Struktur- und Funktionsanalyse der Lgd DM14 Domänen und der Interaktion dieser mit der ESCRT-III Untereinheit Shrub in *Drosophila melanogaster*

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Christine Tibbe
aus Thuine

Düsseldorf, Oktober 2019

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

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

Berichterstatter:
1. Prof. Dr. Thomas Klein

2. Prof. Dr. Hermann Aberle

Tag der mündlichen Prüfung: 15.01.2020

Teilpublikationen im Rahmen dieser Dissertation:

McMillan BJ, **Tibbe C**, Drabek AA, Seegar TCM, Blacklow SC, Klein T (2017) Structural Basis for Regulation of ESCRT-III Complexes by Lgd. Cell reports 19:1750-1757.

Christine Tibbe hat zu dieser Publikation beigetragen:

- alle *in vivo* Daten in dieser Publikation
- mit Ausnahme von Lgd R173E-HA, Lgd R393E-HA und Lgd R173E/R393E-HA; diese Analyen wurden in Zusammenarbeit mit Lars Korfmacher durchgeführt.

McMillan BJ, **Tibbe C**, Jeon H, Drabek AA, Klein T, Blacklow SC (2016) Electrostatic Interactions between Elongated Monomers Drive Filamentation of *Drosophila* Shrub, a Metazoan ESCRT-III Protein. Cell reports 16:1211-1217.

Christine Tibbe hat zu dieser Publikation beigetragen:

- die *in vivo* Daten zu Shrub E40K, Shrub D79K und Shrub E86K.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung ... 1
1.1 Der endosomale Transportweg ... 1
1.2 Die ESCRT-Komplexe ... 3
1.2.1 Die ESCRT-III Komponente Shrub ... 6
1.3 Der Tumorsuppressor Lethal (2) giant discs ... 7
1.3.1 Kristallstruktur der Domänen von Lgd ... 9
1.4 Der Notch-Signalweg ... 10
1.5 Ziele der Arbeit ... 13
2 Material und Methoden ... 14
2.1 Material ... 14
2.1.1 Puffer, Lösungen und Medien ... 14
2.1.2 Enzyme ... 15
2.1.3 Reaktions-Kits ... 16
2.1.4 Primer ... 16
2.1.5 Vektoren ... 20
2.1.6 Antikörper ... 20
2.1.7 Geräte und Software ... 21
2.1.8 Chemisch kompetente Bakterien ... 21
2.1.9 Fliegenstämme ... 22
2.2 Molekularbiologische Methoden ... 24
2.2.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR) ... 24
2.2.2 Gibson Assembly ... 27
2.2.3 Transformation chemisch kompetenter Bakterien ... 29
2.2.4 Mini-Plasmid-Präparation ... 29
2.2.5 Midi-DNA Präparation ... 30

2.2.6 Sequenzierung 30
2.2.7 Restriktionsspaltung 30
2.2.8 Gelextraktion 31
2.2.9 Ligation 31
2.3 Genetische Methoden 31
2.3.1 Fliegenhaltung 31
2.3.2 Erzeugung transgener Fliegen 31
2.3.3 Rettungsexperiment 32
2.3.4 Eiablagen – Shrub 32
2.3.5 Indirekte Antikörper-Färbung an Flügelimaginalscheiben 33
2.3.6 Der Notch-Reporter Gbe+Su(H) 34
3 Ergebnisse 35
3.1 Analyse von Lgd-Deletionskonstrukten – Unterschiede zwischen den geradzahligen und ungeradzahligen DM14 Domänen 35
3.2 Analyse der Wechselwirkung zwischen Lgd und Shrub – Mutationen in der Shrub-Interaktionsstelle 47
3.2.1 Auswirkungen der Ladungsumkehr 49
3.2.2 Auswirkungen des Neutralisierens der Ladung 52
3.2.3 Auswirkungen von Mutationen, die die Ladung nicht beeinflussen 55
3.3 Definition eines minimalen Shrub-Bindemotives 59
3.4 Analyse der Lgd DM14 Domänen – Mutationen an konservierten Positionen 64
3.5 Analyse der Wechselwirkung zwischen Lgd und Shrub – Mutationen im Lgd Interaktionspartner Shrub 71
4 Diskussion 77
4.1 Unterschiede zwischen geradzahligen und ungeradzahligen DM14 Domänen 77
4.2 Mutationen in der Shrub-Interaktionsstelle 81
4.3 Definition eines minimalen Shrub-Bindemotives 84

4.4 Mutationen an konservierten Positionen 85
4.5 Mutationen im Lgd-Interaktionspartner Shrub 89
5 Zusammenfassung 96
6 Summary 97
7 Literaturverzeichnis 98
8 Abkürzungsverzeichnis 107
8.1 Einbuchstaben-Code der Aminosäuren 109
9 Anhang 110
10 Danksagung 111
11 Eidesstattliche Erklärung 112

1 Einleitung

1.1 Der endosomale Transportweg

Der Abbau von Proteinen ist für alle Zellen ein essentieller, streng regulierter Prozess. Membranproteine treten über die Endozytose in diesen Abbauweg ein, wodurch die Menge von Proteinen an der Zelloberfläche reguliert werden kann. Transmembranproteine, welche eine intra- und eine extrazelluläre Domäne aufweisen, werden endozytiert und über den endosomalen Transportweg von der Plasmamembran zu den Lysosomen transportiert und dort abgebaut (Übersicht in Huotari und Helenius, 2011).

Bei der Endozytose wird die Plasmamembran eingestülpt und anschließend abgeschnürt (Abb. 1.1 ①). Dieser Prozess kann von Hüllproteinen wie Clathrin oder Caveolin abhängen oder auch unabhängig von diesen ablaufen (Übersichten in Mousavi et al., 2004, Mayor und Pagano, 2007, Doherty und McMahon, 2009). Die entstandenen frühen endosomalen Vesikel fusionieren miteinander und bilden frühe Endosomen. Sie können aber auch mit bereits bestehenden frühen Endosomen fusionieren (Abb. 1.1 ②).

Die endosomale Fracht wird im frühen Endosom sortiert, weshalb diese Endosomen auch sortierende Endosomen genannt werden (Übersicht in Jovic et al., 2010). Proteine können recycelt werden und von den Endosomen zurück an die Plasmamembran gelangen. Dies geschieht direkt oder über Recycling-Endosomen (Abb. 1.1 ③, gelbe Route) (Übersicht in Maxfield und McGraw, 2004). Sind die Transmembranproteine hingegen durch Ubiquitin für den Abbau markiert, verbleiben sie im Endosom (Abb. 1.1, grüne Route) (Übersicht in Clague et al., 2012).

Durch die Ansäuerung des endosomalen Lumens und die Bildung von intraluminalen Vesikeln (ILV) reifen die Endosomen (Maxfield und Yamashiro, 1987). Auf Grund der Vielzahl an ILV werden die reifenden Endosomen auch MVB (multivesicular bodies) genannt (Abb. 1.1 ④). Die ILV-Bildung ist essentiell für den vollständigen Abbau der Transmembranproteine, da so die intrazelluläre Domäne dieser Proteine vom Zytosol getrennt wird. Dies ist besonders bei Rezeptoren von Bedeutung, da auf diese Weise die Aktivität von Signalwegen reguliert oder sogar ektopische Aktivierung verhindert werden kann (Übersicht in Sorkin und von Zastrow, 2009). Das Verpacken der endosomalen Fracht in ILV wird durch die ESCRT (endosomal sorting complex required for transport)-Komplexe vermittelt (siehe 1.2) (Schöneberg et al., 2017, Gatta und Carlton, 2019).

Am Ende des endosomalen Transportwegs steht die Fusion der reifenden Endosomen mit dem Lysosom. Die Transmembranproteine können hier durch lysosomale Hydrolasen vollständig abgebaut werden (Abb. 1.1 ⑤) (Übersicht in Huotari und Helenius, 2011).

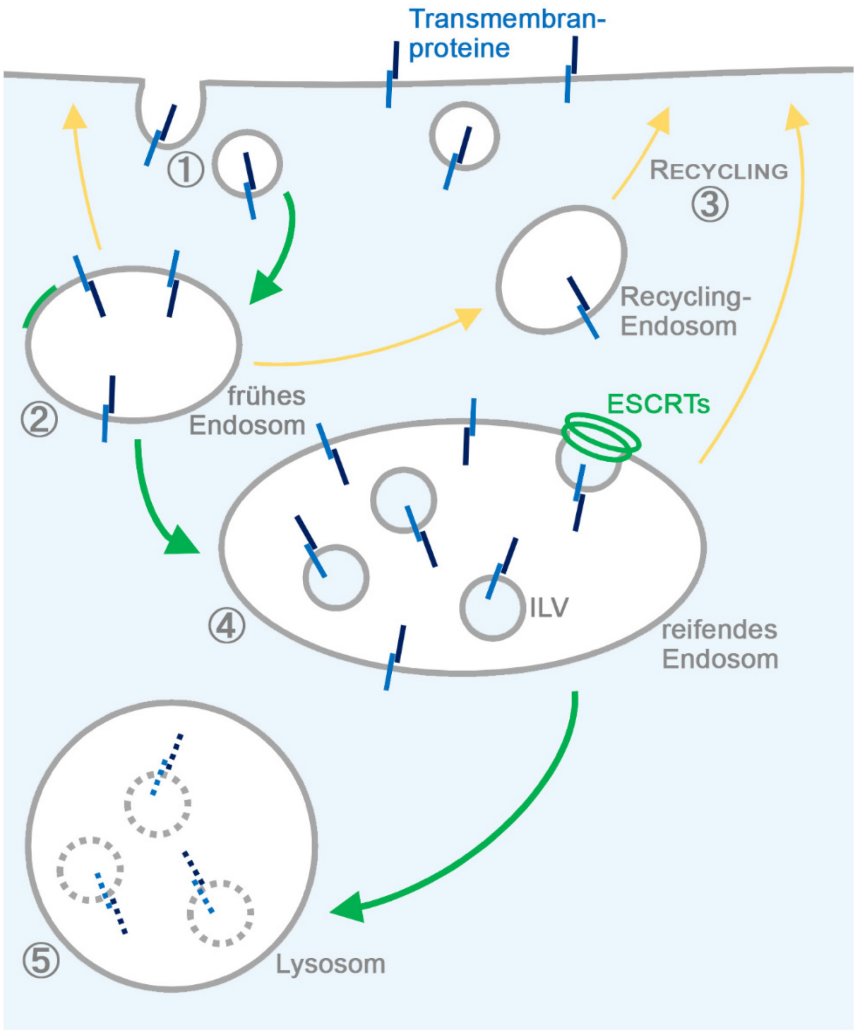


Abb. 1.1 Schematische Darstellung des endosomalen Transportweges. ① Transmembranproteine (blau), die sich in der Plasmamembran befinden, werden endozytiert. ② Die entstandenen frühen endosomalen Vesikel fusionieren zu oder mit frühen Endosomen. ③ Die Proteine können von hier aus direkt oder über Recycling-Endosomen zurück an die Plasmamembran gelangen (gelbe Route) oder sie sind für den Abbau markiert und verbleiben im Endosom (grüne Route). ④ Durch Ansäuerung und die Bildung von intraluminalen Vesikeln (ILV) werden die Endosomen zu reifenden Endosomen. Die ILV-Bildung wird von den ESCRT Komplexen vermittelt und ist essentiell, um das vollständige Transmembranprotein abzubauen. ⑤ Die reifenden Endosomen fusionieren mit dem Lysosom, in welchem der Abbau der Proteine stattfindet.

1.2 Die ESCRT-Komplexe

Die Bildung der ILV während der Reifung der Endosomen wird durch die ESCRT-Komplexe vermittelt. Die ESCRT-Komplexe 0-III und der Vps4-Komplex wirken nacheinander an der limitierenden Membran des Endosoms und sind verantwortlich für das Erkennen der endosomalen Fracht, das Einstülpen der endosomalen Membran, die Sortierung der Fracht in die Membran-Vertiefungen und die Abschnürung der ILV (Übersichten in Schöneberg et al., 2017, McCullough et al., 2018, Gatta und Carlton, 2019). Die ESCRT-Komplexe sind bereits an frühen Endosomen zu finden, wo die ILV-Bildung beginnt (Wenzel et al., 2018).

Der ESCRT-0 Komplex wird durch die Bindung der Untereinheit Hrs (Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate) an das Endosom-spezifische Lipid Phosphatidylinositol(3)-Phosphat (PI(3)P) an die endosomale Membran rekrutiert (Burd und Emr, 1998, Gaullier et al., 1998, Gillooly et al., 2000). Dort bindet der Komplex aus Hrs und Stam (Signal-transducing adaptor molecule) an die für die Degradation im Lysosom durch Ubiquitinierung markierte Fracht (Katzmann et al., 2001, Bilodeau et al., 2002, Bache et al., 2003, Ren und Hurley, 2010). Die endosomale Fracht wird durch den ESCRT-0 Komplex aufkonzentriert (Wollert und Hurley, 2010).

Mit Ausnahme von ESCRT-0 werden alle folgenden ESCRT-Komplexe von dem vorherigen Komplex rekrutiert (Babst et al., 2002b, Teo et al., 2004, Teo et al., 2006).

Nach der Rekrutierung von ESCRT-I an die endosomale Membran, bindet der Komplex ebenfalls an die ubiquitinierte Fracht (Katzmann et al., 2001). ESCRT-I besteht aus den Untereinheiten Tsg101 (Tumor susceptibility gene 101), Vps28 (Vacuolar protein sorting 28), Vps37 und Mvb12 (Multivesicular body sorting factor of 12 kilodaltons), die in einem 1:1:1:1 Verhältnis vorliegen (Gill et al., 2007, Kostelansky et al., 2007).

Gemeinsam vermitteln ESCRT-I und –II die erste Einstülpung der endosomalen Membran und durch den sequentiellen Transfer von einem ESCRT-Komplex zum anderen die Sortierung der ubiquitinierten Fracht in diese (Abb. 1.2 ①) (Kostelansky et al., 2007, Wollert und Hurley, 2010).

Der ESCRT-II Komplex besteht aus je einer Untereinheit Vps22 und Vps36 und zwei Untereinheiten Vps25, die Y-förmig angeordnet sind (Hierro et al., 2004, Teo et al., 2004, Im und Hurley, 2008). Dieser Komplex kann, wie der ESCRT-0 Komplex, neben Ubiquitin auch an Lipide der endosomalen Membran binden (Slagsvold et al., 2005, Im und Hurley, 2008).

Der ESCRT-III Komplex wird durch direkte Interaktion von Vps25 mit der ESCRT-III Untereinheit Vps20 rekrutiert (Teo et al., 2004). Im Gegensatz zu den vorherigen ESCRT-Komplexen assembliert ESCRT-III erst an der endosomalen Membran. Die monomeren Untereinheiten liegen autoinhibiert im Zytosol vor und werden erst durch die Rekrutierung zum Endosom aktiviert (Bajorek et al., 2009). So löst Vps20 die Polymerisation von Shrub aus (siehe 1.2.1). Daran schließt sich die Rekrutierung von Vps24 und Vps2 an, welche die weitere Polymerisation von Shrub hemmen (Abb. 1.2 ②) (Babst et al., 2002a, Teis et al., 2008, Schöneberg et al., 2018). Die häufigste ESCRT-III Untereinheit ist Shrub (Henne et al., 2012, Adell et al., 2017). Diese bildet Spiralen um die aufkonzentrierte endosomale Fracht, welche durch Vps24 und Vps2 in ihrer Form zu Membran-modulierenden Helices verändert werden (Henne et al., 2012).

Vor der Abschnürung der ILV wird die endosomale Fracht von Deubiquitinasen deubiquitiniert, die durch ESCRT-III rekrutiert werden (Dupré und Haguenauer-Tsapis, 2001, Katzmann et al., 2001, Odorizzi et al., 2003, Luhtala und Odorizzi, 2004).

Für die Disassemblierung des ESCRT-III Komplexes wird die Aktivität der ATPase Vps4 benötigt (Abb.1.2 ③) (Übersicht in McCullough et al., 2018). Hierbei entfaltet der als Hexamer aktive Komplex die ESCRT-III Untereinheiten unter Verbrauch von ATP komplett, so dass diese anschließend als Polypeptidketten vorliegen (Monroe et al., 2014, Yang et al., 2015, Han et al., 2017, Monroe et al., 2017). Auch bei der Abschnürung der ILV spielt Vps4 eine entscheidende Rolle (Mierzwa et al., 2017, Schöneberg et al., 2018). Neue Untersuchungen zeigen, dass die Aktivität des Vps4-Komplexes für eine ständige Umbildung des ESCRT-III Polymers, für den Austausch von Untereinheiten im Polymer und für die Anpassung an die Krümmung der Membran benötigt wird (Adell et al., 2014, Adell et al., 2017, Mierzwa et al., 2017). Wie genau es zur Deformierung der endosomalen Membran und schließlich zur Abschnürung des ILV kommt, ist noch nicht abschließend aufgeklärt (Übersicht in Chiaruttini und Roux, 2017, Schöneberg et al., 2017).

Nach der Abschnürung der ILV bleiben die ESCRT-Komplexe an der limitierenden Membran zurück und werden nicht in die ILV verpackt (Wollert und Hurley, 2010). Ein kleiner Teil der früh wirkenden ESCRT-Komplexe verbleibt an der endosomalen Membran und steht für die Abschnürung neuer ILV bereit. So geschieht die Rekrutierung der ESCRT-Komplexe in Wellen und die Abschnürung der ILV findet an definierten Regionen der limitierenden Membran statt (Abb. 1.2 ④) (Wenzel et al., 2018).

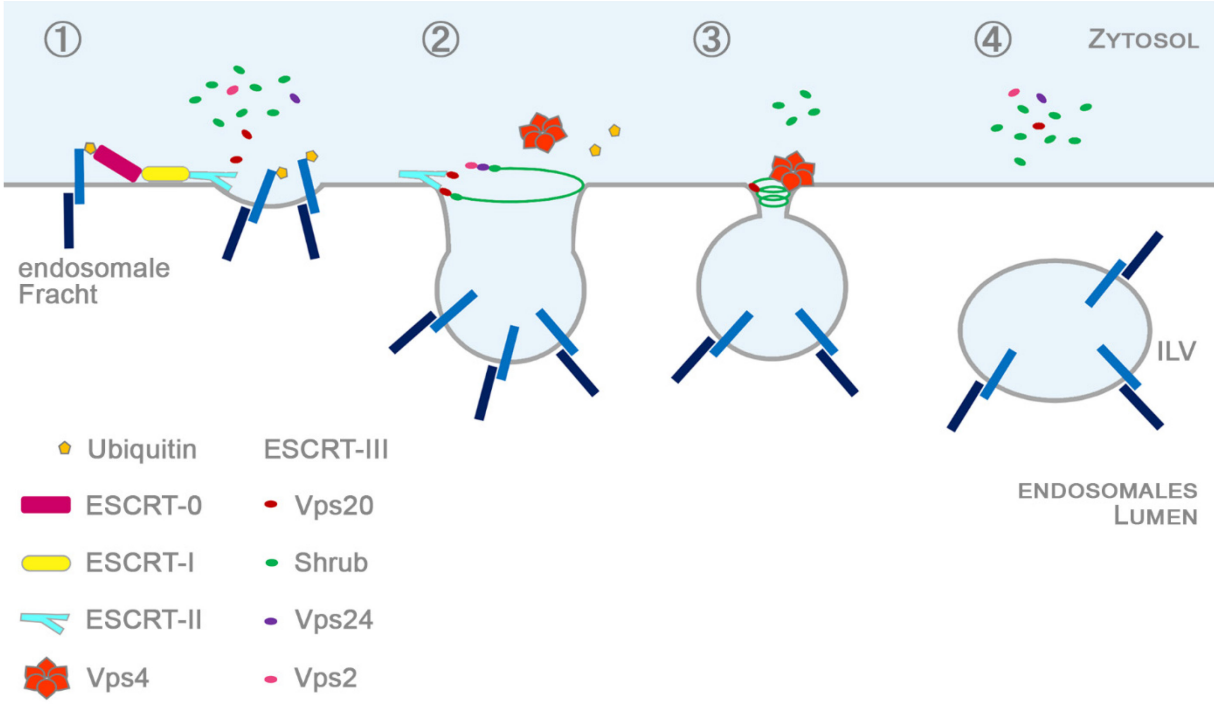


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Wirkungsweise der ESCRT-Komplexe. ① Die ESCRT-Komplexe 0-II werden zur endosomalen Membran rekrutiert und erkennen dort die für den lysosomalen Abbau markierte, ubiquitinierte Fracht. Diese wird in Einstülpungen der limitierenden Membran sortiert. ② Der ESCRT-III Komplex polymerisiert in Spiralen um die endosomale Fracht und vermittelt die Deformierung der Membran. ③ Vps4 sorgt für die Disassemblierung von ESCRT-III und ist entscheidend für die Abschnürung der ILV. ④ Nach der Disassemblierung liegen die ESCRT-III Untereinheiten wieder als Monomere vor und können für eine neue ILV-Bildung an das Endosom rekrutiert werden.

Neben der essentiellen Rolle der ESCRT-Komplexe während der Bildung und Abschnürung der ILV im endosomalen Transportweg, sind diese in viele weitere zelluläre Prozesse involviert, bei denen es zur Verformung von Membranen kommt. Sie sind z.B. wichtig bei der Zytokinese, bei der Reparatur der Plasmamembran oder auch bei der Erneuerung der Kernhülle. Die ESCRT-Komplexe werden auch bei der Knospung der viraler Partikel des humanen Immundefizienz-Virus (HIV) verwendet (Übersicht in Hurley, 2015).

1.2.1 Die ESCRT-III Komponente Shrub

Die am häufigsten vorkommende Untereinheit im ESCRT-III-Komplex ist Shrub (Henne et al., 2012, Adell et al., 2017). Diese bildet Polymere, die essentiell für die Abschnürung der ILV sind. Für Snf7, das Ortholog aus *Saccharomyces cerevisiae*, konnte gezeigt werden, dass das Protein an der endosomalen Membran in seiner offenen Form vorliegt (Henne et al., 2012). Im Zytosol hingegen herrscht ein Gleichgewicht zwischen der offenen und der geschlossenen, autoinhibierten Form und allen Zwischenstadien (Tang et al., 2015).
Der Ausfall von Shrub in *Drosophila* führt zur ektopischen Aktivierung des Notch Signalweges, zum Verlust der epithelialen Integrität und zu einer Letalität im Embryonalstadium (Sweeney et al., 2006, Vaccari et al., 2009, Hori et al., 2011).

Die Kristallstruktur von Shrub

Sowohl für Shrub als auch für Snf7 konnte die Kristallstruktur für ein verkürztes Protein aufgeklärt werden (Abb. 1.3 A, C) (Tang et al., 2015, McMillan et al., 2016). Beide Proteine bilden eine aus zwei Helices bestehende lang gestreckte helikale Haarnadel, wobei die zweite Helix von Snf7 C-terminal einen Knick aufweist (Abb. 1.3 C). Die Interaktion von zwei Shrub Monomeren basiert auf elektrostatischen Wechselwirkungen. So bindet die positiv geladene Kopf-Region eines Monomers an die saure Region des vorherigen Monomers (Abb. 1.3 B) (McMillan et al., 2016). Die Bindung in Snf7 Polymeren beruht hingegen vorrangig auf hydrophoben Interaktionen (Tang et al., 2015). Für das humane Ortholog CHMP4B konnte ebenfalls eine Kristallstruktur aufgeklärt werden, allerdings für ein im Vergleich zu Shrub und Snf7 C-terminal weiter gekürztes Protein. Auch hier formt das Protein eine helikale Haarnadel aus (Martinelli et al., 2012).

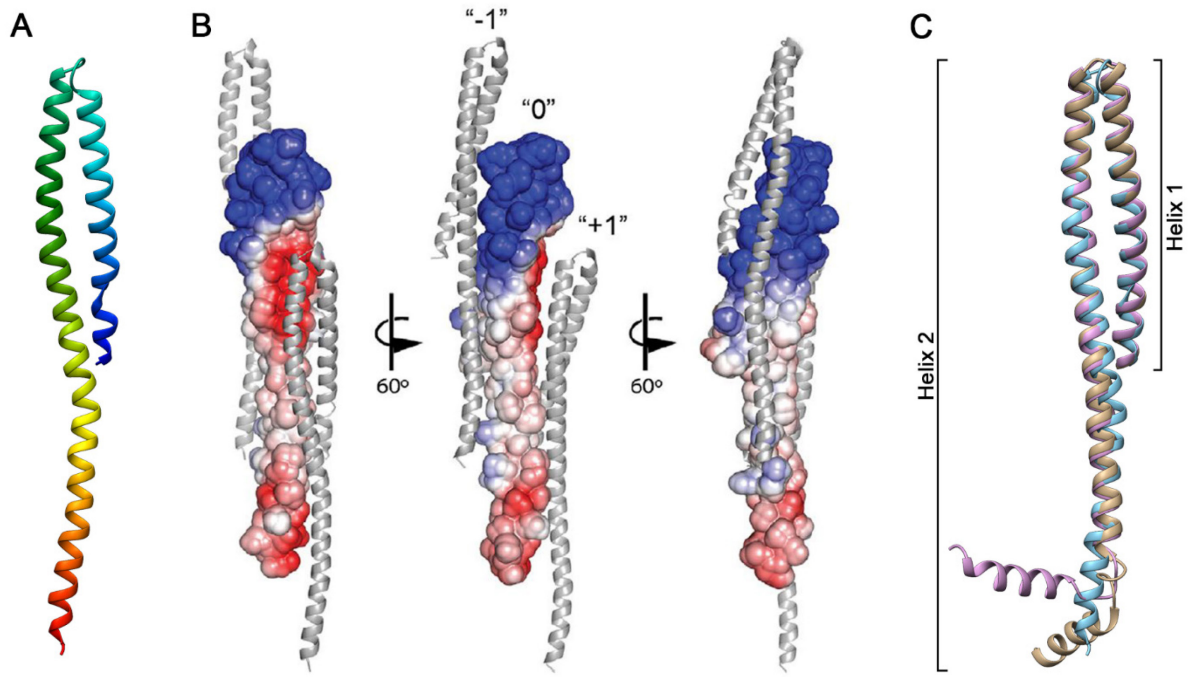


Abb. 1.3: A – Kristallstruktur der ESCRT-III Untereinheit Shrub. Shrub bildet eine helikale Haarnadel aus. Die Struktur ist farblich vom N-Terminus (blau) bis C-Terminus (rot) markiert. PDB Eintrag: 5J45 (McMillan et al., 2016). B – Kristallstruktur der Interaktion zwischen drei Shrub Monomeren. Die positiv geladene Kopf-Region eines Monomers (blau) bindet an die saure Region (rot) des vorherigen Monomers (Abbildung aus McMillan et al. (2016)). C – Überlagerung der Kristallstrukturen von Shrub (blau) und Snf7, Konformation A (beige) (PDB Eintrag: 5FD7) und Konformation B (lila) (PDB Eintrag: 5FD9) (Tang et al., 2015). Die zweite Helix von Snf7 weist im Vergleich zu Shrub einen Knick auf.

1.3 Der Tumorsuppressor Lethal (2) giant discs

Der Tumorsuppressor Lethal (2) giant discs (Lgd) ist ein Interaktionspartner von Shrub und wichtig für die vollständige Aktivität dieser ESCRT-III Untereinheit (Troost et al., 2012). Er gehört zu einer Proteinfamilie, die in allen Metazoen vertreten ist. Charakteristisch für Lgd-Proteine sind vier N-terminale DM14 (*Drosophila melanogaster* 14) Domänen und das Vorhandensein einer C-terminalen C2-Domäne (Ponting et al., 2001, Childress et al., 2006, Gallagher und Knoblich, 2006, Jaekel und Klein, 2006).

Die C2-Domäne ist wichtig für die Protein-Lokalisation, die Stabilität des Proteins und ermöglicht die Assoziation an Phospholipide (Gallagher und Knoblich, 2006, Troost et al., 2012, Ventimiglia et al., 2018). Die DM14 Domänen sind essentiell für die Funktionalität von Lgd und dienen der direkten Interaktion mit Shrub (siehe 1.3.1). Vier DM14 Domänen scheinen funktionale Robustheit zu vermitteln, da zwei Domänen für die Funktion von Lgd ausreichend sind (Troost et al., 2012).

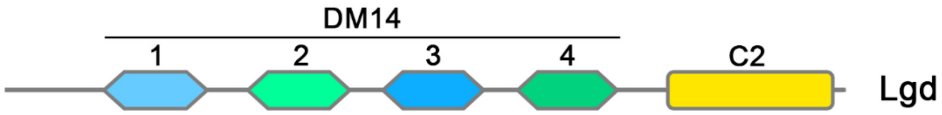


Abb. 1.4: Schematische Darstellung der Domänen-Struktur von Lgd. Die vier N-terminalen DM14 Domänen sind in blau (ungeradzahlig) und grün (geradzahlig) dargestellt. Die C2 Domäne ist in gelb gezeigt.

In Vertebraten existieren zwei Orthologe von Lgd, CC2D1A und CC2D1B (Childress et al., 2006, Jaekel und Klein, 2006). Auch für diese wurde eine Interaktion der DM14 Domänen mit den Orthologen von Shrub, CHMP4A, B und C, gezeigt (Tsang et al., 2006, Martinelli et al., 2012, Usami et al., 2012).

In *Drosophila* ist Lgd in jeder Zelle schwach exprimiert und zytoplasmatisch lokalisiert (Childress et al., 2006, Gallagher und Knoblich, 2006, Jaekel und Klein, 2006, Troost et al., 2012). Der vollständige Funktionsverlust von *lgd* führt in *Drosophila* zu einer ektopischen Aktivierung des Notch Signalweges (siehe 1.4) (Klein, 2003, Schneider et al., 2013). Diese Über-Aktivierung führt zur ektopischen Aktivierung von Notch-Zielgenen wie *wingless* (*wg*), zur Überproliferation der Imaginalscheiben, zu einem verlängerten Larvenstadium und zur Letalität im Puppenstadium (Bryant und Schubiger, 1971, Buratovich und Bryant, 1995). Die ektopische Aktivierung des Notch Signalweges ist auf einen Defekt im endosomalen Transport zurückzuführen. So wird vermutet, dass durch den Verlust von Lgd die Aktivität der ESCRT-III Untereinheit Shrub herabgesetzt ist, wodurch die Bildung der ILV bei der Reifung der Endosomen gestört ist. Hierdurch bleibt ein Teil des Notch-Rezeptors an der limitierenden Membran des Endosoms zurück. Durch einen alternativen Schnitt der extrazellulären Domäne von Notch im Lysosom, kann es beim Verlust von Lgd Liganden-unabhängig zur Aktivierung des Notch-Signalweges kommen (Troost et al., 2012, Schneider et al., 2013). Die Überexpression von Lgd führt wie der Verlust zu einer ektopische Aktivierung des Notch-Signalweges (Gallagher und Knoblich, 2006, Jaekel und Klein, 2006).

Die Interaktion mit Shrub und der in *lgd*-mutanten Geweben beobachtete endosomale Phänotyp deuten auf eine Funktion von Lgd im endosomalen Transportweg hin (Childress et al., 2006, Gallagher und Knoblich, 2006, Jaekel und Klein, 2006, Troost et al., 2012, Schneider et al., 2013).

1.3.1 Kristallstruktur der Domänen von Lgd

Für die dritte DM14 Domäne von Lgd konnte die Struktur mittels Röntgenkristallographie aufgeklärt werden (McMillan et al., 2017). Sie formt eine kurze helikale Haarnadel, die eine positiv geladene Region beinhaltet (Abb. 1.5 A, B). Die ebenfalls aufgeklärte Kristallstruktur der Interaktion zwischen der dritten DM14 Domäne und der ESCRT-III Untereinheit Shrub deutet darauf hin, dass die Bindung von Lgd an den sauren Bereich von Shrub über diese basische Region mittels elektrostatischer Wechselwirkungen vermittelt wird (Abb. 1.5 C) (McMillan et al., 2017).

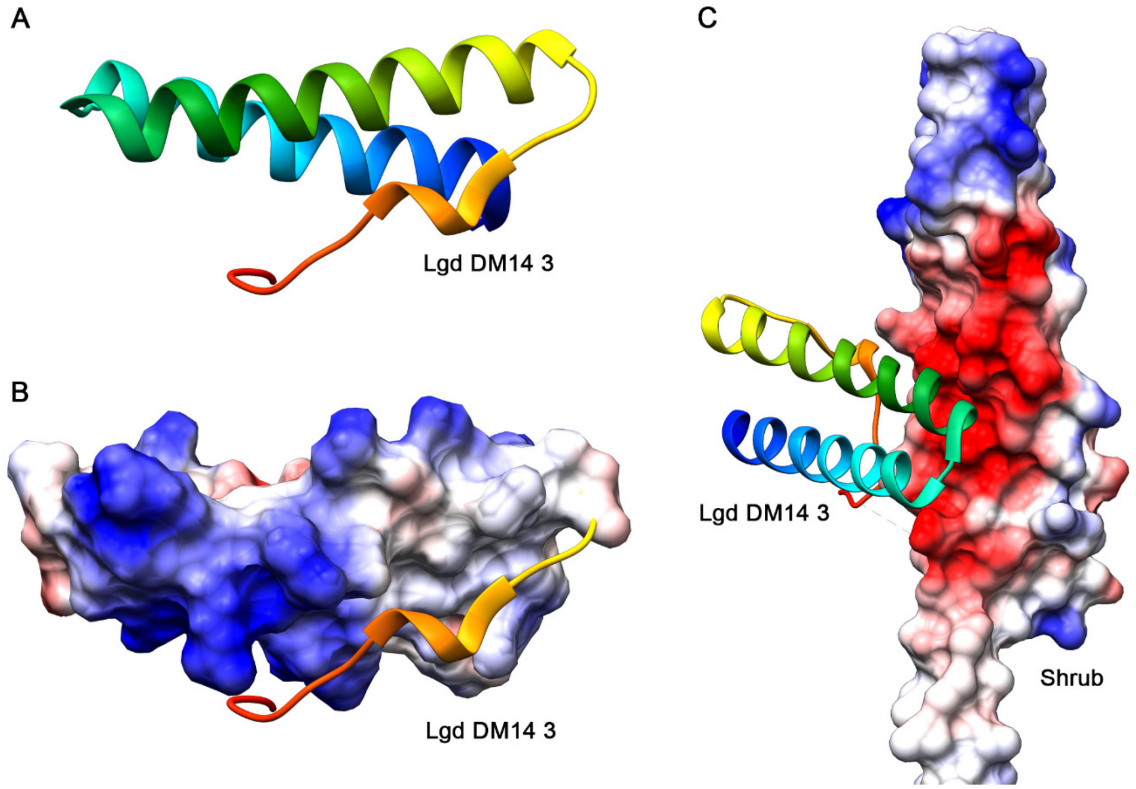


Abb. 1.5: A – Kristallstruktur der dritten DM14 Domäne von Lgd. Diese Domäne bildet eine helikale Haarnadel aus. Die Struktur ist farblich vom N-Terminus (blau) bis C-Terminus (rot) markiert. PDB Eintrag: 5VNY. B – Oberflächendarstellung der beiden Helices der dritten DM14 Domäne von Lgd. Die dargestellte Oberfläche ist positiv geladen (blau). C – Kristallstruktur der Interaktion der dritten DM14 Domäne von Lgd mit der ESCRT-III Untereinheit Shrub. Die Interaktion beider Proteine scheint auf elektrostatischen Wechselwirkungen zu beruhen. PDB Eintrag: 5VO5 (McMillan et al., 2017). In der Oberflächendarstellung repräsentiert blau positive Oberflächenladung und rot negative.

Auch für die C2 Domäne von Lgd und den N-terminal dieser Domäne liegenden Bereich wurde eine Kristallstruktur aufgeklärt. Die C2 Domäne formt ein β-Sandwich mit zwei integrierten, kurzen α-Helices. Der N-terminale Bereich formt eine helikale Haarnadel, die strukturell ähnlich zu der dritten DM14 Domäne von Lgd ist (Ventimiglia et al., 2018).

1.4 Der Notch-Signalweg

Wie beschrieben, führt der Verlust von Lgd zu einer ektopischen Aktivierung des Notch Signalweges (Klein, 2003). Diese Aktivierung ist unabhängig von den Notch-Liganden und beruht auf einem alternativen Schnitt des Rezeptors durch den γ-Sekretase-Komplex im Lysosom (Schneider et al., 2013).

Die kanonische, Liganden-abhängige Aktivierung des Notch Signalweges basiert auf der direkten Interaktion zwischen dem Notch-Rezeptor in der Signal-empfangenden Zelle und einem DSL-Liganden (Delta und Serrate in *Drosophila*, Lag-2 in *C. elegans*) in der Signal-sendenden Zelle (Übersichten in Kopan und Ilagan, 2009, Bray, 2016, Kovall et al., 2017).

Der Notch-Rezeptor als Transmembranprotein wird im rauen endoplasmatischen Retikulum synthetisiert, im Trans-Golgi-Netzwerk durch die Konvertase Furin prozessiert (S1-Schnitt) und durch Fringe modifiziert. Als Heterodimer gelangt der Notch-Rezeptor an die Plasmamembran (Abb. 1.6 ①) (Blaumueller et al., 1997, Logeat et al., 1998, Übersicht in Haines und Irvine, 2003).

Die DSL-Liganden sind ebenfalls Transmembranproteine. Diese können durch die E3-Ubiquitin-Ligasen Neuralized und Mind bomb modifiziert werden, was wichtig für die Aktivierung der Liganden ist (Le Borgne et al., 2005, Wang und Struhl, 2005).

Binden Rezeptor und Ligand in trans aneinander, wird der Notch-Signalweg aktiviert (Abb. 1.6 ②). Durch die beginnende Endozytose des Liganden, wirkt eine Zugkraft auf den gebundenen Notch-Rezeptor, wodurch die Schnittstelle der Metalloprotease Kuzbanian oberhalb der Plasmamembran frei wird (Meloty-Kapella et al., 2012). Der Notch-Rezeptor wird im sogenannten S2-Schnitt proteolytisch geschnitten (Abb. 1.6 ③) (Brou et al., 2000, Mumm et al., 2000). Die extrazelluläre Domäne des Rezeptors wird zusammen mit dem Liganden in die Signal-sendende Zelle trans-endozytiert (Abb. 1.6 ④) (Parks et al., 2000). Das an der Plasmamembran verbleibende Fragment des Notch-Rezeptors wird anschließend durch den γ-Sekretase-Komplex in einer dritten proteolytischen Spaltung (S3) geschnitten (Abb. 1.6 ⑤) (De Strooper et al., 1999, Struhl und Greenwald, 1999, Ye et al., 1999). Hierdurch wird die intrazelluläre Domäne des Rezeptors (engl. Notch intracellular domain, kurz NICD) frei und kann in den Zellkern translozieren.

Im Zellkern bindet die NICD an einen Transkriptionsfaktor der CSL-Familie (CBF1 in Vertebraten, Su(H) in *Drosophila*, Lag1 in *C. elegans*) und zusammen mit Mastermind

(Mam) und Co-Aktivatoren wird die Transkription von Notch-Zielgenen aktiviert (Abb. 1.6 ⑥) (Furriols und Bray, 2000, Nam et al., 2006, Wilson und Kovall, 2006). Durch die Bindung der NICD an Supressor of Hairless (Su(H)) werden Co-Repressoren verdrängt, die in Abwesenheit von NICD zusammen mit Su(H) die Transkription von Zielgenen verhindern (Abb. 1.6 ⑦) (Übersichten in Borggrefe und Oswald, 2009, 2016).

Neben der Bindung von Rezeptor und Ligand in trans kann auch eine Bindung in cis innerhalb einer Zelle geschehen. Diese Interaktion führt zur Cis-Inhibition des Signalweges, wodurch der Anteil an aktivierbarem Notch-Rezeptor an der Plasmamembran der Signal-empfangenden Zelle reduziert wird (Übersicht in del Alamo et al., 2011).

Um die Rate an Rezeptor-Molekülen bei ständiger Neu-Synthese konstant zu halten, wird der nicht aktivierte Notch-Rezeptor kontinuierlich von der Plasmamembran endozytiert. Wie bereits beschrieben, kann dieser als endozytierte Fracht entweder recycelt werden (Abb. 1.6 ⑧) oder für den endosomalen Abbau bestimmt sein (Abb. 1.6 ⑨). Durch Defekte im endosomalen Transportweg, beispielsweise durch den Verlust einer ESCRT-Untereinheit oder Verlust von *lgd*, kann es zu einer alternativen Liganden-unabhängigen, ektopischen Aktivierung des Notch-Rezeptors kommen (Abb. 1.6 ⑩). Diese resultiert im Frei-werden der NICD, welche in den Zellkern translozieren und dort die Transkription von Notch-Zielgenen aktivieren kann (Übersicht in Schnute et al., 2018).

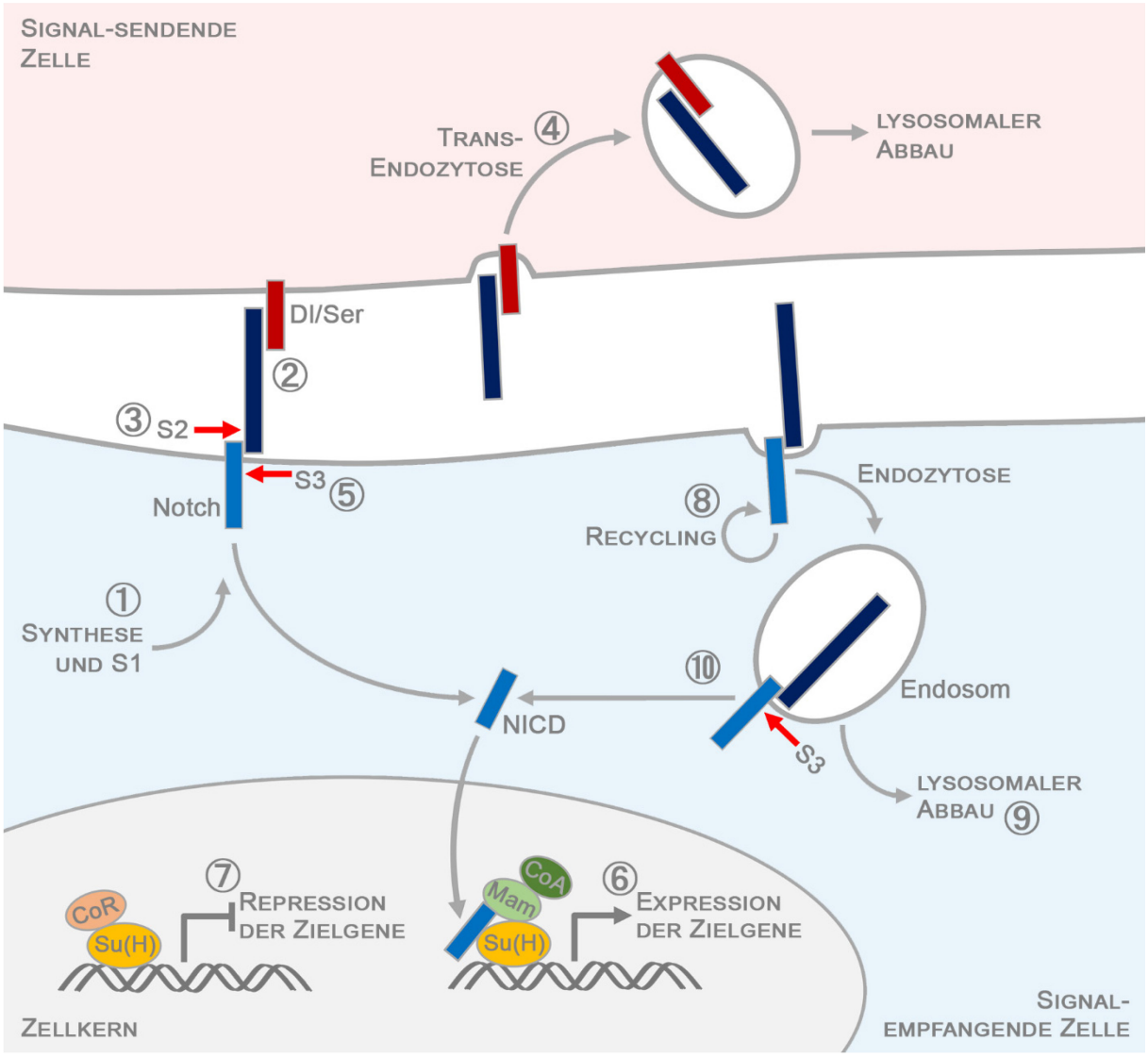


Abb. 1.6: Schematische Darstellung des Notch-Signalweges. ① Der Notch-Rezeptor wird synthetisiert und gelangt nach der ersten proteolytischen Spaltung (S1) als Heterodimer an die Plasmamembran. ② Nach der Bindung des Notch Rezeptors an den Liganden (Dl/Ser) der Signal-sendenden Zelle ③ kommt es zum proteolytischen Schnitt (S2) des Rezeptors durch die Metalloprotease Kuzbanian in der extrazellulären Domäne. ④ Die extrazelluläre Domäne von Notch wird zusammen mit dem Liganden in die Signal-sendende Zelle trans-endozytiert. ⑤ Das an der Plasmamembran verbleibende Fragment des Rezeptors wird in einem weiteren proteolytischen Schnitt (S3) geschnitten, wodurch die intrazelluläre Domäne von Notch (NICD) frei wird. Diese transloziert in den Zellkern und ⑥ bindet dort an Su(H). Zusammen mit Mam und Co-Aktivatoren wird die Expression der Notch-Zielgene aktiviert. ⑦ In Abwesenheit von NICD binden Repressoren an Su(H) und verhindern die Expression der Zielgene. Um die Anzahl der Rezeptoren an der Plasmamembran konstant zu halten, werden bei ständiger Neusynthese stetig Rezeptoren endozytiert. ⑧ Ein Teil wird recycelt und gelangt zurück an die Plasmamembran, ⑨ ein anderer Teil ist für den lysosomalen Abbau markiert und wird degradiert. ⑩ Bei Defekten des endosomalen Transports kann es zur alternativen Spaltung des Rezeptors kommen, wodurch NICD Liganden-unabhängig frei wird und im Zellkern die Aktivierung von Notch-Zielgenen vermitteln kann.

1.5 Ziele der Arbeit

Der Tumorsuppressor Lgd weist vier für seine Proteinfamilie einzigartige DM14 Domänen auf, die sich am N-Terminus befinden. Diese Domänen vermitteln die direkte Interaktion mit der ESCRT-III Untereinheit Shrub (Troost et al., 2012).
In dieser Arbeit sollen die DM14 Domänen und die Interaktion zwischen Lgd und Shrub näher untersucht werden. Die Fragestellungen hierbei sind:

Welche DM14 Domänen sind für die Funktion von Lgd essentiell?

Welche Aminosäuren innerhalb dieser Domänen sind wichtig für die elektrostatischen Wechselwirkungen mit dem Interaktionspartner Shrub (McMillan et al., 2017)?

Kann ein minimales Shrub-Bindemotiv definiert werden?

Sind konservierte Aminosäuren der DM14 Domänen entscheidend für die Funktionalität von Lgd?

Welche Aminosäuren in Shrub sind wichtig für die elektrostatischen Wechselwirkungen des Proteins?

Um diese Fragen zu beantworten werden verschiedene Lgd-Deletionskonstrukte erzeugt und Mutagenesen mit Lgd- und Shrub-Varianten durchgeführt. Diese Konstrukte werden in verschiedenen mutanten Hintergründen in *Drosophila* analysiert und ihr Rettungsvermögen *in vivo* untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Puffer, Lösungen und Medien

Puffer

1 x PBS (phosphate buffered saline)

137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na_2HPO_4; 2 mM KH_2PO; pH 7,4.

0,3 % PBT (1 x PBS + Triton X-100)

500 ml 1x PBS; 1,5 ml Triton-X-100.

1 x TAE-Puffer

40mM Tris-Acetat; pH 8,0; 1mM EDTA.

Gibson-Assembly 5x ISO-Puffer

3ml 1M Tris-HCL pH 7,5; 150 µl 2M $MgCl_2$; 60 µl 100mM dGTP, 60 µl 100mM dATP, 60 µl 100mM dTTP, 60 µl 100mM dCTP, 300 µl 1M DTT; 1,5 g PEG-8000; 300 µl 100mM NAD; dH_2O auf 6 ml.

Cut Smart® Restriktionspuffer	New England Biolabs (NEB)
T4 DNA-Ligase Puffer	NEB
Pfu-Polymerase Puffer	Promega
Q5 Reaktionspuffer	NEB
RES-Puffer	Macherey-Nagel
LYS-Puffer	Macherey-Nagel
NEU-Puffer	Machery-Nagel

Lösungen

4 % Paraformaldehyd (PFA)

4 g Paraformaldehyd in 80 ml ddH_2O lösen, 3 Tropfen NaOH hinzugeben, 5ml 20x PBS zufügen, auf 100 ml mit ddH_2O auffüllen und den pH-Wert auf 7,2 einstellen.

Ampicillin 100 mg/ml – Verdünnung 1:1.000	Sigma Aldrich
5 % Normales Ziegenserum (NGS)	Dianova
Hoechst 33258 – Verdünnung 1:10.000	Sigma Aldrich
dNTPs	Thermo Fisher Scientific
dGTP	Thermo Fisher Scientific
dATP	Thermo Fisher Scientific

dTTP	Thermo Fisher Scientific
dCTP	Thermo Fisher Scientific
6 x Ladepuffer	Thermo Fisher Scientific
GeneRuler 1kB DNA-Längenstandard	Thermo Fisher Scientific

Medien

Futtermedium zur Kultivierung von *Drosophila melanogaster*

100 g Agar; 1,4 kg Maismehl; 336 g Trockenhefe; 190 g Sojamehl; 900 g Malzextrakt; 800 g Zuckerrübensirup; 90 ml Propionsäure; 30 g Napagin-Pulver in 20 l dH_2O.

LB-Medium

10 g Bacto Tryptone; 5 g Hefeextrakt; 10 g NaCl in 1 l dH_2O; das Medium wird autoklaviert und vor Benutzung mit Antibiotika (100mg/ml) versetzt.

LB-Plattenmedium

LB-Medium wird mit 15 g Agar/Liter angesetzt und autoklaviert. Die 60 °C-warme Lösung wird nach Zugabe von Antibiotika (100mg/ml) in Petrischalen verteilt.

Apfelsaft-Agar-Plattenmedium

40 g Agar auf 1 l mit dH_2O auffüllen; gemischt mit 340ml 100% Apfelsaft; 17g Zucker; 30ml Nipagin; aufkochen; auf Petrischalen verteilen.

Vectarshield Einbettungsmedium, Vector Laboratories Inc.

2.1.2 Enzyme

Polymerasen

Pfu DNA Polymerase	Promega
Q5® High-Fidelity DNA Polymerase	NEB
Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase	NEB

Nukleasen

NotI-HF® Endonuklease	NEB
KpnI-HF® Endonuklease	NEB
DpnI Endonuklease	NEB
T5 Exonuklease	Biozym

Ligase

T4 DNA Ligase NEB

Taq DNA Ligase NEB

Gibson-Assembly Enzym Mastermix

320 µl	Gibson-Assembly 5x ISO-Puffer
0,64 µl	10 U/µl T5 Exonuklease
20 µl	2 U/µl Phusion® High-Fidelity DNA-Polymerase
160 µl	40 U/µl Taq DNA Ligase
1,2 ml	dH_2O

2.1.3 Reaktions-Kits

NucleoBond® Xtra Midi Kit, Machery-Nagel

Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit, Zymo Research

2.1.4 Primer

Mutagenese-Primer

Lgd-Konstrukte

Name	**Sequenz 5'→ 3'**
R368E For	g ttg gag gct ctg cag caa gag tta gag aaa tat caa tct g
R368E_Rev	c aga ttg ata ttt ctc taa ctc ttg ctg cag agc ctc caa c
DM14 3 For R>A R 368 A	g ttg gag gct ctg cag caa gcc tta gag aaa tat caa tct gta g
DM14 3 Rev R>A	ctacagattgatatttctctaaggcttgctgcagagcctccaac
K380E For	ct gta gaa gcg gca gcc gag gca gaa aac aat agc
K380E_Rev	gct att gtt ttc tgc ctc ggc tgc cgc ttc tac ag
K380A For	caa tct gta gaa gcg gca gcc gcc gca gaa aac aat agc gg
K380A Rev	ccgctattgttttctgcggcggctgccgcttctacagattg
DM14 3 For 1.K>R K 380 R	ct gta gaa gcg gca gcc cgc gca gaa aac aat agc gg
DM14 3 Rev 1.K->R	ccgctattgttttctgcgcgggctgccgcttctacag
K387E For	gca gaa aac aat agc gga gag gca aga cgc ttt gga agg
K387E Rev	cct tcc aaa gcg tct tgc ctc tcc gct att gtt ttc tgc
K387A For	ca gaa aac aat agc gga gcc gca aga cgc ttt gga ag

K387A Rev	ct tcc aaa gcg tct tgc ggc tcc gct att gtt ttc tg
K387R For	ca gaa aac aat agc gga cgc gca aga cgc ttt gga ag
K387R Rev	ct tcc aaa gcg tct tgc gcg tcc gct att gtt ttc tg
DM14 3 For A>G A 388 G	gaa aac aat agc gga aaa ggc aga cgc ttt gga agg att g
DM14 3 Rev A>G	caatccttccaaagcgtctgccttttccgctattgttttc
R389E For	gaa aac aat agc gga aaa gca gag cgc ttt gga agg att gtg
R389E Rev	cac aat cct tcc aaa gcg ctc tgc ttt tcc gct att gtt ttc
R389A For	gaa aac aat agc gga aaa gca gcc cgc ttt gga agg att gtg
R389A Rev	cac aat cct tcc aaa gcg ggc tgc ttt tcc gct att gtt ttc
R389K For	c aat agc gga aaa gca aag cgc ttt gga agg att g
R389K Rev	c aat cct tcc aaa gcg ctt tgc ttt tcc gct att g
R390E For	c aat agc gga aaa gca aga gag ttt gga agg att gtg aag c
R390E Rev	g ctt cac aat cct tcc aaa ctc tct tgc ttt tcc gct att g
R390A For	c aat agc gga aaa gca aga gcc ttt gga agg att gtg aag c
R390A Rev	g ctt cac aat cct tcc aaa ggc tct tgc ttt tcc gct att g
R390K For	c aat agc gga aaa gca aga aag ttt gga agg att gtg aag c
R390K Rev	g ctt cac aat cct tcc aaa ctt tct tgc ttt tcc gct att g
R393E For	gc gga aaa gca aga cgc ttt gga gag att gtg aag caa tac gaa g
R393E_Rev	c ttc gta ttg ctt cac aat ctc tcc aaa gcg tct tgc ttt tcc gc
R393A For	gga aaa gca aga cgc ttt gga gcc att gtg aag caa tac gaa g
R393A Rev	c ttc gta ttg ctt cac aat ggc tcc aaa gcg tct tgc ttt tcc
R393K For	gga aaa gca aga cgc ttt gga aag att gtg aag caa tac gaa g
R393K Rev	c ttc gta ttg ctt cac aat ctt tcc aaa gcg tct tgc ttt tcc
K396E For	cgc ttt gga agg att gtg gag caa tac gaa gat gcc
K396E Rev	ggcatcttcgtattgctccacaatccttccaaagcg
DM14 3 For 2.K>A K 396 A	cgc ttt gga agg att gtg gcc caa tac gaa gat gcc ata aag
DM14 3 Rev 2.K>A	ctttatggcatcttcgtattgggccacaatccttccaaagcg
DM14 3 For 2.K>R K 396 R	cgc ttt gga agg att gtg cgc caa tac gaa gat gcc ata aag
DM14 3 Rev 2.K>R	ctttatggcatcttcgtattggcgcacaatccttccaaagcg
R393E, K396E auf R For	cgc ttt gga gag att gtg gag caa tac gaa gat gcc ata aag
R393E, K396E auf R Rev	ctttatggcatcttcgtattgctccacaatctctccaaagcg
R393A, K396A For	gga aaa gca aga cgc ttt gga gcc att gtg gcc caa tac gaa g
R393A, K396A_Rev	c ttc gta ttg ggc cac aat ggc tcc aaa gcg tct tgc ttt tcc
DM14 3 For G>A G 408 A	g ttg tac aag gca gcc aaa cca gtg cct tac g
DM14 3 Rev G>A	cgtaaggcactggtttggctgccttgtacaac

DM14 3 For P>A P 417 A	g cct tac gat gag ctg gcc gtg cca cca ggt ttt gg
DM 14 3 Rev P>A	ccaaaacctggtggcacggccagctcatcgtaaggc
V 418 T For	g cct tac gat gag ctg cct acc cca cca ggt ttt gg
V 418 T Rev	ccaaaacctggtggggtaggcagctcatcgtaaggc
P 417 A, V 418 T For	g cct tac gat gag ctg gcc acc cca cca ggt ttt gg
P 417 A, V 418 T Rev	ccaaaacctggtggggtggccagctcatcgtaaggc

Shrub-Konstrukte

Name	**Sequenz 5'→ 3'**
shrub R59E For	g aat gcg tct aaa aac aaa gag gtg gcc ctg caa gca ctc aag
shrub R59E Rev	ctt gag tgc ttg cag ggc cac ctc ttt gtt ttt aga cgc att c
shrub R70E For	gca ctc aag aaa aag aag gag ctg gag aag caa ctc cag
shrub R70E Rev	ctg gag ttg ctt ctc cag ctc ctt ctt ttt ctt gag tgc
Shrub D79K For	caa ctc cag cag atc aag ggc acc ctg tcc ac
Shrub D79K Rev	gt gga cag ggt gcc ctt gat ctg ctg gag ttg
Shrub E86K For	c acc ctg tcc aca atc aag atg cag cgc gag gct c
Shrub E86K Rev	g agc ctc gcg ctg cat ctt gat tgt gga cag ggt g
Shrub D126R For	gtg gac aag gtg cac cgc atg atg gat gac att gc
Shrub D126R Rev	gc aat gtc atc cat cat gcg gtg cac ctt gtc cac
Shrub D129R For	g gtg cac gac atg atg cgc gac att gcc gag cag c
Shrub D129R Rev	g ctg ctc ggc aat gtc gcg cat cat gtc gtg cac c
Shrub D130R For	cac gac atg atg gat cgc att gcc gag cag cag
Shrub D130R Rev	ctg ctg ctc ggc aat gcg atc cat cat gtc gtg

Gibson-Primer

Name	**Sequenz 5'→ 3'**
lgd N-term pattB For	taaacagcctctgtgcaatcaagg
lgd C-term patt B Rev	ttttatttaaattttcttgtttagccggtacc
lgd DM14 3,3 N-Term Rev	gctgcagagcctccaattgttgctcggcaatattattcttctg
lgd DM14 3,3 3(2) For	tattgccgagcaacaattggaggctctgcagcaacg
lgd DM14 3,3 3(2) Rev	gattatccctttgtgatggtggcacaggcagctcatc
lgd DM14 3,3 C-Term For	gctgcctgtgccaccatcacaaagggataatctagaagcc
lgd Del DM 14 2 Rev	attcaagaaactcagcaagaggattagggggagatgtgg
lgd Del DM 14 2 For	tccccctaatcctcttgctgagtttcttgaattccttaaaaaaatgc
lgd Del DM 14 4 Rev	gattatccctttgtgattgttgctcggcaatattattcttctgc
lgd Del DM 14 4 For	tattgccgagcaacaatcacaaagggataatctagaagcctc
lgd Del DM14 1 Rev	caattggctttacacttgtgtccacagtcgtcgtgg
lgd Del DM14 1 For	gacgactgtggacacaagtgtaaagccaattggcggg
lgd Del DM14 3 Rev	gcagcggtccaaaacccatatttgttgcagctgctagaac
lgd Del DM14 3 For	agctgcaacaaatatgggttttggaccgctgcctacg
lgd Del 1+3 (Del 3-4) For	agctgcaacaaatatgatgaaactgctcctcgagcgc
lgd Del 1+3 (Del 3-4) Rev	cgaggagcagtttcatcatatttgttgcagctgctagaac

Klonierungs-Primer

Name	**Sequenz 5'→ 3'**
Not I N Term C.e. lgd	ataagaatgcggccgcatgaatttcaatgatattgataatcaaatg
Kpn I C Term C.e. lgd	aatacttaaggggtaccttaattatctaaaatgagccatttctg

Sequenzierungs-Primer

Name	**Sequenz 5'→ 3'**
L1	atatggtgaggacgatgggg
L10	agctgtcggctatcattttg
L2	agacctttctgcccacgac
L3	tgaagtcagtgtaaagcc
L4	aaatgtgtgaagacggacagg
L5	acaaggcaggcaaaccag
L6	caaaaaagcgggagaaatag
L7	tatgggagatgtagcagg
shrb 5' UTR For	cggcaatcggtatcgggtg

2.1.5 Vektoren

Bezeichnung	**Quelle**
pattB lgdP lgd-HA	Troost et al. (2012)
pattB lgdP lgdΔDM14 1-2-HA	Troost et al. (2012)
pattB lgdP lgdΔDM14 1-3-HA	Troost et al. (2012)
pattB shrubP myc-shrub	Masterarbeit Bäumers (2015)

2.1.6 Antikörper

primäre Antikörper

gegen	**generiert in**	**Verdünnung**	**Hersteller**
Wingless (Wg)	Maus	1:50	Hybridoma
β-Galactosidase (β-Gal)	Kaninchen	1:1500	MP Biomedicals

sekundäre Antikörper

gekoppelt mit	**gegen**	**generiert in**	**Verdünnung**	**Hersteller**
Alexa-488	Maus	Ziege	1:500	Invitrogen
Alexa-568	Kaninchen	Ziege	1:500	Invitrogen

2.1.7 Geräte und Software

Geldokumentation	QUANTUM-System	peqlab
Konzentrations-bestimmung	NanoDrop™ 2000c Spectralphotometer	peqlab
Mikroskopie	Axio Imager Z1 mit Apotome und AxioCam MR3	Carl Zeiss AG
Thermocycler	TProfessional Thermo Cycler Gradient	Biometra
Zentrifugation	Avanti J-26 XP JX508L37	Beckmann Coulter
Software	Axio Vision Rel. 4.8 und Rel. 4.9	Carl Zeiss AG
	Photoshop CS6	Adobe
	Chromas 2.6.2	Technelysium Pty Ltd
	CLC Sequence Viewer 8, Qiagen	Qiagen Bioinformatics
	Serial Cloner 2.6.1	SerialBasics
	SnapGene® Viewer 5.0.2	SnapGene®
	EndNote™ X8.2	Thomson Reuters
	EMBOSS Needle	https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/
	NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
	UCSF Chimera 1.10.2	Universitiy of California, USA
	Windows 10 Home	Microsoft
	Office Professional Plus 2016	Microsoft

2.1.8 Chemisch kompetente Bakterien

Name	**Hersteller**	**Genotyp**
DH5-α	Invitrogen	F- φ80*lac*ZΔM15 Δ(*lac*ZYA-*arg*F)U169 *rec*A1 *end*A1 *hsd*R17(r_{k-}, m_{k+}) *pho*A *sup*E44 *thi*-1 *gyr*A96 *rel*A1 λ-
TOP10	Invitrogen	F- *mcrA* Δ(*mrr-hsd*RMS-*mcr*BC) Φ80*lacZ*ΔM15 Δ*lacX*74 *rec*A1 *ara*D139 Δ(*araleu*)7697 *gal*U *gal*K *rps*L (StrR) *end*A1 *nup*G

2.1.9 Fliegenstämme

Genotyp	**Referenz**
w; lgd^{d7} FRT40A; Gbe+Su(H)-lacZ/SM6a-TM6b	Stammsammlung AG Klein
w; lgd^{d7}, shrub$^{4-1}$; Gbe+Su(H)-lacZ/SM6a-TM6b	Stammsammlung AG Klein
w; If/CyO$^{wg-lacZ}$; Gbe+Su(H)-lacZ/TM6b	Stammsammlung AG Klein
w; +/+; +/+	Stammsammlung AG Klein
w; If/CyO$^{wg-lacZ}$; MKRS/TM6b (MB)	Stammsammlung AG Klein
w; lgd^{d7} FRT40A/CyO$^{wg-lacZ}$; MKRS/TM6b	Stammsammlung AG Klein
w; lgd^{d7} FRT40A; att 86 Fb lgd-P lgd-HA/SM6a-TM6b	Troost et al. (2012)
w; lgd^{d7} FRT40A; att 86 Fb lgd-P lgdΔDM14 1-2-HA/SM6a-TM6b	Troost et al. (2012)
w; lgd^{d7} FRT40A; att 86 Fb lgd-P lgdΔDM14 1-3-HA/SM6a-TM6b	Troost et al. (2012)
w; lgd^{d7} FRT40A; att 86 Fb lgd-P lgdΔDM14-HA/SM6a-TM6b	Troost et al. (2012)
w; lgd^{d7} FRT40A; att 86 Fb lgd-P lgd DM14 1+3-HA/SM6a-TM6b	diese Arbeit
w; lgd^{d7} FRT40A; att 86 Fb lgd-P lgd DM14 2+4-HA/SM6a-TM6b	diese Arbeit
w; lgd^{d7} FRT40A; att 86 Fb lgd-P lgd DM14 2+4 Δ aa 421-498-HA/ SM6a-TM6b	diese Arbeit
w; lgd^{d7} FRT40A; att 86 Fb lgd-P lgd DM14 1-HA/SM6a-TM6b	diese Arbeit
w; lgd^{d7} FRT40A; att 86 Fb lgd-P lgd DM14 3-HA/SM6a-TM6b	diese Arbeit
w; lgd^{d7} FRT40A; att 86 Fb lgd-P lgdΔDM14 1-2 DM14 3-3-HA/ SM6a-TM6b	diese Arbeit
w; lgd^{d7} FRT40A; att 86 Fb lgd-P lgdΔDM14 1-2 K380E-HA/ SM6a-TM6b	diese Arbeit
w; lgd^{d7} FRT40A; att 86 Fb lgd-P lgdΔDM14 1-2 K380A-HA/ SM6a-TM6b	diese Arbeit
w; lgd^{d7} FRT40A; att 86 Fb lgd-P lgdΔDM14 1-2 K380R-HA/ SM6a-TM6b	Masterarbeit Benscheidt (2013)
w; lgd^{d7} FRT40A; att 86 Fb lgd-P lgdΔDM14 1-2 K387E-HA/ SM6a-TM6b	diese Arbeit
w; lgd^{d7} FRT40A; att 86 Fb lgd-P lgdΔDM14 1-2 K387A-HA/ SM6a-TM6b	diese Arbeit
w; lgd^{d7} FRT40A; att 86 Fb lgd-P lgdΔDM14 1-2 K387R-HA/ SM6a-TM6b	diese Arbeit
w; lgd^{d7} FRT40A; att 86 Fb lgd-P lgdΔDM14 1-2 R389E-HA/ SM6a-TM6b	diese Arbeit

w; lgd^{d7} FRT40A; att 86 Fb lgd-P lgdΔDM14 1-2 R389A-HA/ SM6a-TM6b	diese Arbeit
w; lgd^{d7} FRT40A; att 86 Fb lgd-P lgdΔDM14 1-2 R389K-HA/ SM6a-TM6b	diese Arbeit
w; lgd^{d7} FRT40A; att 86 Fb lgd-P lgdΔDM14 1-2 R390E-HA/SM6a-TM6b	diese Arbeit
w; lgd^{d7} FRT40A; att 86 Fb lgd-P lgdΔDM14 1-2 R390A-HA/ SM6a-TM6b	diese Arbeit
w; lgd^{d7} FRT40A; att 86 Fb lgd-P lgdΔDM14 1-2 R390K-HA/ SM6a-TM6b	diese Arbeit
w; lgd^{d7} FRT40A; att 86 Fb lgd-P lgdΔDM14 1-2 R393E-HA/SM6a-TM6b	diese Arbeit
w; lgd^{d7} FRT40A; att 86 Fb lgd-P lgdΔDM14 1-2 R393A-HA/ SM6a-TM6b	diese Arbeit
w; lgd^{d7} FRT40A; att 86 Fb lgd-P lgdΔDM14 1-2 R393K-HA/ SM6a-TM6b	diese Arbeit
w; lgd^{d7} FRT40A; att 86 Fb lgd-P lgdΔDM14 1-2 R368E-HA/SM6a-TM6b	diese Arbeit
w; lgd^{d7} FRT40A; att 86 Fb lgd-P lgdΔDM14 1-2 R368A-HA/ SM6a-TM6b	Masterarbeit Benscheidt (2013)
w; lgd^{d7} FRT40A; att 86 Fb lgd-P lgdΔDM14 1-2 A388G-HA/ SM6a-TM6b	diese Arbeit
w; lgd^{d7} FRT40A; att 86 Fb lgd-P lgdΔDM14 1-2 K396E-HA/SM6a-TM6b	diese Arbeit
w; lgd^{d7} FRT40A; att 86 Fb lgd-P lgdΔDM14 1-2 K396A-HA/ SM6a-TM6b	diese Arbeit
w; lgd^{d7} FRT40A; att 86 Fb lgd-P lgdΔDM14 1-2 K396R-HA/ SM6a-TM6b	Masterarbeit Benscheidt (2013)
w; lgd^{d7} FRT40A; att 86 Fb lgd-P lgdΔDM14 1-2 R393A, K396A-HA/SM6a-TM6b	diese Arbeit
w; lgd^{d7} FRT40A; att 86 Fb lgd-P lgdΔDM14 1-2 G408A-HA/ SM6a-TM6b	diese Arbeit
w; lgd^{d7} FRT40A; att 86 Fb lgd-P lgdΔDM14 1-2 P417A-HA/SM6a-TM6b	Masterarbeit Benscheidt (2013)

w; lgd^{d7} FRT40A; att 86 Fb lgd-P lgdΔDM14 1-2 V418T-HA/SM6a-TM6b	diese Arbeit
w; lgd^{d7} FRT40A; att 86 Fb lgd-P lgdΔDM14 1-2 P417A, V418T-HA/ SM6a-TM6b	diese Arbeit
w; lgd^{d7} FRT40A; att 86 Fb lgd-P lgd DM14 2+4 KARR-HA/SM6a-TM6b	diese Arbeit
w; lgd^{d7} FRT40A; att 86 Fb lgd-P lgdΔDM 1-3 DM14 4 KARR-HA/ SM6a-TM6b	diese Arbeit
w; lgd^{d7} FRT40A; att 86 Fb lgd-P lgd DM14 2+4 DM14 2+4 KARR-HA/SM6a-TM6b	diese Arbeit
w; shrub$^{4-1}$ FRT G13; att 86 Fb lgd-P shrub-P myc-shrub D79K/ SM6a-TM6b	diese Arbeit
w; shrub$^{4-1}$ FRT G13; att 86 Fb lgd-P shrub-P myc-shrub E86K/ SM6a-TM6b	diese Arbeit
w; shrub$^{4-1}$ FRT G13; att 86 Fb lgd-P shrub-P myc-shrub R59E/ SM6a-TM6b	diese Arbeit
w; shrub$^{4-1}$ FRT G13; att 86 Fb lgd-P shrub-P myc-shrub R70E/ SM6a-TM6b	diese Arbeit
w; shrub$^{4-1}$ FRT G13; att 86 Fb lgd-P shrub-P myc-shrub D126R/ SM6a-TM6b	diese Arbeit
w; shrub$^{4-1}$ FRT G13; att 86 Fb lgd-P shrub-P myc-shrub D129R/ SM6a-TM6b	diese Arbeit
w; shrub$^{4-1}$ FRT G13; att 86 Fb lgd-P shrub-P myc-shrub D130R/ SM6a-TM6b	diese Arbeit
w; shrub$^{4-1}$ FRT G13; MKRS/SM6a-TM6b	Stammsammlung AG Klein
y w M{eGFP.vas.int.Dm}ZH2A; M{RFP.attP`}2H-86Fb	Bischof et al. (2007)

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Mutagenese PCR

Die Mutagenesen in dieser Arbeit wurden nach den Vorgaben des Kits QuickChange II Site-Directed Mutagenesis von Agilent Technologies durchgeführt. Die Primer (siehe 2.1.4), durch die die Mutationen eingeführt wurden, wurden nach den Angaben dieses

Protokolls entworfen. Der verwendete PCR Ansatz ist in Tabelle 2.1 zu sehen, das PCR Programm in Tabelle 2.2.

Tabelle 2.1: Mutagenese PCR Ansatz

5 µl	10 x Pfu Puffer
55 ng	methylierte Template DNA
125 ng	Forward Primer
125 ng	Reverse Primer
1 µl	dNTPs
auf 50 µl	dH_2O
1 µl	Pfu Polymerase

Tabelle 2.2: Mutagenese PCR Programm

1) 95 °C	30 s	initiale Denaturierung
2) 95 °C	30 s	Denaturierung
3) 55 °C	1 min	Primer-Hybridisierung
4) 68 °C	5 min	Elongation
Schritte 2) bis 4) 15-mal wiederholen		
5) 10 °C		Pause

Im Anschluss an die PCR wurde eine Restriktionsspaltung mit 0,75 µl DpnI für 60 min bei 37°C durchgeführt. Nach einer DNA Aufreinigung mit dem Kit Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit von Zymo Research, wurde die zirkuläre DNA in chemisch kompetente Bakterien transformiert. Für die Aufreinigung wurde wie folgt vorgegangen:

100 µl ADB Puffer zu 50 µl PCR Ansatz geben

1 min zentrifugieren bei 11.000 x g

2 x 200 µl Wash Buffer zugeben und 30 s bei 11.000 x g zentrifugiern

15 µl Elutionspuffer 1 min 11.000 x g

Tabelle 2.3: Übersicht über die mittels Mutagenese hergestellten Konstrukte und den dazugehörigen Ausgangsvektoren

Konstrukt	**Ausgangsvektor**
pattB lgdP lgdΔDM14 1-2 R368E-HA	*pattB lgdP lgdΔDM14 1-2-HA*
pattB lgdP lgdΔDM14 1-2 K380A-HA	*pattB lgdP lgdΔDM14 1-2-HA*
pattB lgdP lgdΔDM14 1-2 K380E-HA	*pattB lgdP lgdΔDM14 1-2-HA*
pattB lgdP lgdΔDM14 1-2 A388G-HA	*pattB lgdP lgdΔDM14 1-2-HA*
pattB lgdP lgdΔDM14 1-2 K387R-HA	*pattB lgdP lgdΔDM14 1-2-HA*
pattB lgdP lgdΔDM14 1-2 K387A-HA	*pattB lgdP lgdΔDM14 1-2-HA*
pattB lgdP lgdΔDM14 1-2 K387E-HA	*pattB lgdP lgdΔDM14 1-2-HA*
pattB lgdP lgdΔDM14 1-2 R389K-HA	*pattB lgdP lgdΔDM14 1-2-HA*
pattB lgdP lgdΔDM14 1-2 R389A-HA	*pattB lgdP lgdΔDM14 1-2-HA*
pattB lgdP lgdΔDM14 1-2 R389E-HA	*pattB lgdP lgdΔDM14 1-2-HA*
pattB lgdP lgdΔDM14 1-2 R390K-HA	*pattB lgdP lgdΔDM14 1-2-HA*
pattB lgdP lgdΔDM14 1-2 R390A-HA	*pattB lgdP lgdΔDM14 1-2-HA*
pattB lgdP lgdΔDM14 1-2 R390E-HA	*pattB lgdP lgdΔDM14 1-2-HA*
pattB lgdP lgdΔDM14 1-2 R393K-HA	*pattB lgdP lgdΔDM14 1-2-HA*
pattB lgdP lgdΔDM14 1-2 R393A-HA	*pattB lgdP lgdΔDM14 1-2-HA*
pattB lgdP lgdΔDM14 1-2 R393E-HA	*pattB lgdP lgdΔDM14 1-2-HA*
pattB lgdP lgdΔDM14 1-2 K396A-HA	*pattB lgdP lgdΔDM14 1-2-HA*
pattB lgdP lgdΔDM14 1-2 K396E-HA	*pattB lgdP lgdΔDM14 1-2-HA*
pattB lgdP lgdΔDM14 1-2 R393A, K396A-HA	*pattB lgdP lgdΔDM14 1-2-HA*
pattB lgdP lgdΔDM14 1-2 R393E, K396E-HA	*pattB lgdP lgdΔDM14 1-2-HA*
pattB lgdP lgdΔDM14 1-2 G408A-HA	*pattB lgdP lgdΔDM14 1-2-HA*
pattB lgdP lgdΔDM14 1-2 V418T-HA	*pattB lgdP lgdΔDM14 1-2-HA*
pattB lgdP lgdΔDM14 1-2 P417A, V418T-HA	*pattB lgdP lgdΔDM14 1-2-HA*
pattB shrubP myc-shrub R59E	*pattB shrubP myc-shrub*
pattB shrubP myc-shrub R70E	*pattB shrubP myc-shrub*
pattB shrubP myc-shrub D79K	*pattB shrubP myc-shrub*
pattB shrubP myc-shrub E86K	*pattB shrubP myc-shrub*
pattB shrubP myc-shrub D126R	*pattB shrubP myc-shrub*
pattB shrubP myc-shrub D129R	*pattB shrubP myc-shrub*
pattB shrubP myc-shrub D130R	*pattB shrubP myc-shrub*

Gibson-Fragment PCR

Fragmente für ein anschließendes Gibson Assembly wurden mittels Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (NEB) amplifiziert. Die PCR wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.2 Gibson Assembly

Mittels Gibson Assembly können mehrere DNA-Fragmente in einer gewünschten Reihenfolge in einer isothermalen *in vitro* Rekombination miteinander verbunden werden (Gibson et al., 2009). Die einzelnen DNA-Fragmente werden so gewählt, dass sie 32 Basenpaare (bp) Überhang zu den vorherigen und nachfolgenden Fragmenten besitzen (Abb. 2.1). Das Plasmid-Rückgrat wird mittels Restriktionsendonukleasen linearisiert. In einer einzigen Reaktion wirken dann eine 5'-Exonuklease, eine DNA-Polymerase und eine DNA-Ligase nacheinander, um einzelsträngige Überhänge zwischen den einzelnen DNA-Fragmenten zu erzeugen, nach der Anlagerung der homologen Bereiche die Lücken in dem neu gebildeten, zirkulären Plasmid zu schließen und die Fragmente abschließend zu verbinden.

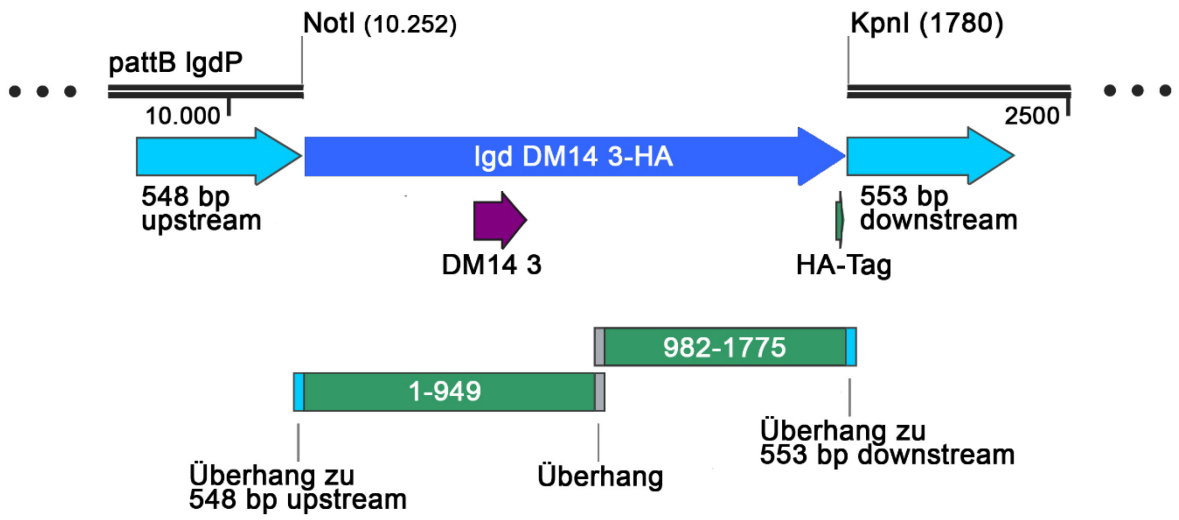


Abb. 2.1: Exemplarische, schematische Darstellung der Gibson-Fragmente und ihrer Überhänge zueinander für das Konstrukt *pattB lgdP lgd DM14 3-HA*. Das Insert wird aus zwei amplifizierten Fragmenten (grün) gebildet. Diese besitzen jeweils einen 32 bp Überhang zum Vektorrückgrat (cyan) und zu dem angrenzenden Fragment (grau). Das Vektorrückgrat wird durch eine Restriktionsspaltung mit NotI und KpnI linearisiert.

Die für die Gibson-Reaktion benötigten Konzentrationen der DNA-Fragmente können wie folgt berechnet werden.

$$\text{Masse Rückgrat [ng]} = \text{Größe Rückgrat [kbp]} \times 12$$

$$\text{Masse Insert [ng]} = \text{Masse Rückgrat [ng]} \times \frac{\text{Größe Insert [kbp]}}{\text{Größe Rückgrat [kbp]}} \times 8$$

Tabelle 2.4: Zusammensetzung der Gibson-Reaktion

x µl	Plasmid-Rückgrat
x µl	DNA-Fragment 1-n
auf 5 µl	dH_2O
15 µl	Gibson-Mix

Tabelle 2.5: Temperatur-Verlauf der Gibson-Reaktion

50 °C	60 min
RT	3 min
4°C	3 min

Für die Transformation chemisch kompetenter Bakterien wurden 5 µl der Gibson-Reaktion verwendet.

Tabelle 2.6: Übersicht der mittels Gibson Assembly hergestellten Konstrukte

Konstrukt	**Ausgangsvektor**
pattB lgdP lgd DM14 2+4-HA	*pattB lgdP lgd-HA*
pattB lgdP lgd DM14 1+3-HA	*pattB lgdP lgd-HA*
pattB lgdP lgd DM14 3-HA	*pattB lgdP lgdΔDM14 1-2-HA*
pattB lgdP lgdΔDM14 1-2 DM14 3-3-HA	*pattB lgdP lgdΔDM14 1-2-HA*
pattB lgdP lgd DM14 2+4 Δ aa 421-498	*pattB lgdP lgd DM14 2+4-HA*

2.2.3 Transformation chemisch kompetenter Bakterien

Die Transformation chemisch kompetenter Bakterien wurde nach dem folgenden Protokoll durchgeführt:

15 min Bakterien auf Eis auftauen
5 µl des Mutagenese PCR Produktes bzw. 20 µl des Ligationsansatzes hinzufügen
15 min Inkubation auf Eis
90 s Hitzeschock bei 42°C
2 min Inkubation auf Eis
900 µl LB Medium zu den Bakterien geben
60 min Inkubation bei 37°C, schütteln
1 min zentrifugieren bei 5.000 x g

Das Bakterienpellet wurde auf Ampicillin-haltige LB-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.4 Mini-Plasmid-Präparation

Für eine Mini-DNA-Präparation wurde zuvor eine 3 ml Bakterienkultur mit transformierten Bakterien in LB-Medium mit Ampicillin angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Präparation der Plasmid-DNA erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse:

1,5 ml Bakterien-Übernacht-Kultur 5 min bei 13.000 rpm zentrifugieren
300 µl Resuspensions-Puffer zum Pellet geben, Bakterien durch rütteln resuspendieren
300 µl Lysis-Puffer hinzugeben, fünf Mal invertieren und 5 min bei RT inkubieren
300 µl Neutralisations-Puffer hinzugeben, Probe zehnmal Mal invertieren und 5 min auf Eis inkubieren
20 min bei 13.000 rpm zentrifugieren
750 µl des Überstandes mit 500 µl Isopropanol versetzen und so die Plasmid-DNA fällen
30 min bei 13.000 rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen
500 µl 70 %-iges Ethanol zugeben, 15 min bei 13.000 rpm zentrifugieren und so die Plasmid-DNA waschen
Ethanol entfernen und Plasmid-DNA trocknen
Plasmid-DNA in 20 µl dH_2O lösen

Die Konzentration der Plasmid-DNA wurde bei anschließender Sequenzierung mittels NanoDrop™ bestimmt.

2.2.5 Midi-DNA Präparation

Für eine Midi-Plasmid-Präparation wurde zuvor eine 100 ml Bakterienkultur in LB-Medium mit Ampicillin mit 100 µl der Übernachtkultur für eine Mini-Plasmid-Präparation angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert.
Die Plasmid-Präparation wurde mit dem Kit NucleoBond® Xtra Midi von Macherey-Nagel durchgeführt. Die gewonnene Plasmid-DNA wurde in 50 µl dH_2O aufgenommen. Die Konzentration der Plasmid-DNA wurde mittels NanoDrop™ bestimmt.

2.2.6 Sequenzierung

Sequenzierungen wurden von Microsynth SeqLab, Göttingen durchgeführt.

2.2.7 Restriktionsspaltung

Tabelle 2.7: Ansatz für eine Kontroll-Restriktionsspaltung

2,5 µl	Plasmid-DNA
2 µl	Cut Smart Puffer
0.25 µl	KpnI HF
0.25 µl	NotI HF
15 µl	dH_2O

Tabelle 2.8: Ansatz für eine präparative Restriktionsspaltung

2 µg	Plasmid-DNA
2 µl	Cut Smart Puffer
1 µl	KpnI HF
1 µl	NotI HF
auf 20 µl	dH_2O

Die Restriktionsspaltung wurde über 60 min bei 37 °C durchgeführt.
Der Reaktionsansatz wurde mit 6x Ladepuffer versetzt und auf einem 0,8 %-igem Agarosegel aufgetrennt.

2.2.8 Gelextraktion

Für die DNA-Extraktion wurde das gewünschte DNA-Fragment aus dem Agarosegel herausgeschnitten und anschließend nach Angaben des Herstellers mit dem Kit Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit von Zymo Research extrahiert.

2.2.9 Ligation

Tabelle 2.9: Ligationsansatz

2 µl	T4 DNA Ligase
2 µl	T4 Puffer
1 µl	Vektor-DNA
6 µl	Insert-DNA
9 µl	dH_2O

Die Reaktion wurde über Nacht bei 18°C durchgeführt.

2.3 Genetische Methoden

2.3.1 Fliegenhaltung

Die Fliegen wurden in Kunststoff-Röhrchen gehalten, die bis zu einem Drittel mit Fliegenfutter-Medium gefüllt und mit einem Schaumstoffstopfen verschlossen sind. Stämme für die Sammlung von Jungfrauen wurden bei 18°C gehalten, Kreuzungen wurden bei 25°C kultiviert.

2.3.2 Erzeugung transgener Fliegen

Transgene Fliegen wurden nach dem Protokoll von Bachmann und Knust (2008) erzeugt. Damit alle Konstrukte am gleichen Insertionsort in der DNA integriert sind, wurden für die Injektion Fliegen mit der Insertionsstelle 86 Fb auf dem dritten Chromosom verwendet (Bischof et al., 2007).

Tabelle 2.10: Injektionsmix

400 ng/µl	Plasmid-DNA
1 µl	2 % Phenolrot
1 µl	Injektionspuffer
auf 10 µl	dH_2O

Der Injektionsmix wurde 30 min bei 13.000 rpm zentrifugiert.

Die Plasmid-DNA wurde in 30 min alte, dechorionisierte Embryonen in das posteriore Ende injiziert. An dieser Stelle entstehen die Polzellen, die Vorläufer der Keimbahn. In diesem Entwicklungsstadium besteht der Embryo aus einem synzytialen Blastoderm, somit kann die eingeführte Plasmid-DNA vor der Zellularisierung in den Zellkern gelangen. Hier vermittelt die ϕC31-Integrase zwischen der attB-Sequenz im Plasmid und der attP-Insertionsstelle in der genomischen DNA Rekombination (Bischof et al., 2007). Die Injektionen wurden von Sylvia Tannebaum durchgeführt.
Nachdem sich die injizierten Embryonen zu Adulten entwickelt haben, wurden diese gegen Multibalancer (MB) gekreuzt. Da mit dem injizierten Plasmid ein wildtypisches *white*-Gen in die genomische DNA integriert wird, können in der F1-Generation die transgenen Fliegen anhand roter Augenfarbe erkannt werden.
Ein Teil der Injektionen wurde durch BestGene Inc, Chino Hills, CA, USA durchgeführt.

2.3.3 Rettungsexperiment

Die in dieser Arbeit erzeugten Konstrukte wurden in Rettungsexperimenten analysiert. Hierzu wurde eine Kopie der Transgene im null-mutanten Hintergrund exprimiert. Die unter dem endogenen Promotor exprimierten Transgene wurden darauf überprüft, ob sie den Verlust des endogenen Proteins kompensieren und dessen Funktion übernehmen können. Der endogene *lgd*-Promotor setzt sich aus 548 bp upstream des Translations-Starts und 553 bp downstream zusammen (Troost et al., 2012), der *shrub*-Promotor aus je 510 bp up- und downstream (McMillan et al., 2016).

2.3.4 Eiablagen – Shrub

Um zu überprüfen, bis zu welchem Stadium sich die Fliegen entwickeln, die im $shrub^{4\text{-}1}$ null-mutanten Hintergrund mit transgenen Shrub-Varianten gerettet werden, wurden

Eiablagen der entsprechenden Stämme bzw. Kreuzungen durchgeführt (siehe 3.5). Diese sind über den Doppel-Balancer SM6a-TM6b balanciert. Die falschen Genotypen sind mit dem Tubby (Tb)-Marker (TM6b) gekennzeichnet (*w; shrub$^{4-1}$/Transgen; SM6a-TM6b* bzw. *w; shrub$^{4-1}$/MKRS; SM6a-TM6b*). Tb ist anhand des gedrungenen Aussehens der Larven zu erkennen. Den zu überprüfenden Genotypen fehlt dieser Marker (*w; shrub$^{4-1}$/shrub$^{4-1}$; Transgen/Transgen* bzw. *w; shrub$^{4-1}$/shrub$^{4-1}$; Transgen/MKRS*).
Die Kreuzungen wurden in Flugkäfige gesetzt, die auf Apfelsaft-Agar-Platten, mit einem Klecks Bäckerhefe, befestigt wurden. Mit Hilfe eines Binokulars konnte das Entwicklungsstadium der über Nacht auf die Apfelsaft-Agar-Platten abgelegten und sich entwickelnden Eier an den folgenden Tagen bestimmt werden. Da erst ab dem dritten Larvenstadium ein klarer Unterschied zwischen Larven mit dem Tb-Marker und denen ohne erkannt werden kann, kann erst ab dem frühen dritten Larvenstadium eine Aussage über eine erfolgte Rettung getroffen werden.

2.3.5 Indirekte Antikörper-Färbung an Flügelimaginalscheiben

Für eine Antikörperfärbung an Flügelimaginalscheiben wurden L3-Larven des gewünschten Genotyps in 1xPBS präpariert. Hierfür wurden die Vorderhälften der L3-Larven umgestülpt und in einem Sieb in einer 24-Well-Platte gesammelt. Anschließend wurde folgendes Protokoll durchgeführt. Wenn keine Angaben gemacht sind, wurden die Inkubations-Schritte bei Raumtemperatur durchgeführt.

500 µl 4 % Paraformaldehyd für 30 min zugeben, um das Gewebe zu fixieren
3 x 10 min in 0,3 % PBT waschen
500 µl 5 % NGS in PBT zugeben und für 1h blockieren der unspezifischen Bindestellen für die Antikörper
500 µl 5 % NGS in PBT mit primärem Antikörper (siehe 2.1.6) zugeben und über Nacht bei 4°C inkubieren
3 x15 min in 0,3% PBT waschen
500 µl 5 % NGS in PBT mit sekundärem Antikörper (siehe 2.1.6) zugeben und für 60 min inkubieren
10 min in 0,3 % PBT waschen
4 min Inkubation mit Hoechst (1:10.000) in 0,3 % PBT, um die Zellkerne anzufärben
2 x 10 min in 0,3 % PBT waschen

Die Imaginalscheiben wurden in 1 x PBS abpräpariert und in VECTASHIELD® für die Mikroskopie auf Objektträgern eingebettet.

2.3.6 Der Notch-Reporter Gbe+Su(H)

Das Gbe+Su(H) Reportergen-Konstrukt kann genutzt werden, um die Aktivität des Notch-Signalweges zu untersuchen (Abb. 2.2) (Furriols und Bray, 2001). Dieses synthetische Konstrukt ist aus drei Grainyhead (Grh) Bindeelementen (Gbe) (Abb. 2.2 lila), zwei Suppressor of Hairless (Su(H)) Bindestellen (Abb. 2.2, orange), einem *hsp70*-Minimalpromotor (Abb. 2.2, rot) und einem Reportergen, hier *lacZ* (Abb. 2.2, blau-grün), aufgebaut. Der in Imaginalscheiben ubiquitär exprimierte Transkriptionsfaktor Grh bindet an die Gbe. Su(H) dient wie im Notch-Signalweg als molekularer Schalter. In Abwesenheit der intrazellulären Domäne des Notch-Rezeptors (NICD) binden Co-Repressoren (CoR) an Su(H) und die Expression des Reportergens wird verhindert (Abb. 2.2 A). Bei der Aktivierung des Notch-Signalweges wird NICD frei, transloziert in den Zellkern und bindet dort an Su(H). Zusammen mit Mastermind (Mam) und Co-Aktivatoren (CoA) wird die Expression des *lacZ* Reportergens aktiviert, welche durch die Anwesenheit von Grh zusätzlich verstärkt wird (Abb. 2.2 B). β-Galactosidase (β-Gal) wird gebildet und kann in einer Antikörperfärbung nachgewiesen werden.

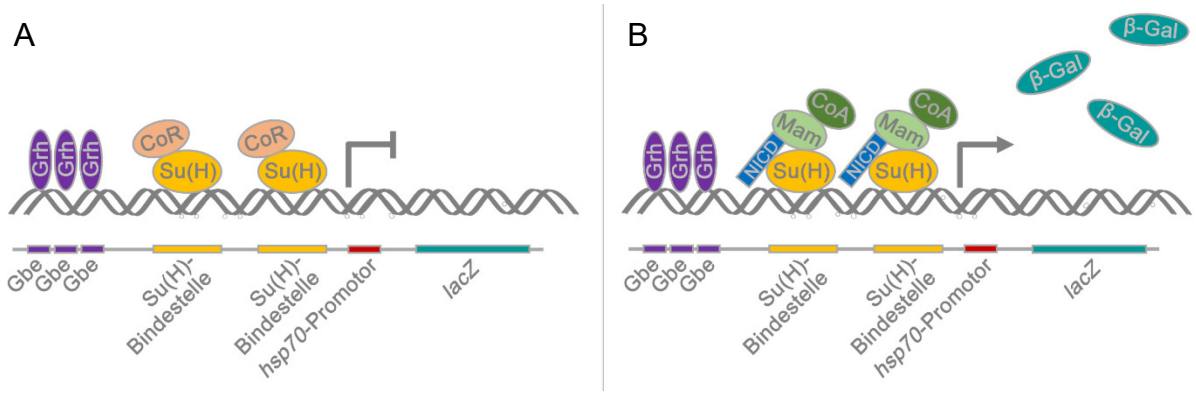


Abb. 2.2: Schematische Darstellung des Reportergen-Konstruktes Gbe+Su(H). Drei aufeinander folgende Grainyhead (Grh) Bindeelemente (Gbe) (lila) gefolgt von zwei Supressor of Hairless (Su(H)) Bindestellen (orange) bilden zusammen mit einem *hsp70*-Minimalpromotor (rot) und einem Reportergen, hier *lacZ* (blau-grün), das Reportergen-Konstukt Gbe+Su(H). Der ubiquitär exprimierte Transkriptionsfaktor Grh bindet an Gbe und fördert die Transkription des Reportergens. Binden an Su(H) Co-Repressoren (CoR), wird die Expression von *lacZ* verhindert. Wird hingegen der Notch-Signalweg aktiviert, bindet die intrazelluläre Domäne von Notch (NICD) an Su(H) und zusammen mit Mastermind (Mam) und Co-Aktivatoren (CoA) wird die Expression des Reportergens *lacZ* aktiviert. Das Genprodukt β-Galactosidase (β-Gal) kann mittels Antikörperfärbung im Gewebe nachgewiesen werden.

3 Ergebnisse

3.1 Analyse von Lgd-Deletionskonstrukten – Unterschiede zwischen den geradzahligen und ungeradzahligen DM14 Domänen

Der Tumorsuppressor Lethal (2) giant discs (Lgd) ist ein Protein, welches aus vier N-terminalen aufeinander folgenden DM14 (*Drosophila melanogaster* 14) Domänen und einer C-terminalen C2 Domäne besteht (Ponting et al., 2001, Childress et al., 2006, Gallagher und Knoblich, 2006, Jaekel und Klein, 2006). Die DM14 Domänen vermitteln die Interaktion von Lgd mit der ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) –III Untereinheit Shrub und sind für die vollständige Funktion von Lgd essentiell (Troost et al., 2012).

Der Vergleich aller vier DM14 Domänen von Lgd zeigt eine größere Sequenz-Identität zwischen den ungeradzahligen DM14 Domänen DM14 1 und DM14 3 (44 %), als zwischen diesen und den geradzahligen Domänen DM14 2 und DM14 4 (23-25 %, Tabelle 3.1). Die Sequenz-Identität beschreibt, in welchem Ausmaß zwei Aminosäuresequenzen an den gleichen Positionen dieselben Aminosäuren besitzen. Die beiden ungeradzahligen DM14 Domänen sind sich somit am ähnlichsten.

Tabelle 3.1: Übersicht über die Sequenz-Identitäten zwischen den einzelnen DM14 Domänen von *Drosophila* Lgd. Die Sequenz-Identitäten wurden mit EMBOSS Needle berechnet.

	DM14 1	DM14 2	DM14 3	DM14 4
DM14 1	-	23.7%	44.3%	23.0%
DM14 2	23.7%	-	25.4%	37.3%
DM14 3	44.3%	25.4%	-	25.4%
DM14 4	23.0%	37.3%	25.4%	-

Die große Ähnlichkeit zwischen den ungeradzahligen DM14 Domänen könnte auf eine wichtige Rolle für die Lgd Funktion hinweisen. Um den Unterschied zwischen den geradzahligen und ungeradzahligen DM14 Domänen in Bezug auf die Lgd Funktion und damit die Interaktion mit Shrub genauer zu untersuchen, wurden Lgd-Deletionskonstrukte analysiert (Abb. 3.1). Es wurden Konstrukte untersucht, welche nur die ungeradzahligen (Lgd DM14 1+3) bzw. nur die geradzahligen DM14 Domänen (Lgd DM14 2+4) besitzen. Lgd-Deletionskonstrukte, die neben der C2 Domäne nur die erste (Lgd

DM14 1) oder die dritte DM14 Domäne (Lgd DM14 3) beinhalten, wurden ebenfalls analysiert. Als Kontrollen dienen das vollständige Lgd-Transgen mit einem C-terminalen HA-Tag (Lgd-HA) und die Deletionskonstrukte denen entweder die ersten beiden (LgdΔDM14 1-2), die ersten drei (LgdΔDM14 1-3) oder alle DM14 Domänen (LgdΔDM14) fehlen (Troost et al., 2012).

Alle untersuchten Lgd-Konstrukte wurden unter dem endogenen *lgd*-Promotor exprimiert (siehe 2.3.3) und wurden an die gleiche Stelle im *Drosophila* Genom integriert (86Fb) (Bischof et al., 2007). Alle Konstrukte besitzen den N-terminal der ersten DM14 Domäne gelegenen Bereich sowie den Bereich zwischen der DM14 4 und der C2 Domäne, wie auch die C2 Domäne selbst. Alle Transgene besitzen einen C-terminalen HA-Tag (Abb. 3.1).

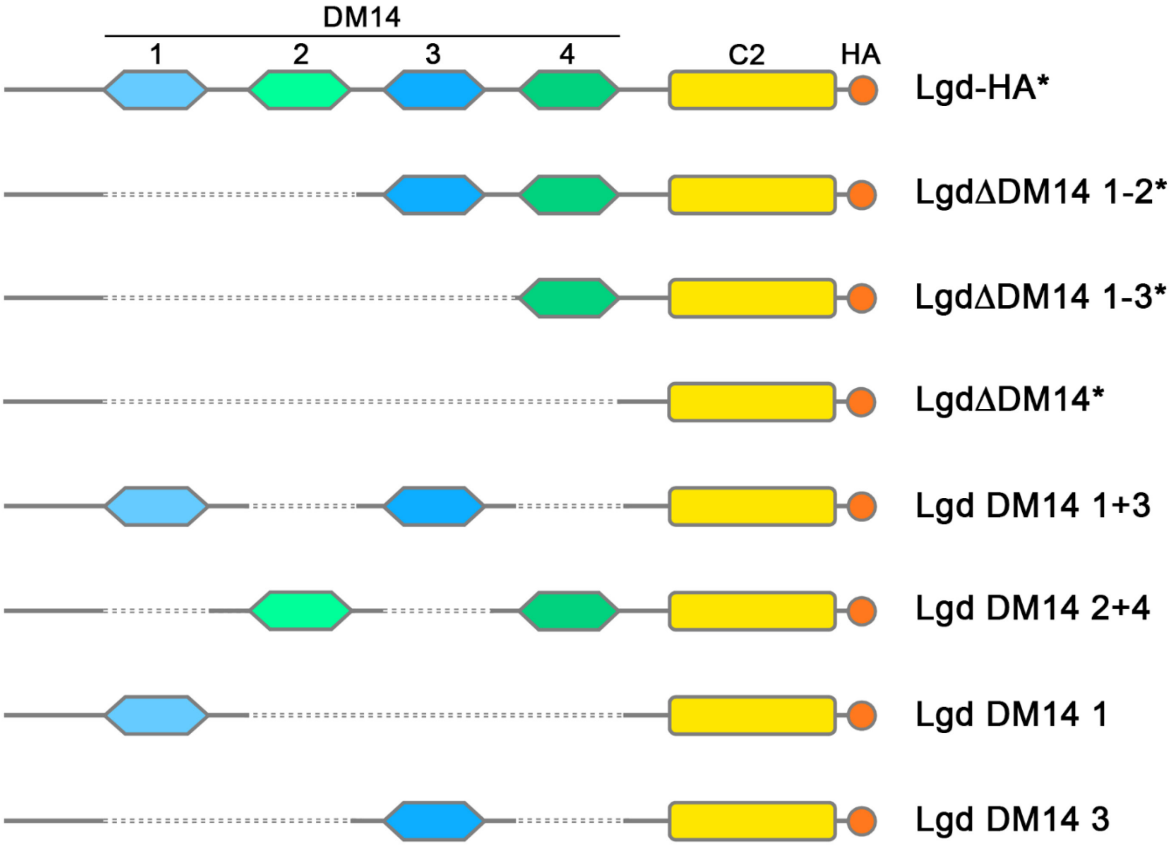


Abb. 3.1: Graphische Darstellung der analysierten Lgd-Deletionskonstrukte. Die ungeradzahligen DM14 Domänen sind in blau, die geradzahligen Domänen in grün dargestellt. Die C2-Domäne ist in gelb, der HA-Tag in orange gezeigt. Die mit einem Stern markierten Konstrukte wurde bereits in Troost et al. (2012) publiziert und dienen als Kontrollen. (Bereits veröffentlicht in McMillan et al., 2017).

Mit Hilfe von Rettungsexperimenten sollte analysiert werden, inwieweit die Lgd-Deletionskonstrukte die Funktion des endogenen Lgds ersetzen können (siehe 2.3.3).

Hierzu wurden die Konstrukte in einem *lgd* null-mutanten Hintergrund (lgd^{d7}/lgd^{d7}) exprimiert.

Der Verlust von Lgd führt zur ektopischen Aktivierung des Notch Signalweges (Klein, 2003). Dies kann anhand der Expression von *wingless* (*wg*), einem endogenen Zielgen des Notch Signalweges, gezeigt werden. In wildtypischen Flügelimaginalscheiben kann die Expression des Wg Proteins mittels indirekter Antikörperfärbung entlang der dorso-ventralen Grenze (D/V-Grenze) nachgewiesen werden (Pfeil Abb. 3.2 A). Des Weiteren ist Wg in zwei Kreisen, die das Flügelfeld einrahmen, exprimiert (Pfeilkopf Abb. 3.2 A). Diese Expressionsdomäne ist, wie die Expression im Notum der Flügelimaginalscheibe (Stern Abb. 3.2 A), allerdings nicht abhängig vom Notch Signalweg (Klein, 2001). In Imaginal-scheiben, die null-mutant für *lgd* sind, ist neben der Überproliferation des gesamten Gewebes eine deutliche Verbreiterung der Wg-Expressionsdomäne an der D/V-Grenze zu erkennen (Pfeile Abb. 3.2 B) (Bryant und Schubiger, 1971, Buratovich und Bryant, 1995). Neben der Analyse eines endogenen Zielgens, wurde auch ein Reportergenkonstrukt für die Aktivität des Notch-Signalweges, Gbe+Su(H) (siehe 2.3.6), untersucht (Furriols und Bray, 2001). Im Wildtyp ist ein charakteristisches Expressionsmuster des Notch-Reporters zu erkennen, mit einer starken Expression entlang der D/V-Grenze (Pfeil Abb. 3.2 A^{I}). Bei dem Verlust von *lgd* kommt es zu einer ubiquitären Expression von Gbe+Su(H) in jeder Zelle der Flügelimaginalscheibe und ein distinktes Expressionsmuster ist nicht zu erkennen (Abb. 3.2 B^{I}) (Jaekel und Klein, 2006). Eine verstärkte Expression des Reporters an der D/V-Grenze ist je nach Alter der Flügelimaginalscheibe sichtbar (Pfeil Abb. 3.2 B^{I}). Sind die Fliegen *lgd*-mutant, entwickeln sie sich nur bis ins Puppenstadium und sterben.

Der Hintergrund für die Rettungsexperimente kann sensitiviert werden, indem zusätzlich zum Verlust von *lgd* eine Kopie des endogenen *shrub* Gens mutiert wird. Ohne die Expression eines Transgens sterben Tiere dieses Genotyps bereits im frühen dritten Larvenstadium (Diplomarbeit Ohlenhard, 2011, Troost et al., 2012).

Frühere Studien haben gezeigt, dass das endogene Lgd durch ein vollständiges Transgen (*lgdP lgd-HA*), welches unter dem endogenen *lgd*-Promotor exprimiert wird, ersetzt werden kann (Troost et al., 2012). Die Expression einer Kopie dieses Transgens im *lgd* null-mutanten Hintergrund kann den *lgd*-Ausfallphänotyp vollständig unterdrücken. Sowohl das endogene Zielgen des Notch Signalweges *wg* als auch der sensitive Notch-Reporter Gbe+Su(H) sehen wildtypisch aus (vgl. Abb. 3.2 C, C^{I} und A, A^{I}). Auch im

sensitivierten Hintergrund, reicht eine Kopie von Lgd-HA aus, um den Verlust von Lgd zu retten (Abb. 3.2 D, D^{I}). Auch die Letalität der Fliegen wird durch dieses Transgen gerettet. Ein Lgd-Deletionskonstrukt, dem die ersten beiden DM14 Domänen fehlen (*lgdP lgdΔDM14 1-2-HA*), reicht ebenfalls aus, um den Verlust von endogenem Lgd vollständig zu retten (Abb. 3.2 E, E^{I}) (Troost et al., 2012). Im sensitivierten Hintergrund hingegen, ist das Rettungsvermögen des Konstruktes nicht ausreichend, um den Ausfallphänotyp vollständig zu unterdrücken. So ist neben der Überproliferation des Gewebes in der Antikörperfärbung gegen Wg eine Verbreiterung der Expressionsdomäne entlang der D/V-Grenze zu erkennen (vgl. Abb. 3.2 F und A). Die ektopische Aktivierung ist allerdings deutlich geringer als bei dem Verlust von Lgd (vgl. Abb. 3.2 F und B). Der Notch-Reporter Gbe+Su(H) zeigt, dass der Notch-Signalweg in jeder Zelle der Flügelimaginalscheibe aktiv ist, vergleichbar mit dem Verlust von Lgd (vgl. Abb. 3.2 F^{I} und B^{I}) (Diplomarbeit Ohlenhard, 2011). Im sensitivierten Hintergrund sterben die Fliegen im Puppenstadium.
Besitzt das Rettungskonstrukt nur die vierte DM14 Domäne und die C2 Domäne, reicht es nicht aus, um den *lgd*-mutanten Hintergrund zu retten (*lgdP lgdΔDM14 1-3-HA*) (Troost et al., 2012). Die Imaginalscheiben sind überproliferiert und in der Wg-Färbung ist eine leichte Verbreiterung der D/V-Grenze nach dorsal und ventral zu erkennen (Abb. 3.2 G). Ebenso zeigt der Notch-Reporter Gbe+Su(H) die Aktivität des Notch Signalweges in jeder Zelle der Flügelimaginalscheibe an (Abb. 3.2 G^{I}).
Ein Lgd-Deletionskonstrukt ohne DM14 Domänen ist ebenfalls nicht in der Lage den Verlust von Lgd auszugleichen (*lgdP lgdΔDM14-HA*) (Troost et al., 2012). Es kommt zu einer Überproliferation des Gewebes. Entlang der D/V-Grenze ist eine ektopische Expression von Wg zu beobachten (Abb. 3.3 H). Der Notch-Reporter Gbe+Su(H) ist in jeder Zelle der Imaginalscheibe aktiviert (Abb. 3.3 H^{I}). Die Letalität kann ebenfalls nicht gerettet werden.

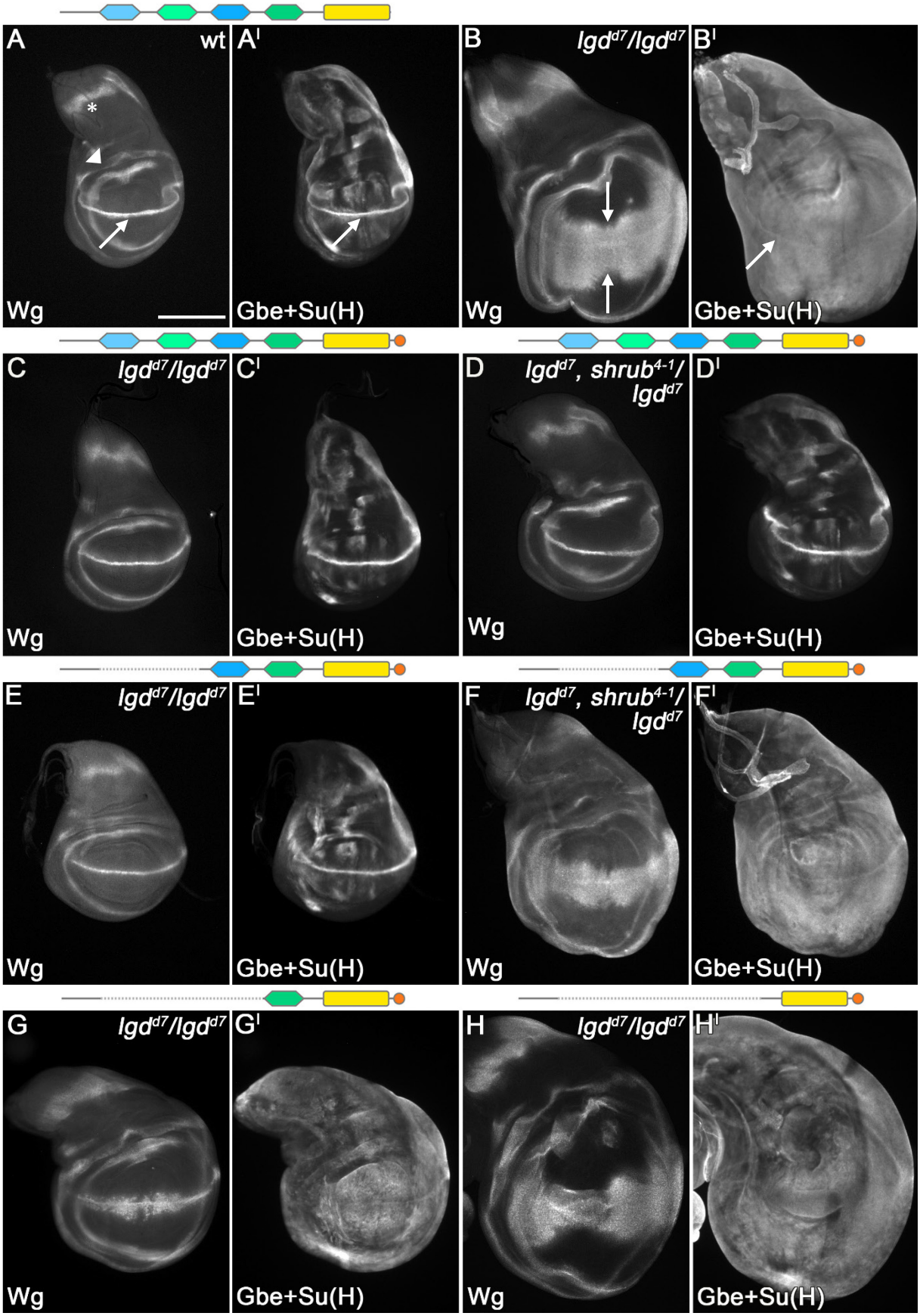

A
wt
A'
B
lgd^d7/lgd^d7
B'
Wg
Gbe+Su(H)
Wg
Gbe+Su(H)
C
lgd^d7/lgd^d7
C'
D
lgd^d7, shrub^4-1/ lgd^d7
D'
Wg
Gbe+Su(H)
Wg
Gbe+Su(H)
E
lgd^d7/lgd^d7
E'
F
lgd^d7, shrub^4-1/ lgd^d7
F'
Wg
Gbe+Su(H)
Wg
Gbe+Su(H)
G
lgd^d7/lgd^d7
G'
H
lgd^d7/lgd^d7
H'
Wg
Gbe+Su(H)
Wg
Gbe+Su(H)

Abb. 3.2: Rettung des *lgd* null-mutanten (*lgd*^{d7}/*lgd*^{d7}) bzw. sensitivierten (*lgd*^{d7}, *shrub*$^{4-1}$/*lgd*^{d7}) Hintergrundes mit einem vollständigen Lgd-Transgen und Lgd-Deletionskonstrukten. Die Expression des endogenen Notch-Zielgens *wg* wird mittels Antikörperfärbung gegen Wg dargestellt (A-H). Die Notch-Aktivität wird zusätzlich mit Hilfe des Notch-Reporters Gbe+Su(H) gezeigt (A^I-H^I). In A und A^I ist eine wildtypische Imaginalscheibe abgebildet, die Pfeile deuten auf die Expressionsdomänen an der D/V-Grenze. In A markieren Pfeilkopf und Stern die Notch-unabhängige Expressionsdomänen von Wg. In B und B^I ist der *lgd* null-mutante Phänotyp zu erkennen. Die Pfeile in B zeigen die verbreiterte Expressionsdomäne von Wg an, der Pfeil in D^I hebt die Expression an der D/V-Grenze hervor. C und C^I zeigen die Rettung des *lgd* null-mutanten Hintergrundes mit einem vollständigen Lgd-Transgen (Lgd-HA), D und D^I die Rettung des sensitivierten Hintergrundes mit dem gleichen Konstrukt. In E/E^I und F/F^I sind Rettungen des Verlustes von endogenem Lgd bzw. diesem und dem zusätzlichen Verlust von einer Kopie *shrub* mit dem Lgd-Deletionskonstrukt LgdΔDM14 1-2 zu sehen. G und G^I zeigen die Rettung des *lgd* null-mutanten Hintergrundes mit LgdΔDM14 1-3. In H und H^I ist der Verlust von Lgd gerettet mit LgdΔDM14 zu sehen. Die zur Rettung verwendeten Konstrukte sind jeweils über den Teilabbildungen graphisch dargestellt (siehe Abb. 3.1). Die Flügelimaginalscheiben sind so orientiert, dass anterior links und dorsal oben ist. Der Maßstabsbalken in A entspricht 200 µm. Alle Imaginalscheiben wurden bei der gleichen Vergrößerung aufgenommen.

Wie LgdΔDM14 1-2 kann auch das Lgd-Deletionskonstrukt, in dem die geradzahligen DM14 Domänen fehlen (*lgdP lgd DM14 1+3-HA*), den *lgd*-null-mutanten Hintergrund retten. Sowohl die Färbung gegen Wg als auch der sensitive Notch-Reporter Gbe+Su(H) zeigen eine wildtypische Expression (vgl. Abb. 3.3 A, A^{I} und Abb. 3.2 A, A^{I}). Selbst im sensitivierten Hintergrund kann dieses Deletionskonstrukt vollständig retten. Ein Unterschied in den Expressionsmustern von Wg und Gbe+Su(H) im Vergleich zur wildtypischen Situation ist nicht zu erkennen (vgl. Abb. 3.3 B, B^{I} und Abb. 3.2 A, A^{I}) (bereits veröffentlicht in McMillan et al., 2017). Die Fliegen dieses Rettungsexperiment entwickeln sich zu Adulten.

Im Gegensatz dazu ist das Konstrukt Lgd DM14 2+4, welchem die ungeradzahligen DM14 Domänen fehlen, nicht in der Lage den Verlust von Lgd zu kompensieren. Der beobachtete Phänotyp ähnelt dem, der Rettung durch LgdΔDM14 1-3 (vgl. Abb. 3.3 C, C^{I} und Abb. 3.2 G, G^{I}). Die Wg-Expressionsdomäne ist deutlich verbreitert (Pfeile Abb. 3.3 C) und eine Aktivität des Notch-Reportergens ist in jeder Zelle der Flügelimaginalscheibe detektierbar (Abb. 3.3 C^{I}). Eine Rettung der puppalen Letalität ist nicht möglich. Die Fliegen sterben wie bei dem vollständigen Verlust von Lgd als Puppe. Bei der Rettung des sensitivierten Hintergrundes mit diesem Deletionskonstrukt können die Larven das späte dritte Larvenstadium nicht erreichen und konnten somit nicht vergleichend analysiert werden (Abb. 3.3 D, D^{I}) (bereits veröffentlicht in McMillan et al., 2017).

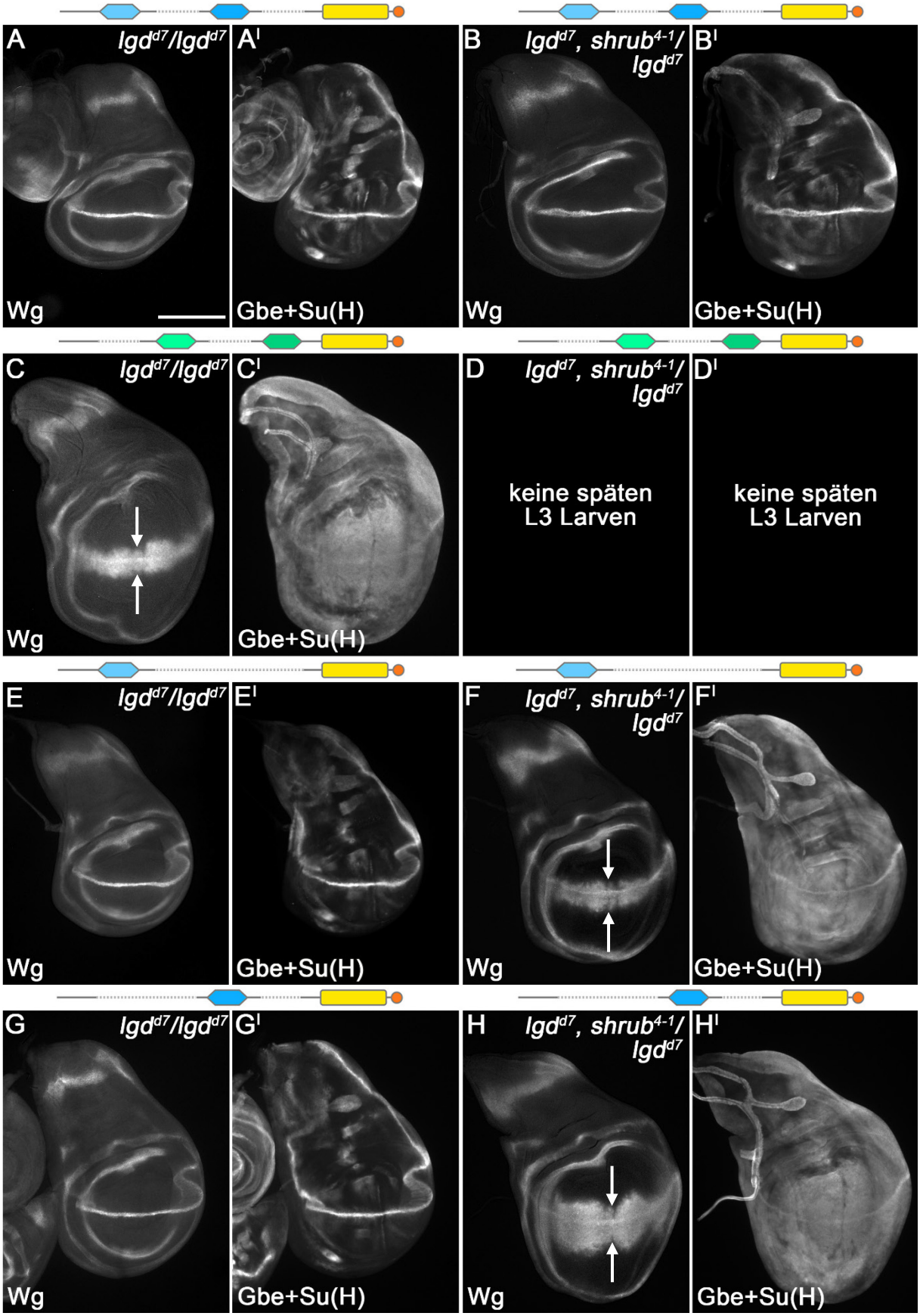

A
lgd^d7/lgd^d7
Wg
A'
Gbe+Su(H)
B
lgd^d7, shrub^4-1/ lgd^d7
Wg
B'
Gbe+Su(H)
C
lgd^d7/lgd^d7
Wg
C'
Gbe+Su(H)
D
lgd^d7, shrub^4-1/ lgd^d7
keine späten L3 Larven
D'
keine späten L3 Larven
E
lgd^d7/lgd^d7
Wg
E'
Gbe+Su(H)
F
lgd^d7, shrub^4-1/ lgd^d7
Wg
F'
Gbe+Su(H)
G
lgd^d7/lgd^d7
Wg
G'
Gbe+Su(H)
H
lgd^d7, shrub^4-1/ lgd^d7
Wg
H'
Gbe+Su(H)

Abb. 3.3 Rettung des *lgd* null-mutanten (A, C, E, G) und sensitivierten (B, D, F, H) Hintergrundes mit Lgd-Deletionskonstrukten (bereits veröffentlicht in McMillan et al., 2017). Die Aktivität des Notch-Signalweges wird mit Hilfe einer Antikörperfärbung gegen Wg dargestellt (A-H). *wg* ist ein endogenes Zielgen des Signalweges. Zusätzlich wird die Notch-Aktivität mittels des Notch-Reporters Gbe+Su(H) gezeigt (A^I-H^I). In A bis B^I sind Rettungen mit dem Konstrukt Lgd DM14 1+3 zu sehen. C bis D^I zeigen Rettungen mit Lgd DM14 2+4. Die Pfeile in C heben die verbreiterte Expression von Wg an der D/V-Grenze hervor. Bei der Rettung des sensitivierten Hintergrundes (D, D^I) wurden keine L3-Larven erhalten. In E bis F^I sind Rettungen mit dem Lgd-Deletionskonstrukt Lgd DM14 1 zu erkennen. Die Pfeile in F zeigen die ektopische Expression von Wg an. In G bis H^I sind die Rettungen mit Lgd DM14 3 zu sehen. Die Pfeile in H heben die verbreiterte Wg-Expressionsdomäne hervor. Die zur Rettung verwendeten Konstrukte sind jeweils über den Teilabbildungen graphisch dargestellt (siehe Abb. 3.1). Die Flügelimaginalscheiben sind so orientiert, dass anterior links und dorsal oben ist. Der Maßstabsbalken in A entspricht 200 µm. Alle Imaginalscheiben wurden bei der gleichen Vergrößerung aufgenommen.

Um zu überprüfen, ob das fehlende Rettungsvermögen von Lgd DM14 2+4 im Zusammenhang mit einem zu großen Abstand zwischen den DM14 Domänen steht, wurde ein Deletionskonstrukt analysiert, welches zwischen der zweiten und vierten DM14 Domäne nur 43 Aminosäuren (*lgdP lgd DM14 2+4 Δ aa 421-498-HA*) statt 121 Aminosäuren (*lgdP lgd DM14 2+4-HA*) Lgd DM14 2+4 besitzt (Abb. 3.4 A). In Lgd DM14 2+4 wurden ausschließlich die DM14 Domänen 1 und 3 deletiert. In dem Konstrukt Lgd DM14 2+4 Δ aa 421-498 wurden zusätzlich die Aminosäuren, die im vollständigen Lgd Protein zwischen der dritten und vierten DM14 Domäne liegen, deletiert, um einen Abstand zwischen den Domänen zu erhalten, der vergleichbar mit dem im endogenen Lgd Protein ist. Es ist zu erkennen, dass eine Reduktion des Abstandes zwischen den DM14 Domänen keine Auswirkungen auf das Rettungsvermögen hat. So ist noch immer eine Verbreiterung der Wg-Expressionsdomäne und eine Aktivierung des Notch-Reporters Gbe+Su(H) in jeder Zelle der Flügelimaginalscheibe zu erkennen (Abb. 3.4 B und B^I).

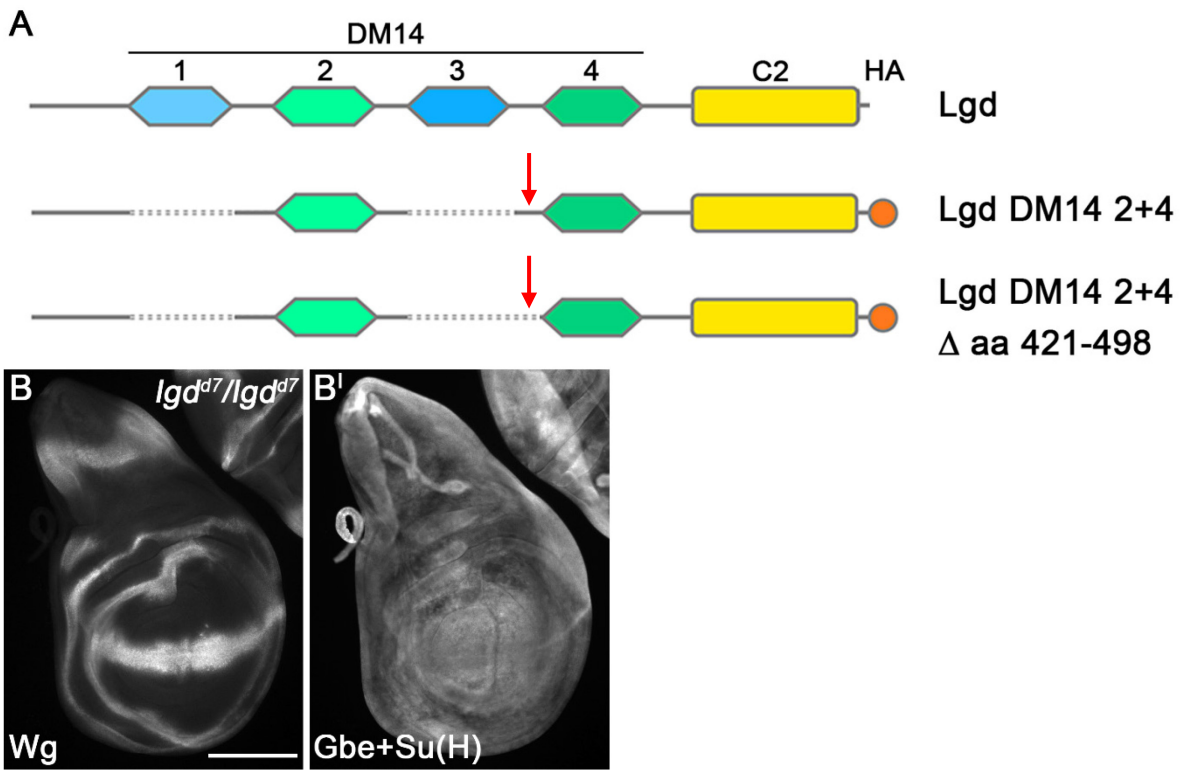


Abb. 3.4: A – Schematische Darstellung des Lgd-Deletionskonstruktes Lgd DM14 2+4 Δ aa 421-498 und seiner Ausgangskonstrukte. Die roten Pfeile heben den Unterschied zwischen den Deletionskonstrukten hervor. B – Rettung des *lgd* null-mutanten Hintergrundes mit Lgd DM14 2+4 Δ aa 421-498. Die Aktivität des Notch-Signalweges ist mit Hilfe einer Antikörperfärbung gegen Wg (B) und des Notch-Reporters Gbe+Su(H) (B^{I}) zu sehen. Die Flügelimaginalscheibe ist so orientiert, dass anterior links und dorsal oben ist. Der Maßstabsbalken in B entspricht 200 µm.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die ungeradzahligen DM14 Domänen in Lgd für die Funktion des Proteins essentiell sind. Im Gegensatz dazu scheinen die geradzahligen Domänen entbehrlich zu sein. Vorherige Untersuchungen konnten zeigen, dass weder die zweite noch die vierte DM14 Domäne von Lgd alleine (Abb. 3.2 G, G^{I}) in der Lage ist, den *lgd*-null-mutanten Phänotyp zu retten (Troost et al., 2012, Dissertation Troost, 2013).

Um zu untersuchen, ob eine einzelne ungeradzahlige DM14 Domäne ausreicht, um die Funktionalität von Lgd aufrechtzuerhalten, wurden Lgd-Deletionskonstrukt hergestellt, die neben der C2 Domäne entweder nur die erste (*lgdP lgd DM14 1-HA*, hergestellt von Marcel Helle (2017)) oder die dritte DM14 Domäne (*lgdP lgd DM14 3-HA*) beinhalten (Abb. 3.1).

Die Expression von Lgd DM14 1 im *lgd* null-mutanten Hintergrund kann die Lgd Funktion wiederherstellen. Sowohl die Färbung gegen Wg als auch der Notch-Reporter Gbe+Su(H) zeigen ein wildtypisches Expressionsmuster (vgl. Abb. 3.3 E, E^{I} und Abb. 3.2 A, A^{I}). Die

Rettung mit diesem Konstrukt reicht aus, damit sich Adulte entwickeln können. Im sensitivierten Hintergrund kann dieses Konstrukt im Gegensatz zum vollständigen Lgd-Tansgen (*lgdP lgd-HA*) oder dem mit zwei ungeraden DM14 Domänen (*lgdP lgd DM14 1+3-HA*) nicht vollständig retten. Das beobachtete Rettungsvermögen ähnelt dem von LgdΔDM14 1-2 im sensitivierten Hintergrund (vgl. Abb. 3.3 F, F^{I} und Abb. 3.2 F, F^{I}). Die Expressionsdomäne von Wg ist an der D/V-Grenze verbreitert (Pfeile Abb. 3.3 F) und auch die Aktivität des Notch-Reporters ist verstärkt, so ist in jeder Zelle der Imaginalscheibe Notch Aktivität zu beobachten (Abb. 3.3 F, F^{I}). Die Fliegen aus dieser Rettung sterben im Puppenstadium.

Ein ähnliches Rettungsvermögen ist für ein Lgd-Konstrukt zu beobachten, in dem als einzige DM14 Domäne die dritte vorhanden ist (*lgdP lgd DM14 3-HA*). Die *lgd* null-mutante Situation kann dieses Konstrukt vollständig retten (vgl. Abb. 3.3 G, G^{I} und Abb. 3.2 A, A^{I}). Wie Lgd DM14 1 kann auch Lgd DM14 3 den sensitivierten Hintergrund nicht vollständig retten und eine verbreiterte Wg-Expressionsdomäne und eine Aktivität von Gbe+Su(H) in jeder Zelle der Flügelimaginalscheibe kann festgestellt werden (Abb. 3.3 H Pfeile, H^{I}) (bereits veröffentlicht in McMillan et al., 2017). Das Notch-Zielgen *wg* ist hier etwas stärker aktiviert, als bei der Rettung mit Lgd DM14 1 im sensitivierten Hintergrund. Auch bei der Rettung mit Lgd DM14 3 schlüpfen die Fliegen im *lgd*-mutanten Hintergrund, im sensitivierten Hintergrund erreichen die Tiere nur das Puppenstadium.

Um zu überprüfen, ob ein Lgd-Deletionskonstrukt, dass zwei gleiche ungeradzahlige DM14 Domänen besitzt, besser retten kann, als eines mit nur einer ungeradzahligen DM14 Domäne, wurde das Konstrukt LgdΔDM14 1-2 DM14 3-3 untersucht. Dieses Konstrukt basiert auf LgdΔDM14 1-2, die vierte DM14 Domäne wurde hier gegen eine zusätzliche dritte DM14 Domäne ausgetauscht (3.5 A). Der Lgd-Ausfallphänotyp kann mit LgdΔDM14 1-2 DM14 3-3 vollständig gerettet werden. Sowohl die Expression von Wg als auch von Gbe+Su(H) sehen wildtypisch aus und die Fliegen entwickeln sich zu Adulten (Abb. 3.5 B und B^{I}). Im Gegensatz dazu kann im sensitivierten Hintergrund keine vollständige Rettung durch LgdΔDM14 1-2 DM14 3-3 beobachtet werden. Im Vergleich zu den Konstrukten Lgd DM14 1 und Lgd DM14 3 ist der beobachtete Phänotyp allerdings deutlich schwächer. In der Antikörperfärbung gegen Wg ist eine leichte ektopische Expression entlang der D/V-Grenze zu erkennen, der Notch-Reporter Gbe+Su(H) zeigt Aktivität in jeder Zelle der Flügelimaginalscheibe an, die Expression entlang der D/V-Grenze ist allerdings deutlich sichtbar (Abb. 3.5 C und C^{I}) (bereits veröffentlicht in

McMillan et al., 2017). Auch bei dieser Rettung des sensitivierten Hintergrundes erreichen die Fliegen nur das Puppenstadium.

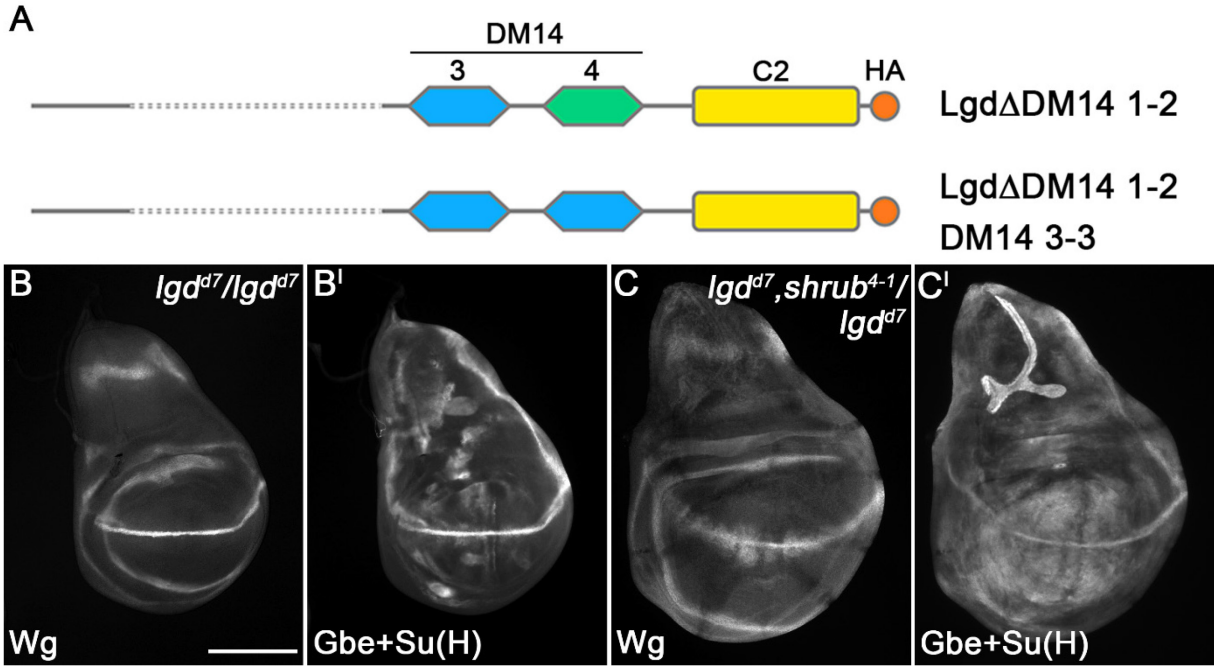


Abb. 3.5: A – Schematische Darstellung des Lgd-Deletionskonstruktes LgdΔDM14 1-2 DM14 3-3 und des Ausgangskonstruktes LgdΔDM14 1-2. B-C' – Rettung des *lgd* null-mutanten (B, B') bzw. sensitivierten Hintergrundes (C, C') mit LgdΔDM14 1-2 DM14 3-3 (bereits veröffentlicht in McMillan et al., 2017). Eine Antikörperfärbung gegen Wg (B, C) und die Expression des Notch-Reporters zeigen die Aktivität des Notch-Signalweges an (B', C'). Die Flügelimaginalscheiben sind so orientiert, dass anterior links und dorsal oben ist. Der Maßstabsbalken in B entspricht 200 µm. Die Imaginalscheiben wurden bei der gleichen Vergrößerung aufgenommen.

Durch diese Untersuchungen wird deutlich, dass die ungeradzahligen DM14 Domänen für die Protein-Funktion von Lgd eine wichtige Rolle spielen. Die Präsenz einer einzelnen ungeradzahligen DM14 Domäne ist ausreichend, um den Verlust des endogenen Lgds im *lgd* null-mutanten Hintergrund zu kompensieren. Die Ergebnisse im sensitivierten Hintergrund deuten hingegen darauf hin, dass die ungeradzahligen DM14 Domänen unterschiedliche Funktionen haben und sich nicht vollständig ersetzen können. Der leichte Unterscheid im Rettungsvermögen der ungeradzahligen DM14 Domänen weist darauf hin, dass die dritte DM14 Domäne wichtiger für die Lgd-Funktion ist.

3.2 Analyse der Wechselwirkung zwischen Lgd und Shrub – Mutationen in der Shrub-Interaktionsstelle

Mittels Röntgenkristallographie wurde die Interaktionsstelle zwischen der dritten DM14 Domäne von *Drosophila* Lgd und Shrub aufgeklärt. Diese Analyse deutet darauf hin, dass in Shrub saure Glutaminsäuren (E40, E86) und eine Asparaginsäure (D79) benötigt werden, um elektrostatischen Wechselwirkungen mit den basischen Argininen (R389, R390, R393) und eventuell einem Lysin (K387) von Lgd aufzubauen (siehe Abb. 3.7 B) (McMillan et al., 2017). Die Nummerierung der Aminosäuren bezieht sich hierbei jeweils auf die Position im vollständigen Protein. Ein Sequenzvergleich der Lgd DM14 Domänen zeigt, dass die vermutlich für die Interaktion mit Shrub benötigten basischen Aminosäure in Lgd in der ersten und dritten DM14 Domäne von Lgd stark konserviert sind (rote Rahmen Abb. 3.6) (McMillan et al., 2017). In den geradzahligen DM14 Domänen sind nur an einer (in DM14 2) bzw. an zwei von vier Positionen (in DM14 4) basische Aminosäuren zu finden. Diese unterscheiden sich zudem von denen in den ungeradzahligen Domänen. So befinden sich in den ungeradzahligen Domänen an Position 169/389 und an Position 173/393 Arginine, in den geradzahligen DM14 Domänen hingegen an den entsprechenden Positionen Lysine (Pfeile Abb. 3.6).

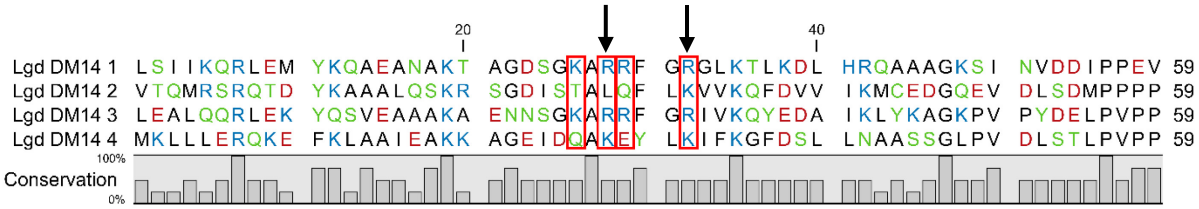


Abb. 3.6: Aminosäuresequenzenvergleich der vier *Drosophila* Lgd DM14 Domänen. Die roten Rahmen markieren die für die Interaktion mit Shrub benötigten Aminosäuren, die Pfeile heben Unterschiede zwischen den basischen Aminosäuren in den geradzahligen und ungeradzahligen DM14 Domänen hervor. Unterhalb der Sequenzvergleiche ist die Höhe der Konservierung in Prozent dargestellt. Die Aminosäuren sind im Ein-Buchstaben-Code abgekürzt (siehe 8.1). Die Farbe der Aminosäuren entspricht ihrer Polarität, schwarz = unpolar, grün = polar, blau = basisch und rot = sauer.

Um die Interaktionsstelle zwischen Lgd und Shrub näher zu analysieren und um die Röntgenkristallographie Daten *in vivo* zu überprüfen, sollten im Folgenden Lgd-Deletionskonstrukte analysiert werden, denen die ersten beiden DM14 Domänen fehlen (*lgdP lgdΔDM14 1-2-HA*) und die zusätzlich eine Punktmutation in der dritten DM14 Domäne tragen (Abb. 3.7). Mit diesen Konstrukten wurden Rettungsexperimente im *lgd* null-mutanten Hintergrund durchgeführt.

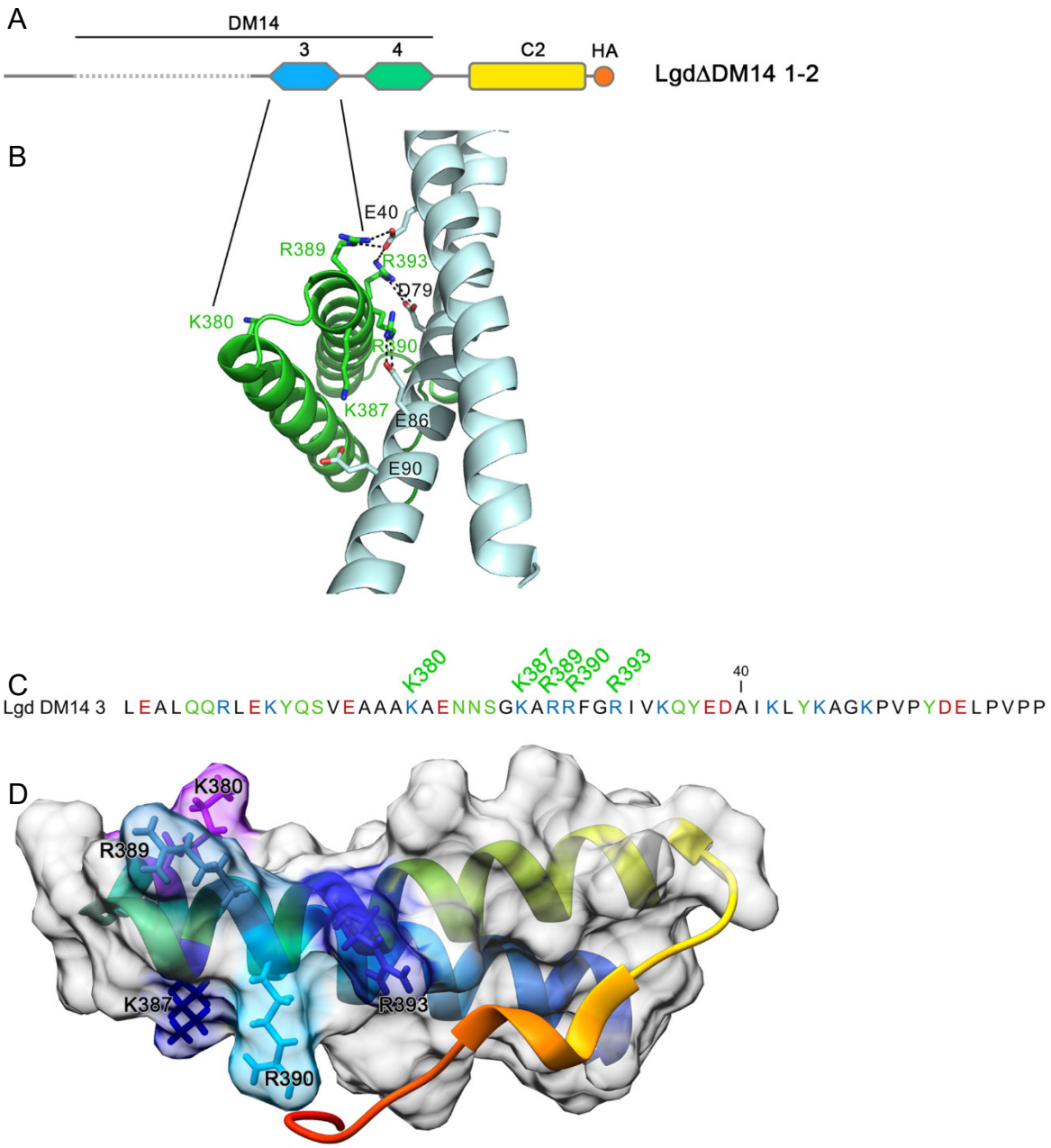


Abb. 3.7: A – Graphische Darstellung des Lgd-Deletionskonstruktes LgdΔDM14 1-2-HA. Die untersuchten Lgd-Mutantionskonstrukte basieren auf LgdΔDM14 1-2-HA. B – Kristallstruktur der Interaktion zwischen der dritten Lgd DM14 Domäne (grün) und Shrub (blau). Die Aminosäuren, die wahrscheinlich an der elektrostatischen Wechselwirkung beider Proteine beteiligt sind, sind mit ihrer Position im vollständigen Protein hervorgehoben, zusätzlich ist das Lysin an Position 380 markiert. PDB Eintrag: 5VO5. (Abbildung aus McMillan et al. (2017)). C – Aminosäuresequenz der dritten DM14 Domäne von *Drosophila* Lgd. Die Aminosäuren, welche für die Analyse mutiert wurden, sind in grün mit ihrer Position im vollständigen Protein markiert. D – Oberfläche-Darstellung der beiden Helices der dritten DM14 Domäne von Lgd. Die untersuchten Aminosäuren sind mit ihren Resten dargestellt und farblich hervorgehoben. PDB Eintrag: 5VNY (McMillan et al., 2017).

Wie oben beschrieben, besitzen die betrachteten Konstrukte nur eine für die Funktion von Lgd essentielle, ungeradzahlige DM14 Domäne (DM14 3). Der Austausch einer, an der Interaktion mit Shrub beteiligten Aminosäure in dieser DM14 Domäne, könnte zum Verlust der Interaktion mit Shrub und somit zum Verlust der Funktionalität von Lgd führen. In Rettungsexperimenten im *lgd* null-mutanten Hintergrund wäre somit ein Phänotyp wie bei der Rettung mit LgdΔDM14 1-3 zu erwarten (siehe Abb. 3.2 G, G^{I}). Auf diese Weise kann ein deutlicher Phänotyp durch die Mutation von nur einer Aminosäure erzeugt werden.

Durch Einführen einer Punktmutation wurde jeweils K387, R389, R390 oder R393 ausgetauscht (Abb. 3.7 C, D). Diese Aminosäuren sind wahrscheinlich wichtig für die elektrostatischen Wechselwirkungen mit Shrub (McMillan et al., 2017). Zusätzlich zu diesen vier basischen Aminosäuren wurde als Kontrolle K380 betrachtet, welches sich außerhalb der Interaktionsstelle befindet (Abb. 3.7 D). Es wurden Auswirkungen der Ladungsumkehr (Mutation zu Glutaminsäure, siehe 3.2.1), des Neutralisierens der Ladung (Mutation zu Alanin, siehe 3.2.2) und des Austausches zu einer anderen basischen Aminosäure an den genannten Positionen untersucht (siehe 3.2.3).

3.2.1 Auswirkungen der Ladungsumkehr

Zunächst wurden die Auswirkungen einer Ladungsumkehr der Aminosäuren in der Shrub-Interaktionsstelle untersucht. Hierzu wurden die basischen Aminosäuren zu sauren Glutaminsäuren mutiert.

Wie bereits beschrieben, kann das Ausgangskonstrukt LgdΔDM14 1-2 den Verlust von endogenem Lgd kompensieren und den Ausfall-Phänotyp vollständig retten (siehe 3.1). Sowohl die Färbung gegen Wg (Abb. 3.8 A) als auch der sensitive Notch-Reporter Gbe+Su(H) (Abb. 3.8 A^{I}) sehen wildtypisch aus.

Auch das Kontrollkonstrukt LgdΔDM14 1-2 K380E, in dem das Lysin an Aminosäureposition 380 zu Glutaminsäure mutiert wurde, kann den *lgd* null-mutanten Hintergrund retten. Die Expressionsdomänen von Wg und Gbe+Su(H) sehen wildtypisch aus (Abb. 3.8 B, B^{I}). Die Ladungsumkehr einer Aminosäure in der dritten DM14 Domäne führt somit nicht in jedem Fall zum Funktionsverlust des Proteins. Die Fliegen entwickeln sich bis zu Adulten.

Wird hingegen die Ladung einer Aminosäure in der Shrub-Interaktionsstelle umgekehrt, so kann keines der untersuchten Konstrukte den Verlust von endogenem Lgd kompensieren. Der Austausch K387E führt zu einem Verlust des Rettungsvermögens des Konstruktes (*lgdP lgdΔDM14 1-2 K378E-HA*). In der Antikörperfärbung gegen Wg ist eine Verbreiterung der Expressionsdomäne entlang der D/V-Grenze zu beobachten (Pfeile Abb. 3.8 C). Die Aktivität des Notch-Reporters beschränkt sich nicht mehr auf ein definiertes Expressionsmuster, sondern ist in jeder Zelle der Flügelimaginalscheibe nachweisbar (Abb. 3.8 C^{I}). Die Flügelimaginalscheibe ist überproliferiert. Ein ähnlicher Phänotyp ist zu beobachten, wenn das Arginin an Position 389 gegen eine Glutaminsäure ausgetauscht wird (*lgdP lgdΔDM14 1-2 R389E-HA*) (Abb. 3.8 D Pfeile, D^{I}). Auch die Mutation R390E führt zu einem Verlust des Rettungsvermögens (*lgdP lgdΔDM14 1-2 R390E-HA*) (Abb. 3.8 E Pfeile, E^{I}). Wird das Arginin an Position 393 zu Glutaminsäure mutiert (*lgdP lgdΔDM14 1-2 R393E-HA*), kommt es ebenfalls im Vergleich zum Ausgangskonstrukt zum Verlust des Rettungsvermögens (Abb. 3.8 F Pfeile, F^{I}) (Bachelorarbeit Wienigk, 2015). Bei der Rettung mit diesen Konstrukten können sich die Fliegen nur bis ins Puppenstadium entwickeln und sterben dann.

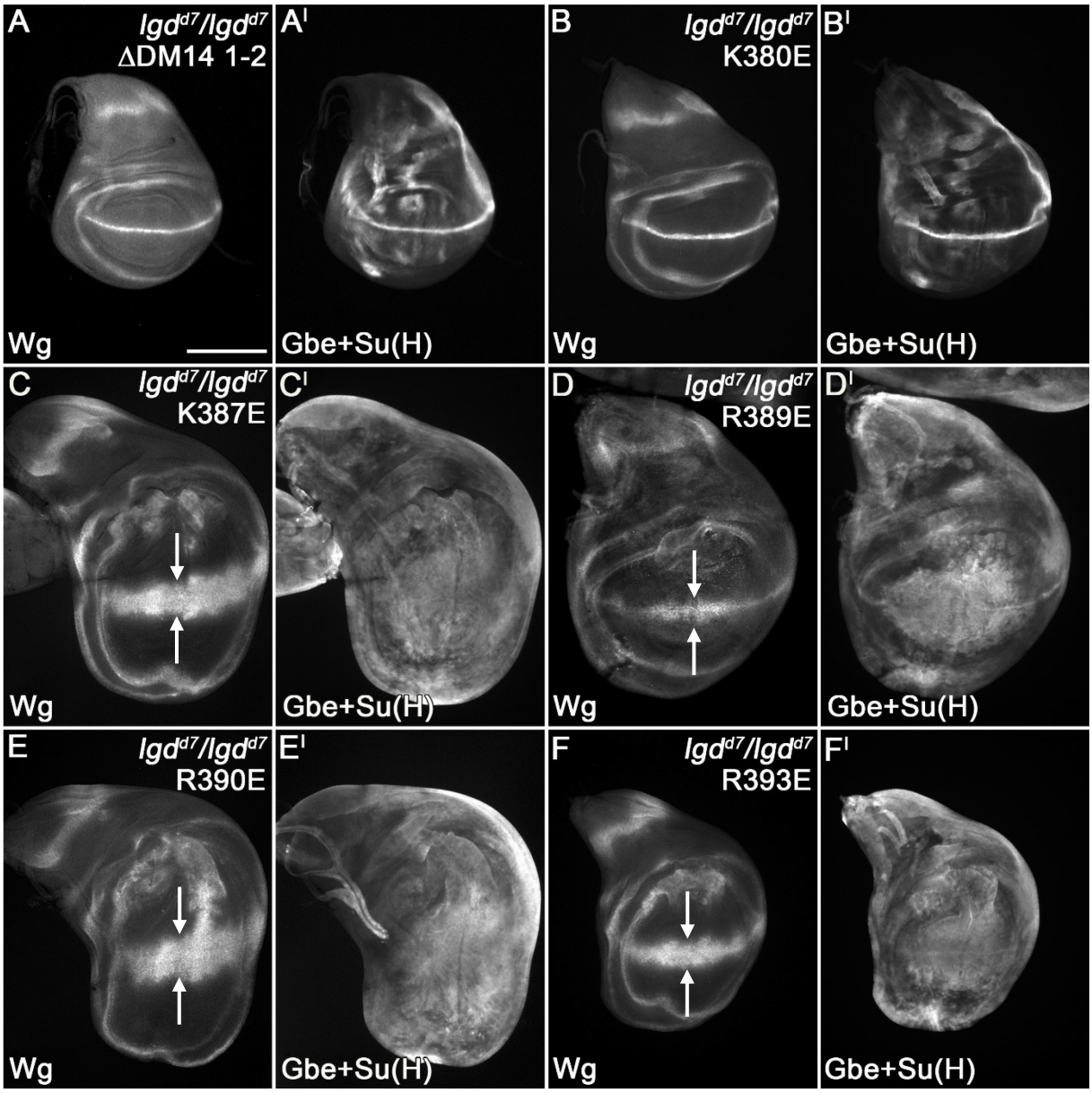


Abb. 3.8: Rettung des *lgd* null-mutanten Hintergrundes mit Lgd-Deletionskonstrukten, die Mutationen in der Shrub-Interaktionsstelle tragen, welche die Ladung der jeweiligen Aminosäuren umkehren. Die Aktivität des Notch-Signalweges ist durch eine Antikörperfärbung gegen Wg dargestellt (A-F). Darüber hinaus wird die Expression des Notch-Reporters Gbe+Su(H) gezeigt (A^I-F^I). In A und A^I ist die Rettung mit dem Ausgangskonstrukt LgdΔDM14 1-2 zu sehen. B bis F^I zeigen die Rettung mit den angezeigten mutierten Deletionskonstrukten (siehe Abb. 3.7). Die Pfeile in C, D, E und F heben die verbreiterte Wg-Expressionsdomäne hervor. Die Flügelimaginalscheiben sind so orientiert, dass anterior links und dorsal oben ist. Der Maßstabsbalken in A entspricht 200 µm. Alle Imaginalscheiben wurden bei der gleichen Vergrößerung aufgenommen.

Die Ladungsumkehr einer Aminosäure in Lgd führt somit nicht zwingend zur Beeinträchtigung der Proteinfunktion. Wird allerdings eine auf elektrostatischen Wechselwirkungen beruhende Interaktionsstelle auf diese Weise manipuliert, führt dies zum Funktionsverlust.

3.2.2 Auswirkungen des Neutralisierens der Ladung

In einem weiteren Experiment wurde untersucht, welche Auswirkungen das Neutralisieren der Ladung in der Shrub-Interaktionsstelle hat. Hierzu wurden die in die Bindung mit Shrub involvierten Aminosäuren einzeln zu Alanin (A) mutiert. Als Kontrolle wurde erneut der Effekt auf K380 untersucht.

Wie schon der Austausch zu Glutaminsäure, hat auch der Austausch des Kontroll-Lysins zu Alanin (*lgdP lgd ΔDM14 1-2 K380A-HA*) keinen Einfluss auf das Rettungsvermögen im *lgd* null-mutanten Hintergrund. Wie bei der Rettung des Verlustes von *lgd* mit dem Kontrollkonstrukt Lgd ΔDM14 1-2 (Abb. 3.9 A, A^{I}) sind auch hier die Expressionsdomänen von Wg und dem Reporter-Konstrukt Gbe+Su(H) wildtypisch (Abb. 3.9 B, B^{I}) (bereits veröffentlicht in McMillan et al., 2017). Diese Konstrukte retten den Verlust von Lgd vollständig und es entwickeln sich Adulte.

Der Verlust der Ladung beeinflusst allerdings das Rettungsvermögen sobald eine Aminosäure aus der Shrub-Interaktionsstelle verändert wird.

Bei dem Austausch K387A verliert das Lgd-Deletionskonstrukt die Fähigkeit den *lgd* null-mutanten Hintergrund zu retten (*lgdP lgd ΔDM14 1-2 K378A-HA*). In der Färbung gegen Wg ist eine deutliche Verbreitung der Expressionsdomäne entlang der D/V-Grenze zu erkennen (Pfeile Abb. 3.9 C). Auch Gbe+Su(H) zeigt eine Überaktivierung des Notch-Signalweges in jeder Zelle der Flügelimaginalscheibe, die überproliferiert ist, an (Abb. 3.9 C^{I}) (bereits veröffentlicht in McMillan et al., 2017). Die Mutation R389A führt ebenfalls zum Funktionsverlust von Lgd (*lgdP lgdΔDM14 1-2 R389A-HA*) (Abb. 3.9 D Pfeile, D^{I}) (bereits veröffentlicht in McMillan et al., 2017). Für den Aminosäureaustausch an Position 390 ist zu erkennen, dass der Verlust der Ladung hier die Funktion von Lgd nicht so stark zu stören scheint, wie an den anderen Positionen in der Interaktionsstelle (*lgdP lgd ΔDM14 1-2 R390A-HA*). Der beobachtete Phänotyp ist schwächer. So ist eine leichte Verbreitung der Wg-Expressionsdomäne entlang der D/V-Grenze zu sehen (Pfeile Abb. 3.9 E). Der Notch-Reporter Gbe+Su(H) ist in jeder Zelle der Imaginalscheibe aktiv, die D/V-Grenze ist aber zu erkennen (Pfeil Abb. 3.9 E^{I}). Eine Überproliferation des Gewebes

ist zu erkennen (bereits veröffentlicht in McMillan et al., 2017). Der Austausch R393A resultiert wieder im fehlenden Rettungsvermögen des Konstruktes Lgd ΔDM14 1-2 R393A (Abb. 3.9 F Pfeile, F^{I}) (bereits veröffentlicht in McMillan et al., 2017). Die hier betrachteten Konstrukte können die Letalität der Fliegen im Puppenstadium nicht retten.

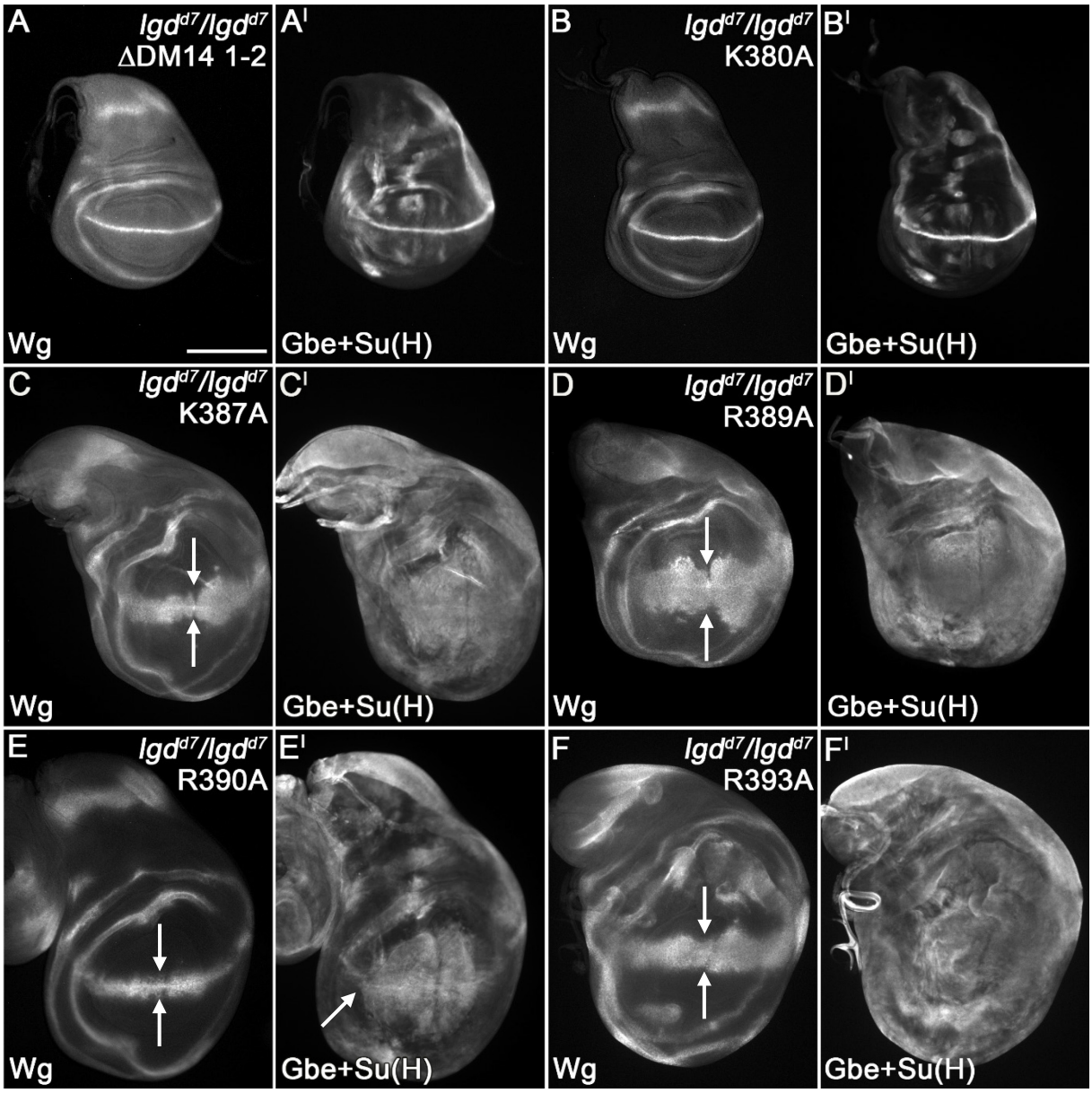


Abb. 3.9: Rettung des *lgd* null-mutanten Hintergrundes mit Lgd-Deletionskonstrukten, die Mutationen in der Shrub-Interaktionsstelle tragen, durch welche die Ladung der jeweiligen Aminosäure neutralisiert wird. Die Expression des endogenen Notch-Zielgens *wg* ist mittels Antikörperfärbung dargestellt (A-F). Der Notch-Reporter Gbe+Su(H) zeigt die Aktivität des Signalweges an (A^I-F^I). A und A^I zeigen die Rettung mit dem Ausgangskonstrukt LgdΔDM14 1-2. In B bis F^I ist die Rettung mit den angezeigten mutierten Deletionskonstrukten zu sehen (siehe Abb. 3.7) (bereits veröffentlicht in McMillan et al., 2017). Die Pfeile in C, D, E und F markieren die ektopische Wg-Expression. Der Pfeil in E^I deutet auf die Expression an der D/V-Grenze. Die Flügelimaginalscheiben sind so orientiert, dass anterior links und dorsal oben ist. Der Maßstabsbalken in A entspricht 200 µm. Alle Imaginalscheiben wurden bei der gleichen Vergrößerung aufgenommen.

Diese Untersuchung zeigt, dass die Interaktion zwischen Lgd und Shrub fein reguliert ist und dass das Neutralisieren der Oberflächen-Ladung an nur einer Position in der Interaktionsstelle zu Shrub zum Funktionsverlust von Lgd führt.

3.2.3 Auswirkungen von Mutationen, die die Ladung nicht beeinflussen

Im Folgenden wurde untersucht, ob für die Interaktion zwischen Lgd und Shrub basische und damit positiv geladene Aminosäuren in Lgd ausreichen oder ob sogar bestimmte basische Aminosäuren benötigt werden. Hierzu werden die bereits betrachteten Lysine in Arginine umgewandelt und andersherum.

Der Austausch der Lysine an den Positionen 380 (*lgdP lgdΔDM14 1-2 K380R-HA*) (Masterarbeit Benscheidt, 2013) und 387 (*lgdP lgdΔDM14 1-2 K387R-HA*) zu Argininen hat keinen Einfluss auf das Rettungsvermögen der Konstrukte im *lgd* null-mutanten Hintergrund. Sowohl die Antikörperfärbung gegen Wg (vgl. Abb. 3.10 B, C und A) als auch das Expressionsmuster des Reporter-Konstruktes Gbe+Su(H) (vgl. Abb. 3.10 B^{I}, C^{I} und A^{I}) sehen wildtypisch aus. Die Rettung des *lgd* null-mutanten Hintergrundes mit diesen Konstrukten ist vollständig und die Fliegen entwickeln sich zu Adulten. Im sensitivierten Hintergrund kann LgdΔDM14 1-2 K387R sogar besser retten als das Ausgangskonstrukt LgdΔDM14 1-2. Die ektopische Expression von Wg an der D/V-Grenze ist wie die Aktivierung von Gbe+Su(H) reduziert (Abb. 3.10 G, G^{I} und H, H^{I}). Die Fliegen entwickeln sich trotzdem nicht weiter als beim vollständigen Verlust von Lgd und sterben als Puppe. Wird die positiv geladene Seitenkette der Arginine in der Interaktionsstelle zu Shrub durch Mutation zu Lysin verkleinert, hat dies Auswirkungen auf das Rettungsvermögen der Lgd-Konstrukte.

Eine Rettung des *lgd* null-mutanten Hintergrundes mit dem Konstrukt LgdΔDM14 1-2 R389K und LgdΔDM14 1-2 R393K zeigen einen schwachen *lgd*-Phänotyp. Neben der Überproliferation der Flügelimaginalscheibe ist in der Wg-Färbung eine leichte Überexpression entlang der D/V-Grenze zu beobachten (Pfeile Abb. 3.10 D, F). Auch Gbe+Su(H) zeigt eine Überaktivierung, der Reporter ist in jeder Zelle der Imaginalscheiben aktiv. Die Expressionsdomäne entlang der D/V-Grenze ist aber noch deutlich zu erkennen (Pfeil Abb. 3.10 D^{I}, F^{I}). Die Mutation des Arginins an Position 390 zu Lysin resultiert in einer deutlichen Reduktion des Rettungsvermögens (*lgdP lgdΔDM14 1-2 R390K-HA*). Die überproliferierte Imaginalscheibe, die verbreiterte Wg-Expressionsdomäne an der D/V-Grenze (Pfeile Abb. 3.10 E) und die Aktivität des Reportergen-Konstruktes Gbe+Su(H) (Abb. 3.10 E^{I}) zeigen eine erhöhte Aktivierung des Notch-Signalweges an. Auch hier entwickeln sich die Fliegen trotz Expression eines Lgd-Transgens nur bis ins Puppenstadium.

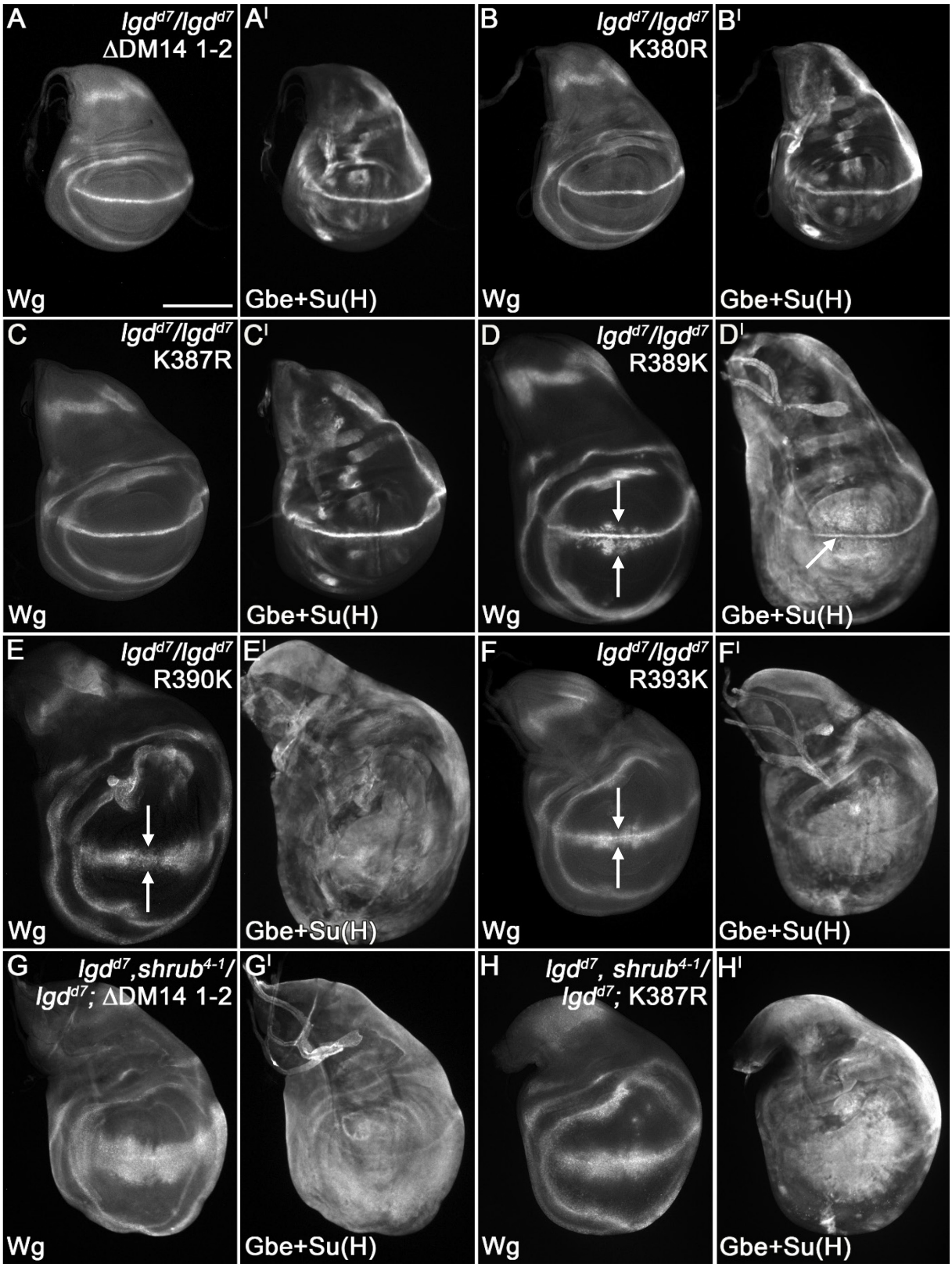
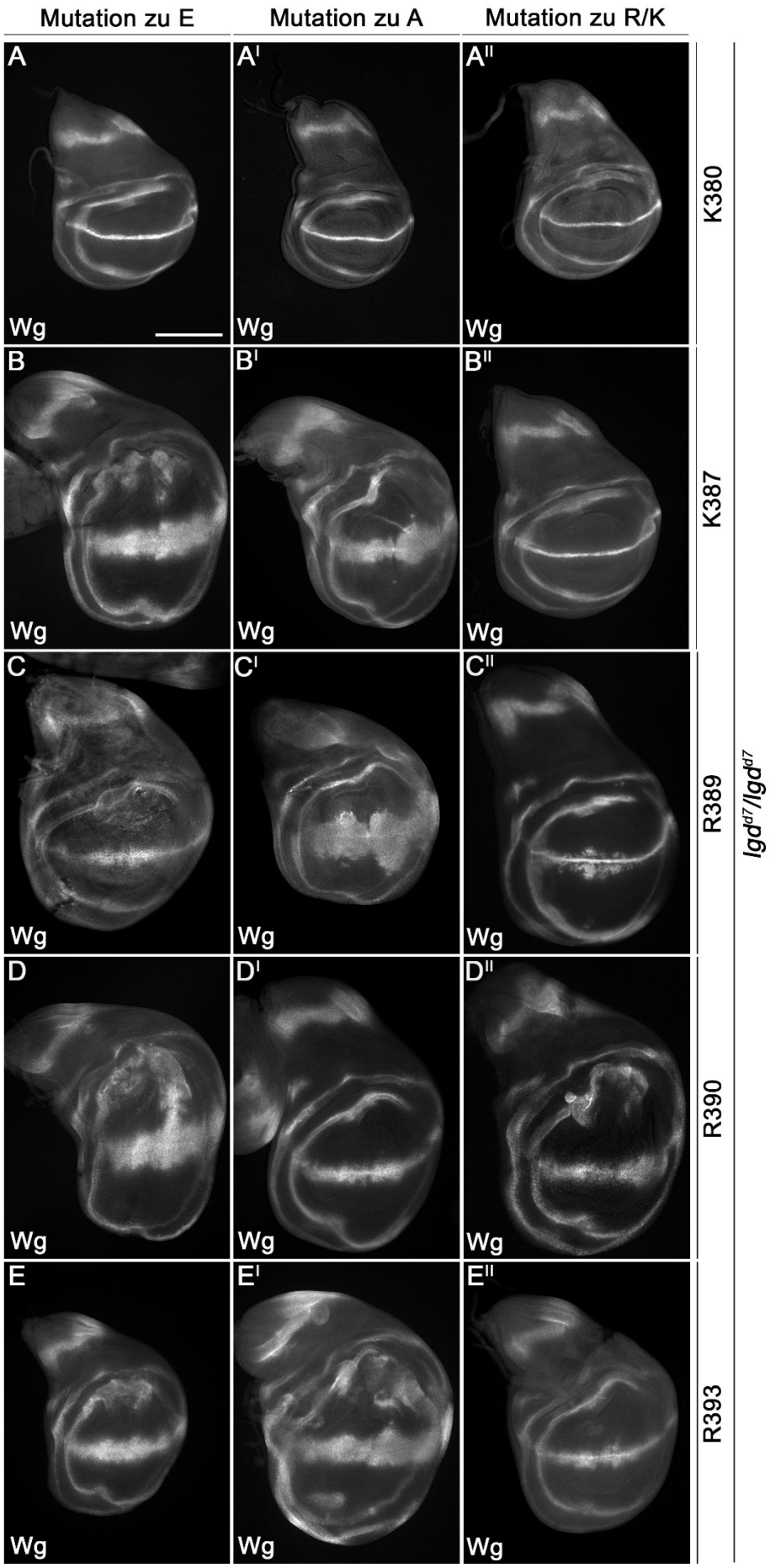


Abb. 3.10: Rettung des *lgd* null-mutanten bzw. sensitivierten Hintergrundes mit Lgd-Deletionskonstrukten, die Mutationen in der Shrub-Interaktionsstelle tragen, durch welche die Ladung der ausgetauschten Aminosäure erhalten bleibt. Die Aktivität des Notch-Signalweges wird mittels Antikörperfärbung gegen Wg dargestellt (A-H). Ebenfalls ist die Expression des Notch-Reporter Gbe+Su(H) gezeigt (A^I-H^I). In A und A^I ist

die Rettung mit dem Ausgangskonstrukt LgdΔDM14 1-2 zu sehen. B bis F' zeigen die Rettung mit den angezeigten mutierten Deletionskonstrukten im *lgd*-mutanten Hintergrund (siehe Abb. 3.7) (Masterarbeit Benscheidt, 2013). Die Pfeile in D, E und F heben die verbreiterte Wg-Expressionsdomäne hervor. Der Pfeil in D' markiert die verstärkte Gbe+Su(H)-Expression an der D/V-Grenze. G bis H' zeigen die Rettung des sensitivierten Hintergrundes mit LgdΔDM14 1-2 und LgdΔDM14 1-2 K387R. Die Flügelimaginalscheiben sind so orientiert, dass anterior links und dorsal oben ist. Der Maßstabsbalken in A entspricht 200 µm. Die Imaginalscheiben wurden bei der gleichen Vergrößerung aufgenommen.

Das vorherige Experiment hat bereits gezeigt, dass jede positive Ladung in der Interaktionsstelle zwischen Lgd und Shrub benötigt wird. Durch diesen Versuch wird deutlich, dass nicht nur die Ladung, sondern auch die Größe der Aminosäure-Seitenkette an bestimmten Positionen entscheidend für die erfolgreiche Interaktion beider Proteine ist.

Abb. 3.11: Zusammenstellung der Ergebnisse zum Austausch der Ladung, zum Neutralisieren der Ladung und zum Beibehalten der Ladung von Aminosäuren in der Interaktionsstelle der dritten DM14 Domäne von Lgd mit der ESCRT-III Untereinheit Shrub. Die Rettung des *lgd* null-mutanten Hintergrundes wird mit Lgd-Deletionskonstrukten durchgeführt, die auf dem Konstrukt LgdΔDM14 1-2 basieren und zusätzlich eine der angezeigten Aminosäureaustausche tragen (siehe 3.7). Die Antikörperfärbung gegen Wg zeigt die Aktivität des Notch-Signalweges an. Die Flügelimaginalscheiben sind so orientiert, dass anterior links und dorsal oben ist. Der Maßstabsbalken in A entspricht 200 µm. Die Imaginalscheiben wurden bei der gleichen Vergrößerung aufgenommen.



Bildunterschrift auf S.57

3.3 Definition eines minimalen Shrub-Bindemotives

Die Interaktion zwischen Lgd und Shrub basiert auf elektrostatischen Wechselwirkungen. Die vorherigen Ergebnisse haben die Daten der Kristallstrukturanalyse *in vivo* bestätigt (McMillan et al., 2017). Die Aminosäuren an den Positionen 387, 389, 390 und 393 in der dritten DM14 Domäne von Lgd sind für die Interaktion mit Shrub essentiell (siehe 3.2). Ein Aminosäure-Sequenzvergleich der Lgd DM14 Domänen zeigt, dass an den korrespondierenden Positionen in der ersten DM14 Domäne die gleichen Aminosäuren zu finden sind und dass an der letzten Position sogar in jeder DM14 Domäne eine basische Aminosäure konserviert ist (siehe Abb. 3.6).

Im Folgenden wurde untersucht, ob das nur in den ungeradzahligen DM14 Domänen vorkommende KARR Motiv (Aminosäuren 167-170 bzw. 387-390) als ein minimales Shrub-Bindemotiv verwendet werden kann.

Hierzu wurde ein vollständiges Lgd Konstrukt generiert, welches das KARR Motiv in den geradzahligen DM14 Domänen an entsprechenden Stellen trägt. Dieses Konstrukt trägt somit vier statt zwei möglicher Shrub-Bindemotive (*lgdP lgd DM14 2+4 KARR-HA*). Darüber hinaus wurde ein Lgd-Deletionskonstrukt analysiert, welches nur die vierte DM14 Domäne mit dem eingeführten KARR Motiv besitzt (*lgdP lgdΔDM14 1-3 DM14 4 KARR-HA*). Hiermit kann die Funktionalität des KARR Motives überprüft werden. Außerdem wurde ein Konstrukt untersucht, welches nur die geradzahligen DM14 Domänen trägt, in die jeweils das mögliche Bindemotiv zu Shrub eingeführt wurde (*lgdP lgd DM14 2+4 DM14 2+4 KARR-HA*) (hergestellt von Katharina Nowak (2017)) (Abb. 3.12).

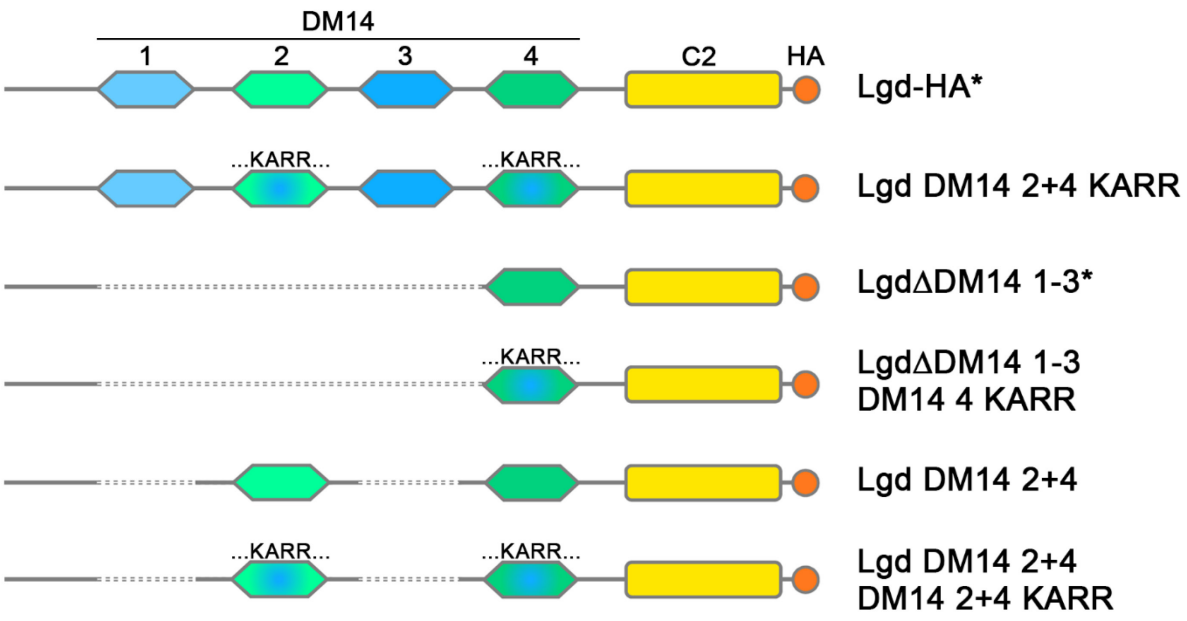


Abb. 3.12: Graphische Darstellungen der analysierten Lgd-Konstrukte und ihrer Ausgangskonstrukte. Das in die geradzahligen DM14 Domänen eingeführte KARR Motiv ist durch blau-Färbung und Beschriftung gekennzeichnet. Die ungeradzahligen DM14 Domänen sind in blau, die geradzahligen Domänen in grün dargestellt. Die C2-Domäne ist in gelb, das HA-Tag in orange gezeigt. Die mit einem Stern markierten Konstrukte wurde bereits in Troost et al. (2012) publiziert (bereits veröffentlicht in McMillan et al., 2017).

Wie bereits beschrieben, ist eine Kopie des Transgens Lgd-HA in der Lage den Verlust von endogenem Lgd zu kompensieren. Sowohl im *lgd* null-mutanten, als auch im sensitivierten Hintergrund kann das Konstrukt Lgd-HA retten (Diplomarbeit Ohlenhard, 2011, Troost et al., 2012). Die Expression des endogenen Notch-Zielgens *wg* (Abb. 3.13 A, B) und der Reporter Gbe+Su(H) (Abb. 3.13 A^{I}, B^{I}) sehen wildtypisch aus.

Wird im vollständigen Lgd-Protein in der zweiten und vierten DM14 Domäne das mögliche minimale Bindemotiv zu Shrub eingeführt (*lgdP lgd DM14 2+4 KARR-HA*), so wird das Rettungsvermögen nicht beeinflusst. Sowohl der Verlust von Lgd als auch die zusätzliche Reduktion von Shrub können mit einer Kopie Lgd DM14 2+4 KARR gerettet werden. Auch hier sehen Wg (Abb. 3.13 C, D) und Gbe+Su(H) (Abb. 3.13 C^{I}, D^{I}) wie im Wildtyp aus.

Um zu überprüfen, ob das KARR-Motiv ausreichend für eine Interaktion mit Shrub ist, wird LgdΔDM14 1-3 DM14 4 KARR auf sein Rettungsvermögen untersucht. Das Kontroll-Konstrukt LgdΔDM14 1-3 kann den *lgd* null-mutanten Hintergrund nicht retten (siehe 3.1, Abb. 3.13 E Pfeile, E^{I}) (Troost et al., 2012). Das in die vierte DM14 Domäne eingeführte KARR-Motiv kann das Rettungsvermögen des Konstruktes nicht verbessern. Die

Expression von Wg an der D/V Grenze ist verbreitert (Abb. 3.13 F) und Gbe+Su(H) ist in jeder Zelle der überproliferierten Zelle aktiv (Abb. 3.13 F^{I}).

Es wurde auch ein Konstrukt analysiert, welches auf dem Lgd-Deletionskonstrukt Lgd DM14 2+4 basiert. Das Ausgangs-Konstrukt kann den Verlust von endogenem Lgd nicht kompensieren (siehe 3.1, Abb. 3.13 G Pfeile, G^{I}) (bereits veröffentlicht in McMillan et al., 2017). Wird nun das mögliche minimale Bindemotiv zu Shrub in die beiden vorhandenen DM14 Domänen eingeführt (*lgdP lgd DM14 2+4 DM14 2+4 KARR-HA*), ist zu erkennen, dass auch zwei KARR-Motive nicht ausreichend sind, um die Lgd-Funktion zu übernehmen. Für das Notch-Zielgen *wg* ist eine Überexpression an der D/V-Grenze zu erkennen (Pfeile Abb. 3.13 H) und Gbe+Su(H) zeigt eine Überaktivierung des Notch-Signalweges in jeder Zelle der überproliferierten Imaginalscheibe (Abb. 3.13 H^{I}).

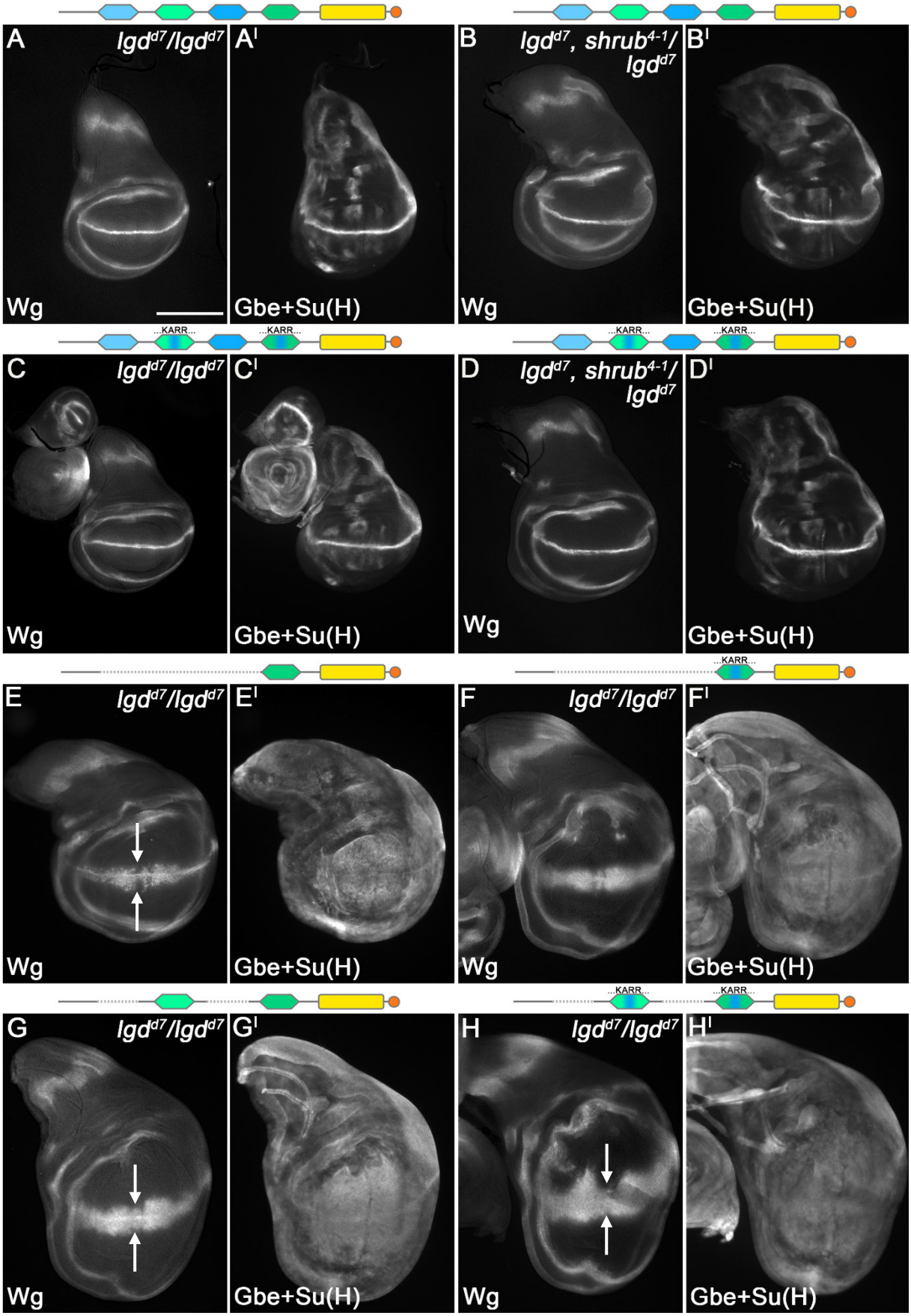

A
lgd^d7/lgd^d7
A'
Wg
Gbe+Su(H)
B
lgd^d7, shrub^4-1/ lgd^d7
B'
Wg
Gbe+Su(H)
...KARR...
C
lgd^d7/lgd^d7
C'
Wg
Gbe+Su(H)
D
lgd^d7, shrub^4-1/ lgd^d7
D'
Wg
Gbe+Su(H)
E
lgd^d7/lgd^d7
E'
Wg
Gbe+Su(H)
F
lgd^d7/lgd^d7
F'
Wg
Gbe+Su(H)
G
lgd^d7/lgd^d7
G'
Wg
Gbe+Su(H)
H
lgd^d7/lgd^d7
H'
Wg
Gbe+Su(H)

Abb. 3.13: Rettung des *lgd* null-mutanten bzw. sensitivierten Hintergrundes mit Lgd-Konstrukten, die zusätzlich in den geradzahligen DM14 Domänen das minimale Shrub-Bindemotiv KARR tragen. Die Aktivität des Notch-Signalweges wird mittels Antikörperfärbung gegen Wg gezeigt (A-H). Zusätzlich ist die Expression des Notch-Reporters Gbe+Su(H) zu sehen (A^I-H^I). A bis B^I zeigen die Rettung mit einem vollständigen Lgd-Transgen, im *lgd* null-mutanten (A, A^I) bzw. sensitivierten Hintergund (B, B^I). In C und C^I wird der Verlust von Lgd mit dem Konstrukt Lgd DM14 2+4 KARR gerettet, in D und D^I der sensitivierte Hintergrund. E und E^I zeigen die Rettung des *lgd* null-mutanten Hintergrundes mit LgdΔDM14 1-3, die Pfeile in E heben die ektopische Wg-Expression hervor. In F und F^I ist die Rettung mit LgdΔDM14 1-3 DM14 4 KARR zu sehen. In G und G^I ist die Rettung des Lgd-Verlustes mit dem Lgd-Deletionskonstrukt Lgd DM14 2+4 zu sehen. Die Pfeile in G markieren die verbreiterte Wg-Expressionsdomäne. In H und H^I ist die Rettung des *lgd* null-mutanten Hintergrundes mit Lgd DM14 2+4 DM14 2+4 KARR zu erkennen, die Pfeile in H zeigen die ektopische Expression von Wg an. Die zur Rettung verwendeten Konstrukte sind jeweils über den Teilabbildungen graphisch dargestellt (siehe Abb. 3.12). Die Flügelimaginalscheiben sind so orientiert, dass anterior links und dorsal oben ist. Der Maßstabsbalken in A entspricht 200 µm. Alle Imaginalscheiben wurden bei der gleichen Vergrößerung aufgenommen.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das in die geradzahligen DM14 Domänen eingebrachte KARR-Motiv nicht für die Interaktion mit Shrub ausreichend ist.

3.4 Analyse der Lgd DM14 Domänen – Mutationen an konservierten Positionen

Die Aminosäuresequenz-Analyse der Lgd DM14 Domänen zeigt, dass neben der größeren Ähnlichkeit der ungeradzahligen DM14 Domänen (siehe 3.1) sechs Aminosäuren in ihrer Position in jeder Domäne konserviert sind (Abb. 3.14 A). In die Interaktion mit Shrub ist keine dieser Aminosäuren direkt involviert. Ein Sequenzvergleich der *Drosophila* Lgd DM14 Domänen mit den humanen Orthologen CC2D1A und CC2D1B zeigt, dass vier dieser Aminosäuren in den Wirbeltier Orthologen konserviert sind (Abb. 3.14 B).

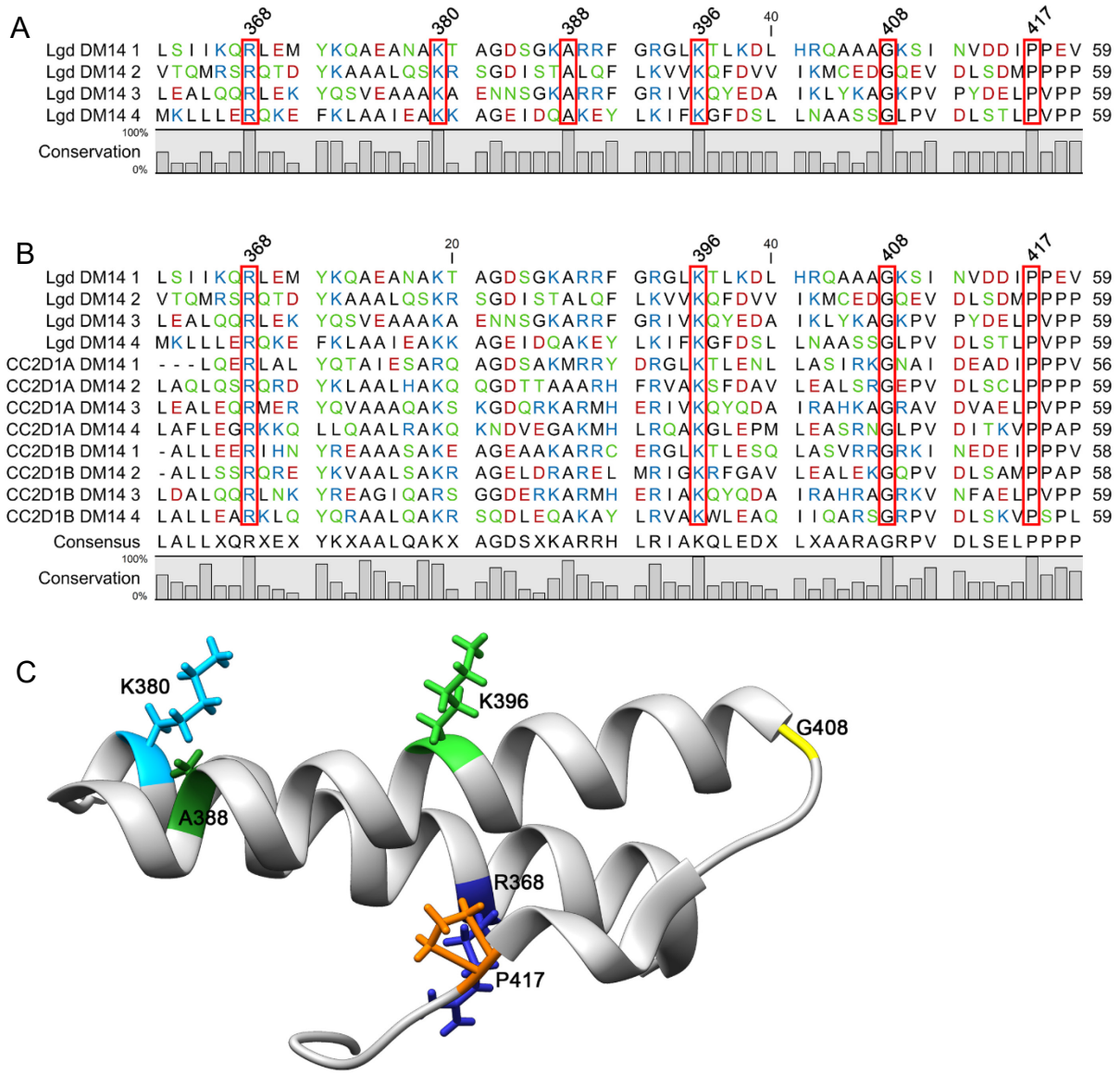


Abb. 3.14: A – Aminosäuresequenzenvergleich der vier *Drosophila melanogaster* DM14 Domänen. Die roten Rahmen markieren die in allen DM14 Domänen konservierten Aminosäuren. Die Zahl über den Sequenzen gibt die Position der Aminosäuren in der dritten DM14 Domäne an. B – Aminosäuresequenzvergleich der DM14 Domänen von *Drosophila* und den beiden humanen Orthologen CC2D1A und CC2D1B. Die roten Rahmen kennzeichnen die in allen DM14 Domänen konservierten Aminosäuren. Die Zahl über den

Sequenzen gibt die Position der Aminosäuren in der dritten DM14 Domäne von Lgd an. Unterhalb der Sequenzvergleiche ist die Höhe der Konservierung in Prozent dargestellt. Die Aminosäuren sind im Ein-Buchstaben-Code abgekürzt (siehe 8.1). Die Farbe der Aminosäuren entspricht ihrer Polarität, schwarz = unpolar, grün = polar, blau = basisch und rot = sauer. C – Darstellung der Kristallstruktur der dritten DM14 Domäne. Die konservierten Aminosäuren sind durch ihre Reste und eine farbliche Markierung hervorgehoben. PDB Eintrag: 5VNY (McMillan et al., 2017).

Im Folgenden sollten die konservierten Aminosäuren genauer untersucht werden. Die starke Konservierung könnte einen Hinweis darauf geben, dass diese Aminosäuren für die Struktur, die Funktion oder auch die Interaktion von Lgd mit anderen Proteinen wichtig sind. Da die Interaktion mit Shrub essentiell für die Funktion von Lgd ist, wurde auch hier die dritte DM14 Domäne in dem Deletionskonstrukt LgdΔDM14 1-2 mutiert (siehe 3.2). Sollte in den Rettungsexperimenten die Interaktion mit Shrub gestört sein, so ist bei diesem Ausgangskonstrukt, wie zuvor durch die Mutation von nur einer Aminosäure, ein Lgd Ausfallphänotyp zu erwarten.

Das Lysin an Position 380 in der dritten DM14 Domäne wurde bereits zuvor betrachtet (siehe 3.2). Die Nummerierung der Aminosäuren bezieht sich unverändert auf die Position im vollständigen Lgd Protein.

Wie beschrieben, kann das Ausgangskonstrukt LgdΔDM14 1-2 den *lgd* null-mutanten Hintergrund vollständig retten (siehe 3.1, Abb. 3.15 A, A^{I}) (Troost et al., 2012). Die Rettung des sensitivierten Hintergrundes ist mit diesem Konstrukt nicht möglich (Abb. 3.15 B, B^{I}) (Diplomarbeit Ohlenhard, 2011).

Eine der konservierten Aminosäuren ist R368 (Abb. 3.14). Wird diese zu einem Alanin mutiert, beeinflusst dies das Rettungsvermögen nicht (*lgdP lgdΔDM14 1-2 R368A-HA*) (siehe Anhang Abb. 9.1 A, A^{I}) (Masterarbeit Benscheidt, 2013). Wird die Ladung der Aminosäure umgekehrt, indem eine saure Glutaminsäure an dieser Position eingeführt wird (*lgdP lgdΔDM14 1-2 R368 E-HA*), kann das Lgd-Deletionskonstrukt den Verlust von *lgd* nicht mehr retten. Die Antikörperfärbung gegen Wg zeigt eine deutliche verbreiterte Expression entlang der D/V-Grenze (Pfeile Abb. 3.15 C) und Gbe+Su(H) ist in jeder Zelle der Flügelimaginalscheibe aktiviert (Abb. 3.15 C^{I}). Eine Überproliferation der Imaginal-scheibe ist zu erkennen. Eine Rettung der Letalität der Fliegen über das Puppenstadium hinaus ist nicht möglich.

Wird das konservierte A388 zu einem Glycin (G) mutiert (*lgdP lgdΔDM14 1-2 A388G*), kann das Lgd-Deletionskonstrukt den *lgd* null-mutanten Hintergrund retten. Sowohl Wg

als auch Gbe+Su(H) sehen wie im Wildtyp aus (Abb. 3.15 D, D^{I}). Fliegen, die mit diesem Konstrukt gerettet werden, können sich zu Adulten entwickeln.

Ein stark konserviertes Lysin (K396) befindet sich in unmittelbarer Nähe zur Shrub-Interaktionsstelle. Bei dem Austausch dieser Aminosäure zu Glutaminsäure kann das Konstrukt LgdΔDM14 1-2 K396E, ähnlich wie bei Mutationen in der Shrub-Interaktionsstelle (siehe 3.2), den Verlust von endogenem Lgd nicht ausgleichen (Bachelorarbeit Wienigk, 2015). Es ist eine ektopische Wg Aktivierung, eine Überaktivierung des Notch-Reporters Gbe+Su(H) und eine Überproliferation der Flügelimaginalscheibe zu beobachten (siehe Anhang Abb. 9.1 B, B^{I}). Die so geretteten Fliegen entwickeln sich nur bis ins Puppenstadium. Der Verlust der Ladung durch Mutation zu Alanin (*lgdP lgdΔDM14 1-2 K396A-HA*) und die Vergrößerung der Seitenkette durch den Austausch zu Arginin (*lgdP lgdΔDM14 1-2 K396R-HA*) beeinflussen das Rettungsvermögen des Konstruktes nicht (Masterarbeit Benscheidt, 2013). Die Antikörperfärbung gegen Wg und die Expressionsdomäne von Gbe+Su(H) sehen wildtypisch aus (Abb. 3.15 E, E^{I} und Anhang Abb. 9.1 C, C^{I}). Eine Doppelmutante (*lgdP LgdΔDM14 1-2 R393A, K396A-HA*), in der das in die Bindung zu Shrub involvierte R393 und zusätzlich das stark konservierte K396 zu Alanin mutiert sind, zeigt den gleichen Phänotyp wie LgdΔDM14 1-2 R393A (siehe 3.2), eine Rettung des *lgd* null-mutanten Hintergrundes ist nicht möglich (siehe Anhang Abb. 9.1 D, D^{I}). Es ist davon auszugehen, dass der Phänotyp ausschließlich durch den Verlust des Arginins an Position 393 verursacht wird.

Ein Austausch von G408 zu Alanin beeinflusst die Funktionalität des Lgd-Deletionskonstruktes nicht (*lgdP lgdΔDM14 1-2 G408A-HA*). Der Verlust von Lgd wird kompensiert und sowohl die Expression von Wg als auch die des Notch-Reporters Gbe+Su(H) sehen wie im Wildtyp aus (Abb. 3.15 F, F^{I}).

Am C-Terminus der DM14 Domänen befinden sich vermehrt Proline (P), eines ist bis zum Menschen konserviert (Abb. 3.14 A, B). Wird dieses zu einem Alanin mutiert (*lgdP lgdΔDM14 1-2 P417A-HA*), ist bei der Rettung des *lgd* null-mutanten Hintergrundes ein schwacher *lgd* Phänotyp zu beobachten (siehe Anhang Abb. 9.1 E, E^{I}) (Masterarbeit Benscheidt, 2013). In der Antikörperfärbung gegen Wg ist die D/V Grenze noch zu erkennen, gleichzeitig ist eine ektopische Aktivierung deutlich detektierbar. Gbe+Su(H) ist in jeder Zelle der Imaginalscheibe aktiviert. Eine Überproliferation der

Flügelimaginalscheibe ist ebenfalls zu beobachten. Die Fliegen, die mit LgdΔDM14 1-2 P417A gerettet werden, entwickeln sich nur bis ins Puppenstadium.

Die am C-Terminus der DM14 Domänen vermehrt vorkommenden Proline könnten eine Prolin-reiche Region bilden. PXXP, wobei X für eine beliebige Aminosäure steht, ist z.B. eine minimale Konsensus-Sequenz für SH3-Bindedomänen (Yu et al., 1994). Dieses minimale Motiv ist in den DM14 Domänen zwei, drei und vier zu finden (Abb. 3.14 A). Um eine weitere Aminosäure in dieser möglichen Prolin-reichen Domäne zu untersuchen, die weniger Einfluss auf die Struktur von Lgd hat, wurde auch das Valin (V) an Position 418 mutiert, welches in der dritten DM14 Domäne bis zu den Wirbeltieren konserviert ist und auch in der vierten DM14 Domäne von *Drosophila* vorkommt (Abb. 3.14 A, B). Da Proline einen starken Einfluss auf die Proteinstruktur haben und z.B. als Helixbrecher dienen, wurde V418 gegen Threonin (T), eine Aminosäure gleicher Größe, ausgetauscht, um die Position der Proline möglichst wenig zu beeinflussen.

Das Konstrukt LgdΔDM14 1-2 V418T kann den Verlust von Lgd kompensieren. Die Expression von Wg und Gbe+Su(H) sind wildtypisch (Abb. 3.15 G, G^{I}). Im sensitivierten Hintergrund kann dieses Konstrukt sogar besser retten, als das Ausgangskonstrukt (vgl. Abb 3.15 H, H^{I} und B, B^{I}). In der Antikörperfärbung gegen Wg ist die D/V Grenze deutlich zu erkennen, nach dorsal und ventral ist eine ektopische Aktivierung des Notch-Zielgens detektierbar (Pfeil Abb. 3.15 H). Der Notch-Reporter Gbe+Su(H) ist in jeder Zelle der überproliferierten Imaginalscheibe aktiv, die Expressionsdomäne an der D/V-Grenze ist noch erkennbar (Pfeil Abb. 3.15 H^{I}). Eine Rettung der pupalen Letalität ist allerdings nicht möglich.

Eine Doppelmutante, in der das Prolin an Position 417 zu Alanin und zusätzlich das Valin an Position 418 zu Threonin mutiert ist, kann den Lgd Ausfallphänotyp nicht vollständig retten (*lgdP lgdΔDM14 1-2 P417A, V418T-HA*). Ein intermediärer Phänotyp zwischen der vollständigen Rettung und der Rettung mit dem Konstrukt LgdΔDM14 1-2 P417A ist zu beobachten. In der Wg-Färbung ist eine leichte ektopische Expression ventral der D/V-Grenze zu erkennen (siehe Anhang Pfeil Abb. 9.1 F). Der Notch-Reporter Gbe+Su(H) ist in jeder Zelle der Imaginalscheibe aktiv, die Expression entlang der D/V-Grenze ist deutlich zu sehen (siehe Anhang Abb. 9.1 F^{I}). Es ist eine leichte Überproliferation der Flügelimaginalscheibe zu beobachten. Die Letalität der Fliegen im Puppenstadium kann mit diesem Konstrukt nicht gerettet werden. Der sensitivierte Hintergrund kann mit diesem Konstrukt nicht gerettet werden.

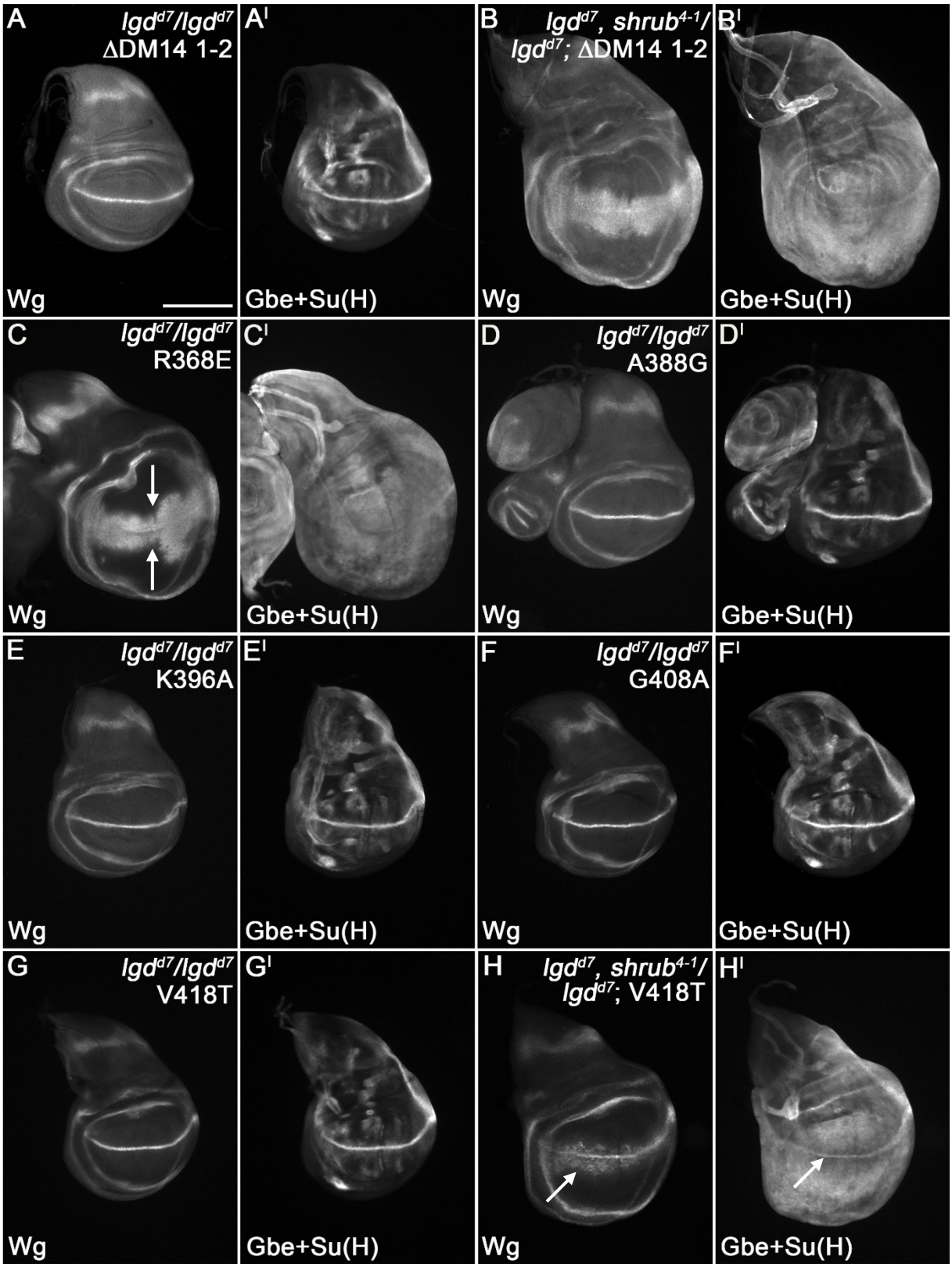
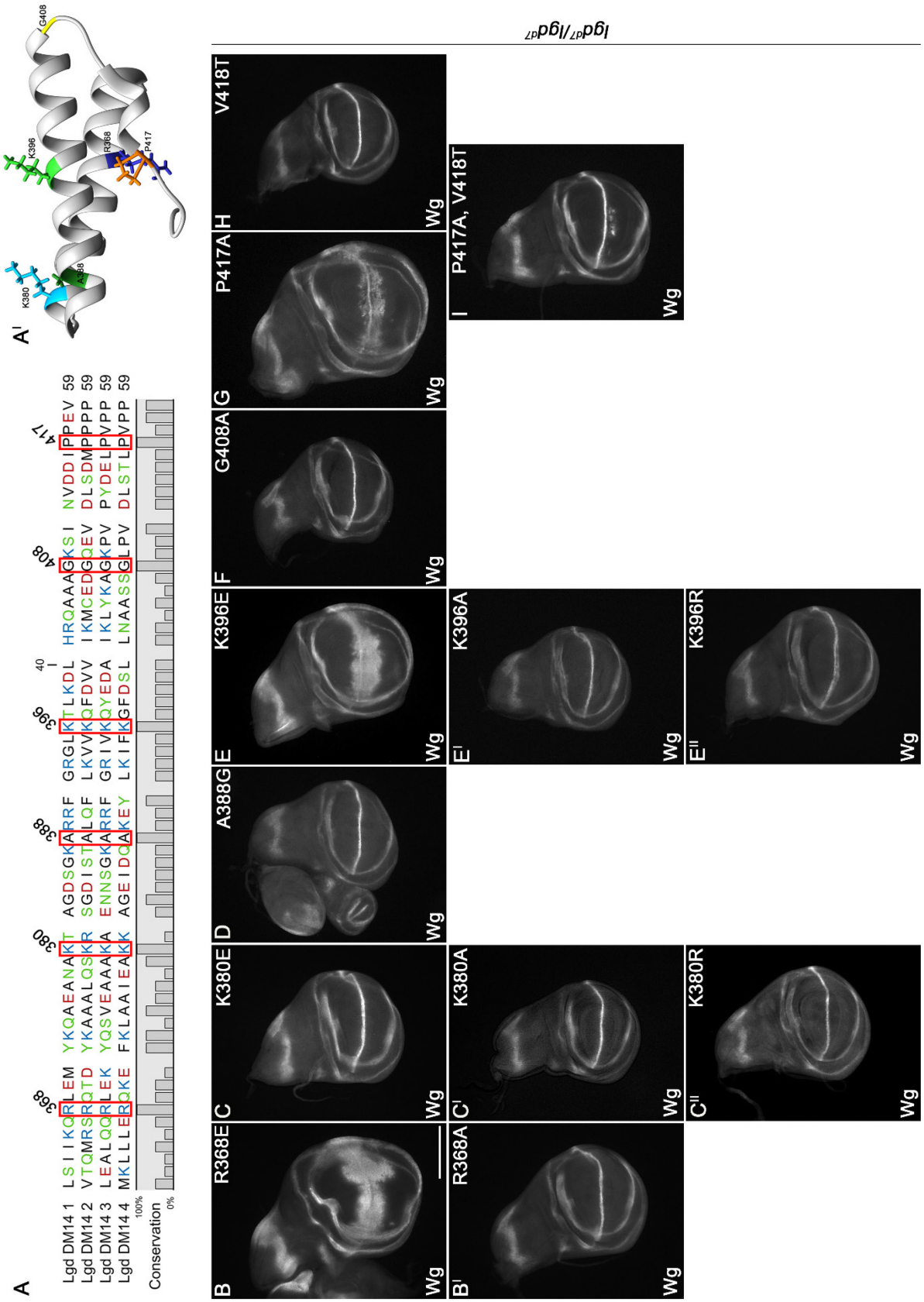


Abb. 3.15: Rettung des *lgd* null-mutanten bzw. sensitivierten Hintergrundes mit Lgd-Deletionskonstrukten, in denen stark konservierte Aminosäuren mutiert sind. Die Expression des endogenen Notch-Zielgens *wg* wird mittels Antikörperfärbung gegen Wg sichtbar (A-H). Die Aktivität des Notch-Signalweges wird auch durch den Notch-Reporter Gbe+Su(H) gezeigt (A^I-H^I). In A und A^I ist die Rettung des *lgd* null-mutanten

Hintergrundes mit dem Ausgangskonstrukt LgdΔDM14 1-2 zu sehen, B und B' zeigen die Rettung des sensitivierten Hintergrundes mit dem gleichen Konstrukt. C bis G' zeigen Rettungen des Verlustes von endogenem Lgd mit den angezeigten mutierten Deletionskonstrukten. In H und H' ist die Rettung des sensitivierten Hintergrundes mit LgdΔDM14 1-2 V418T dargestellt. Die Flügelimaginalscheiben sind so orientiert, dass anterior links und dorsal oben ist. Der Maßstabsbalken in A entspricht 200 µm. Alle Imaginalscheiben wurden bei der gleichen Vergrößerung aufgenommen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Aminosäure nicht essentiell für die Funktion oder Struktur von Lgd sein muss nur, weil sie stark konserviert ist. Starke Veränderungen wie die Ladungsumkehr der Aminosäure, können allerdings zum Funktionsverlust des Proteins führen. Der Prolin-reiche Bereich am Ende der DM14 Domänen scheint wichtig für die Funktionalität der Domänen zu sein.

Abb. 3.16: Zusammenfassung der Ergebnisse zum Austausch konservierter Aminosäuren in der dritten DM14 Domäne von Lgd. A – Aminosäuresequenzvergleich der *Drosophila* Lgd DM14 Domänen. Die in allen Domänen konservierten Aminosäuren sind mit einem Rahmen markiert und mit ihrer Position im vollständigen Protein gekennzeichnet. A' – Kristallstruktur der dritten DM14 Domäne von Lgd. Die betrachteten Aminosäuren sind mit ihren Resten hervorgehoben. PDB Eintrag: 5VNY (McMillan et al., 2017). B-I – Rettung des *lgd* null-mutanten Hintergrundes mit Lgd-Varianten, die auf dem Konstrukt LgdΔDM14 1-2 basieren und zusätzlich eine der angezeigten Aminosäureaustausche tragen. Es ist eine Antikörperfärbung gegen Wg gezeigt. Die Flügelimaginalscheiben sind so orientiert, dass anterior links und dorsal oben ist. Der Maßstabsbalken in B entspricht 200 µm. Die Imaginalscheiben wurden bei der gleichen Vergrößerung aufgenommen.



Bildunterschrift auf S. 69

3.5 Analyse der Wechselwirkung zwischen Lgd und Shrub – Mutationen im Lgd Interaktionspartner Shrub

Das ESCRT-III Protein Shrub ist ein direkter Interaktionspartner von Lgd (Troost et al., 2012). Durch Homooligomerisierung an der endosomale Membran ist Shrub an der Bildung und Abschnürung der intraluminalen Vesikel (ILV) bei der Reifung der Endosomen beteiligt (Übersicht in Teis et al., 2008, Gatta und Carlton, 2019). Diese Polymerisierung erfolgt durch die Bindung der positiv geladenen Kopf-Region eines Monomers an eine negativ geladene Region des vorangegangenen Monomers (Abb. 3.17 A, B, siehe Abb. 1.3 B) (Tang et al., 2015, McMillan et al., 2016). Die in diese Bindung involvierten sauren Aminosäuren dienen ebenfalls als Lgd-Interaktionsstelle in Shrub (vgl. Abb. 3.17 A und Abb. 3.7 B) (McMillan et al., 2017).

Soll die Interaktion zwischen Lgd und Shrub auf der Seite von Shrub durch die Einführung von Mutationen komplementär zu denen in Lgd untersucht werden (siehe 3.2), muss berücksichtigt werden, dass durch die Mutation der Lgd-Interaktionsstelle in Shrub immer auch die Homooligomerisation der ESCRT-III Untereinheit gestört werden kann.

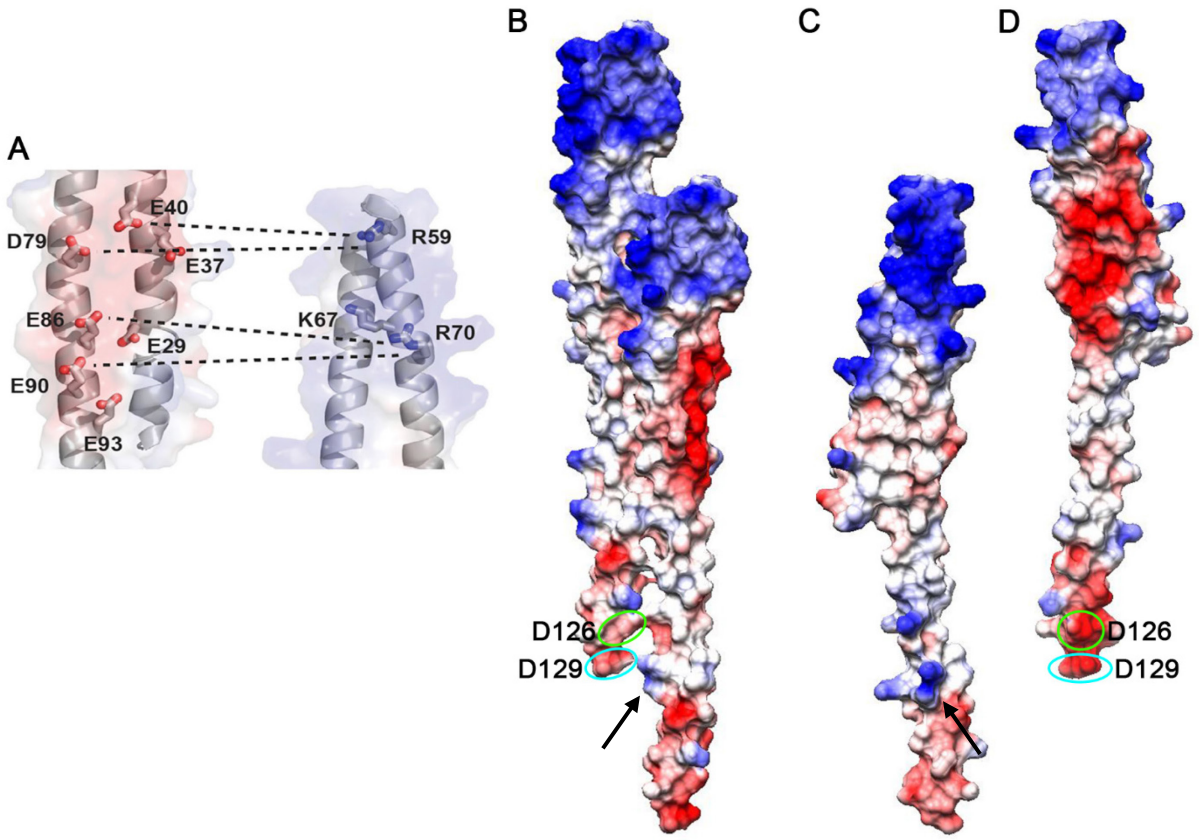


Abb. 3.17: A – Darstellung der an der elektrostatischen Wechselwirkung zwischen zwei aneinander gebundenen Shrub Monomeren beteiligten Aminosäuren (Abbildung aus McMillan et al. (2016)). B-D – Darstellung der Oberflächen-Ladung von zwei interagierenden Shrub Monomeren (B) und einem Shrub Monomer (C, D). B – Die positiv geladene Kopf-Region eines Monomers bindet an eine saure Region des vorangegangenen Monomers. C – Ansicht der basischen Kopfregion von Shrub, gegenüber B ist das zweite Monomer um 90 Grad nach rechts rotiert. D – Ansicht der sauren Region von Shrub, gegenüber B ist das erste Monomer um 90 Grad nach links gedreht. Die Farben repräsentieren die Oberflächen-Ladung: blau – basisch, rot – sauer. Die grünen Markierungen heben D126 hervor, die in cyan D129. Die Pfeile in B und C markieren K113, mit dem D129 interagieren könnte. PDB Eintrag: 5J45 (McMillan et al., 2016).

Der Verlust von Shrub (*shrub*$^{4\text{-}1}$/*shrub*$^{4\text{-}1}$) führt in *Drosophila* zu Letalität im Embryonal-Stadium (Sweeney et al., 2006). Dieser Phänotyp kann durch die Expression von zwei Kopien eines vollständigen Shrub-Transgens (Shrub^{cDNA}), welches unter dem endogenen Shrub Promotor exprimiert wird, gerettet werden (Masterarbeit Bäumers, 2015). Eine Kopie dieses Transgens kann den Phänotyp bis zum Stadium der *pharate adults* retten, d.h. die differenzierten Fliegen scheitern beim Schlüpfen aus der Puppe. Gelegentlich schlüpfen einzelne Adulte (*Escapers*), die allerdings schnell sterben. Wird an dieses Transgen ein myc-Tag angefügt, reduziert sich das Rettungsvermögen leicht. Bei der Rettung des *shrub* null-mutanten Hintergrundes mit zwei Kopien myc-Shrub schlüpfen

fertile Adulte. Bei der Rettung mit nur einer Kopie des Transgens erreichen die Fliegen nur das Puppenstadium (Miriam Bäumers – AG Klein, unveröffentlicht).

Wird eine Aminosäure aus der Interaktionsstelle zu Lgd mutiert, verliert das Transgen die Fähigkeit den Verlust von endogenem Shrub zu kompensieren. Wird D79 zu Lysin mutiert (*shrubP myc-Shrub D79K*), können selbst zwei Kopien des Konstruktes den *shrub* null-mutanten Hintergrund nicht retten (bereits veröffentlicht in McMillan et al., 2016). Um zu bestimmen, ob sich mit myc-Shrub D79K gerettete *Drosophila* weiter entwickeln können, als Shrub-Nullmutanten, die bereits im Embryonalstadium sterben, wurden Eiablagen (siehe 2.3.4) untersucht. Eine deutliche Rettung der Letalität konnte nicht beobachtet werden, es konnten keine frühen L3 Larven beobachtet werden. Eine weitere Eingrenzung der Entwicklungsdauer auf frühere Stadien war auf Grund des Markers Tubby (Tb) bei diesem Versuchsaufbau nicht möglich.

Der gleiche Phänotyp ist bei der Rettung des *shrub* null-mutanten Hintergrundes mit myc-Shrub E86K zu erkennen. Für dieses Transgen wurde die Glutaminsäure an Position 86 zu einem Lysin mutiert. Zwei Kopien des Konstruktes können den Verlust von endogenem Shrub nicht retten und es können keine frühen L3-Larven in Eiablagen beobachtet werden (bereits veröffentlicht in McMillan et al., 2016).

Nach der Mutation des Arginins an Position 59 zu Glutaminsäure in der basischen Polymerisations-Region von Shrub, kann das Transgen myc-Shrub R59E noch immer den Verlust von endogenem Shrub in zwei Kopien kompensieren. Es entwickeln sich fertile Adulte. In einer Kopie ist das Konstrukt allerdings nicht in der Lage die frühe Letalität zu retten. In Eiablagen sind keine frühen L3-Larven zu erkennen.

Bei der Rettung des *shrub* null-mutanten Hintergrundes mit zwei Kopien myc-Shrub R70E können sich ebenfalls Adulte entwickeln. In einer Kopie reicht das Transgen ebenfalls nicht aus, um das endogene Shrub zu ersetzten. Es können keine frühen L3-Larven in Eiablagen beobachtet werden.

Tabelle 3.2: Übersicht über das Rettungsvermögen verschiedener Shrub Transgene, in einer und zwei Kopien im *shurb* null-mutanten Hintergrund. Das mit * markierte Ergebnis wurden bereits veröffentlicht in der Masterarbeit von Miriam Bäumers (2015), mit ** markierte Ergebnisse sind unveröffentlichte Daten von Miriam Bäumers – AG Klein. (Bereits veröffentlicht in McMillan et al., 2016).

	Rettungsvermögen	
Transgene	eine Kopie	zwei Kopien
*shrubP Shrub^{cDNA}**	*pharate adults*, Escapers**	fertile Adulte*
*shrubP myc-Shrub***	*pharate adults***	fertile Adulte**
shrubP myc-Shrub D79K	-	keine frühen L3-Larven
shrubP myc-Shrub E86K	-	keine frühen L3-Larven
shrubP myc-Shrub R59E	keine frühen L3-Larven	fertile Adulte
shrubP myc-Shrub R70E	keine frühen L3-Larven	fertile Adulte

Für das Shrub Ortholog aus *Saccharomyces cerevisiae* Snf7 konnte *in vitro* gezeigt werden, dass durch Mutationen der in die Polymerisation involvierten Regionen die Oligomerisierung von Snf7 unterdrückt werden kann. Werden die sich komplementierenden Mutanten zusammen exprimiert, können *in vitro* wieder Polymere beobachtet werden (Tang et al., 2015).

In Zusammenarbeit mit Denise Isenburg wurde die Expression von sich komplementierenden Shrub Varianten untersucht (Abb. 3.18) (Bachelorarbeit Isenburg, 2018). Die Kristallstruktur von Shrub gibt Hinweise darauf, dass die Aminosäuren R59 und D79 aneinander binden, genau wie R70 und E86 (Abb. 3.18 A) (McMillan et al., 2016). Wie beschrieben, können mutierte Shrub-Varianten einzeln in einer Kopie exprimiert den Verlust von endogenem Shrub nicht retten. Werden nun myc-Shrub R59E und myc-Shrub D79K zusammen exprimiert, erreichen die Fliegen das *pharate adult* Stadium, sie scheitern beim Schlüpfen aus der Puppe (Abb. 3.18 B). Auch eine Kombination aus myc-Shrub R70E und myc-Shrub E86K reicht, um den Verlust von endogenem Shrub bis ins frühe dritte Larvenstadium zu retten (Abb. 3.18 C).

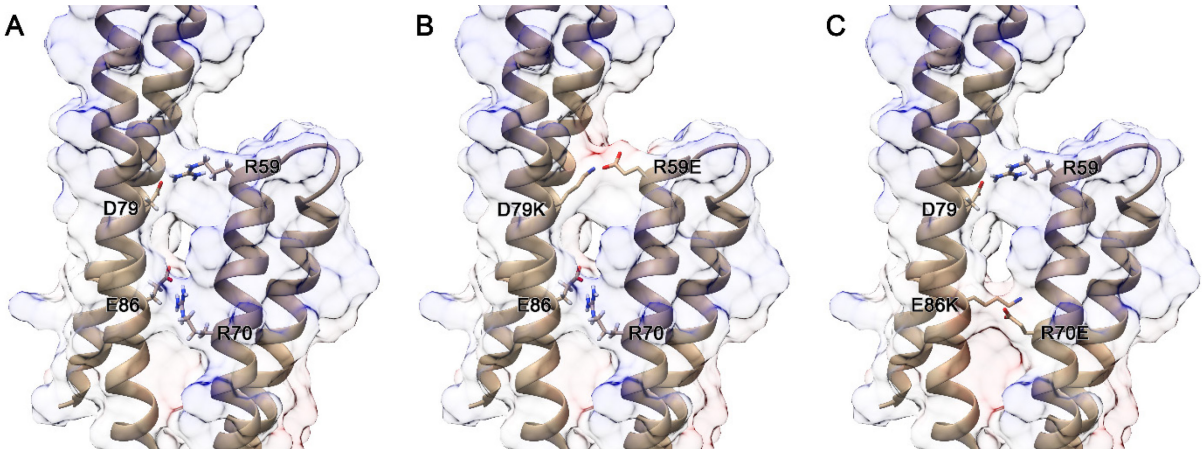


Abb. 3.18: Kristallstruktur von zwei interagierenden Shrub Monomeren. A – In der wildtypischen Situation scheint R59 durch Interaktion mit D79 und R70 durch Interaktion mit E86 zur elektrostatischen Wechselwirkung von zwei Shrub Monomeren beizutragen. B, C – Mit Hilfe der Funktion Rotamers von UCSF Chimera wurden die untersuchten Aminosäureaustausche dargestellt. Bei der Expression der sich komplementierenden Aminosäuren können R39E und D79K interagieren (B) genau wie R70E und E86K (C). Die betrachteten Aminosäuren sind mit ihren Resten dargestellt und markiert. Die Oberflächen-Darstellung der Kristallstruktur ist transparent dargestellt. PDB Eintrag: 5J45 (McMillan et al., 2016).

Durch diese Ergebnisse kann die durch die Kristallstruktur vermutete Interaktion zwischen der basischen Kopfregion und der sauren Region von Shrub bestätigt werden. Die elektrostatische Wechselwirkung zwischen R59 und D79 sowie zwischen R70 und E86 kann bestätigt werden.

Tabelle 3.3: Übersicht über das Rettungsvermögen von zwei sich komplementierenden Shrub-Varianten (Bachelorarbeit Isenburg, 2018).

Kombination von zwei Transgenen	Rettungsvermögen
shrubP myc-Shrub R59E/ shrubP myc-Shrub D79K	*pharate adults*
shrubP myc-Shrub R70E/ shrubP myc-Shrub E86K	frühe L3-Larven

Im Shrub-Polymer berühren sich die Monomere nicht nur an der bereits beschriebenen Interaktionsstelle, sondern auch weiter C-terminal (Markierung, Pfeile Abb. 3.17 B-D). Die Oberflächenladung von Shrub ist hier allerdings weniger stark ausgeprägt. Um zu überprüfen, ob auch diese Aminosäuren zur auf elektrostatischen Wechselwirkungen basierenden intermolekularen Interaktion beitragen, wurden die Asparaginsäuren D126, D129 und D130 zu Argininen mutiert.

Die Shrub Varianten myc-Shrub D126R und myc-Shrub D130R können den Verlust von endogenem Shrub in zwei Kopien kompensieren. Die Fliegen entwickeln sich zu Adulten.

Durch die Mutation der Asparaginsäure an Position 129 (*shrubP myc-Shrub D129R*) verliert das Transgen die Fähigkeit den *shrub* null-mutanten Hintergrund zu retten.

Hier konnte gezeigt werden, dass eine Mutation in der Polymerisations-Region von Shrub nicht zwangsläufig zum Verlust der Proteinfunktion führen muss. Die Auswirkungen der Mutation scheinen vielmehr von der Position innerhalb des Proteins abzuhängen. Die Untersuchung der zweiten Kontaktstelle im Shrub-Polymer zeigt, dass diese für die Funktionalität von Shrub von Bedeutung zu sein scheint.

4 Diskussion

Lethal (2) giant discs (Lgd) ist ein Tumorsuppressor, dessen N-Terminus vier aufeinander folgende DM14 (*Drosophila melanogaster* 14) Domänen ausweist (Ponting et al., 2001, Childress et al., 2006, Gallagher und Knoblich, 2006, Jaekel und Klein, 2006). Diese Domänen sind einzigartig für die Lgd-Proteinfamilie und dienen der direkten Interaktion mit der ESCRT (endosomal sorting complex required for transport)-III Untereinheit Shrub (Troost et al., 2012). Dies konnte auch für die humanen Orthologe von Lgd, CC2D1A und B, und Shrub, CHMP4B, gezeigt werden (Martinelli et al., 2012, Usami et al., 2012). *In vivo* Untersuchungen deuteten darauf hin, dass für die Funktionalität von *Drosophila* Lgd jede Kombination aus zwei DM14 Domänen ausreicht. Es gab Hinweise, dass die zweite DM14 Domäne von besonderer Bedeutung ist (Troost et al., 2012). Die kürzlich aufgeklärte Kristallstruktur zwischen der dritten DM14 Domäne von Lgd und Shrub deutet darauf hin, dass diese Interaktion auf elektrostatischen Wechselwirkungen beruht (McMillan et al., 2017). Auch für die humanen Orthologe CC2D1A und CHMP4B konnten bereits Hinweise auf eine auf Ladung basierende Interaktion gegeben werden (Martinelli et al., 2012). Die Bindung von Lgd und Shrub ist für die volle Funktionalität von Shrub notwendig (Troost et al., 2012).

In dieser Arbeit wurde zunächst eine detaillierte Analyse der DM14 Domänen durchgeführt und anschließend die in der Kristallstruktur aufgezeigte Interaktion *in vivo* überprüft. Auf Grund der Ergebnisse wurde versucht ein minimales Bindemotiv für Shrub zu definieren. In den DM14 Domänen konservierte Aminosäuren wurden auf ihre Relevanz für die vollständige Lgd-Funktion untersucht. Abschließend wurden die für die Polymerisation und auch Interaktion benötigen Regionen des Lgd-Interaktionspartner Shrub untersucht.

4.1 Unterschiede zwischen geradzahligen und ungeradzahligen DM14 Domänen

Die erste Fragestellung dieser Arbeit war - Welche DM14 Domänen sind für die Funktion von Lgd essentiell?

Werden die Sequenz-Identitäten zwischen den DM14 Domänen von *Drosophila* Lgd analysiert, fällt auf, dass sich die ungeradzahligen DM14 Domänen deutlich ähnlicher sind, als die anderen DM14 Domänen untereinander (Tabelle 3.1). Um zu überprüfen, ob es einen funktionellen Unterschied zwischen den geradzahligen und ungeradzahligen

DM14 Domänen gibt, wurden zunächst Rettungsexperimente mit Lgd-Deletionskonstrukten durchgeführt. Diese wurden unter dem endogenen *lgd*-Promotor exprimiert. Das Rettungsvermögen wurde für den *lgd* null-mutanten Hintergrund (lgd^{d7}/lgd^{d7}) und für den sensitivierten Hintergrund, in dem neben dem Verlust von Lgd eine Kopie des *shrub* Gens mutant ist ($lgd^{d7}, shrub^{4-1}/lgd^{d7}$), überprüft.

Hier konnte gezeigt werden, dass ein Konstrukt, welches nur die ungeradzahligen DM14 Domänen trägt (Lgd DM14 1+3), in der Lage ist, sowohl den *lgd* null-mutanten Hintergrund als auch den sensitivierten Hintergrund vollständig zu retten (Abb. 3.3 A-B^{I}) (bereits veröffentlicht in McMillan et al., 2017). Bisher war kein Lgd-Deletionskonstrukt mit nur zwei DM14 Domänen ausreichend, um neben dem Verlust von Lgd die zusätzliche Reduktion von Shrub zu retten (Troost et al., 2012). Ein Deletionskonstrukt, welches nur die zweite und vierte DM14 Domäne trägt (Lgd DM14 2+4), kann hingegen den *lgd* null-mutanten Hintergrund nicht retten (Abb. 3.3 C, C^{I}) (bereits veröffentlicht in McMillan et al., 2017).

In dem Konstrukt Lgd DM14 2+4 wurden ausschließlich die erste und dritte DM14 Domänen deletiert. Der Abstand zwischen den beiden geradzahligen DM14 Domänen ist bei diesem Transgen somit größer, als im endogenen Lgd, da sowohl die Region zwischen der zweiten und dritten als auch zwischen der dritten und vierten DM14 Domäne enthalten ist. Um zu überprüfen, ob das fehlende Rettungsvermögen von Lgd DM14 2+4 auf einen falschen Abstand der DM14 Domänen zurückzuführen ist, wurde das Deletionskonstrukt Lgd DM14 2+4 Δ aa 421-498 analysiert (Abb. 3.4). Eine Verbesserung des Rettungsvermögens nach Korrektur des Abstandes zwischen den DM14 Domänen wurde nicht beobachtet. Da der vergrößerte Abstand im Transgen Lgd DM14 1+3 keine Auswirkungen auf das Rettungsvermögen hat, deuten die Ergebnisse darauf hin, dass der Ausfallphänotyp durch den Verlust der ungeradzahligen DM14 Domänen bedingt ist.

Eine mögliche Funktion der geradzahligen DM14 Domänen kann durch diese Ergebnisse allerdings nicht ausgeschlossen werden. Jedoch könnte diese weniger entscheidend sein, als die Funktion von DM14 Domäne 1 und 3. Der Prozess an dem die geradzahligen Domänen beteiligt sein könnten, könnte durch Lgd effektiver gemacht werden, aber die Funktion der geradzahligen DM14 Domänen nicht zwingend benötigt werden. Der Ausfall der Domänen hätte in diesem Fall keinen starken Phänotyp.

Für das humane Lgd-Ortholog CC2D1B konnte kürzlich gezeigt werden, dass die vierte DM14 Domäne wichtig für die Interaktion mit dem ESCRT-III ähnlichen Protein CHMP7

ist (Ventimiglia et al., 2018). CHMP7 ist involviert in den Verschluss der Kernhülle nach der Zellteilung (Vietri et al., 2015, Olmos et al., 2016). Der Ausfall von *Dchmp7* in *Drosophila* zeigt keinen mutanten Phänotyp. Erst der gleichzeitige Verlust von *Dchmp7* und *lgd* führt zu einem stärkeren Phänotyp, als der Verlust von *lgd* alleine (Miriam Bäumers – AG Klein, unveröffentlicht). Auch in *Drosophila* könnte somit die vierte DM14 Domäne für die spezifische Interaktion mit DChmp7 benötigt werden. Bei der Analyse von Lgd DM14 1+3 wird kein mutanter Phänotyp, bedingt durch den Verlust der Interaktion mit DChmp7, erwartet, da selbst der Verlust von *Dchmp7* keinen mutanten Phänotyp zeigt.

Um die geradzahligen DM14 Domänen weiter zu untersuchen, wurden Deletionskonstrukte erzeugt, die entweder nur die erste (Lgd DM14 1) oder nur die dritte DM14 Domäne (Lgd DM14 3) besitzen. Beide Konstrukte können die Funktion von endogenem Lgd im *lgd* null-mutanten Hintergrund vollständig ersetzen (Abb 3.4 E, E^{I} und G, G^{I}) (bereits veröffentlich in McMillan et al., 2017). Im Gegensatz dazu können dies weder die zweite noch die vierte DM14 Domäne von Lgd alleine (Troost et al., 2012, Troost, 2013).

Mittels Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (engl. *surface plasmon resonance spectroscopy*, kurz SPR)-Messungen konnte *in vitro* gezeigt werden, dass Shrub mit einem Lgd Fragment aus dritter und vierter DM14 Domäne und einem Fragment mit der dritten DM14 Domäne alleine interagieren kann. Eine Interaktion mit der vierten DM14 Domäne alleine konnte hingegen nicht detektiert werden (McMillan et al., 2017). Dies zeigt, dass die geradzahligen DM14 Domänen nicht in die direkte Interaktion mit Shrub involviert sind. Die Bindung von Lgd an Shrub scheint ausschließlich über die ungeradzahligen DM14 Domänen zu geschehen. Auch für das humane Ortholog CC2D1A konnte gezeigt werden, dass die Interaktion mit CHMP4B über die dritte DM14 Domäne vermittelt wird (Martinelli et al., 2012, Usami et al., 2012).

Das Rettungsvermögen von Lgd DM14 1 und Lgd DM14 3 im sensitivierten Hintergrund ist vergleichbar mit dem von LgdΔDM14 1-2 (vgl. Abb. 3.3 F, F^{I}, H, H^{I} und Abb. 3.2 F, F^{I}) (bereits veröffentlich in McMillan et al., 2017). Dies deutet darauf hin, dass das Rettungsvermögen von LgdΔDM14 1-2 auf die Präsenz der dritten DM14 Domäne zurückzuführen ist. Bei der Rettung im sensitivierten Hintergrund mit Lgd DM14 3 scheint die ektopische Wingless (Wg)-Expression stärker zu sein. Die Unterschiede im Rettungsvermögen von Lgd DM14 1 und Lgd DM14 3 könnten auf die Variabilität des Lgd-Ausfallphänotyps zurückzuführen sein, sie könnten aber auch darauf hindeuten, dass die dritte

DM14 Domäne von größerer Bedeutung ist. Untersuchungen im vollständigen Protein geben auch Hinweise darauf, dass die dritte DM14 Domäne wichtiger für die Funktion von Lgd ist. So kann ein vollständiges Lgd-Transgen mit einer Mutation in der ersten DM14 Domäne, die die Interaktion mit Shrub verhindert, den sensitivierten Hintergrund vollständig retten, ein Lgd-Konstrukt mit entsprechender Mutation in der dritten DM14 Domäne hingegen rettet nicht (Bachelorarbeit Korfmacher, 2017, McMillan et al., 2017). Um zu überprüfen, ob zwei ungeradzahlige DM14 Domänen ausreichen, um den Lgd-Ausfall vollständig zu retten, wurde ein Konstrukt erzeugt, dass zweimal die dritte DM14 Domänen trägt. Das Rettungsvermögen im sensitivierten Hintergrund ist gegenüber den Konstrukten mit einer ungeradzahligen DM14 Domäne verbessert, es ist jedoch keine vollständige Rettung wie bei dem Lgd-Deletionskonstrukt Lgd DM14 1+3 zu beobachten (Abb. 3.5) (bereits veröffentlich in McMillan et al., 2017). Dies deutet darauf hin, dass die beiden ungeradzahligen DM14 Domänen sowohl gemeinsame als auch exklusive Funktionen vermitteln. Um auszuschließen, dass nicht nur die erste DM14 Domäne zusätzlich Funktionen besitzt, könnte ein Lgd-Deletionskonstrukt mit zwei ersten DM14 Domänen auf sein Rettungsverhalten überprüft werden. Eine vollständige Rettung würde darauf hinweisen, dass nur die erste DM14 Domäne weitere Funktionen, im Vergleich zur dritten Domäne, besitzt.

Vorherige Untersuchungen haben gezeigt, dass vier DM14 Domänen für die Robustheit der Funktionalität von Lgd sorgen (Troost et al., 2012). Die Ergebnisse dieser Arbeit heben vor allem die Wichtigkeit der ungeradzahligen DM14 Domänen für die Funktion von Lgd hervor. Die dritte DM14 Domäne scheint hierbei von besonderer Bedeutung zu sein. In der Sequenz ähneln sich die ungeradzahligen DM14 Domänen untereinander deutlich mehr, als im Vergleich zu den anderen DM14 Domänen (Tabelle 3.1). Ein größerer Unterschied könnte ein Hinweis darauf sein, dass die geradzahligen DM14 Domänen unterschiedliche Funktionen besitzen. Da für die zweite DM14 Domäne noch keine spezifische Funktion beobachtet werden konnte, könnte der größere Unterscheid zwischen den geradzahligen DM14 Domänen auch dafür sprechen, dass die zweite Domäne ohne eine essentielle Funktion immer weiter mutiert ist und daher immer unähnlicher wurde.

4.2 Mutationen in der Shrub-Interaktionsstelle

Durch die Kristallstruktur des Bindungs-Komplexes der dritten DM14 Domäne von Lgd und Shrub gibt es Hinweise darauf, welche Aminosäuren an der direkten Bindung beider Proteine beteiligt sind. Die Interaktion von Lgd und Shrub scheint auf elektrostatischen Wechselwirkungen zu beruhen (McMillan et al., 2017).

Bei der Analyse eines Aminosäuresequenzvergleiches der *Drosophila* DM14 Domänen fällt auf, dass alle für die Interaktion mit Shrub benötigten Aminosäuren nur in den ungeradzahligen Domänen vorkommen (Abb. 3.6). Dies deutet darauf hin, dass für die Lgd spezifische Funktion, die Interaktion mit der ESCRT-III Untereinheit Shrub, nur die ungeradzahligen DM14 Domänen benötigt werden.

In dieser Arbeit sollte auch überprüft werden, ob die *in vitro* in der Kristallstruktur der Interaktion von DM14 3 und Shrub beobachtete Wechselwirkung auch *in vivo* bestätigt werden kann. Hierzu wurden Rettungsexperimente mit Lgd-Deletionskonstrukten durchgeführt, in denen einzelne Aminosäuren der Shrub-Interaktionsstelle mutiert wurden.

Zunächst wurden die Auswirkungen der Ladungsumkehr betrachtet. Hierzu wurden die basischen Aminosäuren in Lgd durch Glutaminsäuren (E) ersetzt. Das Kontroll-Konstrukt LgdΔDM14 1-2 K380E zeigt, dass eine Ladungsumkehr im Protein nicht zwangsläufig zum Funktionsverlust führen muss (Abb. 3.8 B, B^{I}). Eine Mutation zu Glutaminsäure in der Interaktionsstelle zu Shrub führt hingegen in jedem Fall zum Verlust des Rettungsvermögens (Abb. 3.8). Die fehlende Rettung ist vermutlich darauf zurückzu-führen, dass die Aminosäuren in der Interaktionsstelle zwischen Lgd und Shrub nach der Mutation an einer Stelle nun die gleiche Ladung besitzen und sich dadurch abstoßen, wodurch die Interaktion gestört wird. Hervorzuheben ist hierbei, dass diese Störung auftritt, egal ob eine Aminosäure am Rand der Interaktionsstelle oder in der Mitte mutiert wurde. Dies spricht dafür, dass die Bindung zwischen Lgd und Shrub fein reguliert ist. Bei der Ladungsumkehr einer Aminosäure kann auch die Oberflächenladung in ihrem Umfeld verändert werden. Dies könnte die elektrostatische Wechselwirkung in einem solchen Grade reduzieren, dass die Interaktion beider Proteine nicht mehr möglich ist.

Die ektopische Wg-Aktivierung bei der Rettung mit LgdΔDM14 1-2 R389E scheint geringer zu sein, als bei den anderen Mutationen in der Shrub-Interaktionsstelle (Abb. 3.8 D, D^{I}). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass das Rettungsvermögen dieses Konstruktes etwas besser ist. Die Aminosäure R389 befindet sich in der Kristallstruktur

am Rand der Interaktionsstelle (siehe Abb. 3.7 D). Die abstoßende Ladung könnte sich somit von der Interaktionsstelle wegbiegen und würde die Bindung beider Proteine weniger stark stören. Die Messung der Affinität der unterschiedlichen Mutanten zu Shrub könnte diese Theorie überprüfen. Hierfür könnte beispielsweise SPR oder Microscale Thermopherese (MST) angewendet werden. Eine stärkere Affinität der R389E Variante im Vergleich zu den anderen Mutanten würde darauf hindeuten, dass sich die entgegengesetzte Ladung von der Interaktionsstelle weg biegt.

Neben der Ladungsumkehr wurde auch das Neutralisieren der Ladung in der Interaktionsstelle betrachtet (Abb. 3.9) (bereits veröffentlicht in McMillan et al., 2017). Hierbei zeigt sich, dass der Verlust der Ladung an einer Stelle bereits ausreichend ist, um die Interaktion zwischen Lgd und Shrub zu stören. Die Bindung beider Proteine scheint relativ schwach zu sein und bereits minimale Veränderungen in der Oberflächenladung können zum Verlust der Interaktion führen. Die verbleibende Ladung scheint für eine elektrostatische Wechselwirkung mit Shrub nicht auszureichen. SPR Messungen zeigen, dass es durch die Mutation des Arginins (R) an Position 393 zu Alanin (A) zum Verlust der Interaktion zwischen der dritten DM14 Domäne von Lgd und Shrub kommt (McMillan et al., 2017).
Für das Konstrukt LgdΔDM14 1-2 R389E konnte ein minimal besseres Rettungsvermögen beobachtet werden, als für die anderen Mutationen in der Interaktionsstelle. Dies trifft nicht für die Mutation zu Alanin an dieser Stelle zu (Abb. 3.9 D, D^{I}). Dies könnte damit erklärt werden, dass eine Glutaminsäure eine größere Seitenkette besitzt, die sich durch die entgegengesetzte Ladung von der Interaktionsstelle wegbiegen kann, durch die Mutation zu Alanin hingegen wird die Ladung nur entfernt.

Abschließend wurde für die Shrub-Interaktionsstelle untersucht ob an den entscheidenden Positionen eine basische Ladung per se benötigt wird oder sogar eine bestimmte Aminosäure.
Die Mutation der betrachteten Lysine (K) zu Arginin hat keinen Einfluss auf das Rettungsvermögen des *lgd* null-mutanten Hintergrundes der Transgene im Vergleich zum Ausgangskonstrukt (Abb. 3.10 B-C^{I}) (Masterarbeit Benscheidt, 2013). Ein Arginin an Position 387 stört somit trotz größerer Seitenkette die Interaktion zu Shrub nicht. Im

sensitivierten Hintergrund ist bei diesem Konstrukt sogar ein besseres Rettungsvermögen als bei der Kontrolle LgdΔDM14 1-2 zu beobachten (Abb. 3.10 H, H[I]). Dies deutet darauf hin, dass durch das eingeführte Arginin die Interaktion zu Shrub verbessert wird.
Wird hingegen ein Arginin zu Lysin mutiert, kann ein schwacher Lgd-Ausfallphänotyp bei der Rettung des *lgd* null-mutanten Hintergrundes beobachtet werden (Abb. 3.10 D-F[I]). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass durch die Mutation zu Lysin die Affinität von Lgd zu Shrub herabgesetzt wird. Dies könnte mittels SPR und MST überprüft werden. Da ein Arginin zwei Aminogruppen und ein Stickstoff Atom mit freiem Elektronenpaar besitzt, mit denen es drei Salzbrücken ausbilden könnte, ein Lysin hingegen nur eine Aminogruppe besitzt und damit nur eine Salzbrücke ausbilden kann, könnte die Interaktion von Lgd und Shrub durch den Austausch von Arginin zu Lysin durch die reduzierte Wechselwirkung geschwächt sein. Gegenteiliges könnte für den Austausch K387R gelten.

Durch diese Untersuchungen kann die mögliche Art der Interaktion zwischen Lgd und Shrub *in vivo* bestätigt werden. Es sind genau die Aminosäuren auch *in vivo* an der Wechselwirkung beider Proteine beteiligt, die durch die Kristallstruktur aufgezeigt wurden. Dies zeigt, wie fein reguliert die Interaktion der beiden Proteine ist.
Die auf elektrostatischen Wechselwirkungen beruhende Interaktion scheint bis in die humanen Proteine konserviert zu sei. So konnte für CC2D1A gezeigt werden, dass eine Gruppe von sieben Aminosäuren wichtig für die Interaktion mit CHMP4B ist, von denen drei auch in der Interaktionsstelle von Lgd zu finden sind. Des Weiteren konnten Mutationen in CHMP4B, die die Ladung umkehren, die Interaktion zu CC2D1A unterbinden (Martinelli et al., 2012). Ein weiterer Hinweis auf die Konservierung der Interaktions-Art ist die Rettung des *lgd* null-mutanten Hintergrundes mit den humanen Orthologen CC2D1A und CC2D1B (Drusenheimer et al., 2015).

Da Lgd zwei DM14 Domänen besitzt, an die Shrub binden kann, bleibt die Frage, wie viele Monomere tatsächlich an wildtypisches Lgd binden. *In vitro* zeigen die humanen Orthologe CC2D1A und CHMP4B eine 1:1 Bindung von einer DM14 Domäne mit CHMP4B (Martinelli et al., 2012). Die hier durchgeführten detaillierten Untersuchungen der DM14 Domänen deuten darauf hin, dass zwei Shrub Monomere von Lgd gebunden werden

können. So ist im sensitivierten Hintergrund keine vollständige Rettung zu beobachten, wenn nur eine ungeradzahlige Domäne vorhanden ist. Hier ist nur eine 1:1 Bindung zwischen dem Transgen und Shrub möglich. Das Konstrukt Lgd DM14 1+3 hingegen kann in beiden Hintergründen vollständig retten. Hier stehen zwei DM14 Domänen mit endogener Shrub-Interaktionsstelle für die Bindung an Shrub zur Verfügung, wie im wildtypischen Protein. Um die Stöchometrie der Lgd-Shrub-Bindung experimentell aufzudecken, könnte die isotherme Titrationskalometrie (ITC) oder MST als *in vitro* Methode dienen.

4.3 Definition eines minimalen Shrub-Bindemotives

In dieser Arbeit wurde auch untersucht, ob das nur in den ungeradzahligen DM14 Domänen vorkommende KARR Motiv, mit dem K387 und den Argininen R389 und R390 in der dritten DM14 Domäne, als minimales Shrub-Bindemotiv verwendet werden kann. An der R393-entsprechenden Position besitzen alle DM14 Domänen eine basische Aminosäure. Wie zuvor wurden die generierten Konstrukte in Rettungsexperimenten überprüft.

Im vollständigen Lgd wurde in beide geradzahligen DM14 Domänen das putative minimale Bindemotiv eingeführt. Das Konstrukt Lgd DM14 2+4 KARR kann den Verlust von endogenem Lgd ausgleichen (Abb. 3.13 C, C^{I}). Eine geradzahlige DM14 Domäne mit eingeführtem KARR Motiv kann weder in einer noch in zwei Kopien retten (Abb. 3.13 F, F^{I} und H, H^{I}).

Somit reicht das KARR Motiv alleine nicht aus, damit das Transgen mit Shrub interagieren kann. Eine Störung der endogenen Interaktion durch dieses Motiv wurde allerdings auch nicht beobachtet, wie die Expression von Lgd DM14 2+4 KARR zeigt (Abb. 3.13 D, D^{I}). Die vorhandenen ungeradzahligen DM14 Domänen können mit Shrub interagieren und die Rettung des Lgd-Ausfall-Phänotyps vermitteln. Die fehlenden Rettungen für LgdΔDM14 1-3 DM14 4 KARR und Lgd DM14 2+4 DM14 2+4 KARR könnten dadurch erklärt werden, dass die Untersuchungen der Shrub-Interaktionsstelle in der dritten DM14 Domäne gezeigt haben, dass an Position 393 für eine vollständige Rettung ein Arginin benötigt wird und dass ein Lysin, wie es in der zweiten und vierten DM14 Domäne an dieser Position vorkommt, nicht ausreicht. Um zu überprüfen, ob die Kompetenz des minimalen Shrub-Bindemotivs verbessert werden kann, wurde zusätzliche die Mutationen K291R und K530R in der zweiten und vierten DM14 Domäne vorgenommen. Eine Verbesserung

des Rettungsvermögens war allerdings nicht zu beobachten (Thomas Breuer – AG Klein, unveröffentlicht).

Der Austausch von K 387 in der dritten DM14 Domäne zu Arginin (LgdΔDM14 1-2 K387R) hat gezeigt, dass es zu einer Verbesserung des Rettungsvermögens im Vergleich zur Kontrolle kommt (siehe 4.2). Um die Interaktion zwischen Lgd und Shrub zu verstärken, könnte das Lysin innerhalb des KARR Motivs zu Arginin ausgetauscht werden. Das so entstandene RARR Motiv könnte in den geradzahligen DM14 Domäne ausreichen, um mit Shrub zu interagieren.

Das fehlende Rettungsvermögen der hier betrachteten Konstrukte könnte auch an der falschen Oberflächen- oder intermolekularen Ladung im Umfeld des eingeführten KARR Motivs liegen. So befindet sich in der vierten DM14 Domäne an Position 523 eine Asparaginsäure (D), direkt N-terminal des eingeführten Motivs. Diese könnte die für die Bindung an Shrub benötigte positive Oberflächenladung zum Teil neutralisieren. In den ungeradzahligen DM14 Domänen wird die Shrub-Interaktionsstelle von ungeladen Aminosäuren eingerahmt, auch dies trifft nicht für die veränderten DM14 Domänen zu (Abb. 3.6). Durch gezielte Mutationen in den geradzahligen DM14 Domänen könnte versucht werden, ein funktionales minimales Shrub-Bindemotiv zu erhalten.

Eine weitere Erklärung für das fehlende Rettungsvermögen könnte die unterschiedliche Aminosäure-Sequenz der nicht Shrub-bindenden Helix der ungeradzahligen DM14 Domänen sein. Diese könnte dafür sorgen, dass das eingeführte KARR Motiv nicht wie in den ungeradzahligen DM14 Domänen an der Oberfläche von Lgd präsent ist und so keine Bindung an Shrub möglich ist. Die Interaktion beider Proteine kann bereits durch kleinste Veränderungen gestört werden, wie bereits in dieser Arbeit gezeigt wurde (siehe 4.2).

Die hier gezeigten Ergebnisse machen deutlich, dass für die Interaktion zwischen Lgd und Shrub mehr wichtig zu sein scheint, als die direkt an der Interaktion beteiligten Aminosäuren. Ob ein minimales Shrub-Bindemotiv definiert werden kann, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

4.4 Mutationen an konservierten Positionen

Zwischen den Lgd DM14 Domänen gibt es sechs konservierte Aminosäuren. An vier Positionen sind diese sogar bis zu den humanen Orthologen konserviert (Abb. 3.14 A, B). Die Bedeutung dieser Aminosäuren für die Lgd Funktionalität wurde in dieser Arbeit in

Rettungsexperimenten untersucht. Der hohe Grad an Konservierung scheint jedoch nicht zwangsläufig auf eine hohe Relevanz für die Protein-Funktion oder -Struktur hinzudeuten.

Für die hier betrachteten basischen Aminosäuren zeigt sich, dass eine Ladungsumkehr zum Verlust des Rettungsvermögens des Konstruktes führen kann (Abb. 3.8 B, B^{I}; Abb. 3.15 C, C^{I}; Abb. 9.1 B, B^{I}). Die Position der Aminosäure innerhalb der Proteindomäne scheint hierbei entscheidend zu sein. So ist K380 in der DM14 Domäne an der Oberfläche lokalisiert (Abb. 4.1 A und B). Nach einer Mutation zu Glutaminsäure ist auch diese an der Oberfläche der Domäne lokalisiert und stört so die Integrität der Proteindomäne nicht. Das Konstrukt kann den *lgd* null-mutanten Hintergrund retten. Im Gegensatz dazu ist das R368 eher innerhalb der DM14 Domäne lokalisiert (Abb. 4.1 C). Die Mutation zu Glutaminsäure an dieser Position könnte einen Einfluss auf die Faltung der DM14 Domäne haben. Durch die zusätzliche negative Ladung könnte sogar die Shrub-Bindestelle beeinflusst werden. Auch die Mutation K396E resultiert im Verlust des Rettungsvermögens des Lgd-Deletionskonstruktes (siehe Anhang Abb. 9.1 B, B^{I}). Diese Aminosäure liegt allerdings in direkter Nähe zur Shrub-Interaktionsstelle (Abb. 4.1 D). Es ist somit wahrscheinlich, dass es in dem Konstrukt LgdΔDM14 1-2 K396E zur partiellen Neutralisation der Oberflächenladung und damit zur Störung der Interaktion zu Shrub kommt.

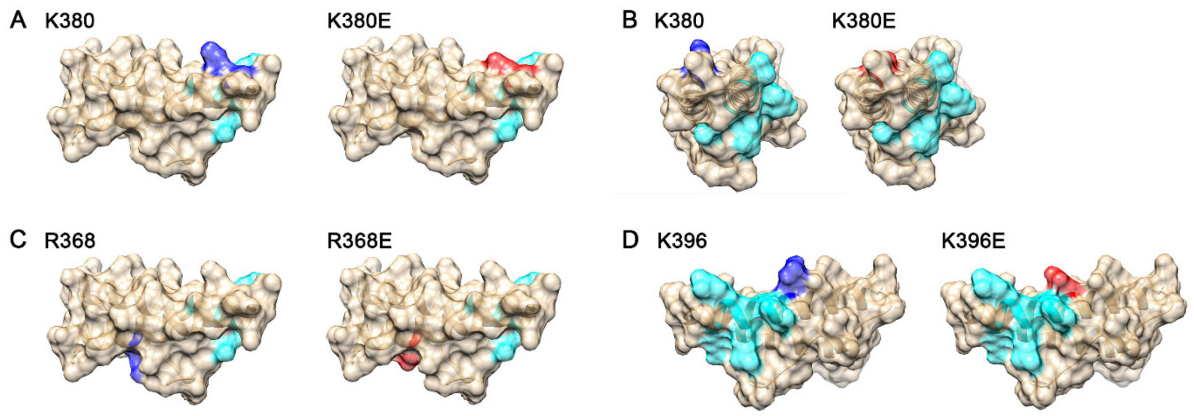


Abb. 4.1: Oberflächen-Darstellung der Kristallstruktur der dritten DM14 Domäne von *Drosophila*. Die Aminosäuren der Shrub-Interaktionsstelle sind in cyan dargestellt. Die hier betrachteten basischen Aminosäuren sind in blau zu sehen. Mit Hilfe der Funktion Rotamers von USCF Chimera wurden die basischen Aminosäuren durch Glutaminsäuren ausgetauscht. Die dargestellten Positionen entsprechen dem wahrscheinlichsten Aufenthaltsort. Die Glutaminsäuren sind in rot dargestellt. A – Ansicht der N-terminalen Helix der dritten DM14 Domäne. Betrachtet wird K380. B – Ansicht A um 90 Grad nach links gedreht. C- Gleiche Ansicht wie A. Es wird R368 betrachtet. D – Ansicht der C-terminalen Helix der dritten DM14 Domäne, Ansicht A um 180 Grad gedreht. K396 wird hier betrachtet. PDB Eintrag: 5VNY (McMillan et al., 2017).

Andere Mutationen an den konservierten Positionen haben nur in zwei Fällen eine Auswirkung auf das Rettungsvermögen der Lgd-Deletionskonstrukte. Bei dem Konstrukt LgdΔDM14 1-2 R393A, K396A, in dem an zwei Positionen ein Alanin eingeführt wurde, ist keine Rettung des *lgd* null-mutanten Hintergrundes zu beobachten (siehe Anhang Abb. 9.1 D, D^{I}). Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass an Position 393 ein Arginin für die vollständige Funktion von Lgd benötigt wird (siehe 4.2).

Die Mutation P417A führt zu einer Reduktion des Rettungsvermögens (siehe Anhang Abb. 9.1 E, E^{I}) (Masterarbeit Benscheidt, 2013). Dieses Prolin (P) scheint somit wichtig für die Struktur der DM14 Domäne zu sein, da Proline häufig als Helixbrecher dienen. Um dies zu überprüfen, wäre eine Kristallstruktur des vollständigen Proteins hilfreich, da die bisher bekannte Struktur bald nach P417 aufhört.

P417 ist das erste in einer Prolin-reichen Sequenz in der dritten DM14 Domäne, die möglicherweise eine sogenannten Prolin-reiche Domäne sein könnte. Für eine Art SH3-Bindedomänen lautet die minimale Konsensussequenz PXXP, wobei X für eine beliebige Aminosäure steht (Yu et al., 1994). Auf das betrachtete P417 folgen in der Aminosäuresequenz der dritten DM14 Domäne ein Valin (V) und zwei weitere Proline.

Die gleiche bzw. eine ähnliche Sequenz ist ebenfalls in der zweiten und vierten DM14 Domäne von *Drosophila* Lgd und sogar in der zweiten bis vierten DM14 Domäne von humanem CC2D1A und in der zweiten und dritten DM14 Domäne von humanem CC2D1B zu finden (Abb. 3.14 B). Um eine weitere Aminosäure in der möglichen Prolin-reichen Domäne zu untersuchen, wurde auch V418 mutiert. Um die mögliche Funktion der Proline als Helixbrecher nicht zu stören, wurde an diese Position eine Aminosäure ähnlicher Größe eingeführt. Durch die Mutation zu Threonin (T) wird das Rettungsvermögen im *lgd* null-mutanten Hintergrund nicht beeinträchtigt. Im sensitivierten Hintergrund kann dieses Transgen sogar besser retten als das Kontrollkonstrukt (Abb. 3.15 G-H^{I}). Ein ähnlicher Effekt ist auch bei der Doppelmutante LgdΔDM14 1-2 P417A, V418T im *lgd* null-mutanten Hintergrund zu beobachten. So ist hier ein besseres Rettungsvermögen als bei LgdΔDM14 1-2 P417A zu sehen, allerdings keine vollständige Rettung (vgl. Abb. 9.1 E, E^{I} und F, F^{I}). Durch das Einführen einer polaren Aminosäure in diese Sequenz scheint sich die Funktionalität von Lgd sogar zu verbessern. In DM14 Domänen mit einer PXXP Sequenz kommen allerdings keine polaren Aminosäuren an den beliebigen Stellen der Sequenz vor. Ob die PXXP Sequenzen wirklich als SH3-Bindedomänen dienen oder ob sie andere Funktionen vermitteln, muss in weiteren Untersuchungen gezeigt werden. Die hier gewonnenen Ergebnisse deuten allerdings darauf hin, dass die Sequenzen am Ende der DM14 Domänen entscheidend für die volle Funktion von Lgd sind. Da eine PXXP Sequenz in der ersten DM14 Domäne fehlt, könnte dies ein Anhaltspunkt für die Untersuchung der unterschiedlichen Funktionen der beiden ungeradzahligen DM14 Domänen sein.

Die Ergebnisse für die Konstrukte, in denen die konservierten, basischen Aminosäuren zu Alanin mutiert wurden, sprechen dafür, dass die positive Ladung für die Funktionalität von Lgd an den Positionen R368, K380 und K396 nicht benötigt wird (Abb. 9.1 A, A^{I}; Abb. 3.9 B, B^{I}; Abb. 3.15 E, E^{I}) (Masterarbeit Benscheidt, 2013, bereits veröffentlicht inMcMillan et al., 2017). Die Vergrößerung der Seitenkette scheint an Position 396 auch keine Auswirkungen auf das Rettungsvermögen zu haben (siehe Anhang Abb. 9.1 C, C^{I}) (Masterarbeit Benscheidt, 2013).
Auch wenn durch die Mutation zu Glycin (G) an Position 388 und zu Alanin an Position 408 keine Beeinträchtigung des Rettungsvermögens beobachtet wurde, könnten die endogenen Aminosäuren trotzdem für die Struktur von Lgd wichtig sein, da es durch diese

Austausche kaum zu einer Veränderung der Größe der Aminosäuren kommt (Abb. 3.15 D, D^I und F, F^I).

4.5 Mutationen im Lgd-Interaktionspartner Shrub

Die Funktion des Lgd-Interaktionspartners Shrub besteht u.a. darin, an der endosomalen Membran zu polymerisieren und bei der Abschnürung der intraluminalen Vesikel (ILV) mitzuwirken (Teis et al., 2008). Die Oligomerisierung von Shrub beruht dabei, wie die Interaktion mit Lgd, auf elektrostatischen Wechselwirkungen (Tang et al., 2015, McMillan et al., 2016). Die saure Region, die für die Polymerisation benötigt wird, ist dabei gleichzeitig die Interaktionsstelle für Lgd (McMillan et al., 2017).

Eine Analyse der Interaktion zwischen Lgd und Shrub, durch gezielte Mutationen der ESCRT-III Untereinheit, beeinflusst immer auch die Polymerisation von Shrub. Die hier untersuchten Transgene, die jeweils eine Mutation tragen, wurden im *shrub* null-mutanten Hintergrund (*shrub*$^{4\text{-}1}$/*shrub*$^{4\text{-}1}$) auf ihr Rettungsvermögen überprüft. Wird die saure Region, die sowohl für die Oligomerisierung als auch für die Interaktion mit Lgd benötigt wird, an einzelnen Positionen so mutiert, dass sich die Ladung umkehrt, führt dies zum Funktionsverlust von Shrub (bereits veröffentlich in McMillan et al., 2016). Dies könnte entweder auf das Neutralisieren der Oberflächen-Ladung an einem Monomer zurückzuführen sein oder auch auf das gegenseitige Abstoßen von zwei Monomere auf Grund der gleichen Ladung. Eine Polymerisierung von Shrub würde so verhindert. Darüber hinaus wird vermutlich die Interaktion mit Lgd gestört. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass Shrub E86R nicht mehr mit der dritten DM14 Domäne interagieren kann (McMillan et al., 2017).

Obwohl wie beschrieben, die Oligomerisierung von Shrub auf elektrostatischen Wechselwirkungen basiert, führt die Ladungsumkehr in der basischen Kopfregion von Shrub nicht zum Funktionsverlust. Bei der Polymerisierung dieser Shrub Varianten kann sich die entgegengesetzte Ladung vermutlich auf Grund der Position im Protein wegbiegen und stört die Interaktion beider Monomere nicht.

Dass der Funktionsverlust der Mutanten in der sauren Region auf die mangelnde Polymerisation zurückzuführen ist, zeigen unter anderem *in vitro* Experimente. Bei Mutanten des Shrub Orthologs Snf7, bei denen basische Aminosäuren zu sauren mutiert wurden und umgekehrt, konnte keine Polymerisierung beobachtet werden. Wurden beide Mutanten zusammen untersucht, kam es zur Oligomerisierung, was darauf

schließen lässt, dass sich Heteropolymere gebildet haben (Tang et al., 2015). Ähnliches konnte auch *in vivo* in *Drosophila* beobachtet werden. So kann die Expression von zwei komplementierenden Shrub Varianten zusammen den Verlust von Shrub besser retten, als die einzelnen Shrub-Transgene in einer Kopie (Zusammenarbeit mit Denise Isenburg, Bachelorarbeit Isenburg, 2018). Diese Ergebnisse können nur durch die Bildung von Shrub Heteropolymeren erklärt werden. So können bei der Expression von myc-Shrub R59E zusammen mit myc-Shrub D79K einerseits die Glutaminsäure an Position 59 mit dem Lysin an Position 79 intergieren, andererseits das endogene R70 mit E86 (Abb. 3.18 B). Diese Fliegen entwickeln sich zu *pharate adults*. Bei der Expression von myc-Shrub R70E mit myc-Shrub E86K können die Aminosäuren R59 und D79 interagieren und gleichzeitig E70 und K86 (Abb. 3.18 C). Diese Varianten zusammen können den *shrub* null-mutanten Hintergrund nur bis ins frühe L3-Larvenstadium retten. Der Unterschied im Rettungsvermögen könnte zum einen dadurch erklärt werden, dass die weiter N-terminal eingeführten Aminosäuren (E59, K79) im Polymer mehr Platz haben und sich so wegbiegen können, dass sie gut miteinander interagieren können. E70 und K86 hingegen befinden sich mittig im Polymer. Zudem scheinen die Aminosäuren nach dem Austausch nicht gut aufeinander ausgerichtet zu sein (Abb. 3.18 C). Der Unterschied im Rettungsvermögen der komplementierenden Shrub-Varianten im Vergleich zu der Rettung mit zwei Kopien R59E oder R70E könnte in der fehlenden Interaktion mit Lgd liegen. Durch die Mutation von Shrub in der sauren Interaktionsstelle (D79K, E86K) wird zusätzlich die elektrostatische Wechselwirkung mit Lgd gestört. Dies konnte wie oben beschrieben *in vitro* für die dritte DM14 Domäne von Lgd mit Shrub E86R gezeigt werden (McMillan et al., 2016).

Eine Verbesserung des Rettungsvermögens von zwei kombinierten Shrub Varianten könnte durch die zusätzliche Expression einer mutierten Lgd-Variante verbessert werden. Der lgd^{d7}, $shrub^{4-1}$ doppelt null-mutante Hintergrund könnte mit myc-Shrub R59E, myc-Shrub D79K und LgdΔDM14 1-2 R393E oder myc-Shrub R70E, myc-Shrub E86K und LgdΔDM14 1-2 R390E gerettet werden. Diese Lgd-Varianten sollten mit den Lysinen K79 und K86 in Shrub interagieren können. Durch diesen Versuch könnte zusätzlich bestätigt werden, dass die in der Kristallstruktur interagierenden Aminosäuren in Lgd und Shrub auch *in vivo* so an einander binden.

Neben der bereits beschriebenen Oligomerisations-Stelle berühren sich die Shrub Monomere im Polymer auch noch weiter C-terminal (Markierungen Abb. 3.17 B-D). Die Oberflächenladung von Shrub ist in diesem Bereich allerdings nicht so ausgeprägt wie in der bereits beschriebenen Region. Direkt an der Kontaktstelle befinden sich Asparaginsäuren (D126, D129, D130) in einem Monomer, im folgenden Monomer aber nur ein Lysin (K113), welches zur Bildung einer Salzbrücke verfügbar wäre (Pfeil Abb. 3.17 B und C).

Um zu überprüfen, ob auch diese Aminosäuren zur elektrostatischen Wechselwirkung bei der Polymerisation von Shrub beitragen, wurden Mutanten untersucht, in denen die Asparaginsäuren an den Positionen 126, 129 und 130 zu Argininen ausgetauscht wurden. Nur die Mutation D129R hat einen Einfluss auf das Rettungsvermögen der Transgene. Die Aminosäure D126 scheint nicht zur elektrostatischen Wechselwirkung der einzelnen Shrub Monomere beizutragen (Abb. 3.17 B). D129 scheint hingegen an der elektrostatischen Wechselwirkung beteiligt zu sein. Nach der Mutation zu Arginin könnte es zwischen den beiden Shrub Monomeren zur Abstoßung kommen (Pfeil Abb. 3.17 B und C), wodurch die Homooligomerisierung verhindert werden könnte. Dies würde den Verlust des Rettungsvermögens des Transgens myc-Shrub D129R erklären. Die Aminosäure 130 ist in der Kristallstruktur von Shrub nicht mehr aufgelöst. D130 ist vermutlich durch die Drehung der Helix eher von dem folgenden Shrub-Monomer weggedreht. Da auch keine basische Aminosäure im folgenden Monomer weiter C-terminal folgt, ist davon auszugehen, dass D130 ebenfalls nicht an der elektrostatischen Wechselwirkung zwischen den Shrub Monomeren beteiligt ist.

Auch für das Shrub Ortholog aus *Saccharomyces cerevisiae,* Snf7, konnte die Kristallstruktur aufgeklärt werden (Tang et al., 2015). Beim Vergleich der Struktur von Shrub und Snf7 zeigt sich ein Knick in der zweiten Helix von Snf7 (Abb. 4.2 A). Die in Shrub beobachtete zweite Kontaktstelle zwischen den einzelnen Monomeren, die auf elektrostatischen Wechselwirkungen zu beruhen scheint, ist in Snf7 nicht zu erkennen (Vgl. Abb. 3.17 B und Abb. 4.2 D). Die entsprechenden Aminosäuren K115 und D131 haben keinen Kontakt zueinander. Die zweite Interaktion zwischen den Monomeren bei Shrub könnte die Bindung im Polymeren gegenüber Snf7 robuster machen.

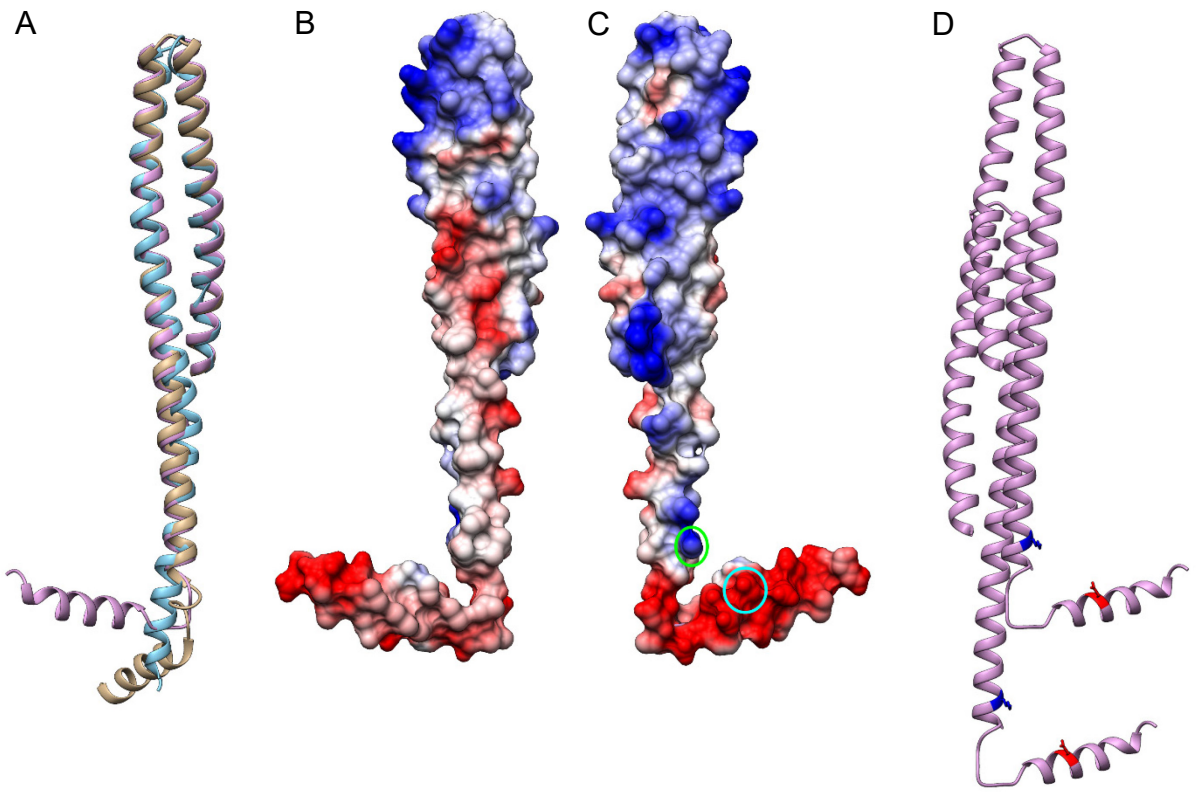


Abb. 4.2 A – Überlagerung der Kristallstrukturen von Shrub (blau) (PDB Eintrag: 5J45) und Snf7, Konformation A (beige) (PDB Eintrag: 5FD7) und Konformation B (lila) (PDB Eintrag: 5FD9) (Tang et al., 2015, McMillan et al., 2016). Im Gegensatz zu Shrub weist Snf7 einen Knick in der zweiten Helix auf. B – Oberflächen-Ladung von Snf7, Konformation B. C – Ansicht B um 180 Grad gedreht. Der Rahmen in cyan markiert D131, der grüne Rahmen hebt K115 vor, dieses Lysin entspricht K113 in Shrub. Die Farben repräsentieren die Oberflächen-Ladung, wobei blau für basisch und rot für sauer steht. D – Darstellung von zwei interagierenden Snf7 (Konformation B) Monomeren. Hervorgehoben sind jeweils D131 (rot) und K115 (blau). Die Ansicht ist gegenüber A um 180 Grad gedreht.

Neuste Untersuchungen in *Saccharomyces cerevisiae* zeigen, dass die Asparaginsäuren D127 und D131 sowie die Glutaminsäuren E138 und E142 in Snf7die Interaktionsstelle zur ESCRT-III Untereinheit Vps24 darstellen. Die Interaktion beruht auf elektrostatischen Wechselwirkungen, wobei die Interaktion geladener Regionen und nicht die Interaktion einzelner Aminosäuren miteinander im Vordergrund steht (Banjade et al., 2019).

Ein Aminosäuresequenzvergleich von Shrub und Snf7 zeigt, dass die in dieser Arbeit untersuchte Asparaginsäure (D) an Position 129 der Asparaginsäure D131 in Snf7 entspricht (Abb. 4.3). Der hier beobachtete Verlust des Rettungsvermögens von myc-Shrub D129 könnte somit auch auf den Verlust der Interaktion mit Vps24 und die damit beeinträchtigte Rekrutierung von Vps4 zurückzuführen sein.

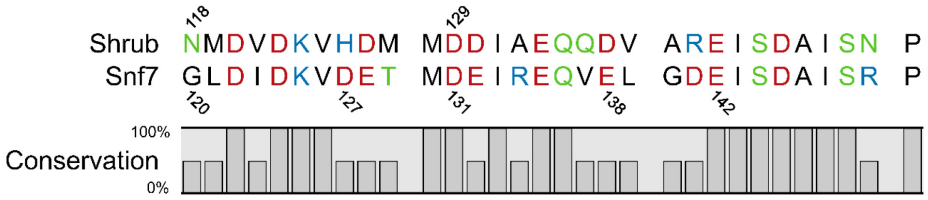


Abb. 4.3: Aminosäuresequenzvergleich von Shrub (Aminosäure 118-148) und seinem Ortholog Snf7 (Aminosäure 120-150). Die Zahlen beschreiben die Position der Aminosäuren im vollständigen Protein. Unterhalb der Sequenzvergleiche ist die Höhe der Konservierung in Prozent dargestellt. Die Aminosäuren sind im Ein-Buchstaben-Code abgekürzt (siehe 8.1). Die Farbe der Aminosäuren entspricht ihrer Polarität, schwarz = unpolar, grün = polar, blau = basisch und rot = sauer.

Um zu überprüfen, worauf die fehlende Rettung des *shrub* null-mutanten Hintergrundes zurückzuführen ist, könnte die Affinität der Shrub-Variante D129R zu sich selbst bzw. zu Vps24 mittels *in vitro* Methoden wie SPR oder MST überprüft werden. Auf diese Weise könnte festgestellt werden, ob das fehlende Rettungsvermögen von myc-Shrub D129R auf die gestörte Oligomerisierung von Shrub oder aber ausschließlich auf die fehlende Interaktion mit Vps24, damit die fehlende Rekrutierung von Vps4 und so letztendlich auf die fehlende Disassemblierung von ESCRT-III zurückzuführen ist.

Ebenso könnte die Kompetenz zur Polymerisierung von myc-Shrub D129R *in vivo* untersucht werden. So könnte wie zuvor die Bildung von Heteropolymeren zwischen zwei Shrub Varianten untersucht werden. Zusammen mit myc-Shrub D129R könnte die komplementierende Variante myc-Shrub K113E exprimiert und deren gemeinsames Rettungsvermögen untersucht werden. Eine Affinität der mutierten Monomere zueinander oder eine Rettung des *shrub* null-mutanten Hintergrundes durch die sich komplementierenden Shrub-Transgene *in vivo* würden darauf hindeuten, dass die Asparaginsäure D129 in endogenem Shrub auch zur elektrostatischen Wechselwirkung der einzelnen Shrub-Monomere beiträgt. Ob die Interaktion von Shrub und Vps24 in *Drosophila* wie für die Orthologe aus *Saccharomyces cerevisiae* beschrieben geschieht, könnte mit Hilfe von Analysen mit sich komplementierenden Shrub- und Vps24-Transgenen untersucht werden.

Für die Orthologe aus *Saccharomyces cerevisiae* wurden Co-Polymere von Snf7 mit Vps24 und Vps2 beobachtet. Diese Interaktion scheint notwendig zu sein, um zweidimensionalen Snf7-Spiralen für die anschließende Abschnürung der ILV zu drei-

dimensionalen Helices zu verändern (Henne et al., 2012, Mierzwa et al., 2017, Banjade et al., 2019). Die Art der Interaktion der Shrub-Monomere bei der Polymerisation scheint auf Grund der geraden zweiten Helix in Shrub wahrscheinlich anders als bei Snf7 zu sein (Abb. 4.2 A). Die Kristallstruktur von Shrub legt nahe, dass es entweder zur Polymerisation von Shrub kommen kann oder aber zur Bindung von Vps24 (McMillan et al., 2016). Beides scheint sich auszuschließen, da D129 sowohl in die Polymerisation von Shrub als auch in die Interaktion zu Vps24 involviert sein könnte. Dies spricht dafür, dass in *Drosophila* durch die Bildung von Shrub an Vps24 die Polymerisation von Shrub beendet wird und mit der Rekrutierung von Vps4 die Abschnürung eines ILV eingeleitet wird.

Auch für die humanen Orthologe von Vps24 und Vps2, CHMP3 und CHMP2 konnten Co-Polymere beobachtet werden, diese beinhalteten allerdings kein CHMP4 (Lata et al., 2008). Diese Beobachtungen zusammen mit der Kristallstruktur des Shrub-Polymers könnten ein Hinweis darauf geben, dass der Mechanismus der Interaktion zwischen Shrub/CHMP4 und Vps24/CHMP3 und damit auch der Mechanismus der Abschnürung der ILV in mehrzelligen Organismen ein anderer ist, als im Einzeller *Saccharomyces cerevisiae*.

Die Interaktion von Shrub mit Lgd beruht wie beschrieben auf den gleichen Aminosäuren, wie die elektrostatische Wechselwirkungen im Shrub-Polymer. Lgd könnte somit durch Bindung an Shrub wie Vps24 eine weitere Oligomerisierung von Shrub verhindern. Diese regulatorische Funktion von Lgd könnte vorzeitige Shrub-Polymerisation oder Polymere von Shrub an der falschen Stelle verhindern. Allerdings wurde für das humane Ortholog CC2D1A *in vitro* gezeigt, dass es nicht an CHMP4B Polymere binden kann (Martinelli et al., 2012).

Auf Grund der Shrub-Interaktionsstelle ist eine Bindung von Lgd an Shrub sowohl in der offenen Konformation, wie es an der endosomalen Membran vorkommt, als auch in der geschlossenen Konformation, wie im Zytosol, möglich (Tang et al., 2015, McMillan et al., 2016). Eine weitere denkbare Funktion von Lgd könnte daher das Bereitstellen von monomerem Shrub an der endosomalen Membran sein.

Der Verlust von Lgd führt zur Bildung von vergrößerten reifenden Endosomen und zum Abbau-Defekt von Transmembranproteinen wie dem Notch Rezeptor. Diese Defekte sind wahrscheinlich auf die Reduktion der Shrub-Aktivität zurückzuführen (Schneider et al., 2013). Die verminderte Aktivität von Shrub bei dem Verlust von Lgd könnte sich durch

vorzeitiges Polymerisieren zeigen, wodurch die Abschnürung der ILV, die Verpackung von Transmembranproteinen und die Reifung der Endosomen verlangsamt und ineffizient wäre. Diese Theorie wird dadurch bestärkt, dass durch die Expression von zusätzlichem Shrub der Verlust von endogenem Lgd gerettet werden kann (Masterarbeit Bäumers, 2015) und dass Lgd *in vitro* bei der Aufreinigung von Shrub dessen Polymerisation verhindern kann (mündliche Kommunikation Brian McMillan – Stephen Blacklow Lab, Harvard Medical School). Diese Beobachtungen legen eine Shrub-regulierende Funktion von Lgd im endosomalen Transportweg nahe.

Bei der Überexpression von Lgd kommt es in *Drosophila* wie bei dem Verlust von Lgd zur ektopischen Aktivierung des Notch Signalweges (Gallagher und Knoblich, 2006, Jaekel und Klein, 2006). Dieser Phänotyp kann ebenfalls mit der regulierenden Funktion von Lgd gegenüber der ESCRT-III Untereinheit Shrub erklärt werden. Bei der Überexpression von Lgd liegt Shrub vermutlich verstärkt gebunden an Lgd vor und steht so, wie bei dem Verlust von Lgd, nicht für die Bildung von ILV zur Verfügung. Die fehlende Polymerisation von Shrub führt vermutlich dazu, dass Transmembranproteine wie der Notch-Rezeptor nicht vollständig in ILV verpackt werden. Nach der Fusion mit dem Lysosom kann es zur ektopischen, Liganden-unabhängigen Aktivierung der sich an der limitierenden endosomalen Membran befindlichen Rezeptoren kommen. Die intrazelluläre Domäne von Notch kann in den Zellkern translozieren und die Expression von Zielgenen des Notch-Signalweges ektopisch aktivieren.

Lgd und Shrub scheinen im Gleichgewicht zueinander in der Zelle vorliegen zu müssen, damit Lgd regulierend auf Shrub wirken kann und Shrub-abhängige Prozesse ohne Beeinträchtigungen ablaufen können.

5 Zusammenfassung

Das Tumorsuppressorgen *lethal (2) giant discs* (*lgd*) kodiert für ein Protein mit vier N-terminalen DM14 Domänen und einer C-terminalen C2 Domäne. Letztere ist wichtig für die Stabilität und die Lokalisation von Lgd. Die DM14 Domänen, die einzigartig für die Lgd Proteinfamilie sind, vermitteln die direkte Interaktion mit der ESCRT-III Untereinheit Shrub. Sie sind essentiell für die vollständige Funktion von Lgd. Der Lgd-Interaktionspartner Shrub ist bei der Bildung der intraluminalen Vesikel (ILV), welche essentiell für den Abbau von Transmembranproteinen sind, während der Reifung der Endosomen im endosomalen Transportweg von entscheidender Bedeutung. Shrub bildet lange Polymere, die zur Abschnürung der ILV beitragen. Der Ausfall von Lgd bedingt Störungen in diesem Prozess, wodurch es zu einem unvollständigen Abbau des Notch-Rezeptors kommt. Dies führt zur ektopischen Aktivierung des Notch-Signalweges.

Die Kristallstruktur der Interaktion zwischen der dritten DM14 Domäne von Lgd und Shrub deuten darauf hin, dass die Bindung beider Proteine auf elektrostatischen Wechselwirkungen basiert. In Lgd sind basische, in Shrub saure Aminosäuren in diese Interaktion involviert.

In dieser Arbeit konnte mit Hilfe von Rettungsexperimenten gezeigt werden, dass die ungeradzahligen DM14 Domänen von Lgd entscheidend für dessen Funktion sind. Die dritte DM14 Domäne scheint wichtiger zu sein, als die erste. Die geradzahligen DM14 Domänen scheinen für die vollständige Funktion von Lgd eine untergeordnete Rolle zu spielen. Weiterhin konnte die durch die Kristallstruktur skizzierte elektrostatische Wechselwirkung zwischen Lgd und Shrub *in vivo* bestätigt werden. Der Versuch ein minimales Shrub-Bindemotiv auf Grund dieser Wechselwirkungen zu definieren, hat gezeigt, dass mehr als die direkt in die Interaktion mit Shrub involvierten Aminosäuren für eine funktionale Bindung von Lgd an Shrub benötigt werden. Es konnte eine mögliche SH3-Bindedomäne am Ende der DM14 Domänen 2-4 bestimmt werden, die den potentiellen Funktionsunterschied zwischen den beiden ungeradzahligen DM14 Domänen erklären könnte. Zudem haben Untersuchungen von Shrub gezeigt, dass die Funktion von Lgd für die volle Funktionalität bzw. Effizienz von Shrub benötigt wird.

6 Summary

The tumor suppressor gene *lethal (2) giant discs* (*lgd*) encodes a protein with four N-terminal DM14 domains and a C-terminal C2 domain. The C2 domain ensures protein stability and correct localization of Lgd. DM14 domains are unique for the Lgd protein family and are essential for the full function of Lgd. They mediate direct interaction with the ESCRT-III subunit Shrub. Shrub is crucial for intraluminal vesicles (ILV) formation during endosome maturation in the endosomal pathway. By polymer formation, Shrub contributes to the abscission of newly formed ILVs. Loss of Lgd results in ectopic activation of the Notch signaling pathway due to impaired ILV formation and failed degradation of the Notch receptor within endosomal trafficking.

The crystal structure of the third DM14 domain of Lgd interacting with Shrub points to a binding based on electrostatic interactions. Lgd needs basic amino acids, Shrub requires a patch of acidic amino acids for this interplay.

This study shows that odd-numbered DM14 domains of Lgd are crucial for its function and that the third DM14 domain appears to be more important than the first one. In contrast, the even-numbered DM14 domains seem to be dispensable for full function of Lgd. Furthermore, this work confirms the electrostatic interaction of Lgd and Shrub, suggested by crystal structure, *in vivo*. The results show that residues additionally to the known interacting amino acids are needed for a functional binding of Lgd and Shrub, meaning a minimal Shrub binding motif could not be defined. A putative SH3 binding domain at the C-terminus of DM14 2-4 was defined, potentially explaining the functional differences between the first and the third DM14 domain. Moreover, the analysis of Shrub shows that proper Lgd function is needed for the full efficiency of the ESCRT-III subunit Shrub.

7 Literaturverzeichnis

Adell MAY, Migliano SM, Upadhyayula S, Bykov YS, Sprenger S, Pakdel M, Vogel GF, Jih G, Skillern W, Behrouzi R, Babst M, Schmidt O, Hess MW, Briggs JA, Kirchhausen T, Teis D (2017) Recruitment dynamics of ESCRT-III and Vps4 to endosomes and implications for reverse membrane budding. eLife 6.

Adell MAY, Vogel GF, Pakdel M, Müller M, Lindner H, Hess MW, 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.

Babst M, Katzmann DJ, Estepa-Sabal EJ, Meerloo T, Emr SD (2002a) Escrt-III: an endosome-associated heterooligomeric protein complex required for mvb sorting. Developmental cell 3:271-282.

Babst M, Katzmann DJ, Snyder WB, Wendland B, Emr SD (2002b) Endosome-associated complex, ESCRT-II, recruits transport machinery for protein sorting at the multivesicular body. Developmental cell 3:283-289.

Bache KG, Raiborg C, Mehlum A, Stenmark H (2003) STAM and Hrs are subunits of a multivalent ubiquitin-binding complex on early endosomes. The Journal of biological chemistry 278:12513-12521.

Bachmann A, Knust E (2008) The use of P-element transposons to generate transgenic flies. Methods in molecular biology (Clifton, NJ) 420:61-77.

Bajorek M, Schubert HL, McCullough J, Langelier C, Eckert DM, Stubblefield WM, Uter NT, Myszka DG, Hill CP, Sundquist WI (2009) Structural basis for ESCRT-III protein autoinhibition. Nature structural & molecular biology 16:754-762.

Banjade S, Tang S, Shah YH, Emr SD (2019) Electrostatic lateral interactions drive ESCRT-III heteropolymer assembly. eLife 8:e46207.

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.

Benscheidt C (2013) Charakterisierung der DM14 Domänen von *lgd* und Analyse der Prozessierung des Notch Rezeptors in *Drosophila melanogaster*. Masterarbeit. Institut für Genetik, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Bilodeau PS, Urbanowski JL, Winistorfer SC, Piper RC (2002) The Vps27p Hse1p complex binds ubiquitin and mediates endosomal protein sorting. Nature cell biology 4:534-539.

Bischof J, Maeda RK, Hediger M, Karch F, Basler K (2007) An optimized transgenesis system for *Drosophila* using germ-line-specific phiC31 integrases. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104:3312-3317.

Blaumueller CM, Qi H, Zagouras P, Artavanis-Tsakonas S (1997) Intracellular Cleavage of Notch Leads to a Heterodimeric Receptor on the Plasma Membrane. Cell 90:281-291.

Borggrefe T, Oswald F (2009) The Notch signaling pathway: transcriptional regulation at Notch target genes. Cellular and molecular life sciences : CMLS 66:1631-1646.

Borggrefe T, Oswald F (2016) Setting the Stage for Notch: The *Drosophila* Su(H)-Hairless Repressor Complex. PLoS Biol 14:e1002524.

Bray SJ (2016) Notch signalling in context. Nat Rev Mol Cell Biol 17:722-735.

Brou C, Logeat F, Gupta N, Bessia C, LeBail O, Doedens JR, Cumano A, Roux P, Black RA, Israel A (2000) A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. Molecular cell 5:207-216.

Bryant PJ, Schubiger G (1971) Giant and duplicated imaginal discs in a new lethal mutant of *Drosophila melanogaster*. Developmental biology 24:233-263.

Buratovich MA, Bryant PJ (1995) Duplication of *l(2)gd* imaginal discs in *Drosophila* is mediated by ectopic expression of *wg* and *dpp*. Developmental biology 168:452-463.

Burd CG, Emr SD (1998) Phosphatidylinositol(3)-phosphate signaling mediated by specific binding to RING FYVE domains. Molecular cell 2:157-162.

Chiaruttini N, Roux A (2017) Dynamic and elastic shape transitions in curved ESCRT-III filaments. Current opinion in cell biology 47:126-135.

Childress JL, Acar M, Tao C, Halder G (2006) Lethal giant discs, a novel C2-domain protein, restricts notch activation during endocytosis. Current biology : CB 16:2228-2233.

Clague MJ, Liu H, Urbe S (2012) Governance of endocytic trafficking and signaling by reversible ubiquitylation. Developmental cell 23:457-467.

De Strooper B, Annaert W, Cupers P, Saftig P, Craessaerts K, Mumm JS, Schroeter EH, Schrijvers V, Wolfe MS, Ray WJ, Goate A, Kopan R (1999) A presenilin-1-dependent

gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. Nature 398:518-522.

del Alamo D, Rouault H, Schweisguth F (2011) Mechanism and significance of cis-inhibition in Notch signalling. Current biology : CB 21:R40-47.

Doherty GJ, McMahon HT (2009) Mechanisms of endocytosis. Annual review of biochemistry 78:857-902.

Drusenheimer N, Migdal B, Jackel S, Tveriakhina L, Scheider K, Schulz K, Groper J, Kohrer K, 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.

Dupré S, Haguenauer-Tsapis R (2001) Deubiquitination step in the endocytic pathway of yeast plasma membrane proteins: crucial role of Doa4p ubiquitin isopeptidase. Molecular and cellular biology 21:4482-4494.

Furriols M, Bray S (2000) Dissecting the mechanisms of suppressor of hairless function. Developmental biology 227:520-532.

Furriols M, Bray S (2001) A model Notch response element detects Suppressor of Hairless–dependent molecular switch. Current Biology 11:60-64.

Gallagher CM, Knoblich JA (2006) The conserved C2 domain protein Lethal (2) giant discs regulates protein trafficking in *Drosophila*. Developmental cell 11:641-653.

Gatta AT, Carlton JG (2019) The ESCRT-machinery: closing holes and expanding roles. Current opinion in cell biology 59:121-132.

Gaullier JM, Simonsen A, D'Arrigo A, Bremnes B, Stenmark H, Aasland R (1998) FYVE fingers bind PtdIns(3)P. Nature 394:432-433.

Gibson DG, Young L, Chuang RY, Venter JC, Hutchison CA, 3rd, Smith HO (2009) Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. Nature methods 6:343-345.

Gill DJ, Teo H, Sun J, Perisic O, Veprintsev DB, Emr SD, Williams RL (2007) Structural insight into the ESCRT-I/-II link and its role in MVB trafficking. The EMBO journal 26:600-612.

Gillooly DJ, Morrow IC, Lindsay M, Gould R, Bryant NJ, Gaullier JM, Parton RG, Stenmark H (2000) Localization of phosphatidylinositol 3-phosphate in yeast and mammalian cells. The EMBO journal 19:4577-4588.

Haines N, Irvine KD (2003) Glycosylation regulates Notch signalling. Nat Rev Mol Cell Biol 4:786-797.

Han H, Monroe N, Sundquist WI, Shen PS, Hill CP (2017) The AAA ATPase Vps4 binds ESCRT-III substrates through a repeating array of dipeptide-binding pockets. eLife 6:e31324.

Helle M (2017) Charakterisierung der Interaktion zwischen dem ESCRT-III-Hilfsfaktor DChmp5 und dem Tumorsuppressor Lgd in *Drosophila melanogaster in vivo*. Bachelorarbeit. Institut für Genetik, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Henne WM, Buchkovich NJ, Zhao Y, Emr SD (2012) The endosomal sorting complex ESCRT-II mediates the assembly and architecture of ESCRT-III helices. Cell 151:356-371.

Hierro A, Sun J, Rusnak AS, Kim J, Prag G, Emr SD, Hurley JH (2004) Structure of the ESCRT-II endosomal trafficking complex. Nature 431:221-225.

Hori K, Sen A, Kirchhausen T, Artavanis-Tsakonas S (2011) Synergy between the ESCRT-III complex and Deltex defines a ligand-independent Notch signal. J Cell Biol 195:1005-1015.

Huotari J, Helenius A (2011) Endosome maturation. The EMBO journal 30:3481-3500.

Hurley JH (2015) ESCRTs are everywhere. The EMBO journal 34:2398-2407.

Im YJ, Hurley JH (2008) Integrated structural model and membrane targeting mechanism of the human ESCRT-II complex. Developmental cell 14:902-913.

Isenburg D (2018) Analyse verschiedener Shrub-Mutanten in Bezug auf die Rekrutierung zum Endosom und deren Polymerisation sowie Herstellung unterschiedlicher Notch-Varianten mit Mutationen in der PEST-Domäne. Bachelorarbeit. Institut für Genetik, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Jaekel R, 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.

Jovic M, Sharma M, Rahajeng J, Caplan S (2010) The early endosome: a busy sorting station for proteins at the crossroads. Histology and histopathology 25:99-112.

Katzmann DJ, Babst M, Emr SD (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.

Klein T (2001) Wing disc development in the fly: the early stages. Current opinion in genetics & development 11:470-475.

Klein T (2003) The tumour suppressor gene *l(2)giant discs* is required to restrict the activity of Notch to the dorsoventral boundary during *Drosophila* wing development. Developmental biology 255:313-333.

Kopan R, Ilagan MX (2009) The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. Cell 137:216-233.

Korfmacher L (2017) Untersuchung der Relevanz konservierter Aminosäuren in den DM14 Domänen für die Funktion von Lgd in *Drosophila melanogaster* und Generierung von Shrub/Snf7 Hybrid-Konstrukten. Bachelorarbeit. Institut für Genetik, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Kostelansky MS, Schluter C, Tam YYC, Lee S, Ghirlando R, Beach B, Conibear E, Hurley JH (2007) Molecular Architecture and Functional Model of the Complete Yeast ESCRT-I Heterotetramer. Cell 129:485-498.

Kovall RA, Gebelein B, Sprinzak D, Kopan R (2017) The Canonical Notch Signaling Pathway: Structural and Biochemical Insights into Shape, Sugar, and Force. Developmental cell 41:228-241.

Lata S, Schoehn G, Jain A, Pires R, Piehler J, Gőttlinger HG, Weissenhorn W (2008) Helical Structures of ESCRT-III Are Disassembled by VPS4. Science 321:1354-1357.

Le Borgne R, Remaud S, Hamel S, Schweisguth F (2005) Two distinct E3 ubiquitin ligases have complementary functions in the regulation of delta and serrate signaling in *Drosophila*. PLoS Biol 3:e96.

Logeat F, Bessia C, Brou C, LeBail O, Jarriault S, Seidah NG, Israel A (1998) The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95:8108-8112.

Luhtala N, Odorizzi G (2004) Bro1 coordinates deubiquitination in the multivesicular body pathway by recruiting Doa4 to endosomes. J Cell Biol 166:717-729.

Martinelli N, Hartlieb B, Usami Y, Sabin C, Dordor A, Miguet N, Avilov SV, Ribeiro EA, Jr., Gottlinger H, Weissenhorn W (2012) CC2D1A is a regulator of ESCRT-III CHMP4B. Journal of molecular biology 419:75-88.

Maxfield FR, McGraw TE (2004) Endocytic recycling. Nat Rev Mol Cell Biol 5:121-132.

Maxfield FR, Yamashiro DJ (1987) Endosome acidification and the pathways of receptor-mediated endocytosis. Advances in experimental medicine and biology 225:189-198.

Mayor S, Pagano RE (2007) Pathways of clathrin-independent endocytosis. Nature Reviews Molecular Cell Biology 8:603.

McCullough J, Frost A, Sundquist WI (2018) Structures, Functions, and Dynamics of ESCRT-III/Vps4 Membrane Remodeling and Fission Complexes. Annual review of cell and developmental biology 34:85-109.

McMillan BJ, Tibbe C, Drabek AA, Seegar TCM, Blacklow SC, Klein T (2017) Structural Basis for Regulation of ESCRT-III Complexes by Lgd. Cell reports 19:1750-1757.

McMillan BJ, Tibbe C, Jeon H, Drabek AA, Klein T, Blacklow SC (2016) Electrostatic Interactions between Elongated Monomers Drive Filamentation of *Drosophila* Shrub, a Metazoan ESCRT-III Protein. Cell reports 16:1211-1217.

Meloty-Kapella L, Shergill B, Kuon J, Botvinick E, Weinmaster G (2012) Notch ligand endocytosis generates mechanical pulling force dependent on dynamin, epsins, and actin. Developmental cell 22:1299-1312.

Mierzwa BE, Chiaruttini N, Redondo-Morata L, Moser von Filseck J, Konig J, Larios J, Poser I, Muller-Reichert T, Scheuring S, Roux A, Gerlich DW (2017) Dynamic subunit turnover in ESCRT-III assemblies is regulated by Vps4 to mediate membrane remodelling during cytokinesis. Nature cell biology.

Monroe N, Han H, Gonciarz MD, Eckert DM, Karren MA, Whitby FG, Sundquist WI, Hill CP (2014) The Oligomeric State of the Active Vps4 AAA ATPase. Journal of molecular biology 426:510-525.

Monroe N, Han H, Shen PS, Sundquist WI, Hill CP (2017) Structural basis of protein translocation by the Vps4-Vta1 AAA ATPase. eLife 6.

Mousavi SA, Malerod L, Berg T, Kjeken R (2004) Clathrin-dependent endocytosis. The Biochemical journal 377:1-16.

Mumm JS, Schroeter EH, Saxena MT, Griesemer A, Tian X, Pan DJ, Ray WJ, Kopan R (2000) A ligand-induced extracellular cleavage regulates gamma-secretase-like proteolytic activation of Notch1. Molecular cell 5:197-206.

Nam Y, Sliz P, Song L, Aster JC, Blacklow SC (2006) Structural Basis for Cooperativity in Recruitment of MAML Coactivators to Notch Transcription Complexes. Cell 124:973-983.

Nowak KA (2017) Untersuchung des funktionalen Zusammenhangs von Deltex und Lgd und Analyse der Funktionalität einer minimalen Shrub-Interaktionsdomäne von Lgd in *Drosophila melanogaster*. Bachelorarbeit. Institut für Genetik, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Odorizzi G, Katzmann DJ, Babst M, Audhya A, Emr SD (2003) Bro1 is an endosome-associated protein that functions in the MVB pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of cell science 116:1893-1903.

Ohlenhard N (2011) Determination des strukturellen Bindemotivs von Mindbomb1 in den intrazellulären Domänen von DSL - Liganden. Diplomarbeit. Institut für Genetik, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Olmos Y, Perdrix-Rosell A, Carlton JG (2016) Membrane Binding by CHMP7 Coordinates ESCRT-III-Dependent Nuclear Envelope Reformation. Current biology : CB 26:2635-2641.

Parks AL, Klueg KM, Stout JR, Muskavitch MA (2000) Ligand endocytosis drives receptor dissociation and activation in the Notch pathway. Development 127:1373-1385.

Ponting CP, Mott R, Bork P, Copley RR (2001) Novel protein domains and repeats in *Drosophila melanogaster*: insights into structure, function, and evolution. Genome research 11:1996-2008.

Ren X, Hurley JH (2010) VHS domains of ESCRT-0 cooperate in high-avidity binding to polyubiquitinated cargo. The EMBO journal 29:1045-1054.

Schneider M, Troost T, Grawe F, Martinez-Arias A, 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.

Schnute B, Troost T, Klein T (2018) Endocytic Trafficking of the Notch Receptor. Advances in experimental medicine and biology 1066:99-122.

Schöneberg J, Lee IH, Iwasa JH, Hurley JH (2017) Reverse-topology membrane scission by the ESCRT proteins. Nat Rev Mol Cell Biol 18:5-17.

Schöneberg J, Pavlin MR, Yan S, Righini M, Lee I-H, Carlson L-A, Bahrami AH, Goldman DH, Ren X, Hummer G, Bustamante C, Hurley JH (2018) ATP-dependent force generation and membrane scission by ESCRT-III and Vps4. Science 362:1423-1428.

Slagsvold T, Aasland R, Hirano S, Bache KG, Raiborg C, Trambaiolo D, Wakatsuki S, Stenmark H (2005) Eap45 in mammalian ESCRT-II binds ubiquitin via a

phosphoinositide-interacting GLUE domain. The Journal of biological chemistry 280:19600-19606.

Sorkin A, von Zastrow M (2009) Endocytosis and signalling: intertwining molecular networks. Nat Rev Mol Cell Biol 10:609-622.

Struhl G, Greenwald I (1999) Presenilin is required for activity and nuclear access of Notch in *Drosophila*. Nature 398:522-525.

Sweeney NT, Brenman JE, Jan YN, Gao FB (2006) The coiled-coil protein shrub controls neuronal morphogenesis in *Drosophila*. Current biology : CB 16:1006-1011.

Tang S, Henne WM, Borbat PP, Buchkovich NJ, Freed JH, Mao Y, Fromme JC, Emr SD (2015) Structural basis for activation, assembly and membrane binding of ESCRT-III Snf7 filaments. eLife 4.

Teis D, Saksena S, Emr SD (2008) Ordered assembly of the ESCRT-III complex on endosomes is required to sequester cargo during MVB formation. Developmental cell 15:578-589.

Teo H, Gill DJ, Sun J, Perisic O, Veprintsev DB, Vallis Y, Emr SD, Williams RL (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.

Teo H, Perisic O, Gonzalez B, Williams RL (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.

Troost T (2013) Analyse der liganden-unabhängigen Aktivierung des Notch Rezeptors in *lgd* Mutanten und der liganden-abhängigen Aktivierung des Notch Rezeptors während der Flügelentwicklung in *Drosophila*. Dissertation. Institut für Genetik, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Troost T, Jaeckel S, Ohlenhard N, 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 HTH, Connell JW, Brown SE, Thompson A, Reid E, Sanderson CM (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 ER, Vriesema-Magnuson C, Calistri A, Gottlinger HG (2012) Regulation of CHMP4/ESCRT-III function in human immunodeficiency virus type 1 budding by CC2D1A. Journal of virology 86:3746-3756.

Vaccari T, Rusten TE, Menut L, Nezis IP, Brech A, Stenmark H, Bilder D (2009) Comparative analysis of ESCRT-I, ESCRT-II and ESCRT-III function in *Drosophila* by efficient isolation of ESCRT mutants. Journal of cell science 122:2413-2423.

Ventimiglia LN, Cuesta-Geijo MA, Martinelli N, Caballe A, Macheboeuf P, Miguet N, Parnham IM, Olmos Y, Carlton JG, Weissenhorn W, Martin-Serrano J (2018) CC2D1B Coordinates ESCRT-III Activity during the Mitotic Reformation of the Nuclear Envelope. Developmental cell 47:547-563.e546.

Vietri M, Schink KO, Campsteijn C, Wegner CS, Schultz SW, Christ L, Thoresen SB, Brech A, Raiborg C, Stenmark H (2015) Spastin and ESCRT-III coordinate mitotic spindle disassembly and nuclear envelope sealing. Nature 522:231-235.

Wang W, Struhl G (2005) Distinct roles for Mind bomb, Neuralized and Epsin in mediating DSL endocytosis and signaling in *Drosophila*. Development 132:2883-2894.

Wenzel EM, Schultz SW, Schink KO, Pedersen NM, Nähse V, Carlson A, Brech A, Stenmark H, Raiborg C (2018) Concerted ESCRT and clathrin recruitment waves define the timing and morphology of intraluminal vesicle formation. Nature communications 9:2932.

Wienigk A (2015) Strukturelle Analyse des *Drosophila* Tumorsuppressors Lethal (2) giant discs und seines Säugerorthologs LGD1. Bachelorarbeit. Institut für Genetik, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Wilson JJ, Kovall RA (2006) Crystal Structure of the CSL-Notch-Mastermind Ternary Complex Bound to DNA. Cell 124:985-996.

Wollert T, Hurley JH (2010) Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes. Nature 464:864-869.

Yang B, Stjepanovic G, Shen Q, Martin A, Hurley JH (2015) Vps4 disassembles an ESCRT-III filament by global unfolding and processive translocation. Nature Structural &Amp; Molecular Biology 22:492.

Ye Y, Lukinova N, Fortini ME (1999) Neurogenic phenotypes and altered Notch processing in *Drosophila Presenilin* mutants. Nature 398:525-529.

Yu H, Chen JK, Feng S, Dalgarno DC, Brauer AW, Schrelber SL (1994) Structural basis for the binding of proline-rich peptides to SH3 domains. Cell 76:933-945.

8 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
CHMP	charged multivesicular body protein
C-Terminus/-terminal	Carboxyl-Terminus
CyO	Curly of Oster – Balancer für das 2. Chromosom
D/V	dorso-ventral
ddH_2O	doppelt destilliertes Wasser
dH_2O	destilliertes Wasser
DM14	*Drosophila melanogaster* 14 domain
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs, dATP, dCTP, dTTP, dGTP	Desoxynukleosidtriphosphat,-adenosin-, -cytidin-, -thymidin-, -guanosin-
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESCRT	endosomal sorting complex required for transport
g, ng µg, mg, kg	Gramm, Nano-, Mikro-, Milli-, Kilogramm
Gbe	Grainyhead binding element
Grh	Grainyhead
HA	Hämagglutinin
HF	high fidelity
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
If	Irregular facets – Marker für das 2. Chromosom
ILV	intraluminale Vesikel
ISO	isothermal
ITC	isotherme Titrationskalometrie
kB/kbp	Kilobasenpaare
LB	lysogeny broth
Lgd/*lgd*	*lethal (2) giand discs*
min	Minuten
l, µl, ml	Liter, Mikro-, Milliliter
M	Molar
MKRS	Marker für das 3. Chromosom

MST	Microscale Thermopherese
MVB	multivesicular body
NEB	New England Biolabs
NGS	normal goat serum - Normales Ziegenserum
NICD	intrazellulärere Domäne des Notch Rezeptors
N-Terminus/-terminal	Amino-Terminus
P	Promotor
PBS	phosphate buffered saline
PBT	1 x PBS + Triton X-100
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*)
PDB	Protein data bank
PFA	Paraformaldehyd
s	Sekunde
SM6a-TM6b	Doppel-Balancer für das 2. und 3. Chromosom
SPR	Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (engl. *surface plasmon resonance spectroscopy*
Su(H)	Supressor of Hairless
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TM6b	Balancher für das 3. Chromosom
U	Unit
Vps	vacuolar protein-sorting
w	*white*
Wg/*wg*	Wingless, *wingless*
wt	Wildtyp
x g/rpm	x-faches der Erdbeschleunigung/ revolutions per minute
β-Gal	β-Galactosidase
Δ	Deletion

8.1 Einbuchstaben-Code der Aminosäuren

Aminosäure	**Einbuchstaben-Code**
Alanin	A
Arginin	R
Asparagin	N
Asparaginsäure	D
Cystein	C
Glutamin	Q
Glutaminsäure	E
Glycin	G
Histidin	H
Isoleucin	I
Leucin	L
Lysin	K
Methionin	M
Phenylalanin	F
Prolin	P
Serin	S
Threonin	T
Tryptophan	W
Tyrosin	Y
Valin	V

9 Anhang

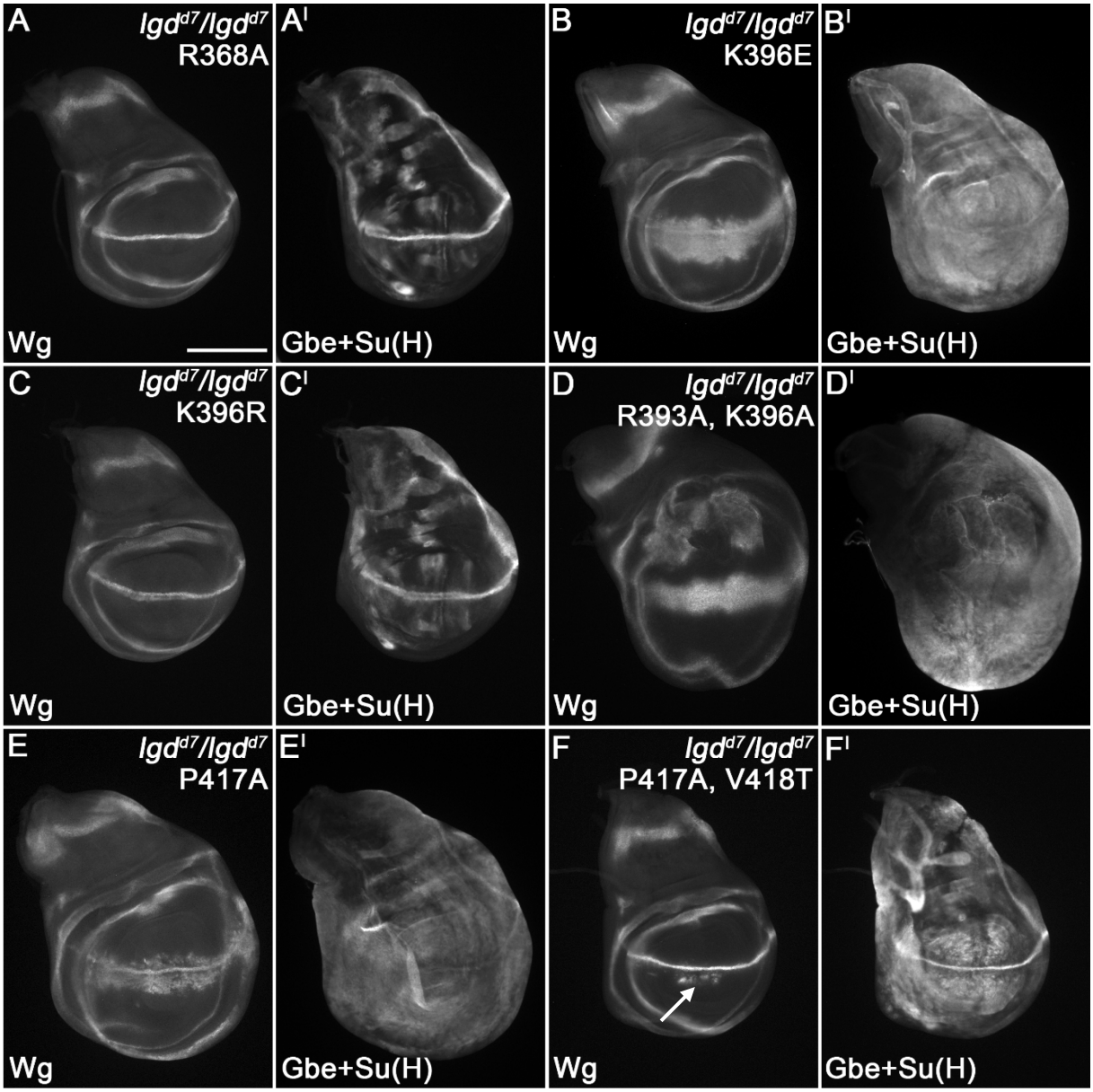


Abb. 9.1: Rettung des *lgd* null-mutanten Hintergrundes mit Lgd-Deletionskonstrukten, die auf dem Konstrukt LgdΔDM14 1-2 basieren und in denen stark konservierte Aminosäuren mutiert sind. Die Expression des endogenen Notch-Zielgens *wg* ist durch eine Antikörperfärbung gegen Wg sichtbar (A-F). Durch den Notch-Reporter Gbe+Su(H) wird die Aktivität des Notch-Signalweges detektiert (A^I-F^I). Der Verlust von endogenem Lgd wird mit den angezeigten mutierten Deletionskonstrukten gerettet. Die Flügelimaginalscheiben sind so orientiert, dass anterior links und dorsal oben ist. Der Maßstabsbalken in A entspricht 200 µm. Alle Imaginalscheiben wurden bei der gleichen Vergrößerung aufgenommen.

10 Danksagung

Bei Prof. Dr. Thomas Klein bedanke ich mich für die Betreuung über viele Jahre und die Möglichkeit meine Doktorarbeit in seinem Labor zu machen. Danke für die Überlassung des spannenden Themas. Ich bedanke mich für die Gelegenheit so viele Leute kennengelernt zu haben, die ich nicht mehr missen möchte.
Prof. Dr. Hermann Aberle danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Ich danke allen ehemaligen und gegenwärtigen Kollegen im Institut. Ihr habt eine Atmosphäre geschaffen, in der ich auch gerne gearbeitet habe, wenn es mal richtig stressig wurde. Danke für die Diskussionen, die Hilfe, den Spaß.
Ein großer Dank gilt Sylvia Tannebaum, die mich durch die Injektionen unzähliger Embryonen unterstützt hat und sich über jede Transformante mit mir gefreut hat.
Danke Gisela für das Jungfrauen sammeln und die Unterstützung bei den Klonierungen.
Ebenfalls möchte ich mich bei meinen Bachelorstudenten Astrid, Vivien, Lars, Denise, Marcel und Katharina bedanken, die mich in vielerlei Hinsicht unterstützt haben. Bei meinem grandiosen Masterstudenten natürlich auch ;-)
Björn, manchmal braucht es nur ein Wort – KÄSEKUCHEN.
Miri, keiner konnte unseren Gedanken folgen, aber wir haben uns verstanden, meistens.
Thomas, danke!
Der Filmrunde, der Telefonkonferenz, der Besetzung des besten Moduls aller Zeiten möchte ich für all die schönen Stunden während der vergangenen Jahre danken.
Kristina, Miri, Daisy, Stephan, Lena, Claudia, Christoph, Inga …. ihr habt den Mist erträglich gemacht ;-)

Ich muss mich bedanken bei Lena, Thomas und Miri, die mich bis zur letzten Sekunde durch Korrekturlesen und aufmunternde Worte unterstützt haben!

Lena, du bist einzigartig! DANKE!
Ich bedanke mich bei meiner Familie, bei Ralf, bei Ida. Danke für die Unterstützung, die Liebe, den Sonnenschein …fürs Klingelschild...

11 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist. Darüber hinaus versichere ich, dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät zur Prüfung vorgelegen hat.

Düsseldorf, Oktober 2019 Christine Tibbe