

Analysen zur Funktion von CC2D1A und CC2D1B im endosomalen Transportweg und zur Interaktion mit ESCRT-III Proteinen in Säugern

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Bernhard Migdal

aus Düsseldorf

Düsseldorf, März 2016

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
Koreferent: Jun.-Prof. Dr. Mathias Beller

Tag der mündlichen Prüfung:

„Ich bin immer noch verwirrt, aber auf einem höheren Niveau“

Enrico Fermi

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Die Endozytose von Membranrezeptoren und der endosomale Transportweg.	1
1.2 Die ESCRT-Komplexe	3
1.2.1 Der ESCRT-III Komplex	6
1.2.2 Der VPS4-Komplex und die Hilfs-ESCRT-Untereinheiten	9
1.3 Die CC2D1/Lgd-Proteinfamilie	11
1.4 Ziele der Arbeit	15
2. Ergebnisse	16
2.1 Die Funktion von CC2D1A und CC2D1B im endosomalen Transportweg	16
2.1.1 <i>Cc2d1a</i> ^{-/-} MEF Zellen zeigen nur schwachen endosomalen Defekt verglichen mit wildtypischen und <i>Vps4a</i> ^{+/-} ; <i>Vps4b</i> ^{+/-} Zellen, <i>Cc2d1b</i> ^{-/-} MEF Zellen zeigen keinen.	17
2.1.2 Der zusätzliche Verlust von <i>Cc2d1a</i> und <i>Cc2d1b</i> modifiziert den endosomalen Phänotyp von <i>Vps4a</i> ^{+/-} ; <i>Vps4b</i> ^{+/-} Zellen.	23
2.1.3 CC2D1A lokalisiert an vergrößerten Endolysosomen in <i>Vps4a</i> ^{+/-} ; <i>Vps4b</i> ^{+/-} Zellen.	33
2.1.4 Endogenes CC2D1A interagiert mit endogenem CHMP4B <i>in vivo</i> .	35
2.2 Lokalisation und Interaktion von CC2D1A und CC2D1B und die Funktion der Domänen.	36
2.2.1 Die Expression von ESCRT-III und VPS4 Untereinheiten führt zu unterschiedlichen Veränderungen im endosomalen Transportweg.	39
2.2.2 Die Expression von CC2D1A oder CC2D1B in <i>Cc2d1a</i> ^{-/-} ; <i>Cc2d1b</i> ^{-/-} hat keinen Einfluss auf die Lokalisation von endogenem CHMP4B.	46
2.2.3 CC2D1A und CC2D1B interagieren mit CHMP4, CHMP5 und CHMP7 sowie mit sich selbst.	48
2.2.4 <i>Drosophila</i> Lgd und Shrub lokalisieren und interagieren in murinen Zellen vergleichbar zu ihren Säuger Orthologen.	50
2.2.5 Die C2 Domänen werden nicht für die Interaktion mit CHMP-Proteinen benötigt, aber für Regulation und Lokalisation der CC2D1-Proteine.	52
2.2.6 Ein Teil der DM14 Domänen der CC2D1 Proteine vermittelt die Interaktion mit ESCRT-Untereinheiten.	57
2.2.7 Die DM14 Domänen in CC2D1B sind auf unterschiedliche Interaktionen spezialisiert.	60
2.2.8 Die Bedeutung konservierter Aminosäuren in der dritten DM14 Domäne von CC2D1B und Lgd für die Interaktion.	63
2.2.9 Der N-Terminus vor der ersten DM14 Domäne beeinflusst die Lokalisation der CC2D1 Proteine und ihrer Interaktion mit CHMP4B.	68
2.2.10 Der verlängerte C-Terminus von CC2D1A hat eine Funktion, welche die Interaktion mit CHMP4 und CHMP7 beeinflusst.	72
2.2.11 Die Interaktion der CC2D1 Proteine mit CHMP4A, CHMP4B und CHMP4C unterscheidet sich in ihrer Mechanik.	76
2.2.12 Konkurrenz und Affinitäten der Interaktionen	81
2.2.13 CC2D1A und CC2D1B bilden möglicherweise Komplexe.	84
2.2.13 Zusammenfassung der Interaktionen von CC2D1A und CC2D1B mittels FRET-APB in lebenden Zellen.	85
3. Diskussion	88
3.1 CC2D1A und CC2D1B haben eine Funktion im endosomalen Transportweg.	88

3.2 Die CC2D1 Proteine wirken vor VPS4 am Endosom und werden durch die ESCRT-III Assemblierung rekrutiert.	90
3.3 Struktur/Funktionsanalyse der Lokalisation und Interaktion von CC2D1A und CC2D1B.	92
3.3.1 CC2D1A und CC2D1B interagieren mit CHMP4, CHMP5 und CHMP7 und ihre Lokalisation wird von diesen beeinflusst.	93
3.3.2 Die C2 Domäne hat eine andere Funktion in Säugern als in <i>Drosophila</i> .	95
3.3.3 Verschiedene DM14 Domänen von CC2D1B vermitteln die Interaktion mit CHMP Interaktionspartnern.	96
3.3.4 Konservierte basische Aminosäuren in CC2D1B und Lgd werden für die Interaktion mit CHMP Interaktionspartnern benötigt.	99
3.3.5 In CHMP4 und Shrub werden unterschiedliche Aminosäuren für die Interaktion mit den CC2D1 Proteinen und Lgd benötigt.	101
3.3.6 Der N-Terminus der CC2D1 Proteine hat eine regulatorische Funktion und beeinflusst die Lokalisation.	102
3.3.7 Der verlängerte C-Terminus von CC2D1A ist essentiell für seine Funktion.	103
3.3.8 Die C2 Domäne und der verlängerte C-Terminus von CC2D1A haben eine gemeinsame Funktion.	104
3.4 CC2D1A und CC2D1B wirken an der endosomalen Membran zusammen mit ESCRT-III und werden mit diesem von VPS4 entfernt.	106
4. Zusammenfassung/Summary	109
4.1 Zusammenfassung	109
4.2 Summary	110
5 Material und Methoden	111
5.1 Material	111
5.1.1 Chemikalien	111
5.1.2 Material für molekularbiologische Arbeiten	111
5.1.2.1 Allgemeine Materialien	111
5.1.2.2 Reaktionssets	111
5.1.2.3 Enzyme	111
5.1.2.4 Größenstandard	111
5.1.2.5 Puffer und Lösungen	111
5.1.2.6 Medien zur Kultivierung von Bakterien	111
5.1.2.7 Bakterienstämme	112
5.1.2.8 Antibiotika Stocklösungen	112
5.1.2.9 Plasmide	112
5.1.2.10 Oligonukleotide	112
5.1.3 Material für proteinbiochemische Arbeiten	114
5.1.3.1 Stammlösungen	114
5.1.3.2 Puffer und Lösungen	114
5.1.3.3 Allgemeine Materialien	115
5.1.3.4 Größenstandard	115
5.1.3.5 Antikörper	115
5.1.4 Material für die Zellkultur und Mauslinien	115
5.1.4.1 Mauslinien und Zelllinien	115
5.1.4.2 Stammmedien und Reagenzien	116
5.1.4.3 Medien und Lösungen	116
5.1.5 Material für die Immunocytochemie	116
5.1.5.1 Puffer, Lösungen und Reagenzien	116
5.1.5.2 Proximity Ligation Assay (PLA) Sonden und Kits	117
5.1.5.3 Antikörper	117

5.1.6 Material für Elektronenmikroskopie	118
5.1.6.1 Puffer, Lösungen und Kits	118
5.1.6.2 Allgemeines Material	118
5.1.7 Geräte	118
5.1.8 Computer, Software und Datenbanken	119
5.2 Methoden	120
5.2.1 Molekularbiologische Methoden	120
5.2.1.1 Transformation chemisch kompetenter Zellen	120
5.2.1.2 Minipräparation von Plasmid-DNA	120
5.2.1.3 Midipräparation von Plasmid-DNA	120
5.2.1.4 Restriktion von DNA mit Endonukleasen	120
5.2.1.5 Gelelektrophorese und Gelextraktion von DNA	121
5.2.1.6 Ligation	121
5.2.1.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	121
5.2.1.8 Sequenzierung	124
5.2.2 Proteinbiochemische Methoden	124
5.2.2.1 Proteingewinnung aus Zellen	124
5.2.2.2 SDS-Page und Western Blot	124
5.2.3 Maushaltung und Techniken der Zellkultur	125
5.2.3.1 Maushaltung und Zucht	125
5.2.3.2 Genotypisierung von Mäusen	125
5.2.3.3 Gewinnung von MEF-Zellen	125
5.2.3.4 Kultivierung und Passage von Zellen	126
5.2.3.5 Einfrieren und Auftauen von Zellen	126
5.2.3.6 Transfektion von Zellen	126
5.2.4 Immunocytochemie und Elektronenmikroskopie	127
5.2.4.1 Immunocytochemie	127
5.2.4.2 Proximity Ligation Assay	127
5.2.4.3 Einbettung von Zellen für die Elektronenmikroskopie	128
5.2.5 Das CRISPR/Cas9 System	128
5.2.6 Methoden zur FRET-Messung	130
5.2.6.1 Der Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)	130
5.2.6.2 FRET Messung durch Akzeptorphotobleichen	131
6. Literaturverzeichnis	133
7. Abkürzungsverzeichnis	142
8. Anhang	144
Danksagung	154
Eidesstattliche Erklärung	155

1. Einleitung

1.1 Die Endozytose von Membranrezeptoren und der endosomale Transportweg.

Jede eukaryotische Zelle ist in der Lage Stoffe aus der Umgebung aufzunehmen. Diese Aufnahme wird Endozytose genannt. Bei den aufgenommenen Stoffen kann es sich beispielsweise um Flüssigkeiten, darin gelöste Stoffe, Makromoleküle oder Komponenten der eigenen Zellmembran handeln. Die Endozytose wird daher unter anderem auch in Pinozytose, Phagozytose und rezeptorvermittelte Endozytose unterteilt. Die Internalisierung erfolgt dabei durch eine Einstülpung der Plasmamembran gefolgt von deren Abschnürung und Abspaltung in das Zelllumen in Form von Vesikeln. Eine besondere Rolle kommt der Endozytose bei der Internalisierung von Membranproteinen zu. Hierbei kann es sich zum Beispiel um Membrantransporter oder um Transmembranrezeptoren handeln. Die geregelte Endozytose ist dabei sowohl für die Regulation der Konzentration von Rezeptoren an der Zelloberfläche von essentieller Bedeutung, als auch bei der Signalweiterleitung in das Zellinnere (Übersicht in Huotari und Helenius 2011, Soldati und Schliwa, 2006). Besonders deutlich wird die Bedeutung der Regulation bei Signalwegen wie dem Hedgehog-, EGF- und dem Notch-Signalweg. Defekte in der Regulation dieser Signalwege können zu verschiedenen Krankheiten wie Neurodegeneration oder Krebs führen, bis hin zum embryonal letalen Störungen in der Entwicklung des Organismus (Übersicht in Zastrow und Sorkin, 2007; Lanzetti und Fiore, 2008). Rezeptoren, welche endozytiert werden sollen, werden durch eine E3-Ligase kovalent mit einem Ubiquitinmolekül markiert (Übersicht in Staub und Rotin, 2006). Diese Ubiquitinierung dient als Signal für die Anreicherung der Rezeptoren in der Membraneinstülpung und ihrer anschließenden Internalisierung in Vesikel. Diese Vesikel können dann miteinander zu frühen Endosomen oder mit bereits bestehenden frühen Endosomen fusionieren (Mayor et al., 1993). Die so gebildeten frühen Endosomen werden auch sortierende frühe Endosomen genannt (Huotari und Helenius, 2011). Von diesen ausgehend können die Membranproteine über Recyclingendosomen zurück zur Plasmamembran gelangen. Für den Abbau bestimmte Proteine verbleiben in frühen Endosomen, welche dann reifen. Charakteristisch für diese reifenden Endosomen ist die Bildung von intraluminalen Vesikeln (ILVs) (Abb.1.1). Die ILVs werden von der endosomalen Membran ins Lumen der Endosomen abgeschnürt. Reife Endosomen, welche intraluminale Vesikel enthalten, werden auch „multivesicular bodies“ (MVBs) genannt. Transmembranrezeptoren in der endosomalen Membran werden mit Hilfe der ILV Bildung vollständig in das Lumen der Endosomen überführt. Erst dadurch können Transmembranproteine vollständig abgebaut werden. Diese Entfernung von Rezeptoren von der endosomalen Membran ist besonders wichtig, um die intrazellulären Domänen von Rezeptoren vom Zytoplasma zu trennen. Auf diese Weise kann eine Signalweiterleitung beendet oder eine ektopische, ligandenunabhängige Aktivierung eines Signalwegs unterbunden werden. Letztendlich fusioniert das reife Endosom mit dem Lysosom und es kommt zum Abbau der

enthaltenen Proteine und Membranen (Huotari und Helenius, 2011). Eine schematische Übersicht über den endosomalen Transportweg ist in Abbildung 1.1 dargestellt.

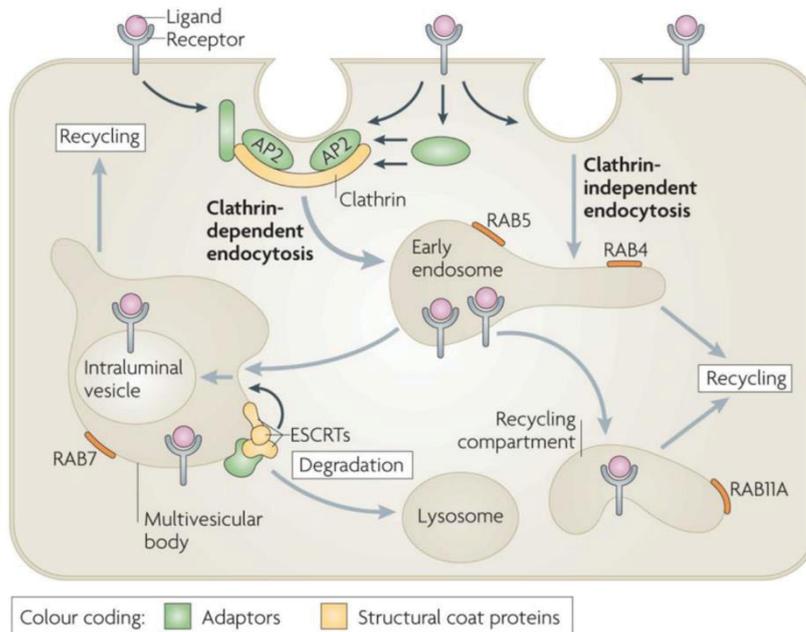


Abb.1.1 Die Rezeptor-vermittelte Endozytose. Die Internalisierung von Transmembranproteinen und Rezeptoren kann sowohl Clathrin abhängig (Clathrin-dependent endocytosis) als auch unabhängig erfolgen (Clathrin-independent endocytosis). Die auf beiden Wegen entstandenen Vesikel fusionieren dann miteinander oder mit bereits bestehenden frühen Endosomen (early endosome). Dort werden die Rezeptoren sortiert und gelangen so in den Degradations- oder Recyclingweg. Die zum Abbau bestimmten Rezeptoren werden in reifenden Endosomen in intraluminalen Vesikeln (intraluminal vesicle, ILV) verpackt, um sie vom Zytoplasma zu trennen und einen vollständigen Abbau zu ermöglichen. Für die Bildung der ILVs sind die ESCRT-Komplexe verantwortlich. Reifende, späte Endosomen mit ILVs werden Multivesikuläre Körper (multivesicular bodies, MVBs) genannt. Abschließend fusionieren sie mit Lysosomen und es kommt zur Degradation der Rezeptoren. Für die Bewegung der Endosomen am Zytoskelett sind unter anderem die RAB GTPasen verantwortlich. Diese sind spezifisch für die verschiedenen Stadien der Endosomen und werden bei der Reifung ausgetauscht. RAB5 ist spezifisch an frühen Endosomen lokalisiert, RAB7 an reifenden bzw. an MVBs. RAB4 und RAB11A lokalisiert an Recycling-Endosomen des schnellen, respektive langsamen Recyclingweges. (modifiziert aus Sorkin und Zastrow, 2009).

Der Transport der Endosomen durch die Zelle wird unter anderem durch die Rab GTPasen (ras genes from rat brain) organisiert. GTPasen gehören zu den Hydrolasen und können eine GTP gebundene „an“ Konformation und eine GDP gebundene „aus“ Konformation einnehmen. Im Menschen sind über 60 Rab GTPasen bekannt, welche individuell jeweils an anderen Membranen lokalisieren. In eukaryotischen Zellen organisieren die Rab GTPasen fast alle Membrantransportprozesse, indem sie indirekt unter anderem mit SNAREs (Soluble N-Ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor), kleinen Membranproteinen in Vesikelmembranen, Hüll- und Motorproteinen interagieren. Die spezifische Lokalisation wird dabei auch beim endosomalen Transportweg deutlich. Rab5 ist mit frühen Endosomen assoziiert, Rab7 mit späten Endosomen. Die Rab GTPasen Rab4 und Rab11A lokalisieren an Recyclingendosomen, über welche Membranproteine zurück an die Plasmamembran

befördert werden (s. Abb. 1.1). Dadurch können Rab Proteine auch als Marker für Endosomen genutzt werden (Stenmark, 2009; Grosshans, 2006; Rodman und Wandinger-Ness, 2000). Eine weitere Gruppe von Proteinen mit besonderer Bedeutung im endosomalen Transportweg sind die ESCRT-Komplexe. Diese Komplexe sind für die Bildung der intraluminalen Vesikel verantwortlich.

1.2 Die ESCRT-Komplexe

Der erste ESCRT-Komplex wurde 2001 erstmals beschrieben und nach seiner Funktion „endosomale sorting complex required for transport“ genannt (Katzmann et al., 2001), während MVBs schon in den 50er Jahren in elektronenmikroskopischen Aufnahmen beobachtet wurden (Paley und Palade, 1955; Sotelo und Porter, 1959). Inzwischen sind vier Komplexe ESCRT-0 bis ESCRT-III und der VPS4-Komplex (auch ESCRT-IV genannt) bekannt, welche alle für die Bildung von intraluminalen Vesikeln (ILVs) essentiell sind (Babst et al., 1997, 2002a und 2002b). Dabei konzentrieren die ESCRT-Komplexe 0 bis II die zum Abbau markierten Proteine und bilden eine Einstülpung. Der ESCRT-III und der VPS4-Komplex schnüren das sich so bildende ILV dann endgültig ab (Abb.1.2).

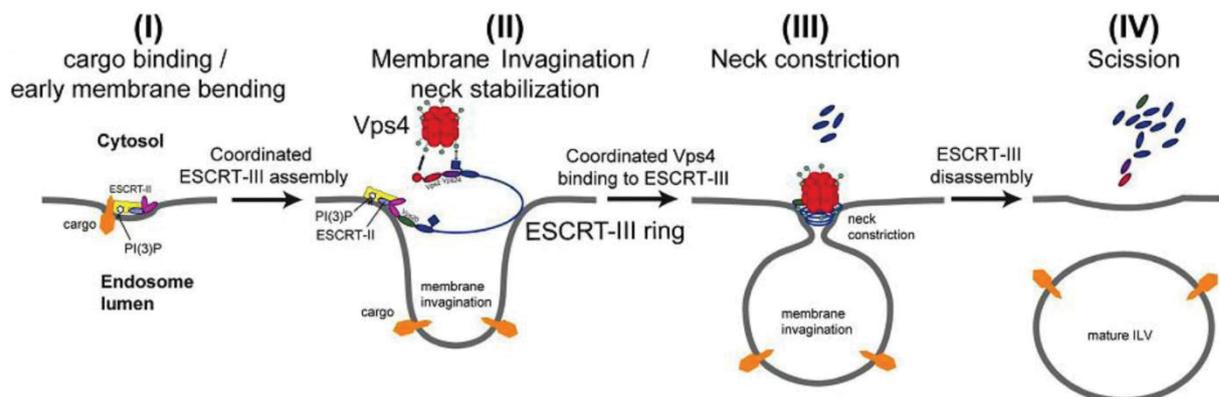


Abb.1.2 Schematische Darstellung der ILV Bildung durch die ESCRT-Komplexe.

Zuerst bindet der ESCRT-0 Komplex an PI(3)P und ubiquitinierte Proteine (cargo). Es folgt die Bindung von ESCRT-I und dann ESCRT-II. Dabei wird eine Vertiefung in der Endosomenmembran gebildet und die ubiquitinierten Proteine dort konzentriert (I). Durch die Bindung und Polymerisation von ESCRT-III bildet sich dann eine Einstülpung, welche stabilisiert wird (II). In dieser Einstülpung befinden sich die nun deubiquitinierten Proteine. Durch die Bindung des VPS4-Komplexes an ESCRT-III kommt es zur Einschnürung der Membran (III). Abschließend kommt es zur Abschnürung des ILVs und der Auflösung des ESCRT-III Komplexes durch den VPS4-Komplex (IV) (Adell et al., 2014).

Allgemein sind die ESCRT-Komplexe nicht nur für die ILV Bildung, sondern generell für verschiedene Membranverformungen und -abschnürungen weg vom Zytoplasma verantwortlich (Abb.1.3). Die Komplexe wirken dadurch in verschiedenen weiteren, fundamentalen Prozessen in der Zelle. Dazu zählen die Zytokinese (Carlton and Martin-Serrano, 2007), die Plasmamembranreparatur (Jimenez et al., 2014), die Assemblierung von Kernporen-Komplexen (Webster et al., 2014) und die Neuformierung der Kernhülle (Olmos et al., 2015, Viertri et al., 2015). Auch wird dieser

Mechanismus z.B. vom HI-Virus korrumpiert und für seine Knospung benutzt (Carlson and Hurley, 2012; Garrus et al., 2001). Während der ESCRT-III Komplex bei all diesen Funktionen eine zentrale Rolle spielt, werden die anderen ESCRT-Komplexe nicht bei allen oder nur zum Teil benötigt. (Abb.1.3; Übersicht in Hurley, 2015; Jouvenet, 2012, Henne et *al.* und Babst 2011). Zudem werden Störungen der ESCRT-Komplexe mit verschiedenen Krankheiten in Verbindung gebracht. Dazu zählen Krebs und Neurodegenerationskrankheiten wie Huntington und Parkinson (Übersicht in Saksena and Emr, 2009).

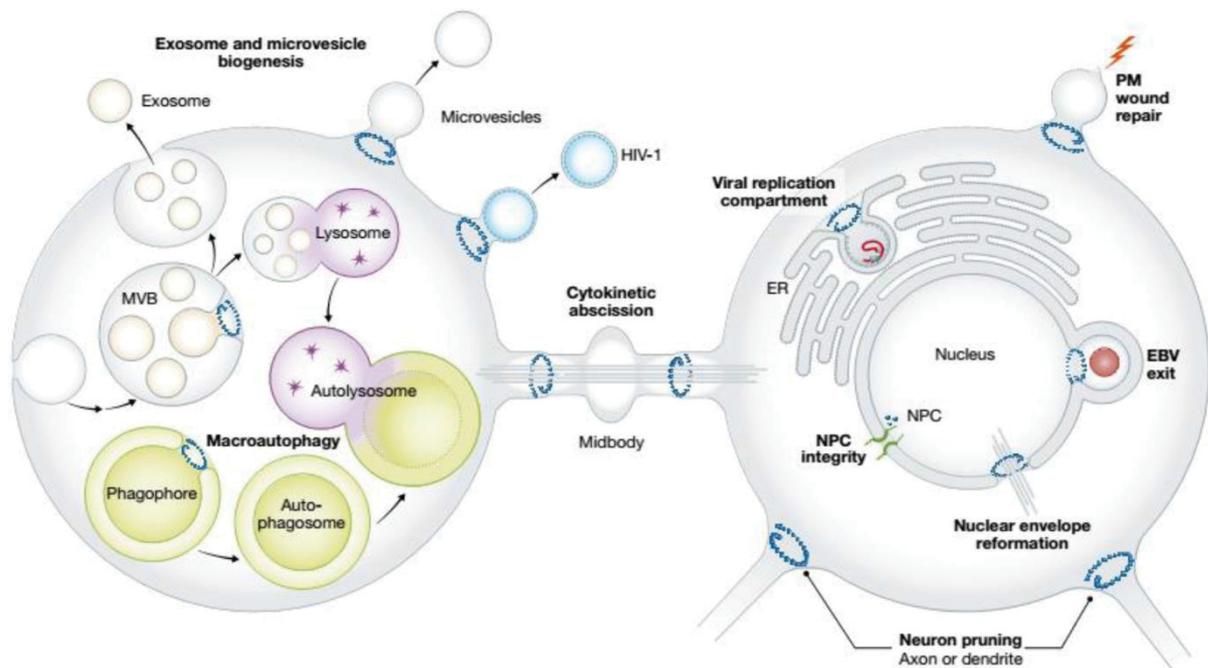


Abb.1.3 Übersicht über die zellulären Funktionen der ESCRT-Komplexe.

Die ESCRT-Komplexe erfüllen Funktionen in vielen zellulären Prozessen, bei denen es zu einer Umgestaltung einer Membran kommt. Dies kann die Bildung intraluminaler Vesikel während des endosomal Transportweges sein, die Reparatur von Schäden in der Plasmamembran oder auch die Neuformierung der Kernmembran. Die Rekrutierung der ESCRT-Komplexe erfolgt dabei über spezifische Adaptorproteine. Nicht alle ESCRT-Komplexe sind gleichermaßen an jeder der dargestellten Funktionen beteiligt. Immer beteiligt sind lediglich CHMP4 (Snf7) und VPS4 (modifiziert nach Hurley, 2015).

Die ESCRT-Komplexe bestehen jeweils aus mehreren Untereinheiten (s. Tab.1.1). Diese Untereinheiten gehören hauptsächlich zu den VpsE-Proteinen (class E vacuolar protein sorting), welche erstmals in Hefe-Mutanten beschrieben wurden. In diesen Mutanten kommt es zur Akkumulation von endozytierten Rezeptoren und Hydrolasen in abnormalen, vergrößerten Endosomen, den sogenannten „Class E“ Kompartimenten (Raymond et al., 1992). Diese „Class E“ Kompartimente bilden sich bei ESCRT Dysfunktion aufgrund einer Hyperaktivität von RAB5 (Vps21) (Russell et al., 2012). Da viele dieser Untereinheiten auch in anderen Modellorganismen entdeckt wurden, bevor die Orthologie bekannt war, unterscheiden sich ihre Namen. In dieser Arbeit werden, wenn nicht gesondert erwähnt, die Bezeichnungen der humanen Proteine verwendet (s. Tab.1.1).

Tabelle 1.1: Die Untereinheiten der ESCRT-Komplexe. Jeder ESCRT-Komplex besteht aus mehreren Untereinheiten. Hinzu kommen im Fall von ESCRT-III und dem VPS4-Komplex mehrere Hilfsuntereinheiten. Die Orthologe in Säugern und der Hefe haben zu einem großen Teil unterschiedliche Namen.

Säuger	Hefe	Säuger	Hefe	Säuger	Hefe
ESCRT-0		ESCRT-I		ESCRT-II	
HRS	Vps27	TSG101	Vps23	EAP45	Vps36
STAM 1,2	Hse1	MVB12 A,B	Mvb12	EAP30	Vps22
		VPS37 A,B,C,D	Vps37	EAP20	Vps25
		VPS28	Vps28		
ESCRT-III		Hilfs-ESCRTs		VPS4 (ESCRT-IV)	
CHMP6	Vps20	CHMP1 A,B	Did2 (Vps46)	VPS4 A,B	Vps4
CHMP4 A,B,C	Snf7 (Vps32)	IST1	Ist1	LIP5	Vta1
CHMP3	Vps24	CHMP5	Vps60		
CHMP2 A,B	Vps2	CHMP7	Chm7	ALIX	Bro1

Der ESCRT-0 Komplex setzt sich aus zwei Untereinheiten zusammen, HRS (hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate) und STAM (signal-transducing adaptor molecule). Beide Untereinheiten können Ubiquitin über ein UIM Motiv (Ubiquitin interacting motif) und eine VHS Domäne (Vps27/Hrs, Hse1/STAM) binden und interagieren im Verhältnis 1:1 miteinander (Asao et al., 1997; Prag et al., 2007; Ren and Hurley, 2010). HRS besitzt eine FYVE-Domäne (Fab-1, YGL023, Vps27, EEA1) welche an PI(3)P (Phosphatidylinositol-3-Phosphat) binden kann und so für eine spezifische Rekrutierung des ESCRT-0 Komplexes an Endosomen sorgt (Burd and Emr, 1998; Komada and Soriano, 1999; Mao et al., 2000; Raiborg et al., 2001). HRS bindet ebenfalls an TSG101, eine Untereinheit des ESCRT-I Komplexes, wodurch dieser rekrutiert wird. Die ESCRT-I Rekrutierung ist dabei in allen untersuchten Modellorganismen abhängig von ESCRT-0 (Bache et al., 2003; Katzmann et al., 2003; Lu et al., 2003) ESCRT-I besteht neben TSG101 (tumor susceptibility gene 101) aus VPS28, VPS37 und MVB12 (multi-vesicular body 12) (Katzmann et al., 2001; Chu et al., 2006; Curtiss et al., 2007). In Säugetieren kommen von VPS37 und MVB12 drei, bzw. zwei Isoformen vor (Tab.1.1). Generell kommen in Säugern häufiger mehrere Isoformen von verschiedenen Untereinheiten der ESCRT-Komplexe vor als in Hefe oder *Drosophila*. Der ESCRT-I Komplex wird in einer 1:1:1:1 Stöchiometrie aus diesen vier Untereinheiten gebildet (Gill et al., 2007). TSG101 kann ähnlich wie HRS und STAM Ubiquitin binden, dies geschieht über eine UEV-Domäne (Ubiquitin E2 variant) (Katzmann et al., 2003; Kostelansky et al., 2006). Vermutlich werden so die Ubiquitin-markierten Proteine übernommen. VPS28 rekrutiert dann EAP45 und damit den ESCRT-II Komplex (Teo et al., 2006; Gill et al., 2007). Der ESCRT-II Komplex besteht je aus einer Untereinheit EAP45 (ELL-associated protein of 45 kDa), EAP30 und zwei Untereinheiten EAP20 (Babst et al., 2002b; Langelier et al., 2006). Über die GLUE-Domäne (GRAM-like ubiquitin-binding in EAP45) kann EAP45 sowohl Ubiquitin binden, also die markierten Proteine registrieren, als auch an PI(3)P binden (Slagsvold et al., 2005). Gemeinsam mit der FYVE-Domäne von ESCRT-0 sorgt die GLUE-Domäne

für eine spezifische Bindung an Endosomen über PI(3)P, welches an deren Membranen durch die Klasse III PI3 Kinase VPS34 generiert wird (Übersicht in Lindmo und Stenmark, 2006). EAP45 und EAP30 bilden die Basis des ESCRT-II Komplexes und binden jeweils ein EAP20, wodurch sich eine Y-Form ergibt (Hierro et al., 2004; Teo et al., 2004). EAP20 rekrutiert dann mit CHMP6 (charged multivesicular body protein) die erste Untereinheit des ESCRT-III Komplexes (Teo et al., 2004; Yorikawa et al., 2005). CHMP6 rekrutiert dann die folgenden ESCRT-III Untereinheiten, wobei CHMP4 polymerisiert und Homooligomere bildet. Im Gegensatz zu den anderen ESCRT-Komplexen bildet sich der ESCRT-III Komplex erst direkt an der Membran, während seine Untereinheiten rekrutiert werden.

1.2.1 Der ESCRT-III Komplex

Wie die anderen ESCRT-Komplexe besteht der ESCRT-III Komplex aus mehreren Untereinheiten, in seinem Fall vier. Diese vier Untereinheiten sind CHMP2, CHMP3, CHMP4 und CHMP6 (Babst et al., 2002a). Von CHMP2 und CHMP4 sind mehrere Isoformen bekannt, welche im Menschen vorkommen (Tab.1.1). CHMP6 bindet an die ESCRT-II Untereinheit EAP20 und initiiert damit die Assemblierung des Komplexes (Teo et al., 2004). Durch CHMP6 wiederum wird CHMP4 rekrutiert und polymerisiert dann in einem Homooligomer. Schließlich binden CHMP2 und CHMP3 an dieses CHMP4-Polymer (Teis et al., 2008). CHMP2 rekrutiert dann den VPS4-Komplex, welcher den ESCRT-III Komplex von der Membran löst (Obita et al., 2007; Lata et al., 2008). Im Gegensatz zu den vorher agierenden ESCRT-Komplexen bindet keine der ESCRT-III Untereinheiten Ubiquitin. Zusätzlich zu diesen vier Hauptuntereinheiten gibt es vier Hilfs-ESCRT Proteine, IST1, CHMP1, CHMP5 und CHMP7, welche wichtige, in Metazoen nicht redundante Rollen in der ESCRT Funktion ausüben (Howard et al., 2001; Ward et al., 2005; Horii et al., 2006; Shim et al., 2006). Zusätzlich wird auch ALIX (apoptosis-linked gene-2 interacting protein X) durch CHMP4 rekrutiert. ALIX rekrutiert die Deubiquitinase DOA4 (degradation of alpha-4), welche die Frachtproteine deubiquitiniert (Odorizzi, 2003; Luhtala and Odorizzi, 2004)

Bisher konnte die Kristallstruktur von Fragmenten mehrerer Hauptuntereinheiten des ESCRT-III Komplexes und eines Hilfs-ESCRT Proteins analysiert werden. Diese sind humanes CHMP3 (Muziol et al., 2006; Lata et al., 2008), humanes CHMP4B (Martinelli et al., 2012) und das Hefe Ortholog Snf7 (Tang et al., 2015) sowie humanes IST1 (Bajorek et al., 2009a). Diese Analysen weisen darauf hin, dass die ESCRT-III Untereinheiten in einer inaktiven „geschlossenen“ und einer aktiven „offenen“ Form vorliegen können (s. Abb.1.4). Die beiden N-terminalen α -Helices bilden dabei eine ~ 7 nm lange Haarnadelstruktur. Diese bildet in der geschlossenen Form intramolekulare Kontakte mit drei kurzen α -Helices, $\alpha 3$, $\alpha 4$ und $\alpha 5$ aus (Muziol et al., 2006; Bajorek et al., 2009b; Tang et al., 2015). Die Helix $\alpha 5$ ist über einen flexiblen Linker verbunden, wodurch diese beweglich bleibt. Bei der Aktivierung und der Ausbildung der offenen Form kommt es wahrscheinlich zu einer

Neuorganisation, durch welche die Haarnadelstruktur auf ~ 90 Å gestreckt wird, die Helix $\alpha 4$ wird dabei um ~ 60 Å verschoben (Tang et al., 2015). Außerdem konnte gezeigt werden, dass CHMP6 in einer ~ 94 Å langen offenen Konformation vorliegt, welche allerdings nicht Polymerisieren kann (Schuh et al., 2015). Durch *in silico* Vorhersagen gibt es zusätzlich Hinweise auf eine weitere, C-terminale Helix, $\alpha 6$ (Shim et al., 2007). Diese konnte bisher jedoch nur einmal bei IST1 beobachtet werden und dies nur unter Bedingungen, bei denen sie durch Gitternetzstrukturen stabilisiert wurde (Bajorek et al., 2009b). Die Flexibilität des Linkers, mit dem diese Helix verbunden ist, erschwert wahrscheinlich ihr sichtbarwerden in Röntgenkristallen. Ihre Funktion ist vermutlich die Interaktion mit ALIX. Im C-Terminus zwischen den Helices $\alpha 5$ und $\alpha 6$ liegt zudem eine MIM-Domäne (MIT (microtubule-interacting and transport) interacting motifs). Über diese wird die Interaktion mit VPS4 vermittelt (Scott et al., 2005; Obita et al., 2007; Stuchell-Brereton et al., 2007).

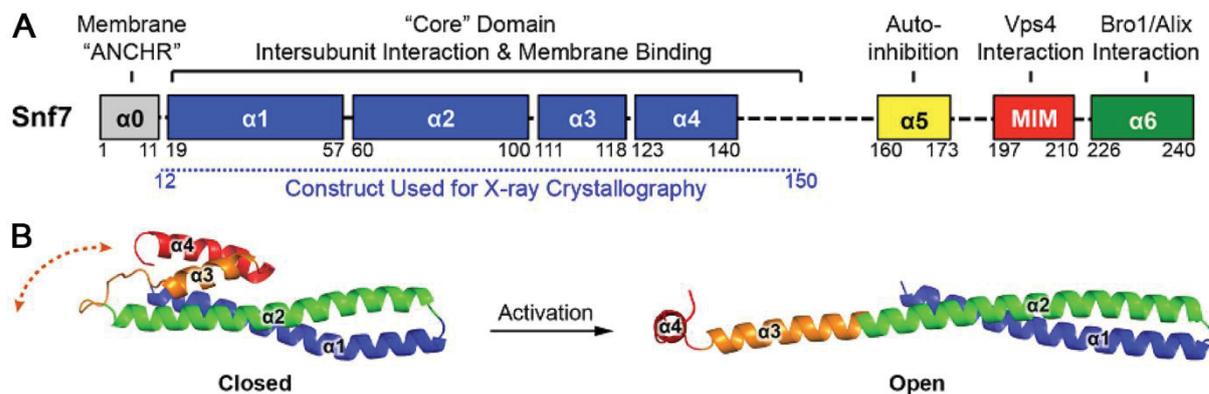


Abb.1.4 Schematische Darstellung des vollständigen Snf7 und offene und geschlossene Variante der Kristallstruktur des Snf7 Fragments. (A) Snf7 besitzt am äußersten N-terminus ein ANCHR Motiv (grau), welches der Verankerung des Proteins in der Membran durch hydrophobe Seitenketten der Aminosäuren dient. Darauf folgt die Kerndomäne („core“ domain) welche aus den Helices $\alpha 1$ bis $\alpha 4$ (blau) besteht. Dieser Kerndomäne interagiert mit den anderen Untereinheiten des ESCRT-III Komplexes und der Membran. C-terminal folgt dann der, oft autoinhibitorische Domäne genannte, Teil des Proteins. Dieser ist über einen flexiblen Linker mit der Kerndomäne verbunden und besteht aus der autoinhibitorischen Helix $\alpha 5$ (gelb), der MIM-Domäne (rot), welche die Interaktion mit VPS4 vermittelt und der Helix $\alpha 6$ (grün), welche wahrscheinlich der Interaktion mit ALIX dient. Die Kristallstruktur des Snf7 Fragments (B) zeigt in der geschlossenen (closed) Form eine Biegung zwischen $\alpha 2$ (grün) und $\alpha 3$ (orange), wodurch $\alpha 3$ und $\alpha 4$ (rot) Kontakt zu $\alpha 1$ (blau) und $\alpha 2$ erhalten. In der offenen (open) Form streckt sich Snf7 zu einer Haarnadelstruktur aus den Helices $\alpha 1$, $\alpha 2$ und $\alpha 3$, wobei sich Helix $\alpha 4$ um ca. 90° dreht (modifiziert nach Tang et al., 2015)

Es wird vermutet, dass Snf7 im Zytoplasma in einem dynamischen Gleichgewicht aus Zwischenstadien von offener und geschlossener Form vorliegt (Tang et al., 2015). An Endosomen interagiert Vps20 (CHMP6) mit seiner Helix $\alpha 1$ mit der ESCRT-II Untereinheit Vps25 (EAP20) (Im et al., 2009) und interagiert dann mit einem offenen Snf7. Diese offene Form besitzt eine Oberfläche, welche mit Membranen interagieren kann und assoziiert so mit dem Endosom. Diese Rekrutierung verschiebt das Gleichgewicht der Konformationen im Zytoplasma. Dadurch ergibt sich ein „Domino-

Effekt“ sich öffnender Snf7 Proteine welche an die Membran des Endosoms binden. Die Snf7 Proteine an der Membran können dann polymerisieren (Tang et al., 2015). Der genaue Mechanismus, wie Snf7/Shrub/CHMP4 an die Membran gelangt und sich dort das Polymer bildet ist bisher unklar. Ähnliche Modelle wurden jedoch auch vorher bereits vorgeschlagen, nicht nur für die Hefe, sondern auch für Mehrzeller. Zudem gibt es Hinweise, dass auch das *Drosophila* Ortholog Shrub in Lösung über Zwischenstadien zwischen offener und geschlossener Form wechselt (Masterarbeit Sebastian Schnorrenberg, 2013; AG Klein, unveröffentlicht). *In vitro* konnte durch Elektronenmikroskopie bereits die Polymerisation von CHMP4 bzw. seiner Orthologe zu langen Filamenten gezeigt werden. Diese können lineare, als auch spiralförmige Formen annehmen (Henne et al., 2011, Shen et al., 2014). Die genaue Anordnung der einzelnen Untereinheiten ist allerdings unklar und teils widersprüchlich, wie auch die Funktion des flexiblen, C-terminalen Bereichs. Die Kristallstruktur eines Polymers aus Snf7 Fragmenten zeigt, dass die Untereinheiten in einer periodischen, $\sim 30 \text{ \AA}$ Anordnung Kontakt haben (Abb.1.5; Tang et al., 2015). Anhand von elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurde ein Abstand von $32,5 \text{ \AA}$ zwischen den Untereinheiten in *C.elegans* Vps32 (CHMP4/Snf7/Shrub) Spiralen errechnet (Shen et al., 2014). Unklar bleibt weiterhin der Einfluss des C-Terminus auf die Bildung der Polymere.

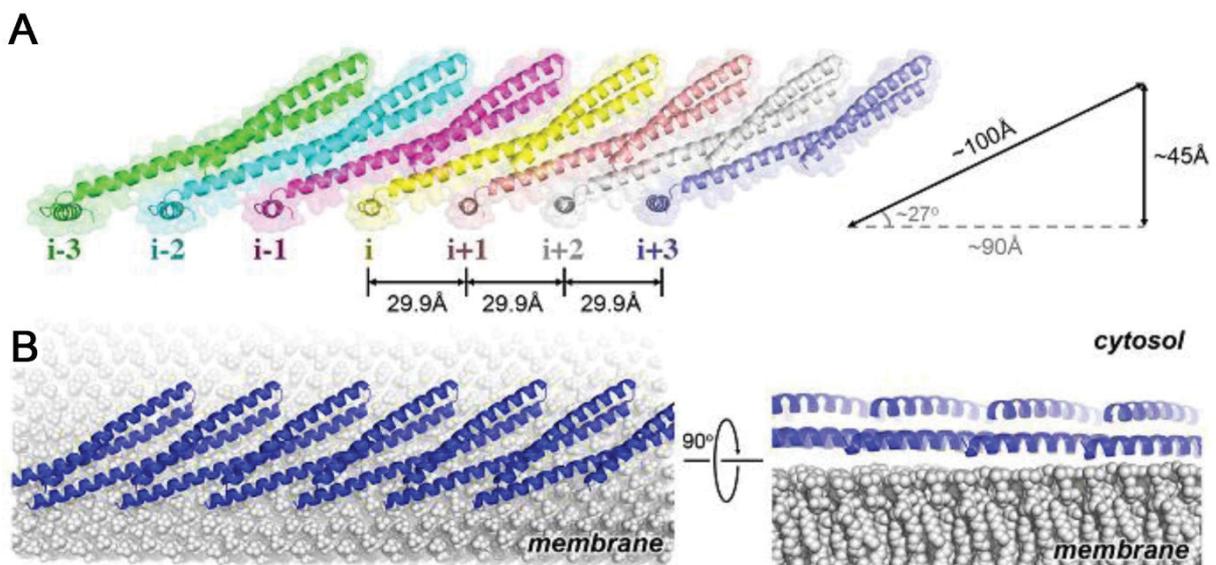


Abb.1.5 Schematische Darstellungen eines Snf7 Polymers basierend auf der Kristallstruktur.

(A) Die Polymerisation der Snf7 Moleküle führt dazu, dass etwa alle 30 \AA Länge eine Untereinheit folgt. Dabei bilden vor allem die Helices $\alpha 2$ und $\alpha 3$ den Kontakt zur Membran (B). Die Interaktion zwischen den Untereinheiten findet sowohl durch hydrophobe als auch elektrostatische Bereiche der Untereinheiten statt (modifiziert nach Tang et al., 2015).

Im Menschen gibt es mit CHMP4A, CHMP4B und CHMP4C drei Orthologe von Snf7/Shrub. CHMP4A ist mit 265 Aminosäuren länger als CHMP4B (224 AS) und CHMP4C (233 AS). Über die Funktion von CHMP4A gibt es allerdings bisher keine Veröffentlichungen. Analysen der mRNA Expression aller drei CHMP4 Isoformen zeigen, dass diese in allen, soweit getestet, humanen

Gewebe exprimiert wird. CHMP4B mRNA wird jedoch vor allem in Skelettmuskeln und in Herzgewebe am stärksten exprimiert. (Katoh et al., 2004). CHMP4B interagiert zudem am stärksten mit ALIX (Katoh et al., 2003; Katoh et al., 2004; Odorizzi, 2006). Die Überexpression von YFP-CHMP4B zeigt eine inhibitorische Wirkung auf die HIV-1 Knospung, während die Überexpression von YFP-CHMP4C vor allem die Zytokinese inhibiert (Carlton et al., 2008). Die Herunterregulation der CHMP4 Expression durch siRNA zeigt ebenfalls einen negativen Einfluss auf die HIV-Knospung. Dieser Effekt ist bei der Herunterregulation von CHMP4B am stärksten (Morita et al., 2011). Weitere Hinweise auf eine Funktion von CHMP4C in der Zytokinese gibt dessen Regulation durch die Kinase Aurora B. CHMP4C wird durch Aurora B phosphoryliert und so die Polymerisation verhindert und reguliert (Capalbo et al., 2012). Phosphoryliert wird ein C-terminales, nur in CHMP4C auftretendes Motiv aus drei Serinen (Capalbo et al., 2012). Grundsätzlich weisen die bisher veröffentlichten Ergebnisse darauf hin, dass alle CHMP4 Proteine grundsätzlich eine ähnliche Funktion wie Snf7 oder Shrub bei der Membranabschnürung haben. Jedoch gibt es Hinweise auf eine Spezialisierung auf unterschiedliche Abschnürungsprozesse in der Zelle, bei welchen der ESCRT-III Komplex beteiligt ist.

Für die Abschnürung der ILVs oder anderer Membranstrukturen wird nicht nur der ESCRT-III Komplex benötigt, sondern ebenfalls die AAA ATPase VPS4. Diese löst während der Abschnürung dann den ESCRT-III Komplex von der Membran und wobei er in seine einzelnen Untereinheiten zerlegt wird. Dadurch werden diese dann für einen weiteren Zyklus der ILV Bildung zur Verfügung gestellt. Dabei spielen auch die Hilfs-ESCRT Proteine eine wichtige Rolle.

1.2.2 Der VPS4-Komplex und die Hilfs-ESCRT-Untereinheiten

Bei VPS4 handelt es sich um eine AAA ATPase (ATPase associated with a variety of cellular activities), welche unter ATP Verbrauch den ESCRT-III Komplex von der endosomalen Membran löst und in seine Untereinheiten zerlegt. Wie auch die ESCRT-Komplexe ist der VPS4-Komplex bisher vor allem in der Hefe untersucht worden. In Säugern existieren zwei Isoformen, VPS4A und VPS4B. Im Zytoplasma liegt VPS4 als inaktives Mono- oder Dimer vor (Babst et al., 1998). Die Rekrutierung an die Membran der Endosomen und der ESCRT-III Komplexe führt zur Bildung eines dodecameren Komplexes (Shestakova et al., 2010). Dieser Komplex kann dann den ESCRT-III Komplex von der endosomalen Membran ablösen. Dies geschieht wahrscheinlich dadurch, dass die Untereinheiten entfaltet werden (Yang et al., 2015). Unklar ist allerdings der genaue Mechanismus, da VPS4 nicht an alle Untereinheiten bindet. So wird nur CHMP2 stark, und CHMP4 schwach gebunden, CHMP6 und CHMP3 hingegen gar nicht (Adell et al., 2014). Der VPS4-Komplex wird allerdings nicht nur für die Auflösung des ESCRT-III Komplexes benötigt, sondern wahrscheinlich auch für die endgültige Abschnürung der ILVs (Adell et al., 2014; Shen et al., 2014; Henne et al., 2012).

Für die vollständige Funktion des VPS4-Komplexes und auch des ESCRT-III Komplexes werden Hilfsfaktoren, sog. Hilfs-ESCRTs, benötigt. Hierbei handelt es sich um CHMP1, IST1 (Increased sodium tolerance 1), CHMP5, LIP5 (LYST-interacting protein 5) und CHMP7. Im Gegensatz zu VPS4 und den Hauptuntereinheiten des ESCRT-III Komplexes, wurden diese Hilfs-ESCRTs bisher hauptsächlich in der Hefe und kaum in Mehrzellern analysiert. In der Hefe zeigt ihr Verlust nicht den „Class E“ Phänotyp der Hauptuntereinheiten. Der Verlust von *Ist1* führt zu keinem sichtbaren Phänotyp, der Verlust von *Vps60* (*CHMP5*) zu einem schwachen Phänotyp (Dimaano et al., 2008; Rue et al., 2008). Je zwei der Hilfs-ESCRTs bilden zusammen einen Komplex. IST1 und CHMP1 bilden einen der Komplexe. Dieser wird vom ESCRT-III Komplex an die Membran rekrutiert und unterstützt vermutlich wiederum die Rekrutierung des VPS4-Komplexes (Azmi et al., 2008; Rue et al., 2008). Der zweite Komplex wird von CHMP5 und LIP5 gebildet und es wird vermutet, dass er die Aktivität von VPS4 steigert (Azmi et al., 2008; Xiao et al., 2008; Azmi et al., 2006; Shiflett et al., 2004). LIP5 rekrutiert CHMP5 und kann über seine VSL-Domäne (Vta1 SBP1 Lip5) direkt an VPS4 binden. Dadurch stabilisiert es den Komplex (Azmi et al., 2008; Azmi et al., 2006). Die Bindung von CHMP5 oder CHMP1 an die MIT Domäne von LIP5 löst vermutlich die Autoinhibition der VSE-Domäne (Vps4 stimulatory element) innerhalb von LIP5 selbst und fördert so die Aktivierung von Vps4 (Norgan et al., 2013). Während der Verlust eines dieser Hilfs-ESCRTs zu keiner Störung in der MVB-Biogenese führt, resultiert ein gleichzeitiger Verlust je einer Komponente beider Komplexe in einer Störung, welcher vergleichbar ist mit dem Verlust einer Hauptuntereinheit der ESCRT-Komplexe (Rue et al., 2008). Neueste *in vitro* Ergebnisse zeigen auch, dass IST1 und CHMP1 Polymere bilden können (McCullough et al., 2015). Ob diese eine physiologische Funktion haben und endogen vorkommen, ist allerdings unbekannt.

In Mehrzellern gibt es deutlich weniger Daten zu den Hilfs-ESCRT Proteinen. Im Menschen wird IST1 in vielen Tumoren überexprimiert, wie zum Beispiel bei Lungenkrebs und ist daher auch unter dem Namen OLC1 (overexpressed in lung cancer 1) bekannt (Liu et al., 2014; Yuan et al., 2008). Der Verlust von CHMP5 in Mäusen ist ähnlich wie der Verlust von HRS um Tag E10 embryonal letal. Außerdem zeigen sich leichte Störungen im späten endosomalen Transportweg bei der Herunterregulation des TGF β -Signalweges (Shim et al., 2006). In *Drosophila* führt der Verlust von Chmp5 im Follikelepithel zu einem Defekt der Degradierung von Notch und zu einer verstärkten Aktivierung des JAK/STAT Signalweges (Berns et al., 2014). Außerdem konnten in *Drosophila* ähnlich wie in der Hefe beobachtet werden, dass der Verlust von Ist1 oder Chmp5 nur einen schwachen endosomalen Phänotyp zeigt, der Verlust beider diesen aber deutlich verstärkt. Außerdem konnte eine Temperatursensitivität des Phänotyps beobachtet werden (Masterarbeit Christian Brüser, 2013; Sven Klose, unveröffentlicht).

Über die Funktion des Hilfs-ESCRT Protein CHMP7 ist bisher kaum etwas bekannt. Seine N-terminale Hälfte hat eine hohe Ähnlichkeit mit CHMP4, seine C-terminale Hälfte mit CHMP6. Es

interagiert mit CHMP4B und die Überexpression führt zu einer Störung im späten endosomalen Transportweg (Horii et al., 2006). Außerdem ist es Teil des Komplexes, welcher bei der Kernhüllbildung wirkt. Dieser Komplex besteht aus CHMP7, CHMP4, CHMP1, CHMP2 und CHMP3 (Vietri et al., 2015). In Hefe konnte gezeigt werden, dass CHMP7 möglicherweise Teil eines alternativen ESCRT-III Komplexes ist und am ER wirkt (Bauer et al., 2015). Da CHMP6 dabei nicht entdeckt wurde, wird vermutet, dass CHMP7 zu einer ESCRT-II unabhängigen Rekrutierung des ESCRT-III Komplexes dient.

Eine weitere Gruppe von Proteinen, welche im späten endosomalen Transportweg wirkt und mit Untereinheiten des ESCRT-III Komplexes interagiert, sind die der CC2D1-Proteinfamilie.

1.3 Die CC2D1/Lgd-Proteinfamilie

Die Proteine der CC2D1 (coiled-coil and C2 domain containing 1)-Familie sind konservierte Proteine in Metazoen. Das erste Mitglied dieser Familie wurde 1971 in *Drosophila melanogaster* beschrieben und nach seinem Ausfallphänotyp *lethal (2) giant discs (lgd)* genannt (Bryant and Schubiger, 1971). Ein Ausfall von *lgd* führt zu einer starken Überproliferation aller Imaginalscheiben in der Larve und zu einem verlängerten dritten Larvenstadium. Letztendlich ist der Verlust im frühen Puppenstadium letal. Daher wird *lgd* auch als Tumorsuppressorgen bezeichnet. Während in *Drosophila* mit *lgd* nur ein Gen der CC2D1 Familie vorkommt, besitzen Säuger zwei Orthologe, *Cc2d1a* und *Cc2d1b* (Abb.1.6). Die Proteine bestehen aus vier N-terminalen DM14-Domänen (*drosophila melanogaster 14*) und einer C-terminalen C2-Domäne (conserved region 2) (Ponting et al., 2001). Die DM14-Domänen sind ein einzigartiges Merkmal der CC2D1-Proteine und sind für Protein-Protein Interaktionen verantwortlich. Für die Säuger Proteine konnte *in vitro* eine Interaktion mit der ESCRT-III Untereinheit CHMP4A/B/C nachgewiesen werden (Martinelli et al., 2012; Usami et al., 2012; Tsang et al., 2006). Für die Interaktion mit CHMP4B *in vitro* wird lediglich eine DM14 Domäne und ein Teil der Verbindung zur nächsten Domäne benötigt (Usami et al., 2012; Martinelli et al., 2012). Außerdem konnte gezeigt werden, dass ein Aminosäure-Austausch der Glutaminsäuren 90, 94 und 97 in CHMP4B zu Lysin die Interaktion mit CC2D1A verhindert (Martinelli et al., 2012). C2-Domänen sind weiter verbreitet und kommen auch in anderen Proteinen vor. Ihre Funktion umfasst Protein-Protein Interaktionen sowie Protein-Membran Interaktionen. Hierbei können sie Ca²⁺ abhängig oder unabhängig an Phospholipide binden. Für *Drosophila* Lgd wurde gezeigt, dass die C2-Domäne *in vitro* an Phosphatidylinositole wie PI(3)P, PI(4)P und PI(5)P binden kann (Gallagher und Knoblich, 2006). Außerdem ist die C2-Domäne in *Drosophila* wichtig für die Proteinstabilität und die Lokalisation im Zytoplasma (Troost et al., 2012). Die Säuger Orthologe CC2D1A und CC2D1B haben eine hohe Ähnlichkeit mit Lgd (Abb.1.1). CC2D1A weist allerdings einen verlängerten C-Terminus nach der C2-Domäne auf, welchen CC2D1B oder Lgd nicht besitzen.

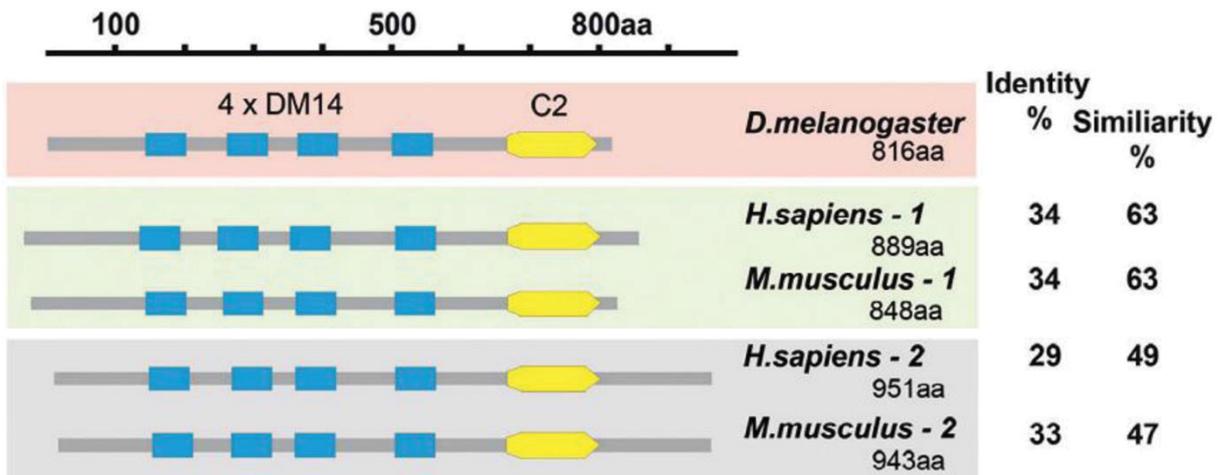


Abb1.6 Schematische Darstellung der Proteine der CC2D1-Familie.

Die Proteine der CC2D1-Familie besitzen im N-Terminus vier DM14 Domänen und C-terminal eine C2-Domäne. CC2D1B (*H.sapiens-1*, *M.musculus-1*) hat eine größere Ähnlichkeit mit dem Ortholog aus *Drosophila melanogaster* als CC2D1A (*H.sapiens-2*, *M.musculus-2*). CC2D1A besitzt nach der C2-Domäne einen verlängerten C-Terminus, welcher in CC2D1B und dem *Drosophila* Ortholog Lgd nicht vorkommt (modifiziert nach Jaekel und Klein, 2006).

Im Menschen wurde das Gen *CC2D1A* erstmals 2003 in einer Studie als positiver Regulator des NF- κ B Signalwegs identifiziert (Mastuda et al., 2003), CC2D1A aktiviert den kanonischen Signalweg (Zhao et al., 2010). Seither wurden mehrere weitere Funktionen in Säugern, hauptsächlich für CC2D1A beschrieben. So wird CC2D1A als Gerüstprotein für die Interaktion des EGF (epidermal growth factor)-Rezeptors mit PDK1 und Akt beschrieben. Hierbei führt der Verlust von CC2D1A zu einer gesteigerten Apoptose, während die Überexpression zu einer verstärkten Akt-Aktivität führt (Nakamura et al., 2008). Zudem soll CC2D1A an der Kohäsion der Zentriolen und der Bildung der bipolaren Spindelfasern während der Mitose beteiligt sein. Eine Herunterregulation von CC2D1A hat eine frühzeitige Teilung der Zentriolen sowie der multipolaren Spindel zur Folge (Nakamura et al., 2010; Nakamura et al., 2009). CC2D1A verbindet die NF- κ B Aktivierung bei der angeborenen Immunantwort mit den Toll-like-Rezeptor 3 und 4 abhängigen Signalwegen (Chang et al., 2011). Außerdem reguliert CC2D1A neben dem TLR auch den RLR (Retinoic acid-inducible gene I (RIG-I) like receptors) Signalweg und interagiert dabei mit der Kinase TBK1, wodurch eine antivirale Immunantwort ausgelöst wird (Chen et al., 2012). Neben diesen führt CC2D1A weitere Funktionen im zentralen Nervensystem aus. Neuronen von Mäusen zeigen bei Verlust von CC2D1A eine Störung in der funktionalen Reifung von Synapsen, sowie möglicherweise eine Störung der Endozytose und Reifung synaptischer Vesikel (Zhao et al., 2011). Des Weiteren wirkt CC2D1A als positiver Regulator des cAMP/PKA-Signalweges. CC2D1A rekrutiert möglicherweise den PKA Komplex zur Membran und vermittelt zusätzlich die Signaltransduktion (Al-Tawashi et al., 2012). Zudem interagiert CC2D1A mit der Phosphodiesterase PDE4D und reguliert so den Signalweg zusätzlich (Al-Tawashi und Gehring, 2013). Fehlt CC2D1A, kommt es in Zellkulturstudien zu einer Hypersensibilisierung der Neuronen unter Stresseinwirkung sowie einer Störung der Synapsen- und Dendriten Bildung. Der

Verlust von *Cc2d1a* führt bei Mäusen zu einer postnatalen Letalität, welche wahrscheinlich auf einen Atemdefekt, sowie eine fehlerhafte neuronale Entwicklung zurückzuführen ist (Drusenheimer et al., 2015; Manzini et al., 2014; Al-Tawashi et al., 2012; Zhao et al., 2011). Außerdem reguliert CC2D1A die Neurotransmission als transkriptioneller Repressor des Serotonin-1A (5-HT1A)-Rezeptorgens (Rogaeva and Albert, 2007; Ou et al., 2003). Hierbei fungieren CC2D1A und CC2D1B zusammen als dualer Mechanismus der 5-HT1A Rezeptorregulation (Hadjighassem et al., 2011; Hadjighassem et al., 2009). Des Weiteren ist CC2D1A ein transkriptioneller Repressor des Dopamin-D2 Rezeptorgens (*DRD2*) (Rogaeva et al., 2007).

Im Menschen wird eine verkürzte Form von CC2D1A mit einer autosomal-rezessiven nichtsyndromischen mentalen Retardierung (ARNSMR) in Verbindung gebracht, welche auch „nonsyndromic intellectual disability“ (NSID) genannt wird. Durch eine Deletion im Gen kommt es zu einer Verschiebung des Leserasters. Dabei entsteht nach der dritten DM14 Domäne ein 30 Aminosäure langes „nonsense“-Peptid gefolgt von einem Stopp-Codon (Basal-Vanagaite et al., 2006). Der vollständige Funktionsverlust von *CC2D1A* resultiert in einem großen Spektrum an kognitiven und sozialen Phänotypen, wie „intellectual disability“ (ID), „autism spectrum disorder“ (ASD) und führt zu epileptischen Anfällen (Manzini et al., 2014).

CC2D1B ist bisher weniger untersucht worden und über seine Funktion ist daher weniger bekannt. Mäuse mit einer *Cc2d1b* Defizienz sind lebensfähig und fertil und zeigen keinen sichtbaren Phänotypen. Vermutet wird eine teilweise Redundanz von *Cc2d1a* und *Cc2d1b* (Drusenheimer et al., 2015). Beschrieben ist eine gemeinsame transkriptionelle Repression des 5-HT1A Rezeptors zusammen mit CC2D1A. Zudem sollen CC2D1A und CC2D1B als negative Regulatoren der Polymerisierung von CHMP4B bei der Knospung von HIV-I (humaner Immundefizienz-Viren Typ 1) wirken. Dabei interagieren beide *in vitro* direkt in einem 1:1 Verhältnis mit CHMP4B (Martinelli et al., 2012). Zusätzlich blockiert CC2D1A die Funktion von ALIX bei der HIV Knospung (Usami et al., 2012).

In *Drosophila* ist der Phänotyp von *lgd* auf eine ektopische, ligandenunabhängige Aktivierung des Notch-Signalweges zurückzuführen. Zu dieser Aktivierung kommt es bei Akkumulation des Notch-Rezeptors in vergrößerten, spätendosomalen Kompartimenten (Jaekel and Klein, 2006; Gallagher und Knoblich, 2006; Childress et al., 2006). Zu dieser ektopischen Aktivierung des Rezeptors kommt es, da die Verpackung in intraluminale Vesikel gestört ist und so die Trennung vom Zytoplasma nicht erfolgt. Die intrazelluläre Domäne des Notch-Rezeptors kann so durch den γ -Sekretasekomplex abgespalten werden und in den Zellkern translozieren. (Schneider et al., 2013). In den Follikelzellen der Ovarien von *Drosophila*, in welchen Notch nicht exprimiert wird, kommt es bei *lgd* Verlust zu einer ektopischen Aktivierung des DPP (decapentaplegic)-Signalweges. Im Epithel der Ovarien kommt es zu einer Störung des Notch-Signalweges. Bei beiden Signalwegen resultiert die Störung aus einer Störung des endosomalen Transportwegs durch den *lgd* Verlust (Morawa et al., 2015). Dies

zeigt, dass Lgd eine generelle Funktion im endosomalen Transportweg in *Drosophila* hat und keine signalwegspezifische. Lgd wirkt dabei zusammen mit dem CHMP4 Ortholog Shrub und zeigt *in vivo* eine starke genetische, sowie *in vitro* eine direkte Interaktion. Rettungsexperimente zeigen, dass mindestens zwei DM14 Domänen für eine Rettung benötigt werden (Troost et al., 2012). Ein solche, generelle Funktion von CC2D1A und CC2D1B im endosomalen Transportweg konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Bei einer Herunterregulierung von CC2D1A konnte aber eine Reduktion der Endozytose sowie des endosomalen Transports von Transferrin (TF)- und EGF-Rezeptoren gezeigt werden (Collinet et al., 2010). In HEK-Zellen (humane embryonale Nierenzellen) konnte zudem eine Kollokalisierung von gleichzeitig Überexprimiertem CC2D1A und RAB7 oder LAMP1 gezeigt werden (Chang et al., 2011). Außerdem kann die Expression von CC2D1B den *lgd* Phänotypen vollständig, und die Expression von CC2D1A diesen partiell retten (Drusenheimer et al., 2015). Zusammen mit der *in vitro* gezeigten Interaktion von CC2D1A und CC2D1B mit der ESCRT-III Untereinheit CHMP4A/B/C, sowie dem regulatorischen Einfluss von CC2D1A auf CHMP4B bei der HIV Knospung lassen all diese Ergebnisse eine endosomale Funktion von CC2D1A und CC2D1B auch in Säugern vermuten.

1.4 Ziele der Arbeit

Sowohl für CC2D1A als auch für CC2D1B wurden bisher Funktionen in verschiedenen Signalwegen in Säugern beschrieben. Während in *Drosophila melanogaster* für das Ortholog Lgd eine wichtige Funktion im späten endosomalen Transportweg bereits untersucht und charakterisiert wurde, ist für die Säugerorthologe CC2D1A und CC2D1B nur deren Interaktion mit dem endosomalen Protein CHMP4B aus *in vitro* Experimenten bekannt. Sowohl in Mäusen als auch murinen, embryonalen Fibroblasten mit *Cc2d1a* oder *Cc2d1b* Defizienz konnte bisher kein endosomaler Phänotyp beobachtet werden.

Das erste Ziel war es, die Funktion von CC2D1A und CC2D1B im endosomalen Transportweg von Säugern weitergehend zu analysieren. Dazu sollten murine, embryonale Fibroblasten mit dem Genotypen *Vps4a*^{+/-};*Vps4b*^{+/-} generiert werden um, das ESCRT-System zu schwächen und einen endosomalen Phänotyp zu erzeugen. Mit Hilfe dieser Zellen sollten die folgenden Fragestellungen beantwortet werden.

1. Modifizieren zusätzliche Defizienzen für *Cc2d1a*, *Cc2d1b* oder beider Gene zusammen den endosomalen Phänotyp in *Vps4a*^{+/-};*Vps4b*^{+/-} Zellen?
2. Verändert sich die Lokalisation von CC2D1A bei einer Störung des ESCRT-Systems?
3. Interagiert CC2D1A mit CHMP4B endogen in Zellen?

Das zweite Ziel der Arbeit war es, die Interaktion von CC2D1A und CC2D1B mit ESCRT-Untereinheiten genauer zu analysieren. Für diese Untersuchungen wurde die Methode des FRET-Akzeptorphotobleichens in lebenden Zellen verwendet, um folgende Fragen zu beantworten.

1. Welche Domänen haben einen Einfluss auf die Lokalisation von CC2D1A und CC2D1B?
2. Gibt es neben CHMP4 weitere Interaktionspartner von CC2D1A und CC2D1B unter den Untereinheiten des ESCRT-III und VPS4-Komplexes?
3. Welche Domänen werden für die Interaktion mit bekannten und potentiellen neuen Interaktionspartnern benötigt?

2. Ergebnisse

2.1 Die Funktion von CC2D1A und CC2D1B im endosomalen Transportweg

Für die Proteine der CC2D1 Familie wurden bisher mehrere Funktionen in verschiedenen Signalwegen beschrieben (s. Kapitel 1.3). Allerdings beschäftigte sich keine der Untersuchungen mit einer möglichen Funktion im endosomalen Transportweg. Bekannt ist die Interaktion mit CHMP4B, welches eine Hauptuntereinheit des ESCRT-III Komplexes ist. Dieser ist von zentraler Bedeutung für die ILV Bildung während der Endosomenreifung. Die Interaktion von CC2D1A mit CHMP4B wurde allerdings nur bei der Knospung des HI-Virus untersucht, welcher Teile des ESCRT-III Komplexes für diese Funktion rekrutiert (Martinelli et al., 2012; Usami et al., 2012). In *Drosophila* wurde dagegen bereits gezeigt, dass das Ortholog der CC2D1 Proteine, Lgd während der Reifung der Endosomen benötigt wird. Fehlt Lgd, führt dies zu einer Störung der Verpackung des Notch Rezeptors in die ILVs und so zu einer ligandenunabhängigen Aktivierung. Zu erkennen ist auch eine Vergrößerung von späten, reifenden Endosomen, den MVBs (Troost et al., 2012). Um die Funktion der CC2D1 Proteine in Säugern zu untersuchen, wurden in vorangegangenen und parallelen Arbeiten „knockout“ Mäuse von *Cc2d1a* und *Cc2d1b* generiert. Aus diesen wurden embryonale Fibroblasten (MEFs) generiert, um diese zu untersuchen. In *Drosophila* wird der Phänotyp von *lgd* durch heterozytogenes *shrub* (*Chmp4* Ortholog) verstärkt. Es kommt zu einer früheren Letalität und vergrößerte Endosomen, in welchen Notch akkumuliert konnten beobachtet werden. (Troost et al., 2012). Da die Möglichkeit besteht, dass eine Redundanz der CC2D1 Proteine im endosomalen Transportweg besteht, sollte überprüft werden, ob durch eine Schwächung des ESCRT-Systems wie in *Drosophila* ein endosomaler Phänotyp bei *Cc2d1a* oder *Cc2d1b* Defizienz zu beobachten ist. Da keine Mauslinien mit *Chmp4* Defizienz zur Verfügung standen, wurden *Vps4a* und *Vps4b* KO- („knockout“) Mäuse gewählt. VPS4 wirkt nach dem ESCRT-III Komplex und ist für die Ablösung seiner Untereinheiten, wie CHMP4, verantwortlich, wie auch für die finale ILV Abschnürung. Auch VPS4 Verlust zeigt in Hefe einen „Class E“ Phänotypen. Sowohl der homozygote Verlust von *Vps4a* als auch *Vps4b* ist früh embryonal letal. Dies ist für alle bisher untersuchten ESCRT Untereinheiten ebenfalls der Fall, alle defizienten Embryonen sterben vor Tag E10 der embryonalen Entwicklung (s. Kapitel 1.2). Da sowohl *Vps4a*^{+/-} als auch *Vps4b*^{+/-} Tiere und MEF Zellen keinen erkennbaren Phänotyp zeigten (Masterarbeit, Bernhard Migdal, 2012) wurden *Vps4a*^{+/-};*Vps4b*^{+/-} Tiere durch Kreuzung generiert und MEF Zellen aus Embryonen gewonnen. Diese sollten dann im Hinblick auf einen endosomalen Phänotyp untersucht und mit den *Cc2d1a* und *Cc2d1b* KO-Zellen verglichen werden. Außerdem sollten sie als Kontrolle für einen endosomalen Phänotyp dienen, welcher durch Störung des ESCRT-Systems auftritt. Des Weiteren wurden *Vps4a*^{+/-};*Vps4b*^{+/-} MEF-Zellen generiert, bei welchen zusätzlich für *Cc2d1a*, *Cc2d1b* oder beide Gene homozygot mutant waren. Bei diesen Zellen sollte untersucht werden, ob es analog zu der genetischen Interaktion von *lgd* und *shrub* in *Drosophila* einen ähnlichen Effekt in

Säugerzellen gibt. Nachfolgend sind die Genotypen der untersuchten MEF-Zelllinien aufgelistet (siehe auch Kapitel 5.1.4.1).

Tabelle 2.1.1 Übersicht über die verwendeten Genotypen der MEF-Zellen. Unv. = unveröffentlicht; Ursprung *Vps4a*^{+/-} und *Vps4b*^{+/-} AG Köhler

Genotyp	Generierung der MEF-Zelllinie
Wildtyp	Diese Arbeit; AG Klein
<i>Cc2d1a</i> ^{-/-}	Diese Arbeit; AG Klein; Drusenheimer et al., 2015
<i>Cc2d1b</i> ^{-/-}	AG Klein; Drusenheimer et al., 2015
<i>Vps4a</i> ^{+/-} ; <i>Vps4b</i> ^{+/-}	Diese Arbeit
<i>Cc2d1a</i> ^{-/-} ; <i>Vps4a</i> ^{+/-} ; <i>Vps4b</i> ^{+/-}	Diese Arbeit
<i>Cc2d1b</i> ^{-/-} ; <i>Vps4a</i> ^{+/-} ; <i>Vps4b</i> ^{+/-}	Diese Arbeit; Bachelorarbeit Dominik Janßen, 2015
<i>Cc2d1a</i> ^{-/-} ; <i>Cc2d1b</i> ^{-/-}	Daisy Moll, Masterarbeit 2015; Nadja Drusenheimer unv.
<i>Cc2d1a</i> ^{-/-} ; <i>Cc2d1b</i> ^{-/-} ; <i>Vps4a</i> ^{+/-} ; <i>Vps4b</i> ^{+/-}	Diese Arbeit; Bachelorarbeit Dominik Janßen, 2015

2.1.1 *Cc2d1a*^{-/-} MEF Zellen zeigen nur schwachen endosomalen Defekt verglichen mit wildtypischen und *Vps4a*^{+/-}; *Vps4b*^{+/-} Zellen, *Cc2d1b*^{-/-} MEF Zellen zeigen keinen.

Der Verlust sowohl von *Cc2d1a* oder von *Cc2d1b* führt zu keiner mit Fluoreszenzmikroskopie erkennbaren Veränderung im endosomalen Transportweg in MEF-Zellen verglichen mit wildtypischen Zellen (Drusenheimer et al., 2015). So ist keine Veränderung bei frühen und reifenden, späten Endosomen erkennbar. Ebenfalls sind keine Veränderungen bei der Verteilung des endolysosomalen Markers LAMP1 zu erkennen (s. Abb.2.1.1 A², B² und C²). Der bekannte Interaktionspartner CHMP4B zeigt ebenso keine veränderte Verteilung. Es ist keine auffällige Kolo-kalisation mit LAMP1 positiven Endolysosomen zu detektieren (Abb.2.1.1 A³, B³, C³). Im Gegensatz dazu sind in *Vps4a*^{+/-}; *Vps4b*^{+/-} MEF-Zellen deutliche Veränderungen im endosomalen Transportweg zu erkennen. Mit Hilfe des Markers für späte Endosomen und Lysosomen, LAMP1 (Lysosomal-Associated Membrane Protein 1), lassen sich vergrößerte Strukturen nachweisen (Abb.2.1.1 D²). Da mit Hilfe von LAMP1 nicht zwischen späten Endosomen und Lysosomen unterschieden werden kann, werden die Strukturen zusammenfassend Endolysosomen genannt. In und an diesen vergrößerten Endolysosomen kommt es zu einer verstärkten Lokalisation von CHMP4B (Abb.2.1.1. D-D³, Pfeile).

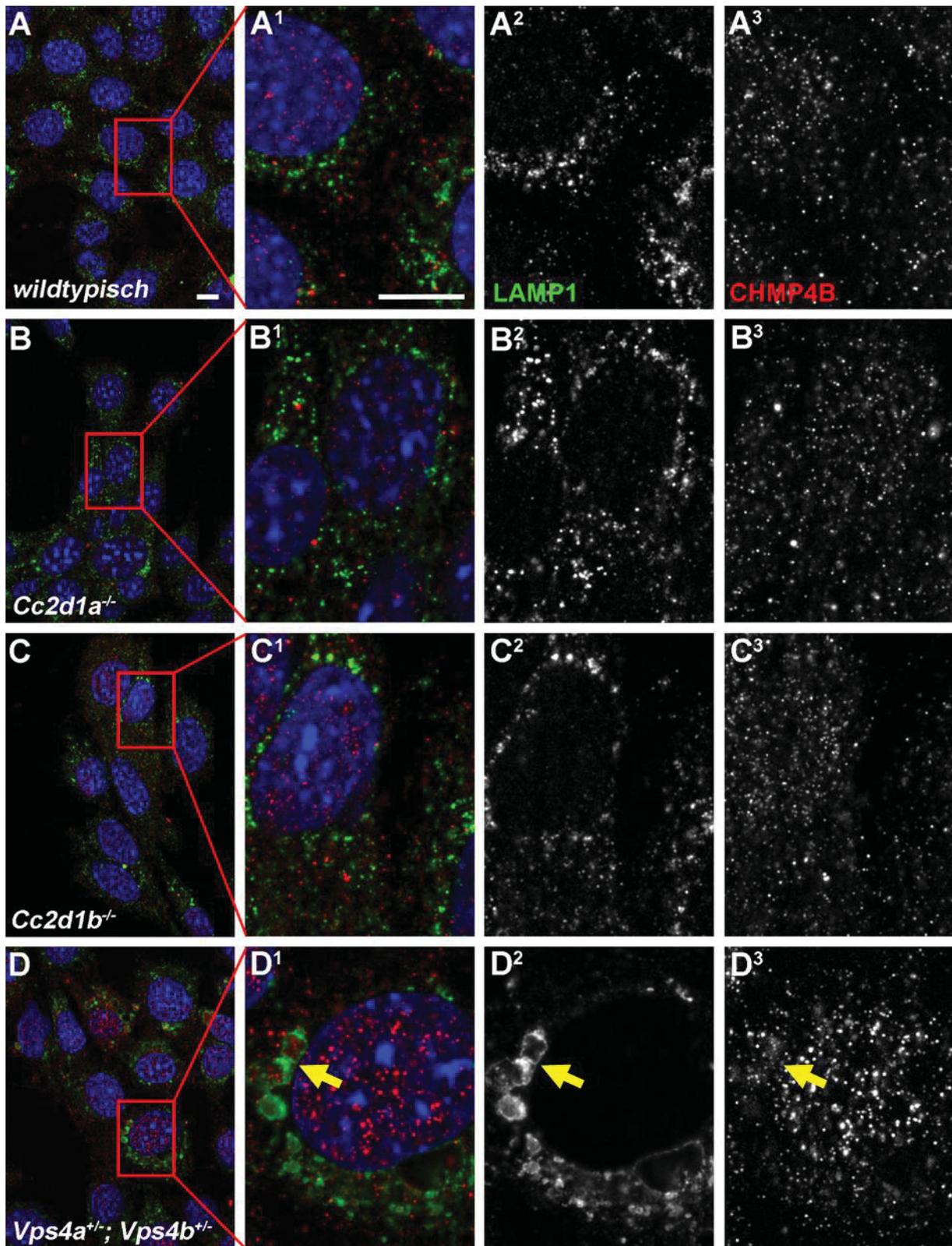


Abb.2.1.1 *Vps4a*^{+/-}; *Vps4b*^{+/-} Zellen zeigen im Gegensatz zu *Cc2d1a*^{-/-} und *Cc2d1b*^{-/-} Zellen einen **endosomal Phänotyp**. Sowohl der Verlust von *Cc2d1a* (B-B³) als auch der Verlust von *Cc2d1b* (C-C³) führt zu keiner erkennbaren Veränderung der Endolysosomen, welche durch LAMP1 markiert wurden (B² und C²). Auch die Verteilung von CHMP4B ist nicht verändert (B³ und C³), verglichen mit dem Wildtyp (A-A³). Zellen, welche heterozygot sowohl für *Vps4a* als auch *Vps4b* sind, zeigen hingegen deutliche Veränderungen (D-D³). In diesen Zellen sind stark vergrößerte LAMP1 positive Endolysosomen zu erkennen (D²). Zudem ist CHMP4B sowohl an, als auch in diesen Endolysosomen zu sehen (D²-D³). Die Maßstabsbalken entsprechen 10 μm .

Mit Hilfe der Transemissionselektronenmikroskopie wurden diese Phänotypen auf ultrastruktureller Ebene weiter untersucht. Hier zeigt sich, dass sowohl in *Cc2d1a*^{-/-} als auch in *Cc2d1b*^{-/-} Zellen die Morphologie der Endolysosomen im Vergleich zu wildtypischen Zellen nicht verändert ist (Abb. 2.1.2 A-A², B-B² und C-C², Pfeile). Es sind reifende Endosomen zu erkennen, welche noch keine erkennbaren ILVs gebildet haben. Außerdem finden sich (Endo)lysosomen, welche mit ILVs oder elektronendichtem Material gefüllt sind. Zum Teil enthalten sie auch erkennbare Membranstrukturen. Die Endosomen und Lysosomen haben eine rundliche Form, welche sich zwischen den wildtypischen Zellen und den *Cc2d1a*^{-/-} bzw. *Cc2d1b*^{-/-} Zellen nicht unterscheidet.

In *Vps4a*^{+/-}; *Vps4b*^{+/-} Zellen ist bereits im Lichtmikroskop ein starker endosomaler Phänotyp zu erkennen. In diesen Zellen treten deutlich vergrößerte Endolysosomen auf (Abb. 2.1.2 D-D²). Diese Strukturen sind auch in elektronenmikroskopischen Aufnahmen zu beobachten und sind im Vergleich zum Wildtypen deutlich vergrößert. Außerdem zeigen sie auffällige morphologische Veränderungen. Neben der veränderten Größe zeigt sich, dass es bei einem Teil der Endolysosomen zu einem Verlust der wildtypischen, runden Form kommt (Abb. 2.1.2 D¹ und D²). Viele sind mit stark elektronendichtem Material gefüllt und es sind kaum noch ILVs zu erkennen (Abb. 2.1.2 D², Pfeile). Bei anderen kommt es zu einer starken Anhäufung von Membranstrukturen im Inneren (Abb. D¹, Pfeile). Diese beobachteten morphologischen Veränderungen sind vergleichbar mit den in der Hefe beobachteten „Class E“ Kompartimenten. Dort kommt es bei Verlust von ESCRT-Komplexen zur Bildung von abnormal vergrößerten, endolysosomalen Strukturen und Häufung von Membranen. An diesen akkumulieren Rezeptoren und Transmembranproteine (Raymond et al., 1992). Auch konnten ähnliche morphologische Veränderungen bei siRNA induziertem „knockdown“ der ESCRT-Komplexe 0 bis III beobachtet werden (Stuffers et al., 2009)

Während weder lichtmikroskopisch noch elektronenmikroskopisch in *Cc2d1a*^{-/-} oder in *Cc2d1b*^{-/-} Zellen ein endosomaler Phänotyp zu erkennen ist, ist ein solcher bei *Vps4a*^{+/-}; *Vps4b*^{+/-} Zellen zu beobachten. Sowohl in Größe und Morphologie unterscheiden sich die Endolysosomen dieser Zellen deutlich vom Wildtypen. Um die Veränderung der Größe zu quantifizieren, wurden die Endosomen und Lysosomen der Zellen aller Genotypen ausgemessen und statistisch ausgewertet (s. Abb. 2.1.3 und Abb. 2.1.4). Dabei wurden sowohl frühe endosomale Kompartimente, als auch spät endolysosomale Kompartimente ausgemessen und gemeinsam ausgewertet. Diese Kompartimente wurden auf Grundlage veröffentlichter Charakterisierungen von frühen und späten endosomalen Kompartimenten identifiziert (Vogel et al., 2015; Stuffers et al., 2009).

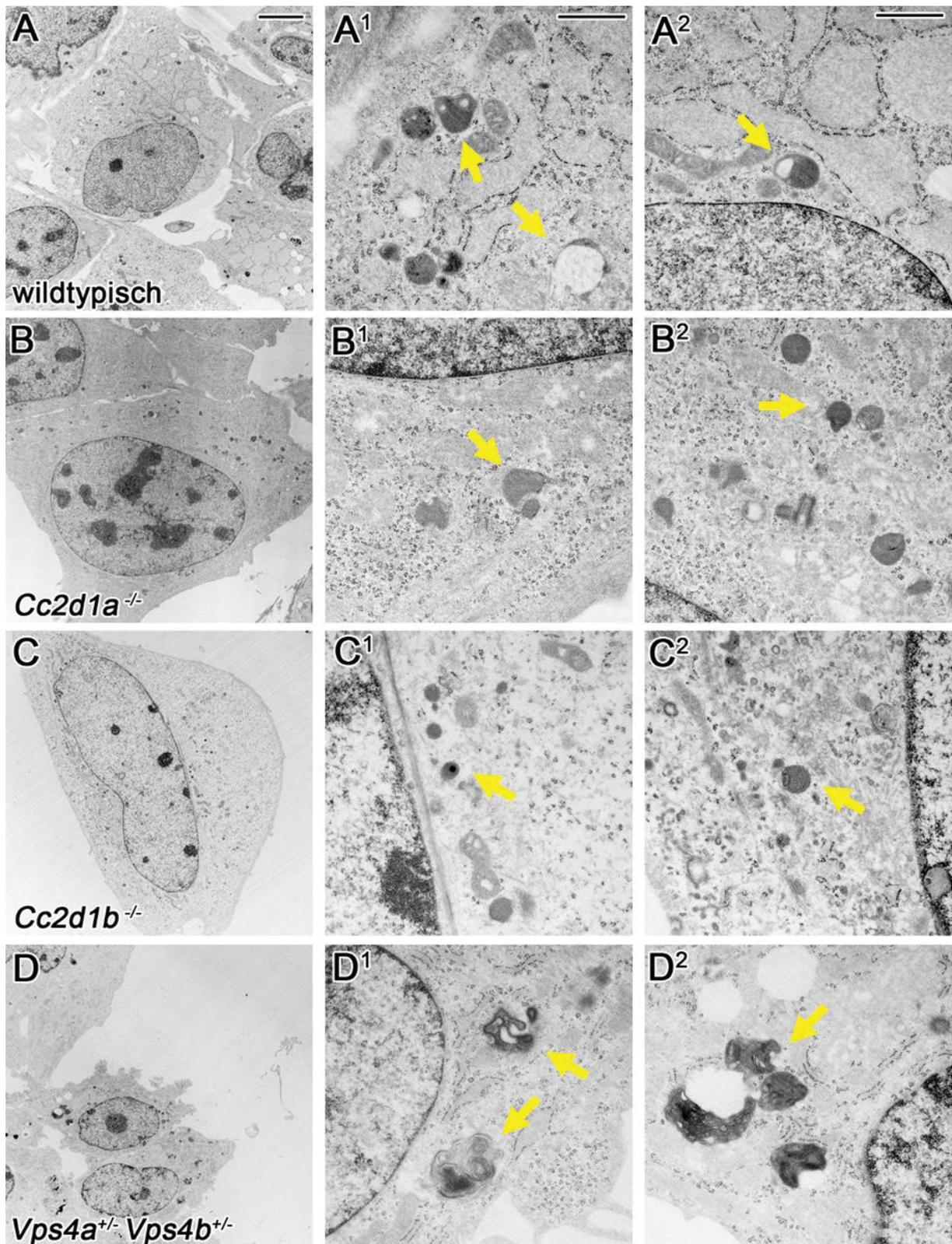


Abb.2.1.2 Die ultrastrukturelle Analyse zeigt morphologische Veränderungen von Endolysosomen in *Vps4a*^{+/-};*Vps4b*^{+/-} Zellen. Die Ultrastruktur der Endolysosomen unterscheidet sich morphologisch im Wildtyp nicht von der in *Cc2d1a*^{-/-} (B-B²) und *Cc2d1b*^{-/-} (C-C²) Zellen. In *Vps4a*^{+/-};*Vps4b*^{+/-} Zellen sind hingegen stark vergrößerte Endolysosomen zu erkennen, welche sich morphologisch deutlich von wildtypischen unterscheiden. Diese Endolysosomen zeigen stark membranöse Inhalte und einen partiellen Verlust der runden Form (D¹ und D², Pfeile). Die Maßstabsbalken entsprechen 5 µm (A-D) und 0,5 µm (A¹-D¹ und A²-D²).

Um die Veränderung der Größe der Endolysosomen auszuwerten, wurde ihr Umfang gemessen. Hierfür wurden in mindestens vier unabhängigen Experimenten die Endolysosomen von wenigstens 35 Zellen pro Genotyp ausgemessen. Dabei zeigt sich, dass zwar die Morphologie der Endolysosomen der *Cc2d1a*^{-/-} und *Cc2d1b*^{-/-} Zellen im Vergleich zum Wildtyp nicht verändert ist, die Größe jedoch schon (Abb.2.1.3). Die Endolysosomen der wildtypischen MEF Zellen sind im Durchschnitt 1415 nm (± 552 nm) groß. Bei den *Cc2d1b*^{-/-} MEFs sind die Endolysosomen im Durchschnitt etwa 200 nm größer (1610 \pm 781 nm). Deutlich größer sind dagegen die der *Cc2d1a*^{-/-} Zellen mit 2108 nm (± 1057 nm). Die morphologisch stark veränderten Endolysosomen der *Vps4a*^{+/-};*Vps4b*^{+/-} Zellen sind nochmals deutlich größer (2675 \pm 1215 nm). In *Drosophila* wurden ähnliche Größen für Endolysosomen in wildtypischen (1581 \pm 506 nm) und *lgd* mutanten Zellen (2210 \pm 596 nm) gemessen (Schneider et al., 2012).

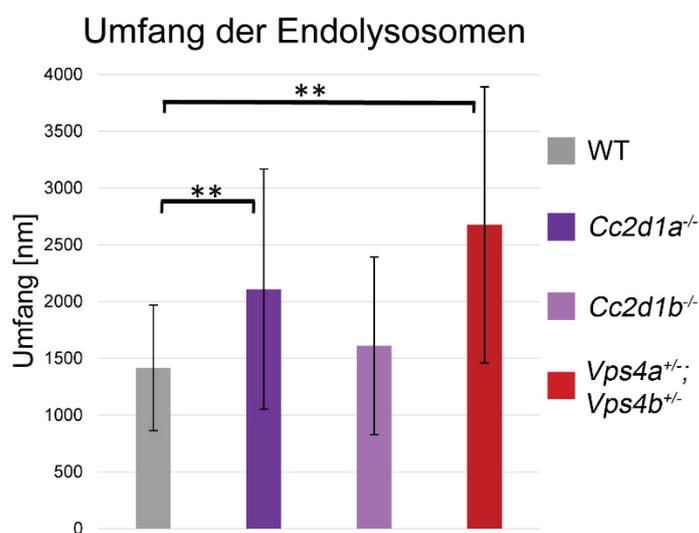


Abb.2.1.3 Mittelwerte des Umfangs der Endolysosomen von wildtypischen MEF Zellen sowie *Cc2d1a*^{-/-}, *Cc2d1b*^{-/-} und *Vps4a*^{+/-};*Vps4b*^{+/-} MEFs.

Während Endolysosomen in wildtypische MEF Zellen einen mittleren Umfang von 1415 \pm 552 nm haben sind sie vor allem in *Cc2d1a*^{-/-} und *Vps4a*^{+/-};*Vps4b*^{+/-} MEFs deutlich größer. Die Endolysosomen der *Cc2d1a*^{-/-} sind mit 2108 \pm 1057 nm etwa 50% größer, damit jedoch immer noch kleiner als die 2675 \pm 1215 nm großen Endolysosomen der *Vps4a*^{+/-};*Vps4b*^{+/-} Zellen. Kaum größer als im Wildtyp sind sie in den *Cc2d1b*^{-/-} Zellen mit 1610 \pm 781 nm.

Um die Veränderung der Endolysosomen weiter zu analysieren, wurden sie ihrer Größe nach sortiert. Dabei wurden sie in Gruppen von je 100 nm beginnend mit 400 nm (dem kleinsten, gemessenen Umfang) zusammengefasst und der Anteil der Gruppe an der Gesamtzahl der ausgemessenen Endolysosomen dargestellt (Abb.2.1.4). Bei wildtypischen Zellen haben rund 87 % der Endolysosomen einen Umfang von weniger als 2000 nm. Lediglich 1,3 % der Endolysosomen ist größer als 3000 nm. Diese Verteilung ist bei *Cc2d1b*^{-/-} sehr ähnlich. Es treten alle Größenklassen auf, allerdings steigt der Anteil der großen Endolysosomen etwas. Etwa 81 % sind kleiner als 2000 nm während der Anteil der Endolysosomen, welche größer als 3000 nm sind auf rund 6 % steigt. Deutlich verändert ist die Verteilung in *Cc2d1a*^{-/-} und *Vps4a*^{+/-};*Vps4b*^{+/-}. Bei beiden Genotypen treten keine

Endolysosomen auf, welche einen Umfang von unter 1000 nm hatten. Bei den *Cc2d1a*^{-/-} Zellen haben 58 % der Endolysosomen einen Umfang zwischen 1000 und 2000 nm. Zudem sind 10 % größer als 3000 nm und es treten Endolysosomen mit einem Umfang von über 5000 nm auf (2 %). Bei *Vps4a*^{+/-}; *Vps4b*^{+/-} ist eine noch stärkere Verschiebung der Größen zu beobachten. Bei diesen Zellen sind bereits 52 % der Endolysosomen größer als 3000 nm. Außerdem haben rund 6 % einen Umfang über 5000 nm. Lediglich 30 % der Endolysosomen sind kleiner als 2000 nm.

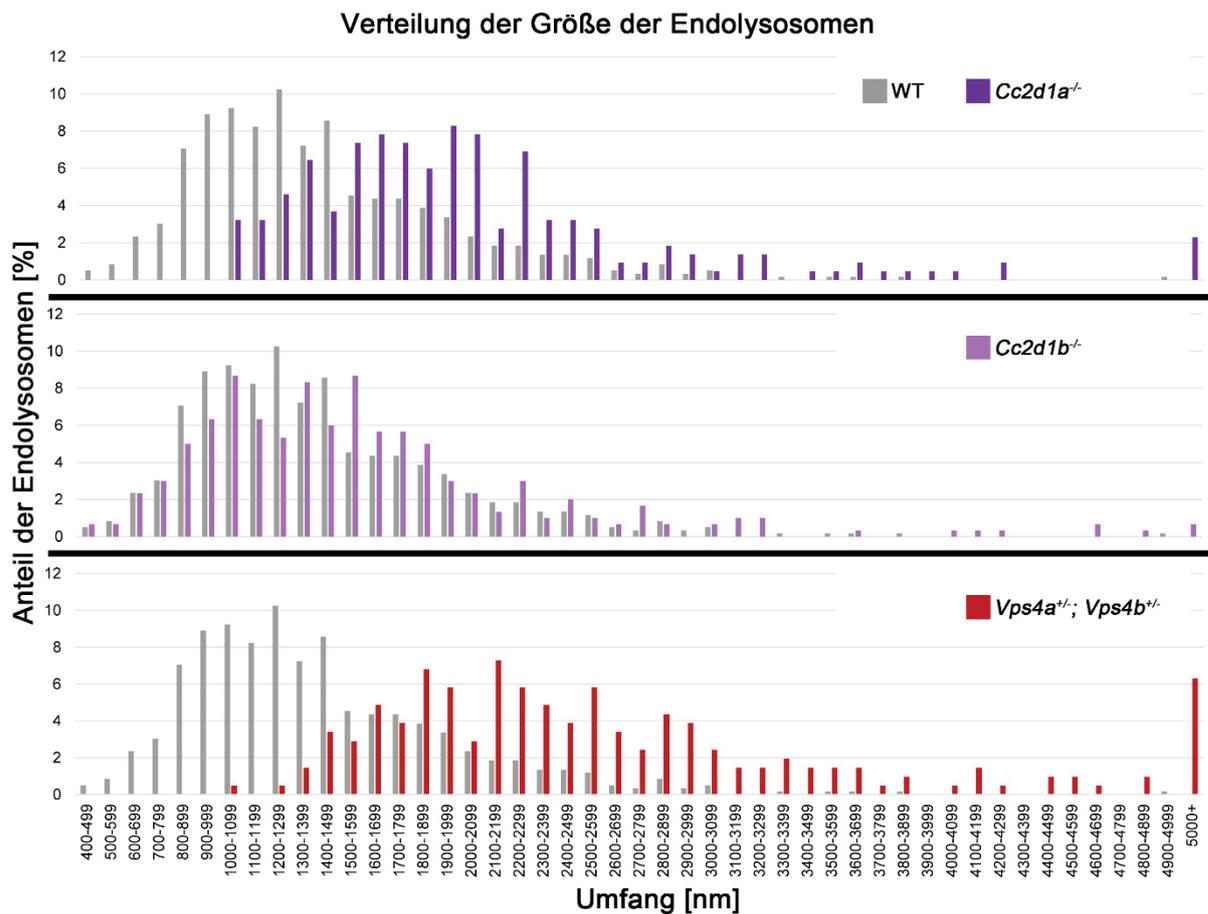


Abb.2.1.4 Verteilung der Größen von Endolysosomen. Während sich die Größenverteilung der Endolysosomen bei *Cc2d1b*^{-/-} im Vergleich zum Wildtypen insgesamt kaum verändert ist, tritt bei *Cc2d1a*^{-/-} und *Vps4a*^{+/-}; *Vps4b*^{+/-} eine Verschiebung auf. Zum einen treten bei diesen beiden Genotypen keine Endolysosomen unter 1000 nm mehr auf, zum anderen steigt der Anteil an größeren Endolysosomen an. Vor allem bei *Vps4a*^{+/-}; *Vps4b*^{+/-} Zellen ist ein deutlicher Anstieg an Endolysosomen mit einem Umfang von über 3000 nm zu erkennen ebenso wie eine große Anzahl welche größer als 5000 nm sind.

2.1.2 Der zusätzliche Verlust von *Cc2d1a* und *Cc2d1b* modifiziert den endosomalen Phänotyp von *Vps4a*^{+/-}; *Vps4b*^{+/-} Zellen.

Der endosomale Phänotyp von *Vps4a*^{+/-}; *Vps4b*^{+/-} MEF Zellen unterscheidet sich deutlich von dem, der *Cc2d1a*^{-/-} und *Cc2d1b*^{-/-} Zellen. Durch eine Kombination der Genotypen wurde daher analysiert, ob sich diese Phänotypen verändern. Durch Kreuzung der vorhandenen Mauslinien wurden MEF Zelllinien mit dem Genotyp *Cc2d1a*^{-/-}; *Vps4a*^{+/-}; *Vps4b*^{+/-} gewonnen. Außerdem wurden mit Hilfe des CRISPR/Cas9 Systems ausgehend von *Vps4a*^{+/-}; *Vps4b*^{+/-} MEF Zellen, solche mit dem Genotyp *Cc2d1b*^{-/-}; *Vps4a*^{+/-}; *Vps4b*^{+/-} generiert (Bachelorarbeit Dominik Janßen, 2015). Ferner wurden so aus *Cc2d1a*^{-/-}; *Vps4a*^{+/-}; *Vps4b*^{+/-} zusätzlich *Cc2d1a*^{-/-}; *Cc2d1b*^{-/-}; *Vps4a*^{+/-}; *Vps4b*^{+/-} Zellen geschaffen. In parallelen Arbeiten wurden MEF Linien mit dem Genotyp *Cc2d1a*^{-/-}; *Cc2d1b*^{-/-} generiert, da durch eine frühe embryonale Letalität die Gewinnung von MEF Linien aus Embryonen nicht möglich war (Masterarbeit Daisy Moll, 2015; Nadja Drusenheimer, unveröffentlicht). Diese Zellen wurden zusätzlich als Vergleich genutzt. Der zusätzliche Verlust sowohl von *Cc2d1a* oder *Cc2d1b* in *Vps4a*^{+/-}; *Vps4b*^{+/-} Zellen führt zu einer Veränderung des lichtmikroskopisch sichtbaren Phänotyps. Sowohl in *Cc2d1a*^{-/-}; *Vps4a*^{+/-}; *Vps4b*^{+/-} als auch in *Cc2d1b*^{-/-}; *Vps4a*^{+/-}; *Vps4b*^{+/-} Zellen treten die stark vergrößerten LAMP1 positiven Endolysosomen nicht mehr auf (Abb.2.1.5 B², C² und D²). Die Endolysosomen sind allerdings immer noch größer, als solche in wildtypischen MEF Zellen. Auffällig ist bei den großen Endolysosomen der *Vps4a*^{+/-}; *Vps4b*^{+/-} Zellen, dass CHMP4B sowohl an, als auch in diesen verstärkt zu detektieren ist, während im Wildtypen keine Kolokalisation beobachtet werden konnte. In *Cc2d1a*^{-/-}; *Vps4a*^{+/-}; *Vps4b*^{+/-} und *Cc2d1b*^{-/-}; *Vps4a*^{+/-}; *Vps4b*^{+/-} MEFs lokalisiert CHMP4B ebenfalls noch an und in den Endolysosomen (Abb.2.1.5 C¹⁻³ und D¹⁻³).

Die Untersuchung der Ultrastruktur mittels Elektronenmikroskop zeigt, dass die Morphologie der Endolysosomen in *Cc2d1a*^{-/-}; *Vps4a*^{+/-}; *Vps4b*^{+/-} und *Cc2d1b*^{-/-}; *Vps4a*^{+/-}; *Vps4b*^{+/-} Zellen nicht wildtypisch ist (Abb.2.1.6). Während lichtmikroskopisch erkennbar ist, dass die Endolysosomen bei beiden Genotypen kleiner sind, zeigt sich hier, dass ihre Morphologie immer noch der von *Vps4a*^{+/-}; *Vps4b*^{+/-} Endolysosomen entspricht. Es ist auch hier ein „Class E“ ähnlicher Phänotyp zu beobachten. Die Endolysosomen zeigen zum Teil einen Verlust ihrer wildtypischen runden Form, ebenso wie eine starke Einlagerung membranösen und elektronendichten Materials (Abb.2.1.6, C¹⁻² und D¹⁻², Pfeile). ILVs sind wie in *Vps4a*^{+/-}; *Vps4b*^{+/-} auch bei diesen beiden Genotypen zu beobachten.

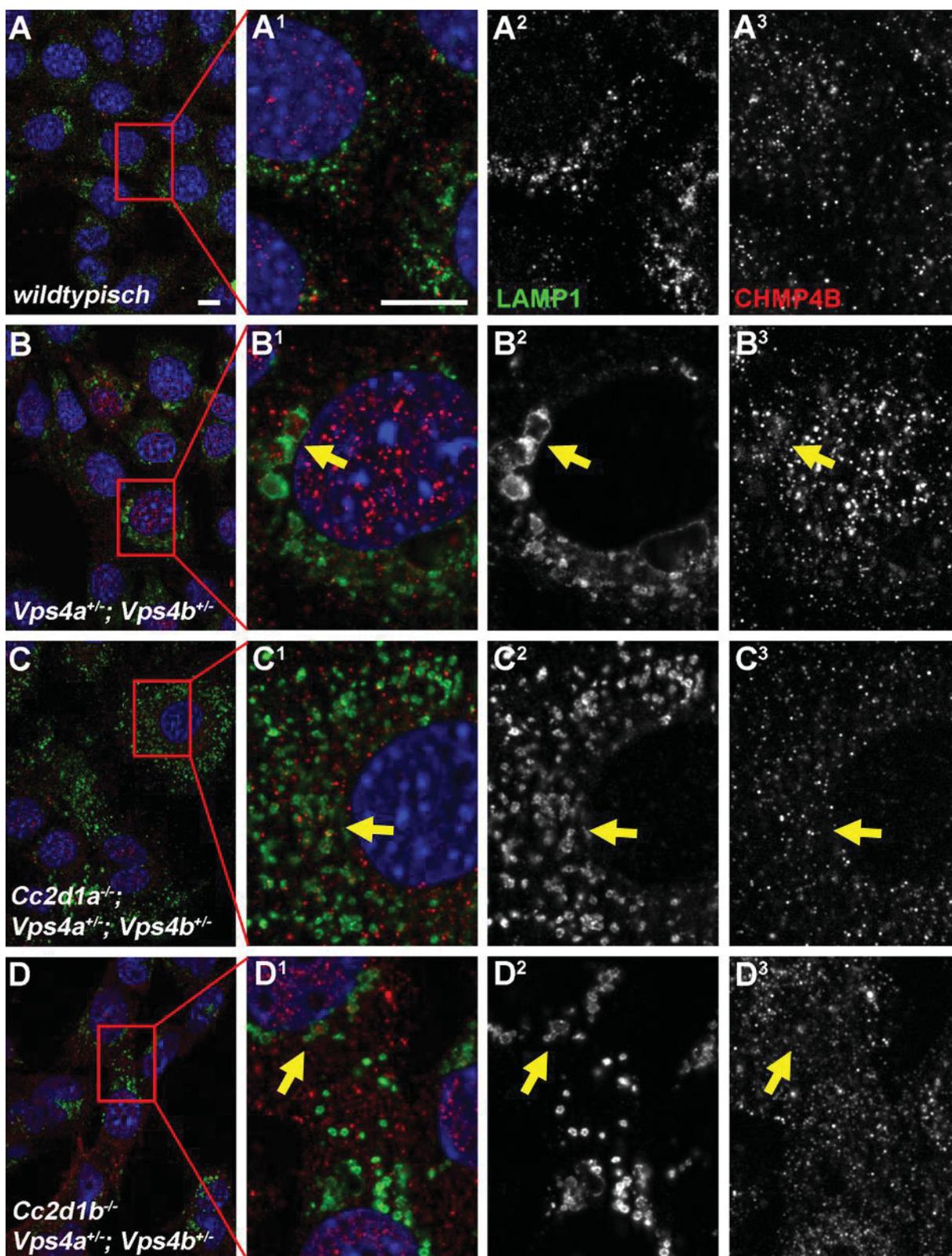


Abb.2.1.5 Der zusätzliche Verlust von *Cc2d1a* oder *Cc2d1b* in *Vps4a*^{+/-};*Vps4b*^{+/-} MEF Zellen verändert den endosomalen Phänotyp. In *Vps4a*^{+/-};*Vps4b*^{+/-} Zellen treten im Vergleich zu wildtypischen Zellen stark vergrößerte LAMP1 positive Endolysosomen auf (A², B²) welche eine Kolokalisation mit CHMP4B zeigen (B¹⁻³, Pfeile). Sowohl in *Cc2d1a*^{-/-};*Vps4a*^{+/-};*Vps4b*^{+/-} und *Cc2d1b*^{-/-};*Vps4a*^{+/-};*Vps4b*^{+/-} sind die Endolysosomen wieder kleiner (C², D²) zeigen allerdings immer noch zum Teil Kolokalisationen mit CHMP4B (C¹⁻³ und D¹⁻³, Pfeile). Die Maßstabsbalken entsprechen 10 µm.

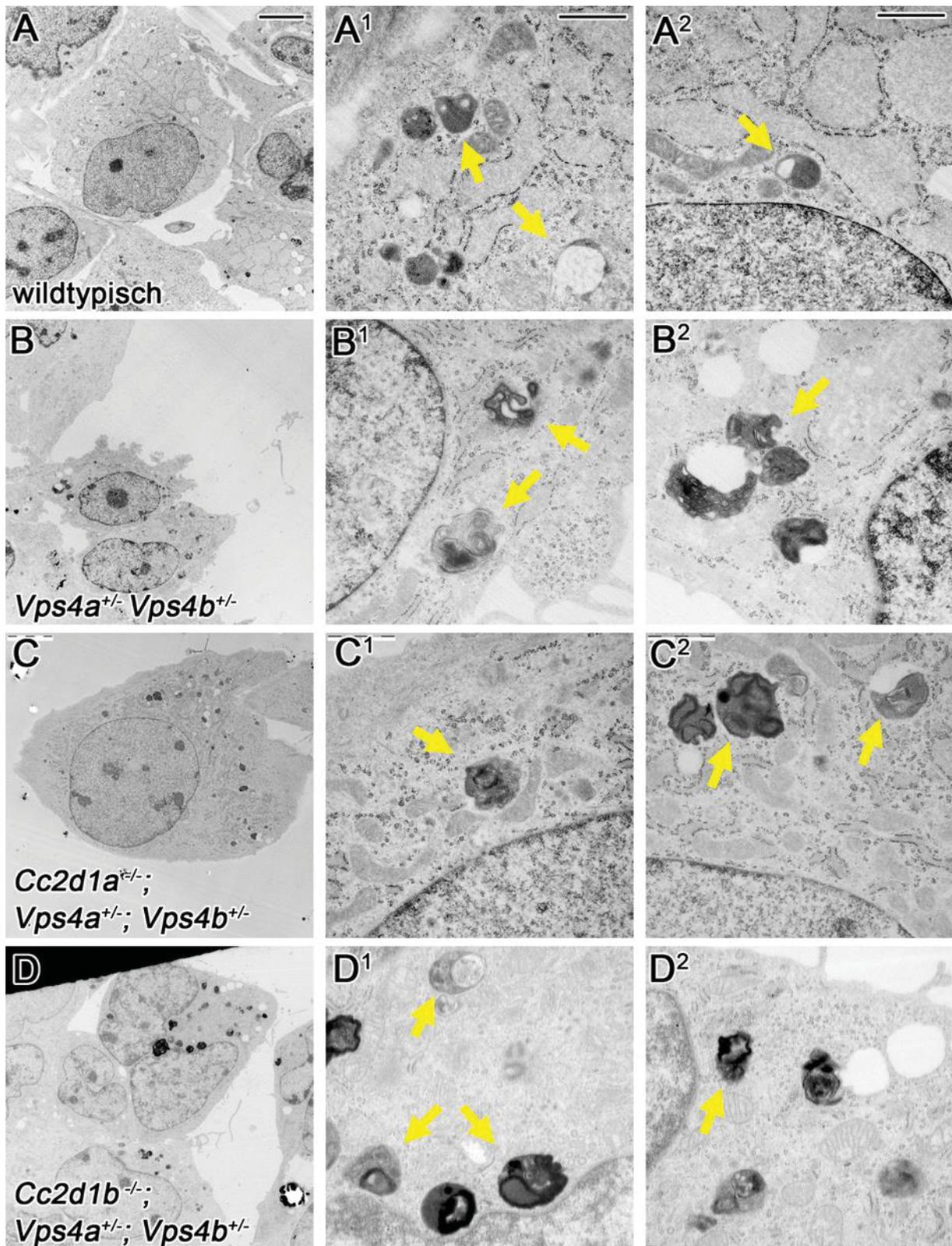


Abb.2.1.6 Die Endolysosomen in *Cc2d1a^{-/-};Vps4a^{+/-};Vps4b^{+/-}* und *Cc2d1b^{-/-};Vps4a^{+/-};Vps4b^{+/-}* Zellen zeigen einen ähnlichen “Class E” Phänotyp wie solche in *Vps4a^{+/-};Vps4b^{+/-}* MEFs. Die im Vergleich zum Wildtypen (A-A²) stark veränderte Morphologie der Endolysosomen in *Vps4a^{+/-};Vps4b^{+/-}* Zellen (B-B²) bleibt auch bei einem zusätzlichen Verlust von *Cc2d1a* (C-C²) oder *Cc2d1b* (D-D²) erhalten. Die wildtypisch runde Form geht zum Teil verloren und es zeigen sich starke Einlagerungen von Membranen und elektronendichtem Material. Weiterhin sind ILVs in allen Genotypen zu erkennen. Die Maßstabsbalken entsprechen 5 μ m (A-D) und 0,5 μ m (A¹-D¹ und A²-D²).

Da der Verlust von *Cc2d1a* oder *Cc2d1b* in *Vps4a^{+/-};Vps4b^{+/-}* Zellen nicht zu einer veränderten Morphologie der Endolysosomen, aber zu einer geringeren Größe führt, wurde untersucht, was der gemeinsame Verlust von beiden *Cc2d1* Genen in *Vps4a^{+/-};Vps4b^{+/-}* Zellen bewirkt. Dazu wurden auf Grundlage der *Cc2d1a^{-/-};Vps4a^{+/-};Vps4b^{+/-}* Zellen mit Hilfe des CRISPR/Cas9 Systems Zellen generiert, welche den Genotypen *Cc2d1a^{-/-};Cc2d1b^{-/-};Vps4a^{+/-};Vps4b^{+/-}* haben (Bachelorarbeit Dominik Janßen, 2015). Diese wurden mit den *Cc2d1a^{-/-};Vps4a^{+/-};Vps4b^{+/-}* und *Cc2d1b^{-/-};Vps4a^{+/-};Vps4b^{+/-}* Zellen, sowie mit der *Cc2d1a^{-/-};Cc2d1b^{-/-}* Zelllinie DKO25 verglichen (Masterarbeit Daisy Moll, 2015). Die *Cc2d1a^{-/-};Cc2d1b^{-/-}* Zellen zeigen ähnlich stark vergrößerte LAMP1 positive Endolysosomen wie die *Vps4a^{+/-};Vps4b^{+/-}* (Abb.2.1.7 A², vgl. Abb. 2.1.5 B²). CHMP4B lokalisiert ebenfalls in und an diesen vergrößerten Endolysosomen (Abb.2.1.7 A-A³, Pfeile). Bei den Zellen der *Cc2d1a^{-/-};Vps4a^{+/-};Vps4b^{+/-}* und *Cc2d1b^{-/-};Vps4a^{+/-};Vps4b^{+/-}* Linien waren die Endolysosomen immer noch größer als im Wildtypen, aber wieder kleiner als in *Vps4a^{+/-};Vps4b^{+/-}* Zellen (Abb.2.1.5). In den Zellen der *Cc2d1a^{-/-};Cc2d1b^{-/-};Vps4a^{+/-};Vps4b^{+/-}* Linie ist eine sehr große Anzahl LAMP1 positiver Endolysosomen erkennbar. Diese haben eine klare, rundliche Form und akkumulieren zum Teil (Abb.2.1.7 D²). CHMP4B ist nicht in diesen Endolysosomen zu erkennen, allerdings lokalisiert es an ihnen (Abb.2.1.7 D¹⁻³, Pfeil).

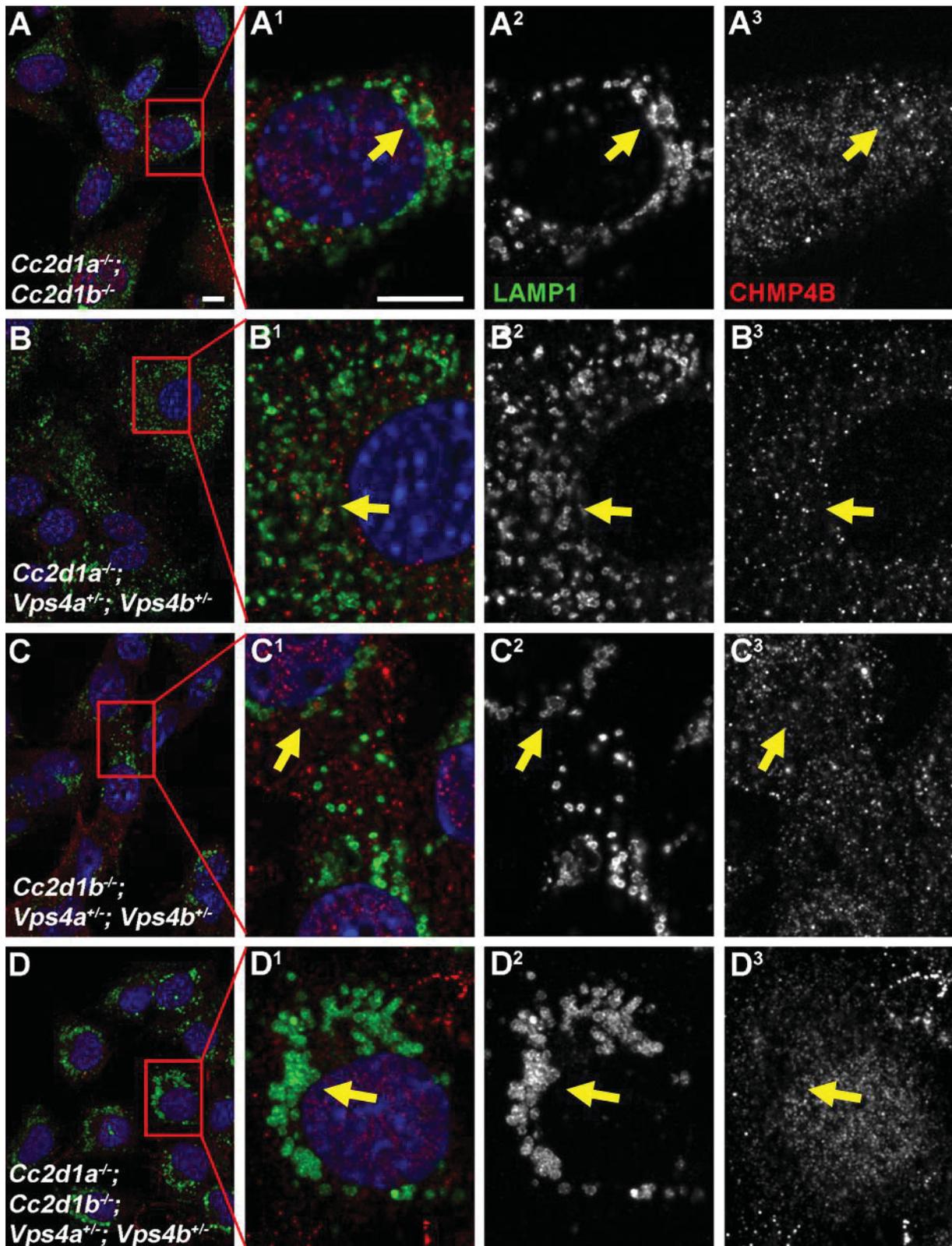


Abb.2.1.7 *Cc2d1a^{-/-};Cc2d1b^{-/-};Vps4a^{+/-};Vps4b^{+/-}* Zellen zeigen einen anderen endosomal Phänotyp als die bisher untersuchten Genotypen. *Cc2d1a^{-/-};Cc2d1b^{-/-};Vps4a^{+/-};Vps4b^{+/-}* Zellen zeigen eine sehr große Anzahl LAMP1 positiver Endolysosomen (D²). CHMP4B lokalisiert an, aber nicht in diesen Endolysosomen (D¹⁻³, Pfeile). Dies unterscheidet sie von denen der *Cc2d1a^{-/-};Vps4a^{+/-};Vps4b^{+/-}* (B-B³) und *Cc2d1b^{-/-};Vps4a^{+/-};Vps4b^{+/-}* (C-C³) Zellen. Zum einen zeigen diese keine so klare Form (B², C²), zum anderen lokalisiert CHMP4B nicht nur an, sondern auch in ihnen. *Cc2d1a^{-/-};Cc2d1b^{-/-}* Zellen zeigen vergrößerte Endolysosomen (A²), in und an denen CHMP4B lokalisiert (A¹⁻³, Pfeile). Die Maßstabsbalken entsprechen 10 μ m.

Die ultrastrukturelle Analyse der endosomalen Phänotypen dieser Zelllinien zeigt starke Unterschiede in der Morphologie der Endolysosomen. In Zellen der *Cc2d1a*^{-/-};*Cc2d1b*^{-/-} Linie sind sie deutlich größer als in wildtypischen Zellen, vergleichbar mit den Größen der *Cc2d1a*^{-/-};*Vps4a*^{+/-};*Vps4b*^{+/-} und *Cc2d1b*^{-/-};*Vps4a*^{+/-};*Vps4b*^{+/-} Zellen. Ähnlich wie bei den Zellen mit *Vps4a*^{+/-};*Vps4b*^{+/-} Genotyp zeigen sich starke Einlagerungen von Membranen und elektronendichtem Material. Ebenfalls verlieren sie zum Teil ihre wildtypisch runde Form und zeigen eine starke Deformation. Ein Unterschied ist allerdings, dass sehr große ILVs zu erkennen sind. Sie sind zum Teil deutlich größer als in den anderen untersuchten Genotypen (Abb.2.1.8 A-A², Pfeile).

Bei den Zellen der *Cc2d1a*^{-/-};*Cc2d1b*^{-/-};*Vps4a*^{+/-};*Vps4b*^{+/-} Linie war schon in der lichtmikroskopischen Analyse zu erkennen, dass die Endolysosomen eine runde Form haben, als die der anderen defizienten Zelllinien. Dies lässt sich auch auf der Ebene der Ultrastruktur bestätigen. Die Endolysosomen haben eine vergleichsweise einheitliche Größe und eine runde Form (Abb.2.1.8 D-D²). Nur vereinzelt sind sie ähnlich deformiert wie bei den anderen Genotypen (Abb.2.1.8 D², Pfeil). Auch ist zu erkennen, dass diese Endolysosomen in großer Anzahl in den Zellen auftreten. Zudem zeigen sich kaum Einlagerungen von Membranen oder stark elektronendichtem Material. Die Füllung der Endolysosomen ist vergleichsweise gleichmäßig. Damit unterscheidet sich der endosomale Phänotyp der *Cc2d1a*^{-/-};*Cc2d1b*^{-/-};*Vps4a*^{+/-};*Vps4b*^{+/-} Zellen deutlich von dem der anderen Genotypen.

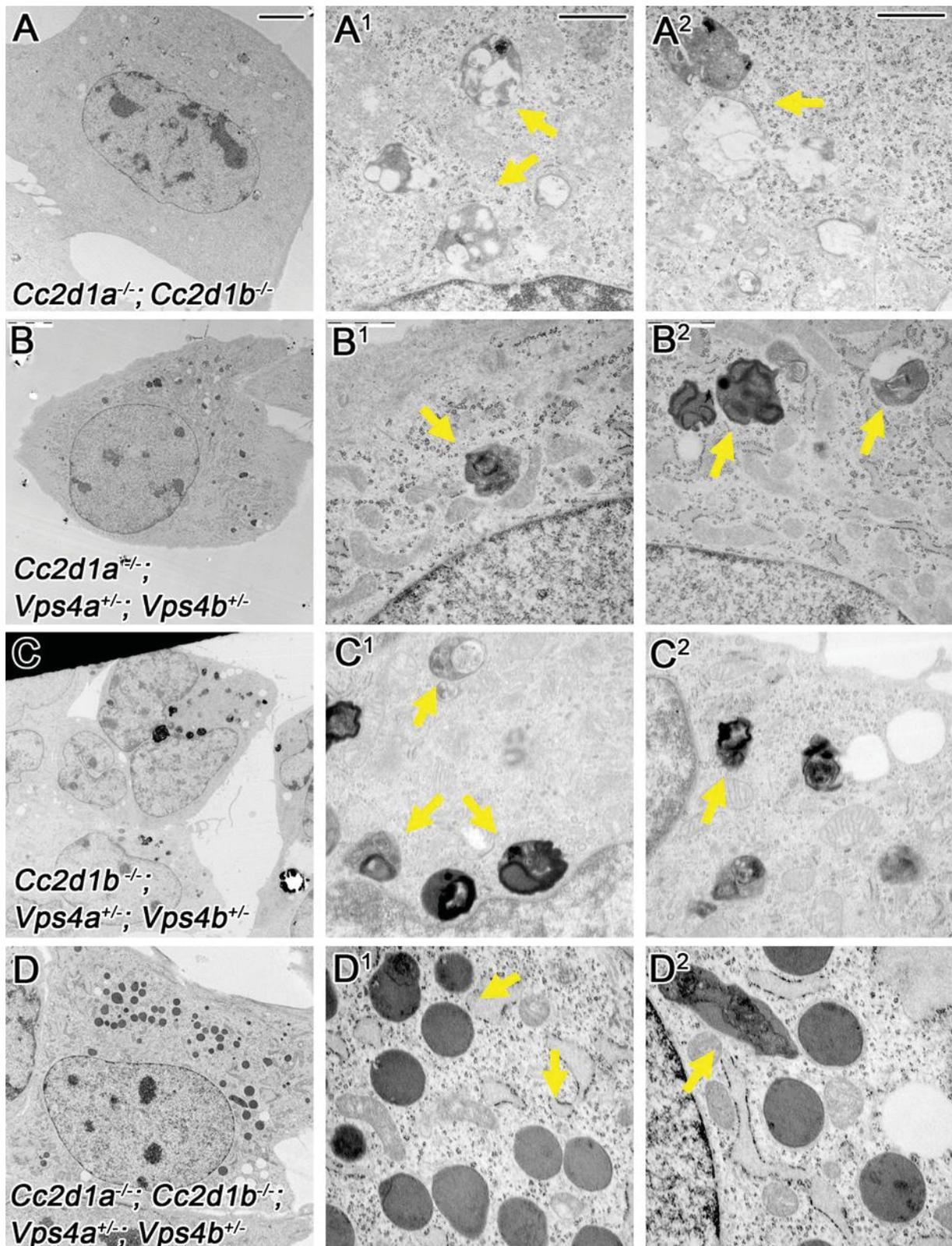


Abb.2.1.8 *Cc2d1a^{-/-}; Cc2d1b^{-/-}; Vps4a^{+/-}; Vps4b^{+/-}* und *Cc2d1a^{-/-}; Cc2d1b^{-/-}* zeigen einen anderen endosomalen Phänotyp als *Cc2d1a^{-/-}; Vps4a^{+/-}; Vps4b^{+/-}* und *Cc2d1b^{-/-}; Vps4a^{+/-}; Vps4b^{+/-}* Zellen. Die Endolysosomen der *Cc2d1a^{-/-}; Cc2d1b^{-/-}* Zellen (A-A²) zeigen einen Verlust der wildtypisch runden Form. Zudem sind die ILVs zum Teil größer als bei anderen Genotypen (A¹⁻², Pfeile). Bei den Zellen des Genotyps *Cc2d1a^{-/-}; Cc2d1b^{-/-}; Vps4a^{+/-}; Vps4b^{+/-}* ist eine sehr große Anzahl von Endolysosomen zu erkennen. Diese haben zum größten Teil eine klare, rundliche Form und zeigen eine gleichmäßige, diffuse Füllung (D¹, Pfeile) was sie von den Endolysosomen der *Cc2d1a^{-/-}; Vps4a^{+/-}; Vps4b^{+/-}* (B-B²) und *Cc2d1b^{-/-}; Vps4a^{+/-}; Vps4b^{+/-}* (C-C²). Nur vereinzelt sind Endolysosomen

zu beobachten, welche stärkere Einlagerungen und einen Verlust der runden Form zeigen (D², Pfeil). Die Maßstabsbalken entsprechen 5 μm (A-D) und 0,5 μm (A¹-D¹ und A²-D²).

Zur statistischen Analyse wurde wie zuvor (Kapitel 2.1.1) der Umfang der Endolysosomen gemessen, um ihre Größen vergleichen zu können (Abb.2.1.9). Hier zeigt sich, dass bei allen vier Genotypen die Endolysosomen im Durchschnitt einen Umfang von etwa 2000 nm haben. Die entspricht dem Umfang der Endolysosomen von *Cc2d1a*^{-/-} Zellen, und ist somit größer als der in wildtypischen oder *Cc2d1b*^{-/-} Zellen. Sowohl der Verlust von *Cc2d1a* oder *Cc2d1b* in *Vps4a*^{+/-};*Vps4b*^{+/-} als auch der beider *Cc2d1* Gene führt zu einer Verkleinerung der Endolysosomen im Vergleich zu reinen *Vps4a*^{+/-};*Vps4b*^{+/-} Zellen. Gleiches gilt auch für *Cc2d1a*^{-/-};*Cc2d1b*^{-/-};*Vps4a*^{+/-};*Vps4b*^{+/-}. Auch die Endolysosomen der *Cc2d1a*^{-/-};*Cc2d1b*^{-/-} Zellen weisen einen ähnlichen Umfang auf.

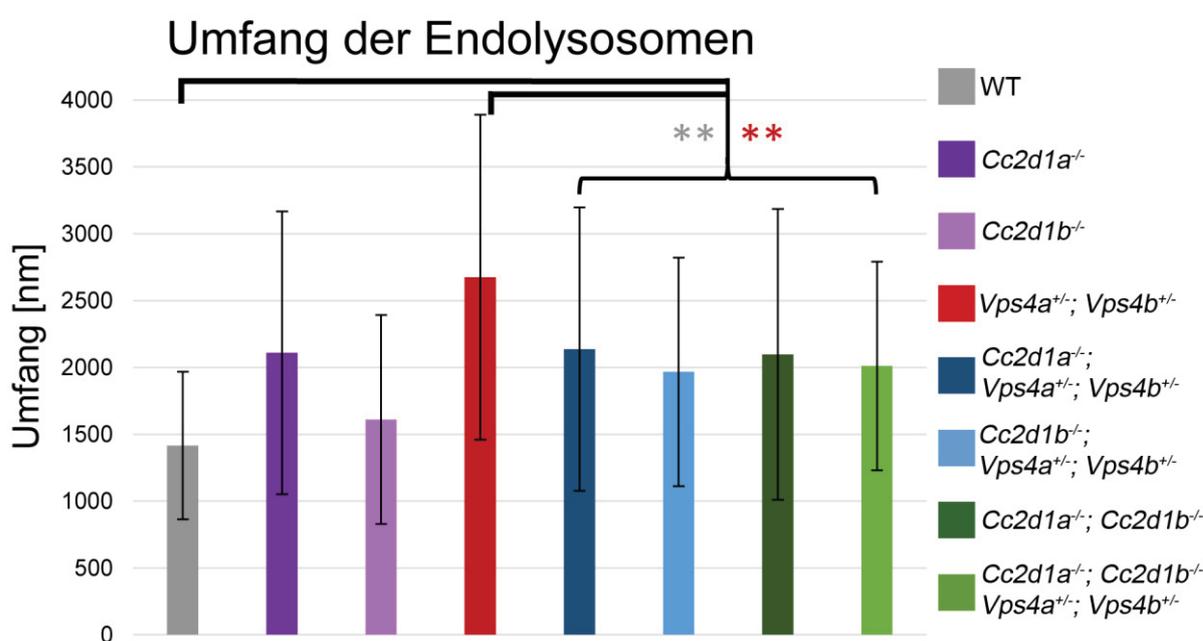


Abb.2.1.9. Der Verlust von *Cc2d1a* oder *Cc2d1b* in *Vps4a*^{+/-};*Vps4b*^{+/-} Zellen führt zu kleineren Endolysosomen, wie auch der Verlust beider *Cc2d1* Gene. Sowohl der zusätzliche Verlust von *Cc2d1a* oder *Cc2d1b* oder beider Gene in *Vps4a*^{+/-};*Vps4b*^{+/-} Zellen (2136±1060 nm; 1966±854 nm; 2011±780 nm) führt dazu, dass die Endolysosomen kleiner werden als in *Vps4a*^{+/-};*Vps4b*^{+/-} Zellen (2675±1215 nm). Dabei sind sie immer noch deutlich größer als in wildtypischen Zellen (1415±552 nm) und etwa gleich groß, wie in *Cc2d1a*^{-/-} Zellen (2108±1057 nm). Auch in *Cc2d1a*^{-/-};*Cc2d1b*^{-/-} Zellen sind die Endolysosomen vergleichbar groß (2098±1087 nm), womit allein in *Cc2d1b*^{-/-} die Endolysosomen im Bereich der wildtypischen Größe liegen (1610±781 nm). P < 0,01 (grau im Vergleich zum Wildtyp, rot im Vergleich zu *Vps4a*^{+/-};*Vps4b*^{+/-}).

Da der Umfang der Endolysosomen im Durchschnitt bei den untersuchten Genotypen mit etwa 2000 nm sehr ähnlich ist, wurde die Verteilung der Größen analysiert. Dazu wurden wie zuvor die gemessenen Größen in 100 nm Gruppen eingeteilt (Abb.2.1.10). In *Cc2d1a*^{-/-};*Vps4a*^{+/-};*Vps4b*^{+/-} und *Cc2d1b*^{-/-};*Vps4a*^{+/-};*Vps4b*^{+/-} Zellen ist eine Verschiebung der Größenverteilung hin zu kleineren Umfängen zu erkennen, verglichen mit *Vps4a*^{+/-};*Vps4b*^{+/-}. Im Vergleich zum Wildtypen handelt es sich dabei aber immer noch um eine Verschiebung zu mehr größeren Endolysosomen. Die Verteilungen sind vergleichbar mit der von *Cc2d1a*^{-/-}. In *Cc2d1a*^{-/-};*Vps4a*^{+/-};*Vps4b*^{+/-} und *Cc2d1b*^{-/-}

Vps4a^{+/-}; *Vps4b*^{+/-} wurden keine Endolysosomen unter 800 nm Umfang gemessen, unter 1000 nm Umfang lediglich 1 % bzw. 1,7 % der ausgemessenen Endolysosomen. In beiden Genotypen sind 59 %, respektive 63 % der Endolysosomen kleiner als 2000 nm (WT 87 %). Größer als 3000 nm sind in *Cc2d1a*^{-/-}; *Vps4a*^{+/-}; *Vps4b*^{+/-} Zellen 10 % der Endolysosomen, wobei insgesamt 2 % aller Endolysosomen größer als 5000 nm sind. In *Cc2d1b*^{-/-}; *Vps4a*^{+/-}; *Vps4b*^{+/-} ist dieser Anteil mit 8,5 % bzw. 1 % etwas geringer. In *Cc2d1a*^{-/-}; *Cc2d1b*^{-/-}; *Vps4a*^{+/-}; *Vps4b*^{+/-} ist die Verteilung nur geringfügig anders. Es wurden keine Endolysosomen unter 800 nm gemessen. Unter 2000 nm Umfang haben 53 % der Endolysosomen, während 8% größer als 3000 nm sind. Knapp 1 % aller Endolysosomen sind über 5000 nm groß. Bei Zellen mit *Cc2d1a*^{-/-}; *Cc2d1b*^{-/-} Genotyp ist die Verteilung insgesamt etwas breiter. Es treten auch Endolysosomen unter 800 nm Größe auf, was bei keiner anderen Defizienzlinie, außer *Cc2d1b*^{-/-} der Fall ist. Insgesamt 7% der Endolysosomen sind bei *Cc2d1a*^{-/-}; *Cc2d1b*^{-/-} kleiner als 1000 nm, 53 % kleiner als 2000 nm. Größer als 3000 nm sind 11 % der Endolysosomen, wobei insgesamt rund 2,5 % aller Endolysosomen größer als 5000 nm sind.

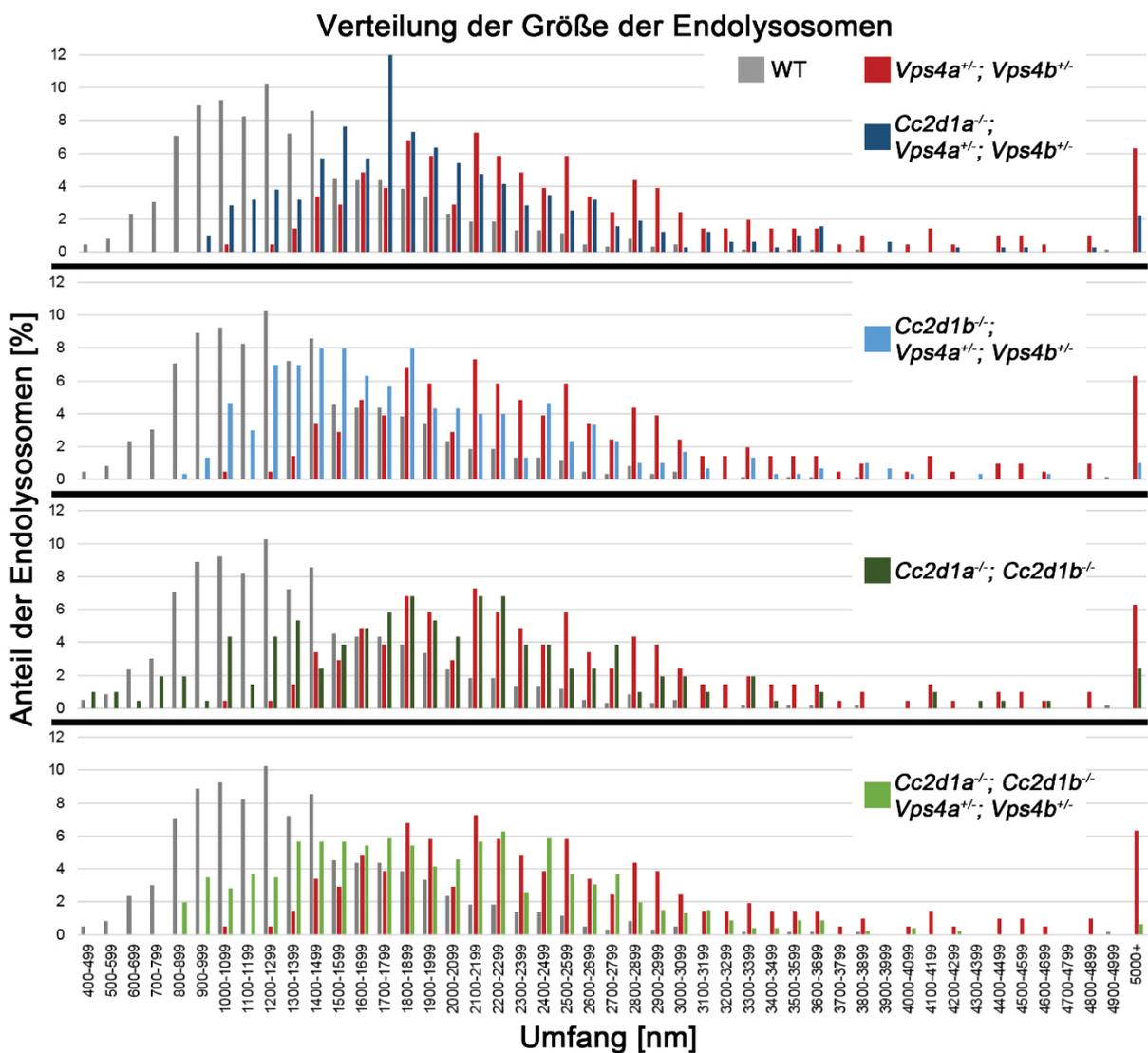


Abb.2.1.10 Verteilung der Endolysosomen. Sowohl bei *Cc2d1a^{-/-};Vps4a^{+/-};Vps4b^{+/-}* als auch bei *Cc2d1b^{-/-};Vps4a^{+/-};Vps4b^{+/-}* treten wieder mehr Endolysosomen unter 2000 nm auf als bei *Vps4a^{+/-};Vps4b^{+/-}*. Außerdem sind weniger große Endolysosomen über 3000 nm zu beobachten. Allerdings ist die Verteilung der Größen bei beiden Genotypen im Vergleich zum Wildtyp immer noch deutlich verschoben. Ähnlich verhält es sich bei *Cc2d1a^{-/-};Cc2d1b^{-/-};Vps4a^{+/-};Vps4b^{+/-}*, im Vergleich zu *Vps4a^{+/-};Vps4b^{+/-}* treten mehr kleinere und weniger große Endolysosomen auf, welche aber immer noch deutlich größer sind als im Wildtyp. Bei *Cc2d1a^{-/-};Cc2d1b^{-/-}* treten als einziges so kleine Endolysosomen auf wie beim Wildtypen, allerdings auch deutlich mehr größere. Die Verteilung ist bei diesem Genotyp breiter gefächert als bei den anderen.

Da vor allem bei *Cc2d1a^{-/-};Cc2d1b^{-/-};Vps4a^{+/-};Vps4b^{+/-}* eine hohe Anzahl an Endolysosomen pro Zelle auffällt, wurde ihre Anzahl pro Zelle für alle Genotypen ausgewertet (Abb.2.1.11). Dazu wurde die Anzahl der identifizierten und ausgemessenen Endolysosomen durch die Anzahl der untersuchten Zellen geteilt (s. Anhang Tabelle 7.1). Dabei zeigt sich, dass im Durchschnitt in wildtypischen Zellen 6,0 Endolysosomen identifiziert und ausgemessen wurden. In *Cc2d1a^{-/-}* und in *Vps4a^{+/-};Vps4b^{+/-}* Zellen sind es mit 5,4 bzw. 5,6 Endolysosomen pro Zelle ähnlich viele. In *Cc2d1b^{-/-}* hingegen sind es mit 7,5 Endolysosomen pro Zelle mehr. In *Cc2d1a^{-/-};Vps4a^{+/-};Vps4b^{+/-}* sind es etwas mehr mit 8,1 pro Zelle. In *Cc2d1b^{-/-};Vps4a^{+/-};Vps4b^{+/-}* wiederum sind es mit 6,0 Endolysosomen pro Zelle genauso viele wie in wildtypischen Zellen. Bei *Cc2d1a^{-/-};Cc2d1b^{-/-};Vps4a^{+/-};Vps4b^{+/-}* sind es mit 11,5 etwa doppelt so viele Endolysosomen wie in Wildtypzellen. In *Cc2d1a^{-/-};Cc2d1b^{-/-}* Zellen können als einzigem Genotypen mit 4,1 weniger Endolysosomen als im Wildtyp pro Zelle identifiziert werden.

Tabelle 2.1.2 Anzahl der durchschnittlich identifizierten und ausgemessenen Endolysosomen pro Zelle in allen Genotypen. EL = Endolysosomen.

	Wildtyp	<i>Cc2d1a^{-/-}</i>	<i>Cc2d1b^{-/-}</i>	<i>Vps4a^{+/-};Vps4b^{+/-}</i>
EL/Zelle	6,0	5,4	7,5	5,6
	<i>Cc2d1a^{-/-}; Vps4a^{+/-};Vps4b^{+/-}</i>	<i>Cc2d1b^{-/-}; Vps4a^{+/-}; Vps4b^{+/-}</i>	<i>Cc2d1a^{-/-}; Cc2d1b^{-/-}</i>	<i>Cc2d1a^{-/-};Cc2d1b^{-/-}; Vps4a^{+/-}; Vps4b^{+/-}</i>
EL/Zelle	8,1	6,0	4,1	11,5

Insgesamt zeigen die Untersuchungen, dass *Cc2d1a* und *Cc2d1b* eine Funktion im späten endosomalen Transportweg haben. Der Verlust eines der beiden *Cc2d1* Gene zeigt keine morphologische Veränderung der Endolysosomen, verglichen mit dem Wildtyp. In *Cc2d1a^{-/-}* sind die Endolysosomen allerdings größer. In *Vps4a^{+/-};Vps4b^{+/-}* Zellen ist dagegen eine starke morphologische Veränderung zu beobachten, sowie eine starke Zunahme sehr großer Endolysosomen. Der zusätzliche Verlust eines der *Cc2d1* Gene verändert die abnormale Morphologie der Endolysosomen in *Vps4a^{+/-};Vps4b^{+/-}* Zellen nicht, allerdings wird die Vergrößerung reduziert. Die Akkumulation von CHMP4B in den stark vergrößerten Endolysosomen der *Vps4a^{+/-};Vps4b^{+/-}* Zellen kann ebenfalls noch beobachtet werden. Der Verlust beider *Cc2d1* Gene in *Vps4a^{+/-};Vps4b^{+/-}* Zellen führt allerdings zu einer morphologischen Veränderung. Während die Endolysosomen in *Vps4a^{+/-};Vps4b^{+/-}* Zellen ihre

wildtypische runde Form verlieren und ein „Class E“ ähnlicher Phänotyp zu beobachten ist, sind die Endolysosomen in *Cc2d1a^{-/-};Cc2d1b^{-/-};Vps4a^{+/-};Vps4b^{+/-}* wieder vergleichsweise rund und zeigen in elektronenmikroskopischen Aufnahmen eine gleichmäßige Füllung. Es sind zum großen Teil keine Akkumulationen von Membranen und ILV in ihnen zu erkennen, wie dies in *Vps4a^{+/-};Vps4b^{+/-}* Endolysosomen der Fall war. Dafür kommt es zu einem deutlichen Anstieg der Anzahl pro Zelle. CHMP4B kann in diesen Endolysosomen nicht mehr beobachtet werden. In *Cc2d1a^{-/-};Cc2d1b^{-/-}* Zellen kommt es ebenfalls zu einer Vergrößerung der Endolysosomen und zu morphologischen Veränderungen. Es sind vergrößerte ILVs zu beobachten, zum Teil auch „Class E“ ähnliche Phänotypen. CHMP4B lokalisiert an diesen Endolysosomen, aber nicht in ihnen. Einen zusammenfassenden Überblick über die Ergebnisse gibt die folgende Tabelle 2.1.3.

Tabelle 2.1.3 Zusammenfassung der beobachteten endosomalen Phänotypen der MEF-Zelllinien. In dieser Tabelle sind die beobachtete Morphologie und Größenverteilung der Endolysosomen, sowie die Lokalisation von CHMP4B der untersuchten MEF-Zelllinien zusammengefasst.

Genotyp	Morphologie der Endolysosomen	Größenverteilung	Lokalisation von CHMP4B
Wildtyp	Rundlich, z.T. gefüllt,	<2000 nm: 87 % >3000 nm: 1,5 %	zytoplasmatisch, punktförmig
<i>Cc2d1a^{-/-}</i>	wildtypisch	<2000 nm: 58 % >3000 nm: 10 %	wildtypisch
<i>Cc2d1b^{-/-}</i>	wildtypisch	<2000 nm: 81 % >3000 nm: 6 %	wildtypisch
<i>Vps4a^{+/-};Vps4b^{+/-}</i>	„Class E“ ähnlich, starke Membraneinlagerungen	<2000 nm: 30 % >3000 nm: 25 %	an und in Endolysosomen
<i>Cc2d1a^{-/-};Vps4a^{+/-};Vps4b^{+/-}</i>	„Class E“ ähnlich, starke Membraneinlagerungen	<2000 nm: 59 % >3000 nm: 10 %	an und in Endolysosomen
<i>Cc2d1b^{-/-};Vps4a^{+/-};Vps4b^{+/-}</i>	„Class E“ ähnlich, starke Membraneinlagerungen	<2000 nm: 63 % >3000 nm: 8,5 %	an und in Endolysosomen
<i>Cc2d1a^{-/-}; Cc2d1b^{-/-};Vps4a^{+/-};Vps4b^{+/-}</i>	Rundlich, gleichmäßig stark gefüllt, wenig Membranen	<2000 nm: 53 % >3000 nm: 8 %	wildtypisch
<i>Cc2d1a^{-/-}; Cc2d1b^{-/-}</i>	Große ILVs, z.T. „Class E“ ähnlich	<2000 nm: 51 % >3000 nm: 11 %	an Endolysosomen

2.1.3 CC2D1A lokalisiert an vergrößerten Endolysosomen in *Vps4a^{+/-}; Vps4b^{+/-}* Zellen.

Ähnlich wie bei CHMP4B konnte bisher in wildtypischen MEF Zellen keine Kolo-kalisation von CC2D1A an endosomalen Kompartimenten gezeigt werden (Drusenheimer et al., 2015). In *Vps4a^{+/-};Vps4b^{+/-}* ist hingegen eine Lokalisation von CHMP4B in und an vergrößerten, LAMP1 positiven Endolysosomen zu erkennen. Dies ist auch der Fall in *Cc2d1a^{-/-};Vps4a^{+/-};Vps4b^{+/-}* und *Cc2d1b^{-/-};Vps4a^{+/-};Vps4b^{+/-}* Zellen. Da für CC2D1A ein spezifischer Antikörper zur Verfügung stand, wurde mittels Immunocytochemie überprüft, ob CC2D1A ebenfalls an diesen vergrößerten Endolysosomen lokalisiert. Hier zeigt sich, dass CC2D1A genau wie CHMP4B an und in den stark vergrößerten

LAMP1 positiven Endolysosomen lokalisiert (Abb.2.1.11 B-B³, Pfeile). Diese veränderte Lokalisation wirkt noch stärker als bei CHMP4B. In *Cc2d1b*^{-/-};*Vps4a*^{+/-};*Vps4b*^{+/-} tritt diese Kolokalisation von CC2D1A, CHMP4B und LAMP1 ebenfalls auf, wirkt aber deutlich schwächer (Abb.2.1.11 C-C³).

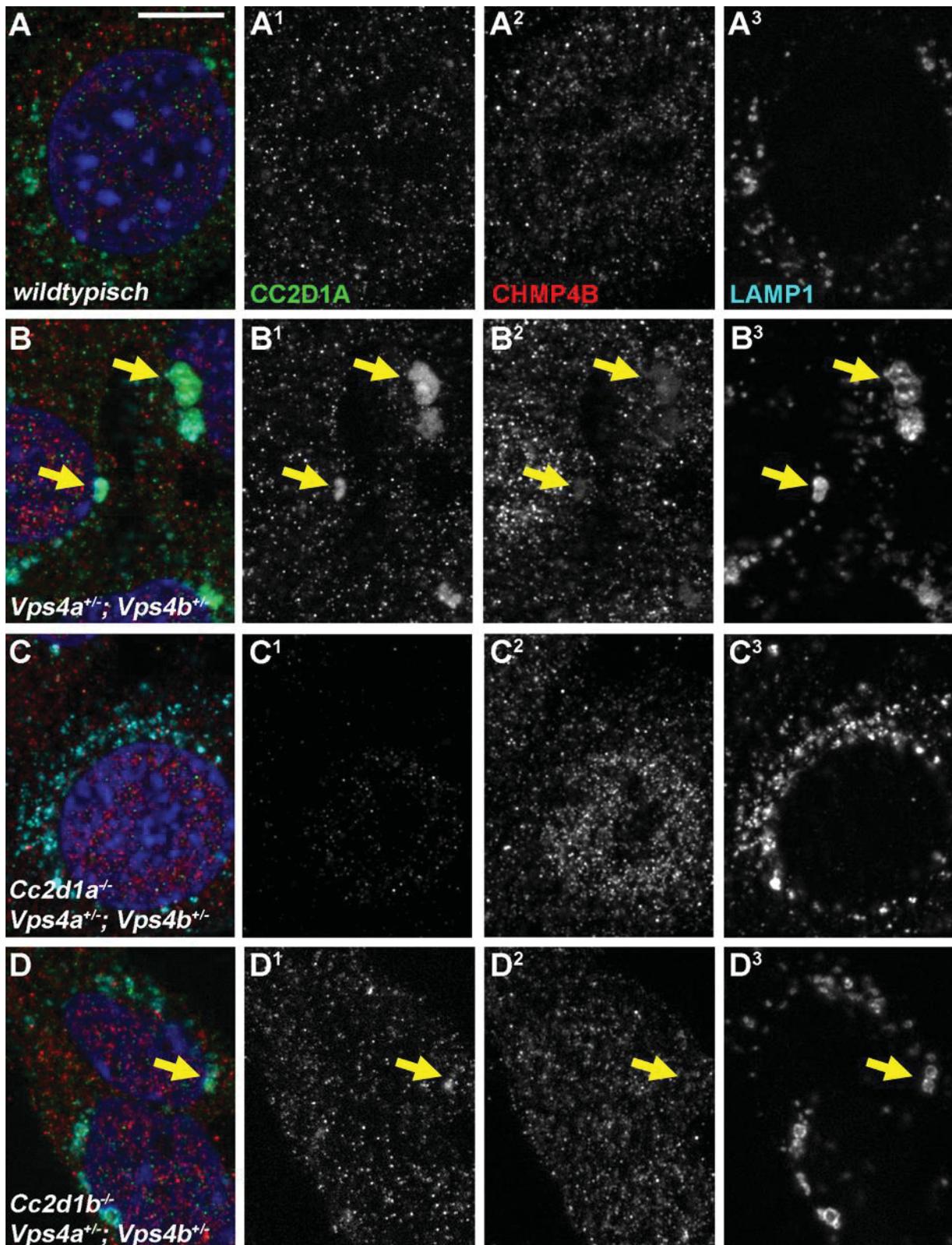


Abb.2.1.11 CC2D1A lokalisiert wie CHMP4B an vergrößerte Endolysosomen in *Vps4a^{+/-};Vps4b^{+/-}*-Zellen.

In wildtypischen Zellen ist keine Kolo­kalisierung von CC2D1A oder CHMP4B miteinander oder an LAMP1 positiven Endolysosomen erkennbar (A-A³). In *Vps4a^{+/-};Vps4b^{+/-}* Zellen hingegen kolo­kalisieren die beiden Proteine an und in vergrößerten LAMP1 markierten Endolysosomen (B-B³, Pfeile). CC2D1A zeigt dabei dort eine stärkere Lokalisation als CHMP4B. In *Cc2d1b^{-/-};Vps4a^{+/-};Vps4b^{+/-}* Zellen ist diese Kolo­kalisierung ebenfalls noch zu beobachten, wenn auch deutlich schwächer als in *Vps4a^{+/-};Vps4b^{+/-}* (C-C³, Pfeile). Die Maßstabsbalken entsprechen 10 µm.

2.1.4 Endogenes CC2D1A interagiert mit endogenem CHMP4B *in vivo*.

Eine Interaktion zwischen CC2D1A und CHMP4B wurde bisher nur durch *in vitro* Experimente gezeigt. In *Drosophila* konnte für *lgd* und *shrb* eine genetische Interaktion gezeigt werden. Als Möglichkeit, eine Interaktion von CC2D1A und CHMP4B auf endogenem Level zu untersuchen, wurde der PLA (proximity ligation assay) genutzt. Mit dieser Methode können durch Immunocytochemie und Signalverstärkung einzelne Interaktionen nachgewiesen werden (s. Kapitel.5.2.4.2). Mit Hilfe dieser Methode kann gezeigt werden, dass CC2D1A und CHMP4B endogen miteinander in wildtypischen MEF Zellen interagieren (s. Ab.2.1.12 A und B; Bachelorarbeit Laura Fischer, 2013). Als Kontrolle wurde der PLA mit CC2D1A und CHMP4B in *Cc2d1a^{-/-}* Zellen durchgeführt, wo keine Signale detektiert wurden (Abb.2.1.12 A¹ und B, Bachelorarbeit Laura Fischer, 2013). Um auszuschließen, dass es sich um eine zufällige Nähe beider Proteine handelt, wurde als Kontrolle ein PLA von PGK1 mit CHMP4B in wildtypischen Zellen durchgeführt. PGK1 ist im Zytoplasma lokalisiert. Bei dieser Kontrolle treten keine Signale auf, während bei CC2D1A und CHMP4B wieder Signale detektiert werden konnten (Abb.2.1.12 C, C¹ und D). CC2D1A und CHMP4B interagieren also auf endogenem Expressionslevel *in vivo* miteinander.

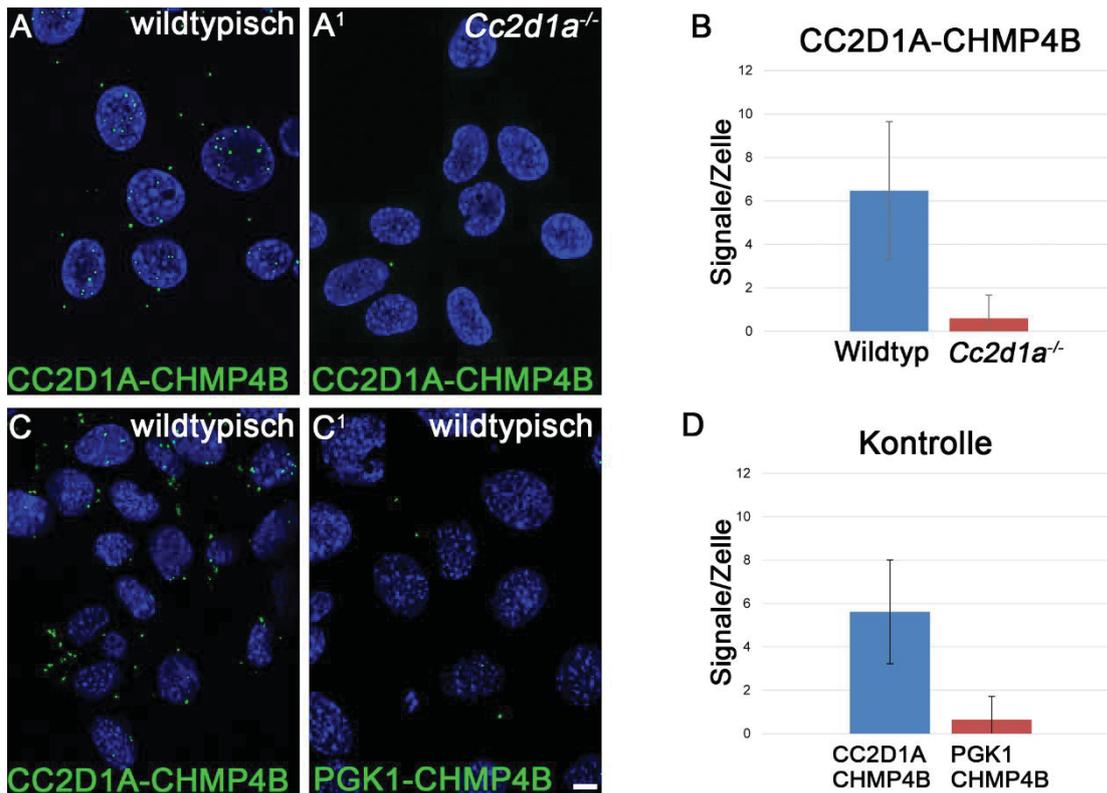


Abb.2.1.12 CC2D1A und CHMP4B interagieren endogen in wildtypischen MEF Zellen.

Während in wildtypischen Zellen PLA Signale von CC2D1A und CHMP4B detektiert werden können (A), ist dies in *Cc2d1a*^{-/-} Zellen nicht der Fall (A¹). Die statistische Auswertung zeigt, dass in wildtypischen Zellen im Durchschnitt $6,5 \pm 3,2$ Signale detektiert werden, in *Cc2d1a*^{-/-} $0,6 \pm 1,1$ Signale (B). Als zusätzliche Kontrolle wurde der PLA von CC2D1A und CHMP4B (C) mit PGK1 und CHMP4B (C¹) in wildtypischen Zellen verglichen. Während für CC2D1A und CHMP4B $5,6 \pm 2,4$ Signale pro Zelle detektiert werden, sind es bei PGK1 und CHMP4B nur $0,6 \pm 1,1$ Signale (D). Der Maßstabsbalken entspricht 10 μm .

2.2 Lokalisation und Interaktion von CC2D1A und CC2D1B und die Funktion der Domänen.

Endogenes CC2D1A und CC2D1B sind zytoplasmatisch verteilt und zeigen im Wildtypen keine Kolokalisation mit endosomalen Markern (Drusenheimer et al., 2015). Bei einer Störung des ESCRT-Systems in murinen, embryonalen Fibroblasten kolokalisiert CC2D1A mit CHMP4B in und an großen, LAMP1 positiven Endolysosomen (Kapitel 2.1.3; Drusenheimer et al., 2015). Eine gemeinsame Überexpression von CC2D1A mit RAB5 oder LAMP1 in HEK293-Zellen zeigte eine Kolokalisation dieser Proteine (Chang et al., 2011). In HeLa zeigt die Überexpression von CC2D1A oder CC2D1B eine zytoplasmatische Verteilung und eine Kolokalisation mit RAB7 und CHMP4B in vesikulären Strukturen (Dissertation Katharina Schulz, 2015). Um die Funktion der verschiedenen Domänen bei der Lokalisation von CC2D1A und CC2D1B zu untersuchen wurden Deletionskonstrukte generiert, welche N-terminal mit EGFP fusioniert sind. Diese wurden in *Cc2d1a*^{-/-}; *Cc2d1b*^{-/-} MEF-Zellen (s. Kapitel 2.1.2, Masterarbeit Daisy Moll, 2015) unter Kontrolle des CMV-Promotors überexprimiert und ihre Lokalisation untersucht. Zusätzlich wurde der Einfluss der

exprimierten Konstrukte auf die den Marker für Endolysosomen, LAMP1 und den bekannten Interaktionspartner CHMP4B analysiert. Des Weiteren wurden die Konstrukte mit einem RFP-CHMP4B Konstrukt koexprimiert, um mögliche Veränderungen der Lokalisation durch die Koexpression mit dem bekannten Interaktionspartner zu untersuchen. Durch die Expression in den *Cc2d1a^{-/-};Cc2d1b^{-/-}* Zellen kann ein Einfluss der endogenen CC2D1 Proteine ausgeschlossen werden. Dies ist wichtig, da es Hinweise darauf gibt, dass die CC2D1 Proteine miteinander interagieren können (Masterarbeit Bernhard Migdal, 2012) und in dieser Arbeit weiter analysiert wurde (Kapitel 2.2.13).

In vitro Experimente zeigten eine Interaktion von CC2D1A mit CHMP4A, CHMP4B und CHMP4C, sowie eine Interaktion von CC2D1B mit CHMP4B (Tsang et al., 2006; Martinelli et al., 2012). Untersuchungen in *Drosophila* zeigen zudem *in vitro* eine direkte und *in vivo* eine funktionelle Interaktion von Lgd mit Shrub und mit Chmp5 (Troost et al., 2012; Sven Klose, unveröffentlicht). Mit Hilfe des FRET-Akzeptorphotobleichens (FRET-APB) sollten die Interaktionen von CC2D1A und CC2D1B genauer charakterisiert werden (siehe auch Kapitel 5.2.6). Dabei sollte durch Deletionskonstrukte die Funktion der Domänen für die Interaktion untersucht werden. Als Donor für die FRET-Messungen dienen die gleichen Konstrukte, mit welchen auch die Lokalisation untersucht wurde, also Fusionsproteine mit N-terminal fusioniertem EGFP. Als Akzeptorproteine dienen ESCRT-III und VPS4-Komplex Untereinheiten, mit N-terminal fusioniertem TagRFP. Die jeweiligen FRET-Paare wurden zusammen in NIH3T3 Zellen koexprimiert und dann durch FRET-APB Messungen die Interaktion analysiert (s. Kapitel 5.2.6). In *Drosophila* wurde gezeigt, dass mit C-terminal fusioniertem GFP exprimiertes Shrub-GFP einen dominant-negativen Effekt hat (Sweeny et al., 2006). Darauf weisen auch unveröffentlichte Ergebnisse dieser Arbeitsgruppe hin. Daher wurden für die Untersuchungen in dieser Arbeit die Chromophore an den N-Terminus der jeweiligen Proteine fusioniert.

Um die Lokalisation der RFP-fusionierten ESCRT-Untereinheiten zu analysieren, wurden diese in wildtypischen MEFs exprimiert. Dabei sollte ihre Lokalisation im endosomalen Transportweg, und Veränderungen von diesem durch die Expression untersucht werden. Dies sollte später Rückschlüsse ermöglichen, wo mögliche Interaktionen mit CC2D1A und CC2D1B in den FRET-APB Messungen stattfinden. Eine Liste aller generierten Konstrukte findet sich nachfolgend in Abb.2.2.1.

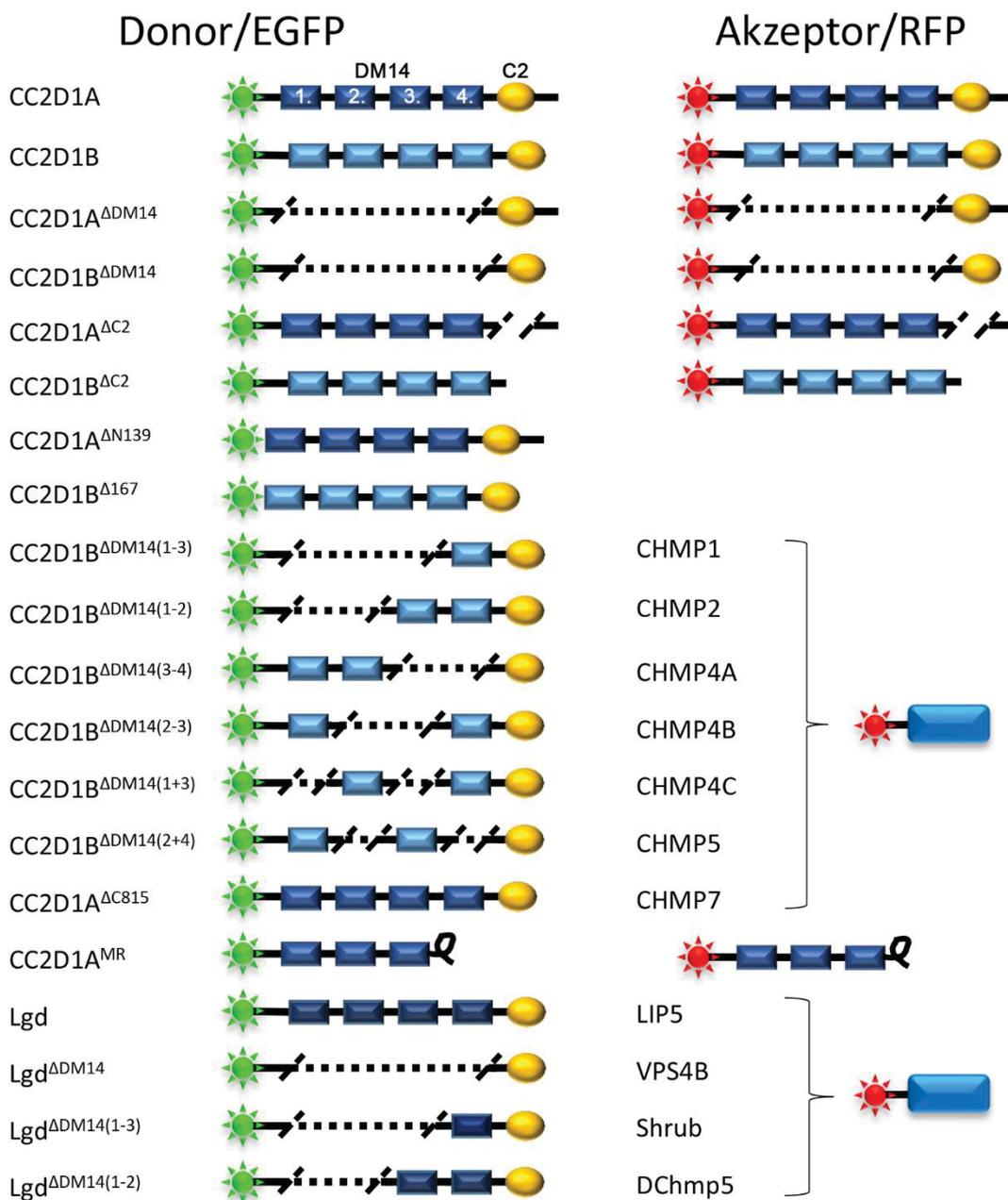


Abb.2.2.1 Schematische Darstellung der in dieser Arbeit generierten und verwendeten Konstrukte. Die Akzeptorkonstrukte sind N-terminal mit EGFP fusioniert (grün). CC2D1A und CC2D1B sind jeweils mit den vier DM14 Domänen (hellblau/dunkelblau) und der C2 Domäne (gelb) dargestellt. Die Akzeptorkonstrukte sind N-terminal mit RFP fusioniert (rot). Für die ESCRT-Konstrukte sind keine einzelnen Domänen oder Helices dargestellt.

2.2.1 Die Expression von ESCRT-III und VPS4 Untereinheiten führt zu unterschiedlichen Veränderungen im endosomalen Transportweg.

Als Akzeptorproteine für die FRET-APB Messungen wurden Fusionsproteine mit N-terminalem RFP generiert. Hierfür wurden verschiedene humane ESCRT-III Untereinheiten, Hilfs-ESCRT Proteine, sowie LIP5 und VPS4B gewählt. Zusätzlich wurden aus *Drosophila* Shrub (CHMP4) und Chmp5 gewählt. VPS4B ist beispielsweise ein bekannter Interaktionspartner von CHMP4B (in Hefe Vps4 und Snf7). Bei anderen Proteinen wird eine Interaktion mit CHMP4B (Snf7) vermutet. In Säugern ist allerdings bisher nicht beschrieben worden ob oder wie CHMP4A, CHMP4B und CHMP4C zusammen wirken (siehe Kapitel 1.3). Da CHMP4B mit CC2D1A und CC2D1B interagiert (Martinelli et al., 2012), sollten so weitere potentielle Interaktionspartner identifiziert und überprüft werden. Mit diesen RFP-fusionierten Proteine wurden wildtypische MEF-Zellen transient transfiziert und durch immunocytochemische Färbung die Lokalisation dieser Proteine und der endosomale Phänotyp analysiert.

Bei der Expression der CHMP4 Proteine und Shrub zeigt sich dabei ein markanter Unterschied. Alle Konstrukte akkumulieren in unmittelbarer Nähe zum Zellkern, um diesen herum (s. Abb.2.2.2 A¹-D¹). Diese Akkumulationen sind alle positiv für den endolysosomalen Marker LAMP1 (s. Abb.2.2.2 A-D und A²-D²). Es handelt sich dabei also um späte, endolysosomale Kompartimente, die deutlich vergrößert sind im Vergleich zu untransfizierten Zellen. Bei CHMP4A Überexpression sind die Akkumulationen zusätzlich auch stark RAB7 positiv. Bei RAB7 handelt es sich um einen Marker für reife Endosomen (s. Abb.2.2.2 A-A³). Bei CHMP4B, C und Shrub ist die Verteilung von RAB7 hingegen weiter wildtypisch. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die CHMP4A Überexpression zu einer früheren Störung im endosomalen Transportweg führt, als die der Homologe und des Orthologs. Die Funktion der CHMP4 Proteine bzw. von Shrub ist die Bildung von Polymeren, um intraluminale Vesikel von der Endosomenmembran abzuschneiden. Aufgrund des großen N-terminal fusionierten RFP Proteins ist es allerdings unwahrscheinlich, dass die Konstrukte dies noch können. In *Drosophila* wirken Shrub-Konstrukte mit C-terminal fusionierten Fluoreszenzproteinen dominant-negativ (Sweeny et al., 2006). Die könnte auch bei N-terminal fusionierten CHMP4 Proteinen ebenfalls der Fall sein. Der dominant-negative Effekt könnte darauf zurückzuführen sein, dass das große Chromophor die korrekte Polymerisation verhindert, was zu diesen vergrößerten Endosomalen Kompartimenten führt. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen sind sehr große, „Class E“ ähnliche Strukturen in Zellen zu erkennen, in denen RFP-CHMP4B überexprimiert wurde (s. Anhang Abb.8.4). Dies weist ebenfalls auf einen dominant-negativen Effekt hin, dass solche Strukturen auch beim Ausfall des ESCRT-III Komplexes in Zellen beschreiben wurden (Stuffers et al., 2009).

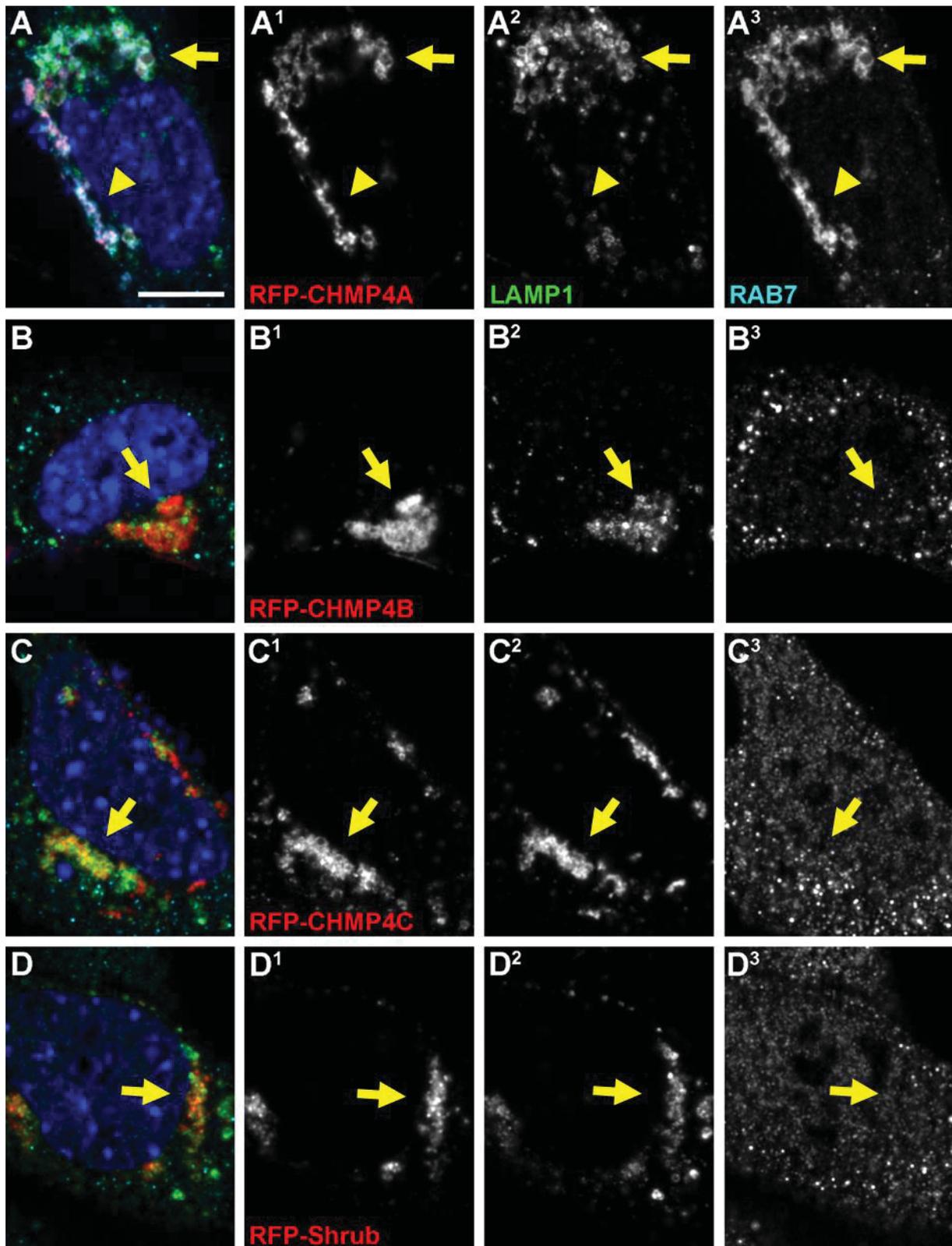


Abb.2.2.2 Expression von CHMP4 Proteinen und Shrub mit N-terminal fusioniertem RFP in wildtypischen MEF Zellen. Die Expression von RFP-CHMP4A führt zu Akkumulationen um den Zellkern, welche positiv für LAMP1 und RAB7 sind (A-A³, Pfeile). In manchen Bereichen ist auch lediglich eine Kolkalisation mit RAB7 zu erkennen (A-A³, Pfeilspitzen). Dies weist auf vergrößerte reifende Endosomen und Endolysosomen hin. Die Expression von CHMP4B (B-B³), CHMP4C (C-C³) und Shrub (D-D³) führt zu vergleichbaren Akkumulationen, diese sind allerdings nur positiv für LAMP1 (B¹, B²; C¹, C² und D¹, D², Pfeile). Die Verteilung von RAB7 ist weiterhin wildtypisch (B³, C³ und D³). Der Maßstabsbalken entspricht 10 μ m.

CC2D1A interagiert mit den CHMP4 Proteinen (Tsang et al., 2006), das *Drosophila* Ortholog Lgd mit dem Ortholog Shrub (Troost et al., 2012). Für CC2D1B wurde nur die Interaktion mit CHMP4B beschrieben (Martinelli et al., 2012). Als weiterer möglicher Interaktionspartner von CC2D1A und CC2D1B wurde eine ,neben CHMP4, weitere zentrale Untereinheit des ESCRT-III Komplexes, CHMP2 untersucht. Außerdem die sogenannten Hilfs-ESCRT Proteine CHMP1, CHMP5 und CHMP7 sowie VPS4B und dessen Interaktionspartner LIP5. Die Expression von RFP-CHMP1 führt dabei ähnlich wie bei den CHMP4 Proteinen zu einer Akkumulation in Bereichen um den Zellkern. Diese kolokalisieren weder mit LAMP1 oder RAB7, noch sind Unterschiede bei diesen Markern im Vergleich zu wildtypischen Zellen zu erkennen (s. Abb.2.2.3 A-A³). CHMP2 zeigt im Gegensatz zu den anderen Proteinen eine Verteilung im gesamten Zytoplasma der Zelle, und nur kleinere Akkumulationen (s. Abb.2.2.3 B und B¹). Teilweise sind Kolokalisationen mit LAMP1 markierten Endolysosomen zu erkennen (s. Abb.2.2.3 B-B², gelbe Pfeile). Keine Veränderung ist bei RAB7 ersichtlich (Abb. B³). Im Gegensatz dazu akkumuliert CHMP5 verstärkt in Bereichen nah am Zellkern, ähnlich den CHMP4 Proteinen (Abb.2.2.3 C¹). Allerdings ist keine starke Veränderung der LAMP1 Lokalisation zu erkennen, welches nur sehr schwach und diffus in Bereichen der Akkumulation von CHMP5 zu beobachten ist (Abb.2.2.3 C, C², Pfeile). RAB7 lokalisiert hingegen verstärkt in Bereichen der CHMP5 Akkumulation und zeigt eine deutliche Kolokalisation mit diesem (Abb.2.2.3 C, C³, gelbe Pfeile). Die Expression von CHMP7 führt zu starken Akkumulationen in großen Bereichen um den Zellkern herum (s. Abb.2.2.3 D). Diese sind aber nicht positiv für LAMP1 oder RAB7, welche wildtypisch verteilt sind (s. Abb.2.2.3 D¹-D³, gelbe Pfeile). Von den getesteten Proteinen führt also nur die Überexpression von CHMP2 und CHMP5 zu einem endosomalen Phänotyp.

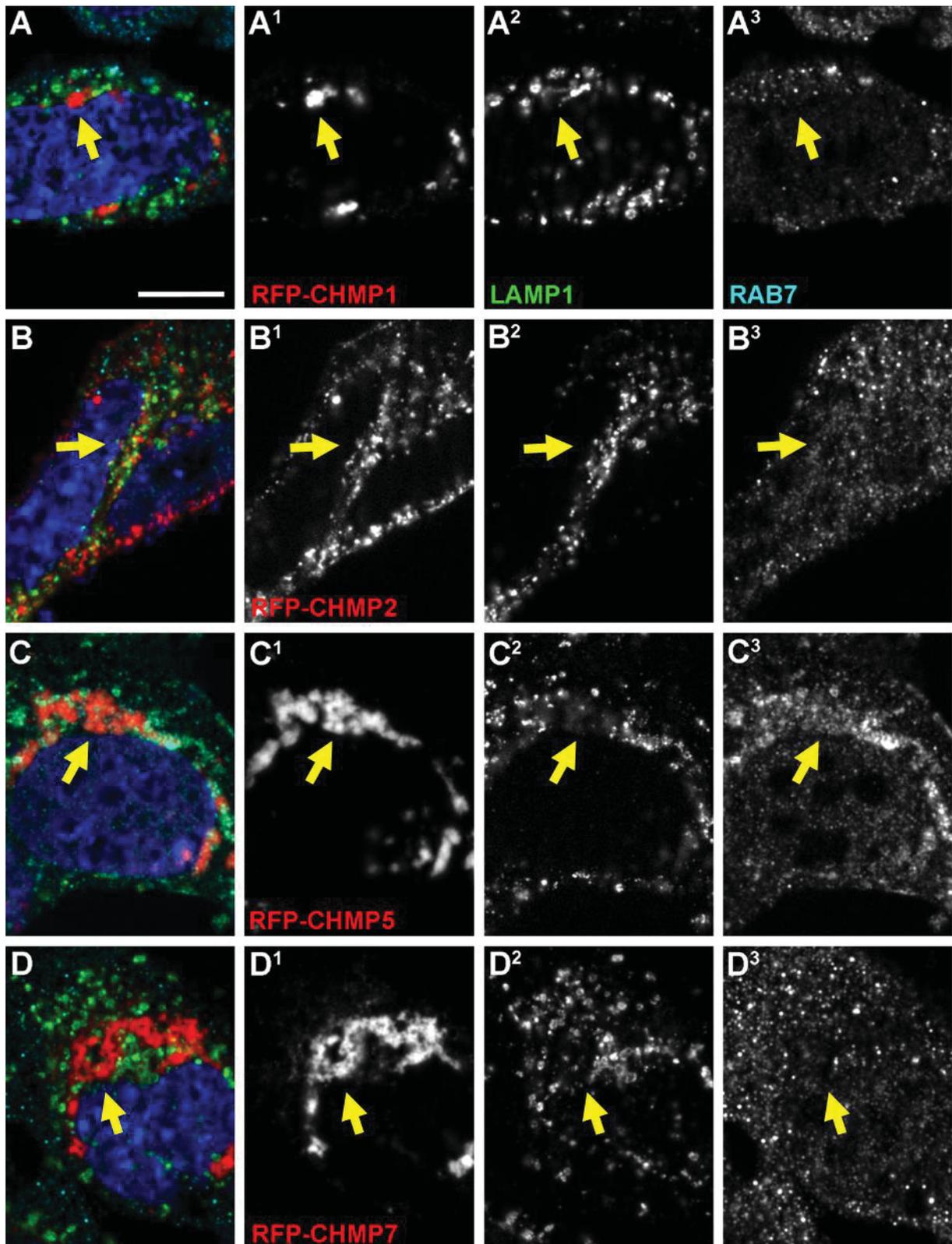


Abb.2.2.3 Expression von CHMP1, 2, 5 und 7 mit N-terminal fusioniertem RFP in wildtypischen Zellen.

Die Expression von RFP-CHMP1 zeigt Akkumulationen des Konstruktes um den Zellkern (A und A¹, gelber Pfeil) welche allerdings nicht positiv für die Marker des späten endosomalen Transportwegs, LAMP1 und RAB7 sind (A² und A³, gelbe Pfeile). CHMP2 zeigt dagegen eine Verteilung im gesamten Zytoplasma und nur kleine Akkumulationen sind zu erkennen (B und B¹). CHMP2 kolokalisiert zum Teil mit LAMP1 (B², gelber Pfeil), jedoch nicht mit RAB7 (B³ gelber Pfeil). CHMP5 akkumuliert stärker um den Zellkern herum, als CHMP1 oder CHMP2 (C¹, gelber Pfeil). In seiner Lokalisation ähnelt es stärker den CHMP4 Proteinen. Es ist keine verstärkte

Lokalisation von LAMP1 in diesen Bereichen zu erkennen (C², gelber Pfeil) und es ist nur vereinzelt eine diffuse Kolokalisation zu erkennen. RAB7 hingegen kolokalisiert deutlich mit CHMP5 und ist auch verstärkt lokalisiert um diese Bereiche herum (C³, gelber Pfeil). CHMP7 akkumuliert in großen Bereichen um den Zellkern (D, D¹). Während um diese Bereiche herum LAMP1 und RAB7 positive endolysosomale Kompartimente erkennbar sind, ist nur eine geringe Kolokalisation der endosomalen Marker mit den Akkumulationen von CHMP7 zu beobachten (D-D³, gelbe Pfeile). Der Maßstabsbalken entspricht 10 µm.

CHMP7 zeigt keine Kolokalisation mit den endosomalen Markern LAMP1 und RAB7. Ergebnisse aus der Hefe weisen auf eine mögliche Funktion von CHMP7 am endoplasmatischen Retikulum hin. Calnexin ist ein Lektin, welches an die Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) bindet und kann daher als Marker für dieses Zellkompartiment genutzt werden. Überexprimiertes CHMP7 kolokalisiert zum Teil mit schwach, diffus verteiltem Calnexin um den Zellkern (Abb.2.2.4).

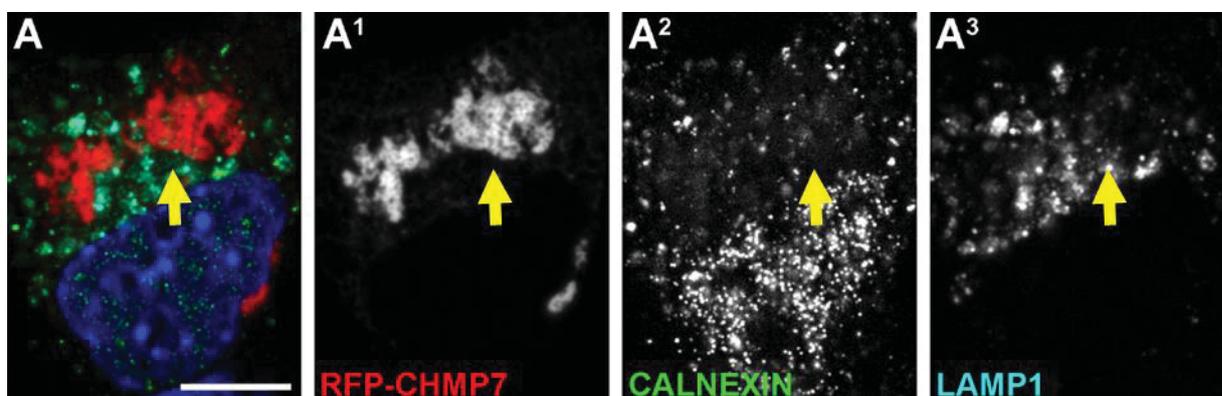


Abb.2.2.4 Expression von RFP-CHMP7 in wildtypischen MEF Zellen zur Analyse der Lokalisation am ER. Exprimiertes CHMP7 akkumuliert in Bereichen nahe des Zellkerns (A¹). In diesen Bereichen zeigt Calnexin eine schwach diffuse Verteilung (A²). CHMP7 und Calnexin zeigen eine schwache Kolokalisation (A-A², Pfeile). LAMP1 ist wildtypisch verteilt (A³) und kolokalisiert weder mit CHMP7 noch mit Calnexin (A-A³, Pfeile). Der Maßstabsbalken entspricht 10 µm.

Da der VPS4 Komplex zusammen mit LIP5 für die endgültige Abschnürung der intraluminalen Vesikel benötigt wird, wurden auch diese beiden Komponenten untersucht. Sowohl VPS4B (Abb.2.2.5 A, A¹) als auch LIP5 (Abb.2.2.5 B und B¹) zeigen eine zytoplasmatische Verteilung in der Zelle. LIP5 ist zudem auch im Zellkern zu erkennen. Die Überexpression von LIP5 zeigt keinen Phänotyp in Hinblick auf die späten endosomalen Marker (Abb.2.2.5 A², A³ und B², B³). VPS4B kolokalisiert allerdings an einem Teil der größeren LAMP1 positiven Endolysosomen, diese sind aber nicht vergrößert wie beispielsweise bei der Überexpression der CHMP4 Proteine (s. Abb.2.2.5 A-A³, Pfeile).

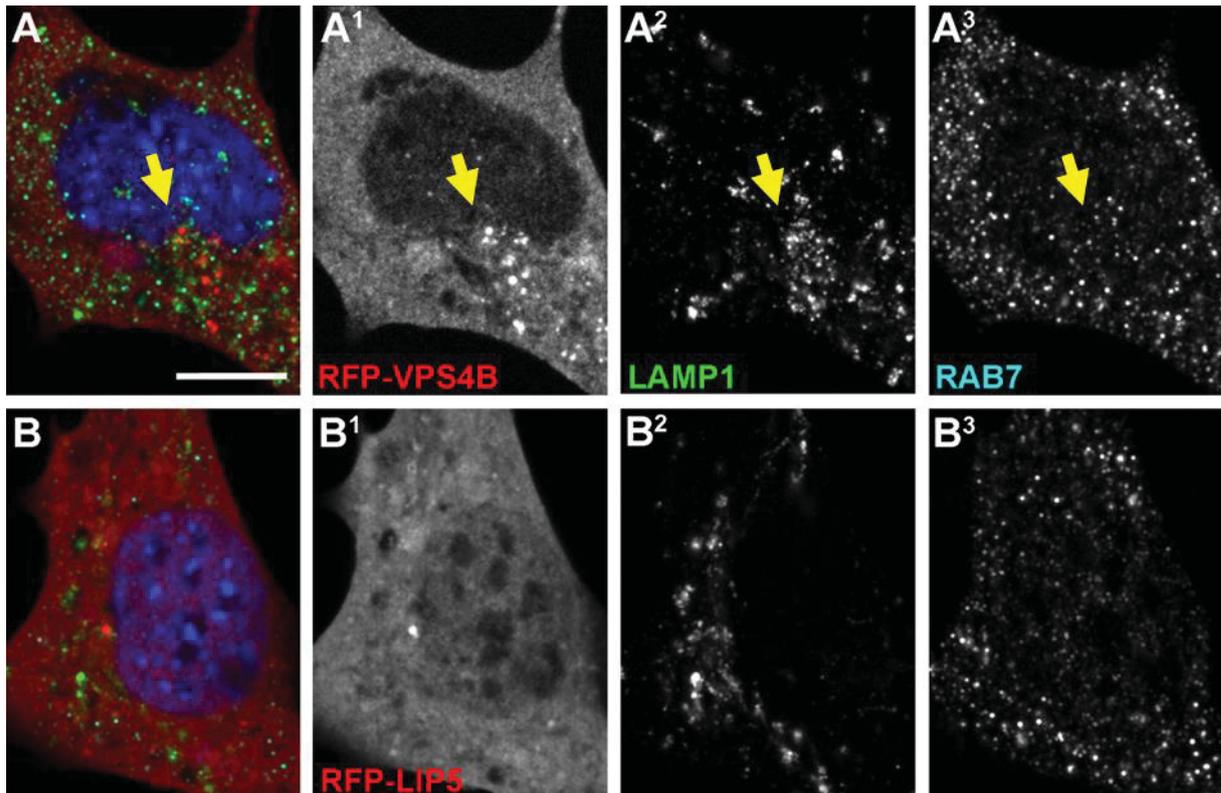


Abb.2.2.5 Expression von RFP-VPS4B und RFP-LIP5 in wildtypischen MEF-Zellen.

VPS4B ist zytoplasmatisch in der Zelle verteilt (A, A¹). Die Verteilung von LAMP1 und RAB7 wird nicht beeinflusst und ist wildtypisch (A² und A³). Es zeigen sich Kolokalisationen mit VPS4B und LAMP1 an vereinzelt, größeren LAMP1 positiven Endolysosomen (A-A², gelbe Pfeile). Keine Kolokalisation ist mit RAB7 festzustellen (A und A³, gelbe Pfeile). LIP5 ist ebenfalls zytoplasmatisch verteilt, lokalisiert aber zusätzlich auch im Zellkern (B¹). LAMP1 und RAB7 sind wie bei VPS4B wildtypisch verteilt (B², B³) und kolokolalisieren nicht mit LIP5 (B-B³). Der Maßstabsbalken entspricht 10 μ m.

Eine Störung des ESCRT-Systems wie bei einer Defizienz für *Vps4* wie in *Vps4a*^{+/-}; *Vps4b*^{+/-} MEF-Zellen (Kapitel 2.1) führt zu einer Akkumulation von CC2D1A und CHMP4B in vergrößerten Endolysosomen. Die Überexpression von RFP-CHMP4 Konstrukten führt ebenfalls zu vergrößerten späten Endosomen und Endolysosomen (Abb.2.2.2). Auch kommt es durch die Expression von CHMP4A, CHMP4B oder CHMP4C zu einer Akkumulation von endogenem CC2D1A (Abb.2.2.6). Diese Akkumulationen kolokolalisieren mit dem jeweiligen, exprimierten CHMP4. CHMP4A zeigt eine stärkere Kolokolisation mit RAB7 als mit LAMP1 (Abb.2.2.2 A-A³). Endogenes CC2D1A kolokolalisiert stark mit CHMP4A in Bereichen in welchen nur zum Teil LAMP1 akkumuliert (Abb.2.2.6 A-A¹). Vermutlich wäre mit RAB7 dort eine stärkere Kolokolisation zu erkennen (vgl. Abb.2.2.2 A-A³ mit Abb.2.2.6 A-A³). Exprimiertes CHMP4B und CHMP4C zeigen starke Kolokolisationen mit LAMP1 (Abb.2.2.2 und 2.2.6, jeweils B-B³ und C-C³). Das endogene CC2D1A kolokolalisiert stark mit CHMP4B und CHMP4C und somit ebenfalls mit LAMP1 (Abb.2.2.6 B-B³ und C-C³). Dies weist darauf hin, dass CC2D1A durch die Expression der CHMP4 Proteine nicht generell an vergrößerte endosomale Kompartimente lokalisiert. Vielmehr wird CC2D1A spezifisch dorthin rekrutiert, wo die CHMP4 Proteine akkumulieren.

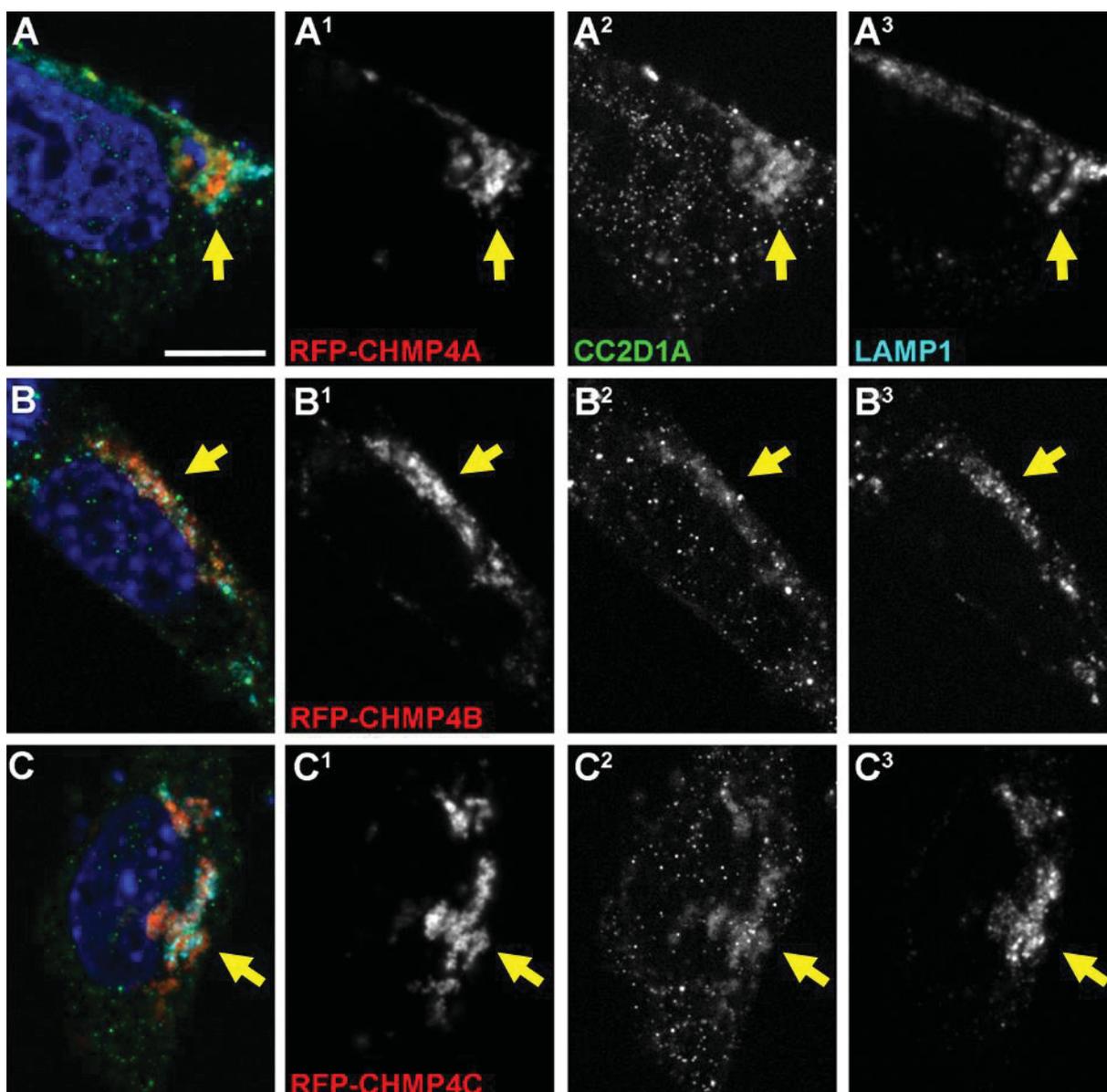


Abb.2.2.6 Expression von RFP-CHMP4 in wildtypischen MEF-Zellen zur Analyse des Einflusses auf endogenes CC2d1A. Die Expression von CHMP4A zeigt eine Akkumulation des Konstruktes in der Nähe des Zellkerns (A¹) und eine teilweise Kolo­kalisierung mit LAMP1 (A, A³). Endogenes CC2D1A kolo­kalisiert stark mit CHMP4A und ebenso teilweise mit LAMP1 (A, A²). Die Expression von CHMP4B zeigt eine starke Kolo­kalisierung sowohl mit LAMP1 als auch CC2D1A (B-B³). Im Gegensatz zur Expression von CHMP4A kolo­kalisieren alle drei Proteine in gleichem Maße. Die Expression von CHMP4C zeigt einen ähnlichen Phänotyp wie die CHMP4B Expression. CHMP4C, endogenes CC2D1A und LAMP1 kolo­kalisieren gemeinsam unmittelbar um den Zellkern (C-C³). Der Maßstabsbalken entspricht 10 µm.

2.2.2 Die Expression von CC2D1A oder CC2D1B in *Cc2d1a*^{-/-};*Cc2d1b*^{-/-} hat keinen Einfluss auf die Lokalisation von endogenem CHMP4B.

Die Expression von CHMP4 Proteinen führt zu einer Akkumulation und Kolokalisation mit endogenem CC2D1A und Markern für späte Endosomen oder Endolysosomen. Die CHMP4 Proteine beeinflussen also zumindest in Überexpression die Lokalisation von CC2D1A. Um zu analysieren, ob umgekehrt CC2D1A und CC2D1B die Lokalisation von CHMP4B beeinflussen, wurden die beiden CC2D1-Proteine in *Cc2d1a*^{-/-};*Cc2d1b*^{-/-} Zellen exprimiert (Abb.2.2.7). Sowohl die Expression von EGFP-CC2D1A als auch von EGFP-CC2D1B führt zu keiner Veränderung der Lokalisation von endogenem CHMP4B (Abb.2.2.7 A² und C²). Exprimiertes CC2D1A zeigt eine zytoplasmatische Verteilung und kolokalisiert weder mit LAMP1 noch endogenem CHMP4B (Abb.2.2.7 A-A³). CC2D1B ist ebenso zytoplasmatisch verteilt, zeigt aber auch eine schwache Lokalisation im Zellkern (Abb.2.2.7 C¹). Außerdem sind Akkumulationen zu beobachten, welche zum Teil mit LAMP1 kolokalisieren (Abb.2.2.7 C-C³). Die Koexpression von CC2D1A mit CHMP4B führt zu einer starken Kolokalisation beider Proteine nahe des Zellkerns (Abb.2.2.7 B-B²). Die Kolokalisationen sind zudem positiv für den endolysosomalen Marker LAMP1 (Abb.2.2.7 B-B³). Die Lokalisation von CHMP4B ist im Vergleich zur Expression von CHMP4B alleine in wildtypischen MEF-Zellen nicht verändert (vgl. Kapitel 2.2.1 und Abb.2.2.2 B-B³). Die Koexpression von CC2D1B und CHMP4B zeigt eine starke Kolokalisation beider Proteine, vergleichbar mit der Koexpression von CC2D1A mit CHMP4B (Abb.2.2.7 D-D²). Diese Kolokalisationen sind zu einem großen Teil auch positiv für LAMP1 (Abb.2.2.7 D-D³).

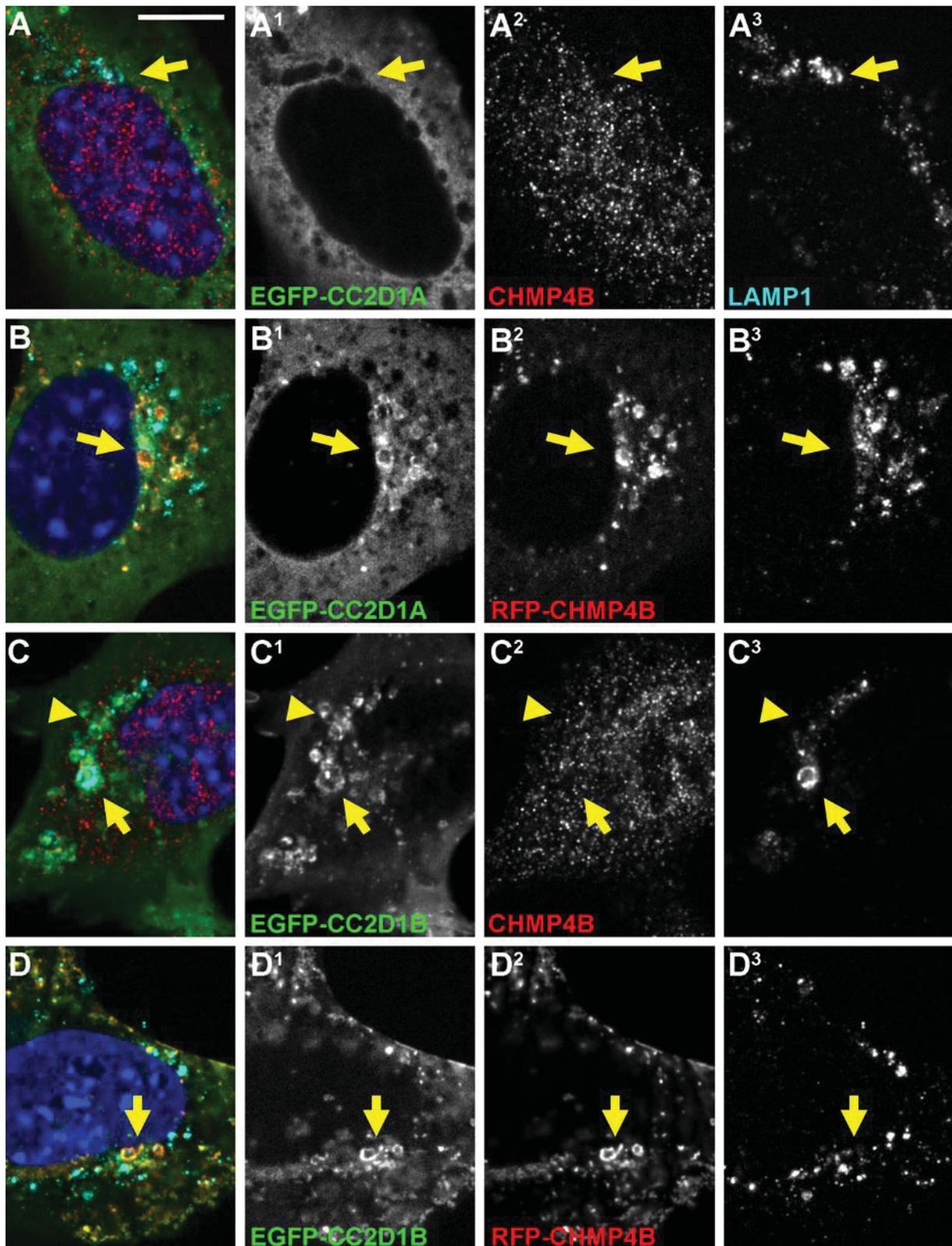


Abb.2.2.7 Expression von EGFP-CC2D1A und EGFP-CC2D1B alleine, und Koexpression beider Konstrukte mit RFP-CHMP4B in *Cc2d1a*^{-/-};*Cc2d1b*^{-/-} MEF-Zellen.

In *Cc2d1a*^{-/-};*Cc2d1b*^{-/-} Zellen exprimiertes EGFP-CC2D1A ist zytoplasmatisch verteilt (A²) und zeigt keine Kolokalisation mit CHMP4B oder LAMP1 (A-A³, Pfeile) deren Lokalisation nicht verändert ist. Koexprimiertes CC2D1A und CHMP4B zeigen eine starke Kolokalisation (B-B², Pfeile). Die Bereiche der Kolokalisation sind zudem positiv für LAMP1 (B, B³, Pfeile). CC2D1A ist aber weiterhin auch zytoplasmatisch verteilt. CC2D1B ist ebenfalls zytoplasmatisch verteilt und lokalisiert schwach im Zellkern (C¹). Außerdem akkumuliert es in

vesikulären Strukturen, welche zum Teil LAMP1 positiv sind (C, C¹, C³, Pfeile und Pfeilspitzen). Die Lokalisation von endogenem CHMP4B ist nicht verändert (C²). Koexprimiertes CC2D1B und CHMP4B kolokalisieren (D-D², Pfeile). Diese Kolokalisationen sind zum Teil LAMP1 positiv (D, D³, Pfeile). CC2D1B ist weiterhin im Zytoplasma und schwach im Zellkern zu beobachten. Der Maßstabsbalken entspricht 10 µm.

2.2.3 CC2D1A und CC2D1B interagieren mit CHMP4, CHMP5 und CHMP7 sowie mit sich selbst.

Bisherige Untersuchungen zu den Interaktionen der CC2D1 Proteine zeigten, dass CC2D1A mit CHMP4A, CHMP4B und CHMP4C interagiert und dass CC2D1B ebenfalls mit CHMP4B interagiert. Dies konnte bisher durch einen Yeast-2-Hybrid Screen und weitere *in vitro* Experimente, wie Co-IP und „Pull Down“ gezeigt werden (Masterarbeit Angie Lindner, 2013; Martinelli et al., 2012; Usami et al., 2012; Tsang et al., 2006). In *Drosophila* konnten *in vivo* Studien zeigen, dass das CC2D1 Ortholog Lgd ein positiver Regulator des CHMP4 Orthologs Shrub ist und mit diesem direkt interagiert (Troost et al., 2012). Außerdem wurde in *Drosophila* gezeigt, dass Lgd ebenfalls mit Chmp5 interagiert und es ebenfalls eine funktionelle, genetische Interaktion gibt (Sven Klose, unveröffentlicht).

Um die bereits beschriebenen Interaktionen und solche mit potentiell neuen Interaktionspartnern genauer zu analysieren, wurden FRET Messungen in lebenden Zellen durchgeführt. Hierzu wurden NIH3T3 Zellen mit Donor- und Akzeptorkonstrukten unter Kontrolle des CMV-Promotors transient transfiziert. Mittels Akzeptorphotobleichen wurde dann die FRET Effizienz gemessen (s. Kapitel 5.2.6). Einer der Vorteile dieser Methode besteht darin, dass die Analyse in lebenden Zellen stattfindet, was gegenüber reinen *in vitro* Methoden wie „Pull-Down Assays“ eine größere Nähe zur *in vivo* Situation darstellt.

Als Positivkontrolle diente ein Fusionsprotein aus Donor und Akzeptor, EGFP-RFP. Als Negativkontrolle wurden EGFP-CC2D1A und EGFP-CC2D1B jeweils mit freiem RFP koexprimiert. Exprimiertes RFP ist frei zytoplasmatisch in der Zelle verteilt. Die gemessene FRET-Effizienz dieser Negativkontrollen stellt den grundlegenden Wert für „zufällige“ Nähe zwischen den Donorkonstrukten und einem zytoplasmatisch verteilten Protein innerhalb der Zelle dar. Abhängig ist die FRET-Effizienz unter anderem von der Distanz der beiden Chromophore. Diese ist größer, je näher sich die Chromophore sind und kann maximal 10 nm betragen. Außerdem ist die FRET-Effizienz beispielsweise vom Winkel der Chromophore oder der Anzahl der Moleküle abhängig (Übersicht in Vogel et al., 2006; Sisamakakis et al., 2010).

Neben den bisher beschriebenen CHMP4 Interaktionspartnern, konnten drei weitere potentielle Interaktionspartner für beide CC2D1 Proteine identifiziert werden, CHMP1, CHMP5 und CHMP7. Zudem können CC2D1A und CC2D1B jeweils mit sich selbst, als auch miteinander interagieren. Außerdem konnte gezeigt werden, dass CC2D1A und CC2D1B nicht mit CHMP2, LIP5 und VPS4B interagieren. (Abb.2.2.8).

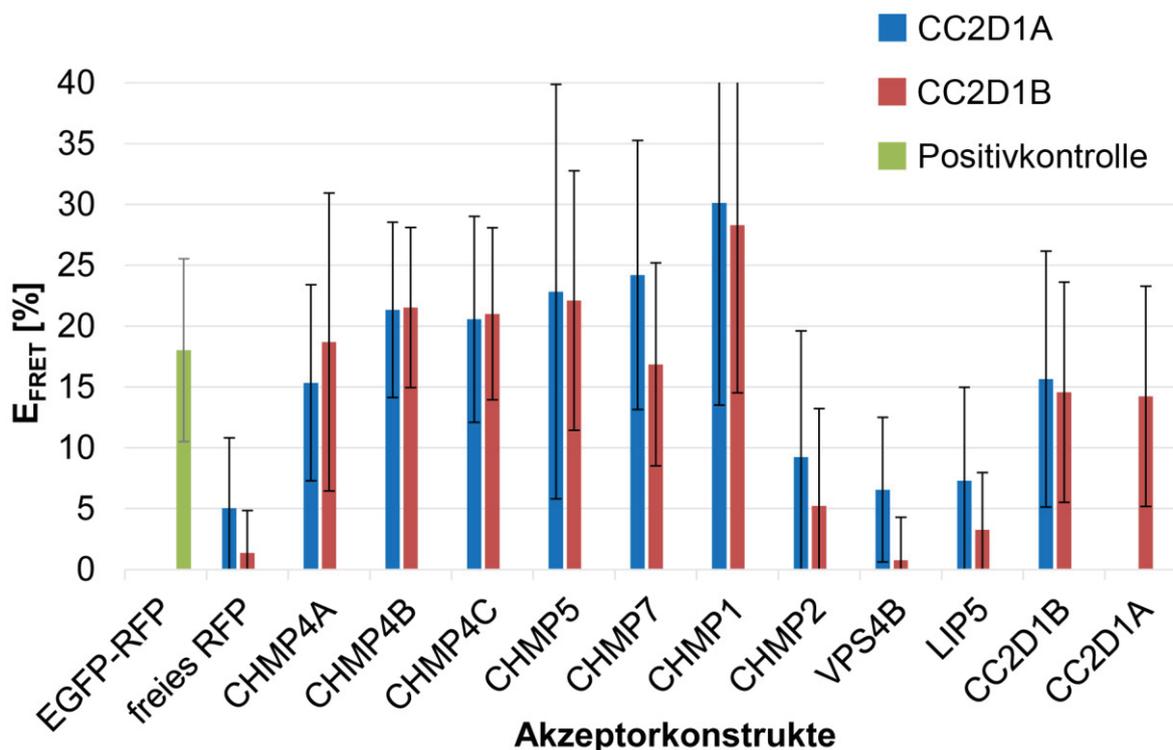


Abb.2.2.8 Interaktion von CC2D1A und CC2D1B mit ESCRT-III und VPS4-Komplex Untereinheiten. In der Abbildung sind die durch Akzeptorphotobleichen gemessenen Werte der FRET Effizienz (E_{FRET}) für die Donorkonstrukte EGFP-CC2D1A (rot) und EGFP-CC2D1B (blau) mit verschiedenen Akzeptorkonstrukten von Untereinheiten des ESCRT-III und VPS4B-Komplexes, sowie mit Akzeptorkonstrukten der CC2D1 Proteine selbst gezeigt. Dargestellt sind ebenfalls die Positivkontrolle (grün) und die Negativkontrollen (freies RFP). Sowohl CC2D1A als auch CC2D1B interagiert mit CHMP4A, CHMP4B und CHMP4C, sowie mit CHMP1, CHMP5 und CHMP7. Außerdem können die CC2D1 Proteine jeweils sowohl mit sich selbst, als auch miteinander interagieren. Beide interagieren nicht mit CHMP2, VPS4B und LIP5.

Die Messungen der Interaktionen mit CHMP4A, CHMP4B, CHMP4C, CHMP5 und CHMP7 zeigen eine ähnliche FRET Effizienz wie die Positivkontrolle, welche aus einem Fusionsprotein von EGFP und RFP besteht. Hierbei zeigen sich keine deutlichen Unterschiede zwischen CC2D1A und CC2D1B. Bei den Messungen mit CHMP4A und CHMP5 traten höhere Schwankungen auf als bei den anderen drei Interaktionspartnern. Bei CHMP1 fällt im Vergleich die höchste FRET Effizienz auf. In parallel durchgeführten *in vitro* „Pull-Down“ Versuchen konnte keine direkte Interaktion der CC2D1 Proteine mit CHMP1 nachgewiesen werden. Allerdings zeigen Co-IP Experimente eine schwache Interaktion (Masterarbeit Kristina Scheider, 2014). Es handelt sich also möglicherweise um eine indirekte Interaktion. Die Interaktionen mit CHMP5 und CHMP7 konnten als direkte Interaktionen mittels „Pull-Down“ bestätigt werden (Masterarbeit Angie Lindner, 2013). Untersuchungen zu Methoden der FRET Messung zeigten, dass beinahe jedes FRET-Paar aus Membranproteinen, welches in der gleichen Membran exprimiert wird eine FRET-Effizienz von ca. 5 % hat (Vogel et al., 2006). Ausgehend von diesen Ergebnissen und den in dieser Arbeit genutzten Kontrollen kann bei einer FRET-Effizienz von über 10 % daher von einer Interaktion ausgegangen werden, bei einer FRET-Effizienz von unter 10 % von keiner Interaktion.

Erstmals konnte durch diese Versuche die Interaktion von CC2D1A und CC2D1B mit den drei CHMP4 Proteinen in lebenden Zellen gezeigt werden. Außerdem konnten mit CHMP5 und CHMP7 neue Interaktionspartner identifiziert werden. Auch eine Interaktion zwischen den CC2D1 Proteinen selbst konnte erstmals gezeigt werden.

2.2.4 *Drosophila* Lgd und Shrub lokalisieren und interagieren in murinen Zellen vergleichbar zu ihren Säuger Orthologen.

Shrub zeigt eine ähnliche Verteilung bei der Expression in wildtypischen MEF Zellen wie CHMP4B und CHMP4C (s. Abb.2.2.2). Daher sollte auch die Lokalisation von Lgd dem *Drosophila* Ortholog der CC2D1 Proteine und letztlich auch seine Interaktion mit Shrub untersucht werden. EGFP-Lgd wurde dazu in *Cc2d1a*^{-/-};*Cc2d1b*^{-/-} MEF Zellen exprimiert und seine Lokalisation untersucht. Lgd ist ähnlich wie die CC2D1 Proteine zytoplasmatisch verteilt und zeigt wie CC2D1B (vgl. Abb.2.2.6) eine schwache Lokalisation im Zellkern (Abb.2.2.9 A¹). Die Verteilung von endogenem CHMP4B wird nicht sichtbar beeinflusst (Abb.2.2.9 A²). Shrub akkumuliert bei Expression in wildtypischen Zellen in LAMP1 positiven, endolysosomalen Kompartimenten (vgl. Abb.2.2.2 D-D³). Die Koexpression von Lgd und Shrub zeigt eine Kolo-kalisation in LAMP1 positiven Bereichen unmittelbar um den Zellkern (Abb.2.2.9 B-B³, Pfeile). Die Verteilung der exprimierten *Drosophila* Proteine ähnelt dabei dem der Säuger Orthologe, ebenso wie die Verteilung von LAMP1 (vgl. Abb.2.2.7). Lgd beeinflusst also nicht die Lokalisation von CHMP4B. Umgekehrt wird die Lokalisation von Lgd durch Shrub stark beeinflusst, ebenso wie die Lokalisation der CC2D1 Proteine durch CHMP4 beeinflusst wird (vgl. Kapitel 2.2.2).

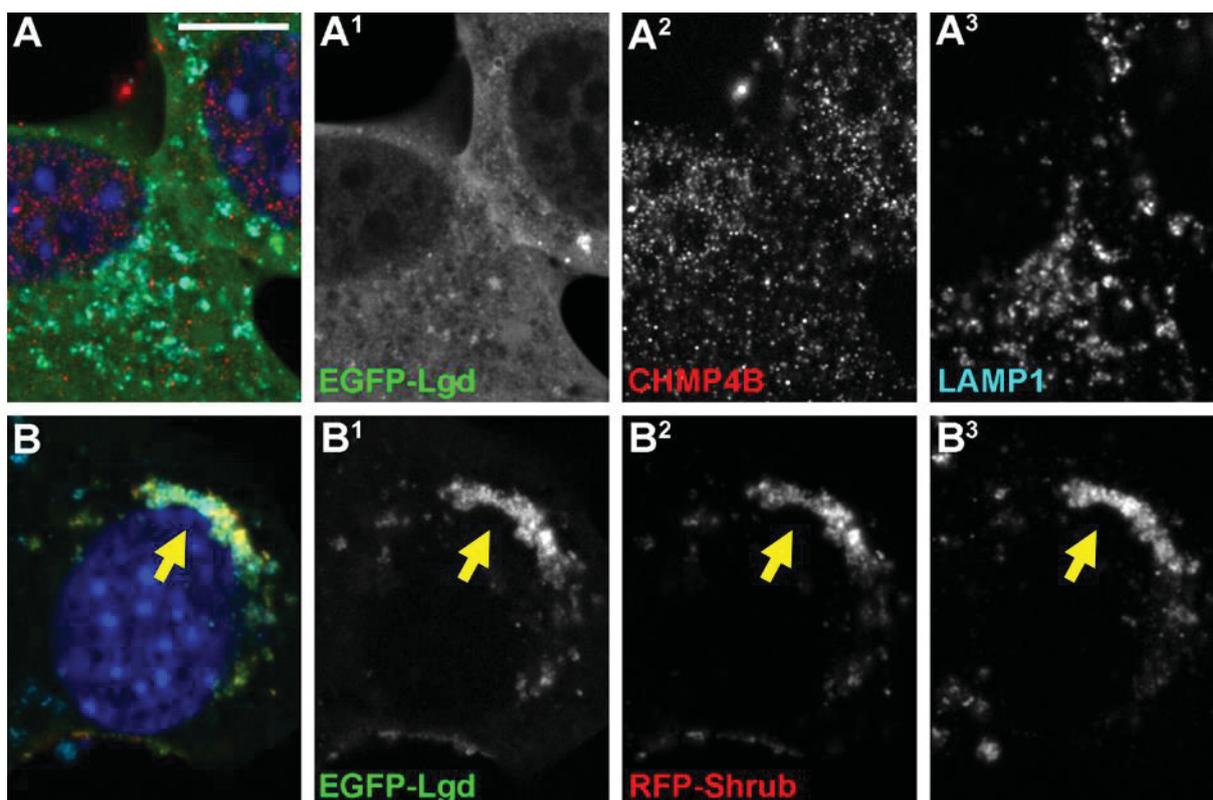


Abb.2.2.9 Expression von EGFP-Lgd und Koexpression von EGFP-Lgd und RFP-Shrub in *Cc2d1a*^{-/-}; *Cc2d1b*^{-/-} MEF Zellen. Lgd ist zytoplasmatisch in den Zellen verteilt (A¹). Es ist keine Kolokalisation mit CHMP4B oder LAMP1 erkennbar (A-A³). Die Expression von Lgd zusammen mit Shrub führt zu einer starken Kolokalisation in LAMP1 positiven Bereichen der Zelle (E-E3). Der Maßstabsbalken entspricht 10 μ m.

Zum Vergleich der Interaktionen der humanen Proteine mit den Drosophila Orthologen wurden diese ebenfalls in FRET Messungen untersucht. Hierzu wurden sie genau wie die anderen Konstrukte in NIH3T3 Zellen exprimiert und durch Akzeptorphotobleichen die FRET Effizienz gemessen (Abb.2.2.10). Hierbei konnten auch mit dieser Methodik die Interaktion von Lgd mit Shrub und Chmp5 bestätigt werden. Außerdem kann eine Interaktion mit Ist1 nachgewiesen werden, deren FRET Effizienz allerdings deutlich geringer ist, als die der beiden anderen Interaktionen. Bei dieser Interaktion handelt es sich vermutlich um eine indirekte Interaktion durch Komplexbildungen, da „Pull-Down“ Versuche zeigten, dass es zu keiner direkten Interaktion kommt (Masterarbeit Christian Brüser, 2013).

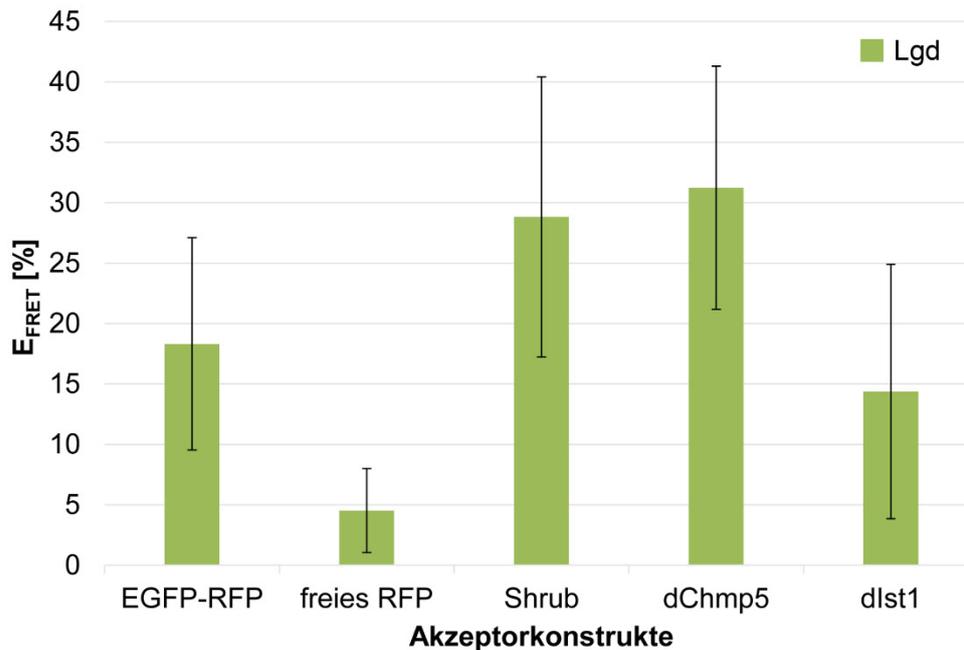


Abb.2.2.10 Interaktionen von *Drosophila* Lgd mit ESCRT-III Untereinheiten.

In dieser Abbildung sind die Messungen der FRET-Effizienz von Lgd und ESCRT-III Untereinheiten aus *Drosophila* dargestellt. Eine Interaktion mit Shrub und Chmp5 kann hierdurch bestätigt werden, die gemessenen Werte der Effizienz sind ähnlich hoch. Die gemessene Effizienz der Interaktion von Lgd mit Ist1 ist hingegen deutlich niedriger, allerdings immer noch ähnlich der Positivkontrolle (EGFP-RFP) und höher als die der Negativkontrolle (freies RFP).

2.2.5 Die C2 Domänen werden nicht für die Interaktion mit CHMP-Proteinen benötigt, aber für Regulation und Lokalisation der CC2D1-Proteine.

Während die DM14 Domänen nur in der CC2D1 Proteinfamilie vorkommen, sind C2 Domänen weiter verbreitet. In der Regel dienen sie der Bindung von Proteinen an Lipidmembranen, aber auch der Protein-Protein Interaktion. Die Expression von CC2D1A^{ΔC2} und CC2D1B^{ΔC2} Konstrukten in *Cc2d1a*^{-/-}; *Cc2d1b*^{-/-} MEF Zellen zeigt eine Lokalisation im Zytoplasma, ähnlich der der vollständigen CC2D1 Konstrukte (Abb.2.2.11 A¹ und C¹). CC2D1B^{ΔC2} ist wie das vollständige CC2D1B ebenfalls im Zellkern zu erkennen. Es ist keine Kolokalisation mit LAMP1 positiven Endolysosomen erkennbar (Abb.2.2.11 A, A³ und C, C³, Pfeilspitzen). In anderen Bereichen der Zelle sind vergrößerte LAMP1 positive Endolysosomen zu erkennen, ähnlich wie bei untransfizierten *Cc2d1a*^{-/-}; *Cc2d1b*^{-/-} MEF Zellen (vgl. Abb.2.1.7 A-A³). Besonders auffällig sind jedoch großflächige Akkumulationen der Konstrukte im Zytoplasma, welche keine Kolokalisation mit LAMP1 zeigen (Abb.2.2.11 A, A³ und C, C³, Pfeile). Innerhalb der großflächigen Akkumulationen von CC2D1B^{ΔC2} kommt es zudem zu einer verstärkten Lokalisation von endogenem CHMP4B (Abb.2.2.11 C, C² Pfeile). Im Falle von CC2D1A^{ΔC2} ist keine Assoziation mit endogenem CHMP4B erkennbar (s.Abb.2.2.11 A-A², Pfeile). Bei der Koexpression von CC2D1A^{ΔC2} und CC2D1B^{ΔC2} mit CHMP4B sind die großflächigen Akkumulationen ebenfalls zu beobachten, zudem kolokalisiert das koexprimierte CHMP4B mit beiden ΔC2 Konstrukten dort (s.

Anhang Abb.8.3). Abseits dieser großen Akkumulationen kolokalisieren die $\Delta C2$ Konstrukte mit CHMP4B in LAMP1 positiven Bereichen um den Zellkern (Abb.2.2.11 B-B³ und D-D³, Pfeile).

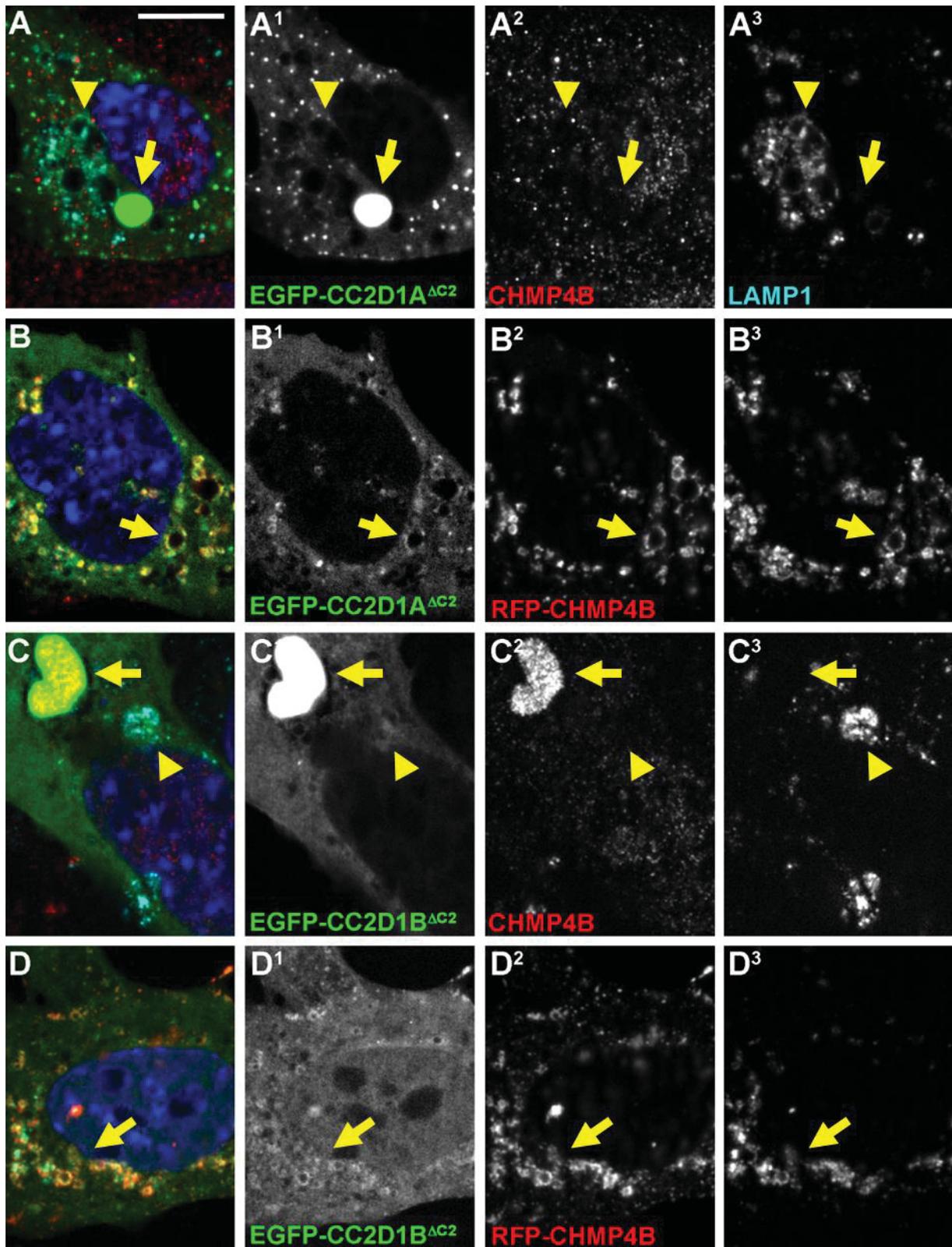


Abb.2.2.9 Expression von EGFP-CC2D1^{ΔC2} in *Cc2d1a*^{-/-};*Cc2d1b*^{-/-} MEF Zellen und Koexpression mit RFP-CHMP4B. Exprimiertes CC2D1A^{ΔC2} ist zytoplasmatisch verteilt und zeigt im Zytoplasma außerdem starke Akkumulationen (A¹, Pfeil). Endogenes CHMP4B ist wildtypisch verteilt (B). Es sind vergrößerte LAMP1 positive Endolysosomen zu erkennen (A³, Pfeilspitze), wie in untransfizierten *Cc2d1a*^{-/-};*Cc2d1b*^{-/-} MEF Zellen

(vgl. Abb.2.1.7). Die starken Akkumulationen von CC2D1A^{ΔC2} sind weder positiv für CHMP4B noch LAMP1 (A-A³, Pfeile). Die Koexpression von CC2D1A^{ΔC2} mit CHMP4B zeigt eine starke Kolokalisation beider Konstrukte (B-B², Pfeile). Diese Kolokalisationen sind positiv für LAMP1 (B, B³, Pfeile). Das exprimierte CC2D1B^{ΔC2} ist ebenfalls zytoplasmatisch verteilt und zeigt starke Akkumulationen (C¹, Pfeil). In diesen Akkumulationen ist eine starke Anreicherung von endogenem CHMP4B zu erkennen (C-C², Pfeile). LAMP1 ist wie in untransfizierten *Cc2d1a*^{-/-};*Cc2d1b*^{-/-} MEF Zellen verteilt und zeigt vergrößerte Endolysosomen (C³, Pfeilspitze) aber keine Lokalisation in den CC2D1B^{ΔC2} Akkumulationen (C³, Pfeil). Die Koexpression von CC2D1B^{ΔC2} und CHMP4B zeigt eine starke Kolokalisation beider Konstrukte (D-D², Pfeile). Diese Kolokalisationen sind LAMP1 positiv (D, D³ Pfeile). Der Maßstabsbalken entspricht 10 μm.

Um zu analysieren, um was es sich bei diesen starken Akkumulationen der CC2D1^{ΔC2} Konstrukte handelt, wurden diese in wildtypischen MEF Zellen exprimiert und dann ihre Ultrastruktur durch Transmissionselektronenmikroskopie untersucht. Hierbei kann allerdings nicht direkt zwischen transfizierten und untransfizierten Zellen unterschieden werden. Jedoch zeigen sich bei Zellen, welche mit EGFP-CC2D1B^{ΔC2} transfiziert wurden, sehr große endolysosomale Strukturen, welche einem „Class E“ Phänotyp gleich kommen (s. Abb.2.2.10 B-B¹ und C-C¹, Pfeile). Diese Endolysosomen sind zum Teil stark deformiert und enthalten große Mengen an membranösen Strukturen und elektronendichtem Material. Diese Strukturen treten in wildtypischen MEF Zellen nicht auf und passen von ihrer Größe auch zu den auftretenden Akkumulationen von CC2D1B^{ΔC2}. Eine Überexpression dieses Konstrukts führt also zu einer starken Störung im endosomalen Transportweges, möglicherweise durch einen dominant-negativen Effekt der ΔC2 Konstrukte.

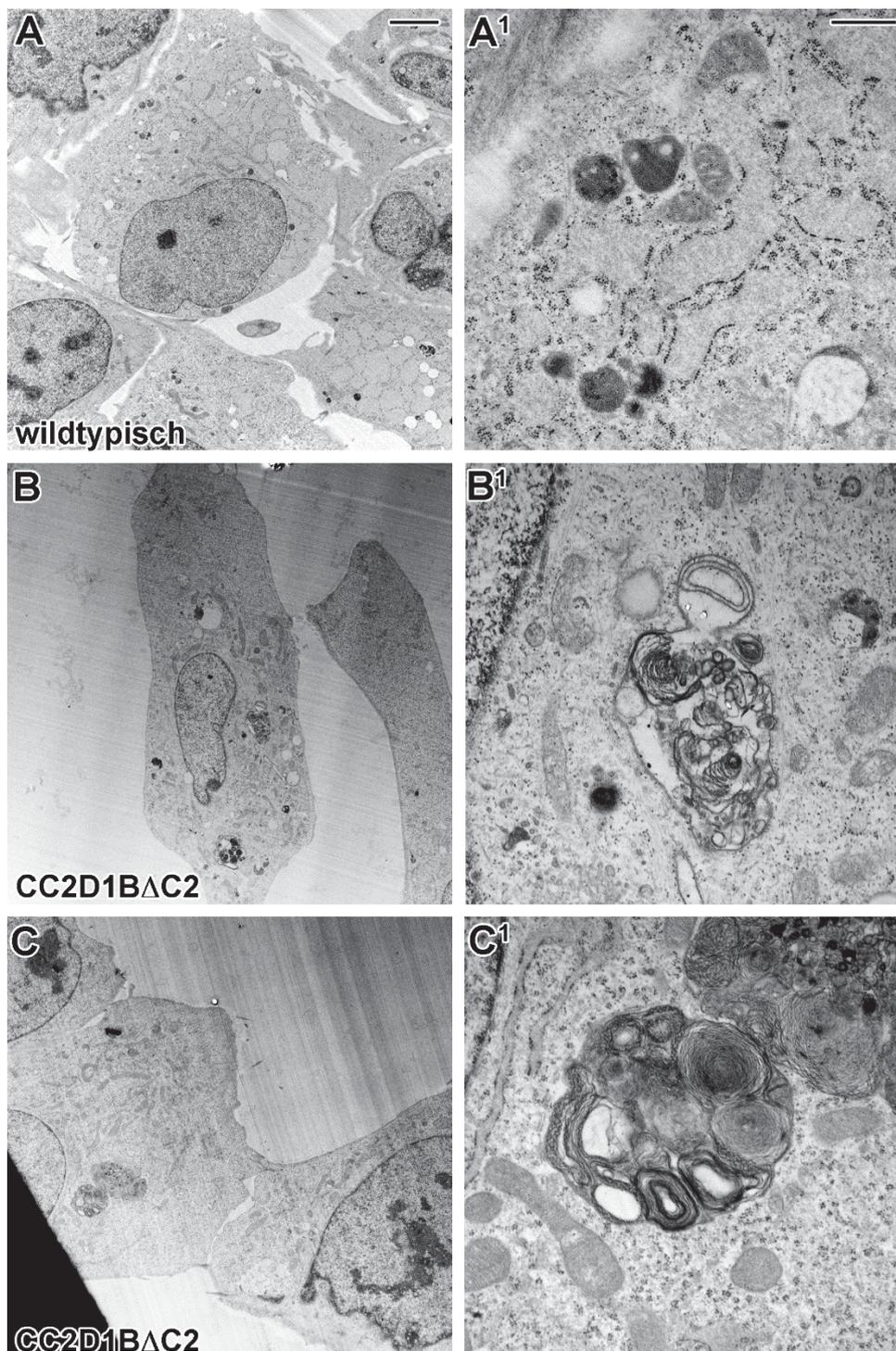


Abb.2.2.10 Ultrastruktur von stark vergrößerten Endolysosomen in Folge von EGFP-CC2D1BΔC2 Überexpression in wildtypischen MEF Zellen. Im Vergleich zu wildtypischen, untransfizierten MEF Zellen (A und A¹) treten in wildtypischen Zellen, in welchen EGFP-CC2D1BΔC2 überexprimiert wurde, stark vergrößerte endolysosomale Kompartimente auf (B, B¹ und C, C¹, gelbe Pfeile). Diese haben einen „Class E“ ähnlichen Phänotyp und enthalten stark konzentrierte membranöse Strukturen (C¹, gelber Pfeil) oder andere elektronendichte, diffusere Strukturen (B¹, gelber Pfeil). Die Maßstabsbalken entsprechen 5 μm (A, B und C) und 0,5 μm (A¹, B¹ und C¹).

Bisherige Untersuchungen von CC2D1A und *Drosophila* Lgd zeigten, dass die DM14 Domänen für die Interaktion mit CHMP4B bzw. Shrub verantwortlich sind. So zeigen die FRET-APB Analysen keinen Einfluss des Verlustes der C2 Domäne auf die Interaktion. Sowohl CC2D1A Δ C2 als auch CC2D1B Δ C2 interagieren weiterhin mit den drei CHMP4 Proteinen, CHMP5 und CHMP7 (Abb.2.2.11). Die ermittelten Werte für die FRET-Effizienz zeigen nur zum Teil Unterschiede zwischen den vollständigen CC2D1 und den Δ C2 Konstrukten. Bei den Interaktionen von CC2D1A Δ C2 mit CHMP4C und beider Δ C2 Konstrukte mit CHMP5 ist ein größerer Anstieg der FRET-Effizienz zu beobachten. Bei der Interaktion mit CHMP7 wurde eine niedrigere FRET-Effizienz bei den Δ C2 Konstrukten ermittelt. Auch wenn die FRET-Effizienz der Interaktion von CC2D1B Δ C2 mit CHMP7 sehr niedrig ist, kann hier allerdings nicht von einem eindeutigen Verlust der Interaktion gesprochen werden, da er immer noch deutlich über der Negativkontrolle liegt (1,5 %). Die FRET-Effizienz wird unter anderem vom Abstand der Chromophore als auch ihrem Winkel zueinander beeinflusst. Durch das Fehlen der C2 Domäne kann also die Stereometrie der Interaktion verändert worden sein, was zu diesen Abweichungen bei der FRET-Effizienz führen kann. Eine weitere Möglichkeit ist, dass weniger Moleküle miteinander interagieren, was ebenfalls zu einem Absinken der FRET-Effizienz führen würde.

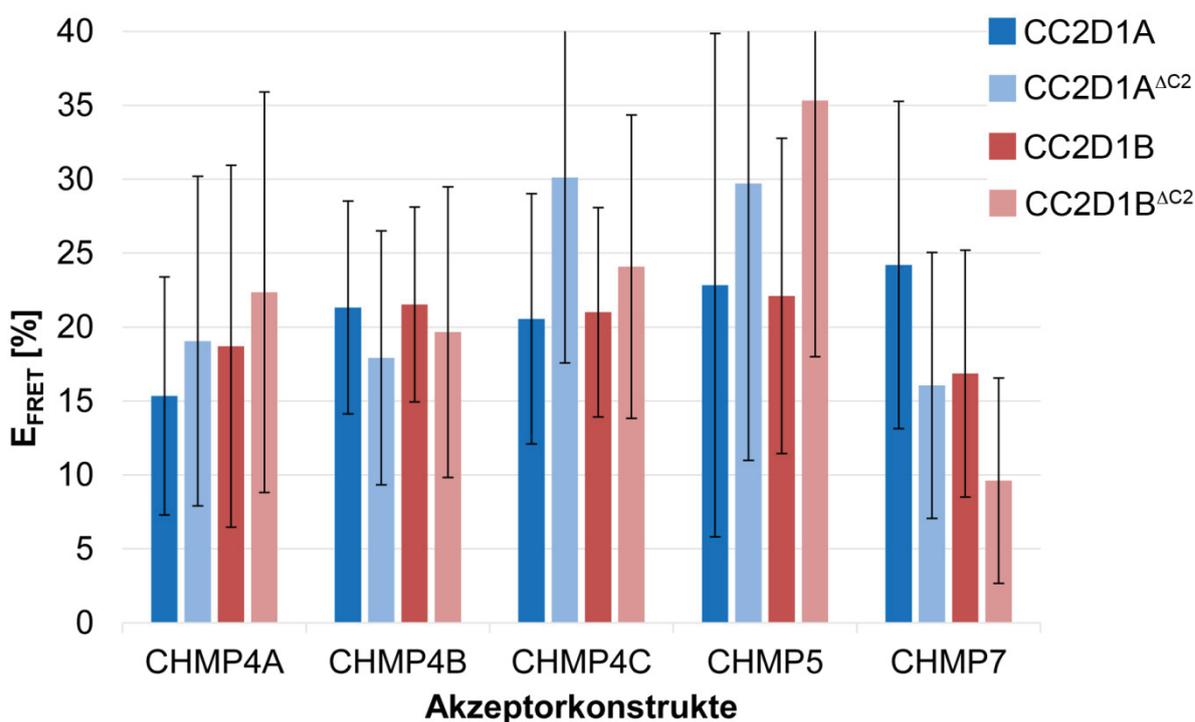


Abb.2.2.11 Auswirkung der Deletion der C2 Domäne in CC2D1A und CC2D1B auf die Interaktion mit CHMP Interaktionspartnern.

Die Deletion der C2 Domäne führt weder bei CC2D1A noch bei CC2D1B zu einem Verlust der Interaktion mit einem der CHMP Proteine. Bei der Interaktion von CC2D1A Δ C2 mit CHMP4C und den Interaktionen beider Δ C2 Konstrukte mit CHMP5 ist, verglichen mit den Interaktionen der vollständigen Konstrukten, ein Anstieg der FRET-Effizienz zu erkennen. Bei der Interaktion beider Δ C2 Konstrukte mit CHMP7 ist hingegen ein Absinken der FRET-Effizienz festzustellen. Die Unterschiede der gemessenen FRET-Effizienzen bei den Interaktionen der

Δ C2 Konstrukte im Vergleich zu den vollständigen CC2D1 Proteinen können auf eine veränderte Stereometrie durch die Deletion zurückzuführen sein.

2.2.6 Ein Teil der DM14 Domänen der CC2D1 Proteine vermittelt die Interaktion mit ESCRT-Untereinheiten.

Die DM14 Domänen sind ein einzigartiges Merkmal der CC2D1 Proteinfamilie. Daher gibt es keine Vergleichsmöglichkeiten ihrer Funktion in anderen Proteinfamilien, wie dies bei der C2 Domäne der Fall ist. In *in vitro* Experimenten konnte bisher gezeigt werden, dass Fragmente von CC2D1A, welche nur aus der zweiten, dritten oder vierten DM14 Domäne alleine bestehen, für die Interaktion mit CHMP4B ausreichen (Martinelli et al., 2012, Usami et al., 2012). Die erste DM14 Domäne alleine kann nur interagieren, wenn noch ein Stück der Verbindung zur zweiten DM14 Domäne im Fragment erhalten ist (Usami et al., 2012). In *Drosophila* wurde in *in vivo* Studien hingegen gezeigt, dass für die Rettung von *lgd* ein Konstrukt mit wenigstens zwei DM14 Domänen benötigt wird. Hierbei ist es irrelevant, welche der DM14 Domänen erhalten sind, wobei bei Erhalt der zweiten Domäne die Rettung am robustesten ausfällt (Troost et al., 2012).

Um zu überprüfen, ob der Verlust der DM14 Domänen und damit der mögliche Verlust von Interaktionen einen Einfluss auf die Lokalisation der CC2D1 Proteine hat, wurden Δ DM14 Konstrukte in *Cc2d1a^{-/-};Cc2d1b^{-/-}* Zellen exprimiert. Dabei wurde auch der Einfluss auf den bekannten Interaktionspartner CHMP4B und den endolysosomalen Marker LAMP1 analysiert. EGFP-CC2D1A ^{Δ DM14} ist weiterhin zytoplasmatisch lokalisiert (Abb.2.2.12 A¹). Es kann keine eindeutige Kolokalisation mit CHMP4B oder LAMP1 festgestellt werden (Abb.2.2.12 A-A³). CC2D1A ^{Δ DM14} zeigt also keinen erkennbaren Unterschied zum vollständigen CC2D1A hinsichtlich seiner Lokalisation oder der untersuchten Marker (vgl. Abb.2.2.6, A-A³). Die Koexpression von EGFP-CC2D1A ^{Δ DM14} und RFP-CHMP4B führt zu einer starken Kolokalisation beider Konstrukte (Abb.2.2.12 B-B², Pfeile). Diese Kolokalisation tritt vor allem in und an stark vergrößerten LAMP1 positiven, endolysosomalen Kompartimenten auf (Abb.2.2.12 B, B³, Pfeile). Abseits der Kolokalisation mit CHMP4B ist CC2D1A ^{Δ DM14} weiterhin zytoplasmatisch verteilt. Es ist kein Unterschied zur Koexpression von vollständigem CC2D1A mit CHMP4B zu beobachten (vgl. Abb.2.2.6 B-B³).

Exprimiertes EGFP-CC2D1B ^{Δ DM14} ist zytoplasmatisch lokalisiert und zudem schwach im Zellkern zu erkennen (Abb.2.2.12 C¹). Des Weiteren lokalisiert CC2D1B ^{Δ DM14} zum Teil an großen, LAMP1 positiven Endolysosomen (Abb.2.2.12 C, C¹ und C³, Pfeilspitzen). Außerdem treten Akkumulationen von CC2D1B ^{Δ DM14} in unmittelbarer Nähe zu großen Endolysosomen auf (Abb.2.2.12 C¹, Pfeil). Endogenes CHMP4B lokalisiert zum Teil dort ebenfalls verstärkt, LAMP1 hingegen nicht (Abb.2.2.12 C-C³, Pfeile). Diese CHMP4B positiven Akkumulationen von CC2D1B ^{Δ DM14} sind ein Unterschied zur Expression des vollständigen CC2D1B, bei dem diese nicht auftreten (vgl. Abb.2.2.6). Bei der

Koexpression von EGFP-CC2D1B^{ADM14} mit RFP-CHMP4B sind starke Koloalationen an großen, LAMP1 positiven Endolysosomen zu erkennen (Abb.2.2.12 D-D³, Pfeile). Bei der Koexpression von CC2D1B^{ADM14} mit CHMP4B ist kein Unterschied zur Koexpression des vollständigen CC2D1B mit CHMP4B erkennbar (vgl. Abb.2.2.6 D-D³).

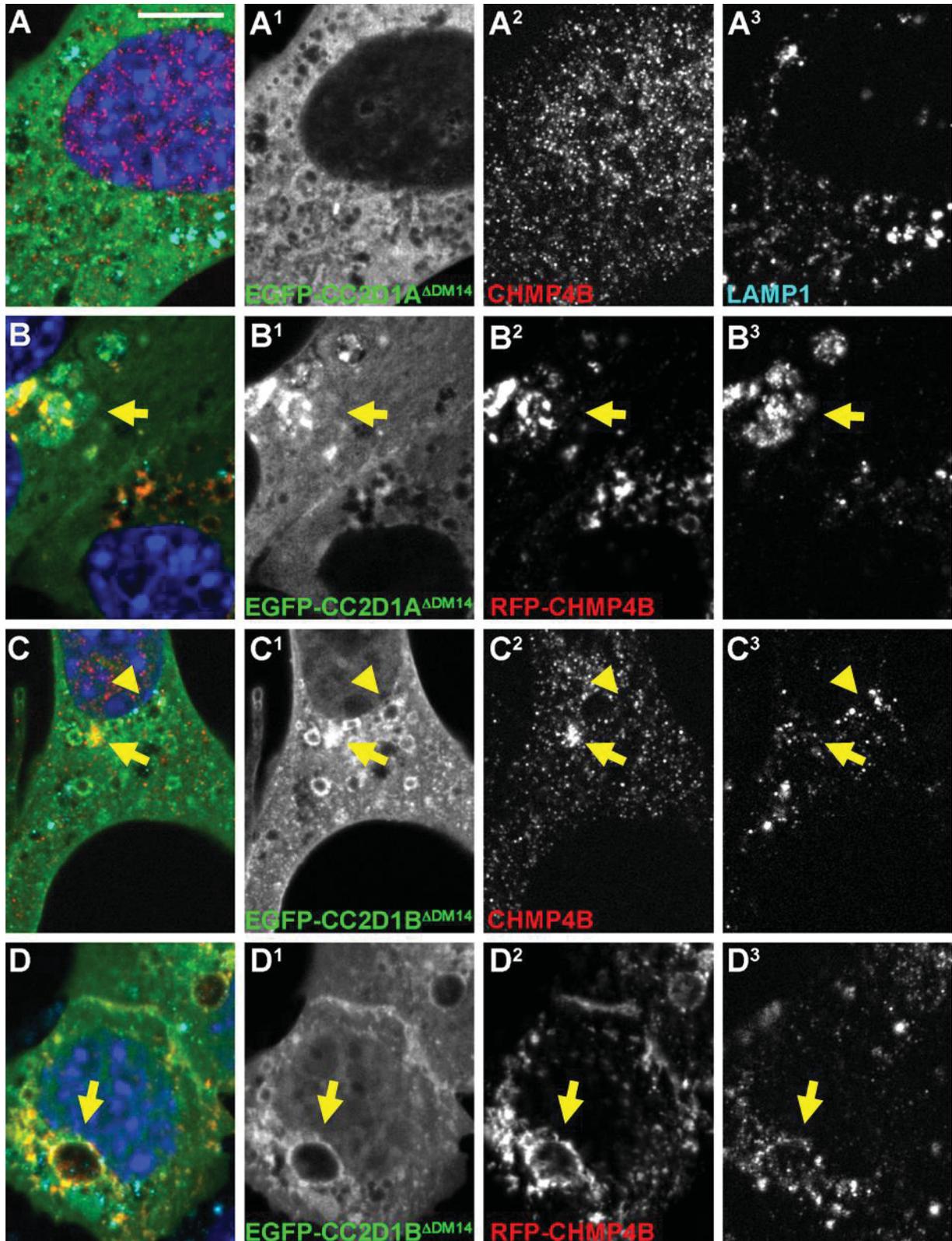


Abb.2.2.12 Expression von EGFP-CC2D1A^{ADM14} und EGFP-CC2D1B^{ADM14} in *Cc2d1a*^{-/-}; *Cc2d1b*^{-/-} MEF Zellen und Koexpression mit RFP-CHMP4B. Exprimiertes CC2D1A^{ADM14} ist diffus zytoplasmatisch verteilt (A¹). Die Lokalisation von endogenem CHMP4B (A²) und LAMP1 (A³) ist nicht verändert und es ist keine eindeutige Kolo­kalisation mit dem Konstrukt zu erkennen (A). Die Koexpression von CC2D1A^{ADM14} (B¹) mit CHMP4B (B²) führt zu einer starken Kolo­kalisation beider Konstrukte in LAMP1 positiven Strukturen (B-B³, Pfeile). Exprimiertes CC2D1B^{ADM14} lokalisiert im Zytoplasma und im Zellkern (C¹). Außerdem sind Akkumulationen im Zytoplasma zum Teil an vesikulären erkennbar. Die Akkumulationen an vesikulären Strukturen sind zum Teil LAMP1 positiv (C, C¹ und C³, Pfeilspitzen). Außerdem gibt es Akkumulationen, welche nicht LAMP1 positiv sind (C, C³, Pfeile), aber ebenfalls eine starke Akkumulation von endogenem CHMP4B zeigen (C-C², Pfeile). Die Koexpression von CC2D1B^{ADM14} (D¹) mit CHMP4B (D²) führt zu einer starken Kolo­kalisation beider Proteine (D-D², Pfeile) in LAMP1 positiven Bereichen der Zelle (D und D³, Pfeile). Der Maßstabsbalken entspricht 10 µm.

Die *in vitro* Ergebnisse der Interaktion von CC2D1A mit CHMP4B und die *in vivo* und *in vitro* Ergebnisse der Interaktion von Lgd mit Shrub aus *Drosophila* zeigen, dass die DM14 Domänen für diese Interaktionen benötigt werden (Martinelli et al., 2012; Usami et al., 2012; Troost et al., 2012). Für CC2D1B wurde bisher weder beschrieben, ob und welche DM14 Domänen für die Interaktion mit CHMP4B benötigt werden. Auch wurde bisher die Interaktion der CC2D1 Proteine mit CHMP4A und CHMP4C nicht näher analysiert. Daher wurde mit Hilfe von FRET-APB Messungen untersucht, ob die DM14 Domänen für diese Interaktionen benötigt werden. Zudem sollte analysiert werden, ob sie ebenfalls für die Interaktion mit den neu identifizierten Interaktionspartnern CHMP5 und CHMP7 benötigt werden.

Bei CC2D1A^{ADM14} zeigt sich bei keinem der fünf untersuchten Interaktionspartner ein Verlust der Interaktion (Abb.2.2.13). Bei der Interaktion von CC2D1A^{ADM14} mit CHMP4A, CHMP4B und CHMP5 ist keine Veränderung der FRET-Effizienz zu beobachten. Bei der Interaktion von CC2D1A^{ADM14} mit CHMP4C und CHMP7 wurde eine geringere FRET-Effizienz gemessen. Da die gemessenen Werte mit einer FRET-Effizienz von über 10% noch deutlich über dem Wert der Negativkontrolle (5%) liegen, kann nicht von einem vollständigen Verlust der Interaktion gesprochen werden. Durch die Deletion aller DM14 Domänen und der zwischen ihnen liegenden Bereiche fehlt der Großteil des Proteins. Die Schwankungen und Änderungen der gemessenen FRET-Effizienz können also auf eine Änderung der Stereometrie zurückzuführen sein. Auch könnten die Konstrukte möglicherweise zum Teil über endogene Proteine indirekt interagieren.

Die Deletion der DM14 Domänen in CC2D1B führt hingegen zu einem eindeutigen Verlust einiger Interaktionen (Abb.2.1.13). CC2D1B^{ADM14} kann nicht mehr mit CHMP4B, CHMP4C und CHMP7 interagieren. Weiterhin interagieren kann CC2D1B^{ADM14} hingegen mit CHMP4A und CHMP5.

Die Interaktion von CC2D1A mit den CHMP Proteinen scheint komplexer zu sein, als die von CC2D1B mit diesen. So können die *in vitro* gezeigten Ergebnisse zur Funktion der DM14 Domänen von CC2D1A (Martinelli et al., 2012, Usami et al., 2012) durch FRET-APB in lebenden Zellen nicht bestätigt werden. Die deutlich komplexere Situation in lebenden Zellen, im Vergleich zu *in vitro*

Experimenten könnte hierfür der Grund sein. Für CC2D1B kann hingegen gezeigt werden, dass die DM14 Domänen zumindest für einen Teil der Interaktionen benötigt werden. Auch zeigen sich nicht nur Unterschiede zwischen CC2D1A und CC2D1B, sondern auch zwischen CHMP4A, CHMP4B und CHMP4C. Die Lokalisation von CC2D1B^{ΔDM14} wird durch koexprimiertes CHMP4B beeinflusst und beide Konstrukte kolokalisieren stark (Abb.2.2.12). Allerdings interagieren sie nicht mehr miteinander (Abb.2.2.13). Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Lokalisation von CC2D1B nicht über die direkte Interaktion mit CHMP4B beeinflusst wird. Zudem zeigen diese Ergebnisse, dass von einer Kolokalisation nicht auf eine Interaktion geschlossen werden kann.

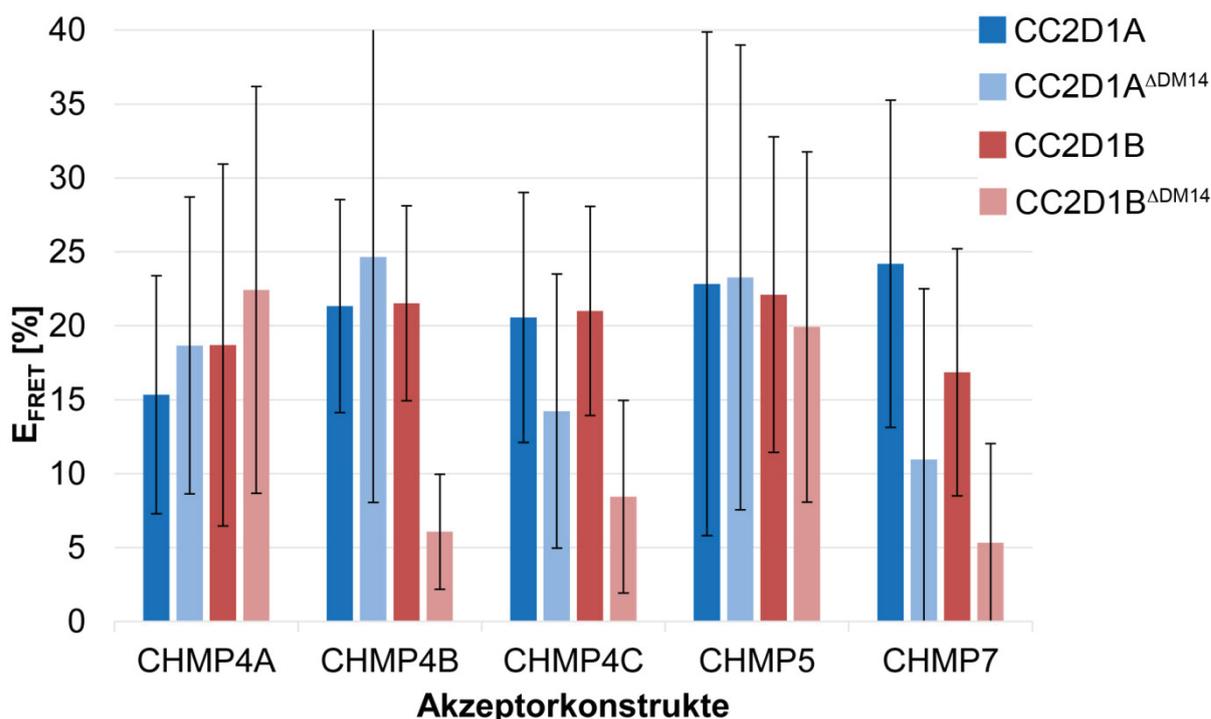


Abb.2.2.13 Auswirkung der Deletion aller DM14 Domänen in CC2D1A und CC2D1B auf die Interaktion mit CHMP Interaktionspartnern. Die Deletion der DM14 Domänen in CC2D1A zeigt keinen eindeutigen Verlust der Interaktion mit einem der fünf Interaktionspartner. Die FRET-Effizienz der Interaktionen mit CHMP4C und CHMP7 sinkt, doch nicht so stark, dass von einem Verlust gesprochen werden kann. Die Deletion der DM14 Domänen in CC2D1B führt hingegen zu einem Verlust der Interaktion mit CHMP4B, CHMP4C und CHMP7. Die Interaktion mit CHMP4A und CHMP5 ist weiterhin möglich.

2.2.7 Die DM14 Domänen in CC2D1B sind auf unterschiedliche Interaktionen spezialisiert.

In vitro Experimente haben gezeigt, dass eine DM14 Domäne von CC2D1A für die Interaktion mit CHMP4B ausreicht (Martinelli et al., 2012; Usami et al., 2012). In *Drosophila* werden zwei DM14 Domänen in Lgd für die vollständige Rettung des *lgd* mutanten Phänotyps benötigt (Troost et al., 2012). Außerdem zeigten *in vitro* Experimente, dass die DM14 Domänen essentiell für die Interaktion mit Shrub sind. Bei einem Verlust der ersten beiden DM14 Domänen ist diese Interaktion immer noch vorhanden, wenn auch deutlich abgeschwächt (Dissertation Sandra Jäckel, 2010) Für die Interaktion

mit CHMP4C gibt es keine Daten, die Interaktion mit CHMP7 ist bisher nicht beschrieben und konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden. Da mittels FRET Messungen von CC2D1B^{ADM14} gezeigt werden konnte, dass die DM14 Domänen für die Interaktion mit CHMP4B, CHMP4C und CHMP7 benötigt werden, sollte nun überprüft werden, ob eine Spezifität besteht. Zudem sollte analysiert werden, ob der Unterschied zwischen den *in vitro* Daten mit Säuger Proteinen und den *in vivo* Ergebnissen aus *Drosophila* auf die Methodik oder den Organismus zurückzuführen ist. Hierzu wurden weitere Deletionskonstrukte generiert, bei welchen jeweils eine unterschiedliche Kombination von DM14 Domänen erhalten blieben (Abb.2.2.1).

Die Ergebnisse zeigen, dass in CC2D1B die dritte und vierte DM14 Domäne für eine Interaktion mit CHMP4B zusammen benötigt werden (s. Abb.2.2.14). Werden ausschließlich diese beiden Domänen deletiert (CC2D1B^{ADM14(3-4)}), führt dies zu einem kompletten Verlust der Interaktion mit CHMP4B. Auch die vierte DM14 Domäne alleine (CC2D1B^{ADM14(1-3)}) reicht, im Gegensatz zu *in vitro* Versuchen, nicht für eine Interaktion aus. Auch eine Kombination einer dieser beiden benötigten DM14 Domänen mit einer der anderen beiden (CC2D1B^{ADM14(2-3)}, ⁻⁽¹⁺³⁾ und ⁻⁽²⁺⁴⁾) führt nicht zu einer Rettung der Interaktion (s. Abb.2.2.14). Im Gegensatz dazu kann CC2D1B nicht mehr mit CHMP4C interagieren, wenn die dritte und vierte DM14 Domäne erhalten bleiben (CC2D1B^{ADM14(1-2)}). Auch ist die Interaktion mit CHMP4C nicht mehr möglich, wenn nur noch die vierte DM14 Domäne vorhanden ist (CC2D1B^{ADM(1-3)}). Nur bei einem Konstrukt kann noch eine, wenn auch abgeschwächte Interaktion nachgewiesen werden. Dies ist der Fall, wenn die erste und die zweite DM14 Domäne vorhanden sind (CC2D1B^{ADM14(3-4)}) (Abb.2.2.14). Eine Kombination der ersten oder zweiten Domäne mit einer der anderen DM14 Domäne (CC2D1B^{ADM14(2-3)}, ⁻⁽¹⁺³⁾ und ⁻⁽²⁺⁴⁾) zeigt ebenfalls keine Interaktion mehr. Dies ist ein Hinweis darauf, dass für die Interaktion von CC2D1B mit CHMP4C die erste und zweite DM14 Domäne benötigt werden. Die Verringerung der FRET Effizienz kann hier unter anderem an einem veränderten Abstand der Chromophore durch eine Veränderung in der Interaktionsstereometrie liegen.

Wieder ein anderes Bild zeigt sich bei der Untersuchung der Interaktionen der CC2D1B Konstrukte mit CHMP7. Sowohl CC2D1B^{ADM14(3-4)} als auch CC2D1B^{ADM14(1-2)} kann noch mit CHMP7 interagieren. Die FRET Effizienz ist allerdings bei beiden Konstrukten im Vergleich zum vollständigen Protein verringert. Die anderen Konstrukte, CC2D1B^{ADM14(2-3)}, ⁻⁽¹⁺³⁾ und ⁻⁽²⁺⁴⁾, können mit CHMP7 eindeutig nicht mehr interagieren. Dies weist darauf hin, dass spezifisch jeweils die im wildtypischen CC2D1B benachbarten Domänen vorhanden sein müssen.

Die Ergebnisse zeigen, dass in lebenden Zellen zwei DM14 Domänen für die Interaktion mit CHMP4B, CHMP4C und CHMP7 benötigt werden. Dies ähnelt den *in vivo* Ergebnissen aus *Drosophila*. Zusätzlich zeigt sich allerdings, dass es Unterschiede in der Spezifität der DM14 Domänen gibt. Während für die Interaktion von CC2D1B mit CHMP4C die erste und zweite DM14 Domäne benötigt werden, braucht es für die Interaktion mit CHMP4B die dritte und vierte. Für die Interaktion mit CHMP7 reichen jeweils die erste und zweite oder dritte und vierte DM14 Domäne aus.

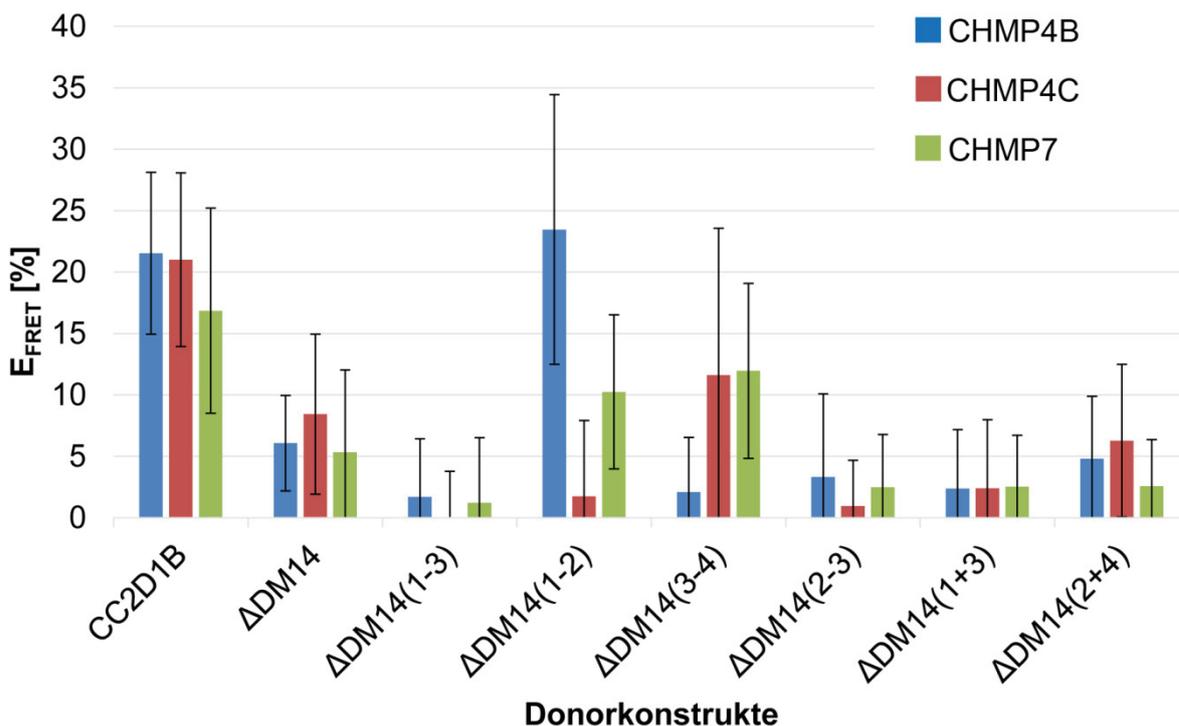


Abb.2.2.14 Auswirkung verschiedener Deletionen von DM14 Domänen in CC2D1B auf die Interaktion mit CHMP4B, CHMP4C und CHMP7

In diesem Diagramm wird die gemessene FRET Effizienz von verschiedenen Kombinationen von CC2D1B DM14-Deletionskonstrukten mit CHMP Proteinen dargestellt. In dem Diagramm ist zu erkennen, dass nur bei Erhalt der dritten und vierten DM14 Domäne die Interaktion mit CHMP4B noch möglich ist. Auch eine Kombination dieser beiden Domänen mit einer der ersten beiden rettet diese Interaktion nicht mehr. Die vierte DM14 Domäne reicht ebenfalls nicht für eine Interaktion aus. Im Gegensatz dazu ist eine Interaktion mit CHMP4C nur noch möglich, wenn die erste und zweite DM14 Domäne vorhanden sind, wobei hier die FRET Effizienz ebenfalls niedriger ausfällt. Für CHMP7 wiederum ist es unerheblich, ob die ersten oder letzten beiden DM14 Domänen erhalten bleiben. Die Messungen zeigen, dass immer wenigstens zwei spezifische DM14 Domänen vorhanden sein müssen, um eine Interaktion mit den CHMP Proteinen in lebenden Zellen zu ermöglichen.

Da durch *in vitro* Untersuchungen gezeigt wurde, dass bei Deletion der ersten beiden DM14 Domänen von Lgd eine Interaktion mit Shrub nur noch sehr eingeschränkt möglich ist (Dissertation Sandra Jäckel), sollte dieses Ergebnis ebenfalls überprüft werden. Außerdem ist bisher nicht bekannt, ob die DM14 Domänen in *Drosophila* auch für die Interaktion mit Chmp5 benötigt werden, die Säugerorthologe interagieren trotz Verlust aller DM14 Domänen noch mit CHMP5. Daher wurden Konstrukte von Lgd generiert, bei welchen alle vier DM14 Domänen, die ersten drei, oder die ersten beiden deletiert wurden.

Die FRET-Messungen zeigen, dass bei einem Verlust von drei oder allen DM14 Domänen keine Interaktion zwischen Lgd und Shrub mehr stattfindet (s. Abb. 2.2.15). Analog zu den *in vitro* Experimenten zeigt sich, dass durch den Verlust der ersten beiden DM14 Domänen diese Interaktion sehr stark abgeschwächt, aber nicht vollständig verhindert. Eine Interaktion mit Chmp5 ist hingegen

schon durch die Deletion dieser ersten beiden Domänen nicht mehr möglich (Abb.2.2.15). Möglicherweise werden für die Interaktion von Lgd mit Chmp5 also genau diese beiden ersten DM14 Domänen oder mindestens drei DM14 Domänen benötigt.

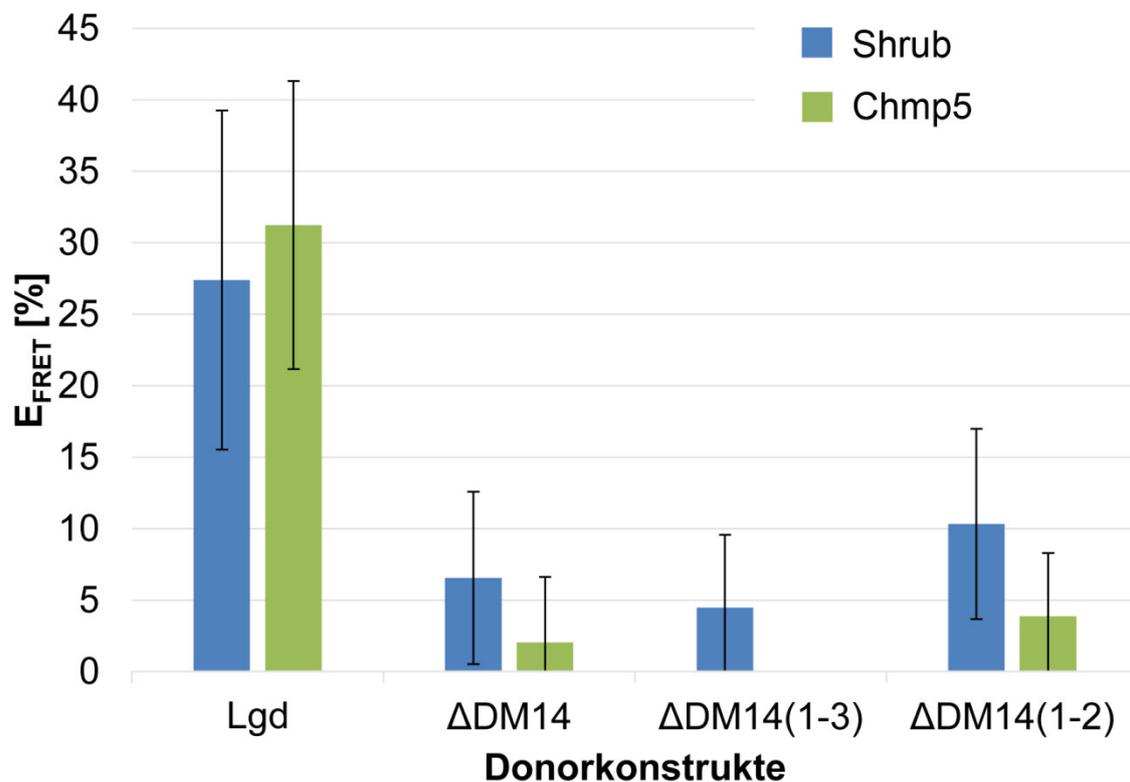


Abb.2.2.15 Auswirkung der Deletion von DM14 Domänen in Lgd auf die Interaktion mit Shrub und Chmp5. Die FRET-APB Untersuchungen zeigen, dass der Verlust der ersten beiden DM14 Domänen in Lgd die Interaktion mit Chmp5 unmöglich macht, sie mit Shrub hingegen nur stark abschwächt. Erst eine Deletion der ersten drei DM14 Domänen führt zu einem vollständigen Verlust der Interaktion mit Shrub.

Ein Vergleich der Aminosäuresequenz der DM14 Domänen zeigt, dass mehrere Aminosäuren in allen Domänen konserviert vorliegen (s. Abb.2.2.16). Ob diese essentiell für die Funktion der DM14 Domänen bei der Interaktion mit verschiedenen CHMP Proteinen sind, sollte daher überprüft werden. Parallel dazu wurden *in vivo* Rettungsexperimente in *Drosophila* durchgeführt (Bachelorarbeit Astrid Wienigk, 2015; Christine Tibbe, unveröffentlicht).

2.2.8 Die Bedeutung konservierter Aminosäuren in der dritten DM14 Domäne von CC2D1B und Lgd für die Interaktion.

Ein Vergleich aller DM14 Domänen von *Drosophila*, Maus und Mensch zeigt mehrere Aminosäuren, welche in allen Orthologen, in allen DM14 Domänen konserviert sind (s. Abb.2.2.16). Zudem gibt es Positionen, an welchen in allen DM14 Domänen aller Orthologe zumindest eine basische Aminosäure zu finden ist. Diese starke Konservierung der Aminosäuren ist ein Hinweis darauf, dass diese

essentiell für die Funktion der DM14 Domänen sind. Für die *in vivo* Untersuchung in *Drosophila* wurde als Ausgangskonstrukt Lgd mit deletierter erster und zweiter DM14 Domäne gewählt. Diese Variante zeigte eine, am wenigsten robuste Rettung des *lgd* Phänotyps und wurde daher als „am sensitivsten“ für Mutationen vermutet. Durch Mutation der Aminosäuren sollte ihre Funktion und eine mögliche Redundanz der Domänen untersucht werden. Da das analoge Konstrukt von CC2D1B mit CHMP4B und CHMP7 interagieren kann, konnten die gleichen Mutationen hier ebenfalls eingeführt werden. Daher wurde als Ausgangskonstrukt CC2D1B^{ΔDM14(1-2)} gewählt. Sollte eine Mutation in der dritten DM14 Domäne diese funktionslos werden lassen, ist daher zu erwarten, dass dadurch die Interaktion mit den beiden CHMP Proteinen ebenfalls gestört wird, wie bei CC2D1B^{ΔDM14(1-3)} beobachtet. Daher diente dieses Konstrukt als Negativkontrolle. Es wurden drei konservierte Aminosäuren für diese Mutationen ausgewählt, welche zu einem Verlust der Rettung des *lgd* Phänotyps in Lgd führen (Christine Tibbe, unveröffentlicht). Dies sind Arginin 416, Lysin 419 und Prolin 440 (Position in der Aminosäure Sequenz von humanem CC2D1B). Das basische Arginin und Lysin wurde hierbei jeweils zur sauren Glutaminsäure, das Prolin zu Alanin mutiert. Die Mutationen wurden durch Veränderung der Basensequenz im Ausgangskonstrukt CC2D1B^{ΔDM14(1-2)} eingeführt. Zusätzlich wurde ein Konstrukt generiert, bei welchem das Arginin und das Lysin zusammen mutiert wurden. Diese Konstrukte werden kurz R416E, K419E, P440A und R416E;K419E genannt.

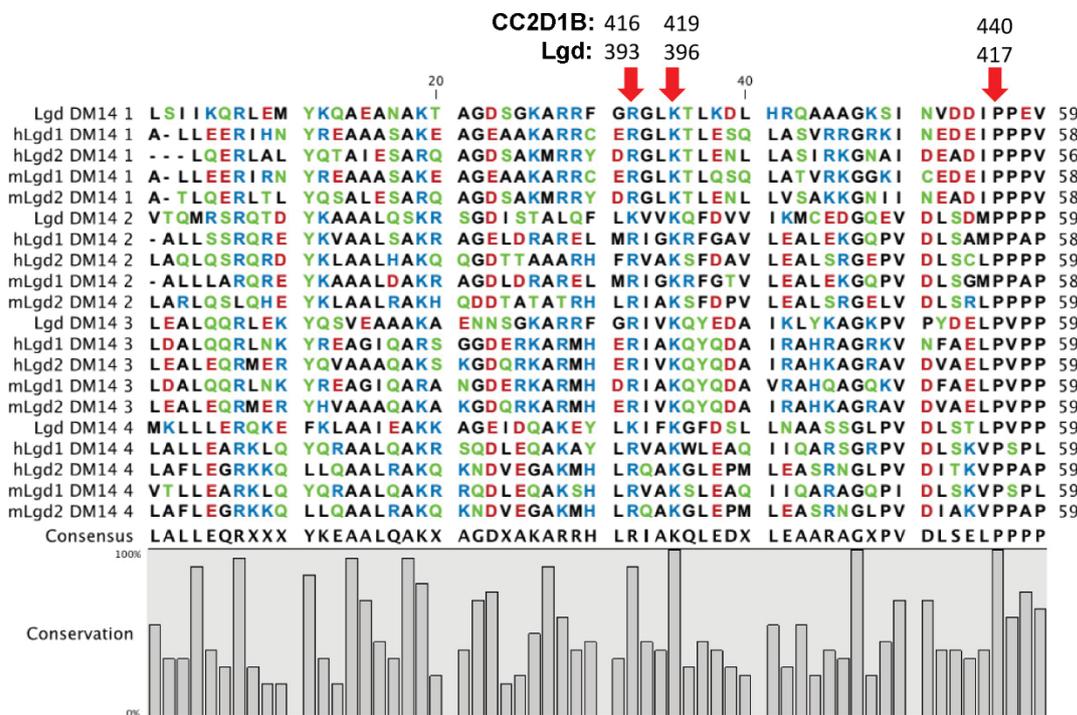


Abb.2.2.16 Vergleich der Aminosäuresequenz der DM14 Domänen von *Drosophila*, Maus und Mensch.

Diese Abbildung zeigt einen Vergleich aller vier DM14 Domänen aus den CC2D1/Lgd Proteinen aus *Drosophila* (Lgd), Maus (mLgd1/CC2D1B; mLgd2/CC2D1A) und Mensch (hLgd1/CC2D1B; hLgd1/CC2D1A). Basische Aminosäuren sind blau markiert, saure rot, polare Aminosäuren grün und unpolare schwarz. Die drei Aminosäuren R416, K419 und P440, welche durch Mutation ausgetauscht wurden, sind durch rote Pfeile markiert (Position der Aminosäuren in humanem CC2D1B).

Die Einzelmutationen R416E und K419E führen jeweils zu einem Verlust der Interaktion mit CHMP4B, die Doppelmutation R416E;K419E jedoch nicht. Die FRET-Effizienz ist wieder so hoch wie bei der Interaktion von CC2D1B^{ADM14(1-2)} oder vollständigem CC2D1B mit CHMP4B (s. Abb.2.2.17). Der Austausch des Prolins durch Alanin führt ebenfalls nicht zu einem Verlust der Interaktion. Die FRET-Effizienz der Interaktion mit CHMP7 ist durch die Deletion der ersten beiden DM14 Domänen in CC2D1B bereits niedriger als beim vollständigen CC2D1B. Die FRET-Effizienz der Interaktion des R416E Konstruktes liegt auf dem gleichen, niedrigen Niveau wie vom CC2D1B^{ADM14} Ausgangskonstrukt. Die FRET Effizienz der Interaktion des K419E und des P440A Konstruktes mit CHMP7 sinken leicht im Vergleich zum Ausgangskonstrukt. Allerdings ist die jeweilige FRET-Effizienz immer noch höher als bei CC2D1B^{ADM14(1-3)}, welches die Negativkontrolle darstellt. Keine der Einzelmutationen führt also zu einem vollständigen Verlust der Interaktion. Im Gegensatz dazu ist die FRET-Effizienz der Interaktion des Doppelmutanten Konstruktes, R416E;K419E deutlich höher als die des Ausgangskonstrukts. Die FRET-Effizienz liegt sogar wieder auf dem Wert der Interaktion des vollständigen CC2D1B mit CHMP7 (Abb.2.2.17). Es kommt also ähnlich wie bei der Interaktion mit CHMP4B durch die Doppelmutation zu einer „Rettung“ der Interaktion.

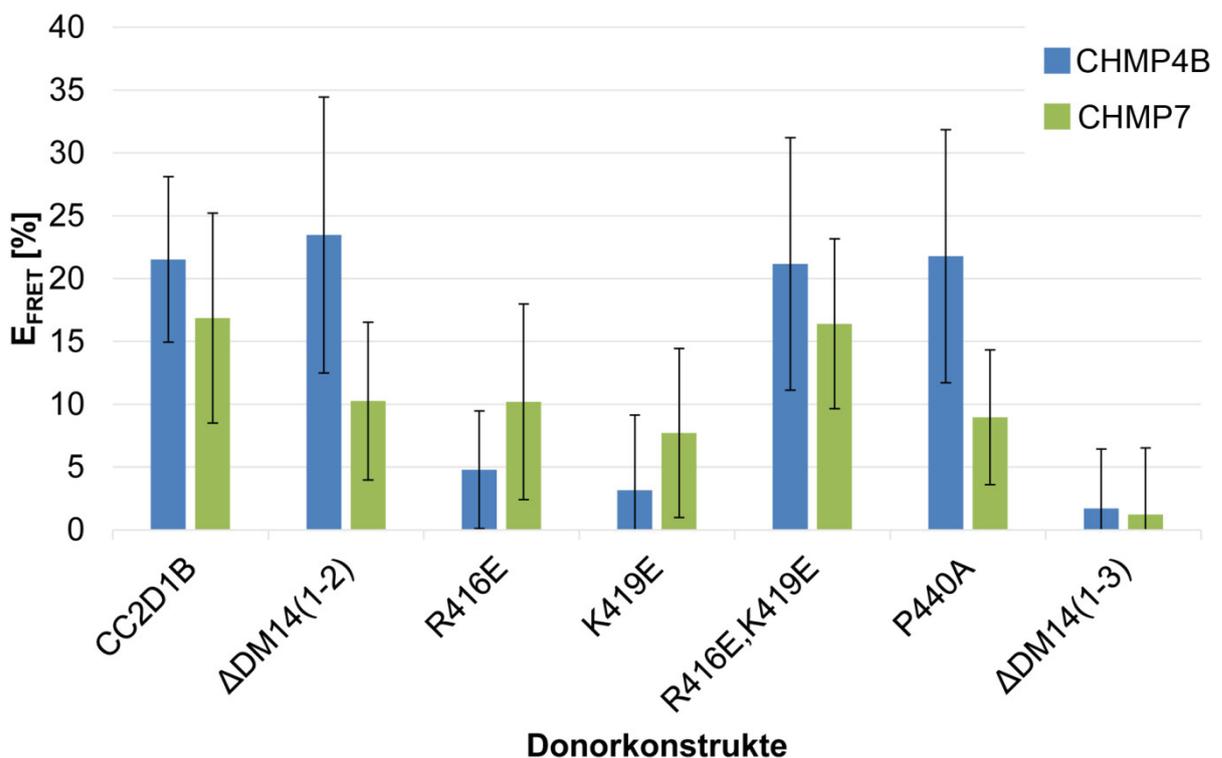


Abb.2.2.17 Auswirkung des Austauschs konservierter Aminosäuren in der dritten DM14 Domäne von CC2D1B^{ADM14(1-2)} auf die Interaktion mit CHMP4B (blau) und CHMP7 (grün). Durch den Austausch von Arginin 416 (R416E) oder Lysin 419 (K419E) durch Glutaminsäure in der dritten DM14 Domäne von CC2D1B^{ADM14(1-2)} kommt es zu einem Verlust der Interaktion mit CHMP4B. Die FRET-Effizienz sinkt auf einen Wert ähnlich der Negativkontrolle CC2D1B^{ADM14(1-3)}. Die Doppelmutation R416E;K419E „rettet“ die Interaktion wieder, die gemessene FRET-Effizienz ist genauso hoch wie die der Interaktion des Kontrollkonstrukts CC2D1B^{ADM14(1-2)} oder vollständigem CC2D1B mit CHMP4B. Der Austausch von Prolin 440 durch Alanin hat

keine Auswirkung auf die Interaktion mit CHMP4B. Die FRET-Effizienz der Interaktion von CC2D1B^{ADM14(1-2)} mit CHMP7 ist deutlich niedriger, als die des vollständigen CC2D1B mit CHMP7. Bei R416E sinkt sie nicht weiter, bei K419E und P440A etwas. Die FRET-Effizienz dieser Interaktionen liegt allerdings immer noch deutlich über der der Interaktion der Negativkontrolle CC2D1B^{ADM14(1-3)} mit CHMP7. Die Doppelmutation R416E;K419E „rettet“ die Interaktion mit CHMP7 dagegen, die FRET-Effizienz liegt auf dem Niveau der Interaktion des vollständigen CC2D1B mit CHMP7.

Während in *Drosophila* Lgd^{ADM14(1-2)} den *lgd* Phänotyp vollständig retten kann, können Lgd^{ADM14(1-2)} Konstrukte mit den analogen Aminosäureaustauschen dies nicht mehr (Bachelorarbeit Astrid Wienigk, 2015; Christine Tibbe, unveröffentlicht). Sie scheinen dort ihre Funktion nicht mehr ausführen zu können. Die Ergebnisse weisen also darauf hin, dass entweder ein Unterschied in der Funktion dieser Aminosäuren zwischen den Orthologen besteht oder dass der Funktionsverlust in *Drosophila* nicht auf eine Störung der Interaktion mit Shrub und Chmp7 zurückzuführen ist. Die Funktion und Interaktion von Chmp7 in *Drosophila* wurde bisher nicht beschrieben. Auch stand kein *Drosophila* RFP-Chmp7 Konstrukt zu Verfügung. Daher sollte nur die Funktion der Aminosäuren bei der Interaktion mit Shrub untersucht werden. Um dies zu überprüfen, wurden die Mutationen auch in EGFP-Lgd^{ADM14(1-2)} eingebracht. Dadurch ergaben sich die Konstrukte mit den Mutationen R393E, K396E, P417A und R393E;K396E (Position in der Aminosäuresequenz von Lgd in *Drosophila melanogaster*). Zudem wurden bei den Rettungsexperimenten festgestellt, dass eine Mutation des Valin 418 zu Threonin (V418T) in Lgd^{ADM14(1-2)} die Rettung des *lgd* Phänotyps verbessert werden kann (Christine Tibbe, unveröffentlicht). Eine Doppelmutation führt zu einer Rettung, welche besser ist als die von P417A, aber schlechter als die von V418T. Daher wurde neben dieser Mutation auch noch die Doppelmutation P417A;V418T getestet. Alle Konstrukte wurden auf ihre Interaktionsfähigkeit mit RFP-Shrub getestet.

Im Gegensatz zu FRET-Effizienz der Interaktion von CC2D1B^{ADM14(1-2)} mit CHMP4B sinkt die FRET-Effizienz der Interaktion von Lgd^{ADM14(1-2)} mit Shrub deutlich, verglichen mit der Interaktion des jeweiligen vollständigen Konstrukts (Abb.2.2.18). Bei der Interaktion von R393E ist die FRET-Effizienz etwas höher, bei K396E etwas niedriger als die von Lgd^{ADM14(1-2)} mit Shrub (Abb.2.2.18). Bei K396E könnte man von einem Verlust der Interaktion sprechen, allerdings liegen die FRET-Effizienzwerte aller Konstrukte sehr nah beieinander, was dies schwierig macht. Bei der Doppelmutation R393E;K396E ist die FRET-Effizienz wiederum deutlich erhöht, höher als bei Lgd^{ADM14(1-2)}, aber immer noch niedriger als bei vollständigem Lgd. Der Effekt der Doppelmutation in Lgd ist vergleichbar mit dem bei CC2D1B (vgl. Abb.2.2.17). Die Mutation P417A führt ebenfalls zu einer leicht höheren FRET-Effizienz der Interaktion mit Shrub, verglichen mit Lgd^{ADM14(1-2)}, ähnlich dem Ergebnis von R393E. Bei dem V418T Konstrukt kommt es, vergleichbar mit dem R393E;K396E Konstrukt zu einem Anstieg der FRET-Effizienz. Gleiches gilt für das P417A;V418T Konstrukt.

Die FRET-Effizienz der Interaktion von Lgd^{ADM14(1-2)} mit Shrub ist sehr niedrig, sodass mögliche Veränderungen schwer zu messen sind. Die Analyse der Mutationen in CC2D1B^{ADM14(1-2)} zeigt allerdings, dass die Methode sensitiv genug ist, um Veränderungen, die durch den Austausch einer

Aminosäure auftreten, zu messen. Da mit Hilfe von FRET-APB allerdings nur eine „ja oder nein“ Aussage über die Interaktionen möglich ist, ist eine weitere qualitative Analyse nicht möglich. Die Mutationen können möglicherweise zu nicht funktionalen Interaktionen führen, wodurch die Rettung des *lgd* Verlusts nicht möglich ist. Allerdings ist es auch möglich, dass andere Interaktionen als die mit Shrub gestört werden, was die Rettungsfähigkeit der Konstrukte einschränkt.

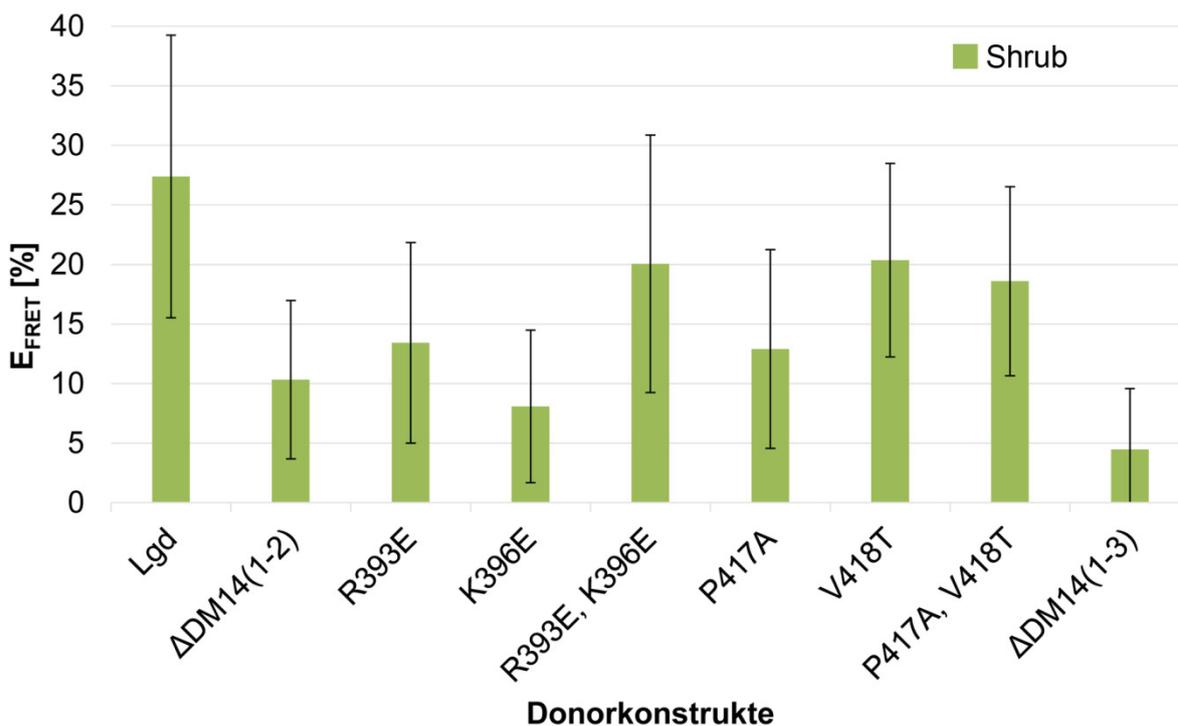


Abb.2.2.17 Auswirkung des Austauschs konservierter Aminosäuren in der dritten DM14 Domäne von $\text{Lgd}^{\text{ADM14}(1-2)}$ auf die Interaktion mit Shrub. Diese Grafik zeigt die ermittelten Werte der FRET-Effizienz für die Interaktion der verschiedenen, mutierten $\text{Lgd}^{\text{ADM14}(1-2)}$ Konstrukte mit RFP-Shrub. Es zeigt sich, dass bei keinem der Konstrukte die FRET-Effizienz auf den Wert der Negativkontrolle $\text{Lgd}^{\text{ADM14}(1-3)}$ sinkt. Bei R393E, K396E und P417A sind nur leichte Unterschiede zum Kontrollkonstrukt $\text{Lgd}^{\text{ADM14}(1-2)}$ zu erkennen. Die FRET-Effizienz der Interaktionen der Konstrukte mit den Doppelmutationen R393E,K396E und P417A,V418T, sowie der Einzelmutation V418T liegen sogar höher. Die jeweilige FRET-Effizienz liegt zwischen dem Wert des vollständigen Lgd und des Kontrollkonstrukts.

2.2.9 Der N-Terminus vor der ersten DM14 Domäne beeinflusst die Lokalisation der CC2D1 Proteine und ihrer Interaktion mit CHMP4B.

Bisherige Analysen zur Funktion der Domänen der CC2D1 Proteine beschränkten sich auf die DM14 Domänen und ihre Funktion bei der Interaktion mit CHMP4B. In *Drosophila* wurde zudem auch die Funktion der C2 Domäne untersucht. Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der N-Termini von humanen und murinen CC2D1 Proteinen und dem *Drosophila* Ortholog Lgd zeigt zwei basische und zwei saure Sequenzbereiche, welche zum Teil über alle Organismen konserviert sind (Abb.2.2.18). Der N-Terminus von CC2D1B ist zudem ~30 Aminosäuren länger als der von CC2D1A und Lgd. Um eine potentielle Funktion der N-Termini zu analysieren, wurden die Deletionskonstrukte CC2D1A^{ΔN139} und CC2D1B^{ΔN167} generiert, bei denen jeweils der N-Terminus vor der ersten DM14 Domäne deletiert wurde (s. Abb.2.2.1).

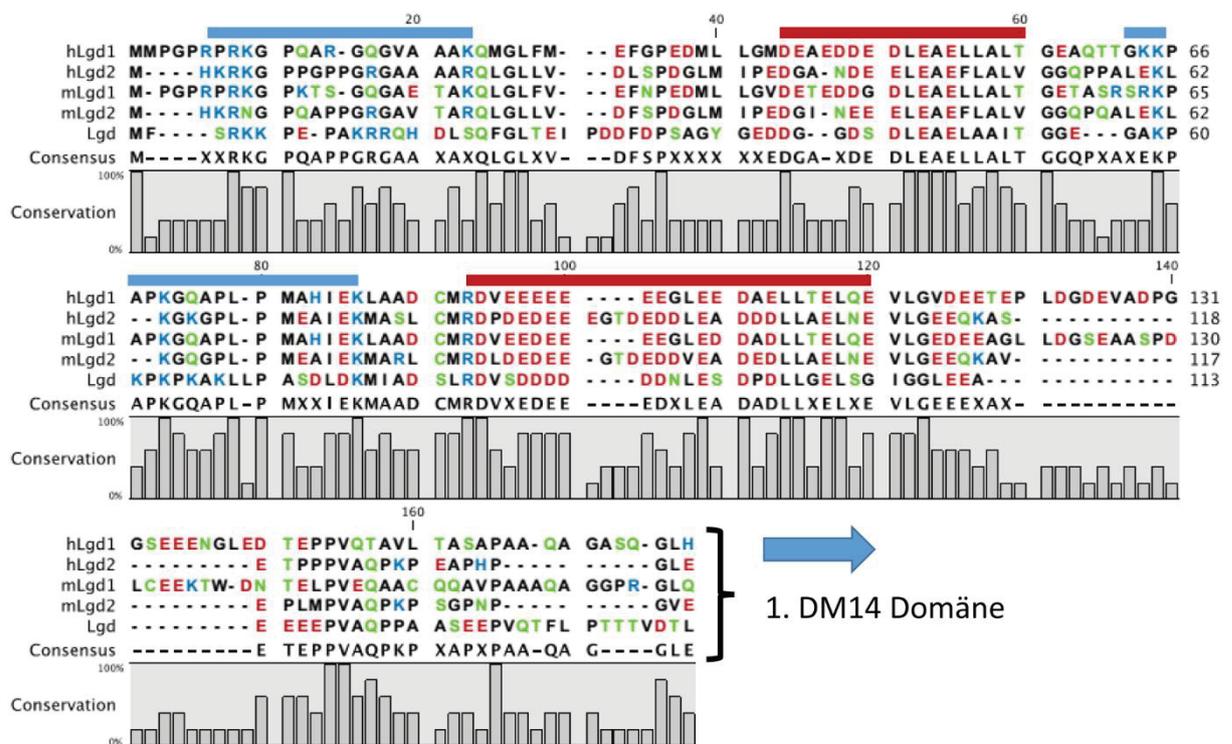


Abb.2.2.18 Vergleich der Aminosäuresequenz der N-terminalen Bereiche vor der ersten DM14 Domäne von humanem und murinem CC2D1A und CC2D1B und *Drosophila* Lgd. Der Vergleich der Aminosäuresequenz der N-Termini von humanem CC2D1A (hLGD2) und CC2D1B (hLGD1), murinem CC2D1A (mLGD2) und CC2D1B (mLGD1) und *Drosophila* Lgd zeigt mehrere geladene Bereiche, welche konserviert sind. Vor allem saure Aminosäuren (rot) treten in zwei Bereichen (rote Balken) verstärkt auf und sind zum Teil über alle Organismen konserviert. Neben diesen sauren Bereichen gibt es auch zwei basische (blaue Balken), in welchen basische Aminosäuren (blau) konserviert sind. Vereinzelt sind auch unpolare Aminosäuren (schwarz) konserviert, dabei vor allem Proline (P). Polare Aminosäuren (grün) sind kaum konserviert.

Die Expression von EGFP-CC2D1A^{ΔN139} in *Cc2d1a^{-/-};Cc2d1b^{-/-}* MEF-Zellen zeigt eine diffuse Verteilung im gesamten Zytoplasma der Zelle und im Zellkern (Abb.2.2.19 A und A¹, Pfeile). Es ist das einzige Deletionskonstrukt von CC2D1A, welches eine Lokalisation im Zellkern aufweist. Die Verteilung von endogenem CHMP4B und LAMP1 ist nicht verändert (Abb.2.2.19 A² und A³). Aufgrund der diffusen Verteilung im gesamten Zytoplasma von CC2D1A^{ΔN139} kann keine eindeutige Kolokalisation mit diesen Markern festgestellt werden (Abb.2.2.19 A-A³). Die Koexpression von CC2D1A^{ΔN139} mit CHMP4B zeigt eine starke Kolokalisation beider Konstrukte (Abb.2.2.19 B, B¹ und B²). Diese Kolokalisation ist besonders an vesikulären Strukturen zu erkennen, welche teilweise LAMP1 positiv sind (Abb.2.2.19, B-B³, Pfeilspitzen und Abb.2.2.19, B-B³, Pfeile). Die Lokalisation von CC2D1A^{ΔN139} im Zellkern ist nur noch schwach zu erkennen, dies liegt an der starken Fluoreszenzintensität in den Bereichen der Kolokalisation mit CHMP4B. Die Lokalisation CC2D1A^{ΔN139} unterscheidet sich von vollständigem CC2D1A nur durch seine zusätzliche Lokalisation im Zellkern. Dieser beobachtete Defekt in der Lokalisation von CC2D1A^{ΔN139} verhindert allerdings nicht, dass CHMP4B seine Lokalisation beeinflussen kann, allerdings ist die Kolokalisation mit LAMP1 abgeschwächt. Ein Unterschied in der Morphologie der Endolysosomen ist nicht zu erkennen.

Exprimiertes EGFP-CC2D1B^{ΔN167} ist diffus im Zytoplasma und schwach im Zellkern lokalisiert (Abb.2.2.19 C¹). Zudem lokalisiert es an LAMP1 positiven Endolysosomen (Abb.2.2.19 A, A¹ und A³, Pfeile). Die Verteilung von endogenem CHMP4B ist nicht verändert und es ist keine Kolokalisation mit CC2D1B^{ΔN167} zu erkennen (Abb.2.2.19 C und C²). Die Koexpression von CC2D1B^{ΔN167} und CHMP4B zeigt eine starke Kolokalisation beider Proteine (Abb.2.2.19 D-D², Pfeile). Diese Kolokalisation tritt vor allem an LAMP1 positiven Endolysosomen auf (Abb.2.2.19 D-D³, Pfeile). Insgesamt ist kein Unterschied in der Lokalisation von CC2D1B^{ΔN167} im Vergleich zum vollständigen CC2D1B zu beobachten. Auch die Morphologie der Endolysosomen ist nicht erkennbar verändert. Da vollständiges CC2D1B im Gegensatz zu CC2D1A bereits im Zellkern lokalisiert, kann hier bei CC2D1B^{ΔN167} nicht festgestellt werden, ob ein ähnlicher Lokalisationsdefekt wie bei CC2D1A^{ΔN139} auftritt.

Die veränderte Lokalisation von CC2D1A^{ΔN139} gibt erstmals einen Hinweis darauf, dass die N-Termini eine bisher nicht beschriebene Funktion bei der korrekten Lokalisation erfüllen. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden Rettungsexperimente mit einem analogen Lgd^{ΔN135} Konstrukt in *Drosophila* durchgeführt. Hier zeigt sich, dass der *lgd* Phänotyp vollständig gerettet werden kann (Bachelorarbeit Astrid Wienigk, 2015; Bachelorarbeit Linda Oesterwind, 2014). Dies weist darauf hin, dass der N-Terminus der CC2D1 Proteine in Säugern eine zusätzliche Funktion besitzt, welche er bei Lgd in *Drosophila* noch nicht besitzt. Ob diese Funktion einen Einfluss auf die Interaktionen mit den CHMP Proteinen hat, wurde in FRET-APB Experimenten untersucht.

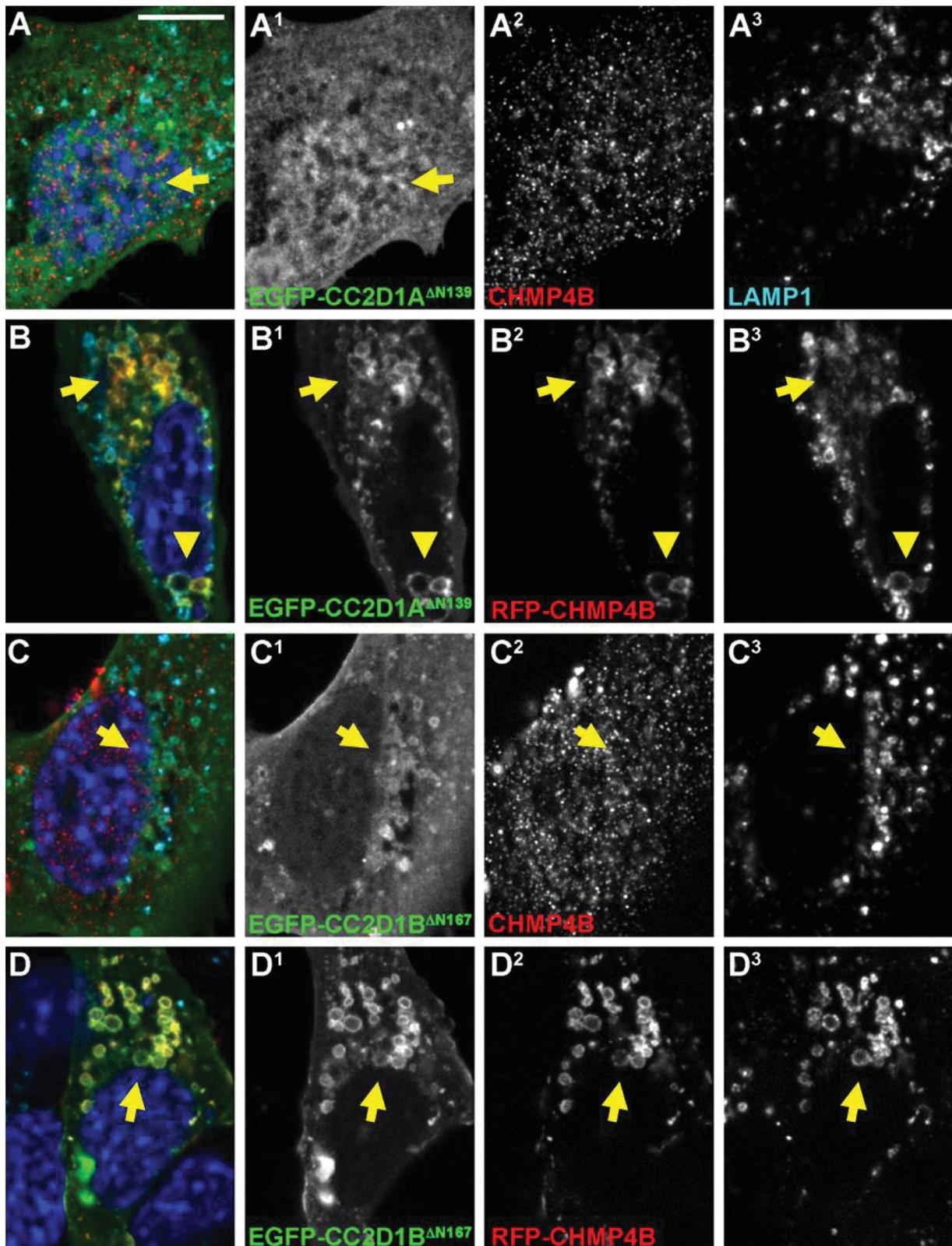


Abb.2.2.19 Expression von EGFP-CC2D1A^{ΔN139} und EGFP-CC2D1B^{ΔN167} alleine, und Koexpression beider Konstrukte mit RFP-CHMP4B in *Cc2d1a*^{-/-};*Cc2d1b*^{-/-} MEF-Zellen.

Exprimiertes CC2D1A^{ΔN139} ist diffus im Zytoplasma und im Zellkern verteilt (A und A¹, Pfeil). Die Verteilung von endogenem CHMP4B (A²) und LAMP1 (A³) sind nicht verändert und es ist keine Kolokalisation mit CC2D1A^{ΔN139} erkennbar (A). Die Koexpression von CC2D1A^{ΔN139} (B¹) mit CHMP4B (B²) führt zu einer starken Kolokalisation beider Konstrukte (B). Diese Bereiche der Kolokalisation sind zum Teil LAMP1 positiv (B-B³, Pfeilspitzen) und zum Teil nicht (B-B³, Pfeile). Exprimiertes CC2D1B^{ΔN167} ist diffus im Zytoplasma und

schwächer im Zellkern zu erkennen (C^1). Außerdem ist eine verstärkte Lokalisation an vesikulären Strukturen erkennbar (C^1 , Pfeil). Diese Strukturen sind LAMP1 positiv (C und C^3 , Pfeile). Endogenes CHMP4B (C^2) zeigt keine veränderte Verteilung und kolokalisiert nicht mit $CC2D1B^{\Delta N167}$ ($C-C^2$, Pfeile). Die Koexpression von $CC2D1B^{\Delta N167}$ (D^1) mit CHMP4B (D^2) zeigt eine starke Kolokalisation beider Konstrukte ($D-D^2$, Pfeile) an LAMP1 positiven Endolysosomen ($D-D^3$, Pfeile). Der Maßstabsbalken entspricht $10\ \mu\text{m}$.

Um neben der Funktion des N-Terminus bei der Lokalisation der CC2D1 Proteine auch die Funktion bei der Interaktion zu analysieren, wurden FRET-APB Experimente durchgeführt. Der Verlust des N-Terminus führt bei CC2D1A zu einer Störung der Interaktion mit CHMP4B (Abb.2.2.20). Während $CC2D1A^{\Delta N139}$ noch mit CHMP4A, CHMP4C, CHMP5 und CHMP7 interagieren kann, ist eine Interaktion mit CHMP4B nicht mehr möglich. Den gleichen Effekt hat der Verlust des N-Terminus bei CC2D1B (Abb.2.2.20). Genau wie $CC2D1A^{\Delta N139}$ kann $CC2D1B^{\Delta N167}$ immer noch mit CHMP4A, CHMP4C, CHMP5 und CHMP7 interagieren, aber nicht mehr mit CHMP4B. Obwohl $CC2D1A^{\Delta N139}$ und $CC2D1B^{\Delta N167}$ also noch stark mit CHMP4B in Koexpression kolokalisieren, können sie mit diesem nicht mehr interagieren. Neben der generellen Störung in der Lokalisation von $CC2D1A^{\Delta N139}$ (Abb.2.2.19) weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass der N-Terminus eine spezifische Funktion für die Interaktion beider CC2D1 Proteine mit CHMP4B hat. *In vitro* können auch Deletionskonstrukte von CC2D1A, welchen der N-Terminus fehlt und nur die DM14 Domänen erhalten sind mit CHMP4B interagieren (Martinelli et al., 2012; Usami et al., 2012). Der N-Terminus scheint also nicht für die direkte Interaktion an sich benötigt zu werden.

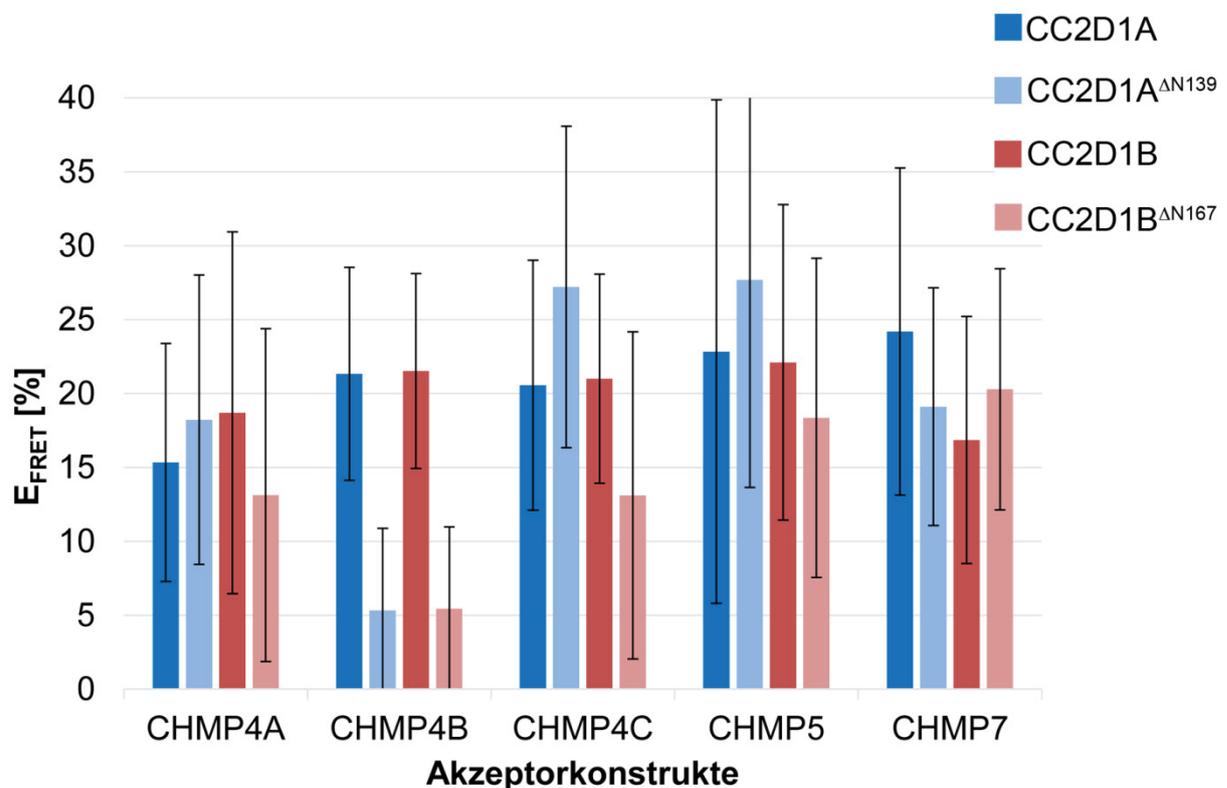


Abb.2.2.20 Auswirkung der Deletion des N-Terminus vor der ersten DM14 Domäne in CC2D1A und CC2D1B auf die Interaktion mit CHMP Interaktionspartnern. Die Deletion des N-Terminus vor der ersten

DM Domäne führt bei beiden CC2D1 Proteinen zu einem Verlust der Interaktion mit CHMP4B. Die Interaktionen mit CHMP4A, CHMP4C, CHMP5 und CHMP7 sind dagegen nicht beeinflusst.

2.2.10 Der verlängerte C-Terminus von CC2D1A hat eine Funktion, welche die Interaktion mit CHMP4 und CHMP7 beeinflusst.

CC2D1A hat im Vergleich zu CC2D1B und dem Drosophila Ortholog Lgd einen verlängerten C-Terminus nach der C2 Domäne. Der Vergleich der Aminosäuresequenzen mit Hilfe des Needleman-Wunsch Algorithmus (Abb.2.2.21; Dissertation Katharina Schulz, 2015; Jaekel und Klein, 2006 (Jones-Talor-Thornton Matrix)) zeigt eine höhere Ähnlichkeit zwischen CC2D1B und Lgd (Ähnlichkeit 54 %; Identität 35 %) als zwischen CC2D1A und Lgd (Ähnlichkeit 45 %; Identität 30 %). Der Vergleich von CC2D1A mit CC2D1B zeigt eine Ähnlichkeit von 55 % und eine Identität von 41 %. Vergleicht man CC2D1A mit deletiertem, verlängertem C-Terminus ($\Delta C815$) mit CC2D1B und Lgd zeigt sich eine deutlich höhere Ähnlichkeit. $CC2D1A^{\Delta C815}$ und CC2D1B haben eine Ähnlichkeit von 62 % und eine Identität von 47 %. $CC2D1A^{\Delta C815}$ und Lgd sind sich zu 52 % ähnlich und zu 34 % identisch. Die bisher beschriebene größere Ähnlichkeit von CC2D1B und Lgd im Vergleich zu CC2D1A und Lgd liegt also fast vollständig an dem verlängerten C-Terminus von CC2D1A (Abb.2.2.21 und Anhang Tab.8.2). Eine mögliche Funktion dieses Bereichs ist bisher nicht bekannt. Rettungsexperimente in Drosophila zeigen jedoch, dass eine Deletion des C-Terminus die Rettung des *lgd* Phänotyps im Vergleich zum wildtypischen CC2D1A verbessert. Zudem konnte bisher keine Veränderung in der Lokalisation festgestellt werden (Dissertation Katharina Schulz, 2015).

	Identität (%)		Ähnlichkeit (%)	
	CC2D1B	Lgd	CC2D1B	Lgd
 CC2D1A	41	30	55	45
 $CC2D1A^{\Delta C815}$	47	34	62	52
 CC2D1B		35		54

Abb.2.2.21 Sequenzvergleich von CC2D1A und $CC2D1A^{\Delta C815}$ mit CC2D1B und Lgd.

Der Sequenzvergleich zeigt, dass durch Deletion des verlängerten C-Terminus die Ähnlichkeit zwischen CC2D1A und CC2D1B bzw. Lgd steigt. CC2D1A hat ist zu 41 % identisch mit CC2D1B und hat eine Ähnlichkeit von 55 %. $CC2D1A^{\Delta C815}$ ist zu 47 % identisch mit CC2D1B und die Ähnlichkeit beträgt 62 %. Ebenso steigen Identität und Ähnlichkeit von CC2D1A zu Lgd durch Deletion des C-Terminus von 30 %, respektive 45 % auf 34 % respektive 52 %. Damit gleicht $CC2D1A^{\Delta C815}$ Lgd fast genauso, wie CC2D1B Lgd mit 35 % Identität und 54 % Ähnlichkeit gleicht.

Im Menschen wurde eine Mutation von CC2D1A beschrieben, welche zu einem verkürzten Protein führt. Bei diesem *CC2D1A^{MR}* (Mental Retardation) genannten Allel tritt eine Verschiebung des Leserasters auf, wodurch bei der Proteinexpression auf die dritte DM14 Domäne ein kurzes „nonsense“ Peptid und dann ein Stopp Codon folgt. Untersuchungen in *Drosophila* zeigten, dass *CC2D1A^{MR}* nicht in der Lage ist, den *lgd* Phänotyp zu retten. In HeLa Zellen ist das exprimierte Protein zytoplasmatisch verteilt und zeigt keine Kolokalisation mit endosomalen Markern. Allerdings treten vergrößerte LAMP1 positive Endolysosomen auf (Dissertation Katharina Schulz, 2015). Um die Funktion des verlängerten C-Terminus von CC2D1A und die *CC2D1A^{MR}* Variante weitergehend zu charakterisieren, wurden EGFP Fusionskonstrukte in *Cc2d1a^{-/-};Cc2d1b^{-/-}* Zellen exprimiert. So sollte die Lokalisation und der Einfluss auf endosomale Marker überprüft werden. Außerdem wurde mit FRET-APB Experimenten überprüft, ob die Interaktionen mit den CHMP Proteinen durch die Deletionen beeinflusst werden.

CC2D1A^{ΔC815} zeigt eine zytoplasmatische Verteilung in den *Cc2d1a^{-/-};Cc2d1b^{-/-}* Zellen (Abb.2.2.22 A¹). Es ist keine Lokalisation im Zellkern erkennbar. Die Verteilung von endogenem CHMP4B ist nicht verändert (Abb.2.2.22 A²) und auch LAMP1 zeigt keine Veränderung in seiner Verteilung (Abb.2.2.22 A³). Es ist keine eindeutige Kolokalisation von *CC2D1A^{ΔC815}* mit endogenem CHMP4B oder LAMP1 zu beobachten (Abb.2.2.22 A-A³). Wie im Fall von vollständigem CC2D1A, führt die Koexpression von *CC2D1A^{ΔC815}* (Abb.2.2.22 B¹) mit RFP-CHMP4B (Abb.2.2.22 B²) zu einer starken Kolokalisation beider Konstrukte (Abb.2.2.22 B-B², Pfeile). Diese Kolokalisation ist hauptsächlich in LAMP1 positiven Bereichen zu erkennen (Abb.2.2.22 B und B³, Pfeile). Die Expression von CHMP4B führt also zu einer Lokalisation von *CC2D1A^{ΔC815}* an endolysosomale Kompartimente, wie auch beim vollständigen CC2D1A.

CC2D1A^{MR} zeigt eine diffuse, zytoplasmatische Verteilung und keine Lokalisation im Zellkern (Abb.2.2.22 C¹). Zudem sind große vesikuläre Strukturen zu erkennen, in welchen *CC2D1A^{MR}* zum Teil lokalisiert (Abb.2.2.22 C¹, Pfeil und Pfeilspitze). Die Verteilung von endogenem CHMP4B ist nicht verändert, es lokalisiert auch nicht an oder in den großen Vesikulären Strukturen (Abb.2.2.22 C², Pfeil und Pfeilspitze). Die vesikulären Strukturen sind teilweise LAMP1 positiv (Abb.2.2.22 C³, Pfeil und Abb.2.2.22 C³, Pfeilspitze). Die Koexpression von *CC2D1A^{MR}* und CHMP4B zeigt keine eindeutige Kolokalisation beider Konstrukte. *CC2D1A^{MR}* ist weiterhin diffus, zytoplasmatisch verteilt (Abb.2.2.22 D¹), vergleichbar zu seiner alleinigen Expression ohne CHMP4B (Abb.2.2.22 C¹). CHMP4B akkumuliert in LAMP1 positiven Bereichen der Zelle (Abb.2.2.22 D, D² und D³, Pfeile und Pfeilspitzen). Durch die diffuse Verteilung von *CC2D1A^{MR}* im gesamten Zytoplasma ist es auch in CHMP4B und LAMP1 positiven Akkumulationen erkennbar (Abb.2.2.22 D-D³, Pfeilspitzen). Allerdings ist es dort nicht stärker lokalisiert als im sonstigen Zytoplasma. Im Gegensatz zum vollständigen CC2D1A und den anderen Deletionskonstrukten wird *CC2D1A^{MR}* nicht mehr in seiner Lokalisation von koexprimiertem CHMP4B beeinflusst. *CC2D1A^{MR}* akkumuliert im Gegensatz zu

CC2D1A^{ΔC2} auch nicht in großflächigen Bereichen. Dies sind Hinweise darauf, dass der verlängerte C-Terminus, die C2 Domäne und möglicherweise auch die vierte DM14 Domäne sowie der Bereich zwischen dieser und der C2 Domäne zusammen für die Rekrutierung von CC2D1A durch CHMP4B benötigt werden und gemeinsam die Lokalisation von CC2D1A beeinflussen oder regulieren.

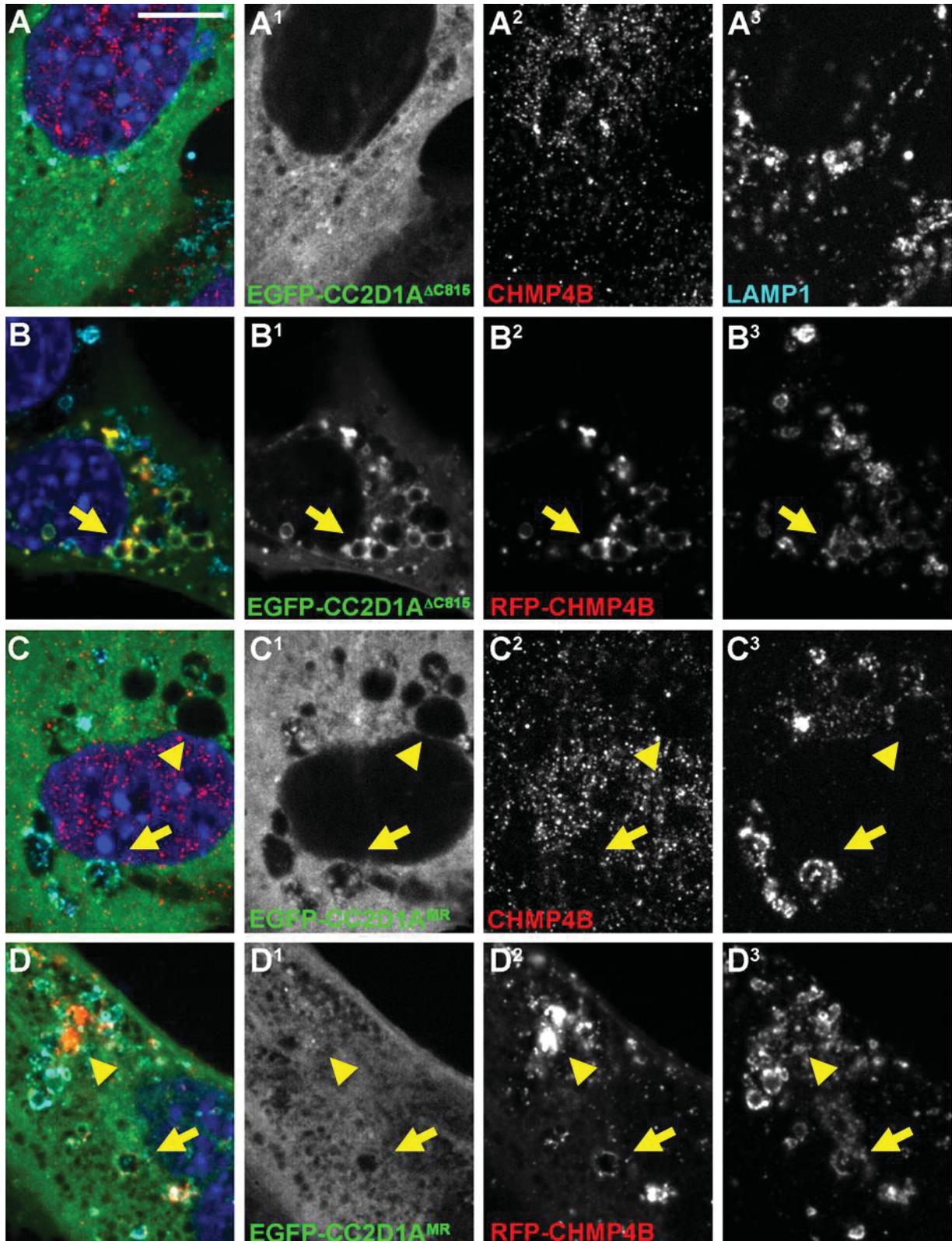


Abb.2.2.22 Expression von EGFP-CC2D1A^{ΔC815} und EGFP-CC2D1A^{MR} alleine, und Koexpression beider Konstrukte mit RFP-CHMP4B in *Cc2d1a*^{-/-};*Cc2d1b*^{-/-} MEF-Zellen. Exprimiertes CC2D1A^{ΔC815} ist diffus zytoplasmatisch in der Zelle verteilt und zeigt keine Lokalisation im Zellkern (A¹). Die Lokalisation von endogenem CHMP4B (A²) und LAMP1 (A³) ist nicht verändert. Es ist keine eindeutige Kolo­kalisierung von CC2D1A^{ΔC815} mit einem der beiden Proteine zu erkennen (A). Die Koexpression von CC2D1A^{ΔC815} (B¹) und CHMP4B (B²) führt zu einer starken Kolo­kalisierung beider Proteine (B-B², Pfeile) in und an LAMP1 positiven Endolysosomen (B, B³, Pfeile). Exprimiertes CC2D1A^{MR} ist ebenfalls diffus im gesamten Zytoplasma verteilt (C). Zum Teil lokalisiert es außerdem in großen vesikulären Strukturen (C¹, Pfeil). Diese vesikulären Strukturen sind zum Teil stark LAMP1 positiv (C³, Pfeil), zum Teil schwach oder gar nicht (C³, Pfeilspitze). Endogenes CHMP4B zeigt keine Veränderung seiner Lokalisation (C²) und keine Assoziation mit den großen vesikulären Strukturen (C², Pfeil und Pfeilspitze). Die Koexpression von CC2D1A^{MR} (D¹) und CHMP4B (D²) zeigt keine eindeutige Kolo­kalisierung. CHMP4B akkumuliert in LAMP1 positiven Bereichen der Zelle, in welchen auch CC2D1A^{MR} erkennbar ist (D-D³, Pfeilspitzen), doch lokalisiert CC2D1A^{MR} dort nicht stärker als im sonstigen Zytoplasma der Zelle. Auch an großen LAMP1 positiven Endolysosomen (D³, Pfeilspitze), an welchen CHMP4B lokalisiert (D², Pfeil), ist keine verstärkte Lokalisation von CC2D1A^{MR} zu erkennen (D und D¹, Pfeil). Der Maßstabsbalken entspricht 10 μm.

Um zu analysieren, ob der Verlust des verlängerten C-Terminus zu einem Verlust der Interaktion mit den bekannten und neu entdeckten Interaktionspartnern hat, wurden wie bei den anderen Konstrukten FRET-APB Messungen durchgeführt. Obwohl das Konstrukt mit CHMP4B kolo­kalisiert (Abb.2.2.22 B-B³), zeigt sich in den FRET-Analysen ein negativer Einfluss des Verlusts des verlängerten C-Terminus auf die Interaktionsfähigkeit (Abb.2.2.23). Die Deletion des verlängerten C-Terminus von CC2D1A führt zu einem Verlust der Interaktion mit CHMP4A, CHMP4B CHMP4C und CHMP7. Die Interaktion mit CHMP5 wird dagegen nicht beeinflusst.

Ein gegenteiliges Ergebnis zeigen die FRET-APB Messungen von CC2D1A^{MR} (Abb.2.2.23). Die FRET-Effizienz der Interaktion von CC2D1A^{MR} mit allen drei CHMP4 Proteinen steigt im Vergleich zur FRET-Effizienz der Interaktion von vollständigem CC2D1A mit diesen stark an. Die Interaktion wird also nicht wie bei CC2D1A^{ΔC815} verhindert. Dieser Anstieg der FRET-Effizienz könnte auf eine starke Annäherung der Chromophore durch eine veränderte Interaktionsstereometrie oder durch eine erhöhte Anzahl an Interaktionen zurückzuführen sein. CC2D1A^{MR} kann ebenfalls mit CHMP7 wieder interagieren, was CC2D1A^{ΔC815} nicht mehr konnte. Die FRET-Effizienz erreicht nicht ganz den Wert der Interaktion des vollständigen CC2D1A mit CHMP7, was ebenfalls an einer veränderten Stereometrie der Interaktion liegen kann. Mit CHMP5 kann CC2D1A^{MR} genau wie CC2D1A^{ΔC2} und CC2D1A^{ΔC815} interagieren.

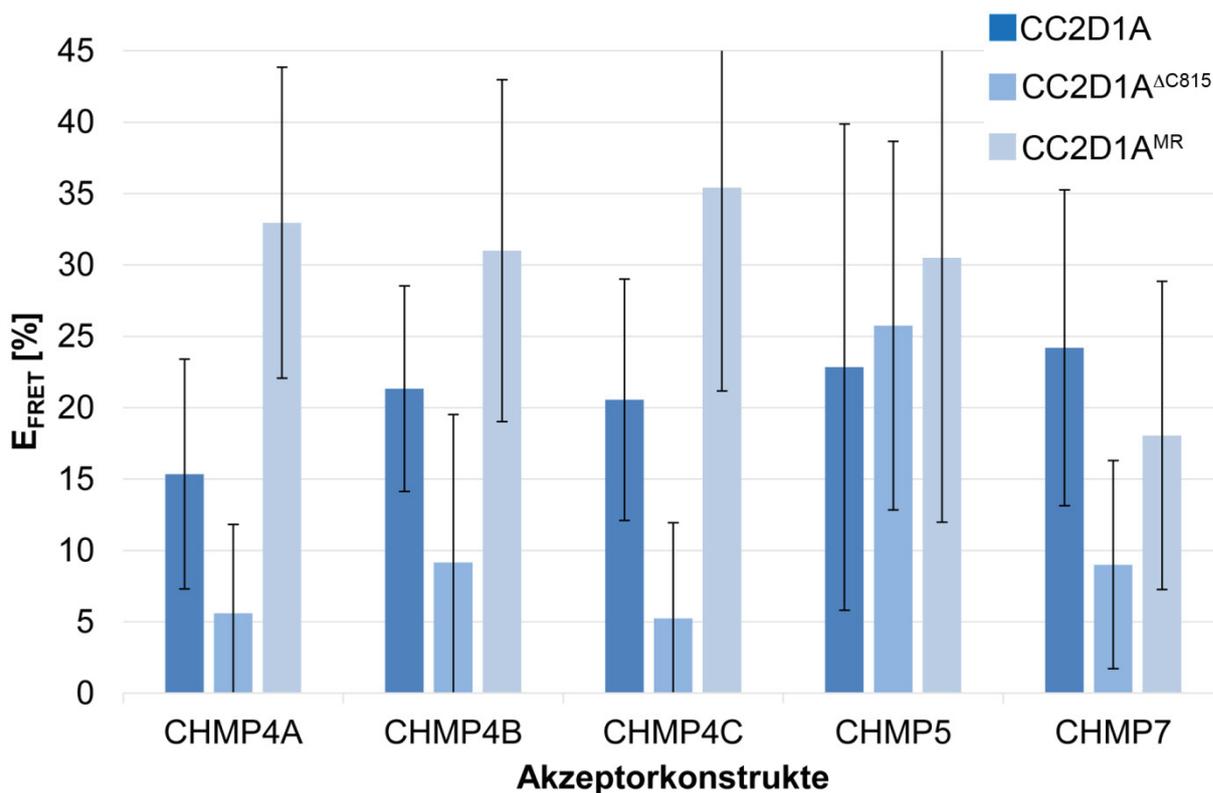


Abb.2.2.23 Auswirkung der Deletion des verlängerten C-Terminus von CC2D1A und der MR Mutation in CC2D1A auf die Interaktion mit CHMP Interaktionspartnern. Die Deletion des verlängerten C-Terminus in CC2D1A (CC2D1A^{ΔC815}) führt zu einem Verlust der Interaktion mit CHMP4A, CHMP4B, CHMP4C und CHMP7. Lediglich die Interaktion mit CHMP5 ist weiterhin möglich. CC2D1A^{MR} kann dagegen mit allen fünf CHMP Proteinen interagieren. Die FRET-Effizienz der Interaktion mit CHMP4A, CHMP4B und CHMP4C steigt sogar deutlich über die der Interaktion des vollständigen CC2D1A mit den CHMP4 Proteinen.

2.2.11 Die Interaktion der CC2D1 Proteine mit CHMP4A, CHMP4B und CHMP4C unterscheidet sich in ihrer Mechanik.

Durch Mutation von Aminosäuren in Helix 2 von CHMP4B wurde gezeigt, dass die Glutaminsäuren E90, E94 und E97 für die Bindung mit der dritten DM14 Domäne von CC2D1A benötigt werden (Martinelli et al., 2012). Eine Umkehrung der Ladung aller drei Glutaminsäuren durch ihren Austausch in Lysine führt zu diesem Verlust der Interaktion in *in vitro* Experimenten. Diese Mutation wurde mut2 genannt (s. Anhang Abb.8.4). Um zu überprüfen, ob dieser Aminosäureaustausch auch in lebenden Zellen zu einem Verlust der Interaktion führt, wurde diese Mutation in RFP-CHMP4B eingebracht. Außerdem wurden zusätzlich CHMP4A und CHMP4C mutiert, da nicht bekannt ist, ob diese Aminosäuren auch dort eine Relevanz für die Interaktion haben und sie in diesen beiden Proteinen konserviert sind (s. Anhang Abb.8.4). Zudem wurden die *in vitro* Experimente nur mit kleinen Fragmenten durchgeführt. So wurde von CC2D1A nur ein Fragment benutzt, welches die dritte DM14 Domäne und einen Teil der Verbindung zur vierten DM14 Domäne beinhaltet (AS 346-455; vollständiges CC2D1A 951 AS). Von CHMP4B wurde ein Fragment benutzt, welches nur die

ersten beiden α -Helices umfasst (AS 7-105; vollständiges CHMP4B 220 AS). Ob CC2D1B ebenfalls die drei Glutaminsäuren in CHMP4B für die Interaktion benötigt wurde nicht beschrieben.

In HEK293 Zellen ist die Lokalisation des CHMP4B^{mut2} Fragments nicht gestört, die Knospung von HIV wird allerdings verhindert, da das Fragment möglicherweise nicht mehr polymerisieren kann (Martinelli et al., 2012). Um zu überprüfen, ob die Lokalisation der N-terminal mit RFP fusionierten CHMP4A^{mut2}, CHMP4B^{mut2} und CHMP4C^{mut2} Konstrukte wie die wildtypischen Varianten eine endosomale Lokalisation zeigen, wurden diese in wildtypischen MEF Zellen exprimiert.

Bei CHMP4A^{mut2} ist eine starke Veränderung der Lokalisation zu beobachten, ebenso wie ein starker Einfluss auf endosomale Marker (Abb.2.2.24; vgl. Abb.2.2.2 A-A³). CHMP4A^{mut2} lokalisiert im Gegensatz zu wildtypischen CHMP4A stark im Zellkern (Abb.2.2.24 A¹). Daneben zeigt es immer noch eine Kolokalisation um den Zellkern mit LAMP1 und RAB7 (Abb.2.2.24 A-A³, Pfeile). Hinzu kommt eine Filamentartige Lokalisation im Zellkern und dem Zytoplasma. Diese Lokalisation zeigt RAB7 abseits seiner wildtypischen Lokalisation ebenfalls und kolokalisiert dort mit CHMP4A^{mut2} (Abb.2.2.24 A, A¹ und A³, Pfeilspitzen). CHMP4B^{mut2} und CHMP4C^{mut2} zeigen keine solchen Veränderungen wie CHMP4A^{mut2}. Die Verteilung von CHMP4B^{mut2} gleicht der von wildtypischem CHMP4B, es akkumuliert im Zytoplasma in der Nähe des Zellkerns (Abb.2.2.24 B¹, Pfeil; vgl. Abb.2.2.2 B-B³). Diese Akkumulationen sind wie bei wildtypischen CHMP4B positiv für LAMP1 (Abb.2.2.24 B und B², Pfeile). Anders als bei wildtypischem CHMP4B akkumuliert und kolokalisiert jedoch auch RAB7 dort (Abb.2.2.24 B und B³, Pfeile). Vergleichbar mit der mut2 Mutation in CHMP4B wirkt sich diese in CHMP4C aus. CHMP4C^{mut2} akkumuliert wie wildtypisches CHMP4C um den Zellkern (Abb.2.2.24 C¹, Pfeil; vgl. Abb.2.2.2 C-C³). Diese Akkumulationen sind ebenfalls LAMP1 positiv (Abb.2.2.24 C und C², Pfeile). Anders als bei wildtypischem CHMP4C akkumuliert und kolokalisiert RAB7 ebenfalls mit CHMP4C^{mut2} und LAMP1 (Abb.2.2.24 C-C³, Pfeile). Diese Veränderung tritt also sowohl bei CHMP4B^{mut2} als auch CHMP4C^{mut2} auf.

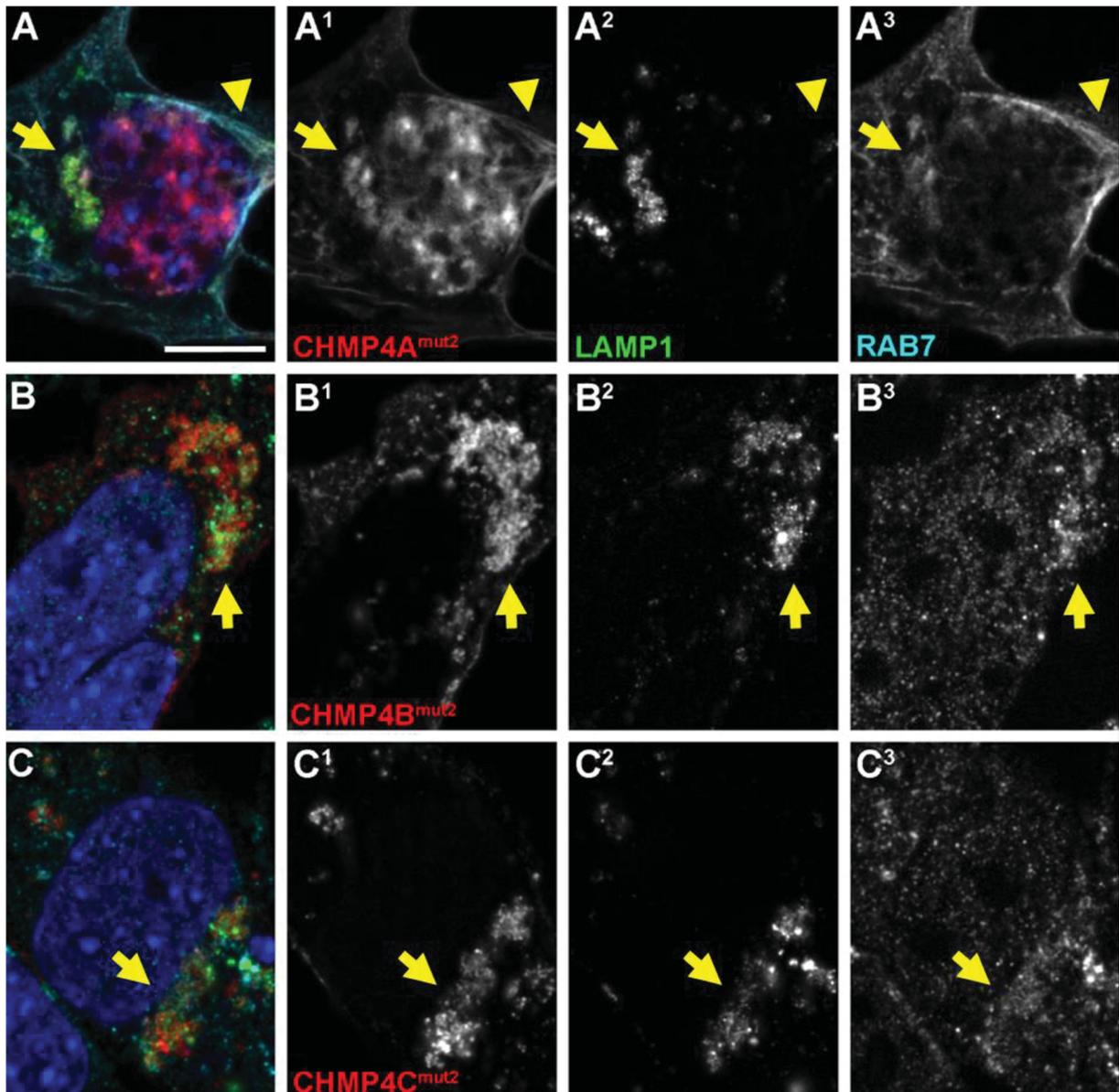


Abb.2.2.24 Expression von RFP-CHMP4A^{mut2}, -CHMP4B^{mut2} und -CHMP4C^{mut2} in wildtypischen MEF-Zellen. Die Expression von CHMP4A^{mut2} zeigt eine starke Lokalisation im Zellkern (A¹), Akkumulationen im Zytoplasma nahe des Zellkerns (A¹, Pfeil) und filamentöse Strukturen (A¹, Pfeilspitze). Die Akkumulationen nahe des Zellkerns sind LAMP1 (A²) und RAB7 (A³) positiv, es handelt sich also um spät endosomale Kompartimente (A-A³, Pfeile). Die filamentösen Strukturen von CHMP4A^{mut2} sind RAB7 positiv (A, A¹ und A³, Pfeilspitzen). CHMP4B^{mut2} (B¹) kolokalisiert mit LAMP1 (B²) und RAB7 (B³) nahe des Zellkerns in großflächigen, spät endosomalen Kompartimenten (B-B³, Pfeile). CHMP4C^{mut2} (C¹) kolokalisiert ebenfalls mit LAMP1 (C²) und RAB7 (C³) in großen, spät endosomalen Kompartimenten nahe des Zellkerns (C-C³, Pfeile). Der Maßstabsbalken entspricht 10 μ m.

CHMP4A^{mut2} zeigt zum Teil eine Lokalisation in filamentösen Strukturen und kolokalisiert dort mit RAB7 (Abb.2.2.24 A-A³). Um diese Strukturen weiter zu analysieren, wurde überprüft, ob es sich dabei um Teile des Zytoskelett handelt. Als Marker hierfür wurde α -TUBULIN eingesetzt. Dabei zeigt sich, dass CHMP4A^{mut2} mit α -TUBULIN vor allem in der Nähe des Zellkerns kolokalisiert (Abb.2.2.25 A-A², Pfeile). Bei den filamentösen Strukturen handelt es sich also um Teile des

Zytoskeletts. RAB7 zeigt in dieser immunozytochemischen Färbung eine schwächere Kolokalisation mit CHMP4A^{mut2} und nur eine punktuelle Assoziation mit den Filamenten (Abb.2.2.25 A und A³). Allerdings wurde ein anderer RAB7 Antikörper verwendet (s. Kapitel 5.1.5.3 Tabelle 5.4).

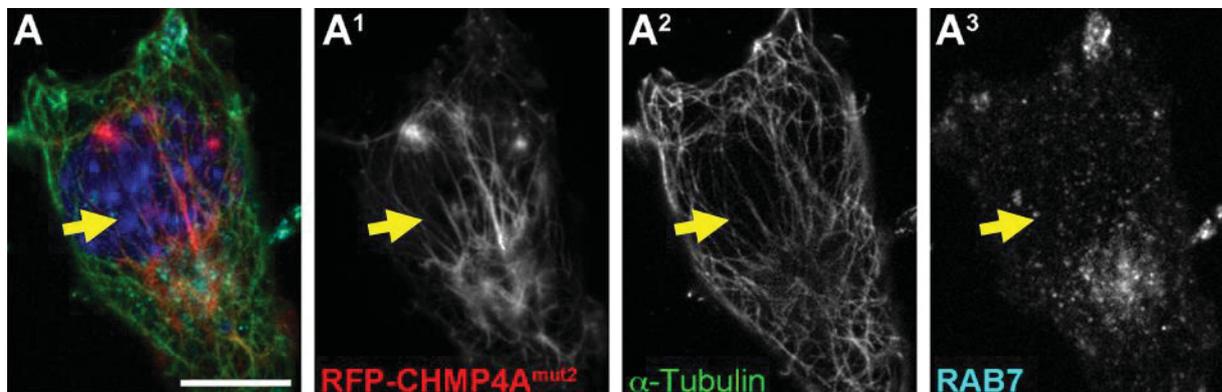


Abb.2.2.25 Expression von RFP-CHMP4A^{mut2} in wildtypischen MEF-Zellen. RFP-CHMP4A^{mut2} (A¹) zeigt zum Teil eine Lokalisation in Form von Filamenten. Diese Filamente kolokalisieren mit dem Marker für das Zytoskelett, α -TUBULIN (A-A², Pfeile). RAB7 zeigt nur eine punktuelle Kolokalisation mit dem Zytoskelett (A³, Pfeil). Der Maßstabsbalken entspricht 10 μ m.

Die *in vitro* Experimente zeigten den Verlust der Interaktion durch die mut2 Mutation in einem Fragment von CHMP4B mit einem Fragment von CC2D1A (Martinelli et al., 2012). Daher wurde mit FRET-APB die Interaktion von vollständigem CC2D1A und CC2D1B mit vollständigem CHMP4A^{mut2}, CHMP4B^{mut2} und CHMP4C^{mut2} überprüft. Dabei zeigt sich kein Unterschied zwischen CC2D1A und CC2D1B, jedoch ein Unterschied im Vergleich der CHMP4^{mut2} Proteine (Abb.2.2.26). Beide CC2D1 Proteine kolokalisieren mit allen CHMP4^{mut2} Konstrukten, ähnlich wie mit den wildtypischen CHMP4 Konstrukten (s. Anhang Abb.8.6). Sowohl CC2D1A als auch CC2D1B können jedoch nicht mehr mit CHMP4B^{mut2} und CHMP4C^{mut2} interagieren. Beide CC2D1 Proteine können allerdings weiterhin mit CHMP4A^{mut2} interagieren, die FRET-Effizienz dieser Interaktionen steigt sogar deutlich an, verglichen mit den Interaktionen mit wildtypischem CHMP4A. Dieser Anstieg ist bei CC2D1A deutlicher als bei CC2D1B. Der Anstieg der FRET-Effizienz kann durch eine Änderung der Stereometrie der Interaktion bewirkt werden. Allerdings ist nicht bekannt, ob die Struktur der CHMP4 Proteine durch die Mutation beeinflusst wird. Es kann sich allerdings die Ausrichtung der Interaktionspartner ändern, wodurch sich auch Abstand und Ausrichtung der Chromophore ändern kann. Die FRET-Effizienz kann aber auch durch eine erhöhte Anzahl an Interaktionen ansteigen, es kann also auch ein Hinweis auf eine vermehrte Interaktion von CHMP4A^{mut2} mit den CC2D1 Proteinen sein.

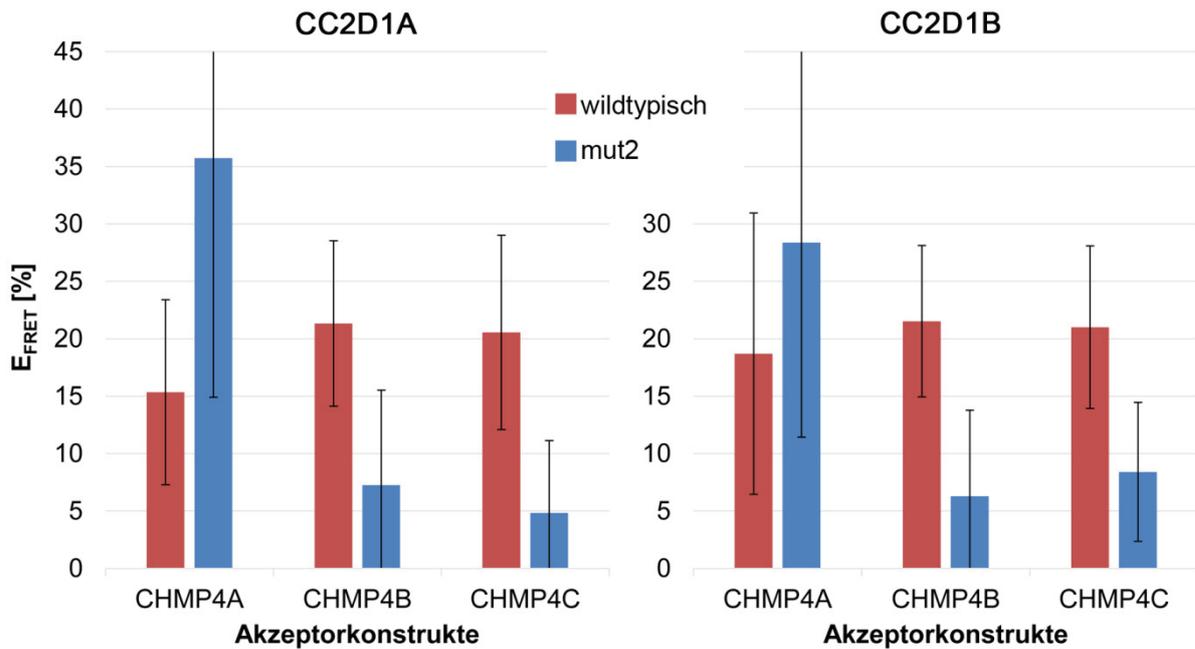


Abb.2.2.26 Auswirkung der mut2 Mutation in CHMP4A, CHMP4B und CHMP4C auf die Interaktion mit den CC2D1 Proteinen. Sowohl CC2D1A als auch CC2D1B kann nicht mehr mit CHMP4B^{mut2} oder CHMP4C^{mut2} (blau) interagieren. Beide CC2D1 Proteine interagieren aber weiterhin mit CHMP4A^{mut2} (blau). Die FRET-Effizienz steigt bei der Interaktion mit CHMP4A^{mut2} bei beiden sogar an, verglichen mit der Interaktion mit wildtypischem CHMP4A (rot). Bei der Interaktion von CC2D1A ist dieser Anstieg deutlicher als bei CC2D1B.

Da die mut2 Mutation einen solch unterschiedlichen Effekt auf die Interaktion der CC2D1 Proteine mit CHMP4A^{mut2}, CHMP4B^{mut2} und CHMP4C^{mut2} hat, sollte überprüft werden, wie sich die Mutation auf die Interaktion der *Drosophila* Orthologe auswirkt. Die in mut2 durch Arginin ausgetauschten Glutaminsäuren sind in Shrub konserviert (s. Anhang Abb.8.4). Daher konnte ein RFP-Shrub^{mut2} Konstrukt generiert werden. Durch FRET-APB Experimente wurde analysiert, ob CC2D1A und CC2D1B mit Shrub und Shrub^{mut2} und umgekehrt Lgd mit Shrub, Shrub^{mut2}, CHMP4B und CHMP4B^{mut2} interagieren kann (Abb.2.2.27). Dabei zeigt sich ein Unterschied zwischen den CC2D1 Proteinen und Lgd. Sowohl CC2D1A als auch CC2D1B können mit CHMP4B interagieren, mit CHMP4B^{mut2} hingegen nicht mehr. Lgd kann ebenso mit CHMP4B interagieren, mit einer vergleichbaren FRET-Effizienz der Interaktion wie die der CC2D1 Proteine mit CHMP4B. Lgd kann aber im Gegensatz zu den Orthologen weiterhin mit CHMP4B^{mut2} interagieren, bei nahezu unveränderter FRET-Effizienz. CC2D1A und CC2D1B können ebenfalls mit Shrub interagieren, bei Shrub^{mut2} sinkt zwar die FRET-Effizienz der Interaktion, es kann aber kein kompletter Verlust der Interaktion festgestellt werden. Lgd kann mit Shrub^{mut2} genauso interagieren wie mit Shrub, hier ändert sich die FRET-Effizienz kaum.

Die Ergebnisse der Untersuchung der mut2 Mutation in den CHMP4 Proteinen und Shrub weist darauf hin, dass es nicht nur Unterschiede zwischen CHMP4A und CHMP4B und CHMP4C gibt, sondern auch zwischen Säugern und *Drosophila*. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die CC2D1 Proteine

möglicherweise zumindest zum Teil an andere Aminosäuren in CHMP4 und Shrub binden als Lgd. Zudem weist die unveränderte Kolo-kalisation trotz verlorener Interaktion der CC2D1 mit CHMP4B^{mut2} und CHMP4C^{mut2} darauf hin, dass die Rekrutierung von CC2D1A und CC2D1B nicht über eine direkte Interaktion mit den beiden CHMP4 Proteinen geschieht.

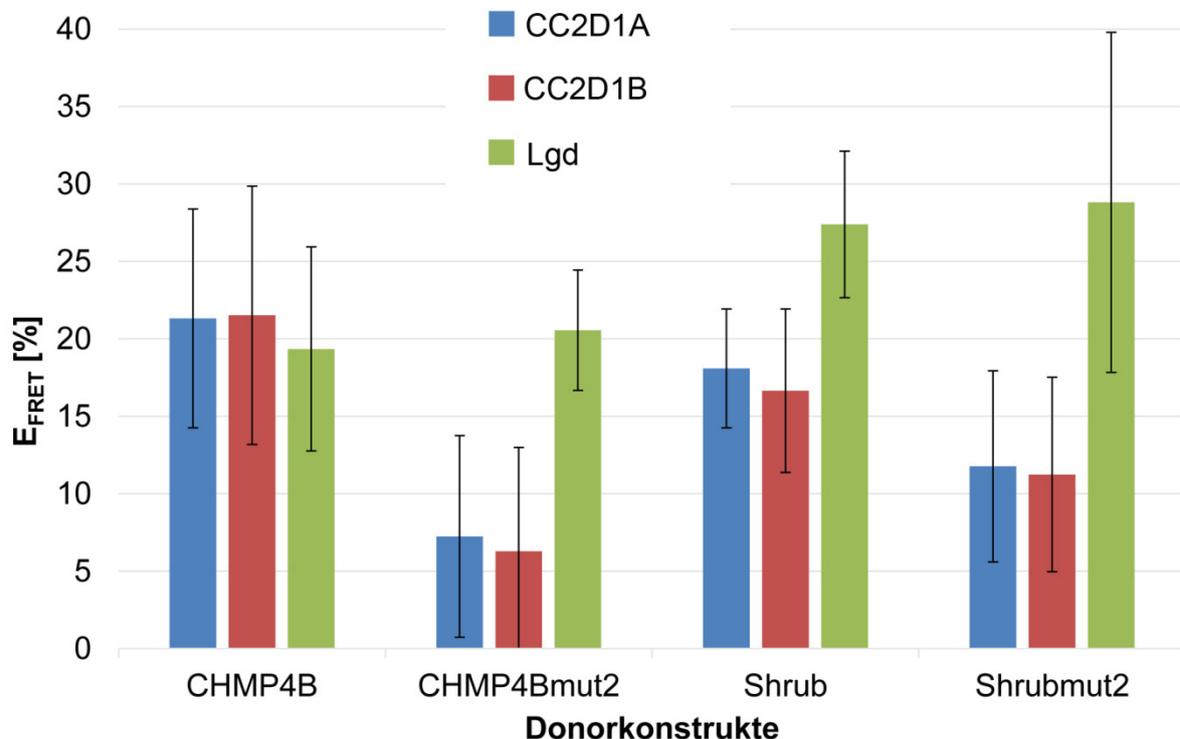


Abb.2.2.27 Vergleich der Auswirkung der mut2 Mutation auf die Interaktion der CC2D1 Proteine und Lgd mit CHMP4B und Shrub. Genau wie die CC2D1A (blau) und CC2D1B (rot) kann das *Drosophila* Ortholog Lgd (grün) mit CHMP4B interagieren. Mit CHMP4B^{mut2} kann Lgd im Gegensatz zu den CC2D1 Proteinen ebenfalls weiterhin interagieren. CC2D1A und CC2D1B können wie mit CHMP4B auch mit dem *Drosophila* Ortholog Shrub interagieren. Bei Shrub^{mut2} sinkt die FRET-Effizienz dagegen, es kann aber nicht von einem vollständigen Verlust der Interaktion gesprochen werden. Vergleichbar mit der Interaktion mit dem Säugerortholog CHMP4B kann Lgd sowohl mit Shrub als auch Shrub^{mut2} interagieren.

2.2.12 Konkurrenz und Affinitäten der Interaktionen

Bislang konnte nicht geklärt werden, ob die CC2D1 Proteine mit einem oder mehreren CHMP Proteinen gleichzeitig interagieren können oder in welcher Reihenfolge diese Interaktionen stattfinden. Möglicherweise gibt es hier Unterschiede zwischen CC2D1A und CC2D1B. So könnten die Affinitäten zu den verschiedenen CHMP Proteinen unterschiedlich sein, was auf endogenem Level dazu führen könnte, dass es zu unterschiedlichen Interaktionen kommt. Um diese Möglichkeiten zu untersuchen, wurden weitere FRET-APB Messungen durchgeführt. Hierbei wurde zusätzlich zu dem jeweiligen exprimierten FRET-Paar ein weiteres Konstrukt ohne Chromophor exprimiert. Interagiert das Donor- oder Akzeptorprotein bevorzugt mit dem dritten Protein, führt dies zu einer Verringerung der FRET-Effizienz. Kommt es zu einer Komplexbildung aller drei Konstrukte, sollte dies ebenso durch eine Veränderung der FRET-Effizienz messbar sein. Überprüft wurde der Einfluss von CHMP5

und VPS4B auf die Interaktion der CC2D1 Proteine mit den CHMP4 Proteinen. Zwischen CHMP4 und CHMP5 könnte eine Konkurrenz um die Interaktion mit CC2D1A und CC2D1B bestehen, da beide direkte Interaktionspartner sind. VPS4B ist ein direkter Interaktionspartner der CHMP4 Proteine bei der ILV Bildung. Allerdings ist es, wie in dieser Arbeit gezeigt, kein Interaktionspartner der CC2D1 Proteine. Zudem interagiert VPS4B mit der MIM Domäne im C-Terminus von CHMP4 (Kieffer et al., 2008; Adell et al., 2014), während die CC2D1 Proteine wahrscheinlich mit der Helix $\alpha 2$ im N-Terminus von CHMP4 interagieren (Martinelli et al., 2014). Die CC2D1 Proteine und VPS4 konkurrieren also möglicherweise nicht um die gleiche Bindestelle in CHMP4.

Die zusätzliche Expression von FLAG-CHMP5 und FLAG-VPS4B zu den CC2D1A – CHMP4 FRET-Paaren zeigt unterschiedliche Effekte (Abb.2.2.28). Die FRET-Effizienz der Interaktion von CC2D1A und CHMP4A ändert sich in Anwesenheit von CHMP5 nicht (Abb.2.2.28, rot). Die Interaktion wird also nicht beeinflusst. Die FRET-Effizienz der Interaktion von CC2D1A mit CHMP4A steigt allerdings bei gemeinsamer Expression mit VPS4B (Abb.2.2.18, grün). Im Gegensatz dazu sinkt die FRET-Effizienz der Interaktionen von CC2D1A sowohl mit CHMP4B als auch CHMP4C, wenn CHMP5 gleichzeitig exprimiert wird (Abb.2.2.28, rot). Allerdings sinkt die FRET-Effizienz nicht so stark, dass von einem vollständigen Verlust der Interaktion gesprochen werden kann. Dies könnte bedeuten, dass ein Teil von CC2D1A oder der CHMP4 Proteine statt miteinander mit CHMP5 interagiert. Auch möglich wäre, dass sich ein größerer Komplex bildet, welcher den Abstand der Chromophore verändert. Die FRET-Effizienz der Interaktionen von CC2D1A mit CHMP4B oder CHMP4C ändert sich durch zusätzliche Expression von VPS4B kaum (Abb.2.2.28, grün). Die Anwesenheit von VPS4B scheint also keinen Einfluss auf die Interaktion von CC2D1A mit CHMP4B und CHMP4C zu haben. Wie bei den Analysen zur *mut2* Mutation zeigen sich auch hier Unterschiede zwischen CHMP4A und CHMP4B bzw. CHMP4C.

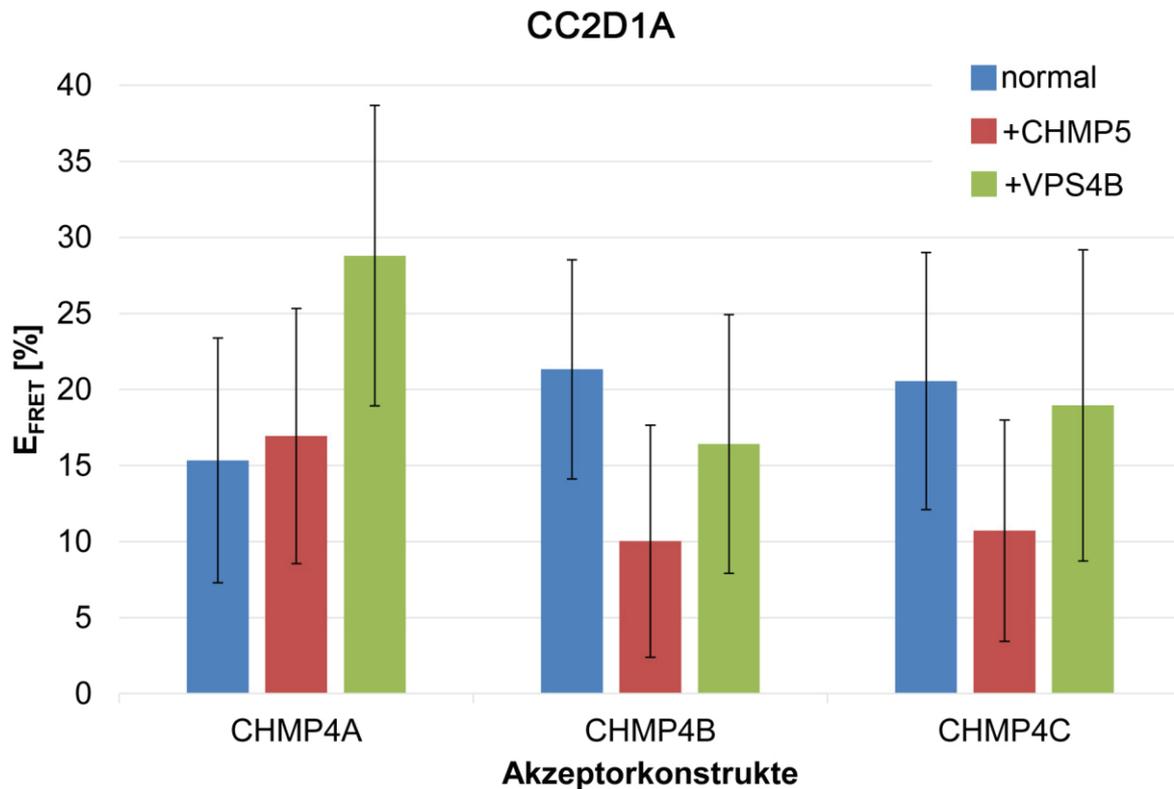


Abb.2.2.28 Auswirkung der zusätzlichen Expression von CHMP5 oder VPS4B auf die Interaktion von EGFP-CC2D1A mit RFP-CHMP4A, -CHMP4B und -CHMP4C. Die zusätzliche Expression von CHMP5 (rot) und VPS4B (grün) beeinflusst die Interaktion von CC2D1A mit CHMP4A, CHMP4B oder CHMP4C in unterschiedlichem Maße, verglichen mit der „normalen“ Interaktion (blau). CC2D1A kann in Anwesenheit von CHMP5 weiterhin mit CHMP4A interagieren. Die FRET-Effizienz der Interaktion ändert sich nur geringfügig. In Anwesenheit von VPS4B steigt die FRET-Effizienz der Interaktion von CC2D1A mit CHMP4A. Anders ist der Einfluss auf die Interaktion von CC2D1A mit CHMP4B und CHMP4C. Die FRET-Effizienz beider Interaktionen sinkt deutlich bei gemeinsamer Expression mit CHMP5, allerdings nicht so stark, dass auf einen vollständigen Verlust der Interaktion geschlossen werden kann. Die gemeinsame Expression mit VPS4B beeinflusst die Interaktion von CC2D1A mit CHMP4B und CHMP4C hingegen nicht.

Bei der Interaktion von CC2D1B zeigt sich ein anderer Einfluss der zusätzlichen Expression von CHMP5 oder VPS4B auf die Interaktion mit den CHMP4 Proteinen als bei CC2D1A (Abb.2.2.29). Die Interaktion von CC2D1B mit CHMP4A wird weder durch gemeinsame Expression mit CHMP5 (Abb.2.2.29, rot), noch mit VPS4B (Abb.2.2.29, grün) messbar beeinflusst. Bei der gemeinsamen Expression sowohl mit CHMP5 als auch VPS4B kommt es zu einem vollständigen Verlust der Interaktion von CC2D1B mit CHMP4B (Abb.2.2.29, rot und grün). Das gleiche gilt auch für die Interaktion von CC2D1B mit CHMP4C, auch diese wird durch die gemeinsame Expression mit CHMP5 oder VPS4B vollständig verhindert (Abb.2.2.29, rot und grün).

Während die Interaktion von CC2D1A mit CHMP4B oder CHMP4C durch CHMP5 also schwach beeinflusst wird, wird die Interaktion von CC2D1B mit CHMP4B oder CHMP4C durch CHMP5 verhindert oder beendet. Durch VPS4B wird die Interaktion von CC2D1A mit CHMP4B oder CHMP4C hingegen nicht messbar beeinflusst, während die Interaktion von CC2D1B mit diesen

beiden CHMP4 Proteinen, wie durch CHMP5, verhindert wird. Die Interaktion mit CHMP4A von CC2D1A oder CC2D1B wird weder von CHMP5 noch VPS4B negativ beeinflusst.

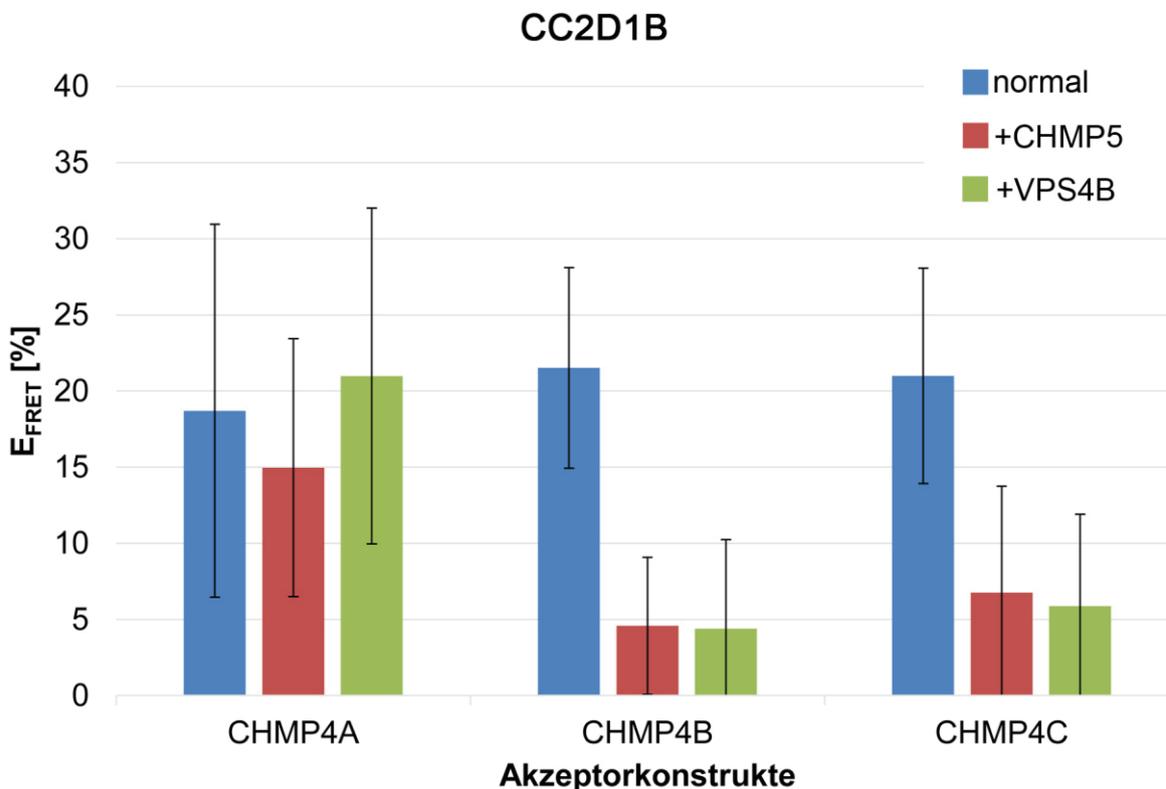


Abb.2.2.29 Auswirkung der zusätzlichen Expression von CHMP5 oder VPS4B auf die Interaktion von EGFP-CC2D1B mit RFP-CHMP4A, -CHMP4B und -CHMP4C. Die zusätzliche Expression von CHMP5 (rot) und VPS4B (grün) beeinflusst die Interaktion von CC2D1B mit CHMP4A, CHMP4B oder CHMP4C in unterschiedlichem Maße, verglichen mit der „normalen“ Interaktion (blau). CC2D1B kann sowohl bei gemeinsamer Expression mit CHMP5 als auch VPS4B weiterhin mit CHMP4A interagieren. Die FRET-Effizienz der Interaktionen ändert sich nur geringfügig. Die Interaktion von CC2D1B mit CHMP4B oder CHMP4C wird hingegen sowohl durch gemeinsame Expression mit CHMP5 oder VPS4B vollständig verhindert.

2.2.13 CC2D1A und CC2D1B bilden möglicherweise Komplexe.

Die ESCRT-Proteine sind alle an der Bildung von Komplexen beteiligt, auch die Hilfs-ESCRT Proteine bilden kleinere Komplexe. Die CC2D1 Proteine wurden bisher mit keinem dieser Komplexe in Verbindung gebracht. Bisher wurde auch nicht beschrieben, ob sie nicht selbst einen Komplex bilden können. So ist eine Interaktion über die C2- oder DM14-Domänen denkbar. Erste Experimente wiesen bereits darauf hin, dass die CC2D1 Proteine und auch Lgd Homomere bilden können (Masterarbeit Bernhard Migdal, 2012, Dissertation Katharina Schulz, 2015; Sandra Jäckel, unveröffentlicht). Um dies zu überprüfen und die Funktion der Domänen bei diesen Interaktionen zu analysieren, wurden FRET-APB Messungen mit mehreren Deletionskonstrukten von CC2D1A und CC2D1B durchgeführt (Abb.2.2.30).

CC2D1A kann genau wie CC2D1B Homomere bilden. Zudem können CC2D1A und CC2D1B miteinander interagieren, also auch Heteromere bilden. Ein unterschiedlicher Effekt zeigt sich bei der Auswirkung von Deletionen auf die Interaktion. CC2D1A kann sowohl mit CC2D1A^{ΔDM14} als auch mit CC2D1A^{ΔC2} weiterhin interagieren. Die FRET-Effizienz dieser Interaktionen steigt im Vergleich zur Interaktion des vollständigen Proteins mit sich selbst. Mit CC2D1A^{MR} kann CC2D1A hingegen nicht mehr oder nur noch schwach interagieren. CC2D1B kann hingegen sowohl mit CC2D1B^{ΔDM14} als auch mit CC2D1B^{ΔC2} nicht mehr interagieren. Dies weist darauf hin, dass die Homomerbildung von CC2D1A anders reguliert wird, als die von CC2D1B oder dass diese durch unterschiedliche Domänen vermittelt werden. Die in Interaktion von CC2D1A mit CC2D1B wird dagegen durch jegliche Deletion verhindert (nicht gezeigt, s. Anhang Tab.8.3).

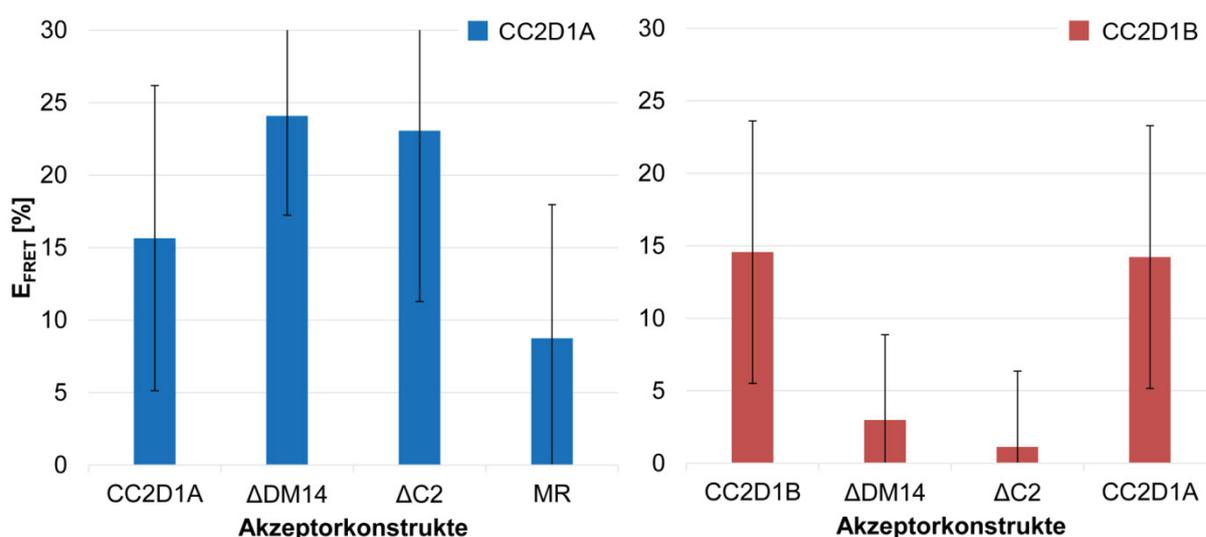


Abb.2.2.30 Auswirkung der Deletion unterschiedlicher Domänen in CC2D1A oder CC2D1B auf die Interaktion mit vollständigem CC2D1A und CC2D1B. Vollständiges CC2D1A (blau) kann sowohl mit CC2D1A^{ΔDM14} als auch mit CC2D1A^{ΔC2} interagieren, die FRET-Effizienz der Interaktion steigt sogar verglichen mit der Interaktion mit vollständigem CC2D1A. Keine oder nur noch eine schwache Interaktion ist mit CC2D1A^{MR} möglich. CC2D1B (rot) kann hingegen weder mit CC2D1B^{ΔDM14} noch mit CC2D1B^{ΔC2} noch interagieren. Die beiden CC2D1B können zudem miteinander interagieren.

2.2.13 Zusammenfassung der Interaktionen von CC2D1A und CC2D1B mittels FRET-APB in lebenden Zellen.

CC2D1A und CC2D1B können mit ESCRT-III Untereinheiten CHMP4A, CHMP4B und CHMP4C, und den Hilfs-ESCRT Proteinen CHMP5 und CHMP7 interagieren (Kapitel 2.2.3). Zudem können sowohl CC2D1A als auch CC2D1B Homomere und Heteromere bilden (Kapitel 2.2.13). Die Deletion der C2 Domäne führt bei beiden CC2D1 Proteinen zu keinem Verlust der Interaktionen mit den CHMP Proteinen. Es treten aber großflächige Akkumulationen der ΔC2 Konstrukte in stark vergrößerten endolysosomalen Kompartimenten auf (Kapitel 2.2.5). Die Deletion aller DM14 Domänen hat keinen Einfluss auf die Interaktion von CC2D1A mit den CHMP Proteinen,

CC2D1B^{ΔDM14} kann hingegen nicht mehr mit CHMP4B, CHMP4C und CHMP7 interagieren (Kapitel 2.2.6). Für die Interaktion von CC2D1B mit CHMP4B werden die 3. und 4. DM14 Domäne benötigt, für die Interaktion mit CHMP4C die 1. und die 2. DM14 Domäne. Für die Interaktion mit CHMP7 reichen sowohl die 1. und 2. als auch die 3. und 4. DM14 Domäne aus (Kapitel 2.2.7). *Drosophila* Lgd kann sowohl mit Shrub (CHMP4 Ortholog) als auch mit Chmp5 (CHMP5 Ortholog) interagieren (Kapitel 2.2.4). Für die Interaktion mit Shrub reichen die 3. und 4. DM14 Domäne noch aus, für die Interaktion mit CHMP5 nicht (Kapitel 2.2.7). Die Analyse der Funktion verschiedener konservierter Aminosäuren in der dritten DM14 Domäne von CC2D1B zeigt einen Verlust der Interaktion mit CHMP4B bei den Mutationen R416E und K419E, jedoch keinen Einfluss auf die Interaktion durch die Mutation P440A und die Doppelmutation R416E;K419E. Die Interaktion mit CHMP7 wird durch keine Mutation messbar gestört (Kapitel 2.2.8). Die Mutation der analogen, konservierten Aminosäuren in Lgd zeigt keinen Verlust der Interaktion mit Shrub durch die Mutationen R393E, K396E und P417A. Die Mutation V418T sowie die Doppelmutationen R393E;K396E und P417A;V418T stärken die Interaktion eher (Kapitel 2.2.8). Eine Funktion des N-Terminus von CC2D1A und CC2D1B wurde bisher nicht beschrieben. Die Deletion des N-Terminus von CC2D1A führt zu einer zusätzlichen Lokalisation im Zellkern, wo vollständiges CC2D1A und seine Deletionskonstrukte nicht lokalisieren. Zudem führt die Deletion des N-Terminus sowohl bei CC2D1A als auch CC2D1B zu einem Verlust der Interaktion mit CHMP4B (Kapitel 2.2.9). Auch dem verlängerten C-Terminus von CC2D1A konnte bisher keine Funktion zugeschrieben werden. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Deletion des C-Terminus zu einem Verlust der Interaktion mit CHMP4A, CHMP4B, CHMP4C und CHMP7 führt (Kapitel 2.2.10). Wird der verlängerte C-Terminus, die C2 Domäne und die vierte DM14 Domäne deletiert, werden alle diese Interaktionen wieder gerettet und zum Teil sogar verstärkt (Kapitel 2.2.10). In CHMP4B und CHMP4C werden drei konservierte Glutaminsäuren für die Interaktion mit CC2D1A und CC2D1B benötigt, der Austausch dieser durch Arginin führt zu einem Verlust der Interaktion. In CHMP4A führt dieser Austausch zu keiner Störung der Interaktion (Kapitel 2.2.11). *Drosophila* Lgd kann mit bei einem Austausch der drei Glutaminsäuren in Shrub, in welchem diese ebenfalls konserviert sind, immer noch mit diesem interagieren. Zudem kann Lgd auch mit dem mutierten CHMP4B interagieren, während CC2D1A und CC2D1B mit dem mutierten Shrub nur noch abgeschwächt interagieren können (Kapitel 2.2.11). Die zusätzliche Expression von CHMP5 und VPS4B hat einen unterschiedlichen Einfluss auf die Interaktionen von CC2D1A und CC2D1B mit CHMP4 Proteinen. Die Interaktion von CC2D1A mit CHMP4A wird nicht gestört. Die Interaktion mit CHMP4B und CHMP4C wird durch zusätzlich exprimiertes CHMP5 abgeschwächt, VPS4B hat keinen Einfluss. Die Interaktion von CC2D1B mit CHMP4A wird ebenfalls nicht gestört. Die Interaktion von CC2D1B mit CHMP4B oder CHMP4C wird allerdings sowohl durch die zusätzliche Expression von CHMP5 als auch VPS4B vollständig verhindert (Kapitel 2.2.12). Eine Übersicht über die Ergebnisse bietet die nachfolgende Tabelle.

Tab. 2.2.1 Übersicht über die analysierten Interaktionen. ✓ = Interaktion; ✗ = keine Interaktion

		CHMP4A	CHMP4B	CHMP4C	CHMP5	CHMP7	CC2D1A	CC2D1B
vollständig	CC2D1A	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	CC2D1B	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
ΔDM14	CC2D1A	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✗
	CC2D1B	✓	✗	✗	✓	✗	✗	✗
ΔC2	CC2D1A	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✗
	CC2D1B	✓	✓	✓	✓	✓	✗	✗
ΔN	CC2D1A	✓	✗	✓	✓	✓		
	CC2D1B	✓	✗	✓	✓	✓		
CC2D1A ^{ΔC815}		✗	✗	✗	✓	✗		
CC2D1A ^{MR}		✓	✓	✓	✓	✓		
CC2D1B	ΔDM14(1-3)		✗	✗		✗		
	ΔDM14(1-2)		✓	✗		✓		
	ΔDM14(3-4)		✗	✓		✓		
	ΔDM14(2-3)		✗	✗		✗		
	ΔDM14(1+3)		✗	✗		✗		
	ΔDM14(2+4)		✗	✗		✗		

		Mut2			WT		
		CHMP4A	CHMP4B	CHMP4C	Shrub	Shrub	CHMP4B
CC2D1A		✓	✗	✗	✓	✓	✓
CC2D1B		✓	✗	✗	✓	✓	✓
Lgd			✓		✓	✓	✓

		Shrub	DChmp5
Lgd	vollständig	✓	✓
	ΔDM14	✗	✗
	ΔDM14(1-3)	✗	
	ΔDM14(1-2)	✓	✗

		CHMP4A	CHMP4B +CHMP5	CHMP4C	CHMP4A	CHMP4B +VPS4B	CHMP4C
CC2D1A		✓	✓	✓	✓	✓	✓
CC2D1B		✓	✗	✗	✓	✗	✗

CC2D1B ^{ΔDM14(1-2)}		CHMP4B	CHMP7
R416E		✗	✓
K419E		✗	✓
R416E;K419E		✓	✓
P440A		✓	✓

Shrub	Lgd ^{ΔDM14(1-2)}
✓	R393E
✓	K396E
✓	R393E;K396E
✓	P417A
✓	V418T
✓	P417A;V418T

3. Diskussion

Für CC2D1A und zu einem geringen Teil auch für CC2D1B wurden bisher unter anderem Funktionen in verschiedenen Signalwegen, im angeborenen Immunsystems und die Funktion als Repressor von Genen beschrieben (s. Einleitung 1.3). In *Drosophila* hingegen ist eine Funktion des Orthologs Lgd im endosomalen Transportweg bekannt und genauer analysiert worden. Der Ausfall von *lgd* führt zu vergrößerten Endosomen und zu einer ektopischen Aktivierung des Notch Signalwegs. Diese ist auf eine fehlerhafte Verpackung des Notch-Rezeptors in intraluminalen Vesikel (ILV) zurückzuführen, wodurch es nach der Fusion mit dem Lysosom zu der ligandenunabhängigen Aktivierung kommt. Dabei wird vermutet, dass Lgd ein positiver Regulator von Shrub ist, einer Hauptuntereinheit des ESCRT-III Komplexes, welcher für die ILV Bildung verantwortlich ist (Troost et al., 2012, Jäkel und Klein, 2006). Außerdem konnte in *Drosophila in vivo* eine genetische Interaktion von Lgd mit den Hilfs-ESCRT Proteinen Ist1 und Chmp5, sowie *in vitro* eine direkte Interaktion von Lgd und Chmp5 gezeigt werden (Sven Klose, unveröffentlicht; Masterarbeit Christian Brüser, 2013). Hier gibt es eine Verbindung zur Funktion von CC2D1A und CC2D1B. Für beide wurde gezeigt, dass sie *in vitro* mit CHMP4B, einem der Säugerorthologe von Shrub interagieren. CC2D1A interagiert zudem in „Yeast-2-Hybrid“ Experimenten mit CHMP4A, CHMP4B und CHMP4C (Tsang et al., 2006). Während Lgd in *Drosophila* als positiver Regulator von Shrub im endosomalen Transportweg beschrieben wurde, wurde für die Knospung von HIV CC2D1A als negativer Regulator von CHMP4B beschrieben (Usami et al., 2012). In dieser Arbeit wurde daher der Frage nachgegangen, ob CC2D1A und CC2D1B in Säugern eine ähnliche Funktion im endosomalen Transportweg haben, wie Lgd in *Drosophila*. Des Weiteren wurde untersucht, ob beide Proteine noch mit weiteren Untereinheiten des ESCRT-III Komplexes oder Hilfs-ESCRT Proteinen interagieren. Außerdem wurde die Funktion der Domänen der CC2D1 Proteine im Hinblick auf diese Interaktionen und ihres Einflusses auf die Lokalisation und Regulation analysiert.

3.1 CC2D1A und CC2D1B haben eine Funktion im endosomalen Transportweg.

Die Ergebnisse in dieser Arbeit zeigen, dass CC2D1A und CC2D1B eine zum Teil redundante Funktion im endosomalen Transportweg haben. Der Ausfall von *Cc2d1a* alleine zeigt in elektronenmikroskopischen Analysen einen schwachen endosomalen Phänotyp, es treten vergrößerte Endolysosomen mit wildtypischer Morphologie auf und kleinere Endolysosomen können nicht beobachtet werden (Abb.2.1.3 und 2.1.4). Fehlt *Cc2d1b* ist auch in elektronenmikroskopischen Untersuchungen kein Phänotyp erkennbar. Der Ausfall beider *Cc2d1* Gene zusammen zeigt hingegen einen stärkeren endosomalen Phänotyp. In *Cc2d1a^{-/-};Cc2d1b^{-/-}* Zellen sind vergrößerte Endolysosomen zu beobachten, welche vergrößerte ILVs und viel elektronendichtes Material enthalten, aber kaum die Membraneinlagerungen welche typisch sind für „Class E“ Kompartimente (Abb.2.1.7-2.1.10). Diese

„Class E“ Kompartimente bilden sich in der Hefe beim Ausfall eines ESCRT-Komplexes oder des VPS4-Komplexes. Sie zeichnen sich durch eine vielfach erhöhte Einlagerung von Membranen im Vergleich zu MVBs aus und durch die Akkumulation von Membranrezeptoren. Außerdem ist ihre Bildung abhängig von dem Ortholog der RAB5 GTPase, Vps21. Vermutet wird, dass durch den Ausfall des ESCRT-Systems die Umwandlung von RAB5 zu RAB7 gestört ist (Russell et al., 2012). Wie es letztendlich zu diesen Membraneinlagerungen kommt, ist allerdings unklar. Der Verlust der ESCRT-Funktion in Säugerzellen zeigt einen vergleichbaren Phänotyp (Stuffers et al., 2009). Der Verlust der Funktion beider CC2D1 Proteine zeigt also einen starken endosomalen Phänotyp, aber nicht den gleichen wie der Verlust der ESCRT-Funktion, was darauf hinweist, dass die ESCRT-Funktion nicht grundsätzlich gestört ist. Dies zeigt auch der weitere Vergleich mit dem Phänotyp von *Vps4a^{+/-};Vps4b^{+/-}* Zellen. Diese zeigen den für den Verlust von ESCRT-Komplexen typischen „Class E“ Phänotyp. Die Endolysosomen sind stark vergrößert und es sind verstärkte Membraneinlagerungen zu erkennen (Abb.2.1.2-2.1.4). Dieser Phänotyp wird durch den zusätzlichen Verlust von *Cc2d1a* oder *Cc2d1b* kaum modifiziert, lediglich die starke Vergrößerung der Endolysosomen wird abgeschwächt und es treten mehr Endolysosomen auf, der „Class E“ Phänotyp bleibt erhalten (Abb.2.1.5-2.1.11). Kein Unterschied ist zwischen *Cc2d1a^{-/-};Vps4a^{+/-};Vps4b^{+/-}* und *Cc2d1b^{-/-};Vps4a^{+/-};Vps4b^{+/-}* zu erkennen, was für eine ähnliche Funktion beider CC2D1 Proteine spricht. Für eine Redundanz der beiden Proteine im endosomalen Transportweg spricht auch die Veränderung des endosomalen Phänotyps in *Cc2d1a^{-/-};Cc2d1b^{-/-};Vps4a^{+/-};Vps4b^{+/-}* Zellen. Diese zeigen eine deutlich erhöhte Anzahl an Endolysosomen (Abb.2.1.11), welche immer noch vergrößert sind (Abb.2.1.9 und 2.1.10). Diese Endolysosomen zeigen aber nicht mehr den „Class E“ Phänotyp. Die Morphologie der Endolysosomen entspricht jedoch auch nicht der in *Cc2d1a^{-/-};Cc2d1b^{-/-}* MEFs beobachteten Morphologie. Vielmehr haben die Endolysosomen in *Cc2d1a^{-/-};Cc2d1b^{-/-};Vps4a^{+/-};Vps4b^{+/-}* Zellen wieder eine mehr wildtypische Morphologie, sie sind rund, zeigen keine auffälligen ILVs, eine gleichmäßige Füllung mit elektronendichtem Material und keine verstärkten Membraneinlagerungen. Insgesamt scheint es zu einer starken Verzögerung oder Arretierung im endosomalen Transportweg zu kommen, was die große Anzahl vergrößerter Endolysosomen erklären würde. Allerdings scheint die ESCRT-Funktion nicht mehr so wie bei den anderen Zellen mit VPS4 Reduktion gestört zu sein, da kaum „Class E“ ähnlichen Endolysosomen zu erkennen sind. Möglicherweise läuft dies ohne die CC2D1 Proteine und mit reduziertem VPS4 zwar korrekt aber langsamer ab. Aufgrund von Analysen in *Drosophila* wird vermutet, dass Lgd (CC2D1) die Aktivität von Shrub (CHMP4) steigert (Troost et al., 2012). Durch den Verlust der CC2D1 Proteine und die Reduktion von VPS4 in *Cc2d1a^{-/-};Cc2d1b^{-/-};Vps4a^{+/-};Vps4b^{+/-}* Zellen könnte also einerseits die erhöhte CHMP4 Aktivität durch die CC2D1 Proteine fehlen, andererseits der Abbau der CHMP4 Polymere durch weniger VPS4 langsamer stattfinden. In Hefe gibt es kein Protein der CC2D1/Lgd Familie und lediglich ein Vps4 Ortholog. Möglicherweise befindet sich das ESCRT-System also wieder in einem Gleichgewicht, wodurch die

ILV Bildung „normal“ funktioniert, der gesamte Prozess allerdings langsamer abläuft. Dadurch könnte es zu den vergrößerten Endolysosomen mit wildtypischer Morphologie kommen.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse erstmals, dass CC2D1A und CC2D1B in Säugern eine wichtige Funktion im endosomalen Transportweg haben.

3.2 Die CC2D1 Proteine wirken vor VPS4 am Endosom und werden durch die ESCRT-III Assemblierung rekrutiert.

Bisherige Untersuchungen konnten keine einheitlichen Ergebnisse zur Lokalisation der CC2D1/Lgd Proteine zeigen und auch nicht wo die Funktion oder die Interaktionen stattfinden. Die gemeinsame Überexpression von CC2D1A mit RAB5 oder LAMP1 in HEK293 Zellen zeigte jeweils in beiden Fällen eine Kolokalisation (Chang et al., 2011). Auf endogenem Expressionslevel konnte jedoch in Säugerzellen keine Kolokalisation von CC2D1A mit einem endosomalen Marker oder CHMP4 gezeigt werden (Drusenheimer et al., 2015). Die Expression von dominant-negativem VPS4B, welches den ESCRT-III Komplex nicht mehr ablösen kann (Fujita et al., 2003) zeigte jedoch eine Akkumulation von CC2D1A und CC2D1B an vergrößerten endolysosomalen Kompartimenten (Drusenheimer et al., 2015). Die Expression von Vps4 siRNA zeigte in *Drosophila* bisher hingegen keine Akkumulation von Lgd an vergrößerten Endosomen und bisher wurde eine zytoplasmatische Lokalisation für Lgd beschrieben (Troost et al., 2012). Allerdings zeigen *in vitro* Analysen ebenfalls, dass Lgd über die C2 Domäne an Phosphatidylinositol-Phosphate binden kann, welche in Membranen weit verbreitet sind (Gallagher und Knoblich, 2006). An diese binden unter anderem auch ESCRT-Untereinheiten am Endosom. Allerdings zeigt in wildtypischen Zellen auch CHMP4B eine zytoplasmatische Lokalisation und keine erkennbare Kolokalisation mit endosomalen Markern (Drusenheimer et al., 2015). Neue Ergebnisse dieser Arbeitsgruppe weisen darauf hin, dass bei Überexpression von Shrub-GFP in *Drosophila* Lgd mit diesem an vergrößerten Endosomen kolokalisiert (unveröffentlicht).

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass CC2D1A und CC2D1B an spätendosomalen Kompartimenten lokalisieren. In *Vps4a^{+/-};Vps4b^{+/-}* Zellen ist eine Lokalisation von CC2D1A und CHMP4B an vergrößerten, LAMP1 positiven Endolysosomen zu erkennen. Diese Lokalisation von CC2D1A an vergrößerten Endolysosomen ist auch in *Cc2d1b^{-/-};Vps4a^{+/-};Vps4b^{+/-}* Zellen zu beobachten (Abb.2.1.11). Dies weist darauf hin, dass CC2D1A zumindest zum Teil oder kurzzeitig an spätendosomalen Kompartimenten lokalisiert und im Zuge der Ablösung des ESCRT-III Komplexes durch VPS4 entfernt wird, also „upstream“ von VPS4 wirken. Analysen der subzellulären Lokalisation durch Zellfraktionierung zeigten, dass sowohl in wildtypischen als auch in *Vps4a^{+/-};Vps4b^{+/-}* MEF Zellen beide CC2D1 Proteine sowohl in der Zytoplasmafraktion als auch in der Membranfraktion vorkommen. CHMP4B konnte ebenfalls sowohl in wildtypischen MEF-Zellen und in *Vps4a^{+/-}*

; *Vps4b*^{+/-} MEF Zellen in beiden Fraktionen nachgewiesen werden. Es konnte bei diesen Untersuchungen allerdings nicht zwischen endosomalen und anderen Membranen unterschieden werden (Drusenheimer et al., 2015). Möglicherweise können die Antikörper für CC2D1A und CHMP4B die Proteine in wildtypischen Bedingungen nicht erkennen. Dies könnte daran liegen, dass Epitope, welche die Antikörper binden bei der Bindung der Proteine an die Membran verdeckt werden. Außerdem könnten bei der Polymerisation von CHMP4B weitere Epitope unzugänglich sein und zudem könnte der vergleichsweise große VPS4 Komplex diese zusätzlich verdecken. Auch eine nur kurze Verweildauer der Proteine an der Membran könnte der Grund sein, warum diese nicht detektiert werden können. Möglicherweise können sie daher erst bei einer erhöhten Konzentration an der Membran wie in *Vps4a*^{+/-}; *Vps4b*^{+/-} MEF Zellen detektiert werden und sonst nur im Zytoplasma.

Die Überexpression von CHMP4A, CHMP4B oder CHMP4C führt ebenfalls zu stark vergrößerten, spätendosomalen Kompartimenten und zu einer Akkumulation von endogenem CC2D1A (Abb.2.2.6). Die Koexpression sowohl von CC2D1A als auch CC2D1B mit CHMP4 führt ebenfalls zu einer Kolokalisation in spätendosomalen Kompartimenten. Die CC2D1 Proteine kolokalisieren ebenfalls in Koexpression mit CHMP1, CHMP2, CHMP5 und CHMP7 (Anhang Abb.8.5 und Abb.8.6). Dies weist darauf hin, dass CC2D1A und CC2D1B durch die Assemblierung von CHMP Proteinen an Endosomen rekrutiert werden. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass durch die Überexpression der CHMP Proteine fehlerhafte Endolysosomen entstehen an welchen die CC2D1 Proteine akkumulieren. Exprimiertes CHMP7 akkumuliert zudem am endoplasmatischen Retikulum. Die Kolokalisation der CC2D1 Proteine mit CHMP7 weist darauf hin, dass die Rekrutierung von CC2D1A und CC2D1B nicht an Endosomen gebunden ist. Möglicherweise können sie überall dort hin rekrutiert werden, wo es zu einer ESCRT-III Assemblierung kommt. Einen weiteren Hinweis darauf, dass CC2D1A und CC2D1B „upstream“ von VPS4 wirken, geben die Ergebnisse zur Koexpression der CC2D1-CHMP4 FRET Paare mit CHMP5 und VPS4B. Die Interaktion von CC2D1B mit CHMP4B und CHMP4C wird durch die Koexpression von CHMP5 oder VPS4B vollständig verhindert. Dies weist darauf hin, dass bei Bindung von VPS4B an CHMP4B und CHMP4C CC2D1B nicht mehr an diese binden kann. Dies könnte auch an einer höheren Bindeaffinität zwischen VPS4B und den CHMP4 Proteinen liegen. Für CC2D1A lässt sich dieser Effekt hingegen nicht zeigen. Möglicherweise wäre hier die Koexpression von VPS4A nötig oder der Mechanismus unterscheidet sich von CC2D1A zu CC2D1B.

Zusammengefasst weisen die Ergebnisse darauf hin, dass CC2D1A und CC2D1B im Zuge der Assemblierung des ESCRT-III Komplexes an die endosomale Membran rekrutiert (Abb.3.1 I-II). Wird der ESCRT-III Komplex dann durch VPS4 wieder von der endosomalen Membran entfernt, werden die CC2D1 Proteine ebenfalls wieder von dieser gelöst (Abb.3.1).

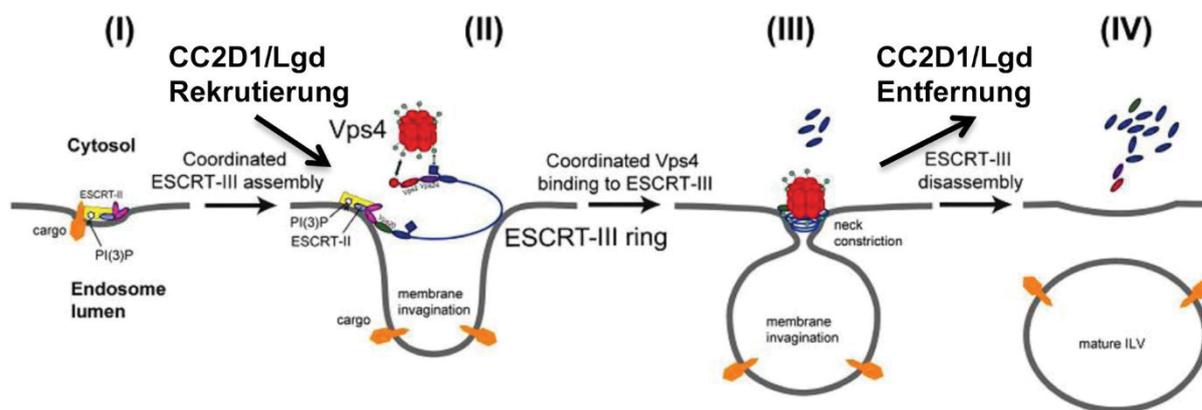


Abb.3.1 Schematische Darstellung der ILV Bildung durch die ESCRT-Komplexe und der Rekrutierung und Entfernung der CC2D1/Lgd Proteine dabei. Die Assemblierung des ESCRT-III Komplexes (I-II) führt zu einer Rekrutierung der CC2D1/Lgd Proteine an der endosomalen Membran. Durch die Entfernung des ESCRT-III Komplexes von der endosomalen Membran werden auch die CC2D1/Lgd Proteine von dort wieder entfernt (III-IV) (modifiziert aus Adell et al., 2014).

3.3 Struktur/Funktionsanalyse der Lokalisation und Interaktion von CC2D1A und CC2D1B.

Bisherige Analysen der Funktion der Domänen der CC2D1 Proteine fokussierten sich vor allem auf die DM14 Domänen und ihre Bedeutung für die Interaktion mit CHMP4B. Die Interaktion der CC2D1 Proteine mit CHMP4B wurde dabei *in vitro* gezeigt (Usami et al., 2012). Die Bedeutung der DM14 Domänen für die Interaktion wurde *in vitro* nur mit Fragmenten analysiert (Martinelli et al., 2012; Usami et al., 2012). In *Drosophila* wurden Rettungsexperimente durchgeführt, welche die Bedeutung der DM14 Domänen und der C2 Domäne für die Funktion von Lgd *in vivo* aufzeigen (Troost et al., 2012). Des Weiteren wurde auch gezeigt, dass diese Domänen der CC2D1 Proteine auch bei einer Expression in *Drosophila* für die Rettung des *lgd* Phänotyps benötigt werden. Durch FRET-APB Messungen wurde in dieser Arbeit erstmals die Funktion einzelner Domänen auf die Interaktion in lebenden Zellen untersucht. Dabei wurden gezielt nur einzelne Domänen deletiert und nicht nur einzelne Domänen exprimiert. Außerdem wurden nicht nur die DM14 Domänen oder die C2 Domäne untersucht. So konnte ebenfalls der Einfluss der Domänen auf die Lokalisation untersucht werden. Dadurch konnten in dieser Arbeit bisher eine nicht beschriebene Funktionen des N-Terminus und des verlängerten C-Terminus identifiziert werden, die Bedeutung von DM14 und C2 Domänen in lebenden Zellen genauer analysiert und bisher nicht beschriebene Interaktionspartner identifiziert werden.

3.3.1 CC2D1A und CC2D1B interagieren mit CHMP4, CHMP5 und CHMP7 und ihre Lokalisation wird von diesen beeinflusst.

CC2D1A und CC2D1B sind in Säugerzellen sowohl endogen als auch in Überexpression zytoplasmatisch lokalisiert (Drusenheimer et al., 2015; Dissertation Katharina Schulz, 2015). Das *Drosophila* Ortholog Lgd ist ebenso im Zytoplasma lokalisiert (Troost et al., 2012). Sowohl in Säugern als auch in *Drosophila* konnte gezeigt werden, dass die Proteine der CC2D1/Lgd Familie direkt mit einer der Hauptuntereinheiten des ESCRT-III Komplexes, CHMP4/Shrub interagieren (Tsang et al., 2006; Troost et al., 2012; Usami et al., 2012; Martinelli et al., 2012). In Säugern wurde die Interaktion von CC2D1A und CC2D1B mit CHMP4B durch *in vitro* Experimente und die Interaktion von CC2D1A und CHMP4B in Zellkultur funktional durch HIV Knospungs-Experimente gezeigt (Usami et al., 2012; Martinelli et al., 2012). In *Drosophila* wurde die direkte Interaktion von Lgd und Shrub *in vitro* gezeigt, sowie die genetische und funktionale Interaktion *in vivo* (Troost et al., 2012).

Durch PLA Experimente konnte dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass CC2D1A und CHMP4B auf endogenem Level in wildtypischen Zellen miteinander interagieren. Zudem zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit erstmals, dass in Überexpression sowohl CC2D1A als auch CC2D1B in lebenden Zellen mit CHMP4A, CHMP4B und CHMP4C interagieren (Abb.3.2). Weiter wurden bisher nicht beschriebene Interaktionspartner identifiziert, die Hilfs-ESCRT Proteine CHMP5 und CHMP7 (Abb.3.2.). Erstmals wurde auch gezeigt, dass sowohl CC2D1A als auch CC2D1B Homo- und Heterodimere, möglicherweise sogar Oligomere bilden können. *In vitro* Experimente mit trunkiertem CC2D1A, CC2D1B und CHMP4B weisen auf eine 1:1 Stöchiometrie der Interaktion zwischen den CC2D1 Proteinen und CHMP4B hin (Martinelli et al., 2012). Aufgrund der vielen, verschiedenen in dieser Arbeit nachgewiesenen Interaktionen sind allerdings komplexere Strukturen denkbar. Mehrere CC2D1A und CC2D1B Proteine könnten mit mehreren, verschiedenen CHMP Proteinen Komplexe bilden. Beide CC2D1 Proteine interagieren möglicherweise indirekt mit CHMP1 oder es kommt durch die gemeinsame Überexpression zu einer Interaktion. Eine direkte Interaktion konnte durch *in vitro* Versuche nicht nachgewiesen werden (Masterarbeit Angie Lindner, 2013). CHMP1 ist ein Hilfs-ESCRT Protein welches einen Komplex mit IST1 bildet. Dieser bindet den ESCRT-III Komplex an der endosomalen Membran (Azmi et al., 2008; Rue et al., 2008). Eine Assoziation mit den CC2D1 Proteinen beispielsweise über CHMP4 wäre dort also möglich. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die CC2D1 Proteine möglicherweise Komplexe mit ESCRT-Einheiten bilden können. Mit CHMP2, LIP5 und VPS4B interagieren die CC2D1 Proteine hingegen nicht (Abb.3.2). Die CC2D1 Proteine interagieren also nicht generell mit allen ESCRT-III Untereinheiten oder Hilfs-ESCRTs.

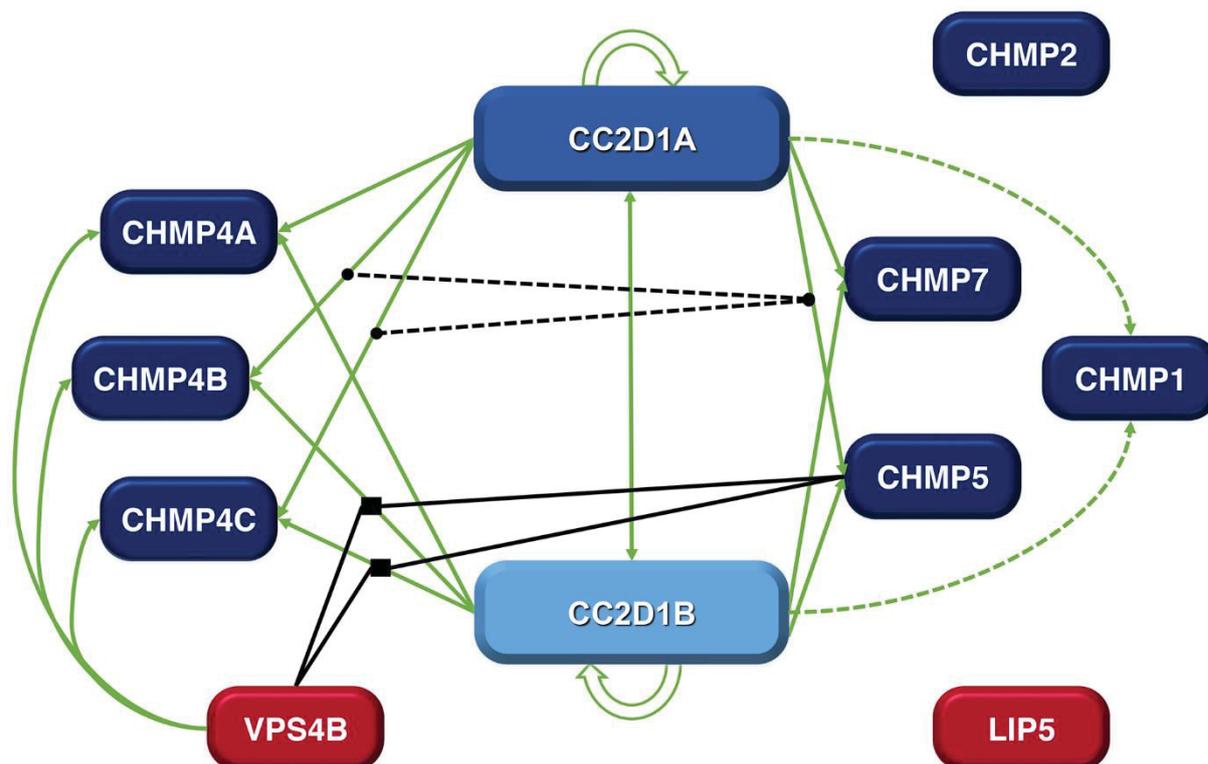


Abb.3.2 Schematische Darstellung des Interaktionsnetzwerks der CC2D1 Proteine. Die CC2D1 Proteine interagieren mit CHMP4A, CHMP4B, CHMP4C, CHMP5 und CHMP7, sowie mit sich selbst und miteinander (grüne Pfeile). Eine indirekte Interaktion ist mit CHMP1 möglich (gestrichelter, grüner Pfeil). Sie interagieren nicht mit CHMP2, LIP5 und VPS4B. Während VPS4B mit den CHMP4 Proteinen interagieren kann, hemmt seine Koexpression die Interaktion von CC2D1B mit CHMP4B und CHMP4C (schwarze Linie). Selbigen Effekt hat die Koexpression von CHMP5 auf diese Interaktionen (schwarze Linie, schwarzes Viereck). Eine Konkurrenz besteht zwischen den Interaktionen von CC2D1A mit CHMP4B, CHMP4C und CHMP5 (gestrichelte, schwarze Linie).

Die Lokalisation der CC2D1 Proteine wird durch die fünf Interaktionspartner stark beeinflusst. Sowohl überexprimiertes CC2D1A als auch überexprimiertes CC2D1B ist zytoplasmatisch verteilt, CC2D1B lokalisiert zusätzlich schwach im Zellkern. Dies ist sowohl in wildtypischen NIH3T3 Zellen als auch in *Cc2d1a^{-/-};Cc2d1b^{-/-}* MEF Zellen der Fall. Die Expression der CHMP Interaktionspartner führt zu stark vergrößerten, spätendosomalen Kompartimenten, im Fall von CHMP7 auch zu vergrößerten Strukturen des endoplasmatischen Retikulums. Endogenes CC2D1A kolokalisiert in diesen Strukturen mit den drei exprimierten CHMP4 Proteinen. Beide CC2D1 Proteine kolokalisieren in Koexpression mit den CHMP Interaktionspartnern an den vergrößerten, endosomalen Strukturen, welche durch Expression letzterer entstehen. Umgekehrt hat die Expression von CC2D1A und CC2D1B keinen Einfluss auf die Lokalisation von koexprimierten CHMP-Proteinen und auch nicht auf die Lokalisation von endogenem CHMP4B. Die FRET-APB Messungen zeigen, dass die stärkste Interaktion an diesen vergrößerten endosomalen Strukturen stattfindet. Eine Interaktion im Zytoplasma kann allerdings nicht völlig ausgeschlossen werden. Allerdings findet diese dort allenfalls zu einem sehr geringen Anteil statt. Die Ergebnisse weisen also insgesamt darauf hin, dass die

CC2D1-Proteine durch die ESCRT-Proteine über einen unbekanntem Mechanismus an Endosomen rekrutiert werden und dort mit ihnen interagieren.

Abgesehen von der zusätzlichen, schwachen Lokalisation von CC2D1B im Zellkern kann kein Unterschied der Lokalisation oder Interaktion von CC2D1A und CC2D1B beobachtet werden. Unterschiede gibt es hingegen zwischen den CHMP Proteinen. Während überexprimiertes CHMP4A in endosomalen Kompartimenten akkumuliert, welche sowohl RAB7 als auch LAMP1 positiv sind, sind die Kompartimente, in welchen CHMP4B und CHMP4C akkumulieren, lediglich LAMP1 positiv, während RAB7 wildtypisch verteilt ist. CHMP5 akkumuliert in stark vergrößerten RAB7 positiven Kompartimenten, welche zum Teil auch LAMP1 positiv sind. Exprimiertes CHMP7 akkumuliert zum Teil jeweils an RAB7, LAMP1 und CALNEXIN (Marker für das endoplasmatische Retikulum) positiven Strukturen. Da RAB7 ein Marker für späte Endosomen und MVBs ist und LAMP1 ein Marker für Endolysosomen und Lysosomen, weist dies darauf hin, dass diese ESCRT-Proteine entweder an Endosomen von unterschiedlichem Reifungsgrad rekrutiert werden oder der jeweilige Defekt durch die Überexpression in unterschiedlichen Stadien der Reifung auftritt. In der Hefe wurde beschrieben, dass Chm7 (CHMP7) am endoplasmatischen Retikulum lokalisiert, die Ergebnisse in dieser Arbeiten zeigen, dass dies in Säugerzellen ebenfalls, zumindest zum Teil der Fall ist. Das bedeutet, dass die CC2D1 Proteine durch CHMP7 auch an das ER rekrutiert werden könnten. Dies wurde bisher noch für kein Protein der CC2D1 Familie beschrieben. Möglicherweise können die CC2D1 Proteine also überall dorthin rekrutiert werden, wo der ESCRT-III Komplex und die Hilfs-ESCRTs lokalisieren.

3.3.2 Die C2 Domäne hat eine andere Funktion in Säugern als in *Drosophila*.

Die bisher veröffentlichten Struktur- und Funktionsanalysen beschäftigten sich vor allem mit den DM14 Domänen und der C2 Domäne. Dabei zeigten sich Unterschiede zwischen *Drosophila* und den Säuger Proteinen. In *Drosophila* führt der Verlust der C2 Domäne zu einer Lokalisation im Zellkern. Durch diese Fehllokalisierung kann ein Lgd^{ΔC2}-Konstrukt den *lgd* mutanten Phänotyp nicht mehr retten, durch eine künstlich angefügtes „Nuclear export signal“ ist eine Rettung wieder möglich. Zudem scheint die C2 Domäne in *Drosophila* für die Proteinstabilität wichtig zu sein (Troost et al., 2012). In HeLa Zellen führt die Überexpression von CC2D1A^{ΔC2} und CC2D1B^{ΔC2} zu großen, möglicherweise spätendosomalen Strukturen, an deren Membran die Konstrukte lokalisieren. Auch die Überexpression dieser Konstrukte in *Drosophila* zeigt keine Kernlokalisierung wie bei Lgd^{ΔC2} aber auch nicht den endosomalen Defekt (Dissertation Katharina Schulz, 2015). Diese Strukturen treten bei Expression der ΔC2 Konstrukte in *Cc2d1a*^{-/-}; *Cc2d1b*^{-/-} MEF Zellen und wildtypischen NIH3T3 Zellen ebenfalls auf. Zudem zeigt die Analyse der Ultrastruktur von wildtypischen MEF Zellen, in denen CC2D1B^{ΔC2} exprimiert wurde, dass es sich um sehr große „Class E“ ähnliche Strukturen handelt, mit starken Membraneinlagerungen. Da sowohl CC2D1A^{ΔC2} als auch CC2D1B^{ΔC2} mit den CHMP Proteinen in

Überexpression interagieren können, liegt dem beobachteten Defekt möglicherweise eine falsch regulierte oder lokalisierte Interaktion zugrunde, wodurch es zu einem dominant-negativen Effekt kommt. So könnte ein dominant negativer Effekt durch die $\Delta C2$ Konstrukte auf das ESCRT-System wirken. Abseits dieser Akkumulationen können sowohl CC2D1A ^{$\Delta C2$} als auch CC2D1B ^{$\Delta C2$} noch durch koexprimiertes CHMP4B oder die anderen CHMP Interaktionspartner rekrutiert werden, genau wie die vollständigen CC2D1 Proteine. Für diese Rekrutierung wird die C2 Domäne also nicht benötigt und auch eine Lokalisation ähnlich den vollständigen Proteinen ist weiterhin zumindest teilweise möglich. Auch können beide $\Delta C2$ Konstrukte weiter mit allen Interaktionspartnern an den spät endosomalen Kompartimenten interagieren. In *Drosophila* kann durch eine erhöhte Expression von Lgd ^{$\Delta C2$} durch das Einbringen von vier oder mehr Genkonstrukten der *lgd* mutante Phänotyp teilweise gerettet werden (Troost et al., 2012). Die C2 Domänen in den CC2D1 Proteinen haben in Säugern also eine veränderte Funktion im Vergleich zu Lgd. In *Drosophila* ist die C2 Domäne von Lgd wichtig für die korrekte Lokalisation. Ein solcher Lokalisationsdefekt kann bei den CC2D1 Proteinen durch den Verlust der C2 Domäne nicht beobachtet werden. Dafür kommt es durch Überexpression von $\Delta C2$ Konstrukten zu Defekten im endosomalen Transportweg, welche auf einen dominant-negativen Einfluss des Deletionskonstrukts zurückzuführen sein könnte. Dieser Defekt ist in *Drosophila* bei Überexpression von Lgd ^{$\Delta C2$} nicht zu beobachten. Die C2 Domänen der CC2D1 Proteine scheinen in Säugern also höchstens zum Teil für die Lokalisation benötigt zu werden, haben möglicherweise zusätzlich eine regulatorische Funktion.

3.3.3 Verschiedene DM14 Domänen von CC2D1B vermitteln die Interaktion mit CHMP Interaktionspartnern.

Die Funktion der DM14 Domänen besteht in der Interaktion mit CHMP Proteinen. Bisherige Untersuchungen zeigten, dass *in vitro* ein Fragment aus jeweils einer DM14 Domäne von CC2D1A zusammen mit dem Bereich zur nächsten DM14 Domäne für die Interaktion mit CHMP4B ausreicht (Martinelli et al., 2012; Usami et al., 2012). In *Drosophila* werden hingegen mindestens zwei DM14 Domänen für die Rettung des *lgd* mutanten Phänotyps benötigt (Troost et al., 2012). Es besteht also entweder ein Unterschied zwischen den Organismen oder zwischen der reinen *in vitro* Interaktion zur *in vivo* Funktionalität. Die Ergebnisse in dieser Arbeit zeigen, dass bei FRET-Experimenten in lebenden Zellen der Verlust aller DM14 Domänen in CC2D1A nicht zu einem Verlust der Interaktion mit den CHMP Interaktionspartnern führt. Möglicherweise sind die Interaktionen in lebenden Zellen komplexer als bisher vermutet. So könnte es beispielsweise zu einer bisher nicht bekannten Komplexbildung kommen, wodurch immer noch eine Interaktion gemessen wird. Die Rekrutierung an die vergrößerten endosomalen Strukturen ist durch den Verlust der DM14 Domänen nicht gestört. Eine Komplexbildung zum Beispiel über die C2 Domäne dort mit ESCRT-Untereinheiten oder unbekanntem Interaktionspartnern könnte also weiterhin möglich sein. Auch die endogenen CC2D1

Proteine in den NIH3T3 Zellen könnten einen Einfluss haben, genauso wie die endogenen CHMP Interaktionspartner, dies ist allerdings aufgrund der starken Überexpression der FRET-Paare unwahrscheinlich. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass durch die starke Überexpression sich die FRET-Paare, da sie noch korrekt lokalisieren so nahe kommen, dass ein falsch positives FRET-Signal gemessen wird. Allerdings ist die ermittelte FRET-Effizienz dafür eigentlich zu hoch. In anderen Fällen, wie zum Beispiel der *mut2* Mutation in CHMP4 Proteine reicht bereits der Austausch von drei Aminosäuren zu einem mit dieser Methode messbaren Verlust der Interaktion. CC2D1B^{ADM14} kolokalisiert ebenfalls weiterhin mit den CHMP Interaktionspartnern. Allerdings kann CC2D1B^{ADM14} im Gegensatz zu CC2D1A^{ADM14} nicht mehr mit CHMP4B, CHMP4C oder CHMP7 interagieren, während die Interaktion mit CHMP4A und CHMP5 nicht beeinflusst wird. Dies zeigt, dass die Rekrutierung der CC2D1 Proteine durch die Akkumulation der CHMP Proteine ausgelöst wird, jedoch nicht durch eine direkte Interaktion mit diesen vermittelt wird. Die Kolokalisation ist auch in *Cc2d1a*^{-/-}; *Cc2d1b*^{-/-} Zellen zu beobachten, ein Einfluss der endogenen CC2D1 Proteine in den NIH3T3 Zellen kann also ausgeschlossen werden. Da diese Lokalisation an Endolysosomen von CC2D1B auch ohne eine direkte Interaktion stattfindet, kann ebenfalls ausgeschlossen werden, dass die Interaktion im Zytoplasma stattfindet und die Interaktionspartner dann gemeinsam an das Endosom lokalisieren. Wäre dies der Fall, dürfte es zu keiner Kolokalisation am Endosom mehr kommen.

Die genauere Analyse, welche der DM14 Domänen in CC2D1B für die Interaktion mit CHMP4B, CHMP4C und CHMP7 benötigt werden zeigt, dass es eine Spezialisierung der Domänen gibt. Während die ersten beiden DM14 Domänen für die Interaktion mit CHMP4C benötigt werden, sind es die dritte und vierte Domäne für die Interaktion mit CHMP4B. Die vierte DM14 Domäne allein reicht für die Interaktion nicht aus. Auch eine andere Kombination von DM14 Domänen durch Deletion von erster und dritter, zweiter und vierter oder zweiter und dritter DM14 Domäne ermöglicht keine Interaktion. Dies zeigt, dass spezifisch die jeweiligen DM14 Domänen benötigt werden. Außerdem wird hier ein Unterschied zu den *in vitro* Interaktionsstudien deutlich, wo bereits eine DM14 Domäne für die Interaktion mit CHMP4B ausreicht (Usami et al., 2012; Martinelli et al., 2012). Es ist also wahrscheinlich, dass, wie die *in vivo* Untersuchungen in *Drosophila* zeigen (Troost et al., 2012), in der lebenden Zelle zwei DM14 Domänen für die Funktion benötigt werden. Weitere Untersuchungen der Arbeitsgruppe weisen ebenfalls darauf hin, dass mindestens zwei DM14 Domänen benötigt werden, wobei jedoch immer die erste oder dritte DM14 Domäne darunter sein muss (Christine Tibbe, unveröffentlicht). Aufgrund der Spezifität der DM14 Domänen bei der Interaktion, könnte in Säugern *in vivo* sogar schon der Verlust einer DM14 Domäne die Funktionalität einschränken, da die Interaktion mit CHMP4B oder CHMP4C verloren gehen könnte. Zudem bedeutet dies, dass CHMP4B und CHMP4C nicht um die gleichen DM14 Domänen von CC2D1B konkurrieren. CC2D1B kann also möglicherweise beide gleichzeitig binden. Mit CHMP7 kann CC2D1B sowohl mit nur den ersten beiden als auch den letzten beiden DM14 Domänen interagieren, hier ist keine Präferenz erkennbar. CHMP7 ist jedoch größer als beispielsweise CHMP4 und besitzt zwei Snf7-Domänen, während

andere CHMP Proteine nur eine besitzen (Horii et al., 2006). CC2D1B könnte also auch über beide Domänen mit jeweils zwei DM14 Domänen an ein CHMP7 binden oder auch zwei CHMP7 Proteine gleichzeitig. Des Weiteren wäre eine Bindung an CHMP7 und CHMP4B oder CHMP7 und CHMP4C gleichzeitig denkbar. Die *in vitro* gezeigte 1:1 Stöchiometrie der Interaktion von CC2D1A und CHMP4B (Martinelli et al., 2012) würde dem nicht widersprechen. Möglicherweise kann CC2D1B je nachdem wohin, wie und von wem es rekrutiert wird, eine angepasste Funktion bei der Bildung von ESCRT-Komplexen ausführen.

Die Analyse der Interaktion von *Drosophila* Lgd mit Shrub und Chmp5 zeigt, dass es auch in Säugerzellen mit diesen interagieren kann. Für die Interaktion mit Shrub reichen die dritte und vierte DM14 Domäne von Lgd aus, vergleichbar mit der Interaktion von CC2D1B mit CHMP4B. Allerdings ist die FRET-Effizienz dieser Interaktion sehr niedrig. Dies bedeutet, dass entweder die Stereometrie der Interaktion stark verändert ist oder weniger Proteine miteinander interagieren. Eine verringerte Affinität könnte hierfür ebenso der Grund sein. *In vivo* Rettungsexperimente in *Drosophila* zeigten, dass ein Konstrukt, welches nur noch die dritte und vierte DM14 Domäne besitzt, in einem sensitivierten genetischen Hintergrund die schwächste Rettung zeigt (Troost et al., 2012). Eine geschwächte Interaktion, wie es die FRET-Ergebnisse zeigen, könnte dafür der Grund sein. In dem sensitivierten Hintergrund ist zusätzlich zum *lgd* Ausfall *shrb* heterozygot mutant. Weniger Shrub und eine verringerte Affinität des Lgd^{ADM14(1-2)} Konstrukts zu diesem, könnte zu einer abgeschwächten Rettung des Phänotyps führen. Zudem weist dies darauf hin, dass die DM14 Domänen in *Drosophila* nicht auf bestimmte Interaktionspartner spezialisiert sind. Eine Interaktion mit Chmp5 ist beim Fehlen der ersten und zweiten DM14 Domäne hingegen nicht mehr möglich. Um zu überprüfen ob Lgd mit Chmp5 über andere DM14 Domänen interagiert, müssten weitere Deletionskonstrukte generiert und getestet werden. Ebenso könnte dann überprüft werden, ob die FRET-Effizienz der Interaktion mit Shrub vergleichbar zu den Ergebnissen der Rettungsexperimente höher ausfällt. Grundsätzlich sind mit FRET-APB allerdings nur „ja oder nein“ Aussagen zu Interaktionen möglich. Deutliche Veränderungen können nur Hinweise auf Veränderungen der Affinität geben. Eine Veränderung der FRET-Effizienz kann beispielsweise auf eine veränderte Anzahl an interagierenden Proteinen zurückzuführen sein. Allerdings verändert sich die FRET-Effizienz ebenso bei einem veränderten Abstand der Chromophore, zum Beispiel bei der Deletion von Domänen. Wäre die FRET-Effizienz der Interaktion bei einem Deletionskonstrukt, bei welchem zwei andere DM14 Domänen fehlen, allerdings so hoch wie beim vollständigen Lgd, wäre dies ein deutlicher Hinweis auf Unterschiede der DM14 Domänen. Diesen Hinweisen kann dann mit Methoden, die auf die Analyse von Interaktionsaffinitäten ausgelegt sind, wie z.B. „Microscale Thermophoresis“ (MST) nachgegangen werden.

3.3.4 Konservierte basische Aminosäuren in CC2D1B und Lgd werden für die Interaktion mit CHMP Interaktionspartnern benötigt.

Der Vergleich der Aminosäuresequenz aller DM14 Domänen von humanen und murinen CC2D1 Proteinen und Lgd zeigt, dass mehrere Aminosäuren vollständig konserviert sind sowie einige, bei denen die Ladung konserviert ist (Abb.2.2.16). Da eine hohe Konservierung von Aminosäuren auf eine essentielle Funktion hinweist, wurde die Wichtigkeit mehrerer Aminosäuren für die Interaktion untersucht. Der Austausch von sieben konservierten Aminosäuren in einem CC2D1A Fragment, welches aus der dritten DM14 Domäne und ca. 40 darauf folgenden Aminosäuren bestand, führte zu einem Verlust der Interaktion mit CHMP4B *in vitro* (Martinelli et al., 2012).

Die Experimente in dieser Arbeit zeigen, dass für die Interaktion von CC2D1B mit CHMP4B die dritte und vierte DM14 Domäne zusammen benötigt werden. Die vierte allein reicht nicht aus. Zudem kann CC2D1B^{ADM14(1-2)} mit CHMP7 ebenfalls noch interagieren. Führt der Austausch von Aminosäuren in der dritten DM14 Domäne zu einem Funktionsverlust dieser, sollte die Interaktion also verloren gehen. Da bei Lgd die dritte und vierte DM14 Domäne ebenfalls für die Interaktion mit Shrub ausreichen, wurden die analogen Aminosäuren sowohl bei CC2D1B als auch bei Lgd in einem Δ DM14(1-2) Konstrukt ausgetauscht. Parallel wurden Rettungsexperimente in *Drosophila* durchgeführt (Bachelorarbeit Astrid Wienigk, 2015; Christine Tibbe, unveröffentlicht). Untersucht wurden ein vollständig konserviertes Lysin und Prolin sowie ein konserviertes Arginin in geringem Abstand zu dem Lysin (in der zweiten und vierten DM14 Domäne von Lgd handelt es sich um ein Lysin anstelle des Arginins). Die basischen Aminosäuren wurden durch Glutaminsäure ausgetauscht, um die Ladung umzukehren, das Prolin durch ein Alanin. Bei CC2D1B zeigt sich, dass der Austausch einer der beiden basischen Aminosäuren zu einem vollständigen Verlust der Interaktion mit CHMP4B führt. Werden beide zusammen ausgetauscht, wird die Interaktion allerdings wieder gerettet (Abb.2.2.17). Grundsätzlich weist dies darauf hin, dass die beiden Aminosäuren essentiell für die Interaktion mit CHMP4B sind. Allerdings scheint nur eine gegensätzliche Ladung beider ein Problem darzustellen, während auch eine einheitliche, umgekehrte Ladung eine Interaktion möglich macht. CHMP4B besitzt große basische und große saure Bereiche an seiner Oberfläche, möglicherweise wird der Kontakt bei der Interaktion bei dem doppelt mutierten Konstrukt also verschoben (Anhang Abb.8.4). Ob diese Interaktion funktional ist kann mit dieser Methode nicht überprüft werden. Vergleichbar ist das Ergebnis bei der Interaktion von Lgd mit Shrub. Allerdings ist hier aufgrund der niedrigen FRET-Effizienz der Interaktion des Ausgangskonstrukts Lgd^{ADM14(1-2)} mit Shrub die Interpretation schwieriger (Abb.2.2.18). Es ist kein eindeutiger Verlust der Interaktion durch Austausch der beiden basischen Aminosäuren zu erkennen, verglichen mit der Negativkontrolle Lgd^{ADM14(1-3)}. Allerdings steigt auch hier die FRET-Effizienz deutlich, wenn beide basischen Aminosäuren zusammen ausgetauscht werden. Die Rettungsexperimente zeigen, dass weder die Einzelmutationen noch die Doppelmutation den *lgd* mutanten Phänotyp retten können (Bachelorarbeit Astrid Wienigk, 2015; Christine Tibbe, unveröffentlicht). Dies weist darauf hin, dass die beiden

basischen Aminosäuren auch in Lgd essentiell für die Funktion sind und wahrscheinlich für die Interaktion mit Shrub benötigt werden. Auch weist dies darauf hin, dass die Interaktion beim Austausch beider Aminosäuren gleichzeitig nicht funktional ist. Bei der Interaktion der mutierten Konstrukte von CC2D1B^{ADM14(1-2)} mit CHMP7 ist die Interpretation ähnlich schwierig, wie bei Lgd und Shrub. Die FRET-Effizienz der Interaktion des Ausgangskonstrukts ist bereits sehr niedrig. Auch hier zeigen die beiden einzeln mutierten basischen Aminosäuren kaum einen Effekt, bei dem Austausch des Lysins könnte von einer Tendenz zu einem Interaktionsverlust gesprochen werden. Allerdings liegen die Werte der FRET-Effizienz deutlich über der Negativkontrolle. Werden beide Aminosäuren zusammen ausgetauscht, steigt die FRET-Effizienz auf den Wert der Interaktion des vollständigen CC2D1B. Auch hier könnte es zu einer Verschiebung der Kontaktfläche kommen, ähnlich wie bei der Interaktion mit CHMP4B und der Interaktion der *Drosophila* Orthologe Lgd und Shrub zu vermuten ist. Insgesamt lässt sich schließen, dass CC2D1B und Lgd über basische Aminosäuren mit CHMP4B bzw. Shrub interagieren. Bei CC2D1B sind das Arginin 416 und das Lysin 419 dabei die zentralen Aminosäuren für die Interaktion. Bei Lgd sind die analogen Aminosäuren Arginin 393 und Lysin 396 möglicherweise nicht die zentralen Aminosäuren für die Interaktion. Es sollten daher zukünftig noch weitere benachbarte und konservierte basische Aminosäuren hinsichtlich ihrer Funktion überprüft werden.

Das konservierte Prolin am Ende der dritten DM14 Domäne von CC2D1B (P440) und Lgd (P417) wird für die Interaktion mit CHMP4B bzw. Shrub nicht benötigt. Auch ist kein eindeutiger Einfluss auf die Interaktion mit CHMP7 erkennbar (Abb.2.2.17 und 2.2.18). Die Ergebnisse in *Drosophila* zeigen aber, dass keine Rettung mehr möglich ist bei einem Austausch zu Alanin (Christine Tibbe, unveröffentlicht). Dies bedeutet, dass dieses Prolin essentiell für die Funktion von Lgd und vermutlich auch von CC2D1B ist, ohne für die Interaktion mit einem der bekannten Interaktionspartner benötigt zu werden. Der Austausch des auf das Prolin folgende konservierte Valin zu Threonin in Lgd erhöht die FRET-Effizienz der Interaktion mit Shrub, dies ist bei der Doppelmutation von Prolin und Valin ebenfalls so. In *Drosophila* verbessert der Austausch des Valins zu Threonin die Rettung des *lgd* mutanten Phänotyps, die Rettungsfähigkeit der Doppelmutation liegt zwischen der der beiden Einzelmutationen. Dies weist auf eine bisher unbekannt Funktion dieses Bereichs hin. Denkbar wäre auch ein bisher unbekannter Interaktionspartner. Jede DM14 Domäne endet mit einer Prolin-reichen Sequenz, welche zum Teil von *Drosophila* bis zum Menschen hochkonserviert ist (Anhang Abb.8.7). Die dritte DM14 Domäne endet mit der Sequenz ELPVPPGF, wobei es sich um den am längsten hundertprozentig konservierten Abschnitt der CC2D1 Proteine handelt (Anhang Abb.8.7). Vergleicht man nur die Säugerorthologe, ist diese Sequenz noch um zwei Proline länger, ELPVPPGFPP (in *Drosophila* ELPVPPGF^{GP}). Prolin-reiche Interaktionsmotive sind weit verbreitet in Eukaryoten und vor allem in Mehrzellern (Übersicht in Kay et al., 2000). So interagieren die ebenfalls weit verbreiteten SH3 Domänen mit Prolin-reichen Motiven der Sequenz PxxP (Übersicht in Teyra et al., 2012). Auch im endosomalen Transportweg und bei den ESCRT Proteinen sind Interaktionen über

Prolin-reiche Motive, SH3 und WW Domänen weit verbreitet (Übersicht in Ren und Hurley, 2011; Xin et al., 2013). Es wäre daher denkbar, dass die CC2D1 Proteine bzw. Lgd über diese Prolin-reichen Motive mit bisher unbekanntem Interaktionspartnern interagieren. Möglicherweise wird über diese Interaktion gesteuert, welche DM14 Domänen für eine Interaktion exponiert werden, und welche Interaktion so möglich ist. Dies würde zu den Hinweisen passen, dass die CC2D1 Proteine funktionsabhängig auch zu verschiedenen Signalwegen und dem ESCRT-System rekrutiert werden und nicht direkt von den CHMP Proteinen selbst. Eine weitere Untersuchung dieser Prolin-reichen Sequenzen könnte neue Erkenntnisse über die Funktion der CC2D1 Proteine erbringen und möglicherweise auch bisher unbekanntem Interaktionspartnern aufzeigen.

3.3.5 In CHMP4 und Shrub werden unterschiedliche Aminosäuren für die Interaktion mit den CC2D1 Proteinen und Lgd benötigt.

Bei CC2D1B lässt sich eine Spezialisierung der DM14 Domänen auf verschiedene CHMP Interaktionspartner erkennen, durch welche eine spezifische Interaktion mit verschiedenen CHMP4 Proteinen und CHMP7 ermöglicht wird. Diese Spezialisierung ist in *Drosophila* möglicherweise in dieser Form nicht nötig, da es mit Shrub nur ein CHMP4 Ortholog gibt. Lgd interagiert also wahrscheinlich nur mit drei CHMP Proteinen, während CC2D1A und CC2D1B fünf CHMP Interaktionspartner haben. Bei der Mutation konservierter Aminosäuren lassen sich jedoch keine auffälligen Unterschiede zwischen CC2D1B und Lgd erkennen. Ein deutlicher Unterschied zwischen den Säuger CC2D1 Proteinen und *Drosophila* Lgd lässt sich jedoch erkennen, betrachtet man konservierte Aminosäuren in CHMP4 bzw. Shrub. In CHMP4B wurden drei Glutaminsäuren identifiziert, deren Austausch zu Arginin (mut2) in einem CHMP4B Fragment, bestehend aus den ersten beiden α -Helices die Interaktion mit einem Fragment aus der dritten DM14 Domäne von CC2D1A hemmt (Martinelli et al., 2012). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass vollständiges CC2D1A und auch vollständiges CC2D1B nicht mit vollständigem CHMP4B^{mut2} in lebenden Zellen interagieren können (Abb.2.2.27). Die gleiche Mutation in CHMP4C führt ebenfalls zu einem Verlust der Interaktion mit den CC2D1 Proteinen. Lgd kann jedoch weiterhin mit Shrub^{mut2} und CHMP4B^{mut2} interagieren. Da die FRET-Effizienz der Interaktion von Lgd mit den mut2 Varianten nicht von der FRET-Effizienz der Interaktion mit den wildtypischen Varianten abweicht, kann ein falsch-positives FRET-Signal ausgeschlossen werden. Bei einem falsch-positiven Signal wäre zumindest eine deutlich niedrigere FRET-Effizienz zu erwarten. Zudem zeigen sowohl diese, als auch die Ergebnisse der Mutationen von Aminosäuren in CC2D1B, dass bereits der Austausch einer einzelnen Aminosäure zu einem Signalverlust führt, wenn es durch den Austausch zu einem Interaktionsverlust kommt. Die FRET-Effizienz der Interaktion der CC2D1 Proteine mit Shrub^{mut2} sinkt hingegen stark, allerdings scheint die Interaktion nicht vollständig verhindert zu werden. Möglicherweise kommt es dadurch, dass die Lokalisation nicht verändert ist hier noch zu einem falsch-positiven Signal. Durch die

Überexpression und die konzentrierte Lokalisation in den endolysosomalen Kompartimenten wäre dies denkbar. Dies zeigt, dass es eine Veränderung im Interaktionsmechanismus und den daran beteiligten Aminosäuren von *Drosophila* zu den Säugern gibt. Die Ergebnisse in dieser Arbeit weisen darauf hin, dass in CC2D1B zwei basische Aminosäuren für die Interaktion benötigt werden, in CHMP4B drei saure. Es wäre daher möglich, dass genau diese Aminosäuren die Interaktion vermitteln. In *Drosophila* geschieht dies möglicherweise über andere geladene Aminosäuren oder möglicherweise wird ein größeres „Interface“ benötigt und die untersuchten Aminosäuren sind nur zum Teil beteiligt. Auch möglich wäre, dass die Aminosäuren in Lgd für andere Interaktionen, als mit Shrub essentiell benötigt werden, was den Verlust der Rettungsfähigkeit in *Drosophila* erklären würde (Bachelorarbeit Astrid Wienigk, 2015; Christine Tibbe, unveröffentlicht). Die Interaktion könnte also in Säugern auf weniger Aminosäuren begrenzt und damit auch spezialisiert worden sein. Innerhalb der CHMP4 Proteine werden durch die mut2 Mutation ebenfalls Unterschiede sichtbar. CHMP4A^{mut2} zeigt eine massive Veränderung in der Lokalisation und scheint zum Teil mit dem Zytoskelett assoziiert zu sein. CHMP4B^{mut2} und CHMP4C^{mut2} zeigen keine Veränderung der Lokalisation. Allerdings sind die vergrößerten Endolysosomen auch RAB7 positiv, während dieser Marker bei der Expression von wildtypischem CHMP4B und CHMP4C wildtypisch verteilt war. CC2D1A und CC2D1B interagieren zudem weiterhin mit CHMP4A^{mut2}, die FRET-Effizienz dieser Interaktionen steigt sogar deutlich. Die Interaktion zwischen den CC2D1 Proteinen und CHMP4A wird also durch andere Aminosäuren vermittelt als die mit CHMP4B oder CHMP4C. Schon dass die DM14 Domänen überhaupt für die Interaktion mit CHMP4A benötigt werden, kann nicht bestätigt werden. CHMP4A kommt im Gegensatz zu CHMP4B und CHMP4C allerdings auch nicht in allen Säugern, z.B. nicht in der Maus, vor und eine Funktion wurde bisher nicht beschrieben. Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe in *Drosophila* weisen darauf hin, dass Shrub^{mut2} und CHMP4B^{mut2} den *shrub* mutanten Phänotyp nicht retten kann. Durch die mut2 Mutation wird Shrub also funktionslos, möglicherweise kann es nicht mehr polymerisieren. Darauf weisen ebenfalls *in vitro* Ergebnisse mit dem *C.elegans* Ortholog Vps32 und *in vivo* Untersuchungen in Hefe hin, wo der Austausch einer der analogen Glutaminsäuren die Polymerisation und verhindert (Shen et al., 2014).

3.3.6 Der N-Terminus der CC2D1 Proteine hat eine regulatorische Funktion und beeinflusst die Lokalisation.

Eine Funktion des N-Terminus der CC2D1 Proteine vor der ersten DM14 Domäne wurde bisher ebenfalls nicht beschrieben. Für CC2D1A kann in dieser Arbeit eine Funktion bei der Lokalisation des Proteins gezeigt werden. Durch Deletion des N-Terminus lokalisiert ein Teil des Proteins auch im Zellkern. Ein solcher Effekt durch die Deletion des N-Terminus von CC2D1B kann nicht beobachtet werden, allerdings ist vollständiges CC2D1B bereits zum Teil im Zellkern lokalisiert. Die Rekrutierung beider CC2D1 Proteine an vergrößerten Endosomen bei der Koexpression der CHMP

Proteine ist weiterhin gewährleistet, auch kolokalisieren die Konstrukte mit allen fünf Interaktionspartnern. Jedoch können sowohl CC2D1A als auch CC2D1B durch Deletion des N-Terminus nicht mehr mit CHMP4B interagieren. Die Interaktion mit den beiden anderen CHMP4 Proteinen sowie mit CHMP5 und CHMP7 ist weiterhin möglich. In *Drosophila* kann ein Lgd Konstrukt mit deletiertem N-terminus jedoch vollständig den *lgd* mutanten Phänotyp retten (Bachelorarbeit Astrid Wienigk, 2015). Dies weist darauf hin, dass der N-Terminus bei den CC2D1 Proteinen im Vergleich zu Lgd neue Funktionen gewonnen hat. Diese Funktion hat direkte Auswirkungen auf die Interaktion mit CHMP4B, wird aber ausgehend von den *in vitro* Interaktionsstudien nicht für die direkte Interaktion selbst benötigt. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die CC2D1 Proteine spezifisch zu bestimmten CHMP Proteinen rekrutiert werden, um dort ihre Funktion zu erfüllen, oder dass es bisher unbekannte Regulationsmechanismen gibt. Der N-Terminus hat also wahrscheinlich eine regulatorische Funktion in den CC2D1 Proteinen oder eine Funktion bei der Feinlokalisierung am Endosom, sowie zumindest bei CC2D1A einen teilweisen Einfluss auf die generelle Lokalisation.

3.3.7 Der verlängerte C-Terminus von CC2D1A ist essentiell für seine Funktion.

CC2D1A besitzt im Gegensatz zu CC2D1B und Lgd einen verlängerten C-Terminus nach der C2-Domäne. Bisher wurde für diesen keine Funktion beschrieben. In Rettungsexperimenten in *Drosophila* konnte gezeigt werden, dass CC2D1A ohne den verlängerten C-Terminus ($\Delta C815$) den *lgd* mutanten Phänotyp besser retten kann als vollständiges CC2D1A (Dissertation Katharina Schulz, 2015). Da CC2D1A $\Delta C815$ und CC2D1B eine fast gleich große Ähnlichkeit mit Lgd haben (Abb.2.2.21) zeigt dies, dass ihre grundsätzliche Funktion konserviert ist. Vergleicht man zudem die Domänen der Proteine, zeigt sich, dass die ersten drei DM14 Domänen von CC2D1A eine höhere Ähnlichkeit mit den DM14 Domänen von Lgd haben, als dies bei CC2D1B der Fall ist. Die vierte DM14 Domäne von CC2D1B und die C2 Domäne sind hingegen Lgd ähnlicher, als die von CC2D1A (s. Anhang Tab.8.2). Die zusätzliche Funktion des C-Terminus von CC2D1A scheint diese Funktion in *Drosophila* allerdings zu stören. Die Lokalisation von CC2D1A $\Delta C815$ zeigt keine Veränderung im Vergleich zum vollständigen CC2D1A. Die generelle Lokalisation wird also nicht vom verlängerten C-Terminus beeinflusst. Auch die Rekrutierung an die vergrößerten endosomalen Strukturen bei Koexpression mit CHMP4B und den anderen Interaktionspartnern ist nicht gestört. Diese Rekrutierung wird also ebenfalls nicht über den verlängerten C-Terminus gesteuert. Allerdings führt die Deletion des verlängerten C-Terminus zu einem Verlust der Interaktion mit allen CHMP4 Proteinen sowie mit CHMP7, wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen (Abb.2.2.23). Nur die Interaktion mit CHMP5 wird nicht beeinflusst. Der verlängerte C-Terminus ist also essentiell für die meisten Interaktionen mit CHMP Proteinen, wird allerdings *in vitro* nicht für die direkte Interaktion benötigt. Darauf lassen die Untersuchungen von kleinen Fragmenten von CC2D1A und CHMP4B schließen (Martinelli et al., 2012; Usami et al.,

2012). Dies weist darauf hin, dass er nicht für die direkte Interaktion an sich benötigt wird. Allerdings hat der verlängerte C-Terminus eine essentielle Rolle bei der Regulation der Interaktionen oder der spezifischen Lokalisation direkt am Endosom. Zudem ist diese Deletion die einzige, welche die Interaktion mit CHMP4A negativ beeinflusst. Die Funktion des verlängerten C-Terminus von CC2D1A ist in Säugern also grundlegend wichtig für die Interaktion mit CHMP4 und CHMP7, während diese Funktion in *Drosophila* seine Rettungsfähigkeit des *lgd* Ausfalls behindert. Allerdings ist in *Drosophila* nicht geklärt, ob dies an Problemen der Lokalisation am Endosom, der Regulation oder der Interaktion mit Shrub oder einem anderen Interaktionspartner liegt. CC2D1A^{AC815} wird in *Drosophila* weiterhin auf ähnlichem Niveau exprimiert wie vollständiges CC2D1A und ist ebenso wie dieses zytoplasmatisch lokalisiert (Dissertation Katharina Schulz, 2015).

3.3.8 Die C2 Domäne und der verlängerte C-Terminus von CC2D1A haben eine gemeinsame Funktion.

Die Grundlage für ein weiteres Konstrukt ist ein mutiertes Allel von von *CC2D1A* im Menschen, welches zu einer mentalen Retardierung führt. Das Konstrukt wird daher CC2D1A^{MR} genannt. Durch eine Deletion in diesem Allel kommt es zu einer Verschiebung des Leserasters. Dies führt dazu, dass auf die dritte DM14 Domäne ein kurzes „nonsense“ Peptid folgt und schließlich die Translation durch ein Stop-Codon abgebrochen wird. Es fehlt dadurch der gesamte C-Terminale Bereich nach der dritten DM14 Domäne, also die vierte DM14 Domäne, die C2 Domäne und der verlängerte C-Terminus. CC2D1A^{MR} zeigt eine zytoplasmatische Verteilung wie CC2D1A, die Konstrukte mit Deletion der C2 Domäne oder dem verlängerten C-Terminus. Allerdings kommt es nicht zu den großflächigen Akkumulationen und der Bildung sehr großer „Class E“ ähnlicher Endolysosomen wie bei CC2D1A^{AC2}. Als einziges der untersuchten Deletionskonstrukte wird CC2D1A^{MR} bei Koexpression mit einem der CHMP Proteine nur schwach an endosomale Kompartimente rekrutiert und kolokalisiert dort nur schwach mit den CHMP Proteinen. Dies bedeutet, dass erst der kombinierte Verlust von 4. DM14 Domäne, C2 Domäne und verlängertem C-Terminus eine Lokalisation an endosomale Kompartimente größtenteils verhindert. Unkontrollierte Akkumulationen wie bei dem Δ C2 Konstrukt treten ebenfalls nicht mehr auf. Es kommt also nicht mehr zu einem dominant-negativen Effekt. Dies weist darauf hin, dass die korrekte Regulation und Lokalisation von CC2D1A das Zusammenspiel von 4. DM14 Domäne, C2 Domäne und verlängertem C-Terminus benötigt wird. Während durch Deletion des verlängerten C-Terminus die Interaktion mit CHMP4 und CHMP7 gestört ist, kann CC2D1A^{MR} mit allen vier Proteinen wieder interagieren. Die FRET-Effizienz der Interaktionen mit den CHMP4 Proteinen steigt sogar deutlich an, was auf eine Änderung der Stereometrie oder der Anzahl der Interaktionen hinweist. Möglicherweise kommt es zu einer unkontrollierten Interaktion mit den CHMP Proteinen. Diese könnte das Resultat der Überexpression sein, wodurch trotz Störung der Lokalisation ein Teil der CC2D1A^{MR} Proteine noch an die endosomalen Kompartimente gelangen und so die

Interaktionspartner aufeinander treffen. Menschen mit dem *MR* Allel von *CC2D1A* zeigen ähnliche mentale Einschränkungen wie Menschen mit einem Allel, welches zur Expression eines Proteins führt, dass nur aus dem N-Terminus vor der ersten DM14 Domäne besteht und als Nullmutante identifiziert wurde (Manzini et al., 2015; Basal-Vanagaite et al., 2006). Ebenso kann die Expression von *CC2D1A^{MR}* in *Drosophila* den *lgd* mutanten Phänotyp nicht retten. Seine Expression ist dabei im Vergleich zum vollständigen *CC2D1A* nicht verringert und seine Lokalisation ist weiterhin zytoplasmatisch (Dissertation Katharina Schulz, 2015). Das Protein *CC2D1A^{MR}* kann also endogen seine Funktion nicht mehr ausüben. Dies liegt also wahrscheinlich nicht an der fehlenden Interaktionsfähigkeit, sondern an der Störung von Regulation und Lokalisation.

Zusammengefasst lässt sich festhalten, dass die *CC2D1* Proteine sich von *Drosophila* zu den Säugern weiterentwickelt haben und ihre Spezialisierung zugenommen hat. Die DM14 Domänen sind auf die Interaktion mit unterschiedlichen CHMP Proteinen spezialisiert, basische Aminosäuren konnten dabei zum Teil als für die Interaktion essentiell identifiziert werden. Zudem gibt es Hinweise auf weitere Bindestellen im C-Terminus jeder DM14 Domäne für bisher unbekannte Interaktionspartner. Über diese Bereiche könnte auch reguliert werden, welche DM14 Domänen exponiert werden und daher interagieren können. Insgesamt werden Funktion und Lokalisation von *CC2D1A* und *CC2D1B* über mehrere Domänen reguliert (Abb.3.3). Während in *Lgd* nur die C2 Domäne eine solche Funktion zu haben scheint, haben in *CC2D1A* und *CC2D1B* zusätzlich die jeweiligen N-Termini vor der ersten DM14 Domäne diese Funktion. Sie haben einen Einfluss auf die Lokalisation und die Interaktion. Die C2 Domänen haben ebenfalls eine regulatorische Funktion, allerdings anders als bei *Lgd*, wo der Verlust dieser Domäne zu einer Lokalisation im Zellkern führt. Der Verlust der C2 Domäne in den *CC2D1* Proteine führt nicht zu einer solchen Lokalisationsstörung, dafür aber zu Störungen im endosomalen Transportweg. *CC2D1A* hat als zusätzliche regulatorische Region den verlängerten C-Terminus, der in lebenden Zellen essentiell für die Interaktion mit den meisten CHMP Interaktionspartnern ist. Hier liegt möglicherweise der Schlüssel, für die vielfältigen Funktionen die für *CC2D1A* und *CC2D1B* beschrieben wurden. Je nachdem von wem, wie und wohin sie rekrutiert werden, könnten sie unterschiedliche Funktionen in Signalwegen oder dem ESCRT-System übernehmen. Möglich wäre auch, dass die *CC2D1* Proteine überall dorthin rekrutiert werden, wo auch ESCRT-III assembliert. Darauf weist hin, dass sie durch CHMP7 auch an Strukturen des endoplasmatischen Retikulums rekrutiert werden können, zudem wirken sie mit dem ESCRT-III Komplex bei der HIV Knospung. Diesen Hinweisen sollte in Zukunft weiter nachgegangen werden.

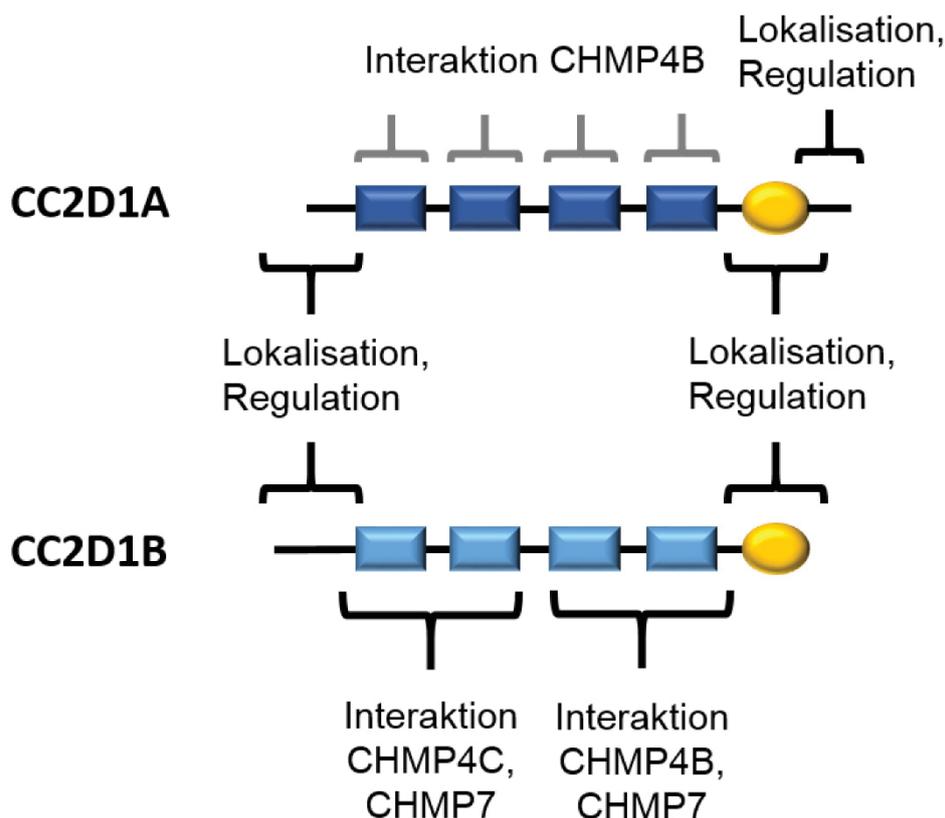


Abb.3.3 Schematische Darstellung der Funktion der Domänen von CC2D1A und CC2D1B. CC2D1A und CC2D1B verfügen über mehrere Domänen, welche für die Regulation der Funktion und/oder die korrekte Lokalisation verantwortlich sind. CC2D1A besitzt drei solcher Domänen, den N-Terminus, die C2 Domäne (gelb) und den verlängerten C-Terminus. Bei CC2D1B sind es zwei Domänen, der N-Terminus und die C2 Domäne (gelb). Die Funktion der DM14 Domänen in CC2D1A (dunkelblau) konnte nicht weiter analysiert werden, die bisher beschriebenen *in vitro* Interaktionen der einzelnen DM14 Domänen mit CHMP4B (Martinelli et al., 2012; Usami et al., 2012) wurden aber ebenfalls dargestellt (grau). Die DM14 Domänen in CC2D1B (hellblau) werden für die Interaktion mit CHMP Proteinen benötigt, die ersten beiden Domänen spezifisch für die Interaktion mit CHMP4C, die letzten beiden für die Interaktion mit CHMP4B. Mit CHMP7 kann CC2D1B sowohl über die ersten beiden, als auch die letzten beiden DM14 Domänen interagieren. Die Spezifität zeigt sich auch dadurch, dass andere Kombinationen zweier DM14 Domänen keine Interaktion mehr ermöglichen.

3.4 CC2D1A und CC2D1B wirken an der endosomalen Membran zusammen mit ESCRT-III und werden mit diesem von VPS4 entfernt.

CC2D1A und CC2D1B akkumulieren und kolokalisieren in Koexpression mit CHMP4, CHMP5 und CHMP7 in spät endosomalen Kompartimenten. Auf endogenem Level konnte bisher jedoch keine Kolokalisation dieser Proteine gezeigt werden. In HeLa Zellen (Dissertation Katharina Schulz, 2015) und in wildtypischen MEF Zellen (Drusenheimer et al., 2015) kolokalisiert CC2D1A weder mit CHMP4B noch mit endosomalen Markern. Für CC2D1B konnte bisher kein spezifischer Antikörper generiert werden, um dies überprüfen zu können. Doch auch CHMP4B zeigt keine Kolokalisation mit endosomalen Markern, möglicherweise kann der Komplex am Endosom also nicht detektiert werden (Abb. 2.1.1 und Drusenheimer et al., 2015). Analysen der subzellulären Lokalisation durch Zellfraktionierung zeigten, dass sowohl in wildtypischen als auch in *Vps4a^{+/-};Vps4b^{+/-}* MEF Zellen

beide CC2D1 Proteine und CHMP4B sowohl in der Zytoplasmafraktion als auch in der Membranfraktion vorkommen (Drusenheimer et al., 2015). Dies weist darauf hin, dass die Antikörper für CC2D1A und CHMP4B diese Proteine an der Membran in wildtypischen Zellen nicht erkennen können oder die Detektion durch Fluoreszenz bisher nicht möglich ist. Möglicherweise würde ultrahochauflösende Fluoreszenzmikroskopie dies ermöglichen. In *Vps4a^{+/-};Vps4b^{+/-}* MEF Zellen kolokalisieren sowohl endogenes CC2D1A als auch endogenes CHMP4B an stark vergrößerten, LAMP1 positiven Endolysosomen. Erstmals konnte also gezeigt werden, dass auch endogenes CC2D1A an endosomalen Kompartimenten lokalisiert und dass es dort mit endogenem CHMP4B kolokalisiert. Dies weist darauf hin, dass ein gestörter Abbau des ESCRT-III Komplexes durch fehlendes VPS4 zu einer Akkumulation von CC2D1A am Endosom führt. Zu dieser Akkumulation kommt es ebenfalls bei Überexpression von VPS4B^{E235Q}, dessen ATPase Aktivität gestört ist und damit den ESCRT-III Komplex nicht von der Membran lösen kann (Drusenheimer et al., 2015). Daraus lässt sich schließen, dass CC2D1A am Endosom „upstream“ von VPS4 wirkt. Umgekehrt führt die Überexpression von CHMP4 Proteinen ebenfalls zur Akkumulation von endogenem CC2D1A an vergrößerten Endolysosomen. Sowohl eine verstärkte Assemblierung als auch ein verzögerter Abbau des ESCRT-III Komplexes führt also zur Akkumulation von CC2D1A an Endolysosomen. Zusammen genommen weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass CC2D1A im Zuge der Assemblierung von ESCRT-III an die endosomale Membran rekrutiert wird und dort von VPS4 dann entweder verdrängt oder indirekt durch die Auflösung von ESCRT-III ebenfalls mit abgelöst wird. Vermutlich pendeln also auch die CC2D1/Lgd Proteine wie die ESCRT-III Proteine zwischen Zytoplasma und Membran hin und her.

Ein weiterer Hinweis darauf, und dass es für CC2D1B ebenso funktioniert, zeigt sich bei der Analyse der Interaktion der CC2D1 Proteine mit CHMP4 Proteinen, bei zusätzlicher Expression von CHMP5 oder VPS4B. Die Interaktion von CC2D1A mit CHMP4B und CHMP4C wird durch die Koexpression von CHMP5 abgeschwächt (Abb.2.2.28). Möglicherweise interagiert ein Teil von CC2D1A oder den CHMP4 Proteinen mit CHMP5, was die sinkende FRET-Effizienz erklären würde. Die Koexpression von VPS4B hat keinen Einfluss auf die Interaktionen. Die Interaktion von CC2D1B mit CHMP4B oder CHMP4C wird jedoch sowohl durch CHMP5 als auch VPS4B Koexpression vollständig unterbunden. Da VPS4 über die MIM Domäne mit CHMP4 interagiert, kann eine direkte Konkurrenz um die Bindestelle mit CC2D1 Proteinen eher ausgeschlossen werden. Über den Interaktionsmechanismus von CHMP5 mit CHMP4 ist bisher nichts veröffentlicht worden. Hier könnte also eine Konkurrenz um die Bindestelle mit CC2D1A und CC2D1B bestehen. CHMP4A unterscheidet sich auch hier von CHMP4B und CHMP4C, die Interaktion der CC2D1 Proteine mit ihm wird weder durch CHMP5 noch durch VPS4B negativ beeinflusst. Bisher wurde nicht beschrieben, ob die CHMP4 Proteine in gleichem Maße mit CHMP5, VPS4A oder VPS4B interagieren. Möglicherweise würde VPS4A die Interaktionen auch anders beeinflussen als VPS4B. Es wäre beispielsweise möglich, dass VPS4A die Interaktion von CC2D1A mit CHMP4B und

CHMP4C unterbindet. Auch möglich wäre es, dass VPS4A die Interaktion beider CC2D1 Proteine mit CHMP4A verhindert. In Säugern ist das ESCRT-System nochmals deutlich komplexer in seiner Funktion und Regulation als in Hefe oder *Drosophila*. Gleichzeitig ergeben sich allein dadurch, dass es drei CHMP4 Proteine gibt, deutlich mehr Möglichkeiten in der Funktion, Zusammensetzung und Interaktionen.

Es wird vermutet, dass Snf7 im Zytoplasma in einem dynamischen Gleichgewicht aus Zwischenstadien von offener und geschlossener Form vorliegt (Tang et al., 2015). An Endosomen rekrutiert Vps20 (CHMP6) dann ein offenes Snf7. Diese offene Form besitzt eine Oberfläche, welche mit Membranen interagieren kann und assoziiert so mit dem Endosom. Diese Rekrutierung verschiebt das Gleichgewicht der Konformationen im Zytoplasma. Dadurch ergibt sich ein „Domino-Effekt“ sich öffnender Snf7 Proteine welche an die Membran des Endosoms binden. Die Snf7 Proteine an der Membran können dann polymerisieren (Tang et al., 2015). Möglich wäre, dass nicht alle Snf7 Proteine das Polymer „finden“ und nicht an der Polymerisation beteiligt sind. Ähnlich könnte dies dann auch bei CHMP4 (Shrub) der Fall sein. Einzelne CHMP4 Untereinheiten könnten dann möglicherweise nicht vom VPS4 Komplex von der Membran gelöst werden, wenn diese das Polymer im Zuge der Abschnürung auflöst. Würden die einzelnen CHMP4 Untereinheiten an der Membran verbleiben wären sie für die Zelle verloren. Die CC2D1/Lgd Proteine könnten möglicherweise diese einzelnen Untereinheiten binden und über eine Interaktion mit CHMP5 zum VPS4 Komplex bringen, sodass dieser auch die vereinzelt CHMP4 Proteine von der Membran ablöst. So würde die Zelle keine CHMP4 Proteine an der Membran verlieren, die Effizienz von CHMP4 (Shrub) wäre erhöht, da der Zelle mehr zur Verfügung steht. Dies passt zu der Rekrutierung der CC2D1 Proteine durch die ESCRT-Assemblierung und die Akkumulation bei VPS4 Verlust. Außerdem würde dies erklären, warum VPS4 die Interaktion zwischen CC2D1 und CHMP4 beenden oder verhindern kann. Auch würde dies dazu passen, dass in *Drosophila* Lgd die Aktivität von Shrub steigert (Troost et al., 2012) und dass eine Erhöhung der Genkopien von *shrub* in *Drosophila* den *lgd* Phänotyp abschwächt (Masterarbeit Miriam Bäumers 2015).

4. Zusammenfassung/Summary

4.1 Zusammenfassung

Die Proteine der CC2D1/Lgd Familie sind in allen Metazoen konserviert und besitzen vier DM14 Domänen und eine C2 Domäne. In *Drosophila* wird Lgd für die vollständige Funktion der ESCRT-III Untereinheit Shrub benötigt und sein Verlust zu einer Störung im endosomalen Transportweg führt. Für die beiden Säugerorthologe CC2D1A und CC2D1B wurde eine solche Funktion bisher nicht beschrieben, dafür unter anderem Funktionen in mehreren Signalwegen. Beschrieben wurde bisher nur die *in vitro* Interaktion von CC2D1A mit allen CHMP4 Isoformen und von CC2D1B mit CHMP4B. *In vitro* reicht ein Fragment bestehend aus einer DM14 Domäne von CC2D1A für die Interaktion mit einem Fragment von CHMP4B. In *Drosophila* werden *in vivo* hingegen mindesten zwei DM14 Domänen für eine Rettung des *lgd* Phänotyps benötigt.

In dieser Arbeit konnte erstmals eine Funktion von CC2D1A und CC2D1B im endosomalen Transportweg nachgewiesen werden. Elektronenmikroskopische Analysen zeigen vergrößerte endolysosomale Kompartimente in *Cc2d1a*^{-/-} MEF Zellen. In *Vps4a*^{+/-};*Vps4b*^{+/-} MEF Zellen sind „Class E“ ähnliche endolysosomale Kompartimente zu beobachten, welche durch zusätzlichen Verlust eines *Cc2d1* Gens kleiner sind. Beim zusätzlichen Ausfall beider *Cc2d1* Gene in *Vps4a*^{+/-};*Vps4b*^{+/-} MEF Zellen sind deutlich mehr endolysosomale Kompartimente zu beobachten, welche allerdings nicht mehr den „Class E“ Phänotyp zeigen. Zudem lokalisiert endogenes CC2D1A an vergrößerten Endolysosomen in *Vps4a*^{+/-};*Vps4b*^{+/-} MEF Zellen. Darüber hinaus werden die CC2D1 Proteine durch die ESCRT-III Assemblierung an endosomale Membranen rekrutiert und durch die Auflösung des Komplexes durch VPS4 wieder von dort entfernt. Aufgrund der Ergebnisse kann eine Funktion der CC2D1/Lgd Proteine an der endosomalen Membran „upstream“ von VPS4 vermutet werden.

Mittels des PLA Systems konnte erstmals die endogene Interaktion von CC2D1A und CHMP4B in Zellen nachgewiesen werden. Mit Hilfe von FRET-APB Experimenten konnte zusätzlich erstmals gezeigt werden, dass CC2D1A und CC2D1B in lebenden Zellen mit den ESCRT-III Untereinheiten CHMP4A, CHMP4B und CHMP4C interagieren. Des Weiteren wurden mit den Hilfs-ESCRT Proteinen CHMP5 und CHMP7 bisher nicht beschriebene Interaktionspartner identifiziert. Darüber hinaus interagieren die CC2D1 Proteine jeweils mit sich und miteinander. Die Bedeutung der DM14 Domänen von CC2D1B für die Interaktion mit CHMP4B, CHMP4C und CHMP7 wurde ebenfalls genauer charakterisiert. So interagiert CC2D1B über unterschiedliche DM14 Domänen mit Diesen. Zudem konnten für die Interaktion mit CHMP4B und CHMP7 Unterschiede bei den in der dritten DM14 Domäne benötigten, konservierten Aminosäuren gezeigt werden. Mit dem N-Terminus vor der ersten DM14 Domäne beider CC2D1 Proteine und dem verlängerten C-Terminus von CC2D1A wurden zwei neue Domänen identifiziert, welche einen Einfluss auf Lokalisation, Regulation und Interaktion der Proteine haben.

4.2 Summary

Proteins of the CC2D1/Lgd family are conserved throughout all metazoans and consist of four DM14 domains and one C2 domain. In *Drosophila*, Lgd is needed for the full function of the ESCRT-III subunit Shrub and its loss leads to dysfunctions in the endosomal pathway. For the mammalian Orthologs CC2D1A and CC2D1B none such function was described yet, but amongst others, functions in several signaling pathways were shown. Only an *in vitro* interaction of CC2D1A with all CHMP4 isoforms and of CC2D1B with CHMP4B was described. A fragment of CC2D1A consisting of only one DM14 domain is sufficient for the interaction with a CHMP4B fragment, *in vitro*. However in *Drosophila* at least two DM14 domains are needed *in vivo* to rescue the *lgd* mutant phenotype.

A function of CC2D1A and CC2D1B in the endosomal pathway could be shown in this study for the first time. Electron microscopy analysis show enlarged endolysosomal compartments in *Cc2d1a*^{-/-} MEF cells. In *Vps4a*^{+/-};*Vps4b*^{+/-} MEF cells „class E“ like endolysosomal compartments can be observed, which are smaller when additionally one of the *Cc2d1* genes was lost. Loss of both *Cc2d1* genes in *Vps4a*^{+/-};*Vps4b*^{+/-} MEF cells leads to an increased number of endolysosomal compartments, which however do not show an “class E” like phenotype anymore. Furthermore endogenous CC2D1A localizes at enlarged endolysosomes in *Vps4a*^{+/-};*Vps4b*^{+/-} MEF cells. Moreover CC2D1 proteins are recruited to the endosomal membrane via ESCRT-III assembly and are removed when VPS4 disassembles ESCRT-III. These results suggest, that CC2D1/Lgd proteins function at the endosomal membrane upstream of VPS4.

By using the PLA system the endogenous interaction of CC2D1A and CHMP4B could be shown directly in cells for the first time. In addition FRET-APB experiments show the interaction of CC2D1A and CC2D1B with the ESCRT-III subunits CHMP4A, CHMP4B and CHMP4C in living cells. Furthermore CHMP5 and CHMP7 were identified as novel interaction partners and it could be shown, that the CC2D1 proteins interact with each other and themselves. The importance of the DM14 domains of CC2D1B was characterized in details regarding the interaction with CHMP4B, CHMP4C and CHMP7. Different DM14 domains of CC2D1B are needed for these interactions. Moreover, the different relevance of conserved amino acids in the third DM14 domain of CC2D1B could be shown in this study. By analyzing the N-terminal part previous of the first DM14 domain of both CC2D1 proteins and the elongated C-terminal part of CC2D1A, novel domains could be described. These domains influence the localization, the regulation and the interactions of the CC2D1 proteins.

5 Material und Methoden

5.1 Material

5.1.1 Chemikalien

Die Chemikalien, welche in dieser Arbeit genutzt wurden waren, falls nicht anders angegeben, analysereine Substanzen (p. A.) der Firmen Fluka; Merck; Roth; Serva; Grüssing; AppliChem; Biozym, VWR; Macherey-Nagel; Becton Dickinson and Company und Sigma-Aldrich.

5.1.2 Material für molekularbiologische Arbeiten

5.1.2.1 Allgemeine Materialien

dNTPs	Fermentas
Agarose Standard; Roti®garose	Roth
DirectPCR Lysis Reagent Tail	PeqLab

5.1.2.2 Reaktionssets

Nucleo Bond Xtra Midi Kit	Macherey-Nagel
pGem-T Easy Vector System	Promega
Zymoclean Gel DNA Recovery Kit	Zymo Research

5.1.2.3 Enzyme

Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs (NEB)
T4-DNA Ligase	NEB
OneTaq Polymerase	NEB
Q5 High-Fidelity DNA Polymerase	NEB
RNase A DNase frei	Fermentas
Proteinase K [20 mg/ml]	Roche
GoTaq G2 Flexi DNA Polymerase	Promega

5.1.2.4 Größenstandard

GeneRuler 1kb Ladder	Thermo Scientific Fisher
----------------------	--------------------------

5.1.2.5 Puffer und Lösungen

S1-Puffer	50 mM Tris-HCl; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase A; pH8
S2-Puffer	200 mM NaOH; 1 %SDS
S3-Puffer	2,8 M KAc; pH 5,1
1x TAE	40 mM Tris-Acetat; pH 8,0; 1 mM EDTA

5.1.2.6 Medien zur Kultivierung von Bakterien

LB-Medium (Flüssigkultur)	10 g Bactotrypton; 5 g Hefeextrakt; 10 g NaCl; pH 7,2 mit NaOH einstellen und mit H ₂ O auf 1 l auffüllen, autoklavieren
---------------------------	---

LB-Agar Platten

LB-Medium; 1,5 % Agar

5.1.2.7 Bakterienstämme

E.coli DH5 α : F- ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*)U169 *recA1 endA1 hsdR17*(rk-, mk+) *phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1* λ - (Invitrogen)

E.coli Mach-1TM-T1R: F- ϕ 80(*lacZ*) Δ IM15 Δ *lacX74 hsd R* (rk-,mk+) Δ *recA1398 end A1 tonA* (Invitrogen)

5.1.2.8 Antibiotika StocklösungenAmpicillin 100 mg/ml in ddH₂OKanamycin 50 mg/ml in ddH₂O5.1.2.9 Plasmide

pGem-T Easy Vektor Promega

pTag-RFP-C Evrogen

pTag-GFP2-C Evrogen

pEGFP-C1 Clontech

pSpCas9n(BB)-2A-GFP (Cas9-Nickase), Ran et al., 2013

pMSSVLT SV40 Immortalisierungsvektor, Reddy et al., 1978; Schuermann, 1990

5.1.2.10 Oligonukleotide

Tabelle 5.1: Liste der verwendeten Oligonukleotide zur Klonierung, Mutagenese, Sequenzierung und Genotypisierung

Primer Bezeichnung	Sequenz 5' – 3'
Primer zur Klonierung	
CHMP1-For-XhoI	AACTCGAGTCATGGACGATACCCTGTTCC
CHMP1-Rev-EcoRI	AAGAATTCAATTCCTCAAGGCGGCAACC
CHMP2-For-XhoI	GGCTCGAGTCATGGACCTATTGTTCCGGG
CHMP2-Rev-EcoRI	CCGAATTCTCAGTCCCTCCGCAGGTTCC
CHMP4A-For-XhoI	GGCTCGAGCCATGTCGCGGGCGGC
CHMP4A-Rev-EcoRI	CCGAATTCAAGCGGCCGCTCAGG
CHMP4B-For-XhoI	AACTCGAGCCATGTCGGTGTTCGGGAAGCT
CHMP4B-Rev-EcoRI	AAGAATTCTTACATGGATCCAGCCCAGTTCTC
CHMP4C-For-XhoI	AACTCGAGCAATGAGCAAGTTGGGCAAGTT
CHMP4C-Rev-EcoRI	AAGAATTCTTAGGTAGCCCAAGCTGCCA
CHMP5-For-XhoI	GGCTCGAGAGATGAACCGACTC
CHMP5-Rev-EcoRI	CCGAATTCCAAATCTATGAAGCAGG
CHMP6-For-XhoI	GGCTCGAGCCATGGGTAACCTGTTCCGG
CHMP6-Rev-EcoRI	CCGAATTCTTACGAAGCTGCCACCA
CHMP7-For-EcoRI	CCGAATTCATGTGGTCCCCGGAG
CHMP7-Rev-XbaI	GGTCTAGACGCAAAGCTTCTACAATGG
hIST1-For-XhoI	AACTCGAGTCATGCTGGGCTCTGGATTTAA
hIST1-Rev-EcoRI	AAGAATTCTCAGCTCTTCAAACCTCCGGGAA
hLGD1-dDM14-For-XhoI	GCCTCGAGCCATGATGCCAGGGCCAAGACCTC
hLGD1-dDM14-Rev-EcoRI	GCGGAATTCCAAGCCCCTGGGCTCCAGAAC
hLGD1delC2-Rev-EcoRI	GAGAATTCCTAGAGTTCTGAGAAG

hLGD1-dN167-For-XhoI	GGCTCGAGCCATGGCTTTGCTGGAGGAACGGATTAC
hLGD1-For-XhoI	AAACTCGAGCCATGATGCCAGG
hLGD1-Rev-EcoRI	GCGGAATTCCTACAAGCCCCTGGGCTCCAGAAC
hLGD2-dDM14-For-XhoI	CGCTCGAGCCATGCACAAGAGGAAAGGACCC
hLGD2-dDM14-Rev-EcoRI	CGGAATTCCTGCGGAGCCGCTGCAGCT
hLGD2delC815-Rev-EcoRI	GGGAATTCATGCCGGCACAGGGTCAATG
hLGD2-dN139-For-XhoI	GGCTCGAGCCATGTTGCAGGAGAGGCTGGCGC
hLGD2-For-XhoI	AACTCGAGCCATGCACAAGAGGAAAGGAC
hLGD2-Rev-EcoRI	AAGAATTCGTC AAGCGTAATCTGGCACATC
hLGD2-MR-For-XhoI	CGCTCGAGCCATGCACAAGAGGAAAGGACCCCGGGA
hLGD2-MR-Rev-EcoRI	CGGAATTCGCTCACCTGCGGAGCCGCTGCAGCTC
VPS4B-For-XhoI	GGCTCGAGCCATGTCATCCACTTCGCCC
VPS4B-Rev-EcoRI	CCGAATTCGCTTAGCCTTCTTGACCAAAATC
VT A1-For-XhoI	GGCTCGAGGGATGGCCGCGCTTGACCCGC
VT A1-Rev-EcoRI	AAGAATTCATTCTCTGCTGTGTCAGTAAC
EGFP-XhoI-For	CTCGAGTTATGGTGAGCAAGGGC
EGFP-EcoRI-Rev	GGGAATTCCTACTTGTACAGCTCGTC
RFP-For-XhoI	CTCTCGAGTTATGGTGCTAAGGGCGAAGAG
RFP-Rev-EcoRI	CCGAATTCGAATTAAGTTTGTGCCCCAGTTTG
Lgd-For-HindIII	CCAAGCTTCCATGTTCTCCAGAAAGAAGCCAGAGCC
Lgd-Rev-BamHI	AGTGGATCCGGCTCAGGCATCCAAGACCAACCCTTTTCG
Chmp5-Dm-For-XhoI	GGCTCGAGCCATGAATCGCCTTTTTGGTCGTG
Chmp5-Dm-Rev-EcoRI	CCGAATTCCTATGTGGTCTTCAGCGATGT
Ist1-Dm-For-XhoI	GGCTCGAGCCATGTTTTCCAGCGGCCCA
Ist1-Dm-Rev-EcoRI	CCGAATTCCTACTTTCGCTTCTTAAGGTTCTC
Shrub-For-HindIII	CCAAGCTTCCATGAGTTTCTTCGGGAAGATG
Shrub-Rev-EcoRI	AAGAATTC AATTAGTTGGACCAGGATAAAAAGC
Primer für die Mutagenese	
CHMP4A-mut2-For	CACCCTGCGGTTTCAGCGTCGGGCCATTTCGGAATGCCAC
CHMP4A-mut2-Rev	GTGGCATTCCGAATGGCCCCGACGCTGAAACCCGAGGGTG
CHMP4B-mut2-For	CAACCATCCGGTTCCAGCGGGCCCTGCGGAATGCCAAC
CHMP4B-mut2-Rev	GTTGGCATTCCG CAGGGCCCCGCGCTGGAACCGGATGGTTG
CHMP4B-E90R-For	GCACATTATCAACCATCCGGTTCCAGCGGGAGGCCCTG
CHMP4B-E90R-Rev	CAGGGCCTCCCGCTGGAACCGGATGGTTGATAATGTGC
CHMP4C-mut2-For	CTTTCTACCATTTCGTTCCAGAGACGAGCCCTGCGGAAC
CHMP4C-mut2-Rev	GTTCCG CAGGGCTCGTCTCTGGAACCGAATGGTAGAAAAG
CHMP5-E90R-For	GCCCAACAGTCATTCAACATGCGACAAGCCAATTATACCATCCAGTC
CHMP5-E90R-Rev	GACTGGATGGTATAATTGGCTTGTGCGATGTTGAATGACTGTTGGGC
hLGD1-K419E-For	GATGCATGAGCGCATTGCCGAGCAATATCAAGATGC
hLGD1-K419E-Rev	GCATCTTGATATTGCTCGGCAATGCGCTCATGCATC
hLGD1-P440A-For	CAACTTTGCTGAATTGGCTGTTCCTCCAGGATTCC
hLGD1-P440A-Rev	GGAAATCCTGGAGGAACAGCCAATTCAGCAAAGTTG
hLGD1-R416E-auf-K419E-For	GCAAGGCTCGGATGCATGAGGAGATTGCCGAGCAATATCAAG
hLGD1-R416E-auf-K419E-Rev	CTTGATATTGCTCGGCAATCTCCTCATGCATCCGAGCCTGTC
hLGD1-R416E-For	GCAAGGCTCGGATGCATGAGGAGATTGCCAAGCAATATCAAG
hLGD1-R416E-Rev	CTTGATATTGCTTGGCAATCTCCTCATGCATCCGAGCCTGTC
Primer zur Sequenzierung	
T7	TAATACGACTCACTATAGGG
SP6 universal	ATTTAGGTGACACTATAG

Primer zur Genotypisierung	
Cc2d1a-P1	AGACCCTGTGGCTGGATTGT
Cc2d1a-P3	GCCAGCCTGGTCTACAATCA
Cc2d1a-P5	CCTGACCTGAGTACTGGACA
Vps4a-5F	TATAATATGGTTGAGCCTCCCTTC
Vps4a-5R	ATTCGTGACCTATCTCGATTCTTC
3.1 Rev Vps4a	GCACCCCAAACCTGGAAAACCACTTACTCTCC
Vps4bKO_NEO_For1	AGGATTGGGAAGACAATAGCAG
Vps4b_WT_For2	TGCTTTGAGGAACTAAATCATCC
Vps4b_WT_Rev2	GGATTGGACTCAATGCCTACAT
Int2-For (CRISPR)	GTTAAGAGCACTTAGGTGTGG
Int3-Rev (CRISPR)	CTTCGCACACAATTCTGTCAG

5.1.3 Material für proteinbiochemische Arbeiten

5.1.3.1 Stammlösungen

Proteinase-Inhibitor-Cocktail P8340 (PIC)	Roth
PMSF (Stocklösung [200 mM] in DMSO)	Sigma-Aldrich
Rotiphorese Gel 30 (37, 5:1. 30 % (w/v))	Roth
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	Merck

5.1.3.2 Puffer und Lösungen

Proteinlysispuffer (nach Nakamura et al., 2008)

20 mM Tris-HCl pH 7,5; 0,2 % (w/v) Nonident P40; 10% (w/v) Glycerin; 1 mM EDTA; 1,5 mM MgCl₂ 1,37 mM NaCl; 50 mM NaF; 1 mM Na₃VO₄; frische Zugabe von 1 mM PMSF, PIC (1:200)

1x PBS (phosphate-buffered saline)	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na ₂ HPO ₄ ; 2 mM KH ₂ PO ₄
PBT (Tween)	1x PBS; 0,1 % (v/v) Tween 20
4x Trenngelpuffer	1,5 M Tris; 0,04 % (w/v) SDS; pH 8,8 mit HCl einstellen
4x Sammelgelpuffer	0,5 M Tris; 0,4 % (w/v) SDS; pH 6,8 mit HCl einstellen
APS (Ammoniumperoxidsulfat)	10 % (w/v); 0,2 g APS zu 2 ml dH ₂ O
10x Transferpuffer (Western Blot)	250 mM Tris, pH 8,3; 1,5 M Glycin; 10-20 % (v/v) Methanol; 0,0375 % (w/v) SDS
10x Elektrophoresepuffer	0,25 M Tris; 1,92 M Glycin; 1 % (w/v) SDS
Blockierlösung	5 % Magermilchpulver (Sucofin) in 1x PBS
Färbelösung	2 % Magermilchpulver (Sucofin) in 1x PBS
4x Lämmli-Puffer	16 ml 100 % Glycerin; 3,2 g SDS; 1,6 mg Bromphenol Blau; 9,6 ml 1 M Tris-HCl pH 6,8; 2,4 g DTT

5.1.3.3 Allgemeine Materialien

Transfermembran Roti-PVDF Roth

5.1.3.4 Größenstandard

PageRuler Plus Prestained Protein Ladder Thermo Scientific Fisher

5.1.3.5 Antikörper

Tabelle 5.2: Liste der verwendeten primären Antikörper für Western Blot Analysen. DSHB: Developmental Studies Hybridoma Bank. CST: Cell Signaling Technologies.

Antigen	Herkunft (Organismus)	Verdünnung	Quelle/Referenz
Actin	Maus	1:5000	Sigma A-5060
Alpha-Tubulin	Maus	1:5000	Sigma T5168
CC2D1A	Maus	1:2000	Abnova H00054862-B01P
CC2D1A (mLGD2)	Meerschweinchen	1:1000	AG Klein
CC2D1B (mLGD1)	Meerschweinchen	1:1000	AG Klein
CC2D1B (mLGD1)	Kaninchen	1:4000	Proteintech 20774-1-AP
CHMP4B	Kaninchen	1:2000	Santa Cruz C12 sc-82556
HA	Ratte	1:5000	Roche 3F10 #11867423001
Lamp1 (1D4B)	Ratte	1:2000	DSHB 1D4B

Tabelle 5.3: Liste der verwendeten sekundären Antikörper für Western Blot Analysen.

Antigen und Farbstoff/HRP	Herkunft	Verdünnung	Quelle/Referenz
Maus HRP	Ziege	1:5000	Jackson Immuno Research
Kaninchen HRP	Ziege	1:5000	Jackson Immuno Research
Ratte HRP	Ziege	1:5000	Jackson Immuno Research
Meerschweinchen HRP	Ziege	1:5000	Jackson Immuno Research

5.1.4 Material für die Zellkultur und Mauslinien

5.1.4.1 Mauslinien und Zelllinien

Cc2d1a (AG Klein) *B6N;B6129(CB20)-Freud1tm-neo*

Vps4a (AG Köhrer) *C57BL/6J;129Sv-TgH(Vps4akla)BMFZ*

Vps4b (AG Köhrer) *129Sv-VPS4-b(ex1-4)neotm*

Die Linien wurden verpaart um folgende Kombinationen zu erhalten (Nummerierung der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und Tierschutzaufgaben (ZETT))

Linie 9114 *Cc2d1a;Vps4a*

Linie 9115 *Cc2d1a;Vps4b*

Linie 9122 *Cc2d1a;Vps4a;Vps4b*

Aus diesen Mauslinien wurden MEF Zellen mit den unterschiedlichen Genotypen gewonnen, welche in dieser Arbeit analysiert wurden. Zusätzlich wurden weitere Genotypen mit dem CRISPR/Cas9-System generiert.

Wildtyp	Diese Arbeit; AG Klein
<i>Cc2d1a</i> ^{-/-}	Diese Arbeit; AG Klein, Drusenheimer et al., 2015
<i>Cc2d1b</i> ^{-/-}	AG Klein; Drusenheimer et al., 2015
<i>Vps4a</i> ^{+/-} ; <i>Vps4b</i> ^{+/-}	Diese Arbeit
<i>Cc2d1a</i> ^{-/-} ; <i>Vps4a</i> ^{+/-} ; <i>Vps4b</i> ^{+/-}	Diese Arbeit
<i>Cc2d1b</i> ^{-/-} ; <i>Vps4a</i> ^{+/-} ; <i>Vps4b</i> ^{+/-}	Diese Arbeit
<i>Cc2d1a</i> ^{-/-} ; <i>Cc2d1b</i> ^{-/-} (DKO #25)	Daisy Moll, Masterarbeit 2015; Nadja Drusenheimer unv.
<i>Cc2d1a</i> ^{-/-} ; <i>Cc2d1b</i> ^{-/-} ; <i>Vps4a</i> ^{+/-} ; <i>Vps4b</i> ^{+/-}	Diese Arbeit; Dominik Janßen, Bachelorarbeit, 2015

Zusätzlich wurden folgende Zelllinien verwendet:

NIH3T3 Zellen	(AG Lammert, Institut für Stoffwechselphysiologie, HHU, Düsseldorf)
HeLa Zellen	(AG Piekorz, Institut für Biochemie und Molekularbiologie II, HHU, Düsseldorf)

5.1.4.2 Stammmedien und Reagenzien

Folgende Medien und Reagenzien stammen von PAN Biotech:

DMEM (4,5 g/l Glucose, stab. Glutamine, Sodium pyruvate, 3,7 g/l NaHCO₃)

Dulbeccos PBS (w/o Ca²⁺ and Mg²⁺)

Trypsin 0,05 %/EDTA 0,02 % in PBS (w/o Ca²⁺ and Mg²⁺)

Penicillin/Streptomycin (10000 units/ml Penicillin; 10000 µg/ml Streptomycin)

FBS Good (EU approved, filtrated bovine serum, Virus and mycoplasma tested)

G418-BC (Neomycin) (30000 units/ml)	Biochrome
Transfektionsmedium Lipofectamine2000	Invitrogen
Opti-MEM	Invitrogen

5.1.4.3 Medien und Lösungen

Nährmedium DMEM; 10 % (v/v) FBS; bei Bedarf 0,5 % (v/v) Penicillin/Streptomycin; bei Bedarf 1 % (v/v) G418-BC

2x Gefriermedium 20 % (v/v) DMSO in FBS

5.1.5 Material für die Immunozytochemie

5.1.5.1 Puffer, Lösungen und Reagenzien

1x PBS (phosphate-buffered saline) 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄;
2 mM KH₂PO₄

PBT (Tween) 1x PBS; 0,1 % Tween 20

PBT (Triton)	1x PBS; 0,3 % Triton X-100	
Fixierlösung	4 % (w/v) Paraformaldehyd in 1x PBS, pH 7,2 (mit NaOH eingestellt)	
Blockierlösung	10 % (v/v) NGS; 0,3 M Glycin; in PBT (Tween)	
Färbelösung	1,5 % (v/v) NGS; in PBT (Tween)	
DAPI, 1 mg/ml in 0,18 M Tris-HCl, pH ,74		Serva
Vectashield H-1000		Vector Laboratories

5.1.5.2 Proximity Ligation Assay (PLA) Sonden und Kits

Alle aufgeführten Materialien stammen von Olink Biosciences

Duolink In Situ PLA Probe anti-rabbit PLUS

Duolink In Situ PLA Probe anti-mouse MINUS

Duolink In Situ Probemaker Oligonukleotid-Strang MINUS

Duolink In Situ Detection Reagent Red

5.1.5.3 Antikörper

Tabelle 5.4: Liste der verwendeten primären Antikörper in der Immunocytochemie. DHSB: Developmental Studies Hybridoma Bank. CST: Cell Signaling Technologies.

Antigen	Herkunft (Organismus)	Verdünnung	Quelle/Referenz
Alpha-Tubulin	Maus	1:500	Sigma T5168
Calnexin	Kaninchen	1:200	CST #2433
CC2D1A (mLGD2)	Meerschweinchen	1:200	AG Klein
CC2D1B (mLGD1)	Meerschweinchen	1:200	AG Klein
CHMP4B	Kaninchen	1:200	Santa Cruz C12 sc-82556
CHMP5	Kaninchen	1:200	Santa Cruz H-90 sc-67230
FK2	Maus	1:200	Enzo BML-PW8810-0500
HA	Ratte	1:500	Roche 3F10 #11867423001
Lamp1 (1D4B)	Ratte	1:200	DSHB 1D4B
LBPA	Maus	1:200	MoBiTec 6C4
Notch1	Kaninchen	1:200	CST #3608
Rab5	Maus	1:200	Abcam ab18211
Rab7	Kaninchen	1:200	CST #9367
Rab7	Maus	1:200	Abcam ab50533
Rab7 (D9572)	Kaninchen	1:200	CST #9367
Syntaxin6 (C34B2)	Kaninchen	1:200	CST #2869
VPS4A/B	Kaninchen	1:200	Sigma SAB4200025
VPS4B	Kaninchen	1:200	Sigma SAB4200023

Tabelle 5.5: Liste der verwendeten sekundären Antikörper in der Immunocytochemie. Der unkonjugierte Antikörper wurde für den PLA verwendet (s. 5.1.5.2 und 5.2.1.7)

Antigen und Farbstoff/HRP	Herkunft	ICH/WB	Quelle/Referenz
Maus Alexa-488	Ziege	1:500	Invitrogen
Maus Alexa-568	Ziege	1:500	Invitrogen
Maus Alexa-647	Ziege	1:500	Invitrogen
Kaninchen Alexa-488	Ziege	1:500	Invitrogen
Kaninchen Alexa-568	Ziege	1:500	Invitrogen
Kaninchen Alexa-647	Ziege	1:500	Invitrogen
Ratte Alexa-488	Ziege	1:500	Invitrogen
Ratte Alexa-568	Ziege	1:500	Invitrogen
Ratte Alexa-647	Ziege	1:500	Invitrogen
Meerschweinchen Alexa-488	Ziege	1:500	Invitrogen
Meerschweinchen Alexa-568	Ziege	1:500	Invitrogen
Meerschweinchen Alexa-647	Ziege	1:500	Invitrogen
Meerschweinchen unkonjugiert	Ziege	PLA	Jackson Immuno Research Code Nr.: 106-005-003

5.1.6 Material für Elektronenmikroskopie

5.1.6.1 Puffer, Lösungen und Kits

Cacodylat-Puffer Stammlösung: Cacodylat-Na-Salz in dH₂O, pH 7,2 mit HCl eingestellt

Fixierlösung 2 % (v/v) Glutaraldehyd in 0,1 M Cacodylat-Puffer

Epoxy Embedding Medium Kit Sigma-Aldrich

Osmium Tetroxid 4 % (w/w) in H₂O Electron Microscopy Sciences

5.1.6.2 Allgemeines Material

Aclarfolie Plano

5.1.7 Geräte

Sterilbank Hera Safe KS 12 Heraeus Instruments

Inkubator Heraeus BBD 6220 Heraeus Instruments

Zentrifuge Biofuge pico Heraeus Instruments

Zentrifuge Heraeus Fresco 21 Thermo Scientific

Zentrifuge Avanti J-26 XP JX508L37 Beckmann & Coulter

Gel Doc XR Systems Bio-Rad Laboratories

Trans-Blot SD Semi Dry Transfer Cell Bio-Rad Laboratories

Fluoreszenzmikroskop Imager ZI mit ApoTime Carl Zeiss

Konfokal-Fluoreszenzmikroskop LSM780 Carl Zeiss

Fluoreszenzmikroskop ELYRA PS	Carl Zeiss
Mikroskop Axio Vert. A1	Carl Zeiss
PCR-Gerät TProfessional Thermo Cycler Gradient	Biometra
PCR-Gerät PeqStar2x	PeqLab
NanoDrop 2000c	PeqLab
Taumler Polymax 2040	Heidolph
Schüttler Mixing Block MB-102	Bioer
Schüttler SM-30	Edmund Bühler GmbH
Mikrowellenofen	Sharp
Waage BL 600	Satorius
Feinwaage FA-110-4i	Faust
Kühl- und Gefrierschränke	Bauknecht, Liebherr und Siemens
37 °C und 4 °C Raum	HHU Gebäude 26.02.02 Raum 35A und 29

5.1.8 Computer, Software und Datenbanken

IBM kompatible PCs mit Windows XP oder Windows 7	
Apple Mac, OS X oder höher	
Photoshop CS3-5	Adobe
Fiji/ImageJ 1.50a 64 automatisch aktualisiert	NIH USA
Office 2013	Microsoft
AxioVision Rel 4.6 und SE64 Rel 4.9	Zeiss
Zen lite 2012	Zeiss
CLC Sequence Viewer 5	CLC Bio, Qiagen
SerialCloner 2.6.1 automatisch aktualisiert	SerialBasics
Chromas lite 2.1.1	Technelysium Pty Ltd
NCBI Pubmed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/
NCBI Blast	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

5.2 Methoden

5.2.1 Molekularbiologische Methoden

5.2.1.1 Transformation chemisch kompetenter Zellen

100 µl Aliquots chemisch kompetenter Zellen (DH5 α , Mach1) wurden auf Eis aufgetaut, Plasmid DNA hinzugegeben und 15 min auf Eis inkubiert. Es folgte der Hitzeschock bei 42 °C für 90 s. Alsdann wurde das Gefäß wieder auf Eis gestellt, 900 µl LB-Medium hinzugegeben, gemischt und 1 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Dann wurden die Bakterien 30 s bei 13000 x g abzentrifugiert und 900 µl des Überstandes abgenommen. Nach der folgenden Resuspension des Pellets in dem verbliebenen Medium wurde die Suspension auf LB-Agar-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Dem LB-Agar wurde zuvor schon ein Antibiotikum zugesetzt, gegen welches das Plasmid eine Resistenz trug, sodass nach erfolgreich transformierten Bakterien selektiert werden konnte.

5.2.1.2 Minipräparation von Plasmid-DNA

Für eine Minipräparation von Plasmid-DNA wurden einzelne Kolonien von den LB-Agar Platten in 3 ml LB-Medium mit Antibiotikum in Reagenzgläsern überführt und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Am folgenden Tag wurden 2 ml der jeweiligen Bakteriensuspension in Eppendorfgefäße überführt und 5min bei 13000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet in 300 µl S1 Puffer resuspendiert. Danach wurden 300 µl S2 Puffer hinzugegeben um die Zellen 5 min bei Raumtemperatur zu lysieren. Die Lyse wurde anschließend mit 300 µl S3 Puffer gestoppt und das Lysat 5 min auf Eis gelagert. Im Folgenden wurde mindestens 20 min bei 4 °C mit mindestens 13000 x g zentrifugiert. 750 µl des entstandenen Überstandes wurden abgenommen und in einem neuen Eppendorfgefäß mit 500 µl Isopropanol gemischt und bei 4 °C und mindestens 13000 x g für mindestens 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und auf das erhaltene DNA Pellet 500 µl 70 %iges Ethanol gegeben und mindestens 10 min bei RT und 13000 x g zentrifugiert. Auch hier wurde der Überstand verworfen und das Pellet 5 min bei 50 °C getrocknet und abschließend in Wasser gelöst.

5.2.1.3 Midipräparation von Plasmid-DNA

Für die Midipräparation wurden 100 ml LB-Medium in Erlenmeyerkolben mit Bakterien aus Minikulturen angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Am nächsten Tag wurde die Midipräparation mit dem Nucleo Bond Xtra Midi Kit von Macherey&Nagel nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

5.2.1.4 Restriktion von DNA mit Endonukleasen

Die Restriktionsendonukleasen wurden von der Firma New England Biolabs bezogen und mit den empfohlenen Puffern verwendet. Das Gesamtvolumen eines Ansatzes zur Analyse war hierbei grundsätzlich 20 µl für einen präparativen Ansatz wurden 50 µl Gesamtvolumen benutzt, wobei die

Mengenverhältnisse entsprechen angepasst wurden. Alle Ansätze setzen sich dabei standardmäßig wie folgt zusammen:

- DNA variabel
- Restriktionsenzyme je 0,1-0,5 μ l
- Puffer (10x) 2 μ l
- BSA 0,5 μ l
- ddH₂O auf 20 μ l Gesamtvolumen aufgefüllt

5.2.1.5 Gelelektrophorese und Gelextraktion von DNA

DNA Fragmente einer PCR oder eine DNA-Restriktion wurden mithilfe der Gelelektrophorese aufgetrennt. Hierbei wurden 0,8 – 1,8 %ige Agarosegele mit Ethidiumbromid verwendet. Sollten die Fragmente extrahiert werden, wurden die gewünschten Banden mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe des Gelextraktionskits Zymoclean Gel DNA Recovery Kit von Zymo Research nach Anleitung des Herstellers aufgereinigt.

5.2.1.6 Ligation

Für Subklonierungen von PCR-Fragmenten wurde das pGEM-T Easy-Vektor System von Promega verwendet. Die Ligation setzte sich wie folgt zusammen:

- 2x Rapid Ligation Buffer 5 μ l
- pGEM-T Easy Vektor (25 ng) 0,5 μ l
- PCR Produkt X μ l
- T4-DNA-Ligase 1 μ l
- ddH₂O auf 10 μ l Gesamtvolumen aufgefüllt

Die Ligation wurde bei RT für 1 h inkubiert, oder für maximale Effizienz bei 4 °C über Nacht.

Für andere Ligationen wurden die T4 Ligase und der Puffer von NEB verwendet. Sie wurden über Nacht bei 18 °C inkubiert und wurden folgendermaßen angesetzt:

- Puffer (10x) 1,5 μ l
- Vektor X μ l
- Insert X μ l
- T4-DNA-Ligase 1 μ l
- ddH₂O auf 15 μ l Gesamtvolumen aufgefüllt

Insert und Vektor wurden in einem Molaren Verhältnis von 1:1 bis 8:1 eingesetzt.

5.2.1.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für PCR Ansätze zur Klonierung wurde die OneTaq Polymerase mit dazugehörigem Puffer von NEB verwendet. Es wurde folgender, vom Hersteller empfohlener Reaktionsansatz genutzt:

- 5x OneTaq Standard Buffer 5 µl
- 10mM dNTPs 0,5 µl
- 10µM Vorwärts-Primer 0,5 µl
- 10µM Rückwärts-Primer 0,5 µl
- OneTaq DNA Polymerase 0,125 µl
- Template DNA X µl (<1000 ng finale Konzentration)
- ddH₂O auf 25 µl Gesamtvolumen aufgefüllt

Das PCR-Programm für die Amplifikation wurde nach den vom Hersteller der Polymerase empfohlenen Bedingungen durchgeführt und für die jeweiligen Primer und die Länge des Produkts angepasst.

Schritt	Temperatur	Zeit	Wiederholungen
Initiale Denaturierung	94 °C	3 min	1x
Denaturierung	94 °C	15-45 s	30-40x
Primer Hybridisierung	45-68 °C	15-60 s	
Elongation	68 °C	1 min/kb	
Finale Elongation	68 °C	5 min	1x
Kühlung	12 °C	∞	

Für die Genotypisierung von Mäusen und Zellen wurden PCR Ansätze und Programme entwickelt und optimiert, die dann immer gleich verwendet werden konnten. Hierfür wurde die GoTaq G2 Flexi DNA Polymerase mit dazugehörigem und Puffer genutzt.

Genotypisierung von Cc2d1a

- 5x Green GoTaq Flexi Puffer 5 µl
- MgCl₂ Lösung (25 mM) 1,5 µl
- Nukleotide Mix 10mM 0,5 µl
- P1 Vorwärts Primer 20 µM 0,1 µl
- P3 Rückwärtsprimer 20 µM 0,2 µl
- P5 Vorwärtsprimer 20 µM 0,1 µl
- GoTaq G2 Polymerase (5 u/µl) 0,1 µl
- DNA 1 µl
- ddH₂O 16,5 µl

Schritt	Temperatur	Zeit	Wiederholungen
Initiale Denaturierung	94 °C	3 min	1x
Denaturierung	94 °C	45 s	35x
Primer Hybridisierung	55 °C	45 s	
Elongation	72 °C	1 min	
Finale Elongation	72 °C	10 min	1x
Kühlung	12 °C	∞	

Genotypisierung von Vps4a

- 5x Green GoTaq Flexi Puffer 5 µl
- MgCl₂ Lösung (25 mM) 1,5 µl
- Nukleotide Mix 10mM 0,5 µl
- 5F Vorwärtsprimer 10 µM 0,5 µl
- 5R Rückwärtsprimer 10 µM 0,25 µl
- 3.1 Rückwärtsprimer 10 µM 0,25 µl
- GoTaq G2 Polymerase (5 u/µl) 0,1 µl
- DNA 1 µl
- ddH₂O 15,9 µl

Schritt	Temperatur	Zeit	Wiederholungen
Initiale Denaturierung	94 °C	5 min	1x
Denaturierung	94 °C	45 s	41x
Primer Hybridisierung	54 °C	45 s	
Elongation	72 °C	1,5 min	
Finale Elongation	72 °C	5 min	1x
Kühlung	12 °C	∞	

Genotypisierung von Vps4b

- 5x Green GoTaq Flexi Puffer 5 µl
- MgCl₂ Lösung (25 mM) 1,5 µl
- Nukleotide Mix 10mM 0,5 µl
- Primer Mix 1 µl
- GoTaq G2 Polymerase (5 u/µl) 0,1 µl
- DNA 1 µl
- ddH₂O 15,9 µl

Der Primer Mix für diese PCR setzte sich wie folgt zusammen: 20 µM Vps4bKO_WT_Rev2, 10 µM Vps4bKO_Wt_For2 und 5 µM Vps4bKO_NEO_For1.

Schritt	Temperatur	Zeit	Wiederholungen
Initiale Denaturierung	94 °C	3 min	1x
Denaturierung	94 °C	20 s	41x
Primer Hybridisierung	58,5 °C	30 s	
Elongation	72 °C	30 s	
Finale Elongation	72 °C	5 min	1x
Kühlung	12 °C	∞	

Genotypisierung der CRISPR/Cas9 Klone

- 5x Green GoTaq Flexi Puffer 5 µl
- MgCl₂ Lösung (25 mM) 1,5 µl
- Nukleotide Mix 0,5 µl
- Int2-For 10 µM 0,5 µl
- Int3-Rev 10 µM 0,5 µl
- GoTaq G2 Polymerase (5 u/µl) 0,1 µl
- DNA 1 µl
- ddH₂O 15,9 µl

Schritt	Temperatur	Zeit	Wiederholungen
Initiale Denaturierung	94 °C	5 min	1x
Denaturierung	94 °C	30 s	35x
Primer Hybridisierung	57 °C	30 s	
Elongation	72 °C	30 s	
Finale Elongation	72 °C	5 min	1x
Kühlung	12 °C	∞	

5.2.1.8 Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA-Plasmiden wurde von der Firma SeqLab durchgeführt. Hierzu wurden 700-1200 ng DNA in 12 µl Gesamtvolumen (aufgefüllt mit ddH₂O) an die Firma geschickt. Primer aus ihrer „Standardliste“ wurden durch die Firma selbst hinzugegeben. Handelte es sich um spezielle, eigene Primer wurden zu obigem Ansatz 3 µl Primer [10 µM] hinzu pipettiert. Die Sequenzen wurden dann vom Server der Firma heruntergeladen und konnten dann überprüft werden.

5.2.2 Proteinbiochemische Methoden5.2.2.1 Proteingewinnung aus Zellen

Zur Gewinnung von Proteinen aus Zellen wurden diese auf 10 cm Zellkulturschalen ausgesät. Nachdem die Schalen konfluent bewachsen waren, wurde 1 ml 1x Laemmli Puffer auf die Zellen gegeben und 10 min bei 4°C inkubiert. Das entstehende, zähflüssige Lysat wurde dann mit einem Zellschaber vollständig von der Schale gelöst und in ein Eppendorfgefäß übertragen. Es folgte eine Inkubation von 10 min bei 95 °C und ein Zentrifugationsschritt bei 13000 x g für 5 min. Der Überstand konnte dann auf für SDS-Gelanalysen und Western Blots weiter benutzt werden. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

5.2.2.2 SDS-Page und Western Blot

Zur Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe wurden 30-50 µl Proteinlysate auf ein 10 %iges SDS-Gel geladen. Das Gel bestand aus einem Sammelgel, welches das Lysat bei 80 V Spannung durchlief und einem Trenngel. Beim Erreichen des Trenngels wurde die Spannung auf 120-140 V erhöht. Durchgeführt wurde dieser Teil im BioRad „Mini Format 1-D Electrophoresis System“.

Für den Western Blot wurde eine PVDF-Membran in Methanol inkubiert und anschließend wurden die im SDS-Gel aufgetrennten Proteine in einem „Semi-Dry Blotter“ von BioRad auf diese Membran übertragen. Die Übertragung erfolgte bei konstanten 200 mA und maximal 25 V für 1 Stunde. Danach wurde die Membran für 1 Stunde bei Raumtemperatur in 5 % Magermilchpulver in PBS geblockt und dann über Nacht mit dem primären Antikörper in 2 % Magermilchpulver in PBS auf 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Membran 3 Mal in 0,1 % PBT für jeweils 20 Minuten gewaschen. Daraufhin folgte die Inkubation mit dem HRP-gekoppelten, sekundären Antikörper für 1 h bei Raumtemperatur und wiederum drei 20 minütige Waschschrte mit 0,1 % PBT. Zur Detektion wurde das „BM Chemiluminescence Western Blot Kit“ benutzt und die durch die Meerrettich-Peroxidase entstehenden Signale auf einen Röntgenfilm übertragen.

5.2.3 Maushaltung und Techniken der Zellkultur

5.2.3.1 Maushaltung und Zucht

Die Haltung und Verpaarung der Mäuse wurde von der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und Tierschutzaufgaben (ZETT) der Universität Düsseldorf durchgeführt. Lediglich für die Untersuchung von Embryonen oder die Gewinnung von MEF-Zellen wurden die Mäuse in das eigene Labor gebracht.

5.2.3.2 Genotypisierung von Mäusen

Für die Genotypisierung der Mäuse wurden vom ZETT Schwanzspitzen Biopsien genommen und dann abgeholt. Die Schwanzspitzen wurden über Nacht bei 56 °C in 150-200 µl DirectPCR-Tail Puffer und Proteinase K 1:50 unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Morgen wurde 45-90 min bei 85 °C inkubiert und abschließend 5 min bei 13000 x g zentrifugiert. Der Überstand konnte dann für die jeweilige Genotypisierungs-PCR benutzt werden (s. 4.).

5.2.3.3 Gewinnung von MEF-Zellen

Eine trächtige Maus wurde durch Genickbruch getötet und mit 70 %igem Ethanol gewaschen. Danach wurde der Bauchraum geöffnet und die Embryonen in eine Petrischale mit sterilem PBS überführt. Anschließend wurden sie vom Uterus getrennt. Scheren und Pinzetten wurden hierbei, zwischen der Präparation einzelner Embryonen immer mit 70 %igem Ethanol gewaschen um die Verschleppung von Zellen zu vermeiden. Ein Teil des Kopfes wurde abgetrennt und zur DNA-Gewinnung lysiert. Die roten Organe wurden ebenfalls entfernt und zur Proteingewinnung lysiert. Unter der Sterilbank wurden nun die Embryonen in 5 ml Trypsin zerkleinert und in Erlenmeyerkolben, welche mit Gaspelchen am Boden gefüllt waren, überführt. Im Anschluss wurden diese 30 min bei 37 °C geschüttelt wodurch die Embryonen weiter zerkleinert wurden. Nach der Zugabe von 5 ml Kulturmedium folgte die Überführung der gesamten 10 ml Zellsuspension in ein Falcon Gefäß, welches dann 5 min bei 100 x g zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 5 ml Kulturmedium resuspendiert und in eine T25 Flasche gefüllt. Nun konnten die Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert werden. Dies wurde als Passage 1 gezählt. Zur Immortalisierung der MEF

Zellen wurden diese zwischen Passage 3 und 5 mit dem linearisierten pMSSVLT SV40 Vektor transfiziert. Diese Transfektion wurde mit Lipofectamine nach Herstellerangaben durchgeführt. Sechs Stunden nach der Transfektion wurde das Kultivierungsmedium erstmals gewechselt. 24 Stunden nach der Transfektion wurde das Kultivierungsmedium abermals gewechselt und durch Medium mit Neomycin ersetzt. Da der Immortalisierungsvektor eine Neomycin Resistenz trägt erfolgte so eine Selektion der erfolgreich transfizierten MEF Zellen.

5.2.3.4 Kultivierung und Passage von Zellen

Die Zellen wurden in Zellkulturmedium in Zellkulturflaschen oder –schalen bei 37 °C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. War der Boden des jeweiligen Gefäßes konfluent bewachsen (80 % oder höher) wurde mit 1x DPBS gewaschen und anschließend mit Trypsin 5 min bei 37 °C inkubiert. Die Wirkung des Trypsins wurde dann durch Zugabe des doppelten Volumens von Kulturmedium abgestoppt. Schließlich konnte die entstandene Zellsuspension in gewünschte Menge in neue Gefäße überführt oder eingefroren werden.

5.2.3.5 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurde die Zellsuspension in ein Falcon Tube überführt und 5 min bei 100 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 500 µl Kulturmedium resuspendiert und in ein Kryokoservierungsgefäß überführt. Anschließend wurden 500 µl 2x Gefriemedium hinzu gegeben, durch invertieren gemischt und das Gefäß auf Eis gestellt und schließlich bei -72 °C eingefroren. Für die Langfristige Aufbewahrung wurden sie nach 2-3 Wochen in flüssigen Stickstoff umgelagert.

Um die Zellen wieder aufzutauen wurden sie mit Kulturmedium auf Raumtemperatur gespült bis das Gefriemedium nicht mehr gefroren war und in mindestens 4 ml Kulturmedium in einem Falcon Tube überführt. Die Zellen wurden dann 5 min bei 100 x g abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Im Anschluss wurden die Zellen in Kulturmedium resuspendiert um sie dann in die gewünschten Gefäße zur Kultivierung zu überführen.

5.2.3.6 Transfektion von Zellen

Für die Transfektion mit Plasmid-DNA wurde das Transfektionsreagenz Lipofectamine2000 von LifeTechnologies verwendet. Hierbei wurden das Protokoll und die empfohlenen Mengen an Reagenz und DNA vom Hersteller verwendet. Für die Transfektion von Zellen für lebend-Zell FRET Experimente wurden die Mengen für 24-well Platten verwendet. Zudem wurde die Menge an verwendeter DNA erhöht auf 1 µg pro Plasmid.

5.2.4 Immunozytochemie und Elektronenmikroskopie

5.2.4.1 Immunozytochemie

Die Zellen wurden auf Deckgläschen in 24well Platten Kammern ausgesät und kultiviert bis sie konfluent gewachsen waren. Anschließend wurde das Medium abgenommen, mit PBS gewaschen und folgende Schritte, wenn nicht anders beschrieben, bei Raumtemperatur durchgeführt:

- 10 min Fixierung bei 4 °C mit 4 % Paraformaldehyd in PBS (EM-grade)
- 3x 5 min waschen mit PBS
- 10 min permeabilisieren mit 0,3 % Triton X-100 in PBS
- 30 min oder länger Blockierung mit 0,3 M Glycin, 10 % NGS, 0,1 % Tween in PBS
- Über Nacht Inkubation des primären Antikörpers bei 4 °C in 1,5 % NGS, 0,1 % Tween in PBS
- 3x 5min waschen mit 0,1 % Tween in PBS (PBT)
- 1 h Inkubation des sekundären Antikörpers in 1,5 % NGS, 0,1 % Tween in PBS
- 3x 5 min waschen mit PBT
- 20-60 min Inkubation mit DAPI (Stammlösung 100 µg/ml in 0,18 M Tris-HCl pH 7,4), 1:333 in PBS
- Einbettung in Vectashield

5.2.4.2 Proximity Ligation Assay

Der Proximity Ligation Assay (PLA) ermöglicht die Detektion von Interaktionen auf endogenem Level in Zellen oder Geweben. Hierzu werden primäre Antikörper verwendet, welche die Zielproteine binden können. Die sekundären Antikörper sind mit DNA-Fragmenten konjugiert und werden als PLA-Sonden bezeichnet. Bei einem Abstand von unter 40 nm dieser DNA-Fragmente können diese durch eine Ligase verknüpft werden. Im Anschluss wird durch eine Polymerase nach dem „rolling circle“ Prinzip ein langer DNA-Einzelstrang generiert. An diesen Hybridisieren dann fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide. Durch diese Signalverstärkung durch die Bindung mehrerer dieser Oligonukleotide an einen DNA-Einzelstrang kann bereits eine einzelne Protein-Protein Interaktion im Fluoreszenzmikroskop sichtbar werden. Da von Olink Bioscience keine PLA-Sonde gegen primäre Meerschweinchen Antikörper angeboten wurden, wurde mit Hilfe des Duolink In Situ Probemaker dieser selbst hergestellt. Hierfür wurde ein unkonjugierter Ziege-anti-Meerschweinchen Antikörper (Jackson ImmunoResearch Laboratories) benutzt.

Für den PLA wurde eine modifizierte Antikörperfärbung durchgeführt, bei welcher die Waschritte nach Inkubation mit dem primären Antikörper entfallen. Wenn nicht anders angegeben wurden die Schritte bei Raumtemperatur durchgeführt.

- 10 min Fixierung bei 4 °C mit 4 % Paraformaldehyd in PBS (EM-grade)
- 3x 5 min waschen bei mit PBS
- 10 min permeabilisieren mit 0,3 % Triton X-100 in PBS
- 30 min oder länger Blockierung mit 0,3 M Glycin, 10 % NGS, 0,1 % Tween in PBS

- Über Nacht Inkubation des primären Antikörpers bei 4 °C in 1,5 % NGS, 0,1 % Tween in PBS

Anschließend wurde nach dem Protokoll des Herstellers (Olink Bioscience) vorgegangen.

5.2.4.3 Einbettung von Zellen für die Elektronenmikroskopie

Aclarfolie wird zurecht geschnitten, sodass sie in die Kammern von 96 well Platten passt und dann autoklaviert. Die Folie wird auf den Boden der Kammern platziert und die Zellen darauf kultiviert. Sind die Zellen konfluent gewachsen wird das Medium abgenommen und mit auf 37 °C erwärmtem PBS gewaschen. Anschließend werden folgende Schritte bei Raumtemperatur durchgeführt:

- 30min Fixierung in 2 % Glutaraldehyd, 0,2 gesättigter Pikrinsäure in 0,1 M Cacodylat-Puffer
- 3x 5min waschen mit 0,1 M Cacodylat-Puffer
- 30min Osmierung mit 1 % OsO₄ in 0,1 M Cacodylat-Puffer im Dunkeln
- 5x 5min waschen mit 0,1 M Cacodylat-Puffer

Die anschließende Entwässerung wird auf Eis durchgeführt.

- 7 min 50 % Ethanol
- 7 min 70 % Ethanol
- 7 min 90 % Ethanol
- 7 min 96 % Ethanol
- 2x 10 min 100 % Ethanol

Die Einbettung in Epon findet bis auf den finalen Schritt bei 4 °C statt

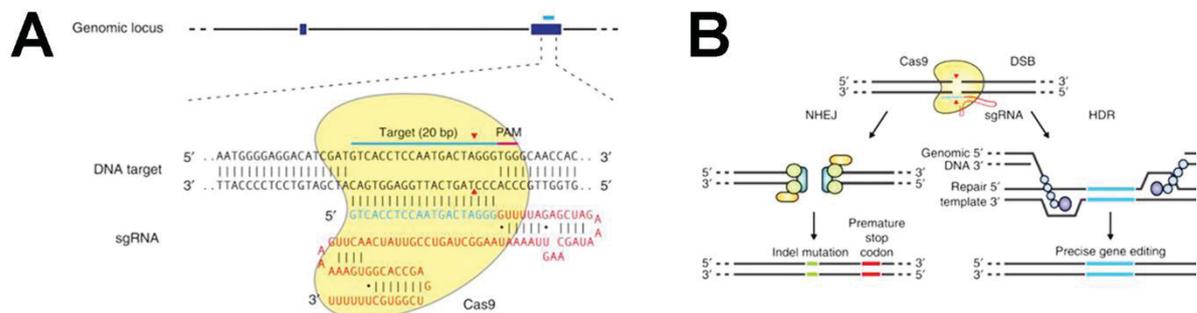
- 1 h in 1:1 Epon-Ethanol
- 2 h in 3:1 Epon-Ethanol
- Über Nacht reines Epon
- 2x 2 h reines Epon
- 48 h 65 °C reines Epon

Epon 49 % Epoxy; 27 % DDSA; 22 % NMA; 2 % DMP30 (s. 5.1.6.1)

5.2.5 Das CRISPR/Cas9 System

Das CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)/Cas-System ist ein adaptives antivirales Abwehrsystem aus Bakterien. Seine Funktion besteht darin, durch RNA-gesteuerte Nukleasen fremde (virale) Oligonukleotide zu zerschneiden und damit zu zerstören. Dieses System kann zum „Genome editing“ genutzt werden. Cas9 (Crispr-associated protein 9) ist eine Endonuklease, welche Doppelstrangbrüche (DSB) induzieren kann. Diese können durch zwei Mechanismen innerhalb der Zelle repariert werden, dem „non-homologous end-joining“ (NHEJ) und dem „homology-directed repair“ (HDR) (Abb.5.1). Bei der NHEJ-Reparatur entstehen häufig Insertions- oder Deletionsmutationen im Bereich des DSB. Dies macht man sich zu Nutze um

Mutationen zu erzeugen. Zusammen mit Cas9 bildet die „guide RNA“ (gRNA) einen Komplex. Die gRNA besteht dabei aus der crRNA und der tracrRNA. Die crRNA besitzt eine variable Sequenz welche komplementär an die Ziel-DNA binden kann. Die tracrRNA hybridisiert mit der crRNA und bindet an Cas9. Der gRNA-Cas9 Komplex kann an Zielsequenzen der DNA binden welche komplementär zur 20 Nukleotide langen Erkennungssequenz der gRNA sind und diese dann Schneiden. Zusätzlich muss sich neben der Erkennungssequenz eine PAM Sequenz (5'-NGG) befinden. Um das Risiko von „Off-targets“ zu minimieren können Cas9 Varianten benutzt werden, welche durch eine Nickase Einzelstrangbrüche erzeugen (Ran et al., 2013; Sander und Joung, 2014).



C

Zielsequenz 1

5'... GGACATGCT**CCTGGGGGTGGATGAGACTGAACATGATGGAGACCTGGAGCCTGAGTTACTGGCACTCACAGGGGAAACAG**...3'
 3'... CCTGTACGAG**GCACCCACCCTACTCTGACTTCTACTACCTCTGGACCTCGACTCAATGACCGTGAGTGTCC**CCTTTGTC...5'

Zielsequenz 2

Abb.5.1 Schematische Darstellung der CRISPR Funktion. (A) Cas9 bindet die gRNA über die tracrRNA (rot) und kann so durch die crRNA (blau) die 20bp lange Zielsequenz in der genomischen DNA erkennen und einen Doppelstrangbruch (DSB) hervorrufen. Ein DSB kann durch zwei Methoden repariert werden (B). Die eine Variante ist das fehleranfällige „nonhomologous end-joining“ (NHEJ), die andere das „homology-directed repair“ (HDR), bei welchem weniger Fehler entstehen (modifiziert nach Ran et al., 2014). Durch den Einsatz von Nickase Varianten von Cas9 kann die Effizienz erhöht werden. Diese führen jeweils zu einem Einzelstrangbruch, wodurch nicht zusammenpassende 5' Überhänge entstehen. Jede Nickase-Variante hat dabei ihre eigene Zielsequenz. C zeigt die beiden Zielsequenzen im Exon 3 von *Cc2d1b* (blau) und die benachbarten PAM Regionen (rot).

Als Grundlage diente das Plasmid pSpCas9n(BB)-2A-GFP (Cas9-Nickase) (Ran et al., 2014). Zwei Zielsequenzen im dritten Exon von *Cc2d1b* wurden als Ziel für die Cas9-Nickase-gRNA Komplexe ausgewählt (Abb.3.1 C). Die Ausgangs-MEF-Zelllinien *Vps4a*^{+/-}; *Vps4b*^{+/-} und *Cc2d1a*^{-/-}; *Vps4a*^{+/-}; *Vps4b*^{+/-} wurden mit beiden Plasmiden transfiziert. Durch das ebenfalls in dem Vektor codierte GFP konnten anhand der Fluoreszenz erfolgreich transfizierte Zellen mittels FACS selektiert werden. Diese wurden im Anschluss kultiviert und durch Verdünnungsreihen vereinzelt werden. Aus den Zelllinien wurde dann DNA gewonnen, das Exon 3 mittels PCR vermehrt und in den pGEM-T easy Vektor ligiert. Mit diesem Vektor wurden dann Bakterien transformiert und einzelne, selektierte

Bakterienklone vermehrt und die Plasmide aufgereinigt (Kapitel 4.2). Anschließend wurden jeweils 10 Minipräparationen sequenziert.

Es wurden letztlich zwei Zelllinien generiert, welche keine wildtypischen Exon 3 Sequenzen enthalten, sondern eine Mischung aus mehreren Mutationen die zu einer Verschiebung des Leserasters führen. Dies können Mutationen in unterschiedlichen Ausgangszellen sein oder Mutationen auf den beiden Homologen Chromosomen in einer Zelle. Dies kann nicht unterschieden werden.

Linie: *Cc2d1b*^{-/-}; *Vps4a*^{+/-}; *Vps4b*^{+/-}

Deletion/Insertion	Frameshift/nonsense
47 Basen Deletion	Ja
43 Basen Deletion	Ja

Linie: *Cc2d1a*^{-/-}; *Cc2d1b*^{-/-}; *Vps4a*^{+/-}; *Vps4b*^{+/-}

Deletion	Frameshift/nonsense
32 Basen Deletion	Ja
25 Basen Deletion	Ja
4 Basen Insertion & 36 Basen Insertion	Ja

Exon 3 kodiert die Aminosäuren 32 bis 53 von CC2D1B. Um zu überprüfen ob tatsächlich kein CC2D1B Protein mehr gebildet wird, wurden Western Blot Analysen durchgeführt (s. Anhang Abb.8.1).

5.2.6 Methoden zur FRET-Messung

5.2.6.1 Der Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)

Der Förster-Resonanz-Energie-Transfer beschreibt den physikalischen Vorgang, bei dem Energie von einem Molekül (Donor) auf ein anderes Molekül (Akzeptor) übertragen wird. Diese Energieübertragung ist nur über eine Entfernung von maximal 10 nm möglich. FRET tritt ebenfalls zwischen Fluoreszenzmolekülen auf. Dies kann genutzt werden um die Interaktion zwischen Fusionsproteinen zu untersuchen. Um FRET zwischen zwei Fluoreszenzmolekülen untersuchen zu können, muss sich das Emissionsspektrum des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappen (Abb.5.2; Übersicht in Sisamakos et al., 2010 und Vogel et al., 2006).

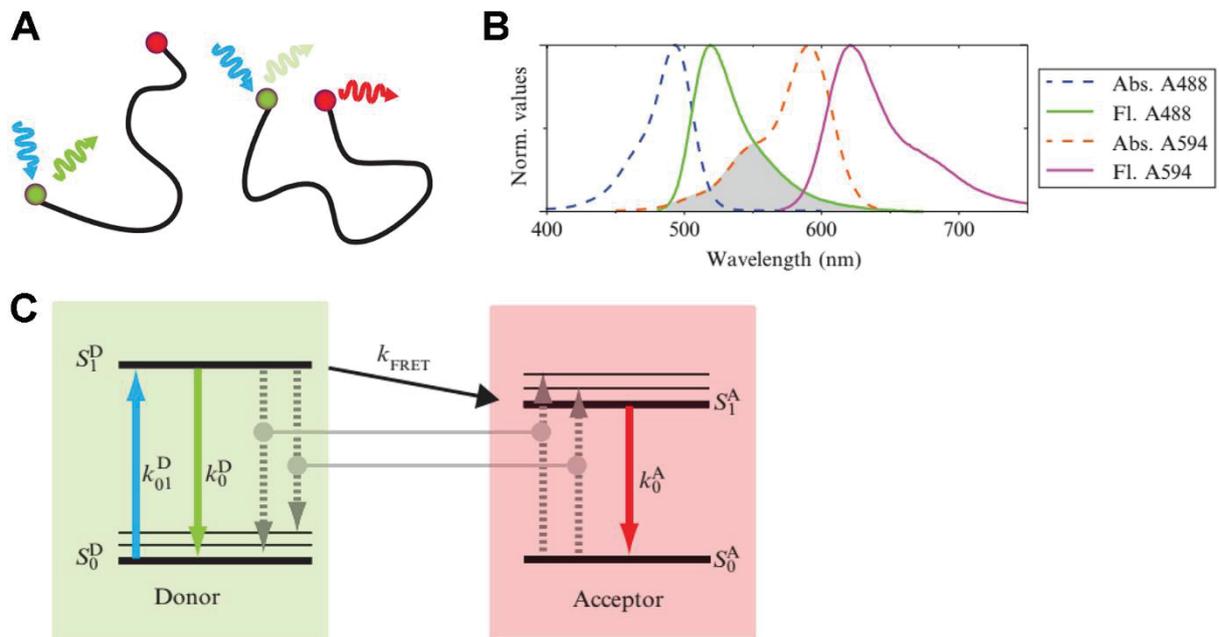


Abb.5.2 Grundlagen der FRET-Theorie. FRET tritt nur auf, wenn sich zwei Chromophore auf weniger als 10 nm annähern. Sind Donor und Akzeptor zu weit voneinander entfernt gibt der Donor aufgenommene Energie direkt als Fluoreszenz ab (A, links). Sind die Chromophore nah genug beieinander kann der Donor die aufgenommene Energie zum Teil an den Akzeptor übertragen. Dieser kann die Energie dann ebenfalls als Fluoreszenz abgeben (A, rechts). Weiterhin muss sich für FRET bei Chromophoren das Emissionsspektrum des Donors (B, grün) mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors (B, orange) überlappen (B, graue Fläche). Ein vereinfachtes Jablonski-Diagramm verdeutlicht die Energieübertragung (C). Nimmt der Donor Energie auf (blauer Pfeil), kann er diese unter anderem durch Fluoreszenz abgeben (grüner Pfeil) oder wenn möglich an den Akzeptor übertragen (schwarzer Pfeil). Dieser kann die vom Donor übertragene Energie dann als Fluoreszenz abgeben (roter Pfeil) (modifiziert nach Sisamakakis et al., 2010).

5.2.6.2 FRET Messung durch Akzeptorphotobleichen

Eine Möglichkeit FRET zu messen ist durch das sogenannte Akzeptorphotobleichen. Dabei wird der Akzeptor durch starke Bestrahlung im Wellenlängenbereich seines Absorptionsspektrums „geblichen“, das heißt er verliert seine Fähigkeit der Fluoreszenz. Dadurch kann vom Donor keine Energie mehr auf den Akzeptor übertragen werden. Der Donor gibt dann verstärkt Energie durch eigene Fluoreszenz ab. Dieser Anstieg der Intensität der Donorfluoreszenz wird dann gemessen. Für diese FRET-Messungen wurden wildtypische NIH3T3 Zellen transient mit einem Donor und einem Akzeptorkonstrukt transfiziert. Als Transfektionsreagenz diente Lipofectamine und es wurde das Herstellerprotokoll befolgt. Als Donor dienten Fusionsproteine mit N-terminal fusioniertem EGFP, als Akzeptor dienten Fusionsproteine mit N-terminal fusioniertem RFP. Die FRET Messungen wurden sieben Stunden nach der Transfektion gestartet und wurden innerhalb von maximal drei Stunden durchgeführt. Für die Messungen wurde das Zeiss LSM 780 mit einem 40x Objektiv (Numerische Apertur 1,3; Öl). EGFP wurde bei 488 nm mit einem Argon Laser angeregt. Die Emission wurde zwischen 490 nm und 551 nm gemessen. RFP wurde mit einer Wellenlänge von 561 nm mit einer Diode angeregt und die Emission zwischen 569 nm und 613 nm gemessen. Die Bildfeldgröße betrug konstant 512x512 Pixel. Geblichen wurde ein runder Bereich von 50 Pixel Durchmesser mit 100 %

Laserintensität der 561 nm Diode in 120 Wiederholungen. Drei Aufnahmen wurden vor und fünf Aufnahmen nach dem Bleichen gemacht. Gemessen wurde der Anstieg der Intensität der Donorfluoreszenz (EGFP) im gesamten geblichenen Bereich und zusätzlich in einem Bereich mit starker Akzeptorkonzentration. Die prozentuale Veränderung der EGFP Fluoreszenzintensität direkt vor und nach dem Bleichen wurde analysiert wobei folgende Formel benutzt wurde:

$$E_{\text{FRET}} = (EGFP_{\text{nach}} - EGFP_{\text{vor}}) / EGFP_{\text{nach}} \times 100.$$

Mindestens zwei unabhängige Experimente wurden pro FRET-Paar durchgeführt. Für jedes Experiment wurden NIH3T3 Zellen neu ausgesät und die Transfektion durchgeführt. Pro Experiment wurde in mindestens neun Zellen je eine Messung durchgeführt.

6. Literaturverzeichnis

- Adell, M.A.Y., Vogel, G.F., Pakdel, M., Muller, M., Lindner, H., Hess, M.W., and Teis, D. (2014). Coordinated binding of Vps4 to ESCRT-III drives membrane neck constriction during MVB vesicle formation. *The Journal of Cell Biology* 205, 33–49.
- Al-Tawashi, A., and Gehring, C. (2013). Phosphodiesterase activity is regulated by CC2D1A that is implicated in non-syndromic intellectual disability. *Cell Communication and Signaling* 11:47
- Al-Tawashi, A., Jung, S.Y., Liu, D., Su, B., and Qin, J. (2012). Protein Implicated in Nonsyndromic Mental Retardation Regulates Protein Kinase A (PKA) Activity. *Journal of Biological Chemistry* 287, 14644–14658.
- Asao, H., Sasaki, Y., Arita, T., Tanaka, N., Endo, K., Kasai, H., Takeshita, T., Endo, Y., Fujita, T., and Sugamura, K. (1997). Hrs Is Associated with STAM, a Signal-transducing Adaptor Molecule. Its Suppressive Effect on Cytokine-induced Cell Growth. *Journal of Biological Chemistry* 272, 32785–32791.
- Azmi, I. (2006). Recycling of ESCRTs by the AAA-ATPase Vps4 is regulated by a conserved VSL region in Vta1. *The Journal of Cell Biology* 172, 705–717.
- Azmi, I.F., Davies, B.A., Xiao, J., Babst, M., Xu, Z., and Katzmann, D.J. (2008). ESCRT-III Family Members Stimulate Vps4 ATPase Activity Directly or via Vta1. *Developmental Cell* 14, 50–61.
- Babst, M. (2011). MVB vesicle formation: ESCRT-dependent, ESCRT-independent and everything in between. *Current Opinion in Cell Biology* 23, 452–457.
- Babst, M., Sato, T.K., Banta, L.M., and Emr, S.D. (1997). Endosomal transport function in yeast requires a novel AAA-type ATPase, Vps4p. *The EMBO Journal* 16, 1820–1831.
- Babst, M., Wendland, B., Estepa, E.J., and Emr, S.D. (1998). The Vps4p AAA ATPase regulates membrane association of a Vps protein complex required for normal endosome function. *The EMBO Journal* 17, 2982–2993.
- Babst, M., Katzmann, D.J., Estepa-Sabal, E.J., Meerloo, T., and Emr, S.D. (2002a). Escrt-III: an endosome-associated heterooligomeric protein complex required for mvb sorting. *Developmental Cell* 3, 271–282.
- Babst, M., Katzmann, D.J., Snyder, W.B., Wendland, B., and Emr, S.D. (2002b). Endosome-associated complex, ESCRT-II, recruits transport machinery for protein sorting at the multivesicular body. *Developmental Cell* 3, 283–289.
- Bache, K.G. (2003). Hrs regulates multivesicular body formation via ESCRT recruitment to endosomes. *The Journal of Cell Biology* 162, 435–442.
- Bajorek, M., Morita, E., Skalicky, J.J., Morham, S.G., Babst, M., and Sundquist, W.I. (2009a). Biochemical analyses of human IST1 and its function in cytokinesis. *Molecular Biology of the Cell* 20, 1360–1373.
- Bajorek, M., Schubert, H.L., McCullough, J., Langelier, C., Eckert, D.M., Stubblefield, W.-M.B., Uter, N.T., Myszka, D.G., Hill, C.P., and Sundquist, W.I. (2009b). Structural basis for ESCRT-III protein autoinhibition. *Nature Structural & Molecular Biology* 16, 754–762.
- Basel-Vanagaite, L. (2005). 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, 203–210.
- Bauer, I., Brune, T., Preiss, R., and Kolling, R. (2015). Evidence for a Nonendosomal Function of the *Saccharomyces cerevisiae* ESCRT-III-Like Protein Chm7. *Genetics* 201, 1439–1452.

- Bäumers, M. (2015). Interaktionsstudien zwischen dem ESCRT-III Protein Shrub und dem Tumorsuppressor Lgd sowie deren Säugerorthologen in *Drosophila melanogaster*. Masterarbeit, Institut für Genetik, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Berns, N., Woichansky, I., Friedrichsen, S., Kraft, N., and Riechmann, V. (2014). A genome-scale in vivo RNAi analysis of epithelial development in *Drosophila* identifies new proliferation domains outside of the stem cell niche. *Journal of Cell Science* 127, 2736–2748.
- Brüser, C. (2013). Aufklärung der Beziehung zwischen Lgd und dem ESCRT-Hilfsfaktor Dist1, sowie des Einflusses von Lgd auf die Regulation des ESCRT-III-Komplexes. Masterarbeit, Institut für Genetik, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Bryant, P. J., and Schubinger, G. (1971). Giant and duplicated imaginal discs in a new lethal mutant of *Drosophila melanogaster*. *Developmental Biology* 24, 233–263
- Burd, C.G., and Emr, S.D. (1998). Phosphatidylinositol (3)-phosphate signaling mediated by specific binding to RING FYVE domains. *Molecular Cell* 2, 157–162.
- Capalbo, L., Montembault, E., Takeda, T., Bassi, Z.I., Glover, D.M., and D'Avino, P.P. (2012). The chromosomal passenger complex controls the function of endosomal sorting complex required for transport-III Snf7 proteins during cytokinesis. *Open Biology* 2, 120070–120070.
- Carlson, L.-A., and Hurley, J.H. (2012). In vitro reconstitution of the ordered assembly of the endosomal sorting complex required for transport at membrane-bound HIV-1 Gag clusters. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 16928–16933.
- Carlton, J.G., and Martin-Serrano, J. (2007). Parallels between cytokinesis and retroviral budding: a role for the ESCRT machinery. *Science* 316, 1908–1912.
- Carlton, J.G., Agromayor, M., and Martin-Serrano, J. (2008). Differential requirements for Alix and ESCRT-III in cytokinesis and HIV-1 release. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 10541–10546.
- Carlton, J.G., Caballe, A., Agromayor, M., Kloc, M., and Martin-Serrano, J. (2012). ESCRT-III Governs the Aurora B-Mediated Abscission Checkpoint Through CHMP4C. *Science* 336, 220–225.
- Chang, C.-H., Lai, L.-C., Cheng, H.-C., Chen, K.-R., Syue, Y.-Z., Lu, H.-C., Lin, W.-Y., Chen, S.-H., Huang, H.-S., Shiau, A.-L., et al. (2011). TBK1-associated Protein in Endolysosomes (TAPE) Is an Innate Immune Regulator Modulating the TLR3 and TLR4 Signaling Pathways. *Journal of Biological Chemistry* 286, 7043–7051.
- Chen, K.-R., Chang, C.-H., Huang, C.-Y., Lin, C.-Y., Lin, W.-Y., Lo, Y.-C., Yang, C.-Y., Hsing, E.-W., Chen, L.-F., Shih, S.-R., et al. (2012). TBK1-associated Protein in Endolysosomes (TAPE)/CC2D1A Is a Key Regulator Linking RIG-I-like Receptors to Antiviral Immunity. *Journal of Biological Chemistry* 287, 32216–32221.
- Childress, J.L., Acar, M., Tao, C., and Halder, G. (2006). Lethal Giant Discs, a Novel C2-Domain Protein, Restricts Notch Activation during Endocytosis. *Current Biology* 16, 2228–2233.
- Chu, T., Sun, J., Saksena, S., and Emr, S.D. (2006). New component of ESCRT-I regulates endosomal sorting complex assembly. *The Journal of Cell Biology* 175, 815–823.
- Collinet, C., Stöter, M., Bradshaw, C.R., Samusik, N., Rink, J.C., Kenski, D., Habermann, B., Buchholz, F., Henschel, R., Mueller, M.S., et al. (2010). Systems survey of endocytosis by multiparametric image analysis. *Nature* 464, 243–249.
- Curtiss, M., Jones, C., and Babst, M. (2007). Efficient cargo sorting by ESCRT-I and the subsequent release of ESCRT-I from multivesicular bodies requires the subunit Mvb12. *Molecular Biology of the Cell* 18, 636–645.

- Dimaano, C., Jones, C.B., Hanono, A., Curtiss, M., and Babst, M. (2008). Ist1 regulates Vps4 localization and assembly. *Molecular Biology of the Cell* *19*, 465–474.
- Drusenheimer, N., Migdal, B., Jäckel, S., Tveriakhina, L., Scheider, K., Schulz, K., Gröper, J., Köhrer, K., and Klein, T. (2015). The Mammalian Orthologs of *Drosophila* Lgd, CC2D1A and CC2D1B, Function in the Endocytic Pathway, but Their Individual Loss of Function Does Not Affect Notch Signalling. *PLOS Genetics* *11*, e1005749.
- Fischer, L. (2013). Zur Interaktion von LGD Proteinen mit der ESCRT-III Untereinheit CHMP4B. Bachelorarbeit, Institut für Genetik, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Fujita, H., Yamanaka, M., Imamura, K., Tanaka, Y., Nara, A., Yoshimori, T., Yokota, S. and Himeno, M. (2003). A dominant negative form of the AAA ATPase SKD1/VPS4 impairs membrane trafficking out of endosomal/lysosomal compartments: class E vps phenotype in mammalian cells. *Journal of Cell Science* *116*, 401–414.
- Gallagher, C.M., and Knoblich, J.A. (2006). The Conserved C2 Domain Protein Lethal (2) Giant Discs Regulates Protein Trafficking in *Drosophila*. *Developmental Cell* *11*, 641–653.
- Garrus, J.E., von Schwedler, U.K., Pornillos, O.W., Morham, S.G., Zavitz, K.H., Wang, H.E., Wettstein, D.A., Stray, K.M., Côté, M., Rich, R.L., et al. (2001). Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell* *107*, 55–65.
- Gill, D.J., Teo, H., Sun, J., Perisic, O., Veprintsev, D.B., Emr, S.D., and Williams, R.L. (2007). Structural insight into the ESCRT-I/II link and its role in MVB trafficking. *The EMBO Journal* *26*, 600–612.
- Gröper, J. (2015). Untersuchung der Rolle von CC2D1A und CC2D1B im endosomalen Transportweg. Masterarbeit, Institut für Genetik, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Grosshans, B.L., Ortiz, D., and Novick, P. (2006). Rabs and their effectors: achieving specificity in membrane traffic. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *103*, 11821–11827.
- Hadjighassem, M.R., Austin, M.C., Szewczyk, B., Daigle, M., Stockmeier, C.A., and Albert, P.R. (2009). Human Freud-2/CC2D1B: A Novel Repressor of Postsynaptic Serotonin-1A Receptor Expression. *Biological Psychiatry* *66*, 214–222.
- Hadjighassem, M.R., Galaraga, K., and Albert, P.R. (2011). Freud-2/CC2D1B mediates dual repression of the serotonin-1A receptor gene: Freud-2, a complementary repressor of 5-HT1A receptor. *European Journal of Neuroscience* *33*, 214–223.
- Henne, W.M., Buchkovich, N.J., and Emr, S.D. (2011). The ESCRT Pathway. *Developmental Cell* *21*, 77–91.
- Henne, W.M., Buchkovich, N.J., Zhao, Y., and Emr, S.D. (2012). The Endosomal Sorting Complex ESCRT-II Mediates the Assembly and Architecture of ESCRT-III Helices. *Cell* *151*, 356–371.
- Horii, M., Shibata, H., Kobayashi, R., Katoh, K., Yorikawa, C., Yasuda, J., and Maki, M. (2006). CHMP7, a novel ESCRT-III-related protein, associates with CHMP4b and functions in the endosomal sorting pathway. *Biochemical Journal* *400*, 23–32.
- Howard, T.L., Stauffer, D.R., Degnin, C.R., and Hollenberg, S.M. (2001). CHMP1 functions as a member of a newly defined family of vesicle trafficking proteins. *Journal of Cell Science* *114*, 2395–2404.
- Huotari, J., and Helenius, A. (2011). Endosome maturation: Endosome maturation. *The EMBO Journal* *30*, 3481–3500.
- Hurley, J.H. (2015). ESCRTs are everywhere. *The EMBO Journal*.

- Im, Y.J., Wollert, T., Boura, E., and Hurley, J.H. (2009). Structure and Function of the ESCRT-II-III Interface in Multivesicular Body Biogenesis. *Developmental Cell* *17*, 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 Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Düsseldorf.
- Jaekel, R., and Klein, T. (2006). The *Drosophila* Notch Inhibitor and Tumor Suppressor Gene lethal (2) giant discs Encodes a Conserved Regulator of Endosomal Trafficking. *Developmental Cell* *11*, 655–669.
- Janßen, D. (2015). Charakterisierung der Funktion von LGD1 im endosomalen Transportweg. Bachelorarbeit, Institut für Genetik, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Jimenez, A.J., Maiuri, P., Lafaurie-Janvore, J., Divoux, S., Piel, M., and Perez, F. (2014). ESCRT Machinery Is Required for Plasma Membrane Repair. *Science* *343*, 1247136–1247136.
- Jouvenet, N. (2012). Dynamics of ESCRT proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences* *69*, 4121–4133.
- Katoh, K., Shibata, H., Suzuki, H., Nara, A., Ishidoh, K., Kominami, E., Yoshimori, T., and Maki, M. (2003). The ALG-2-interacting Protein Alix Associates with CHMP4b, a Human Homologue of Yeast Snf7 That Is Involved in Multivesicular Body Sorting. *Journal of Biological Chemistry* *278*, 39104–39113.
- Katoh, K., Shibata, H., Hatta, K., and Maki, M. (2004). CHMP4b is a major binding partner of the ALG-2-interacting protein Alix among the three CHMP4 isoforms. *Archives of Biochemistry and Biophysics* *421*, 159–165.
- Katzmann, D.J. (2003). Vps27 recruits ESCRT machinery to endosomes during MVB sorting. *The Journal of Cell Biology* *162*, 413–423.
- Katzmann, D.J., Babst, M., and Emr, S.D. (2001). Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell* *106*, 145–155.
- Kieffer, C., Skalicky, J.J., Morita, E., De Domenico, I., Ward, D.M., Kaplan, J., and Sundquist, W.I. (2008). Two Distinct Modes of ESCRT-III Recognition Are Required for VPS4 Functions in Lysosomal Protein Targeting and HIV-1 Budding. *Developmental Cell* *15*, 62–73.
- Komada, M., and Soriano, P. (1999). Hrs, a FYVE finger protein localized to early endosomes, is implicated in vesicular traffic and required for ventral folding morphogenesis. *Genes & Development* *13*, 1475–1485.
- Kostelansky, M.S., Sun, J., Lee, S., Kim, J., Ghirlando, R., Hierro, A., Emr, S.D., and Hurley, J.H. (2006). Structural and functional organization of the ESCRT-I trafficking complex. *Cell* *125*, 113–126.
- Langelier, C., von Schwedler, U.K., Fisher, R.D., De Domenico, I., White, P.L., Hill, C.P., Kaplan, J., Ward, D., and Sundquist, W.I. (2006). Human ESCRT-II Complex and Its Role in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Release. *Journal of Virology* *80*, 9465–9480.
- Lanzetti, L., and Di Fiore, P.P. (2008). Endocytosis and Cancer: an “Insider” Network with Dangerous Liaisons. *Traffic* *9*, 2011–2021.
- Lata, S., Schoehn, G., Jain, A., Pires, R., Piehler, J., Gottlinger, H.G., and Weissenhorn, W. (2008). Helical Structures of ESCRT-III Are Disassembled by VPS4. *Science* *321*, 1354–1357.
- Lindmo, K., and Stenmark, H. (2006). Regulation of membrane traffic by phosphoinositide 3-kinases. *Journal of Cell Science* *119*, 605–614.

- Lindner, A. (2013). Interaktionsstudien von CC2D1A und CC2D1B mit Mitgliedern der CHMP Familie. Masterarbeit, Institut für Genetik, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Liu, J., Song, H., Yao, L., Liu, Y., Zhang, Y., Zhao, H., Ji, H., and Wang, Y. (2014). Over-expression of the overexpressed in lung cancer-1 is associated with poor prognosis in colorectal cancer. *Anticancer Research* 34, 367–372.
- Lu, Q., Hope, L.W., Brasch, M., Reinhard, C., and Cohen, S.N. (2003). TSG101 interaction with HRS mediates endosomal trafficking and receptor down-regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 7626–7631.
- Luhtala, N. (2004). Bro1 coordinates deubiquitination in the multivesicular body pathway by recruiting Doa4 to endosomes. *The Journal of Cell Biology* 166, 717–729.
- Manzini, M.C., Xiong, L., Shaheen, R., Tambunan, D.E., Di Costanzo, S., Mitalis, V., Tischfield, D.J., Cinquino, A., Ghaziuddin, M., Christian, M., et al. (2014). CC2D1A Regulates Human Intellectual and Social Function as well as NF- κ B Signaling Homeostasis. *Cell Reports* 8, 647–655.
- Mao, Y., Nickitenko, A., Duan, X., Lloyd, T.E., Wu, M.N., Bellen, H., and Quiocho, F.A. (2000). Crystal structure of the VHS and FYVE tandem domains of Hrs, a protein involved in membrane trafficking and signal transduction. *Cell* 100, 447–456.
- Martinelli, N., Hartlieb, B., Usami, Y., Sabin, C., Dordor, A., Miguet, N., Avilov, S.V., Ribeiro, E.A., Göttlinger, H., and Weissenhorn, W. (2012). CC2D1A Is a Regulator of ESCRT-III CHMP4B. *Journal of Molecular Biology* 419, 75–88.
- Matsuda, A., Suzuki, Y., Honda, G., Muramatsu, S., Matsuzaki, O., Nagano, Y., Doi, T., Shimotohno, K., Harada, T., Nishida, E., et al. (2003). Large-scale identification and characterization of human genes that activate NF- κ B and MAPK signaling pathways. *Oncogene* 22, 3307–3318.
- Morita, E., Sandrin, V., McCullough, J., Katsuyama, A., Baci Hamilton, I., and Sundquist, W.I. (2011). ESCRT-III Protein Requirements for HIV-1 Budding. *Cell Host & Microbe* 9, 235–242.
- Mayor, S., Presley, J.F., and Maxfield, F.R. (1993). Sorting of membrane components from endosomes and subsequent recycling to the cell surface occurs by a bulk flow process. *Journal of Cell Biology* 121, 1257–1269.
- McCullough, J., Clippinger, A.K., Talledge, N., Skowyra, M.L., Saunders, M.G., Naismith, T.V., Colf, L.A., Afonine, P., Arthur, C., Sundquist, W.I., et al. (2015). Structure and membrane remodeling activity of ESCRT-III helical polymers. *Science* 350, 1548–1551.
- McCullough, J., Colf, L.A., and Sundquist, W.I. (2013). Membrane Fission Reactions of the Mammalian ESCRT Pathway. *Annual Review of Biochemistry* 82, 663–692.
- Moll, D. (2015). Untersuchung der Auswirkung des Verlusts von Cc2d1a/Lgd2 und Cc2d1b/Lgd1 auf die Homöostase des Darmepithels und Aktivierung des Notch-Signalweges in der Maus. Masterarbeit, Institut für Genetik, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Morawa, K.S., Schneider, M., and Klein, T. (2015). Lgd regulates the activity of the BMP/Dpp signalling pathway during Drosophila oogenesis. *Development* 142, 1325–1335.
- Muzioł, T., Pineda-Molina, E., Ravelli, R.B., Zamborlini, A., Usami, Y., Göttlinger, H., and Weissenhorn, W. (2006). Structural Basis for Budding by the ESCRT-III Factor CHMP3. *Developmental Cell* 10, 821–830.
- Nakamura, A., Naito, M., Tsuruo, T., and Fujita, N. (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, 5996–6009.
- Nakamura, A., Arai, H., and Fujita, N. (2009). Centrosomal Aki1 and cohesin function in separase-regulated centriole disengagement. *The Journal of Cell Biology* 187, 607–614.

- Nakamura, A., Naito, M., Arai, H., and Fujita, N. (2010). Mitotic phosphorylation of Aki1 at Ser208 by cyclin B1–Cdk1 complex. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 393, 872–876.
- Norgan, A.P., Davies, B.A., Azmi, I.F., Schroeder, A.S., Payne, J.A., Lynch, G.M., Xu, Z., and Katzmann, D.J. (2013). Relief of Autoinhibition Enhances Vta1 Activation of Vps4 via the Vps4 Stimulatory Element. *Journal of Biological Chemistry* 288, 26147–26156.
- Obita, T., Saksena, S., Ghazi-Tabatabai, S., Gill, D.J., Perisic, O., Emr, S.D., and Williams, R.L. (2007). Structural basis for selective recognition of ESCRT-III by the AAA ATPase Vps4. *Nature* 449, 735–739.
- Odorizzi, G. (2003). Bro1 is an endosome-associated protein that functions in the MVB pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cell Science* 116, 1893–1903.
- Odorizzi, G. (2006). The multiple personalities of Alix. *Journal of Cell Science* 119, 3025–3032.
- Oesterwind, L. (2014). Analysen zu Interaktionen von CC2D1A und CC2D1B mit Proteinen des endosomalen Transportweges. Bachelorarbeit, Institut für Genetik, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Olmos, Y., Hodgson, L., Mantell, J., Verkade, P., and Carlton, J.G. (2015). ESCRT-III controls nuclear envelope reformation. *Nature* 522, 236–239.
- Ou, X.-M., Lemonde, S., Jafar-Nejad, H., Bown, C.D., Goto, A., Rogaeva, A., and Albert, P.R. (2003). Freud-1: a neuronal calcium-regulated repressor of the 5-HT1A receptor gene. *The Journal of Neuroscience* 23, 7415–7425.
- Palay, S.L., and Palade, G.E. (1955). The fine structure of neurons. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* 1, 69.
- Prag, G., Watson, H., Kim, Y.C., Beach, B.M., Ghirlando, R., Hummer, G., Bonifacino, J.S., and Hurley, J.H. (2007). The Vps27/Hse1 Complex Is a GAT Domain-Based Scaffold for Ubiquitin-Dependent Sorting. *Developmental Cell* 12, 973–986.
- Raiborg, C., Bremnes, B., Mehlum, A., Gillooly, D.J., D'Arrigo, A., Stang, E., and Stenmark, H. (2001). FYVE and coiled-coil domains determine the specific localisation of Hrs to early endosomes. *Journal of Cell Science* 114, 2255–2263.
- Ran, F.A., Hsu, P.D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D.A., and Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols* 8, 2281–2308.
- Raymond, C.K., Howald-Stevenson, I., Vater, C.A., and Stevens, T.H. (1992). Morphological classification of the yeast vacuolar protein sorting mutants: evidence for a prevacuolar compartment in class E vps mutants. *Molecular Biology of the Cell* 3, 1389–1402.
- Ren, X., and Hurley, J.H. (2010). VHS domains of ESCRT-0 cooperate in high-avidity binding to polyubiquitinated cargo. *The EMBO Journal* 29, 1045–1054.
- Rodman, J.S., and Wandinger-Ness, A. (2000). Rab GTPases coordinate endocytosis. *Journal of Cell Science* 113, 183–192.
- Rogaeva, A., and Albert, P.R. (2007). The mental retardation gene CC2D1A/Freud-1 encodes a long isoform that binds conserved DNA elements to repress gene transcription: Repressor function of human Freud-1 long isoform. *European Journal of Neuroscience* 26, 965–974.
- Rogaeva, A., Ou, X.-M., Jafar-Nejad, H., Lemonde, S., and Albert, P.R. (2007). Differential Repression by Freud-1/CC2D1A at a Polymorphic Site in the Dopamine-D2 Receptor Gene. *Journal of Biological Chemistry* 282, 20897–20905.
- Rue, S.M., Mattei, S., Saksena, S., and Emr, S.D. (2008). Novel Ist1-Did2 complex functions at a late step in multivesicular body sorting. *Molecular Biology of the Cell* 19, 475–484.

- Russell, M.R.G., Shideler, T., Nickerson, D.P., West, M., and Odorizzi, G. (2012). Class E compartments form in response to ESCRT dysfunction in yeast due to hyperactivity of the Vps21 Rab GTPase. *Journal of Cell Science* *125*, 5208–5220.
- Rusten, T.E., Rodahl, L.M., Pattni, K., Englund, C., Samakovlis, C., Dove, S., Brech, A., and Stenmark, H. (2006). Fab1 phosphatidylinositol 3-phosphate 5-kinase controls trafficking but not silencing of endocytosed receptors. *Molecular Biology of the Cell* *17*, 3989–4001.
- Saksena, S., and Emr, S.D. (2009). ESCRTs and human disease. *Biochemical Society Transactions* *37*, 167–172.
- Saksena, S., Wahlman, J., Teis, D., Johnson, A.E., and Emr, S.D. (2009). Functional Reconstitution of ESCRT-III Assembly and Disassembly. *Cell* *136*, 97–109.
- Sander, J.D., and Joung, J.K. (2014). CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nature Biotechnology* *32*, 347–355.
- 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, Institut für Genetik, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Schneider, M., Troost, T., Grawe, F., Martinez-Arias, A., and Klein, T. (2013). Activation of Notch in lgd mutant cells requires the fusion of late endosomes with the lysosome. *Journal of Cell Science* *126*, 645–656.
- Schnorrenberg, S. (2013). Zur Funktion der LGD-Proteine bei der Konformationsänderung des ESCRT-III Proteins Shrub/CHMP4B und bei dem Abbau des Notch-Rezeptors in Säugerzellen. Masterarbeit, Institut für Genetik, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Schuh, A.L., Hanna, M., Quinney, K., Wang, L., Sarkeshik, A., Yates, J.R., and Audhya, A. (2015). The VPS-20 subunit of the endosomal sorting complex ESCRT-III exhibits an open conformation in the absence of upstream activation. *Biochemical Journal* *466*, 625–637.
- Schulz, K. (2015). Analyse der Funktion der humanen LGDs und hLGD2^{MR} in humanen Zellen und in *Drosophila melanogaster*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Shen, Q.-T., Schuh, A.L., Zheng, Y., Quinney, K., Wang, L., Hanna, M., Mitchell, J.C., Otegui, M.S., Ahlquist, P., Cui, Q. and Audhya, A. (2014). Structural analysis and modeling reveals new mechanisms governing ESCRT-III spiral filament assembly. *The Journal of Cell Biology* *206*, 763–777.
- Shetakova, A., Hanono, A., Drosner, S., Curtiss, M., Davies, B.A., Katzmann, D.J., and Babst, M. (2010). Assembly of the AAA ATPase Vps4 on ESCRT-III. *Molecular Biology of the Cell* *21*, 1059–1071.
- Shiflett, S.L. (2004). Characterization of Vta1p, a Class E Vps Protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* *279*, 10982–10990.
- Shim, J.-H. (2006). CHMP5 is essential for late endosome function and down-regulation of receptor signaling during mouse embryogenesis. *The Journal of Cell Biology* *172*, 1045–1056.
- Shim, S., Kimpler, L.A., and Hanson, P.I. (2007). Structure/Function Analysis of Four Core ESCRT-III Proteins Reveals Common Regulatory Role for Extreme C-Terminal Domain. *Traffic* *8*, 1068–1079.
- Sisamakris, E., Valeri, A., Kalinin, S., Rothwell, P.J., and Seidel, C.A.M. (2010). Accurate Single-Molecule FRET Studies Using Multiparameter Fluorescence Detection. In *Methods in Enzymology*, (Elsevier), pp. 455–514.
- Slagsvold, T. (2005). Eap45 in Mammalian ESCRT-II Binds Ubiquitin via a Phosphoinositide-interacting GLUE Domain. *Journal of Biological Chemistry* *280*, 19600–19606.

- Sorkin, A., and von Zastrow, M. (2009). Endocytosis and signalling: intertwining molecular networks. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10, 609–622.
- Sotelo, J.R., and Porter, K.R. (1959). An electron microscope study of the rat ovum. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* 5, 327–342.
- Staub, O., and Rotin (2006). Role of Ubiquitylation in Cellular Membrane Transport. *Physiological Reviews* 86, 669–707.
- Stenmark, H. (2009). Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10, 513–525.
- Stuchell-Breton, M.D., Skalicky, J.J., Kieffer, C., Karren, M.A., Ghaffarian, S., and Sundquist, W.I. (2007). ESCRT-III recognition by VPS4 ATPases. *Nature* 449, 740–744.
- Stuffers, S., Sem Wegner, C., Stenmark, H., and Brech, A. (2009). Multivesicular Endosome Biogenesis in the Absence of ESCRTs. *Traffic* 10, 925–937.
- Sweeney, N.T., Brenman, J.E., Jan, Y.N., and Gao, F.-B. (2006). The Coiled-Coil Protein Shrub Controls Neuronal Morphogenesis in *Drosophila*. *Current Biology* 16, 1006–1011.
- Tang, S., Henne, W.M., Borbat, P.P., Buchkovich, N.J., Freed, J.H., Mao, Y., Fromme, J.C., and Emr, S.D. (2015). Structural basis for activation, assembly and membrane binding of ESCRT-III Snf7 filaments. *eLife* 4.
- Teis, D., Saksena, S., and Emr, S.D. (2008). Ordered Assembly of the ESCRT-III Complex on Endosomes Is Required to Sequester Cargo during MVB Formation. *Developmental Cell* 15, 578–589.
- Teis, D., Saksena, S., Judson, B.L., and Emr, S.D. (2010). ESCRT-II coordinates the assembly of ESCRT-III filaments for cargo sorting and multivesicular body vesicle formation. *The EMBO Journal* 29, 871–883.
- Teo, H., Perisic, O., González, B., and Williams, R.L. (2004). ESCRT-II, an endosome-associated complex required for protein sorting: crystal structure and interactions with ESCRT-III and membranes. *Developmental Cell* 7, 559–569.
- Teo, H., Gill, D.J., Sun, J., Perisic, O., Veprintsev, D.B., Vallis, Y., Emr, S.D., and Williams, R.L. (2006). ESCRT-I Core and ESCRT-II GLUE Domain Structures Reveal Role for GLUE in Linking to ESCRT-I and Membranes. *Cell* 125, 99–111.
- Troost, T., Jaeckel, S., Ohlenhard, N., and Klein, T. (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, 763–776.
- Tsang, H.T.H., Connell, J.W., Brown, S.E., Thompson, A., Reid, E., and Sanderson, C.M. (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, 333–346.
- Usami, Y., Popov, S., Weiss, E.R., Vriesema-Magnuson, C., Calistri, A., and Gottlinger, H.G. (2012). Regulation of CHMP4/ESCRT-III Function in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Budding by CC2D1A. *Journal of Virology* 86, 3746–3756.
- Vietri, M., Schink, K.O., Campsteijn, C., Wegner, C.S., Schultz, S.W., Christ, L., Thoresen, S.B., Brech, A., Raiborg, C., and Stenmark, H. (2015). Spastin and ESCRT-III coordinate mitotic spindle disassembly and nuclear envelope sealing. *Nature* 522, 231–235.
- Vogel, S.S., Thaler, C., Koushik, S.V. (2006). Fanciful FRET. *Science Signaling* 331, re2.
- Vogel, G.F., Ebner, H.L., de Araujo, M.E.G., Schmiedinger, T., Eiter, O., Pircher, H., Gutleben, K., Witting, B., Teis, D., Huber, L.A., et al. (2015). Ultrastructural Morphometry Points to a New Role for

- LAMTOR2 in Regulating the Endo/Lysosomal System: Endo/Lysosomal System Affected by LAMTOR2-Deficiency. *Traffic* *16*, 617–634.
- Ward, D.M. (2005). The Role of LIP5 and CHMP5 in Multivesicular Body Formation and HIV-1 Budding in Mammalian Cells. *Journal of Biological Chemistry* *280*, 10548–10555.
- Webster, B.M., Colombi, P., Jäger, J., and Lusk, C.P. (2014). Surveillance of Nuclear Pore Complex Assembly by ESCRT-III/Vps4. *Cell* *159*, 388–401.
- Wienigk, A. (2015). Strukturelle Analyse des Drosophila Tumorsuppressors Lethal (2) giant discs und seines Säugerorthologs LGD1. Bachelorarbeit, Institut für Genetik, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Xiao, J., Xia, H., Zhou, J., Azmi, I.F., Davies, B.A., Katzmann, D.J., and Xu, Z. (2008). Structural Basis of Vta1 Function in the Multivesicular Body Sorting Pathway. *Developmental Cell* *14*, 37–49.
- Yang, B., Stjepanovic, G., Shen, Q., Martin, A., and Hurley, J.H. (2015). Vps4 disassembles an ESCRT-III filament by global unfolding and processive translocation. *Nature Structural & Molecular Biology* *22*, 492–498.
- Yang, Z., Vild, C., Ju, J., Zhang, X., Liu, J., Shen, J., Zhao, B., Lan, W., Gong, F., Liu, M., et al. (2012). Structural Basis of Molecular Recognition between ESCRT-III-like Protein Vps60 and AAA-ATPase Regulator Vta1 in the Multivesicular Body Pathway. *Journal of Biological Chemistry* *287*, 43899–43908.
- Yorikawa, C., Shibata, H., Waguri, S., Hatta, K., Horii, M., Katoh, K., Kobayashi, T., Uchiyama, Y., and Maki, M. (2005). Human CHMP6, a myristoylated ESCRT-III protein, interacts directly with an ESCRT-II component EAP20 and regulates endosomal cargo sorting. *Biochem. J* *387*, 17–26.
- Yuan, J., Ma, J., Zheng, H., Shi, T., Sun, W., Zhang, Q., Lin, D., Zhang, K., He, J., Mao, Y., et al. (2008). Overexpression of OLC1, Cigarette Smoke, and Human Lung Tumorigenesis. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* *100*, 1592–1605.
- Zastrow, M. von, and Sorkin, A. (2007). Signalling on the Endocytic Pathway. *Current Opinion in Cell Biology* *19*, 436–445
- Zhao, M., Li, X.-D., and Chen, Z. (2010). CC2D1A, a DM14 and C2 Domain Protein, Activates NF- κ B through the Canonical Pathway. *Journal of Biological Chemistry* *285*, 24372–24380.
- Zhao, M., Raingo, J., Chen, Z.J., and Kavalali, E.T. (2011). Cc2d1a, a C2 domain containing protein linked to nonsyndromic mental retardation, controls functional maturation of central synapses. *Journal of Neurophysiology* *105*, 1506–1515.

7. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
∞	undefiniert
Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure(n)
Bp	Basenpaar(e)
DAPI	4'-6'-Diamidin-2-phenylindol
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	Enhanced Green Fluorescence Protein
et al.	et alii (und andere)
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting
FBS	Fetales Bovines Serum
g	Gramm
h	hour/Stunde
HRP	Horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
kb	Kilobasenpaar(e)
kDA	Kilodalton
l	Liter
LB	lysogeny broth
M	molar
MEF	murine embryonale Fibroblasten
m	Milli
min	Minuten
n	Nano
NGS	Normal Goat Serum
nt	Nukleotide
PAM	Protospacer Adjacent Motif
PFA	Paraformaldehyd
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RFP	Red Fluorescence Protein
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen
WB	Western Blot

WT	Wildtyp
X g	x-fache Erdbeschleunigung
α	anti
μ	Mikro

8. Anhang

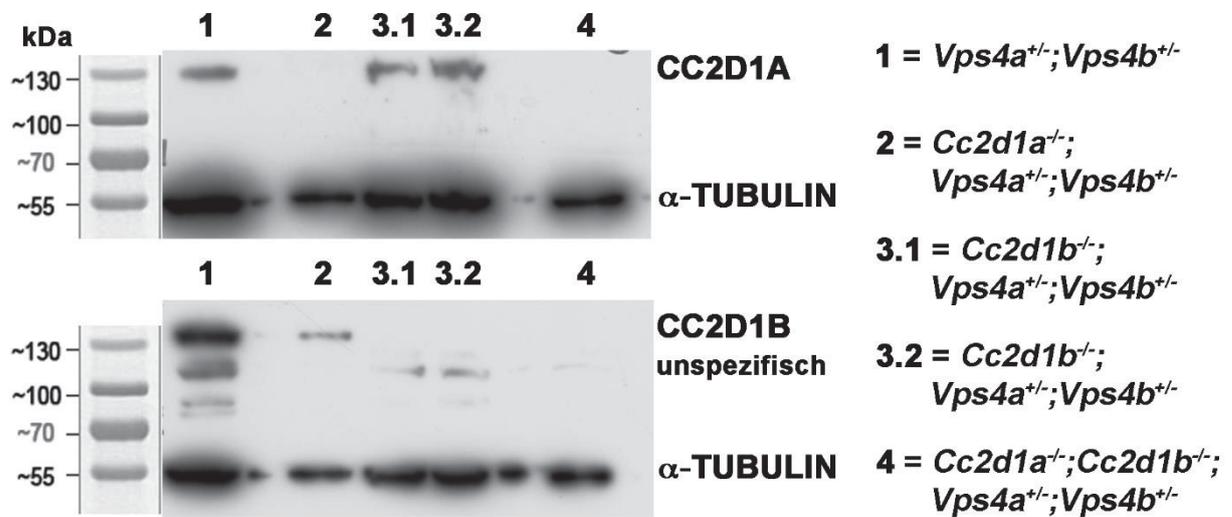


Abb.8.1 Western Blot Analyse von CC2D1A und CC2D1B in defizienten MEF Zelllinien. Die Western Blot Analyse zeigt, dass in den MEF Zellen mit *Cc2d1a* und/oder *Cc2d1b* Defizienz das jeweilige Protein nicht mehr exprimiert wird. In $Vps4a^{+/-}; Vps4b^{+/-}$ Zellen (1) kann sowohl CC2D1A als auch CC2D1B detektiert werden. In $Cc2d1a^{-/-}; Vps4a^{+/-}; Vps4b^{+/-}$ Zellen (2) wird keine CC2D1A mehr exprimiert, weiterhin aber CC2D1B. $Cc2d1b^{-/-}; Vps4a^{+/-}; Vps4b^{+/-}$ Zellen (3.1 und 3.2) wurden mit Hilfe des CRISPR/Cas9 Systems generiert. Die beiden Zelllinien wurden aus unterschiedlichen Zellklonen generiert. Die Linie 3.1 enthält eine Mutation bei welcher es nicht zu einem Frameshift kommt (Bachelorarbeit Dominik Janßen, 2015, Linie F6), trotzdem kann kein exprimiertes CC2D1B detektiert werden. Die Linie 3.2 ist die in dieser Arbeit analysierte Zelllinie, sie exprimiert ebenfalls kein CC2D1B mehr. Beide Linien exprimieren weiterhin CC2D1A. In den $Cc2d1a^{-/-}; Cc2d1b^{-/-}; Vps4a^{+/-}; Vps4b^{+/-}$ Zellen, welche ebenfalls durch das CRISPR/Cas9 System generiert wurden wird keines der beiden CC2D1 Proteine mehr exprimiert. Jeweils zwischen 1 und 2 und zwischen 3.2 und 4 wurde eine Tasche des SDS-Gels frei gelassen. Als Ladekontrolle diente α -TUBULIN.

Tabelle 8.1 Anzahl der elektronenmikroskopisch analysierten Zellen und der ausgemessenen Endolysosomen. ELs = Endolysosomen.

	Wildtyp	$Cc2d1a^{-/-}$	$Cc2d1b^{-/-}$	$Vps4a^{+/-}; Vps4b^{+/-}$
Zellen	100	40	40	37
ELs	595	217	300	206

	$Cc2d1a^{-/-}; Vps4a^{+/-}; Vps4b^{+/-}$	$Cc2d1b^{-/-}; Vps4a^{+/-}; Vps4b^{+/-}$	$Cc2d1a^{-/-}; Cc2d1b^{-/-}$	$Cc2d1a^{-/-}; Cc2d1b^{-/-}; Vps4a^{+/-}; Vps4b^{+/-}$
Zellen	39	50	50	40
ELs	315	302	206	460

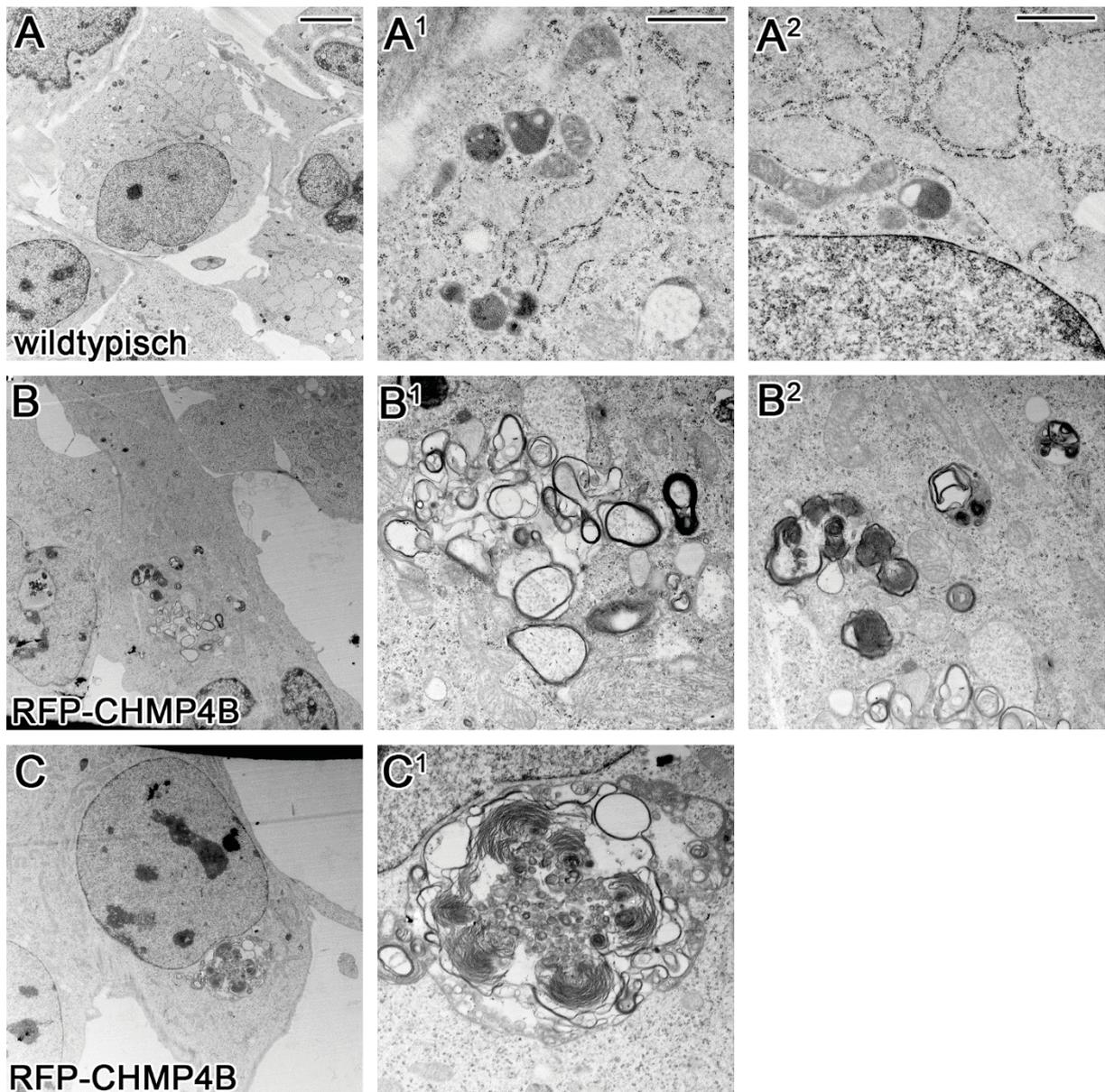


Abb.8.2 Ultrastruktur von stark vergrößerten Endolysosomen in Folge von RFP-CHMP4B Überexpression in wildtypischen MEF-Zellen. Wildtypische MEF-Zellen (A-A²) zeigen kleine, rundliche Endolysosomen. Wildtypische MEF-Zellen in denen RFP-CHMP4B überexprimiert wurde (B-B² und C-C¹) zeigen „Class E“ ähnliche, stark vergrößerte, Endolysosomen. Die Maßstabsbalken entsprechen 5 μm (A-D) und 0,5 μm (A¹-C¹ und A²-B²).

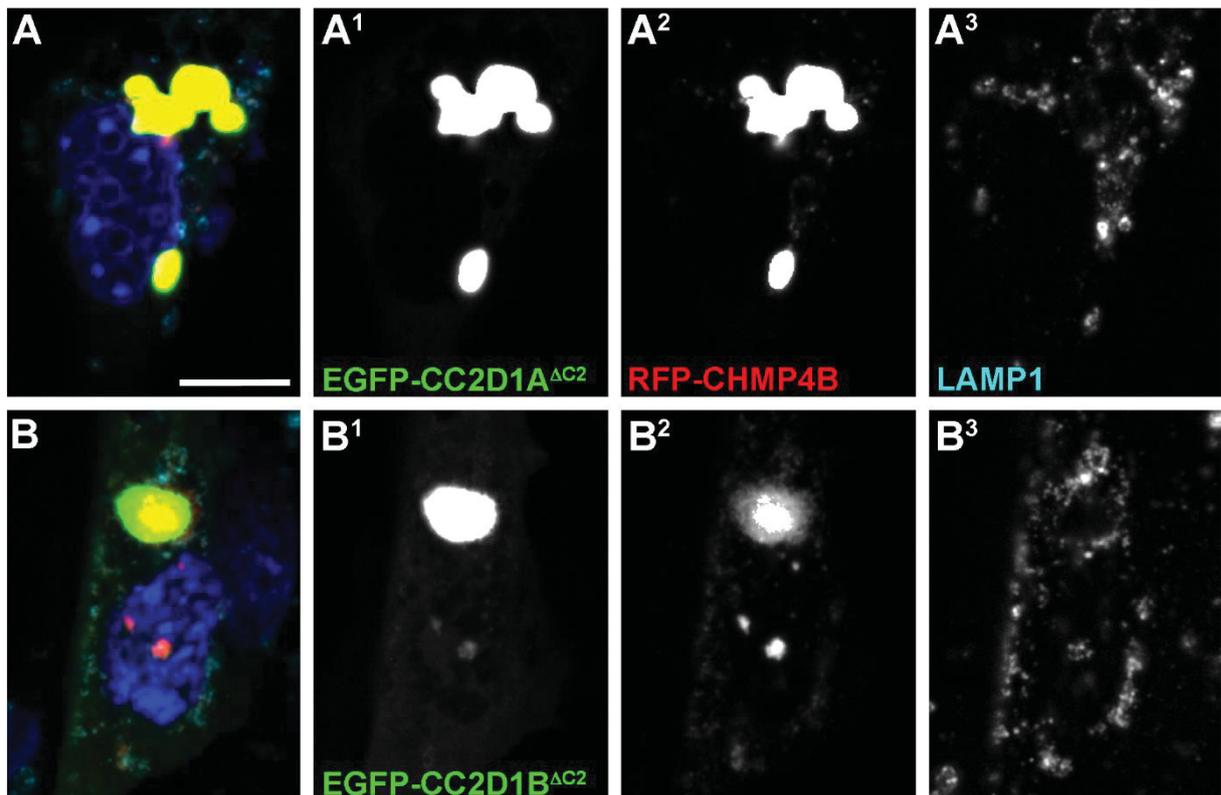


Abb.8.3 Koexpression von CC2D1A^{ΔC2} bzw. CC2D1B^{ΔC2} mit CHMP4B in *Cc2d1a*^{-/-};*Cc2d1b*^{-/-} MEF-Zellen. Die Expression der ΔC2 Konstrukte führt zu großflächigen Akkumulationen. Koexprimiertes CHMP4B kolokalisiert mit beiden ΔC2 Konstrukten in diesen Akkumulationen. Der Maßstabsbalken entspricht 10 μm.

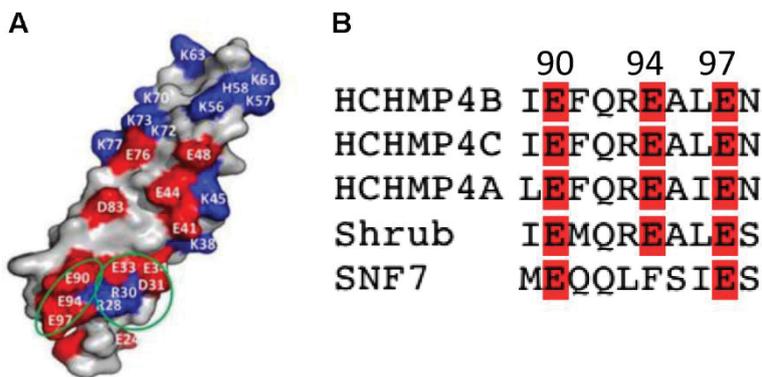


Abb.8.4 Kristallstruktur eines CHMP4B Fragmentes und Ausschnitt eines Aminosäuresequenzvergleichs. Der Kristall des CHMP4B Fragmentes (Aminosäure 7-105; Helix α1 und α2) zeigt, dass die beiden ersten Helices eine Haarnadelstruktur bilden (A). Der Austausch von drei in Mehrzellern konservierten Glutaminsäuren (mut2) (A, grüner Kreis; B, rot) führt zu einem Verlust der Interaktion mit der dritten DM14 Domäne von CC2D1A *in vitro*. Im Ortholog der Hefe, Snf7, sind nur zwei dieser Glutaminsäuren konserviert (modifiziert nach Martinelli et al., 2012).

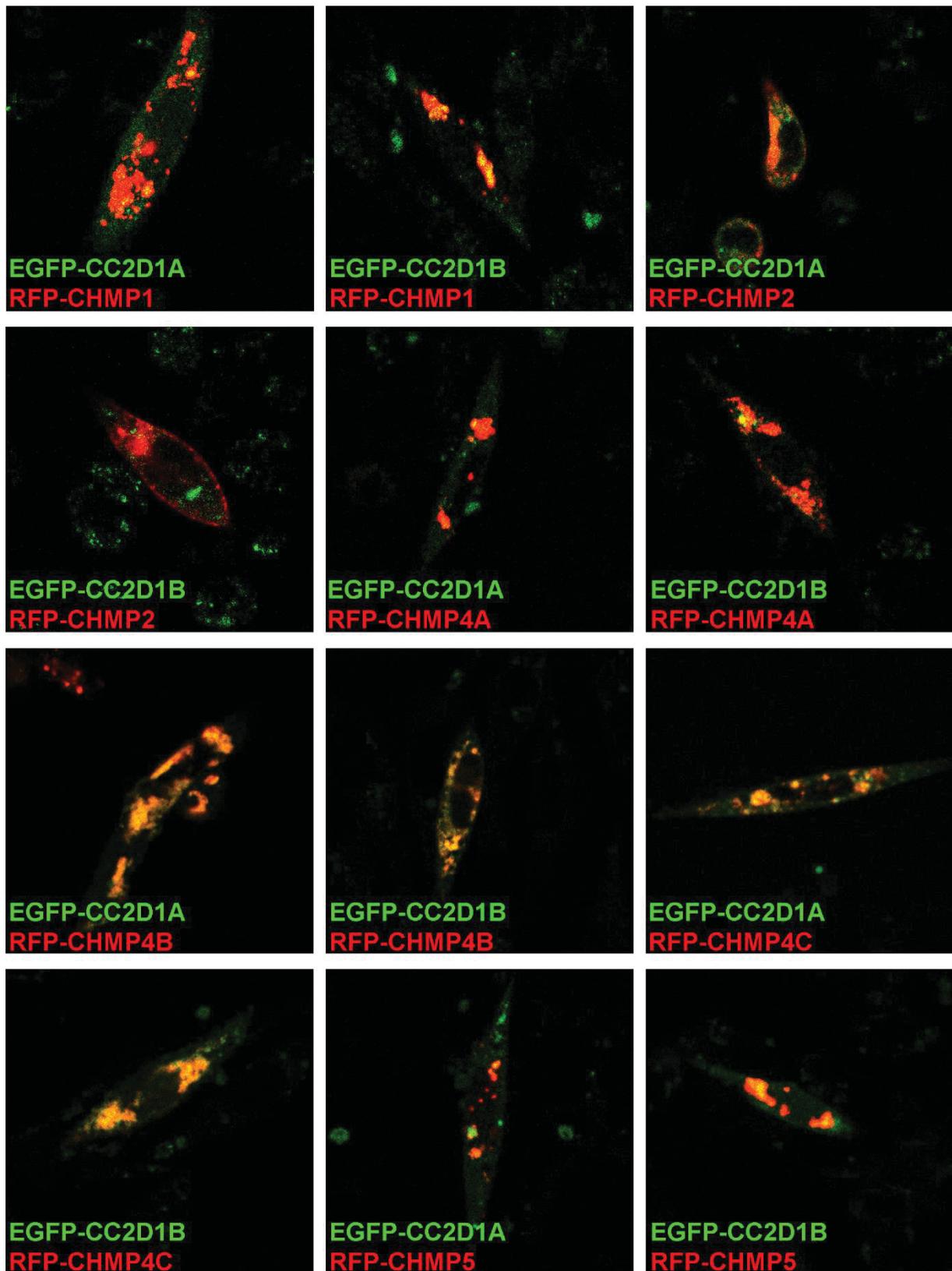


Abb.8.5 Koexpression von EGFP-CC2D1A bzw. EGFP-CC2D1B mit verschiedenen ESCRT-III und VPS4 Proteinen in NIH3T3 Zellen unmittelbar vor FRET-APB Messungen.

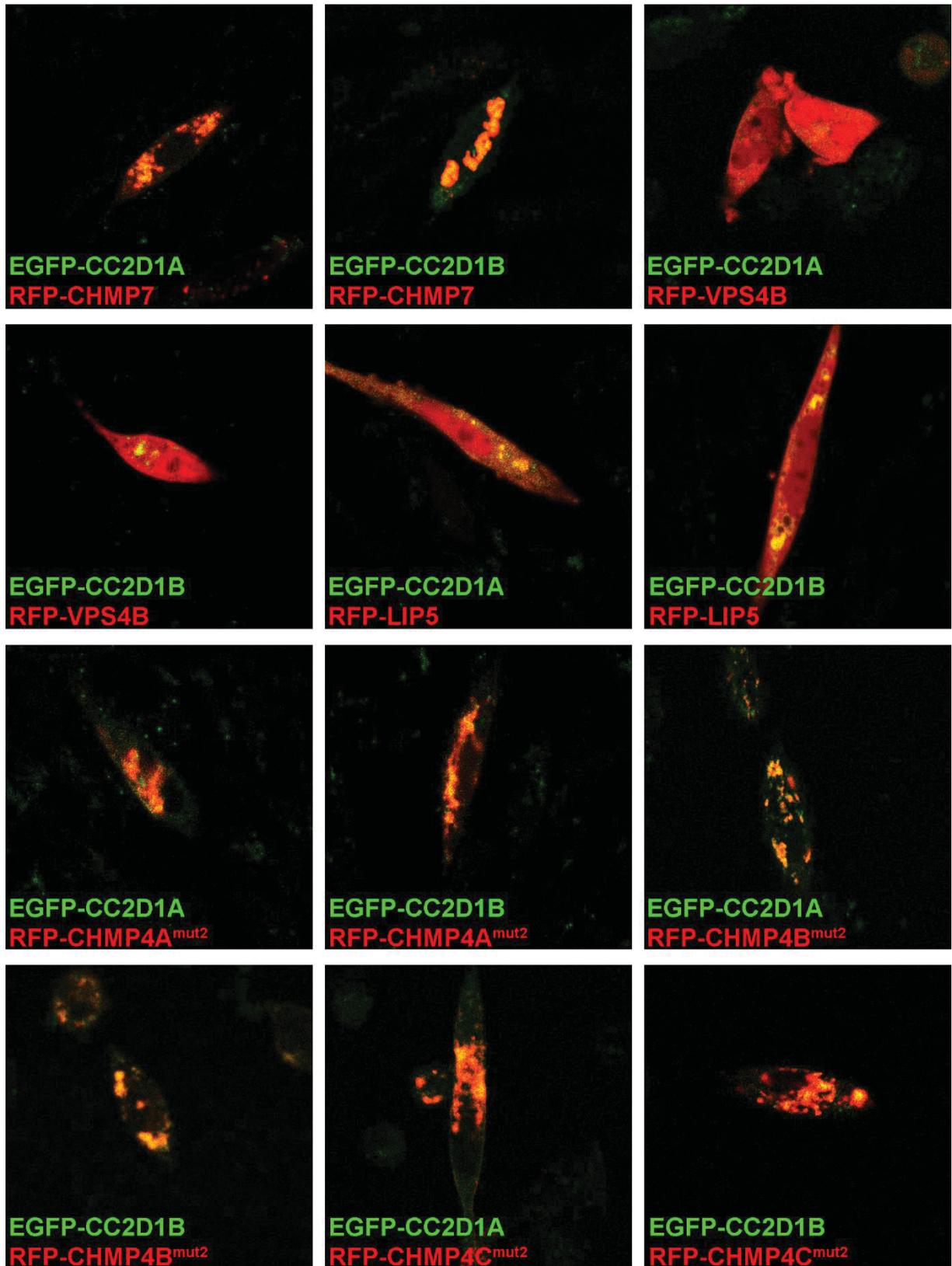


Abb.8.6 Koexpression von EGFP-CC2D1A bzw. EGFP-CC2D1B mit verschiedenen ESCRT-III und VPS4 Proteinen in NIH3T3 Zellen unmittelbar vor FRET-APB Messungen.



Abb.8.7 Aminosäuresequenzvergleich von CC2D1 Proteinen. Verglichen wurde die Aminosäuresequenz von humanem CC2D1A (hLGD2) und CC2D1B (hLGD1) mit murinem CC2D1A (mLGD2), CC2D1B (mLGD1) und *Drosophila* Lgd. Saure (rot), basische (blau) und polare (grün) Aminosäuren wurden hervorgehoben. Die Bereiche der DM14 Domänen (rote Linien) und der C2 Domäne (grüne Linie) sind gesondert markiert.

Tabelle 8.2 Vergleich der Aminosäuresequenz der DM14 Domänen und der C2 Domäne der CC2D1 Proteine mit Lgd. Mit Hilfe des Needleman-Wunsch Algorithmus wurde jeweils die Aminosäuresequenz der Domänen von CC2D1A und CC2D1B mit Lgd verglichen.

Lgd			
	Domäne	Identität (%)	Ähnlichkeit (%)
CC2D1A	1.DM14	46	64
CC2D1B		44	67
CC2D1A	2.DM14	47	67
CC2D1B		44	66
CC2D1A	3.DM14	58	74
CC2D1B		51	69
CC2D1A	4.DM14	36	64
CC2D1B		39	69
CC2D1A	C2	35	61
CC2D1B		39	64

Tabelle 8.3 Ergebnisse aller FRET Messungen. Die Tabelle zeigt für jede FRET-Paar die Anzahl der Werte (N), den Mittelwert der FRET-Effizienz sowie die Standardabweichung. Das erstgenannte Konstrukt ist der Donor, das zweitgenannte der Akzeptor. Pro Zelle wurden zwei Messungen durchgeführt, die Anzahl der gemessenen Zellen ist daher N/2. Extreme Ausreißer wurden eliminiert.

FRET-Paar (Donor + Akzeptor)	N	Mittelwert E_{FRET} (%)	Standardabw.
EGFP-RFP Positivkontrolle	25	18,01	7,52
CC2D1A + freies RFP, Negativkontrolle	27	5,04	5,77
CC2D1B + freies RFP, Negativkontrolle	41	1,35	3,49
CC2D1A + CHMP4A	42	15,34	8,05
CC2D1A + CHMP4B	37	21,33	7,20
CC2D1A + CHMP4C	36	20,56	8,46
CC2D1A^{ΔDM14} + CHMP4A	38	18,67	10,04
CC2D1A^{ΔDM14} + CHMP4B	58	24,66	16,60
CC2D1A^{ΔDM14} + CHMP4C	31	14,23	9,28
CC2D1A^{MR} + CHMP4A	34	32,95	10,89
CC2D1A^{MR} + CHMP4B	48	31,00	11,97
CC2D1A^{MR} + CHMP4C	36	35,41	14,24
CC2D1A^{ΔC2} + CHMP4A	34	19,05	11,15
CC2D1A^{ΔC2} + CHMP4B	34	17,92	8,59
CC2D1A^{ΔC2} + CHMP4C	40	30,12	12,55
CC2D1A^{ΔC815} + CHMP4A	66	5,60	6,22
CC2D1A^{ΔC815} + CHMP4B	40	9,15	10,36
CC2D1A^{ΔC815} + CHMP4C	62	5,25	6,69
CC2D1A^{ΔN139} + CHMP4A	40	18,23	9,79
CC2D1A^{ΔN139} + CHMP4B	40	5,34	5,55
CC2D1A^{ΔN139} + CHMP4C	40	27,21	10,86
CC2D1B + CHMP4A	35	18,70	12,24

CC2D1B + CHMP4B	40	21,53	6,59
CC2D1B + CHMP4C	31	21,00	7,07
CC2D1B ^{ADM14} + CHMP4A	34	22,42	13,75
CC2D1B ^{ADM14} + CHMP4B	36	6,07	3,89
CC2D1B ^{ADM14(1-2)} + CHMP4B	40	23,47	10,98
CC2D1B ^{ADM14(3-4)} + CHMP4B	40	2,10	4,44
CC2D1B ^{ADM14} + CHMP4C	41	8,44	6,52
CC2D1B ^{ADM14(1-2)} + CHMP4C	38	1,75	6,17
CC2D1B ^{ADM14(3-4)} + CHMP4C	40	11,63	11,95
CC2D1B ^{AC2} + CHMP4A	32	22,36	13,54
CC2D1B ^{AC2} + CHMP4B	42	19,66	9,82
CC2D1B ^{AC2} + CHMP4C	45	24,08	10,26
CC2D1B ^{ADM14(1-3)} + CHMP4B	44	1,70	4,73
CC2D1B ^{ADM14(2-3)} + CHMP4B	44	3,33	6,77
CC2D1B ^{ADM14(1+3)} + CHMP4B	44	2,37	4,81
CC2D1B ^{ADM14(2+4)} + CHMP4B	44	4,80	5,09
CC2D1B ^{ADM14(1-3)} + CHMP4C	40	-0,06	3,84
CC2D1B ^{ADM14(2-3)} + CHMP4C	40	0,95	3,73
CC2D1B ^{ADM14(1+3)} + CHMP4C	42	2,40	5,59
CC2D1B ^{ADM14(2+4)} + CHMP4C	42	6,28	6,22
CC2D1B ^{AN167} + CHMP4A	40	13,13	11,26
CC2D1B ^{AN167} + CHMP4B	40	5,45	5,53
CC2D1B ^{AN167} + CHMP4C	40	13,11	11,07
CC2D1A + CHMP5	35	22,84	17,03
CC2D1A ^{ADM14} + CHMP5	41	23,27	15,71
CC2D1A ^{MR} + CHMP5	44	30,50	18,52
CC2D1A ^{AC2} -CHMP5	40	29,71	18,72
CC2D1A ^{AC815} + CHMP5	52	25,75	12,90
CC2D1A ^{AN139} + CHMP5	48	27,70	14,04
CC2D1B-CHMP5	46	22,11	10,66
CC2D1B ^{ADM14} + CHMP5	48	19,93	11,85
CC2D1B ^{ADM14(1-2)} + CHMP5	18	25,91	9,91
CC2D1B ^{ADM14(3-4)} + CHMP5	17	23,43	11,30
CC2D1B ^{AC2} + CHMP5	40	35,33	17,33
CC2D1B ^{AN167} + CHMP5	45	18,36	10,79
CC2D1A + CHMP7	34	24,20	11,06
CC2D1A ^{ADM14} + CHMP7	40	10,96	11,54
CC2D1A ^{AC2} + CHMP7	40	16,06	8,99
CC2D1A ^{MR} + CHMP7	40	18,06	10,80
CC2D1A ^{AC815} + CHMP7	40	9,00	7,29
CC2D1A ^{AN139} + CHMP5	48	27,70	14,04
CC2D1B + CHMP7	36	16,86	8,35
CC2D1B ^{ADM14} + CHMP7	37	5,34	6,71
CC2D1B ^{ADM14(1-2)} + CHMP7	56	10,25	6,28
CC2D1B ^{ADM14(3-4)} + CHMP7	40	11,97	7,13
CC2D1B ^{AC2} + CHMP7	38	9,61	6,94

CC2D1B ^{ΔDM14(1-3)} + CHMP7	44	1,23	5,29
CC2D1B ^{ΔDM14(2-3)} + CHMP7	40	2,49	4,30
CC2D1B ^{ΔDM14(1+3)} + CHMP7	40	2,55	4,17
CC2D1B ^{ΔDM14(2+4)} + CHMP7	41	2,57	3,79
CC2D1B ^{ΔN167} + CHMP5	45	18,36	10,79
CC2D1A + VPS4B	37	6,56	5,95
CC2D1B + VPS4B	30	0,77	3,53
CC2D1A + CHMP1	40	30,12	16,61
CC2D1B + CHMP1	47	28,30	13,77
CC2D1B ^{ΔDM14} + CHMP1	19	26,71	8,47
CC2D1B ^{ΔC2} + CHMP1	20	30,36	9,40
CC2D1A + CHMP2	30	9,23	10,39
CC2D1B + CHMP2	40	5,22	8,00
CC2D1A + LIP5	40	7,29	7,69
CC2D1B + LIP5	38	3,25	4,71
CC2D1B ^{ΔDM14(1-2)R416E,K419E} + CHMP4B	39	21,17	10,04
CC2D1B ^{ΔDM14(1-2)P440A} + CHMP4B	36	21,79	10,07
CC2D1B ^{ΔDM14(1-2)R416E} + CHMP4B	44	4,79	4,68
CC2D1B ^{ΔDM14(1-2)K419E} + CHMP4B	42	3,16	5,98
CC2D1B ^{ΔDM14(1-2)R416E,K419E} + CHMP7	40	16,40	6,75
CC2D1B ^{ΔDM14(1-2)P440A} + CHMP7	40	8,96	5,37
CC2D1B ^{ΔDM14(1-2)R416E} + CHMP7	40	10,19	7,78
CC2D1B ^{ΔDM14(1-2)K419E} + CHMP7	40	7,71	6,73
CC2D1A + CHMP4A ^{mut2}	40	35,73	20,84
CC2D1B + CHMP4A ^{mut2}	40	28,37	16,93
CC2D1A + CHMP4B ^{mut2}	46	7,24	8,28
CC2D1A ^{ΔDM14} + CHMP4B ^{mut2}	12	5,58	7,83
CC2D1A ^{MR} + CHMP4B ^{mut2}	8	6,77	13,16
CC2D1A ^{ΔC2} + CHMP4B ^{mut2}	10	4,66	11,47
CC2D1B + CHMP4B ^{mut2}	38	6,29	7,49
CC2D1A + CHMP4C ^{mut2}	38	4,84	6,29
CC2D1B + CHMP4C ^{mut2}	38	8,40	6,05
CC2D1B + CHMP5 + CHMP4B-Myc	51	9,26	10,46
CC2D1A + CHMP5 + CHMP4B-Myc	60	14,12	18,06
CC2D1B + CHMP4A + CHMP5-Flag	30	14,97	8,47
CC2D1A + CHMP4A + CHMP5-Flag	30	16,94	8,39
CC2D1B + CHMP4B + CHMP5-Flag	42	4,58	4,50
CC2D1A + CHMP4B + CHMP5-Flag	42	10,03	7,63
CC2D1B + CHMP4C + CHMP5-Flag	45	6,76	6,99
CC2D1A + CHMP4C + CHMP5-Flag	45	10,72	7,27
CC2D1B + CHMP4B + VPS4B-Myc	38	4,39	5,86
CC2D1A + CHMP4B + VPS4B-Myc	46	16,42	8,50
CC2D1B + CHMP4A + VPS4B-Myc	40	20,98	11,03
CC2D1A + CHMP4A + VPS4B-Myc	30	28,80	9,87
CC2D1B + CHMP4C + VPS4B-Myc	46	5,88	6,02
CC2D1A + CHMP4C + VPS4B-Myc	40	18,96	10,23

CC2D1A + CC2D1A	48	15,65	10,52
CC2D1A + CC2D1A ^{MR}	65	8,75	9,21
CC2D1A + CC2D1A ^{ADM14}	21	24,09	6,85
CC2D1A + CC2D1A ^{ΔC2}	8	23,07	11,79
CC2D1B + CC2D1B	32	14,57	9,06
CC2D1B + CC2D1B ^{ADM14}	40	2,98	5,88
CC2D1B + CC2D1B ^{ΔC2}	40	1,13	5,22
CC2D1B + CC2D1A	50	14,23	9,06
CC2D1B ^{ADM14} + CC2D1A	12	9,63	5,76
CC2D1B + CC2D1A ^{ADM14}	18	4,16	5,18
CC2D1A ^{MR} + CC2D1B	14	5,76	4,16
CC2D1A ^{ΔC2} + CC2D1B	14	-1,59	3,19
CC2D1A + CC2D1B ^{ΔC2}	12	5,15	6,08
VPS4B + CHMP4B	40	24,05	12,58
VPS4B + CHMP4A	36	29,29	11,89
VPS4B + CHMP4C	36	15,42	6,59
VPS4B + CHMP4B ^{mut2}	32	29,40	13,19
Lgd + freies RFP Negativkontrolle	36	4,52	3,48
Lgd + Lgd	40	3,43	5,28
Lgd + Chmp5	36	31,24	10,07
Lgd ^{ADM14(1-2)} + Chmp5	40	3,87	4,43
Lgd ^{ADM14} + Chmp5	40	2,05	4,58
Lgd + Ist1	48	14,38	10,54
Lgd + CHMP4B	30	19,35	11,96
Lgd + CHMP4B ^{mut2}	30	20,56	20,15
Lgd ^{ADM14(1-2)P417A} + CHMP4B	20	10,30	6,01
Lgd ^{ADM14} + CHMP4B	41	5,12	5,53
Lgd + Shrub	56	27,40	11,87
Lgd + Shrub ^{mut2}	54	28,82	11,58
Lgd ^{ADM14(1-2)} + Shrub	44	10,33	6,65
Lgd ^{ADM14(1-2)R393E} + Shrub	38	13,42	8,41
Lgd ^{ADM14(1-2)K396E} + Shrub	42	8,08	6,40
Lgd ^{ADM14(1-2)R393E,K396E} + Shrub	64	20,07	10,81
Lgd ^{ADM14(1-2)P417A} + Shrub	78	12,91	8,35
Lgd ^{ADM14(1-2)V418T} + Shrub	42	20,37	8,12
Lgd ^{ADM14(1-2)P417A,V418T} + Shrub	62	18,60	7,94
Lgd ^{ADM14(1-3)} + Shrub	58	4,48	5,10
Lgd ^{ADM14} + Shrub	37	6,56	6,03
CC2D1B + Shrub	36	16,66	18,52
CC2D1B + Shrub ^{mut2}	64	11,24	10,23
CC2D1B ^{ADM14(1-2)P440A} + Shrub	20	25,85	10,91
CC2D1A + Shrub	27	18,10	10,89
CC2D1A + Shrub ^{mut2}	49	11,77	8,89

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Thomas Klein bedanken, für die Möglichkeit, diese Arbeit in seinem Labor anfertigen zu können. Bedanken möchte ich mich für die ausgezeichnete Betreuung, aber auch die Freiheit, welche er mir bei der Gestaltung und Durchführung der Arbeit gelassen hat.

Junior-Professor Mathias Beller danke ich für Übernahme des Koreferats.

Mein besonderer Dank gilt Nadja, für die vielen Jahre der tollen Zusammenarbeit, ihrer unermüdlichen Unterstützung und ihrer Geduld mit welcher sie sich meine vielen Theorien angehört hat. Sven danke ich für die vielen Diskussionen und den Austausch. Beiden danke ich auch für den vielen Spaß im Labor, im Büro und auch abseits davon.

Bei Christine möchte ich mich dafür bedanken, dass sie sich immer meine Überlegungen zur Funktion der LGDs angehört hat und für den regen Austausch darüber. Björn danke ich für die spaßige Diskussionen über SIM und alle möglichen Programme.

Ich danke Jessica für ihre Unterstützung bei den EM Experimenten, ohne sie wären diese nicht möglich gewesen. Sylvia danke ich dafür, dass sie mich immer auf der Suche nach Chemikalien, bei Bestellungen und auch sonst bei allem im Labor unterstützt hat. Gisela danke ich ebenfalls für ihre Unterstützung im Labor.

Allen weiteren Mitgliedern der AG Klein danke ich ebenso für die gute Zusammenarbeit und die tolle Arbeitsatmosphäre.

Dank gilt auch Laura, Linda, Astrid und Dominik, dass sie mich als Betreuer ihrer Bachelorarbeiten ertragen haben und mich mit ihrer Arbeit auch bei meiner unterstützt haben.

Ich danke Anna, Christine, Daisy, Miriam und Thomas für die lustigen „Telefonkonferenzen“. Zudem danke ich ihnen und allen anderen, die bei den Filmabenden und all unseren anderen Aktivitäten dabei waren, für all den Spaß den wir während und abseits der Arbeit zusammen hatten.

Meinen Eltern danke ich für ihre Unterstützung und dass sie mir das Studium und diese Arbeit überhaupt erst ermöglicht haben. Meiner Mutter danke ich besonders, dass sie sich durch diese, für eine Germanistin, „anstrengend zu lesende“ Arbeit gewählt hat um all die Kommata zu finden, die ich vergessen hatte. Meiner ganzen Familie danke ich für die Unterstützung in all den Jahren.

Eidesstattliche 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 kenntlich gemacht 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 Promotionverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Thomas Klein betreut worden.

Düsseldorf, März 2015

Bernhard Migdal

Teilpublikationen im Rahmen dieser Arbeit:

Drusenheimer, N., Migdal, B., Jäckel, S., Tveriakhina, L., Scheider, K., Schulz, K., Gröper, J., Köhler, K., and Klein, T. (2015). The Mammalian Orthologs of *Drosophila* Lgd, CC2D1A and CC2D1B, Function in the Endocytic Pathway, but Their Individual Loss of Function Does Not Affect Notch Signalling. *PLOS Genetics* 11, e1005749.

Eingereicht bei PLOS Biology (März 2016)

Klose, S., Brüser, C., Migdal, B., Haag, C., Feldbrügge, M. and Klein, T. The auxiliary ESCRT-III proteins Chmp5 and Ist1 confer robustness to cold during MVB formation and interact with Lgd.