Proteins zur Folge hat. Im Gegensatz zu dem Verlust von LGD2 in Mäusen führt der Verlust von LGD2 im Menschen nicht zur Letalität. Dies lässt annehmen, dass es funktionelle Unterschiede zwischen LGD1 und LGD2 in Maus und Mensch gibt, die sich bislang noch nicht erklären lassen. Zudem zeigt sich, dass hLGD2 in der Neurogenese involviert ist. Welche Funktion hLGD2 dort hat, ist bislang noch nicht bekannt und bedarf noch weiterer Analysen.

Bei der zusammenfassenden Betrachtung der einzelnen Teilergebnisse dieser Arbeit lässt sich folgendes Fazit ziehen. Zum einen konnte nachgewiesen werden, dass die hLGDs cytoplasmatische und funktional stark konservierte Proteine sind. Zum anderen weisen die Ergebnisse darauf hin, dass das eine mentale Retardierung auslösende Allel von *hLGD2* einen kompletten Funktionsverlust zur Folge hat. Die in dieser Arbeit zudem generierten Ergebnisse zeigen die hLGDs als Regulatoren des endosomalen Transportweges. Dieser ist ein sehr essentieller Prozess in der Zelle, welcher mit wachsender Komplexität der Organismen stärker reguliert werden muss. Bei dieser Regulation könnte LGD ein wichtiger Faktor sein. So existiert in *Saccharomyces cerevisiae* kein Lgd, aber in weiter entwickelten Organismen, wie z. B. in *D. m.* entstand ein Lgd-Homolog. In höheren Organismen wie Maus oder Mensch entwickelten sich zwei LGD-Homologe, welche sich durch die Verlängerung des C-Terminus von hLGD2 unterscheiden. Dieses kann entscheidend zur stärkeren und differenzierteren Regulation des endosomalen Transportweges beitragen. Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse deuten auf eine differenziertere Rolle der hLGDs in der Regulation des endosomalen Transportweges hin, möglicherweise über die Regulation von CHMP4B.

Möglicherweise ist hLGD2 an der Regulation des Übergangs von späten Endosomen zu Lysosomen beteiligt. Vor allem scheinen die hLGDs über ihre Interaktion mit den CHMP4s aber an der ILV Bildung beteiligt zu sein. Durch weitere Charakterisierung der regulatorischen Rolle der hLGDs am endosomalen Transportweg könnte ein besseres Verständnis für diesen dazu beitragen die Ursachen von Krankheiten zu finden, an denen der endosomale Transportweg oder die ESCRTs beteiligt sind, wie Tumorbildung oder Neurodegeneration.

4 Zusammenfassung/Summary

hLGD1 und hLGD2 (hLGD: humanes lethal (2) giant discs) gehören einer konservierten Proteinfamilie an. Sie besitzen vier N-terminal gelegene DM14 Domänen und eine C-terminalen C2 Domäne. Lgd aus *Drosophila melanogaster* hat eine Funktion im endosomalen Transportweg und interagiert mit dem ESCRT-III Protein Shrub. Diese Interaktion ist auch für die hLGDs bekannt, welche mit den Shrub-Orthologen CHMP4A-C interagieren.

In dieser Arbeit sollten grundlegende Eigenschaften der hLGDs sowie deren Einfluss auf den endosomalen Transportweg analysiert werden. Zudem sollte auch das eine mentale Retardierung auslösende Allel hLGD2^{MR} näher charakterisiert werden. Dazu wurden proteinbiochemische Untersuchungen sowie Analysen in *Drosophila melanogaster* und in humanen Zellen durchgeführt.

Es konnte gezeigt werden, dass neben der Struktur auch die Funktion der hLGDs konserviert ist, so unterdrücken sowohl hLGD1 als auch hLGD2 den *lgd* mutanten Phänotyp in *Drosophila melanogaster*. Die Struktur-Funktionsanalyse wies nach, dass die DM14 Domänen und die C2 Domäne der hLGDs essentiell sind. Sowohl die DM14 Domänen als auch die C2 Domäne von hLGD2 besitzen eine Funktion in der Stabilität des Proteins. Bei hLGD1 hat die C2 Domäne eine andere bislang unbekannte Funktion. Wie auch Lgd sind die hLGDs cytoplasmatische Proteine.

Durch die Überexpression der hLGDs und ihrer Deletionskonstrukte konnte gezeigt werden, dass auch die hLGDs am endosomalen Transportweg beteiligt sind. Dies zeigt beispielsweise die Entstehung von stark vergrößerten späten Endosomen, bzw. Lysosomen bei der Überexpression von hLGD2 Δ DM14 oder den hLGD Δ C2s. Dieser dominant negative Effekt auf den endosomalen Transportweg deutet an, dass die hLGDs an der Regulation des spät endosomalen/lysosomalen Transportweges beteiligt sind. Zudem zeigt sich bei der Expression von hLGD1 Δ C2 und teilweise auch bei der Expression von hLGD2 Δ C2 eine bislang noch nicht beobachtete Lokalisation von CHMP4B, welches sich in den stark vergrößerten Vesikeln befindet.

Weitere Analysen in dieser Arbeit deuten daraufhin, dass das eine mentale Retardierung auslösende *hLGD2* Allel zu einem kompletten Funktionsverlust des Proteins führt. Zudem konnte gezeigt werden, dass keine Assoziation der mentalen Retardierungskonstrukte mit endosomalen Markern in humanen Zellen zu beobachten ist. Dennoch scheint deren Expression den spät endosomalen/lysosomalen Transportweg zu stören.

In dieser Arbeit konnte für die hLGDs ein eindeutiger Bezug zum endosomalen Transportweg nachgewiesen werden. Möglicherweise üben sie eine regulatorische Rolle aus, eventuell über ihre Interaktion mit CHMP4B. Weitergehende Analysen sind notwendig, um die genaue Wirkungsweise der hLGDs näher zu charakterisieren. Dadurch könnten weitere Mechanismen der Regulation des endosomalen Transportweges, bzw. der ESCRT-Komplexe ermittelt werden. Dies wiederum könnte für ein besseres Verständnis neurodegenerativer Erkrankungen oder der Tumorbildung beitragen.

Summary

hLGD1 and hLGD2 (hLGD: human lethal (2) giant discs) belong to a conserved protein family, which consists of four n-terminal DM14 domains and one c-terminal C2 domain. *Drosophila melanogaster* Lgd plays a role in the endosomal pathway and interacts with the ESCRT-III protein Shrub. It is also known that the hLGDs interact with the Shrub- orthologs CHMP4A-C.

In this study, basic characteristics of the hLGDs and their influence on the endosomal pathway have been analysed. Furthermore one allele of *hLGD2*, *hLGD2^{MR}*, which causes a non-syndromic mental retardation, have been characterised using proteinbiochemistry as well as analysis in *Drosophila melanogaster* and human cells.

The results showed that hLGD1 and hLGD2 can suppress the *lgd* mutant phenotyp to different extents. So not only the structure but also the function of the hLGDs is conserved. The structure-/function analysis revealed that the DM14 domains and also the C2 domain of the hLGDs are essential for their function. The DM14 domains as well as the C2 domain of hLGD2 play a role in the stability of the protein. The C2 domain of hLGD1 has a different for yet unknown function. Like Lgd, the hLGDs are cytoplasmatic proteins.

The overexpression of the hLGDs and their deletion constructs showed that the hLGDs are involved in the endosomal trafficking. For example this was demonstrated by the development of huge enlarged late endosomes, respectively lysosomes, when hLGD2 Δ DM14 or the hLGD Δ C2s are overexpressed. This dominant negative effect on the endosomal pathway implies the involvement of the hLGDs at the regulation of the late endosomal/lysosomal pathway. Furthermore the expression of hLGD1 Δ C2 and in some cases the expression of hLGD2 Δ C2 revealed a so far unobserved localisation of CHMP4B, which is localised within the enlarged late endosomes.

Moreover, the allele of *hLGD2*, which leads to a mental retardation, is causing a loss-of-function. Furthermore it was shown, that there is no assoziation of the mental retardation constructs with endosomal markers in human cells. Nevertheless the expression of the mental retardation constructs seems to disturb the late endosomal/lysosomal pathway.

This study revealed an obvious connection of the hLGDs to the endosomal pathway. Maybe they have a regulatory role, eventually due to their interaction with CHMP4B. Further analyses are necessary to characterise the specific function of the hLGDs. Thereby it is possible to reveal additional mechanisms of the regulation of the endosomal pathway, respectively the ESCRT-III complexes. As a result, there might be a clearer understanding of neurodegenerative diseases or cancer.

5 Material und Methoden

5.1 Material

5.1.1 Chemikalien

Die in der Arbeit verwendeten analysereinen Substanzen wurden, falls nicht anders vermerkt, von folgenden Firmen bezogen: Roth (Mannheim), Sigma-Aldrich (Steinheim), AppliChem (Darmstadt), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg), Normapur (Darmstadt), Fluka (Steinheim). In Tabelle 5.1 sind die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien sowie gekaufte Medien für die Zellkultur aufgelistet.

Tab. 5.1: Die in dieser Arbeit benutzten Chemikalien und gekaufte Medien mit Herstellerangaben.

Chemikalien und gekaufte Medien	Hersteller
Amylose Harz	New England Biolabs (Ipswich, USA)
BM Chemiluminescence Blotting Substrate	Roche (Basel, CH)
DAPI No. 18860	Serva (Heidelberg)
DMEM	PAA (Pasching, A)
Fetal calf serum (FCS)	PAA (Pasching, A)
Gene Ruler 1 kb DNA Ladder <i>ready to use</i>	Fermentas (St. Leon-Rot)
Hoechst No.33258	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Magermilchpulver (Sucofin)	TSI (Zeven)
Ni-NTA Agarose	Qiagen (Hilden)
Normales Ziegen Serum (NGS)	Jackson Immuno Research (West Grove, USA)
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Fermentas (St. Leon-Rot)
PBS (Zellkultur)	PAA (Pasching, A)
Protease Inhibitor Cocktail P8340	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Rotiphorese Gel 30 (30% Acrylamid-, Bisacrylamid-Stammlösung im Verhältnis 37, 5:1)	Roth (Mannheim)
Trypsin-EDTA	PAA (Pasching, A)
Vectashield Mounting Medium (H-1000)	Vector Labs (Burlingame, USA)

5.1.2 Geräte, Apparaturen und Zubehör

In Tabelle 5.2 sind die benutzten Geräte, Apparaturen und das Zubehör aufgelistet.

Tab. 5.2: Die in der Arbeit benutzten Geräte und Apparaturen sowie das Zubehör.

Geräte, Apparaturen und Zubehör	Hersteller
Binokulare	EZ4 (Leica, Buffalo Grove, USA)
Brutschrank, CO ₂ -Inkubator	Forma Steri-Cycle CO ₂ -Inkubator (Thermo Scientific, Waltham, USA)
Geldokumentation	UV-Transilluminator (PEQLAB Biotechnologie, Erlangen)
Kunststoffartikel	Reaktionsgefäße und Petrischalen (Eppendorf, Hamburg; Greiner Bio-One, Frickenhausen; Sarstedt, Nümbrecht) Zellkulturflaschen (Sarstedt, Nümbrecht; Biochrom, Berlin)
Mikroskop	Axio Imager ZI mit Apotome und AxioCam MRm (Carl-Zeiss, Jena) Axio Phot mit AxioCamMRc (Carl-Zeiss, Jena) ELYRA PS.1 (Carl-Zeiss, Jena) Olympus BH2 (Shinjuku, Japan)
pH-Meter	pH538 MultiCal (WTW, Weilheim)
Photometer	BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg)
PVDF Membran	Amersham Hybond-P (GE Healthcare, Chalfont St. Giles; Großbritannien)
Röntgenfilme	Super RX (Fujifilm Medical Systems, Stamford, USA)
SDS Gelelektrophorese	Blottingkammer Mini Protean 3 Cell (Bio-Rad Laboratories, München)
Sonifizierer	Gene Pulser (Bio-Rad Laboratories, München)
Spektralphotometer	NanoDrop 2000 (PEQLAB Biotechnologie, Erlangen)
Sterilwerkbank	HeraSafe Typ12 (Hareus Instruments, Hanau)
Taumlern	Rocking Platform Polymax 2040 (Heidolph Instruments, Schwabach)
Thermocycler	Professional Thermocycler Gradient (Biometra, Göttingen)
Vortex-Mixer	Vortex Genie 2 (Scientific Industries, New York, USA)
Blotting-Apparatur	Trans-Blot SD Semi Dry Transfer Cell (Bio-Rad Laboratories, München)

Zentrifugen	Biofuge Pico (Hareus Instruments, Hanau), Coulter Ultrazentrifuge Avanti J-26 XP, Centrifuge JX508L37 mit JA-14 Rotor (Beckmann)
-------------	--

5.1.3 Software und Internetdatenbanken

In der Tabelle 5.3 ist die genutzte Software und in Tabelle 5.4 sind die verwendeten Internetdatenbanken aufgelistet.

Tab. 5.3: Die in der Arbeit verwendete Software

Software	Verwendung
Adobe Acrobat Reader	Dateidarstellung
Adobe Illustrator CS3	Erstellung von Abbildungen
Adobe Photoshop CS3	Bildbearbeitung
AxioVision SE64 Rel. 4.8	Erstellung und Export Mikroskopiebilder
Citavi 3	Literaturverwaltung
Heliconfocus	Bildbearbeitung
Microsoft Office 2003	Verfassung der schriftlichen Arbeit
Vektor NTI	Planung der molekularen Arbeiten
Zen 2011	Erstellung und Export Mikroskopiebilder

Tab. 5.4: Auflistung der genutzten Internetdatenbanken

Internetdatenbank	Internetadresse
BLAST	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
EMBL-EMI	http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/
Ensembl	www.ensembl.org/
Flybase	http://flybase.org/
NCBI Pubmed	www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed
PredictProtein	http://ppopen.informatik.tu-muenchen.de/

5.1.4 Enzyme

Die verwendeten Enzyme zur Restriktion wurden von der Firma New England Biolabs (Ipswich, USA) bezogen. Wenn nicht anders angegeben, erfolgte deren Verwendung nach Herstellerangaben. Die verwendeten Enzyme sind in Tabelle 5.5 aufgelistet.

Tab. 5.5: Die in der Arbeit verwendeten Enzyme

Enzyme	Hersteller
DNA-Polymerasen	Expand High Fidelity ^{PLUS} PCR System (Roche, Mannheim), OneTaq (New England Biolabs, Ipswich, USA), Crimson <i>Taq</i> DNA-Polymerase (New England Biolabs, Ipswich, USA)
Ligase	T4-DNA Ligase (New England Biolabs, Ipswich, USA)
Phosphatase	CIAP (Fermentas, St. Leon-Rot)

5.1.5 Molekularbiologische Kits

In Tabelle 5.6 sind die verwendeten molekularbiologischen Kits aufgelistet.

Tab. 5.6: Auflistung der molekularbiologischen Kits

Molekularbiologische Kits	Hersteller
Aufreinigung von DNA	NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Düren)
Plasmid-Präparation	Plasmid Miniprep Kit I, (PeqLab, Erlangen) NucleoBond Xtra, (Macherey-Nagel, Düren)
Transfektion	Lipofectamin2000 [®] , (Invitrogen, Darmstadt)
Zwischenklonierungsvektor	pGEM-T Easy Vektor System I (Promega, Mannheim)

5.1.6 Antikörper

In Tabelle 5.7 sind die verwendeten Primärantikörper für Antikörperfärbungen in *Drosophila melanogaster* Imaginalscheiben, humanen und murinen Zellen (IHC), sowie für die Detektion der Proteine im Western Blot aufgelistet (WB). Außerdem sind die in dieser Arbeit verwendeten Sekundärantikörper in Tabelle 5.8 aufgeführt.

Tab. 5.7: Primärantikörper

Antigen	Herkunft	Verdünnung		Hersteller
		WB	IHC	
Wingless (Wg)	Maus		1:50	Hybridoma (Iowa City, USA)
β -Galaktosidase (β -gal)	Kaninchen		1:1500 (preabsorbiert)	Hybridoma (Iowa City, USA)
Notch (extra)	Maus		1:100	Hybridoma (Iowa City, USA)
HA	Ratte	1:3000	1:500	Roche (Basel, CH)
CC2D1A	Maus	1:2000		Abnova (Taipei City, TWN)
Cc2d1a	Meerschweinchen		1:100	Sandra Jäckel
α -tubulin (T-5168)	Maus	1:50.000		Sigma (St. Louis, USA)
MBP	Maus	1:200.000		New England Biolabs (Ipswich, USA)
RAB5	Kaninchen		1:200	Abcam (Cambridge, UK)
RAB7	Maus		1:200	Abcam (Cambridge, UK)
LAMP1	Maus		1:200	Hybridoma (Iowa City, USA)
CHMP4B (C-12)	Kaninchen		1:200	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, USA)
FK2	Maus		1:200	Enzo Life Sciences (Lörrach)
Lgd (final; AS 362-663)	Meerschweinchen	1:3000		Robert Jaeckel, Jahan Yousefian
Calnexin (No. 2433)	Kaninchen		1:200	Cell Signaling (Boston, USA)
Syntaxin	Kaninchen		1:200	Cell Signaling (Boston, USA)

Tab. 5.8: Sekundäre Antikörper

Antikörper gegen	gekoppelt mit	Verdünnung	Herkunft
Maus	Alexa-647	1:500	Invitrogen (Carlsbad, USA)
	Alexa-568	1:500	Invitrogen (Carlsbad, USA)
	HRP	1:5000	Dianova (Hamburg)
Kaninchen	Alexa-568	1:500	Invitrogen (Carlsbad, USA)
	Alexa-488	1:500	Invitrogen (Carlsbad, USA)
	HRP	1:5000	Dianova (Hamburg)
Ratte	Alexa-488	1:500	Invitrogen (Carlsbad, USA)
	Alexa-568	1:500	Invitrogen (Carlsbad, USA)
	HRP	1:5000	Dianova (Hamburg)
Meerschweinchen	Alexa-488	1:500	Invitrogen (Carlsbad, USA)
	DyLight-649	1:500	Dianova (Hamburg)

5.1.7 Antibiotika

In Tabelle 5.9 sind die in dieser Arbeit verwendeten Antibiotika aufgelistet.

Tab. 5.9: Die in dieser Arbeit verwendeten Antibiotika

Antibiotika	Endkonzentration	Hersteller
Ampicillin	100 µg/ml	Roth (Mannheim)
Chloramphenicol	34 µg/ml	SERVA (Heidelberg)
G 418	500 µg/ml	PAA (Parsching, A)
Kanamycin sulfate	50 µg/ml	Fluka (Steinheim)

5.1.8 Bakterienstämme

Auflistung der in der Arbeit genutzten Bakterienstämme und deren Verwendung:

- DH5α von Invitrogen (Darmstadt): (Klonierung, Transformation und Plasmid-amplifikation)

Genotyp: F-φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(rk-,mk+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ-

- Rosetta 2(DE3)pLysS Competent Cells von Merck Millipore (Darmstadt) (Expression der MBP-markierten Proteine)

Genotyp: F⁻ ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm (DE3) pLysS (Cam^R)

- M15 cells von Qiagen (Hilden) (Expression His₆-markierter Proteine)

5.1.9 Zelllinien

Tabelle 5.10 erfasst die verwendeten Zelllinien.

Tab. 5.10: Auflistung der Zelllinien

Zelllinie	Charakteristika	Herkunft
3T3 NIH	murine Fibroblastenzelllinie	AG Lammert (Institut für Stoffwechselfysiologie, HHU, Düsseldorf)
HeLa	humane Cervixcarzinomazelllinie	AG Piekorz (Institut für Biochemie und Molekularbiologie II, HHU, Düsseldorf)
MEF wt	murine wildtypische embryonale Fibroblasten	AG Klein (Nadja Drusenheimer)
<i>mLgd2</i> ^{-/-} MEF	murine embryonale Fibroblasten mit <i>mLgd2</i> Defizienz	AG Klein (Nadja Drusenheimer)
U2OS wt	humane Osteosarcomazelllinie	Christel Brou (Institut Pasteur, Paris, F)

5.1.10 Plasmide

In dieser Arbeit wurden Expressionsvektoren verwendet, welche zur Expression in *Drosophila melanogaster* (plgdPattB, pUASattB) (Abb. 5.1), zur Expression in Säugetierzellen (pcDNA3) (Abb. 5.2), sowie zur Expression in Bakterien (pQE-30 Xa, pBADMuta und pBADM-40+) (Abb. 5.3) dienen. In Tabelle 5.11 sind die in dieser Arbeit verwendeten Vektoren aufgelistet.

Tab. 5.11: Die in der Arbeit benutzten Vektoren

Vektor	Verwendung	Herkunft
pBADM-40+	induzierbare Proteinexpression in <i>E. coli</i> , MBP-Tag	EMBL (Heidelberg)
pBADMuta	mutagenisierter pBADM-40+ Vektor zur Expression MBP-markierter Proteine, zwei Stoppkodons wurden aus der MCS entfernt	Angie Lindner (AG Klein)
pcDNA3	Proteinexpression in Säugetierzellen	Invitrogen (Darmstadt)
pGEM-T-Easy	Zwischenklonierungsvektor	Promega (Mannheim)
plgdPattB	Proteinexpression in <i>Drosophila melanogaster</i> auf endogenem Expressionslevel	Tobias Troost (AG Klein) (Troost et al., 2012)
pQE-30 Xa	induzierbare Proteinexpression in <i>E. coli</i> , His ₆ -Tag	Qiagen (Hilden)
pUASattB	induzierbare Proteinexpression in <i>Drosophila melanogaster</i>	Bischof (Zürich, CH) (Bischof et al., 2007)

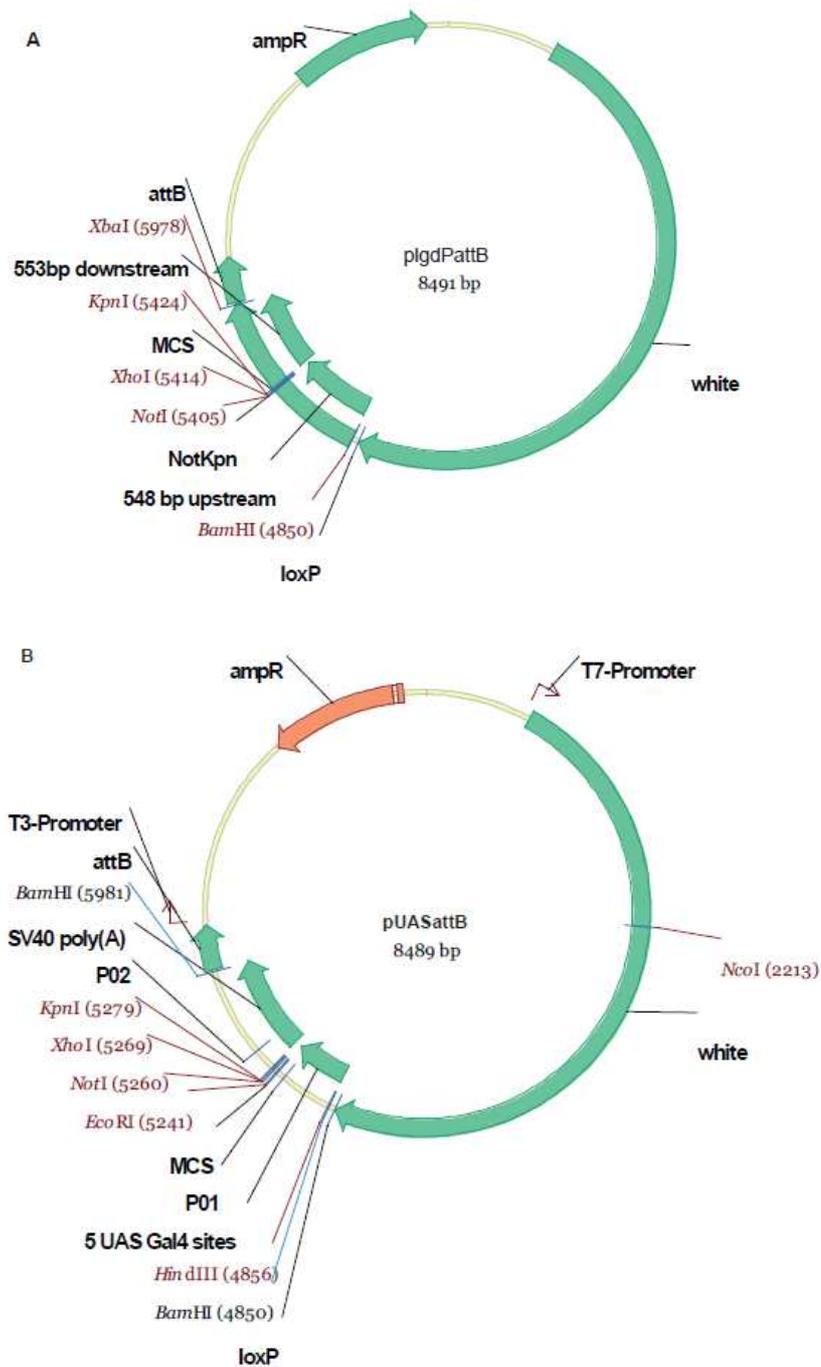
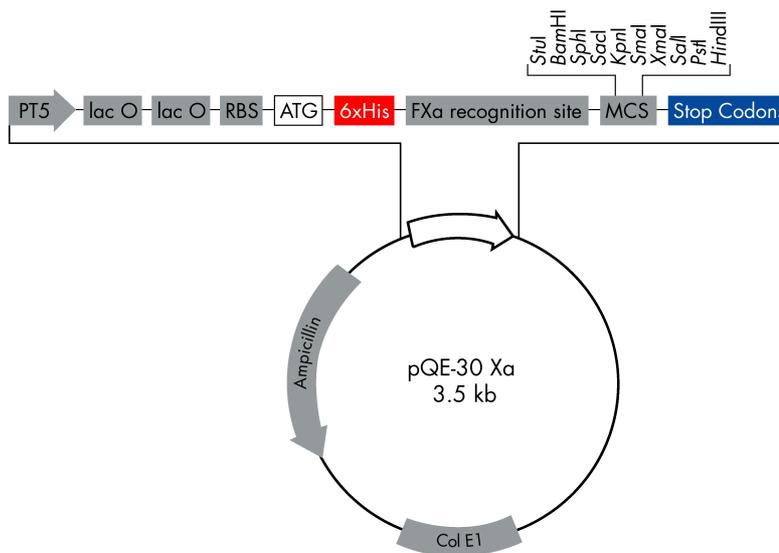


Abb. 5.1: Expressionsvektoren zur Expression in *Drosophila melanogaster*. A: pIgdPattB: In der Expressionskassette unter der Kontrolle des Igd-Promotors erfolgte die Insertion der DNA in die Multiple Klonierungsstelle (MCS). Zusätzlich enthält der Vektor die 3'- und 5'- UTR von Igd. Diese besteht aus circa 500 bp upstream und downstream Bereichen des Igd Locus. Der leere Vektor hat eine Gesamtlänge von 8,4 kb. B: pUASattB: In der Expressionskassette unter der Kontrolle eines Minimalpromotors erfolgte die Insertion der DNA in die Multiple Klonierungsstelle (MCS). Die Expression der Konstrukte erfolgte unter Kontrolle des UAS. Der leere Vektor hat eine Gesamtlänge von 8,4 kb. Beide Vektoren besitzen eine Ampicillin Resistenz (ampR) für die Selektion in Bakterien sowie das white-Gen (white) zur Selektion der transgenen Fliegen.

A



B

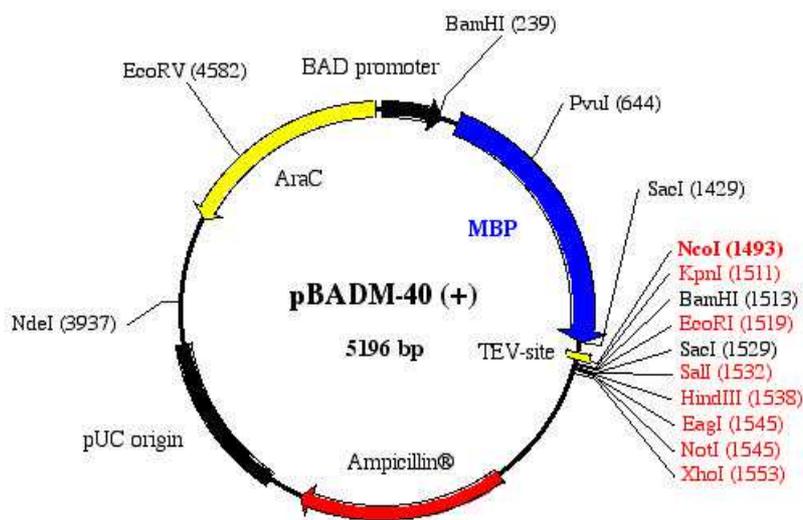


Abb. 5.2: Expressionsvektoren pQE-30Xa und pBADM-40(+) zur Expression von Proteinen in Bakterien. A: Der Vektor pQE-30Xa besitzt eine Ampicillinresistenz und ein *lac*-Operon. Die Induktion der Proteine erfolgt durch IPTG. Der Vektor wurde verwendet, um His₆ markierte hLGD und Lgd Proteine zu generieren. Der leere Vektor hat eine Gesamtlänge von 3,5 kb. B: Der pBADM-40(+) Vektor besitzt eine Ampicillinresistenz zur Selektion der Bakterien sowie einen BAD Promotor. Der Vektor wurde zur Expression von MBP verwendet. Der Vektor hat eine Gesamtlänge von 5,2 kb. Er wurde zudem modifiziert, da in der MCS zwei Stoppkodons vorhanden sind. Der daraus resultierende Vektor wurde als pBADMuta bezeichnet (Lindner, 2013).

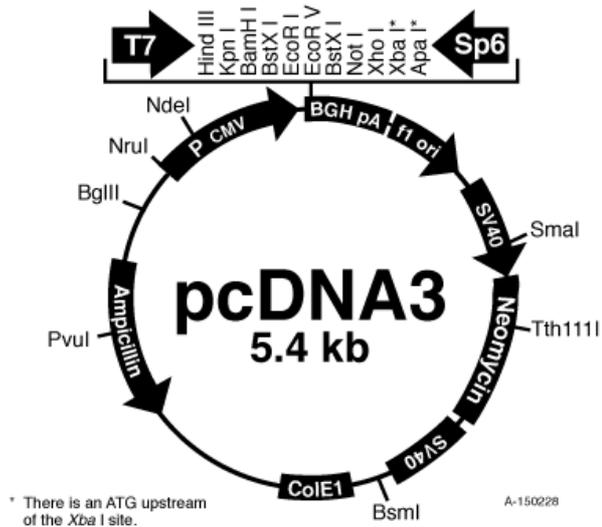


Abb. 5.3: Expressionsvektor zur Expression in Säugetierzellen. In der Expressionskassette unter der Kontrolle des CMV-Promotors erfolgte die Insertion der DNA in die Multiple Klonierungsstelle (MCS). Der leere Vektor hat eine Gesamtlänge von 5,4 kb. Der Vektor besitzt eine Ampicillinresistenz für die Selektion in Bakterien und eine Neomycinresistenz für die Selektion in Säugetierzellen.

In Tabelle 5.12 sind alle Plasmide und die für die Klonierung verwendeten Restriktionsenzyme angegeben. hLGD1 und hLGD2 stehen zudem stellvertretend für ihre Deletionskonstrukte (*), sofern sie nicht gesondert aufgelistet sind.

Tab. 5. 12: Die zur Klonierung verwendeten Restriktionsenzyme. (*) Deletionskonstrukte von hLGD1 bzw. hLGD2 sofern sie nicht gesondert beschrieben wurden

Konstrukt	Plasmid	Restriktionsenzyme
hLGD1*	plgdPattB pUASattB pcDNA3	<i>KpnI</i> , <i>NotI</i> <i>KpnI</i> , <i>NotI</i> <i>EcoRI</i> und <i>XhoI</i>
hLGD1 ^{MR}	pQE-30 Xa	<i>BamHI</i> , <i>KpnI</i>
hLGD1DM14(1-3)	pQE-30 Xa	<i>BamHI</i> , <i>KpnI</i>
hLGD2*	plgdPattB pUASattB pcDNA3	<i>XhoI</i> <i>XhoI</i> <i>EcoRI</i> und <i>XhoI</i>
hLGD2DM14(1-3)	pcDNA3 pQE-30 Xa	<i>HindIII</i> , <i>XhoI</i> <i>BamHI</i> , <i>SacI</i>
Lgd ^{MR}	pcDNA3 pQE-30 Xa	<i>HindIII</i> , <i>XhoI</i> <i>BamHI</i> , <i>KpnI</i>
LgdDM14(1-3)	pQE-30 Xa	<i>BamHI</i> , <i>KpnI</i>

Die cDNA für hLGD1 wurde von der Firma GenScript (Piscataway, USA) nach dem CC2D1B_003 Transkript von Ensembl (Transcript-ID: ENST00000284376) synthetisiert. Die cDNA von hLGD2 (Clone ID: 6585236) wurde von der Firma Source BioScience (Cambridge, UK) bezogen.

In Tabelle 5.13 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Plasmide aufgelistet, sowie die Primer, welche zur Konstruktherstellung benutzt wurden

Tab. 5.13: Auflistung der Plasmide.

Konstrukt	Plasmid	Primer	Herstellung
hLGD1-HA	plgdPattB pUASattB pcDNA3 pQE-30 Xa		in dieser Arbeit Karolin Kroese
hLGD1 Δ C2-HA	plgdPattB pUASattB pcDNA3	#39, #38	in dieser Arbeit
hLGD1 Δ DM14-HA	plgdPattB pUASattB pcDNA3	#39, #47, #48, #49	Jochen Steinbring
hLGD1 Δ DM14(1-2)-HA	plgdPattB pUASattB pcDNA3	#39, #54, #53, #49	in dieser Arbeit
hLGD1 Δ DM14(3-4)-HA	plgdPattB pUASattB pcDNA3	#39, #55, #56, #49	in dieser Arbeit
HA-hLGD1 DM14(1-3)	plgdPattB pUASattB pcDNA3 pQE-30 Xa	#67, #68 #90, #68	Kristina Scheider in dieser Arbeit
HA-hLGD1 ^{MR}	plgdPattB pUASattB pcDNA3 pQE-30 Xa	#67, #75, #74, #76 #90, #76	Kristina Scheider in dieser Arbeit

Fortsetzung Tabelle 5.13

Konstrukt	Plasmid	Primer	Herstellung
hLGD2-HA	plgdPattB pUASattB pcDNA3 pQE-30xa	#25, #26	in dieser Arbeit Karolin Kroese
hLGD2 Δ C2-HA	plgdPattB pUASattB pcDNA3	#25, #36, #26, #37	in dieser Arbeit
hLGD2 Δ DM14-HA	plgdPattB pUASattB pcDNA3	#25, #45, #26, #46	Jochen Steinbring
hLGD2 Δ C815-HA	plgdPattB pUASattB pcDNA3	#25, #8	in dieser Arbeit
HA-hLGD2 DM14(1-3)	plgdPattB pUASattB pcDNA3 pQE-30 Xa	#30, #69 #90, #91	Kristina Scheider in dieser Arbeit
HA-hLGD2 ^{MR}	plgdPattB pUASattB pcDNA3 pQE-30 Xa	#30, #31, #32, #33	in dieser Arbeit Angie Lindner
HA-Lgd DM14(1-3)	plgdPattB pUASattB pcDNA3 pQE-30 Xa	#70, #71 #87, #71 #90, #71	Kristina Scheider in dieser Arbeit
HA-Lgd ^{MR}	plgdPattB pUASattB pcDNA3 pQE-30 Xa	#70, #73, #72, #76 #87, #76 #90, #76	Kristina Scheider in dieser Arbeit
Lgd	pQE-30 Xa		Nadja Ohlenhard
MBP	pBADM-40+		EMBL (Heidelberg)
MBP-shrub	pBADMuta		Sarah Bohnen

5.1.11 Synthetische Oligonukleotide

Alle synthetischen Oligonukleotide (Primer) wurden von BioTeZ (Berlin) oder Biolegio BV (Nijmegen, Niederlande) bezogen und sind in den Tabellen 5.14 und 5.15 zusammengestellt.

Tab. 5.14: Oligonukleotide zur Klonierung: Die Restriktionsschnittstellen, die für die Klonierung verwendet wurden, sind durch Fettdruck gekennzeichnet

Nr.	Oligonukleotid	Sequenz	Amplifikation von
#8	(AS) CC2D1A- Δ C815	gccctcgagg cctcaagcgtaatctggcacat cgatgggtaagcagctgccggcacagggtca a	hLGD2 Δ C815-HA
#25	(S) CC2D1A	ccgctcgaggaattc gccatgcacaagagga aaggacccccgggacc	hLGD2-HA hLGD2 Δ C815-HA hLGD2 Δ C2-HA hLGD2 Δ DM14-HA
#26	(AS) CC2D1A	gccctcgagg cctcaagcgtaatctggcacat cgatgggtaagccctgcggagccgctgcagct	hLGD2-HA hLGD2 Δ C2-HA hLGD2 Δ DM14-HA
#30	(S) hlgd2-mut- HA-nterm	ccgctcgaggaattc gccatggctaccata cgatgtccagattacgctcacaagaggaaag gacccccggga	HA-hLGD2 ^{MR} HA-hLGD2DM14 (1-3)
#31	(AS) hlgd2-mut- überhang-nterm	ttgtgacagggcgaggcggcacctgggggca cgggcaattcagcgacatc	HA-hLGD2 ^{MR}
#32	(S) hlgd2-mut- überhang-cterm	gatgtcgctgaattgcccggtccccaggtgcc gcctgcccctgtcaaca	HA-hLGD2 ^{MR}
#33	(AS) hlgd2-mut- cterm	gccctcgagg cctcacctgaggagccgctgca gctcactctaccaga	HA-hLGD2 ^{MR}
#36	(AS) hlgd2 Δ C2- überhang nterm	tgtgggcacagctgccggcacagggtcgaggt caggaagatcttgatga	hLGD2 Δ C2-HA
#37	(S) hlgd2 Δ C2- überhang cterm	tcatcaagatcttccctgacctcgaccctgtgccg gcagctgtcccaca	hLGD2 Δ C2-HA
#38	(AS) hlgd1 Δ C2	gccctcgaggcgggtacc ctatcaagcgtaatct ggcacatcgatgggtaagcgagttctgagaag atcctcacag	hLGD1 Δ C2-HA
#39	(S) hlgd1	ctggaattcgcggccg ccatgatgccaggg ccaagacctcgaa	hLGD1 Δ C2-HA hLGD1 Δ DM14-HA hLGD1 Δ C2-HA hLGD1 Δ DM14(1-2)- HA hLGD1 Δ DM14(3-4)- HA
#45	(AS) hlgd2 Δ DM14- überhang nterm	gggcaaagtcgtcctgttgaccaaggtgtctc cagccccgatgagg	hLGD2 Δ DM14-HA

Fortsetzung Tabelle 5.14

Nr.	Oligonukleotid	Sequenz	Amplifikation von
#46	(S) hlgd2ΔDM14- überhang cterm	cctcatccggggctggagaccaccttggta acaaggacgactttgcc	hLGD2ΔDM14-HA
#47	(AS) hlgd1ΔDM14- überhang nterm	atgaagtcacccctcctcatccgtcaaagcgtg tagcccctgagatgctccgg	hLGD1ΔDM14-HA
#48	(S) hlgd1ΔDM14- überhang cterm	ccggagcatctcaggggctacacgctttgac ggatgaggagggtgacttcat	hLGD1ΔDM14-HA
#49	(AS) CC2D1B	ggtaccctcgagt caagcgtaatctggcac atcgtatgggtaagccaagcccctgggctcc agaac	hLGD1ΔDM14-HA hLGD1ΔDM14(1-2)-HA hLGD1ΔDM14(3-4)-HA
#53	(S) hlgd1Δ DM14(1-2)- überhang cterm	gcctgctggggctcagatcctcagcgtgtag cccctgagatgctccggcct	hLGD1ΔDM14(1-2)-HA
#54	(AS) hlgd1Δ DM14(1-2)- überhang nterm	aggccggagcatctcaggggctacacgctg aggatctgaagccccagcaggc	hLGD1ΔDM14(1-2)-HA
#55	(AS) hlgd1Δ DM14(3-4)- überhang nterm	gaggatgaagtcacccctcctcatccgtcaac agcactgtctgtgactctgtaggggc	hLGD1ΔDM14(3-4)-HA
#56	(S) hlgd1Δ DM14(3-4)- überhang cterm	gcccctacagagtcacagacagtgtgttga cggatgaggagggtgacttcatcctc	hLGD1ΔDM14(3-4)-HA
#67	(S) HA- hlgd1 DM14(1-3)	ctg gaattcgcgccgccc atggcttacc atacgtatgccagattacgctatgccaggg ccaagacctg	HA-hLGD1DM14(1-3)
#68	(AS) HA- hlgd1 DM14(1-3)	gccc ggtaccctcgagt cacaattcagcaa agttgactttccgtcctgctcgggtgctcgaat agc	HA-hLGD1DM14(1-3)
#69	(AS) HA- hlgd2 DM14(1-3)	gcctcgaggcctcatgggggacagggcaa ttcagcgacatccacggc	HA-hLGD2DM14(1-3)
#70	(S) HA- lgd DM14(1-3)	ctg gaattcgcgccgccc atggcttacc atacgtatgccagattacgctttctccagaa agaagccagagc	HA-LgdDM14(1-3)
#71	(AS) HA- lgd DM14(1-3)	ggtaccctcgagtcatggtggcacaggcagc tcatcgtaaggcactggttgcctgcctgtaca actttatggc	HA-LgdDM14(1-3)
#72	(S) lgd ^{MR} überhang-cterm	cgatgagctgcctgtgccaccaggtgccgcc tgcccctgtcaac	HA-Lgd ^{MR}
#73	(AS) lgd ^{MR} überhang-nterm	gttgacaggggacagggcgccacctggtggca caggcagctcatcg	HA-Lgd ^{MR}

Fortsetzung Tabelle 5.14

Nr.	Oligonukleotid	Sequenz	Amplifikation von
#74	(S) hlgd1 ^{MR} überhang-cterm	cggaagtgcaactttgctgaattgggtgccgc ctgccctgtcaacaagg	HA-hLGD1 ^{MR}
#75	(AS) hlgd1 ^{MR} überhang-nterm	cgtccttggtgacaggggcaggcggcaccca attcagcaaagttgactttccgtcctgc	HA-hLGD1 ^{MR}
#76	(AS) (h)lgd ^{MR}	gcccgggtaccctcgagtcaccatagcgccg ggcggcctcc	HA-hLGD1 ^{MR} HA-Lgd ^{MR}
#87	(S) HindIII HA- lgd	ctgaagcttccatggcttaccatacgatgtg ccagattacgctttctccagaaagaagccag agc	HA-Lgd DM14(1-3)
#90	(S) pQE-MR- BamHI-HA	ctggatccatggcttaccatacgatgtgcca gattacgc	HA-Lgd DM14(1-3) HA-Lgd ^{MR} HA-hLGD1 ^{MR} HA-hLGD1 DM14(1-3) HA-hLGD2 DM14(1-3)
#91	(AS) pQE hlgd2 DM14(1-3)	ccgagctctcatgggggcacgggcaattca gcgacatccacg	HA-hLGD2 DM14(1-3)

In Tabelle 5.15 sind die Sequenzierungs- und Genotypisierungsprimer abgebildet. Die Bildungsstellen der Primer, welche an hLGD1-HA oder hLGD2-HA binden, sind in den Abbildungen 5.4 und 5.5 dargestellt.

Tab. 5.15: Oligonukleotide zur Sequenzierung und Genotypisierung

Nr.	Oligonukleotid	Sequenz	Bindungsstelle
#2	(S)-CC2D1A-1400	tgctgctgaattgcccgtgcc	
#3	(S)-CC2D1A-2900	acacccccctgctccagctgtg	
#5	(S)-CC2D1B-1640	tggagcgagtgccagccagtgat	
#7	(AS)-CC2D1B-2780	agtcaccctcctcatccgtaa	
#9	(S)CC2D1A-800	ggcccggcgctccacgcctacacagcc	
#34	pattb_resc_nterm	ctgttgcgacgcaaaaattt	plgdPattB
#35	pattb_resc_cterm	tgtagggatatttacaac	plgdPattB
	hlgd1-1073- genotyp-R	atccatgccagcagcatgtc	
	hlgd1-1744-F	atctggcagacctgtgatc	
	hlgd1-876-R	cactttgtactctctctgtcg	
	hlgd1-538-R	cctctcggtagttggaatcc	
	hlgd2-seq-2222-F	agttcgaagtgggtcacaagg	
	hlgd2-1053- genotyp-R	tcagggatcatcaggccatctg	

Fortsetzung Tabelle 5.15

Nr.	Oligonukleotid	Sequenz	Bindungsstelle
	hlgd2-731-R	ttagccaagcctggagatgag	
	hlgd2-1602-F	aagggactggagcctatgctg	
	hlgd2-2553-F	tgcatagcctcagtgctg	
	CMV-Promotor-genotyp-F	ctatataagcagagctctctgg	CMV-Promotor
	P01	ctgaaatctgccaagaag	pUASattB
	P02	ggttggaatctaaaatacac	pUASattB
	M13	gtaaaacgagggccag	pGEM-T Easy
	M20	caggaaacagctatgac	pGEM-T Easy
	T7	taatacgcactcactataggg	pGEM-T Easy
	SP6 (universal)	atttagtgacactatag	pGEM-T Easy
	L3	tgaagtgcagttaaagcc	1. DM14 Domäne von Lgd (S)
	L4	aaatgtgtgaagacggacagg	2. DM14 Domäne von Lgd (S)
	L8	cagtcctgactacgatgaac	C2 Domäne von Lgd (S)

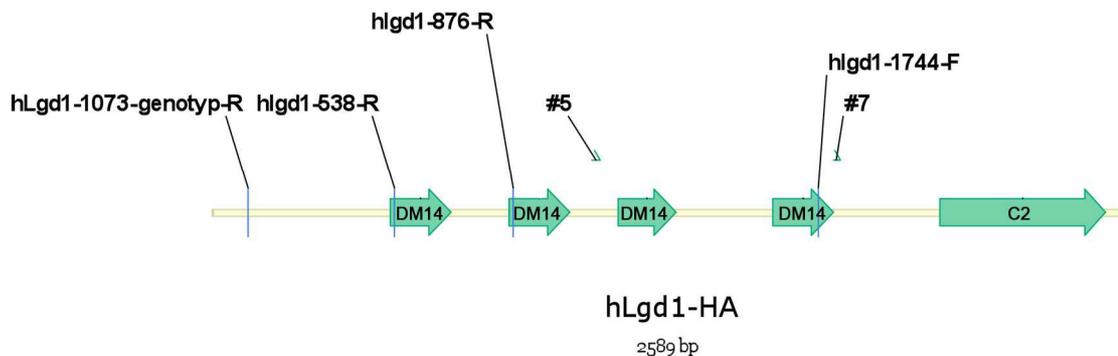


Abb. 5.4: Schematische Darstellung von hLGD1-HA und die Bildungsstellen der Sequenzierungsprimer. In der Abbildung sind die DM14 Domänen und die C2 Domäne von hLGD1 eingezeichnet. Des Weiteren sind die Bildungsstellen der Genotypisierungs- und Sequenzierungsprimer eingezeichnet.

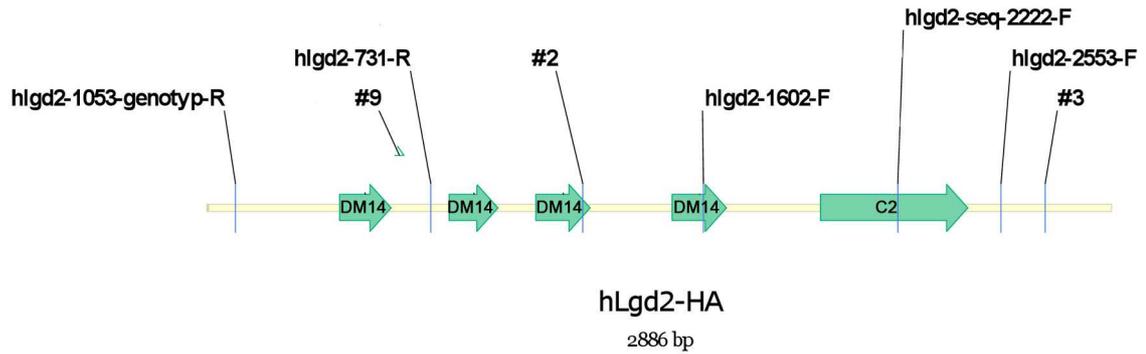


Abb. 5.5: Schematische Darstellung von hLGD2-HA und die Bildungsstellen der Sequenzierungsprimer. In der Abbildung sind die DM14 Domänen und die C2 Domäne von hLGD2 eingezeichnet. Des Weiteren sind die Bildungsstellen der Genotypisierungs- und Sequenzierungsprimer eingezeichnet.

5.2 Methoden

5.2.1 Bakterienkultur

5.2.1.1 Anzucht und Lagerung von *E.coli* DH5 α Bakterien

Die Anzucht von *E.coli* DH5 α Bakterien erfolgte in LB-Medium bei 37°C und 200 μ M über Nacht. Zur Selektion rekombinanter Bakterien wurden dem Medium das entsprechende Antibiotikum hinzugefügt. Die kurzfristige Lagerung erfolgte bei 4°C (1-2 Wochen) auf LB-Agarplatten oder in LB-Medium. Zur langfristigen Lagerung wurden Glycerin Stammkulturen angelegt, indem 700 μ l einer dicht bewachsenen Übernachtkultur mit 300 μ l 87% (v/v) sterilem Glycerin gemischt und anschließend bei -70°C gelagert wurde.

LB-Medium:

1% Baktotrypton; 0,5% Hefeextrakt; 1% NaCl

LB-Agarplatten:

LB-Medium, 1,5 % Agar

Die Antibiotikumzugabe erfolgte bei circa 40°C vor dem Gießen in Petrischalen.

5.2.1.2 Hitzetransformation kompetenter *E.coli* DH5 α Bakterien

Die Hitzetransformation kompetenter Bakterien erfolgte nach den Angaben von Hanahan (1983). Kompetente *E.coli* DH5 α Bakterien wurden auf Eis aufgetaut, mit 10-100 ng Plasmid DNA oder einem Ligationsansatz (s. Kap. 5.2.6.3) gemischt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Hitzeschocktransformation der Bakterien erfolgte für 90 Sekunden bei 42°C. Anschließend wurden die Bakterien 2-3 Minuten auf Eis abgekühlt und mit 1 ml LB-Medium versetzt. Zur Regeneration und Vermehrung der Bakterien wurden diese 1 Stunde bei 37°C kultiviert. Zur Selektion Plasmid tragender

Bakterienkolonien wurden die Bakterien auf Antibiotika-haltigen LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C gelagert.

5.2.2 Isolierung von Plasmid DNA aus E. coli

Zur Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien wurde das Nucleobond PC100-Kit der Firma Macherey-Nagel (Düren) verwendet, welches auf dem Prinzip der alkalischen Lyse beruht. Zur Gewinnung großer DNA-Mengen wurden 100 ml Übernachtskultur angesetzt und die mitgelieferten Anionenaustauscher-Säulen zur Aufreinigung der DNA verwendet. Die gewonnene Plasmid DNA wurde in 50 µl dH₂O resuspendiert. Zur Isolation kleinerer DNA-Mengen wurden 3 ml Übernachtskultur angesetzt und nur die Puffer S1 (Resuspension mit RNaseA), S2 (Zelllyse) sowie S3 (Neutralisation) verwendet. Anschließend wurden die gefällten Proteine und die genomische DNA abzentrifugiert. Die im Überstand enthaltene Plasmid-DNA wurde mithilfe von Isopropanol gefällt. Zum Schluss erfolgten ein Waschschrift mit 70% Ethanol und die Trocknung des DNA-Pellets, welchen dann in 20 µl dH₂O resuspendiert wurde.

Zur Gewinnung von sehr reiner DNA für nachfolgende Klonierungsschritte oder Sequenzierungen erfolgte die Präparation der Plasmid DNA aus 3 ml einer Übernachtskultur mithilfe des „Plasmid Miniprep Kit“ (PeqLab) gemäß Herstellerangaben. Diese basiert ebenfalls auf dem Prinzip der alkalischen Lyse.

S1:

50 mM Tris-HCl, pH 8; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase A

S2:

200 mM NaOH; 1% SDS

S3:

2,8 M Kaliumacetat, pH 5,1

5.2.3 Agarosegelelektrophorese von DNA

Die Agarosegelelektrophorese erfolgte nach Sambrook et al. (1996) mit 0,8%-igen oder 2%-igen (w/v) Agarosegelen in 1xTAE-Puffer mit 0,1 µg/ml Ethidiumbromid. Die Dokumentation der Agarosegele erfolgte im UV-Transluminator bei einer Wellenlänge von 254 nm. Die DNA Größenmarker wurden von der Firma MBI Fermentas (St.Leon-Rot) bezogen („GeneRuler™“ 1kb DNA Ladder, SM0311).

50xTAE:

2M Tris-Base; 57,1 ml/l Eisessig; 50 mM EDTA; pH 8,0

5.2.4 Präzipitation, Reinigung und Konzentrationsbestimmung von DNA

5.2.4.1 DNA-Präzipitation mit Ethanol

Die Präzipitation von DNA dient der Konzentrierung, Reinigung und Umpufferung. Dazu wurden DNA Proben mit 1/10 Vol. 3 M Natrium-Acetat (pH 5,2) und 2,5 Vol. Ethanol (96%) für 30 Minuten bei -20°C gefällt. Die gefällte DNA wurde anschließend durch Zentrifugation sedimentiert ($>20.000 \times g$, 25 min, 4°C), mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert ($>20.000 \times g$, 20 min, 4°C). Die DNA wurde bei RT getrocknet und dann in sterilem 10 mM Tris/HCl (pH 8,4) aufgenommen.

5.2.4.2 Reinigung von DNA-Fragmenten mittels präparativer Agarose-gelelektrophorese

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus PCR-Ansätzen und Restriktion (Kapitel 5.2.5.1 und 5.2.6.1) wurde eine präparative Agarosegelelektrophorese (0,8% v/v) durchgeführt. Die Elektrophorese erfolgte wie unter Kapitel 5.2.3 beschrieben, wobei die Fragmente der gewünschten Größe nach ihrer Auftrennung unter langwelligem UV-Licht mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten wurden. Mithilfe des „NucleoSpin Gel and PCR Clean-up“-Kits (Macherey- Nagel, Düren) wurde die DNA aus dem Gel nach Herstellerangaben isoliert.

5.2.4.3 DNA-Konzentrationsbestimmung

Diese Art der DNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte durch photometrische Messung bei 260 nm gegen H_2O_{dest} als Leerwert. Bei 1 cm Dicke der Quarzküvette entspricht eine $OD_{260\text{nm}}=1$ einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger DNA. Der Reinheitsgrad der Lösung wurde durch den Extinktionskoeffizienten E_{260}/E_{280} ermittelt, welcher bei höchstem Reinheitsgrad einen Quotienten von 1,8 ergibt.

Alternativ wurde die DNA Konzentration mit Hilfe des Nano DropTM (Pepqlab, Erlangen) bestimmt.

5.2.5 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

5.2.5.1 PCR Amplifikation von DNA Fragmenten

Mithilfe der PCR (Polymerase Chain Reaction) können DNA Sequenzen *in vitro* amplifiziert und modifiziert werden (Mullis und Faloona, 1987). Die entstandenen PCR-Produkte wurden für die Klonierung der hLGD- und Igd-Deletionskonstrukte verwendet. Des Weiteren wurden mittels PCR Genotypisierungen von Fliegen durchgeführt und rekombinante Bakterienklone identifiziert (s. Kap. 5.2.8.6 und Kap. 5.2.5.3).

Für die Klonierungen wurden entweder das Expand High Fidelity^{PLUS} PCR System von Roche oder die OneTaq von New England Biolabs verwendet. Für Genotypisierungen oder die Identifizierung rekombinanter Bakterienklone wurde die Crimson *Taq* DNA-Polymerase von New England Biolabs benutzt. Alle Reaktionsansätze wurden nach Herstellerangaben angesetzt.

Der PCR Reaktionsansatz wurde nach folgendem Zyklusprogramm amplifiziert (Tab. 5.16):

Tab. 5.16: PCR-Programm. Die Dauer der Kettenverlängerung ist abhängig von der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments. Die Kettenverlängerung wurde mit 1 Min pro 1kb Amplifikat berechnet.

Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Dauer [min]
Initiale Denaturierung	94	2
35 Zyklen:		
Denaturierung	94	0:30
Primeranlagerung	65	0:30
Kettenverlängerung	68	1-4
Finale Verlängerung	68	7

Um die Größe, Reinheit und Konzentration der spezifischen PCR-Produkte zu bestimmen, wurden die Ansätze anschließend mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt (s. Kap. 5.2.4.2).

5.2.5.2 SOE-PCR

Die SOE-PCR (Splice-Overlap-Extension) dient der Fusion zweier DNA-Fragmente, die um mindestens 30 bp überlappen (Ho et al., 1989). Diese Methode wurde zur Generierung der Deletionskonstrukte verwendet, wenn ein Bereich in der Mitte des Gens deletiert wurde. Dabei werden in einer ersten PCR-Reaktion mit den entsprechenden Oligonukleotiden zunächst zwei Einzelfragmente amplifiziert. Zur Depletion der eingesetzten Oligonukleotide wurden die PCR-Produkte mit Hilfe des „NucleoSpin Gel and PCR Clean-up“-Kits (Macherey-Nagel, Düren) aus dem Agarosegel gereinigt (Kapitel 5.2.5.1). Die Hybridisierung der DNA-Fragmente erfolgte in einem Zwischenschritt mithilfe der überlappenden Sequenzbereiche. Dazu wurden die DNA-Fragmente im gleichen molaren Verhältnis in einem PCR-Ansatz mit den zwei außen flankierenden Oligonukleotiden eingesetzt. Anschließend erfolgte die Amplifikation des Fusionsprodukts in einer PCR-Reaktion. In Abbildung 5.6 ist die SOE-PCR schematisch dargestellt.

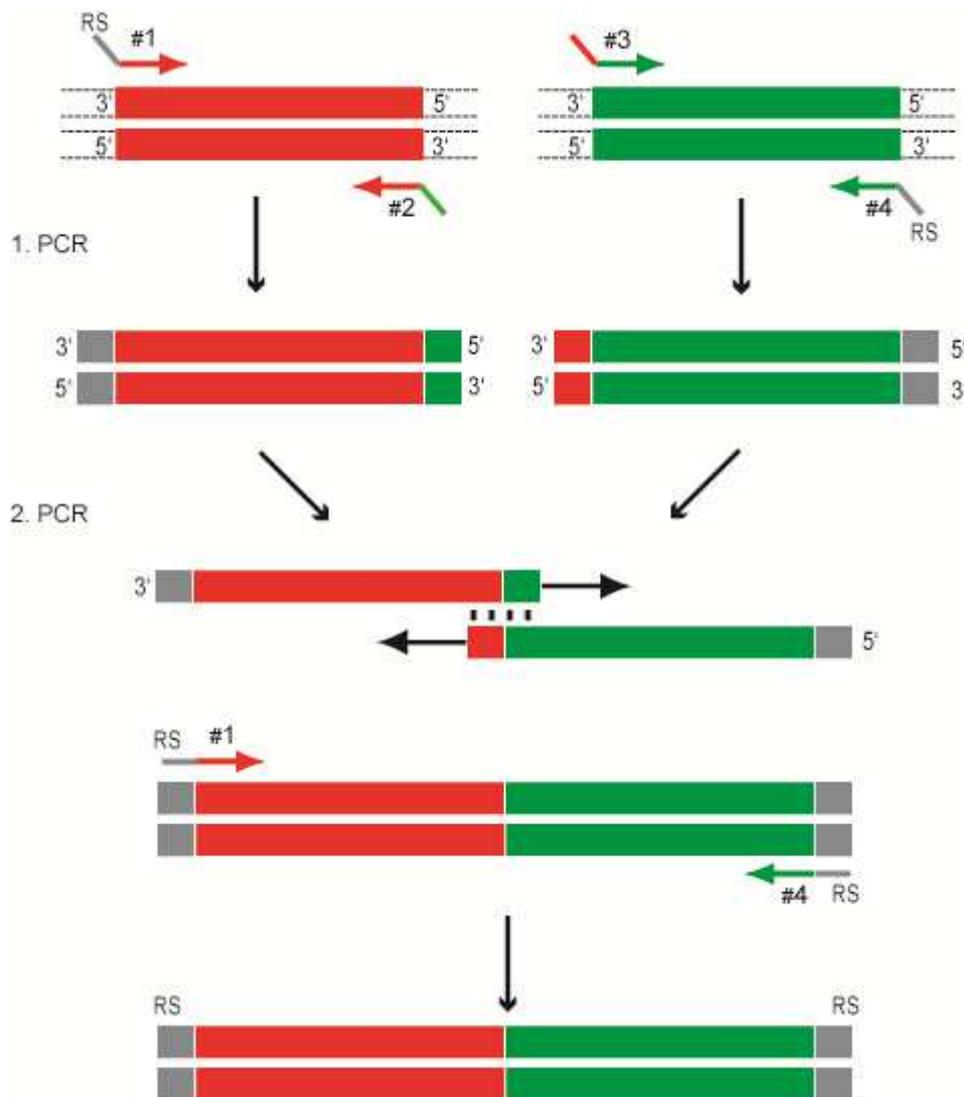


Abb. 5.6: SOE-PCR. Durch diese Methode konnten Deletionskonstrukte generiert werden, in denen Bereiche in der Mitte des Gens deletiert wurden. Dadurch konnten der Bereich N-Terminal (rot) und C-Terminal (grün) von der Deletionsstelle nahtlos aneinandergefügt werden. Die Produkte aus der 1. PCR beinhalten komplementäre Bereiche, welche durch die Primer angefügt wurden. Die komplementären Bereiche dienen in der 2. PCR als Primer für das Gesamtprodukt. Die so erzeugte Matrize wird mithilfe der Primer #1 und #4 amplifiziert. RS steht für eingefügte Restriktionsschnittstellen.

5.2.5.3 Identifikation rekombinanter Bakterienklone mittels Kolonie-PCR

Zur schnellen Identifikation rekombinanter Bakterienklone ohne Plasmidpräparation und Kontrollrestriktion wurde die direkte PCR-Analyse in Anlehnung an die für Hefen beschriebenen Methode eingesetzt (Jesnowski et al., 1995). Einzelne Bakterienkolonien wurden steril von den Agarplatten gepickt und in einem PCR-Ansatz mit 25 µl Gesamtvolumen resuspendiert. Anschließend erfolgte eine Standard PCR-Reaktion (s. Kap. 5.2.5.1) mit Insert-spezifischen Oligonukleotiden (s. Tab. 5.15). Die initiale Denaturierung (96°C, 4 min) diente dabei der Freisetzung der Plasmid DNA aus den Bakterien. Die Analyse des PCR-Reaktionsansatzes erfolgte mittels einer Agarosegelelektrophorese.

5.2.5.4 DNA-Sequenzierung

Um die Plasmid-DNA zu verifizieren wurde eine Sequenzierung durchgeführt. Dazu wurden 600-700 ng DNA mit 20 pmol Sequenzierungsprimer in einem Gesamtvolumen von 7 μ l zusammengefügt. Die Sequenzierung wurde von der Firma SeqLab (Göttingen) durchgeführt. Die Sequenzdaten wurden mit der systemeigenen Software aufgezeichnet und mit dem Programm VektorNTI AdvanceTM 10 (Invitrogen, Karlsruhe) ausgewertet.

5.2.6 Enzymkatalysierte Modifikation von DNA

5.2.6.1 DNA-Restriktion

Die verwendeten Enzyme spalten die DNA an definierten Schnittstellen, bei denen die DNA-Erkennungssequenz der Spaltstelle entspricht. Pro μ g DNA wurden 1-3 Units Restriktionsenzym eingesetzt. Eine Enzymeinheit (Unit) entspricht dabei der definierten Menge an Enzym, die in einer Stunde 1 μ g DNA bei der vorgegebenen Temperatur (meist 37°C), in 10 μ l Gesamtvolumen spaltet. DNA-Restriktionen fanden nach den Vorgaben des Herstellers (New England Biolabs, Ipswich, USA) in den mitgelieferten Puffern unter Einhaltung der jeweiligen optimalen Inkubationszeiten und Temperaturen statt. Die Restriktion mit zwei Enzymen erfolgte in einem Ansatz.

5.2.6.2 Dephosphorylierung von DNA

Wenn Konstrukte nur über eine Restriktionsschnittstelle in den Vektor inseriert werden, wurde der geschnittene Vektor zunächst am 5'-Ende dephosphoryliert. Damit wird bei der Ligation die Religation des Vektors verhindert. Nach der DNA Restriktion wurde einem 10 μ l Ansatz 1 μ l Phosphatase (CIAP) von Fermentas und 1,5 μ l 10x Phosphatasepuffer hinzugefügt. Der Ansatz wurde auf 15 μ l mit dH₂O aufgefüllt und für 30 Min. bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Phosphatase durch eine 15 minütige Inkubation bei 65°C inaktiviert. Danach erfolgte die Aufreinigung der DNA mittels einer Agarosegelelektrophorese.

5.2.6.3 Ligation restringierter DNA

Die Ligation isolierter DNA-Fragmente erfolgte mit Hilfe der T4-DNA-Ligase in dem vom Hersteller angegebenen Puffersystem (New England Biolabs, Ipswich, USA). Dabei wurde das DNA-Insert im dreifachen molaren Überschuß zum Vektor in einem Gesamtvolumen von 10 μ l eingesetzt. Der Reaktionsansatz (Tab. 5.17) wurde mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zur Transformation kompetenter Bakterien eingesetzt (s. Kap 5.2.1.2).

Tab. 5.17: Ligationsansatz.

Komponenten	Verwendetes Volumen
DNA-Gesamtmenge 100 ng (ein 3:1 molares Verhältnis der Vektor-DNA zur Insertions-DNA)	2-4 µl
10xLigationspuffer	1 µl
T4 DNA Ligase (1 U/µl)	1 µl
H ₂ O	4-6 µl
Gesamtvolumen	Σ 10 µl

5.2.7 Zellkultur

5.2.7.1 Allgemeine Kulturbedingungen

Die Durchführung aller Zellkulturarbeiten fand unter der Sterilbank HeraSafe Typ12 (Hareus Instruments, Hanau) statt. Die Zellen wurden im Inkubator Forma Steri-Cycle CO₂-Inkubator (Thermo Scientific, Waltham, USA) unter 5% CO₂-Versorgung bei 37°C und 95 bis 100%-iger Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Verwendung der Medien, Zusätze und Lösungen fand unter sterilen Bedingungen statt. Vor Gebrauch wurden die verwendeten Medien, sowie Wasch- und andere Lösungen auf 37°C vorgewärmt oder auf 4°C abgekühlt. Für die Kultivierung von Zelllinien wurde das Medium DMEM mit Phenolrot und (PAA, Pasching, A) verwendet. Die Zellkultur Medien wurden jeweils mit 10% fetalem Kälberserum (FCS, PAA, Pasching, A) und Penicillin-Streptomycin (50 U/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin; PAA, Pasching, A) versetzt.

5.2.7.2 Kryokonservierung von Zellen

Zur langfristigen Lagerung von Zelllinien wurden die Zellen sedimentiert (1000 x g, 5 min, RT), in 500 µl Kulturmedium aufgenommen und mit 500 µl 2x Gefriermedium versetzt. Die Zellsuspensionen wurden in thermostabilen Kryoröhrchen zunächst -80°C gelagert, und zur langfristigen Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

2x Gefriermedium:

80% FCS, 20% DMSO

5.2.7.3 Passage adhärenter Zellen durch Trypsinierung

Zur Passagierung adhärenter Zellen wurde der Zellkulturüberstand abgenommen, die Zellen einmal mit 10 ml PBS (137 mM NaCl, 2,6 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,4) gewaschen und mit 1x Trypsin-EDTA Lösung (Sigma, Deisenhofen)

überschichtet. Die enzymatische Reaktion erfolgte durch eine 1-5 minütige Inkubation der Zellkulturen bei 37°C, die sich so von der Kulturschalenoberfläche ablösten. Anschließend wurden die abgelösten Zellen in 5 ml Kulturmedium aufgenommen, welches ein Abstoppen der Trypsin-Aktivität zur Folge hatte. Die Passage der Zellen erfolgte je nach Zelllinie nach einem individuellen Verdünnungsfaktor.

5.2.7.4 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen wie in Kapitel 5.2.7.3 beschrieben trypsinisiert und das Zellsediment nach Zentrifugation in 1 ml Medium aufgenommen.

Diese Suspension wurde 1:100 verdünnt und 10 µl auf eine Neubauer Zählkammer gegeben. Nach Auszählung von vier Quadranten wurde der Mittelwert gebildet und mit der Verdünnung und 10^4 multipliziert, da das Volumen des Hauptquadrants 10^{-4} ml beträgt. Das Ergebnis entspricht der Zellzahl pro Milliliter.

Zellzahl/ml = Zellzahl x Verdünnungsfaktor (100) x Kammerfaktor (10^4)

5.2.7.5 Transfektion humaner Zellen mittels Lipofektion

Bei der Lipofektion wird die Plasmid-DNA mit Hilfe von fein verzweigten Trägermolekülen eingeschlossen, deren positiv geladene Amino-Gruppen die DNA umschließen und die Passage durch die Zellmembran erleichtern (Felgner et al., 1987).

Zur Transfektion eukaryotischer Zellen wurde das Lipofectamine[®]2000 Reagenz (Life Technologies, Darmstadt) verwendet, das in serumfreiem Kulturmedium die Plasmid-DNA komplexiert. Der DNA-Lipofectamine-Komplex bindet an negativ geladene Rezeptoren, bevorzugt Glykoproteine, der eukaryotischen Zelle und ermöglicht so die Endocytose in ein von einer einschichtigen Membran umhülltes Lysosom. Das alkalische Lipofectamine-Reagenz wirkt bei pH<5 als Puffer-Substanz und erhöht den pH-Wert des Lysosomenkompartiments, so dass lysosomale Nukleasen erfolgreich inhibiert werden. Jeweils 4×10^5 Zellen wurden 24 Stunden vor der Transfektion in 500 µl Kulturmedium (DMEM, 10% FCS) pro 200 mm² Vertiefung einer 24-Well Kulturplatte ausgesät und über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Pro Transfektionsansatz wurde 0,8 µg Plasmid-DNA in 25 µl OptiMEM verdünnt, getrennt davon wurde 1 µl Lipofectamine-Reagenz mit 25 µl OptiMEM vermischt. Beides wurde für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zusammengefügt und vermischt. Die Komplexbildung fand bei 20 minütiger Inkubation des Ansatzes bei Raumtemperatur statt. Anschließend wurde der Transfektionsansatz tropfenweise zu den kultivierten Zellen in 500 µl Kulturmedium gegeben.

5.2.7.6 Antikörperfärbung humaner Zellen

Um die Proteine in den Zellen mit Antikörpern detektieren zu können, wurden zunächst 4×10^5 Zellen auf einer 24 well-Platte ausgesät (s. Kap. 5.2.7.4). Da die Zellen in der 24-well Platte nicht unter dem Mikroskop untersucht werden können, wurde in die Vertiefung der 24-well Platte ein Glasdeckgläschen gegeben auf dem die Zellen wachsen konnten. Je nach Versuchsansatz wurden die Zellen nach 24h transfiziert (s. Kap. 5.2.7.5) oder direkt für die Antikörperfärbung vorbereitet. Alle Antikörperfärbungsschritte fanden auf dem Schwenker statt und alle Waschschriffe erfolgten in 1xPBS für 5 Minuten bei Raumtemperatur. Zunächst wurde das Medium entfernt und die Zellen gewaschen, damit die restlichen Mediumrückstände entfernt wurden. Anschließend wurden die Zellen mit 200 μ l 4 % Paraformaldehyd (PFA) für 10 Minuten bei RT fixiert. Um das PFA zu entfernen, folgten erneut drei Waschschriffe. Um die Zellen zu Permeabilisieren, wurden sie für 10 Minuten in PBS mit 0,3% Triton bei RT geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen wieder dreimal gewaschen. Danach wurden die Zellen in 10% Blockierlösung für 30 Minuten bei Raumtemperatur geblockt. Die Zellen wurden über Nacht bei 4°C in 200 μ l Färbelösung mit dem Primärantikörper inkubiert. Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper wurden die Zellen wieder dreimal gewaschen. Im Anschluss wurde der Sekundärantikörper in 200 μ l Färbelösung auf die Zellen gegeben und für 1h bei RT inkubiert. Danach wurde der Sekundärantikörper dreimal heruntergewaschen. Die Kernfärbung erfolgte durch eine DAPI- Färbung der Zellen. Dabei wurde DAPI 1:333 (100 μ g/ml, 0,18M Tris-HCl pH 7,5) in PBS verdünnt und die Zellen damit für 1h bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen wieder dreimal gewaschen. Zum Schluss erfolgte die Einbettung in VectaShield, wobei das Deckglas vorsichtig aus der 24-well Platte genommen wurde und umgedreht auf einen Objektträger mit einem kleinen Tropfen VectaShield abgelegt wurde. Die Objektträger wurden danach bei 4°C gelagert.

10% Blockierlösung in PBS:

0,1 % Tween-20; 10 % NGS; 0,3 M Glycin

Färbelösung in PBS:

0,1 % Tween-20; 1,5 % NGS

5.2.8 *Drosophila melanogaster*

5.2.8.1 Fliegenanzucht und Haltung

Die Fliegen wurden in zylindrischen Plastikröhrchen gehalten, welche zu einem Drittel mit Futtermedium gefüllt waren und mit einem Schaumstoffstopfen verschlossen wurden. Die Haltung der Fliegen erfolgte bei 18°C bzw. Raumtemperatur. Kreuzungen wurden auf 25°C durchgeführt. Dazu wurden jungfräuliche Weibchen mit Männchen in einem Verhältnis von ungefähr 1:4 miteinander verpaart.

Futtermedium (20 Liter):

100 g Agar; 1,4 kg Maismehl; 336 g Trockenhefe; 190 g Sojamehl; 900 g Malzextrakt; 800 g Zuckerrübensirup; 90 ml Propionsäure; 30 g Napaginpulver

5.2.8.2 Verwendete Fliegenstämme

In Tabelle 5.18 sind die in dieser Arbeit eingesetzten Fliegenstämme aufgelistet. Sofern nicht anders angegeben wurden die Fliegenstämme in dieser Arbeit hergestellt.

Tab. 5.18: Auflistung der verwendeten Fliegenstämme

Genotyp	Referenz
<i>w; If/CyO^{wg-lacZ}; MKRS/TM6b</i>	Frank Sprenger wg-lacZ: (Kassis et al., 1992)
<i>w; If;+/SM6a-TM6b</i>	Thomas Klein
<i>w; Igd^{d7} FRT40A/ CyO^{wg-lacZ}; MKRS/TM6b</i>	(Gallagher und Knoblich, 2006)
<i>w; Igd^{d7} FRT40A; Gbe+Su(H)-lacZ/SM6aTM6b</i>	Gbe+Su(H)-lacZ: (Furriols und Bray, 2001)
<i>w; Igd^{d7}, shrub⁴⁻¹; Gbe+Su(H)-dsRed/SM6aTM6b</i>	Nadja Ohlenhard, Thomas Klein
<i>w; ptcGAL4; tub Rab5-CFP, tub Rab7-YFP/ SM6a-TM6b</i>	tub Rab5-CFP, tub Rab7-YFP: (Marois et al., 2006) ptcGAL4: (Speicher et al., 1994)
<i>w; If/CyO^{wg-lacZ}; IgdP hlgd1-HA attP86Fb/TM6b</i>	
<i>w; If/CyO^{wg-lacZ}; IgdP hlgd1ΔDM14-HA attP86Fb/ TM6b</i>	Jochen Steinbring (Bachelorarbeit, 2011)
<i>w; If/CyO^{wg-lacZ}; IgdP hlgd1ΔDM14(1-2)-HA attP86Fb/ TM6b</i>	
<i>w; If/CyO^{wg-lacZ}; IgdP hlgd1ΔDM14(3-4)-HA attP86Fb/ TM6b</i>	
<i>w; If/CyO^{wg-lacZ}; IgdP hlgd1ΔC2-HA attP86Fb/ TM6b</i>	
<i>w; If/CyO^{wg-lacZ}; IgdP HA- hlgd1DM14(1-3) attP86Fb/ TM6b</i>	Kristina Scheider (Bachelorarbeit, 2012)
<i>w; If/CyO^{wg-lacZ}; IgdP HA- hlgd1^{MR} attP86Fb/ TM6b</i>	
<i>w; If/CyO^{wg-lacZ}; IgdP hlgd2-HA attP86Fb/ TM6b</i>	
<i>w; If/CyO^{wg-lacZ}; IgdP hlgd2ΔC815-HA attP86Fb/ TM6b</i>	
<i>w; If/CyO^{wg-lacZ}; IgdP hlgd2ΔDM14-HA attP86Fb/ TM6b</i>	Jochen Steinbring (Bachelorarbeit, 2011)
<i>w; If/CyO^{wg-lacZ}; IgdP hlgd2ΔC2-HA attP86Fb/ TM6b</i>	

Fortsetzung Tabelle 5.18

Genotyp	Referenz
<i>w; If/CyO^{wg-lacZ}; IgdP HA-hlgd2DM14(1-3) attP86Fb/TM6b</i>	
<i>w; If/CyO^{wg-lacZ}; IgdP HA-hlgd2^{MR} attP86Fb/TM6b</i>	
<i>w; If/CyO^{wg-lacZ}; IgdP HA- IgdDM14(1-3) attP86Fb/TM6b</i>	Kristina Scheider (Bachelorarbeit, 2012)
<i>w; If/CyO^{wg-lacZ}; IgdP HA- Igd^{MR} attP86Fb/TM6b</i>	Kristina Scheider (Bachelorarbeit, 2012)
<i>w; If/CyO^{wg-lacZ}; UAS hlgd1-HA attP86Fb/TM6b</i>	
<i>w; If/CyO^{wg-lacZ}; UAS hlgd1ΔDM14-HA attP86Fb/TM6b</i>	Jochen Steinbring (Bachelorarbeit, 2011)
<i>w; If/CyO^{wg-lacZ}; UAS hlgd1ΔC2-HA attP86Fb/TM6b</i>	
<i>w; If/CyO^{wg-lacZ}; UAS HA- hlgd1DM14(1-3) attP86Fb/TM6b</i>	Kristina Scheider (Bachelorarbeit, 2012)
<i>w; If/CyO^{wg-lacZ}; UAS HA- hlgd1^{MR} attP86Fb/TM6b</i>	
<i>w; If/CyO^{wg-lacZ}; UAS hlgd2-HA attP86Fb/TM6b</i>	
<i>w; If/CyO^{wg-lacZ}; UAS hlgd2ΔC815-HA attP86Fb/TM6b</i>	
<i>w; If/CyO^{wg-lacZ}; UAS hlgd2ΔDM14-HA attP86Fb/TM6b</i>	Jochen Steinbring (Bachelorarbeit, 2011)
<i>w; If/CyO^{wg-lacZ}; UAS hlgd2ΔC2-HA attP86Fb/TM6b</i>	
<i>w; If/CyO^{wg-lacZ}; UAS HA-hlgd2DM14(1-3) attP86Fb/TM6b</i>	
<i>w; If/CyO^{wg-lacZ}; UAS HA-hlgd2^{MR} attP86Fb/TM6b</i>	
<i>w; If/CyO^{wg-lacZ}; UAS HA- IgdDM14(1-3) attP86Fb/TM6b</i>	Kristina Scheider (Bachelorarbeit, 2012)
<i>w; If/CyO^{wg-lacZ}; UAS HA- Igd^{MR} attP86Fb/TM6b</i>	Kristina Scheider (Bachelorarbeit, 2012)
<i>w; Igd^{d7} FRT40A; IgdP hlgd1-HA attP86Fb/SM6a-TM6b</i>	
<i>w; Igd^{d7} FRT40A; IgdP hlgd1ΔDM14-HA attP86Fb/SM6a-TM6b</i>	Jochen Steinbring (Bachelorarbeit, 2011)
<i>w; Igd^{d7} FRT40A; IgdP hlgd1ΔDM14(1-2)-HA attP86Fb/SM6a-TM6b</i>	
<i>w; Igd^{d7} FRT40A; IgdP hlgd1ΔDM14(3-4)-HA attP86Fb/SM6a-TM6b</i>	
<i>w; Igd^{d7} FRT40A; IgdP hlgd1ΔC2-HA attP86Fb/SM6a-TM6b</i>	

Fortsetzung Tabelle 5.18

Genotyp	Referenz
<i>w; Igd^{d7} FRT40A; IgdP HA-hlgd1DM14(1-3) attP86Fb/ SM6a- TM6b</i>	Kristina Scheider (Bachelorarbeit, 2012)
<i>w; Igd^{d7} FRT40A; IgdP HA-hlgd1^{MR} attP86Fb/ SM6a- TM6b</i>	
<i>w; Igd^{d7} FRT40A; IgdP hlgd2-HA attP86Fb/ SM6a- TM6b</i>	
<i>w; Igd^{d7} FRT40A; IgdP hlgd2ΔC815-HA attP86Fb/ SM6a- TM6b</i>	
<i>w; Igd^{d7} FRT40A; IgdP hlgd2ΔDM14-HA attP86Fb/ SM6a- TM6b</i>	Jochen Steinbring (Bachelorarbeit, 2011)
<i>w; Igd^{d7} FRT40A; IgdP hlgd2ΔC2-HA attP86Fb/ SM6a- TM6b</i>	
<i>w; Igd^{d7} FRT40A; IgdP HA-hlgd2DM14(1-3) attP86Fb/ SM6a- TM6b</i>	
<i>w; Igd^{d7} FRT40A; IgdP HA-hlgd2^{MR} attP86Fb/ SM6a- TM6b</i>	
<i>w; Igd^{d7} FRT40A; IgdP HA- IgdDM14(1-3) attP86Fb/ SM6a- TM6b</i>	Kristina Scheider (Bachelorarbeit, 2012)
<i>w; Igd^{d7} FRT40A; IgdP HA- Igd^{MR} attP86Fb/ SM6a- TM6b</i>	Kristina Scheider (Bachelorarbeit, 2012)

5.2.8.3 Herstellung transgener Fliegen

Da bei der Analyse der Deletionskonstrukte Positionseffekte vermieden werden sollten, wurde das attB/attP System für die Transgenese verwendet (Bischof et al., 2007).

Das attB/attP System beruht darauf, dass durch ein M-Element (Mariner (M) Transposon M{3x P₃ RFPattP}) Integrationsstellen ins Genom integriert wurden und der Insertionsort anschließend bestimmt wurde. Es sind mehrere Insertionsorte für jedes Chromosom vorhanden. Des Weiteren wird eine ΦC-31 Integrase für die stabile Integration der Transgene in das Genom benötigt. Dazu wurde die ΦC-31 Integrase stabil in die attPsite 2A in das Genom integriert unter der Kontrolle des vasa Promotors, welcher in der Keimbahn aktiv ist (Bischof et al., 2007).

Alle Konstrukte wurden in die attP86Fb Insertionsstelle integriert, welche auf dem dritten Chromosom rechts lokalisiert ist (s. Abb. 5.7A). Der Fliegenstamm, in den injiziert wurde, enthält somit die ΦC-31 Integrase in attPZH2A auf dem X-Chromosom im *y w* Hintergrund und die gewünschte Insertionsstelle attP86Fb.

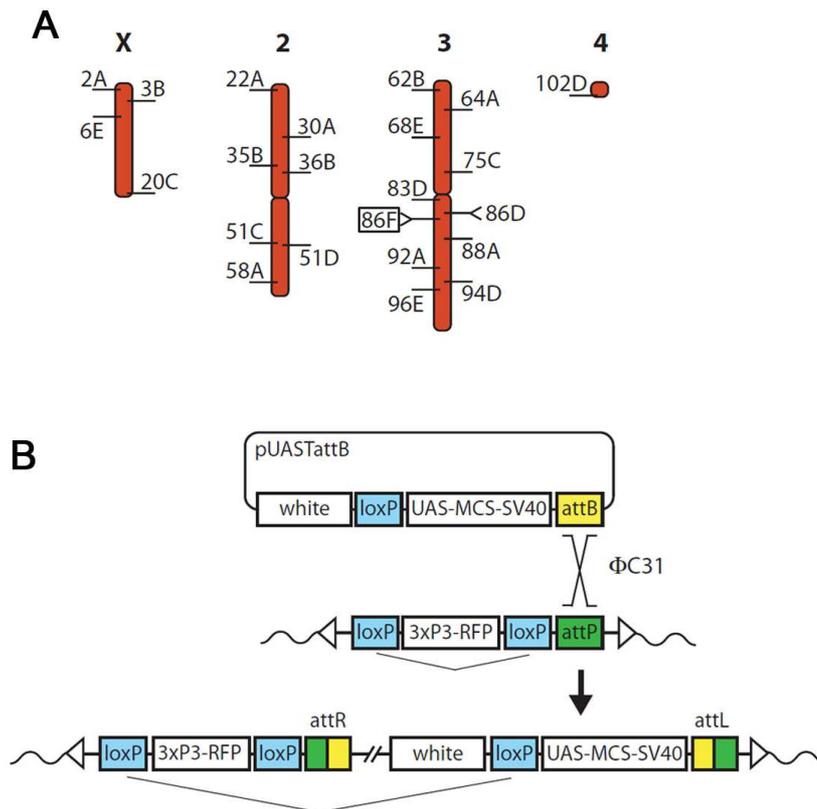


Abb. 5.7: Schematische Darstellung der attP Integrationsstellen sowie des Integrationsmechanismus des pUASTattB in die Integrationsstelle. A: schematische Darstellung aller vier Chromosomen in denen die möglichen Integrationsstellen eingezeichnet sind. Der Insertionsort (attP86Fb), welcher in dieser Arbeit verwendet wurde, wurde eingrahmt. B: Der pUASTattB Vektor enthält ein 285 bp großes attB Fragment, sowie das *white*⁺ Gen, eine UAS-MCS-SV40 Kasette und eine einzelne loxP Stelle. Die Integration des Vektors ins Genom erfolgt durch die Φ C-31 Integrase, welche die Rekombination zwischen der attB und attP Stelle vermittelt (Bischof et al., 2007).

Die Integrationsereignisse zeigen sich in der folgenden Generation. Durch den Selektionsmarker *w*⁺ erfolgt die Identifikation der stabilen Integrationsereignisse anhand der roten Augenfarbe. Die Stärke der Augenfarbe ist vom Insertionsort abhängig. Der Insertionsort attP86Fb zeigt eine wildtypisch rote Augenfarbe (Bischof et al., 2007). In Abb. 5.7B wurde der Integrationsmechanismus beispielhaft am pUASTattB- Vektor schematisch dargestellt.

Bevor die DNA in die Embryonen injiziert werden konnte, wurden Embryonen aus einer bis zu 30 minütigen Ablage, mit einer Chlorix-Wasser-Mischung (1:1) für 1 Minute dechorionisiert. Die Mischung wurde danach durch einminütiges intensives Waschen mit Leitungswasser entfernt. Die Embryonen wurden dann auf einem Apfelsaftagarblöcken aufgereiht und auf ein mit Heptan-Kleber bestrichenes Deckgläschen übertragen. Die anschließende Trocknung der Embryonen erfolgte im Exsikator auf Silikagel für 5-11 Minuten. Danach wurden die Embryonen mit 10S Voltalev-Öl überschichtet und das Deckglas wurde auf einem Objektträger positioniert. Die Injektion erfolgte in den posterioren Pol der Embryonen mittels einer

Microinjektionsvorrichtung. Die Injektionsnadel wurde zuvor mit 0,7 µl Injektionsmischung beladen. Zu alte Embryonen, die die schon beginnende Zellularisierung zeigten, wurden entfernt. Nach der Injektion wurde das Deckgläschen in eine Schale überführt und mit 3S Voltalev-Öl überschichtet, um ein Austrocknen der Embryonen zu verhindern. Die injizierten Embryonen wurden über Nacht bei 25°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Am nächsten Tag wurden die schlüpfenden Larven aufgesammelt und in einer kleinen Menge frischer Hefe in ein Futterröhrchen überführt. Die geschlüpften Fliegen wurden gegen den Multibalancer-Stamm w^+ ; $lf/CyO^{wg-lacZ}$; MKRS/TM6b ausgekreuzt und transgene Fliegen wurden nach einer erneuten Kreuzung gegen den Multibalancer-Stamm über w^+ ; $lf/CyO^{wg-lacZ}$; X/TM6b etabliert.

Injektionsmix (10 µl):

400 ng/µl Plasmid- DNA; 1 µl 10x Injektionspuffer; 1 µl 2% Phenolrot

10x Injektionspuffer:

1 mM Na-Phosphatpuffer pH 6, 8; 50 mM KCL

5.2.8.4 Das GAL4/UAS System

Das GAL4/UAS System wird dazu genutzt, um Gene Gewebe- und entwicklungspezifisch anzuschalten (Brand und Perrimon, 1993); (Phelps und Brand, 1998).

Der Treiberstamm besteht aus dem Transkriptionsaktivator GAL4, welcher unter einem endogenen Promotor exprimiert wird. Durch die Wahl des Promotors kann die Expressionsdomäne, bzw der Zeitpunkt bestimmt werden, an dem das Transgen exprimiert werden soll. GAL4 wird je nach Promotor die ganze Zeit gebildet. Das Transgen kann allerdings erst abgelesen werden, wenn neben dem GAL4 auch eine UAS („upstream activating sequence“) anwesend ist. Die UAS besitzt spezifische Bindungsstellen für das GAL4. Da dieses System aus der Hefe stammt, gibt es kein endogenes UAS in der Fliege und die Expression von GAL4 alleine kann keine Transkription aktivieren.

Der Effektorstamm besteht aus einer UAS mit einem Basalpromotor, welche vor dem Gen von Interesse inseriert sind. Das Transgen wird nur in Anwesenheit von GAL4 aktiviert. Um die Transkription des Transgens zu aktivieren, wird der Treiberstamm mit dem Effektorstamm gekreuzt. Dann kann das gebildete GAL4 an die UAS binden und die Expression des Transgens aktivieren (s. Abb. 5.8).

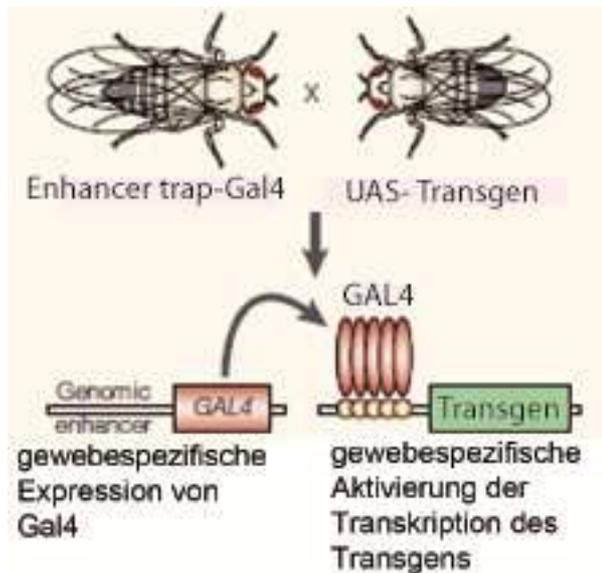


Abb. 5.8: Schematische Darstellung des GAL4/UAS-Systems. Durch die Kreuzung des Treiberstamms gegen den Effektorstamm, kann das GAL4 gewebe- und entwicklungsspezifisch exprimiert werden. Dieses kann nun an seine DNA-Bindungsstelle UAS binden und dadurch kann das Transgen transkribiert werden (modifiziert nach Muqit und Feany, 2002).

5.2.8.5 Der Notch Reporter Gbe+Su(H)

Der Notchreporter Gbe+Su(H) kann dazu verwendet werden in der Flügelimaginalscheibe die Aktivität des Notch- Signalweges nachzuweisen (Furriols und Bray, 2001).

Das Reporterkonstrukt besteht aus drei aufeinander folgenden Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor Grainyhead (Gbe= Grainyhead binding element). Daran schließen sich zwei Bindungsstellen für Su(H) und ein Minimalpromotor an. Zum Schluss folgt noch das Markergen, wie z. B. lacZ oder dsRed (s. Abb. 5.9) (Furriols und Bray, 2001).

Su(H) kann sowohl als Repressor als auch als Aktivator fungieren, je nachdem welchen Co-Faktor es gebunden hat (Furriols und Bray, 2000; Morel und Schweisguth, 2000). So unterdrückt Su(H) die ubiquitäre Expression von Gbe solange es keinen Aktivator gebunden hat. Wenn allerdings die NICD anwesend ist, verdrängt dies den Co-Repressor von Su(H) und die NICD kann an Su(H) binden und somit die Transkription des Markergens starten.

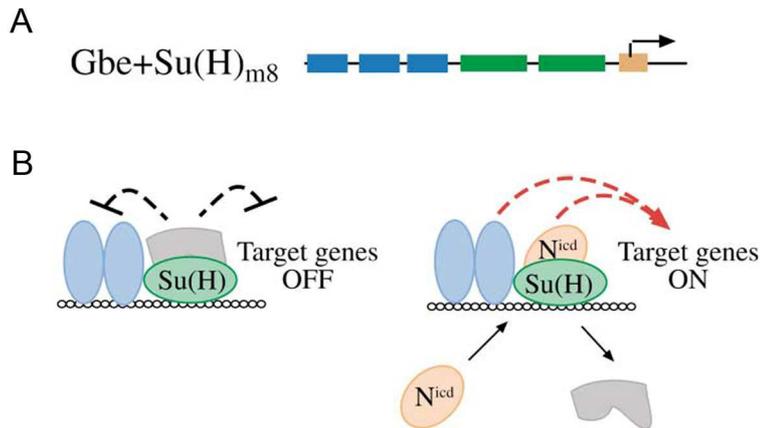


Abb. 5.9: Schematische Darstellung des Notch-Reportergenkonstruktes Gbe+Su(H) sowie der Mechanismus seiner Aktivierung. A: Der genomische Bereich besteht aus drei Bindestellen des Transkriptionsfaktors Grainyhead, Gbe (blau). Darauf folgen zwei Su(H) Bindestellen (grün) sowie der hsp70 Promotor (orange). B: Ist die NICD abwesend bindet an Su(H) (grün) ein Co-Repressor (grau). Dadurch wird die Expression des Markergens verhindert, obwohl der Aktivator Grainyhead (blau) gebunden hat. Sobald die die NICD (orange) an Su(H) bindet, wird der Repressor verdrängt und das Markergen aktiviert (Furriols und Bray, 2001).

5.2.8.6 Genomische DNA-Isolierung aus adulten Fliegen

Zur DNA-Isolation wurden zunächst circa 30 adulte Fliegen in einem Reaktionsgefäß gesammelt und bei -20°C bis zur Unbeweglichkeit betäubt. Danach wurden $200\ \mu\text{l}$ Puffer A hinzugefügt und die Fliegen mit einem Stößel homogenisiert. Danach wurden noch mal $200\ \mu\text{l}$ Puffer A hinzugegeben und die Fliegen solange weiter homogenisiert bis nur noch die Kutikulae zu sehen waren. Dieser Schritt sollte nicht länger als 5 Minuten dauern. Anschließend wurden die homogenisierten Fliegen bei 65°C für 30 Minuten inkubiert. Danach wurden $800\ \mu\text{l}$ LiCl/KAc-Lösung dazugegeben und für 10 Min erfolgte eine Inkubation auf Eis. Anschließend wurde die DNA von den restlichen Zellbestandteilen durch Zentrifugation bei $13000\ \text{rpm}$ für 15 Minuten bei Raumtemperatur getrennt. Der Überstand, welcher die DNA enthielt, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und danach erfolgte eine Fällung der DNA. Dazu wurden $600\ \mu\text{l}$ Isopropanol hinzugefügt, dies wurde kurz gemischt und dann bei $13000\ \text{rpm}$ für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Anschließend wurden $700\ \mu\text{l}$ 70%iger Ethanol dazugegeben und wiederum für 5 Minuten bei $13000\ \text{rpm}$ zentrifugiert. Das Pellet enthielt die DNA und der Überstand wurde verworfen. Die DNA wurde bei 37°C im Heizblock für 20-30 Minuten getrocknet. Zum Schluss wurde die DNA in $150\ \mu\text{l}$ dH_2O aufgenommen und erst bei 65°C für 10 Minuten und dann bei 4°C über Nacht resuspendiert. Die Lagerung der DNA erfolgte auch bei 4°C .

Puffer A:

100 mM Tris HCl (pH 7,5); 100 mM EDTA; 100 mM NaCl; 0,5% SDS

LiCl/KAc-Lösung:

$250\ \mu\text{l}$ 5M KAc; $625\ \mu\text{l}$ 6M LiCl (1:2,5)

5.2.8.7 Präparation und Antikörperfärbung von Flügelimaginalscheiben

Es wurden Larven des späten zweiten bis dritten Larvenstadiums für die Antikörperfärbung präpariert. Dazu wurden die Flügelimaginalscheiben in den Larven in 1x PBS freipräpariert, indem die Larven auseinandergerissen, der vordere Teil umgestülpt, der Darm und das Fett entfernt wurden. Die präparierten Larven wurden in ein Siebchen gegeben, welches in einer 24-Loch-Platte platziert wurde. Darin fanden alle weiteren Schritte statt, die falls nicht anders angegeben bei Raumtemperatur auf dem Schwenker, zur besseren Durchmischung, durchgeführt wurden. Für alle Waschschrte wurde PBT verwendet.

Nachdem das PBS entfernt wurde, wurden die Larven in 4% Paraformaldehyd (PFA) für 30 Minuten fixiert. Danach erfolgten drei Waschschrte für je 10 Minuten. Um alle unspezifischen Proteinbindungsstellen abzusättigen, wurden die Larven in 5% „normal goat serum“ (NGS) in PBT für mindestens 30 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation der Larven in dem primären Antikörper in 5% NGS in PBT für 90 Minuten. Danach wurde der Antikörper in drei Waschungen für je 15 Minuten heruntergewaschen. Dann wurden die Larven mit dem Sekundärantikörper, der gegen den primären Antikörper gerichtet ist, für 60 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgten zwei zehnmütige Waschschrte und eine viermütige Färbung der DNA mittels Hoechst (1:10.000). Danach wurden die Larven noch zweimal für je 10 Minuten gewaschen. Zum Schluss wurden die Larven in ein Blockschälchen mit PBS überführt und die Flügelimaginalscheiben von den Larven abgetrennt, diese auf einen Objektträger mit einem kleinen VectaShield Tropfen überführt und mit einem Deckglas abgedeckt. Die Präparate wurden mikroskopisch analysiert und bei 4°C im Dunkeln gelagert.

10x PBS:

1,37 M NaCl; 27 mM KCl; 100 mM Na₂HPO₄; 20 mM KH₂PO₄; pH 7,4

PBT:

0,3% Triton-X 100 in PBS

5.2.8.8 Dokumentation der Fluoreszenzaufnahmen

Die Flügelimaginalscheiben wurden immer in folgender Orientierung dargestellt: anterior/links, posterior/rechts, dorsal/oben, ventral/unten. Die Übersichtsaufnahme der gesamten Flügelimaginalscheibe erfolgte mit dem 10x Objektiv, die Übersicht des Flügelfeldes mittels des 25x Objektivs und die Detailaufnahme mittels des 63x Objektivs.

Die Übersicht der Säugetierzellen erfolgte mittels des 63x Objektivs. Daraus wurde eine Vergrößerung mittels Photoshop erstellt. In der Übersicht wurde die Stelle, welche vergrößert wurde mit einem weißumrandeten Rechteck markiert. Ein Maßstabsbalken befindet sich immer im ersten Bild einer Zeile oder Spalte der Kollage. Die Kollagen wurden mit Photoshop erstellt.

5.2.9 Proteinbiochemische Methoden

5.2.9.1 Herstellung von Proteinlysaten

Proteinlysatherstellung aus *Drosophila melanogaster*

Um Proteine im Western Blot detektieren zu können, wurden sie aus *Drosophila melanogaster* L3 Larven isoliert. Dazu wurden die Larven in 1x PBS in einem Blockschälchen auseinandergerissen, dann umgestülpt und der Darm und das Fett entfernt. Die freipräparierten Larven wurden in einem Blockschälchen mit PBS auf Eis gesammelt. Anschließend wurden 2 µl Lysispuffer pro Larve in ein Reaktionsgefäß vorgelegt. Die Larven wurden möglichst vollständig vom PBS befreit und in den vorbereiteten Lysispuffer gegeben. Danach wurden die Larven mit einem Homogenisator 2-3 Minuten lang zerquetscht. Das Gemisch wurde im Anschluss für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Zum Schluss wurden die Proteine von den restlichen Bestandteilen durch Zentrifugation bei 20.000 x g für 15 Minuten bei 4°C getrennt und der Überstand mit den Proteinen wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Lagerung der Proteine erfolgte bei -72°C.

Proteinlyse- Puffer:

10% Glycerol; 50 mM HEPES pH 7,5; 150 mM NaCl; 1,5 mM MgCl₂; 0,5% Triton X-100; 1 mM EGTA

Vor Gebrauch werden PMSF und Protease-Inhibitor-Cocktail je 1: 200 hinzugegeben.

Isolierung des Proteinlysats aus humanen Zellen

Um die Proteine aus humanen Zellen isolieren zu können, wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und anschließend wurde der Proteinlyse Puffer hinzugefügt. Bei einer 24- well Platte wurde 150 µl Lysispuffer pro Vertiefung hinzugegeben, bei einer 25 cm² Zellkulturflasche wurden die Zellen in 500 µl Lysispuffer lysiert. Danach wurden die Zellen für 30 Minuten auf dem Schwenker bei 4°C inkubiert. Die lysierten Zellen wurden danach in ein Reaktionsgefäß überführt und für 20 Minuten bei 20.000 x g und 4°C zentrifugiert, um die Proteine von den restlichen Zellbestandteilen zu trennen. Der Überstand, welcher die Proteine enthält, wurde zum Schluss in ein neues Reaktionsgefäß gegeben und bei -72°C gelagert.

Proteinlyse Puffer:

10 mM Tris-HCl (pH8,0); 1 mM EDTA; 2,5% SDS

Vor Gebrauch werden PMSF und Protease-Inhibitor-Cocktail je 1: 200 hinzugegeben.

5.2.9.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Westernblot-Analyse

Bevor die Proteine elektrophoretisch aufgetrennt werden konnten, wurden sie mit 4x Lämmli-Puffer versetzt und für 10 Minuten bei 95°C aufgeköcht. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte mithilfe von 10-15%-ige Polyacrylamidgelen. Die Proteine wurden bei 80-100V im Sammelgel gesammelt und anschließend bei 160-180V im Trenngel aufgetrennt.

Das Gel wurde anschließend je nach Fragestellung des Versuchs entweder mit Coomassie gefärbt (s. Kap. 5.2.9.4) oder für einen Westernblot verwendet.

Für einen Westernblot wurde die PVDF (*polyvinylidene difluoride*) -Membran vor dem Transfer der Proteine für mindestens 5 Minuten in Methanol eingelegt. Der Transfer der Proteine erfolgte durch einen Semi-dry- Blot auf die Membran bei 10V konstant für 1-1,5h, je nachdem ob ein oder zwei Gele transferiert wurden. Nach dem Transfer wurde die Membran für 1h bei RT in 5% Milchpulver/PBS inkubiert, um unspezifische Proteinbindungsstellen abzusättigen. Danach wurde die Membran in 2% Milchpulver/PBS mit dem primären Antikörper über Nacht bei 4°C inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran dreimal für je 15 Minuten mit PBT (0,2% Tween-20 in PBS) gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Der HRP gekoppelte Sekundärantikörper wurde in 2% Milchpulver/PBS verdünnt und für 1h bei Raumtemperatur auf die Membran gegeben. Dann erfolgten wieder drei Waschschritte für 15 Minuten bei Raumtemperatur in PBT. Die Detektion der Proteine erfolgte mithilfe einer ECL-Reaktion auf einem Röntgenfilm.

10x Elektrophoresepuffer (für 1 Liter):

144 g Glycin; 30,3 g Tris; 10 g SDS

4x Laemmli Puffer:

8% SDS; 400 mM DTT; 240 mM Tris HCL (pH 6,8); 0,004% Bromphenolblau; 40% Glycerol

Transferpuffer:

250mM Tris und 1,5M Glycin pH8,3, 10-20% MeOH, 0,0375% SDS

5.2.9.3 Entfernen der gebundenen Antikörper von der Westernblotmembran

Damit Proteine, die ungefähr gleich groß sind, in einem Westernblot detektiert werden können, musste der zuerst gebundene Antikörper wieder von der Membran entfernt werden. Dazu wurde die Membran in der „Stripping“-Lösung für 30 Minuten bei 50°C unter leichtem Schütteln im Wasserbad inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran dreimal für 10 Minuten in PBT (0,2% Tween-20 in PBS) gewaschen. Um zu überprüfen, ob das Entfernen der Proteine erfolgreich war, wurde die Membran vor der Weiterbehandlung einmal entwickelt. Danach wurde die Membran in 5% Milchpulver/PBS für 1h bei Raumtemperatur geblockt und anschließend konnte die Immunodetektion weiter nach Protokoll fortgeführt werden.

„Stripping“- Lösung (für 100 ml):

700 µl 2- Mercaptoethanol (14, 2 M); 20 ml 10% SDS; 6,25 ml 1M Tris-HCl (pH 6,8)

5.2.9.4 Coomassie-Färbung

Zur Visualisierung der Proteine im SDS-Polyacrylamidgel wurde das Gel über Nacht bei Raumtemperatur in der Coomassie Färbelösung geschwenkt. Um die Proteinbanden klarer sehen zu können, wurde das Gel anschließend in der Entfärbelösung entfärbt. Dies geschah solange bis die Proteinbanden gut sichtbar waren.

Coomassie Färbelösung:

Methanol:H₂O (1:1); 10% Eisessig; 0,02% Coomassie Brilliantblau R250

Coomassie Entfärbelösung:

Methanol:H₂O (1:1); 10% Eisessig

5.2.9.5 MBP-Pulldown

Um herauszufinden, ob zwei Proteine direkt miteinander interagieren, kann ein Pulldown Assay durchgeführt werden. Für den Pulldown werden Proteine mit bestimmten Markierungen verwendet, wie zum Beispiel einem His₆- oder MBP-Tag, um sie anschließend aus dem Bakterienlysat isolieren zu können und auch um sie gegebenenfalls mit einem gegen die Markierung gerichtete Antikörper nachweisen zu können. Für den MBP-Pulldown wird das so genannte Köder-Protein, welches mit MBP fusioniert ist, an Amylose-Harz gebunden und aufgereinigt. Bei der Aufreinigung werden ungebundene Proteine durch Waschschritte entfernt. Im Anschluss können die aufgereinigten und frei in Lösung vorliegenden His₆-markierten Beute-Proteine zu den Köder-Proteinen hinzugefügt werden. Nach der Interaktion zwischen den Beute- und Köder- Proteinen können beide Proteine durch Zentrifugation pelletiert werden. Unspezifisch gebundene Proteine werden durch Waschen entfernt. Anschließend kann ein Western Blot mit einem Antikörper durchgeführt werden, der gegen das Beute-Protein gerichtet ist. MBP alleine, aber mit dem Hinzufügen von Beute- Proteinen, dient als Negativkontrolle. Da die Beute- Proteine nicht an das MBP binden sollten, sollten sie beim Waschen entfernt werden und es sollte somit keine Interaktion detektiert werden können. Die Negativkontrolle zeigt die Spezifität der Interaktion zwischen dem Köder- und dem Beute- Protein.

Expression von His₆ oder MBP markierten Proteinen

Für die Expression der His₆- bzw. MBP-markierten Proteine wurden chemisch kompetente Bakterienzellen zunächst mit den gewünschten Plasmiden transformiert. Am nächsten Tag wurde eine 20 ml Vorkultur, bestehend aus LB-Flüssigmedium mit dem entsprechenden Antibiotikum, mit einer Einzelkolonie aus der Transformation angeimpft (s. Tab. 5.19). Die Vorkultur wurde über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler

inkubiert. Danach wurden 200 ml Hauptkultur mit 10 ml der Vorkultur angeimpft und bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Bei der Expression von MBP-markierten Proteinen wurde der Hauptkultur zusätzlich 0,2% Glucose hinzugefügt. In regelmäßigen Abständen wurde die Dichte der Zellen mit dem Photometer gemessen (OD₆₀₀). Bei einer OD₆₀₀ von ungefähr 0,5 wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 1mM IPTG induziert. Die Kultur wurde für 6h bei 37°C weitergeschüttelt und anschließend wurden die Bakterien bei 4000 rpm für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet bei -20°C eingefroren.

Tab. 5.19: Übersicht über die zur Expression der Fusionsproteine verwendeten Bakterien und Plasmide

Expressionsvektor	Bakterienstamm	Resistenz
pQE-30 Xa	M 15	Ampicillin
pBADM-40+	Rosetta 2(DE3)pLysS Competent Cells	Ampicillin und Chloramphenicol
pBADMuta	Rosetta 2(DE3)pLysS Competent Cells	Ampicillin und Chloramphenicol

Aufreinigung His₆-markierter Proteine

Für die Aufreinigung His₆-markierter Proteine wurde das Bakterienpellet aus 200 ml Bakterienkultur in 10 ml Lysispuffer (5 ml Lysispuffer/g Bakterienpellet) resuspendiert und auf Eis gelagert. Zur Erleichterung des Aufschlusses der Bakterien wurde der Kultur Lysozym (1 mg/ml) zugegeben und diese für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Zusätzlich wurde die Suspension dreimal für je 40 Sekunden bei maximaler Leistung sonifiziert, wobei sie zwischendurch immer wieder kurz auf Eis abgekühlt wurde. Danach wurden die Proteine von den restlichen Zellbestandteilen durch Zentrifugation für 20-30 Minuten bei 10000 x g und 4°C getrennt.

Der Überstand mit den Proteinen wurde in ein neues 15 ml Sarstedt-Röhrchen überführt, mit 200 µl Ni-NTA Magnetic Agarose Beads versetzt und zum Binden der Proteine an die Beads für 1h auf dem Schwenker inkubiert. Anschließend wurden die Beads bei 4000 x g für 5 Minuten herunterzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Beads danach dreimal mit je 5 ml Waschpuffer gewaschen. Zwischendurch wurden die Beads mit den gebundenen Proteinen durch Zentrifugation bei 4000 rpm für 5 Minuten pelletiert. Nach dem dritten Waschschrift wurden die Beads in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, der Waschpuffer vollständig abgenommen und 500 µl Elutionspuffer hinzugefügt, um die Proteine wieder von den Beads zu lösen. Anschließend erfolgt eine Inkubation von 30 Minuten bei 4°C auf dem Schwenker. Im Anschluss wurden die Beads bei 4000 rpm für 5 Minuten herunterzentrifugiert und der Überstand wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und auf 4°C gelagert. Der Elutionsschritt wurde dreimal wiederholt.

Lysispuffer:

50 mM NaH₂PO₄; 300 mM NaCl; 10 mM Imidazol; pH 8,0

Vor Gebrauch werden PMSF und Protease-Inhibitor-Cocktail je 1: 200 hinzugegeben.

Waschpuffer:

50 mM NaH₂PO₄; 300 mM NaCl; 20 mM Imidazol; pH 8,0

Elutionspuffer:

50 mM NaH₂PO₄; 300 mM NaCl; 250 mM Imidazol; pH 8,0

Aufreinigung MBP markierter Proteine

Das Pellet der Bakterienkultur wurde aufgetaut und in 5 ml Column Buffer mit hinzugefügtem Protease-Inhibitor-Cocktail und PMSF, resuspendiert. Die resuspendierten Bakterien wurden bei -20°C über Nacht eingefroren.

Die Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und anschließend für den Zellaufschluss sonifiziert. Die Sonifizierung erfolgte einmal für 1 Minute und danach noch einmal für 30 Sekunden bei einem „Duty cycle“ von 0,5 sek, wobei die Proben zwischendrin immer kurz auf Eis abgekühlt wurden. Um die Proteine von den übrigen Zellbestandteilen zu trennen wurde die Probe bei 13000 g für 1h bei 4°C zentrifugiert. In der Zwischenzeit wurden die Amylose-Säulen vorbereitet, indem 2 ml Amylose Harz in die Säule gegeben und fünfmal mit je 10 ml Column Buffer gewaschen wurde. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand abgenommen und auf die vorbereitete Amylose-Säule gegeben, um die MBP markierten Proteine an die Amylose zu binden. Anschließend wurde die Säule zwölfmal mit je 10 ml Column Buffer gewaschen. Danach wurde der Amylose-Harz mit den gebundenen Proteinen in 2 ml Column Buffer resuspendiert, in ein 15 ml- Sarstedt Röhrchen überführt und bei 4°C gelagert.

Column Buffer:

20 mM Tris-HCl (pH 7,4); 200 mM NaCl; 1 mM EDTA

Vor Gebrauch werden PMSF und Protease-Inhibitor-Cocktail je 1: 200 hinzugegeben.

MBP-Pulldown

Für den Nachweis einer direkten Interaktion zwischen zwei Proteinen wird der MBP-Pulldown genutzt. Dazu werden beide Interaktionspartner in ungefähr gleicher Menge im Pulldown Assay eingesetzt. Dabei sind die Köder- Proteine noch an das Amylose-Harz gebunden. Die ungefähre Proteinmenge wurde zuvor durch eine Coomassie-Färbung (s. Kap. 5.2.9.4) bestimmt. Als Negativkontrolle dient MBP alleine, welches mit den His₆- markierten Beute- Proteinen gemischt wird.

Vergleichbare Mengen an Köder-Proteinen (MBP-shrub, MBP) und Beute-Proteinen (His₆-markierte Proteine) werden in 500 µl Pulldown Puffer gegeben. Dem Pulldown Puffer wurde zuvor Protease-Inhibitor-Cocktail und PMSF (je 1:200) hinzugefügt, um das Degradieren der Proteine zu verhindern. Die Proteine wurden über Nacht bei 4°C auf dem Schwenker inkubiert. Danach wurde der Amylose- Harz mit den gebundenen

Proteinen durch Zentrifugation bei 13000 x g für 2 Minuten pelletiert. Anschließend wurde das Harz mit 500 µl Pulldown Waschpuffer gewaschen, mehrfach zum Vermischen invertiert, wieder pelletiert und der Überstand mit den unspezifisch gebundenen Proteinen wurde verworfen. Der Waschschrift wurde zweimal wiederholt. Im Anschluss wurde der Waschpuffer vollständig entfernt und 4x Lämmli-Puffer auf die Proben gegeben, die Menge ist abhängig von der zuvor eingesetzten Menge des Köder-Proteins. Zum Schluss wurden die Proben für 10 Min bei 95°C aufgeköcht. Danach können die Proben entweder direkt auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen werden oder bei -80°C eingefroren werden.

Pulldown Puffer:

20 mM Tris-HCl (pH 8,0); 0,2 M EDTA; 1 mM DTT; 0,1 M NaCl; 0,2% IGEPAL

Vor Gebrauch werden PMSF und Protease-Inhibitor-Cocktail je 1: 200 hinzugegeben.

Pulldown Waschpuffer:

20 mM Tris-HCl (pH 8,0); 0,2 M EDTA; 1 mM DTT; 0,5 M NaCl; 0,2% IGEPAL

6 Literaturverzeichnis

- Abel, T., P. V. Nguyen, M. Barad, T. A. Deuel, E. R. Kandel, R. Bourchouladze (1997): Genetic demonstration of a role for PKA in the late phase of LTP and in hippocampus-based long-term memory. *Cell* 88, 5/1997, S. 615–626.
- Adell, M. A. Y., G. F. Vogel, M. Pakdel, M. Müller, H. Lindner, M. W. Hess, D. Teis (2014): Coordinated binding of Vps4 to ESCRT-III drives membrane neck constriction during MVB vesicle formation. *The Journal of cell biology* 205, 1/2014, S. 33–49.
- Agromayor, M., N. Soler, A. Caballe, T. Kueck, S. M. Freund, M. D. Allen, M. Bycroft, O. Perisic, Y. Ye, B. McDonald, H. Scheel, K. Hofmann, S. J. D. Neil, J. Martin-Serrano, R. L. Williams (2012): The UBAP1 subunit of ESCRT-I interacts with ubiquitin via a SOUBA domain. *Structure (London, England : 1993)* 20, 3/2012, S. 414–428.
- Alam, S. L., J. Sun, M. Payne, B. D. Welch, B. K. Blake, D. R. Davis, H. H. Meyer, S. D. Emr, W. I. Sundquist (2004): Ubiquitin interactions of NZF zinc fingers. *The EMBO journal* 23, 7/2004, S. 1411–1421.
- Al-Tawashi, A., C. Gehring (2013): Phosphodiesterase activity is regulated by CC2D1A that is implicated in non-syndromic intellectual disability. *Cell communication and signaling : CCS* 11, 1/2013, S. 47.
- Al-Tawashi, A., S. Y. Jung, D. Liu, B. Su, J. Qin (2012): Protein implicated in nonsyndromic mental retardation regulates protein kinase A (PKA) activity. *The Journal of biological chemistry* 287, 18/2012, S. 14644–14658.
- American Psychiatric Association (2000): Diagnostic and statistical manual of mental disorders. DSM-IV-TR. American Psychiatric Association, Washington, DC.
- Anitei, M., T. Wassmer, C. Stange, B. Hoflack (2010): Bidirectional transport between the trans-Golgi network and the endosomal system. *Molecular membrane biology* 27, 8/2010, S. 443–456.
- Artavanis-Tsakonas, S., M. D. Rand, R. J. Lake (1999): Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science (New York, N.Y.)* 284, 5415/1999, S. 770–776.
- Asao, H., Y. Sasaki, T. Arita, N. Tanaka, K. Endo, H. Kasai, T. Takeshita, Y. Endo, T. Fujita, K. Sugamura (1997): Hrs is associated with STAM, a signal-transducing adaptor molecule. Its suppressive effect on cytokine-induced cell growth. *The Journal of biological chemistry* 272, 52/1997, S. 32785–32791.
- Audhya, A., I. X. McLeod, J. R. Yates, K. Oegema (2007): MVB-12, a fourth subunit of metazoan ESCRT-I, functions in receptor downregulation. *PloS one* 2, 9/2007, S. e956.
- Azmi, I. F., B. A. Davies, J. Xiao, M. Babst, Z. Xu, D. J. Katzmann (2008): ESCRT-III family members stimulate Vps4 ATPase activity directly or via Vta1. *Developmental cell* 14, 1/2008, S. 50–61.
- Babst, M., T. K. Sato, L. M. Banta, S. D. Emr (1997): Endosomal transport function in yeast requires a novel AAA-type ATPase, Vps4p. *The EMBO journal* 16, 8/1997, S. 1820–1831.
- Babst, M., B. Wendland, E. J. Estepa, S. D. Emr (1998): The Vps4p AAA ATPase regulates membrane association of a Vps protein complex required for normal endosome function. *The EMBO journal* 17, 11/1998, S. 2982–2993.

- Babst, M., D. J. Katzmann, E. J. Estepa-Sabal, T. Meerloo, S. D. Emr (2002): Escrt-III: an endosome-associated heterooligomeric protein complex required for mvb sorting. *Developmental cell* 3, 2/2002, S. 271–282.
- Babst, M., D. J. Katzmann, W. B. Snyder, B. Wendland, S. D. Emr (2002): Endosome-associated complex, ESCRT-II, recruits transport machinery for protein sorting at the multivesicular body. *Developmental cell* 3, 2/2002, S. 283–289.
- Bache, K. G., C. Raiborg, A. Mehlum, H. Stenmark (2003): STAM and Hrs are subunits of a multivalent ubiquitin-binding complex on early endosomes. *The Journal of biological chemistry* 278, 14/2003, S. 12513–12521.
- Bajorek, M., H. L. Schubert, J. McCullough, C. Langelier, D. M. Eckert, W.-M. B. Stubblefield, N. T. Uter, D. G. Myszka, C. P. Hill, W. I. Sundquist (2009): Structural basis for ESCRT-III protein autoinhibition. *Nature structural & molecular biology* 16, 7/2009, S. 754–762.
- Balderhaar, H. J. k., C. Ungermann (2013): CORVET and HOPS tethering complexes - coordinators of endosome and lysosome fusion. *Journal of cell science* 126, Pt 6/2013, S. 1307–1316.
- Bang, A. G., V. Hartenstein, J. W. Posakony (1991): Hairless is required for the development of adult sensory organ precursor cells in *Drosophila*. *Development (Cambridge, England)* 111, 1/1991, S. 89–104.
- Basel-Vanagaite, L., R. Attia, M. Yahav, R. J. Ferland, L. Anteki, C. A. Walsh, T. Olender, R. Straussberg, N. Magal, E. Taub, V. Drasinover, A. Alkelai, D. Bercovich, G. Rechavi, A. J. Simon, M. Shohat (2006): The CC2D1A, a member of a new gene family with C2 domains, is involved in autosomal recessive non-syndromic mental retardation. *Journal of medical genetics* 43, 3/2006, S. 203–210.
- Basel-Vanagaite, L., E. Taub, G. J. Halpern, V. Drasinover, N. Magal, B. Davidov, J. Zlotogora, M. Shohat (2007): Genetic screening for autosomal recessive nonsyndromic mental retardation in an isolated population in Israel. *European journal of human genetics : EJHG* 15, 2/2007, S. 250–253.
- Benes, C. H., N. Wu, A. E. H. Elia, T. Dharia, L. C. Cantley, S. P. Soltoff (2005): The C2 domain of PKCdelta is a phosphotyrosine binding domain. *Cell* 121, 2/2005, S. 271–280.
- Bergeland, T., L. Haugen, O. J. B. Landsverk, H. Stenmark, O. Bakke (2008): Cell-cycle-dependent binding kinetics for the early endosomal tethering factor EEA1. *EMBO reports* 9, 2/2008, S. 171–178.
- Berney, C., G. Danuser (2003): FRET or no FRET: a quantitative comparison. *Biophysical journal* 84, 6/2003, S. 3992–4010.
- Bilodeau, P. S., J. L. Urbanowski, S. C. Winistorfer, R. C. Piper (2002): The Vps27p Hse1p complex binds ubiquitin and mediates endosomal protein sorting. *Nature cell biology* 4, 7/2002, S. 534–539.
- Bilodeau, P. S., S. C. Winistorfer, W. R. Kearney, A. D. Robertson, R. C. Piper (2003): Vps27-Hse1 and ESCRT-I complexes cooperate to increase efficiency of sorting ubiquitinated proteins at the endosome. *The Journal of cell biology* 163, 2/2003, S. 237–243.
- Bischof, J., R. K. Maeda, M. Hediger, F. Karch, K. Basler (2007): An optimized transgenesis system for *Drosophila* using germ-line-specific phiC31 integrases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 9/2007, S. 3312–3317.
- Bishop, S. A., T. Klein, A. M. Arias, J. P. Couso (1999): Composite signalling from Serrate and Delta establishes leg segments in *Drosophila* through Notch. *Development (Cambridge, England)* 126, 13/1999, S. 2993–3003.

- Brand, A. H., N. Perrimon (1993): Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development (Cambridge, England)* 118, 2/1993, S. 401–415.
- Bray, S. J. (2006): Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nature reviews. Molecular cell biology* 7, 9/2006, S. 678–689.
- Brown, W. J., J. Goodhouse, M. G. Farquhar (1986): Mannose-6-phosphate receptors for lysosomal enzymes cycle between the Golgi complex and endosomes. *The Journal of cell biology* 103, 4/1986, S. 1235–1247.
- Bryant, P. J., P. Levinson (1985): Intrinsic growth control in the imaginal primordia of *Drosophila*, and the autonomous action of a lethal mutation causing overgrowth. *Developmental biology* 107, 2/1985, S. 355–363.
- Bryant, P. J., G. Schubiger (1971): Giant and duplicated imaginal discs in a new lethal mutant of *Drosophila melanogaster*. *Developmental biology* 24, 2/1971, S. 233–263.
- Buchkovich, N. J., W. M. Henne, S. Tang, S. D. Emr (2013): Essential N-terminal insertion motif anchors the ESCRT-III filament during MVB vesicle formation. *Developmental cell* 27, 2/2013, S. 201–214.
- Buratovich, M. A., P. J. Bryant (1995): Duplication of l(2)gd imaginal discs in *Drosophila* is mediated by ectopic expression of wg and dpp. *Developmental biology* 168, 2/1995, S. 452–463.
- Buratovich, M. A., P. J. Bryant (1997): Enhancement of overgrowth by gene interactions in lethal(2)giant discs imaginal discs from *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 147, 2/1997, S. 657–670.
- Burd, C. G., S. D. Emr (1998): Phosphatidylinositol(3)-phosphate signaling mediated by specific binding to RING FYVE domains. *Molecular cell* 2, 1/1998, S. 157–162.
- Cabezas, A., K. Pattni, H. Stenmark (2006): Cloning and subcellular localization of a human phosphatidylinositol 3-phosphate 5-kinase, PIKfyve/Fab1. *Gene* 371, 1/2006, S. 34–41.
- Carlton, J. G., J. Martin-Serrano (2007): Parallels between cytokinesis and retroviral budding: a role for the ESCRT machinery. *Science (New York, N.Y.)* 316, 5833/2007, S. 1908–1912.
- Cataldo, A. M., P. M. Mathews, A. B. Boiteau, L. C. Hassinger, C. M. Peterhoff, Y. Jiang, K. Mullaney, R. L. Neve, J. Gruenberg, R. A. Nixon (2008): Down syndrome fibroblast model of Alzheimer-related endosome pathology: accelerated endocytosis promotes late endocytic defects. *The American journal of pathology* 173, 2/2008, S. 370–384.
- Celis, J. F. de, S. J. Bray (2000): The Abruptex domain of Notch regulates negative interactions between Notch, its ligands and Fringe. *Development (Cambridge, England)* 127, 6/2000, S. 1291–1302.
- Celis, J. F. de (2003): Pattern formation in the *Drosophila* wing: The development of the veins. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 25, 5/2003, S. 443–451.
- Ceresa, B. P., M. Lotscher, S. L. Schmid (2001): Receptor and membrane recycling can occur with unaltered efficiency despite dramatic Rab5(q79I)-induced changes in endosome geometry. *The Journal of biological chemistry* 276, 13/2001, S. 9649–9654.
- Chang, C.-H., L.-C. Lai, H.-C. Cheng, K.-R. Chen, Y.-Z. Syue, H.-C. Lu, W.-Y. Lin, S.-H. Chen, H.-S. Huang, A.-L. Shiau, H.-Y. Lei, J. Qin, P. Ling (2011): TBK1-associated protein in endolysosomes (TAPE) is an innate immune regulator modulating the TLR3 and TLR4 signaling pathways. *The Journal of biological chemistry* 286, 9/2011, S. 7043–7051.

- Chastagner, P., A. Israël, C. Brou (2008): AIP4/Itch regulates Notch receptor degradation in the absence of ligand. *PloS one* 3, 7/2008, S. e2735.
- Chavrier, P., R. G. Parton, H. P. Hauri, K. Simons, M. Zerial (1990): Localization of low molecular weight GTP binding proteins to exocytic and endocytic compartments. *Cell* 62, 2/1990, S. 317–329.
- Chen, K.-R., C.-H. Chang, C.-Y. Huang, C.-Y. Lin, W.-Y. Lin, Y.-C. Lo, C.-Y. Yang, E.-W. Hsing, L.-F. Chen, S.-R. Shih, A.-L. Shiau, H.-Y. Lei, T.-H. Tan, P. Ling (2012): TBK1-associated protein in endolysosomes (TAPE)/CC2D1A is a key regulator linking RIG-I-like receptors to antiviral immunity. *The Journal of biological chemistry* 287, 38/2012, S. 32216–32221.
- Childress, J. L., M. Acar, C. Tao, G. Halder (2006): Lethal giant discs, a novel C2-domain protein, restricts notch activation during endocytosis. *Current biology : CB* 16, 22/2006, S. 2228–2233.
- Clague, M. J., H. Liu, S. Urbé (2012): Governance of endocytic trafficking and signaling by reversible ubiquitylation. *Developmental cell* 23, 3/2012, S. 457–467.
- Clague, M. J., S. Urbé (2006): Endocytosis: the DUB version. *Trends in cell biology* 16, 11/2006, S. 551–559.
- Clague, M. J., S. Urbé (2010): Ubiquitin: same molecule, different degradation pathways. *Cell* 143, 5/2010, S. 682–685.
- Collinet, C., M. Stöter, C. R. Bradshaw, N. Samusik, J. C. Rink, D. Kenski, B. Habermann, F. Buchholz, R. Henschel, M. S. Mueller, W. E. Nagel, E. Fava, Y. Kalaidzidis, M. Zerial (2010): Systems survey of endocytosis by multiparametric image analysis. *Nature* 464, 7286/2010, S. 243–249.
- Czech, M. P. (2003): Dynamics of phosphoinositides in membrane retrieval and insertion. *Annual review of physiology* 65, 2003, S. 791–815.
- Di Fiore, P. P., P. de Camilli (2001): Endocytosis and signaling. an inseparable partnership. *Cell* 106, 1/2001, S. 1–4.
- Dimaano, C., C. B. Jones, A. Hanono, M. Curtiss, M. Babst (2008): Ist1 regulates Vps4 localization and assembly. *Molecular biology of the cell* 19, 2/2008, S. 465–474.
- Diwu, Z., C. S. Chen, C. Zhang, D. H. Klaubert, R. P. Haugland (1999): A novel acidotropic pH indicator and its potential application in labeling acidic organelles of live cells. *Chemistry & biology* 6, 7/1999, S. 411–418.
- Doherty, G. J., H. T. McMahon (2009): Mechanisms of endocytosis. *Annual review of biochemistry* 78, 2009, S. 857–902.
- Drevets, W. C., M. E. Thase, E. L. Moses-Kolko, J. Price, E. Frank, D. J. Kupfer, C. Mathis (2007): Serotonin-1A receptor imaging in recurrent depression: replication and literature review. *Nuclear medicine and biology* 34, 7/2007, S. 865–877.
- Dudek, H., S. R. Datta, T. F. Franke, M. J. Birnbaum, R. Yao, G. M. Cooper, R. A. Segal, D. R. Kaplan, M. E. Greenberg (1997): Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science (New York, N.Y.)* 275, 5300/1997, S. 661–665.
- Ellisen, L. W., J. Bird, D. C. West, A. L. Soreng, T. C. Reynolds, S. D. Smith, J. Sklar (1991): TAN-1, the human homolog of the *Drosophila* notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell* 66, 4/1991, S. 649–661.
- EMBL-EBI. Abrufbar unter http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/.
- Felgner, P. L., T. R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H. W. Chan, M. Wenz, J. P. Northrop, G. M. Ringold, M. Danielsen (1987): Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84, 21/1987, S. 7413–7417.

- Fischer, L. (2013): Zur Interaktion von LGD Proteinen mit der ESCRT-III Untereinheit CHMP4B. Bachelorarbeit, Düsseldorf.
- Fisher, R. D., B. Wang, S. L. Alam, D. S. Higginson, H. Robinson, W. I. Sundquist, C. P. Hill (2003): Structure and ubiquitin binding of the ubiquitin-interacting motif. *The Journal of biological chemistry* 278, 31/2003, S. 28976–28984.
- Fleming, R. J., Y. Gu, N. A. Hukriede (1997): Serrate-mediated activation of Notch is specifically blocked by the product of the gene fringe in the dorsal compartment of the *Drosophila* wing imaginal disc. *Development (Cambridge, England)* 124, 15/1997, S. 2973–2981.
- Forgac, M. (2007): Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. *Nature reviews. Molecular cell biology* 8, 11/2007, S. 917–929.
- Fortini, M. E. (2002): Gamma-secretase-mediated proteolysis in cell-surface-receptor signalling. *Nature reviews. Molecular cell biology* 3, 9/2002, S. 673–684.
- Furriols, M., S. Bray (2000): Dissecting the mechanisms of suppressor of hairless function. *Developmental biology* 227, 2/2000, S. 520–532.
- Furriols, M., S. Bray (2001): A model Notch response element detects Suppressor of Hairless-dependent molecular switch. *Current biology : CB* 11, 1/2001, S. 60–64.
- Gallagher, C. M., J. A. Knoblich (2006): The conserved c2 domain protein lethal (2) giant discs regulates protein trafficking in *Drosophila*. *Developmental cell* 11, 5/2006, S. 641–653.
- Gaullier, J. M., A. Simonsen, A. D'Arrigo, B. Bremnes, H. Stenmark, R. Aasland (1998): FYVE fingers bind PtdIns(3)P. *Nature* 394, 6692/1998, S. 432–433.
- Gillooly, D. J., C. Raiborg, H. Stenmark (2003): Phosphatidylinositol 3-phosphate is found in microdomains of early endosomes. *Histochemistry and cell biology* 120, 6/2003, S. 445–453.
- Gordon, W. R., D. Vardar-Ulu, G. Histen, C. Sanchez-Irizarry, J. C. Aster, S. C. Blacklow (2007): Structural basis for autoinhibition of Notch. *Nature structural & molecular biology* 14, 4/2007, S. 295–300.
- Gordon, W. R., D. Vardar-Ulu, S. L'Heureux, T. Ashworth, M. J. Malecki, C. Sanchez-Irizarry, D. G. McArthur, G. Histen, J. L. Mitchell, J. C. Aster, S. C. Blacklow (2009): Effects of S1 cleavage on the structure, surface export, and signaling activity of human Notch1 and Notch2. *PLoS one* 4, 8/2009, S. e6613.
- Greenwald, I., G. Seydoux (1990): Analysis of gain-of-function mutations of the *lin-12* gene of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 346, 6280/1990, S. 197–199.
- Gruenberg, J., G. Griffiths, K. E. Howell (1989): Characterization of the early endosome and putative endocytic carrier vesicles in vivo and with an assay of vesicle fusion in vitro. *The Journal of cell biology* 108, 4/1989, S. 1301–1316.
- Hadjighassem, M. R., M. C. Austin, B. Szewczyk, M. Daigle, C. A. Stockmeier, P. R. Albert (2009): Human Freud-2/CC2D1B: a novel repressor of postsynaptic serotonin-1A receptor expression. *Biological psychiatry* 66, 3/2009, S. 214–222.
- Hadjighassem, M. R., K. Galaraga, P. R. Albert (2011): Freud-2/CC2D1B mediates dual repression of the serotonin-1A receptor gene. *The European journal of neuroscience* 33, 2/2011, S. 214–223.
- Haines, N., K. D. Irvine (2003): Glycosylation regulates Notch signalling. *Nature reviews. Molecular cell biology* 4, 10/2003, S. 786–797.
- Hanahan, D. (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of molecular biology* 166, 4/1983, S. 557–580.
- Hartmann, C., M. Chami, U. Zachariae, B. L. de Groot, A. Engel, M. G. Grütter (2008): Vacuolar protein sorting: two different functional states of the AAA-ATPase Vps4p. *Journal of molecular biology* 377, 2/2008, S. 352–363.

- Henne, W. M., N. J. Buchkovich, S. D. Emr (2011): The ESCRT pathway. *Developmental cell* 21, 1/2011, S. 77–91.
- Ho, S. N., H. D. Hunt, R. M. Horton, J. K. Pullen, L. R. Pease (1989): Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 77, 1/1989, S. 51–59.
- Hoepfner, S., F. Severin, A. Cabezas, B. Habermann, A. Runge, D. Gillyooly, H. Stenmark, M. Zerial (2005): Modulation of receptor recycling and degradation by the endosomal kinesin KIF16B. *Cell* 121, 3/2005, S. 437–450.
- Hori, K., A. Sen, S. Artavanis-Tsakonas (2013): Notch signaling at a glance. *Journal of cell science* 126, Pt 10/2013, S. 2135–2140.
- Horii, M., H. Shibata, R. Kobayashi, K. Katoh, C. Yorikawa, J. Yasuda, M. Maki (2006): CHMP7, a novel ESCRT-III-related protein, associates with CHMP4b and functions in the endosomal sorting pathway. *The Biochemical journal* 400, 1/2006, S. 23–32.
- Howard, T. L., D. R. Stauffer, C. R. Degrin, S. M. Hollenberg (2001): CHMP1 functions as a member of a newly defined family of vesicle trafficking proteins. *Journal of cell science* 114, Pt 13/2001, S. 2395–2404.
- Huotari, J., A. Helenius (2011): Endosome maturation. *The EMBO journal* 30, 17/2011, S. 3481–3500.
- Huotari, J., N. Meyer-Schaller, M. Hubner, S. Stauffer, N. Katheder, P. Horvath, R. Mancini, A. Helenius, M. Peter (2012): Cullin-3 regulates late endosome maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 3/2012, S. 823–828.
- Hurley, J. H. (2010): The ESCRT complexes. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 45, 6/2010, S. 463–487.
- Hurley, J. H., H. Stenmark (2011): Molecular mechanisms of ubiquitin-dependent membrane traffic. *Annual review of biophysics* 40, 2011, S. 119–142.
- Im, Y. J., J. H. Hurley (2008): Integrated structural model and membrane targeting mechanism of the human ESCRT-II complex. *Developmental cell* 14, 6/2008, S. 902–913.
- Im, Y. J., T. Wollert, E. Boura, J. H. Hurley (2009): Structure and function of the ESCRT-II-III interface in multivesicular body biogenesis. *Developmental cell* 17, 2/2009, S. 234–243.
- Jäckel, S. (2010): Identifizierung eines Interaktionspartners von Lethal (2) giant discs (Lgd) in *Drosophila melanogaster* und konditionale Inaktivierung der Lgd-Orthologen in der Maus. Dissertation, Köln.
- Jaekel, R., T. Klein (2006): The *Drosophila* Notch inhibitor and tumor suppressor gene lethal (2) giant discs encodes a conserved regulator of endosomal trafficking. *Developmental cell* 11, 5/2006, S. 655–669.
- Jafar-Nejad, H., K. Norga, H. Bellen (2002): Numb: "Adapting" notch for endocytosis. *Developmental cell* 3, 2/2002, S. 155–156.
- Jesnowski, R., J. Naehring, K. Wolf (1995): A rapid and reliable method for PCR-based amplification of chromosomal and mitochondrial DNA from intact yeast cells. *Current genetics* 27, 4/1995, S. 318–319.
- Kaltschmidt, B., D. Widera, C. Kaltschmidt (2005): Signaling via NF-kappaB in the nervous system. *Biochimica et biophysica acta* 1745, 3/2005, S. 287–299.
- Kassis, J. A., E. Noll, E. P. VanSickle, W. F. Odenwald, N. Perrimon (1992): Altering the insertional specificity of a *Drosophila* transposable element. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 5/1992, S. 1919–1923.

- Kato, M., K. Miyazawa, N. Kitamura (2000): A deubiquitinating enzyme UBPY interacts with the Src homology 3 domain of Hrs-binding protein via a novel binding motif PX(V/I)(D/N)RXXKP. *The Journal of biological chemistry* 275, 48/2000, S. 37481–37487.
- Katzmann, D. J., M. Babst, 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, 2/2001, S. 145–155.
- Katzmann, D. J., C. J. Stefan, M. Babst, S. D. Emr (2003): Vps27 recruits ESCRT machinery to endosomes during MVB sorting. *The Journal of cell biology* 162, 3/2003, S. 413–423.
- Kauppi, M., A. Simonsen, B. Bremnes, A. Vieira, J. Callaghan, H. Stenmark, V. M. Olkkonen (2002): The small GTPase Rab22 interacts with EEA1 and controls endosomal membrane trafficking. *Journal of cell science* 115, Pt 5/2002, S. 899–911.
- Kharabi-Masouleh, S. (2012): In vitro Interaktionsstudien mit dem Tumorsuppressor Lethal (2) giant discs und der ESCRT-III-Komponente Shrub aus *Drosophila melanogaster*. Bachelorarbeit (unpubliziert), Düsseldorf.
- Kidd, S., T. Lieber, M. W. Young (1998): Ligand-induced cleavage and regulation of nuclear entry of Notch in *Drosophila melanogaster* embryos. *Genes & development* 12, 23/1998, S. 3728–3740.
- Kieffer, C., J. J. Skalicky, E. Morita, I. de Domenico, D. M. Ward, J. Kaplan, W. I. Sundquist (2008): Two distinct modes of ESCRT-III recognition are required for VPS4 functions in lysosomal protein targeting and HIV-1 budding. *Developmental cell* 15, 1/2008, S. 62–73.
- Klein, T. (2001): Wing disc development in the fly: the early stages. *Current opinion in genetics & development* 11, 4/2001, S. 470–475.
- Klein, T. (2003): The tumour suppressor gene *l(2)giant discs* is required to restrict the activity of Notch to the dorsoventral boundary during *Drosophila* wing development. *Developmental biology* 255, 2/2003, S. 313–333.
- Kornfeld, S. (1987): Trafficking of lysosomal enzymes. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 1, 6/1987, S. 462–468.
- Korobko, E., S. Kiselev, S. Olsnes, H. Stenmark, I. Korobko (2005): The Rab5 effector Rabaptin-5 and its isoform Rabaptin-5delta differ in their ability to interact with the small GTPase Rab4. *The FEBS journal* 272, 1/2005, S. 37–46.
- Landsberg, M. J., P. R. Vajjhala, R. Rothnagel, A. L. Munn, B. Hankamer (2009): Three-dimensional structure of AAA ATPase Vps4: advancing structural insights into the mechanisms of endosomal sorting and enveloped virus budding. *Structure (London, England : 1993)* 17, 3/2009, S. 427–437.
- Lata, S., M. Roessle, J. Solomons, M. Jamin, H. G. Gottlinger, D. I. Svergun, W. Weissenhorn (2008): Structural basis for autoinhibition of ESCRT-III CHMP3. *Journal of molecular biology* 378, 4/2008, S. 818–827.
- Le Borgne, R., S. Remaud, S. Hamel, F. Schweisguth (2005): Two distinct E3 ubiquitin ligases have complementary functions in the regulation of delta and serrate signaling in *Drosophila*. *PLoS biology* 3, 4/2005, S. e96.
- Lindner, A. (2013): Interaktionsstudien von CC2D1A und CC2D1B mit Mitgliedern der CHMP Familie. Masterarbeit, Düsseldorf.
- Logeat, F., C. Bessia, C. Brou, O. LeBail, S. Jarriault, N. G. Seidah, A. Israël (1998): The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 14/1998, S. 8108–8112.

- Luhtala, N., G. Odorizzi (2004): Bro1 coordinates deubiquitination in the multivesicular body pathway by recruiting Doa4 to endosomes. *The Journal of cell biology* 166, 5/2004, S. 717–729.
- Luzio, J. P., P. R. Pryor, N. A. Bright (2007): Lysosomes: fusion and function. *Nature reviews. Molecular cell biology* 8, 8/2007, S. 622–632.
- Manzini, M. C., L. Xiong, R. Shaheen, D. E. Tambunan, S. Di Costanzo, V. Mitisalis, D. J. Tischfield, A. Cinquino, M. Ghaziuddin, M. Christian, Q. Jiang, S. Laurent, Z. A. Nanjiani, S. Rasheed, R. S. Hill, S. B. Lizarraga, D. Gleason, D. Sabbagh, M. A. Salih, F. S. Alkuraya, C. A. Walsh (2014): CC2D1A regulates human intellectual and social function as well as NF- κ B signaling homeostasis. *Cell reports* 8, 3/2014, S. 647–655.
- Marois, E., A. Mahmoud, S. Eaton (2006): The endocytic pathway and formation of the Wingless morphogen gradient. *Development (Cambridge, England)* 133, 2/2006, S. 307–317.
- Marsh, M., A. Helenius (2006): Virus entry: open sesame. *Cell* 124, 4/2006, S. 729–740.
- Marshansky, V., M. Futai (2008): The V-type H⁺-ATPase in vesicular trafficking: targeting, regulation and function. *Current opinion in cell biology* 20, 4/2008, S. 415–426.
- Martinelli, N., B. Hartlieb, Y. Usami, C. Sabin, A. Dordor, N. Miguet, S. V. Avilov, E. A. Ribeiro, H. Göttlinger, W. Weissenhorn (2012): CC2D1A is a regulator of ESCRT-III CHMP4B. *Journal of molecular biology* 419, 1-2/2012, S. 75–88.
- Matsuda, A., Y. Suzuki, G. Honda, S. Muramatsu, O. Matsuzaki, Y. Nagano, T. Doi, K. Shimotohno, T. Harada, E. Nishida, H. Hayashi, S. Sugano (2003): Large-scale identification and characterization of human genes that activate NF-kappaB and MAPK signaling pathways. *Oncogene* 22, 21/2003, S. 3307–3318.
- Mattisek, C., D. Teis (2014): The role of the endosomal sorting complexes required for transport (ESCRT) in tumorigenesis. *Molecular membrane biology* 31, 4/2014, S. 111–119.
- Maxfield, F. R., D. J. Yamashiro (1987): Endosome acidification and the pathways of receptor-mediated endocytosis. *Advances in experimental medicine and biology* 225, 1987, S. 189–198.
- Maxfield, F. R., T. E. McGraw (2004): Endocytic recycling. *Nature reviews. Molecular cell biology* 5, 2/2004, S. 121–132.
- McGill, M. A., C. J. McGlade (2003): Mammalian numb proteins promote Notch1 receptor ubiquitination and degradation of the Notch1 intracellular domain. *The Journal of biological chemistry* 278, 25/2003, S. 23196–23203.
- Meffert, M. K., D. Baltimore (2005): Physiological functions for brain NF-kappaB. *Trends in neurosciences* 28, 1/2005, S. 37–43.
- Meloty-Kapella, L., B. Shergill, J. Kuon, E. Botvinick, G. Weinmaster (2012): Notch ligand endocytosis generates mechanical pulling force dependent on dynamin, epsins, and actin. *Developmental cell* 22, 6/2012, S. 1299–1312.
- Migdal, B. (2012): Analyse der Interaktionen von CC2D1A und CC2D1B mit ihren Interaktionspartnern. Masterarbeit, Düsseldorf.
- Moberg, K. H., S. Schelble, S. K. Burdick, I. K. Hariharan (2005): Mutations in erupted, the Drosophila ortholog of mammalian tumor susceptibility gene 101, elicit non-cell-autonomous overgrowth. *Developmental cell* 9, 5/2005, S. 699–710.
- Moll, D. (2013): Bestimmung der Expressionsstärke von Deletionskonstrukten der humanen Lgd Orthologen LGD1 und LGD2. Bachelorarbeit (unpubliziert), Düsseldorf.
- Moncrieff, J. (2009): A critique of the dopamine hypothesis of schizophrenia and psychosis. *Harvard review of psychiatry* 17, 3/2009, S. 214–225.

- Morawa, K. S., M. Schneider, T. Klein (2015): Lgd regulates the activity of the BMP/Dpp signalling pathway during *Drosophila* oogenesis. *Development* (Cambridge, England) 142, 7/2015, S. 1325–1335.
- Morel, V., F. Schweisguth (2000): Repression by suppressor of hairless and activation by Notch are required to define a single row of single-minded expressing cells in the *Drosophila* embryo. *Genes & development* 14, 3/2000, S. 377–388.
- Morrison, H. A., H. Dionne, T. E. Rusten, A. Brech, W. W. Fisher, B. D. Pfeiffer, S. E. Celniker, H. Stenmark, D. Bilder (2008): Regulation of early endosomal entry by the *Drosophila* tumor suppressors Rabenosyn and Vps45. *Molecular biology of the cell* 19, 10/2008, S. 4167–4176.
- Mullis, K. B., F. A. Faloon (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in enzymology* 155, 1987, S. 335–350.
- Mumm, J. S., E. H. Schroeter, M. T. Saxena, A. Griesemer, X. Tian, D. J. Pan, W. J. Ray, R. Kopan (2000): A ligand-induced extracellular cleavage regulates gamma-secretase-like proteolytic activation of Notch1. *Molecular cell* 5, 2/2000, S. 197–206.
- Muqit, M. M. K., M. B. Feany (2002): Modelling neurodegenerative diseases in *Drosophila*: a fruitful approach? *Nature reviews. Neuroscience* 3, 3/2002, S. 237–243.
- Murray, J. T., C. Panaretou, H. Stenmark, M. Miaczynska, J. M. Backer (2002): Role of Rab5 in the recruitment of hVps34/p150 to the early endosome. *Traffic* (Copenhagen, Denmark) 3, 6/2002, S. 416–427.
- Muzioł, T., E. Pineda-Molina, R. B. Ravelli, A. Zamborlini, Y. Usami, H. Göttlinger, W. Weissenhorn (2006): Structural basis for budding by the ESCRT-III factor CHMP3. *Developmental cell* 10, 6/2006, S. 821–830.
- Nakamura, A., H. Arai, N. Fujita (2009): Centrosomal Aki1 and cohesin function in separase-regulated centriole disengagement. *The Journal of cell biology* 187, 5/2009, S. 607–614.
- Nakamura, A., M. Naito, H. Arai, N. Fujita (2010): Mitotic phosphorylation of Aki1 at Ser208 by cyclin B1-Cdk1 complex. *Biochemical and biophysical research communications* 393, 4/2010, S. 872–876.
- Nakamura, A., M. Naito, T. Tsuruo, N. Fujita (2008): Freud-1/Aki1, a novel PDK1-interacting protein, functions as a scaffold to activate the PDK1/Akt pathway in epidermal growth factor signaling. *Molecular and cellular biology* 28, 19/2008, S. 5996–6009.
- Nalefski, E. A., J. J. Falke (1996): The C2 domain calcium-binding motif: structural and functional diversity. *Protein science : a publication of the Protein Society* 5, 12/1996, S. 2375–2390.
- Nguyen, P. V., N. H. Woo (2003): Regulation of hippocampal synaptic plasticity by cyclic AMP-dependent protein kinases. *Progress in neurobiology* 71, 6/2003, S. 401–437.
- Nickerson, D. P., C. L. Brett, A. J. Merz (2009): Vps-C complexes: gatekeepers of endolysosomal traffic. *Current opinion in cell biology* 21, 4/2009, S. 543–551.
- Nickerson, D. P., M. West, G. Odorizzi (2006): Did2 coordinates Vps4-mediated dissociation of ESCRT-III from endosomes. *The Journal of cell biology* 175, 5/2006, S. 715–720.
- Niessen, K., A. Karsan (2007): Notch signaling in the developing cardiovascular system. *American journal of physiology. Cell physiology* 293, 1/2007, S. C1-11.
- Norgan, A. P., B. A. Davies, I. F. Azmi, A. S. Schroeder, J. A. Payne, G. M. Lynch, Z. Xu, D. J. Katzmann (2013): Relief of autoinhibition enhances Vta1 activation of Vps4 via the Vps4 stimulatory element. *The Journal of biological chemistry* 288, 36/2013, S. 26147–26156.

- Obita, T., S. Saksena, S. Ghazi-Tabatabai, D. J. Gill, O. Perisic, S. D. Emr, R. L. Williams (2007): Structural basis for selective recognition of ESCRT-III by the AAA ATPase Vps4. *Nature* 449, 7163/2007, S. 735–739.
- Odorizzi, G., D. J. Katzmann, M. Babst, A. Audhya, S. D. Emr (2003): Bro1 is an endosome-associated protein that functions in the MVB pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of cell science* 116, Pt 10/2003, S. 1893–1903.
- Okajima, T., K. D. Irvine (2002): Regulation of notch signaling by o-linked fucose. *Cell* 111, 6/2002, S. 893–904.
- Okajima, T., A. Xu, L. Lei, K. D. Irvine (2005): Chaperone activity of protein O-fucosyltransferase 1 promotes notch receptor folding. *Science (New York, N.Y.)* 307, 5715/2005, S. 1599–1603.
- Ou, X.-M., S. Lemonde, H. Jafar-Nejad, C. D. Bown, A. Goto, A. Rogaeva, P. R. Albert (2003): Freud-1: A neuronal calcium-regulated repressor of the 5-HT_{1A} receptor gene. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23, 19/2003, S. 7415–7425.
- Pal, A., F. Severin, S. Höpfner, M. Zerial (2008): Regulation of endosome dynamics by Rab5 and Huntingtin-HAP40 effector complex in physiological versus pathological conditions. *Methods in enzymology* 438, 2008, S. 239–257.
- Panin, V. M., V. Papayannopoulos, R. Wilson, K. D. Irvine (1997): Fringe modulates Notch-ligand interactions. *Nature* 387, 6636/1997, S. 908–912.
- Panopoulou, E., D. J. Gillyooly, J. L. Wrana, M. Zerial, H. Stenmark, C. Murphy, T. Fotsis (2002): Early endosomal regulation of Smad-dependent signaling in endothelial cells. *The Journal of biological chemistry* 277, 20/2002, S. 18046–18052.
- Parks, A. L., K. M. Klueg, J. R. Stout, M. A. Muskavitch (2000): Ligand endocytosis drives receptor dissociation and activation in the Notch pathway. *Development (Cambridge, England)* 127, 7/2000, S. 1373–1385.
- Phelps, C. B., A. H. Brand (1998): Ectopic gene expression in *Drosophila* using GAL4 system. *Methods (San Diego, Calif.)* 14, 4/1998, S. 367–379.
- Piñeyro, G., P. Blier (1999): Autoregulation of serotonin neurons: role in antidepressant drug action. *Pharmacological reviews* 51, 3/1999, S. 533–591.
- Polo, S., P. P. Di Fiore (2006): Endocytosis conducts the cell signaling orchestra. *Cell* 124, 5/2006, S. 897–900.
- Polo, S., S. Pece, P. P. Di Fiore (2004): Endocytosis and cancer. *Current opinion in cell biology* 16, 2/2004, S. 156–161.
- Polo, S., S. Sigismund, M. Faretta, M. Guidi, M. R. Capua, G. Bossi, H. Chen, P. de Camilli, P. P. Di Fiore (2002): A single motif responsible for ubiquitin recognition and monoubiquitination in endocytic proteins. *Nature* 416, 6879/2002, S. 451–455.
- Ponting, C. P., R. Mott, P. Bork, R. R. Copley (2001): Novel protein domains and repeats in *Drosophila melanogaster*: insights into structure, function, and evolution. *Genome research* 11, 12/2001, S. 1996–2008.
- Ponting, C. P., P. J. Parker (1996): Extending the C2 domain family: C2s in PKCs delta, epsilon, eta, theta, phospholipases, GAPs, and perforin. *Protein science : a publication of the Protein Society* 5, 1/1996, S. 162–166.
- Pornillos, O., D. S. Higginson, K. M. Stray, R. D. Fisher, J. E. Garrus, M. Payne, G.-P. He, H. E. Wang, S. G. Morham, W. I. Sundquist (2003): HIV Gag mimics the Tsg101-recruiting activity of the human Hrs protein. *The Journal of cell biology* 162, 3/2003, S. 425–434.
- Poteryaev, D., S. Datta, K. Ackema, M. Zerial, A. Spang (2010): Identification of the switch in early-to-late endosome transition. *Cell* 141, 3/2010, S. 497–508.

- PredictProtein A: hLGD1. Abrufbar unter [http://ppopen.informatik.tu-muenchen.de/visual_results?req_id=\\$1\\$BDqFXTgN\\$BmVa3pc7kiHSBHIGzUfUv1](http://ppopen.informatik.tu-muenchen.de/visual_results?req_id=1BDqFXTgN$BmVa3pc7kiHSBHIGzUfUv1).
- PredictProtein B: hLGD2. Abrufbar unter [http://ppopen.informatik.tu-muenchen.de/visual_results?req_id=\\$6\\$j5hw8y1G.NPp\\$DJPXt247xRvkvv0ZFpYA095nIRXcFsf5Qejqu8qVKJy6VAcKSv1DbxaFh1bIFzQA43EYZt5VaQ9s7eRevLif/](http://ppopen.informatik.tu-muenchen.de/visual_results?req_id=6j5hw8y1G.NPp$DJPXt247xRvkvv0ZFpYA095nIRXcFsf5Qejqu8qVKJy6VAcKSv1DbxaFh1bIFzQA43EYZt5VaQ9s7eRevLif/).
- PredictProtein C: Lgd. Abrufbar unter [http://ppopen.informatik.tu-muenchen.de/visual_results?req_id=\\$1\\$69ZbX8rh\\$LwTOZTRI8eRvK6fCvEqNV/](http://ppopen.informatik.tu-muenchen.de/visual_results?req_id=$1$69ZbX8rh$LwTOZTRI8eRvK6fCvEqNV/).
- Raiborg, C., B. Bremnes, A. Mehlum, D. J. Gillooly, A. D'Arrigo, E. Stang, H. Stenmark (2001): FYVE and coiled-coil domains determine the specific localisation of Hrs to early endosomes. *Journal of cell science* 114, Pt 12/2001, S. 2255–2263.
- Raiborg, C., K. G. Bache, D. J. Gillooly, I. H. Madshus, E. Stang, H. Stenmark (2002): Hrs sorts ubiquitinated proteins into clathrin-coated microdomains of early endosomes. *Nature cell biology* 4, 5/2002, S. 394–398.
- Raiborg, C., T. Slagsvold, H. Stenmark (2006): A new side to ubiquitin. *Trends in biochemical sciences* 31, 10/2006, S. 541–544.
- Rand, M. D., L. M. Grimm, S. Artavanis-Tsakonas, V. Patriub, S. C. Blacklow, J. Sklar, J. C. Aster (2000): Calcium depletion dissociates and activates heterodimeric notch receptors. *Molecular and cellular biology* 20, 5/2000, S. 1825–1835.
- Reggiori, F., H. R. Pelham (2001): Sorting of proteins into multivesicular bodies: ubiquitin-dependent and -independent targeting. *The EMBO journal* 20, 18/2001, S. 5176–5186.
- Ren, X., J. H. Hurley (2010): VHS domains of ESCRT-0 cooperate in high-avidity binding to polyubiquitinated cargo. *The EMBO journal* 29, 6/2010, S. 1045–1054.
- Ren, X., D. P. Kloer, Y. C. Kim, R. Ghirlando, L. F. Saidi, G. Hummer, J. H. Hurley (2009): Hybrid structural model of the complete human ESCRT-0 complex. *Structure (London, England : 1993)* 17, 3/2009, S. 406–416.
- Renieri, A., C. Pescucci, I. Longo, F. Ariani, F. Mari, I. Meloni (2005): Non-syndromic X-linked mental retardation: from a molecular to a clinical point of view. *Journal of cellular physiology* 204, 1/2005, S. 8–20.
- Riad, M., K. C. Watkins, E. Doucet, M. Hamon, L. Descarries (2001): Agonist-induced internalization of serotonin-1a receptors in the dorsal raphe nucleus (autoreceptors) but not hippocampus (heteroreceptors). *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21, 21/2001, S. 8378–8386.
- Rink, J., E. Ghigo, Y. Kalaidzidis, M. Zerial (2005): Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell* 122, 5/2005, S. 735–749.
- Rogaeva, A., P. R. Albert (2007): The mental retardation gene CC2D1A/Freud-1 encodes a long isoform that binds conserved DNA elements to repress gene transcription. *The European journal of neuroscience* 26, 4/2007, S. 965–974.
- Rogaeva, A., X.-M. Ou, H. Jafar-Nejad, S. Lemonde, P. R. Albert (2007): Differential repression by freud-1/CC2D1A at a polymorphic site in the dopamine-D2 receptor gene. *The Journal of biological chemistry* 282, 29/2007, S. 20897–20905.
- Sakamoto, K., O. Ohara, M. Takagi, S. Takeda, K.-i. Katsube (2002): Intracellular cell-autonomous association of Notch and its ligands: a novel mechanism of Notch signal modification. *Developmental biology* 241, 2/2002, S. 313–326.
- Saksena, S., J. Wahlman, D. Teis, A. E. Johnson, S. D. Emr (2009): Functional reconstitution of ESCRT-III assembly and disassembly. *Cell* 136, 1/2009, S. 97–109.

- Sambrook, J. F. E. M. T. (Hrsg.) (1996): *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York.
- Sanchez-Irizarry, C., A. C. Carpenter, A. P. Weng, W. S. Pear, J. C. Aster, S. C. Blacklow (2004): Notch subunit heterodimerization and prevention of ligand-independent proteolytic activation depend, respectively, on a novel domain and the LNR repeats. *Molecular and cellular biology* 24, 21/2004, S. 9265–9273.
- Sasamura, T., N. Sasaki, F. Miyashita, S. Nakao, H. O. Ishikawa, M. Ito, M. Kitagawa, K. Harigaya, E. Spana, D. Bilder, N. Perrimon, K. Matsuno (2003): neurotic, a novel maternal neurogenic gene, encodes an O-fucosyltransferase that is essential for Notch-Delta interactions. *Development (Cambridge, England)* 130, 20/2003, S. 4785–4795.
- Scheider, K. (2012): Charakterisierung für das Allel CC2D1Amr, das zur mentalen Retardierung führt. Bachelorarbeit (unpubliziert), Düsseldorf.
- Scheider, K. (2014): Charakterisierung eines konditionalen Knockout-Mausmodells für Lgd1/Cc2d1b und Interaktionsstudien von LGD1/CC2D1B und LGD2/CC2D1A mit den Mitgliedern des ESCRT-III-Komplexes. Masterarbeit, Düsseldorf.
- Schmidt, O., D. Teis (2012): The ESCRT machinery. *Current biology : CB* 22, 4/2012, S. R116-20.
- Schneider, M., T. Troost, F. Grawe, A. Martinez-Arias, T. Klein (2013): Activation of Notch in lgd mutant cells requires the fusion of late endosomes with the lysosome. *Journal of cell science* 126, Pt 2/2013, S. 645–656.
- Schuh, A. L., M. Hanna, K. Quinney, L. Wang, A. Sarkeshik, J. R. Yates, A. Audhya (2015): The VPS-20 subunit of the endosomal sorting complex ESCRT-III exhibits an open conformation in the absence of upstream activation. *The Biochemical journal* 466, 3/2015, S. 625–637.
- Seto, E. S., H. J. Bellen, T. E. Lloyd (2002): When cell biology meets development: endocytic regulation of signaling pathways. *Genes & development* 16, 11/2002, S. 1314–1336.
- Shergill, B., L. Meloty-Kapella, A. A. Musse, G. Weinmaster, E. Botvinick (2012): Optical tweezers studies on Notch: single-molecule interaction strength is independent of ligand endocytosis. *Developmental cell* 22, 6/2012, S. 1313–1320.
- Shi, S., P. Stanley (2003): Protein O-fucosyltransferase 1 is an essential component of Notch signaling pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 9/2003, S. 5234–5239.
- Shifley, E. T., S. E. Cole (2007): The vertebrate segmentation clock and its role in skeletal birth defects. *Birth defects research. Part C, Embryo today : reviews* 81, 2/2007, S. 121–133.
- Shih, S. C., D. J. Katzmann, J. D. Schnell, M. Sutanto, S. D. Emr, L. Hicke (2002): Epsins and Vps27p/Hrs contain ubiquitin-binding domains that function in receptor endocytosis. *Nature cell biology* 4, 5/2002, S. 389–393.
- Shim, J.-H., C. Xiao, M. S. Hayden, K.-Y. Lee, E. S. Trombetta, M. Pypaert, A. Nara, T. Yoshimori, B. Wilm, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, B. L. M. Hogan, I. Mellman, S. Ghosh (2006): CHMP5 is essential for late endosome function and down-regulation of receptor signaling during mouse embryogenesis. *The Journal of cell biology* 172, 7/2006, S. 1045–1056.
- Shim, S., L. A. Kimpler, P. I. Hanson (2007): Structure/function analysis of four core ESCRT-III proteins reveals common regulatory role for extreme C-terminal domain. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 8, 8/2007, S. 1068–1079.
- Shim, S., S. A. Merrill, P. I. Hanson (2008): Novel interactions of ESCRT-III with LIP5 and VPS4 and their implications for ESCRT-III disassembly. *Molecular biology of the cell* 19, 6/2008, S. 2661–2672.

- Soldati, T., M. Schliwa (2006): Powering membrane traffic in endocytosis and recycling. *Nature reviews. Molecular cell biology* 7, 12/2006, S. 897–908.
- Sorkin, A., M. von Zastrow (2009): Endocytosis and signalling: intertwining molecular networks. *Nature reviews. Molecular cell biology* 10, 9/2009, S. 609–622.
- Speicher, S. A., U. Thomas, U. Hinz, E. Knust (1994): The Serrate locus of *Drosophila* and its role in morphogenesis of the wing imaginal discs: control of cell proliferation. *Development (Cambridge, England)* 120, 3/1994, S. 535–544.
- Stenmark, H., R. G. Parton, O. Steele-Mortimer, A. Lütcke, J. Gruenberg, M. Zerial (1994): Inhibition of rab5 GTPase activity stimulates membrane fusion in endocytosis. *The EMBO journal* 13, 6/1994, S. 1287–1296.
- Strooper, B. de, W. Annaert, P. Cupers, P. Saftig, K. Craessaerts, J. S. Mumm, E. H. Schroeter, V. Schrijvers, M. S. Wolfe, W. J. Ray, A. Goate, R. Kopan (1999): A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature* 398, 6727/1999, S. 518–522.
- Struhl, G., A. Adachi (1998): Nuclear access and action of notch in vivo. *Cell* 93, 4/1998, S. 649–660.
- Struhl, G., I. Greenwald (1999): Presenilin is required for activity and nuclear access of Notch in *Drosophila*. *Nature* 398, 6727/1999, S. 522–525.
- Stuchell-Breton, M. D., J. J. Skalicky, C. Kieffer, M. A. Karren, S. Ghaffarian, W. I. Sundquist (2007): ESCRT-III recognition by VPS4 ATPases. *Nature* 449, 7163/2007, S. 740–744.
- Stuffers, S., A. Brech, H. Stenmark (2009): ESCRT proteins in physiology and disease. *Experimental cell research* 315, 9/2009, S. 1619–1626.
- Sundquist, W. I., H. L. Schubert, B. N. Kelly, G. C. Hill, J. M. Holton, C. P. Hill (2004): Ubiquitin recognition by the human TSG101 protein. *Molecular cell* 13, 6/2004, S. 783–789.
- Sweeney, N. T., J. E. Brenman, Y. N. Jan, F.-B. Gao (2006): The coiled-coil protein shrub controls neuronal morphogenesis in *Drosophila*. *Current biology : CB* 16, 10/2006, S. 1006–1011.
- Szewczyk, B., P. R. Albert, A. Rogaeva, H. Fitzgibbon, W. L. May, G. Rajkowska, J. J. Miguel-Hidalgo, C. A. Stockmeier, W. L. Woolverton, P. B. Kyle, Z. Wang, M. C. Austin (2010): Decreased expression of Freud-1/CC2D1A, a transcriptional repressor of the 5-HT1A receptor, in the prefrontal cortex of subjects with major depression. *The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP)* 13, 8/2010, S. 1089–1101.
- Takeuchi, O., S. Akira (2010): Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140, 6/2010, S. 805–820.
- Teis, D., S. Saksena, S. D. Emr (2008): Ordered assembly of the ESCRT-III complex on endosomes is required to sequester cargo during MVB formation. *Developmental cell* 15, 4/2008, S. 578–589.
- Teis, D., S. Saksena, B. L. Judson, S. D. Emr (2010): ESCRT-II coordinates the assembly of ESCRT-III filaments for cargo sorting and multivesicular body vesicle formation. *The EMBO journal* 29, 5/2010, S. 871–883.
- Teo, H., D. J. Gill, J. Sun, O. Perisic, D. B. Veprintsev, Y. Vallis, S. D. Emr, R. L. Williams (2006): ESCRT-I core and ESCRT-II GLUE domain structures reveal role for GLUE in linking to ESCRT-I and membranes. *Cell* 125, 1/2006, S. 99–111.
- Teo, H., O. Perisic, B. González, R. L. Williams (2004): ESCRT-II, an endosome-associated complex required for protein sorting: crystal structure and interactions with ESCRT-III and membranes. *Developmental cell* 7, 4/2004, S. 559–569.

- Thompson, B. J., J. Mathieu, H.-H. Sung, E. Loeser, P. Rørth, S. M. Cohen (2005): Tumor suppressor properties of the ESCRT-II complex component Vps25 in *Drosophila*. *Developmental cell* 9, 5/2005, S. 711–720.
- Tooze, J., M. Hollinshead (1992): In AtT20 and HeLa cells brefeldin A induces the fusion of tubular endosomes and changes their distribution and some of their endocytic properties. *The Journal of cell biology* 118, 4/1992, S. 813–830.
- Troost, T. (2007): Struktur- Funktionsanalyse von Lethal(2)giant disks in *Drosophila*. Diplomarbeit, Köln.
- Troost, T. (2012): Analyse der liganden- unabhängigen Aktivierung des Notch Rezeptors in Igd Mutanten und der liganden-abhängigen Aktivierung des Notch Rezeptors während der Flügelentwicklung in *Drosophila*. Dissertation, Düsseldorf.
- Troost, T., S. Jaeckel, N. Ohlenhard, T. Klein (2012): The tumour suppressor Lethal (2) giant discs is required for the function of the ESCRT-III component Shrub/CHMP4. *Journal of cell science* 125, Pt 3/2012, S. 763–776.
- Tsang, H. T. H., J. W. Connell, S. E. Brown, A. Thompson, E. Reid, C. M. Sanderson (2006): A systematic analysis of human CHMP protein interactions: additional MIT domain-containing proteins bind to multiple components of the human ESCRT III complex. *Genomics* 88, 3/2006, S. 333–346.
- Tveriakhina, L. (2013): Characterization of a conditional knockout mouse model for the Igd ortholog Cc2d1b. Masterarbeit (unpubliziert), Düsseldorf.
- Usami, Y., S. Popov, E. R. Weiss, C. Vriesema-Magnuson, A. Calistri, H. G. Göttlinger (2012): Regulation of CHMP4/ESCRT-III function in human immunodeficiency virus type 1 budding by CC2D1A. *Journal of virology* 86, 7/2012, S. 3746–3756.
- Vaccari, T., D. Bilder (2005): The *Drosophila* tumor suppressor vps25 prevents nonautonomous overproliferation by regulating notch trafficking. *Developmental cell* 9, 5/2005, S. 687–698.
- Vaccari, T., H. Lu, R. Kanwar, M. E. Fortini, D. Bilder (2008): Endosomal entry regulates Notch receptor activation in *Drosophila melanogaster*. *The Journal of cell biology* 180, 4/2008, S. 755–762.
- Vaccari, T., T. E. Rusten, L. Menu, I. P. Nezis, A. Brech, H. Stenmark, D. Bilder (2009): Comparative analysis of ESCRT-I, ESCRT-II and ESCRT-III function in *Drosophila* by efficient isolation of ESCRT mutants. *Journal of cell science* 122, Pt 14/2009, S. 2413–2423.
- Vonderheit, A., A. Helenius (2005): Rab7 associates with early endosomes to mediate sorting and transport of Semliki forest virus to late endosomes. *PLoS biology* 3, 7/2005, S. e233.
- Wang, Q., L. Liu, L. Pei, W. Ju, G. Ahmadian, J. Lu, Y. Wang, F. Liu, Y. T. Wang (2003): Control of synaptic strength, a novel function of Akt. *Neuron* 38, 6/2003, S. 915–928.
- Wang, W., G. Struhl (2005): Distinct roles for Mind bomb, Neuralized and Epsin in mediating DSL endocytosis and signaling in *Drosophila*. *Development (Cambridge, England)* 132, 12/2005, S. 2883–2894.
- Ward, D. M., M. B. Vaughn, S. L. Shiflett, P. L. White, A. L. Pollock, J. Hill, R. Schnegelberger, W. I. Sundquist, J. Kaplan (2005): The role of LIP5 and CHMP5 in multivesicular body formation and HIV-1 budding in mammalian cells. *The Journal of biological chemistry* 280, 11/2005, S. 10548–10555.
- Watson, K. L., R. W. Justice, P. J. Bryant (1994): *Drosophila* in cancer research: the first fifty tumor suppressor genes. *Journal of cell science. Supplement* 18, 1994, S. 19–33.
- Wegner, C. S., C. S. Wegener, L. Malerød, N. M. Pedersen, C. Progida, C. Prodigal, O. Bakke, H. Stenmark, A. Brech (2010): Ultrastructural characterization of giant

- endosomes induced by GTPase-deficient Rab5. *Histochemistry and cell biology* 133, 1/2010, S. 41–55.
- Weigmann, K., R. Klapper, T. Strasser, C. Rickert, G. Technau, H. Jäckle, W. Janning, C. Klämbt (2003): FlyMove--a new way to look at development of *Drosophila*. *Trends in genetics* : TIG 19, 6/2003, S. 310–311.
- Wharton, K. A., K. M. Johansen, T. Xu, S. Artavanis-Tsakonas (1985): Nucleotide sequence from the neurogenic locus notch implies a gene product that shares homology with proteins containing EGF-like repeats. *Cell* 43, 3 Pt 2/1985, S. 567–581.
- Wilkin, M. B., A.-M. Carbery, M. Fostier, H. Aslam, S. L. Mazaleyrat, J. Higgs, A. Myat, D. A. P. Evans, M. Cornell, M. Baron (2004): Regulation of notch endosomal sorting and signaling by *Drosophila* Nedd4 family proteins. *Current biology* : CB 14, 24/2004, S. 2237–2244.
- Wollert, T., J. H. Hurley (2010): Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes. *Nature* 464, 7290/2010, S. 864–869.
- Woods, D. F., P. J. Bryant (1989): Molecular cloning of the lethal(1)discs large-1 oncogene of *Drosophila*. *Developmental biology* 134, 1/1989, S. 222–235.
- Woods, D. F., J. W. Wu, P. J. Bryant (1997): Localization of proteins to the apico-lateral junctions of *Drosophila* epithelia. *Developmental genetics* 20, 2/1997, S. 111–118.
- Xiao, J., X.-W. Chen, B. A. Davies, A. R. Saltiel, D. J. Katzmann, Z. Xu (2009): Structural basis of Ist1 function and Ist1-Did2 interaction in the multivesicular body pathway and cytokinesis. *Molecular biology of the cell* 20, 15/2009, S. 3514–3524.
- Yamada, T., S. Takeuchi, N. Fujita, A. Nakamura, W. Wang, Q. Li, M. Oda, T. Mitsudomi, Y. Yatabe, Y. Sekido, J. Yoshida, M. Higashiyama, M. Noguchi, H. Uehara, Y. Nishioka, S. Sone, S. Yano (2013): Akt kinase-interacting protein1, a novel therapeutic target for lung cancer with EGFR-activating and gatekeeper mutations. *Oncogene* 32, 37/2013, S. 4427–4435.
- Yu, Z., M. D. Gonciarz, W. I. Sundquist, C. P. Hill, G. J. Jensen (2008): Cryo-EM structure of dodecameric Vps4p and its 2:1 complex with Vta1p. *Journal of molecular biology* 377, 2/2008, S. 364–377.
- Zamborlini, A., Y. Usami, S. R. Radoshitzky, E. Popova, G. Palu, H. Göttlinger (2006): Release of autoinhibition converts ESCRT-III components into potent inhibitors of HIV-1 budding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 50/2006, S. 19140–19145.
- Zerial, M., H. McBride (2001): Rab proteins as membrane organizers. *Nature reviews. Molecular cell biology* 2, 2/2001, S. 107–117.
- Zhao, M., X.-D. Li, Z. Chen (2010): CC2D1A, a DM14 and C2 domain protein, activates NF-kappaB through the canonical pathway. *The Journal of biological chemistry* 285, 32/2010, S. 24372–24380.
- Zhao, M., J. Raino, Z. J. Chen, E. T. Kavalali (2011): Cc2d1a, a C2 domain containing protein linked to nonsyndromic mental retardation, controls functional maturation of central synapses. *Journal of neurophysiology* 105, 4/2011, S. 1506–1515.

7 Anhang

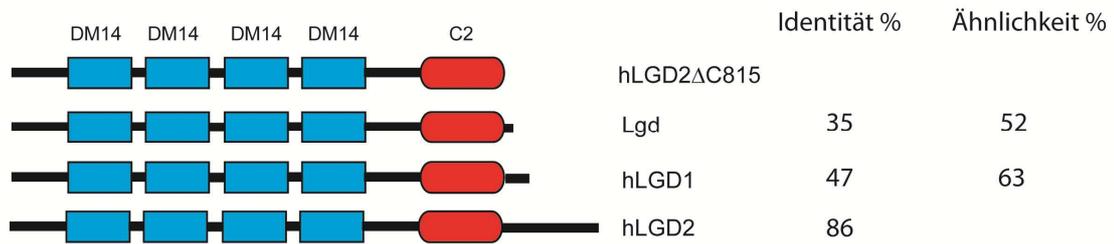


Abb. 7.1: Sequenzvergleich der hLGDs und Lgd mit hLGD2ΔC815. Schematische Darstellung der Proteine mit Prozentangabe der identischen und ähnlichen Aminosäuren. Die Analyse der Sequenzen erfolgte auf der EMBL-EBI Internetseite nach dem Needleman-Wunsch Algorithmus (EMBL-EBI).

w; ptc Gal4; tubP Rab5-CFP, tubP Rab7-YFP
w; If/Cyo; UAS-X

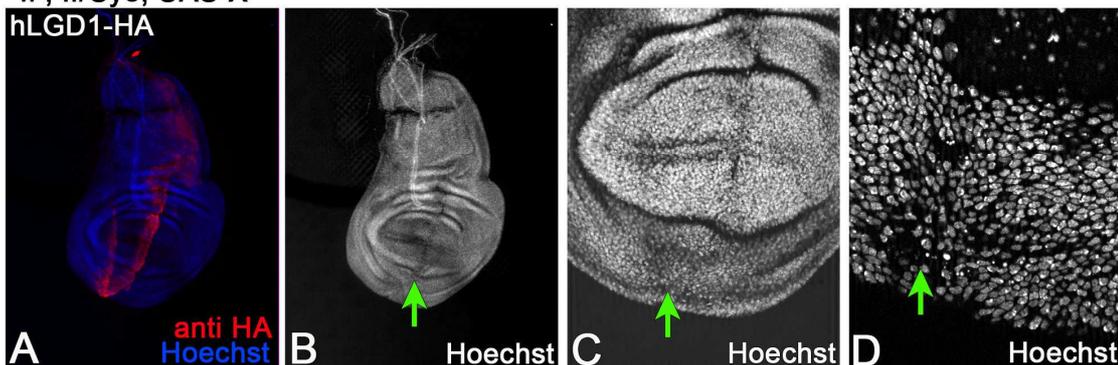


Abb. 7.2: Untersuchung des frühen und späten endosomalen Transportes bei Überexpression von hLGD1-HA. A: Übersicht der hLGD1 Expression, sowie der Kernfärbung im *ptc*-Streifen. B-D: Kernfärbung in verschiedenen Vergrößerungen. Die Expression von hLGD1 führt zu Apoptose. Die grünen Pfeile kennzeichnen die Apoptose im *ptc*-Streifen.

w; *ptc* Gal4; tubP Rab5-CFP, tubP Rab7-YFP

w; *lf/Cyo*; UAS-X

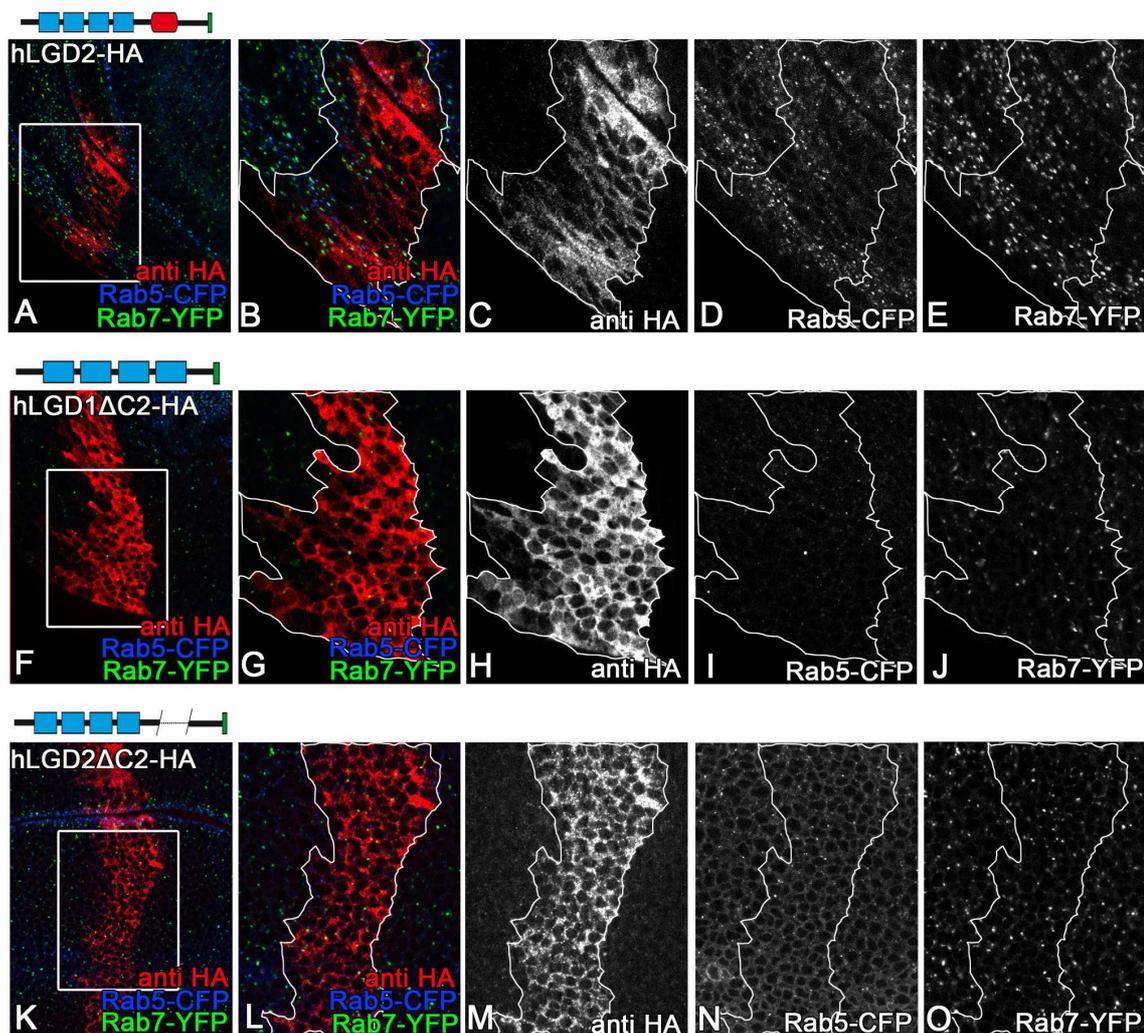


Abb. 7.3: Einfluss der Expression von hLGD2 und der hLGD Δ C2s auf den endosomalen Transportweg. Die Konstrukte wurden im *ptc*-Streifen überexprimiert. Der Genotyp der analysierten Fliegen steht oberhalb der Abbildung. A-B, F-G, K-L: Übersicht über die Expression der Konstrukte im *ptc*-Streifen in verschiedenen Vergrößerungen inklusive der Rab5-CFP und Rab7-YFP Färbung. Der weiße Kasten kennzeichnet den vergrößerten Bereich. C, H, M: Detektion der exprimierten Konstrukte. D, I, N: Rab5-CFP Färbung. E, J, O: Rab7-YFP Färbung. Es ist keine Veränderung der endosomalen Marker zu beobachten.

Tab. 7.1: Auflistung der berechneten sowie der tatsächlichen Proteingrößen. Bei hLGD2 Δ DM14 konnte kein Protein detektiert werden (x).

	berechnete Proteingröße	tatsächliche Proteingröße
hLGD1	94	130
hLGD1 Δ DM14	49	65
hLGD1 Δ DM14(1-2)	76	110
hLGD1 Δ DM14(3-4)	73	100
hLGD1 Δ C2	76	120
hLGD1 ^{MR}	52	72
hLGD1DM14(1-3)	48	70
hLGD2	104	110
hLGD2 Δ DM14	61	x
hLGD2 Δ C2	87	100
hLGD2 Δ C815	90	100
hLGD2 ^{MR}	47	62
hLGD2DM14(1-3)	45	60
Lgd	89	125
Lgd ^{MR}	50	75
LgdDM14(1-3)	46	73

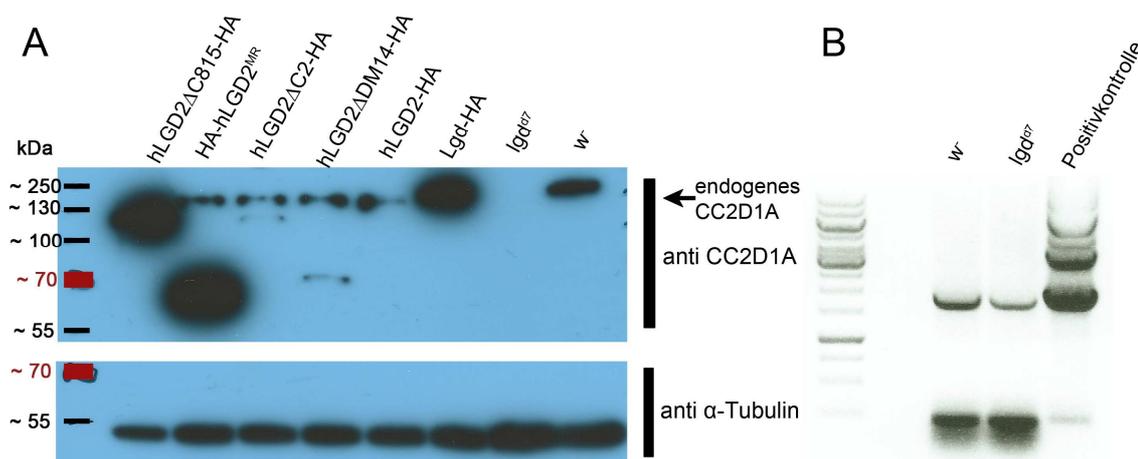


Abb. 7.4: Analyse der hLGD2 Deletionskonstrukte in einem Western Blot sowie die Untersuchung der Genotypisierungs-PCR. A: Es wurde Proteinlysate von jeweils zwei Larven verwendet. Die Konstrukte wurden unter dem UAS-Promotor exprimiert. Die Detektion der Konstrukte erfolgte mittels des CC2D1A Antikörpers (1:2000 von Abnova) (Belichtungszeit: 30 Min). Als Ladekontrolle diente Tubulin (α -Tubulin: 1:10.000) (Belichtungszeit: 10 Min). In dem Proteinlysate aus w Fliegen wurde endogenes Lgd detektiert. Dies ist auch bei den Deletionskonstrukten von hLGD2 bei circa 130 kDa erkennbar. hLGD2 Δ DM14 kann durch den CC2D1A Antikörper detektiert werden. hLGD2 Δ C2 und hLGD2 Δ DM14 werden deutlich schwächer als die anderen Deletionskonstrukte exprimiert. B: Es wurde eine Genotypisierungs-

PCR mit genomischer DNA aus Fliegen durchgeführt, welche hLGD2 Δ DM14 unter dem endogenen Promotor exprimieren. Es wurden sowohl Fliegen im wildtypischem als auch im *Igd* mutantern Hintergrund verwendet. Als Positivkontrolle diente der Vektor, welcher in die Fliegen injiziert wurde. Es ist eine Bande bei circa 1,5 kb zu erkennen. Dies belegt, dass hLGD2 Δ DM14 ins Fliegen-genom integriert wurde.

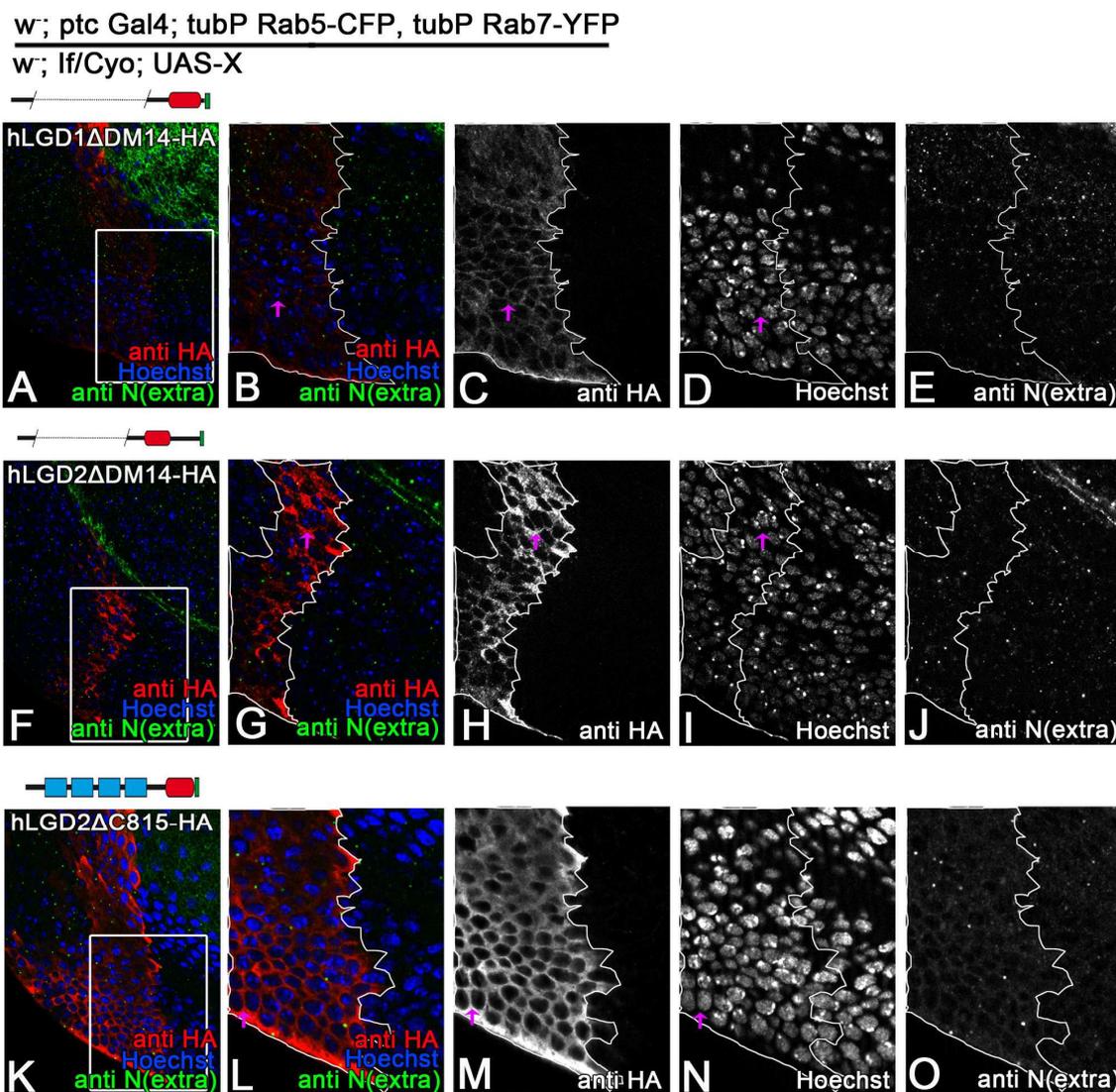


Abb. 7.5: Analyse der Lokalisation der hLGD Δ DM14s und von hLGD2 Δ C815. Die Konstrukte wurden im *ptc*-Streifen überexprimiert. Der Genotyp der analysierten Fliegen steht oben links in der Abbildung. A-B, F-G, K-L: Übersicht über die Expression der Konstrukte im *ptc*-Streifen in verschiedenen Vergrößerungen inklusive der Kern- und N(extra) Färbung. Der weiße Kasten kennzeichnet den vergrößerten Bereich. C, H, M: Detektion der exprimierten Konstrukte. D, I, N: Kernfärbung. E, J, O: N(extra) Färbung. Sowohl die hLGD Δ DM14s als auch hLGD2 Δ C815 sind cytoplasmatisch lokalisiert.



Abb. 7.6: Genetische Interaktion zwischen hLGD2 und hLGD1, bzw. Lgd. A: wildtypische Fliege. B: Fliege, welche homozygot hLGD2 exprimiert. C: Fliege, welche homozygot hLGD1ΔDM14(1-2) exprimiert. D: Fliege, welche homozygot hLGD1ΔDM14(3-4) exprimiert. E: Fliege, welche homozygot NES-LgdΔC2 (68+86) exprimiert. F: Heterozygote Expression von hLGD2 und hLGD1ΔDM14(1-2). G: Heterozygote Expression von hLGD2 und hLGD1ΔDM14(3-4). Der weiße Pfeil kennzeichnet eine zusätzliche Makrochaete. H: Heterozygote Expression von hLGD2 und NES-LgdΔC2 (68+86). Die Fliegen in B-E sterben als „pharate adult“. Aus den Fliegen in F-H entwickeln sich adulte Tiere, welche jedoch nicht fertil sind.

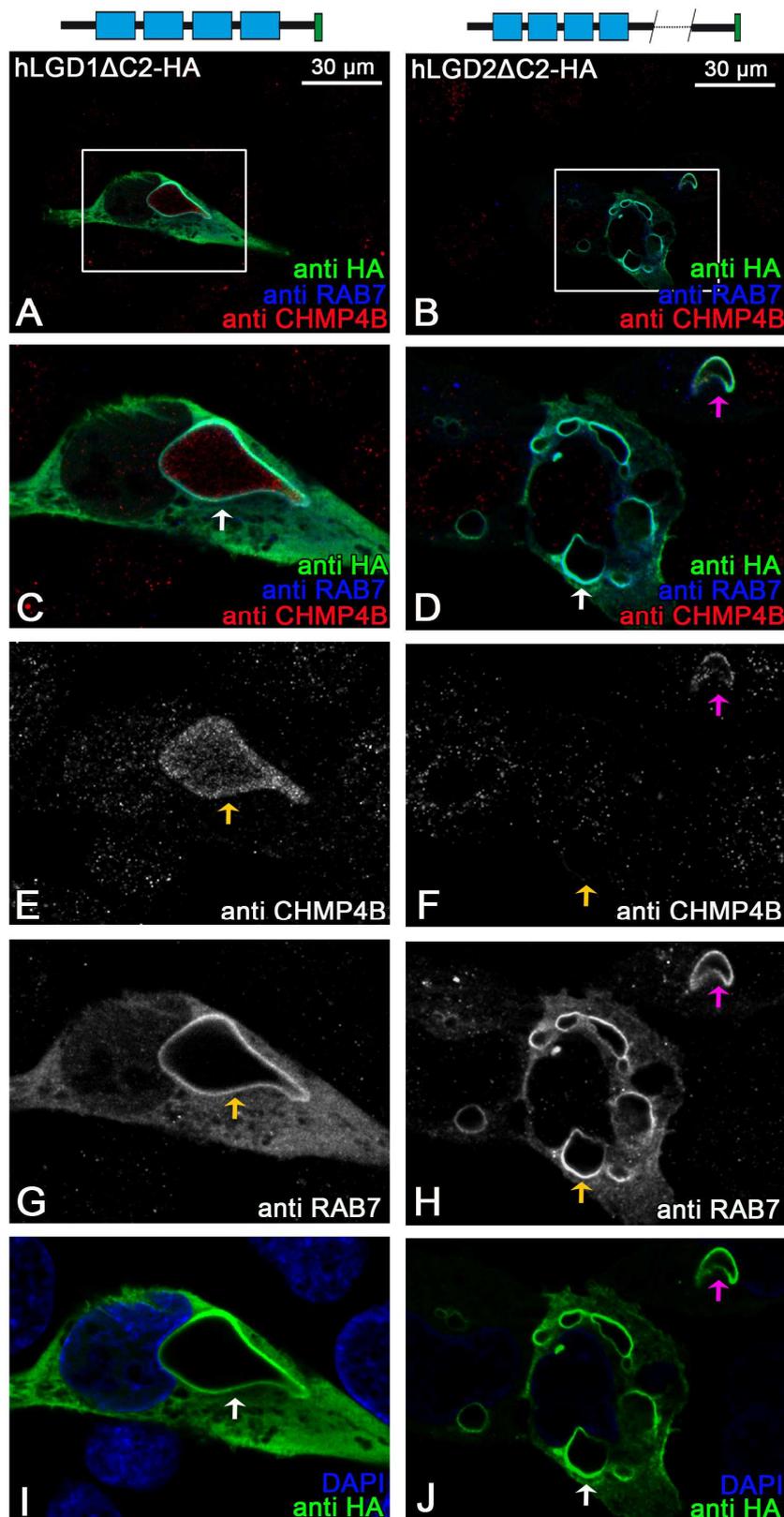


Abb. 7.7: Expression der hLGD Δ C2s in humanen U2OS Zellen. A-D: Übersicht der HA-Färbung, sowie der RAB7 und CHMP4B Färbung. E-F: CHMP4B Färbung. G-H: RAB7 Färbung (spät endosomaler Marker). I-J: HA- und Kernfärbung. Die Expression der hLGD Δ C2s führt zu stark vergrößerten späten Endosomen (Pfeile). Bei der Expression von hLGD1 Δ C2 befindet sich CHMP4B in den stark vergrößerten späten Endosomen (E). Bei der Expression von hLGD2 Δ C2 ist CHMP4B entweder an der Vesikelmembran (pinker Pfeil) oder unabhängig von den Vesikeln lokalisiert (gelber Pfeil) (F).

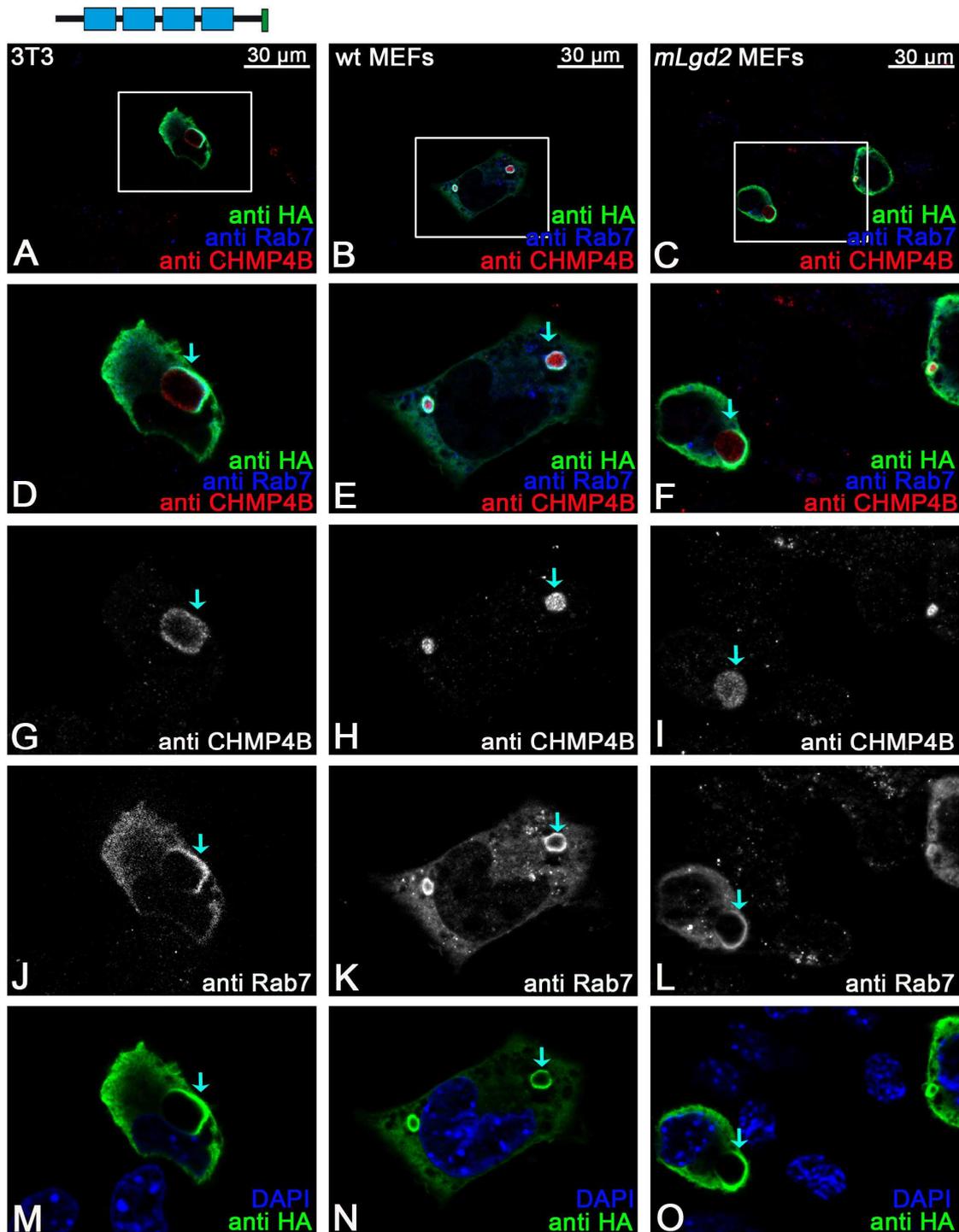


Abb. 7.8: Expression von hLGD1 Δ C2 in murinen Zellen. hLGD1 Δ C2 wurde in 3T3 Zellen sowie in wt und *mLgd2* defizienten MEFs exprimiert. A-F: Übersicht der HA-Färbung, sowie der RAB7 und CHMP4B Färbung. G-I: CHMP4B Färbung. J-L: RAB7 Färbung (spät endosomaler Marker). M-O: HA- und Kernfärbung. Die Expression von hLGD1 Δ C2s führt auch in murinen Zellen zu stark vergrößerten späten Endosomen (Pfeile). Dabei befindet sich CHMP4B in den stark vergrößerten späten Endosomen (G-I).

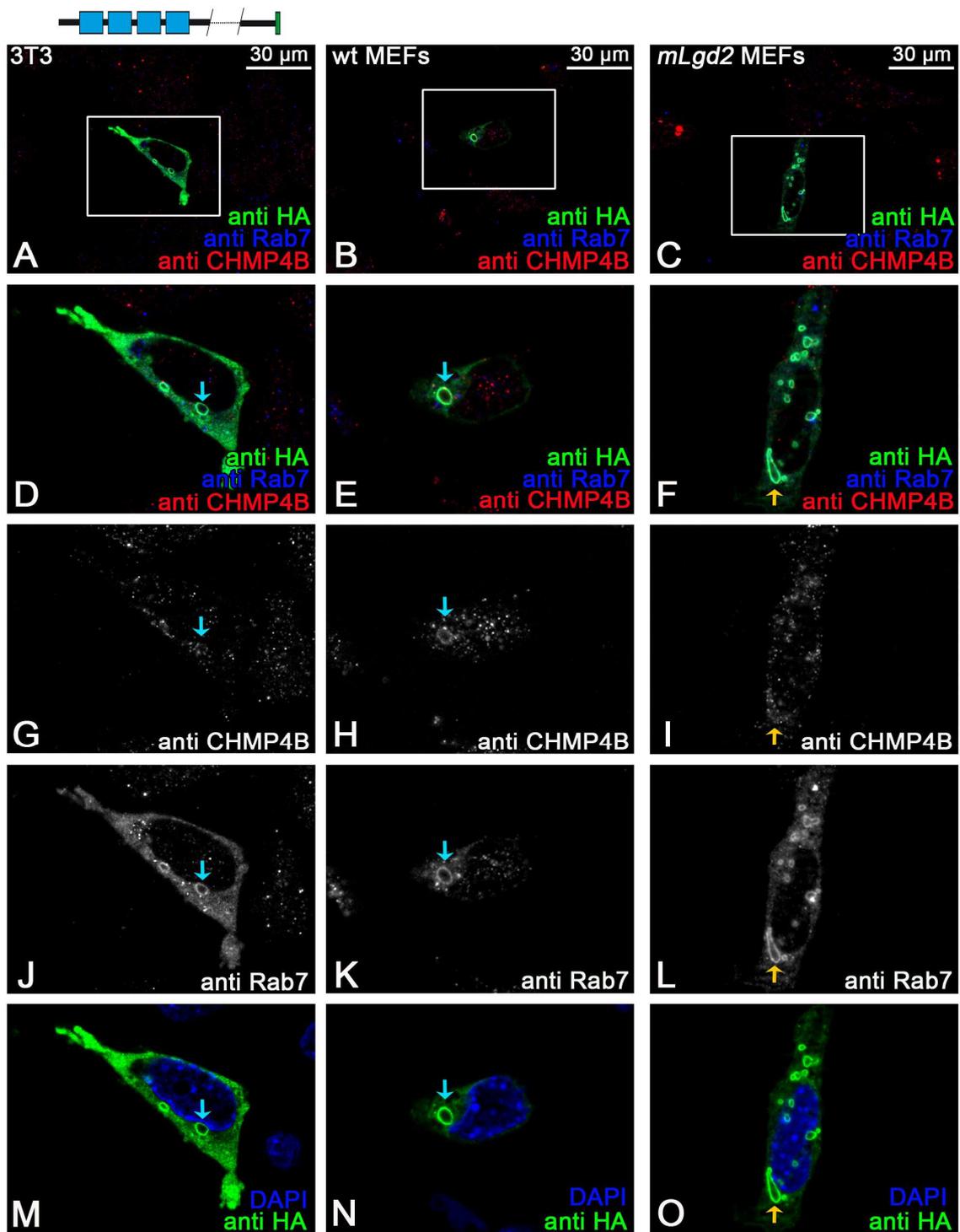


Abb. 7.9: Expression von hLGD2 Δ C2 in murinen Zellen. hLGD2 Δ C2 wurde in 3T3 Zellen sowie in wt und *mLgd2* defizienten MEFs exprimiert. A-F: Übersicht der HA-Färbung, sowie der RAB7 und CHMP4B Färbung. G-I: CHMP4B Färbung. J-L: RAB7 Färbung (spät endosomaler Marker). M-O: HA- und Kernfärbung. Die Expression von hLGD2 Δ C2s führt auch in murinen Zellen zu stark vergrößerten späten Endosomen (Pfeile). Dabei befindet sich CHMP4B an der Membran der stark vergrößerten späten Endosomen (türkiser Pfeil) oder in den Vesikeln (gelber Pfeil) (G-I).

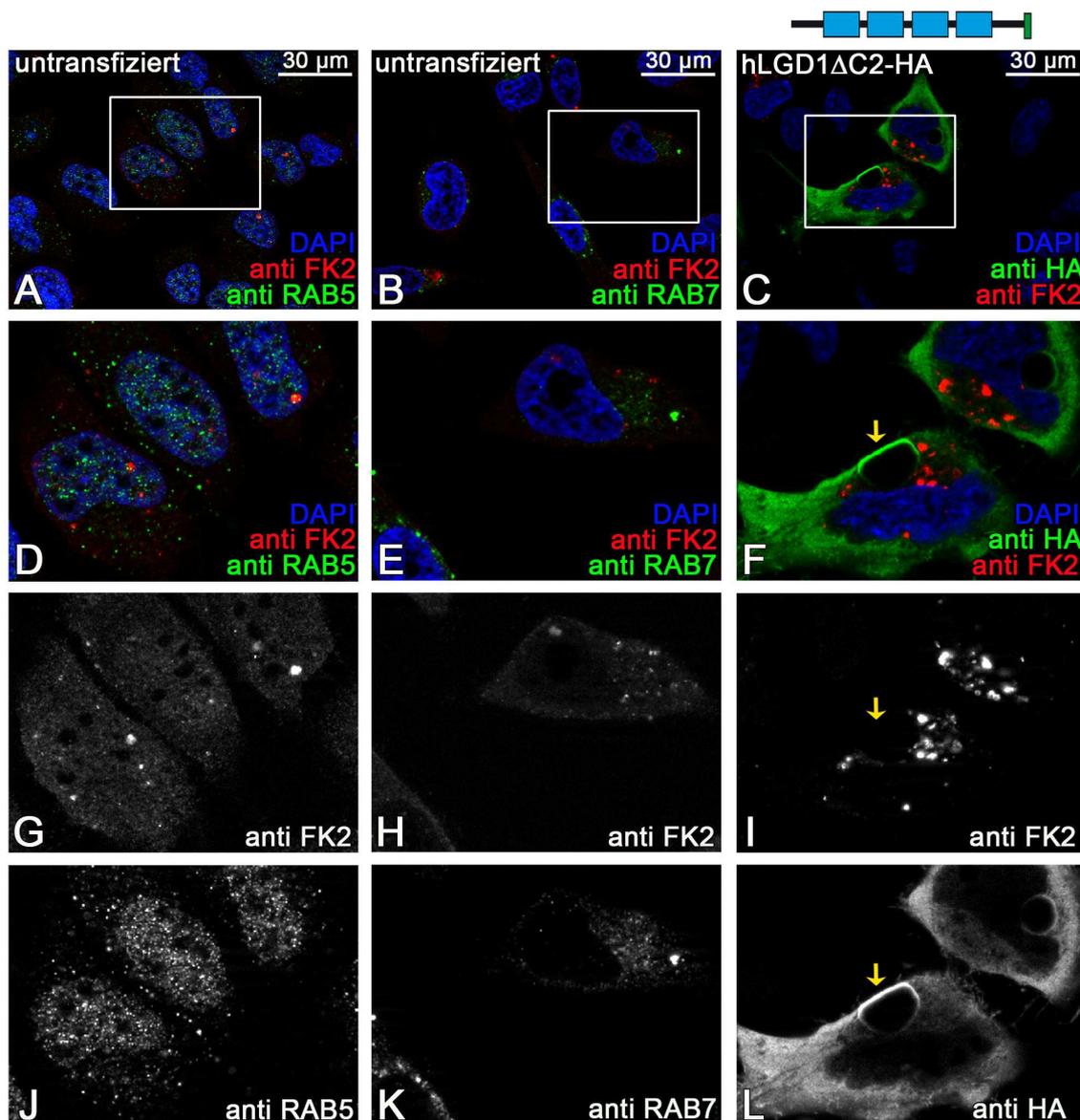


Abb. 7.10: Untransfizierte HeLa Zellen sowie die Expression von hLGD1ΔC2-HA in HeLa Zellen und die Markierung der ubiquitinierten Proteine mittels des FK2 Antikörpers. A: zeigt eine Übersicht der ubiquitinierten Proteine, die Kernfärbung sowie die Markierung des frühen endosomalen Transportes mittels RAB5 in untransfizierten Zellen. B: zeigt eine Übersicht der ubiquitinierten Proteine, die Kernfärbung sowie die Markierung des spät endosomalen Transportes mittels RAB7 in untransfizierten Zellen. C: Übersicht der hLGD1ΔC2-HA Expression sowie Markierung der Kerne und ubiquitiniertes Proteine. D-F: vergrößerte Ausschnitte aus A-C. G-I: vergrößerte Ausschnitte zeigen die Färbung der ubiquitinierten Proteine alleine. J: RAB5 Färbung. K: RAB7 Färbung. L: Markierung von hLGD1ΔC2-HA. Die ubiquitinierten Proteine sind weder mit RAB5 noch mit RAB7 assoziiert. Die ubiquitinierten Proteine scheinen nicht an der Membran der stark vergrößerten hLGD1ΔC2-HA positiven Vesikel lokalisiert zu sein (I, gelber Pfeil).

w; *ptc* Gal4; tubP Rab5-CFP, tubP Rab7-YFP
 w; *If/Cyo*; UAS-X

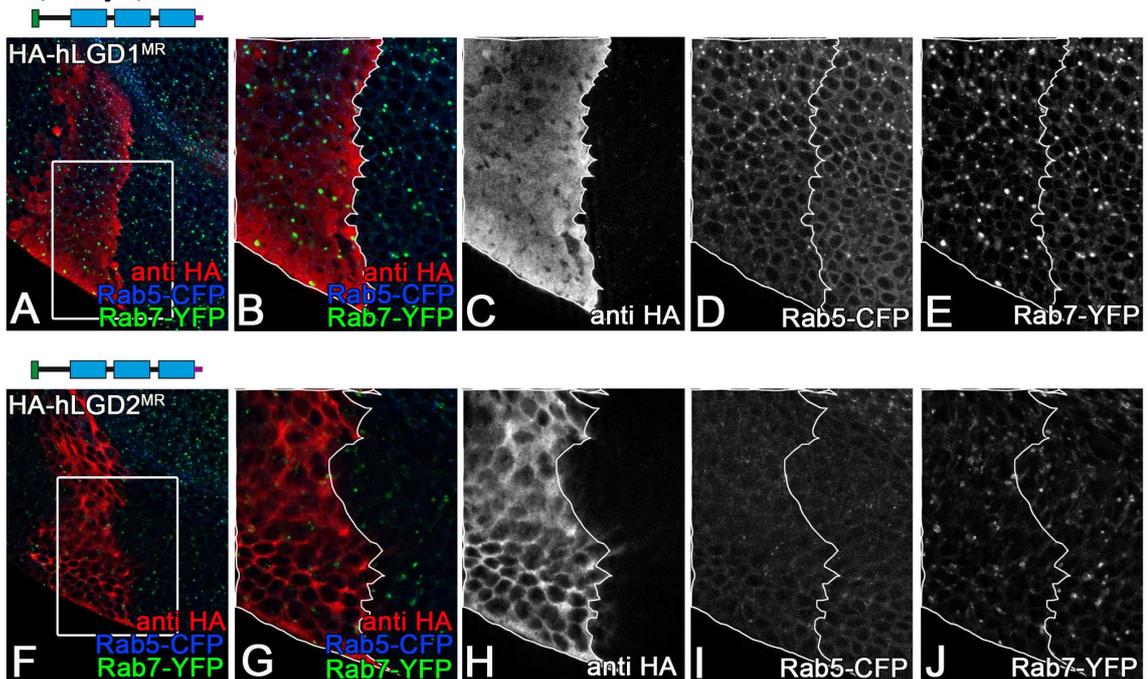


Abb. 7.11: Einfluss der Expression von hLGD1^{MR} sowie hLGD2^{MR} auf den endosomalen Transportweg. Die Konstrukte wurden im *ptc*-Streifen überexprimiert. Der Genotyp der analysierten Fliegen steht oben links in der Abbildung. A-B, F-G: Übersicht über die Expression der Konstrukte im *ptc*-Streifen in verschiedenen Vergrößerungen inklusive der Rab5-CFP und Rab7-YFP Färbung. Der weiße Kasten kennzeichnet den vergrößerten Bereich. C, H: Detektion der exprimierten Konstrukte. D, I: Rab5-CFP Färbung. E, J: Rab7-YFP Färbung. Es ist keine Veränderung der endosomalen Marker zu beobachten.

w; ptc Gal4; tubP Rab5-CFP, tubP Rab7-YFP
w; lf/Cyo; UAS-X

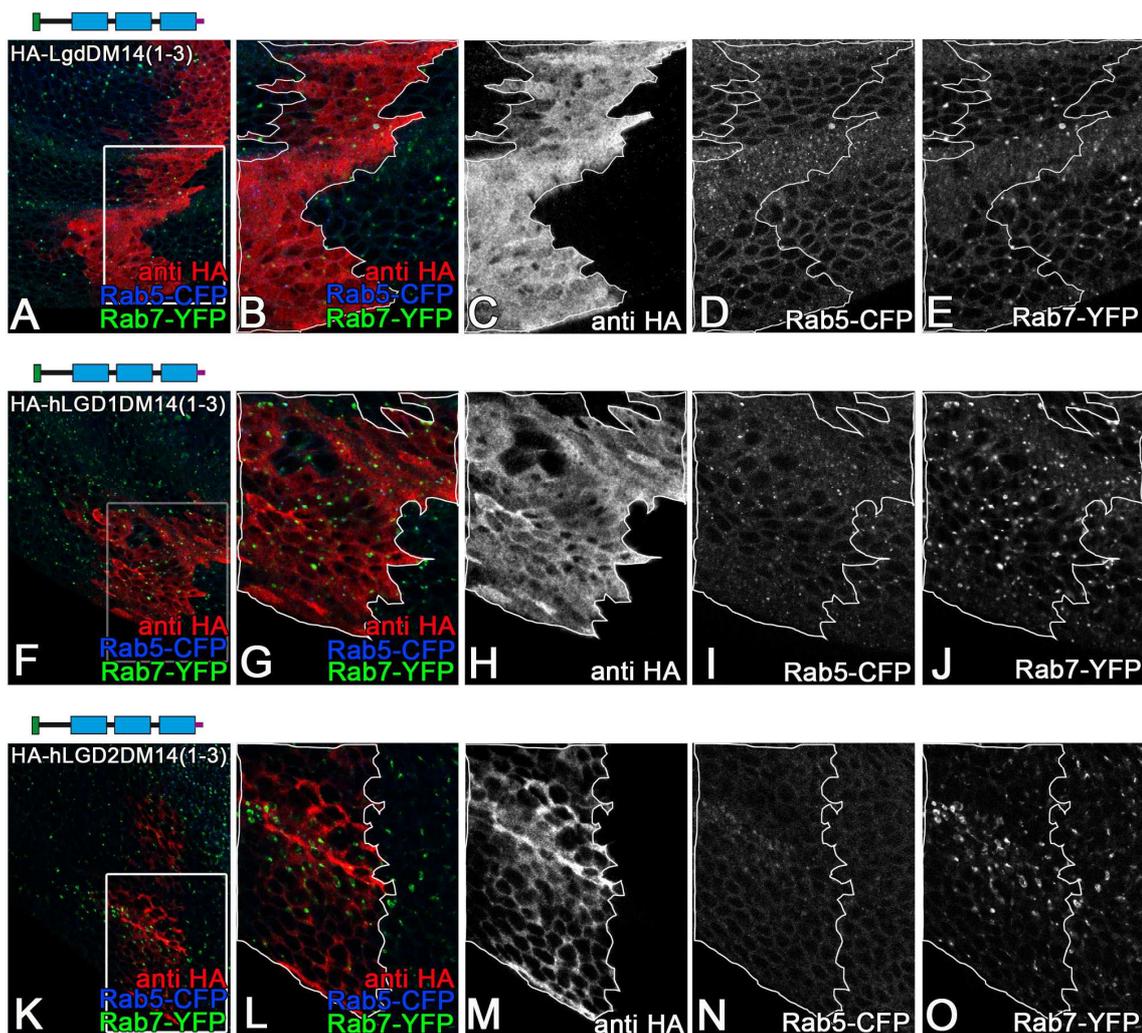


Abb. 7.12: Einfluss der Expression von LgdDM14(1-3), hLGD1DM14(1-3) sowie hLGD2DM14(1-3) auf den endosomalen Transportweg. Die Konstrukte wurden im *ptc*-Streifen überexprimiert. Der Genotyp der analysierten Fliegen steht oben links in der Abbildung. A-B, F-G, K-L: Übersicht über die Expression der Konstrukte im *ptc*-Streifen in verschiedenen Vergrößerungen inklusive der Rab5-CFP und Rab7-YFP Färbung. Der weiße Kasten kennzeichnet den vergrößerten Bereich. C, H, M: Detektion der exprimierten Konstrukte. D, I, N: Rab5-CFP Färbung. E, J, O: Rab7-YFP Färbung. Es ist keine Veränderung der endosomalen Marker zu beobachten.

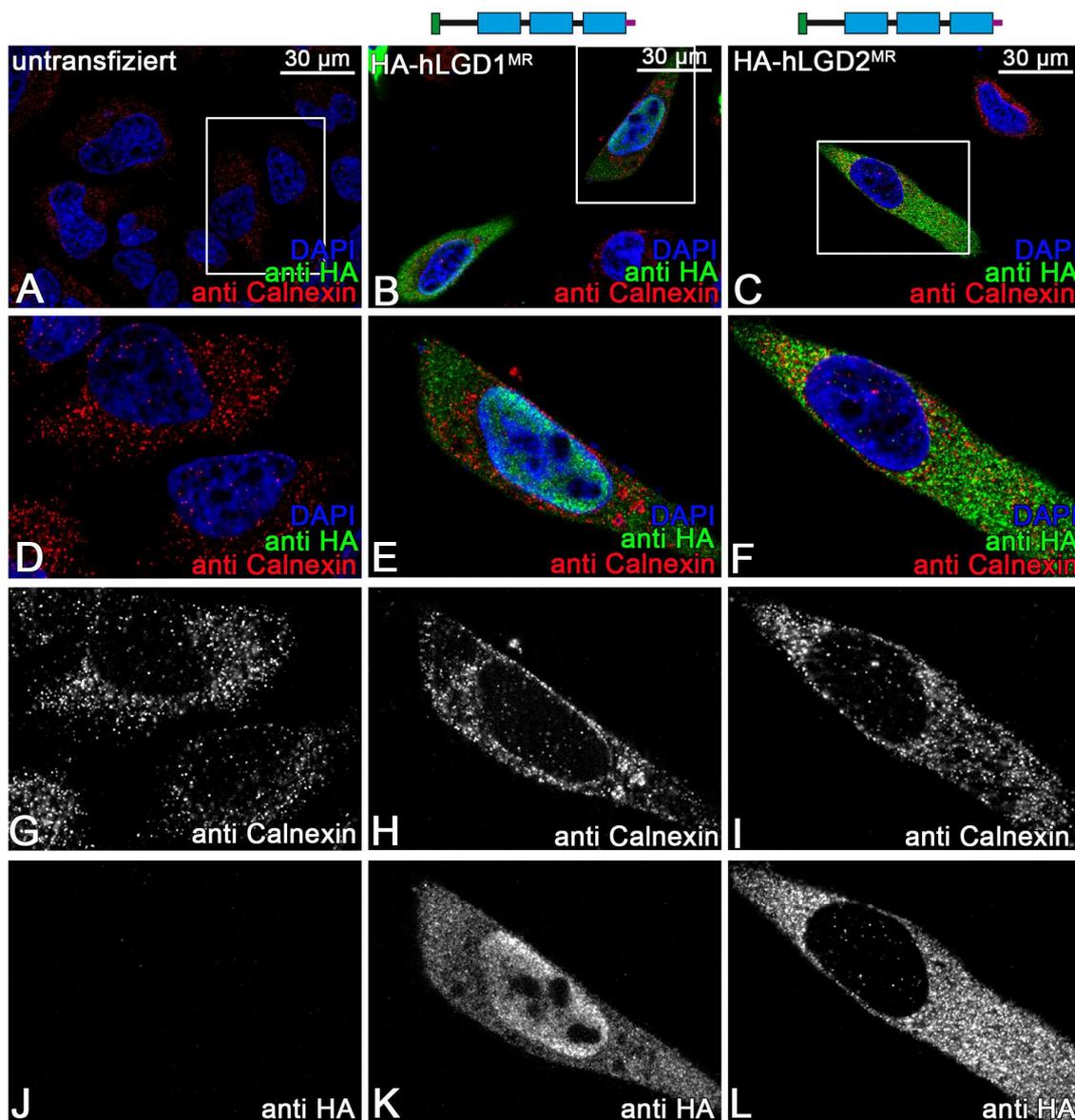


Abb. 7.13: Expression von HA-hLGD^{MR} sowie die untransfizierte Kontrolle und Markierung von Calnexin in HeLa Zellen. A-C: Übersicht der untransfizierten Kontrolle sowie der exprimierten HA-hLGD^{MR} mit der Markierung von Calnexin. D-F: vergrößerter Ausschnitt. G-I: vergrößerter Ausschnitt der Calnexin Färbung. J-L: vergrößerte Ausschnitte der HA Färbung der untransfizierten Kontrolle sowie der HA-hLGD^{MR} exprimierenden Zellen. Calnexin ist punktuell im Cytoplasma verteilt. Die HA-hLGD^{MR}s sind nicht mit dem ER-Marker Calnexin assoziiert.

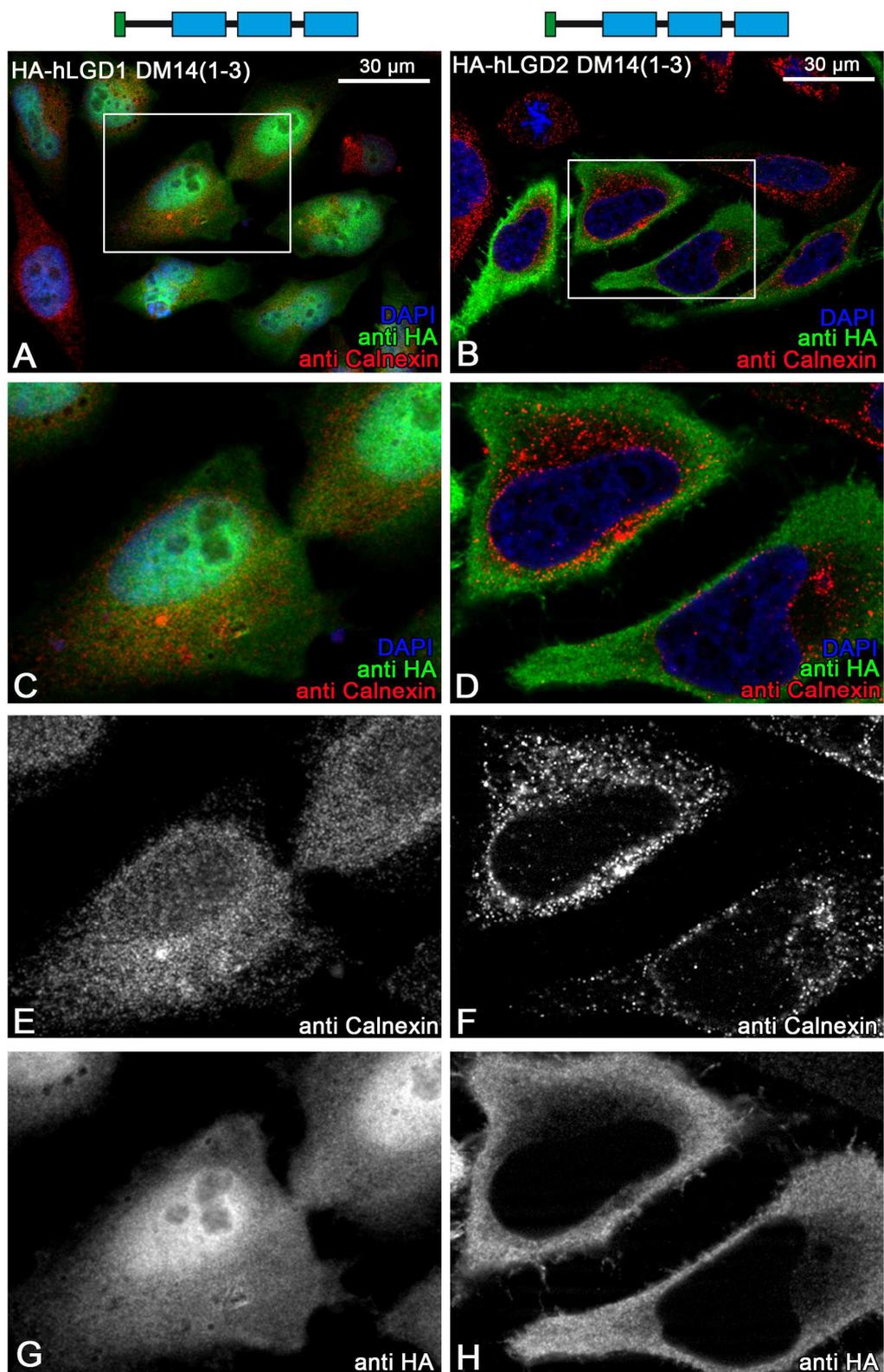


Abb. 7.14: Expression von HA-hLGD1DM14(1-3) und HA-hLGD2DM14(1-3) und Markierung von Calnexin in HeLa Zellen. A-B: Übersicht des exprimierten HA-hLGD1DM14(1-3) und HA-hLGD2DM14(1-3) mit der Markierung von Calnexin. C-D: vergrößerter Ausschnitt. E-F: vergrößerter Ausschnitt der Calnexin Färbung. G-H: vergrößerte Ausschnitte der HA Färbung. HA-hLGD1DM14(1-3) und HA-hLGD2DM14(1-3) sind nicht mit dem ER-Marker Calnexin assoziiert.

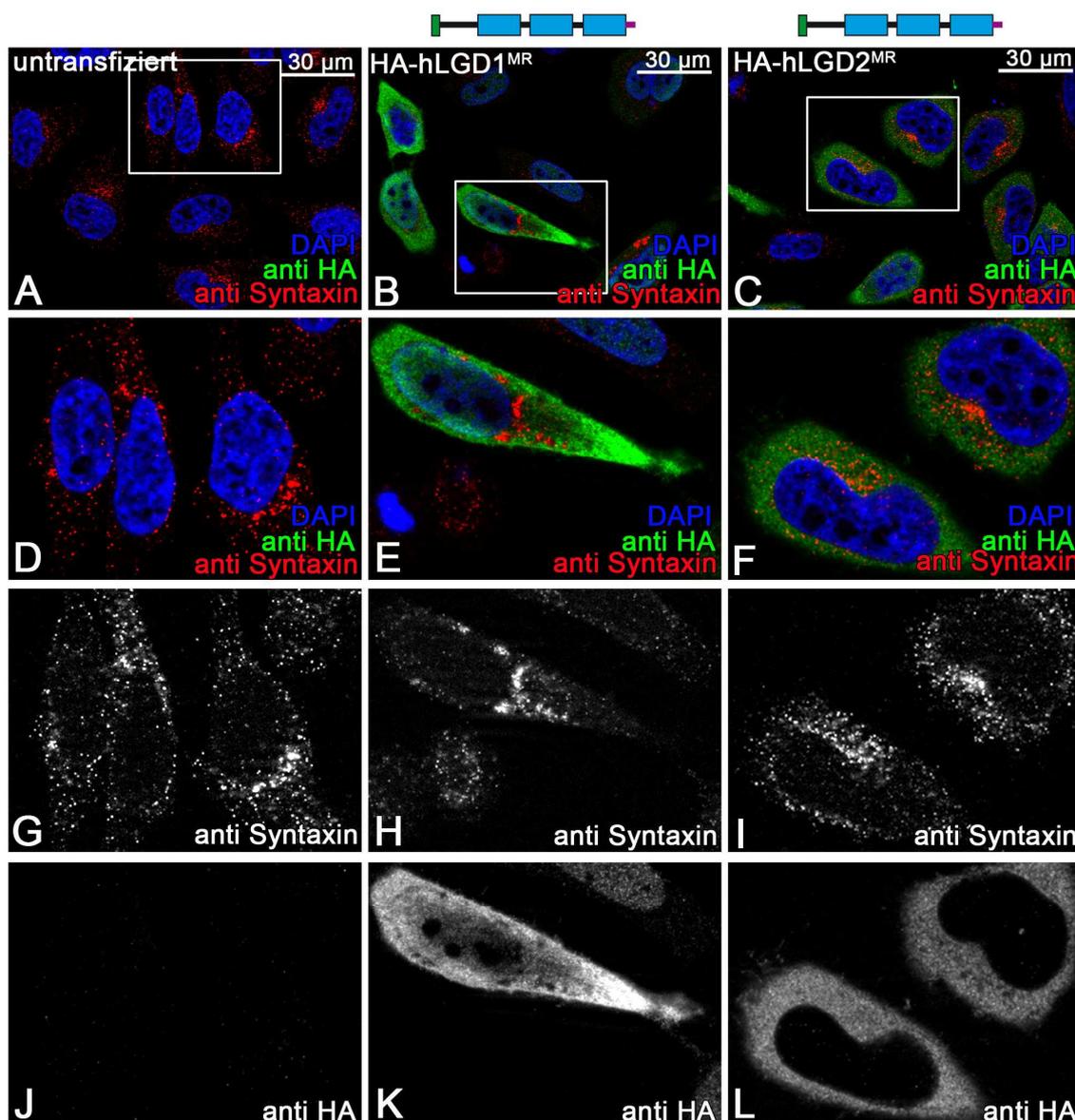


Abb. 7.15: Expression von HA-hLGD^{MR} sowie die untransfizierte Kontrolle und Markierung von Syntaxin in HeLa Zellen. A-C: Übersicht der untransfizierten Kontrolle sowie der exprimierten HA-hLGD^{MR} mit der Markierung von Syntaxin. D-F: vergrößerter Ausschnitt. G-I: vergrößerter Ausschnitt der Syntaxin Färbung. J-L: vergrößerte Ausschnitte der HA Färbung der untransfizierten Kontrolle sowie der HA-hLGD^{MR} exprimierenden Zellen. Syntaxin ist punktuell im Cytoplasma verteilt. Die HA-hLGD^{MR}s sind nicht mit dem Golgi-Marker Syntaxin assoziiert.

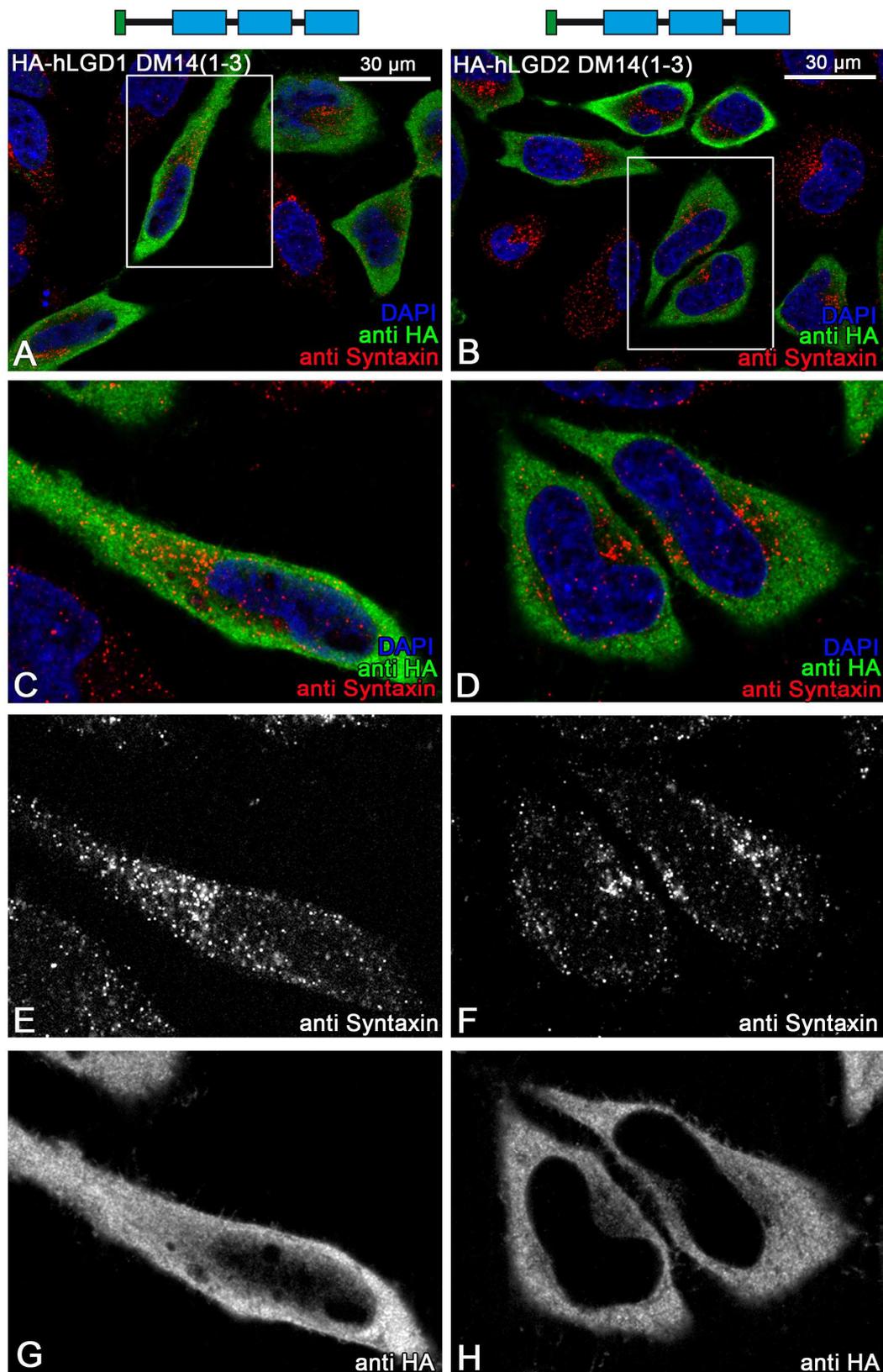


Abb. 7.16: Expression von HA-hLGD1DM14(1-3) und HA-hLGD2DM14(1-3) und Markierung von Syntaxin in HeLa Zellen. A-B: Übersicht des exprimierten HA-hLGD1DM14(1-3) und HA-hLGD2DM14(1-3) mit der Markierung von Syntaxin. C-D: vergrößerter Ausschnitt. E-F: vergrößerter Ausschnitt der Syntaxin Färbung. G-H: vergrößerte Ausschnitte der HA Färbung. HA-hLGD1DM14(1-3) und HA-hLGD2DM14(1-3) sind nicht mit Syntaxin assoziiert.

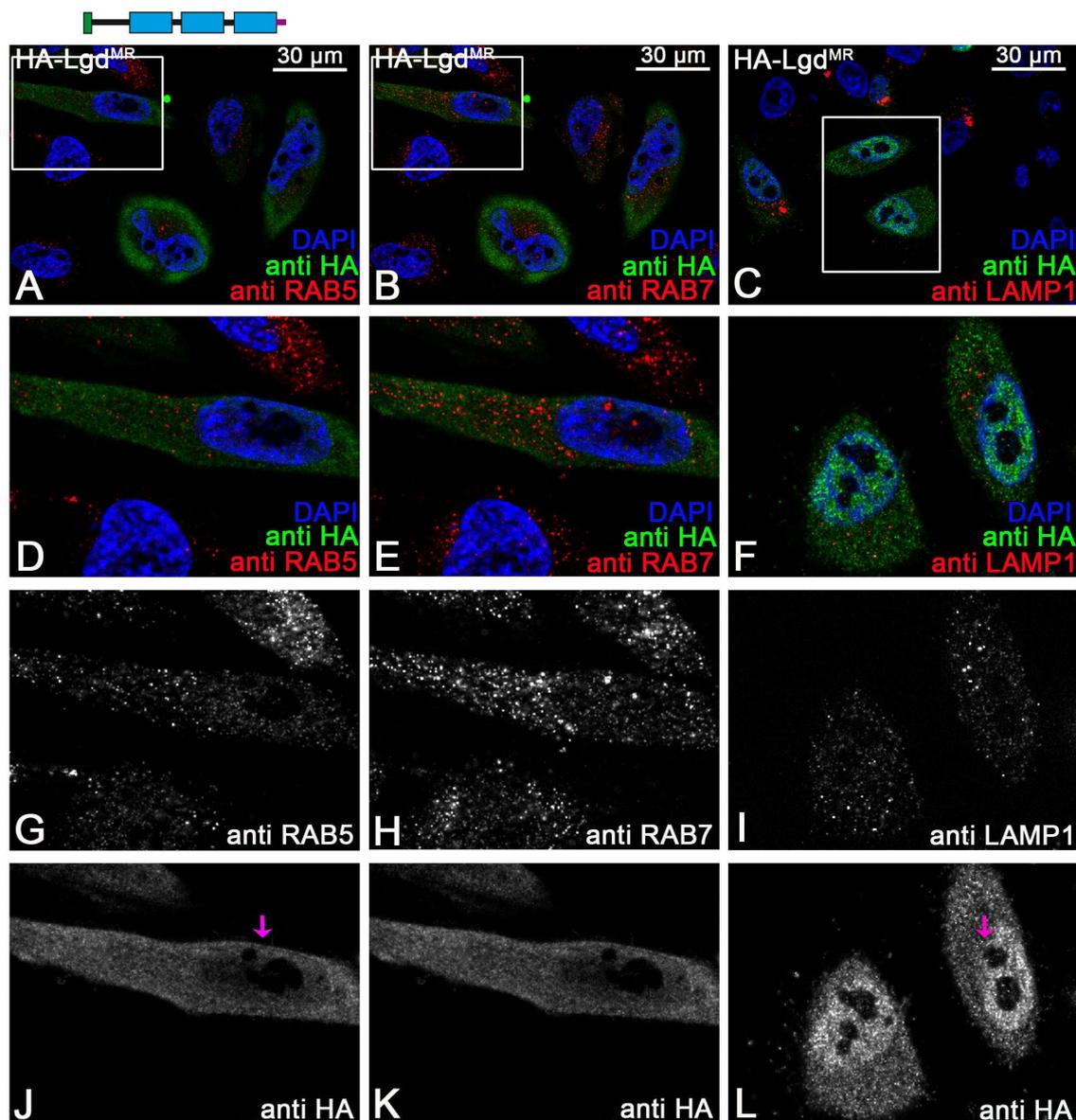


Abb. 7.17: Expression von HA-Lgd^{MR} und Markierung der endosomalen Marker in HeLa Zellen. A-C: Übersicht des exprimierten HA-Lgd^{MR} mit der jeweiligen Färbung der endosomalen Marker. D-F: vergrößerter Ausschnitt, welcher die Färbung der endosomalen Marker sowie die HA- und Kernfärbung zeigt. G: vergrößerter Ausschnitt der RAB5 Färbung. H: vergrößerter Ausschnitt der RAB7 Färbung. I: vergrößerter Ausschnitt der LAMP1 Färbung. J-L: vergrößerte Ausschnitte der HA Färbung der HA-Lgd^{MR} exprimierenden Zellen. HA-Lgd^{MR} ist sowohl im Cytoplasma als auch im Kern lokalisiert und ist nicht mit endosomalen Markern assoziiert.

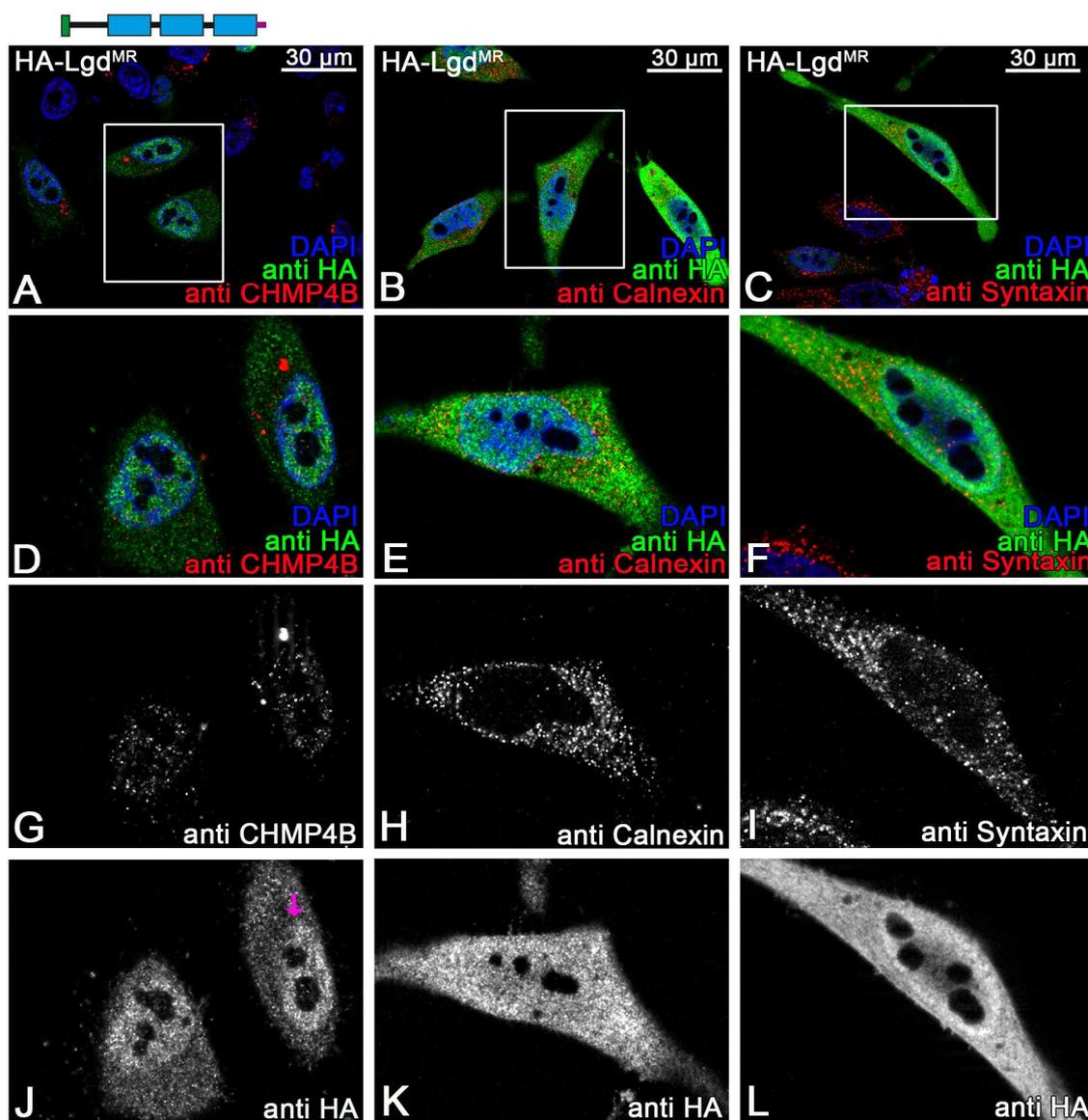


Abb. 7.18: Expression von HA-Lgd^{MR} und Markierung von CHMP4B, Calnexin sowie Syntaxin in HeLa Zellen. A-C: Übersicht des exprimierten HA-Lgd^{MR} mit der jeweiligen Markierung. D-F: vergrößerter Ausschnitt, welcher die Färbung der endosomalen Marker sowie die HA- und Kernfärbung zeigt. G: vergrößerter Ausschnitt der CHMP4B Färbung. H: vergrößerter Ausschnitt der Calnexin Färbung. I: vergrößerter Ausschnitt der Syntaxin Färbung. J-L: vergrößerte Ausschnitte der HA Färbung der HA-Lgd^{MR} exprimierenden Zellen. HA-Lgd^{MR} ist weder mit CHMP4B noch mit dem ER-Marker Calnexin noch mit dem Golgi-Marker Syntaxin assoziiert.

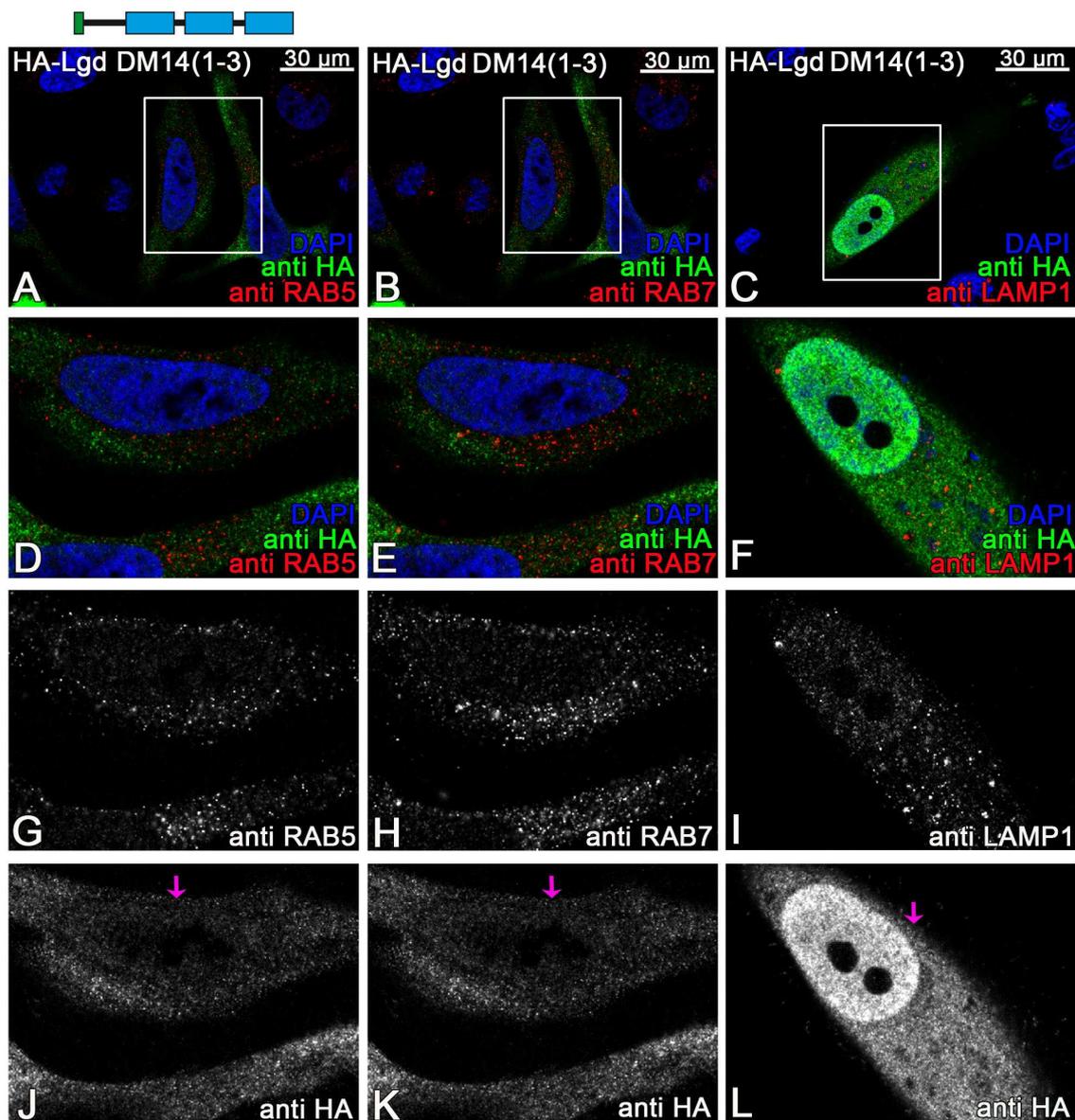


Abb. 7.19: Expression von HA-LgdDM14(1-3) und Markierung der endosomalen Marker in HeLa Zellen. A-C: Übersicht des exprimierten HA-LgdDM14(1-3) mit der jeweiligen Färbung der endosomalen Marker. D-F: vergrößerter Ausschnitt, welcher die Färbung der endosomalen Marker sowie die HA- und Kernfärbung zeigt. G: vergrößerter Ausschnitt der RAB5 Färbung. H: vergrößerter Ausschnitt der RAB7 Färbung. I: vergrößerter Ausschnitt der LAMP1 Färbung. J-L: vergrößerte Ausschnitte der HA Färbung der HA-LgdDM14(1-3) exprimierenden Zellen. HA-LgdDM14(1-3) ist sowohl im Cytoplasma als auch im Kern lokalisiert und ist nicht mit endosomalen Markern assoziiert.

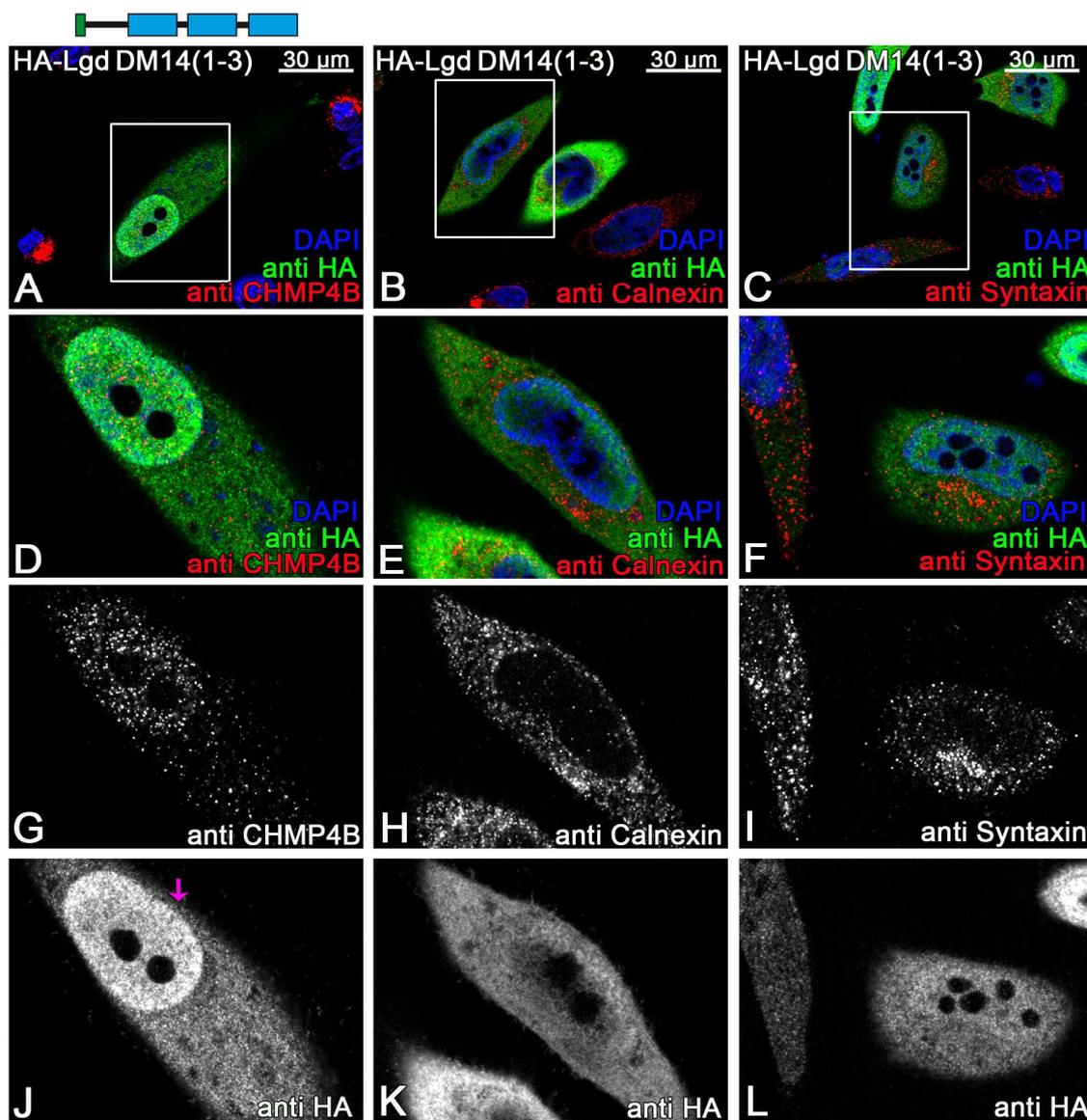


Abb. 7.20: Expression von HA-LgdDM14(1-3) und Markierung von CHMP4B, Calnexin sowie Syntaxin in HeLa Zellen. A-C: Übersicht des exprimierten HA-LgdDM14(1-3) mit der jeweiligen Markierung. D-F: vergrößerter Ausschnitt, welcher die Färbung der endosomalen Marker sowie die HA- und Kernfärbung zeigt. G: vergrößerter Ausschnitt der CHMP4B Färbung. H: vergrößerter Ausschnitt der Calnexin Färbung. I: vergrößerter Ausschnitt der Syntaxin Färbung. J-L: vergrößerte Ausschnitte der HA Färbung der HA-LgdDM14(1-3) exprimierenden Zellen. HA-LgdDM14(1-3) ist weder mit CHMP4B noch mit dem ER-Marker Calnexin noch mit dem Golgi-Marker Syntaxin assoziiert.

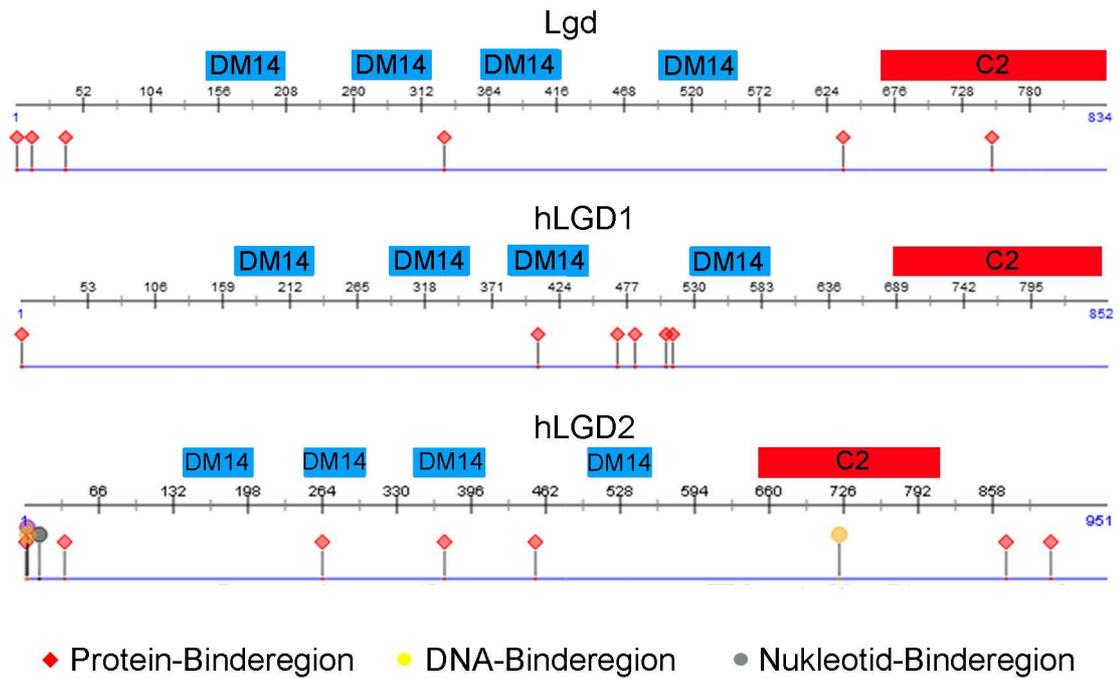


Abb. 7.21: Vorhergesagte Binderegionen in der Sequenz von Lgd, hLGD1 sowie hLGD2. Es sind die potentiellen Protein-Binderegionen (rot), DNA-Binderegionen (gelb) sowie die Nukleotid-Binderegion (grau) von Lgd, hLGD1 und hLGD2 dargestellt. Für die Vorhersage der Bindungsstellen wurde das Programm PredictProtein verwendet (PredictProtein C; PredictProtein A; PredictProtein B).

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Dr. Thomas Klein für die Bereitstellung des interessanten Projekts sowie die gute Betreuung in den letzten Jahren bedanken.

Zudem danke ich Prof. Dr. Hermann Aberle für die Übernahme des Koreferats.

Mein besonderer Dank gilt den technischen Assistenten/Assistentinnen, welche mich während meiner Arbeit begleitet haben. Insbesondere Sylvia für ihre unermüdlichen Injektionen sowie die Hilfe bei den Antikörperfärbungen, wenn mal wieder alles drunter und drüber ging. Neben ihrer praktischen Hilfe, danke ich ihr auch dafür, dass sie immer ein offenes Ohr für mich hatte.

Ich danke auch allen Bachelorstudenten/-innen, Jochen, Björn, Kristina, Scheki und Daisy, die ich während meiner Doktorarbeit betreut habe und die diese Arbeit mit vorangebracht haben.

Der gesamten Arbeitsgruppe Klein danke ich für die fachliche Hilfe, die gute Zusammenarbeit und Arbeitsatmosphäre.

Christine, Kim, Lena, Angie, Nadja, Nadja, Cansu, Hardi, Niklas, Daisy, Miriam, Anna, Marion, Sandra, Jieny, Caro, und und und.... Vielen Dank für die vielen lustigen und manchmal auch ernsteren Stunden während und abseits der Arbeit.

Der großen Nadja danke ich für ihre unermüdliche Hilfe während der Arbeit und beim Korrekturlesen. Danke, dass ich mich immer an dich wenden konnte.

Laura, Nora und Nadja, danke ich für ihre Geduld und dass sie immer an meiner Seite standen.

Meinen Eltern und meinem Bruder danke ich für ihre Liebe und Unterstützung. Danke, dass ihr immer für mich da seid, vor allem wenn es drauf ankommt.

Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlichgemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Thomas Klein betreut worden.

Köln, August 2015

Katharina Schulz

Teilpublikationen im Rahmen dieser Arbeit:

Am Ende wird alles gut.
Wenn es nicht gut wird,
ist es noch nicht das Ende.

Oscar Wilde