

**Molekularbiologische und biochemische  
Analysen zur Charakterisierung der Funktion  
von CC2D1-Proteinen**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

**Kristina Ruhnau**  
aus Tscheljabinsk, Russland

Düsseldorf, Mai 2020

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

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

Berichtersteller:

1. Prof. Dr. Thomas Klein

2. Prof. Dr. Lutz Schmitt

Tag der mündlichen Prüfung: 22.07.2020

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Der endosomale Transportweg .....	1
1.2 Die ESCRT-Maschinerie .....	3
1.3 Der Notch-Signalweg.....	6
1.4 Die CC2D1-Proteinfamilie .....	9
1.5 Ziele der Arbeit .....	17
<b>2. Ergebnisse</b> .....	<b>18</b>
2.1 Funktionsanalyse der CC2D1-Proteine aus Säugern .....	18
2.1.1 Knockout-Zelllinien zur Charakterisierung der Funktion von CC2D1-Proteinen .....	18
2.1.2 Verifizierung der <i>Cc2d1</i> -defizienten MEFs.....	21
2.1.3 Analyse einer möglichen CC2D1-Funktion im endosomalen Transportweg.....	24
2.1.4 Analyse einer möglichen Funktion der CC2D1-Proteine in der Regulation des Notch-Signalwegs.....	38
2.1.5 Analyse der CC2D1-Funktion in der Aufrechterhaltung der Kernhüllenintegrität.....	42
2.2 Analyse der biochemischen Grundlage der Interaktion zwischen CC2D1-Proteinen und CHMP4B .....	55
2.2.1 Charakterisierung von CHMP4B <sup>A54C;L180C</sup> in Bezug auf seine Funktionalität und Bindungsfähigkeit an CC2D1-Proteine.....	56
2.2.2 Etablierung der optimalen Expressionsbedingungen für CC2D1 und CHMP4B.....	59
2.2.3 Etablierung der Reinigungsbedingungen für CC2D1B und CHMP4B <sup>A54C;L180C</sup> .....	66
2.2.4 Konformationsanalyse von CHMP4B <sup>A54C;L180C</sup> .....	74
2.2.5 Chemische Quervernetzung von CHMP4B <sup>A54C;L180C</sup> zur Strukturanalyse von CHMP4B.....	78
<b>3. Diskussion</b> .....	<b>82</b>
3.1 Die Funktion im endosomalen Transportweg ist innerhalb der CC2D1-Proteinfamilie konserviert und wird von beiden Säuger-Homologen ausgeführt .....	83
3.2 CC2D1-Proteine tragen in unterschiedlichem Maße zur Integrität der Kernhülle bei .....	89
3.3 CHMP4B favorisiert in Lösung den geschlossenen Zustand. Seine Konformation wird durch die Interaktion mit CC2D1B nicht beeinflusst.....	95
<b>4. Zusammenfassung / Summary</b> .....	<b>102</b>

---

4.1 Zusammenfassung .....	102
4.2 Summary .....	103
<b>5. Material und Methoden .....</b>	<b>104</b>
5.1 Material .....	104
5.1.1 Nukleinsäure-Techniken .....	104
5.1.1.1 Polymerasekettenreaktion .....	104
5.1.1.2 DNA-Gelelektrophorese .....	105
5.1.1.3 DNA-Gelextraktion .....	105
5.1.1.4 Restriktionsspaltung .....	105
5.1.1.5 Plasmide .....	105
5.1.1.6 Ligation .....	106
5.1.1.7 Kultivierung von Bakterien .....	106
5.1.1.8 Plasmid-DNA-Mini-Präparation .....	106
5.1.1.9 Plasmid-DNA-Midi-Präparation .....	107
5.1.1.10 Sequenzierung .....	107
5.1.1.11 RNA-Extraktion aus MEFs .....	107
5.1.1.12 DNase I Behandlung von RNA-Proben .....	107
5.1.1.13 cDNA-Synthese .....	107
5.1.2 Proteinbiochemie .....	107
5.1.2.1 Proteinextraktion aus Zellen .....	107
5.1.2.2 Co-Immunopräzipitation .....	108
5.1.2.3 Etablierung der Expressionsbedingungen in Bakterien .....	108
5.1.2.4 Proteinreinigung .....	109
5.1.2.5 Renaturierung / Pufferaustausch .....	109
5.1.2.6 Größenausschlusschromatographie (SEC) .....	110
5.1.2.7 Konzentrierung der Proteine .....	110
5.1.2.8 Konzentrationsbestimmung der Proteine .....	110
5.1.2.9 Cystein-basierte Quervernetzung der Proteine .....	110
5.1.2.10 Auftrennung der Proteine mittels einer diskontinuierlichen SDS- Gelelektrophorese .....	110
5.1.2.11 Coomassie-Blau-Färbelösung .....	111

---



---

5.1.2.12	Western Blot mittels des Semi-Dry-Verfahrens .....	112
5.1.2.13	Ponceau-Rot-Färbung der Proteine auf PVDF-Membran .....	112
5.1.2.14	Immundetektion von Proteinen auf PVDF-Membran .....	112
5.1.2.15	Visualisierung der Proteine .....	113
5.1.2.16	„Strippen“ der Membran .....	113
5.1.3	Zellkulturtechniken .....	113
5.1.3.1	Auftauen, Passagieren, Einfrieren von Zellen .....	113
5.1.3.2	Transfektion von Zellen .....	113
5.1.3.3	Immunzytochemie .....	114
5.1.3.4	Einbettung und Kontrastierung der Zellen für TEM-Analysen .....	115
5.1.3.5	Zelllinien .....	115
5.1.4	<i>Drosophila melanogaster</i> Techniken .....	115
5.1.4.1	Kultivierung von <i>D. melanogaster</i> .....	115
5.1.4.2	Immunhistochemie an Flügelimaginalscheiben .....	116
5.1.5	Fliegenstämme .....	116
5.1.6	Geräte .....	117
5.1.7	Programme und Internetdatenbanken .....	117
5.2	Methoden .....	118
5.2.1	Nukleinsäure-Techniken .....	118
5.2.1.1	Polymerasekettenreaktion .....	118
5.2.1.2	DNA-Gelelektrophorese .....	122
5.2.1.3	DNA-Gelextraktion .....	122
5.2.1.4	Restriktionsspaltung .....	122
5.2.1.5	Ligation .....	123
5.2.1.6	Transformation chemisch kompetenter Bakterien .....	123
5.2.1.7	Plasmid-DNA-Mini-Präparation .....	123
5.2.1.8	Plasmid-DNA-Midi-Präparation .....	124
5.2.1.9	Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren .....	124
5.2.1.10	Sequenzierung .....	124
5.2.1.11	RNA-Extraktion aus MEFs .....	125
5.2.1.12	DNase I Behandlung von RNA-Proben .....	125

---

---

5.2.1.13	cDNA-Synthese .....	126
5.2.2	Proteinbiochemie.....	126
5.2.2.1	Proteinextraktion aus Zellen.....	126
5.2.2.2	Co-Immunopräzipitation .....	127
5.2.2.3	Etablierung der Expressionsbedingungen in Bakterien .....	128
5.2.2.4	Proteinexpression in <i>E. coli</i> .....	129
5.2.2.5	Proteinreinigung unter nativen Bedingungen .....	130
5.2.2.6	Proteinreinigung unter denaturierenden Bedingungen .....	131
5.2.2.7	Größenausschlusschromatographie .....	131
5.2.2.8	Renaturierung / Pufferaustausch.....	132
5.2.2.9	Konzentrierung der Proteine.....	132
5.2.2.10	Konzentrationsbestimmung der Proteine.....	133
5.2.2.11	Cystein-basierte Quervernetzung der Proteine .....	133
5.2.2.12	Auftrennung von Proteinen mittels einer diskontinuierlichen SDS- Gelelektrophorese.....	134
5.2.2.13	Visualisierung von Proteinen mittels der kolloidalen Coomassie-Brillant- Blau-Lösung.....	135
5.2.2.14	Western Blot mittels des Semi-Dry-Verfahrens .....	135
5.2.2.15	Ponceau-Rot-Färbung von Proteinen auf einer PVDF-Membran.....	136
5.2.2.16	Immundetektion von Proteinen auf PVDF-Membran.....	136
5.2.2.17	„Strippen“ der Membran.....	137
5.2.2.18	Massenspektrometrie.....	137
5.2.2.19	Proteinkristallisation .....	139
5.2.3	Zellkulturtechniken.....	140
5.2.3.1	Auftauen von Zellen.....	140
5.2.3.2	Passagieren von Zellen.....	140
5.2.3.3	Aussäen von Zellen .....	140
5.2.3.4	Transfektion von Zellen .....	140
5.2.3.5	Einfrieren von Zellen.....	141
5.2.3.6	Immunzytochemie .....	141
5.2.3.7	Einbettung und Kontrastierung der Zellen für TEM-Analysen.....	142
5.2.4	<i>Drosophila melanogaster</i> Techniken.....	144

---

---

5.2.4.1	Generierung transgener Fliegen .....	144
5.2.4.2	Anzucht und Haltung von <i>Drosophila melanogaster</i> .....	144
5.2.4.3	Kreuzungen von <i>Drosophila melanogaster</i> .....	144
5.2.4.4	Klonale Analyse in <i>Drosophila melanogaster</i> .....	144
5.2.4.5	Immunhistochemie an Flügelimaginalscheiben .....	145
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>146</b>
<b>7.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>152</b>
<b>8.</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>157</b>
8.1	Rohdaten Massenspektrometrie.....	157
8.2	Teilpublikationen im Rahmen dieser Arbeit.....	170
<b>9.</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>171</b>
<b>10.</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung.....</b>	<b>172</b>

## 1. Einleitung

Metazoen lassen sich durch eine hohe Zelltyp-Diversität charakterisieren. Die interzelluläre Kommunikation, die auf einem Netzwerk unterschiedlicher Signalwege basiert, stellt dabei die Grundvoraussetzung für die Aufrechterhaltung des gesamten Organismus dar. Die Signalwege, die den Zell-Zell-Kontakt ermöglichen, umfassen ein Spektrum an Liganden, Rezeptoren und Transkriptionsfaktoren, deren Aktivität sich auf die Expression der Zielgene auswirkt und demzufolge einer strengen Koordination unterliegt. Eine Möglichkeit, die Aktivität eines Signalwegs zu regulieren, besteht in der Endozytose der beteiligten Komponenten. So werden nicht mehr benötigte Transmembranproteine auf diese Weise in die Zelle internalisiert, in endosomale Kompartimente verpackt und anschließend degradiert (Übersicht in Huotari und Helenius, 2011). Auf dem Weg zu ihrer vollständigen, Abbau-bedingten Inaktivierung durchlaufen diese Proteine die gesamte Route des endosomalen Transportwegs.

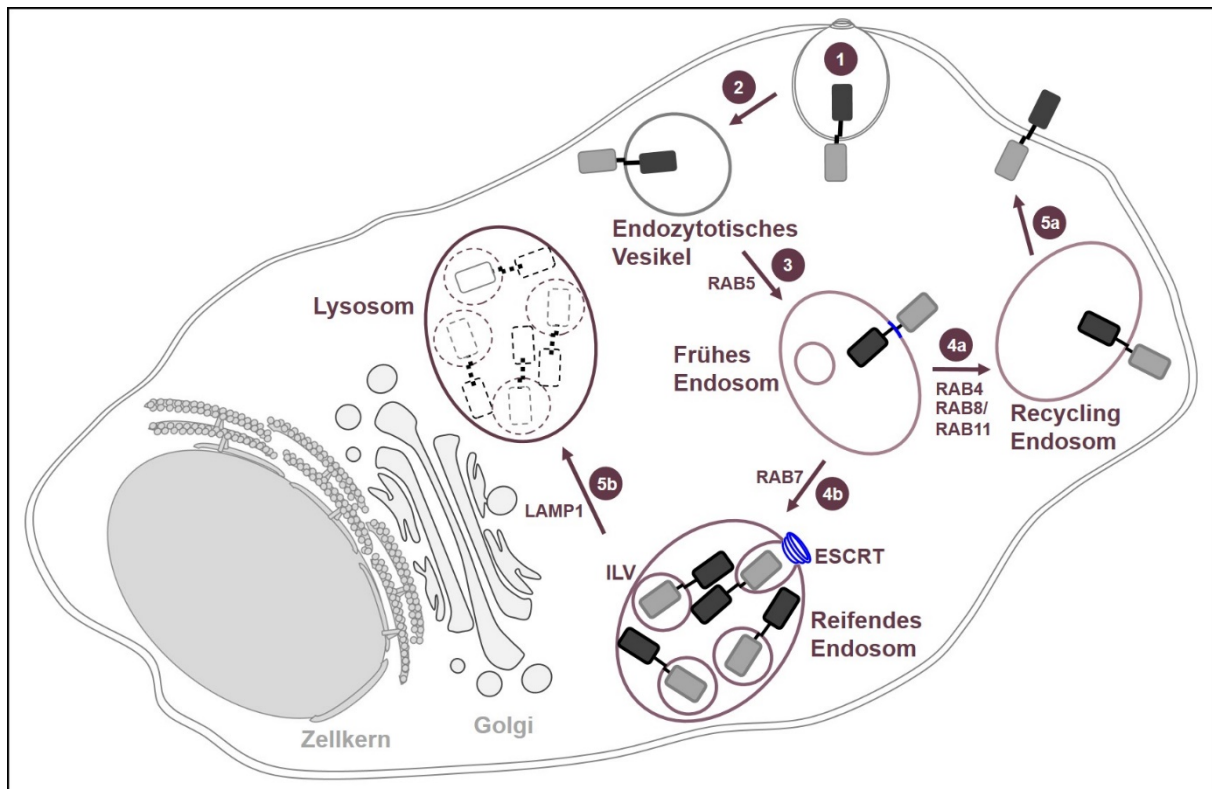
### 1.1 Der endosomale Transportweg

Die Endozytose wird durch die Invagination der Membran ins Zellinnere mit anschließender Abschnürung des endozytotischen Vesikels eingeleitet (Abb. 1.1 **(1)**), wobei dieser Vorgang sowohl Clathrin- oder Caveolin-vermittelt als auch unabhängig von beiden Hüllproteinen ablaufen kann (Übersicht in Mayor und Pagano, 2007). Die entstandenen primären Vesikel lokalisieren in der Nähe der Plasmamembran (Abb. 1.1 **(2)**), wo sie entweder miteinander verschmelzen, um ein frühes Endosom zu bilden, oder mit einem bereits bestehenden fusionieren (Abb. 1.1 **(3)**) (Übersicht in Huotari und Helenius, 2011).

Frühe Endosomen fungieren als Sortierungsstationen (Übersicht in Jovic et al., 2010), an denen entschieden wird, ob die aufgenommene Fracht wiederverwendet und aus diesem Grund über Recycling-Endosomen (Abb. 1.1 **(4a)**) zurück an die Plasmamembran befördert wird (Abb. 1.1 **(5a)**) (Übersicht in Maxfield und McGraw, 2004) oder ob sie abgebaut wird. Im Fall, dass die Fracht durch Ubiquitin markiert und damit zur Degradation vorgesehen ist, verbleibt sie solange im frühen Endosom bis das Vesikel nach dem Reifungsprozess (Abb. 1.1 **(4b)**) mit einem Lysosom fusioniert (Abb. 1.1 **(5b)**) (Übersicht in Clague et al., 2012).

Der Übergang zu einem reifenden Endosom setzt einige Modifikationen voraus. Der pH-Wert innerhalb des Vesikel-Lumens geht von einem leicht sauren in den mittel sauren Bereich über. Die GTPase Rab5, die mit frühen Endosomen assoziiert und sie auf diese Weise markiert, wird durch die GTPase Rab7 als Markerprotein für reifende Endosomen ersetzt (Übersicht in Huotari und Helenius, 2011). Die intraluminalen Vesikel (ILVs), deren Bildung bereits in frühen Endosomen angefangen hat (Raiborg et al., 2002; Sachse et al., 2002), nehmen in ihrer

Anzahl drastisch zu und füllen das Lumen des reifenden Endosoms aus (Abb. 1.1 **(4b)**) (Übersicht in Huotari und Helenius, 2011).



**Abbildung 1.1: Der endosomale Transportweg.** Die Internalisierung von Transmembranproteinen wird durch die Einstülpung der Membran **(1)** mit anschließender Abschnürung des endozytotischen Vesikels **(2)** ins Zytoplasma initiiert. Die primären Vesikel verschmelzen miteinander oder fusionieren mit einem bereits bestehenden frühen Endosom **(3)**, das sich durch die Assoziation mit der GTPase RAB5 und einer geringen Anzahl bereits gebildeter intraluminaler Vesikel (ILVs) charakterisieren lässt. In diesem Kompartiment wird über das Schicksal der endozytierten Fracht entschieden. Kann das aufgenommene Material wiederverwendet werden, so wird es mittels eines Recycling-Endosoms **(4a)** entweder über eine langsame, RAB4-positive oder eine schnelle, RAB8/ RAB11-assoziierte Route zurück an die Plasmamembran **(5a)** befördert. Ist das Protein durch Ubiquitin für den Abbau markiert, so verbleibt es im frühen Endosom während das Vesikel einen Reifungsprozess erfährt. Die reifenden Endosomen zeichnen sich durch die GTPase RAB7 und zahlreiche ILVs aus **(4b)**, die für die vollständige Verpackung von Transmembranrezeptoren absolut erforderlich sind. Die Fusion des reifenden Endosoms mit dem Lysosom **(5b)** resultiert in der Degradation der Fracht infolge der darin enthaltenen Hydrolasen und des herrschenden sauren Milieus.

Aufgrund der zahlreichen ILVs werden die reifenden Endosomen als MVBs (*multivesicular bodies*) bezeichnet. Ihre Entstehung ist für den vollständigen Abbau von Transmembranproteinen essentiell, denn nur auf diese Weise kann eine vollständige Verpackung des Proteins in die Vesikel und die damit verbundene Isolation der Signalleitenden Domäne vom Zytoplasma gewährleistet werden (Übersicht in Sorkin und von Zastrow, 2009). Die ILV-Bildung ist hoch komplex und wird durch die ESCRT-Maschinerie durchgeführt.

Während ihres Reifungsprozesses wandern Endosomen in Richtung der perinukleären Region, wo die meisten Lysosomen lokalisieren, um mit ihnen zu fusionieren (Abb. 1.1 **(5b)**). Nach der Verschmelzung mit dem Lysosom erfolgt der Hydrolasen-vermittelte Abbau der in ILVs verpackten Fracht (Übersicht in Huotari und Helenius, 2011).

## 1.2 Die ESCRT-Maschinerie

Die ILV-Biogenese, die bereits in frühen Endosomen anfangen hat (Wenzel et al., 2018), wird im Laufe des Reifungsprozesses weitergeführt, so dass reife Endosomen durch zahlreiche ILVs gekennzeichnet sind. Dieser Prozess basiert auf einer konservierten Maschinerie, die im Jahre 2001 in Hefe identifiziert und entsprechend ihrer Funktion als ESCRT (*Endosomal Sorting Complex Required for Transport*) benannt wurde (Katzmann et al., 2001). Durch mehrere unabhängige Studien konnte gezeigt werden, dass die ESCRT-Maschinerie neben der Funktion in der ILV-Bildung in zahlreiche weitere, membranmodulierende Vorgänge involviert ist, zu denen die Zytokinese (Spitzer et al., 2006; Carlton und Martin-Serrano, 2007; Morita et al., 2007), die Mitose-bedingte Neuassemblierung der Kernhülle (Olmos et al., 2015; Vietri et al., 2015; Ventimiglia et al., 2018) sowie die Reparatur der Plasmamembran (Jimenez et al., 2014) zählen. Außerdem wurde nachgewiesen, dass das ESCRT-System einer Wirtszelle von HIV-1 genutzt wird, um seine Freisetzung aus der Zelle zu ermöglichen (Übersicht in Morita und Sundquist, 2004; Fujii et al., 2007).

Die ESCRT-Maschinerie setzt sich aus vier sequentiell agierenden Komplexen (ESCRT-0, -I, -II, -III) sowie der AAA ATPase VPS4 zusammen (Übersicht in Hurley, 2010; Babst, 2011), wobei jeder Komplex aus mehreren Untereinheiten aufgebaut ist. Die ESCRT-0-II-Komplexe sind für die Erkennung und Konzentrierung der abzubauenen Proteine zuständig. Im Gegensatz dazu führen ESCRT-III und VPS4 eine membranmodulierende Funktion aus, die letztendlich in der Abschnürung der entstehenden ILVs resultiert (Übersicht in Alonso et al., 2016). Die Funktion des ESCRT-III-Komplexes und der ATPase VPS4 wird zusätzlich durch akzessorische ESCRT-Proteine unterstützt (Übersicht in Hurley, 2010).

Da einzelne Komponenten der ESCRT-Maschinerie neben Hefe gleichzeitig in weiteren Modellorganismen entdeckt wurden, bevor bekannt wurde, dass es sich hierbei um Orthologe handelt, wurden den Hefe- und Säuger-Proteinen zum größten Teil unterschiedliche Namen gegeben. Eine Übersicht über die ESCRT-Komponenten sowie deren Nomenklatur in Hefe und Säugern ist in Tabelle 1.1 dargestellt. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird, falls nicht explizit auf andere Organismen hingewiesen, die Säuger-Nomenklatur verwendet.

Tabelle 1.1: Untereinheiten der ESCRT-Komplexe in Hefe und Säugern

Komplex	Hefe	Säuger
ESCRT-0	Vps27 / Hse1	HRS / STAM1,2
ESCRT-I	Vps23 / Mvb12 / Vps37 / Vps28	TSG101 / MVB12 A,B / VPS37 A,B,C,D / VPS28
ESCRT-II	Vps36 / Vps22 / Vps25	EAP45 / EAP30 / EAP20
ESCRT-III	Vps20 / Snf7 / Vps24 / Vps2	CHMP6 / CHMP4 A,B,C / CHMP3 / CHMP2 A,B
Akzessorisch	Did2 / Ist1 / Vps60 / Chmp7	CHMP1 A,B / IST1 / CHMP5 / CHMP7
VPS4 Akzessorisch	Vps4 Vta1 / Bro1	VPS4 A,B LIP5 / ALIX

Die Initiierung der MVB-Bildung erfolgt durch den ESCRT-0-Komplex, der mittels seiner HRS-Untereinheit das in der limitierenden endosomalen Membran enthaltene Phosphatidylinositol 3-Phosphat (PI3P) bindet und somit in die Nähe der Ubiquitin-markierten abzubauenen Fracht kommt (Abb. 1.2 (1)) (Burd und Emr, 1998; Komada und Soriano, 1999; Raiborg et al., 2001). Dies erlaubt dem ESCRT-0-Komplex mittels seiner Untereinheiten HRS und STAM Ubiquitin zu binden und die Fracht auf diese Weise an der limitierenden Membran zu konzentrieren.

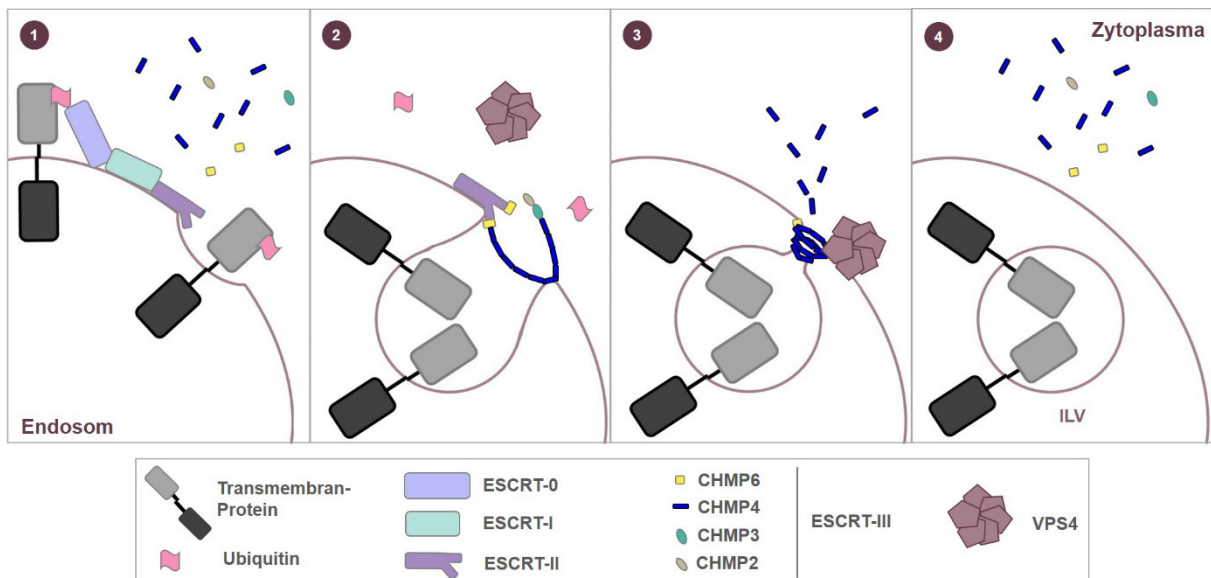
Im Anschluss darauf wird der ESCRT-I-Komplex, der sich aus den Untereinheiten TSG101, VPS28, VPS37 und MVB12 in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1:1:1 zusammensetzt, an die endosomale Membran rekrutiert (Abb. 1.2 (1)) (Gill et al., 2007; Kostelansky et al., 2007). Mittels des TSG101 kann der ESCRT-I-Komplex sowohl an Ubiquitin als auch an ESCRT-0 binden (Bache et al., 2003; Katzmann et al., 2003; Lu et al., 2003), wobei der ganze Komplex durch die Untereinheit MVB12 stabilisiert wird. Während VPS37 für die zusätzliche Membranbindung benötigt wird, vermittelt VSP28 die Interaktion mit EAP45, das eine Untereinheit des als nächstes rekrutierten ESCRT-II-Komplexes darstellt (Teo et al., 2006; Gill et al., 2007). Zusätzlich zu EAP45-Untereinheit besteht der ESCRT-II-Komplex aus einer EAP30-Komponente, die mit der endosomalen Oberfläche interagiert (Im und Hurley, 2008), sowie aus zwei EAP20-Untereinheiten, die für die Rekrutierung und Aktivierung von ESCRT-III benötigt werden (Abb. 1.2 (1)) (Teo et al., 2004).

Der ESCRT-III-Komplex ist aus vier CHMP (*charged multivesicular body protein*)-Untereinheiten aufgebaut, die als CHMP6, CHMP4, CHMP3 und CHMP2 bezeichnet werden, wobei dem CHMP4 drei (CHMP4A/B/C) und CHMP2 zwei (CHMP2A/B) Homologe in Menschen zugeordnet werden (Tab. 1.1) (Übericht in Hurley, 2010). Anders als bei ESCRT-0-II liegen die Komponenten des ESCRT-III-Komplexes in einer monomeren, autoinhibitorischen Form im Zytoplasma vor (Abb. 1.2 (1)) (Bajorek et al., 2009) und werden erst an der limitierenden Membran assembliert (Abb. 1.2 (2)) (Henne et al., 2013).

Den Auslöser dafür stellt das Protein CHMP6 dar, das direkt mit EAP30 vom ESCRT-II interagiert und als Startpunkt für die Polymerisation von CHMP4 dient (Abb. 1.2 **(2)**). Dabei ist die CHMP4-Polymerisation für die ILV-Abschnürung von zentraler Bedeutung. Jedoch ist der genaue Mechanismus, der der CHMP4-Polymerisation zugrunde liegt, noch weitgehend unbekannt. Die Kristallstruktur von einem Teilfragment von CHMP4B, das ein Drittel des Gesamtproteins abdeckt, zeigt im N-terminalen Bereich des Proteins die Bildung einer helikalen Haarnadel (Martinelli et al., 2012). Dennoch liefert diese Information keine Erkenntnisse über die intermolekulare CHMP4B-Interaktion und somit über seine Polymerisation. Im Gegensatz dazu konnte anhand der Kristallstruktur von Teilfragmenten von Shrub, dem CHMP4B-Ortholog aus *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*), gezeigt werden, dass die ebenfalls zwischen den zwei ersten Helices gebildete helikale Haarnadel für die elektrostatische Wechselwirkung zwischen zwei Shrub-Molekülen benötigt wird (McMillan et al., 2017). Dort wird der negativ geladene Bereich eines Monomers durch die positiv geladene Kopf-Region des nächsten Monomers gebunden. Im Unterschied zu Shrub scheint die Polymerisation von Snf7, dem CHMP4B-Ortholog aus Hefe, überwiegend auf einer hydrophoben Wechselwirkung zu basieren (Tang et al., 2015). Auch in diesem Fall konnte ein Teil der Struktur aufgeklärt werden, der den Proteinbereich zwischen  $\alpha$ 1- und  $\alpha$ 4-Helix abdeckt und sich in der Bildung einer helikalen Haarnadel zwischen  $\alpha$ 1- und  $\alpha$ 2-Helix äußert, wobei der C-terminale Bereich der Struktur einen „Knick“ zeigt (Tang et al., 2015). Außerdem konnte für Snf7 gezeigt werden, dass dieses Protein an Membranen in einer geöffneten Konformation vorliegt, während in Lösung eine Mischpopulation aus geschlossenem und offenem Zustand existiert (Henne et al., 2012; Tang et al., 2015). Ob CHMP4B aus Säugern ebenfalls eine konformationelle Wandlung während seiner Route zwischen der endosomalen Membran und dem Zytoplasma durchläuft, wurde noch nicht gezeigt.

Die CHMP4B-Polymerisation wird durch eine weitere ESCRT-III-Untereinheit, CHMP3, terminiert. Ihre Interaktion mit CHMP2 resultiert in der Rekrutierung der ATPase VPS4, die in der Anwesenheit von ATP vorwiegend in Form eines Hexamers vorliegt (Monroe et al., 2014). Der VPS4-Komplex leitet eine energieabhängige Disassemblierung des ESCRT-III-Komplexes ein (Abb. 1.2 **(3)**) (Ghazi-Tabatabai et al., 2008; Lata et al., 2008; Saksena et al., 2009), so dass seine einzelnen Untereinheiten vollständig entfaltet werden und in Form von Polypeptidketten vorliegen (Yang et al., 2015; Monroe et al., 2017). Die auf diese Weise entstandenen monomeren ESCRT-III-Komponenten stehen für den nächsten Zyklus der ILV-Bildung zur Verfügung (Abb. 1.2 **(4)**) und sind demnach einem Kreislauf aus Assemblierung an der limitierenden Membran und kompletter Entfaltung durch die ATPase VPS4 ausgesetzt (Übersicht in Hurley und Yang, 2014).





**Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der ESCRT-vermittelten ILV-Bildung.** (1) Die Initiierung der ILV-Biogenese beginnt mit der Rekrutierung des ESCRT-0-Komplexes an die endosomale Membran, wo er die zum Abbau vorgesehenen Ubiquitin-markierten Proteine erkennt. Unmittelbar darauf werden ESCRT-I und ESCRT-II-Komplexe rekrutiert. Der ESCRT-II-Komplex löst durch seine Interaktion mit CHMP6 die Assemblierung des ESCRT-III-Komplexes aus, dessen Untereinheiten in einem monomeren Zustand im Zytoplasma vorliegen. (2) CHMP6 dient als Startpunkt für CHMP4, das spiralförmig um die eingestülpte Membran polymerisiert, wodurch die ILV-Abschnürung ermöglicht wird. Seine Polymerisation wird durch die Interaktion mit CHMP3 terminiert. (3) Die anschließende CHMP2-Bindung an das Polymer resultiert in der Rekrutierung der ATPase VPS4, deren Aktivität für die ILV-Abschnürung mit anschließender Hydrolyse des ESCRT-III-Komplexes benötigt wird. (4) Infolgedessen wird ein MVB gebildet, während die monomeren Bestandteile des ESCRT-III-Komplexes für die nächste Runde der ILV-Bildung zur Verfügung stehen.

Wie bereits beschrieben, spielt der endosomale Transportweg eine essentielle Rolle bei der Regulation von Signalwegen. Der Notch-Signalweg, der fundamentale Prozesse steuert, unterliegt ebenfalls einer streng regulierten Kontrolle mittels des endosomalen Transportwegs.

### 1.3 Der Notch-Signalweg

Der Notch-Signalweg ist in allen Metazoen ein hoch konservierter Prozess, der die Zell-Zell-Kommunikation auf kurze Distanzen vermittelt und in die Regulation der Zelldifferenzierung, Proliferation, Apoptose sowie in Erhalt von Stammzellen involviert ist (Übersicht in Kimble und Simpson, 1997; Weinmaster, 1997; Artavanis-Tsakonas et al., 1999). Der erste mutante Phänotyp, der mit diesem Signalweg in Verbindung gebracht wurde, konnte bereits 1914 in *D. melanogaster* beobachtet werden (Übersicht in Fiuza und Arias, 2007).

Die Signalübertragung basiert auf drei Hauptkomponenten: einem aktivierenden Liganden in der Signal-sendenden Zelle, einem Notch-Rezeptor in der Signal-empfangenden Zelle sowie einem Transkriptionsfaktor. Während in *D. melanogaster* nur ein Notch-Rezeptor exprimiert

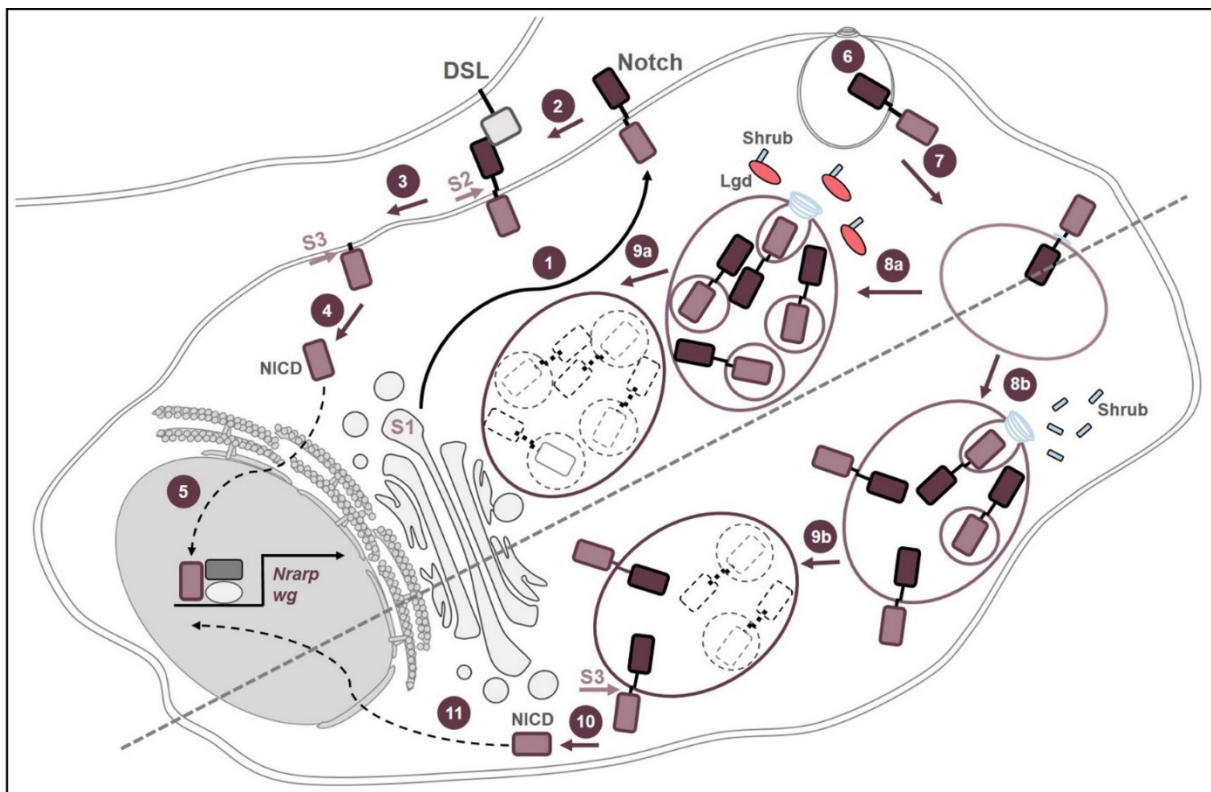
---

wird, kommen in Säugern vier Varianten vor (Notch1-Notch4) (Maine et al., 1995; Lissemore und Starmer, 1999).

Unabhängig vom Organismus werden alle Notch-Rezeptoren als 300-350 kDa „*Single-pass*“-Transmembranproteine im endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert und anschließend zum trans-Golgi transportiert (Übersichten in Fiuza und Arias, 2007; Ables et al., 2011). Dort erfahren sie ihre erste proteolytische Spaltung, die durch eine Furin-ähnliche Konvertase ausgeführt wird (Logeat et al., 1998; Nichols et al., 2007). Die auf diese Weise prozessierten Rezeptoren werden in Form eines Heterodimers zur Plasmamembran befördert (Abb. 1.3 **(1)**) (Blaumueller et al., 1997; Logeat et al., 1998).

Das in der Plasmamembran verankerte Heterodimer weist N-Terminal die extrazelluläre Domäne auf, die von der C-terminalen intrazellulären Domäne durch die Transmembrandomäne getrennt wird (Übersicht in Fiuza und Arias, 2007). Der extrazelluläre Bereich fungiert als Signal-empfangender Teil des Rezeptors, der durch die Anwesenheit von EGF-ähnlichen Wiederholungen gekennzeichnet ist. EGF-ähnliche Sequenzen sind für die Interaktion mit Liganden erforderlich und variieren in ihrer Anzahl zwischen den einzelnen Spezies (Übersichten in Fiuza und Arias, 2007; Gordon et al., 2008). Das unmittelbar darauffolgende Cystein-reiche Lin12-Notch-Motif (LN) vermittelt eine Ca<sup>2+</sup>-abhängige Interaktion zwischen dem extrazellulären Teil des Rezeptors und der Membran-verankerten Region seiner intrazellulären Domäne (Rand et al., 2000). Diese Interaktion erfolgt über die Heterodimerisierungs-Domäne und beruht auf einer nicht-kovalenten Bindung (Übersicht in Fiuza und Arias, 2007).

Das in der Plasmamembran lokalisierte Notch-Heterodimer interagiert mit einem seiner Liganden (Delta und Serrate in *D. melanogaster*; Jagged oder Delta-like in Säugern), wodurch eine Konformationsänderung des Rezeptors zustande kommt. Dies führt zur Freigabe der S2-Schnittstelle innerhalb der extrazellulären Domäne (Abb. 1.3 **(2)**) (Übersicht in Fiuza und Arias, 2007). Die Erkennung dieser Schnittstelle durch eine Metalloprotease der ADAM-Proteinfamilie resultiert in der proteolytischen Abspaltung der extrazellulären Domäne (Brou et al., 2000; Mumm et al., 2000). Dies erlaubt den dritten proteolytischen Schnitt, der innerhalb der in der Membran-verankerten Region von einer Presenilin-abhängigen  $\gamma$ -Sekretase ausgeführt wird (Abb. 1.3 **(3)**) (Kopan et al., 1996; Schroeter et al., 1998), wobei die intrazelluläre Domäne des Notch-Rezeptors (NICD) ins Zytoplasma freigesetzt wird (Abb. 1.3 **(4)**). Im Anschluss darauf transloziert die NICD in den Zellkern, um die Expression der Notch-Zielgene (z.B. *wg* in *D. melanogaster*; *Nrarp* oder *Hes1* in Säugern) zu aktivieren (Abb. 1.3 **(5)**) (Jarriault et al., 1995; Lamar et al., 2001).



**Abbildung 1.3: Der Notch-Signalweg.** Der in ER synthetisierte und in Golgi (S1) prozessierte Notch-Rezeptor wird an die Plasmamembran befördert (1), wo er mit den Liganden aus der Signal-sendenden Zelle wechselwirken kann (2). Diese Interaktion resultiert in einer Konformationsänderung des Rezeptors und erlaubt einen proteolytischen Schnitt (S2) innerhalb seiner extrazellulären Domäne, der durch eine Metalloprotease der ADAM-Familie ausgeführt wird. Unmittelbar darauf kommt es zur Spaltung des in der Membran-verankerten Teils des Proteins (3) mittels der  $\gamma$ -Sekretase (S3), die die Freisetzung der intrazellulären Domäne (NICD) (4) zur Folge hat. Die freigesetzte NICD transloziert in den Zellkern (5), um dort mit Transkriptionsfaktoren zu interagieren und die Expression der Notch-Zielgene zu initiieren. Findet die Aktivierung des an der Plasmamembran lokalisierten Rezeptors nicht statt, unterliegt das Protein der Endozytose (6). Nach der Invagination der Plasmamembran und Abschnürung des Vesikels wird die extrazelluläre Domäne des Rezeptors in ein frühes Endosom verpackt (7), während die NICD nach außen vom Endosom weg ins Zytoplasma ragt. Die Trennung der NICD vom Zytoplasma und somit die vollständige Degradation des Rezeptors (9a) bedarf ihrer Verpackung in die ILVs (8a), deren Bildung auf der ESCRT-Maschinerie basiert. In *D. melanogaster* wird der Prozess der MVB-Bildung mittels der ESCRT-Maschinerie durch Lgd koordiniert, wobei Lgd höchstwahrscheinlich für die volle Aktivität von Shrub, die zentrale Untereinheit des ESCRT-III-Komplexes, benötigt wird. Kommt es zum Lgd-Verlust, resultiert dies in einer gestörten ILV-Bildung (8b). Die NICD bleibt auf diese Weise außerhalb des Endosoms und kann nach der Fusion mit Lysosom (9b) durch den S3-Schnitt abgespalten werden (10). Sie transloziert in den Zellkern (11), aktiviert die Expression der Notch-Zielgene und löst somit eine Liganden-unabhängige Aktivierung des Notch-Signalwegs aus.

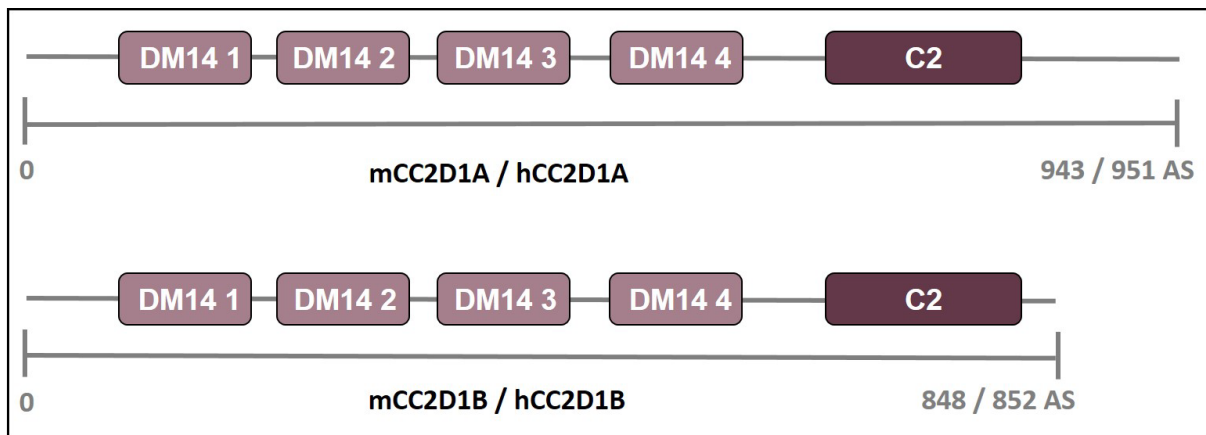
Findet die Aktivierung des Notch-Rezeptors nicht statt, unterliegt das Protein dem lysosomalen Abbau. Durch die Einstülpung der Membran um den Rezeptor (Abb. 1.3 (6)) und Abschnürung des Vesikels (Abb. 1.3 (7)) wird die extrazelluläre Domäne des Rezeptors eingeschlossen. Die räumliche Trennung der NICD vom Zytoplasma und somit die vollständige Degradation des Rezeptors (Abb. 1.3 (9a)) setzt jedoch eine ILV-Bildung voraus (Abb. 1.3 (8a)), die auf der Aktivität der ESCRT-Maschinerie basiert. In *D. melanogaster* wird die MVB-Bildung durch ein

Protein namens Lgd koordiniert, das zu der CC2D1-Proteinfamilie gehört und höchstwahrscheinlich für die volle Shrub-Aktivität benötigt wird. Kommt es zum Lgd-Verlust, resultiert dies in einer fehlgeschlagenen Verpackung des Proteins (Abb. 1.3 **(8b)**), wobei NICD sich außerhalb des Endosoms befindet und nach der Fusion mit dem Lysosom (Abb. 1.3 **(9b)**) durch den S3-Schnitt abgespalten werden kann (Abb. 1.3 **(10)**). Als Folge dessen transloziert NICD in den Zellkern und löst eine Liganden-unabhängige Expression der Notch-Zielgene aus (Abb. 1.3 **(11)**) (Schneider et al., 2013).

#### 1.4 Die CC2D1-Proteinfamilie

CC2D1 (*coiled coil and conserved region 2 (C2) domain-containing 1*)-Proteine sind Mitglieder einer hoch konservierten Familie, die in allen Metazoen vertreten ist (Gallagher und Knoblich, 2006; Jaekel und Klein, 2006). Der erste Vertreter dieser Proteinfamilie wurde im Jahre 1971 in *D. melanogaster* identifiziert (Bryant und Schubiger, 1971), wobei das kodierende Gen dank seines Ausfallphänotyps als *lgd* (*lethal (2) giant discs*) benannt wurde. Der *lgd*-Verlust äußert sich in einem verlängerten Larvenstadium mit überproliferierten Imaginalscheiben und anschließender Letalität der betroffenen Tiere in der frühen Puppenphase (Bryant et al., 1993). Die molekulare Ursache des beschriebenen Phänotyps liegt in der ektopischen, Liganden-unabhängigen Aktivierung des Notch-Signalwegs, die die Zellproliferation und die damit verbundene Gewebeexpansion fördert (Klein, 2003; Childress et al., 2006; Gallagher und Knoblich, 2006; Jaekel und Klein, 2006).

Während in *D. melanogaster* nur ein Vertreter der CC2D1-Proteinfamilie existiert, werden in Säugern zwei Homologe exprimiert, die als CC2D1A (alternative Namen: LGD2, Freud-1, Aki1 und TAPE) und CC2D1B (LGD1, Freud-2) bezeichnet werden. Die Mehrheit der Proteine aus der CC2D1-Familie weist einen uniformen Aufbau auf (Abb. 1.4). N-Terminale befinden sich vier DM14-Domänen, die erstmalig in *D. melanogaster* identifiziert wurden und für diese Proteinfamilie einzigartig sind (Abb. 1.4) (Ponting et al., 2001). Durch mehrere unabhängige Studien konnte gezeigt werden, dass die DM14-Domänen für eine Wechselwirkung mit Interaktionspartnern benötigt werden (Martinelli et al., 2012; Usami et al., 2012; Deshar et al., 2016; McMillan et al., 2017; Ventimiglia et al., 2018). Der C-Terminus ist durch die Anwesenheit der C2-Domäne gekennzeichnet (Abb. 1.4), die bei mehreren Proteinfamilien vorkommt. Sie spielt eine Rolle bei der Wechselwirkung mit Membranen via Phospholipid-Bindung sowie bei Protein-Protein-Interaktionen (Davletov und Südhof, 1993; Sutton et al., 1995). Experimente in *D. melanogaster* haben gezeigt, dass die C2-Domäne die Stabilität und die zytoplasmatische Lokalisation von Lgd gewährleistet (Troost et al., 2012). Im Anschluss an die C2-Domäne zeigt CC2D1A eine Verlängerung im C-Terminus (Abb. 1.4), die weder bei CC2D1B noch bei Lgd vorhanden ist (Jaekel und Klein, 2006).



**Abbildung 1.4: Schematischer Aufbau der CC2D1-Proteine.** CC2D1-Proteine sind in mehrzelligen Organismen hoch konserviert und besitzen einen uniformen Aufbau. Am N-Terminus lokalisieren vier DM14-Domänen, die Protein-Protein-Interaktion vermitteln, während der C-terminale Bereich durch eine Phospholipid-bindende C2-Domäne gekennzeichnet ist. CC2D1A zeigt im Vergleich zu CC2D1B einen verlängerten C-Terminus. h: human; m: murin.

Die tertiäre Struktur der CC2D1-Proteine ist weitgehend unbekannt, wobei die zur Verfügung stehende Information aus kristallisierten Teilfragmenten von Lgd aus *D. melanogaster* gewonnen wurde. So konnte mittels der Röntgen-basierter Kristallographie gezeigt werden, dass es sich sowohl bei der dritten DM14-Domäne (McMillan et al., 2017) als auch bei dem Abschnitt proximal der C2-Domäne (Ventimiglia et al., 2018) um eine helikale Haarnadel handelt, während die C2-Domäne in Form eines  $\beta$ -Sandwiches vorliegt (Ventimiglia et al., 2018). Wie die einzelnen Domänen zueinander orientiert sind und welche dreidimensionale Form die Bereiche zwischen den DM14-Domänen bilden, bleibt unklar.

Mehrere Studien wurden durchgeführt, um die Säuger-Proteine in Bezug auf ihre Funktionen näher charakterisieren zu können. Mit Hilfe eines vollständigen *Cc2d1b*-Knockouts konnte gezeigt werden, dass *Cc2d1b*-defiziente Mäuse lebensfähig und fertil sind, keine offensichtlichen Abnormalitäten aufweisen und in ihrer Vitalität nicht beeinträchtigt sind (Drusenheimer et al., 2015). Durch eine Verhaltensanalyse hat sich jedoch herausgestellt, dass *Cc2d1b*-homozygote Tiere kognitive Einschränkungen haben, die sich in einer verminderten Lern- und Gedächtnisfähigkeit äußern (Zamarbide et al., 2018). Im Gegensatz dazu führt der *Cc2d1a*-Knockout zu postnataler Letalität der homozygoten Mäuse als Folge einer Ateminsuffizienz (Zhao et al., 2011; Al-Tawashi et al., 2012; Drusenheimer et al., 2015) und Schluckunfähigkeit (Oaks et al., 2017). Ein Gehirn-spezifischer *Cc2d1a*-Knockout resultiert ebenfalls in postnataler Mortalität und zeigt hiermit, dass der Verlust der CC2D1A-Funktion im Gehirn ausreichend ist, um letale Folgen hervorzurufen (Drusenheimer et al., 2015). Um trotz der postnatalen Sterblichkeit einen möglichen Einfluss von CC2D1A auf kognitive und soziale Fähigkeiten untersuchen zu können, wurde ein postnataler konditioneller

*Cc2d1a*-Knockout im Vorderhirn induziert, um lebensfähige Mäuse zu erhalten. Bei diesen Mäusen konnten mehrere Merkmale einer Störung in der neurologischen Entwicklung beobachtet werden. Die betroffenen Mäuse zeigten Hyperaktivität, Angst-ähnliche Zustände, verminderte Lernfähigkeit und reduziertes soziales Verhalten (Oaks et al., 2017).

Der gleichzeitige Knockout der beiden Gene ist mit der Lebensfähigkeit inkompatibel und resultiert in pränataler Letalität in frühen Entwicklungsstadien (Zamarbide et al., 2018). Vorläufige Untersuchungen zeigen, dass der Tod der doppel-homozygoten Embryonen spätestens zum Stadium E8.5 eintritt (Dronka und Dildrop - AG Klein; unveröffentlicht). Ein konditioneller Gehirn-spezifischer Knockout beider Gene, der ab Stadium E9.5 im Neuralrohr mittels der Nestin-Cre-Rekombinase induziert wird, führt ab dem Stadium E12.5 zu einer Verringerung der Zellmasse sowohl im Gehirn als auch im Rückenmark. Ob die Ursache dafür in erhöhter Apoptose oder verringerter Zellproliferation liegt, ist unklar (Dronka und Dildrop - AG Klein; unveröffentlicht).

Aktuell liegen keine Informationen vor, welche Auswirkungen ein vollständiger *CC2D1*-Verlust in Menschen hervorrufen kann. Allerdings steht eine bestimmte Mutation in *CC2D1A* mit geistiger Behinderung in Verbindung (Basel-Vanagaite et al., 2006; Basel-Vanagaite et al., 2007). Die betroffenen Personen sind intellektuell beeinträchtigt und in zwei oder mehr adaptiven Fähigkeiten eingeschränkt, weisen jedoch keine physischen Abweichungen auf. Die Ursache der genetischen Erkrankung, die autosomal rezessiv vererbt wird, liegt in einer Mutation im *CC2D1A*-Gen, die zu einem Protein führt, das aus den ersten drei DM14-Domänen gefolgt von einem 30 Aminosäuren langen Nonsense-Peptid besteht (Basel-Vanagaite et al., 2006).

Der genaue Mechanismus, der für die Ausprägung der intellektuellen Beeinträchtigung in Menschen mit mutiertem *CC2D1A* sowie in Mäusen mit Gehirn-spezifischen postnatalen Knockout verantwortlich ist, ist bislang unbekannt. Dennoch werden Störungen in neuronalen Differenzierungen und synaptischer Plastizität in Verbindung mit intellektueller Unterentwicklung gebracht. Die synaptische und neuronale Plastizität, die für Gedächtnisbildung und dementsprechend für die Lernfähigkeit von zentraler Bedeutung ist, wird unter anderem durch den NF- $\kappa$ B-Signalweg (Übersicht in Mattson und Meffert, 2006; Engelmann und Haenold, 2016) reguliert. Interessanterweise wurde das humane *CC2D1A* im Rahmen einer Studie entdeckt, die der Identifizierung humaner Gene dienen sollte, die an der Regulation des NF- $\kappa$ B-Signalwegs beteiligt sind (Matsuda et al., 2003). Basierend auf Zellkulturexperimenten konnte gezeigt werden, dass humanes *CC2D1A* in der Lage ist, den kanonischen NF- $\kappa$ B-Signalweg zu aktivieren (Abb. 1.5 (1)), wobei für diese Funktion seine C2-Domäne von entscheidender Bedeutung zu sein scheint (Zhao et al., 2010). Außerdem konnte

ein Zusammenhang zwischen der CC2D1A-vermittelten Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalwegs und dem neuronalen Phänotyp festgestellt werden (Manzini et al., 2014). *Cc2d1a*-Knockdown-Experimente in neuronalen Vorläuferzellen haben ergeben, dass der *Cc2d1a*-Verlust in einer Verringerung der Dendriten-Komplexität und gleichzeitiger Erhöhung der NF- $\kappa$ B-Aktivität resultiert (Manzini et al., 2014).

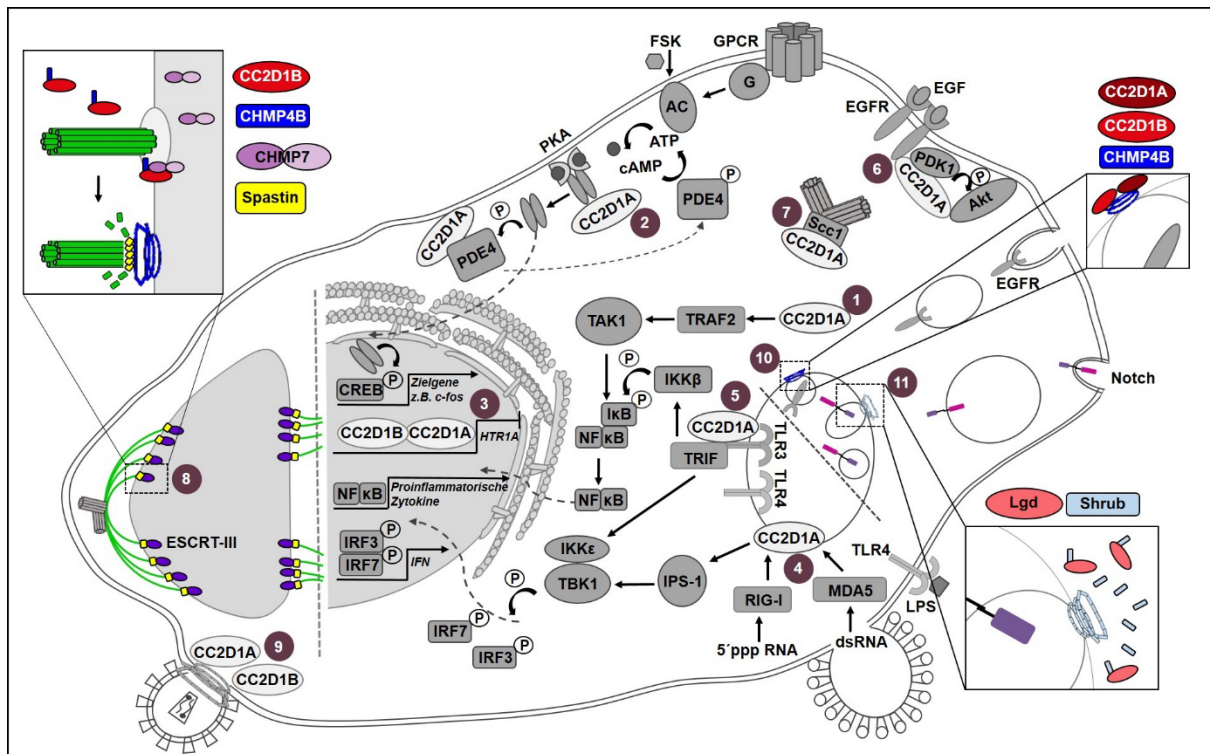
Experimente in Fibroblasten, Makrophagen und primären neuronalen Zellen liefern Hinweise, dass CC2D1A neben NF- $\kappa$ B als positiver Regulator des cAMP/PKA-Signalwegs agiert, der ebenfalls eine wichtige Rolle bei synaptischer Plastizität sowie dem Lern- und Gedächtnisvermögen spielt (Abel et al., 1997; Nguyen und Woo, 2003). Dort scheint die Proteinkinase A (PKA) mittels der Bindung an CC2D1A zur Plasmamembran befördert zu sein, um durch cAMP aktiviert zu werden (Abb. 1.5 (2)). Die durch cAMP ausgelöste freigesetzte katalytische Einheit von PKA transloziert in den Zellkern und phosphoryliert ihr Zielprotein CREB, das im Anschluss darauf die Expression der in die Gedächtnisbildung involvierten Gene induziert (Al-Tawashi et al., 2012). *Cc2d1a*-defiziente Neurone sind hypersensitiv für Stress und haben reduzierte Kapazität zur Dendriten- und Synapsenbildung (Al-Tawashi et al., 2012). Diese experimentellen Befunde deuten darauf hin, dass CC2D1A an der neuronalen Differenzierung und dementsprechend an der Gehirnentwicklung mitbeteiligt ist.

Seine weitere Funktion in diesem komplexen Prozess liegt in der Regulation der Expression des Serotonin-Rezeptors (Abb. 1.5 (3)), der sowohl im peripheren als auch im zentralen Nervensystem exprimiert wird. Durch die Bindung von CC2D1A an die Promoterregion von *HTR1A* wird die Expression des Serotoninrezeptors sowohl prä- als auch postsynaptisch reprimiert (Ou et al., 2003). Die CC2D1A-Bindestelle überlappt teilweise mit der Bindestelle von CC2D1B, wobei die CC2D1B-Bindung ebenfalls in der Repression der postsynaptischen Expression des Serotonin-Rezeptors resultiert (Hadjighassem et al., 2009; Hadjighassem et al., 2011). Der Ausfall beider CC2D1-Proteine führt zur Überexpression des Serotonin-Rezeptors, wodurch die Serotoninausschüttung reduziert wird. Eine Abnahme in der Serotoninkonzentration wirkt sich negativ auf das zentrale Nervensystem aus und ist mit depressiven Verstimmungen (Sullivan et al., 2005), Angstzuständen (Lanzenberger et al., 2007) und suizidalem Verhalten (Pitchot et al., 2005) assoziiert.

Neben den Signalwegen, die neurologische Vorgänge regulieren, wurde für CC2D1A eine Rolle bei der Aktivierung der RLR- und TLR-vermittelten angeborenen Immunantwort beschrieben. Mittels Zellkulturexperimente wurde gezeigt, dass durch virale Infektion freigesetzte dsRNA die zytoplasmatischen Sensoren RIG-I und MDA5 aktiviert, die im Anschluss darauf mit dem endosomal lokalisierten CC2D1A interagieren (Abb. 1.5 (4)). Diese Interaktion löst eine Signalkaskade aus, die in der Expression der Typ-I-Interferon-Gene



resultiert (Chen et al., 2012). Die TLR-assoziierte Immunreaktion setzt eine Interaktion zwischen endosomal lokalisiertem TLR3 mit CC2D1A voraus (Abb. 1.5 (5)), wobei diese Wechselwirkung ebenfalls zu der Expression von Typ-I-Interferon und proinflammatorischen Genen führt (Chang et al., 2011).



**Abbildung 1.5: Übersicht der Funktionen von CC2D1-Proteinen.** Abhängig von ihrer subzellulären Lokalisation werden den CC2D1-Proteinen Funktionen in diversen intrazellulären Signalwegen zugeschrieben, wobei die meisten Prozesse durch CC2D1A ausgeführt werden. Neben der Rolle des positiven Regulators bei der Aktivierung des kanonischen NF-κB (1)- und cAMP/PKA (2)-Signalwegs fungiert CC2D1A als ein Gerüstprotein im EGF-abhängigen PDK1/Akt-Signalweg (6), wo es die Akt-vermittelte PDK1-Phosphorylierung ermöglicht und die Zellteilung-induzierende Signalkaskade aktiviert. Die von CC2D1A ausgeführte Scc1-Rekrutierung an die Zentrosome sorgt zusätzlich für die Aufrechterhaltung der bipolaren Spindeln (7). CC2D1B ist ebenfalls an einem Zellteilungs-assoziierten Vorgang beteiligt. Dort wird das Protein für eine zeitliche Koordination der Rekrutierung der ESCRT-Proteine CHMP4B und CHMP7 an die sich wiedererschließende Kernhülle nach der Mitose benötigt (8). Im Unterschied zu CC2D1B ist das endosomal lokalisierte CC2D1A in der Lage, mit den antimikrobiellen Sensorproteinen zu interagieren und somit eine Funktion bei der Aktivierung der angeborenen Immunantwort auszuüben, die sowohl durch RLR (4) als auch durch TLR (5) vermittelt wird. Das Zellkern-lokalisierte CC2D1A bindet zusammen mit seinem Homolog CC2D1B an die Promotorregion des *HTR1A*-Gens (3) und reprimiert somit die Expression des 5-HT1A-Rezeptors, wobei es einen positiven Einfluss auf den Serotoninspiegel hat. Beide Proteine wirken negativ auf die HIV-1-Abschnürung (9), in dem sie die dafür benötigte Polymerisation von CHMP4B verringern. Außerdem scheint deren Bindung an CHMP4B-Polymere den lysosomalen Abbau von EGFR (10) - und TLR4-Rezeptoren zu verhindern. Im Unterschied dazu wird Lgd aus *D. melanogaster* für die volle Funktion von Shrub benötigt und unterstützt somit den vollständigen Abbau des Notch-Rezeptors (11).



Des Weiteren wird den CC2D1-Proteinen aus Säugern die Beteiligung an Zellteilungsprozessen zugeschrieben. Ausgehend von Experimenten in humanen Zelllinien konnte gezeigt werden, dass CC2D1A im EGF-abhängigen PDK1/Akt-Signalweg die Rolle eines Gerüstproteins übernimmt (Abb. 1.5 (6)). CC2D1A gewährleistet nach der Aktivierung des EGF-Rezeptors die räumliche Nähe zwischen PDK1 und Akt, die für die Akt-vermittelte PDK1-Phosphorylierung erforderlich ist (Nakamura et al., 2008). Als Folge wird ein Signalweg aktiviert, der eine zentrale Rolle bei Zellteilung und Zellüberleben spielt. In diesem Zusammenhang haben weiterführende Studien ergeben, dass CC2D1A als ein mögliches Angriffsziel bei der Behandlung von Lungenkrebs fungieren könnte, denn diese Zellen sind auf den EGFR-Signalweg angewiesen. Ein *CC2D1A*-Knockdown blockiert die Zellproliferation und erzwingt die Apoptose (Yamada et al., 2013).

Mittels weiterer Zellkultur-gestützter Analysen in HeLa-Zellen konnte gezeigt werden, dass CC2D1A an Zentrosomen lokalisiert, wo es zur Aufrechterhaltung von bipolaren Spindeln beiträgt (Nakamura et al., 2009). Es wird vermutet, dass CC2D1A die Kohäsin-Untereinheit Scc1 an Zentrosomen rekrutiert (Abb. 1.5 (7)), um eine verfrühte Zentriolen-Trennung zu verhindern, wobei die Komplexbildung zwischen den beiden Proteinen durch die Aktivität von Cdk1/ZyklinB1 begünstigt werden soll (Nakamura et al., 2010). Der *CC2D1A*-Verlust wird mit der Bildung von multipolaren Spindeln in Verbindung gebracht (Nakamura et al., 2009). Dennoch lieferte eine weitere Studie, die auf einer stabilen, *Cc2d1a*-defizienten MEF-Linie basierte, keine Hinweise auf eine Funktion von CC2D1A in diesem Prozess (Drusenheimer et al., 2015).

Alle bislang bekannten Funktionen, die mit der Zellteilung in Verbindung stehen, konnten nur für CC2D1A gezeigt werden, während zu einer möglichen Rolle seines Homologen CC2D1B in diesem Prozess keine Daten vorlagen. Eine aktuelle Studie hat jedoch gezeigt, dass CC2D1B auf andere Art und Weise in diesen Prozess involviert sein könnte. Die Analyse der Arbeitsgruppe von Martin-Serrano, die entweder auf einem *Cc2d1b*-Knockdown oder auf der CRISPR/Cas9-vermittelten Deletion von *Cc2d1b* in mehreren unterschiedlichen Zelltypen basierte, lieferte Hinweise darauf, dass CC2D1B für die Integrität des Zellkerns nach der Zellteilung essentiell sein könnte (Ventimiglia et al., 2018). Die Untersuchung der Zellkernmorphologie hat ergeben, dass der *Cc2d1b*-Verlust zu einer Verdopplung in der Anzahl der Zellen resultierte, die eine Laminainvagination aufwiesen. Während dieser Phänotyp bereits in 20% der wildtypischen Zellen beobachtet werden konnte, wurden in der *Cc2d1b*-mutanten Situation 40% der Zellen mit der Einstülpung der Kernhülle identifiziert (Ventimiglia et al., 2018).

Die Untersuchungen der Gruppe von Martin-Serrano führten zu einer Hypothese, die besagt, dass CC2D1B für die zeitlich gesteuerte Rekrutierung der ESCRT-Proteine an die sich wiederschließende Kernhülle nach erfolgter Mitose gebraucht wird. Basierend auf Pulldown-Experimenten konnte gezeigt werden, dass CC2D1B einen Komplex mit CHMP4B (zentrale Komponente von ESCRT-III-Komplex) und CHMP7 (akzessorisches ESCRT-Protein) bildet, wobei für diese Interaktion unterschiedliche Domänen von CC2D1B benötigt werden. Während CHMP4B durch die dritte DM14-Domäne gebunden wird, ist für die Interaktion mit CHMP7 die vierte DM14-Domäne erforderlich (Ventimiglia et al., 2018).

Anhand der experimentellen Daten wird angenommen, dass CC2D1B durch seine Bindung an CHMP4B das Protein in seiner monomeren Form im Zytoplasma stabilisiert, was wiederum CHMP7 von den Öffnungen in der sich schließenden Kernhülle fernhält (Abb. 1.5 (8)). Erst wenn diese Öffnungen eine geeignete Größe erreichen, werden die ESCRT-Proteine durch CC2D1B an die Stellen rekrutiert, wo sie mit der Polymerisation und dementsprechend der Schließung der Öffnungen in der Kernmembran beginnen können (Ventimiglia et al., 2018). Kurz bevor die Kernhülle verschlossen wird, wird die ATPase Spastin durch ESCRT-III rekrutiert, die bestehende Spindel-Mikrotubuli abbaut (Abb. 1.5 (8)). Kommt es zum Verlust von CC2D1B, resultiert dies in der asynchronen und verfrühten Rekrutierung der ESCRT-Proteine an die Öffnungen in der Kernhülle, wobei der Abbau der Mikrotubuli gestört wird. Dies äußert sich dann in Einkerbungen der Kernlamina (Ventimiglia et al., 2018).

Die Studie der Gruppe von Martin-Serrano lässt jedoch die Frage offen, ob CC2D1A ebenfalls in die Regulation der Neuassemblierung der Kernhülle involviert ist. Da die untersuchten *Cc2d1b*-defizienten Zellen für CC2D1A wildtypisch sind, wäre eine funktionelle Redundanz der CC2D1-Proteine in diesem Prozess eine mögliche Erklärung für die relativ niedrige Penetranz des beobachteten Phänotyps. Dennoch wurde in der oben genannten Analyse weder der Effekt der *Cc2d1a*-Defizienz noch der gleichzeitige Verlust beider Proteine charakterisiert.

Die Interaktion der CC2D1-Proteine aus Säugern mit Komponenten der ESCRT-Maschinerie wurde bereits durch mehrere andere Studien bewiesen. So konnte z.B. gezeigt werden, dass beide Homologe durch ihre Interaktion mit CHMP4B indirekt an der Inhibierung der HIV-1-Knospongung beteiligt sind (Abb. 1.5 (9)). Die Analyse hat ergeben, dass durch die Interaktion der CC2D1-Proteine mit CHMP4B seine für die Abschnürung des Virus notwendige Polymerisation vermindert wird (Martinelli et al., 2012; Usami et al., 2012).

Eine weitere Studie gibt Hinweise darauf, dass die bereits beschriebene Interaktion zwischen CC2D1-Proteinen und CHMP4B eine Rolle bei der Regulation des endosomalen Transportwegs spielen könnte (Abb. 1. 5 **(10)**). Überexpressionsexperimente in HeLa-Zellen liefern Indizien, dass CC2D1A in der Lage ist, CHMP4B-Polymere an der endosomalen Membran zu binden und infolgedessen den lysosomalen Abbau von EGFR und TLR4 zu verzögern (Deshar et al., 2016). Im Gegensatz dazu resultiert der *CC2D1A*- oder *CC2D1B*-Knockdown in einer beschleunigten Degradation beider analysierten Rezeptoren (Deshar et al., 2016). Experimente in *Cc2d1a*-defizienten MEFs bestätigen eine mögliche Funktion der CC2D1-Proteine aus Säugern in der Regulation des endosomalen Transportwegs (Drusenheimer et al., 2015).

Wie bereits in Abschnitt 1.3 erwähnt wurde, konnte die Involvierung von Lgd in diesen Prozess mittels der *in vivo* Untersuchungen unter endogenen Bedingungen am Beispiel des Notch-Signalweges eindeutig nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, dass der Verlust von *lgd* in einer fehlerhaften Verpackung des endozytierten Notch-Rezeptors in die intraluminalen Vesikel und als Folge dessen in der Liganden-unabhängigen Expression der Notch-Zielgene resultiert (Schneider et al., 2013). Lgd wird dabei höchstwahrscheinlich für die volle Funktion von Shrub, dem CHMP4B Ortholog aus *D. melanogaster*, benötigt (Schneider et al., 2013). Im Gegensatz zu den Experimenten, die in HeLa-Zellen durchgeführt wurden und eine Bindung der CC2D1-Proteine an die bereits gebildeten Polymere vermuten lassen, wird im Fall von Lgd aus *D. melanogaster* die Theorie vertreten, dass Lgd monomeres Shrub bindet und somit sein vorzeitiges Polymerisieren verhindert (Abb. 1.5 **(11)**). Der mutante Phänotyp, der durch den *lgd*-Verlust in *D. melanogaster* zustande kommt, kann durch die Expression der humanen CC2D1-Proteine zum größten Teil aufgehoben werden. Während die Expression von zwei Kopien von CC2D1A unter dem endogenen *lgd*-Promoter in komplett differenzierten Fliegen resultiert, die jedoch Schlüpfdefekte aufweisen, liefert die Expression von CC2D1B schon in einer Kopie lebensfähige und fertile adulte Tiere (Drusenheimer et al., 2015). Dies deutet darauf hin, dass die Funktion im endosomalen Transportweg innerhalb der CC2D1-Familie höchstwahrscheinlich konserviert ist.

## 1.5 Ziele der Arbeit

Mehrere Studien deuten auf ein breites Funktionsspektrum von CC2D1A hin, wobei CC2D1B nur an wenigen Aufgaben mitbeteiligt zu sein scheint. Im Rahmen dieser Dissertation soll die Analyse der CC2D1-Proteine in Bezug auf ihre mögliche Funktion im endosomalen Transportweg untersucht werden. Während *in vivo* Experimente in *D. melanogaster* bestätigen, dass Lgd in die Regulation des endosomalen Transportwegs involviert ist (Schneider et al., 2013), gibt es bei Säuger-Orthologen nur Hinweise auf eine mögliche Beteiligung an diesem Prozess (Drusenheimer et al., 2015; Deshar et al., 2016). Ob die Funktion der CC2D1-Proteine in diesem Prozess konserviert ist, soll anhand einer möglichen Abweichung im endosomalen Phänotyp innerhalb von stabilen einzel- sowie doppeldefizienten Zellen im Vergleich zur wildtypischen Situation sowohl immunzytochemisch als auch ultrastrukturell untersucht werden. Da der Lgd-Verlust sich im konstitutiv aktiven Notch-Signalweg äußert, soll ein möglicher Zusammenhang zwischen dem endosomalen Phänotyp und der Aktivität des Notch-Signalwegs in Säuger-Zellen charakterisiert werden.

Des Weiteren liefert eine neue Studie, basierend auf CRISPR/Cas9 oder *Cc2d1b*-siRNA behandelten Zellen, Indizien, dass CC2D1B mittels seiner Interaktion mit den ESCRT-Komponenten in die Aufrechterhaltung der Integrität der Kernhülle involviert ist (Ventimiglia et al., 2018). Im Rahmen dieser Arbeit soll überprüft werden, ob der beobachtete Phänotyp in Zellen reproduzierbar ist, die aus einer stabilen *Cc2d1b*-KO-Mauslinie isoliert wurden. Anschließend soll ein Vergleich der Effekte, die entweder durch die *Cc2d1a*- oder *Cc2d1b*-Defizienz bzw. durch den gleichzeitigen Verlust beider Proteine ausgelöst werden, eine Aussage über eine mögliche funktionelle Redundanz der CC2D1-Proteine in der Regulation der Neuassemblierung der Kernhülle liefern.

Obwohl die Interaktion zwischen CC2D1-Proteinen und CHMP4B bewiesen wurde, ist ihre direkte Konsequenz unklar. *In vitro* Experimente zeigen einen negativen CC2D1-Einfluss auf die CHMP4B-Polymerisation (Martinelli et al., 2012). Studien in *D. melanogaster* lassen vermuten, dass Lgd als eine Art Chaperon fungieren könnte, das die monomere Shrub-Fraktion stabilisiert. Experimente in Hefe ergaben, dass Snf7 eine konformationelle Wandlung erfährt. Membran-gebunden liegt das Protein in der offenen Konformation vor, während in Lösung eine Mischung aus geschlossenen und offenen Formen existiert (Henne et al., 2012; Tang et al., 2015). Ob humanes CHMP4B ebenfalls zwischen geschlossenem und offenem Zustand wechselt und welcher Zustand unter welchen Bedingungen bevorzugt wird, soll durch die Analyse seiner Konformation basierend auf den Grundlagen der Konformationsstudien von Snf7 analysiert werden. Zusätzlich soll diese Methode zur Beantwortung der Frage herangezogen werden, ob der konformationelle CHMP4B-Zustand durch die Interaktion mit CC2D1-Proteinen beeinflusst wird.

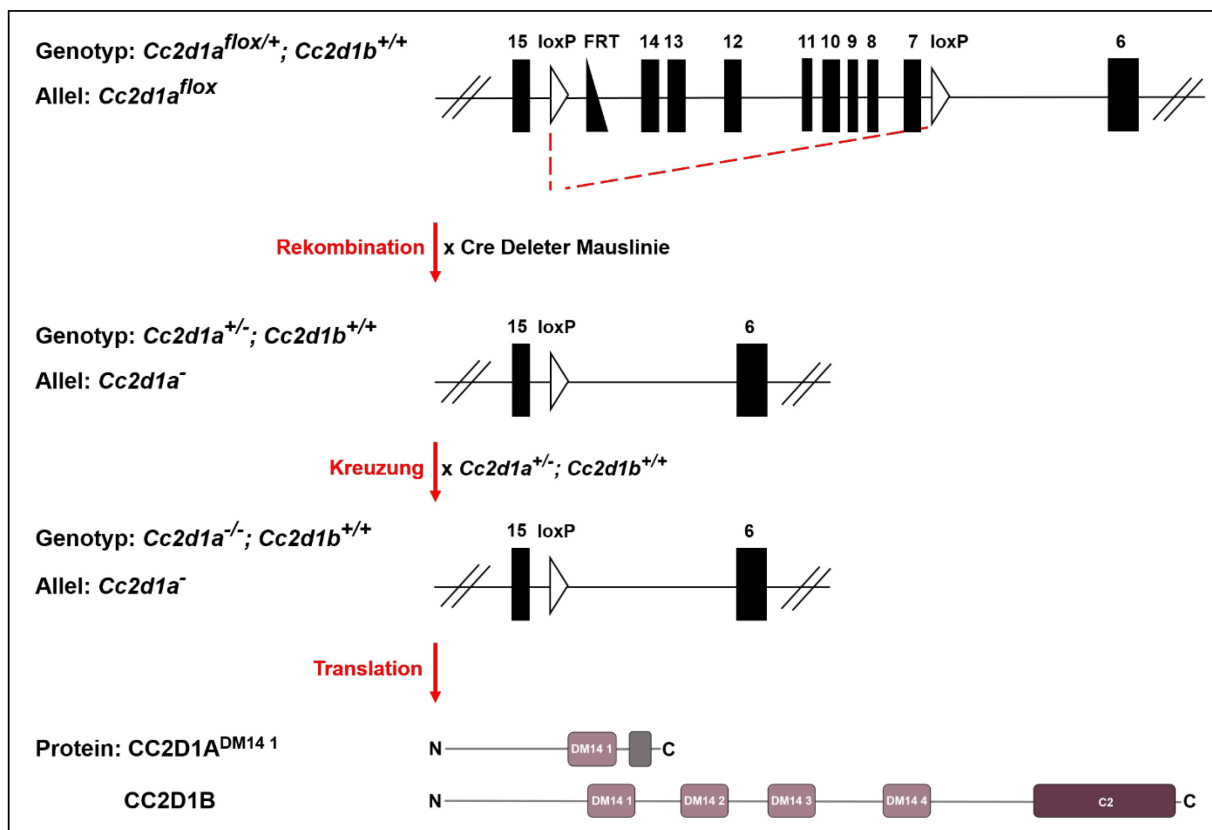
## 2. Ergebnisse

### 2.1 Funktionsanalyse der CC2D1-Proteine aus Säugern

*Cc2d1b*-defiziente Mäuse sind lebensfähig und fertil (Drusenheimer et al., 2015), weisen jedoch kognitive Einschränkungen auf (Zamarbide et al., 2018). Im Gegensatz dazu führt *Cc2d1a*-Defizienz zu Ateminsuffizienz und Schluckunfähigkeit und als Folge dessen zu postnataler Mortalität (Zhao et al., 2011; Al-Tawashi et al., 2012; Drusenheimer et al., 2015; Oaks et al., 2017). Der Verlust beider Gene resultiert in früher pränataler Mortalität im Stadium E8.5 (Dronka und Dildrop - AG Klein; unveröffentlicht). Aufgrund der frühen Letalität ist die Analyse von doppel-defizienten Embryonen nur eingeschränkt möglich. Die Menge des zur Verfügung stehenden Materials sowie die Frequenz, mit der die *Cc2d1a*<sup>-/-</sup>; *Cc2d1b*<sup>-/-</sup> Embryonen auftreten, erschwert die Isolierung doppel-defizienter embryonaler Fibroblasten (MEFs). Aus diesem Grund erfolgte die Funktionsanalyse der CC2D1-Proteine auf der Basis von *Cc2d1a*<sup>-/-</sup>; *Cc2d1b*<sup>-/-</sup> Zellen, die mit Hilfe der Cre/loxP-Technik (Schwenk et al., 1995) aus einer bereits bestehenden Einzelknockout-Linie generiert wurden. Um CC2D1-Proteine in Bezug auf ihre Funktion charakterisieren zu können, wurden die generierten doppel-defizienten Zellen (Migdal - AG Klein; unveröffentlicht) phänotypisch mit den Einzelknockouts (Drusenheimer et al., 2015) verglichen, deren Generierung ebenfalls auf der Cre/loxP-Strategie basierte.

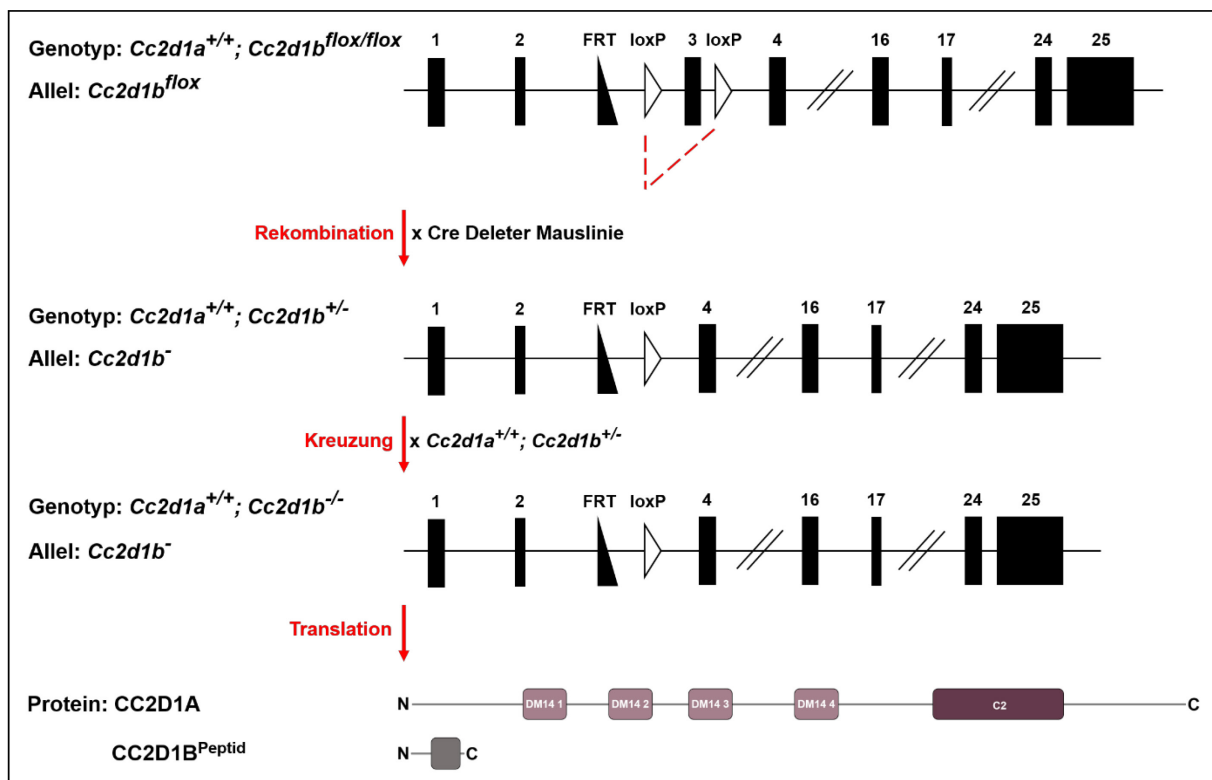
#### 2.1.1 Knockout-Zelllinien zur Charakterisierung der Funktion von CC2D1-Proteinen

Bei der Generierung einer stabilen *Cc2d1a*-defizienten MEF-Linie wurden Mäuse des Genotyps *Cc2d1a*<sup>fllox/+</sup>; *Cc2d1b*<sup>+/+</sup> als Ausgangslinie eingesetzt (Abb. 2.1). Diese Mäuse wiesen das in der Heterozygose vorliegende *Cc2d1a* auf, wobei in seinem modifizierten Allel der Bereich zwischen Exon 6 und Exon 15 durch zwei künstlich eingeführte loxP-Sequenzen flankiert war. Der durch diese Elemente eingeschlossene Abschnitt wurde mittels einer Kreuzung mit Cre Deleter Mäusen in der F1-Generation ubiquitär deletiert. Die resultierenden *Cc2d1a*<sup>+/-</sup>; *Cc2d1b*<sup>+/+</sup> -Tiere enthielten neben dem vollständigen CC2D1A eine verkürzte Form des Proteins, die nur aus der ersten DM14-Domäne bestand und ein Resultat der durch die Deletion hervorgerufenen Leserasterverschiebung war. Diese Tiere wurden anschließend untereinander verpaart, um *Cc2d1a*<sup>-/-</sup>; *Cc2d1b*<sup>+/+</sup>-Embryonen zu erhalten. Sie dienten als Ausgangsmaterial zur Isolierung von *Cc2d1a*-defizienten MEFs (Drusenheimer et al., 2015). Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine auf diese Weise erzeugte und bereits getestete *Cc2d1a*<sup>-/-</sup>; *Cc2d1b*<sup>+/+</sup>-MEF-Linie (Drusenheimer et al., 2015) analysiert.



**Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Generierung des *Cc2d1a*-Knockouts.** Bei der als Ausgangslinie eingesetzten  $Cc2d1a^{lox/+}; Cc2d1b^{+/+}$ -Mauslinie war der Bereich zwischen Exon 6 und Exon 15 innerhalb des heterozygot vorliegenden  $Cc2d1a$  durch zwei loxP-Sequenzen flankiert. Die Kreuzung dieser Linie mit Cre Deleter Mäusen resultierte in einer ubiquitären Deletion des eingeschlossenen Abschnitts in der F1-Generation und in der damit assoziierten Leserasterverschiebung im  $Cc2d1a$ -Genloкус. Die aus dieser Kreuzung resultierenden Tiere des Genotyps  $Cc2d1a^{+/-}; Cc2d1b^{+/+}$  exprimierten neben der wildtypischen CC2D1A-Variante eine verkürzte Form, bestehend aus der ersten DM14-Domäne. Die Generierung eines vollständigen  $Cc2d1a$ -Knockouts wurde durch die Verpaarung von  $Cc2d1a^{+/-}; Cc2d1b^{+/+}$ -Mäusen untereinander erzielt. Die resultierenden Mausembryonen des Genotyps  $Cc2d1a^{-/-}; Cc2d1b^{+/+}$  wurden zur Isolierung  $Cc2d1a$ -defizienter MEFs eingesetzt (modifiziert nach Drusenheimer et al., 2015).

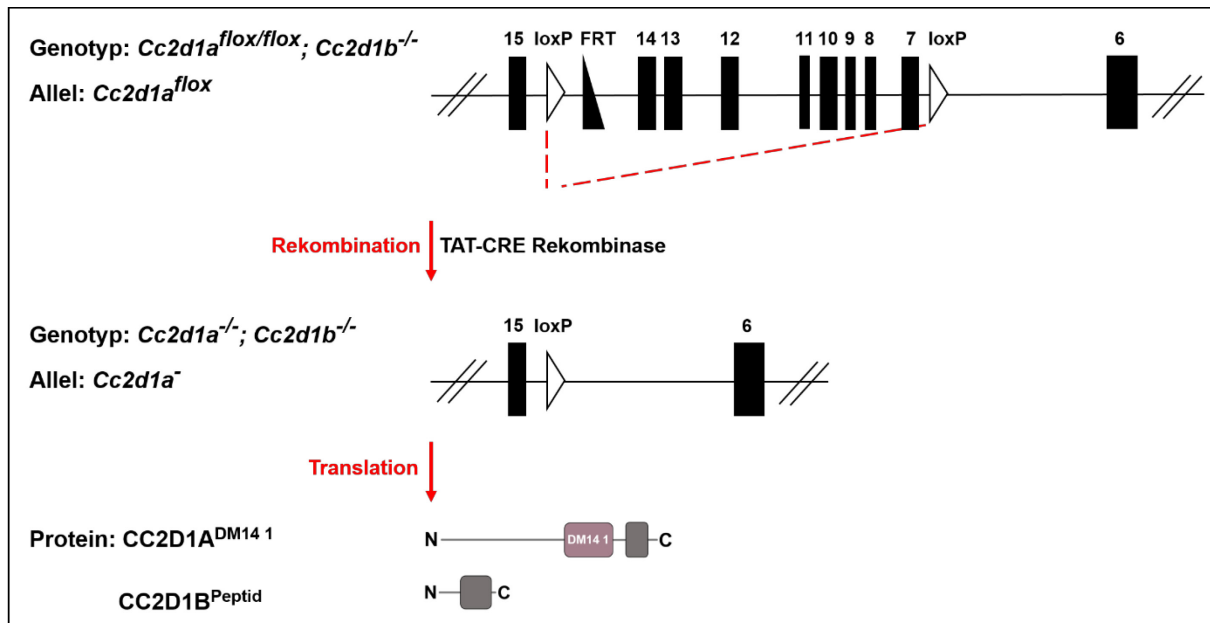
Die Isolierung der  $Cc2d1b$ -defizienten MEFs erfolgte auf analoge Weise. Das  $Cc2d1b$ -Allel der  $Cc2d1a^{+/+}; Cc2d1b^{lox/lox}$ -Mäuse enthielt das Exon 3, das durch zwei loxP-Sequenzen flankiert war und durch die Kreuzung mit Cre Deleter Mäusen in der F1-Generation ubiquitär entfernt wurde (Abb. 2.2). Die durch diese Deletion hervorgerufene Leserasterverschiebung im  $Cc2d1b$ -Genloкус führte zum translationalen Stopp nach 34 Aminosäuren und als Folge dessen zur Entstehung eines kleinen Peptids. Demzufolge exprimierten die aus der Kreuzung mit der Cre Deleter Mauslinie resultierenden Tiere des Genotyps  $Cc2d1a^{+/+}; Cc2d1b^{-/-}$  neben dem vollständigen CC2D1B ebenfalls das als Folge der Deletion entstandene Peptid. Anschließend wurden diese Mäuse untereinander verpaart, um den vollständigen  $Cc2d1b$ -Knockout zu erzeugen. Die aus der Kreuzung resultierenden  $Cc2d1a^{+/+}; Cc2d1b^{-/-}$ -Mausembryonen wurden bei der Isolierung der  $Cc2d1b^{-/-}$ -MEFs verwendet (Drusenheimer et al., 2015) und dienten der Analyse in dieser Arbeit.



**Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der Generierung des *Cc2d1b*-Knockouts.** Zur Erzeugung des *Cc2d1b*-Einzelknockouts wurde eine  $Cc2d1a^{+/+}; Cc2d1b^{flox/flox}$ -Mauslinie verwendet. In dieser Linie wurde das durch zwei loxP-Sequenzen flankierte Exon 3 innerhalb von *Cc2d1b* durch die Kreuzung mit Cre Deleter Mäusen entfernt. Diese Deletion führte zu einer Leserasterverschiebung innerhalb des *Cc2d1b*-Genlokus, die in einem translationalen Stopp nach 34 Aminosäuren resultierte. Die aus der Kreuzung mit Cre Deleter Mäusen entstandene  $Cc2d1a^{+/+}; Cc2d1b^{+/-}$ -Tiere exprimierten neben dem wildtypischen CC2D1B das als Folge der Exzision resultierende Peptid. Diese Mäuse wurden untereinander verpaart, um einen vollständigen *Cc2d1b*-Knockout zu erhalten. Die aus der Kreuzung resultierenden  $Cc2d1a^{+/+}; Cc2d1b^{-/-}$ -Embryonen dienten der Isolierung von *Cc2d1b*-defizienten MEFs (modifiziert nach Drusenheimer et al., 2015).

Wie bereits beschrieben, erwies sich die Isolierung doppel-defizienter MEFs aus Mausembryonen als schwierig. Aus diesem Grund wurde der vollständige *Cc2d1*-Knockout auf Basis der bestehenden  $Cc2d1a^{flox/flox}; Cc2d1b^{-/-}$ -Zelllinie erzeugt (Abb. 2.3). Diese Zelllinie ist durch die vollständige *Cc2d1b*-Defizienz und einem geflochten Bereich innerhalb von *Cc2d1a* gekennzeichnet. Analog zu dem *Cc2d1a*-Einzelknockout war der Bereich zwischen Exon 6 und Exon 15 durch zwei loxP-Sequenzen flankiert und wurde durch eine *in vitro* Behandlung mit einer rekombinanten TAT-CRE Rekombinase deletiert (Migdal - AG Klein, unveröffentlicht). Die resultierende Zelllinie des Genotyps  $Cc2d1a^{-/-}; Cc2d1b^{-/-}$  zeichnete sich durch den Verlust beider CC2D1-Proteine aus und wurde zur Analyse der Doppelknockout-Situation (DKO) eingesetzt. Da die Generierung der doppel-defizienten MEFs auf einer *in vitro* Rekombination basierte und die resultierenden Zellen im Unterschied zu den einzel-defizienten Linien in keiner vorläufigen Studie getestet wurden, wurden im Rahmen dieser

Dissertation zwei separate Linien analysiert, um linienautonome Effekte ausschließen zu können.



**Abbildung 2.3: Schematische Darstellung der Generierung des *Cc2d1a*; *Cc2d1b*-Doppelknockouts.** Die *in vitro* Behandlung der als Ausgangslinie dienenden  $Cc2d1a^{flox/flox}; Cc2d1b^{-/-}$ -Zelllinie mit der rekombinanten TAT-CRE Rekombinase führte zur Exzision des Bereichs zwischen Exon 6 und Exon 15, der durch zwei loxP-Sequenzen flankiert war. Dies resultierte in der Erzeugung der *Cc2d1a*-Defizienz zusätzlich zu dem bereits bestehenden *Cc2d1b*-Knockout.

### 2.1.2 Verifizierung der *Cc2d1*-defizienten MEFs

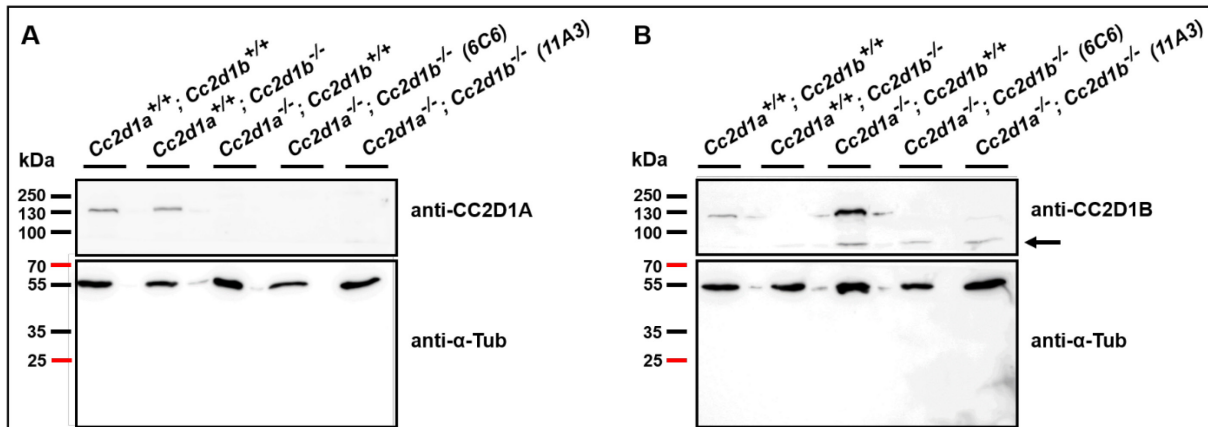
Um die Effizienz des Knockouts zu überprüfen, wurden die einzel- und doppel-defizienten Zelllinien auf Proteinebene untersucht. Der Nachweis beider Proteine erfolgte unter Verwendung spezifischer Antikörper gegen CC2D1A und CC2D1B. Als Positivkontrolle diente in beiden Fällen eine Probe aus wildtypischen MEFs.

Wie der Abbildung 2.4 A zu entnehmen ist, konnte CC2D1A mit einer Größe von ca. 130 kDa sowohl im wildtypischen als auch im  $Cc2d1b^{-/-}$ -Gesamtproteinlysate nachgewiesen werden. Erwartungsgemäß war kein Signal in den Proteinlysaten des *Cc2d1a*-Einzel- bzw. der beiden DKO-Linien detektierbar. Mittels dieser Analyse konnte bestätigt werden, dass die Exzision des Bereichs zwischen Exon 6 und Exon 15 sowohl in den  $Cc2d1a^{-/-}$ -MEFs als auch in  $Cc2d1a^{-/-}; Cc2d1b^{-/-}$ -Zelllinien in einem Ausfall von CC2D1A resultierte.

Der gezielte Nachweis von CC2D1B zeigte das Protein mit der Größe von ca. 130 kDa in den Proteinlysaten, die entweder aus wildtypischer oder *Cc2d1a*-defizienter Probe isoliert wurden. In den Proteinlysaten, gewonnen aus dem *Cc2d1b*-Einzel- oder  $Cc2d1a^{-/-}; Cc2d1b^{-/-}$ -DKO, war

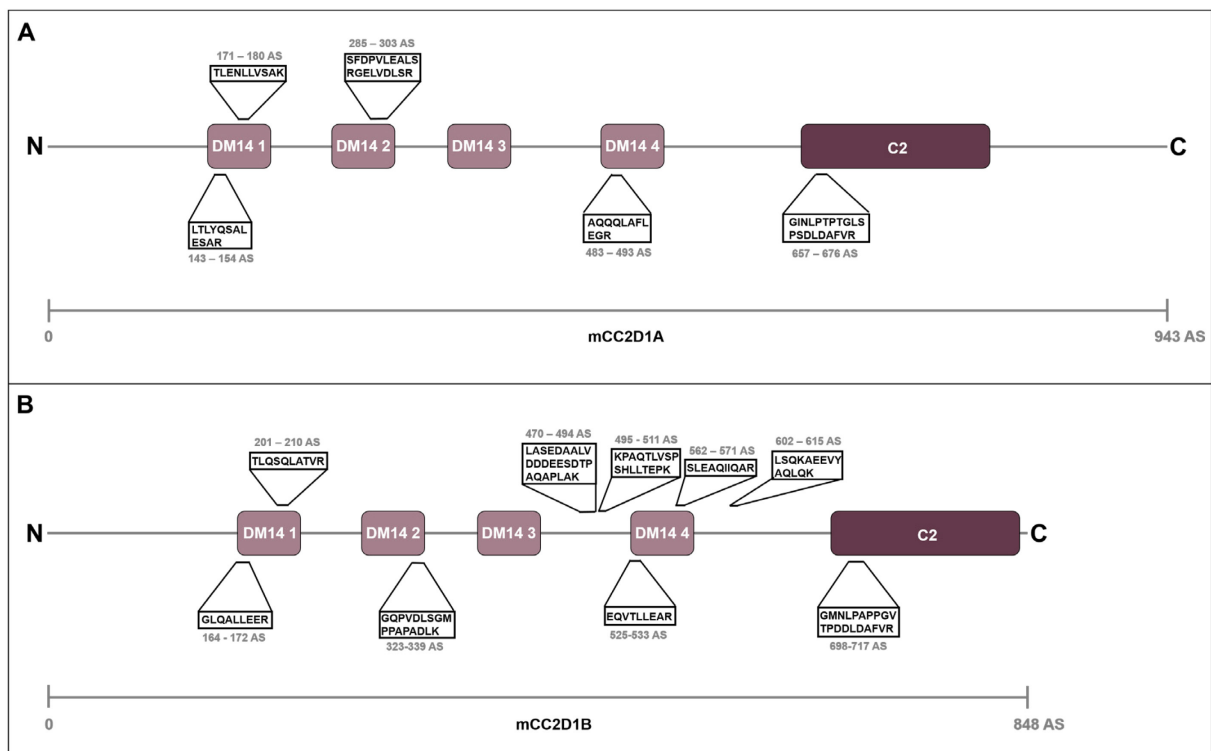


erwartungsgemäß kein Signal auf der Höhe von 130 kDa detektierbar (Abb. 2.4 B). Jedoch konnte in den Proben aus *Cc2d1a*-defizienten MEFs und beiden Linien des DKO eine zusätzliche Bande mit der Größe von ca. 90 kDa nachgewiesen werden (Abb. 2.4 B, Pfeil).



**Abbildung 2.4: Western Blot zur Expressionsanalyse von CC2D1A und CC2D1B in MEFs. (A)** Western Blot zum CC2D1A-Nachweis in MEFs. In Proben, die entweder aus wildtypischen oder *Cc2d1b*-defizienten MEFs isoliert wurden, ist vollständiges CC2D1A mit einer Größe von ca. 130 kDa nachweisbar. Das Protein ist weder in *Cc2d1a*-defizienten noch in Proteinlysaten beider DKO-Zelllinien detektierbar. **(B)** Western Blot zum Nachweis der CC2D1B-Expression in MEFs. Während vollständiges CC2D1B mit der Größe von ca. 130 kDa sowohl in Proben aus wildtypischen als auch aus *Cc2d1a*-defizienten Zellen erkennbar ist, ist es in den Proteinlysaten der *Cc2d1b*-defizienten MEFs und der DKO-Zelllinien abwesend. In Proben aus *Cc2d1a*-defizienten sowie aus DKO-MEFs ist eine zusätzliche Bande bei ca. 90 kDa nachweisbar (mit Pfeil angedeutet). Anti- $\alpha$ -Tubulin-Färbung dient als Ladekontrolle.

Da es mit Hilfe einer Western Blot Analyse nicht ausgeschlossen werden konnte, ob es sich hierbei eventuell um eine verkürzte Form des Zielproteins handelt, wurden die Proteinlysate zusätzlich einer massenpektrometrischen Analyse (MS-Analyse) unterzogen, die durch *Molecular Proteomics Laboratory* (MPL) Düsseldorf durchgeführt wurde. Jede Probe wurde auf die Anwesenheit von fünf einzigartigen CC2D1A- und neun einzigartigen CC2D1B-Peptiden geprüft. Die Sensitivität der Analyse wurde anhand der als Positivkontrolle dienenden wildtypischen Probe untersucht, in der die meisten einzigartigen Peptide für CC2D1A und CC2D1B zu erwarten wären. Eine schematische Darstellung der Lokalisation der jeweiligen einzigartigen Peptide innerhalb der CC2D1-Proteine kann der Abbildung 2.5 entnommen werden.



**Abbildung 2.5: Schematische Darstellung der einzigartigen Peptide zum Nachweis der CC2D1-Proteine mittels Massenspektrometrie.** (A) Position der einzigartigen Peptide innerhalb von CC2D1A. 943 AS großes CC2D1A lässt sich durch die Identifizierung von fünf einzigartigen Peptiden in einem Proteinlysate nachweisen. Die Bereiche, die durch die Peptide abgedeckt werden, liegen innerhalb der ersten, zweiten und vierten DM14-Domäne sowie innerhalb der C2-Domäne. (B) Position der einzigartigen Peptide innerhalb von CC2D1B. Der Nachweis von CC2D1B kann mittels neun einzigartiger Peptide erfolgen, die sich innerhalb der ersten, zweiten und vierten DM14-Domäne sowie der C2-Domäne befinden. Außerdem lassen sich die Bereiche zwischen der dritten und der vierten DM14-Domäne sowie zwischen der vierten DM14- und der C2-Domäne nachweisen und spezifisch CC2D1B zuordnen.

Erwartungsgemäß konnten fünf CC2D1A-Peptide in der wildtypischen und vier in der *Cc2d1b*-defizienten Probe nachgewiesen werden, während keins dieser Peptide in den beiden *Cc2d1a*<sup>-/-</sup>; *Cc2d1b*<sup>-/-</sup> MEF-Linien identifiziert wurde (Tab. 2.1). Hiermit korreliert das Ergebnis der Massenspektrometrie mit dem Ergebnis des Western Blots (Abb. 2.4 A) und bestätigt die vollständige CC2D1A-Abwesenheit in den DKO-Zellen.

**Tabelle 2.1: Einzigartige Peptide zur CC2D1A-Identifizierung im Proteinlysate aus MEFs**

Einzigartiges Peptid (Σ=5)	<i>Cc2d1a</i> <sup>+/+</sup> ; <i>Cc2d1b</i> <sup>+/+</sup> (Σ=5)	<i>Cc2d1a</i> <sup>+/+</sup> ; <i>Cc2d1b</i> <sup>-/-</sup> (Σ=4)	<i>Cc2d1a</i> <sup>-/-</sup> ; <i>Cc2d1b</i> <sup>-/-</sup> (6C6) (Σ=0)	<i>Cc2d1a</i> <sup>-/-</sup> ; <i>Cc2d1b</i> <sup>-/-</sup> (11A3) (Σ=0)
LTYQSAL ESAR	+	-	-	-
TLENLLVSAK	+	+	-	-
SFDPVLEALSRGELVDLSR	+	+	-	-
AQQQLAFL EGR	+	+	-	-
GINLPTPTGLSPDLDAFVR	+	+	-	-

Σ: Gesamtanzahl der identifizierten Peptide

Ein ähnliches Ergebnis lieferte die MS-Analyse der Proteinlysate in Bezug auf die Anwesenheit von CC2D1B. Keins der neun einzigartigen CC2D1B-Peptide wurde im *Cc2d1b*-Einzelknockout oder in den DKO-MEFs identifiziert (Tab. 2.2). Im Gegensatz dazu konnten sieben Peptide in der wildtypischen Probe nachgewiesen werden. Die MS-Analyse lieferte den Beweis des vollständigen CC2D1B-Verlustes in MEFs und bestätigte die doppelte Defizienz in *Cc2d1a<sup>-/-</sup>; Cc2d1b<sup>-/-</sup>*-Zellen. Dies schließt die Möglichkeit aus, dass es sich bei der im CC2D1B-Western Blot detektierten Proteinbande um eine verkürzte CC2D1B-Isoform handelt und deutet auf eine unspezifische Bindung des verwendeten Antikörpers hin.

**Tabelle 2.2: Einzigartige Peptide zur CC2D1B-Identifizierung im Proteinlysate aus MEFs**

Einzigartiges Peptid ( $\Sigma=9$ )	<i>Cc2d1a<sup>+/+</sup>; Cc2d1b<sup>+/+</sup></i> ( $\Sigma=7$ )	<i>Cc2d1a<sup>+/+</sup>; Cc2d1b<sup>-/-</sup></i> ( $\Sigma=0$ )	<i>Cc2d1a<sup>-/-</sup>; Cc2d1b<sup>-/-</sup></i> (6C6) ( $\Sigma=0$ )	<i>Cc2d1a<sup>-/-</sup>; Cc2d1b<sup>-/-</sup></i> (11A3) ( $\Sigma=0$ )
GLQALLEER	+	-	-	-
TLQSQLATVR	+	-	-	-
GQPVDLSGMPPAPADLK	-	-	-	-
LASEDAALVDDDEESDTPAQAPLAK	+	-	-	-
KPAQTLVSPSHLLTEPK	+	-	-	-
EQVTLLLEAR	+	-	-	-
SLEAQIIQAR	+	-	-	-
LSQKAEEVYAQLQK	+	-	-	-
GMNLPAPPGVTPDDLDAFVR	-	-	-	-

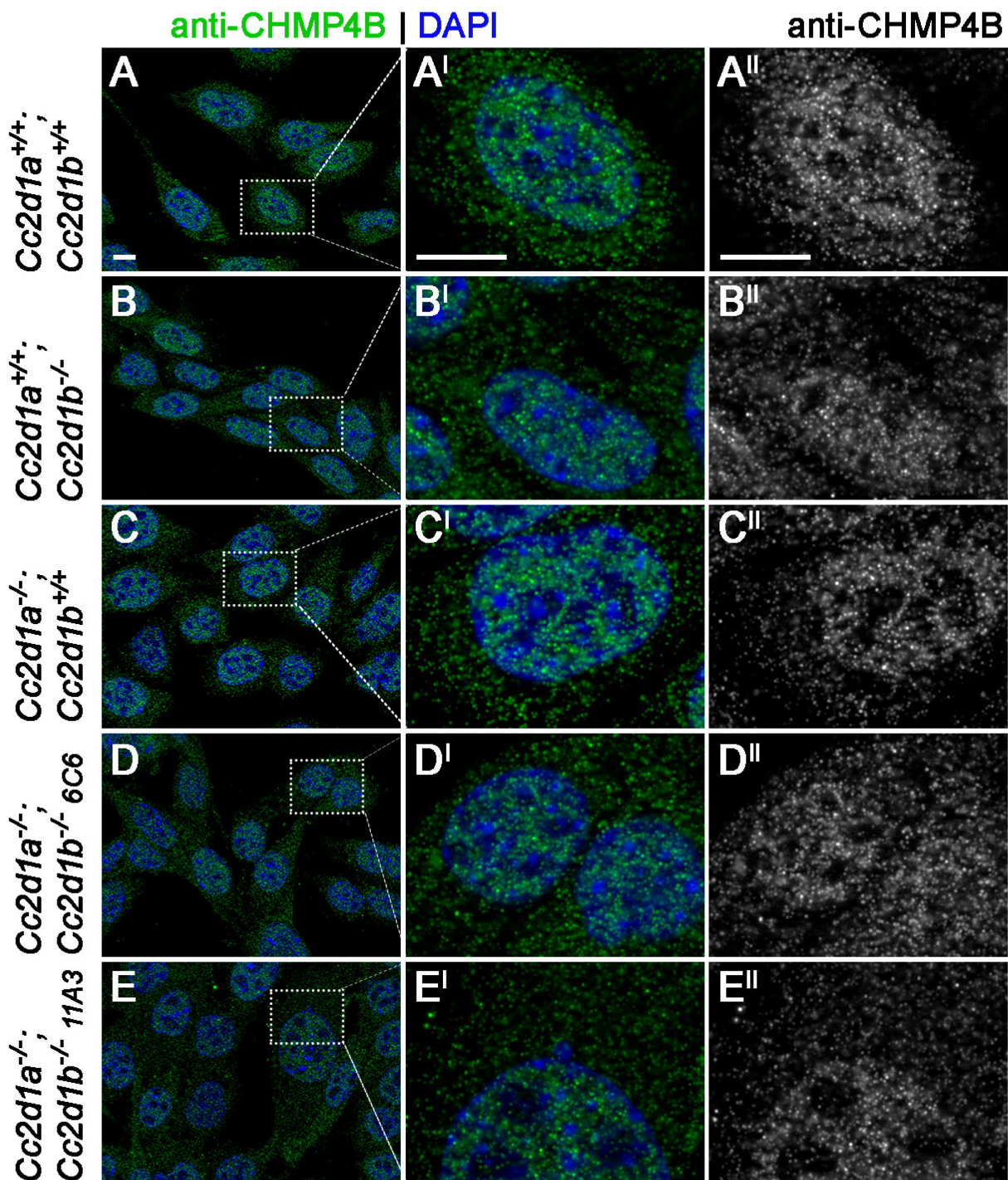
$\Sigma$ : Gesamtanzahl der identifizierten Peptide

### 2.1.3 Analyse einer möglichen CC2D1-Funktion im endosomalen Transportweg

Mittels der *in vivo* Experimente in *D. melanogaster* konnte gezeigt werden, dass Lgd eine wichtige Rolle bei der Regulation des endosomalen Transportwegs spielt, wobei Lgd höchstwahrscheinlich für die volle Shrub-Aktivität benötigt wird und somit die Shrub-vermittelte Verpackung des Notch-Rezeptors in MVBs mitreguliert (Schneider et al., 2013).

Die Tatsache, dass CC2D1-Proteine aus Säugern mit der Kernkomponente des ESCRT-III-Komplexes CHMP4B interagieren, liefert Indizien, dass sie ebenfalls in den endosomalen Transportweg involviert sein könnten (Martinelli et al., 2012; Usami et al., 2012; Drusenheimer et al., 2015; Deshar et al., 2016). Die Frage, die sich in diesem Zusammenhang stellt ist, ob und welche Rolle die Säugerproteine in diesem komplexen Prozess spielen. Eine denkbare Möglichkeit wäre, dass CC2D1-Proteine durch ihre Interaktion mit CHMP4B seine subzelluläre Verteilung beeinflussen und auf diese Weise den endosomalen Transportweg mitregulieren. Um zu testen, ob der Verlust der CC2D1-Proteine eine Abweichung in der endogenen Verteilung von CHMP4B verursacht, erfolgte die immunzytochemische Analyse seiner

Lokalisation sowohl in einzel- als auch in doppel-defizienten Zellen (Abb. 2.6 B-E<sup>II</sup>). Als Kontrolle dienten wildtypische MEFs (Abb. 2.6 A-A<sup>II</sup>). Unter wildtypischen Bedingungen wäre endogenes CHMP4B sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern hauptsächlich in Vesikel-assoziiierter Form zu erwarten (Arii et al., 2018).



**Abbildung 2.6: Untersuchung der subzellulären Lokalisation von CHMP4B in wildtypischen, *Cc2d1b*-, *Cc2d1a*-defizienten und DKO-MEFs.** Das endogene CHMP4B ist bei allen Genotypen ubiquitär in der Zelle verteilt (A-E<sup>II</sup>). Sowohl in der wildtypischen Situation als auch in allen defizienten Zellen ist CHMP4B mit vesikulären Strukturen assoziiert. Es sind keine detektierbaren Unterschiede zwischen den einzelnen Genotypen feststellbar. (A-E) Übersichtsaufnahmen von A<sup>I</sup>-E<sup>I</sup>. Die Maßstabalken entsprechen 10  $\mu$ m.



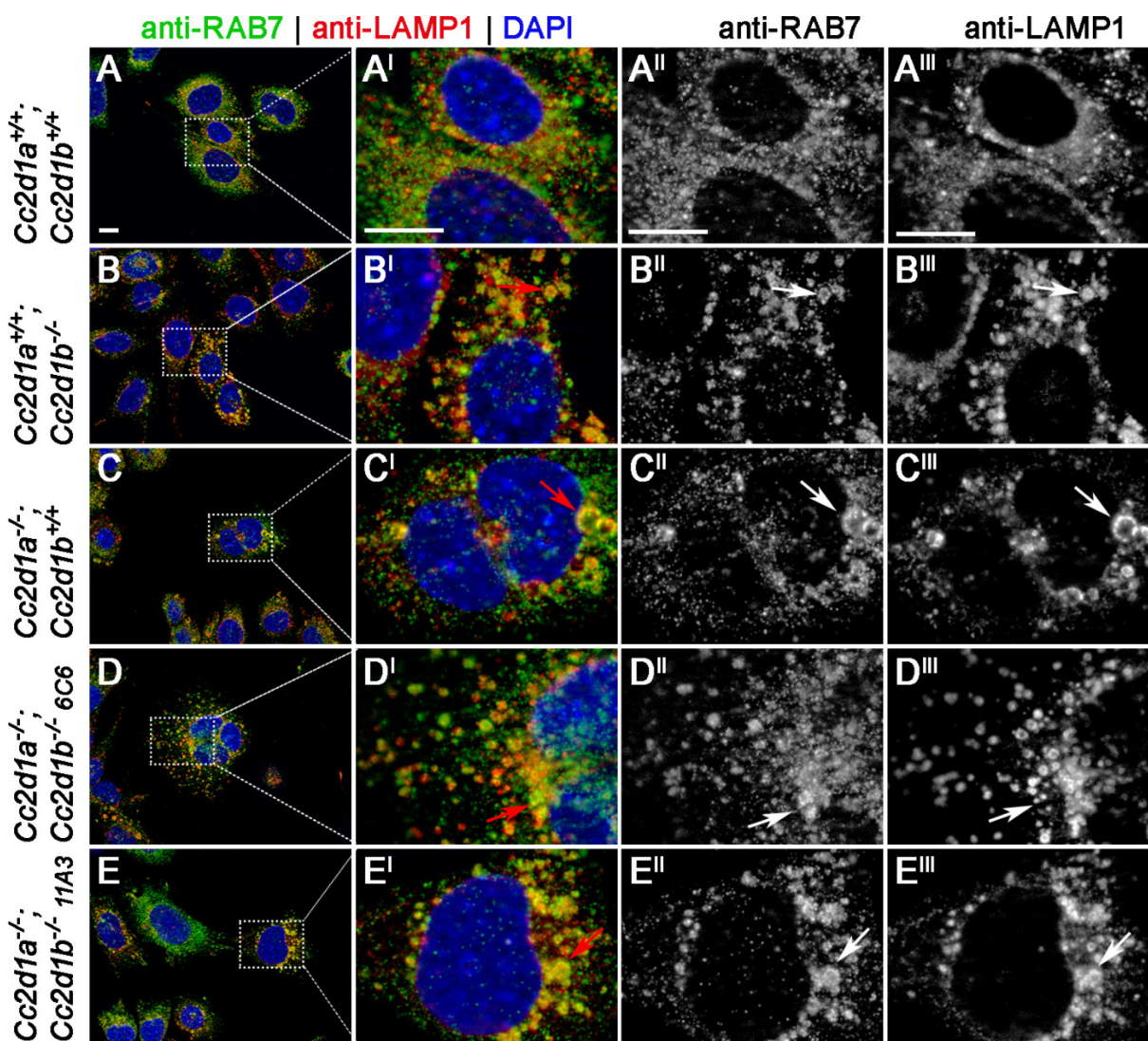
Wie der Abbildung 2.6 zu entnehmen ist, hat die immunzytochemische Analyse der subzellulären Lokalisation von endogenem CHMP4B keine Unterschiede zwischen den einzelnen Genotypen ergeben. Erwartungsgemäß zeigte CHMP4B in der wildtypischen Probe ubiquitäre vesikulär-assoziierte Verteilung (Abb. 2.6 A-A<sup>II</sup>). Weder die Zellen der beiden Einzelknockouts (Abb. 2.6 B-B<sup>II</sup> und C-C<sup>II</sup>) noch die DKO-Zellen (Abb. 2.6 D-D<sup>II</sup> und E-E<sup>II</sup>) zeigten ein von der wildtypischen Situation abweichendes Muster.

Der Verlust von Lgd in *D. melanogaster* äußert sich auf zellulärer Ebene durch die Anwesenheit von vergrößerten, Rab7-positiven Vesikeln, die reife Endosomen repräsentieren (Schneider et al., 2013). Die Auswertung der *in vivo* Daten, die auf Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM) in Flügelimaginalscheiben basieren, belegen den identifizierten vesikulären Phänotyp (Schneider et al., 2013). So konnte anhand der Messung des MVB-Umfangs quantitativ bestätigt werden, dass 23% der ausgewerteten reifenden Endosomen innerhalb des *lgd*-defizienten Gewebes in ihrem Umfang deutlich größer waren als die MVBs unter wildtypischen Bedingungen. Der Fakt, dass die identifizierten MVBs durch die Anwesenheit von ILVs gekennzeichnet waren, deutet auf die bestehende Aktivität der ESCRT-Maschinerie trotz des Lgd-Verlustes hin (Schneider et al., 2013). Da die Mehrheit der identifizierten MVBs in ihrer Größe den wildtypischen Vesikeln entsprach, weist das auf eine ungestörte initiale Reifung der Endosomen hin, wobei der beobachtete Defekt höchstwahrscheinlich in späteren Stadien des Reifungsprozesses auftritt.

Die Frage, ob der Verlust der CC2D1-Proteine in Säugern einen ähnlichen endosomalen Phänotyp hervorruft, wurde bereits in einer vorherigen Dissertation diskutiert (Migdal, 2016; Dissertation). Dort wurden einzel- und doppel-defiziente MEFs bezüglich der Verteilung und der Größe von LAMP1-positiven Vesikeln untersucht. Mittels TEM-basierter Analyse wurden diese Strukturen morphologisch charakterisiert, wobei ihre Größe quantitativ ausgewertet wurde. Jedoch ist zu beachten, dass die analysierten DKO-Zellen mit Hilfe der CRISPR/Cas9-Methode generiert wurden und demzufolge unerwartete „*off target*“-Effekte in diesem Fall nicht auszuschließen sind. Die immunzytochemische Untersuchung dieser Zellen hat ergeben, dass die vollständige *Cc2d1*-Defizienz zu einer Akkumulation vergrößerter LAMP1-positiver Vesikel führt. Dieser Phänotyp wurde durch die TEM-Analyse bestätigt, wobei diese Vesikel Auffälligkeiten in ihrer Morphologie zeigten und vergrößerte ILVs enthielten. Diese Vesikel wurden als Endolysosomen, ein Fusionsprodukt von reifenden Endosomen und Lysosomen, eingestuft. Anders als bei DKO, konnte bei dem individuellen CC2D1-Verlust kein LAMP1-assoziiertes Effekt beobachtet werden. Erst durch eine detaillierte TEM-basierte Charakterisierung der Zellen konnte quantitativ nachgewiesen werden, dass der Ausfall von CC2D1A ebenfalls in einem vermehrten Auftreten von vergrößerten Endolysosomen resultierte, wobei ihre Morphologie unverändert war. Im Gegensatz dazu lieferte die TEM-

basierte Analyse der *Cc2d1b*-defizienten MEFs keinen endosomalen Phänotyp (Migdal, 2016; Dissertation).

Um zu überprüfen, ob der beobachtete Phänotyp auch in Cre/loxP-basierten doppeldefizienten Zellen detektierbar ist und ob die Abwesenheit der Lgd-Orthologe aus Säugern einen ähnlichen RAB7-assoziierten Phänotyp hervorruft wie dies der Fall in *D. melanogaster* ist, erfolgte im Rahmen dieser Arbeit eine immunzytochemische Analyse der DKO in Bezug auf die subzelluläre Lokalisation von endogenem RAB7 und LAMP1 (Abb. 2.7). Ihre Verteilung wurde sowohl mit der wildtypischen als auch mit der einzel-defizienten Situation verglichen.

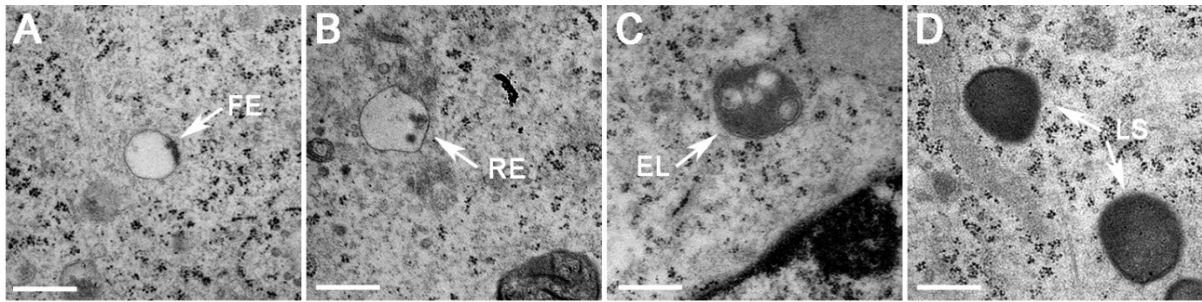


**Abbildung 2.7: Untersuchung der subzellulären Lokalisation von RAB7 und LAMP1 in wildtypischen, *Cc2d1b*-, *Cc2d1a*-defizienten und DKO-MEFs.** Der Marker für reife Endosomen RAB7 (A'') sowie der lysosomale Marker LAMP1 (A''') sind in den wildtypischen Zellen als kleine vesikuläre Strukturen zu erkennen. Die Kolokalisation zwischen den beiden Proteinen ist minimal erkennbar (A'). Im Unterschied dazu zeigen alle defizienten Zellen eine Akkumulation von vergrößerten RAB7-positiven Vesikeln (B''- E''; mit weißen Pfeilen angedeutet), die partiell eine Überlappung (B'-E'; mit roten Pfeilen angedeutet) mit ebenfalls vergrößerten und akkumulierten LAMP1-Vesikeln (B'''- E'''; mit weißen Pfeilen angedeutet) aufweisen. (A-E) Übersichtsaufnahmen von A'-E'. Die Maßstabbalken entsprechen 10  $\mu$ m.

Mittels der immunzytochemischen Analyse der endosomalen Marker konnte ein vom Wildtyp abweichender Phänotyp identifiziert werden. Im Vergleich zu den wildtypischen RAB7- und LAMP1-assoziierten Vesikeln (Abb. 2.7 A<sup>II</sup>-A<sup>III</sup>) zeigten die Zellen des Genotyps *Cc2d1a*<sup>+/+</sup>; *Cc2d1b*<sup>-/-</sup>, *Cc2d1a*<sup>-/-</sup>; *Cc2d1b*<sup>+/+</sup> sowie *Cc2d1a*<sup>-/-</sup>; *Cc2d1b*<sup>-/-</sup> (6C6, 11A3) eine Akkumulation von vergrößerten Vesikeln, die für beide Marker positiv waren (Abb. 2.7 B<sup>II</sup>-E<sup>III</sup>; weiße Pfeile). Die partielle Kolokalisation dieser Vesikel (Abb. 2.7 B<sup>I</sup>-E<sup>I</sup>; rote Pfeile) deutet darauf hin, dass es sich hierbei höchstwahrscheinlich um Endolysosomen handelt, die sich durch die gleichzeitige Markierung mit RAB7 und LAMP1 identifizieren lassen.

Da eine immunzytochemische Analyse auf der Verwendung von Antikörpern basiert, hängt das Ergebnis der Analyse in erster Linie von der Spezifität und der Bindungseffizienz des jeweiligen Antikörpers an sein Zielprotein ab. Außerdem ist eine genaue Aussage über die Größe und die Anzahl der betroffenen Strukturen basierend auf einer Antikörperfärbung nur bedingt möglich. Aus diesem Grund erfolgte eine nähere Charakterisierung der identifizierten Strukturen in Bezug auf ihre Morphologie und Größe basierend auf einer TEM-Analyse. Ausgehend davon, dass die Antikörperfärbung an Zellen eine Akkumulation von vergrößerten RAB7- und LAMP1-assoziierten vesikulären Strukturen gezeigt hat, stand im Mittelpunkt der TEM-Analyse die Identifizierung und Quantifizierung von Endolysosomen und Lysosomen.

Aufgrund dessen, dass bei einer TEM-Analyse keine spezifische Detektion bestimmter Markerproteine möglich ist und der Nachweis von Ultrastrukturen auf Basis einer unspezifischen Kontrastierung der intrazellulären Bestandteile erfolgt, ist die Zuordnung der einzelnen endozytotischen Kompartimente nur anhand deren typischen Merkmalen möglich. So lassen sich frühe Endosomen als runde Vesikel beschreiben, die gar keine oder nur wenige ILVs aufweisen (Abb. 2.8 A). Im Gegensatz dazu sind reife Endosomen an der zunehmenden ILV-Anzahl erkennbar (Abb. 2.8 B). Die für die Analyse relevanten Endolysosomen zeichnen sich hingegen durch eine Kombination aus verbleibenden vesikulären Strukturen sowie dem bereits abgebauten, elektronendichten Material aus (Abb. 2.8 C). Die Endstation der abzubauenden Fracht stellen Lysosomen dar, die an dem mit dem abzubauenden Material gefüllten Lumen erkennbar sind (Abb. 2.8 D).



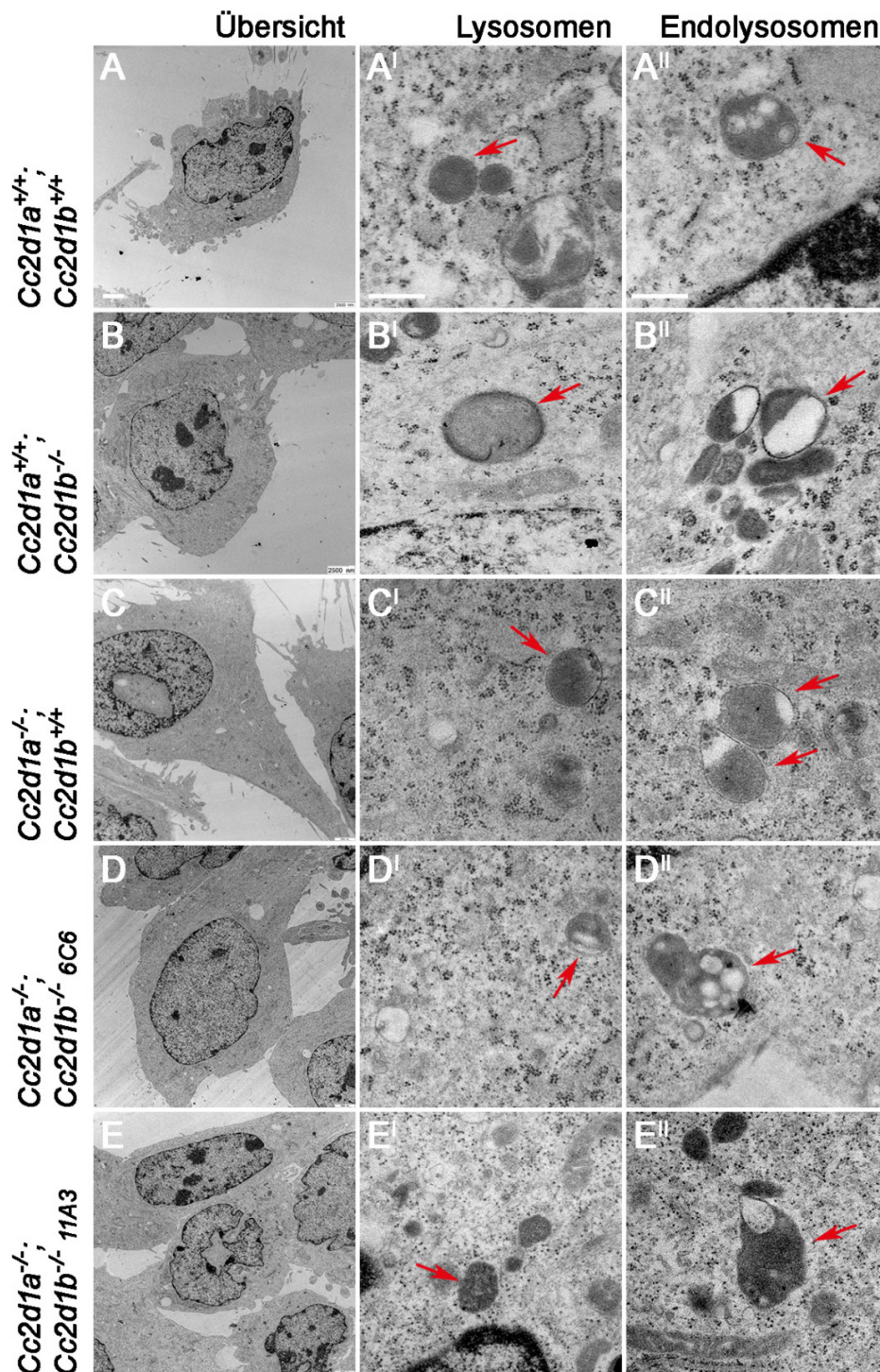
**Abbildung 2.8: Übersicht der endozytotischen Strukturen.** (A) Fröhes Endosom (FE) ist durch die Abwesenheit oder eine geringe Anzahl an ILVs charakterisiert. (B) Bei einem reifenden Endosom (RE) nimmt die Anzahl an ILVs zu. (C) Endolysosomen (EL) zeichnen sich durch ein Lumen aus, das teils mit vesikulären Strukturen, teils mit bereits abgebautem Material gefüllt ist. (D) Lysosomen (LS) sind als dunkle Vesikel mit vollständig ausgefülltem Lumen erkennbar. Pfeile deuten auf endozytotischen Vesikel hin. Maßstabbalken entsprechen 250 nm.

Um eine mögliche morphologische Abweichung in *Cc2d1*-defizienten Zelllinien zu analysieren, wurden deren Endolysosomen und Lysosomen mit wildtypischen Strukturen verglichen, wobei die *Cc2d1a*<sup>+/+</sup>; *Cc2d1b*<sup>+/+</sup>-Zellen als Referenzprobe dienten. Die Abbildung 2.9 zeigt eine Übersicht der identifizierten endozytotischen Vesikel innerhalb der analysierten Zelllinien.

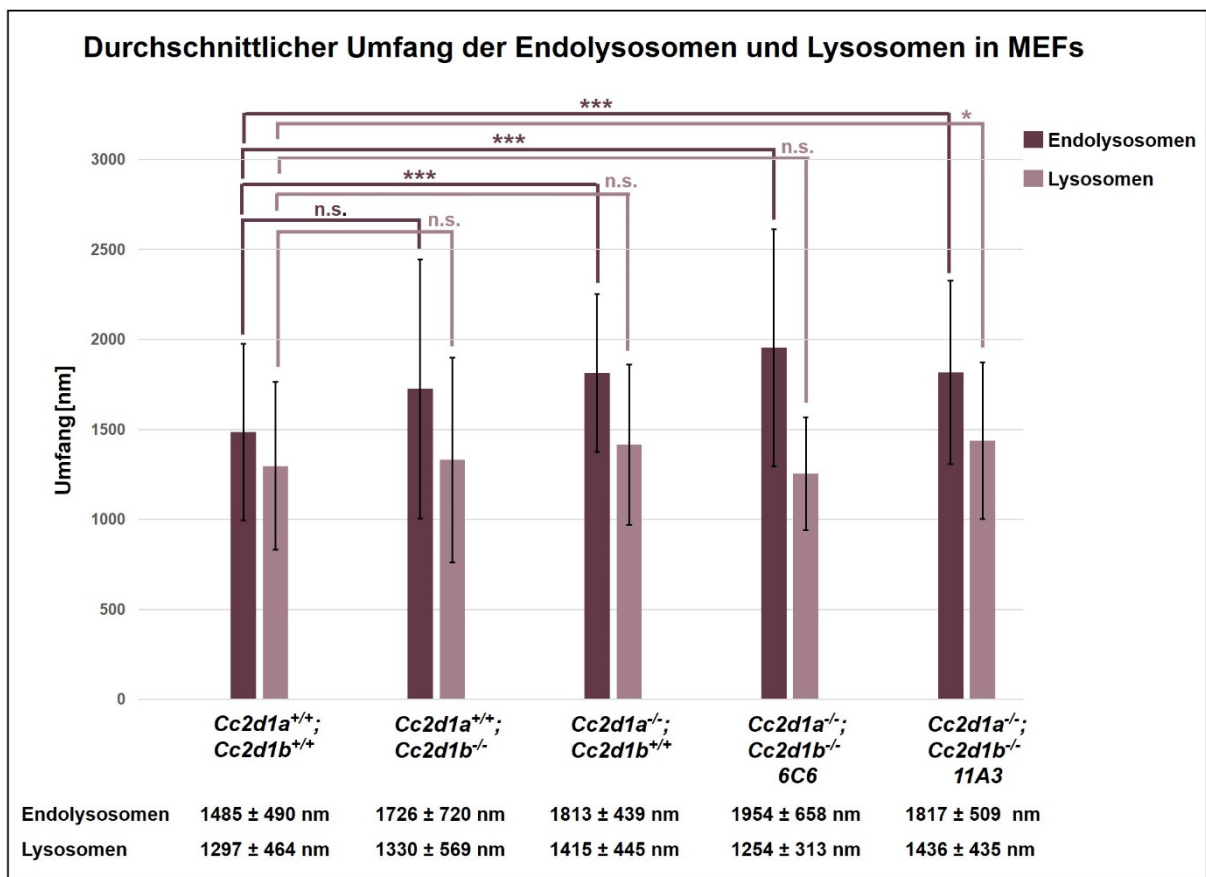
Erwartungsgemäß konnten wildtypische Lysosomen anhand ihrer runden Form und vollständig ausgefülltem Lumen identifiziert werden (Abb. 2.9 A<sup>I</sup>). Die Endolysosomen wurden ebenfalls als runde Strukturen eingestuft, die sowohl diffus verteiltes elektronendichtes Material als auch Vesikel in ihrem Lumen enthielten (Abb. 2.9 A<sup>II</sup>). Das Ergebnis der Untersuchung der Lysosomen-Morphologie in *Cc2d1b*- oder *Cc2d1a*-defizienten MEFs (Abb. 2.9 B<sup>I</sup>, C<sup>I</sup>) sowie in beiden DKO (Abb. 2.9 D<sup>I</sup>, E<sup>I</sup>) lieferte keine erkennbaren Abweichungen von der wildtypischen Situation. Im Gegensatz dazu konnten bei allen defizienten Zelllinien Unterschiede in der Endolysosomen-Morphologie festgestellt werden. Die Abwesenheit beider Proteine äußerte sich in einer vermehrten Verformung der Endolysosomen, die zum Verlust ihrer typischen runden Form führte (Abb. 2.9 D<sup>II</sup>, E<sup>II</sup>). Im Falle der *Cc2d1b*- oder *Cc2d1a*-Defizienz blieb die runde Form der Endolysosomen erhalten, die Lumenstruktur unterschied sich jedoch von der wildtypischen Situation (Abb. 2.9 B<sup>II</sup>, C<sup>II</sup>). Diese Vesikel wiesen eine strenge intravesikuläre Aufteilung des Lumens auf: ein Teil wurde dicht mit dem abzubauenen Material befüllt, während der andere Teil aus einem leeren Raum bestand.

Da die immunzytochemische Analyse Indizien dafür gab, dass der CC2D1-Ausfall sich auf die Größe der endozytotischen Vesikel auswirken könnte, wurden alle identifizierten Endolysosomen und Lysosomen bezüglich ihrer Größe quantitativ ausgewertet. Der durchschnittliche Umfang der Endolysosomen und Lysosomen innerhalb der jeweiligen Zelllinie ist in der Abbildung 2.10 graphisch dargestellt.





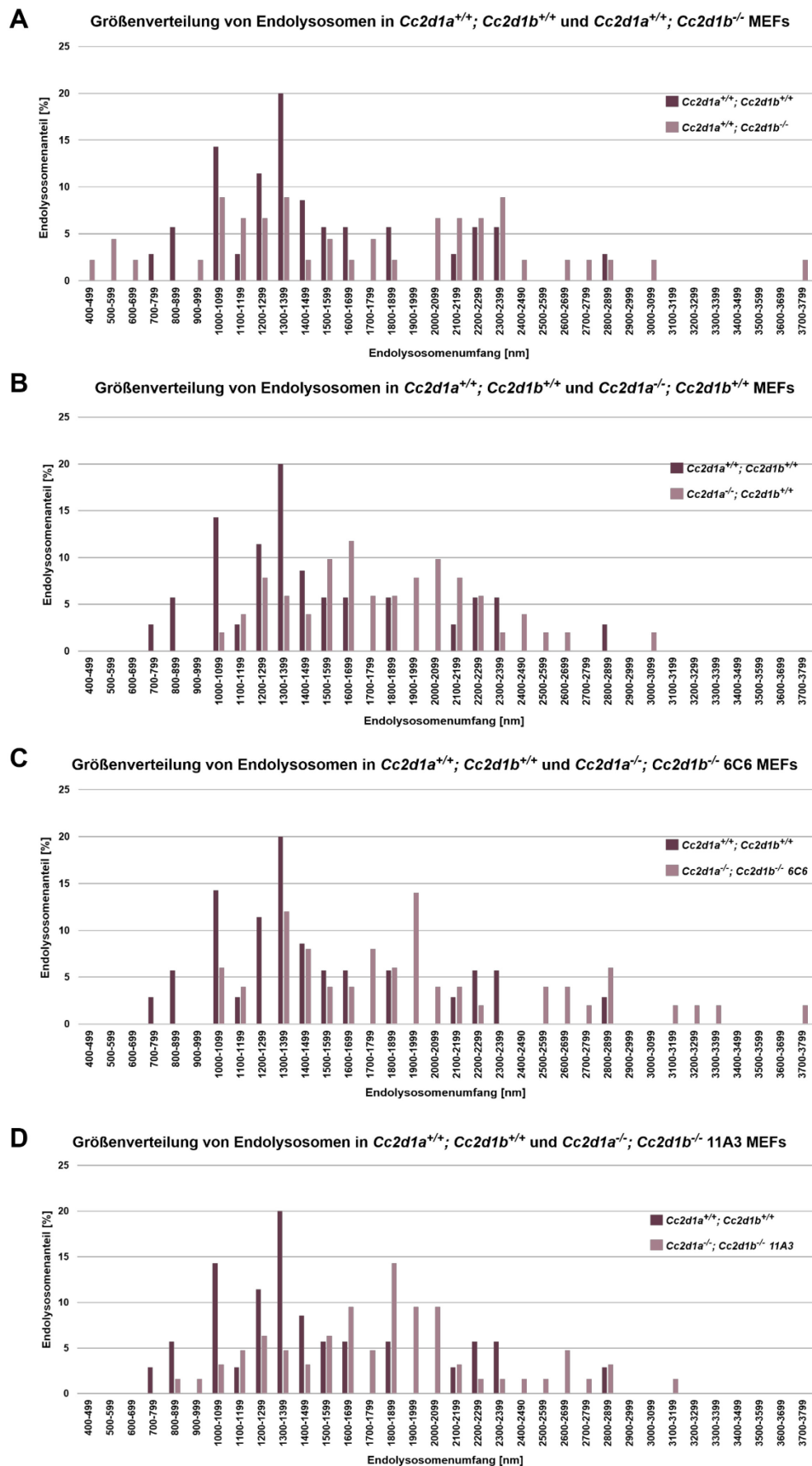
**Abbildung 2.9: TEM-Analyse von wildtypischen, *Cc2d1b*-, *Cc2d1a*-defizienten und DKO-MEFs.** Die Endolysosomen des Genotyps *Cc2d1a*<sup>+/+</sup>; *Cc2d1b*<sup>+/+</sup> zeigen eine uniforme Morphologie. Es sind runde Strukturen erkennbar, die sowohl das elektronendichte Material als auch eingeschlossene Vesikel beinhalten (A''). Die Lysosomen zeichnen sich ebenfalls durch eine runde Form aus (A'). Im Gegensatz zu den Endolysosomen ist ihr Lumen vollständig mit diffusem Material ausgefüllt, das bereits abgebaute Fracht darstellt. Ihre Morphologie ist weder in den *Cc2d1b*- (B') noch in den *Cc2d1a*-defizienten MEFs (C') verändert. Der gleichzeitige Verlust beider Proteine scheint ebenfalls keinen Effekt auf die Form von Lysosomen zu haben (D', E'). In Gegensatz dazu kann bei allen defizienten Zellen eine Änderung der Endolysosomenform detektiert werden (B''-E''). Während bei den beiden DKO die runde Form verloren geht (D'', E''), ist bei den Einzelknockouts eine Veränderung in der Lumenstruktur zu erkennen (B'', C''). (A-E) Übersichtsaufnahmen von A'-E''. Pfeile deuten auf Endolysosomen und Lysosomen hin. Die Maßstab balken entsprechen bei A-E 2500 nm und bei A'-E'' 250 nm.



**Abbildung 2.10: Durchschnittlicher Umfang der Endolysosomen und Lysosomen in wildtypischen, *Cc2d1b*-, *Cc2d1a*-defizienten und DKO-MEFs.** Während die durchschnittliche Größe der Lysosomen durch den Verlust der CC2D1-Proteine nicht beeinflusst wird, ist bei allen defizienten Zellen eine Tendenz zur Größenzunahme von Endolysosomen erkennbar. Dabei liegt je nach Genotyp ein Größenunterschied von ca. 240 - 470 nm im Vergleich zur wildtypischen Situation vor.

Eine quantitative Auswertung der vesikulären Strukturen hat ergeben, dass der Verlust der CC2D1-Proteine keinen Einfluss auf die Größe von Lysosomen zu haben scheint (Abb. 2.10). Die Lysosomen traten in allen Zelllinien mit einer vergleichbaren Durchschnittsgröße auf (*Cc2d1a*<sup>+/+</sup>; *Cc2d1b*<sup>+/+</sup>: 1297 ± 464 nm; *Cc2d1a*<sup>+/+</sup>; *Cc2d1b*<sup>-/-</sup>: 1330 ± 569 nm; *Cc2d1a*<sup>-/-</sup>; *Cc2d1b*<sup>+/+</sup>: 1415 ± 445 nm; *Cc2d1a*<sup>-/-</sup>; *Cc2d1b*<sup>-/-</sup>: 1254 ± 313 nm; *Cc2d1a*<sup>-/-</sup>; *Cc2d1b*<sup>-/-</sup>: 1436 ± 435 nm) und zeigten demnach keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Genotypen. Im Gegensatz dazu konnte bei defizienten Zelllinien eine signifikante Abweichung in der Endolysosomengröße festgestellt werden. Während ihr Umfang in wildtypischen Zellen durchschnittlich 1485 ± 490 nm betrug, lag dieser Wert bei *Cc2d1b*-KO MEFs bei 1726 ± 720 nm und bei *Cc2d1a*-KO MEFs bei 1813 ± 439 nm. Die Untersuchung beider DKO-Linien lieferte ein zu *Cc2d1a*-defizienten MEFs vergleichbares Ergebnis, wobei die Endolysosomen der Linie 6C6 im Durchschnitt einen Umfang von 1954 ± 658 nm zeigten, während im Fall von der DKO-Linie 11A3 eine Größe von 1817 ± 509 ermittelt wurde (Abb. 2.10).

Da es sich hierbei um Durchschnittswerte handelt, kann hier keine Aussage über die Präferenzgröße innerhalb einzelnen Genotypen getroffen werden. Unter diesem Aspekt erfolgte eine Unterteilung der ausgemessenen Vesikel in „100 nm“-Gruppen (Abb. 2.11).



**Abbildung 2.11: Größenverteilung von Endolysosomen in *Cc2d1b*<sup>-/-</sup>, *Cc2d1a*-defizienten und DKO-MEFs in Korrelation zu wildtypischen Zellen. (A)** Die Gesamtpopulation der wildtypischen Endolysosomen erstreckt sich von 700 nm bis 2899 nm, wobei die am häufigsten vertretenen Endolysosomen den 1000 nm / 1200 nm / 1300 nm

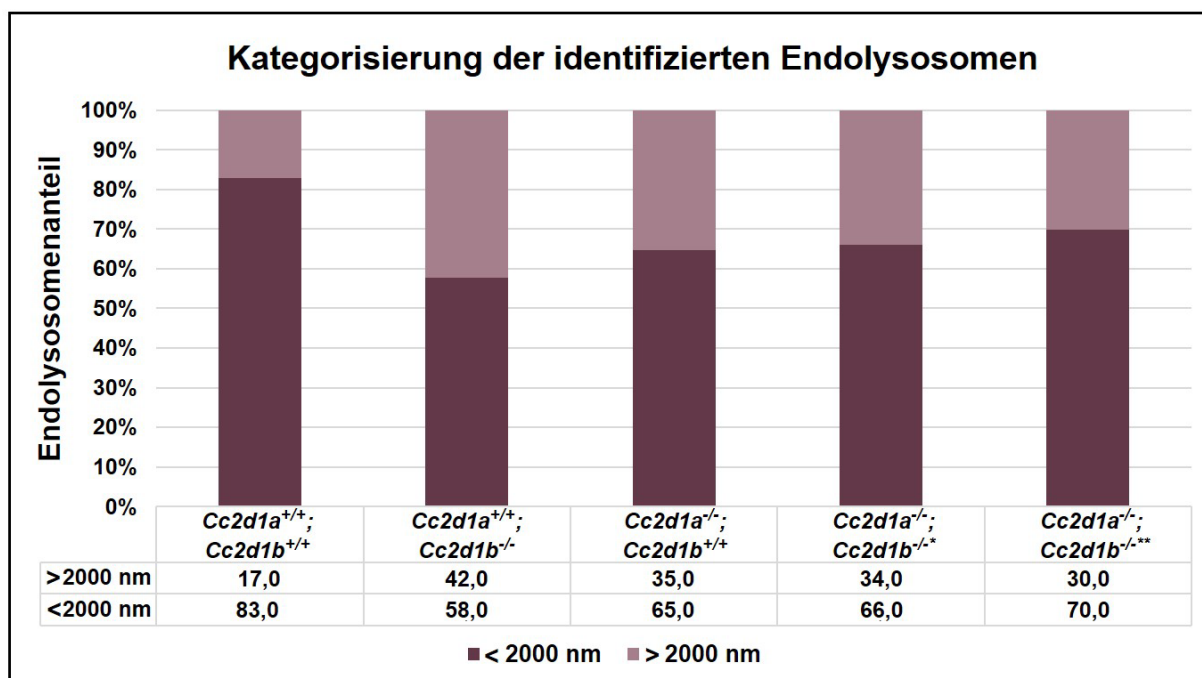
- Gruppen zuzuordnen sind. Die Endolysosomen des *Cc2d1b*-Einzelknockouts zeigen eine Größenverschiebung im Vergleich zum Wildtyp. Ihr Spektrum liegt im Bereich zwischen 400 nm und 3799 nm und die meist auftretenden Vesikel befinden sich in 1000 nm / 1300 nm / 2300 nm - Gruppen. **(B)** Während die Gesamtpopulation der Endolysosomen innerhalb des *Cc2d1a*-Einzelknockouts sich auf einen Bereich zwischen 1000 nm und 3099 nm beschränkt, haben die 1500 nm / 1600 nm / 2000 nm - Gruppen den höchsten Anteil an identifizierten Vesikel. **(C)** Die am häufigsten vertretenen Gruppen in den Zellen des *Cc2d1a*<sup>-/-</sup>; *Cc2d1b*<sup>-/-</sup> Genotyps (6C6) sind die Endolysosomen mit einer Größe von 1300 nm und 1900 nm, während der Rest der Endolysosomen sich im Bereich zwischen 1000 nm und 3799 nm befindet. **(D)** Die zweite DKO-Linie (11A3) zeigt eine Tendenz der Endolysosomen zu 1600 nm / 1800 nm / 1900 nm / 2000 nm und das Gesamtspektrum liegt bei 800 nm - 3199 nm. *Cc2d1a*<sup>+/+</sup>; *Cc2d1b*<sup>+/+</sup>: n=35; *Cc2d1a*<sup>+/+</sup>; *Cc2d1b*<sup>-/-</sup>: n=45; *Cc2d1a*<sup>-/-</sup>; *Cc2d1b*<sup>+/+</sup>: n=51; *Cc2d1a*<sup>-/-</sup>; *Cc2d1b*<sup>-/-</sup> 6C6: n=50; *Cc2d1a*<sup>-/-</sup>; *Cc2d1b*<sup>-/-</sup> 11A3: n=63.

Mittels statistischer Analyse der Endolysosomen-Verteilung konnte bei den wildtypischen Zellen ein Größenspektrum von 700 nm bis 2899 nm identifiziert werden (Abb. 2.11 A). Dabei zeigten die 1000 nm / 1200 nm / 1300 nm - Gruppen den höchsten Anteil an Endolysosomen (14,2% / 11,4% / 20,0% entsprechend). Im Vergleich dazu wurde die Gesamtpopulation von Endolysosomen aus den *Cc2d1a*<sup>+/+</sup>; *Cc2d1b*<sup>-/-</sup>-Zellen in einem etwas breiteren Spektrum gefunden, das sich relativ gleichmäßig über den Bereich von 400 nm bis 3799 nm erstreckte (Abb. 2.11 A). In diesem Fall wurden die am häufigsten vorkommenden Endolysosomen den 1000 nm / 1300 nm / 2300 nm - Gruppen zugeordnet (jeweils 8,9%). Bei den *Cc2d1a*<sup>-/-</sup>; *Cc2d1b*<sup>+/+</sup>-Zellen konnte im Vergleich zur wildtypischen Probe eine Tendenz zur Größenzunahme detektiert werden, da die Gruppen mit einem Umfang von 1500 nm (9,8%), 1600 nm (11,8%) und 2000 nm (9,8%) den höchsten Anteil an den identifizierten Endolysosomen zeigten (Abb. 2.11 B). Dabei befand sich die Gesamtpopulation im Bereich von 1000 nm bis 3099 nm. Bei der Quantifizierung der Endolysosomen aus DKO-Zellen (6C6) war ebenfalls eine Tendenz zur Größenzunahme detektierbar (Abb. 2.11 C). Der maximale Anteil an Endolysosomen innerhalb einer Gruppe wurde den 1300 nm / 1900 nm – Fraktionen zugeordnet (12% / 14% entsprechend), wobei der Rest sich auf den Gesamtbereich von 1000 nm bis 3799 nm verteilte. Eine Verschiebung in der Präferenzgröße der Endolysosomen wurde auch bei der zweiten DKO-Zelllinie (11A3) festgestellt (Abb. 2.11 D). Im Gesamtspektrum von 800 nm bis 3199 nm zeigten die 1600 nm / 1800 nm / 1900 nm / 2000 nm – Gruppen das Maximum an Endolysosomen (9,5% / 14,3% / 9,5% / 9,5% entsprechend). Die beschriebene Größenverteilung der Endolysosomen ist in der Tabelle 2.3 zusammengefasst.

Interessanterweise wurde im Rahmen der Dissertation von B. Migdal gezeigt, dass 87% der wildtypischen Endolysosomen sich in einem Größenspektrum unter 2000 nm befanden, während bei *Cc2d1a*-defizienten Zellen lediglich 58% und bei einer CRISPR/Cas9-basierten DKO-Linie 53% der Endolysosomen in diesem Größenbereich identifizierbar waren. Der Verlust von CC2D1B resultierte hingegen in keiner Abweichung (81% < 2000 nm) von der



wildtypischen Verteilung. Da im Rahmen dieser Dissertation ein endosomaler Phänotyp in allen defizienten Linien identifiziert werden konnte (Abb. 2.9 B<sup>II</sup>-E<sup>II</sup>) und eine Tendenz zur Größenzunahme der Endolysosomen sowohl bei beiden einzel-als auch doppel-defizienten Linien detektierbar war (Abb. 2.10 – Abb. 2.11), wäre auch im Fall der *Cc2d1b*-Defizienz eine Verschiebung der Verhältnisse der beiden Größenkategorien zu erwarten. Um dies zu bestätigen, wurde bei allen identifizierten Endolysosomen ihre prozentuale Aufteilung in den „<2000 nm“- und „>2000 nm“-Größenkategorien analysiert (Abb. 2.12). Zusätzlich wurde mit Hilfe dieser quantitativen Analyse überprüft, ob die in CRISPR/Cas9-basierten DKO-MEFs beobachtete Größenverteilung in den Cre/loxP-DKO-MEFs reproduzierbar ist.



**Abbildung 2.12: Prozentuale Verteilung der Endolysosomen innerhalb der „<2000 nm“- und „>2000 nm“-Größenkategorien in wildtypischen, *Cc2d1b*-, *Cc2d1a*-defizienten und DKO-MEFs.** Während die wildtypischen Zellen lediglich 17% der Endolysosomen beinhalten, die in ihrem Umfang größer als 2000 nm sind, werden in *Cc2d1b*-defizienten Zellen 42% der Endolysosomen der „>2000 nm“-Größenkategorie zugeordnet. Die doppel-defizienten Linien zeigen eine zu der *Cc2d1a*-defizienten (>2000 nm: 35%) Situation ähnliche prozentuale Aufteilung. Der Anteil an Endolysosomen, die der „>2000 nm“-Gruppe zugeordnet wurden, liegt bei DKO 6C6 mit 34% und bei DKO 11A3 mit 30% deutlich höher als in der wildtypischen Situation \*: *Cc2d1a*<sup>-/-</sup>; *Cc2d1b*<sup>-/-</sup> 6C6; \*\*: *Cc2d1a*<sup>-/-</sup>; *Cc2d1b*<sup>-/-</sup> 11A3.

Wie der Abbildung 2.12 zu entnehmen ist, konnten lediglich 17% der wildtypischen Endolysosomen mit einer Größe größer als 2000 nm identifiziert werden. Im Unterschied dazu waren Endolysosomen dieser Größenkategorie bei 42% der *Cc2d1b*- sowie bei 35% der *Cc2d1a*-defizienten Zellen vertreten, während der Rest eine Größe von kleiner als 2000 nm aufwies. Doppel-defiziente Zellen lieferten ein zu einzel-defizienten MEFs vergleichbares Ergebnis, wobei der Endolysosomenanteil zu 34% in DKO 6C6 und zu 30% in DKO11A3 der

„>2000 nm“-Kategorie zugeordnet wurde. Somit entsprach das Ergebnis den Erwartungen und bestätigte einen Zusammenhang zwischen dem CC2D1-Verlust und der Zunahme der Endolysosomengröße.

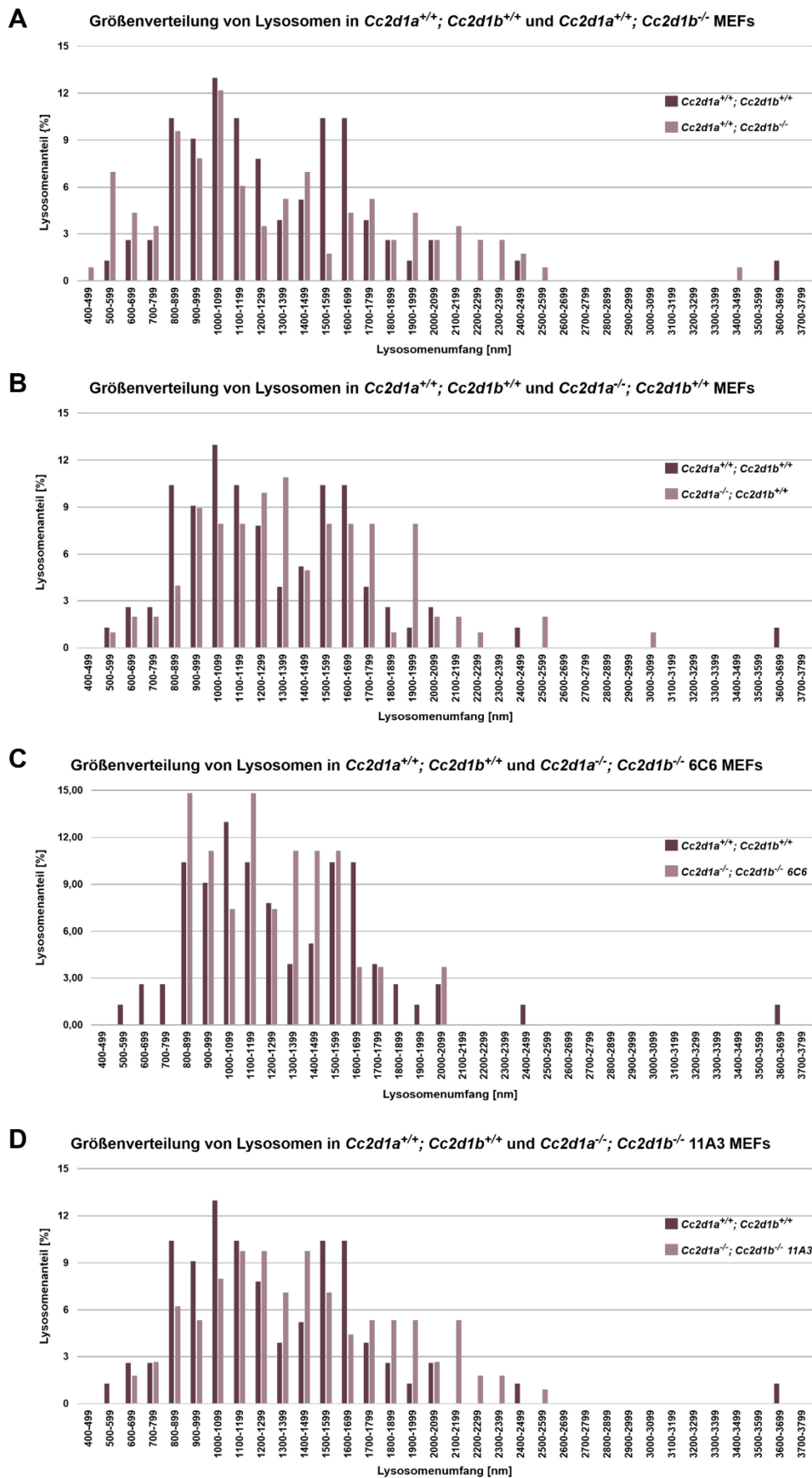
Die Quantifizierung der Lysosomen sowie ihre Einteilung in Größengruppen erfolgte auf analoge Weise. Die graphische Darstellung dieser Auswertung kann der Abbildung 2.13 entnommen werden.

Die Quantifizierung von Lysosomen innerhalb der wildtypischen Zellen resultierte in der Verteilung der Gesamtpopulation in einem Bereich zwischen 500 nm und max. 3699 nm (Abb. 2.13 A). Dabei konnten die meisten Lysosomen anhand des berechneten Umfangs den 800 nm - 1199 nm und 1500 nm - 1699 nm – Gruppen zugeordnet werden (42,8% und 20,8% entsprechend). Ein Vergleich mit den Lysosomen aus den *Cc2d1a*<sup>+/+</sup>; *Cc2d1b*<sup>-/-</sup>-Zellen (Abb. 2.13 A) lieferte für die Gesamtpopulation von 400 nm bis 3499 nm ein ähnliches Ergebnis. Bei diesen Lysosomen konnte ebenfalls eine Präferenz zu den Größen von 800 nm / 900 nm / 1000 nm (9,6% / 7,8% / 12,2 % entsprechend) festgestellt werden. Die Tendenz einer Größenzunahme war bei diesem Genotyp nicht gegeben.

Die Analyse der *Cc2d1a*-defizienten Zellen hat ergeben, dass auch in diesem Fall die Lysosomenpopulation in Bezug auf ihre Größe inhomogen war und im Bereich zwischen 500 nm und 3099 lag (Abb. 2.13 B), wobei die bevorzugte Größe dem Umfang von 900 nm (8,9%) und 1200 nm - 1399 nm (20,8%) entsprach und somit ebenfalls keine Tendenz der Größenzunahme erkennen ließ.

Wie aus der Abbildung 2.13 C und D hervorgeht, verursachte der gleichzeitige Verlust beider Proteine ebenfalls keine Erweiterung der Lysosomen. Die Analyse beider DKO-Zelllinien zeigte, dass diese Lysosomen in einem etwas schmaleren Spektrum vorkamen. Während die Gesamtpopulation der Lysosomen in der Linie 6C6 sich zwischen 800 nm und 2099 nm befand (Abb. 2.13 C), verteilten sich die Lysosomen der Linie 11A3 innerhalb eines Bereiches zwischen 600 nm und 2599 nm (Abb. 2.13 D). Die in den 6C6-Zellen am häufigsten vorkommenden Lysosomen hatten einen Umfang von 800 nm (14,8%), 900 nm (11,1%) und 1100 nm (14,8%) bzw. 1300 nm - 1599 nm (gesamt 33,3 %) und lagen somit in einem ähnlichen Bereich wie die wildtypischen Lysosomen. Die zweite DKO-Linie (11A3) lieferte ein vergleichbares Ergebnis. Die Lysosomen dieser Zellen präferierten zu einer Größe von 1100 nm – 1299 nm (19,4%) sowie 1400 nm (9,7%).

Eine Zusammenfassung der Größenverteilung von Lysosomen ist in der Tabelle 2.3 dargestellt.



**Abbildung 2.13: Größenverteilung von Lysosomen in *Cc2d1b*-, *Cc2d1a*-defizienten und DKO-MEFs in Korrelation zu wildtypischen Zellen. (A)** Die Gesamtpopulation der wildtypischen Lysosomen beschränkt sich auf den Bereich von 500 nm bis 3699 nm, wobei die Mehrzahl der Lysosomen im Größenbereich zwischen 800 nm

und 1199 nm bzw. 1500 nm und 1699 nm liegt. Die Gesamtverteilung der Lysosomen des *Cc2d1b*-Einzelknockouts ist mit der wildtypischen Situation vergleichbar. Diese Lysosomen haben eine Umfangspanne zwischen 400 nm und 3499 nm, wobei die meist präsenten die 800 nm - 1000 nm - Gruppen sind. **(B)** Die Gesamtpopulation der Lysosomen von *Cc2d1a*-defizienten Zellen befindet sich in einem Spektrum von 500 nm bis 3099 nm und ihre meist vertretenen Fraktionen werden den 900 nm / 1200 nm / 1300 nm-Gruppen zugeordnet. **(C)** Die am häufigsten vertretenen Gruppen in den Zellen des Genotyps *Cc2d1a*<sup>-/-</sup>; *Cc2d1b*<sup>-/-</sup> 6C6 sind die Gruppen mit Lysosomen der Größe von 800 nm - 1199 nm bzw. 1300 nm - 1599 nm, während der Rest der Lysosomen sich über den Bereich von 800 nm bis 2099 nm erstreckt. **(D)** Die zweite DKO-Linie zeigt eine vergleichbare Verteilung. Das Gesamtspektrum liegt bei 600 nm - 2599 nm, während die meisten Lysosomen den 1100 nm - 1299 nm bzw. 1400 nm-Gruppen angehören. *Cc2d1a*<sup>+/+</sup>; *Cc2d1b*<sup>+/+</sup>; n=77; *Cc2d1a*<sup>+/+</sup>; *Cc2d1b*<sup>-/-</sup>; n=115; *Cc2d1a*<sup>-/-</sup>; *Cc2d1b*<sup>+/+</sup>; n=101; *Cc2d1a*<sup>-/-</sup>; *Cc2d1b*<sup>-/-</sup> (6C6); n=27; *Cc2d1a*<sup>-/-</sup>; *Cc2d1b*<sup>-/-</sup> (11A3); n=113.

**Tabelle 2.3: Zusammenfassung der Größenverteilung von Endolysosomen und Lysosomen in MEFs**

Endolysosomen				Lysosomen			
Zelllinie	absolute Anzahl	Spektrum	Präferenz	Zelllinie	absolute Anzahl	Spektrum	Präferenz
<i>Cc2d1a</i> <sup>+/+</sup> ; <i>Cc2d1b</i> <sup>+/+</sup>	35	700 nm - 2899 nm	1000 nm / 1200 nm / 1300 nm	<i>Cc2d1a</i> <sup>+/+</sup> ; <i>Cc2d1b</i> <sup>+/+</sup>	77	500 nm - 3699 nm	800 nm - 1199 nm / 1500 nm - 1699 nm
<i>Cc2d1a</i> <sup>+/+</sup> ; <i>Cc2d1b</i> <sup>-/-</sup>	45	400 nm - 3799 nm	1000 nm / 1300 nm / 2300 nm	<i>Cc2d1a</i> <sup>+/+</sup> ; <i>Cc2d1b</i> <sup>-/-</sup>	115	400 nm - 3499 nm	800 nm / 900 nm / 1000 nm
<i>Cc2d1a</i> <sup>-/-</sup> ; <i>Cc2d1b</i> <sup>+/+</sup>	51	1000 nm - 3099 nm	1500 nm / 1600 nm / 2000 nm	<i>Cc2d1a</i> <sup>-/-</sup> ; <i>Cc2d1b</i> <sup>+/+</sup>	101	500 nm - 3099 nm	900 nm / 1200 nm - 1399 nm
<i>Cc2d1a</i> <sup>-/-</sup> ; <i>Cc2d1b</i> <sup>-/-</sup> 6C6	50	1000 nm - 3799 nm	1300 nm / 1900 nm	<i>Cc2d1a</i> <sup>-/-</sup> ; <i>Cc2d1b</i> <sup>-/-</sup> 6C6	27	800 nm - 2099 nm	800 nm / 900 nm / 1100 nm/ 1300 nm - 1599 nm
<i>Cc2d1a</i> <sup>-/-</sup> ; <i>Cc2d1b</i> <sup>-/-</sup> 11A3	63	800 nm - 3199 nm	1600 nm / 1800 nm / 1900 nm / 2000 nm	<i>Cc2d1a</i> <sup>-/-</sup> ; <i>Cc2d1b</i> <sup>-/-</sup> 11A3	113	600 nm - 2599 nm	1100 nm - 1299 nm / 1400 nm

Die immunzytochemische Analyse (Abb. 2.7) sowie die TEM-basierte Charakterisierung der endozytotischen Vesikel (Abb. 2.9 – Abb. 2.13) lieferten einen Hinweis darauf, dass CC2D1A und CC2D1B in die Regulation des endosomalen Transportwegs involviert sind. Sowohl der Verlust von einem der Homologe als auch der gleichzeitige Ausfall beider Proteine führte zu morphologischen Unterschieden in Endolysosomen, wobei bei diesen Strukturen im Vergleich zum Wildtyp eine Tendenz zur Größenzunahme erkennbar war. Aufgrund dessen, dass sowohl die Morphologie als auch die Präferenzgröße der Lysosomen in keiner der untersuchten Zelllinie beeinträchtigt war, scheint dieser Effekt Endolysosomen-spezifisch zu sein. Dies steht in Korrelation mit den *in vivo* Daten aus *D. melanogaster*. Dort konnte ebenfalls gezeigt werden, dass unter dem Funktionsverlust von Lgd die Lysosomen in ihrer Größe nicht beeinflusst werden und ihre Biogenese dadurch höchstwahrscheinlich nicht gestört wird (Schneider et al., 2013).



### **2.1.4 Analyse einer möglichen Funktion der CC2D1-Proteine in der Regulation des Notch-Signalwegs**

Wie bereits beschrieben, spielt Lgd aus *D. melanogaster* eine wichtige Rolle im endosomalen Transportweg, bei welchem seine Funktion für die volle Aktivität der ESCRT-III-Komponente Shrub benötigt wird (Schneider et al., 2013). Diese Interaktion ist für die Regulation des Notch-Signalweges und die Sicherstellung vom vollständigen Abbau des nicht mehr benötigten Rezeptors von zentraler Bedeutung. Kommt es hingegen zum Lgd-Verlust, führt dies zur Akkumulation von vergrößerten Notch-positiven Vesikeln als Folge des gestörten Rezeptorabbaus. Dies resultiert in der Abspaltung der ins Zytoplasma orientierten NICD mit ihrer anschließenden Translokation in den Zellkern und der Initiierung der Expression der Notch-Zielgene. Auf diese Weise wird der Notch-Signalweg Liganden-unabhängig aktiviert (Schneider et al., 2013).

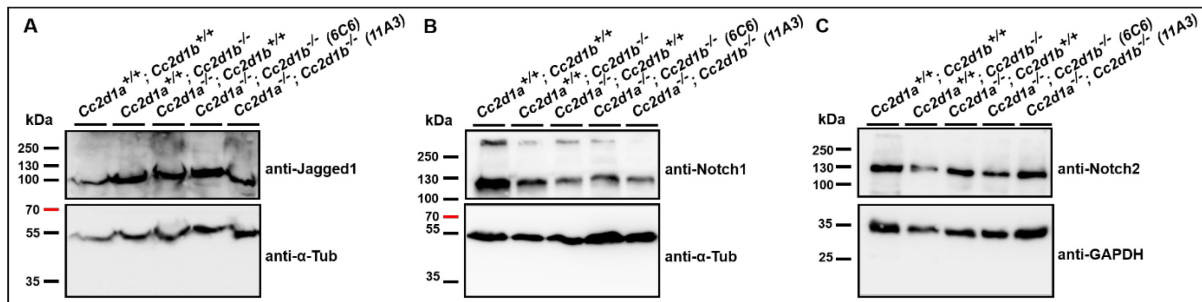
Ob ein direkter Zusammenhang zwischen der Funktion der CC2D1-Proteine aus Säugern im endosomalen Transportweg und der Regulation des Notch-Signalwegs besteht, bleibt unklar. Es gibt Indizien, die diese Theorie unterstützen. So kann z. B. der mutante Phänotyp, der durch den Lgd-Verlust in *D. melanogaster* hervorgerufen wird, durch die Insertion von humanem *CC2D1B* vollständig und durch *CC2D1A* zum größten Teil aufgehoben werden (Drusenheimer et al., 2015). Dies deutet darauf hin, dass die humanen Proteine die Lgd-Funktion höchstwahrscheinlich übernehmen können.

Um eine mögliche Involvierung der CC2D1-Proteine in die Regulation des Notch-Signalwegs in Säugern näher zu charakterisieren, wurden die *Cc2d1b*- und *Cc2d1a*-defizienten Zellen sowie die DKO-MEFs mit dem Fokus auf den Notch-Signalweg untersucht. Als Referenzprobe wurde bei dieser Analyse die wildtypische Zelllinie eingesetzt.

Die zu untersuchenden MEFs wurden in erster Linie auf die Expression der Notch-Komponenten Jagged1, Notch1 und Notch2 überprüft, um sicherzustellen, dass die Grundvoraussetzungen für diesen Signalweg erfüllt sind (Abb. 2.14).

Die auf Western Blot basierte Analyse der Proteinlysate aus MEFs bestätigte die Expression der für den Notch-Signalweg notwendigen Komponenten (Abb. 2.14). Sowohl der Ligand Jagged1 (Abb. 2.14 A) als auch die Notch-Rezeptoren (Abb. 2.14 B, C) konnten in allen Proteinlysaten nachgewiesen werden. Während Jagged1 mit einer Größe von ca. 110 kDa als vollständiges Protein detektiert werden konnte (Abb. 2.14 A), wurde bei Notch2 ausschließlich die 120 kDa Bande eindeutig identifiziert (Abb. 2.14 C). Dabei handelt es sich um eine sogenannte NTM-Region bestehend aus der Transmembrandomäne und der NICD. Die

Inkubation mit dem anti-Notch1-Antikörper ermöglichte den Nachweis des vollständigen Proteins mit einer Größe von ca. 300 kDa sowie der NTM-Region (Abb. 2.14 B).



**Abbildung 2.14: Western Blot zur Expressionsanalyse von Jagged1, Notch1 und Notch2 in MEFs.** (A) Western Blot zum Jagged1-Nachweis in MEFs. Alle Proben zeigen ein Signal auf einer Höhe von ca. 110 kDa, das der Größe von Jagged1 entspricht. (B) Western Blot zum Nachweis der Notch1-Expression in MEFs. In allen analysierten Proteinlysaten ist ein Signal bei ca. 120 kDa erkennbar, wobei diese Bande die NTM-Region des Notch1-Rezeptors repräsentiert. Außerdem ist eine Bande bei ca. 300 kDa nachweisbar, die dem vollständigen Protein entspricht. (C) Expressionsnachweis von Notch2 in MEFs. Die Expression von Notch2 ist anhand einer Bande bei ca. 120 kDa detektierbar, die der Größe der NTM-Region des Notch2-Rezeptors zuzuordnen ist. Anti- $\alpha$ -Tubulin- und anti-GAPDH-Färbungen stellen die Ladekontrollen dar.

Da es beim Verlust von *Lgd* zur Funktionsbeeinträchtigung von *Shrub* kommt und zur damit in Verbindung stehenden Störung bei der Verpackung des Notch-Rezeptors, resultiert dies in einer Akkumulation von vergrößerten Rab7- und Notch-positiven Vesikeln (Schneider et al., 2013), die mittels Antikörperfärbung in Flügelimaginalscheiben nachgewiesen werden können. Wie im Abschnitt 2.1.3 gezeigt wurde, führt der Ausfall der Säugerproteine ebenfalls zu einem endosomalen Phänotyp, der anhand der abweichenden Morphologie (Abb. 2.9) und der Größe von Endolysosomen (Abb. 2.10 – 2.12) detektierbar ist. Um die Frage zu beantworten, ob die *Cc2d1*-Knockout-bedingte Störung im endosomalen Transportweg die subzelluläre Verteilung des Notch-Rezeptors beeinflusst, erfolgte eine immunzytochemische Analyse seiner Lokalisation. Da der Notch1-Antikörper für eine immunzytochemische Färbung nicht geeignet ist, wurde die Analyse der subzellulären Lokalisation des Notch-Rezeptors mit Hilfe des Notch2-Antikörpers durchgeführt. Das Ergebnis dieser Analyse ist in der Abbildung 2.15 dargestellt.

Wie aus der Abbildung 2.15 hervorgeht, konnten mittels der anti-Notch2-Färbung keine Unterschiede in der subzellulären Lokalisation zwischen den einzelnen Genotypen festgestellt werden. Bei allen untersuchten Zelllinien wurde das Protein größtenteils im Zytoplasma in vesikulärer Form detektiert (Abb. 2.15 A-E<sup>II</sup>). Erwartungsgemäß konnte Notch2 neben dem Zytoplasma auch im Zellkern identifiziert werden. Eine Akkumulation der vergrößerten Notch2-positiven Vesikel, die durch Analysen in *Igd*-defizienten Flügelimaginalscheiben von *D. melanogaster* eindeutig nachgewiesen wurde (Schneider et al., 2013), konnte anhand der

durchgeführten Färbung nicht detektiert werden. Dies bedeutet, dass der Verlust der CC2D1-Proteine in Säugern entweder keinen oder einen milden Effekt auf die endosomale Route des Notch-Rezeptors ausübt, der mittels Immunzytochemie nicht identifizierbar ist und dementsprechend einer sensitiveren Methode bedarf.

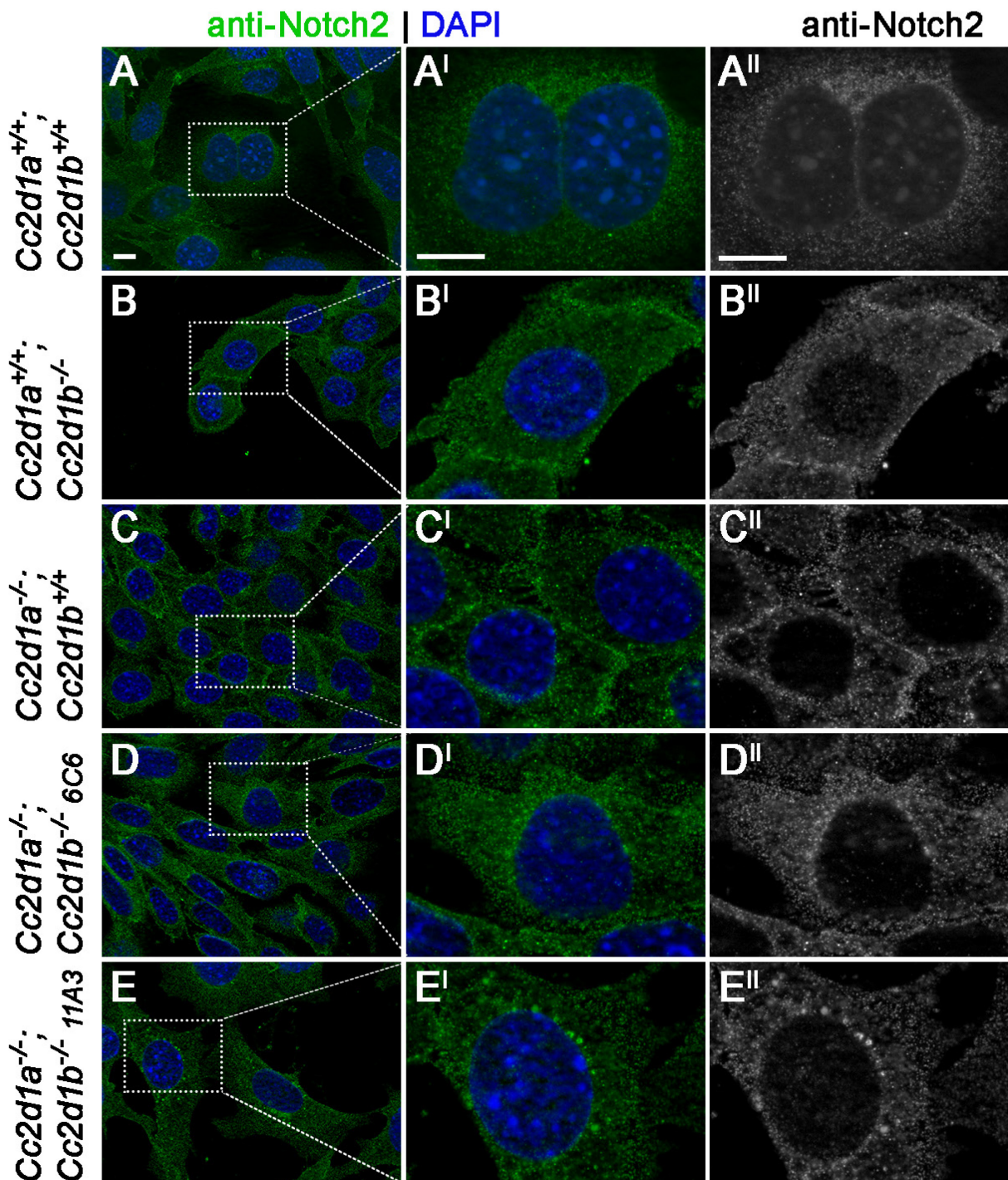
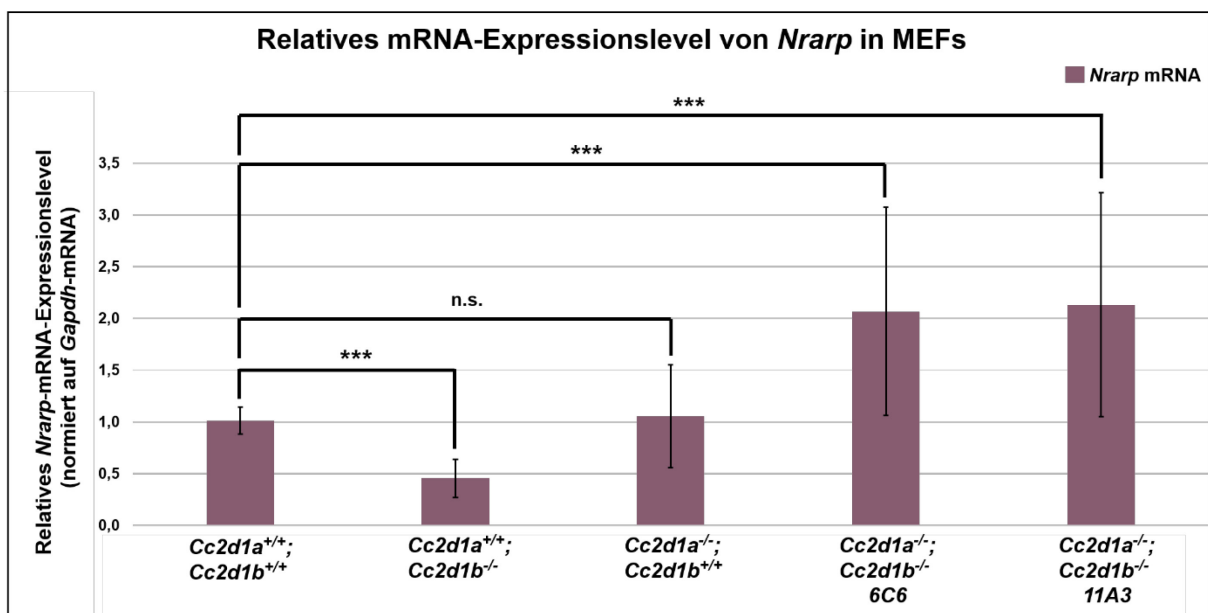


Abbildung 2.15: Untersuchung der subzellulären Lokalisation von Notch2 in wildtypischen, *Cc2d1b*-, *Cc2d1a*-defizienten und DKO-MEFs. Das endogene Notch2 ist bei allen Genotypen zum größten Teil zytoplasmatisch in vesikulärer Form verteilt, zeigt jedoch auch eine schwache Kernlokalisation (A-E''). Es sind keine erkennbaren Unterschiede zwischen den Genotypen feststellbar. (A-E) Übersichtsaufnahmen von A' - E'. Die Maßstab balken entsprechen 10  $\mu$ m.

Um einen möglichen minimalen Einfluss der *Cc2d1*-Defizienz auf die Aktivität des Notch-Signalwegs in Zellen detektieren zu können, wurde die Expression eines Notch-Zielgens in Säugern, *Nrarp*, analysiert. Hierfür wurde aus den zu untersuchenden Zellen die Gesamt-mRNA isoliert und mittels der Reversen Transkriptase *in vitro* in cDNA umgeschrieben. Die cDNA diente schließlich als Matrize bei der Echtzeit-PCR, wobei aufgrund der sequenzspezifischen Primer explizit die *Nrarp*-cDNA amplifiziert und gleichzeitig quantifiziert wurde. Der gemessene Wert wurde auf den Gehalt der *Gapdh*-mRNA normiert und diente der Berechnung der relativen *Nrarp*-mRNA-Expression. Der relative Wert der *Nrarp*-mRNA in wildtypischen Zellen wurde gleich „Eins“ gesetzt und stellte den Referenzwert dar. Die Auswertung der Expressionsanalyse auf der mRNA-Ebene ist in der Abbildung 2.16 dargestellt.



**Abbildung 2.16: Ergebnis der quantitativen Echtzeit-PCR zur Analyse des relativen Expressionslevels von *Nrarp*-mRNA in wildtypischen, *Cc2d1b*-, *Cc2d1a*-defizienten und DKO-MEFs.** Während die Expression der *Nrarp*-mRNA in *Cc2d1a*-defizienten Zellen mit der wildtypischen Situation vergleichbar ist, ist bei *Cc2d1b*-defizienten MEFs eine starke Reduktion in der Expression erkennbar. Die beiden DKO zeigen untereinander ein vergleichbares Ergebnis, das auf eine erhöhte *Nrarp*-mRNA-Expression in diesen Zellen hindeutet. (n=7).

Wie aus der Abbildung 2.16 hervorgeht, konnten zwischen den analysierten Zelllinien Unterschiede in der *Nrarp*-Expression und somit in der Aktivität des Notch-Signalwegs festgestellt werden. Während die Expression von *Nrarp*-mRNA in *Cc2d1a*<sup>+/+</sup>; *Cc2d1b*<sup>-/-</sup>-MEFs im Vergleich zum Wildtyp ca. um die Hälfte reduziert war, zeigte die *Cc2d1a*<sup>-/-</sup>; *Cc2d1b*<sup>+/+</sup> Zelllinie keine signifikanten Unterschiede zur Referenzprobe. Im Gegensatz dazu lieferte der Vergleich des Expressionslevels in beiden doppel-defizienten Zellen eine zweifache Erhöhung der *Nrarp*-Expression in Korrelation zur wildtypischen Situation (Abb. 2.16). Dieses Ergebnis lässt schlussfolgern, dass in diesen Zellen die Aktivität des Notch-Signalweges im Vergleich zu wildtypischen MEFs erhöht war.

Die quantitative Analyse, die auf der Messung der *Nrarp*-mRNA-Expression basiert, lässt darauf schließen, dass beide Säugerproteine CC2D1A und CC2D1B in die Regulation des Notch-Signalwegs involviert sein könnten. Da der Effekt jedoch nicht so stark ausgeprägt ist wie bei *D. melanogaster* und sich mittels immunzytochemischer Analyse nicht nachweisen lässt, lässt sich vermuten, dass die beiden Proteine dabei keine essentielle Rolle spielen. Für diese Annahme spricht auch die Tatsache, dass die untersuchten Zellen bei der durchgeführten *Nrarp*-Analyse starke Schwankungen in ihrer Expression zeigten, die in der Abbildung 2.16 an den ermittelten Standardabweichungen zu erkennen sind. Dies deutet darauf hin, dass der beobachtete Effekt inhomogen und deswegen nicht für alle Zellen repräsentativ ist. Jedoch bleibt die Tendenz erhalten, die für eine potentielle Rolle beider Proteine in der Regulation des Notch-Signalwegs spricht.

### **2.1.5 Analyse der CC2D1-Funktion in der Aufrechterhaltung der Kernhüllenintegrität**

Wie bereits im Abschnitt 1.4 erwähnt wurde, ist über CC2D1B weniger bekannt als über CC2D1A. Einige der Funktionen, die für CC2D1B beschrieben wurden, gehen auf Interaktionen mit Mitgliedern der ESCRT-Maschinerie zurück (Usami et al., 2012; Drusenheimer et al., 2015; Deshar et al., 2016; Ventimiglia et al., 2018). Die meisten davon sind für CC2D1B nicht einzigartig und werden von CC2D1A ebenfalls ausgeführt (Usami et al., 2012; Drusenheimer et al., 2015; Deshar et al., 2016). Die einzig für CC2D1B beschriebene Funktion bezieht sich auf seine mögliche Rolle bei der Regulation der Wiederverschließung der Kernmembran nach der Mitose (Ventimiglia et al., 2018). Dort scheint das Protein die Rekrutierung der ESCRT-Proteine CHMP7 und CHMP4B an die Kernhülle zeitlich zu koordinieren. Seine Bindung an monomeres, zytoplasmatisches CHMP4B verhindert dabei die verfrühte Rekrutierung der ESCRT-III-Proteine. Die zeitliche Verzögerung wird benötigt, um den Spastin-bedingten Abbau der Spindelapparat-Mikrotubuli zu ermöglichen, bevor die Kernmembran wiederverschlossen wird (Ventimiglia et al., 2018). Zum Schluss wird VPS4 rekrutiert, um die ESCRT-III-Filamente aufzulösen und die Fusion der Kernhülle zu unterstützen. Der CC2D1B-Verlust resultiert hingegen in der verfrühten und asynchronen Rekrutierung der ESCRT-III-Proteine sowie in der vorzeitigen Wiederschließung der Kernmembran, wobei der Mikrotubuli-Abbau gestört wird. Als Folge dessen entstehen defekte Zellkerne, die an Kernlamina-Invaginationen erkennbar sind. Diese äußeren Erscheinungen werden auf noch bestehende und den Zellkern durchdringende Mikrotubuli zurückgeführt.

Basierend auf dem beobachteten Phänotyp wird CC2D1B als ein essentieller regulatorischer Faktor bei der Neuassemblierung der Kernhülle eingestuft (Ventimiglia et al., 2018). Jedoch steht seine essentielle Rolle in Diskrepanz mit der relativ niedrigen Penetranz, mit der dieser Phänotyp auftritt. Wird die *Cc2d1b*-Expression unterdrückt, so ist die Invagination der



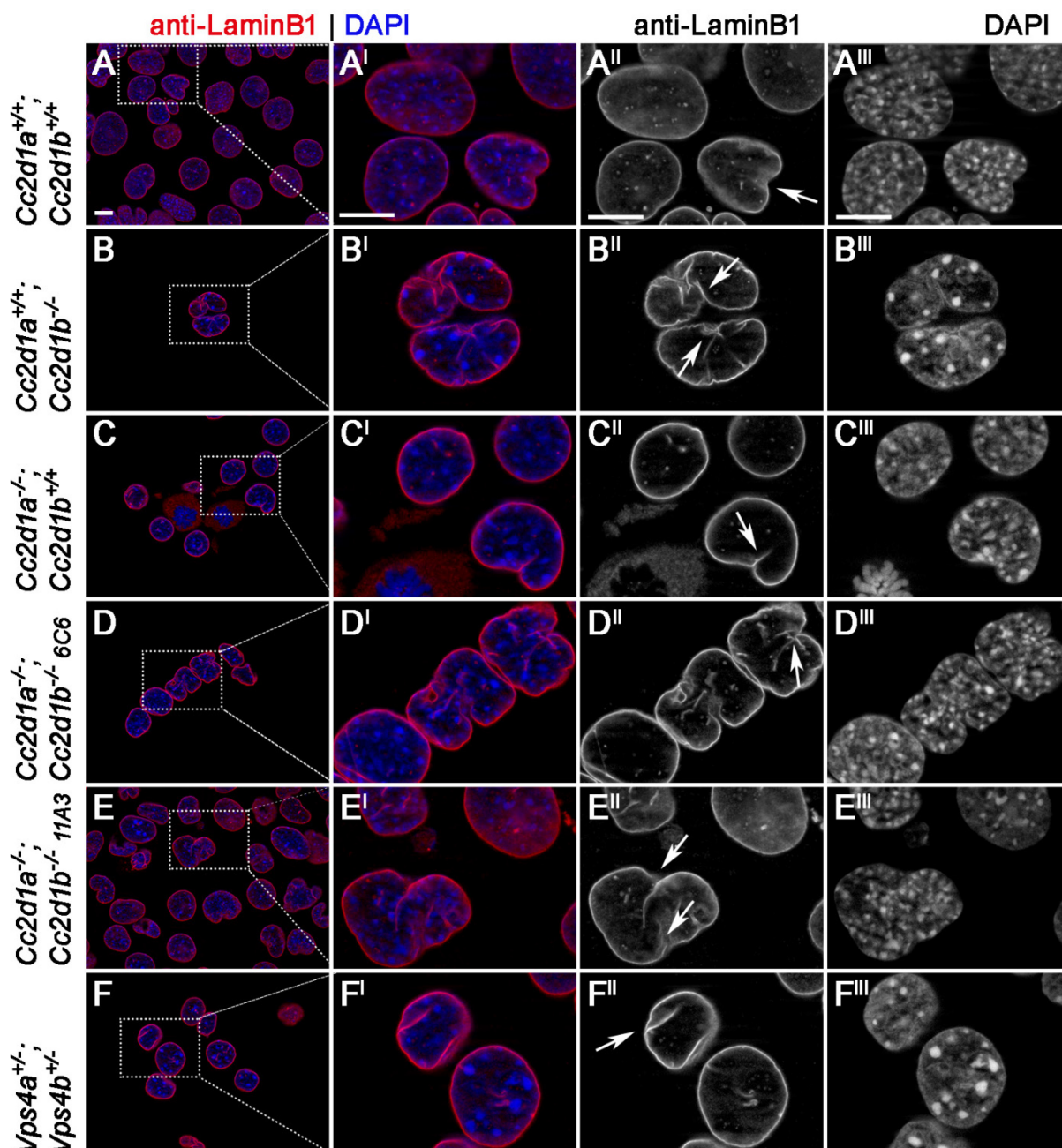
---

Kernhülle bei 40% der Zellen identifizierbar, wobei dieser Defekt bereits in 20% der Kontrollzellen feststellbar ist (Ventimiglia et al., 2018). Da die meisten Experimente in Zellen durchgeführt wurden, bei denen die *Cc2d1b*-Expression mittels einer Transfektion mit siRNA inhibiert wurde, könnte die Ausprägung ihres Phänotyps in einem direkten Zusammenhang mit der Transfektionseffizienz sowie der siRNA-Spezifität stehen. Bei zusätzlich analysierten Zellen, die mittels der CRISPR/Cas9-Methode generiert wurden, können „off-target“-Effekte ebenfalls nicht ausgeschlossen werden. Um herauszufinden, ob der Defekt in der Integrität der Kernhülle in den Zellen des vollständigen *Cc2d1b*-Knockouts reproduzierbar ist und der damit assoziierte Phänotyp mit einer vergleichbaren Penetranz auftritt, erfolgte eine immunzytochemische Untersuchung der Zellen des Genotyps *Cc2d1a*<sup>+/+</sup>; *Cc2d1b*<sup>-/-</sup> unter Verwendung eines Antikörpers gegen das Kernhüllenprotein LaminB1.

Eine weitere mögliche Ursache für die beschriebene Penetranz könnte in der funktionellen Redundanz der CC2D1-Homologe liegen. Sind beide Proteine in diesen Prozess involviert, kann eine partielle Kompensation des CC2D1B-Ausfalls durch die Funktion von CC2D1A nicht ausgeschlossen werden. In diesem Fall wäre beim gleichzeitigen Verlust beider Proteine eine Verstärkung des Phänotyps zu erwarten. Da in der zitierten Studie ausschließlich die Rolle von CC2D1B in der Regulation der nukleären Integrität untersucht wurde (Ventimiglia et al., 2018), wurde im Rahmen dieser Arbeit die Charakterisierung der *Cc2d1b*-defizienten Zellen durch die Analyse von *Cc2d1a*- sowie doppel-defizienten Zellen erweitert.

Da die Wiederverschließung der Kernmembran auf der Aktivität der ESCRT-Maschinerie basiert, stellte sich zusätzlich die Frage, ob eine Beeinträchtigung der ESCRT-Funktion einen zu der *Cc2d1b*-defizienten Situation vergleichbaren Phänotyp hervorruft. Zur Beantwortung dieser Frage wurde VPS4 als Stellvertreter der ESCRT-Maschinerie in den Fokus gestellt. Aufgrund der embryonalen Letalität von *Vps4*-homozygoten Mäusen wurde für die Analyse eine *Vps4a*<sup>+/-</sup>; *Vps4b*<sup>+/-</sup>-Linie verwendet, die in einer vorherigen Dissertation isoliert und mit einem anderen Schwerpunkt untersucht wurde (Migdal, 2016; Dissertation). Die Analyse dieser Linie erlaubt eine Aussage bezüglich des Phänotyps ausschließlich auf der Grundlage der Dosisreduktion von VPS4.

Die morphologische Analyse der Kernhülle ist in der Abbildung 2.17 dargestellt.



**Abbildung 2.17: Untersuchung der nukleären Morphologie in wildtypischen, *Cc2d1b*-, *Cc2d1a*-defizienten und DKO-MEFs sowie in *Vps4a*;*Vps4b*-heterozygoten Zellen.** Die Mehrheit der wildtypischen Zellen ist durch runde Zellkerne charakterisiert, die durch den Farbstoff DAPI zu erkennen sind (**A'''**). Die spezifische Markierung der Kernhülle mittels anti-LaminB1-Antikörpers zeigt nur bei wenigen wildtypischen Zellen eine Invagination der Kernhülle (**A'-A''**), während bei den meisten Zellen ihre Integrität erhalten bleibt (**A**). Die Zellen des Genotyps *Cc2d1a*<sup>-/-</sup>; *Cc2d1b*<sup>+/+</sup> (**C-C'''**) und *Vps4a*<sup>+/+</sup>; *Vps4b*<sup>+/+</sup> (**F-F'''**) zeigen ein analoges Ergebnis. Die meisten Zellen sind rund (**C'''**; **F'''**) und haben eine intakte Kernhülle (**C'-C''**; **F'-F''**). Im Unterschied dazu kommt es bei den *Cc2d1b*-defizienten Zellen zu einem stärkeren Effekt (**B-B'''**). Bei diesen Zellen ist sowohl eine Abweichung von der runden Form (**B'''**) als auch eine vermehrte Invagination der Kernhülle detektierbar (**B'-B''**). Analog dazu ist bei beiden Linien des Genotyps *Cc2d1a*<sup>-/-</sup>; *Cc2d1b*<sup>-/-</sup> (**D-D'''**; **E-E'''**) eine vermehrte Verformung der Zellkerne (**D'''**; **E'''**) und die Invagination der Kernhülle (**D'-D''**; **E'-E''**) nachweisbar. Pfeile deuten auf die Invagination der Kernhülle hin. (**A-F**) Übersichtsaufnahmen von A'-F'. Die Maßstabballen entsprechen 10 µm.

Die immunzytochemische Analyse der wildtypischen Zellkerne ergab einen zu erwartenden Phänotyp (Abb. 2.17 A-A<sup>III</sup>). Die Morphologie der Zellkerne ließ sich nach der Visualisierung mit dem DAPI-Farbstoff zum größten Teil als rund bis leicht oval beschreiben (Abb. 2.17 A<sup>III</sup>). Die Zellkernumrisse, die durch die Färbung mit dem anti-LaminB1-Antikörper die Kernmembran repräsentierten, zeigten einen ununterbrochenen Verlauf. Bei vereinzelt wildtypischen Zellen waren leichte Einkerbungen zu erkennen (Abb. 2.17 A<sup>I</sup>-A<sup>II</sup>).

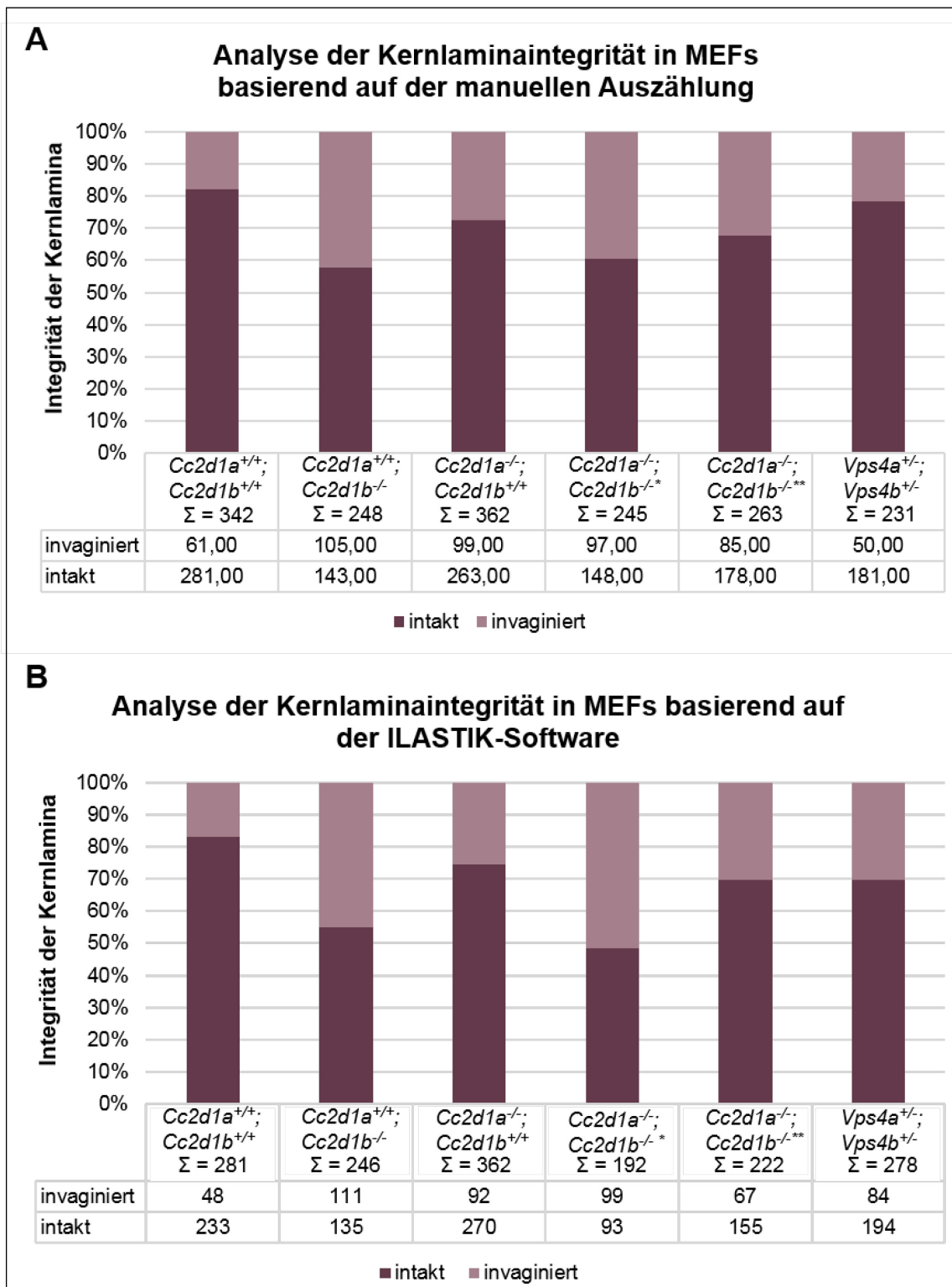
Eine qualitative Analyse der *Cc2d1a*-defizienten Zelllinie (Abb. 2.17 C-C<sup>III</sup>) sowie der *Vps4a*<sup>+/-</sup>; *Vps4b*<sup>+/-</sup>-MEFs (Abb. 2.17 F-F<sup>III</sup>) resultierte in einem zum Wildtyp vergleichbaren Ergebnis. Die meisten Zellen zeigten keine Abnormalitäten in Bezug auf die Zellkernmorphologie und die Integrität der Kernhülle.

Im Gegensatz dazu lieferte die qualitative Charakterisierung der Zellkerne der *Cc2d1b*-defizienten MEFs einen Hinweis auf einen etwas stärker ausgeprägten Phänotyp als bei wildtypischen MEFs (Abb. 2.17 B-B<sup>III</sup>). Die betroffenen Zellen waren durch eine veränderte, nicht mehr runde Zellkernmorphologie (Abb. 2.17 B<sup>III</sup>) und zahlreiche Invaginationsstellen innerhalb der Kernhülle (Abb. 2.17 B<sup>I</sup>-B<sup>II</sup>) gekennzeichnet. Dieser Phänotyp wurde ebenfalls in *Cc2d1a*<sup>-/-</sup>; *Cc2d1b*<sup>-/-</sup> identifiziert (Abb. 2.17 D-E<sup>III</sup>). Diese Zelllinien zeigten ebenfalls eindeutig deformierte Zellkerne mit stark ausgeprägter Invagination der Kernmembran.

Um den identifizierten Effekt zu quantifizieren, wurde die Anzahl der Zellen mit defekten Zellkernen pro Genotyp bestimmt und in Verhältnis zur Gesamtanzahl der Zellen gesetzt. Dabei erfolgte die statistische Auswertung der Fluoreszenzaufnahmen auf zwei unterschiedlichen Weisen. Während die erste Methode auf einer manuellen Auszählung der Zellkerne basierte, wurde die zweite Quantifizierung mittels des Programms ILASTIK von CAI Düsseldorf ausgeführt, wobei betroffene Zellen anhand der Färbung der Zellkernhülle automatisch aussortiert wurden. Beide Analysen wurden separat voneinander durchgeführt. Die Ergebnisse der Quantifizierungen sind in der Abbildung 2.18 graphisch dargestellt und in der Tabelle 2.4 zusammengefasst.

Wie der Abbildung 2.18 und der Tabelle 2.4 zu entnehmen ist, führte die Analyse mittels zwei unabhängigen Methoden zu einem vergleichbaren Ergebnis. Die wildtypische Probe zeigte im Durchschnitt 17,5% der Zellen mit invaginiertem Kernlamina (Abb. 2.18 A: 18% bzw. B: 17%), während die restlichen Zellen keine Defekte aufwiesen. Somit korrelierte der bereits mittels der immunzytochemischen Analyse identifizierte Phänotyp (Abb. 2.17 A-A<sup>III</sup>) mit den Ergebnissen der statistischen Auswertung.





**Abbildung 2.18: Kernanalyse in wildtypischen, *Cc2d1b*-, *Cc2d1a*-defizienten und DKO-MEFs sowie in *Vps4a*; *Vps4b*-heterozygoten Zellen. (A) Analyse der Kernlaminaintegrität basierend auf manueller Auszählung der defekten Zellkerne. Während in der wildtypischen Linie 18% der Zellen eine Invagination der Kernlamina aufweisen, steigt der Anteil an Zellen mit deformierten Zellkernen in *Cc2d1b*-defizienten Zellen um mehr als das Doppelte an. Dieser Defekt ist ebenfalls in beiden doppel-defizienten Zelllinien erkennbar, wobei Kerne mit Einkerbungen bei 40% (6C6 und 11A3) der Zellen nachweisbar sind. Der CC2D1A-Verlust scheint weniger Einfluss auf die Integrität der Kernhülle zu haben, da die defekten Zellkerne bei dieser Linie in 27% auftreten. Die *Vps4a*; *Vps4b*-heterozygote Situation ist mit der *Cc2d1a*-Defizienz vergleichbar und resultiert in 32% der betroffenen**

Zellen. **(B)** Analyse der Kernlaminaintegrität basierend auf der ILASTIK-Software. Die ILASTIK-vermittelte Auswertung liefert zur manuellen Auszählung vergleichbare Ergebnisse. 45% der *Cc2d1b*-defizienten Zellen enthalten defekte Zellkerne und zeigen ein zu der *Cc2d1a*<sup>-/-</sup>; *Cc2d1b*<sup>-/-</sup>-Linie 6C6 ähnliches Ergebnis. Die zweite doppel-defiziente Linie 11A3 weist ein abweichendes Ergebnis mit 30% deformierten Zellkernen auf. Die *Cc2d1a*-defizienten sowie *Vps4a*; *Vps4b*-heterozygoten MEFs liefern untereinander ein vergleichbares Ergebnis, wobei ihr Anteil an betroffenen Zellkernen etwas höher ist als in der wildtypischen Probe, dennoch deutlich niedriger liegt als bei *Cc2d1b*-KO Zellen. \*: *Cc2d1a*<sup>-/-</sup>; *Cc2d1b*<sup>-/-</sup> 6C6; \*\*: *Cc2d1a*<sup>-/-</sup>; *Cc2d1b*<sup>-/-</sup> 11A3.

Im Unterschied zur wildtypischen Zelllinie lieferte die quantitative Auswertung der Zellkerne der *Cc2d1b*-defizienten MEFs eine ca. 2,5-fache Erhöhung in der Frequenz, mit der defekte Zellkerne unter dem CC2D1B-Ausfall aufgetreten sind (Tab. 2.4). So wurden bei einer manuellen Auszählung 42% (Abb. 2.18 A) und bei der „ILASTIK“-basierten Auswertung 45% (Abb. 2.18 B) der Zellen mit einer gestörten Kernlaminaintegrität nachgewiesen. Hiermit korreliert das hier erzielte Ergebnis mit der Arbeit der Gruppe von Martin-Serrano, deren statistische Analyse ein vergleichbares Resultat ergeben hat (Ventimiglia et al., 2018).

Anders als bei *Cc2d1b*-defizienten MEFs zeigten die Zellen des Genotyps *Cc2d1a*<sup>-/-</sup>; *Cc2d1b*<sup>+/+</sup> eine mildere Ausprägung des morphologischen Defekts. Der CC2D1A-Verlust äußerte sich in einem Anstieg in der Anzahl der invaginierten Zellkerne im Vergleich zu wildtypischen Zellen um den Faktor „1,5“ (Tab. 2.4) und führte dementsprechend im Durchschnitt bei 26% der Zellen zu Beeinträchtigungen in der Kernhülle (Abb. 2.18 A: 27 % und B: 25%). Somit lag der Anteil der betroffenen Zellen zwar etwas höher als in der wildtypischen Situation, dennoch deutlich niedriger als beim Verlust von CC2D1B.

Der gleichzeitige Verlust beider CC2D1-Proteine resultierte in einem Phänotyp, der mit dem Effekt der *Cc2d1b*-Einzeldefizienz vergleichbar war. Basierend auf dem Durchschnittswert beider Analysen konnten bei 46% der Zellen der Linie 6C6 (Abb. 2.18 A: 40% bzw. B: 52%) und 35% der Zellen der Linie 11A3 (Abb. 2.18 A: 40% bzw. B: 30%) Einkerbungen in der Kernhülle identifiziert werden. Die ermittelte Steigerung in der Anzahl der Zellen mit defekten Zellkernen lag dabei bei dem Faktor „2,0-2,5“ und entsprach dementsprechend der *Cc2d1b*-defizienten Situation (Tab. 2.4). Da die Penetranz, mit der die Zellkerndefekte auftraten, sich zwischen dem *Cc2d1b*-KO und den beiden DKO-Linien nicht unterschied, scheint die funktionelle Redundanz der CC2D1-Proteine bei diesem Prozess keine Rolle zu spielen.

Die Verringerung der VPS4-Dosis resultierte ebenfalls in einer leichten Erhöhung im Anteil an Zellen, die deformierte Zellkerne beinhalteten. Die Zellkerne, die anhand von invaginierten Stellen als defekt eingestuft wurden, traten durchschnittlich in 31% (Abb. 2.18 A: 32% bzw. B: 30%) der Fälle auf und zeigten somit eine Tendenz zur Erhöhung in der Anzahl der betroffenen Zellkerne. Diese Werte lagen deutlich niedriger als im Fall der *Cc2d1b*-Defizienz. Allerdings

ist hier zu beachten, dass es sich hierbei um keinen vollständigen Knockout handelt, sondern um eine heterozygote Situation.

**Tabelle 2.4: Zusammenfassung der quantitativen Auswertung des Kernphänotyps in MEFs**

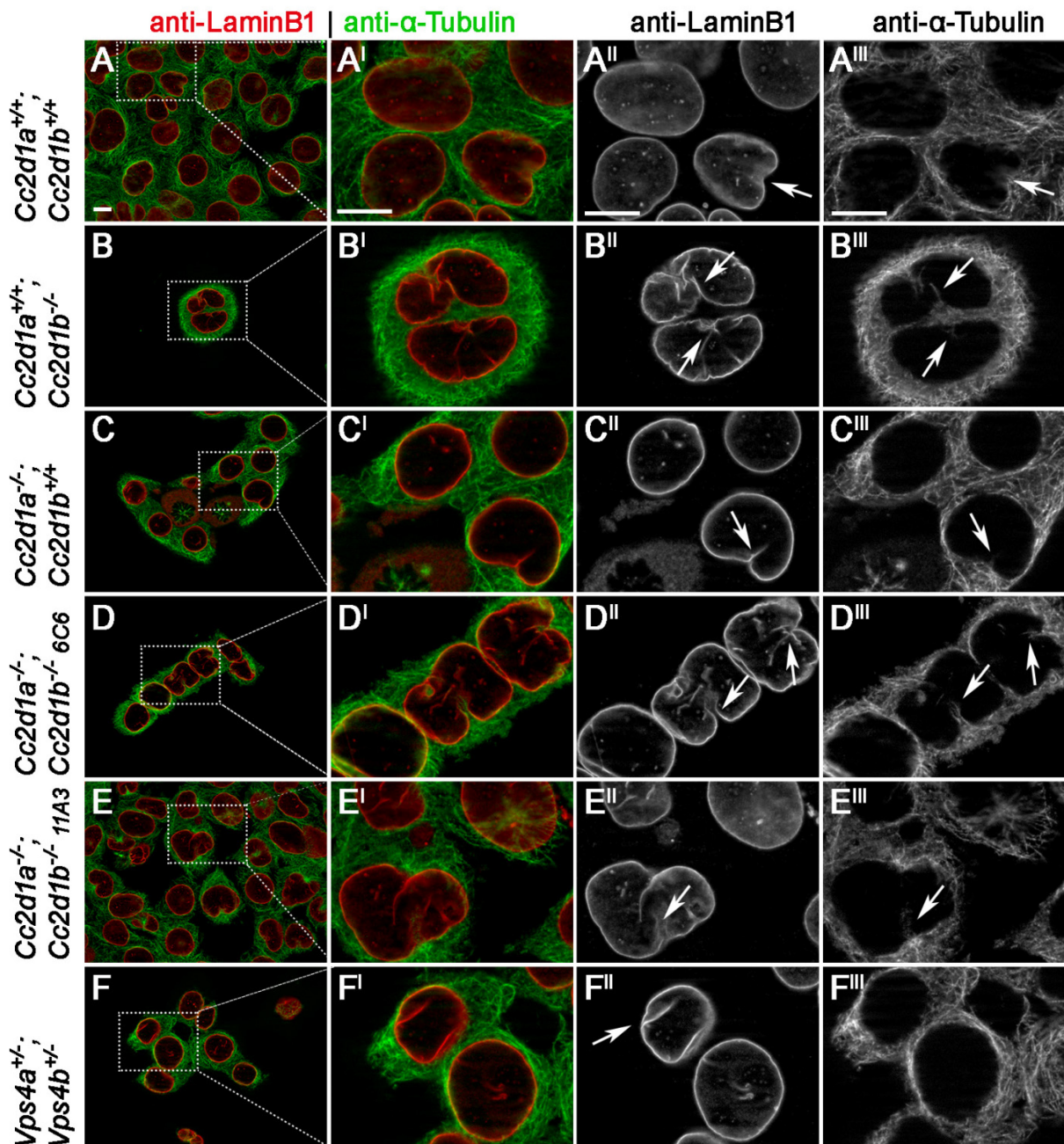
Zelllinie	Anteil der Zellen mit invaginierten Kernlamina		Mittelwert	Änderung zu <i>Cc2d1a</i> <sup>+/+</sup> ; <i>Cc2d1b</i> <sup>+/+</sup>
	Manuelle Analyse	„ILASTIK“ basierte Analyse		
<i>Cc2d1a</i> <sup>+/+</sup> ; <i>Cc2d1b</i> <sup>+/+</sup>	18%	17%	17,5%	-----
<i>Cc2d1a</i> <sup>+/+</sup> ; <i>Cc2d1b</i> <sup>-/-</sup>	42%	45%	43,5%	2,5 x ↑
<i>Cc2d1a</i> <sup>-/-</sup> ; <i>Cc2d1b</i> <sup>+/+</sup>	27%	25%	26,0%	1,5 x ↑
<i>Cc2d1a</i> <sup>-/-</sup> ; <i>Cc2d1b</i> <sup>-/-</sup> 6C6	40%	52%	46,0%	2,6 x ↑
<i>Cc2d1a</i> <sup>-/-</sup> ; <i>Cc2d1b</i> <sup>-/-</sup> 11A3	40%	30%	35,0%	2,0 x ↑
<i>Vps4a</i> <sup>+/-</sup> ; <i>Vps4b</i> <sup>+/-</sup>	32%	30%	31,0%	1,7 x ↑

Die Ergebnisse der statistischen Analyse korrelieren mit der immunzytochemischen Charakterisierung der Kernlamina. Basierend auf beiden Methoden konnte gezeigt werden, dass der Verlust von CC2D1B einen negativen Einfluss auf die Integrität der Zellkerne hat. Mittels quantitativer Analyse von *Cc2d1b*-defizienten Zellen konnte ein erhöhter Anteil an defekten Zellkernen identifiziert werden. Dieser Effekt wurde mit einer vergleichbaren Penetranz ebenfalls in beiden doppel-defizienten Linien nachgewiesen. Eine vergleichbare Frequenz, mit der die defekten Zellkerne in *Cc2d1b*-defizienten und DKO-MEFs auftreten, lässt die redundante Funktion der CC2D1-Proteine in diesem Prozess als eine mögliche Ursache für die relativ niedrige Penetranz ausschließen. Dies wird durch die Quantifizierung des Phänotyps in *Cc2d1a*-defizienten Zellen bestätigt. Der in *Cc2d1a*-KO Zellen identifizierte Effekt deutet darauf hin, dass sowohl CC2D1A als auch CC2D1B höchstwahrscheinlich den Prozess der Wiederverschließung der Kernhülle beeinflussen. Dennoch, ausgehend von den statistischen Daten, scheint die Rolle von CC2D1B in diesem Prozess dominanter zu sein als die Funktion von CC2D1A.

Die Ergebnisse, die auf der Analyse von *Vps4a*; *Vps4b*-heterozygoten MEFs basieren, zeigen einen Zusammenhang zwischen der Integrität der Kernlamina und der Funktion der ESCRT-Maschinerie. Eine Reduktion der VPS4-Dosis führt zu einem Phänotyp, der der *Cc2d1a*-defizienten Situation ähnelt.

Die Gruppe von Martin-Serrano hat den *Cc2d1b*-Knockdown-assoziierten Phänotyp durch einen fehlgeschlagenen rechtzeitigen Abbau der Spindelapparat-Mikrotubuli erklärt (Ventimiglia et al., 2018). Ihre Begründung besteht darin, dass der CC2D1B-Verlust in einer verfrühten Akkumulation der ESCRT-Proteine an der sich wiederverschließenden Kernhülle resultiert. Als Folge wird der Spastin-vermittelte Abbau der Spindelapparat-Mikrotubuli gestört. Dabei bleiben nach der Zellteilung die Zellkerne zurück, die an Invaginationen persistente Mikrotubuli zeigen (Ventimiglia et al., 2018). Um zu prüfen, ob diese Hypothese auch auf die

stabile *Cc2d1b*-defiziente Zelllinie übertragbar ist, wurden diese Zellen mittels des anti- $\alpha$ -Tubulin-Antikörpers in Bezug auf Mikrotubuli untersucht, die sich entweder an den Invaginationsstellen detektieren lassen oder den gesamten Zellkern durchdringen (Abb. 2.19).



**Abbildung 2.19: Untersuchung persistenter Mikrotubuli in wildtypischen, *Cc2d1b*-, *Cc2d1a*-defizienten und DKO-MEFs sowie in *Vps4a*; *Vps4b*-heterozygoten Zellen.** Die untersuchten Linien beinhalten Zellen mit invaginierten Zellkernen (A<sup>I</sup>-F<sup>II</sup>), wobei in den *Cc2d1b*- und den beiden doppel-defizienten MEFs ein im Vergleich zu den anderen Linien stärker ausgeprägter Phänotyp nachweisbar ist. An den Stellen der Invagination der Kernlamina sind Mikrotubuli identifizierbar, die sich durch die Färbung mit anti- $\alpha$ -Tubulin detektieren lassen (A<sup>III</sup>-E<sup>III</sup>). In *Vps4a*; *Vps4b*-heterozygoten Zellen sind an den Einkerbungsstellen keine Mikrotubuli erkennbar. Pfeile deuten auf die Invagination der Kernhülle sowie auf die an den Invaginationsstellen erkennbaren Mikrotubuli hin. (A-F) Übersichtsaufnahmen von A<sup>I</sup>-F<sup>I</sup>. Die Maßstabbalken entsprechen 10  $\mu$ m.

Basierend auf dieser Analyse konnte bestätigt werden, dass die invaginierten Stellen mit Mikrotubuli assoziiert waren (Abb. 2.19 A<sup>III</sup>-E<sup>III</sup>). Dennoch war dieser Phänotyp zwischen den einzelnen Genotypen unterschiedlich stark ausgeprägt. Im Fall der *Cc2d1b*- sowie der doppeldefizienten Linien, die bereits den stärksten nukleären Phänotyp gezeigt haben, konnten die Mikrotubuli an den Invaginationsstellen eindeutig nachgewiesen werden (Abb. 2.19 B<sup>III</sup>; D<sup>III</sup>-E<sup>III</sup>). Diese Mikrotubuli waren in wildtypischen (Abb. 2.19 A<sup>III</sup>) sowie in *Cc2d1a*-defizienten Zellen qualitativ weniger stark ausgeprägt (Abb. 2.19 C<sup>III</sup>).

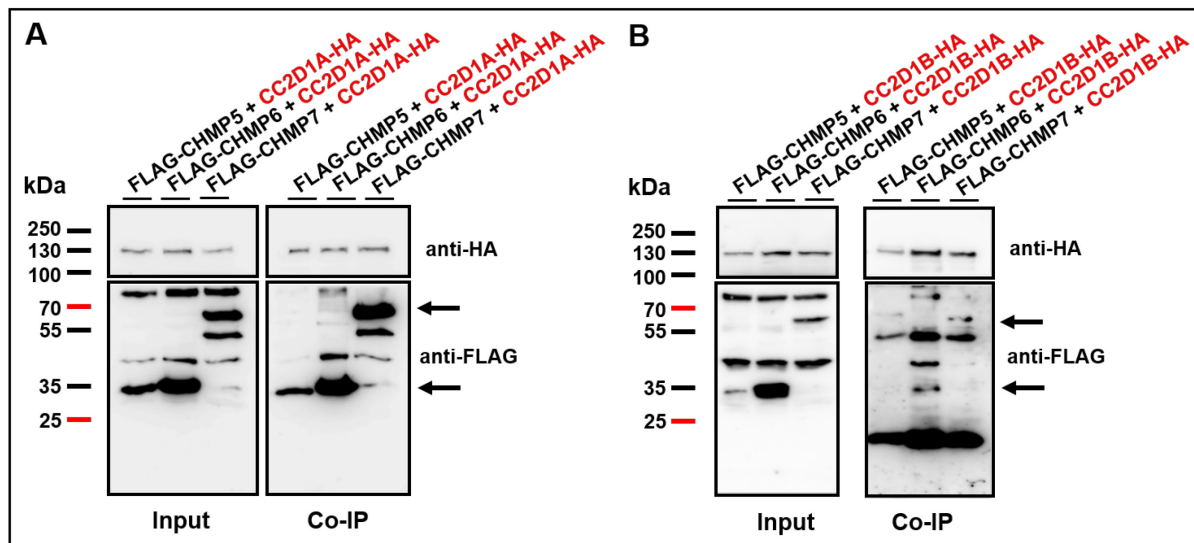
Die Analyse der *Vps4a*; *Vps4b*-heterozygoten Zellen lieferte keine erkennbaren Mikrotubuli an den Einkerbungsstellen (Abb. 2.19 F<sup>III</sup>). Da die VPS4-Funktion erst in der finalen Phase der Wiederverschließung der Öffnungen in der Kernmembran und dementsprechend erst nach dem vollständigen Abbau von Mikrotubuli benötigt wird, stimmt dieses Ergebnis mit den Erwartungen überein. Außerdem konnten im Unterschied zu der Arbeit der Gruppe von Martin-Serrano in keinem der Fälle Mikrotubuli nachgewiesen werden, die durch den kompletten Zellkern durchgingen.

Der molekulare Mechanismus, der dem beobachteten Phänotyp zugrunde liegt, wird durch die Interaktion zwischen CC2D1B und CHMP7 erklärt. Dabei scheint diese Interaktion für die zeitliche Koordination von CHMP7 von Bedeutung zu sein (Ventimiglia et al., 2018). Ausgehend von dieser Annahme würde eine im Vergleich zu CC2D1B schwächere oder fehlende Interaktion zwischen CC2D1A und CHMP7 den möglichen Grund für einen milderen, *Cc2d1a*<sup>-/-</sup>-assoziierten Effekt auf die Kernintegrität im Vergleich zum CC2D1B-Ausfall erklären. Dennoch wurde die Wechselwirkung beider CC2D1-Proteine mit CHMP7 bereits mittels Pulldown- (Drusenheimer - AG Klein; unveröffentlicht) und FRET- (Migdal, 2016; Dissertation) Experimenten nachgewiesen. Auch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Co-IP diente dem Nachweis der bestehenden Wechselwirkung zwischen CC2D1-Proteinen und CHMP7 (Abb. 2.20). Zu diesem Zweck wurden HA-markierte CC2D1-Proteine transient in MEFs exprimiert und auf die Fähigkeit, FLAG-CHMP7 zu präzipitieren, charakterisiert. Neben FLAG-CHMP7 wurde eine mögliche Interaktion mit einem weiteren akzessorischen Protein FLAG-CHMP5 und dem Initiator der CHMP4B-Polymerisation FLAG-CHMP6 untersucht.

Wie aus der Abbildung 2.20 A hervorgeht, führte die Inkubation der Proben mit CC2D1A-HA zu einer Co-Präzipitation aller untersuchten CHMPs. Die präzipitierten FLAG-CHMP5 und FLAG-CHMP6 konnten anhand ihrer Größe von ca. 35 kDa nachgewiesen werden, während FLAG-CHMP7 sein spezifisches Signal auf der Höhe von ca. 70 kDa zeigte (Abb. 2.20 A). Sowohl FLAG-CHMP7 als auch FLAG-CHMP6 konnten nach der Präzipitation mit CC2D1B-HA ebenfalls identifiziert werden (Abb. 2.20 B). Im Gegensatz dazu war eine Interaktion zwischen CC2D1B-HA und FLAG-CHMP5 nicht nachweisbar (Abb. 2.20 B). Zu beachten ist



jedoch, dass FLAG-CHMP5 bereits im Input im Vergleich zu anderen CHMP-Proteinen in einer geringeren Konzentration vorlag.



**Abbildung 2.20: Western Blot zur Analyse der Co-IP, die der Untersuchung einer möglichen Interaktion zwischen CC2D1A-HA / CC2D1B-HA und FLAG-CHMP5, FLAG-CHMP6 sowie FLAG-CHMP7 diente.** (A) Analyse einer möglichen Interaktion zwischen CC2D1A-HA und FLAG-CHMP5, FLAG-CHMP6 sowie FLAG-CHMP7. Die Inputprobe diente dem Nachweis einer erfolgreichen Expression aller potentiellen Interaktionspartner. CC2D1A-HA ist an der Größe von ca. 130 kDa in allen Proben erkennbar. FLAG-CHMP5 und FLAG-CHMP6 sind auf der Höhe von ca. 35 kDa nachweisbar, während FLAG-CHMP7 ein Signal bei ca. 70 kDa zeigt. Die Präzipitation von CC2D1A-HA mit dem anti-HA-Antikörper resultiert in der gleichzeitigen Co-Präzipitation von allen analysierten CHMP-Proteinen, die anhand ihrer Inputgröße identifizierbar sind. (B) Analyse einer möglichen Interaktion zwischen CC2D1B-HA und FLAG-CHMP5, FLAG-CHMP6 sowie FLAG-CHMP7. Im Gegensatz zu CC2D1A-HA, führt die Inkubation von CC2D1B-HA mit dem anti-HA-Antikörper zur Präzipitation von FLAG-CHMP6 und FLAG-CHMP7, wobei FLAG-CHMP5 in der Co-IP nicht nachweisbar ist. Die Expression aller potentiellen Interaktionspartner ist in allen Input-Proben erkennbar. Die Pfeile deuten auf die entsprechenden CHMP-Proteine hin.

Wie die Co-IP-Analyse gezeigt hat, ist CC2D1A-HA ebenfalls in der Lage, mit CHMP7 zu interagieren. Da der CC2D1A-Verlust sich jedoch nicht in einem gravierenden Anstieg an deformierten Zellkernen äußerte, scheint die Interaktion zwischen CC2D1A und CHMP7 für den Prozess der Reassemblierung der Kernhülle nicht von essentieller Bedeutung zu sein. Im Gegensatz dazu resultiert der CC2D1B-Ausfall in einer deutlich höheren Frequenz an defekten Zellkernen (Abb. 2.18). Dies deutet darauf hin, dass die Rolle von CC2D1B in der Aufrechterhaltung der nukleären Integrität zentraler ist als die Funktion von CC2D1A.

Es wurde beschrieben, dass CC2D1B die subzelluläre Lokalisation von CHMP7 koordiniert, indem CC2D1B an den C-Terminus von CHMP7 bindet und es an die Öffnungen in der Kernhülle bringt (Ventimiglia et al., 2018). Der C-Terminus wird ebenfalls für die Interaktion mit weiteren ESCRT-Proteinen benötigt, während der N-Terminus von CHMP7 für die Bindung an

---

das ER erforderlich ist. In diesem Zusammenhang stellte sich die Frage, ob der Verlust der CC2D1-Proteine sich auf die subzelluläre Lokalisation von CHMP7 auswirkt. Eine Änderung in der CHMP7-Verteilung wäre vor allem in *Cc2d1b*- sowie in doppel-defizienten MEFs zu erwarten. Um diese Vermutung zu überprüfen, erfolgte eine immunzytochemische Analyse der Zellen. Zu diesem Zweck wurden alle zu untersuchenden Linien mit einem anti-CHMP7-Antikörper inkubiert, um das endogene Protein nachweisen zu können (Abb. 2.21).

Die Untersuchung der subzellulären CHMP7-Lokalisation hat zwischen den Genotypen deutliche Unterschiede ergeben, die mit dem Ergebnis der Kernlamina-Charakterisierung korrelieren (Abb. 2.21). Das endogene CHMP7 war in *Cc2d1a*<sup>+/+</sup>; *Cc2d1b*<sup>+/+</sup> Zellen hauptsächlich in vesikulärer Form im Zytoplasma verteilt, wobei eine schwache Färbung auch im Zellkern festgestellt wurde (Abb. 2.21 A-A<sup>II</sup>). Eine kleine Fraktion des Proteins konnte ebenfalls an Strukturen nachgewiesen werden, die anhand ihrer charakteristischen tubulären Form dem ER zugeordnet wurden.

Im Unterschied dazu konnte sowohl bei der *Cc2d1a*<sup>+/+</sup>; *Cc2d1b*<sup>-/-</sup> Linie (Abb. 2.21 B-B<sup>II</sup>) als auch bei *Cc2d1a*<sup>-/-</sup>; *Cc2d1b*<sup>-/-</sup> MEFs (Abb. 2.21 D-E<sup>II</sup>) eine vom Wildtyp abweichende Lokalisation von CHMP7 nachgewiesen werden. In diesen Zellen wurde eine Verschiebung in der Verteilung der vesikulären und der ER-gebundenen Fraktionen von CHMP7 beobachtet. Dort zeigte CHMP7 eine verstärkte Lokalisation am ER, die im Vergleich zur vesikulär verteilten Fraktion dominanter vertreten und hauptsächlich in der Zellkern-Peripherie identifizierbar war.

Im Gegensatz dazu konnte in *Cc2d1a*-defizienten Zellen nur eine schwache Umverteilung in der Lokalisation von CHMP7 detektiert werden (Abb. 2.21 C-C<sup>II</sup>). Die anti-CHMP7-Färbung zeigte das Protein in diesen Zellen hauptsächlich mit vesikulären Strukturen assoziiert, während die ER-assoziierte Fraktion etwas stärker vertreten war als in der wildtypischen Situation.

Anders als bei *Cc2d1*-defizienten Zellen, waren bei *Vps4a*; *Vps4b*-heterozygoten Zellen (Abb. 2.21 F-F<sup>II</sup>) keine Auffälligkeiten bezüglich der Lokalisation von CHMP7 detektierbar, wobei seine intrazelluläre Verteilung der wildtypischen Lokalisation entsprach.

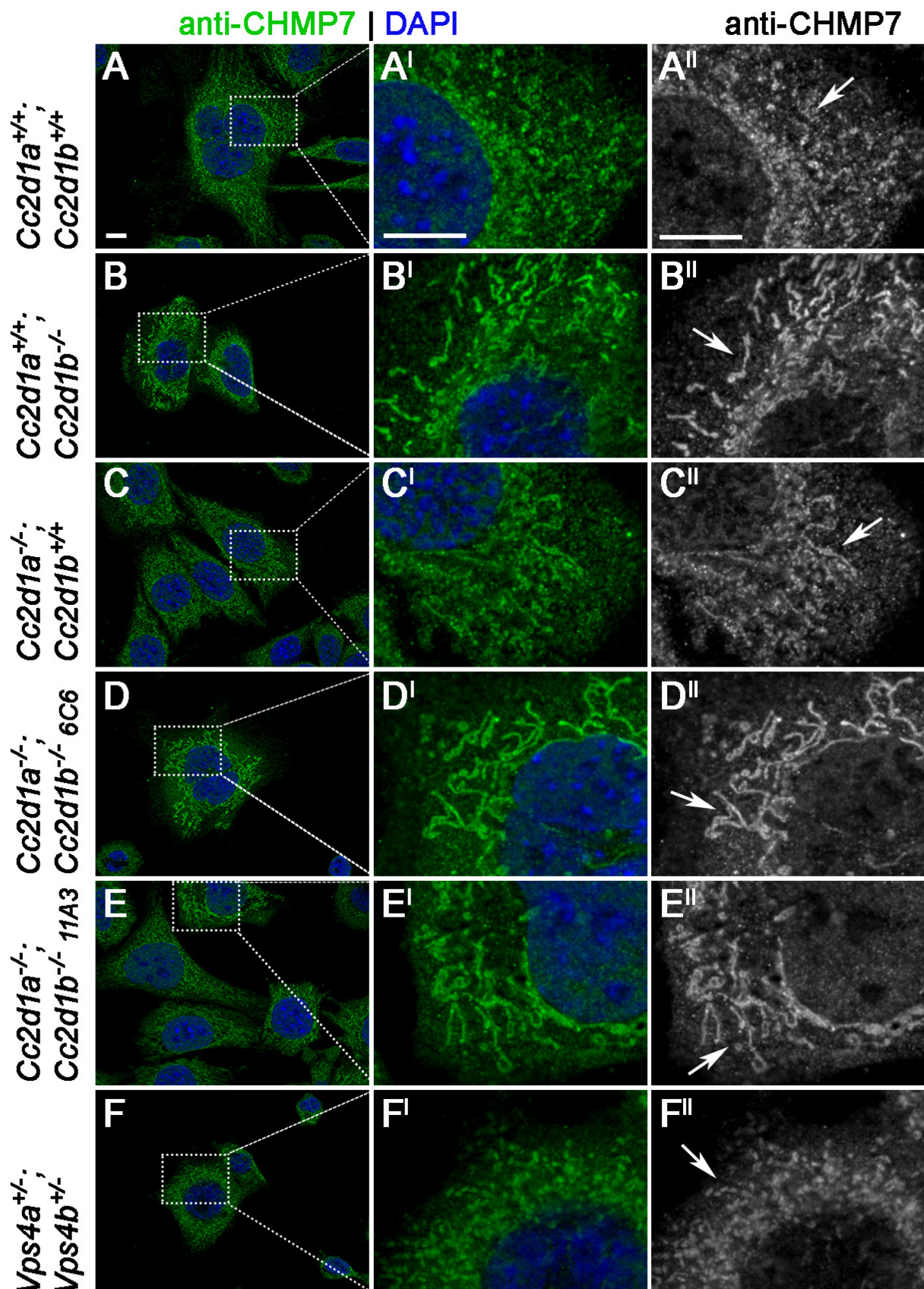


Abbildung 2.21: Untersuchung der subzellulären Lokalisation von CHMP7 in wildtypischen, *Cc2d1b*-, *Cc2d1a*-defizienten und DKO-MEFs sowie in *Vps4a*; *Vps4b*-heterozygoten Zellen. In den wildtypischen Zellen ist endogenes CHMP7 hauptsächlich vesikulär im Zytoplasma verteilt, wobei eine schwache Färbung auch im Zellkern erkennbar ist (A-A''). Neben der vesikulären Verteilung ist das Protein am ER detektierbar. Im Gegensatz dazu zeigt CHMP7 sowohl in *Cc2d1b*-defizienten (B-B'') als auch in beiden doppel-defizienten MEF-Linien (D-E'')



---

eine verstärkte Lokalisation am ER, die über die vesikuläre Lokalisation dominiert und zum größten Teil in der Zellkern-Peripherie identifizierbar ist. Die Lokalisation am ER lässt sich durch tubuläre CHMP7-positive Strukturen erkennen. In *Cc2d1a*-defizienten MEFs ist diese Relokalisation nur schwach erkennbar (**C-C''**), während die Lokalisation von CHMP7 in *Vps4a*; *Vps4b*-heterozygoten Zellen (**F-F''**) der wildtypischen Situation ähnlich ist. Die Pfeile deuten auf CHMP7 hin. (**A-F**) Übersichtsaufnahmen von A1-F1. Die Maßstab balken entsprechen 10 µm.

Mit Hilfe der durchgeführten Experimente konnte der Phänotyp, der für die *Cc2d1b*-siRNA behandelten Zellen gezeigt wurde (Ventimiglia et al., 2018), in unbehandelten, stabilen Knockout-Zelllinien beobachtet und bestätigt werden. Der Verlust von CC2D1B in diesen Zellen äußerte sich in einem erhöhten Anteil an Zellkernen mit Invaginationen und somit mit morphologischen Defekten. Aufgrund dessen, dass die getesteten *Cc2d1a*<sup>-/-</sup>; *Cc2d1b*<sup>-/-</sup> MEFs ebenfalls denselben Phänotyp zeigten, die *Cc2d1a*-Defizienz jedoch weniger gravierende Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp hervorrief, beruht dieser Effekt höchstwahrscheinlich auf der CC2D1B-Funktion. Ausgehend von diesen experimentellen Daten spielt CC2D1A dabei höchstwahrscheinlich eine untergeordnete Rolle. Aufgrund dessen, dass der individuelle Verlust der CC2D1-Proteine untereinander einen unterschiedlich starken Effekt auslöst und die DKO-Situation der *Cc2d1b*-Defizienz entspricht, scheinen CC2D1-Proteine in diesem Prozess nicht redundant zu wirken.

Die Interaktion zwischen CC2D1B und CHMP7, die mittels der Co-IP-Analyse bestätigt werden konnte, scheint für die richtige CHMP7-Lokalisation von Bedeutung zu sein. Der CC2D1B-Verlust resultiert in einer Änderung in der subzellulären Verteilung von CHMP7, wobei es vermehrt an ER-ähnlichen Strukturen und somit in Zellkernnähe lokalisiert. Die subzelluläre Lokalisation von CHMP7 unter dem Verlust beider CC2D1-Proteine entspricht seiner Verteilung in *Cc2d1b*-defizienten Zellen.

## 2.2 Analyse der biochemischen Grundlage der Interaktion zwischen CC2D1-Proteinen und CHMP4B

Experimente in *D. melanogaster* haben gezeigt, dass Lgd für die volle Shrub-Funktion und den damit verbundenen fehlerfreien Ablauf des endosomalen Transportweges benötigt wird (Schneider et al., 2013). Eine Hypothese besagt, dass Lgd als eine Art Chaperon für Shrub fungieren könnte, das seine Polymerisation unterbindet und das Protein somit in seiner monomeren Form behält. Diese Hypothese wird durch *in vitro* Experimente unterstützt, die auf einer Kristallstruktur, bestehend aus der dritten DM14-Domäne von Lgd und einem Shrub-Fragment, basiert (McMillan et al., 2017). Mittels dieser Kristallstruktur konnte gezeigt werden, dass der positiv geladene Bereich der dritten DM14-Domäne innerhalb von Lgd mit negativ geladenen Aminosäuren von Shrub interagiert, die gleichzeitig für die Polymerisation von Shrub benötigt werden (McMillan et al., 2017). Es wird angenommen, dass die Bindung von Lgd an diese Stelle zur Unterbindung der Shrub-Polymerisation führt.

Die Interaktion zwischen CC2D1A/B und CHMP4B konnte ebenfalls durch mehrere unabhängige Studien bestätigt werden (Martinelli et al., 2012; Usami et al., 2012; Drusenheimer et al., 2015; Deshar et al., 2016; Ventimiglia et al., 2018). Doch aufgrund der fehlenden Strukturinformation über beide Interaktionspartner bleibt der genau Mechanismus dieser Wechselwirkung bzw. die Rolle von Säuger-CC2D1-Proteinen bei der Funktion von CHMP4B weitgehend unbekannt. *In vitro* Experimente haben gezeigt, dass CC2D1A ein negativer Regulator der CHMP4B-Polymerisation sein könnte (Martinelli et al., 2012). Diese Annahme basiert, wie im Fall von Lgd und Shrub, auf der Kristallisation von CHMP4B-Fragmenten. Mittels diesen Studien konnte gezeigt werden, dass der Bereich von CHMP4B, der für die Polymerisation gebraucht wird, von CC2D1A gebunden wird, wobei CHMP4B in seiner monomeren Form stabilisiert wird. Die polymere CHMP4B-Fraktion kann hingegen durch CC2D1A nicht gebunden werden (Martinelli et al., 2012).

Weitere Studien haben ergeben, dass Snf7, das Hefe-Ortholog von CHMP4B, seine Konformation unter bestimmten Bedingungen ändern kann. Während in Lösung eine Mischpopulation vorliegt, zeigt die membrangebundene Fraktion eine offene Konformation (Henne et al., 2012; Tang et al., 2015). In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, ob das Säugerprotein ebenfalls zwischen der monomeren zytoplasmatischen und polymeren membrangebundenen Form eine konformationelle Wandlung durchläuft. Wenn dies der Fall ist, leitet sich davon eine weitere Frage ab: Können CC2D1-Proteine die Konformation von CHMP4B durch ihre Interaktion aktiv beeinflussen?

Um diese Fragen zu beantworten, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Experiment durchgeführt, das auf den Grundlagen der Konformationsstudien von Snf7 basiert (Henne et al., 2012). Die Konzeption dieses Experiments liegt im Austausch von zwei Aminosäuren durch Cysteine, die in CHMP4B auf natürliche Weise nicht vorkommen. Die gewählte Position der beiden einzuführenden Cysteine ist dabei von zentraler Bedeutung. Sie müssen so positioniert

werden, dass im Falle einer geschlossenen Konformation die beiden Aminosäuren in unmittelbare Nähe kommen, um unter oxidierenden Bedingungen Disulfidbrücken bilden zu können. Dieser Zustand kann durch die externe Zugabe von Kupfer/ Phenanthrolin-Lösung zu der Probe fixiert werden. Mittels eines nicht-reduzierenden Gels wird die Unterscheidung der geschlossenen Konformation von der offenen Form anhand des veränderten Laufverhaltens ermöglicht. Die Rückschlüsse auf einen möglichen CC2D1-Einfluss auf die CHMP4B-Konformation können anhand des eventuell veränderten Verhältnisses zwischen offener und geschlossener Konformation gezogen werden.

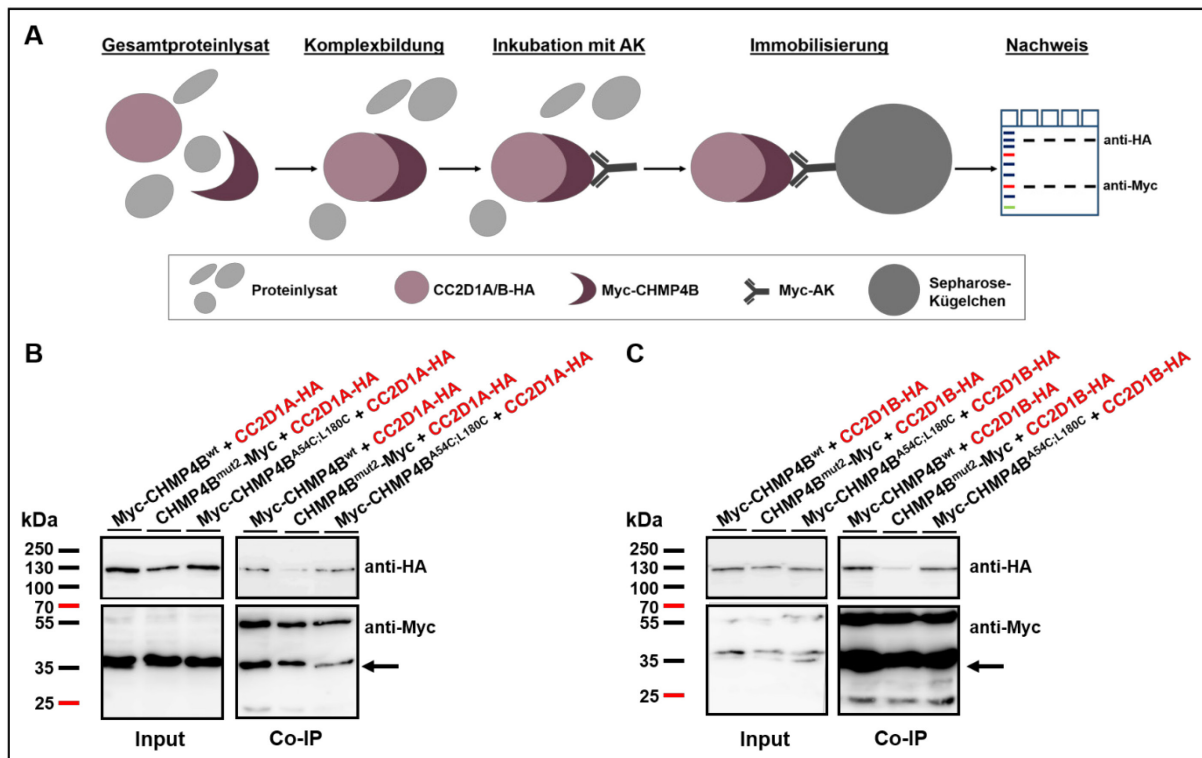
Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Cystein-vermittelte Quervernetzung von CHMP4B basierte auf dem Konstrukt CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup>, dessen Generierung ein Bestandteil einer vorherigen Masterarbeit war (Schnorrenberg, 2013; Masterarbeit). Die Wahl der geeigneten Positionen, an denen der Austausch zu Cysteinen stattfinden sollte, basierte auf dem Snf7<sup>redox</sup>-Konstrukt (Henne et al., 2012). Der Vergleich von Snf7 aus Hefe und humanem CHMP4B auf der Aminosäuren-Ebene erlaubte die Ermittlung der Positionen innerhalb von CHMP4B, die dem Snf7<sup>redox</sup> entsprechen.

### **2.2.1 Charakterisierung von CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup> in Bezug auf seine Funktionalität und Bindungsfähigkeit an CC2D1-Proteine**

Eine wichtige Voraussetzung zur Durchführung der Konformationsstudien von CHMP4B basierend auf einem modifizierten Konstrukt ist die Fähigkeit des Proteins, weiterhin an seine Interaktionspartner, CC2D1A und CC2D1B, binden zu können. Um nachweisen zu können, dass das Einfügen von zwei Cysteinen keine negative Auswirkung auf die Bindungsfähigkeit von CHMP4B hat, wurde in Zusammenarbeit mit Michelle Mohr eine Co-IP-Analyse durchgeführt (Mohr, 2017; Bachelorarbeit). Hierfür wurde an die kodierende Sequenz von CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup> mittels PCR eine N-terminale Myc-Markierung hinzugefügt, wobei das generierte Konstrukt in den pcDNA-Vektor kloniert wurde. Anschließend wurde die zu untersuchende CHMP4B-Variante zusammen mit CC2D1-HA-Konstrukten in MEFs transient exprimiert (Abb. 2.22 A).

Um Bindungsartefakte ausschließen zu können, wurden bei dieser Analyse zwei Kontrollproben eingesetzt. Wildtypisches CHMP4B fungierte dabei als Positivkontrolle, da seine Bindung an CC2D1-Proteine bereits durch mehrere Studien bestätigt wurde (Martinelli et al., 2012; Usami et al., 2012; Drusenheimer et al., 2015; Deshar et al., 2016; Ventimiglia et al., 2018). Als Negativkontrolle diente hingegen eine CHMP4B-Variante, die als CHMP4B<sup>mut2</sup> bezeichnet wird. Bei dieser Variante handelt es sich um ein modifiziertes CHMP4B, bei dem die sauren Glutaminsäuren, die für die Bindung an CC2D1A essentiell sind, an Positionen 90, 94 und 97 gezielt durch basische Arginine ausgetauscht wurden (Martinelli et al., 2012).

Da alle zu testenden CHMP4B-Varianten über einen Myc-Tag verfügten, erfolgte ihre gezielte Präzipitation aus dem Gesamtproteinlysat über einen anti-Myc-Antikörper. Der Nachweis der in dem Präzipitat enthaltenen Interaktionspartner erfolgte über eine anti-HA-Färbung aufgrund der C-terminalen HA-Markierung der CC2D1-Proteine (Abb. 2.22 A). Das Ergebnis dieser Analyse kann der Abbildung 2.22 B-C entnommen werden.

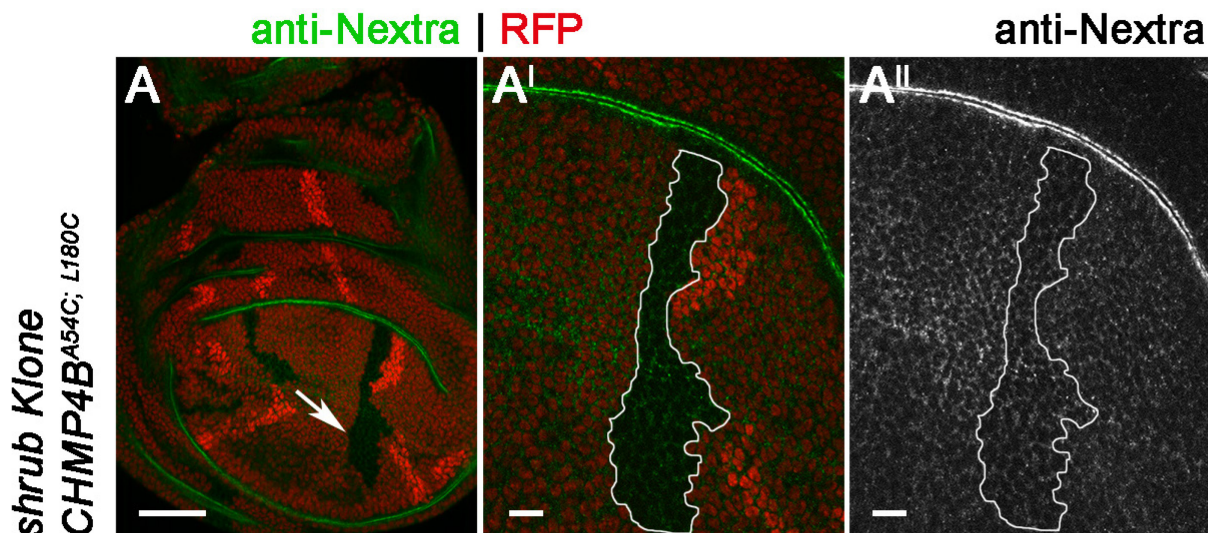


**Abbildung 2.22: Western Blot zur Analyse der Co-IP, die der Untersuchung der Bindungsfähigkeit von Myc-CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup> an CC2D1A-HA und CC2D1B-HA diente.** (A) Schematische Darstellung der durchgeführten Co-IP. Das Gesamtproteinlysat wird mit dem anti-Myc-Antikörper versetzt, um eine gezielte Präzipitation der Myc-markierten CHMP4B-Proteine zu gewährleisten. Findet die Interaktion zwischen den jeweiligen CHMP4B-Varianten und den HA-markierten CC2D1-Proteinen statt, wird ein Komplex bestehend aus den interagierenden Proteinen und dem anti-Myc-Antikörper gebildet. Die anschließende Inkubation mit Sepharose-Kügelchen dient der Immobilisierung des Komplexes, der mittels eines Western Blots unter der Verwendung des anti-HA- sowie des anti-Myc-Antikörpers nachgewiesen werden kann. (B) Analyse der Interaktion zwischen Myc-CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup> und CC2D1A-HA. In jeder Inputprobe sind zwei Proteinbanden erkennbar, wobei die 130 kDa-Bande der Größe von CC2D1A-HA entspricht, während die Banden bei ca. 37 kDa den CHMP4B-Varianten zuzuordnen sind. Die Inkubation mit dem anti-Myc-Antikörper resultiert in der Präzipitation aller CHMP4B-Proteine. Die gleichzeitige Co-Präzipitation von CC2D1A-HA ist sowohl in der Probe mit Myc-CHMP4B<sup>wt</sup> als auch mit Myc-CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup> erkennbar. In der als Negativkontrolle dienenden CHMP4B<sup>mut2</sup>-Myc-Probe ist kein Signal für CC2D1A-HA nachweisbar. (C) Analyse der Interaktion zwischen Myc-CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup> und CC2D1B-HA. CC2D1B-HA lässt sich nach der Präzipitation mit Myc-CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup> anhand seiner Größe von ca. 130 kDa eindeutig detektieren. Das Ergebnis der Präzipitation ist mit der Positivkontrolle vergleichbar, die die Interaktion zwischen Myc-CHMP4B<sup>wt</sup> und CC2D1B-HA repräsentiert. Im Unterschied dazu führt die Inkubation mit CHMP4B<sup>mut2</sup>-Myc zu keiner effizienten Präzipitation von CC2D1B-HA. Die Pfeile deuten auf die entsprechenden CHMP4B-Proteine hin.

Wie aus der Abbildung 2.22 B-C hervorgeht, konnten alle potentielle Interaktionspartner in MEFs exprimiert und anhand ihrer typischen Größe (CC2D1A/B: ca. 130 kDa; alle CHMP4B-Varianten: ca. 37 kDa) in allen Inputproben spezifisch unter der Verwendung des anti-HA- oder anti-Myc-Antikörpers nachgewiesen werden. Die Inkubation der Proben mit dem anti-Myc-Antikörper resultierte in der Präzipitation aller zu analysierenden CHMP4B-Varianten (Abb. 2.22 B-C; mit Pfeil angedeutet). Erwartungsgemäß konnte die Bindungsfähigkeit der wildtypischen CHMP4B-Variante an seine Interaktionspartner bestätigt werden. Die Inkubation von Myc-CHMP4B<sup>wt</sup> resultierte in der gleichzeitigen Co-Präzipitation von CC2D1A-HA (Abb. 2.22 B) und CC2D1B-HA (Abb. 2.22 C). Ein vergleichbares Ergebnis lieferte die Präzipitation von Myc-CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup>. Das modifizierte Protein war ebenfalls in der Lage, trotz der eingefügten Cysteine, an CC2D1-Proteine zu binden und mit ihnen in einem zu dem Myc-CHMP4B<sup>wt</sup> vergleichbaren Komplex zu präzipitieren (Abb. 2.22 B-C). Im Gegensatz dazu zeigten beide Negativkontrollen keine effiziente Bindung von CHMP4B<sup>mut2</sup>-Myc an CC2D1A-HA und CC2D1B-HA (Abb. 2.22 B-C).

Mittels der Co-IP-Analyse konnte bestätigt werden, dass die Interaktion zwischen CHMP4B und CC2D1-Proteinen durch die Anwesenheit der Cysteine nicht beeinträchtigt wird. Dennoch schließt die bestehende Bindungsfähigkeit die Möglichkeit nicht aus, dass das Einfügen der Cysteine sich negativ auf die Funktionalität des Proteins auswirken könnte. Um diese Möglichkeit auszuschließen, erfolgte die Funktionsanalyse von CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup> in *D. melanogaster*. Hierfür wurde eine Kopie von *CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup>* unter der Kontrolle des endogenen *shrub*-Promoters ins Genom der Fliege integriert. Anschließend wurden *shrub*-mutante Klone induziert. Der Verlust von *Shrub* resultiert normalerweise in Zell-Letalität, wobei die verbleibenden Zellen eine Akkumulation Notch-positiver Vesikel aufweisen. Die Insertion von *CHMP4B<sup>wt</sup>* ins Genom von *D. melanogaster* kann diese Situation zum größten Teil retten (Bäumers – AG Klein; unveröffentlicht). Handelt es sich bei CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup> um ein funktionales Protein, ist zu erwarten, dass es in der Lage ist, den *shrub*-mutanten Phänotyp in einem zu CHMP4B<sup>wt</sup> vergleichbaren Ausmaß aufzuheben.

Wie der Abbildung 2.23 zu entnehmen ist, konnten innerhalb einer Flügelimaginalscheibe mehrere *shrub*-Klone identifiziert werden, die durch die Abwesenheit des RFP-Signals gekennzeichnet waren. Dabei war ein Klon dank seiner Größe besonders auffällig (Abb. 2.23 A; mit Pfeil angedeutet). Seine genaue Analyse ergab keine Unterschiede im Vergleich zum umliegenden wildtypischen Gewebe (Abb. 2.23 A<sup>I</sup>). Die Untersuchung des vesikulären Phänotyps resultierte in keiner Abweichung von der wildtypischen Situation. Die Notch-positiven Vesikel waren in ihrer Größe und Verteilung innerhalb des Klons vergleichbar mit den Vesikeln im umgebenden, *shrub*-positiven Gewebe (Abb. 2.23 A<sup>II</sup>). Somit konnte bestätigt werden, dass das Einfügen der Cysteine sich weder auf die Funktionalität noch auf die Bindungsfähigkeit von CHMP4B auswirkt.



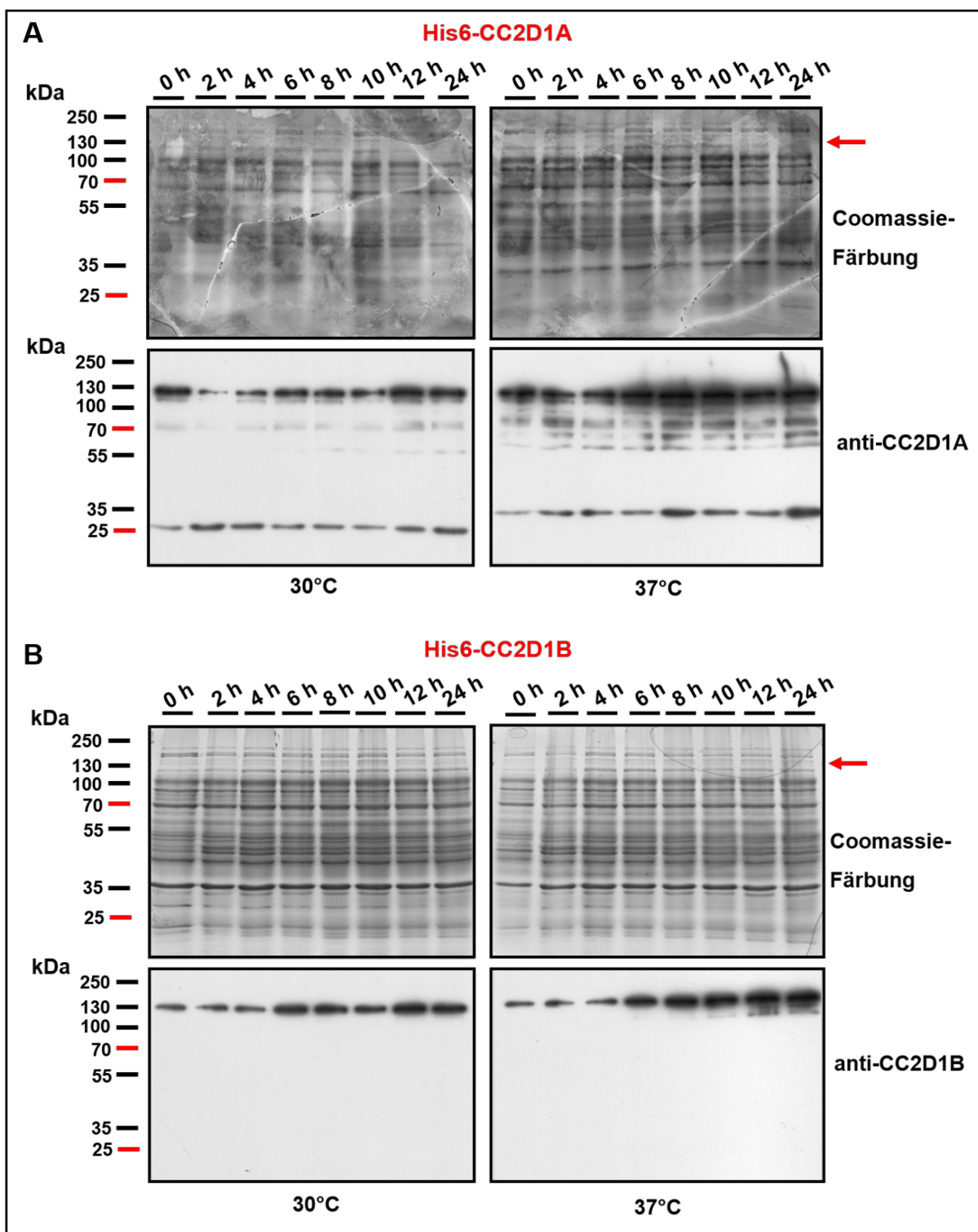
**Abbildung 2.23: Erzeugung der *shrub*-mutanten Klone zur Analyse der CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup>-Funktionalität in der Flügelimaginalscheibe von *D. melanogaster*.** (A) Übersicht einer Flügelimaginalscheibe, die eine Kopie von *shrubP-CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup>* enthält und mehrere induzierte *shrub*-Klone aufweist. (A') Der *shrub*-mutante Klon ist durch die Abwesenheit des RFP-Signals gekennzeichnet und mit einer weißen Linie zur Verdeutlichung umrandet. (A'') Die Verteilung sowie die Größe der Notch-positiven Vesikel innerhalb des Klons sind vergleichbar mit dem umliegenden, *shrub*-positiven Gewebe. Die Maßstab balken entsprechen in A 50  $\mu\text{m}$ , in A'-A'' 10  $\mu\text{m}$ . Pfeil deutet auf den analysierten Klon hin.

### 2.2.2 Etablierung der optimalen Expressionsbedingungen für CC2D1 und CHMP4B

Da sowohl die Funktionalität als auch die Bindungsfähigkeit von CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup> bestätigt werden konnte (Abb. 2.22 – Abb. 2.23), wurde diese Variante zur Konformationsanalyse der CHMP4B sowie zur Charakterisierung eines möglichen Einflusses der CC2D1-Proteine auf die CHMP4B-Konformation auf biochemischer Ebene eingesetzt. Da diese biochemische Analyse nur auf Basis von Proteinen möglich ist, die in einer hohen Konzentration mit einem hohen Reinheitsgrad vorliegen, war die Etablierung der geeigneten Expressionsbedingungen für alle an der Analyse beteiligten Proteine von zentraler Bedeutung und stellte die Grundvoraussetzung zur Durchführung der Konformationsanalyse dar.

Zu diesem Zweck wurden *E.coli*-Bakterien des Stamms BL21 mit dem Expressionsvektor pQE-30Xa, kodierend für die zu analysierenden Proteine, transformiert. Die Induktion der Expression basierte auf dem T5-lac-Promoter-System und erfolgte durch die Zugabe von IPTG zur Kultur beim Erreichen eines OD<sub>600</sub>-Wertes von 0.6. Die Expression der Proteine umfasste einen Zeitraum von 24 Stunden, wobei alle zwei Stunden Proben entnommen wurden. Dies diente der Ermittlung der optimalen Expressionsdauer. Um die optimale Temperatur bestimmen zu können, wurde die Expression bei 30°C und 37°C in zwei parallelen Ansätzen durchgeführt. Nach dem Inkubationsablauf wurde jede Probe auf einen OD<sub>600</sub>-Wert von 0.4 verdünnt, um eine Vergleichbarkeit der Proben zu gewährleisten. Anschließend wurden die Proben sowohl mittels der Coomassie-Blau-Färbung als auch mit Hilfe spezifischer Antikörperfärbungen via Western Blot analysiert (Abb. 2.24 – Abb. 2.25).





**Abbildung 2.24: Etablierung der Expressionsbedingungen für His6-CC2D1A und His6-CC2D1B, exprimiert im pQE-30Xa-Vektor in BL21. (A)** Die Expression von His6-CC2D1A wurde bei 30°C und 37°C über einen Zeitraum von 24 Stunden verfolgt. Weder die Coomassie-Blau-Färbung noch der Nachweis mit dem anti-CC2D1A-Antikörper erlauben eine Aussage über die optimalen Expressionsbedingungen. Es ist eine basale Expression von CC2D1A nachweisbar, die an dem Signal vor der Induktion erkennbar ist. Außerdem sind Abbauprodukte anhand von zahlreichen Proteinbanden detektierbar. **(B)** Die Analyse der His6-CC2D1B-Expression erfolgte unter analogen Bedingungen. Die Färbung mit der Coomassie-Blau-Lösung sowie die Inkubation mit dem anti-CC2D1B-Antikörper liefern keine eindeutige Information zu den optimalen Expressionsbedingungen. Die Probe zum Zeitpunkt „0“ zeigt basale Expression von His6-CC2D1B. Pfeile deuten auf die Bereiche, wo das Zielprotein zu erwarten wäre.

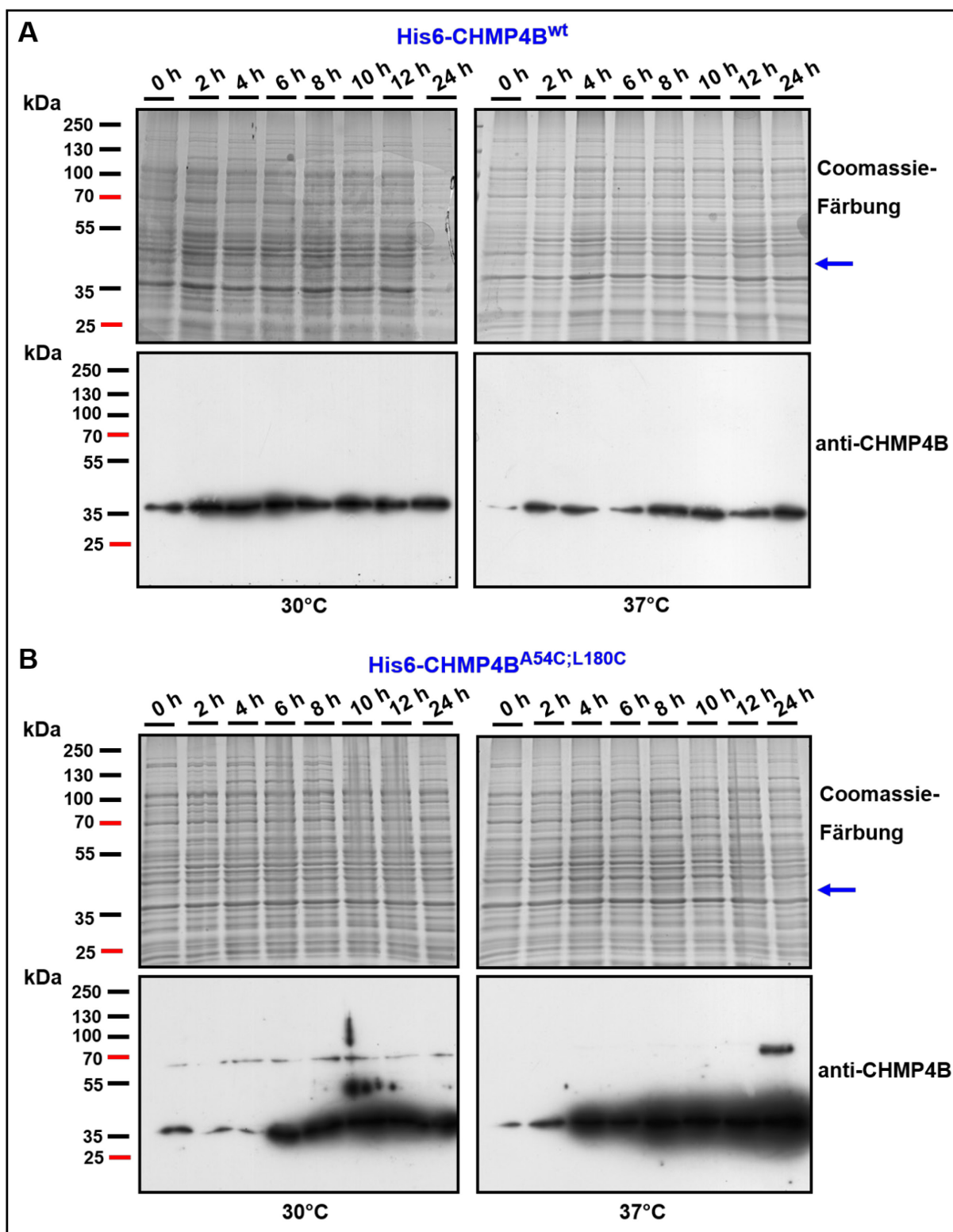


---

Die Analyse der His6-CC2D1A-Expression lieferte kein eindeutiges Ergebnis in Bezug auf die optimalen Expressionsbedingungen. Durch die Analyse der Proben zum Zeitpunkt „0“ konnte festgestellt werden, dass das Protein basal exprimiert wurde, da die His6-CC2D1A-Proteinbande mit einer Größe von 130 kDa bereits vor der Induktion detektierbar war. Die Intensität des Signals nahm während der weiteren Inkubationsstunden nicht zu, was auf eine mögliche toxische Wirkung des humanen Proteins auf die Bakterien hindeutete. Diese Beobachtung traf sowohl auf 30°C- als auch auf 37°C-Proben zu (Abb. 2.24 A). Da das Zielprotein weder bei 30°C noch bei 37°C durch die Färbung mit Coomassie-Blau-Lösung nachweisbar war, handelte es sich in diesem Fall um eine schwache Expression unter den gewählten Bedingungen. Nichtsdestotrotz konnte mit der Analyse gezeigt werden, dass höhere Temperaturen für die Expression von His6-CC2D1A weniger geeignet sind, da in diesen Proben deutlich mehr Abbauprodukte nachgewiesen werden konnten als im Vergleich zu den 30°C-Proben, in denen Abbauprodukte nicht so stark vertreten waren (Abb. 2.24 A).

Ein ähnliches Ergebnis wurde bei der Analyse von His6-CC2D1B beobachtet (Abb. 2.24 B). Analog zu His6-CC2D1A führte die Inkubation der Membran mit dem anti-CC2D1B-Antikörper zur Detektion eines Signals, das sowohl bei 30°C- als auch 37°C-Proben vor der Induktion auf der Höhe von 130 kDa identifizierbar war (Abb. 2.24 B). Im Unterschied zu His6-CC2D1A war bei der Expression von His6-CC2D1B unter beiden Temperaturbedingungen eine leichte Steigerung in der Intensitätsstärke der Proteinbanden sechs Stunden nach der Induktion detektierbar. Ähnlich wie beim His6-CC2D1A, wirkte sich die Expression bei höheren Temperaturen negativ auf die Proteinstabilität aus, da auch im Fall von His6-CC2D1B mehr Abbauprodukte bei der Expression bei 37°C zu erkennen waren als bei den 30°C-Proben. Jedoch war die Proteinfragmentierung nicht so stark ausgeprägt wie im Fall von His6-CC2D1A. Die Färbung mit der Coomassie-Blau-Lösung lieferte keinen eindeutigen Nachweis der His6-CC2D1B-Expression (Abb. 2.24 B) und deutete auch in diesem Fall auf eine schwache Expression des humanen Proteins hin.

Die Etablierung der optimalen Expressionsbedingungen für His6-CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup> wurde auf analoge Weise durchgeführt. Parallel dazu erfolgte eine Analyse der Expression von His6-CHMP4B<sup>wt</sup>. Das Ergebnis dieser Analyse ist in Abbildung 2.25 dargestellt.



**Abbildung 2.25: Etablierung der Expressionsbedingungen für His6-CHMP4B<sup>wt</sup> und His6-CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup>, exprimiert im pQE-30Xa-Vektor in BL21. (A)** Die Analyse der optimalen Expressionsbedingungen basierte auf den Proben, inkubiert bei 30°C oder 37°C innerhalb von 24 Stunden nach der Induktion. Während die CHMP4B<sup>wt</sup>-Expression sich mittels der Coomassie-Blau-Färbung nicht nachweisen lässt, zeigen beide Western Blots kein eindeutiges Ergebnis. Sowohl die 30°C- als auch die 37°C-Proben weisen ein Signal für CHMP4B<sup>wt</sup> bereits zum Zeitpunkt „0“ auf, das auf eine basale Expression zurückzuführen ist. **(B)** Die Analyse der His6-CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup>-Expression erfolgte unter analogen Bedingungen. Während die Coomassie-Blau-Färbung keine Rückschlüsse auf die Expression zulässt, zeigen die beiden Western Blots eine Steigerung in der Signalintensität ab vier bis sechs

---

Stunden nach der Induktion. In beiden Fällen ist eine basale Expression zum Zeitpunkt „0“ erkennbar. Pfeile deuten auf die Bereiche hin, wo das Zielprotein zu erwarten wäre.

Sowohl His6-CHMP4B<sup>wt</sup> (Abb. 2.25 A) als auch His6-CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup> (Abb. 2.25 B) wurden schon vor der Induktion in BL21-Bakterien exprimiert. Ihre Expression ist in der Abbildung 2.25 anhand der Proteinbande bei ca. 37 kDa zum Zeitpunkt „0“ erkennbar. Bei der Analyse der His6-CHMP4B<sup>wt</sup>-Expression bei 30°C fällt auf, dass die Proteinexpression in der angegebenen Inkubationszeit relativ gleichmäßig verlaufen ist und die einzelnen Proben untereinander keine gravierenden Unterschiede in ihrer Expression aufwiesen (Abb. 2.25 A). Eine Tendenz zur maximalen Expression konnte jedoch bei der Probe nachgewiesen werden, die sechs Stunden nach der Induktion der Expression entnommen wurde. Die Analyse der 37°C-Expression lieferte keine eindeutigen Ergebnisse. Das Problem mit Abbauprodukten, wie dies bei CC2D1-Proteinen der Fall war, trat beim CHMP4B<sup>wt</sup> nicht auf. Ähnlich wie bei der Expression von CC2D1-Proteinen, ermöglichte die Coomassie-Blau-Färbung keine eindeutige Zuordnung der His6-CHMP4B<sup>wt</sup>-Banden im Gel (Abb. 2.25 A).

Die Analyse der His6-CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup>-Expression resultierte in einem zu His6-CHMP4B<sup>wt</sup> vergleichbaren Ergebnis. Eine basale Expression vor der Zugabe von IPTG konnte auch in diesem Fall bestätigt werden (Abb. 2.25 B). Nichtsdestotrotz wurde unter beiden Testtemperaturen eine Steigerung in der Proteinexpression vier bis sechs Stunden nach der Induktion beobachtet, die jedoch auch in diesem Fall nicht ausreichend war, um mittels Coomassie-Blau-Färbung identifiziert zu werden (Abb. 2.25 B). Analog zu His6-CHMP4B<sup>wt</sup> hatte im Fall von His6-CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup> die untersuchte Temperatur keinen Einfluss auf die Stabilität des Proteins, da keine Abbauprodukte nachweisbar waren.

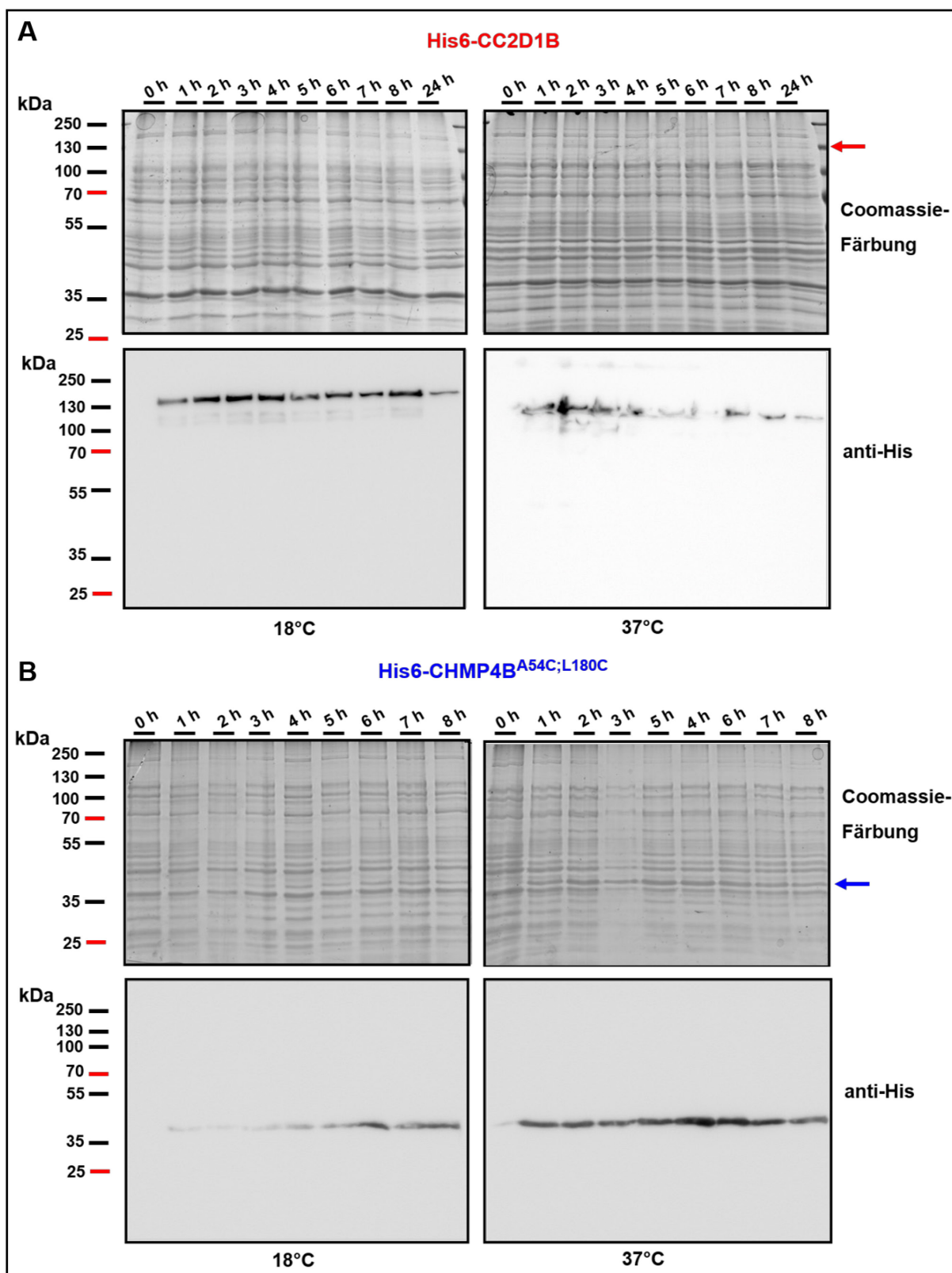
Interessanterweise zeigte His6-CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup>, unabhängig von der Testtemperatur, zusätzlich zu der 37-kDa-Bande ein Signal bei 70 kDa (Abb. 2.25 B). Diese Bande entspricht der Größe eines Dimers. Da es sich in dem Fall um ein Cystein-haltiges Protein handelt, könnte eine mögliche Erklärung dafür in der Ausbildung von intermolekularen Disulfidbrücken liegen. Eine nicht effiziente Behandlung mit DTT im Probenpuffer könnte für den Erhalt dieser Verbindung verantwortlich sein.

Die Analyse zur Etablierung der optimalen Expressionsbedingungen lieferte kein geeignetes Ergebnis, um die Zielproteine in ausreichenden Mengen produzieren zu können. Alle untersuchten Proteine wurden bereits vor der Induktion exprimiert, was auf eine „Undichtigkeit“ des T5-lac-Promoters zurückzuführen ist. Da CC2D1-Proteine keine gravierende Steigerung in der Expression im Vergleich zum Zeitpunkt „0“ gezeigt haben, könnte eine toxische Wirkung der humanen Proteine auf die Bakterien ein möglicher Grund für eine schwache Expression sein. Eine schwache Expression aller untersuchten Proteine wurde anhand der Coomassie-Blau-Färbung ersichtlich, da die exprimierten Proteine mittels dieser Methode nicht detektierbar waren.

Aufgrund der erzielten Ergebnisse wurde die Strategie zur Etablierung der geeigneten Expressionsbedingungen in mehreren Punkten geändert. Um eine mögliche Toxizität der humanen Proteine zu minimieren und die Expression der Zielproteine zu erhöhen, wurden die kodierenden Sequenzen in den pBAD-HisB-Vektor kloniert. Die Expression der Proteine in diesem Vektor basiert auf dem araBAD-Promoter, der durch die externe Zugabe von L-(+)-Arabinose aktiviert wird und dadurch eine kontrollierbare Expression erlaubt (Guzman et al., 1995). Die pBAD-HisB-Konstrukte wurden eingesetzt, um *E.coli*-Bakterien des Stammes C41 zu transformieren. Dieser Stamm wurde entwickelt, um potenziell toxische humane Proteine bakteriell exprimieren zu können (Miroux und Walker, 1996). Des Weiteren erfolgte die Induktion der Expression erst beim Erreichen eines OD<sub>600</sub>-Werts von 2.0-3.0. Die erhöhte Bakteriendichte sollte die Menge des exprimierten Proteins erhöhen. Das Problem des Abbaus der Zielproteine sollte durch die Expression unter niedrigeren Temperaturen gelöst werden. Aus diesem Grund wurde die Expression sowohl bei 18°C als auch bei 37°C testweise durchgeführt. Alle erwähnten Parameter wurden entsprechend geändert, um das Expressionsoptimum zu bestimmen. Da für weiteren Analysen in dieser Arbeit vor allem CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup> und CC2D1B von Bedeutung sind, wird das Ergebnis der Etablierung der optimalen Expressionsbedingungen nur anhand dieser Proteine gezeigt (Abb. 2.26).

Die in vielen Punkten geänderte Expressionsstrategie resultierte in der Ermittlung der optimalen Expressionsbedingungen für beide Interaktionspartner. Die Expression beider Proteine konnte bereits mittels der Färbung mit Coomassie-Blau nachgewiesen werden, jedoch war das Signal für His6-CC2D1B relativ schwach (Abb. 2.26 A). Der Vergleich der Expression bei zwei Testtemperaturen unter der Verwendung des anti-His-Antikörpers hat ergeben, dass eine Expression bei 18°C für His6-CC2D1B besser geeignet war als eine Expression bei 37°C (Abb. 2.26 A). Das Auftreten der Abbauprodukte konnte durch die niedrigere Temperatur zwar nicht vollständig unterdrückt werden, wurde dennoch reduziert. Weder die 18°C- noch die 37°C-Proben wiesen eine Expression vor der Induktion auf. Mittels eines Vergleichs der Proben wurde die Expression von His6-CC2D1B bei 18°C für drei Stunden als optimal festgelegt.

Im Gegensatz dazu erwies sich die Expression von His6-CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup> bei 37°C optimaler als bei 18°C (Abb. 2.26 B), wobei bei keiner der beiden Temperaturen eine Expression vor der Induktion detektierbar war. Dies konnte sowohl durch einen Nachweis mit anti-His-Antikörper als auch durch die Inkubation in der Coomassie-Blau-Lösung bestätigt werden. Während die Expression bei 18°C nur schwach detektierbar war, konnte eine Bande leicht oberhalb von 35 kDa sowohl im Coomassie-Blau-gefärbten Gel als auch mit dem anti-His-Antikörper nach der Expression bei 37°C eindeutig identifiziert werden (Abb. 2.26 B). Auf Basis der anti-His-Antikörperfärbung wurde die Inkubation von vier Stunden bei 37°C als optimale Expressionsbedingungen für His6-CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup> bestimmt.



**Abbildung 2.26: Etablierung der Expressionsbedingungen für His6-CC2D1B und His6-CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup>, exprimiert im pBAD-HisB-Vektor in C41. (A)** Die Expression von His6-CC2D1B wurde bei 18°C und 37°C über einen Zeitraum von 24 Stunden analysiert. Eine schwache Bande mit der Größe von 130 kDa lässt sich mittels der Coomassie-Blau-Lösung in allen Proben mit Ausnahme der Probe zum Zeitpunkt „0“ erkennen. Die Inkubation mit dem anti-His-Antikörper zeigt einen eindeutigen Nachweis der His6-CC2D1B-Expression, wobei der Western Blot der 18°C-Expression deutlichere Ergebnisse liefert als der Western Blot der 37°C-Expression. Die maximale Expression wird drei Stunden nach der Induktion mit L-(+)-Arabinose bei 18°C erreicht. Weder bei 18°C noch bei

37°C ist eine Expression vor der Induktion detektierbar. **(B)** Die Expression von His6-CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup> wurde ebenfalls bei 18°C und 37°C getestet, jedoch über einen Zeitraum von acht Stunden. Im Fall von His6-CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup> ist bei beiden Testtemperaturen eine Bande leicht oberhalb von 35 kDa in den „1-8h“-Proben erkennbar. Der Vergleich der 18°C-Proben mit den 37°C-Proben basierend auf der Antikörperfärbung resultiert in der maximalen Proteinexpression bei 37°C vier Stunden nach der Induktion. Pfeile deuten auf das Zielprotein hin.

Die etablierten optimalen Expressionsbedingungen für His6-CC2D1B und His6-CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup>, exprimiert im C41-Stamm unter der Verwendung des pBAD-HisB-Vektors sind in der Tabelle 2.5 zusammengefasst.

**Tabelle 2.5: Etablierte Expressionsbedingungen für His6-CC2D1B und His6-CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup>**

Expressionsbedingungen	Protein	
	His6-CC2D1B	His6-CHMP4B <sup>A54C;L180C</sup>
Temperatur	18°C	37°C
Dauer	3 h	4 h

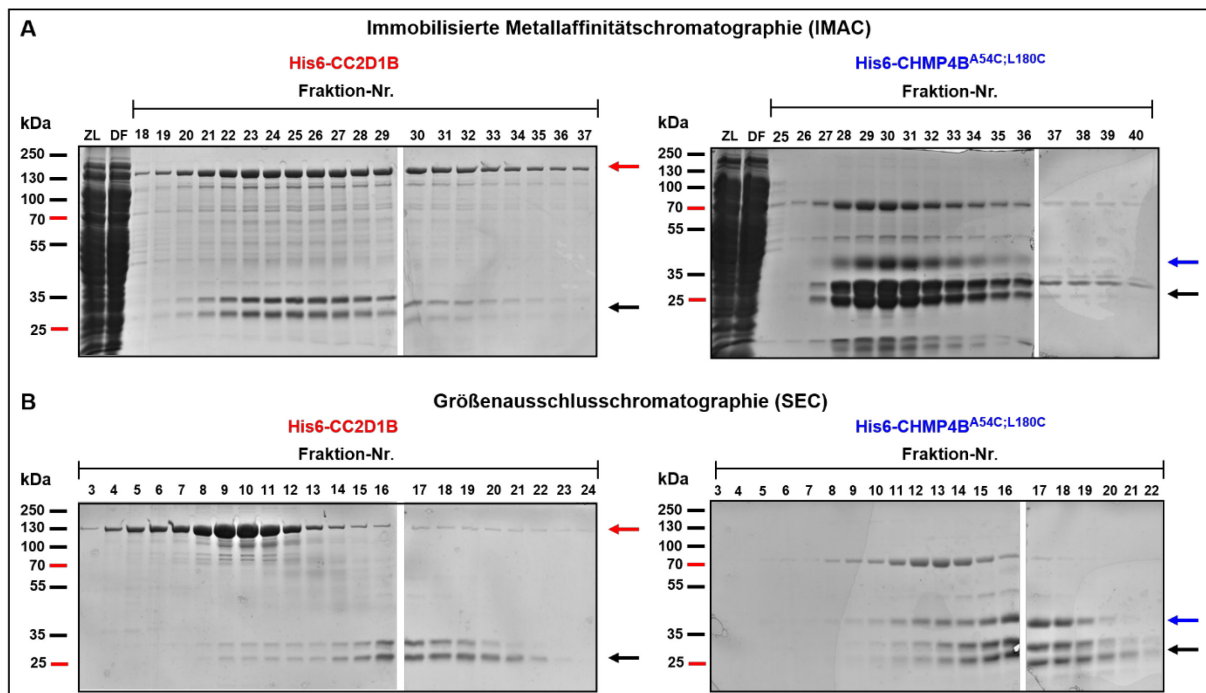
Die als optimal identifizierten Expressionsbedingungen wurden genutzt, um His6-CC2D1B und His6-CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup> in großem Maßstab (jeweils 4 L-Kulturen) zu exprimieren und anschließend zu reinigen. Hierfür mussten die geeigneten Reinigungsbedingungen etabliert werden.

### **2.2.3 Etablierung der Reinigungsbedingungen für CC2D1B und CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup>**

Die Charakterisierung der CHMP4B-Dynamik setzt die Verwendung der Proteine in ihrer nativen Form voraus. Außerdem ist der hohe Reinheitsgrad der beteiligten Proteine von großer Bedeutung, um einen möglichen Einfluss bakterieller Proteine auf die Konformation von CHMP4B ausschließen zu können. Dementsprechend sollte eine Strategie entwickelt werden, die eine effiziente Reinigung unter milden Bedingungen erlaubt. Da alle exprimierten Proteine N-Terminal über eine sechsfache Histidin-Markierung verfügten, war ihre Reinigung über Nickel- bzw. Kobalt-haltige Säulen basierend auf der Methode der immobilisierten Metallaffinitätschromatographie (IMAC) möglich. Aufgrund dessen, dass der Kobalt-gebundenen Matrix eine niedrigere Affinität zu unspezifisch gebundenen bakteriellen Proteinen im Vergleich zur Nickel-Matrix zugeschrieben wird (Bornhorst und Falke, 2000), wurde sie bei der Reinigung der Zielproteine eingesetzt. Um den Reinheitsgrad der Proteine zu erhöhen, wurde eine „Zwei-Schritt-Reinigung“ durchgeführt, die eine Kombination aus der immobilisierten Metallaffinitätschromatographie und der Größenausschlusschromatographie (SEC) beinhaltete. Beide Verfahren wurden mit Hilfe eines automatisierten ÄKTA-Systems durchgeführt. Das gereinigte Protein wurde dabei durch die Zugabe von 150 mM Imidazol fraktionsweise von der Säule eluiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt, um anschließend



mittels der Coomassie-Blau-Färbung analysiert zu werden. Das Ergebnis dieser Analyse kann der Abbildung 2.27 entnommen werden.



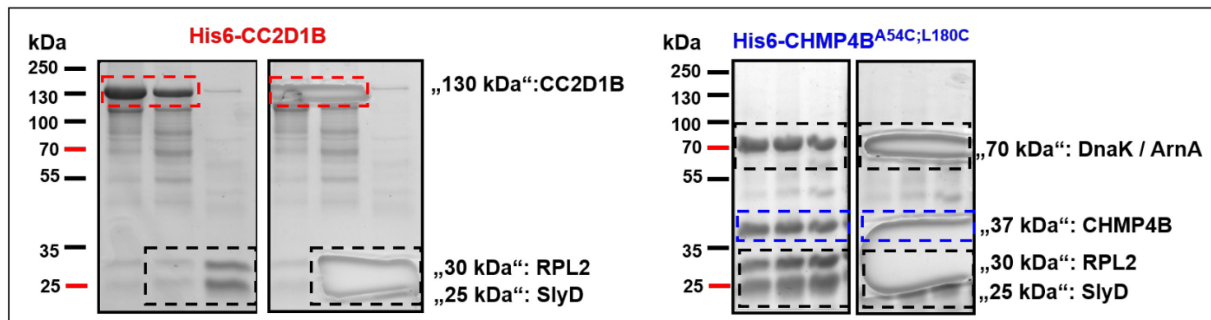
**Abbildung 2.27: ÄKTA-basierte Reinigung von His6-CC2D1B und His6-CHMP4B<sup>A54C:L180C</sup>.** (A) Kobalt-vermittelte immobilisierte Metallaffinitätschromatographie (Co<sup>2+</sup>-IMAC) zur Reinigung von His6-CC2D1B und His6-CHMP4B<sup>A54C:L180C</sup>. Über die Co<sup>2+</sup>-IMAC gereinigtes His6-CC2D1B ist in jeder Fraktion anhand seiner Größe von ca. 130 kDa identifizierbar (roter Pfeil). Das Protein weist darüber hinaus zahlreiche Abbauprodukte auf. Außerdem treten in jeder Fraktion zwei niedermolekulare Banden auf, die sich im Bereich zwischen 25 kDa und 30 kDa befinden (schwarzer Pfeil). Die beiden Proteine werden bei der Reinigung von His6-CHMP4B<sup>A54C:L180C</sup> in hohem Maß konzentriert (schwarzer Pfeil), wobei das Zielprotein im Vergleich dazu eine deutlich schwächere Bindungsaffinität zu der Säule zeigt (blauer Pfeil). Auffällig ist, dass jede Fraktion zusätzlich eine Bande bei ca. 70 kDa aufweist. (B) Größenausschlusschromatographie (SEC) zur Reinigung von His6-CC2D1B und His6-CHMP4B<sup>A54C:L180C</sup>. Die Anwendung der SEC liefert Fraktionen, die fast ausschließlich reines His6-CC2D1B beinhalten (Fr. 8-12). Die beiden „25/30 kDa“- Proteine (schwarzer Pfeil) werden in Fraktionen konzentriert, in denen die Konzentration von His6-CC2D1B abnimmt (Fr. 15-20). Im Gegensatz dazu resultiert der SEC-Reinigungsschritt in keiner Erhöhung des Reinheitsgrades von His6-CHMP4B<sup>A54C:L180C</sup> (blauer Pfeil). Die beiden niedermolekularen Proteinbanden sind in jeder His6-CHMP4B<sup>A54C:L180C</sup>-Fraktion in einem vergleichbaren Ausmaß vorhanden (schwarzer Pfeil). ZL: Zellysate; DF: Durchfluss.

Die Co<sup>2+</sup>-IMAC-Reinigung von His6-CC2D1B hat ergeben, dass das Zielprotein in jeder Fraktion anhand seiner Größe von ca. 130 kDa identifizierbar war (Abb. 2.27 A; roter Pfeil), wobei die Intensität der Banden in den Fraktionen 21 - 30 auf eine ausreichende Affinität von His6-CC2D1B zur Säulenmatrix hindeutete. Wie in der Abbildung 2.27 A zu erkennen ist, konnten in jeder Fraktion neben dem vollständigen Protein auch zahlreiche verkürzte Proteinbanden detektiert werden, die höchstwahrscheinlich auf Abbauprodukte von His6-CC2D1B zurückzuführen sind. Ihre Konzentration, abgeleitet von der Bandenintensität, war im

Vergleich zum vollständigen Protein deutlich niedriger. Auffällig waren jedoch zwei Banden, die auf der Höhe von ca. 25-30 kDa erkennbar und mengenmäßig mit der 130 kDa-Bande von His6-CC2D1B vergleichbar waren. Da die beiden Banden mit derselben Größe ebenfalls in den Fraktionen nach der  $\text{Co}^{2+}$ -IMAC-Reinigung von His6-CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup> zu erkennen waren (Abb. 2.27 A; schwarzer Pfeil), handelte es sich hierbei höchstwahrscheinlich um bakterielle Verunreinigungen. Im Gegensatz zur  $\text{Co}^{2+}$ -IMAC von His6-CC2D1B, wo das Verhältnis zwischen den beiden bakteriellen Proteinen und dem gereinigten His6-CC2D1B subjektiv betrachtet bei ca. 1:1 lag, konnte bei der  $\text{Co}^{2+}$ -IMAC von His6-CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup> eine Anreicherung der bakteriellen Proteine beobachtet werden, während His6-CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup> mit einer Größe von ca. 37 kDa im Vergleich dazu minimal vertreten war (Abb.2.27 A; blauer Pfeil). Interessanterweise zeigte sich bei allen Fraktionen zusätzlich eine Bande, die der Größe von 70 kDa entsprach und im His6-CC2D1B-Gel nicht identifizierbar war (Abb.2.27 A).

Mittels einer Kombination aus  $\text{Co}^{2+}$ -IMAC und SEC konnte im Falle von His6-CC2D1B das Problem mit beiden bakteriellen Proteinen fast vollständig gelöst werden (Abb.2.27 B). Aufgrund der Größenunterschiede (His6-CC2D1B: 130 kDa; bakterielle Proteine: 25-30 kDa) war eine Trennung dieser Proteine voneinander möglich, so dass die Fraktionen mit His6-CC2D1B von den Fraktionen mit „25/30 kDa“-Proteinen separiert werden konnten. Als Ergebnis der SEC konnten die Proben erhalten werden, die zum größten Teil das vollständige His6-CC2D1B und Spuren von „25/30 kDa“-Proteinen enthielten (Abb. 2.27 B; Fr. 8-12). Aufgrund der geringen Größenunterschiede zwischen His6-CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup> und „25/30 kDa“-Proteinen war eine Verbesserung der Reinigung von His6-CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup> mittels der SEC nicht möglich. In allen Fraktionen, die His6-CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup> enthielten (Abb. 2.27 B; blauer Pfeil), wurden die „25/30 kDa“-Proteine identifiziert (Abb. 2.27 B; schwarzer Pfeil), die in der Probe in vergleichbarem Ausmaß vorhanden waren. Des Weiteren zeigten diese Proben analog zu  $\text{Co}^{2+}$ -IMAC eine zusätzliche Bande bei 70 kDa.

Ausgehend von dem Ergebnis der Reinigung von His6-CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup> waren die Voraussetzungen zur Durchführung der Konformationsstudien mit diesen Proben nicht erfüllt. Aus diesem Grund sollte für His6-CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup> eine neue Reinigungsstrategie etabliert werden. Da das Hauptproblem bei der Reinigung von His6-CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup> in bakteriellen Proteinen innerhalb der gereinigten Probe lag, basierte die neue Reinigungsstrategie auf der Eliminierung dieser Proteine. Um dabei gezielt vorzugehen, wurden die bakteriellen Proteine aus dem Gel isoliert und mittels MS-Analyse untersucht. Zusätzlich wurde die 130 kDa bzw. die 37 kDa-Bande ausgeschnitten und massenspektrometrisch analysiert, um direkt nachweisen zu können, dass es sich hierbei tatsächlich um die Zielproteine His6-CC2D1B und His6-CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup> handelt. Die mittels der MS analysierten Proben sind in der Abbildung 2.28 dargestellt.



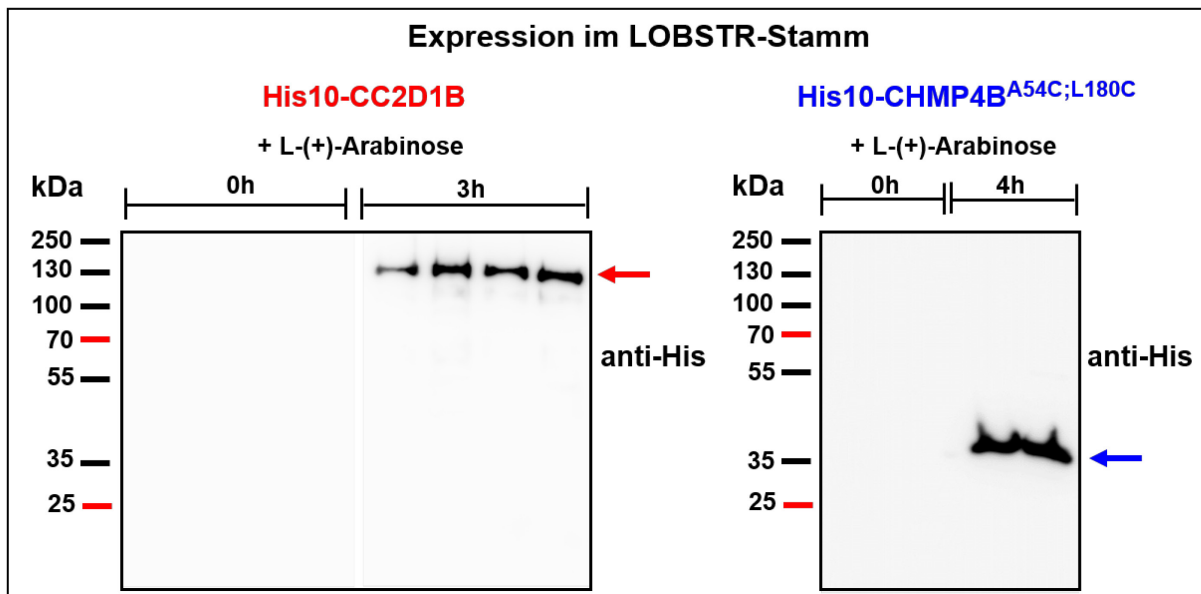
**Abbildung 2.28: Präparation der Proben zur MS-basierten Identifizierung bakterieller Proteine.** Identifizierte Proteine: 130 kDa: CC2D1B; 70 kDa: DnaK/ ArnA; 37 kDa: CHMP4B; 30 kDa: RPL2; 25 kDa: SlyD.

Mittels MS-Analyse konnte bestätigt werden, dass die „130 kDa“-Bande CC2D1B repräsentiert, während die „37 kDa“-Probe mit der Proteinsequenz von CHMP4B übereinstimmt (Abb. 2.28; Anhang Tab.8.1 und Tab. 8.3). Die Analyse der „25/30 kDa“-Banden ergab, dass es sich hierbei um ein bakterielles Chaperon SlyD (25 kD-Bande) sowie um das ribosomale Protein RPL2 (30 kDa-Bande) handelt (Abb. 2.28; Anhang Tab.8.4 und Tab. 8.5). Die Bande bei „70 kDa“ konnte sowohl dem bakteriellen Chaperon DnaK als auch dem Enzym ArnA zugeordnet werden (Abb. 2.28; Anhang Tab.8.2). Dabei stellen die Proteine ArnA und SlyD bekannte bakterielle „Verunreinigungen“ dar, die zahlreiche Histidine aufweisen und aufgrund dessen eine hohe Affinität zur  $\text{Co}^{2+}$ -Matrix haben. Wird das Zielprotein in niedrigen Mengen exprimiert, konkurrieren die beiden bakteriellen Proteine mit ihm um die Bindungsstellen an der Säule und werden somit mitgereinigt. Da es sich bei His6-CC2D1B und His6-CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup> um humane Proteine handelt und ihre Expression für Bakterien höchstwahrscheinlich toxisch ist, werden sie in niedrigen Mengen exprimiert. Dies begünstigt die gleichzeitige Reinigung von bakteriellen Proteinen.

Da die SEC keine geeignete Methode zur Reinigung von His6-CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup> darstellt, wurde für dieses Protein eine neue Reinigungsstrategie entworfen, die einerseits auf der Minimierung der Bindungsaffinität beider bakterieller Proteine basierte, andererseits die gleichzeitige Erhöhung der Bindungseffizienz von CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup> voraussetzte.

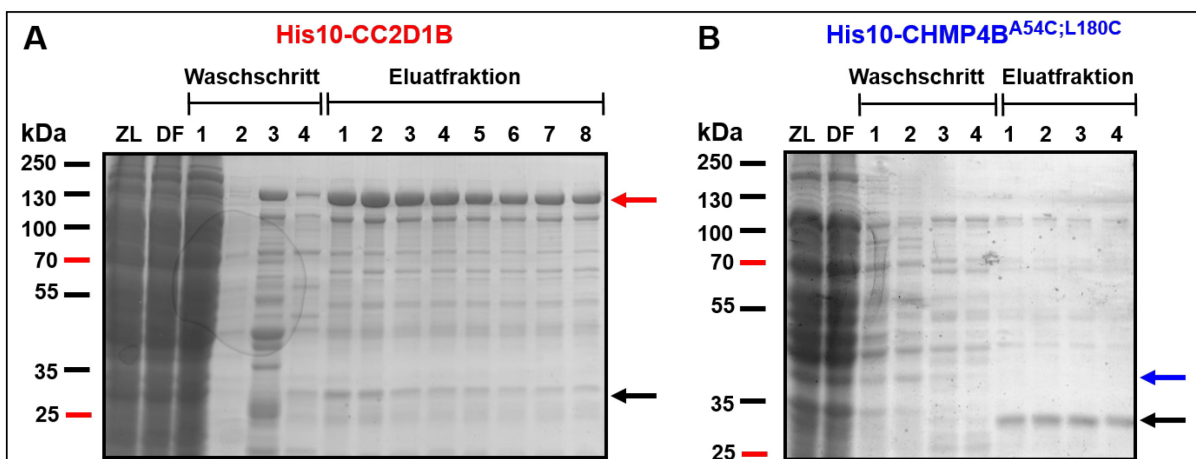
Die Reduktion der Bindungsaffinität von ArnA und SlyD zu der Säule sollte durch die Expression des Zielproteins im LOBSTR-Stamm erzielt werden. Dieser Stamm zeichnet sich durch mutierte SlyD und ArnA aus, die durch einen gezielten Histidin-Austausch durch andere Aminosäuren in ihrer Bindungsaffinität beeinträchtigt werden (Andersen et al., 2013). In Folge des Austausches des His6-Tags durch den His10-Tag sollten die Chancen der Zielproteine, an die Säule zu binden und mit den bakteriellen Proteinen um die Bindungsstellen zu konkurrieren, erhöht werden. Die Expression der beiden Interaktionspartner im LOBSTR-Stamm wurde mittels eines Western Blots untersucht und konnte bestätigt werden (Abb. 2.29).

Dabei wurden beide Proteine unter den Bedingungen exprimiert, die für den C41-Stamm etabliert wurden.



**Abbildung 2.29: Expression von His10-CC2D1B und His10-CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup> im LOBSTR-Stamm.** Sowohl His10-CC2D1B (roter Pfeil) als auch His10-CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup> (blauer Pfeil) konnten im LOBSTR-Stamm unter den für den C41-Stamm etablierten Bedingungen exprimiert und nachgewiesen werden.

Die im LOBSTR-Stamm exprimierten Proteine wurden mittels Co<sup>2+</sup>-IMAC basierend auf HisTalon Gravitationssäulen gereinigt. Die Überprüfung der Reinigungseffizienz erfolgte mit Hilfe der Coomassie-Blau-Färbung (Abb. 2.30).

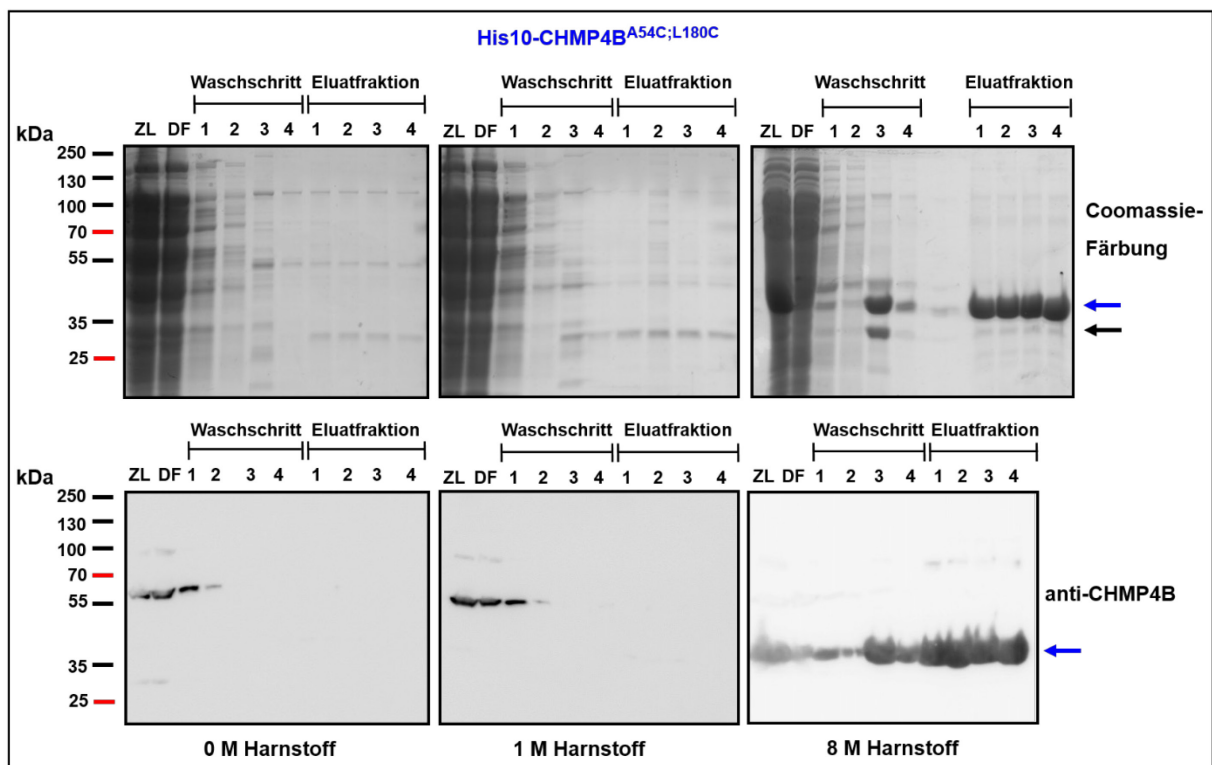


**Abbildung 2.30: Co<sup>2+</sup>-IMAC zur Reinigung von His10-CC2D1B und His10-CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup>.** (A) His10-CC2D1B ist in jeder Eluatfraktion an seiner Größe von ca. 130 kDa erkennbar (roter Pfeil). Alle Fraktionen weisen mehrere Abbauprodukte auf, die jedoch deutlich schwächer vertreten sind als vollständiges Protein. Die bakteriellen Verunreinigungen RLP2 und SlyD sind in einem geringen Ausmaß identifizierbar (schwarzer Pfeil). (B) Während His10-CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup> im Zelllysate, Durchfluss und den ersten zwei Waschschriften erkennbar ist (blauer Pfeil), kann das Protein in keiner der Eluatfraktionen nachgewiesen werden. ZL: Zelllysate; DF: Durchfluss. Waschschrift 1 und 2: ohne Imidazol. Waschschrift 3 und 4: 20 mM Imidazol.

Wie der Abbildung 2.30 A zu entnehmen ist, konnte das im LOBSTR-Stamm exprimierte CC2D1B mittels seiner zehnfachen His-Markierung effizient gereinigt werden. Während das meiste ungebundene Material bereits nach dem ersten, Imidazol-freien Waschschrift eliminiert werden konnte (Abb. 2.30 A; Waschschrift 1), lösten sich die unspezifisch gebundenen Proteine erst nach Zugabe von 20 mM Imidazol zum Waschpuffer von der Säule ab (Abb. 2.30 A; Waschschrift 3). Die Anwesenheit von Imidazol im Waschpuffer wirkte sich minimal negativ auf die Bindung von His10-CC2D1B aus, da dadurch ein Teil des Zielproteins bereits während des Waschschrifts von der Säule eluiert wurde. Da His10-CC2D1B in einer hohen Menge in jeder Fraktion identifizierbar war, konnte der Verlust kleiner Proteinmengen im Laufe des Waschens vernachlässigt werden. Analog zur Co<sup>2+</sup>-IMAC, die zur Reinigung von His6-CC2D1B eingesetzt wurde (Abb. 2.27 A), traten auch in diesem Fall zahlreiche Abbauprodukte auf, die jedoch im Vergleich zum vollständigen Protein minimal vertreten waren. Auffällig ist, dass die Bindung von SlyD (25 kDa) und RPL2 (30 kDa) stark reduziert war, so dass nur schwache Banden auf den entsprechenden Höhen detektierbar waren und das Ergebnis der Reinigung deutlich besser als bei der Co<sup>2+</sup>-IMAC-Reinigung von His6-CC2D1B (Abb. 2.27 A) und vergleichbar mit dem Ergebnis der SEC-Reinigung (Abb. 2.27 B) war. Somit konnte für His10-CC2D1B eine Reinigungsstrategie etabliert werden, die die Isolierung von reinem CC2D1B ohne zusätzlichen SEC-Schritt erlaubte und dementsprechend durch die Reduktion der Reinigungsschritte zu einem verringerten Proteinverlust führte.

Im Unterschied dazu war die neue Strategie zur Reinigung von His10-CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup> nicht geeignet. Während das Protein sowohl in Zelllysat und Durchfluss als auch in den beiden ersten Waschschriftten nachweisbar war, konnte es in keiner der Eluatfraktionen detektiert werden (Abb. 2.30 B, blauer Pfeil). Gleichzeitig konnte eine Anreicherung eines Proteins auf der Höhe von ca. 30 kDa beobachtet werden, das der Größe von RPL2 entsprach (Abb. 2.30 B, schwarzer Pfeil).

Da His10-CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup> im Zelllysat, Durchfluss und den ersten zwei Waschschriftten nachweisbar war, jedoch nicht in den Eluatfraktionen, führte dies zur Vermutung, dass das Protein sich in einer Weise faltet, die in geringer Bindungsaffinität zur Säulenmatrix resultiert. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass der His10-Tag innerhalb des Proteins so zu liegen kommt, dass es für die Bindung an die Kobalt-Ionen nicht ausreichend zugänglich ist. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde His10-CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup> unter nativen, mild denaturierenden (1 M Harnstoff) und stark denaturierenden (8 M Harnstoff) Bedingungen gereinigt. Anschließend erfolgte der Vergleich der Reinigungseffizienz mittels der Coomassie-Blau-Färbung und der Inkubation mit dem spezifischen anti-CHMP4B-Antikörper (Abb. 2.31).



**Abbildung 2.31: Vergleich der Reinigungseffizienz von His10-CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup> unter nativen, mild denaturierenden und stark denaturierenden Bedingungen.** Das gereinigte His10-CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup> ist weder unter nativen noch unter mild denaturierenden Bedingungen nachweisbar. Erst die Zugabe von 8 M Harnstoff zu den verwendeten Lösungen resultiert in einem starken Signal auf der Höhe von ca. 37 kDa, das der Größe von His10-CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup> entspricht (blauer Pfeil). Der schwarze Pfeil deutet auf eine Verunreinigung mit RPL2 hin.

Wie in der Abbildung 2.31 zu erkennen ist, resultierte die Reinigung von His10-CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup> unter stark denaturierenden Bedingungen (8 M Harnstoff) in einer Anreicherung des Proteins an der Säule, das anschließend effizient eluiert werden konnte (Abb. 2.31; blauer Pfeil). Infolge der hohen Bindungseffizienz von His10-CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup> zu der Säule wurde das Problem mit den bakteriellen Proteinen zum größten Teil gelöst. Das RPL2-Protein war in allen Eluatproben weiterhin vorhanden, konnte angesichts seiner im Vergleich zu His10-CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup> niedrigen Konzentration jedoch vernachlässigt werden (Abb. 2.31, schwarzer Pfeil). Im Gegensatz dazu zeigte His10-CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup> keine ausreichende Bindungsaffinität zu der Säule unter nativen oder mild denaturierenden Bedingungen. Die Tatsache, dass His10-CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup> erst nach seiner vollständigen Entfaltung im Eluat nachweisbar war, legt die Vermutung nahe, dass das Problem bei der Bindung des Proteins an die Säule höchstwahrscheinlich am inkorporierten His-Tag lag.

Dieses Ergebnis lieferte den Hinweis darauf, dass die Reinigung von His10-CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup> stark denaturierende Bedingungen erfordert. Da für die Konformationsstudien natives Protein benötigt wird, ist ein Renaturierungsschritt notwendig. Die Renaturierung wurde sowohl durch



einen Pufferaustausch als auch durch starkes Verdünnen in einem nativen Puffer durchgeführt. Das Endergebnis der Reinigung der beiden Proteine sowie der Renaturierung von His10-CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup> ist in der Abbildung 2.32 A dargestellt. Beide Gele zeigen Zielproteine, die hauptsächlich in ihrer vollständigen Form und hoher Konzentration vorlagen. Das Problem mit der Kontamination durch bakterielle Proteine konnte in beiden Fällen auf ein Minimum reduziert werden.

Da His10-CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup> über keine enzymatische Funktion verfügt, ist die Überprüfung seiner korrekten Rückfaltung problematisch. Um dennoch eine Aussage darüber machen zu können, wurde geprüft, ob das renaturierte Protein weiterhin an seinen Interaktionspartner, His10-CC2D1B, binden kann. Hierfür wurden beide gereinigten Proteine in einem Ansatz inkubiert, wobei His10-CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup> anschließend mit dem CHMP4B-Antikörper präzipitiert wurde. Nach mehrmaligem Waschen wurde die Probe mittels eines SDS-Gels analysiert. Dem Nachweis vom His10-CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup> diente der anti-CHMP4B-Antikörper, während His10-CC2D1B separat durch den anti-His-Antikörper detektiert wurde. Als Referenz diente die Probe, die denaturiertes His10-CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup> und natives His10-CC2D1B enthielt (Abb. 2.32 B).



**Abbildung 2.32: Endergebnis der Reinigung von His10-CC2D1B und His10-CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup> sowie Co-IP-Analyse zur Überprüfung der Renaturierung von His10-CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup>.** (A) Vollständiges His10-CC2D1B ist an seiner Größe von ca. 130 kDa erkennbar (roter Pfeil). Es sind mehrere kleinere Proteinbanden identifizierbar, die Abbauprodukte von His10-CC2D1B darstellen. Die Verunreinigungen mit bakteriellen Proteinen sind auf ein Minimum reduziert. Die His10-CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup>-positive Probe zeigt ein Signal bei ca. 37 kDa, das der Größe des Zielproteins entspricht (blauer Pfeil). Die bakteriellen Proteine sind minimal vorhanden. (B) Die Co-IP-Analyse, die dem Nachweis der Renaturierung von His10-CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup> diente, zeigt in der „renaturierten“ Probe ein starkes Signal für His10-CC2D1B, das durch die Interaktion mit His10-CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup> in der Probe angereichert wurde. In der „denaturierten“ Situation ist His10-CC2D1B nach der Präzipitation mit His10-CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup> ebenfalls vorhanden, liegt jedoch in einer geringeren Menge im Vergleich zur „renaturierten“ Probe vor. Die roten Pfeile deuten auf His10-CC2D1B, die blauen auf His10-CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup> hin.

Sowohl in der „renaturierten“ als auch in der „denaturierten“ Situation konnten beide Interaktionspartner im Input identifiziert werden (Abb. 2.32 B). Die Präzipitation des renaturierten His10-CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup> resultierte in einer starken Anreicherung von His10-CC2D1B, das durch die Bindung an His10-CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup> mitpräzipitiert wurde.

Die Analyse der Interaktion zwischen denaturiertem His10-CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup> und nativem His10-CC2D1B hat ergeben, dass auch in diesem Fall ein Teil von His10-CC2D1B mit His10-CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup> zu interagieren schien (Abb. 2.32 B). Die Menge an His10-CC2D1B, die in der „denaturierten“ Situation präzipitiert wurde, war dabei deutlich niedriger als bei der „renaturierten Probe“. Zu beachten ist, dass beide Co-IP-Ansätze unter nativen Bedingungen durchgeführt wurden. Es ist also davon auszugehen, dass ein Teil des denaturierten His10-CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup> in einem nativen Puffer in die renaturierte Form spontan übergehen und schließlich mit His10-CC2D1B interagieren könnte.

Mit Hilfe der durchgeführten biochemischen Analysen konnten für beide Interaktionspartner optimale Reinigungsbedingungen etabliert werden. Die Reinigung beider Proteine kann auf Basis von denselben Puffern erfolgen, jedoch benötigt die Reinigung von His10-CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup> eine Zugabe von 8 M Harnstoff, um den Zugang des His10-Tags zur Säulenmatrix zu gewährleisten. Die Expression der Proteine im LOBSTR-Stamm erübrigt den zusätzlichen Schritt der SEC-Fraktionierung und resultiert somit in einem reduzierten Verlust gereinigter Proteine.

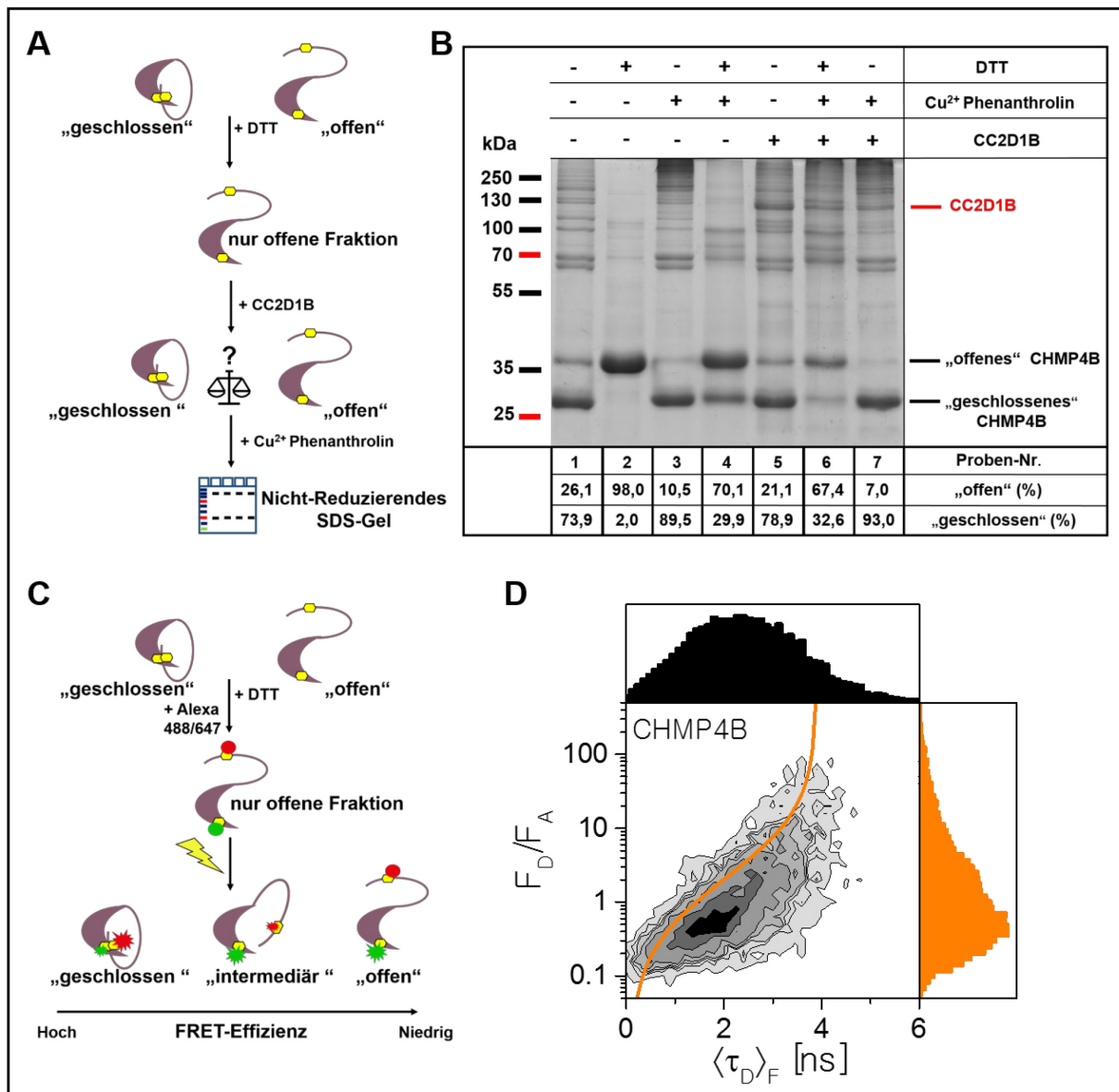
#### **2.2.4 Konformationsanalyse von CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup>**

Mit der Etablierung der optimalen Expressions- und Reinigungsbedingungen für His10-CC2D1B und His10-CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup> wurden die Grundvoraussetzungen für die Durchführung der Experimente zur Konformationsanalyse von CHMP4B erfüllt. Beide Proteine konnten in ausreichenden Mengen exprimiert und in einem akzeptablen Reinheitsgrad aus Bakterien isoliert werden, um sowohl bei der Cystein-basierten Quervernetzung der Proteine als auch bei der smFRET-Analyse (Sisamakidis et al., 2010) eingesetzt zu werden.

Die Durchführung der Cystein-vermittelten Quervernetzung von CHMP4B basierte auf einem einfachen RedOx-Prinzip (Abb. 2.33 A; schematische Darstellung), das bereits bei der Charakterisierung der Snf7-Konformation auf eine ähnliche Weise verwendet wurde (Henne et al., 2012). Cystein-haltiges CHMP4B wurde nach der Reinigung unter denaturierenden Bedingungen im Puffer A renaturiert. Verhält sich CHMP4B in Lösung auf eine Snf7-ähnliche Weise, wird davon ausgegangen, dass das unbehandelte Protein in einer Mischpopulation

vorliegt, die sowohl geschlossene als auch offene Moleküle aufweist (Abb. 2.33 A). Diese Tatsache würde die Aussage über einen möglichen Einfluss von CC2D1B auf CHMP4B erschweren. Um eine uniforme CHMP4B-Population zu begünstigen, wurde die Proteinprobe mit DTT behandelt, das der Reduktion der in der geschlossenen Konformation gebildeten Disulfidbrücken und somit dem Übergang des Proteins in die offene Form diene (Abb. 2.33 A). Die anschließende Inkubation des Zielproteins mit CC2D1B als Interaktionspartner sollte der Beantwortung der Frage dienen, ob die CHMP4B-Konformation von dieser Wechselwirkung beeinflusst wird. Die Antwort auf diese Frage würde ein direkter Vergleich der Proben mit und ohne CC2D1B liefern. Wäre bei den analog behandelten Proben ein Unterschied in der Aufteilung der beiden Zustände erkennbar, würde dies einen Hinweis für den CC2D1B-Einfluss auf die CHMP4B-Konformation liefern. Damit die eventuell gebildete geschlossene Form sichergestellt werden kann, wurde die Probe mit einer Mischung aus  $\text{Cu}^{2+}$ Phenanthrolin 15 Minuten auf Eis inkubiert. Während dieser Zeit wurden die sich in der Nähe befindlichen Cysteine einer Oxidation ausgesetzt, die in der Bildung von Disulfidbrücken resultieren sollte. Eine anschließende Analyse der Proben mittels eines nicht-reduzierenden SDS-Gels sollte Erkenntnisse über den konformationellen Zustand liefern (Abb. 2.33 A).

Die Analyse hat ergeben, dass unbehandeltes CHMP4B, ähnlich wie Snf7, in Lösung in einer Mischpopulation existiert (Abb. 2.33 B; Probe 1). Dabei scheint die geschlossene Form, die im Gel der 27 kDa-Bande zuzuordnen ist, vom Protein bevorzugt zu sein. Ausgehend von einer quantitativen Auswertung dieser Probe konnte gezeigt werden, dass CHMP4B zu 73,9% in der geschlossenen Konformation vorliegt, während die restlichen 26,1% seinen offenen Zustand repräsentieren (Abb. 2.33 B; Probe 1). Die Oxidation der unbehandelten Probe mit  $\text{Cu}^{2+}$ Phenanthrolin resultierte in der Begünstigung des geschlossenen Zustands, die an der leichten Erhöhung des Anteils der 27 kDa-Bande (89,5%) erkennbar war (Abb. 2.33 B; Probe 3). Neben der offenen (37 kDa) und der geschlossenen (27 kDa) Form wurden sowohl in der unbehandelten als auch in der oxidierten Probe weitere, hochmolekulare Banden (ab 70 kDa) festgestellt. Hierbei könnte es sich um CHMP4B-Polymere handeln, deren Ursprung in der Ausbildung der intermolekularen Disulfidbrücken liegen könnte. Eine Inkubation der Probe mit DTT lieferte die Bestätigung dafür, dass es sich bei der 27 kDa-Bande tatsächlich um die geschlossene Form von CHMP4B handelt, während hochmolekulare Banden höchstwahrscheinlich CHMP4B-Polymere darstellen. Diese Folgerung basierte auf der Reduktion der intra- sowie intermolekularen Disulfidbrücken, die sich in der Anreicherung der offenen Konformation äußerte (Abb. 2.33 B; Probe 2). Eine quantitative Analyse dieser Probe zeigte, dass CHMP4B zu 98% im offenen Zustand vorlag, während lediglich 2% des Proteins in der geschlossenen Form identifizierbar waren.



**Abbildung 2.33: Konformationsanalyse von CHMP4B.** (A) Schematische Darstellung der Cystein-basierten Quervernetzung von CHMP4B. CHMP4B existiert sowohl in der geschlossenen als auch in der offenen Form. Die Behandlung der Probe mit DTT resultiert in der Reduktion der Disulfidbrücken innerhalb der geschlossenen Moleküle und erzwingt die Bildung einer uniformen Population mit offener Konformation. Die Zugabe von CC2D1B dient der Analyse seiner möglichen Auswirkung auf die CHMP4B-Konformation. Die anschließende Oxidation mit Cu<sup>2+</sup> Phenanthrolin soll den eventuell entstandenen geschlossenen Zustand fixieren. (B) Ergebnis der Cystein-basierten Quervernetzung von CHMP4B. Die unbehandelte Probe (1) zeigt CHMP4B hauptsächlich in der geschlossenen Konformation, die aufgrund einer Größe von ca. 27 kDa erkennbar ist. Die offene Form mit der Größe von ca. 37 kDa ist ebenfalls in der Probe vorhanden. Außerdem sind weitere, hochmolekulare Banden detektierbar, die möglicherweise den CHMP4B-Polymeren zuzuordnen sind. Die Reduktion mit DTT (2) resultiert in einem fast vollständigen Übergang in die offene Konformation. Die Inkubation der unbehandelten Probe mit Cu<sup>2+</sup> Phenanthrolin (3) liefert ein zu der unbehandelten Probe (1) vergleichbares Ergebnis, zeigt dennoch einen leicht erhöhten Anteil an geschlossener Form. Die Inkubation der reduzierten Probe bei RT vor der Oxidation (4) resultiert in einem spontanen Übergang eines Teils von CHMP4B von dem offenen Zustand in den geschlossenen. Die Zugabe von CC2D1B (5, 6, 7) scheint keinen gravierenden Einfluss auf die Konformation von CHMP4B auszuüben, da die entsprechenden Kontrollproben (1, 3, 4) ein vergleichbares Ergebnis liefern. Die Auswertung der Ergebnisse basiert auf drei unabhängigen Experimenten. (C) Schematische Darstellung der Konformationsanalyse basierend

auf der smFRET-Analyse. Das Cystein-haltige Protein wird durch die Zugabe von DTT reduziert und mit zwei Fluorophoren inkubiert, die an Cysteine kovalent binden. Liegt das Protein in einer geschlossenen Konformation vor, so gibt das angeregte Donorfluorophor die Energie an das Akzeptorfluorophor weiter, wobei die FRET-Effizienz gemessen werden kann. Während die FRET-Effizienz innerhalb einer geschlossenen Form aufgrund der kurzen Distanz hoch ist, ist bei der offenen Konformation entweder von keiner oder einer niedrigen auszugehen. Ein intermediärer Zustand würde eine moderate FRET-Effizienz zeigen. **(D)** Ergebnis der smFRET-Analyse von CHMP4B. Die Analyse der FRET-Effizienz ( $F_D/F_A$ ) und der Lebensdauer der Donorfluoreszenz ( $\tau_D$ )<sub>F</sub> liefern Hinweise, dass CHMP4B in Lösung in einer Mischpopulation existiert, wobei der geschlossene Zustand bevorzugt wird. Das Ergebnis der smFRET-Analyse repräsentiert ein vorläufiges Experiment.

Interessanterweise resultierte eine anschließende Inkubation der reduzierten Probe bei RT in einer Änderung des beobachteten Zustands. So konnte nach 30 Minuten der Inkubation ein spontaner Übergang in den geschlossenen Zustand festgestellt werden. Während unmittelbar nach der Reduktion mit DTT lediglich 2% des Proteins in der geschlossenen Form identifiziert wurden, war diese Konformation nach der anschließenden Inkubation bei RT zu 29,9% vertreten. Dieser Übergang wurde zusätzlich durch die Oxidation mit Cu<sup>2+</sup>Phenanthrolin fixiert (Abb. 2.33 B; Probe 4).

Da der Nachweis der geschlossenen Konformation von CHMP4B aufgrund seiner Faltung mit Hilfe einer Antikörperfärbung nicht möglich war, basierte die Untersuchung der geschlossenen Form auf der Reduktion der Cysteine und der damit verbundenen Abwesenheit der 27 kDa-Bande. Um dennoch gezielt nachweisen zu können, dass die 27 kDa-Bande tatsächlich CHMP4B repräsentiert, erfolgte eine MS-Analyse. Neben der 27 kDa-Bande wurde die 37 kDa-Bande sowie der Bereich aus dem Gel isoliert, in dem die CHMP4B-Polymere vermutet wurden. Mit Hilfe der MS-Analyse konnte nachgewiesen werden, dass die 27 kDa-Bande zu 75% CHMP4B enthielt (Anhang Tab. 8.7). In der 37 kDa-Probe wurde CHMP4B zu 82% identifiziert (Anhang Tab. 8.6). Somit konnte bestätigt werden, dass die 27 kDa-Bande tatsächlich CHMP4B repräsentiert. Bei den hochmolekularen Banden konnte CHMP4B nur zu 13% identifiziert werden (Anhang Tab. 8.8). Die restlichen 87% sind auf bakterielle Verunreinigungen zurückzuführen.

Die Analyse mittels der Cystein-basierten Quervernetzung von CHMP4B hat außerdem ergeben, dass die Interaktion mit CC2D1B unter gegebenen Bedingungen keinen gravierenden Einfluss auf die CHMP4B-Konformation hat. Aufgrund dessen, dass die Zugabe von CC2D1B zu den untersuchten Proben (Abb. 2.33 B; Proben 5-7) den Anteil an der geschlossenen Konformation im Vergleich zu den entsprechenden Referenzproben (Abb. 2.33 B; Proben 1 und 3-4) nur geringfügig (2,7-5%) erhöht hat, konnte sein Einfluss auf die Konformation von CHMP4B unter den gegebenen Bedingungen nicht bestätigt werden.

Die dynamische Natur von CHMP4B konnte durch ein vorläufiges smFRET-Experiment, das in der Kooperation mit der AG Seidel durchgeführt wurde, bestätigt werden. Diese smFRET-Methode macht sich ebenfalls das Vorhandensein von Cysteinen zunutze (Abb. 2.33 C). Die in der Lösung vorhandene Mischpopulation wurde durch DTT reduziert, um eine uniforme Protein-Population zu bilden. Anschließend wurde die Probe mit zwei Fluorophoren versetzt, die kovalent an Cysteine binden. Nach der Anregung des Donorfluorophors wurde die FRET-Effizienz gemessen, die umgekehrt proportional zur Entfernung des Akzeptorfluorophors war. Im Fall der geschlossenen Konformation wäre eine höhere FRET-Effizienz zu erwarten als bei der offenen Proteinform. Ein intermediärer Zustand würde dementsprechend in einem moderaten Signal resultieren (Abb. 2.33 C).

Die Analyse der FRET-Effizienz sowie der Lebensdauer der Donorfluoreszenz lieferte eine zusätzliche Bestätigung dafür, dass CHMP4B in Lösung in einer gemischten Population vorliegt, wobei die geschlossene Konformation präferiert wird (Abb. 2.33 D).

Mittels der Cystein-basierten Quervernetzung von CHMP4B bzw. der smFRET-Analyse konnte die Annahme bestätigt werden, dass humanes CHMP4B ein dynamisches Protein darstellt, das seine Konformation zwischen offenem und geschlossenem Zustand wechselt und somit sich wie Snf7 aus Hefe verhält. Außerdem konnte gezeigt werden, dass in der Lösung vorliegendes Protein die geschlossene Konformation favorisiert, wobei ein signifikanter Anteil ebenfalls in der offenen Form identifizierbar ist. Ein direkter Zusammenhang zwischen der Konformation von CHMP4B und seiner Interaktion mit CC2D1B konnte unter den gewählten Bedingungen nicht bestätigt werden.

### **2.2.5 Chemische Quervernetzung von CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup> zur Strukturanalyse von CHMP4B**

Eine Aufklärung des genauen Mechanismus, der der Interaktion zwischen CHMP4B und CC2D1-Proteinen zugrunde liegt, wäre durch die Information über ihre Struktur möglich. Jedoch bleibt der biochemische Aufbau der Interaktionspartner weitgehend unbekannt. Die strukturelle Information über CHMP4B basiert auf der Kristallisation von einem Fragment, das sich auf den Bereich zwischen den Aminosäuren 23 bis 97 beschränkt und damit lediglich ca. 30% des Gesamtproteins abdeckt (Martinelli et al., 2012). Mit diesem Fragment lassen sich die ersten zwei Helices charakterisieren, während die Struktur des restlichen Proteins unbekannt bleibt. Auch bei seinem Ortholog aus *D. melanogaster*, Shrub, ist nur die Kristallstruktur zwischen den Aminosäuren 17 und 130 bekannt, die ebenfalls die Untersuchung der ersten zwei Helices ermöglicht (McMillan et al., 2017). Noch weniger ist über die Struktur von CC2D1-Proteinen bekannt. Die Information, die in diesem Fall zur Verfügung steht, beschränkt sich lediglich auf die dritte DM14-Domäne (McMillan et al., 2017),



die C2-Domäne sowie den Bereich proximal der C2-Domäne (Ventimiglia et al., 2018) von Lgd.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ebenfalls Testkristallisationsansätze durchgeführt, die der Etablierung der optimalen Kristallisationsbedingungen sowie der anschließenden Strukturaufklärung von CHMP4B und CC2D1B dienen sollten. Jedoch konnten bei keinem der Proteine in der Testphase Kristalle identifiziert werden. Während die fehlgeschlagene Kristallisation von CC2D1B möglicherweise an seiner für diese Methode nicht optimalen Größe lag, wäre im Fall von CHMP4B seine dynamische Natur als mögliche Ursache denkbar.

Um dennoch strukturelle Information über CHMP4B zu erhalten, wurde das Protein einer CX-MS-Methode unterzogen, die chemische Aminosäuren-Vernetzung mit Massenspektrometrie kombiniert. Bei dieser Methode werden chemische Substanzen mit zwei reaktiven Gruppen eingesetzt, die durch einen „Abstandhalter“ mit einer festgelegten Länge voneinander getrennt sind (Übersicht in Sinz, 2003; Rappsilber, 2011). Während der Behandlung des Zielproteins binden die beiden reaktiven Gruppen kovalent an ihre Zielgruppen innerhalb des Proteins und verknüpfen somit die Bereiche, die zueinander in nächster Nähe liegen und nicht weiter voneinander entfernt sind als die Länge des jeweiligen Quervernetzers. Anschließend wird die Probe enzymatisch behandelt und mittels MS analysiert, wobei die Information über die Position der vernetzten Aminosäuren und entsprechenden Proteinbereiche gewonnen werden kann. Mit Hilfe dieser Information lassen sich Aussagen über die Proteinstruktur machen.

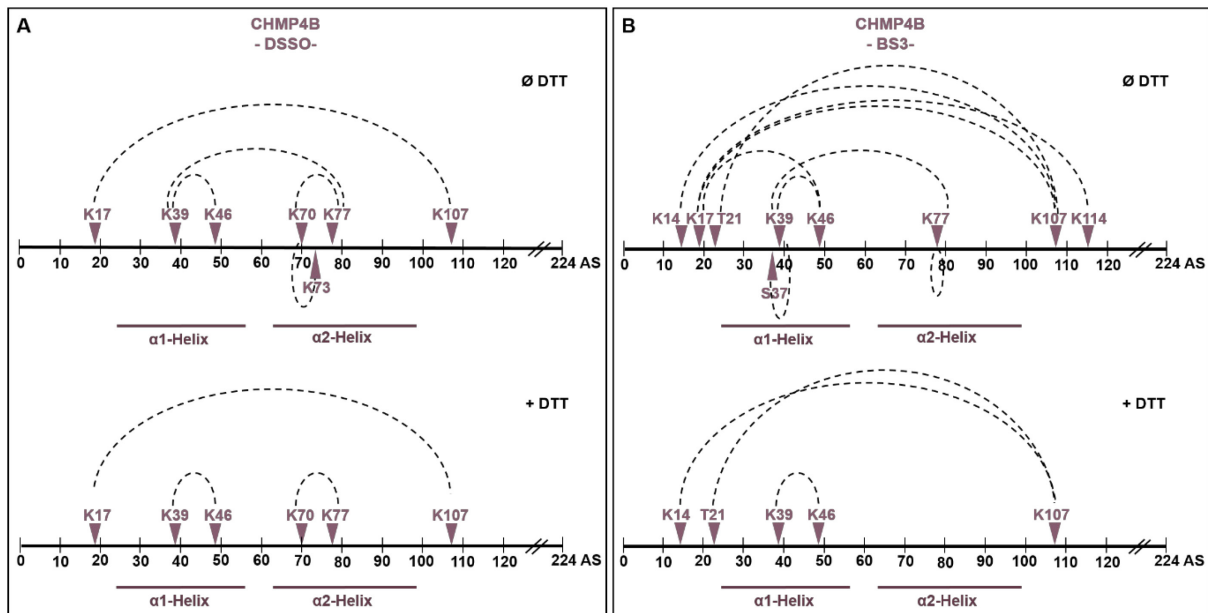
Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte CX-MS-Analyse von CHMP4B erfolgte durch *Molecular Proteomics Laboratory* Düsseldorf. Als Quervernetzer wurden DSSO und BS3 eingesetzt, die die Aminosäuren innerhalb von His10-CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup> miteinander verknüpfen sollten. Die Eigenschaften der verwendeten Quervernetzer können der Tabelle 2.6 entnommen werden.

**Tabelle 2.6: Verwendete Quervernetzer**

Bezeichnung	Länge des Abstandhalters	Reaktive Gruppen	Zielgruppe	Spaltbarkeit
DSSO	10,3 Å	NHS-Ester	primäre Amine	ja
BS3	11,4 Å	Sulfo-NHS-Ester	primäre Amine	nein

Da es sich bei der Ausgangsprobe um ein Cystein-haltiges Protein handelt, wurden die beiden chemischen Reagenzien (DSSO und BS3) sowohl mit unbehandelten als auch mit DTT inkubierten Proben versetzt. Nach der anschließenden gelelektrophoretischen Überprüfung wurden die Proben massenspektrometrisch analysiert. Die im Gel als „37 kDa“-identifizierte Proteinbande diente der Analyse der intramolekularen Aminosäuren-Verknüpfung.

Die nach der MS-Analyse identifizierten Peptide sowie die Positionen der verknüpften Aminosäuren beziehen sich auf das His10-CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup>. Diese Positionen wurden auf die Proteinsequenz des nicht-modifizierten, wildtypischen CHMP4B umgerechnet und anschließend graphisch dargestellt. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in der Abbildung 2.34 zusammengefasst.



**Abbildung 2.34: Schematische Darstellung der quervernetzten Aminosäuren innerhalb von CHMP4B nach der Behandlung mit DSSO oder BS3. (A)** Die „37 kDa“-Probe weist sieben Lysine auf, die in verschiedenen Kombinationen miteinander verknüpft sind. Alle identifizierten Verknüpfungen beschränken sich auf den N-terminalen Bereich des Proteins, der die ersten zwei  $\alpha$ -Helices und ein kurzes Fragment im Anschluss darauf abdeckt. Die Behandlung der Probe mit DTT resultiert in einem vergleichbaren Ergebnis, wobei zwei Vernetzungen nicht mehr nachweisbar sind. **(B)** Die Vernetzung der „37 kDa“-Probe mit BS3 basiert hauptsächlich auf Vernetzungen von Lysinen, liefert jedoch auch Verknüpfungen von Serin und Tyrosin. Es werden insgesamt neun Aminosäuren identifiziert, die miteinander durch eine kovalente Bindung in unterschiedlichen Kombinationen verbunden sind. Alle identifizierten Vernetzungen beschränken sich auf den N-terminalen Bereich von CHMP4B zwischen den Positionen K14 und K114. Die Inkubation der mit DTT vorbehandelten Probe resultiert in einer Reduktion der gebildeten Verknüpfungen.

Wie aus der Abbildung 2.34 A zu entnehmen ist, wurden in der „37kDa“-Probe insgesamt sieben Lysine identifiziert, die durch die Behandlung mit DSSO miteinander verknüpft wurden. Diese Aminosäuren befanden sich im Abschnitt zwischen den Positionen K17 und K107 und beschränkten sich demnach auf den Bereich, der die beiden ersten  $\alpha$ -Helices sowie ein kurzes Fragment im Anschluss auf  $\alpha 2$  umfasste (Abb. 2.34 A). Die Vorbehandlung der Probe mit DTT resultierte in einem ähnlichen Ergebnis, wobei zwei zuvor identifizierte Verknüpfungen aufgehoben wurden (Abb. 2.34 A).

Die Behandlung der Proben mit BS3 resultierte in einem zu DSSO vergleichbaren Ergebnis (Abb. 2.34 B). Mittels der Inkubation der „37kDa-Probe“ mit BS3 wurden hauptsächlich Lysine miteinander verbunden, wobei ein geringer Anteil an Vernetzungen auf Serin und Tyrosin zurückzuführen war (Abb. 2.34 B). Die meisten identifizierten Positionen waren dabei mit der DSSO-Probe identisch und deckten den Bereich zwischen K14 und K114 ab. Analog zu der mit DSSO-behandelten Probe, führte auch in diesem Fall die Vorbehandlung mit DTT zur Reduktion von einigen identifizierten Quervernetzungen (Abb. 2.34 B).

Die Behandlung von CHMP4B mit DSSO und BS3 resultierte in dem Nachweis der quervernetzten Aminosäuren, die den Bereich der ersten zwei  $\alpha$ -Helices abdeckten. Dieses Ergebnis korreliert mit der Information, die über die Struktur von CHMP4B bekannt ist. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die beiden ersten  $\alpha$ -Helices miteinander wechselwirken und dabei eine helikale Haarnadel bilden (Martinelli et al., 2012). Das erhaltene Ergebnis, das auf der CX-MS-Methode basiert, unterstützt zwar die bereits bekannte Struktur, die durch die Kristallisation des verkürzten CHMP4B-Fragments identifiziert wurde (Martinelli et al., 2012), lässt jedoch keine Rückschlüsse auf die Zuordnung der weiteren Proteinbereiche zu.

### 3. Diskussion

Funktionelle Analysen der CC2D1-Proteine aus Säugern zeigen, dass es sich hierbei um Proteine handelt, die in ein breites Spektrum an intrazellulären Prozessen involviert sind, die neben der Regulation des Nervensystems und der angeborenen Immunantwort (Chang et al., 2011; Chen et al., 2012) Zellteilungsereignisse (Nakamura et al., 2008; Nakamura et al., 2009; Nakamura et al., 2010) umfassen. Dabei beziehen sich die meisten der beschriebenen Funktionen auf CC2D1A. Eine bestimmte Mutation in dem dafür kodierenden Gen in Menschen ist mit der Ausprägung einer Intelligenzminderung sowie Einschränkungen in kognitiven Fähigkeiten assoziiert (Basel-Vanagaite et al., 2006; Basel-Vanagaite et al., 2007). In Mäusen führt der CC2D1A-Verlust zu postnataler Letalität (Zhao et al., 2011; Al-Tawashi et al., 2012; Drusenheimer et al., 2015; Oaks et al., 2017).

Die Funktionen seines Homologs, CC2D1B, sind jedoch weitgehend unbekannt und beschränken sich hauptsächlich auf ein Teil der Aufgaben, die bereits von CC2D1A ausgeführt werden (Abel et al., 1997; Hadjighassem et al., 2009; Hadjighassem et al., 2011; Martinelli et al., 2012). Anders als bei *Cc2d1a*, handelt es sich bei *Cc2d1b* um kein essentielles Gen, da sein Verlust keine Auswirkungen auf die Vitalität von Mäusen hat (Drusenheimer et al., 2015). Folgen einer Mutation in humanen *CC2D1B* bzw. seines kompletten Ausfalls sind bislang nicht bekannt.

Ähnlich wie bei murinem CC2D1A, resultiert der Ausfall von Lgd in *D. melanogaster* in der Letalität der betroffenen Tiere, wobei die Ursache dafür in der Beeinträchtigung des endosomalen Transportwegs liegt. Dort wird Lgd höchstwahrscheinlich für die volle Funktion der ESCRT-III-Untereinheit Shrub und letztendlich für die fehlerfreie Verpackung des Notch-Rezeptors in ILVs benötigt (Schneider et al., 2013).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Funktion der CC2D1-Proteine aus Säugern in ESCRT-assoziierten Prozessen näher analysiert werden. Im Fokus dieser Untersuchung stand die Charakterisierung der Rolle der Säuger-Proteine in der Regulation des endosomalen Transportwegs sowie die direkte Folge der Interaktion zwischen CC2D1B und der Kernkomponente des ESCRT-III-Komplexes CHMP4B.

### **3.1 Die Funktion im endosomalen Transportweg ist innerhalb der CC2D1-Proteinfamilie konserviert und wird von beiden Säuger-Homologen ausgeführt**

Mehrere unabhängige Studien geben Indizien, dass CC2D1-Proteine aus Säugern in die Regulation des endosomalen Transportwegs involviert sein könnten. So konnte mittels *in vitro* Experimenten gezeigt werden, dass CHMP4B durch die Interaktion mit CC2D1A in seiner Polymerisation negativ beeinflusst wird (Martinelli et al., 2012).

Die Interaktion beider Proteine auf endogener Ebene wurde mit Hilfe der PLA-Analyse bestätigt, wobei dies zum ersten Mal für vollständige Proteine nachgewiesen werden konnte (Drusenheimer et al., 2015). Da die ESCRT-Maschinerie zahlreiche weitere intrazelluläre Vorgänge in der Zelle reguliert, ist die Wechselwirkung zwischen den beiden Proteinen jedoch kein direkter Beweis für die Funktion der Säuger-CC2D1-Proteine im endosomalen Transportweg und deutet lediglich darauf hin, dass sie in einem der Prozesse als Interaktionspartner fungieren.

Eine weitere Studie postuliert darauf, dass humane CC2D1-Proteine einen negativen Einfluss auf den Abbau von EGFR und TLR4 haben, indem sie an bereits gebildete Polymere von CHMP4B binden und dadurch die ILV-Abschnürung verhindern (Deshar et al., 2016). Kommt es zum Ausfall von einem der beiden CC2D1-Proteine, resultiert dies in einer beschleunigten Degradation der analysierten Rezeptoren. Allerdings beruhen diese Erkenntnisse auf Überexpressions- bzw. Knockdown-Experimenten in HeLa-Zellen und repräsentieren aufgrund dessen keine natürlichen Bedingungen.

Weitere Hinweise auf eine Beteiligung der CC2D1-Proteine an der Regulation des endosomalen Transportwegs liefert die immunzytochemische sowie die TEM-vermittelte ultrastrukturelle Analyse einzel-defizienter MEFs und einer mittels CRISPR/Cas9 generierten doppel-defizienten MEF-Linie (Migdal, 2016; Dissertation). Mit Hilfe dieser Untersuchungen konnte in *Cc2d1a*-KO MEFs ein schwacher endosomaler Phänotyp festgestellt werden, der sich durch das Auftreten von vergrößerten Endolysosomen äußerte, während ihre Morphologie nicht beeinträchtigt war. Obwohl sich in *Cc2d1b*-defizienten MEFs keine Abweichungen zur wildtypischen Situation detektieren ließen, führte der gleichzeitige Verlust beider Proteine zur Verstärkung des endosomalen Phänotyps. Dies äußerte sich durch eine Kombination aus vergrößerten ILVs und einer Ansammlung des elektronendichten Materials (Migdal, 2016; Dissertation).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die bereits beschriebenen einzel-defizienten MEFs erneut in Bezug auf Störungen im endosomalen Transportweg untersucht, wobei dies auf einer immunzytochemischen Analyse der endogenen Verteilung von RAB7- und LAMP1-

assoziierten Vesikeln basierte und somit der Charakterisierung der späteren vesikulären Stadien diene. Die TEM-gestützten Aufnahmen wurden zum Zweck einer detaillierten Analyse und Quantifizierung der identifizierten Strukturen verwendet. Zusätzlich zu den bereits erwähnten MEF-Linien wurden zwei Linien der doppel-defizienten MEFs charakterisiert, deren Generierung im Unterschied zur CRISPR/Cas9-basierten DKO-Linie mittels der Cre/loxP-Methode erfolgte und somit mögliche „*off-target*“-Effekte ausschließen sollte. Eine Kombination aus Western Blot (Abb. 2.4) und Massenspektrometrie (Tab. 2.1 - Tab. 2.2) bestätigte die vollständige Abwesenheit der jeweiligen Proteine in den zu analysierenden Zelllinien.

Die immunzytochemische Charakterisierung dieser Zellen ergab in allen Fällen einen vom Wildtyp abweichenden Phänotyp (Abb. 2.7). Sowohl die einzel-defizienten als auch die doppel-defizienten Zellen zeigten vorwiegend in der Zellkernperipherie eine Akkumulation von vergrößerten vesikulären Strukturen, die sich anhand ihrer Assoziation mit RAB7 und LAMP1 als Endolysosomen einstufen ließen (Abb. 2.7). Dieser Phänotyp konnte durch eine detaillierte ultrastrukturelle Analyse mittels TEM bestätigt werden (Abb. 2.9 – Abb. 2.12) und korrelierte zum größten Teil mit den bereits bekannten Daten. Analog zur Dissertation von B. Migdal konnte auch im Rahmen dieser Arbeit eine Abweichung in der Größe der Endolysosomen in *Cc2d1a*-defizienten Zellen im Vergleich zu wildtypischen MEFs beobachtet werden (Abb. 2.10). Während die wildtypischen Endolysosomen einen durchschnittlichen Umfang von ca.  $1485 \pm 490$  nm aufwiesen, lag der ermittelte Durchschnittswert in *Cc2d1a*-defizienten Zellen bei ca.  $1813 \pm 439$  nm. Dementsprechend traten bei *Cc2d1a*-defizienten MEFs Endolysosomen auf, die im Vergleich zur wildtypischen Probe in ihrem Umfang durchschnittlich um ca. 330 nm größer waren. Durch eine zusätzliche Aufteilung der identifizierten Endolysosomen in zwei Kategorien konnte die Größendifferenz zwischen den wildtypischen und *Cc2d1a*-defizienten Zellen spezifiziert werden (Abb. 2.12). Während 83% der wildtypischen Endolysosomen durch einen Umfang kleiner als 2000 nm gekennzeichnet waren und lediglich 17% diese Größe überschritten, waren bei *Cc2d1a*-defizienten MEFs 35% der Endolysosomen mit einem Umfang größer als 2000 nm detektierbar. Anders als bei dem zuvor beschriebenen Phänotyp (Migdal, 2016; Dissertation), konnte bei diesen Zellen zusätzlich zur Veränderung in der Größe eine Abweichung in der Morphologie der betroffenen Strukturen beobachtet werden. Die Endolysosomen aus *Cc2d1a*-defizienten Zellen behielten ihre typische runde Form bei, wiesen jedoch eine veränderte Lumenstruktur auf (Abb. 2.9 C<sup>II</sup>).

Eine detaillierte Charakterisierung der *Cc2d1b*-defizienten Zelllinie lieferte ebenfalls einen Hinweis auf die Implikation von CC2D1B in die Regulation des endosomalen Transportwegs, wobei im Rahmen dieser Arbeit ein CC2D1B-assoziiertes endosomales Phänotyp zum ersten Mal auf zellulärer Ebene identifiziert werden konnte (Abb. 2.7 B-B<sup>III</sup>; Abb. 2.9 B<sup>II</sup>). Die



morphologische Analyse dieser Zellen resultierte in einem zu den *Cc2d1a*-defizienten MEFs vergleichbaren Ergebnis. Auch in diesem Fall wurde die Form der identifizierten Endolysosomen nicht beeinträchtigt, jedoch die Struktur des Lumens. Eine quantitative Auswertung dieser Vesikel lieferte einen Zusammenhang zwischen dem CC2D1B-Verlust und der Größe der vorkommenden Endolysosomen. Diese Vesikel zeigten im Durchschnitt einen Umfang von  $1726 \pm 720$  nm und demzufolge eine Größenzunahme von etwa 240 nm (Abb. 2.10). Der relativ geringe Unterschied in der berechneten Durchschnittsgröße im Vergleich zum Wildtyp ist durch ein breites Gesamtspektrum von 400 nm bis 3799 nm erklärbar, in dem die Endolysosomen innerhalb der *Cc2d1b*-defizienten MEFs detektiert werden konnten (Abb. 2.11 A; Tab. 2.3). Eine Unterteilung der Endolysosomen in zwei Größenkategorien lieferte jedoch einen eindeutigen Nachweis dafür, dass der CC2D1B-Verlust mit einer Erweiterung des Endolysosomenumfangs assoziiert ist. 42% der Endolysosomen waren in ihrem Umfang größer als 2000 nm im Vergleich zu 17% der wildtypischen Endolysosomen innerhalb derselben Größenkategorie (Abb. 2.12).

Der in *Cc2d1b*-defizienten Zellen identifizierte Phänotyp (Abb. 2.7 und Abb. 2.9 – Abb. 2.12) und somit eine potentielle Rolle von CC2D1B bei der Regulation des endosomalen Transportwegs entspricht den Erwartungen, denn einige experimentelle Daten aus der Dissertation von B. Migdal geben bereits indirekte Hinweise auf seine mögliche Beteiligung an diesem Prozess. In Folge der Untersuchungen einer doppel-heterozygoten *Vps4a*<sup>+/-</sup>; *Vps4b*<sup>+/-</sup> MEF-Linie konnte dort gezeigt werden, dass die Reduktion der VPS4-Dosis in Störungen im endosomalen Transportweg resultiert. Als Folge dieser Störung treten stark vergrößerte Endolysosomen auf. Kommt es jedoch zusätzlich zur *Vps4*-Heterozygose zum Verlust von einem der beiden CC2D1-Homologe, resultiert dies in einer partiellen Reduktion der Endolysosomen-Größe (Migdal, 2016; Dissertation). Da beide Proteine in der Lage sind, einzeln den *Vps4*-bedingten Phänotyp zu schwächen, deutet dies auf ihre individuelle Beteiligung an der Regulation des endosomalen Transportwegs hin.

Außerdem korreliert ein vom Wildtyp abweichendes phänotypisches Erscheinungsbild in *Cc2d1b*-defizienten Zellen mit den *in vivo* Daten aus *D. melanogaster* (Drusenheimer et al., 2015). Dort konnte gezeigt werden, dass eine Kopie des humanen *CC2D1B* ausreichend ist, um den *lgd*-mutanten Phänotyp vollständig zu retten. Mit Hilfe von *in vivo* Experimenten wurde bewiesen, dass Lgd eine essentielle Rolle bei der Regulation des endosomalen Transportwegs spielt und sein Ausfall die Letalität der Tiere im frühen Puppenstadium auslöst (Schneider et al., 2013). In diesem Zusammenhang könnte also davon ausgegangen werden, dass eine Rettung durch humanes CC2D1B nur dann möglich wäre, wenn dieses Protein die Funktion von Lgd in *D. melanogaster* übernehmen und fehlerfrei ausführen könnte. Ist dies der Fall, deutet es auf eine konservierte Funktion in dem analysierten Prozess hin. CC2D1B ist

dank seiner hohen Homologie zu Lgd und der potentiellen Konservierung in der Regulation des endosomalen Transportwegs in der Lage, bereits in einer Kopie den mutanten Phänotyp komplett aufzuheben und trägt hiermit zur vollständigen Entwicklung von *lgd*-defizienten Fliegen bei. Auch im Fall einer *CC2D1A*-Expression in *lgd*-defizienten Fliegen unter dem *lgd*-Promoter kommt es zu einer fast vollständigen Rettung der betroffenen Individuen. Diese Tiere entwickeln sich zu ausdifferenzierten adulten Fliegen, die jedoch Schlüpfdefekte aufweisen (Drusenheimer et al., 2015). Die nicht vollständige Rettung ist möglicherweise auf eine Verlängerung im C-Terminus und somit auf etwas geringere Homologie zwischen *CC2D1A* und *Lgd* zurückzuführen. Dies belegt, dass sowohl die hohe Homologie als auch eine Konservierung im selben Prozess für das Rettungsvermögen von zentraler Bedeutung sind, wobei beide Kriterien bei humanen Proteinen zum größten Teil erfüllt sind.

Das Rettungsvermögen der humanen *CC2D1*-Proteine und der beobachtete endosomale Phänotyp in *Cc2d1*-defizienten Zellen stehen in Korrelation zueinander, wobei aufgrund beider Ereignisse auf die Funktion der Säuger-*CC2D1*-Proteine in der Regulation des endosomalen Transportwegs rückgeschlossen werden kann. Der Grad der Involvierung in diesem Prozess scheint jedoch zwischen den Organismen unterschiedlich zu sein. Während *lgd*-defiziente Fliegen im Laufe ihrer Puppenentwicklung höchstwahrscheinlich infolge eines fehlgesteuerten endosomalen Transportweges sterben (Schneider et al., 2013), sind *Cc2d1b*-defiziente Mäuse lebensfähig und fertil (Drusenheimer et al., 2015). Diese Tatsache lässt darauf schlussfolgern, dass die Funktion von *CC2D1B* in der Regulation des endosomalen Transportwegs nicht entscheidend ist und höchstwahrscheinlich akzessorisch ausgeführt wird. Kommt es zu seinem Funktionsverlust, resultiert dies lediglich in einem milden endosomalen Phänotyp, der mit der Vitalität der Tiere kompatibel ist. Möglicherweise wird der *CC2D1B*-Verlust durch die Funktion von *CC2D1A* zum größten Teil kompensiert, was auf ihre funktionelle Redundanz in diesem Prozess hindeuten würde. Fallen beide Proteine aus, resultiert dies in einer Verstärkung des endosomalen Phänotyps in MEFs, wobei Endolysosomen ihre typische runde Form verlieren und durch zahlreiche, große ILVs in Kombination mit elektronendichtem Material gekennzeichnet sind (Abb. 2.9 D<sup>II</sup>-E<sup>II</sup>). Die beobachtete Morphologie wird durch bereits bekannten Daten bestätigt (Migdal, 2016; Dissertation) und lässt vermuten, dass der Verlust beider Proteine in einer gestörten Degradation der aufgenommenen Fracht und der damit assoziierten Erweiterung der ILVs resultiert. Jedoch scheint der Verlust beider Proteine keine gravierende Änderung in der Größe der Endolysosomen im Vergleich zu den einzeldefizienten Zellen zu verursachen, denn auch in diesem Fall unterscheiden sich diese Strukturen im Durchschnitt um ca. 300-400 nm von wildtypischen Vesikeln (Abb. 2.10).

Interessanterweise konnte bei keiner untersuchten Linie eine Änderung in der Morphologie oder Größe der Lysosomen identifiziert werden (Abb. 2.9 A<sup>I</sup>-E<sup>I</sup> und Abb. 2.13). Dies lässt vermuten, dass die *Cc2d1*-assoziierte Störung Endolysosomen-spezifisch ist. Diese

---

Vermutung steht im Einklang mit *in vivo* Daten aus *D. melanogaster*, die ebenfalls zeigen, dass die Biogenese der Lysosomen unter dem Lgd-Verlust nicht gestört zu sein scheint und die Lysosomen keine Auffälligkeiten aufweisen (Schneider et al., 2013).

Wie bereits besprochen, führt eine *lgd*-bedingte Störung im endosomalen Transportweg in *D. melanogaster* höchstwahrscheinlich zur unvollständigen Verpackung des Notch-Rezeptors mit der daraus resultierenden Liganden-unabhängigen Aktivierung des Notch-Signalwegs (Schneider et al., 2013). Unter diesen Bedingungen lassen sich vergrößerte, Rab7-positive Vesikel nachweisen, die durch eine Akkumulation des Notch-Rezeptors gekennzeichnet sind. Die immunzytochemische Analyse der Notch2-Verteilung in defizienten MEF-Linien zeigte jedoch keine Auffälligkeiten im Vergleich zur wildtypischen Situation (Abb. 2.15). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die beobachtete milde Störung im endosomalen Transportweg unter dem Ausfall der Säuger-CC2D1-Proteine entweder keinen oder einen schwachen Effekt auf die endosomale Transportroute des Notch-Rezeptors ausübt, der mittels der Fluoreszenz-Mikroskopie oder unter der Verwendung des gewählten Antikörpers nicht detektierbar ist. Um dennoch minimale Änderungen in der Aktivität des Notch-Signalwegs identifizieren zu können, die ihren Ursprung in einem gestörten endosomalen Transportweg haben könnten, erfolgte die Messung der Expression seines Zielgens *Nrarp* (Abb. 2.16).

Mit Hilfe der quantitativen PCR konnte gezeigt werden, dass der CC2D1A-Verlust in MEFs, dessen Ausfall in Mäusen zu letalen Folgen führt, das *Nrarp*-Expressionslevel nicht affiziert. Die Expression des Notch-Zielgens in *Cc2d1a*-defizienten Zellen war mit der wildtypischen Situation vergleichbar. Dieses Ergebnis wird durch bereits publizierten Daten unterstützt. Dort lieferte eine *in vivo* Analyse den Beweis dafür, dass der CC2D1A-Verlust in murinem Darmepithelium keine Auswirkungen auf die Aktivität des Notch-Signalwegs hat (Drusenheimer et al., 2015). Die Messung der Expression von *Hes1*, einem weiteren Notch-Zielgen in Säugern, resultierte ebenfalls in keinen Abweichungen zur Kontrollprobe. Des Weiteren zeigte eine Zellkultur-basierte Analyse, dass der Abbau von Notch1 in *Cc2d1a*-defizienten Zellen nicht beeinträchtigt ist (Drusenheimer et al., 2015). Das im Rahmen dieser Arbeit erzielte Ergebnis wird somit durch die publizierten Daten unterstützt und beweist zusätzlich, dass der individuelle CC2D1A-Verlust und der damit assoziierte Effekt im endosomalen Transportweg keine Wirkung auf die Aktivität des Notch-Signalwegs ausübt.

Im Gegensatz dazu lieferte die Analyse *Cc2d1b*-defizienter MEFs eine Verringerung in der Expression von *Nrarp* um ca. 50%. Diese Beobachtung könnte durch einen verstärkten Abbau des Notch-Rezeptors erklärt werden, der letztendlich in einer verminderten Freisetzung von NICD und dementsprechend in einer Verringerung der Expression der Notch-Zielgene resultiert. Studien in HeLa-Zellen zeigen, dass CC2D1B durch seine Bindung an CHMP4B-Polymere die Degradation von EGFR und TLR4 verzögert. Kommt es zum CC2D1B-Ausfall,

wird der Abbau beider Rezeptoren beschleunigt (Deshar et al., 2016). In dieser Hinsicht wäre hier ein möglicher Zusammenhang zwischen der CC2D1B-Verlust-bedingten Verringerung in der Aktivität des Notch-Signalwegs und einer erhöhten Abbaurate des Notch-Rezeptors möglich.

Interessanterweise scheint der Verlust beider Proteine zu einer Steigerung der *Nrarp*-Expression im Vergleich zum Wildtyp zu führen (Abb. 2.16). Dies weist auf eine Erhöhung in der Aktivität des Notch-Signalwegs in der doppel-defizienten Situation hin. Die Änderung in der Expression von *Nrarp* korreliert mit der Änderung der Endolysosomen-Morphologie in den betroffenen Zellen. Die Endolysosomen der doppel-defizienten Zellen zeichnen sich durch den Verlust ihrer runden Form sowie durch die Anwesenheit von großen intraluminalen Vesikeln aus. Die erhöhte Aktivität des Notch-Signalwegs und die Morphologie der Endolysosomen sind mit einem verlangsamten Abbau des Notch-Rezeptors kompatibel.

Möglicherweise spielt die funktionelle Redundanz der CC2D1-Proteine eine Rolle bei der Regulation der Aktivität des Notch-Signalwegs. Während der individuelle Ausfall von einem der beiden Proteine höchstwahrscheinlich durch die Funktion des anderen Proteins zum größten Teil kompensiert wird, fällt diese Funktion beim Verlust beider Proteine weg. Dies äußert sich dementsprechend in der Ausprägung eines vom Wildtyp abweichenden Phänotyps.

Im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten geben Indizien dafür, dass die Funktion der CC2D1-Proteine aus Säugern im endosomalen Transportweg höchstwahrscheinlich konserviert ist. Da der endosomale Phänotyp unter dem individuellen Verlust beider Proteine identifiziert werden konnte, scheinen beide Homologe in die Regulation dieses Prozesses involviert zu sein. Der gleichzeitige Ausfall beider Proteine resultiert zusätzlich zum endosomalen Phänotyp in einer erhöhten Aktivität des Notch-Signalwegs. Diese Aktivierung ist jedoch minimal und kann nur mit sehr sensitiven Methoden nachgewiesen werden. In dieser Hinsicht wäre es interessant, in weiterführenden Experimenten CC2D1-Proteine möglichst nah am endogenen Level transient in defizienten Zellen zu exprimieren und zu testen, ob der beobachtete endosomale Phänotyp und die damit verbundene Erhöhung in der Aktivität des Notch-Signalwegs aufgehoben werden können.

Aktuell liegen keine experimentellen Daten vor, die die Letalität von *Cc2d1a*-defizienten oder doppel-defizienten Mäusen durch eine Störung im endosomalen Transport direkt begründen würden. Dennoch gibt es Indizien auf einen möglichen Zusammenhang. So wurde die Ateminsuffizienz sowie die Schluckunfähigkeit als eigentlicher Grund für die Sterblichkeit *Cc2d1a*-defizienter Mäuse eingestuft, wobei beide Störungen auf eine Dysfunktion der hippocampischen Neuronen zurückgeführt werden (Zhao et al., 2011; Al-Tawashi et al., 2012;

Oaks et al., 2017). Es konnte gezeigt werden, dass die *Cc2d1a*-Defizienz in Zellen sich negativ auf die synaptische Plastizität auswirkt sowie zu einer reduzierten Dendriten-Komplexität führt (Zhao et al., 2011; Al-Tawashi et al., 2012; Oaks et al., 2017). Interessanterweise lieferte eine Analyse der Zellen nach dem Ausfall von CHMP2B, einer ESCRT-III-Untereinheit, ein ähnliches Ergebnis (Chassefeyre et al., 2015). Dort konnte gezeigt werden, dass der Verlust von CHMP2B in hippocampischen Neuronen ebenfalls in einer verminderten synaptischen Plastizität sowie in einer Reduktion der Dendriten-Verzweigung resultiert. Dies könnte ein indirekter Hinweis dafür sein, dass der Neuronen-basierter Phänotyp in *Cc2d1a*-defizienten Mäusen eventuell mit der Funktion der ESCRT-Maschinerie in Verbindung steht. In diesem Zusammenhang wäre es in weiterführenden Experimenten interessant, den endosomalen Phänotyp im Gehirngewebe einzel-defizienter Mäuse zu analysieren. Eine elektronenmikroskopische Analyse soll die Auskunft darüber geben, ob der endosomale Phänotyp in diesem Gewebe stärker zum Vorschein kommt als in MEFs. Mit Hilfe eines Gehirn-spezifischen Knockouts wäre eine Aussage darüber möglich, ob der gleichzeitige Verlust beider Proteine sich in einem verstärkten endosomalen Phänotyp äußert. Um den Effekt auf die Aktivität des Notch-Signalwegs zu validieren, soll in weiteren Analysen die Expression von *Nrarp* im Gewebe charakterisiert werden, das durch den aktiven Notch-Signalweg gekennzeichnet ist. In diesem Zusammenhang wäre eine Messung im Darmgewebe sinnvoll.

### **3.2 CC2D1-Proteine tragen in unterschiedlichem Maße zur Integrität der Kernhülle bei**

Wie bereits im Abschnitt 1.2 erwähnt wurde, steuert die ESCRT-Maschinerie neben dem endosomalen Transportweg, unter anderem, die Neuassemblierung der Kernhülle nach der Zellteilung und sorgt demzufolge für die Integrität der Zellkerne (Olmos et al., 2015; Vietri et al., 2015; Ventimiglia et al., 2018). Die zentrale Komponente, die die Wiederverschließung der Kernhülle koordiniert, stellt dabei das Protein CHMP7 dar. Es handelt sich um ein akzessorisches Protein des ESCRT-III-Komplexes, das dank seines verlängerten N-Terminus einzigartig in dieser Proteinfamilie ist (Olmos et al., 2016). Mittels Zellkulturexperimente konnte gezeigt werden, dass CHMP7 seine intrazelluläre Lokalisation abhängig von der Zellteilungsphase ändert. In der Interphase und am Anfang der Mitose lokalisiert das Protein sowohl im Zytoplasma als auch am ER, während das Protein kurz vor dem Ende der Mitose an die Kernhülle rekrutiert wird (Olmos et al., 2016). Die Prälokalisierung am ER kurz vor dem Austritt aus der Mitose wird durch seinen N-Terminus vermittelt und ist wichtig für die anschließende Rekrutierung der ESCRT-Proteine zu der sich wiedererschließenden Kernhülle, die durch die Interaktion mit CHMP4B mittels seiner C-terminalen Domäne ausgeführt wird (Olmos et al., 2016).

Neue Erkenntnisse geben Hinweise darauf, dass CC2D1B mit der Regulation der Neuassemblierung der Kernhülle nach der Zellteilung in Verbindung steht und auf diese Weise zur Aufrechterhaltung der nukleären Integrität beiträgt (Ventimiglia et al., 2018). Ausgehend von den Resultaten der Charakterisierung der *Cc2d1b*-defizienten Zellen, die auf der Basis von siRNA- oder CRISPR/Cas9-Experimenten erzielt wurden, hat die Gruppe von Martin-Serrano eine Hypothese aufgestellt, die dem CC2D1B eine essentielle Rolle bei der zeitlich gesteuerten Rekrutierung der ESCRT-Proteine an die Kernmembran zuschreibt. Es wird vermutet, dass CC2D1B mittels seiner dritten DM14-Domäne an CHMP4B bindet, um das ESCRT-III-Protein in seiner monomeren Form im Zytoplasma zu stabilisieren und auf diese Weise eine verfrühte oder fehlerhafte Polymerisation zu verhindern. Seine C2-Domäne soll hingegen die Bindung an die Kernhülle ermöglichen, wodurch eine präzise CHMP4B-Rekrutierung an die Öffnungen in der Kernhülle erreicht wird. Es wird angenommen, dass es anschließend zur Bildung eines transienten Komplexes bestehend aus CC2D1B, CHMP4B und CHMP7 kommt, um nach der Dissoziation von CC2D1B die CHMP4B-Polymerisation zu begünstigen. Kommt es zum CC2D1B-Ausfall, wird eine asynchrone und verfrühte Rekrutierung der ESCRT-Proteine an die Kernhülle ausgelöst, wobei die Öffnungen in der Kernlamina noch vor dem vollständigen Abbau der Spindel-Mikrotubuli verschlossen werden. Infolgedessen bleiben Zellkerne zurück, die deformiert sind und Einkerbungen in der Kernlamina aufweisen. Dieser Phänotyp ist dennoch nicht penetrant und kommt lediglich in 40% der *Cc2d1b*-defizienten Zellen vor. Er weist somit eine Verdopplung in der Anzahl der betroffenen Zellkerne im Vergleich zur wildtypischen Situation mit 20% defekter Zellkerne auf (Ventimiglia et al., 2018). Ob eine mögliche Ursache der relativ schwachen Ausprägung des beobachteten Phänotyps in der funktionellen Redundanz der CC2D1-Proteine liegt, wurde in dieser Studie nicht untersucht und blieb offen. Da in der analysierten *Cc2d1b*-Knockdown-Situation CC2D1A weiterhin exprimiert wird, kann es nicht ausgeschlossen werden, dass der CC2D1B-Verlust durch die Beteiligung von CC2D1A an diesem Prozess kompensiert wird. In dem Zusammenhang wäre es ein denkbarer Grund für die relativ schwache Penetranz des identifizierten Phänotyps.

Eine weitere mögliche Erklärung des schwachen Phänotyps könnte eventuell im Ursprung der verwendeten Zelllinien liegen. Für die vorgestellte Analyse wurden Zellen eingesetzt, die entweder mit *Cc2d1b*-siRNA transfiziert wurden, um in der Expression von CC2D1B unterdrückt zu werden, oder mittels des CRISPR/Cas9-Systems erzeugt wurden (Ventimiglia et al., 2018). Da beide Methoden keine 100%-Effizienz versprechen, kann eine eventuell vorhandene Restfunktion des Proteins in diesen Zellen nicht ausgeschlossen werden.

Um eine mögliche Rolle von CC2D1B in der Aufrechterhaltung der Kernlamina zu überprüfen, wurde im Rahmen dieser Dissertation eine stabile *Cc2d1b*-defiziente MEF-Linie eingesetzt,

die ihren Ursprung in *Cc2d1b*-defizienten Mäusen hatte und dementsprechend keine zusätzliche Manipulation zur Unterdrückung der CC2D1B-Expression erforderte (Abb. 2.2). Der vollständige CC2D1B-Ausfall innerhalb dieser Zelllinie wurde durch eine Kombination aus Western Blot (Abb. 2.4) und MS-Analyse (Tab. 2.2) bestätigt.

Um die Frage bezüglich einer möglichen funktionellen Redundanz beider CC2D1-Proteine zu beantworten und demzufolge den identifizierten Phänotyp korrekt interpretieren zu können, wurde die Charakterisierung der *Cc2d1b*-defizienten Zellen durch die Analyse der *Cc2d1a*-defizienten sowie der DKO-MEFs erweitert.

Eine Kombination aus einer qualitativen morphologischen Untersuchung und der quantitativen Auswertung der gewonnenen Daten lieferte durch den Vergleich der *Cc2d1b*-defizienten Zellen mit den wildtypischen MEFs ein Ergebnis, das mit den bereits bekannten Literaturdaten übereinstimmt. In beiden analysierten Zelllinien traten Zellkerne auf, deren Kernhülle sich als morphologisch defekt beschreiben ließ (Abb. 2.17 A-A<sup>III</sup>; B-B<sup>III</sup>). Eine statistische Analyse, die auf zwei unabhängigen Methoden basierte, ermöglichte eine quantitative Differenzierung zwischen den einzelnen Genotypen (Abb. 2.18; Tab. 2.4). Beide Methoden haben ergeben, dass *Cc2d1b*-defiziente Zellen im Durchschnitt in 43,5% der Fälle Zellkerne aufwiesen, die durch die Anwesenheit der beschriebenen Einkerbungen gekennzeichnet waren. Da der Anteil an Zellen mit defekten Zellkernen in der wildtypischen Situation sich durchschnittlich auf 17,5% beschränkte, deutet der ca. 2,5-fache Anstieg in der Anzahl der deformierten Zellkerne auf eine Rolle von CC2D1B in diesem Prozess hin. Die im Rahmen dieser Analyse identifizierte Penetranz, mit der die defekten Zellkerne in beiden Zelllinien auftraten, korreliert mit den Ergebnissen der Gruppe von Martin-Serrano (Ventimiglia et al., 2018). Da die Ergebnisse innerhalb einer validierten stabilen Zelllinie mit den Daten übereinstimmen, die aus siRNA behandelten oder CRISPR-Cas9-erzeugten Zellen stammen, kann eine Restfunktion von CC2D1B als mögliche Ursache der relativ niedrigen Penetranz ausgeschlossen werden.

Anders als bei *Cc2d1b*-defizienten Zellen äußerte sich der Ausfall von CC2D1A in einer 1,5-fachen Erhöhung des Anteils der betroffenen Zellen und resultierte demzufolge in einem schwächer ausgeprägten Phänotyp (Abb. 2.17 C-C<sup>III</sup>). In diesem Fall waren 26% der Zellen durch die Abweichungen in der Zellkernmorphologie im Vergleich zu 17,5% den wildtypischen Zellen gekennzeichnet (Abb. 2.18; Tab. 2.4). Dies lässt darauf schließen, dass CC2D1A einen milden Einfluss auf die ESCRT-vermittelte Neuassemblierung der Kernhülle hat und deutet auf eine dem CC2D1B untergeordnete Rolle in diesem Prozess hin.

Die Frage, ob beide Proteine in der Regulation der nukleären Reassemblierung funktionell redundant agieren, konnte durch einen direkten Vergleich der doppel-defizienten MEFs mit der wildtypischen bzw. einzel-defizienten Situationen beantwortet werden. Der in beiden DKO-



---

Linien identifizierte Phänotyp stimmte mit dem Ergebnis der Analyse der *Cc2d1b*-defizienten MEFs überein (Abb. 2.18; Tab. 2.4). Die morphologischen Defekte, die sich durch Invaginationen innerhalb der Kernhülle identifizieren ließen, traten in beiden doppel-defizienten Linien mit einer zum *Cc2d1b*-KO vergleichbaren Häufigkeit auf. Die Frequenz des Auftretens der morphologischen Effekte in Form von Invaginationen innerhalb der Kernhülle war in beiden doppel-defizienten Zellen um den Faktor „2,0-2,6“ erhöht und spiegelte somit den *Cc2d1b*-KO-basierten Effekt wieder. Diese Daten legen nahe, dass CC2D1-Proteine keine redundante Funktion in der Aufrechterhaltung der Integrität der Kernhülle aufweisen, wobei der in doppel-defizienten Zellen identifizierte Phänotyp auf den CC2D1B-Verlust zurückzuführen ist.

Da der Phänotyp in weniger als in 50% der beobachteten *Cc2d1b*-defizienten und in fast 20% der wildtypischen Zellen zu erkennen war, kann hier nicht, wie in der publizierten Studie behauptet wird, von einer essentiellen Rolle von CC2D1B in diesem Prozess ausgegangen werden. Gegen seine zentrale Funktion spricht auch die Tatsache, dass *Cc2d1b*-defiziente Mäuse in ihrer Vitalität nicht beeinträchtigt sind und keine erkennbaren physischen Einschränkungen zeigen (Drusenheimer et al., 2015), obwohl abnormale oder verformte Zellkerne in Korrelation mit einem Spektrum an Erkrankungen, unter anderem mit Tumorbildung, stehen (Übersicht in Webster et al., 2009). Wäre die CC2D1B-Funktion in so einem zentralen Prozess wie die Aufrechterhaltung der intakten Kernhülle und somit der genetischen Stabilität essentiell, wäre hier ein penetranter Phänotyp mit der damit assoziierten Beeinträchtigung bis hin zur Letalität der betroffenen Tiere zu erwarten. Basierend auf den phänotypischen und statistischen Daten, die im Rahmen dieser Arbeit gewonnen wurden, kann CC2D1B eine akzessorische und keine essentielle Funktion in diesem Prozess zugewiesen werden, wobei sein Ausfall mit negativen Auswirkungen auf die Integrität der Zellkerne verbunden ist.

Die Reassemblierung der Kernhülle nach der Mitose hängt primär von der Funktion der ESCRT-Maschinerie ab. Da der finale Schritt bei der Wiederverschließung der Kernhülle durch die ATPase VPS4 durchgeführt wird, deren Aufgabe in der Disassemblierung der ESCRT-III-Filamente und der Unterstützung der Kernhüllenfusion liegt (Olmos et al., 2015; Vietri et al., 2015; Olmos et al., 2016), wären bei einer Funktionsstörung von VPS4 ebenfalls Defekte in der nukleären Lamina-Integrität zu erwarten. Die Analyse der *Vps4a*<sup>+/-</sup>;*Vps4b*<sup>+/-</sup>- MEFs lieferte einen direkten Nachweis dafür (Abb. 2.18; Tab. 2.4). Es konnte gezeigt werden, dass die in der heterozygoten Situation vorliegende Dosisreduktion von VPS4 um 50% bereits ausreichend war, um einen detektierbaren Effekt auf Zellkerne auszulösen. Die *Vps4a*<sup>+/-</sup>;*Vps4b*<sup>+/-</sup>- MEFs äußerten sich im Vergleich zum Wildtyp in einem Anstieg in dem Anteil der defekten Zellkerne um den Faktor „1,7“. Demzufolge waren unter dieser Situation 31% der

---

Zellen identifizierbar, die Einkerbungen in der Kernlamina aufwiesen. Der quantifizierte Anteil an betroffenen Zellen, die in der *Vps4*-doppel-heterozygoten Situation identifiziert wurden, lag höher als im Fall des vollständigen CC2D1A-Knockouts und bestätigte eine übergeordnete Rolle von VPS4 in diesem Prozess. Die reduzierte Dosis der ATPase VPS4 führt höchstwahrscheinlich zu einer ineffizienten Disassemblierung der ESCRT-III-Untereinheiten und somit zu den Defekten bei der Fusion der Öffnungen in der Kernhülle.

Anders als bei der Gruppe von Martin-Serrano, konnten persistente Mikrotubuli nicht als die Ursache zur Entstehung der Einkerbungen in der Kernlamina bestimmt werden. Unabhängig von dem untersuchten Genotyp waren in keinem der Fälle Mikrotubuli detektierbar, die den kompletten Zellkern durchdringen (Abb. 2.19). Im Gegensatz dazu konnten die Mikrotubuli ansatzweise an den Stellen nachgewiesen werden, die durch eine Invagination der Kernhülle gekennzeichnet waren. Dieser Phänotyp war bei wildtypischen und *Cc2d1a*-defizienten Zellen schwächer vertreten als bei *Cc2d1b*-einzel- oder doppel-defizienten Zellen. Diese Ergebnisse korrelieren mit den Erwartungen, denn persistente Mikrotubuli, die den gesamten Zellkern durchqueren, würden den Zellkern höchstwahrscheinlich funktionell beeinträchtigen und als ein Signal zur Auslösung der Apoptose fungieren. Da bei keiner der untersuchten Zellen ein Anzeichen für die Apoptose erkennbar war und *Cc2d1b*-defiziente Mäuse vital sind, ist hier ein Phänotyp mit persistenten Mikrotubuli unwahrscheinlich.

Anders als bei *Cc2d1*-defizienten Zellen waren im Fall von *Vps4a*<sup>+/-</sup>;*Vps4b*<sup>+/-</sup>-MEFs erwartungsgemäß keine Mikrotubuli an den Invaginationsstellen zu erkennen (Abb. 2.19 F<sup>III</sup>). Da der VPS4-Komplex die Dissoziation der ESCRT-III-Untereinheiten ausführt, wird seine Aktivität in der finalen Phase der Wiederverschließung der Kernhülle und dementsprechend erst nach dem bereits erfolgten Abbau der Spindel-Mikrotubuli durch Spastin benötigt. Demzufolge wäre bei diesem Phänotyp kein Mikrotubuli-Phänotyp zu erwarten.

Als molekulare Ursache des beobachteten Phänotyps in *Cc2d1b*-siRNA-Zellen wurde die fehlende Interaktion zwischen CC2D1B, CHMP4B und CHMP7 und die damit verbundene Störung in der zeitlichen Koordination der ESCRT-Assemblierung beschrieben (Ventimiglia et al., 2018). Mit Hilfe der Co-IP-Analyse (Abb. 2.20) sowie auf Basis der bereits bekannten Interaktionsdaten aus Pulldown- (Nadja Drusenheimer - AG Klein; unveröffentlicht) und FRET (Migdal, 2016; Dissertation)-Experimenten konnte gezeigt werden, dass sowohl CC2D1A als auch CC2D1B in der Lage sind, mit CHMP7 zu interagieren. Dennoch scheint die Interaktion zwischen CC2D1A und CHMP7 keine wichtige Rolle bei dem Prozess der Reassemblierung der Kernmembran nach der Mitose zu spielen, da der CC2D1A-Ausfall zu keinem gravierenden Anstieg an defekten Zellkernen führt.

Interessanterweise scheint CHMP7 durch seine Interaktion mit CC2D1B in seiner Lokalisation beeinflusst zu werden. Wie bereits beschrieben, handelt es sich bei CHMP7 um ein Protein, das sowohl am ER assoziiert als auch vesikulär im Zytoplasma verteilt ist (Olmos et al., 2016; Ventimiglia et al., 2018). Mit Hilfe von immunzytochemischen Analyse konnte seine in der Literatur beschriebene Verteilung auf endogener Ebene bestätigt werden (Abb. 2.21). Unter wildtypischen Bedingungen konnte das Protein zum größten Teil im Zytoplasma in vesikulärer Form nachgewiesen werden, wobei eine kleine CHMP7-Fraktion an Strukturen lokalisierte, die anhand ihrer typischen tubulären Form und der Lokalisation in der Nukleus-Peripherie als ER eingestuft wurden (Abb. 2.21 A-A<sup>II</sup>). Die Analyse der *Cc2d1a*-defizienten MEFs ergab milde Abweichungen zur wildtypischen Situation (Abb. 2.21 C-C<sup>II</sup>). Im Unterschied dazu resultierte der CC2D1B-Verlust in einer verstärkten CHMP7-Akkumulation am ER (Abb. 2.21 B-B<sup>II</sup>). Die Akkumulation an diesen Strukturen korrelierte mit der Abnahme der vesikulär-assoziierten Fraktion, die für CHMP7 positiv war. Die Charakterisierung der doppel-defizienten MEFs ergab erwartungsgemäß denselben Phänotyp wie bei der Analyse der *Cc2d1b*-defizienten Zellen (Abb. 2.21 D-E<sup>II</sup>). Eine verstärkte CHMP7-Relokalisation ans ER korreliert mit der verfrühten Assemblierung der ESCRT-Proteine an der Kernhülle und dementsprechend mit den damit assoziierten Defekten in der Kernmorphologie. Wie bereits beschrieben, spielt die Prälokalisierung von CHMP7 am ER eine zentrale Rolle bei der Rekrutierung der weiteren ESCRT-Proteine, um die Neuassemblierung der Kernhülle zu initiieren. Aufgrund der Tatsache, dass die Kernhülle aus ER-Membranen reassembliert wird und CHMP7 sich unter der *Cc2d1b*-Defizienz verstärkt unmittelbar in Zellkernnähe befindet, würde dies seine verfrühte Rekrutierung und die damit verbundene Verschließung der Kernhülle unkontrolliert begünstigen.

Erwartungsgemäß war die CHMP7-Relokalisation in der *Vps4a*<sup>+/-</sup>;*Vps4b*<sup>+/-</sup>-heterozygoten Situation nicht gegeben, wobei in diesen Zellen CHMP7 hauptsächlich an vesikulären Strukturen lokalisiert war. Dieser Phänotyp lieferte einen zusätzlichen Nachweis der Spezifität des beobachteten Phänotyps in *Cc2d1b*-KO und doppel-defizienten Zellen in Bezug auf die CHMP7-Lokalisation.

Mittels der immunzytochemischen Analyse der *Cc2d1a*<sup>+/+</sup>; *Cc2d1b*<sup>-/-</sup> und *Cc2d1a*<sup>-/-</sup>; *Cc2d1b*<sup>-/-</sup> Zelllinien konnte bestätigt werden, dass CC2D1B an der Regulation der nukleären Laminaintegrität beteiligt ist. Diese Funktion scheint auf seiner Interaktion mit CHMP7 zu beruhen. Der CC2D1B-Verlust äußert sich in einer Änderung der Lokalisation von CHMP7, die wiederum die Ursache der verfrühten und fehlerhaften Wiederverschließung der Zellkernhülle sein könnte. Die betroffenen Zellen zeichnen sich als Folge dessen durch deformierte und invaginierte Zellkerne aus. Um zusätzlich zu bestätigen, dass die geänderte CHMP7-Lokalisation tatsächlich auf dem CC2D1B-Verlust basiert, soll in weiteren Experimenten die subzelluläre CHMP7-Verteilung unter transienter CC2D1B-Expression sowohl in *Cc2d1b*- als

auch in doppel-defizienten MEFs analysiert werden. Um seine Lokalisation mit der wildtypischen Situation vergleichen zu können, soll CC2D1B möglichst auf einem endogenen Level exprimiert werden. Wird mit Hilfe der transienten Expression eine zur wildtypischen Situation vergleichbare Verteilung von CHMP7 bestätigt, wäre die Analyse der Expression von CC2D1B- $\Delta$ DM14 4 in *Cc2d1b*-defizienten Zellen sinnvoll. Mittels *in vitro* Experimente konnte gezeigt werden, dass die vierte DM14-Domäne von CC2D1B für die Interaktion mit CHMP7 benötigt wird (Ventimiglia et al., 2018). Würde es im Fall der Expression dieser Proteinvariante zur CHMP7-Lokalisation führen, die unter *Cc2d1b*-defizienten Bedingungen identifiziert wurde, wäre dies ein zusätzlicher Hinweis darauf, dass die beobachtete Störung in der nukleären Lamina-Integrität ein Resultat der fehlenden Interaktion zwischen CC2D1B und CHMP7 ist.

Im Rahmen dieser Dissertation konnte mit Hilfe einer stabilen *Cc2d1b*-defizienten MEF-Linie bestätigt werden, dass CC2D1B an der Regulation der Prozesse beteiligt ist, die die Integrität der Kernmembran nach der erfolgten Mitose koordinieren. Da der Zellkern-Phänotyp nicht in allen *Cc2d1b*-defizienten Zellen auftritt und zu einem gewissen Anteil bereits in den wildtypischen Zellen feststellbar ist, scheint die Rolle vom CC2D1B in diesem Prozess akzessorisch und nicht zentral zu sein. Obwohl der CC2D1A-Ausfall ebenfalls im Zusammenhang mit einer Steigerung in der Anzahl an Zellen mit defekten Zellkernen steht, ist der in diesen Zellen identifizierte Defekt deutlich schwächer ausgeprägt als nach dem CC2D1B-Verlust. Da der gleichzeitige Ausfall beider CC2D1-Proteine in einem Phänotyp resultiert, der mit der *Cc2d1b*-defizienten Situation vergleichbar ist, scheinen CC2D1B und CC2D1A keine redundante Funktion in diesem Prozess zu haben.

### **3.3 CHMP4B favorisiert in Lösung den geschlossenen Zustand. Seine Konformation wird durch die Interaktion mit CC2D1B nicht beeinflusst**

Der ESCRT-III-Komplex stellt die dynamischste Untereinheit der ganzen ESCRT-Maschinerie dar, denn seine einzelnen monomeren Komponenten sind einem ständigen Kreislauf aus Assemblierung an der limitierenden endosomalen Membran mit anschließender Auflösung und Freigabe zur weiteren Runde der ILV-Bildung ausgesetzt. Demzufolge bedarf dieser Prozess einer strengen Koordination, um gravierenden Folgen einer Fehlregulation zu vermeiden. Zahlreiche Studien wurden durchgeführt, um den Prozess der Assemblierung des ESCRT-III-Komplexes sowie die Polymerisation seiner Kernkomponente zu verstehen.

Untersuchungen in verschiedenen Modellorganismen belegen, dass alle analysierten CHMP4B-Orthologe (Shrub in *D. melanogaster*; Snf7 in Hefe; Vps32 in *C.elegans*) an der limitierenden Membran strukturierte Polymere bilden, während sie im Zytoplasma als

monomere Untereinheiten vorliegen (Henne et al., 2012; Martinelli et al., 2012; Shen et al., 2014; Tang et al., 2015). Dennoch ist nicht vollständig geklärt, wodurch genau diese Polymerisation initiiert wird und was diese Proteine daran hindert, bereits im Zytoplasma zu polymerisieren. In diesem Zusammenhang stellte sich die Frage, ob die Ursache dafür in ihrer dynamischen Natur liegt und somit in der Fähigkeit, ihre Konformation entsprechend den vorliegenden Bedingungen anpassen zu können.

Experimentelle Daten für Snf7 zeigen einen Zusammenhang zwischen seinem monomeren/polymeren Zustand und seiner Konformation. So wurde mittels der *in vivo* Experimente in *S. cerevisiae* nachgewiesen, dass in Lösung vorliegende monomere Fraktion von Snf7 aus einer Mischpopulation aus geschlossener und offener Konformation in einem Verhältnis von 1:1 besteht (Henne et al., 2012). Diese Mischpopulation konnte durch eine zusätzliche *in vitro* Analyse bestätigt werden, wobei unter diesen Bedingungen die geschlossene Konformation des Proteins stärker vertreten war als die offene Form. Außerdem konnte im Rahmen von Snf7-Untersuchungen gezeigt werden, dass sein Übergang von der geschlossenen in die offene Konformation sowohl die Bindung an Membranen als auch die Interaktion mit Vps20 (CHMP6 in Säugern) erfordert (Tang et al., 2015). Sind diese Voraussetzungen erfüllt, liegt die Membran-gebundene Fraktion des Proteins ausschließlich im offenen Zustand vor. In Hinblick auf die Tatsache, dass in einer *in vivo* Situation diese Bedingungen gegeben sind und der Anteil des offenen, im Zytoplasma vorliegenden Snf7 bei 50% liegt, stellt sich die Frage, wodurch die Polymerisation dieser Fraktion unterbunden wird. Eine mögliche Ursache dafür wäre eine stabilisierende Wirkung eines Hilfsproteins, das die Polymerisation der offen vorliegenden Proteinfraktion zeitlich koordiniert. Im Fall von Shrub aus *D. melanogaster* und CHMP4B aus Säugern wäre ein Vertreter der CC2D1-Proteinfamilie ein möglicher Kandidat für die Regulation ihrer Konformation, denn die Interaktion dieser Proteine mit Shrub/CHMP4B wurde bereits durch mehrere Studien bewiesen (Martinelli et al., 2012; McMillan et al., 2017). Außerdem gibt es Hinweise, die auf eine Zirkulation der CC2D1-Proteine aus Säugern zwischen dem Zytosol und der limitierenden Membran der reifenden Endosomen hindeuten (Drusenheimer et al., 2015). Dennoch bleibt die direkte Konsequenz der Wechselwirkungen der CC2D1-Proteine mit der zentralen Komponente des ESCRT-III-Komplexes unbekannt. Ebenfalls ist zu beachten, dass bei Shrub/CHMP4B zwar von mehreren Konformationen ausgegangen wird, jedoch gab es bis jetzt keinen direkten experimentellen Beweis dafür.

Um zu überprüfen, ob diese Annahme auf humanes CHMP4B tatsächlich zutrifft, wurden im Rahmen dieser Dissertation Konformationsstudien durchgeführt, die auf einem modifizierten CHMP4B mit künstlich eingeführten Cysteinen basierten. Die Cysteine wurden so positioniert, dass sie im Fall einer geschlossenen Konformation in unmittelbare Nähe zueinander geführt werden und den Konformationsnachweis mittels der oxidativen Quervernetzung bzw. der

---

smFRET-Methode ermöglichen würden (Abb. 2.33). Da es sich hierbei um eine Modifikation des Proteins handelt, wurde Cystein-haltiges CHMP4B sowohl in Bezug auf seine Bindungsfähigkeit an CC2D1-Proteine (Abb. 2.22) als auch auf seine Funktionalität mittels *in vivo* Studien in *D. melanogaster* (Abb. 2.23) überprüft. Es konnte bestätigt werden, dass die Insertion beider Cysteine an den entsprechenden Positionen weder die Bindung noch die Funktionalität von CHMP4B beeinflusst.

Da eine aussagekräftige Interpretation der Ergebnisse basierend auf Konformationsstudien ausschließlich auf der Grundlage hoch gereinigter Proteine möglich ist, wurden im Rahmen dieser Dissertation Strategien entwickelt, die die Gewinnung der an dieser Analyse beteiligten Proteine in geeigneter Qualität ermöglichten. Da alle bislang vorliegenden Daten zur heterologen CC2D1B-Expression auf seinen Teilfragmenten basieren, war es in dieser Arbeit anhand der etablierten Expressions- und Reinigungsstrategien zum ersten Mal möglich, ein vollständiges, hoch konzentriertes CC2D1B zu isolieren. Mittels des individuell optimierten Reinigungsverfahrens, das ein mehrstufiges Prozedere aus denaturierender Reinigung und Renaturierung des Proteins umfasst, wurde außerdem die Gewinnung von CHMP4B in hoher Qualität ermöglicht (Abb. 2.32 A).

Basierend auf den Daten der Cystein-vermittelten oxidativen Quervernetzung (Abb. 2.33 B) und smFRET-Analyse (Abb. 2.33 D) von CHMP4B konnte zum ersten Mal experimentell nachgewiesen werden, dass es sich hierbei um ein dynamisches Protein handelt, das zwischen dem geschlossenen und dem offenen Zustand wechseln kann. Unter den gewählten *in vitro* Bedingungen konnte CHMP4B als eine Mischpopulation identifiziert werden, die sich aus geschlossenen, offenen und intermediären Fraktionen zusammensetzt und demzufolge dem Snf7-Verhalten entspricht. An dieser Stelle ist zu beachten, dass ein Snf7-ähnliches Verhalten gleichzeitig als indirekter Beweis der korrekten Proteinfaltung trotz der denaturierenden Reinigung mit der anschließenden Renaturierung betrachtet werden kann.

Mit Hilfe der Cystein-vermittelten oxidativen Quervernetzung konnte gezeigt werden, dass die identifizierten CHMP4B-Fraktionen in Lösung in keinem Gleichgewicht vorliegen, sondern die geschlossene Fraktion mit einem Anteil von fast 74% von dem Protein bevorzugt wird (Abb. 2.33 B; Probe 1). Dieses Ergebnis korreliert mit den *in vitro* Daten von Snf7. Durch eine vorläufige smFRET-gestützte Analyse konnte bestätigt werden, dass der geschlossene Zustand von CHMP4B in Lösung favorisiert wird (Abb. 2.33 D). Einen zusätzlichen Nachweis dafür lieferte die Charakterisierung der Probe, die durch die Zugabe von DTT zum Übergang in die offene Konformation gezwungen wurde (Abb. 2.33 B; Probe 4). Eine anschließende Inkubation dieser Probe bei RT zeigte, dass das Protein spontan aus dem offenen in den geschlossenen Zustand zurückkehrt, wobei die geschlossene Konformation nach diesem

---

Übergang zu ca. 30% in der Probe vorliegt. Da es sich um eine Probe handelt, die gereinigtes CHMP4B ohne eine gezielte Zugabe von weiteren Proteinen enthielt, kann der Übergang in die geschlossene Form nicht auf den Einfluss extrinsischer Faktoren zurückgeführt werden. Dies ist ein Hinweis darauf, dass dieser Zustand für CHMP4B energetisch günstiger ist und aus diesem Grund spontan und ohne zusätzliche Einwirkungen favorisiert wird.

Zu beachten ist ebenfalls, dass die unbehandelte Probe neben der dominant vertretenen geschlossenen Fraktion zu ca. 26% das Protein in seiner offenen Form aufwies (Abb. 2.33 B; Probe 1). Unter den physiologischen Bedingungen stellt die offene Konformation die für die Polymerisation potentiell zur Verfügung stehende Fraktion dar. Da Studien zur Analyse von Vps32 (CHMP4B-Ortholog aus *C.elegans*) eine spontane Polymerisation des Proteins in der Lösung gezeigt haben (Shen et al., 2014), kann dies im Fall der offenen Fraktion von CHMP4B ebenfalls nicht ausgeschlossen werden.

Die identifizierte Fraktionsaufteilung innerhalb der unbehandelten Probe stimmt mit den Erwartungen überein, da die gewählten *in vitro* Bedingungen ausschließlich das Verhalten des Proteins in Lösung repräsentieren und keine Aussage über eine membran-gebundene Fraktion zulassen. Interessant an dieser Stelle wären weiterführende Experimente unter der Verwendung von Liposomen zur Rekonstruktion der Membran-ähnlichen Umgebung sowie die gleichzeitige Inkubation mit CHMP6 zur Initiierung der CHMP4B-Polymerisation. Experimente unter Beachtung dieser Faktoren würden Aufschluss darüber geben, ob eine zu erwartende Verschiebung der vorliegenden Verhältnisse zwischen geschlossener und offener Konformation unter Endosomen-imitierenden Bedingungen auftreten würde. Ergebnisse der Snf7-Studien, die auf einem Liposomen-Assay basieren, liefern eine eindeutige Bestätigung dafür. Dort konnte gezeigt werden, dass die Inkubation von Snf7 mit Liposomen und Vps20 (CHMP6-Ortholog aus Hefe) zu einem Übergang von der hauptsächlich geschlossenen in die offene Konformation führt (Tang et al., 2015). Eine weiterführende Charakterisierung von Snf7 hat ergeben, dass das Vorhandensein einer Lipiddoppelschicht für seine Polymerisation absolut notwendig ist. In ihrer Gegenwart polymerisiert das Protein in Form von Spiralen, während ohne Membranen keine Polymerisation stattfindet (Chiaruttini et al., 2015).

Nachdem der konformationelle Zustand von CHMP4B in Lösung mittels zwei unabhängigen Analysemethoden aufgeklärt werden konnte, stellte sich die Frage, ob CHMP4B in seiner Konformation durch die Interaktion mit CC2D1B beeinflusst wird. Experimente in Zellkultur zeigen, dass CC2D1B zwischen dem Zytoplasma und Endosomen zirkuliert (Drusenheimer et al., 2015). In Anbetracht dessen, dass CC2D1B und CHMP4B auf eine direkte Weise miteinander interagieren, könnte eine mögliche Bindung von CC2D1B an die offene zytoplasmatische CHMP4B-Fraktion seinen Übergang in die geschlossene Konformation begünstigen. In dem Fall würde CC2D1B als eine Art Chaperon für CHMP4B fungieren,



---

welches das Protein in seiner geschlossenen Form an die limitierende endosomale Membran transportieren könnte und dementsprechend eine spontane Polymerisation der offenen Form im Zytoplasma verhindern würde. Die Ergebnisse der Cystein-vermittelten Quervernetzung von CHMP4B basierend auf einer Inkubation mit CC2D1B sprechen dennoch gegen diese Hypothese. Die Interaktion beider Proteine wirkte sich weder auf die offene noch auf die geschlossene Konformation aus, da bei den prozentuellen Anteilen beider Fraktionen nur geringfügige Abweichungen im Vergleich zur Kontrollprobe nachweisbar waren (Abb. 2.33 B; 5-7). Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass CC2D1B durch seine Bindung an CHMP4B nicht die Rolle eines Chaperon übernimmt und dementsprechend keinen Einfluss auf die CHMP4B-Konformation zu haben scheint.

*In vitro* Studien zeigen, dass die Interaktion zwischen CC2D1A und CHMP4B auf einer elektrostatischen Wechselwirkung basiert, wobei die basischen Aminosäuren der dritten DM14-Domäne von CC2D1A an die sauren Aminosäuren innerhalb der helikalen Haarnadel von CHMP4B binden. Dieser Bereich wird für die Polymerisation von CHMP4B benötigt (Martinelli et al., 2012). Auch für ihre Orthologe aus *D. melanogaster*, Lgd und Shrub, konnte nachgewiesen werden, dass die Interaktion zwischen beiden Proteinen innerhalb des Polymerisationsbereichs stattfindet und auf einer elektrostatischen Wechselwirkung beruht (McMillan et al., 2017). Da eine Rolle von CC2D1B als Chaperon durch die Experimente dieser Arbeit nicht bestätigt werden konnte, könnte seine Funktion in der Neutralisation des negativen Bereichs innerhalb von CHMP4B und dementsprechend in der Unterbindung einer spontanen Polymerisation der monomeren, offenen Fraktion im Zytoplasma liegen. Diese Hypothese steht im Einklang mit *in vivo* Daten aus *D. melanogaster*. Dort konnte gezeigt werden, dass der Verlust von Lgd in einer ektopischen Aktivierung des Notch-Signalwegs resultiert, die höchstwahrscheinlich auf eine Störung im endosomalen Transportweg zurückzuführen ist (Schneider et al., 2013). Neueste Daten belegen, dass in der *lgd*-defizienten Situation die Aktivität von Shrub herabgesetzt wird, während seine Expression davon nicht betroffen ist (Bäumers - AG Klein; unveröffentlicht). Wird davon ausgegangen, dass Shrub, ähnlich wie CHMP4B, ebenfalls zu einem signifikanten Anteil in der offenen Konformation im Zytosol vorliegt, könnte seine reduzierte Aktivität durch eine im Zytosol stattfindende Polymerisation dieser Fraktion erklärt werden. Dadurch würde die für die Funktion an der limitierenden endosomalen Membran potentiell benötigte offene Fraktion nicht mehr zur Verfügung stehen. Interessanterweise kann der *lgd*-mutante Phänotyp durch das Einbringen von zusätzlichen *shrub*-Kopien ins Genom der Fliege aufgehoben werden (Bäumers - AG Klein; unveröffentlicht). Auf diese Weise wird die Menge des möglicherweise im Zytosol polymerisierten Shrub durch das zusätzlich exprimierte Protein kompensiert.

---

Die Hypothese, die auf einer neutralisierenden Wirkung der offenen, im Zytosol vorliegenden CHMP4B-Fraktion basiert, wird zusätzlich durch die Tatsache unterstützt, dass in Hefe, die als Einzeller keinen Vertreter der CC2D1-Proteinfamilie enthält, die Polymerisation von Snf7 hydrophober und nicht elektrostatischer Natur ist (Tang et al., 2015). Das lässt vermuten, dass während der evolutionären Entwicklung zu den Metazoen ein Übergang von der hydrophoben zur elektrostatischen Wechselwirkung der ESCRT-Proteine stattgefunden haben könnte, bei dem die CC2D1-Proteine möglicherweise an der Bedeutung in der Regulation des endosomalen Transportwegs gewonnen haben.

Die mittels der *in vitro* Experimente gewonnen Erkenntnisse bezüglich der CHMP4B-Konformation sowie der Rolle von CC2D1B in diesem Prozess sollen durch die Analysen unter natürlichen Bedingungen ergänzt werden. Konformationelle Analysen der Proben, durchgeführt in Zellen oder in *D. melanogaster*, würden den CHMP4B-Zustand in einem natürlichen Milieu offenbaren. Da eine quantitative Auswertung dieser Proben aufgrund von zahlreichen intrazellulären Proteinen auf der Basis einer Coomassie-Blau-Färbung nicht möglich ist, setzt ihre Quantifizierung eine Analyse mittels Western Blot voraus. Eine Grundvoraussetzung zur Durchführung von diesem Experiment stellt die Generierung eines CHMP4B-Antikörpers dar, der in der Lage sein soll, sowohl die geschlossene als auch die offene CHMP4B-Fraktion mit vergleichbarer Affinität binden zu können. Bei der Generierung eines Antikörpers, der an die geschlossene Fraktion binden soll, wäre eine Probe nach der Oxidation und Fixierung mit Cu<sup>2+</sup>Phenanthrolin als potentielles Antigen denkbar. Eine Erkennung der offenen Form durch einen Antikörper, der spezifisch gegen geschlossenes CHMP4B gerichtet ist, wird sehr wahrscheinlich ebenfalls gegeben sein.

Die im Rahmen dieser Dissertation etablierten Expressions- und Reinigungsbedingungen für CC2D1B und CHMP4B können in weiterführenden Experimenten zur Aufklärung des zwischen den beiden Proteinen gebildeten Komplexes herangezogen werden. Basierend auf den gewonnenen Proteinen wurden bereits die ersten Schritte zur Strukturaufklärung unternommen. So war es auf Basis der CX-MS-Analyse möglich, die bereits bekannte strukturelle Information über CHMP4B zu bestätigen (Abb. 2.34). Im Rahmen einer anderen Studie hat die Kristallisation eines Teilfragments von CHMP4B ergeben, dass das Protein durch intramolekulare Wechselwirkung der beiden ersten  $\alpha$ -Helices eine helikale Haarnadel bildet (Martinelli et al., 2012). Die intramolekulare Interaktion zwischen den Aminosäuren innerhalb dieses Bereiches konnte mit Hilfe der Quervernetzung von CHMP4B bestätigt werden (Abb. 2.34). Die Übereinstimmung der bekannten Kristallstruktur mit den identifizierten quervernetzten Bereichen innerhalb der ersten zwei Helices liefert eine zusätzliche Bestätigung für eine korrekte Faltung des Proteins, das mittels einer denaturierenden Methode gereinigt und anschließend renaturiert wurde.

Aufgrund dessen, dass mittels der CX-MS-Analyse nur der Bereich charakterisiert werden konnte, zu dem bereits strukturelle Informationen vorliegen und die Auswertung der intermolekularen Wechselwirkungen anhand dieser Methode ohne weitere strukturelle Informationen problematisch ist, sollen in weiteren Experimenten andere Methoden zur Strukturaufklärung beider Interaktionspartner verwendet werden. Aufgrund der Größe von CC2D1B hat sich eine strukturelle Analyse basierend auf Röntgen-vermittelter Kristallographie als nicht geeignet gezeigt. Infolgedessen ist bei der Strukturaufklärung eines Komplexes aus CC2D1B und CHMP4B die Cryo-EM die Methode der Wahl, die mit der SAXS (*Small-angle X-ray scattering*)-Analyse kombiniert werden kann, um möglichst viel Information zur Struktur beider Proteine zu erhalten.

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zu der Interaktion zwischen CC2D1B und CHMP4B sowie weiter geplante, oben beschriebene Experimente sollen zusätzlich durch die Analyse der Wechselwirkung von CHMP4B mit CC2D1A ergänzt werden.

## 4. Zusammenfassung / Summary

### 4.1 Zusammenfassung

Die CC2D1-Proteinfamilie ist in allen Metazoen hoch konserviert. In Säugern kommen zwei Vertreter dieser Familie vor. Beide Proteine sind an der Regulation diverser Prozesse beteiligt, wobei sich die Mehrheit der beschriebenen Funktionen auf CC2D1A bezieht. Dieses Protein spielt eine entwicklungsrelevante Rolle und sein Verlust in Mäusen ist postnatal letal. Obwohl die *Cc2d1b*-Defizienz keinen Einfluss auf die Vitalität von Mäusen hat, resultiert der Ausfall beider Proteine in der pränatalen Letalität. Ähnlich wie bei Säugern, ist der Lgd-Verlust in *D. melanogaster* letal. Diese Tiere sterben im frühen Puppenstadium infolge einer Störung im endosomalen Transportweg, die auf der fehlenden Interaktion zwischen Lgd und dem ESCRT Protein Shrub beruht.

Basierend auf Zellkulturexperimenten konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass beide CC2D1-Proteine aus Säugern an der Regulation des endosomalen Transportwegs beteiligt sind. Eine Kombination aus immunzytochemischer Analyse und ultrastruktureller Charakterisierung der endozytotischen Vesikel in MEFs zeigt, dass der Verlust der CC2D1-Proteine zu milden Störungen in diesem Prozess führt. Beispielsweise, kommt es in *Cc2d1a*- und *Cc2d1b*-einzel-defizienten sowie in DKO-MEFs zur Änderung der Morphologie und Größe der Endolysosomen. Mittels der Analyse der *Nrarp*-Expression konnte gezeigt werden, dass die Aktivität des Notch-Signalwegs in MEFs höchstwahrscheinlich in Korrelation zum endosomalen Phänotyp steht und nach dem Verlust beider CC2D1-Proteine erhöht ist. Außerdem hat eine Zellkernanalyse ergeben, dass die Interaktion der CC2D1-Proteine mit den ESCRT-Mitgliedern neben dem endosomalen Transportweg die ESCRT-vermittelte Neuassemblierung der Kernhülle beeinflusst. Der CC2D1B-Verlust ist mit einer Änderung der CHMP7-Lokalisation und einem Anstieg an Zellen mit defekten Zellkernen assoziiert. Trotz identifizierter Abnormalitäten scheint CC2D1B eine akzessorische Funktion in der Aufrechterhaltung der nukleären Integrität zu haben. Aufgrund des in DKO-MEFs beobachteten Phänotyps scheinen CC2D1-Proteine trotz starker Homologie keine redundante Funktion in diesem Prozess zu haben.

Um eine mögliche Funktion von CC2D1B in den ESCRT-vermittelten Ereignissen aufzuklären, wurden biochemische Analysen durchgeführt. Basierend auf *in vitro* Experimenten unter der Verwendung der hoch gereinigten vollständigen Proteine konnte erstmalig nachgewiesen werden, dass CHMP4B seinen konformationellen Zustand ändern kann. In Lösung präferiert CHMP4B die geschlossene Konformation, wobei ein signifikanter Anteil des Proteins ebenfalls in der offenen Form vorliegt. Seine Konformation wird durch die Wechselwirkung mit CC2D1B nicht beeinflusst. CC2D1B wird höchstwahrscheinlich benötigt, um an die offene Fraktion von CHMP4B zu binden und durch die Neutralisation des negativen Bereichs die unkontrollierte Polymerisation von CHMP4B im Zytosol zu unterbinden.

## 4.2 Summary

The CC2D1 protein family is highly conserved in all metazoa. In mammals, two members of this family are present. Both proteins are involved in the regulation of a variety of processes, but the majority of described functions are related to CC2D1A. This protein plays a developmental role and its loss in mice is lethal postnatally. Although *Cc2d1b* deficiency has no influence on the viability of the mice, the lack of both proteins results in prenatal lethality. Like in mammals, the loss of Lgd in *D. melanogaster* is also lethal. These animals die at early pupal stage as a consequence of a disturbance in the endosomal pathway caused by the loss of interaction between Lgd and the ESCRT protein Shrub.

Based on cell culture experiments performed in this study it was shown that both mammalian CC2D1 proteins are involved in the regulation of the endosomal pathway. A combination of immunocytochemical analysis and ultrastructural characterization of the endocytic vesicles in MEFs shows, that the loss of CC2D1 proteins leads to mild disturbances in this process. For instance, there is a change in morphology and size of the endolysosomes present in *Cc2d1a*- and *Cc2d1b*-single deficient and DKO-MEFs. It could be shown through analysis of the *Nrarp* expression, that the activity of the Notch signaling in MEFs is most likely correlated to the endosomal phenotype and is increased upon the loss of both CC2D1 proteins. The nuclear analysis additionally demonstrated that the interaction of CC2D1 proteins with the ESCRT-member, besides the endosomal pathway, also influences the ESCRT-mediated reassembly of the nuclear envelope. The loss of CC2D1B is associated with a change of the CHMP7-localization and an increase in cells with defect cell nuclei. Despite the described abnormalities, CC2D1B seems to have an accessory function in the maintenance of nuclear integrity. Based on the phenotype observed in DKO-MEFs, CC2D1 proteins seem to have no functional redundancy in this process despite their strong homology.

Biochemical analysis was performed to reveal a possible function of CC2D1B in ESCRT-mediated events. Based on *in vitro* experiments using highly purified full length proteins, it could be demonstrated for the first time, that CHMP4B is able to change its conformational state. In solution CHMP4B prefers a closed conformation, but a significant portion of the open form is also present. Its conformation is not affected by the interaction with CC2D1B. CC2D1B is most likely needed to bind to the open fraction of CHMP4B and to prevent uncontrolled polymerization of CHMP4B in the cytosol by neutralizing its negative part.

## 5. Material und Methoden

### 5.1 Material

#### 5.1.1 Nukleinsäure-Techniken

##### 5.1.1.1 Polymerasekettenreaktion

###### Polymerasen

GoTaq DNA Polymerase; 5 Units/µl (Promega)

Q5 High-Fidelity DNA Polymerase; 2 Units/µl (New England Biolabs)

###### dNTPs

dNTP Mix; 10 mM (Thermo Scientific)

###### qRT-PCR

KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2x) Kit (KAPA Biosystems)

###### Oligonukleotide

Tabelle 5.1: Verwendete Oligonukleotide mit Angaben zur Sequenz und dem Verwendungszweck

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Verwendungszweck
NotI-CHMP4B (for)	AAAGCGGCCGCATGTCGGTG TTCGGGAAG	Generierung von NotI-CHMP4B <sup>A54C; L180C</sup> -Stopp- KpnI zur Klonierung in pattB <i>shrubP</i> rescue Vektor
KpnI-Stopp-CHMP4B (rev)	AAAGGTACCTTACATGGATCC AGCCCAG	
HindIII-Myc-CHMP4B (for)	AAAAAGCTTATGGAACAAAA CTTATTTCTGAAGAAGATCTG GGAGGAGGAGGATCGGTGTT CGGGAAGCTGTT	Generierung von HindIII-Myc-CHMP4B <sup>A54C; L180C</sup> - Stopp-XhoI zur Klonierung in pcDNA-Vektor
XhoI-Stopp-CHMP4B (rev)	AAACTCGAGTTACATGGATCC AGCCCAGTTCTC	
KpnI-hLGD1 (for)	AAAGGTACCATGATGCCAGG GCCAAGA	Generierung von KpnI-CC2D1B-EcoRI zur Klonierung in pBAD-HisB- Vektor
EcoRI-Stopp-hLGD1 (rev)	AAAGAATTCTCACAAAGCCCT GGG	
EcoRI-hLGD2 (for)	AAAGAATTCATGCACAAGAG GAAAGGACC	Generierung von EcoRI-CC2D1A-HindIII zur Klonierung in pBAD-HisB- Vektor
HindIII-Stopp-hLGD2 (rev)	AAAAAGCTTTCACCTGCGGA GCC	
AgeI-pBAD (for)	AAAACCGGTAACCCCGCTTAT TAAAAGCATTCTGTAA	Generierung von pBAD-His10 -TEV-Vektoren
KpnI-TEV-His10-pBAD (rev)	TTTGGTACCGGATCCTCCGC CCTGAAAATACAGGTTTTCTC CTCCGGATCCTCCGGATCCT CCGGATCCTCCATGATGATG ATGATGATGATGATGATGATG AGAACCCCCCATGGTTAA	
EcoRI-TEV-His10-pBAD (rev)	TTTGAATTCGGATCCTCCGCC CTGAAAATACAGGTTTTCTCC TCCGGATCCTCCGGATCCTC CGGATCCTCCATGATGATGAT GATGATGATGATGATGATGA GAACCCCCCATGGTTAA	
GAPDH_F2	TGAAGGTCGGTGTGAACGG	Quantifizierung von <i>Gapdh</i>
GAPDH_R2	CGTGAGTGGAGTCATACTGG AA	
NRARP_F6a	TCTTCGGTCTTCTGCGCTTT	Quantifizierung von <i>Nrarp</i>
NRARP_R6b	GACCAACCAGGACCCATCTG	

### 5.1.1.2 DNA-Gelelektrophorese

#### Agarose

my-Budget Standard Agarose (Bio-Budget Technologies)

#### 10xTAE-Puffer

Tabelle 5.2: Zusammensetzung des 10x TAE-Puffers

Komponente	Firma
40 mM TRIS; auf pH 8.0 mit HCl eingestellt	Acros Organics
100 mM EDTA	Sigma-Aldrich

#### Probenladepuffer

6x Loading Dye (Thermo Scientific)

#### 1 kb DNA-Längenstandard

GeneRuler 1 kb DNA Ladder, ready-to-use (Thermo Scientific)

#### Substanz zur Visualisierung der DNA

1% Ethidiumbromid (AppliChem)

### 5.1.1.3 DNA-Gelextraktion

Zymoclean Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research)

### 5.1.1.4 Restriktionsspaltung

#### Restriktionsendonukleasen

Tabelle 5.3: Verwendete Restriktionsenzyme

Restriktionsenzym	Erkennungssequenz	Firma
AgeI-HF	5'...A▼CCGGT...3'	New England Biolabs
EcoRI-HF	5'...G▼AATTC...3'	
HindIII-HF	5'...A▼AGCTT...3'	
KpnI-HF	5'...GGTAC▼C...3'	
NotI-HF	5'...GC▼GGCCGC...3'	
XhoI	5'...C▼TCGAG...3'	

#### Restriktionspuffer

CutSmart Buffer (New England Biolabs)

### 5.1.1.5 Plasmide

Tabelle 5.4: Verwendete Plasmide

Plasmid	Verwendungszweck	Firma/ Herkunft
pattB <i>shrubP</i> rescue	Expression in Fliege	AG Klein; HHU
pBAD-HisB	Expression in Bakterien	Aliquot aus AG Schmitt; HHU
pcDNA 3.0	Expression in Säugerzellen	Invitrogen
pGEM TEasy	Klonierung von PCR-Produkten	Promega
pQE-30Xa-CC2D1A	Expression von His6-CC2D1A in Bakterien	AG Klein; HHU



pQE-30Xa-CC2D1B	Expression von His6-CC2D1B in Bakterien	AG Klein; HHU
pQE-30Xa-CHMP4B <sup>wt</sup>	Expression von His6-CHMP4B <sup>wt</sup> in Bakterien	AG Klein; HHU
pQE-30Xa-CHMP4B <sup>A54C;L180C</sup>	Expression von His6-CHMP4B <sup>A54C;L180C</sup> in Bakterien	AG Klein; HHU
pBAD-HisB-CC2D1B	Expression von His6-CC2D1B in Bakterien	Diese Arbeit
pBAD-HisB-CHMP4B <sup>A54C;L180C</sup>	Expression von His6-CHMP4B <sup>A54C;L180C</sup> in Bakterien	Diese Arbeit
pBAD-His10-TEV-CC2D1B	Expression von His10-TEV-CC2D1B in Bakterien	Diese Arbeit
pBAD-His10-TEV-CHMP4B <sup>A54C;L180C</sup>	Expression von His10-TEV-CHMP4B <sup>A54C;L180C</sup> in Bakterien	Diese Arbeit
pattB <i>shrubP</i> rescue CHMP4B <sup>A54C; L180C</sup>	Expression von CHMP4B <sup>A54C; L180C</sup> in Fliege	Diese Arbeit

### 5.1.1.6 Ligation

T4 DNA Ligase; 5 Weiss Units/μl (Thermo Scientific)

10x T4 DNA Ligase Buffer (Thermo Scientific)

### 5.1.1.7 Kultivierung von Bakterien

#### LB-Medium

Tabelle 5.5: Zusammensetzung von LB-Medium

Komponente	Firma
5 g/l BactoYeast Extract	BD Biosciences
10 g/l Bacto Tryptone	BD Biosciences
8 g/l Natriumchlorid	Carl Roth
0,1 g/l Ampicillin*	AppliChem

\* Zugabe bei Bedarf

#### LB-Agarplatten

1,5% Bacto Agar (BD Biosciences) in LB-Medium; 0,1 g/l Ampicillin (AppliChem) bei Bedarf

### 5.1.1.8 Plasmid-DNA-Mini-Präparation

#### Lösungen

Tabelle 5.6: Lösungen für die Plasmid-DNA-Mini-Präparation

Lösung	Zusammensetzung	Firma
Resuspensionspuffer	50 mM TRIS; auf pH 8.0 mit HCl eingestellt	Acros Organics
	10 mM EDTA	Sigma-Aldrich
	100 μg/ml RNase A	Serva Elektrophoresis
Lysispuffer	200 mM NaOH	Grüssing
	1% SDS	AppliChem
Neutralisationspuffer	2,8 M Kaliumacetat; auf pH 5.1 mit Essigsäure eingestellt	Acros Organics
Isopropanol	Propan-2-ol	Fisher Scientific
70% Ethanol	Ethanol absolut mit dH <sub>2</sub> O verdünnt	Honeywell

### 5.1.1.9 Plasmid-DNA-Midi-Präparation

NucleoBond Xtra Midi Kit (MACHEREY-NAGEL)

### 5.1.1.10 Sequenzierung

#### Sequenzierungs-Oligonukleotide

Tabelle 5.7: Verwendete Sequenzierungs-Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Sequenziertes Konstrukt
# 2	TGTCGCTGAATTGCCCGTGCCC	CC2D1A
# 9	GGCCCGGCGTCCACGCCTACCTACAGCC	
CMV (for)	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG	Konstrukte im pcDNA-Vektor
BGH (rev)	TAGAAGGCACAGTCGAGG	
pBAD (for)	ATG CCA TAG CAT TTT TAT CC	Konstrukte im pBAD-Vektor
pBAD (rev)	GAT TTA ATC TGT ATC AGG	
pBAD-HisB_Seq_228 (for)	ATAAGATTAGCGGATCCTACC	
pBAD-HisB_Seq_252 (for)	CGCTTTTTATCGCAACTCTCTA	
pBAD-HisB_Seq_587 (rev)	GCTACGGCGTTTCACTTCTGAGTT	
pBAD-HisB_Seq_677 (rev)	CCCAGTCTTTCGACTGAGCC	
Seq_hLGD1_816_for	GCCCGTTTCAGACTTAGACCCAGA	CC2D1B
Seq_hLGD1_1262_rev	TTGGCAATGCGCTCATGCATCCG	
Seq_hLGD1_1337_rev	CCTGGAGGAACAGGCAATTCA	
shrub 5'-UTR (for)	CGGCAATCGGTATCGGGTG	Konstrukte im pattB-shrubP rescue Vektor
shrub 3'-UTR (rev)	TTCTCTCCCTCGCTTCGAAC	

### 5.1.1.11 RNA-Extraktion aus MEFs

peqGOLD TriFAST (peqlab)

### 5.1.1.12 DNase I Behandlung von RNA-Proben

DNase I, RNase-free; 50 U/μl (Thermo Scientific)

10x Reaction Buffer with MgCl<sub>2</sub> (Thermo Scientific)

50 mM EDTA (Thermo Scientific)

### 5.1.1.13 cDNA-Synthese

GoScript Reverse Transcription System (Promega)

## 5.1.2 Proteinbiochemie

### 5.1.2.1 Proteinextraktion aus Zellen

Proteinlysispuffer (modifiziert nach Nakamura et al., 2008)

20 mM TRIS (Acros Organics) mit HCl auf pH 7.5 eingestellt; 0,2% Nonidet P40 (Sigma-Aldrich); 10% Glycerin (Fisher Scientific); 1 mM EDTA (Sigma-Aldrich); 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> (Grüssing); 137 mM NaCl (Carl Roth); 50 mM NaF (J.T.Baker); 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich).

Proteinaseinhibitoren

Proteinase Inhibitor Cocktail P8340 (Sigma-Aldrich)

PMSF [200 mM] (Carl Roth)

**5.1.2.2 Co-Immunopräzipitation**Immobilisierungsreagenz

Life Science Protein G Sepharose™ 4 FastFlow (GE Healthcare)

Blocklösung

1% BSA (Sigma-Aldrich) in Proteinlysispuffer

Proteinlysispuffer

Proteinlysispuffer (modifiziert nach Nakamura et al., 2008) + PIC + PMSF (je 1:200)

Konstrukte zur Proteinexpression in Säugerzellkultur (Co-Immunopräzipitation)

Tabelle 5.8: Konstrukte zur Expression in Säugerzellen

Konstrukt	Markierung	Firma / Herkunft
pcDNA-hCC2D1A-HA	HA (C-terminal)	AG Klein; HHU
pcDNA-hCC2D1B-HA		
pcDNA-Myc-hCHMP4B <sup>wt</sup>	Myc (N-terminal)	
pcDNA-Myc-hCHMP4B <sup>A54C; L180C</sup>		
pcDNA-hCHMP4B-Myc <sup>mut2</sup>	Myc (C-terminal)	
pcDNA-FLAG-hCHMP5	FLAG (N-terminal)	
pcDNA-FLAG-hCHMP6		
pcDNA-FLAG-hCHMP7		

Antikörper zur Immunopräzipitation

Tabelle 5.9: Antikörper zur Immunopräzipitation

Antikörper	Bezeichnung	Verdünnung	Herkunft	Firma
α-HA	α-HA	1:250	Ratte	Roche
α-Myc	α-Myc (9B11)	1:250	Maus	Cell Signaling Technology

**5.1.2.3 Etablierung der Expressionsbedingungen in Bakterien**Kultivierungsmedium

LB-Medium (siehe Tab. 5.5 „Zusammensetzung von LB-Medium“)

Induktor

IPTG (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific)

L-(+)-Arabinose (Sigma-Aldrich)

Bakterienstämme

Tabelle 5.10: Verwendete Bakterienstämme mit Angaben zum Verwendungszweck

<i>E. coli</i> Stamm	Verwendungszweck	Herkunft
DH5α	Klonierung von Konstrukten	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific
BL21 (DE3)	Proteinexpression in Bakterien	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific

C41	Expression zelltoxischer Proteine in Bakterien	(Miroux und Walker, 1996)
LOBSTR	Proteinexpression in Bakterien mit modifizierten SlyD und ArnA	Kerafast; Ursprung (Andersen et al., 2013)

### 5.1.2.4 Proteinreinigung

#### Puffer

Tabelle 5.11: Zusammensetzung der Puffer zur Proteinreinigung unter nativen Bedingungen

Komponente	Firma	Native Bedingungen			
		Lysispuffer	Waschpuffer I	Waschpuffer II	Elutionspuffer
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	J.T. Baker	20 mM	20 mM	20 mM	20 mM
NaCl	Carl Roth	150 mM	150 mM	150 mM	150 mM
Glycerin	Fisher Scientific	5%	5%	5%	5%
Lysozym	Roche	1,5 mg/ml	keine Zugabe		
DNase I	Thermo Scientific	10 Units/ml	keine Zugabe		
RNase A		0,01 mg/ml	keine Zugabe		
PIC	Sigma-Aldrich	1:200	keine Zugabe		
PMSF		1 mM	keine Zugabe		
Imidazol	Acros Organics	keine Zugabe	keine Zugabe	20 mM	150 mM

Tabelle 5.12: Zusammensetzung der Puffer zur Proteinreinigung unter denaturierenden Bedingungen

Komponente	Firma	Denaturierende Bedingungen			
		Lysispuffer	Waschpuffer I	Waschpuffer II	Elutionspuffer
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	J.T. Baker	20 mM	20 mM	20 mM	20 mM
NaCl	Carl Roth	150 mM	150 mM	150 mM	150 mM
Glyzerin	Fisher Scientific	5%	5%	5%	5%
Harnstoff	Biomol	8 M	8 M	8 M	8 M
Imidazol	Acros Organics	keine Zugabe	keine Zugabe	20 mM	150 mM

#### Säulen

HisTALON Gravity Column (Takara Bio Inc.)

HisTalon Superflow Catriges (Takara Bio Inc.)

### 5.1.2.5 Renaturierung / Pufferaustausch

#### Puffer A

Tabelle 5.13: Zusammensetzung\* von Puffer A

Komponente	Firma
20 mM HEPES; pH 7.4	AppliChem
150 mM NaCl	Carl Roth

\* übernommen aus (Henne et al., 2012)

#### Säulen

PD-10 Desalting Columns (GE Healthcare Bio-Sciences)

### 5.1.2.6 Größenausschlusschromatographie (SEC)

#### Puffer

Waschpuffer I (siehe Tab. 5.11 „Zusammensetzung der Puffer zur Proteinreinigung unter nativen Bedingungen“).

#### Säulen

HiLoad Superdex 200 pg (GE Healthcare Bio Sciences)

### 5.1.2.7 Konzentrierung der Proteine

#### Zentrifugalkonzentratoren

Vivaspin 500 (Sartorius)

Vivaspin 2 (Sartorius)

Amicon Ultra-4 (Millipore)

Amicon Ultra-15 (Millipore)

Macrosep Advance (Pall Corporation)

### 5.1.2.8 Konzentrationsbestimmung der Proteine

Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific)

### 5.1.2.9 Cystein-basierte Quervernetzung der Proteine

#### Reaktionspuffer

Puffer A (siehe Tab. 5.13 „Zusammensetzung von Puffer A“)

#### Lösungen

Tabelle 5.14: Lösungen für Cystein-basierte Quervernetzung der Proteine

Lösung	Zusammensetzung	Firma
<b>Reduktionslösung</b>	10 mM 1,4-Dithiothreit (DTT)	Carl Roth
<b>Oxidationslösung (1:1)</b>	200 mM 1,10-Phenanthrolin in 100% Ethanol  50 mM Kupfer(II)-Sulfat in Lösung bestehend aus 150 mM Kaliumacetat 5 mM Magnesiumacetat 250 mM Sorbitol 20 mM HEPES, pH 7.4	Sigma-Aldrich
		Merck
		Acros Organics
		J.T.Baker
		Merck
<b>Abstopplösung</b>	15 mM EDTA	AppliChem
		Thermo Scientific

### 5.1.2.10 Auftrennung der Proteine mittels einer diskontinuierlichen SDS-Gelelektrophorese

#### Acrylamid-, Bisacrylamid-Stammlösung

Rotiphorese Gel 30 (37,5:1) (Carl Roth)

Trenn- und Sammelgelpuffer

Tabelle 5.15: Zusammensetzung von Trenngelpuffer und Sammelgelpuffer

Komponente	4x Trenngelpuffer	4x Sammelgelpuffer
TRIS	0,5 M	3 M
SDS	0,4%	0,08%

Katalysatoren

10% APS (Merk)

TEMED (Merk)

10x Elektrophoresepuffer

Tabelle 5.16: Zusammensetzung des 10x Elektrophoresepuffers

Komponente	Menge	Firma
TRIS	0,25 M	Acros Organics
Glycin	1,92 M	Sigma-Aldrich
SDS	1%	AppliChem

4x Lämmli-puffer

Tabelle 5.17: Zusammensetzung des 4x Lämmli-Puffers

Komponente	Reduzierend	Nicht-Reduzierend	Firma
Glycerin	62,5%	62,5%	Fisher Scientific
SDS	12,5%	12,5%	AppliChem
Bromphenolblau	0,006 %	0,006%	Aldrich
TRIS-HCl; pH 6.8	0,375 M	0,375 M	Acros-Organics
DTT	9,4%	keine Zugabe	Carl Roth

Proteinlängenstandard

PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific)

**5.1.2.11 Coomassie-Blau-Färbelösung**Färbelösung

Tabelle 5.18: Zusammensetzung der Coomassie-Blau-Lösung

Komponente	Menge	Firma
Coomassie Brilliant blue R-250	0,02%	AppliChem
Aluminiumsulfat 18xH <sub>2</sub> O	5%	Acros Organics
Ethanol absolut	10%	Honeywell
Phosphorsäure ≥ 85%	2%	Sigma-Aldrich

Entfärbelösung

Tabelle 5.19: Zusammensetzung der Entfärbelösung

Komponente	Menge	Firma
Methanol	40%	Fisher Scientific
Essigsäure	10%	Sigma-Aldrich

### 5.1.2.12 Western Blot mittels des Semi-Dry-Verfahrens

#### Transfermembran

Roti-PVDF; Porengröße 0,45 µm (Carl Roth)

#### Blottingpapiere

Rotilabo Blottingpapiere, Dicke 0,35 mm (Carl Roth)

#### Transferpuffer

10% 10x Transferpuffer (250 mM TRIS-HCl, pH 8.3; 1,5 M Glycin); 10% Methanol; 0,04% SDS

### 5.1.2.13 Ponceau-Rot-Färbung der Proteine auf PVDF-Membran

#### Ponceau-Rot-Lösung

Ponceau S solution (Sigma-Aldrich)

### 5.1.2.14 Immundetektion von Proteinen auf PVDF-Membran

#### Blocklösung

5% Milchpulver (Sucofin) in PBS

#### Färbelösung

2% Milchpulver (Sucofin) in PBS

#### Waschpuffer

0,1% PBT: 0,1% Tween-20 (Sigma-Aldrich) in PBS

#### Physiologische Lösung (PBS):

130 mM NaCl (Carl Roth), 7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Carl Roth), 3 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (J.T.Baker); pH 7.4

#### Antikörper

Tabelle 5.20: Primäre Antikörper für Western Blot

Antikörper	Bezeichnung	Verdünnung	Herkunft	Firma
anti-CC2D1A	mLGD2	1:1000	Meerschweinchen	AG Klein; HHU
anti-CC2D1B	mLGD1	1:200	Meerschweinchen	AG Klein; HHU
anti-CHMP4B	CHMP4B (C12): sc-82556	1:2000	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology
anti-FLAG	Anti-FLAG M2: F1804	1:2000	Maus	Sigma-Aldrich
anti-GAPDH	GAPDH (1E6D9): 60004	1:10 000	Maus	Proteintech
anti-HA	HA (3F10)	1:2000	Ratte	Roche
anti-His	penta His: 34660	1:3000	Maus	QIAGEN
anti-Jagged1	Anti-Jagged1/ ICD	1:500	Kaninchen	UCLA Biological Chemistry
anti-Myc	Myc-Tag (9B11): 2276	1:2000	Maus	Cell Signaling Technology
anti-Notch1	Notch1 (D1E11) XP: 3608	1:2000	Kaninchen	Cell Signaling Technology
anti-Notch2	Notch2 (D76A6) XP: 5732	1:2000	Kaninchen	Cell Signaling Technology
anti-αTubulin	Anti-α-Tubulin (B512): T-5168	1:50 000	Maus	Sigma-Aldrich



Tabelle 5.21: Sekundäre Antikörper für Western Blot

Antikörper	Bezeichnung	Verdünnung	Herkunft	Firma
anti-Maus-HRP	goat anti mouse IgG (H+L) HRP	1:5000	Ziege	dianova
anti-Ratte-HRP	goat anti rat IgG (H+L) HRP			
anti-Kaninchen-HRP	goat anti rabbit IgG (H+L) HRP			
anti-Meerschweinchen-HRP	goat anti guinea pig HRP			

### 5.1.2.15 Visualisierung der Proteine

WesternBright Sirius (Biozym)

### 5.1.2.16 „Strippen“ der Membran

#### „Stripping“-Lösung

Tabelle 5.22: Zusammensetzung der "Stripping"-Lösung

Komponente	Konzentration	Firma
NaOH	100 mM	Grüssing
SDS	2%	AppliChem
DTT	0,5%	Carl Roth

## 5.1.3 Zellkulturtechniken

### 5.1.3.1 Auftauen, Passagieren, Einfrieren von Zellen

#### Kultivierungsmedium

Tabelle 5.23: Zusammensetzung des Kultivierungsmediums für Zellen

Komponente	Medium <sup>Ø</sup>	Medium <sup>Neomycin</sup>	Firma
DMEM	500 ml	500 ml	PAN Biotech
FCS	50 ml	50 ml	PAN Biotech
Penicillin/ Streptomycin	3 ml	3 ml	Gibco by life technologies
G418-BC 30,000 U/ml	keine Zugabe	5,5 ml	Biochrom

#### 2x Gefriermedium

20% DMSO (Sigma-Aldrich) in FCS

#### Waschpuffer

DPBS without Ca and Mg (PAN Biotech)

#### Zell-dissoziierende Enzyme

Trypsin-EDTA solution 1x (PAN Biotech)

### 5.1.3.2 Transfektion von Zellen

#### Transfektionsreagenz

Lipofectamine 2000 Reagent (Invitrogen by life technologies)

#### Transfektionsmedium

Opti-MEM (1x) Reduced Serum Media (Gibco by life technologies)

### 5.1.3.3 Immunzytochemie

#### Fixierlösung

4% PFA (Sigma-Aldrich) in PBS

#### Waschpuffer

1x PBS

0,1% PBT: 0,1% Tween-20 (Sigma-Aldrich) in PBS

#### Detergenz

0,1% PBT

#### Block- und Färbelösungen

Tabelle 5.24: Zusammensetzung von Block- und Färbelösung für immunzytochemische Analysen

Komponente	Blocklösung	Färbelösung
NGS	10%	1,5%
Glycin	0,3 M	keine Zugabe
Tween-20	0,1%	0,1%
PBS	auf das gewünschte Gesamtvolumen auffüllen	

#### Primäre Antikörper für Immunzytochemie

Tabelle 5.25: Primäre Antikörper für Immunzytochemie

Antikörper	Bezeichnung	Verdünnung	Herkunft	Firma
anti-CHMP4B	CHMP4B (C12): sc-82556	1:100	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology
anti-CHMP7	CHMP7: 16424-1-AP	1:100	Kaninchen	Proteintech
anti-LaminB1	Anti-Lamin B1: ab16048	1.100	Kaninchen	abcam
anti-LAMP1	1D4B anti-LAMP1	1:100	Ratte	Hybridoma
anti-Notch2	Notch2 (D76A6) XP: 5732	1:1000	Kaninchen	Cell Signaling Technology
anti-Rab7	Anti-RAB7: ab126712	1:100	Kaninchen	abcam
anti- $\alpha$ -Tubulin	Anti- $\alpha$ -Tubulin (B512): T-5168	1:500	Maus	Sigma-Aldrich

#### Sekundäre Antikörper für Immunzytochemie

Tabelle 5.26: Sekundäre Antikörper für Immunzytochemie

Antikörper	Bezeichnung	Verdünnung	Herkunft	Firma
anti-Maus-488/568/647	Alexa Fluor 488/568/647 goat anti mouse IgG (H+L)-highly cross-adsorbed	1:5000	Ziege	Invitrogen
anti-Ratte-488/568/647	Alexa Fluor 488/568/647 goat anti rat IgG (H+L)			
anti-Kaninchen-488/568/647	Alexa Fluor 488/568/647 goat anti rabbit IgG (H+L)			

#### Reagenz zur Zellkernfärbung

DAPI [100  $\mu$ g/ml] (Serva Electrophoresis) in 0,18 M TRIS-HCl pH 7.4

#### Einbettungsmedium

Vectashield Antifade Mounting Medium (Vector Laboratories)

### 5.1.3.4 Einbettung und Kontrastierung der Zellen für TEM-Analysen

#### Fixierung der Proteine

Tabelle 5.27: Zusammensetzung der Proteinfixierlösung

Komponente	Menge	Firma
Glutaraldehyd	2,0%	Science Services
Pikrinsäure	0,2%	Sigma-Aldrich
Cacodylat-Puffer	0,1 M	Sigma-Aldrich

#### Waschpuffer

0,1 M Natriumcacodylatsalz (Sigma-Aldrich) in dH<sub>2</sub>O

#### Fixierung der Lipide

4% Osmiumtetroxid (Science Services)

#### Entwässerung

Ethanolreihe (Honeywell)

Epoxy Embedding Medium Kit (Sigma-Aldrich)

#### Kontrastmittel

2% Uranylacetat (Merck)

Bleicitrat (Schuchardt München)

### 5.1.3.5 Zelllinien

Tabelle 5.28: Verwendete Zelllinien

Zelllinie (MEFs)	Herkunft
<i>Cc2d1a</i> <sup>+/+</sup> ; <i>Cc2d1b</i> <sup>+/+</sup> (interne Bezeichnung WT 17)	AG Klein; HHU
<i>Cc2d1a</i> <sup>+/+</sup> ; <i>Cc2d1b</i> <sup>-/-</sup> (interne Bezeichnung <i>Cc2d1b</i> -KO 3)	
<i>Cc2d1a</i> <sup>-/-</sup> ; <i>Cc2d1b</i> <sup>+/+</sup> (interne Bezeichnung <i>Cc2d1a</i> -KO 16)	
<i>Cc2d1a</i> <sup>-/-</sup> ; <i>Cc2d1b</i> <sup>-/-</sup> (interne Bezeichnung CRE DKO 6C6)	
<i>Cc2d1a</i> <sup>-/-</sup> ; <i>Cc2d1b</i> <sup>-/-</sup> (interne Bezeichnung CRE DKO 11A3)	
<i>Vps4a</i> <sup>+/+</sup> ; <i>Vps4b</i> <sup>+/+</sup> (interne Bezeichnung <i>Vps4</i> he 9)	

## 5.1.4 Drosophila melanogaster Techniken

### 5.1.4.1 Kultivierung von *D. melanogaster*

#### Nährmedium

Tabelle 5.29: Zusammensetzung des Nährmediums zur Kultivierung von *D. melanogaster*

Komponente	Menge*	Firma
Agar	100 g	Carl Roth
Maisgrieß	1424 g	Küper
Sojamehl	190 g	SOBO Naturkost
Trockenhefe	336 g	Heirler Cenovis
Rübensirup	800 g	Grafschafter

Gerstenmalzextrakt	900 g	Lindenmeyer GmbH
Nipaginlösung in Ethanol	300 ml	Merck
Propionsäure	90 ml	Sigma-Aldrich

\* bezogen auf 20 L Gesamtvolumen

### 5.1.4.2 Immunhistochemie an Flügelimaginalscheiben

#### Puffer

PBS: Zusammensetzung siehe Abschnitt 5.1.2.14.

0,3% PBT: 0,3% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) in PBS

#### Fixierlösung

4% PFA in PBS

#### Blocklösung und Färbelösung

5% NGS (Jackson ImmunoResearch) in 0,3% PBT

#### Einbettungsmedium

Vectashield Antifade Mounting Medium (Vector Laboratories)

#### Primäre Antikörper für die Immunhistochemie (IHC)

Tabelle 5.30: Primäre Antikörper für immunhistochemische Analysen

Antikörper	Bezeichnung	Verdünnung	Herkunft	Firma
anti-CHMP4B	CHMP4B (C12): sc-82556	1:100	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology
anti-Nextra	C458.2H EGF12-20	1:100	Maus	Hybridoma

#### Sekundäre Antikörper für die Immunhistochemie (IHC)

Siehe Tab. 5.26 „Sekundäre Antikörper für Immunzytochemie“

#### Reagenz zur Zellkernfärbung

Hoechst 33258 (life technologies by Thermo Fisher Scientific)

### 5.1.5 Fliegenstämme

Tabelle 5.31: Verwendete Fliegenstämme

Stamm	Herkunft
<i>w; lf/CyO<sup>wg-lacZ</sup>; MKRS/TM6B</i>	Stammsammlung AG Klein, HHU
<i>w; Igd<sup>d7</sup> FRT40A/CyO<sup>wg-lacZ</sup>; MKRS/TM6B</i>	
<i>w; shrub<sup>4-1</sup> FRTG13/CyO<sup>wg-lacZ</sup>; MKRS/TM6B</i>	
<i>w; lf/Sm6a-TM6B</i>	
<i>w; lf/CyO<sup>wg-lacZ</sup>; attP 86 Fb shrubP CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup> /TM6B</i>	Diese Arbeit
<i>w; shrub<sup>4-1</sup> FRT13G/CyO<sup>wg-lacZ</sup>; attP 86 Fb shrubP CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup>/TM6B</i>	
<i>w; shrub<sup>4-1</sup> FRT13G; attP 86 Fb shrubP CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup>/SM6a-TM6B</i>	
<i>hhFL1.2; FRTG13 His-RFP/CyO; attP 86 Fb shrubP CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup>/TM6B</i>	

### 5.1.6 Geräte

Tabelle 5.32: Verwendete Geräte mit Angaben zum Verwendungszweck und Hersteller / Firma

Gerät	Verwendungszweck	Hersteller / Firma
Professional Thermocycler	PCR-Maschine	biometra
Stratagene Mx3005P	qPCR-Maschine	Agilent Technologies
dry bath FB 15103	Heizblock	Fisher Scientific
QBD1	Heizblock	Grant
Julabo U3	Wasserbad	Julabo
ThermoCell Mixing Block MB-102	Schüttelgerät mit Heizfunktion	Bioer
Avanti J-26 XP Centrifuge	Zentrifuge	Beckman Coulter
Mikro 220R	Zentrifuge	Hettich Zentrifugen
FUNCTION Line Laborfuge 400 R	Zentrifuge	Heraeus Instruments
PicoFuge	Zentrifuge	Stratagene
Mini Star Silverline	Zentrifuge	VWR
Vortex-Genie	Vortexer	Scientific Industries
Intelli-Mixer RM-2L	Rotator	ELMI
Polymax 2040	Schüttelgerät	Heidolph Instruments
CAT RM5	Rollenmischer	CAT
SM-30	Universalschüttler	Edmund Bühler GmbH
Microcomputer electrophoresis power supply	Netzgerät	Consort
peqPOWER	Netzgerät	peqlab
Trans-Blot Turbo Transfer System	Blotter	Bio-Rad Laboratories
Waage BL 6000	Waage	Sartorius
pH Meter pH 538	pH-Meter	WTW
BioPhotometer	Photometer	eppendorf
NanoDrop ND-2000	Spektralphotometer	peqlab
Axiomager.Z1m	Fluoreszenzmikroskop	ZEISS
Axio Vert. A1	Lichtmikroskop	ZEISS
EM902A	Transmissionselektronen-Mikroskop	ZEISS
Axiovert 25	Inverses Mikroskop	ZEISS
LAS-4000 mini	Lumineszenz-Messgerät	Fujifilm
FORMA Steri-Cycler CO <sub>2</sub> Inkubator	Zellkulturinkubator	Thermo Scientific
HERAsafe	Sterilbank	Heraeus Instruments
ÄKTA prime plus	Automatisiertes Reinigungssystem	GE Healthcare Bio-Sciences
ZiegraEismaschine	Eismaschine	Ziegra
Labsonic U	Sonifikator	B.Braun
R-967	Mikrowelle	Sharp
Transilluminator	UV-Lichtgerät	peqlab
Epson Perfection V800 Photo	Scanner	Epson

### 5.1.7 Programme und Internetdatenbanken

Tabelle 5.33: Verwendete Programme und Internetdatenbanken mit Angaben zum Verwendungszweck

Programm / Datenbank	Verwendungszweck	Hersteller / Firma
Axio Vision LE, Axio Vision40 Version 4.7.2.0	Bildbearbeitung	Zeiss
ImageJ 1.52a	Bildbearbeitung	Wayne Rasband

Adobe Photoshop CS4	Bildbearbeitung	Adobe Systems
LAS-4000 mini Ver.2.1	Aufnahme von Western Blot	Fujifilm
GelAnalyzer 2010a	Auswertung von Gelen	Istvan Lasar
MxPro-MxPro3005P v4.10	Darstellung der qPCR-Ergebnisse	Agilent
Microsoft Office Professional Plus 2016	Textbearbeitung und mathematische Datenauswertung	Microsoft Corporation
EndNote X9	Referenz-Manager	Clarivate Analytics
SerialCloner 2.6.1	Auswertung von DNA-Sequenzen	SerialClonerInc.
NCBI	Literaturrecherche	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>
UniProt	Proteindatenbank	<a href="https://www.uniprot.org/">https://www.uniprot.org/</a>

## 5.2 Methoden

### 5.2.1 Nukleinsäure-Techniken

#### 5.2.1.1 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine molekularbiologische Methode zur *in vitro* Amplifikation eines gewünschten DNA-Fragments. Diese Methode erlaubt eine gezielte Vervielfältigung von geringen DNA-Mengen innerhalb einer kurzen Zeit und ermöglicht somit weitere Analysen mit dem gewonnenen Material. Eine klassische PCR setzt sich aus drei Schritten zusammen: Denaturierung (Auftrennung der komplementären Stränge), Annealing (Anlagerung der Primer) und Elongation (Einfügen der Nukleotide mittels einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase). Die drei grundlegenden Schritte durchlaufen mehrere Zyklen, damit das gewünschte Produkt in ausreichenden Mengen amplifiziert werden kann. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten PCRs werden im weiteren Verlauf näher beschrieben.

#### mHprt-PCR

Die *mHprt*-PCR diente der Effizienzanalyse der cDNA-Synthese. Bei *mHprt* handelt es sich um ein sogenanntes murines Haushaltsgen, das ubiquitär exprimiert wird. Der *mHprt*-Ansatz sowie das PCR-Programm sind in der Tabelle 5.34 dargestellt.

Tabelle 5.34: PCR-Ansatz und Programm zur Amplifikation von *mHprt*

PCR-Ansatz		PCR-Programm			
Komponente	Volumen	PCR-Zyklus	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
5x Green GoTaq Reaction Buffer	5,0 µl	Initiale Denaturierung	95°C	2 min.	1x
MgCl <sub>2</sub> [25 mM]	1,5 µl	Denaturierung	95°C	30 sek.	40x
dNTPs [10 mM]	0,5 µl	Annealing	51°C	30 sek.	
mHprt_for [10 µM]	0,5 µl	Elongation	72°C	30 sek.	
mHprt_rev [10 µM]	0,5 µl	Finale Elongation	72°C	10 min.	1x
GoTaq DNA Polymerase [5 U/µl]	0,1 µl	Lagerung	8°C	∞	1x
cDNA (unverdünnt)	0,5 µl				
Gesamtvolumen: 25 µl					

**PCR-Produktgröße:** 300 bp

PCR zur Generierung der Konstrukte *KpnI-CC2D1B-Stopp-EcoRI* und *EcoRI-CC2D1A-Stopp-HindIII* zur Klonierung in den *pBAD-HisB*-Vektor

Die Klonierung der *pBAD-HisB-CC2D1B* und *pBAD-HisB-CC2D1A* Konstrukte basierte auf der Generierung von *KpnI-CC2D1B-Stopp-EcoRI* und *EcoRI-CC2D1A-Stopp-HindIII* PCR-Fragmenten. Die entsprechenden PCR-Ansätze sowie die dazu gehörenden PCR-Programme sind in den Tabellen 5.35 und 5.36 zusammengefasst.

**Tabelle 5.35: PCR-Ansatz und Programm zur Generierung von *KpnI-CC2D1B-EcoRI***

PCR-Ansatz		PCR-Programm			
Komponente	Volumen	PCR-Zyklus	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
5x Q5 Reaction Buffer	5,0 µl	Initiale Denaturierung	98°C	30 sek.	1x
MgCl <sub>2</sub> [25 mM]	1,5 µl	Denaturierung	98°C	10 sek.	35x
dNTPs [10 mM]	0,5 µl	Annealing	66°C	10 sek.	
KpnI-hLGD1_for [10 µM]	1,25 µl	Elongation	72°C	27 sek.	
EcoRI-Stopp hLGD1_rev [10 µM]	1,25 µl	Finale Elongation	72°C	2 min.	1x
Q5 High-Fidelity DNA Polymerase [2 U/µl]	0,25 µl	Lagerung	8°C	∞	1x
pQE-30Xa-hLGD1 (100 ng/µl)	1,0 µl				
Gesamtvolumen: 25 µl					

**PCR-Produktgröße: 2571 bp**

**Tabelle 5.36: PCR-Ansatz und Programm zur Generierung von *EcoRI-CC2D1A-HindIII***

PCR-Ansatz		PCR-Programm			
Komponente	Volumen	PCR-Zyklus	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
5x Q5 Reaction Buffer	5,0 µl	Initiale Denaturierung	98°C	30 sek.	1x
MgCl <sub>2</sub> [25 mM]	1,5 µl	Denaturierung	98°C	10 sek.	35x
dNTPs [10 mM]	0,5 µl	Annealing	66°C	10 sek.	
EcoRI-hLGD2_for [10 µM]	1,25 µl	Elongation	72°C	30 sek.	
HindIII-Stopp hLGD2_rev [10 µM]	1,25 µl	Finale Elongation	72°C	2 min.	1x
High-Fidelity Q5 DNA-Polymerase [2 U/µl]	0,25 µl	Lagerung	8°C	∞	1x
pQE-30Xa-hLGD2 (100 ng/µl)	1,0 µl				
Gesamtvolumen: 25 µl					

**PCR-Produktgröße: 2868 bp**

PCR zur Generierung der Konstrukte *Agel-pBAD-His10-TEV-KpnI* und *Agel-pBAD-His10-TEV-EcoRI*

Der Austausch der kodierenden Sequenz für His6-EK durch die kodierende Sequenz für His10-TEV erfolgte durch die Generierung der PCR-Fragmente *Agel-pBAD-His10-TEV-KpnI* und *Agel-pBAD-His10-TEV-EcoRI*. Der entsprechende PCR-Ansatz und das dazu gehörende PCR-Programm sind in der Tabelle 5.37 zusammengefasst.

Tabelle 5.37: PCR-Ansatz und Programm zur Generierung von Agel-pBAD-His10-TEV-KpnI/ EcoRI

PCR-Ansatz		PCR-Programm			
Komponente	Volumen	PCR-Zyklus	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
5x Q5 Reaction Buffer	5,0 µl	Initiale Denaturierung	98°C	30 sek.	1x
MgCl <sub>2</sub> [25 mM]	1,5 µl	Denaturierung	98°C	10 sek.	35x
dNTPs [10 mM]	0,5 µl	Annealing	69°C	10 sek.	
Agel-pBAD_for [10 µM]	1,25 µl	Elongation	72°C	10 sek.	
pBAD-TEV-His10-KpnI (rev) [10 µM] oder pBAD-TEV-His10-EcoRI (rev) [10 µM]	1,25 µl	Finale Elongation	72°C	2 min.	1x
Q5 High-Fidelity DNA Polymerase [2 U/µl]	0,25 µl	Lagerung	8°C	∞	1x
pBAD-HisB (100 ng/µl)	1,0 µl				
Gesamtvolumen: 25 µl					

**PCR-Produktgröße:**

Agel-pBAD-His10-TEV-KpnI → 356 bp

Agel-pBAD-His10-TEV-EcoRI → 356 bp

PCR zur Generierung des Konstrukts *NotI-CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup>-KpnI* zur Klonierung in den *pattB shrubP rescue Vektor*

Die Klonierung von *CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup>* in den *pattB shrubP rescue Vektor* erfolgte über die *NotI/KpnI*-Schnittstellen. Hierzu wurde *NotI-CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup>-KpnI* mittels des folgenden PCR-Ansatzes generiert (Tab. 5.38).

Tabelle 5.38: PCR-Ansatz und Programm zur Generierung von *NotI-CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup>-KpnI*

PCR-Ansatz		PCR-Programm			
Komponente	Volumen	PCR-Zyklus	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
5x Q5 Reaction Buffer	5,0 µl	Initiale Denaturierung	98°C	30 sek.	1x
MgCl <sub>2</sub> [25 mM]	1,5 µl	Denaturierung	98°C	10 sek.	35x
dNTPs [10 mM]	0,5 µl	Annealing	65°C	10 sek.	
<i>NotI-CHMP4B_for</i> [10 µM]	1,25 µl	Elongation	72°C	9 sek.	
<i>KpnI-Stopp-CHMP4B_rev</i> [10 µM]	1,25 µl	Finale Elongation	72°C	2 min.	1x
Q5 High-Fidelity DNA Polymerase [2 U/µl]	0,25 µl	Lagerung	8°C	∞	1x
pQE-30Xa- <i>CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup></i> (100 ng/µl)	1,0 µl				
Gesamtvolumen: 25 µl					

**PCR-Produktgröße: 689 bp**Quantitative RT-PCR

Um die Expressionsstärke eines Zielgens quantifizieren zu können, wurde die mittels der Reversen Transkription synthetisierte cDNA mit Hilfe der quantitativen RT-PCR (qRT-PCR) analysiert. Die qRT-PCR-Methode setzt sich aus den grundlegenden PCR-Schritten zusammen, wobei die Verwendung spezifischer Oligonukleotide die Amplifikation des Zielgens erlaubt. Dies wird durch die gleichzeitige Echtzeitmessung des entstehenden PCR-Produkts



ergänzt, wobei die Messung durch die Applikation von Fluoreszenzfarbstoffen oder sequenzspezifischen Fluorophor-markierten Sonden ermöglicht wird. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten qRT-PCRs basierten auf der Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR Green, der unspezifisch in doppelsträngige DNA-Moleküle interkaliert. Während das in der Reaktionslösung ungebundene SYBR Green kein Licht emittiert, führt seine Bindung an die doppelsträngige DNA zur Absorption des blauen ( $\lambda=497$  nm) und zur Emission des grünen Lichts ( $\lambda=520$  nm), dessen Intensität direkt proportional zur DNA-Konzentration ist und mittels eines Sensors detektiert werden kann (Übersicht in Arya et al., 2005).

Um die Auswertung der Ergebnisse zu ermöglichen, wird parallel zum Zielgen die Expression eines Haushaltsgens gemessen, das in allen Zellen ubiquitär exprimiert und zur Normierung verwendet wird. Dabei basierte die Normierung aller durchgeführten qRT-PCRs auf der Messung der Expressionsstärke des *Gapdh*-Gens. Um mögliche Messfehler zu reduzieren, wurde die Expression des Ziel- sowie Haushaltsgens in Triplets gemessen.

Die Berechnung der Expressionsstärke wurde mit Hilfe der „ $\Delta\Delta$ Ct-Methode“ durchgeführt, bei der der gemessene Ct-Punkt (*cycle threshold*) den Anfang des exponentiellen Anstiegs der Kurve über den Hintergrundwert angibt (Livak und Schmittgen, 2001). Um den sogenannten  $\Delta$ Ct-Wert zu berechnen, wurde der Ct-Wert des Haushaltsgens von dem jeweiligen Ct-Wert des Zielgens abgezogen. Anschließend wurde der  $\Delta$ Ct-Mittelwert der festgelegten Kontrollprobe von dem  $\Delta$ Ct-Wert der zu untersuchenden Probe subtrahiert, wobei der ausgerechnete Wert als  $\Delta\Delta$ Ct bezeichnet wurde. Dieser Wert wurde anschließend in die Formel  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  eingesetzt, um die relative Expression und anschließend den Expressionsunterschied zwischen der Kontroll- und der Testprobe zu berechnen.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte qRT-PCR ist in der Tabelle 5.39 dargestellt.

qRT-PCR zur Expressionsmessung von *Nrarp*

Tabelle 5.39: qRT-PCR-Ansatz und Programm zur Messung der *Nrarp*-Expression

PCR-Ansatz		PCR-Programm			
Komponente	Volumen	PCR-Zyklus	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2x) Universal	5,0 $\mu$ l	„two-step“-PCR	98°C	15 min.	1x
NRARP_F6a oder GAPDH_F2 [10 $\mu$ M]	0,2 $\mu$ l		95°C	10 sek.	40x
NRARP_R6b oder GAPDH_R2 [10 $\mu$ M]	0,2 $\mu$ l		64°C	30 sek.	
cDNA (unverdünnt)	1,0 $\mu$ l	Schmelzkurve	95°C	60 sek.	1x
Gesamtvolumen: 10 $\mu$ l			55°C	30 sec.	
			95°C	30 sec	

**PCR-Produktgröße:** *Nrarp* → 203 bp  
*Gapdh* → 150 bp

### 5.2.1.2 DNA-Gelelektrophorese

Der Nachweis eines mittels PCR generierten DNA-Produktes oder eines nach Restriktionsspaltung entstandenen Fragmentes erfolgte mit Hilfe der elektrophoretischen Auftrennung in einem Agarosegel. Hierzu wurde die benötigte Agarosemenge in TAE-Puffer aufgekocht, auf ca. 60°C abgekühlt, mit Ethidiumbromid versetzt (2 µl pro 100 ml) und in einem Gelschlitten auspolymerisiert. Je nach der Größe des Fragments variierte die Prozentigkeit des Gels zwischen 0,8% und 1,8%. Daraufhin wurde das Gel in eine Gelkammer mit TAE-Puffer überführt und mit Proben beladen, die kurz davor mit sechsfachem Ladepuffer versetzt wurden. Der Ladepuffer begünstigt das Absinken der Proben in die Geltaschen durch das enthaltene Glycerin und gewährleistet die Visualisierung der Lauffront durch Xylencyanol und Bromphenolblau. Anschließend wurde die Apparatur an eine Stromquelle mit 70 – 120 Volt angeschlossen. Die Ergebnisse wurden mittels eines Geldetektionssystems von Bio-Rad dokumentiert, wobei die Detektion der DNA durch Ethidiumbromid ermöglicht wurde.

### 5.2.1.3 DNA-Gelextraktion

Die Extraktion der DNA aus dem Agarosegel erfolgte mit Hilfe des Zymoclean Gel DNA Recovery Kits von Zymo Research entsprechend den Herstellerangaben. Die Elution der DNA wurde durch die Zugabe von 8 µl Elutionspuffer durchgeführt.

### 5.2.1.4 Restriktionsspaltung

Restriktionsspaltung ist eine enzymatische Reaktion, die DNA-Hydrolyse an einer gewünschten Position erlaubt. Der Bereich, an dem die DNA-Spaltung erfolgt, ist durch eine bestimmte Basenabfolge gekennzeichnet, die durch Restriktionsendonukleasen erkannt wird. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Restriktionsspaltung durchgeführt, um entweder das entstandene Fragment mit einem anderen, ebenfalls gespaltenen Fragment zu ligieren oder um die Existenz eines bestimmten Inserts im Vektor von Interesse nachzuweisen. Der verwendete Restriktionsansatz kann der Tabelle 5.40 entnommen werden.

**Tabelle 5.40: Restriktionsansatz**

Komponente	Menge
DNA	5 - 10 µg (präparativ) oder 0,5 µg (analytisch)
Restriktionsenzym 1	10 Units
Restriktionsenzym 2	10 Units
10x Reaktionspuffer	2 µl
dH <sub>2</sub> O	auf Gesamtvolumen von 20 µl auffüllen

Alle Restriktionsansätze wurden bei 37°C durchgeführt. Die analytische Restriktionsspaltung dauerte eine Stunde, während die präparative Restriktion eine Inkubation von mindestens drei Stunden bis zu über Nacht erforderte.

### 5.2.1.5 Ligation

Bei der Ligation handelt es sich um einen enzymatischen Vorgang, der durch das Enzym Ligase katalysiert wird und der Verknüpfung von zwei DNA-Enden dient. Dabei führt die Verknüpfung des 5'-Phosphat-Endes mit dem 3'-Hydroxy-Ende zur Entstehung eines zirkulären DNA-Moleküls. Die Effizienz, mit der die Ligase die Zirkularisierung ausführt, hängt von Inkubationstemperatur, Inkubationsdauer und dem „Insert zu Vektor“-Verhältnis ab. Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Mengen an Insert basierten auf der folgenden Formel:

$$\text{Masse}^{\text{Insert}} \text{ (ng)} = (\text{A} \times \text{Masse}^{\text{Vektor}} \text{ (ng)} \times \text{Länge}^{\text{Insert}} \text{ (bp)}) / \text{Länge}^{\text{Vektor}} \text{ (bp)}$$

A: Insert zu Vektor-Verhältnis

Alle durchgeführten Ligationsansätze wurden zwei Stunden bei 22°C bei einem „Insert zu Vektor-Verhältnis“ von 5:1 unter der Verwendung des T4 DNA Ligase Systems durchgeführt. Der verwendete Ansatz ist in der Tabelle 5.41 zusammengefasst.

**Tabelle 5.41: Ligationsansatz**

Komponente	Menge
Vektor	50 ng
Insert	250 ng
10x T4 DNA Ligase Puffer	2 µl
T4 DNA Ligase (5 Weiss Units/µl)	0,2 µl
dH <sub>2</sub> O	auf das Gesamtvolumen von 20 µl auffüllen

### 5.2.1.6 Transformation chemisch kompetenter Bakterien

Die mittels Ligation generierten Plasmide wurden in chemisch kompetenten Bakterien transformiert, um das gewünschte Plasmid zu vervielfältigen. Hierzu wurden die Bakterien auf Eis aufgetaut und mit 10 µl des Ligationsansatzes versetzt, um anschließend weitere 30 Minuten auf Eis inkubiert zu werden. Der darauffolgende Hitzeschock für 90 Sekunden bei 42°C diente der Aufnahme der Plasmide in die Bakterien und wurde von einer Inkubation auf Eis für zweieinhalb Minuten gefolgt. Anschließend wurden die Bakterien mit 1 ml LB-Medium ohne Antibiotikum versetzt und 60 Minuten bei 37°C geschüttelt. Nach dem Ablauf der angegebenen Zeit wurden die Bakterien 20 Sekunden bei 6200 x g zentrifugiert, wobei der Überstand bis auf 50 µl verworfen wurde und die Bakterien in der Restflüssigkeit resuspendiert wurden. Da alle verwendeten Vektoren die Sequenz für die Ampicillin-Resistenz trugen, wurde die Bakteriensuspension auf einer Ampicillin-haltigen Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### 5.2.1.7 Plasmid-DNA-Mini-Präparation

Um die Plasmid-DNA in Bakterien zu vervielfältigen und sie anschließend in kleinen Mengen zu isolieren, wurde jeweils eine Bakterienkolonie in ein Reagenzglas mit 1,5 ml LB-Medium

mit Ampicillin überführt und über Nacht bei 37°C unter permanenten Schütteln kultiviert. Am darauffolgenden Tag wurde die angewachsene Kultur in ein Reaktionsgefäß transferiert und fünf Minuten bei 13000 x g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen, während das Pellet in 300 µl kalten Resuspensionspuffer gevortext wurde. Anschließend erfolgte die Zellyse, die durch eine fünfminütige Inkubation mit 300 µl Lysispuffer bei RT initiiert wurde, wobei die Bestandteile des Puffers die Denaturierung der Proteine auslösten. Im Anschluss darauf wurden die Proben mit 300 µl des Neutralisationspuffers vermischt, mehrmals invertiert und fünf Minuten bei RT inkubiert, bevor die Proben 20 Minuten bei 13000 x g und 4°C zentrifugiert wurden. Nach der Zentrifugation wurden 750 µl des Überstandes mit 500 µl Isopropanol vermischt und erneut 30 Minuten unter denselben Bedingungen zentrifugiert, um die Plasmid-DNA zu präzipitieren. Nach dem der Überstand verworfen wurde, wurde das Pellet mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen. Es folgte eine Zentrifugation bei 13000 x g und 4°C für 15 Minuten. Mittels des Waschschrilles wurden Salze entfernt, die bei der Plasmid-DNA-Präzipitation ausgefallen sind. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen, die Restflüssigkeit abgenommen und das Pellet zehn Minuten bei 55°C getrocknet. Anschließend wurde die Plasmid-DNA in 20 µl dH<sub>2</sub>O aufgenommen und weitere zehn Minuten bei 55°C inkubiert. Die Lagerung der resuspendierten Proben erfolgte bei -20°C. Die bei der Plasmid-DNA-Mini-Präparation verwendeten Lösungen sind in der Tabelle 5.6 zusammengefasst.

#### 5.2.1.8 Plasmid-DNA-Midi-Präparation

Die Plasmid-DNA-Midi-Präparation wurde zur Isolierung von größeren Plasmid-Mengen eingesetzt und mit Hilfe von „NucleoBond Xtra Midi“ Kit entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Die eluierte DNA wurde in 50 - 100 µl dH<sub>2</sub>O resuspendiert.

#### 5.2.1.9 Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren

Die Konzentrationsmessung der DNA- und RNA-haltigen Proben erfolgte am NanoDrop entsprechend den Herstellerangaben. Als Referenz diente die Lösung, in der sich die zu analysierende Probe befand.

#### 5.2.1.10 Sequenzierung

Alle Sequenzierungen wurden durch die Firma „Microsynth Seqlab“ in Göttingen durchgeführt. Der Sequenzierungsansatz ist in der Tabelle 5.42 zusammengefasst.

**Tabelle 5.42: Sequenzierungsansatz**

Komponente	Menge
Plasmid-DNA	1,2 µg
Primer (optional) (10 µM)	1 µl
dH <sub>2</sub> O	auf 15 µl auffüllen

Die Sequenzanalyse erfolgte mit Hilfe der Software „*Serial Cloner*“ (Tab.5.33).

#### 5.2.1.11 RNA-Extraktion aus MEFs

Um RNA aus MEFs zu isolieren, wurden  $8 \times 10^4$  Zellen/ well auf einer 6-well-Platte ausplattiert und bis zu einer Konfluenz von 70 bis 90% im Inkubator kultiviert. Beim Erreichen der benötigten Dichte wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit je 1 ml phenolhaltiger peqGOLD TriFast Lösung versetzt. Nach dem die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers von dem Plattenboden gelöst und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren resuspendiert wurden, wurden sie in ein Reaktionsgefäß überführt und fünf Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurde jede Probe mit 200  $\mu$ l Chloroform versetzt und 15 Sekunden kräftig geschüttelt. Nach einer zehnminütigen Inkubation bei RT wurden die Proben zehn Minuten bei 12000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit Isopropanol vermischt. Es folgte eine Inkubation auf Eis für 15 Minuten. Die anschließende Zentrifugation bei 12000 x g und 4°C für zehn Minuten diente dem Präzipitieren der RNA, die im darauffolgenden Schritt zweimal mit 1 ml 70% Ethanol in DEPC-H<sub>2</sub>O gewaschen wurde, wobei die Proben jedes Mal zehn Minuten bei 12000 x g und 4°C zentrifugiert wurden. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Reste des Ethanols mit einer Pipette abgenommen und die Probe wurde ca. fünf Minuten bei 55°C getrocknet. Zum Schluss erfolgte die Zugabe von 10 - 20  $\mu$ l DEPC-H<sub>2</sub>O, wobei die Pellets fünf Minuten bei 55°C resuspendiert wurden. Nach der Konzentrationsbestimmung wurden die Proben entweder bei -70°C gelagert oder direkt einer DNase I Behandlung unterzogen.

#### 5.2.1.12 DNase I Behandlung von RNA-Proben

Da bei der Isolierung der RNA eine Kontamination mit genomischer DNA nicht auszuschließen ist, wurden alle RNA-Extrakte mit DNase I behandelt. Der dabei verwendete Reaktionsansatz ist in der Tabelle 5.43 zusammengefasst.

**Tabelle 5.43: DNase I Reaktionsansatz**

Komponente	Menge
RNA	2 - 4 $\mu$ g
DNase I, RNase-frei	1 Unit/ 1 $\mu$ g RNA
10 x Reaktionspuffer	1 $\mu$ l
DEPC-H <sub>2</sub> O	auf Gesamtvolumen von 10 $\mu$ l auffüllen

Der Reaktionsansatz wurde 50 Minuten bei 37°C inkubiert und durch die Zugabe von 1  $\mu$ l 50 mM EDTA und anschließender Inkubation bei 65°C abgestoppt. Anschließend wurden die Proben entweder bei -70°C gelagert oder unmittelbar für die cDNA-Synthese eingesetzt.

### 5.2.1.13 cDNA-Synthese

Bei einer cDNA-Synthese wird die einzelsträngige RNA mittels des Enzyms Reverse Transkriptase in komplementäre DNA umgeschrieben. Da alle mRNAs über eine polyA-Sequenz am 3'-Terminus verfügen, können Oligo(dT)-Nukleotide eingesetzt werden, die komplementär an diese Sequenz binden und somit als Startpunkt für die Reverse Transkriptase fungieren. Auf diese Weise werden die in der Probe enthaltenen mRNAs umgeschrieben. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte cDNA-Synthese wurde mit Hilfe von GoScript Reverse Transcription System der Firma Promega durchgeführt. Hierbei wurden bei jedem Ansatz 4 µl der mit der DNase I behandelten Probe mit 1 µl Oligo(dT) versetzt und fünf Minuten bei 70°C inkubiert. Anschließend wurde die Probe fünf Minuten auf Eis abgekühlt und unmittelbar darauf mit dem cDNA-Syntheseansatz vermischt. Der verwendete Reaktionsansatz ist in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 5.44: cDNA-Syntheseansatz

Komponente	Menge
5x GoScript Reaktionspuffer	4 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	3 µl
10 mM dNTP Mix	1 µl
Reverse Transkriptase	1 µl
rRNasin RNase Inhibitor (40 Units/µl)	1 µl
DEPC-H <sub>2</sub> O	auf Gesamtvolumen von 15 µl auffüllen

Der Reaktionsansatz wurde fünf Minuten bei 25°C inkubiert, um den Annealingschritt zu ermöglichen. Die Reverse Transkription wurde eine Stunde bei 42°C durchgeführt, wobei die Reverse Transkriptase nach dem Ablauf der Zeit mittels 15-minütiger Inkubation bei 70°C inaktiviert wurde. Die Effizienz der cDNA-Synthese wurde mit Hilfe der *mHprt*-PCR getestet. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -20°C.

## 5.2.2 Proteinbiochemie

### 5.2.2.1 Proteinextraktion aus Zellen

Um Proteine aus MEFs zu isolieren, wurden die Zellen in einer T25-Flasche ausplattiert und bis zu einer Konfluenz von ca. 90 bis 100% bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Nach dem Erreichen der benötigten Konfluenz wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit 1,5 ml Trypsin für fünf Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen im dreifachen Volumen DMEM<sup>Ø</sup> resuspendiert und in ein Zentrifugenröhrchen überführt, um fünf Minuten bei 100 x g und RT zentrifugiert zu werden. Nachdem der Überstand verworfen wurde, wurde das Pellet in 2 ml PBS resuspendiert und fünf Minuten bei 12000 x g und 4°C zentrifugiert. Die Lyse der Zellen erfolgte durch die Zugabe von 200 µl Proteinlysepuffer (+ PIC und PMSF → 1:200) und anschließender 20-minütiger Inkubation bei

4°C im Rotator. Daraufhin wurden die Proben 30 Minuten bei 4°C und 12000 x g zentrifugiert, wobei der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt wurde. Anschließend wurden die Proteinproben mit 4x Lämmli-Puffer versetzt, zehn Minuten bei 95°C inkubiert und nach einer kurzen Inkubation auf Eis bei -70°C gelagert.

### 5.2.2.2 Co-Immunopräzipitation

Die Co-Immunopräzipitation (Co-IP) wird als eine indirekte Nachweismethode von Protein-Protein-Interaktion in einem Gesamtproteinlysat eingesetzt. Damit die potentiellen Interaktionspartner miteinander wechselwirken können, müssen sie in ihrer nativen Form vorliegen. Aus diesem Grund erfolgten alle Co-IP-Schritte unter nativen Bedingungen.

Um eine mögliche Interaktion mittels der Co-IP zu analysieren, wurden MEFs des Genotyps *Cc2d1a*<sup>-/-</sup>; *Cc2d1b*<sup>+/+</sup> verwendet. Dabei wurden 1x10<sup>6</sup> Zellen pro 10 cm Schale ausplattiert und 24 Stunden im DMEM<sup>Ø</sup> bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Nach dem Erreichen der Konfluenz von ca. 70 bis 90% fand die Transfektion der Zellen mit Konstrukten in einem pcDNA-Vektor mittels des Lipofectamine 2000 Transfektionsreagenz statt. Hierzu dienten zwei parallel durchgeführten Reaktionsansätze. Der erste Ansatz diente dem Verdünnen der DNA, wobei 10 µg des Vektors mit 500 µl Opti-MEM versetzt wurden. Im zweiten Ansatz wurden 50 µl Lipofectamine 2000 ebenfalls in 500 µl Opti-MEM verdünnt. Beide Reaktionsansätze wurden fünf Minuten bei RT inkubiert, bevor sie im nächsten Schritt miteinander vermischt und für die nächsten 20 Minuten unter analogen Bedingungen inkubiert wurden. Während die DNA durch das Lipofectamine 2000 komplexiert wurde, wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 10 ml DMEM<sup>Ø</sup> versetzt. Anschließend wurde der gesamte Reaktionsansatz tropfenweise auf die Zellen pipettiert. Es folgte eine Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für 18 Stunden. Daraufhin wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 1 ml Proteinlysispuffer versetzt. Die in dem Puffer enthaltenen Proteinaseinhibitoren (PIC und PMSF) dienten dem Schutz der Proteine vor der Degradation. Im Anschluss an die 20-minütige Zellyse, die bei 4°C unter permanenten Schwenken durchgeführt wurde, wurden die Zellen mittels eines Zellschabers von der Schale geerntet, durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren resuspendiert, in ein Reaktionsgefäß überführt und 30 Minuten bei 16200 x g und 4°C zentrifugiert. 75 µl des Überstandes fungierten als Input und wurden direkt mit 4x Lämmli-Puffer vermischt, zehn Minuten bei 95°C aufgeköcht und bis zum gelelektrophoretischen Nachweis der Proteinexpression bei -70°C gelagert. In einem parallelen Ansatz wurde 1 ml des Überstandes mit dem Präzipitationsantikörper versetzt und über Nacht bei 4°C auf einem Rotator inkubiert. Dabei war der verwendete Antikörper gegen eines der Zielproteine gerichtet und diente somit der späteren Immobilisierung der Proteinkomplexe, die nach dem Ablauf der angegebenen Zeit mittels Protein G Sepharose-Kügelchen erfolgte. Zu diesem Zweck wurden pro Probe 40 µl Protein G Sepharose-Kügelchen in 1 ml Proteinlysispuffer überführt, kurz gevortext und zwei Minuten bei 600 x g und RT zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abpipettiert und

verworfen, während die Kügelchen mindestens eine Stunde bei 4°C im Proteinlysispuffer (+ PIC und PMSF) komplementiert mit 1% BSA geblockt wurden. Der Inkubation folgte die Zentrifugation der Kügelchen bei 600 x g für 20 Sekunden bei RT, wonach der Überstand verworfen wurde. Die Kügelchen wurden mit 1 ml Proteinlysispuffer (+ PIC und PMSF) gewaschen, wobei sie erneut 20 Sekunden unter analogen Bedingungen zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde verworfen und das Proteinlysate mit dem darin enthaltenen Antikörper auf die Kügelchen überführt. Es folgte eine Inkubation bei 4°C über Nacht im Rotator, um die Präzipitation des Zielproteinkomplexes zu begünstigen. Während dieser Zeit sollte der für die Präzipitation eingesetzte Antikörper, der mit seiner variablen Region (Fab) an das Zielprotein gebunden hat, mittels seiner schweren Kette (Fc) das Protein G erkennen, das an die Sepharose-Kügelchen gekoppelt ist. Interagiert das Zielprotein mit seinem potentiellen Interaktionspartner, entsteht ein Komplex aus dem Interaktionspartner gebunden an das Zielprotein, das seinerseits mittels des Antikörpers an die Kügelchen verankert ist. Anschließende Zentrifugation führt dazu, dass nur dieser Komplex stabil präzipitiert und dementsprechend von den restlichen zellulären Proteinen separiert werden kann. Um die Reste von nicht-gebundenen unspezifischen Proteinen auszuwaschen, wurden die Proben dreimal nacheinander mit 400 µl Proteinlysispuffer (+ PIC und PMSF) gewaschen, in dem sie mehrmals invertiert und 20 Sekunden bei 600 x g und 4°C zentrifugiert wurden. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Reste der Flüssigkeit mittels einer Insulinspritze entfernt und die Kügelchen in 30 µl 4x Lämmli-Puffer zehn Minuten bei 95°C inkubiert. Dieser Schritt diente der Auflösung der Bindung zwischen den Kügelchen und den einzelnen Proteinen in der Probe. Anschließend wurden die Proben entweder bei -70°C gelagert oder direkt weiterbehandelt, um mittels Western Blot analysiert zu werden. Bevor die Proben auf das Gel aufgetragen wurden, erfolgte eine Zentrifugation für zehn Minuten bei 9600 x g und 4°C, um die Sepharose-Kügelchen von der Proteinlösung zu separieren. Für die Analyse wurden 50 µl des Inputs und 30 µl der Co-IP-Probe eingesetzt.

### **5.2.2.3 Etablierung der Expressionsbedingungen in Bakterien**

Die Expressionseffizienz des Zielproteins in Bakterien wird durch mehrere Faktoren beeinflusst:

- Bakterienstamm
- Expressionsvektor
- Temperatur und Dauer der Expression
- optische Dichte der Kultur zum Zeitpunkt der Induktion

Um das gewünschte Protein in ausreichenden Mengen bakteriell zu produzieren, mussten diese Faktoren für jedes einzelne Protein individuell optimiert werden. Hierzu wurden mehrere Bakterienstämme mit unterschiedlichen Expressionsvektoren transformiert (Tab. 5.4 und Tab. 5.10). Da alle der verwendeten Plasmide über eine Sequenz für die Ampicillin-Resistenz



verfügten, wurden die Bakterien auf einer Ampicillin-haltigen Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C kultiviert. Pro Konstrukt und Bakterienstamm wurde jeweils eine Bakterienkolonie in 30 ml LB-Amp-Medium überführt und als Vorkultur über Nacht bei 37°C unter permanentem Schütteln inkubiert. Die Vorkultur diente der Inokulation der Hauptkultur, die sich aus 30 ml der Vorkultur und 170 ml LB-Amp-Medium zusammensetzte. Das Bakterienwachstum erfolgte bei 37°C unter ständigem Schütteln bis der gewünschte OD<sub>600</sub>-Wert erreicht wurde. Die Induktion der Expression wurde entweder bei OD<sub>600</sub> = 0.6 oder OD<sub>600</sub> = 2.0 - 3.0 und je nach Promoter durch die Zugabe von 10 mM IPTG oder 10 mM L-(+)-Arabinose gestartet. Um die optimale Expressionstemperatur zu ermitteln, wurde die Induktion der Proteinexpression in separaten Ansätzen bei 18°C, 30°C und 37°C durchgeführt. In allen Fällen wurde jede Stunde eine 1 ml-Probe über ein Zeitintervall zwischen 8-24 h entnommen, um die Expression zeitlich verfolgen zu können. Jede Probe wurde auf den OD<sub>600</sub>-Wert von 0.4 mit LB-Amp-Medium verdünnt und eine Minute bei 13000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, während das Pellet mit 50 µl 4x Lämmli-Puffer versetzt und zehn Minuten bei 95°C inkubiert wurde. Anschließend wurden die Proben kurz auf Eis abgekühlt und entweder bei -70°C gelagert oder es wurden jeweils 20 µl von jeder Probe direkt auf ein SDS-Gel aufgetragen. Darauf folgende Färbung in Coomassie-Blau-Lösung erlaubte den direkten Vergleich der Expression zwischen den einzelnen Proben und diente der Ermittlung der optimalen Bedingungen. Zusätzlich wurde jedes Protein mittels eines spezifischen Antikörpers nachgewiesen.

#### **5.2.2.4 Proteinexpression in *E.coli***

Nach der Ermittlung der optimalen Bedingungen erfolgte die Expression der Zielproteine in größerem Maßstab. Hierzu wurde der LOBSTR-Stamm mit dem pBAD-Expressionsvektor transformiert, der im Anschluss an die EK/TEV-Schnittstelle die für das Zielprotein kodierende Sequenz beinhaltete. Es folgte eine Inkubation über Nacht bei 37°C. Anschließend wurden pro Konstrukt zwei separate Vorkulturen in jeweils 300 ml LB-Amp-Medium mit einer Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C kultiviert. Für die Inokulation der Hauptkultur wurden jeweils zwei „Fünf Liter“-Schikanekolben verwendet, die einen höheren Sauerstoffeintrag gewährleisten sollten. In beide Kolben wurden 1700 ml LB-Amp-Medium vorgelegt und mit 300 ml Vorkultur versetzt. Die Hauptkultur wurde über Nacht bei 37°C unter Schütteln kultiviert bis ein OD<sub>600</sub>-Wert von ca. 2.0-3.0 erreicht war. Zu diesem Zeitpunkt wurde jeder Kultur 1 ml entnommen, auf den OD<sub>600</sub>-Wert von 0.4 verdünnt und eine Minute bei 13000 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde zehn Minuten bei 95°C aufgekocht und diente als Negativkontrolle der Expression zum Zeitpunkt „0“. Während die Kulturen, deren Proteinexpression bei 37°C durchgeführt wurde, direkt nach der Entnahme der Negativkontrolle mit 10 mM L-(+)-Arabinose induziert wurden, wurden die Proben der 18°C-Expression erst auf die entsprechende Temperatur abgekühlt bevor die Induktion durchgeführt

werden konnte. Nach dem Ablauf der Expressionszeit wurde bei jeder Probe erneut 1 ml der Kultur entnommen und analog zu der Negativkontrolle verarbeitet, um die Expression des Zielproteins mittels eines SDS-Gels nachweisen zu können. Anschließend wurde das gesamte Volumen der Expressionskultur in mehreren Durchläufen bei 5000 x g zentrifugiert, wobei der Überstand verworfen wurde. Das Pellet wurde in 1x PBS durch Vortexen resuspendiert, auf vier Aliquotes aufgeteilt (1 Aliquot je Ein-Liter-Kultur) und erneut zehn Minuten bei 5000 x g zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde das gewaschene Pellet in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Proteinreinigung bei -70°C gelagert.

#### **5.2.2.5 Proteinreinigung unter nativen Bedingungen**

Die zur Reinigung der Zielproteine verwendete Strategie basierte auf dem Prinzip der immobilisierten Metallaffinitätschromatographie (IMAC). Hierzu wurden die nach der Proteinexpression pelletierten und eingefrorenen Bakterien auf Eis aufgetaut und mittels eines nicht denaturierenden Lysispuffers vollständig resuspendiert, wobei für das Pellet einer „Ein-Liter-Kultur“ 8 - 10 ml Puffer verwendet wurden. Eine anschließende 30-minütige Inkubation in einem Rotator bei 4°C und Sonifikation mit „4x30 Sekunden“- Pulsen mit jeweils zwei Minuten Pause auf Eis dienten dem Zellaufschluss. Es folgte eine einstündige Zentrifugation bei 48400 x g bei 4°C. Während der Zentrifugation wurde die HisTalon-Gravitationssäule äquilibriert, indem sie aufrecht positioniert wurde, um das Auslaufen des Ethanol, in dem sie gelagert wurde, zu gewährleisten. Anschließend wurden die Reste des Ethanol mit 5 ml dH<sub>2</sub>O ausgewaschen und die Säule mit 10 ml Waschpuffer auf die Reinigungsbedingungen eingestellt. Nach der einstündigen Zentrifugation wurde der Überstand in ein frisches Zentrifugenröhrchen überführt, während das Pellet verworfen wurde. 75 µl des Überstands wurden direkt mit 25 µl 4x Lämmli-Puffer versetzt und zehn Minuten bei 95°C inkubiert. Die Probe wurde bis zur gelelektrophoretischen Analyse bei -20°C gelagert.

Aufgrund von begrenzter Kapazität wurde die Säule mit 5 ml des Überstands beladen, wobei der Rest des Zellysats auf Eis gelagert wurde. Es folgte eine einstündige Inkubation bei 4°C im Rotator, die dem Binden des His-Tags des Zielproteins an die Kobalt-Ionen der HisTalon-Gravitationssäule diente. Nach dem Ablauf der Inkubationszeit wurde die Säule senkrecht positioniert, um das Auslaufen der Flüssigkeit zu ermöglichen. Der Durchfluss wurde separat in einem Zentrifugenröhrchen aufgefangen und bei 4°C für eine mögliche weitere Reinigung aufbewahrt. 75 µl des Durchflusses wurden analog zum Überstand behandelt und bei -20°C aufbewahrt. Anschließend wurde der Rest des Überstandes schrittweise auf die Säule überführt, wobei die Säule nicht verschlossen wurde, um das Auslaufen des nicht-gebundenen Materials zu ermöglichen, das gleichzeitig in dem Durchfluss-Röhrchen aufgefangen wurde. Nach der Bindung wurde die Säule zweimal mit 5 ml des Waschpuffers I versetzt, um nicht-gebundenes Material zu entfernen. Da einige bakterielle Proteine dazu tendieren, ebenfalls an die Kobalt-Ionen zu binden, wurden die unspezifisch gebundenen Proteine durch zweimaliges

Versetzen mit 5 ml des Waschpuffers II, der 20 mM Imidazol enthielt, ausgewaschen. Imidazol hat eine höhere Affinität zu Kobalt und verdrängt somit die schwach gebundenen Proteine von der Säule. Nach jedem Waschschrift wurden 75 µl des Durchflusses gesammelt, um die Effizienz der Bindung des Zielproteins und des Auswaschens der bakteriellen Verunreinigungen elektrophoretisch zu analysieren.

Um das spezifisch gebundene Zielprotein von der Säule zu lösen, wurden 2,5 ml des Elutionspuffers mit darin enthaltenen 150 mM Imidazol auf die Säule pipettiert und 30 Minuten bei 4°C im Rotator inkubiert. Das Eluat wurde in einem frischen Zentrifugenröhrchen aufgefangen und bis zur weiteren Verarbeitung bei 4°C gelagert. Die Effizienz der Reinigung wurde gelelektrophoretisch analysiert. Die Säule wurde anschließend mindestens einmal mit 5 ml dH<sub>2</sub>O gewaschen und in 20% Ethanol bei 4°C bis zur nächsten Reinigung aufbewahrt.

Eine automatisierte Proteinreinigung unter nativen Bedingungen wurde mittels der ÄKTA-basierter Affinitätschromatographie durchgeführt. Die Bedingung des Chromatographie-Systems erfolgte entsprechend den Herstellerangaben. Die Lyse der Zellen sowie die verwendeten Puffer (Tab. 5.11) entsprachen denselben Bedingungen wie bei der manuellen Reinigung mittels der Gravitationssäulen.

#### **5.2.2.6 Proteinreinigung unter denaturierenden Bedingungen**

Aufgrund des inkorporierten His-Tags innerhalb des CHMP4B-Moleküls war eine Reinigung unter nativen Bedingungen nicht möglich. Um den His-Tag zugänglich zu machen, wurde CHMP4B unter denaturierenden Bedingungen gereinigt. Hierzu beinhaltete jeder verwendete Puffer 8 M Harnstoff (Tab. 5.12), aufgrund dessen die Reinigung bei RT erfolgte. Die Reinigungsschritte verliefen analog zu der nativen Reinigung.

#### **5.2.2.7 Größenausschlusschromatographie**

Um eine Proteinprobe nach der Reinigung von den restlichen Verunreinigungen zu separieren, wird eine Methode namens Größenausschlusschromatographie (SEC) verwendet. Das dabei zugrundeliegende Prinzip basiert auf der Verwendung einer Säule, die mit einer Matrix befüllt ist. Diese Matrix weist Poren auf, die kleine, in der Probe vorhandene Moleküle auffangen und somit deren Wandergeschwindigkeit durch die Säule abbremsen können. Die großen Moleküle passen hingegen nicht in die Poren und erreichen das Säulenende schneller als die kleinen Moleküle. Als Ergebnis werden erst die großen Moleküle (z.B. Aggregate) und zum Schluss die kleinsten Moleküle eluiert.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Größenausschlusschromatographie basierte auf der Verwendung einer HiLoad 16/600 Sepadex 200 Säule, die vor der Anwendung mit mindestens einem Säulenvolumen dH<sub>2</sub>O gewaschen und mit dem entsprechenden Volumen an Puffer äquilibriert wurde. Die zu injizierende Probe wurde auf das Gesamtvolumen von 2

ml konzentriert und mindestens 30 Minuten bei 15000 x g zentrifugiert, um mögliche Aggregate zu entfernen. Die Fraktionen wurden gesammelt und mittels der Coomassie-Blau-Lösung analysiert. Nach Feststellung der geeigneten Eluate wurden die Proben konzentriert und bis zur weiteren Analyse bei 4°C gelagert.

### 5.2.2.8 Renaturierung / Pufferaustausch

Die Renaturierung der Proteine erfolgte durch den Pufferaustausch mittels einer Entsalzungssäule basierend auf der Methode der Gelfiltration. Hierzu wurde die Entsalzungssäule mit dem fünffachen Volumen an dH<sub>2</sub>O gewaschen und mit dem gleichen Volumen an Puffer A äquilibriert. Anschließend wurde die Probe mit dem gereinigten Protein durch den Elutionspuffer auf ein Gesamtvolumen von 2,5 ml aufgefüllt und auf die Entsalzungssäule pipettiert, wobei der Durchfluss verworfen wurde. Die Elution der Probe erfolgte durch die Zugabe von 3,5 ml des Puffers A auf die Säule. Das aufgefangene Eluat enthielt das Zielprotein im Puffer A und wurde bei 4°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert. Die Säule wurde mit dem fünffachen dH<sub>2</sub>O-Volumen gewaschen und in 20% Ethanol bis zum nächsten Pufferaustausch bei RT gelagert.

Der automatisierte Pufferaustausch erfolgte mittels der ÄKTA-basierten Affinitätschromatographie. Die Bedingung des Chromatographie-Systems entsprach den Herstellerangaben.

### 5.2.2.9 Konzentrierung der Proteine

Um eine höhere Proteinkonzentration in einem kleineren Volumen zu erhalten, wurden die Proteine mittels Zentrifugalkonzentratoren der Marke Vivaspin von Sartorius, Amicon von Millipore und Macrosep von PALL Corporation konzentriert. Bei der Wahl des geeigneten Konzentrators wurde auf die Größe des Zielproteins (CC2D1: max. 30 MWCO; CHMP4B: max. 10 MWCO) und das Gesamtvolumen der Probe geachtet.

Bei allen gewählten Filtereinheiten erfolgte die Konzentrierung nach demselben Prinzip: vor der Anwendung wurde die Säule mit dH<sub>2</sub>O gewaschen und mit dem entsprechenden Volumen des Puffers, in dem sich das Zielprotein befand, äquilibriert. Anschließend wurde das maximale Volumen der Proteinlösung auf die Säule pipettiert und bei maximal zulässiger Geschwindigkeit (Tab. 5.45) zentrifugiert bis das gewünschte Volumen erreicht wurde. Das Konzentrat wurde in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Lagerung der Probe erfolgte bei 4°C.

**Tabelle 5.45: Charakteristika der verwendeten Konzentratoren**

	Vivaspin 500	Vivaspin 2	Amicon Ultra-4	Amicon Ultra-15	PALL Macrosep
<b>max. Volumen</b>	500 µl	2 ml	4 ml	15 ml	15 ml
<b>max. Geschwindigkeit*</b>	1200 x g	8000 x g	7500 x g	5000 x g	5000 x g

\*bezogen auf Festwinkelrotor

### 5.2.2.10 Konzentrationsbestimmung der Proteine

Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte mit Hilfe des „Pierce BCA Assay Kit“. Bei dieser kolorimetrischen Messung führt der Kontakt von dem in dem Reagenz befindlichen  $\text{Cu}^{2+}$  mit Cystein, Tyrosin, Tryptophan und Cystin zu seiner Reduktion. Das dabei entstandene  $\text{Cu}^+$ -Ion bindet an zwei BCA-Moleküle, die ebenfalls in dem Reagenz vorhanden sind, und resultiert in der Entstehung eines farblichen Komplexes. Je höher die Proteinmenge in der Probe ist, desto höher ist die  $\text{Cu}^+$ -Konzentration, die sich wiederum auf die Farbintensität des gebildeten Komplexes auswirkt. Um daraus auf die Proteinkonzentration schließen zu können, wird in einem parallelen Ansatz ein Protein mit bekannter Konzentration auf die gleiche Weise behandelt, wobei seine Messwerte der Erstellung einer Standardkurve dienen. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Proteinkonzentrationsmessung basierte auf einem von den Herstellerangaben abgewandelten Protokoll. Die Vorbereitung des Standards erfolgte entsprechend der Tabelle 5.46.

**Tabelle 5.46: Reaktionsansatz zur Messung der Standardprobe**

Standard-Nr.	Lösungsmittel* [ $\mu\text{l}$ ]	BSA
Standard 1 (2000 $\mu\text{g/ml}$ )	keine Zugabe	200 [2000 $\mu\text{g/ml}$ ]
Standard 2 (1500 $\mu\text{g/ml}$ )	125	375 [2000 $\mu\text{g/ml}$ ]
Standard 3 (1000 $\mu\text{g/ml}$ )	325	375 [2000 $\mu\text{g/ml}$ ]
Standard 4 (500 $\mu\text{g/ml}$ )	325	325 [aus Standard 3]
Standard 5 (250 $\mu\text{g/ml}$ )	325	325 [aus Standard 4]
Standard 6 (125 $\mu\text{g/ml}$ )	325	325 [aus Standard 5]
Standard 7 (25 $\mu\text{g/ml}$ )	400	100 [aus Standard 6]
Referenz (0 $\mu\text{g/ml}$ )	400	keine Zugabe

\*Lösungsmittel: Lösung, in der sich das zu messende Protein befindet

5  $\mu\text{l}$  von jedem Standard wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt, in dem sich bereits 45  $\mu\text{l}$  des Lösungsmittels befanden. Die zu messenden Proben wurden auf analoge Weise behandelt. Sowohl die Standards als auch die Proben wurden mit 1 ml „Working Solution“ (50A:1B) versetzt, gevortext und 30 Minuten bei 37°C geschüttelt. Nach dem Ablauf der Inkubationszeit wurden die Proben in eine Küvette überführt und am NanoDrop bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen. Aufgrund der Verdünnung wurde der am NanoDrop angezeigte Wert mit dem Faktor „1000“ multipliziert.

### 5.2.2.11 Cystein-basierte Quervernetzung der Proteine

Um einen möglichen Einfluss von CC2D1B auf die Konformation von CHMP4B näher analysieren zu können, wurde ein Experiment basierend auf einer Abwandlung der etablierten Methode der Cystein-bedingten Quervernetzung der Proteine durchgeführt (Henne et al., 2012). Hierzu dienten sieben identische CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup> Ausgangsproben, die auf unterschiedliche Weise bearbeitet wurden (Tab.5.47).

Tabelle 5.47: Reaktionsansatz für die Cystein-basierte Quervernetzung der Proteine

Nr.	Probenbezeichnung	CHMP4B	Puffer A	DTT	Cu <sup>2+</sup> Phen	CC2D1B
1.	CHMP4B <sup>∅</sup>	+	+	-	-	-
2.	CHMP4B <sup>+DTT</sup>	+	+	+	-	-
3.	CHMP4B <sup>+Ox.</sup>	+	+	-	+	-
4.	CHMP4B <sup>+DTT +Ox.</sup>	+	+	+	+	-
5.	CHMP4B <sup>∅</sup> + CC2D1B	+	-	-	-	+
6.	CHMP4B <sup>+DTT + Ox + CC2D1B</sup>	+	-	+	+	+
7.	CHMP4B <sup>+Ox +CC2D1B</sup>	+	-	-	+	+

Während die Proben 5 bis 7 ausschließlich 10 µl CHMP4B im Puffer A enthielten, wurden die Proben 1 bis 4 mit zusätzlichen 10 µl von Puffer A versetzt. Im ersten Schritt des Experiments wurden die Proben 2, 4 und 6 mit 10 mM DTT versetzt und 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Zugabe von DTT diente der Reduktion der eventuell vorhandenen Disulfidbrücken und begünstigte den Übergang aller CHMP4B-Moleküle in einen uniformen Zustand. Nach dem Ablauf der Inkubationszeit wurden alle Proben 30 Minuten bei RT inkubiert, wobei zu den Proben 5 bis 7 10 µl CC2D1B pipettiert wurde. Die Fixierung der entstandenen Zustände wurde bei den Proben 3, 4, 6 und 7 durch die Behandlung mit Kupfer/Phenanthrolin-Lösung durchgeführt. Währenddessen wurden alle Proben 15 Minuten auf Eis inkubiert. Die Oxidation wurde durch Zugabe von 15 mM EDTA zu den Kupfer/Phenanthrolin-enthaltenden Proben abgestoppt. Anschließend wurde jede Probe mit 4x Lämmli-Puffer (nicht-reduzierend) versetzt, zehn Minuten bei 95°C inkubiert und direkt mittels eines 10%igen SDS-Gels analysiert. Die anschließende Färbung in der Coomassie-Blau-Lösung lies Rückschlüsse auf den konformationellen Zustand von CHMP4B zu.

### 5.2.2.12 Auftrennung von Proteinen mittels einer diskontinuierlichen SDS-Gelelektrophorese

Um die Proteine innerhalb einer Probe ihrer Masse nach auftrennen zu können, wurden diskontinuierliche SDS-Gele verwendet. Ein Gel bestand dabei aus zwei Teilen (Trenngel und Sammelgel), die zwischen zwei vertikal positionierten Glasplatten gegossen wurden. Das obere Sammelgel diente der Konzentrierung der Proteine und wurde oberhalb des auspolymerisierten Trenngels (Tab. 5.48) pipettiert, das für die Auftrennung der Proteine entsprechend ihrer Größe entscheidend war. Nach dem vollständigen Polymerisieren wurde das Gel in ein vertikales Elektrophoresesystem überführt und mit dem Elektrophoresepuffer auf das benötigte Volumen aufgefüllt. Der Kamm wurde innerhalb des Puffers senkrecht aus dem Gel rausgezogen und die Taschen wurden mit dem Puffer durchgespült. Um die Größe der Proteine zuordnen zu können, wurden in eine der Taschen 5 µl der Proteinleiter pipettiert. Je nach Fragestellung wurden 6 bis 60 µl Proteinlösung pro Tasche aufgetragen. Die Gelapparatur wurde mit einem Deckel verschlossen und an eine Stromquelle angeschlossen. Um die Proteine innerhalb des Sammelgels zu konzentrieren, wurde eine Spannung von 70 V

für mindestens 30 Minuten angelegt. Sobald die Lauffront im Trenngel zu erkennen war, wurde die Spannung auf 120 V erhöht.

Aufgrund der Bindung des in dem Proben- und Elektrophoresepuffer enthaltenen Natriumdodecylsulfats (SDS) an die Proteine erhalten diese eine stark negative Ladung, wobei ihre Ladung proportional zu ihrer Molekülmasse ist. Eine zusätzliche Zugabe von DTT zum Probenpuffer reduziert die vorhandenen Disulfidbrücken und linearisiert die Proteine zusätzlich. Dies resultiert in einer Wandergeschwindigkeit, die fast ausschließlich von der Proteingröße abhängig ist und nicht durch die unterschiedliche Eigenladung der Proteine beeinflusst wird.

**Tabelle 5.48: Zusammensetzung eines SDS-Polyacrylamidgels der „1,5 mm“- Stärke**

Komponente	10% Trenngel	5% Sammelgel
Rotiphorese Gel 30 (37,5:1)	3,34 ml	0,5 ml
dH <sub>2</sub> O	4,0 ml	1,688 ml
4x Trenngel- /Sammelgelpuffer	2,5 ml	0,75 ml
10% APS	134 µl	60 µl
TEMED	10 µl	3 µl

### 5.2.2.13 Visualisierung von Proteinen mittels der kolloidalen Coomassie-Brillant-Blau-Lösung

Die Visualisierung aller Proteine auf dem SDS-Gel wurde durch die Färbung mit der kolloidalen Coomassie-Brillant-Blau-Lösung ermöglicht. Hierzu wurde das Gel unmittelbar nach der Elektrophorese in eine Schale überführt und dreimal jeweils zehn Minuten mit dH<sub>2</sub>O unter ständigem Schwenken gewaschen, um Reste des Elektrophoresepuffers zu entfernen. Anschließend wurde das Gel in die Coomassie-Blau-Lösung (Tab. 5.18 „Zusammensetzung der Coomassie-Blau-Lösung“) überführt und mit undurchsichtigem Deckel abgedeckt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei RT unter permanentem Schütteln. Während dieser Inkubationszeit wird es ermöglicht, dass die kolloidalen Coomassie-Partikel an die basischen und aromatischen Seitenketten binden und somit Proteine sichtbar machen. Zum Schluss wurde das Gel erneut dreimal jeweils zehn Minuten mit dH<sub>2</sub>O gewaschen, um die überschüssige Färbelösung sowie eventuelle Hintergrundfärbung zu entfernen. Das Ergebnis der Färbung wurde mit einem Scanner dokumentiert.

### 5.2.2.14 Western Blot mittels des Semi-Dry-Verfahrens

Western Blot findet seine Anwendung als eine Methode zum Transfer von Proteinen, die zuvor ihrer Größe nach elektrophoretisch aufgetrennt wurden. Dabei erfolgt der Transfer von einem Gel auf eine Membran, die anschließend mit einem Antikörper gegen das Zielprotein inkubiert wird. Dies ermöglicht einen spezifischen Nachweis des gewünschten Proteins.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden alle Western Blots mit Hilfe des Semi-Dry-Verfahrens durchgeführt, das im Unterschied zu einem „Tank“-Western Blot nicht in einer mit Puffer

befüllten Apparatur stattfindet, sondern auf der Verwendung der mit dem Puffer gesättigten Filtersysteme basiert. Um die Proteine auf eine Membran zu übertragen, wurden vier gestapelte Filterpapiere genommen, in Transferpuffer getränkt und auf die Anodenseite des Blotters positioniert. Anschließend wurde die PVDF-Membran fünf Minuten in Methanol äquilibriert, kurz mit dH<sub>2</sub>O abgewaschen und für eine Minute in Transferpuffer inkubiert, um anschließend mittels einer Pinzette auf die Filterpapiere übertragen zu werden. Daraufhin wurde das Gel aus den Glasplatten herausgenommen, das Sammelgel vollständig abgetrennt und das Trenngel in einer Schale mit dem Transferpuffer kurz abgespült und anschließend auf die Membran positioniert. Zum Schluss wurden wieder vier Filterpapiere auf analoge Weise behandelt und auf den Transferstapel gelegt. Um einen effizienten und gleichmäßigen Transfer der Proteine zu gewährleisten, wurden die Luftblasen mit Hilfe einer speziellen Rolle entfernt. Der Kathodendeckel wurde verschlossen und das Standardprogramm für Bio-Rad-Transfer gewählt. Der Transfer dauerte 30 Minuten bei 25 Volt und 0.6 Ampere.

#### **5.2.2.15 Ponceau-Rot-Färbung von Proteinen auf einer PVDF-Membran**

Der Transfer der Proteine auf die Membran wurde mittels der Ponceau-Rot-Färbung überprüft. Hierzu wurde die Membran in eine Schale überführt und ca. eine Minute in der Ponceau-Rot-Lösung inkubiert. Der in der Lösung enthaltene Farbstoff bindet unspezifisch an alle Proteine und markiert sie farblich. Bei einem erfolgreichen Transfer der Proteine konnten rote Banden auf der Membran festgestellt werden. Anschließend wurde die Färbelösung recycelt. Da es sich hierbei um eine reversible Färbung handelt, wurde die Membran durch mehrmaliges Waschen in dH<sub>2</sub>O entfärbt.

#### **5.2.2.16 Immundetektion von Proteinen auf PVDF-Membran**

Nachdem die Effizienz des Proteintransfers mittels Ponceau-Rot-Färbung überprüft wurde, wurde die Membran eine Stunde bei RT in einer Blocklösung bestehend aus 5% Magermilchpulver in 1x PBS inkubiert, um mögliche unspezifische Bindungen zu minimieren. Nach dem Blocken wurde die Membran mit dem primären Antikörper versetzt (Tab. 5.20), wobei die Färbung in einer 2%-igen Milchlösung über Nacht bei 4°C unter permanenter Rotation erfolgte. Anschließend wurde der nicht gebundene primäre Antikörper durch dreifaches Waschen mit 0,1% PBT je 20 Minuten bei RT entfernt. Es folgte eine einstündige Inkubation bei RT mit dem sekundären Antikörper, der gegen den primären Antikörper gerichtet und an das Enzym HRP gekoppelt war. Im Anschluss wurde die Membran erneut dreimal mit 0,1% PBT je 20 Minuten bei RT gewaschen. Anschließend wurde die Membran in eine Klarsichtfolie überführt und mit 1 ml des Substrats behandelt, wobei das überschüssige Substrat vor der Messung entfernt wurde. Die Membran wurde in dem Dokumentationsgerät positioniert und die Messung der Chemilumineszenz erfolgte in bestimmten Zeitintervallen:



eine Sekunde, fünf Sekunden, zehn Sekunden, 30 Sekunden, 60 Sekunden und fünf Minuten nach dem Versetzen mit dem Substrat.

#### **5.2.2.17 „Strippen“ der Membran**

Um auf derselben Membran Proteine nachweisen zu können, die im Gel ungefähr dieselbe Größe aufweisen, erfolgte die Immundetektion verschiedener Proteine nacheinander. Der Nachweis der gleichgroßen Proteine wurde durch die Methode des „Stripping“s der Membran ermöglicht. Nachdem die Messung der Chemilumineszenz nach dem ersten Antikörper vom Interesse abgeschlossen war, wurde die Membran kurz mit PBS abgespült und in eine hitzebeständige Schale mit dem vorgelegten „Strippingpuffer“ (Tab. 5.22) überführt. Die Inkubation dauerte eine bis zwei Stunden bei 55°- 65°C. Anschließend wurde die Membran erneut mit PBS gewaschen und daraufhin in ein Zentrifugenröhrchen mit der Blocklösung überführt, wobei die Inkubation mindestens eine Stunde bei RT unter ständigem Schütteln erfolgte. Nach dem Ablauf der Inkubation stand die Membran für weitere Antikörperfärbungen zur Verfügung.

#### **5.2.2.18 Massenspektrometrie**

Die Massenspektrometrie ist eine Methode zur Bestimmung der Masse von Molekülen innerhalb einer Probe. Ein Massenspektrometer setzt sich dabei aus drei grundlegenden Komponenten zusammen: Ionisator (Ionisierung der Probe), Massenanalysator (Messung des Massen-zu-Ladung-Verhältnisses der geladenen Teilchen) und einem Detektor (Registrierung der Ionenanzahl mit dem jeweiligen Massen-zu-Ladung-Verhältnis). Bei der Ionisierung wird die Probe in einen vakuumisierten Bereich des Massenspektrometers überführt, in dem sie mit einem Elektronenstrahl beschossen wird. Hierbei wird der Probe eine positive Ladung verliehen. Durch das Anlegen eines elektromagnetischen Feldes werden die positiven Teilchen beschleunigt und zu einem Strahl gebündelt. Die beschleunigten Teilchen werden anschließend einem zweiten elektromagnetischen Feld ausgesetzt, das eine seitliche Ablenkung der Teilchen induziert, wobei das Ausmaß der Ablenkung umgekehrt proportional zu ihrer Größe ist. Das Signal wird mittels eines Detektors gemessen und mit der Datenbank abgeglichen (Übersicht in Murayama et al., 2009).

Basierend auf dieser Methode können Analysen zur Proteinidentifizierung und Proteinmodifikation, aber auch strukturelle Analysen von Proteinen durchgeführt werden. Um ein bestimmtes Protein oder eine Proteinmodifikation in einem Proteinlysate mittels der Massenspektrometrie nachweisen zu können, wird das ganze Proteingemisch elektrophoretisch aufgetrennt, der Bereich vom Interesse aus dem Gel ausgeschnitten und proteolytisch gespalten. Anschließend wird die auf diese Weise vorbehandelte Probe mittels Massenspektrometer charakterisiert.

Die Methode der Massenspektrometrie kann ebenfalls verwendet werden, um Informationen über die mögliche Proteinstruktur zu erhalten. Hierfür wird das native Protein durch die Zugabe von geeigneten Reagenzien intramolekular quervernetzt. Dabei setzt die kovalente Quervernetzung die Verwendung von Reagenzien mit reaktiven Gruppen voraus, die z.B. benachbarten Lysinreste innerhalb eines Proteins verbinden. Nach der Quervernetzung werden die Proben einer enzymatischen Spaltung durch eine geeignete Endoproteinase unterzogen. Die quervernetzten Peptide können mittels der Massenspektrometrie identifiziert werden und liefern somit die Information über die interagierenden inter- und intramolekularen Bereiche. Dabei ist die Wahl des geeigneten Quervernetzers von entscheidender Bedeutung, die von mehreren Faktoren beeinflusst wird:

- Größe und Spaltbarkeit des Quervernetzers
- Das Vorhandensein der Aminosäuren, die durch den jeweiligen Quervernetzer miteinander verbunden werden können.

#### Identifizierung der Proteine

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Methode der Massenspektrometrie verwendet, um folgenden Aspekte zu analysieren:

- Identifizierung von CC2D1 Proteinen in immortalisierten MEF-Linien
- Identifizierung von bakteriellen Verunreinigungen innerhalb der gereinigten Proteinproben
- Identifizierung der Proteinbanden nach der durchgeführten Cystein-basierten Quervernetzung von CHMP4B

Um diese Proteine identifizieren zu können, wurde entweder das gesamte Zelllysate oder die bereits gereinigte Probe auf ein 10% SDS-Gel aufgetragen und der Größe nach elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel in Coomassie-Blau-Lösung gefärbt und in eine Klarsichtfolie übertragen. Die Bereiche von Interesse wurden mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in ein steriles Reaktionsgefäß überführt. Pro Probe oder Genotyp wurden jeweils zwei Ansätze präpariert. Die Massenspektrometrie wurde durch das *Molecular Proteomics Laboratory* (MPL) Düsseldorf durchgeführt.

#### Quervernetzung und Analyse der Proteine bei MS

Im Rahmen dieser Arbeit wurden BS3 und DSSO verwendet, um die Quervernetzung der Aminosäurereste innerhalb von CHMP4B durchzuführen. Alle Quervernetzungs-Reaktionen und Identifizierung der Peptide wurden durch MPL Düsseldorf durchgeführt.

### 5.2.2.19 Proteinkristallisation

Kristallisation ist eine Methode zur Identifizierung der dreidimensionalen Struktur von Proteinen. Hierfür wird das zu kristallisierende Protein aus dem löslichen Zustand in eine kristalline Form überführt und mittels Röntgenstrukturanalyse untersucht (Übersicht in Russo Krauss et al., 2013). Entscheidend für die Ausbildung der Kristalle ist die Homogenität innerhalb der Lösung. Damit die Homogenität begünstigt werden kann, soll die Reinheit des Proteins bei mindestens 95% liegen.

Der Übergang vom flüssigen in den kristallinen Zustand wird unter anderem durch folgenden Faktoren beeinflusst:

- pH-Wert des Puffers
- Art des Puffers
- Salzgehalt/ Salztart
- Stabilität des Proteins
- Temperatur
- Proteinkonzentration

Um sich an die optimalen Kristallisationsbedingungen anzunähern, werden vor dem Kristallisationsexperiment alle Faktoren getestet. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Tests basierten auf dem „*Sitting drop*“-Verfahren. Dabei wird das zu kristallisierende Protein in eine Probeneindellung auf einer speziellen 96-well-Platte überführt, in der sich bereits der zu testende Puffer befindet. Neben jeder Probeneindellung befindet sich eine Reservoir-eindellung, die denselben Puffer beinhaltet, der in einer höheren Konzentration vorliegt. Diese Konstellation erzeugt die Diffusion, die über die Dampfphase erfolgt. Der etwas höher konzentrierte Puffer in dem Reservoir entzieht der Probe das Wasser und führt dazu, dass der Salzgehalt in der Probe langsam ansteigt. Dies resultiert schließlich in dem Übergang des Proteins von der löslichen in die kristalline Form (Übersicht in Russo Krauss et al., 2013). Bei einem „*Sitting drop*“-Verfahren enthält jede Vertiefung der 96-well-Platte etwas andere Bedingungen, so dass gleichzeitig 96 Bedingungen getestet werden können.

Alle getesteten Bedingungen wurden durch *Center for Structural Studies (CSS)* HHU Düsseldorf durchgeführt und sind in der Tabelle 5.49 zusammengefasst. Die eingesetzte Proteinkonzentration lag bei 3,5-5,3 mg/ml.

**Tabelle 5.49: Durchgeführte Kristallisations-Screens**

Screen-Name	Firma
The Classic Suite	Qiagen
The PACT Suite	Qiagen
The pHClear Suite	Qiagen
Crystal Screen Cryo	Hampton Research
Solubility & Stability Screen	Hampton Research
MemStart + MemSys HT-96	Molecular Dimensions
MemGold2	Molecular Dimensions
ProPlex	Molecular Dimensions

### **5.2.3 Zellkulturtechniken**

#### **5.2.3.1 Auftauen von Zellen**

Die in Kryoröhrchen gelagerten Zellen wurden durch eine kurze Inkubation im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und unmittelbar darauf in ein Zentrifugenröhrchen überführt, das 9 ml des vorgewärmten DMEM<sup>®</sup> enthielt. Dieser Schritt diente dem Verdünnen des Gefriermediums, in dem sich die Zellen befanden und sollte dadurch den toxischen Effekt des in dem Medium enthaltenen DMSO reduzieren. Es folgte die Zentrifugation bei 100 x g für fünf Minuten bei RT. Anschließend wurde der Überstand verworfen, das Pellet in 6 ml DMEM<sup>®</sup> resuspendiert und in eine T25-Zellkulturflasche überführt. Die Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von ca. 70 – 90% bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert, bis sie entweder gesplittet und in Kultur gehalten oder für Experimente eingesetzt wurden.

#### **5.2.3.2 Passagieren von Zellen**

Nach dem Erreichen der Konfluenz von ca. 70 bis 90% wurden die Zellen passagiert. Hierzu wurden sie mit PBS gewaschen, um die Reste des serumhaltigen Mediums zu entfernen, dessen Komponenten die Wirkung des Trypsins negativ beeinflussen könnten. Anschließend wurden die Zellen fünf Minuten bei 37°C mit Trypsin inkubiert, das dem Auflösen der Zell-Zell-Kontakte diente. Nach dem Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen mit dem dreifachen Volumen des Kultivierungsmediums versetzt, um die Wirkung des Trypsins zu unterbrechen. Die Zellen wurden durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren resuspendiert, wobei ca. 1/50 des resuspendierten Volumens in eine neue Flasche mit vorgelegtem Medium überführt wurde. Die Kultivierung der Zellen fand bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> statt.

#### **5.2.3.3 Aussäen von Zellen**

Um je nach Fragestellung eine gewünschte Anzahl an Zellen auszusäen, musste die Zellzahl/µl bestimmt werden. Hierzu wurden die Zellen mit PBS gewaschen, trypsinisiert und durch die Zugabe der dreifachen Menge am Medium gründlich resuspendiert. Anschließend wurde die gesamte Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt, wobei 10 µl davon auf eine Neubauer-Kammer pipettiert wurden. Die Anzahl der Zellen in einem Mikroliter wurde berechnet über die Zellzahl in vier Eckquadraten multipliziert mit dem Faktor „10“ und geteilt durch die Zahl vier. Anschließend wurde der Wert für die gewünschte Anzahl an Zellen durch die Anzahl der Zellen in einem Mikroliter geteilt, um das Volumen an Zellsuspension zu erhalten. Wenn die Zellen mittels einer immunzytochemischen Analyse untersucht werden sollten, wurden sie auf die zuvor vorgelegten Deckgläschen pipettiert.

#### **5.2.3.4 Transfektion von Zellen**

Transfektion ist eine Technik, die dem Einbringen von genetischem Material in eukaryotische Zellen dient. Dabei basiert diese Methode auf der Verwendung einer lipophilen Substanz, die

in wässriger Lösung zur Bildung von Liposomen neigt. Die Liposomen formen Bilayer, die die zu transfizierende Nukleinsäure komplexieren und ihre Aufnahme in die Zelle durch die Endozytose begünstigen.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Transfektion erfolgte mittels des Lipofectamine 2000 Reagenz. Hierzu wurden die Zellen einen Tag vor der Transfektion ausgesät und anschließend bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach dem Erreichen einer Konfluenz von ca. 70 bis 90% erfolgte die Transfektion der Zellen. Hierzu wurde die zu transfizierende DNA in Opti-MEM verdünnt und fünf Minuten bei RT inkubiert. In einem parallelen Ansatz erfolgte die Inkubation von Lipofectamine 2000 in Opti-MEM unter analogen Bedingungen. Nach dem Ablauf der angegebenen Inkubationszeit wurden beide Reaktionsansätze vereinigt, gut gemischt und weitere 20 Minuten bei RT inkubiert. Währenddessen wurden die zu transfizierenden Zellen mit PBS gewaschen und mit frischem DMEM<sup>®</sup> versetzt. Nachdem der Transfektionsansatz tropfenweise auf die Zellen verteilt wurde, erfolgte die Inkubation der Zellen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für 18 Stunden. Die Inkubation diente der Aufnahme der Konstrukte in die Zellen und der anschließenden Expression der Proteine. Der verwendete Transfektionsansatz ist in der Tabelle 5.50 zusammengefasst.

**Tabelle 5.50: Transfektionsansatz**

Zellbehälter	Zellzahl	Medium	Ansatz 1		Ansatz 2	
			Plasmid	Opti-MEM	Lipofectamine	Opti-MEM
10 cm Schale	10 <sup>6</sup>	10 ml	10 µg	500 µl	50 µl	500 µl

### 5.2.3.5 Einfrieren von Zellen

Um auf eine frühere Passage zugreifen zu können und die Zellen nicht permanent in Kultur halten zu müssen, wurde ein Teil der Zellen beim ersten Passagieren nach dem Auftauen wieder eingefroren. Hierzu wurden die Zellen in einer T25-Flasche kultiviert. Beim Erreichen der Konfluenz von ca. 90% wurden die Zellen mit PBS gewaschen, fünf Minuten in 1 ml Trypsin bei 37°C inkubiert und in einem dreifachen Volumen DMEM<sup>®</sup> resuspendiert. Die resuspendierten Zellen wurden in ein Zentrifugenröhrchen überführt und fünf Minuten bei 100 x g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen, während das Zellpellet in 1 ml DMEM<sup>®</sup> resuspendiert und in ein Kryoröhrchen mit dem vorgelegtem 2x Gefriermedium (20% DMSO in FCS) 1:1 versetzt wurde. Das Kryoröhrchen wurde kurz geschwenkt und direkt auf Eis gelegt. Die Lagerung erfolgte bei -70°C.

### 5.2.3.6 Immunzytochemie

Um die subzelluläre Lokalisation des Proteins von Interesse zu untersuchen, wurden immunzytochemischen Analysen durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen auf die vorgelegten Deckgläschen in einer 24-well-Platte ausplattiert (5x10<sup>4</sup> Zellen/ well) und bis zu einer Konfluenz von ca. 90% bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit

PBS gewaschen und zehn Minuten in 4% PFA bei 4°C unter permanentem Schwenken fixiert. Der Fixierung folgten drei fünfminütige Waschschriffe mit PBS bei RT. Die Permeabilisierung der Zellen erfolgte durch die Inkubation mit 0,1% Tween-20 in PBS (0,1% PBT) für zehn Minuten bei RT. Daraufhin wurden die Zellen erneut dreimal mit PBS gewaschen. Um unspezifische Bindungen der verwendeten Antikörper zu vermeiden, wurden die Zellen entweder 30 Minuten bei RT oder über Nacht bei 4°C in Blocklösung (0,1% Tween-20, 10% NGS und 0,3 M Glycin in PBS) inkubiert. Nach dem Ablauf der angegebenen Zeit wurde der primäre Antikörper, verdünnt in der Färbelösung (0,1% Tween-20 und 1,5% NGS in PBS), auf die Zellen pipettiert. Die verwendeten Antikörper sowie deren Verdünnungen können der Tabelle 5.25 entnommen werden. Alle Färbungen mit primären Antikörpern wurden über Nacht bei 4°C durchgeführt. Die Reste des nicht gebundenen Antikörpers wurden durch den dreifachen 5-minütigen Waschschriff mit 0,1% PBT entfernt. Im Anschluss an den letzten Waschschriff folgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper, der gegen den primären gerichtet und an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt war (Tab. 5.26). Nach einer Stunde Inkubation bei RT und dreimaligen Waschen mit 0,1% PBT wurde die Färbung der Zellkerne durch die Zugabe des DAPI-Farbstoffs in PBS (1:333) durchgeführt, wobei die Inkubation eine Stunde bei RT dauerte. Zum Schluss wurden die Zellen erneut dreimal für fünf Minuten mit PBS gewaschen und direkt nach der Färbung mittels Vectashield eingebettet. Die fertigen Präparate wurden entweder direkt zur Mikroskopie herangezogen oder bei 4°C gelagert.

#### **5.2.3.7 Einbettung und Kontrastierung der Zellen für TEM-Analysen**

Um die Zellkompartimente auf einer ultrastrukturellen Ebene analysieren zu können, wurden transmissionselektronen-mikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Hierzu wurden  $1,5 \times 10^4$  Zellen/ well auf einer in 96-well-Platte vorgelegten Aclarfolie ausplattiert und bis zur Konfluenz von ca. 70 bis 90% im Inkubator kultiviert. Nach dem Erreichen der benötigten Dichte erfolgte das Waschen mit vorgewärmten PBS und eine 30-minütige Fixierung der Proteine bei RT in einem Gesamtvolumen von 150  $\mu$ l Fixierlösung (2% Glutaraldehyd und 0,2% gesättigte Pikrinsäure in 0,1 M Cacodylat-Puffer). Der Inkubation folgten drei 5-minütige Waschschriffe mit 0,1 M Cacodylat-Puffer. Anschließend wurden die Zellen 30 Minuten bei RT in 100  $\mu$ l Osmiumtetroxid-Lösung inkubiert. Dieser Schriff diente der Fixierung der Lipide innerhalb der Zellen und wurde analog zu den folgenden fünf 5-minütigen Waschschriffen mit 0,1 M Cacodylat-Puffer unter dem Abzug aufgrund der toxischen Osmiumdämpfe durchgeführt. Nach dem die Osmiumreste gründlich ausgewaschen wurden, erfolgte die Entwässerung der Proben mittels einer Ethanolreihe, wobei alle Schriffe auf Eis durchgeführt wurden. Die ersten vier Schriffe dauerten jeweils sieben Minuten und unterschieden sich durch den Ethanol-Gehalt (50%, 70%, 90% und 96% aufsteigend). Anschließend wurden die Zellen zweimal zehn Minuten mit 100% Ethanol inkubiert, um die Proben auf die Behandlung mit dem Epon vorzubereiten, die sich ebenfalls aus mehreren Schriffen zusammensetzte. Im ersten

Schritt wurden die Zellen mit einer Mischung aus Epon und 100% Ethanol im Verhältnis 1:1 versetzt und eine Stunde bei 4°C inkubiert. Nach der angegebenen Inkubationszeit wurde das Gemisch aus Epon und Ethanol mit einer Plastikpipette aufgesammelt. Der nächste Schritt erforderte eine höhere Eponkonzentration (3:1) und dauerte zwei Stunden bei 4°C, wonach die Mischung durch reines Epon ersetzt wurde. Es folgte eine Inkubation über Nacht bei 4°C. Am darauffolgenden Tag wurde das Epon zweimal durch frisch angesetztes Epon ausgetauscht, wobei die Inkubation jedes Mal zwei Stunden bei RT erfolgte. Nach dem letzten zweistündigen Schritt wurde die Aclarfolie mit den Zellen mit Hilfe einer Spritzenkanüle in TAAB-Kapseln überführt und mit Epon randvoll aufgefüllt. Nachdem alle Proben auf diese Weise bearbeitet wurden, wurden die Kapseln 72 Stunden bei 65°C inkubiert, um das Epon vollständig auspolymerisieren zu lassen. Das ausgehärtete Material wurde aus den Kapseln rausgeschnitten und mit Hilfe einer Diamantschleifmaschine zu einer konischen Form getrimmt, um das überschüssige Epon und die Aclarfolie zu entfernen und die Anfertigung der Ultradünnschnitte mittels eines Mikrotoms zu erleichtern.

Die Ultradünnschnitte wurden auf Grids überführt und der Kontrastierung mit Uranylacetat und Bleicitrat unterzogen. Die zu kontrastierenden Proben wurden erst auf ein zuvor beschriftetes Filterpapier in einer Glaspetrischale gelegt und mit einem Deckel abgedeckt, damit sie während der Kontrastierung sicher gelagert werden konnten. Als Kontrastierungsfläche diente eine mit Paraffin überzogene Glasplatte, wobei die Paraffinbeschichtung nach jedem Genotyp gewechselt wurde. Pro Genotyp wurden gleichzeitig drei Grids behandelt. Die Kontrastierung fand in den vorgelegten Tropfen statt, die reihenweise auf dem Paraffin verteilt wurden. Die erste Reihe bestand dabei aus drei separaten Tropfen 2% Uranylacetat, während in den nächsten fünf Reihen dH<sub>2</sub>O verteilt wurde. Jeweils ein Grid wurde mit der Schnittseite nach unten auf ein Tropfen Uranylacetat gelegt und fünf Minuten, abgedeckt mit einem Glaspetrischalen-Deckel inkubiert. Danach wurde jedes Grid Tropfen für Tropfen in Wasser gewaschen und auf ein Filterpapier mit der Schnittseite nach oben zum Trocknen gelegt. Nach dem vollständigen Trocknen wurde jedes Grid mit Bleicitrat behandelt. Hierfür wurden ca. sechs Natriumhydroxid-Plätzchen auf das Paraffin positioniert und für ca. fünf Minuten mit einem Glaspetrischalen-Deckel abgedeckt. Da das Blei beim Kontakt mit Kohlenstoffdioxid zu Niederschlägen neigt, wurden Natriumhydroxid-Plätzchen verwendet, um den Kohlenstoffdioxid aus der Luft zu binden. Anschließend wurde das Bleicitrat tropfenweise auf dem Paraffin verteilt, wobei der Deckel minimal geöffnet wurde, um den Einzug von CO<sub>2</sub> zu minimieren. Auf je einen Tropfen Bleicitrat wurde ein Grid mit dem Objekt nach unten gelegt und vier Minuten kontrastiert. Die Reste des Bleicitrats wurden durch Waschen in fünf Tropfen dH<sub>2</sub>O entfernt. Die nach dem Waschen getrockneten Grids wurden in einer Gridbox aufbewahrt. Die Mikroskopie erfolgte bei drei Vergrößerungen: 3000x, 20000x und 50000x.

## **5.2.4 *Drosophila melanogaster* Techniken**

### **5.2.4.1 Generierung transgener Fliegen**

Die Erzeugung transgener Fliegen wurde durch die Firma Bestgene durchgeführt. Hierzu wurden mindestens 20 µg des Zielkonstrukts in einem *attB*-Vektor an Bestgene geschickt, wobei die Integration des Konstrukts auf dem *attP/attB*-System basierte. Wird ein *attB*-Konstrukt in einen Embryo injiziert, dessen DNA *attP*-Sequenzen aufweist, so kommt es zu der durch die  $\Phi$ C31-Integrase vermittelten Rekombination zwischen den zwei *attP/attB*-Elementen, wobei das Transgen stabil in das Genom von *Drosophila melanogaster* inseriert wird.

### **5.2.4.2 Anzucht und Haltung von *Drosophila melanogaster***

Die Kultivierung transgener Fliegen aller Stadien erfolgte in einem durchsichtigen Plastikröhrchen, das mit einem luftdurchlässigen Stopfen versehen und zu einem Drittel mit Nährmedium befüllt war. Die Haltung erfolgte bei 18°C, wobei die Fliegen in einem Rhythmus von drei bis vier Wochen auf frisches Medium umgesetzt wurden.

### **5.2.4.3 Kreuzungen von *Drosophila melanogaster***

Um adulte Individuen miteinander zu kreuzen, wurden jungfräuliche Weibchen mit Männchen in einem Verhältnis von 3:1 in ein frisches Röhrchen umgesetzt und bei 25°C kultiviert, bis die ersten Nachkommen geschlüpft waren. Die Jungtiere wurden mittels Marker auf den benötigten Genotyp analysiert und die richtigen Individuen bei der Stammetablierung verwendet.

### **5.2.4.4 Klonale Analyse in *Drosophila melanogaster***

Um einen mutanten Phänotyp besser charakterisieren zu können, wird die Methode des genetischen Mosaiks eingesetzt. Diese Technik erlaubt die Erzeugung mutanter Klone innerhalb des wildtypischen Gewebes, so dass sich kleinste Unterschiede zwischen wildtypischen und mutanten Bereichen detektieren lassen. Die klonale Analyse basiert auf der mitotischen Rekombination, die zur Entstehung der homozygot mutanten Areale führt und durch die Verwendung des FLP/FRT-Systems induziert wird. Dabei grenzt der zu rekombinierende Bereich an eine FRT-Sequenz, die durch die Rekombinase namens Flippase erkannt wird. Sobald die Flippase produziert wird, bindet sie an die FRT-Sequenzen der beiden homologen Nichtschwesterchromatiden und führt die Rekombination aus, die in der Erzeugung der mutanten Klone resultiert. Die Größe und die Anzahl von Klonen hängt dabei von dem Zeitpunkt der Rekombination ab. Aufgrund dessen, dass die Zellen des ersten Larvenstadiums sich öfter teilen als die Zellen des dritten Stadiums, führt die Rekombination in früheren Entwicklungsstadien zu größeren Klonen, während die zu einem späteren Zeitpunkt induzierten Klone kleiner, aber zahlreicher auftreten. Das Stadium, in dem die



Rekombination durchgeführt wird, kann unter anderem, mittels eines Hitze-induzierten Promoters gesteuert werden. Dabei resultiert die Inkubation der Larven bei 37°C in der Expression der Flippase zu einem gewünschten Zeitpunkt.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Klonerzeugung basierte auf einer Kreuzung, die 48 Stunden bei 25°C gehalten wurde, bevor die adulten Fliegen in ein neues Röhrchen umgesetzt wurden. Unmittelbar darauf wurden die Larven des ersten Stadiums 60 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend bis zum dritten Larvenstadium bei 25°C gehalten. Diese Larven wurden der Präparation unterzogen und immunhistochemisch analysiert.

#### **5.2.4.5 Immunhistochemie an Flügelimaginalscheiben**

Um die immunhistochemische Analyse an Flügelimaginalscheiben durchführen zu können, wurden die Larven des dritten Stadiums verwendet, die bereits den Brei verlassen haben und sich somit gut identifizieren lassen. Die Larven wurden in ein Blockschälchen mit vorgelegtem PBS überführt, mit einer Pinzette fixiert und in der Körpermitte halbiert, wobei der hintere Teil verworfen wurde. Anschließend wurde das Vorderende umgestülpt und der Darm, das Gehirn sowie das Fettgewebe zum größten Teil entfernt. Die zurückbleibende Kutikula mit den daran gebundenen Tracheen und Flügelimaginalscheiben wurde in ein Siebchen überführt, das in eine 24-well-Platte positioniert wurde. Anschließend wurde das Gewebe in 500 µl 4% PFA in PBS 30 Minuten bei RT inkubiert, wobei während dieser Zeit eine Quervernetzung des Gewebes und somit seine Fixierung in dem aktuellen Zustand erfolgte. Der Fixierung folgten drei Waschschriffe mit 0,3% PBT (0,3% Triton-100 in PBS). Um eine unspezifische Antikörperfärbung zu vermeiden, wurde das Gewebe 30 Minuten in 500 µl der Blocklösung bestehend aus 5% NGS in PBS bei RT inkubiert. Die darauffolgende Antikörperfärbung wurde 90 Minuten bei RT in der Blocklösung durchgeführt. Nach dem Ablauf der angegebenen Zeit wurden die überschüssigen Antikörper durch dreifaches, 15-minütiges Waschen mit 0,3% PBT entfernt, bevor die Proben mit dem sekundären Antikörper für eine Stunde bei RT versetzt wurden. Anschließend wurden die Proben zehn Minuten mit 0,3% PBT gewaschen und vier Minuten bei RT mit Hoechst-Lösung (1:100) inkubiert, wonach sie erneut zweimal zehn Minuten mit 0,3% PBT gewaschen wurden. Zum Schluss wurden die Flügelimaginalscheiben von der Kutikula freipräpariert und in Vectashield eingebettet. Die Präparate wurden entweder direkt mikroskopiert (bei 10-, 25- und 63-facher Vergrößerung) oder lichtundurchlässig bei 4°C gelagert.

## 6. Literaturverzeichnis

- Abel, T., P. V. Nguyen, M. Barad, T. A. Deuel, E. R. Kandel, and R. Bourtschouladze. 1997. 'Genetic demonstration of a role for PKA in the late phase of LTP and in hippocampus-based long-term memory'. *Cell* **88**: 615-26.
- Ables, J. L., J. J. Breunig, A. J. Eisch, and P. Rakic. 2011. 'Not(ch) just development: Notch signalling in the adult brain'. *Nature Reviews Neuroscience* **12**: 269-83.
- Al-Tawashi, A., S. Y. Jung, D. Liu, B. Su, and J. Qin. 2012. 'Protein implicated in nonsyndromic mental retardation regulates protein kinase A (PKA) activity'. *The Journal of Biological Chemistry* **287**: 14644-58.
- Alonso, Y. Adell M., S. M. Migliano, and D. Teis. 2016. 'ESCRT-III and Vps4: a dynamic multipurpose tool for membrane budding and scission'. *The FEBS journal* **283**: 3288-302.
- Andersen, K. R., N. C. Leksa, and T. U. Schwartz. 2013. 'Optimized E. coli expression strain LOBSTR eliminates common contaminants from His-tag purification'. *Proteins* **81**: 1857-61.
- Arii, J., M. Watanabe, F. Maeda, N. Tokai-Nishizumi, T. Chihara, M. Miura, Y. Maruzuru, N. Koyanagi, A. Kato, and Y. Kawaguchi. 2018. 'ESCRT-III mediates budding across the inner nuclear membrane and regulates its integrity'. *Nature Communications* **9**: 3379.
- Artavanis-Tsakonas, S., M. D. Rand, and R. J. Lake. 1999. 'Notch signaling: cell fate control and signal integration in development'. *Science* **284**: 770-6.
- Arya, M., I. S. Shergill, M. Williamson, L. Gommersall, N. Arya, and H. R. Patel. 2005. 'Basic principles of real-time quantitative PCR'. *Expert Review of Molecular Diagnostics* **5**: 209-19.
- Babst, M. 2011. 'MVB vesicle formation: ESCRT-dependent, ESCRT-independent and everything in between'. *Current Opinion in Cell Biology* **23**: 452-7.
- Bache, K. G., A. Brech, A. Mehlum, and H. Stenmark. 2003. 'Hrs regulates multivesicular body formation via ESCRT recruitment to endosomes'. *The Journal of Cell Biology* **162**: 435-42.
- Bajorek, M., H. L. Schubert, J. McCullough, C. Langelier, D. M. Eckert, W. M. Stubblefield, N. T. Uter, D. G. Myszk, C. P. Hill, and W. I. Sundquist. 2009. 'Structural basis for ESCRT-III protein autoinhibition'. *Nature Structural & Molecular Biology* **16**: 754-62.
- Basel-Vanagaite, L., R. Attia, M. Yahav, R. J. Ferland, L. Anteki, C. A. Walsh, T. Olender, R. Straussberg, N. Magal, E. Taub, V. Drasinover, A. Alkelai, D. Bercovich, G. Rechavi, A. J. Simon, and M. Shohat. 2006. 'The CC2D1A, a member of a new gene family with C2 domains, is involved in autosomal recessive non-syndromic mental retardation'. *Journal of Medical Genetics* **43**: 203-10.
- Basel-Vanagaite, L., E. Taub, G. J. Halpern, V. Drasinover, N. Magal, B. Davidov, J. Zlotogora, and M. Shohat. 2007. 'Genetic screening for autosomal recessive nonsyndromic mental retardation in an isolated population in Israel'. *European Journal of Human Genetics* **15**: 250-3.
- Blaumueller, C. M., H. Qi, P. Zagouras, and S. Artavanis-Tsakonas. 1997. 'Intracellular cleavage of Notch leads to a heterodimeric receptor on the plasma membrane'. *Cell* **90**: 281-91.
- Bornhorst, J. A., and J. J. Falke. 2000. 'Purification of proteins using polyhistidine affinity tags'. *Methods in Enzymology* **326**: 245-54.
- Brou, C., F. Logeat, N. Gupta, C. Bessia, O. LeBail, J. R. Doedens, A. Cumano, P. Roux, R. A. Black, and A. Israel. 2000. 'A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE'. *Molecular Cell* **5**: 207-16.
- Bryant, P. J., and G. Schubiger. 1971. 'Giant and duplicated imaginal discs in a new lethal mutant of *Drosophila melanogaster*'. *Developmental Biology* **24**: 233-63.
- Bryant, P. J., K. L. Watson, R. W. Justice, and D. F. Woods. 1993. 'Tumor suppressor genes encoding proteins required for cell interactions and signal transduction in *Drosophila*'. *Development Supplement*: 239-49.
- Burd, C. G., and S. D. Emr. 1998. 'Phosphatidylinositol(3)-phosphate signaling mediated by specific binding to RING FYVE domains'. *Molecular Cell* **2**: 157-62.
- Carlton, J. G., and J. Martin-Serrano. 2007. 'Parallels between cytokinesis and retroviral budding: a role for the ESCRT machinery'. *Science* **316**: 1908-12.
- Chang, C. H., L. C. Lai, H. C. Cheng, K. R. Chen, Y. Z. Syue, H. C. Lu, W. Y. Lin, S. H. Chen, H. S. Huang, A. L. Shiau, H. Y. Lei, J. Qin, and P. Ling. 2011. 'TBK1-associated protein in endolysosomes (TAPE) is an innate immune regulator modulating the TLR3 and TLR4 signaling pathways'. *The Journal of Biological Chemistry* **286**: 7043-51.
- Chassefeyre, R., J. Martinez-Hernandez, F. Bertaso, N. Bouquier, B. Blot, M. Laporte, S. Fraboulet, Y. Coute, A. Devoy, A. M. Isaacs, K. Pernet-Gallay, R. Sadoul, L. Fagni, and Y. Goldberg. 2015. 'Regulation of postsynaptic function by the dementia-related ESCRT-III subunit CHMP2B'. *The Journal of Neuroscience* **35**: 3155-73.
- Chen, K. R., C. H. Chang, C. Y. Huang, C. Y. Lin, W. Y. Lin, Y. C. Lo, C. Y. Yang, E. W. Hsing, L. F. Chen, S. R. Shih, A. L. Shiau, H. Y. Lei, T. H. Tan, and P. Ling. 2012. 'TBK1-associated protein

- in endolysosomes (TAPE)/CC2D1A is a key regulator linking RIG-I-like receptors to antiviral immunity'. *The Journal of Biological Chemistry* **287**: 32216-21.
- Chiaruttini, N., L. Redondo-Morata, A. Colom, F. Humbert, M. Lenz, S. Scheuring, and A. Roux. 2015. 'Relaxation of Loaded ESCRT-III Spiral Springs Drives Membrane Deformation'. *Cell* **163**: 866-79.
- Childress, J. L., M. Acar, C. Tao, and G. Halder. 2006. 'Lethal giant discs, a novel C2-domain protein, restricts notch activation during endocytosis'. *Current Biology* **16**: 2228-33.
- Clague, M. J., H. Liu, and S. Urbe. 2012. 'Governance of endocytic trafficking and signaling by reversible ubiquitylation'. *Developmental Cell* **23**: 457-67.
- Davletov, B. A., and T. C. Südhof. 1993. 'A single C2 domain from synaptotagmin I is sufficient for high affinity Ca<sup>2+</sup>/phospholipid binding'. *The Journal of Biological Chemistry* **268**: 26386-90.
- Deshar, R., E. B. Cho, S. K. Yoon, and J. B. Yoon. 2016. 'CC2D1A and CC2D1B regulate degradation and signaling of EGFR and TLR4'. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **480**: 280-87.
- Drusenheimer, N., B. Migdal, S. Jackel, L. Tveriakhina, K. Scheider, K. Schulz, J. Groper, K. Kohrer, and T. Klein. 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.
- Engelmann, C., and R. Haenold. 2016. 'Transcriptional Control of Synaptic Plasticity by Transcription Factor NF-kappaB'. *Neural Plasticity* **2016**: 7027949.
- Fiuza, U. M., and A. M. Arias. 2007. 'Cell and molecular biology of Notch'. *The Journal of Endocrinology* **194**: 459-74.
- Fujii, K., J. H. Hurley, and E. O. Freed. 2007. 'Beyond Tsg101: the role of Alix in 'ESCRTing' HIV-1'. *Nature Reviews Microbiology* **5**: 912-6.
- Gallagher, C. M., and J. A. Knoblich. 2006. 'The conserved c2 domain protein lethal (2) giant discs regulates protein trafficking in Drosophila'. *Developmental Cell* **11**: 641-53.
- Ghazi-Tabatabai, S., S. Saksena, J. M. Short, A. V. Pobbati, D. B. Veprintsev, R. A. Crowther, S. D. Emr, E. H. Egelman, and R. L. Williams. 2008. 'Structure and disassembly of filaments formed by the ESCRT-III subunit Vps24'. *Structure* **16**: 1345-56.
- Gill, D. J., H. Teo, J. Sun, O. Perisic, D. B. Veprintsev, S. D. Emr, and R. L. Williams. 2007. 'Structural insight into the ESCRT-I/II link and its role in MVB trafficking'. *The EMBO Journal* **26**: 600-12.
- Gordon, W. R., K. L. Arnett, and S. C. Blacklow. 2008. 'The molecular logic of Notch signaling: a structural and biochemical perspective'. *Journal of Cell Science* **121**: 3109-19.
- Guzman, L. M., D. Belin, M. J. Carson, and J. Beckwith. 1995. 'Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter'. *Journal of Bacteriology* **177**: 4121-30.
- Hadjighassem, M. R., M. C. Austin, B. Szewczyk, M. Daigle, C. A. Stockmeier, and P. R. Albert. 2009. 'Human Freud-2/CC2D1B: a novel repressor of postsynaptic serotonin-1A receptor expression'. *Biological Psychiatry* **66**: 214-22.
- Hadjighassem, M. R., K. Galaraga, and P. R. Albert. 2011. 'Freud-2/CC2D1B mediates dual repression of the serotonin-1A receptor gene'. *The European Journal of Neuroscience* **33**: 214-23.
- Henne, W. M., N. J. Buchkovich, Y. Zhao, and S. D. Emr. 2012. 'The endosomal sorting complex ESCRT-II mediates the assembly and architecture of ESCRT-III helices'. *Cell* **151**: 356-71.
- Henne, W. M., H. Stenmark, and S. D. Emr. 2013. 'Molecular mechanisms of the membrane sculpting ESCRT pathway'. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **5**.
- Huotari, J., and A. Helenius. 2011. 'Endosome maturation'. *The EMBO Journal* **30**: 3481-500.
- Hurley, J. H. 2010. 'The ESCRT complexes'. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **45**: 463-87.
- Hurley, J. H., and B. Yang. 2014. 'Making sense of Vps4'. *Journal of Molecular Biology* **426**: 503-6.
- Im, Y. J., and J. H. Hurley. 2008. 'Integrated structural model and membrane targeting mechanism of the human ESCRT-II complex'. *Developmental Cell* **14**: 902-13.
- Jaekel, R., and T. Klein. 2006. 'The Drosophila Notch inhibitor and tumor suppressor gene lethal (2) giant discs encodes a conserved regulator of endosomal trafficking'. *Developmental Cell* **11**: 655-69.
- Jarriault, S., C. Brou, F. Logeat, E. H. Schroeter, R. Kopan, and A. Israel. 1995. 'Signalling downstream of activated mammalian Notch'. *Nature* **377**: 355-8.
- Jimenez, A. J., P. Maiuri, J. Lafaurie-Janvore, S. Divoux, M. Piel, and F. Perez. 2014. 'ESCRT machinery is required for plasma membrane repair'. *Science* **343**: 1247136.
- Jovic, M., M. Sharma, J. Rahajeng, and S. Caplan. 2010. 'The early endosome: a busy sorting station for proteins at the crossroads'. *Histology and Histopathology* **25**: 99-112.
- Katzmann, D. J., M. Babst, and S. D. Emr. 2001. 'Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I'. *Cell* **106**: 145-55.

- Katzmann, D. J., C. J. Stefan, M. Babst, and S. D. Emr. 2003. 'Vps27 recruits ESCRT machinery to endosomes during MVB sorting'. *The Journal of Cell Biology* **162**: 413-23.
- Kimble, J., and P. Simpson. 1997. 'The LIN-12/Notch signaling pathway and its regulation'. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **13**: 333-61.
- 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**: 313-33.
- Komada, M., and P. Soriano. 1999. 'Hrs, a FYVE finger protein localized to early endosomes, is implicated in vesicular traffic and required for ventral folding morphogenesis'. *Genes & Development* **13**: 1475-85.
- Kopan, R., E. H. Schroeter, H. Weintraub, and J. S. Nye. 1996. 'Signal transduction by activated mNotch: importance of proteolytic processing and its regulation by the extracellular domain'. *PNAS* **93**: 1683-8.
- Kostelansky, M. S., C. Schluter, Y. Y. Tam, S. Lee, R. Ghirlando, B. Beach, E. Conibear, and J. H. Hurley. 2007. 'Molecular architecture and functional model of the complete yeast ESCRT-I heterotetramer'. *Cell* **129**: 485-98.
- Lamar, E., G. Deblandre, D. Wettstein, V. Gawantka, N. Pollet, C. Niehrs, and C. Kintner. 2001. 'Nrarp is a novel intracellular component of the Notch signaling pathway'. *Genes & Development* **15**: 1885-99.
- Lanzenberger, R. R., M. Mitterhauser, C. Spindelegger, W. Wadsak, N. Klein, L. K. Mien, A. Holik, T. Attarbaschi, N. Mossaheb, J. Sacher, T. Geiss-Granadia, K. Kletter, S. Kasper, and J. Tauscher. 2007. 'Reduced serotonin-1A receptor binding in social anxiety disorder'. *Biological Psychiatry* **61**: 1081-9.
- Lata, S., G. Schoehn, A. Jain, R. Pires, J. Piehler, H. G. Gottlinger, and W. Weissenhorn. 2008. 'Helical structures of ESCRT-III are disassembled by VPS4'. *Science* **321**: 1354-7.
- Lissemore, J. L., and W. T. Starmer. 1999. 'Phylogenetic analysis of vertebrate and invertebrate Delta/Serrate/LAG-2 (DSL) proteins'. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **11**: 308-19.
- Livak, K. J., and T. D. Schmittgen. 2001. 'Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-Delta Delta C(T)</sup> Method'. *Methods* **25**: 402-8.
- Logeat, F., C. Bessia, C. Brou, O. LeBail, S. Jarriault, N. G. Seidah, and A. Israel. 1998. 'The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase'. *PNAS* **95**: 8108-12.
- Lu, Q., L. W. Hope, M. Brasch, C. Reinhard, and S. N. Cohen. 2003. 'TSG101 interaction with HRS mediates endosomal trafficking and receptor down-regulation'. *PNAS* **100**: 7626-31.
- Maine, E. M., J. L. Lissemore, and W. T. Starmer. 1995. 'A phylogenetic analysis of vertebrate and invertebrate Notch-related genes'. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **4**: 139-49.
- Manzini, M. C., L. Xiong, R. Shaheen, D. E. Tambunan, S. Di Costanzo, V. Mitisalis, D. J. Tischfield, A. Cinquino, M. Ghaziuddin, M. Christian, Q. Jiang, S. Laurent, Z. A. Nanjiani, S. Rasheed, R. S. Hill, S. B. Lizarraga, D. Gleason, D. Sabbagh, M. A. Salih, F. S. Alkuraya, and C. A. Walsh. 2014. 'CC2D1A regulates human intellectual and social function as well as NF-kappaB signaling homeostasis'. *Cell Reports* **8**: 647-55.
- Martinelli, N., B. Hartlieb, Y. Usami, C. Sabin, A. Dordor, N. Miguet, S. V. Avilov, E. A. Ribeiro, Jr., H. Gottlinger, and W. Weissenhorn. 2012. 'CC2D1A is a regulator of ESCRT-III CHMP4B'. *Journal of Molecular Biology* **419**: 75-88.
- Matsuda, A., Y. Suzuki, G. Honda, S. Muramatsu, O. Matsuzaki, Y. Nagano, T. Doi, K. Shimotohno, T. Harada, E. Nishida, H. Hayashi, and S. Sugano. 2003. 'Large-scale identification and characterization of human genes that activate NF-kappaB and MAPK signaling pathways'. *Oncogene* **22**: 3307-18.
- Mattson, M. P., and M. K. Meffert. 2006. 'Roles for NF-kappaB in nerve cell survival, plasticity, and disease'. *Cell Death and Differentiation* **13**: 852-60.
- Maxfield, F. R., and T. E. McGraw. 2004. 'Endocytic recycling'. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **5**: 121-32.
- Mayor, S., and R. E. Pagano. 2007. 'Pathways of clathrin-independent endocytosis'. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **8**: 603-12.
- McMillan, B. J., C. Tibbe, A. A. Drabek, T. C. M. Seegar, S. C. Blacklow, and T. Klein. 2017. 'Structural Basis for Regulation of ESCRT-III Complexes by Lgd'. *Cell Reports* **19**: 1750-57.
- Migdal, B. 2016. 'Analysen zur Funktion von CC2D1A und CC2D1B im endosomalen Transportweg und zur Interaktion mit ESCRT-III Proteinen in Säugern'. Dissertation. Institut für Genetik, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf.
- Miroux, B., and J. E. Walker. 1996. 'Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels'. *Journal of Molecular Biology* **260**: 289-98.
- Mohr, M. 2017. 'Analyse der Interaktion zwischen CC2D1A/B und CHMP4B(A54C;L180C) und Etablierung der optimalen Proteinexpressionsbedingungen für CC2D1A delta DM14(1-4) und

- CC2D1B delta DM14(1-4)'. Bachelorarbeit. Institut für Genetik, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf.
- Monroe, N., H. Han, M. D. Gonciarz, D. M. Eckert, M. A. Karren, F. G. Whitby, W. I. Sundquist, and C. P. Hill. 2014. 'The oligomeric state of the active Vps4 AAA ATPase'. *Journal of Molecular Biology* **426**: 510-25.
- Monroe, N., H. Han, P. S. Shen, W. I. Sundquist, and C. P. Hill. 2017. 'Structural basis of protein translocation by the Vps4-Vta1 AAA ATPase'. *Elife* **6**.
- Morita, E., V. Sandrin, H. Y. Chung, S. G. Morham, S. P. Gygi, C. K. Rodesch, and W. I. Sundquist. 2007. 'Human ESCRT and ALIX proteins interact with proteins of the midbody and function in cytokinesis'. *The EMBO Journal* **26**: 4215-27.
- Morita, E., and W. I. Sundquist. 2004. 'Retrovirus budding'. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **20**: 395-425.
- Mumm, J. S., E. H. Schroeter, M. T. Saxena, A. Griesemer, X. Tian, D. J. Pan, W. J. Ray, and R. Kopan. 2000. 'A ligand-induced extracellular cleavage regulates gamma-secretase-like proteolytic activation of Notch1'. *Molecular Cell* **5**: 197-206.
- Murayama, C., Y. Kimura, and M. Setou. 2009. 'Imaging mass spectrometry: principle and application'. *Biophysical Reviews* **1**: 131.
- Nakamura, A., H. Arai, and N. Fujita. 2009. 'Centrosomal Aki1 and cohesin function in separase-regulated centriole disengagement'. *The Journal of Cell Biology* **187**: 607-14.
- Nakamura, A., M. Naito, H. Arai, and N. Fujita. 2010. 'Mitotic phosphorylation of Aki1 at Ser208 by cyclin B1-Cdk1 complex'. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **393**: 872-6.
- Nakamura, A., M. Naito, T. Tsuruo, and N. Fujita. 2008. 'Freud-1/Aki1, a novel PDK1-interacting protein, functions as a scaffold to activate the PDK1/Akt pathway in epidermal growth factor signaling'. *Molecular and Cellular Biology* **28**: 5996-6009.
- Nguyen, P. V., and N. H. Woo. 2003. 'Regulation of hippocampal synaptic plasticity by cyclic AMP-dependent protein kinases'. *Progress in Neurobiology* **71**: 401-37.
- Nichols, J. T., A. Miyamoto, S. L. Olsen, B. D'Souza, C. Yao, and G. Weinmaster. 2007. 'DSL ligand endocytosis physically dissociates Notch1 heterodimers before activating proteolysis can occur'. *The Journal of Cell Biology* **176**: 445-58.
- Oaks, A. W., M. Zamarbide, D. E. Tambunan, E. Santini, S. Di Costanzo, H. L. Pond, M. W. Johnson, J. Lin, D. M. Gonzalez, J. F. Boehler, G. K. Wu, E. Klann, C. A. Walsh, and M. C. Manzini. 2017. 'Cc2d1a Loss of Function Disrupts Functional and Morphological Development in Forebrain Neurons Leading to Cognitive and Social Deficits'. *Cerebral Cortex* **27**: 1670-85.
- Olmos, Y., L. Hodgson, J. Mantell, P. Verkade, and J. G. Carlton. 2015. 'ESCRT-III controls nuclear envelope reformation'. *Nature* **522**: 236-9.
- Olmos, Y., A. Perdrix-Rosell, and J. G. Carlton. 2016. 'Membrane Binding by CHMP7 Coordinates ESCRT-III-Dependent Nuclear Envelope Reformation'. *Current Biology* **26**: 2635-41.
- Ou, X. M., S. Lemonde, H. Jafar-Nejad, C. D. Bown, A. Goto, A. Rogaeva, and P. R. Albert. 2003. 'Freud-1: A neuronal calcium-regulated repressor of the 5-HT1A receptor gene'. *The Journal of Neuroscience* **23**: 7415-25.
- Pitchot, W., M. Hansenne, E. Pinto, J. Reggers, S. Fuchs, and M. Ansseau. 2005. '5-Hydroxytryptamine 1A receptors, major depression, and suicidal behavior'. *Biological Psychiatry* **58**: 854-8.
- Ponting, C. P., R. Mott, P. Bork, and R. R. Copley. 2001. 'Novel protein domains and repeats in Drosophila melanogaster: insights into structure, function, and evolution'. *Genome Research* **11**: 1996-2008.
- Raiborg, C., K. G. Bache, D. J. Gillooly, I. H. Madshus, E. Stang, and H. Stenmark. 2002. 'Hrs sorts ubiquitinated proteins into clathrin-coated microdomains of early endosomes'. *Nature Cell Biology* **4**: 394-8.
- Raiborg, C., B. Bremnes, A. Mehlum, D. J. Gillooly, A. D'Arrigo, E. Stang, and H. Stenmark. 2001. 'FYVE and coiled-coil domains determine the specific localisation of Hrs to early endosomes'. *Journal of Cell Science* **114**: 2255-63.
- Rand, M. D., L. M. Grimm, S. Artavanis-Tsakonas, V. Patriub, S. C. Blacklow, J. Sklar, and J. C. Aster. 2000. 'Calcium depletion dissociates and activates heterodimeric notch receptors'. *Molecular and Cellular Biology* **20**: 1825-35.
- Rappsilber, J. 2011. 'The beginning of a beautiful friendship: cross-linking/mass spectrometry and modelling of proteins and multi-protein complexes'. *Journal of Structural Biology* **173**: 530-40.
- Russo Krauss, I., A. Merlino, A. Vergara, and F. Sica. 2013. 'An overview of biological macromolecule crystallization'. *International Journal of Molecular Sciences* **14**: 11643-91.
- Sachse, M., S. Urbe, V. Oorschot, G. J. Strous, and J. Klumperman. 2002. 'Bilayered clathrin coats on endosomal vacuoles are involved in protein sorting toward lysosomes'. *Molecular Biology of the Cell* **13**: 1313-28.
- Saksena, S., J. Wahlman, D. Teis, A. E. Johnson, and S. D. Emr. 2009. 'Functional reconstitution of ESCRT-III assembly and disassembly'. *Cell* **136**: 97-109.

- Schneider, M., T. Troost, F. Grawe, A. Martinez-Arias, and T. Klein. 2013. 'Activation of Notch in Igd mutant cells requires the fusion of late endosomes with the lysosome'. *Journal of Cell Science* **126**: 645-56.
- Schnorrenberg, S. 2013. 'Funktion der LGD-Proteine bei der Konformationsänderung des ESCRT-III Proteins Shrub/CHMP4B und bei dem Abbau des Notch-Rezeptors in Säugerzellen.'. Masterarbeit. Institut für Genetik, Heinrich-Heine-Universität.
- Schroeter, E. H., J. A. Kisslinger, and R. Kopan. 1998. 'Notch-1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain'. *Nature* **393**: 382-6.
- Schwenk, F., U. Baron, and K. Rajewsky. 1995. 'A cre-transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of loxP-flanked gene segments including deletion in germ cells'. *Nucleic Acids Research* **23**: 5080-1.
- Shen, Q. T., A. L. Schuh, Y. Zheng, K. Quinney, L. Wang, M. Hanna, J. C. Mitchell, M. S. Otegui, P. Ahlquist, Q. Cui, and A. Audhya. 2014. 'Structural analysis and modeling reveals new mechanisms governing ESCRT-III spiral filament assembly'. *The Journal of Cell Biology* **206**: 763-77.
- Sinz, A. 2003. 'Chemical cross-linking and mass spectrometry for mapping three-dimensional structures of proteins and protein complexes'. *Journal of Mass Spectrometry* **38**: 1225-37.
- Sisamakris, E., A. Valeri, S. Kalinin, P. J. Rothwell, and C. A. Seidel. 2010. 'Accurate single-molecule FRET studies using multiparameter fluorescence detection'. *Methods in Enzymology* **475**: 455-514.
- Sorkin, A., and M. von Zastrow. 2009. 'Endocytosis and signalling: intertwining molecular networks'. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **10**: 609-22.
- Spitzer, C., S. Schellmann, A. Sabovljevic, M. Shahriari, C. Keshavaiah, N. Bechtold, M. Herzog, S. Muller, F. G. Hanisch, and M. Hulskamp. 2006. 'The Arabidopsis elc mutant reveals functions of an ESCRT component in cytokinesis'. *Development* **133**: 4679-89.
- Sullivan, G. M., M. A. Oquendo, N. Simpson, R. L. Van Heertum, J. J. Mann, and R. V. Parsey. 2005. 'Brain serotonin1A receptor binding in major depression is related to psychic and somatic anxiety'. *Biological Psychiatry* **58**: 947-54.
- Sutton, R. B., B. A. Davletov, A. M. Berghuis, T. C. Südhof, and S. R. Sprang. 1995. 'Structure of the first C2 domain of synaptotagmin I: a novel Ca<sup>2+</sup>/phospholipid-binding fold'. *Cell* **80**: 929-38.
- Tang, S., W. M. Henne, P. P. Borbat, N. J. Buchkovich, J. H. Freed, Y. Mao, J. C. Fromme, and S. D. Emr. 2015. 'Structural basis for activation, assembly and membrane binding of ESCRT-III Snf7 filaments'. *Elife* **4**.
- Teo, H., D. J. Gill, J. Sun, O. Perisic, D. B. Veprintsev, Y. Vallis, S. D. Emr, and R. L. Williams. 2006. 'ESCRT-I core and ESCRT-II GLUE domain structures reveal role for GLUE in linking to ESCRT-I and membranes'. *Cell* **125**: 99-111.
- Teo, H., O. Perisic, B. Gonzalez, and R. L. Williams. 2004. 'ESCRT-II, an endosome-associated complex required for protein sorting: crystal structure and interactions with ESCRT-III and membranes'. *Developmental Cell* **7**: 559-69.
- Troost, T., S. Jaeckel, N. Ohlenhard, and T. Klein. 2012. 'The tumour suppressor Lethal (2) giant discs is required for the function of the ESCRT-III component Shrub/CHMP4'. *Journal of Cell Science* **125**: 763-76.
- Usami, Y., S. Popov, E. R. Weiss, C. Vriesema-Magnuson, A. Calistri, and H. G. Gottlinger. 2012. 'Regulation of CHMP4/ESCRT-III function in human immunodeficiency virus type 1 budding by CC2D1A'. *Journal of Virology* **86**: 3746-56.
- Ventimiglia, L. N., M. A. Cuesta-Geijo, N. Martinelli, A. Caballe, P. Macheboeuf, N. Miquet, I. M. Parnham, Y. Olmos, J. G. Carlton, W. Weissenhorn, and J. Martin-Serrano. 2018. 'CC2D1B Coordinates ESCRT-III Activity during the Mitotic Reformation of the Nuclear Envelope'. *Developmental Cell* **47**: 547-63.e6.
- Vietri, M., K. O. Schink, C. Campsteijn, C. S. Wegner, S. W. Schultz, L. Christ, S. B. Thoresen, A. Brech, C. Raiborg, and H. Stenmark. 2015. 'Spastin and ESCRT-III coordinate mitotic spindle disassembly and nuclear envelope sealing'. *Nature* **522**: 231-5.
- Webster, M., K. L. Witkin, and O. Cohen-Fix. 2009. 'Sizing up the nucleus: nuclear shape, size and nuclear-envelope assembly'. *Journal of Cell Science* **122**: 1477-86.
- Weinmaster, G. 1997. 'The ins and outs of notch signaling'. *Molecular and Cellular Neurosciences* **9**: 91-102.
- Wenzel, E. M., S. W. Schultz, K. O. Schink, N. M. Pedersen, V. Nähse, A. Carlson, A. Brech, H. Stenmark, and C. Raiborg. 2018. 'Concerted ESCRT and clathrin recruitment waves define the timing and morphology of intraluminal vesicle formation'. *Nature Communications* **9**: 2932.
- Yamada, T., S. Takeuchi, N. Fujita, A. Nakamura, W. Wang, Q. Li, M. Oda, T. Mitsudomi, Y. Yatabe, Y. Sekido, J. Yoshida, M. Higashiyama, M. Noguchi, H. Uehara, Y. Nishioka, S. Sone, and S. Yano. 2013. 'Akt kinase-interacting protein1, a novel therapeutic target for lung cancer with EGFR-activating and gatekeeper mutations'. *Oncogene* **32**: 4427-35.

- Yang, B., G. Stjepanovic, Q. Shen, A. Martin, and J. H. Hurley. 2015. 'Vps4 disassembles an ESCRT-III filament by global unfolding and processive translocation'. *Nature Structural & Molecular Biology* **22**: 492-8.
- Zamarbide, M., A. W. Oaks, H. L. Pond, J. S. Adelman, and M. C. Manzini. 2018. 'Loss of the Intellectual Disability and Autism Gene Cc2d1a and Its Homolog Cc2d1b Differentially Affect Spatial Memory, Anxiety, and Hyperactivity'. *Frontiers in Genetics* **9**: 65.
- Zhao, M., X. D. Li, and Z. Chen. 2010. 'CC2D1A, a DM14 and C2 domain protein, activates NF-kappaB through the canonical pathway'. *The Journal of Biological Chemistry* **285**: 24372-80.
- Zhao, M., J. Raino, Z. J. Chen, and E. T. Kavalali. 2011. 'Cc2d1a, a C2 domain containing protein linked to nonsyndromic mental retardation, controls functional maturation of central synapses'. *Journal of Neurophysiology* **105**: 1506-15.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

### Zeichen

%	Prozent
∅	unbehandelt
>	größer als
<	kleiner als
∞	undefiniert
°C	Grad Celsius
x g	x-fache der Erdbeschleunigung
α	alpha
β	beta
κ	kappa
γ	gamma
μ	Micro
Σ	Summe
5-HT1A	5-Hydroxytryptamin

### A

<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>AC</b>	Adenylatcyclase
<b>ADAM</b>	<i>A Disintegrin And Metalloprotease</i>
<b>Aki1</b>	<i>Akt Kinase Interacting Protein 1</i>
<b>Amp</b>	Ampicillin
<b>ALIX</b>	<i>Apoptosis-Linked Gene 2-Interacting Protein X</i>
<b>APS</b>	Ammoniumperoxodisulfat
<b>AS</b>	Aminosäuren
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat

### B

<b>bp</b>	Basenpaare
<b>BSA</b>	Bovines Serumalbumin
<b>bzw.</b>	beziehungsweise

### C

<b>cAMP</b>	zyklisches Adenosinmonophosphat
<b>CC2D1</b>	<i>coiled-coil and conserved region 2 (C2) domain containing 1</i>
<b>Cdk1</b>	<i>Cyclin-dependent kinase 1</i>
<b>cDNA</b>	<i>complementary DNA</i>
<b>CHMP</b>	<i>charged multivesicular body protein</i>
<b>Cre</b>	<i>Cyclization recombination/ causes recombination</i>
<b>CREB</b>	<i>cAMP response element-binding protein</i>



---

<b>Ct</b>	<i>Cycle threshold</i>
<b>CX-MS</b>	<i>Crosslinking Mass Spectrometry</i>
<b>D</b>	
<b>DAPI</b>	4'-6-Diamidin-2-phenylindol
<b>DEPC</b>	Diethyldicarbonat
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	destilliertes Wasser
<b><i>D. melanogaster</i></b>	<i>Drosophila melanogaster</i>
<b>DM14</b>	<i>Drosophila melanogaster</i> 14
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	<i>deoxyribonucleic acid</i>
<b>dNTPs</b>	Desoxynukleosidtriphosphate
<b>dsRNA</b>	doppelsträngige DNA
<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b>E</b>	
<b>EAP</b>	<i>ELL-Associated Protein</i>
<b><i>E.coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure
<b>EGF</b>	<i>epidermal growth factor</i>
<b>EGFR</b>	<i>epidermal growth factor receptor</i>
<b>EK</b>	Enterokinase
<b>EL</b>	Endolysosom
<b>ER</b>	Endoplasmatisches Retikulum
<b>ESCRT</b>	<i>endosomal sorting complex required for transport</i>
<b>F</b>	
<b>FCS</b>	<i>fetal calf serum</i>
<b>FE</b>	Frühes Endosom
<b>FLP</b>	<i>Flippase</i>
<b>for</b>	<i>Forward</i>
<b>FRET</b>	Förster-Resonanzenergietransfer
<b>Freud-1/2</b>	<i>FRE under dual repression-binding protein 1/2</i>
<b>FRT</b>	<i>Flippase Recognition Target</i>
<b>FSK</b>	Forskolin
<b>G</b>	
<b>g</b>	Gramm
<b>G</b>	G-Protein
<b>GAPDH</b>	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
<b>GPCR</b>	<i>G-protein coupled receptor</i>

---

**H**

<b>h</b>	Stunde
<b>HA</b>	Human influenza hemagglutinin
<b>HCl</b>	Salzsäure
<b>HEPES</b>	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
<b>Hes1</b>	<i>Hairy and enhancer of split 1</i>
<b>His6/10</b>	sechs oder zehn Histidine
<b>HRP</b>	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
<b>Hrs</b>	Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate

**I**

<b>If</b>	<i>Irregular facets</i>
<b>IFN</b>	<i>Interferon</i>
<b>I<math>\kappa</math>B</b>	<i>inhibitor of kappa B</i>
<b>IKK<math>\beta</math></b>	<i>Inhibitor of Nuclear Factor Kappa-B subunit beta</i>
<b>IKK<math>\epsilon</math></b>	<i>Inhibitor of Nuclear Factor Kappa-B subunit epsilon</i>
<b>ILVs</b>	Intraluminale Vesikel
<b>IMAC</b>	<i>Immobilized Metal Affinity Chromatography</i>
<b>IPS-1</b>	<i>Inositol-3-phosphate synthase isozyme 1</i>
<b>IPTG</b>	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
<b>IRF3/7</b>	<i>Interferon Regulatory Factor 3/7</i>

**K**

<b>K</b>	Lysin
<b>kb</b>	Kilo-Basen
<b>kDa</b>	Kilo-Dalton
<b>KO</b>	Knockout

**L**

<b>L</b>	Liter
<b>LAMP-1</b>	<i>lysosome associated membran protein-1</i>
<b>LB</b>	<i>Lysogeny broth</i>
<b>Lgd</b>	<i>Lethal (2) giant discs</i>
<b>LIP5</b>	<i>LYST-interacting protein 5</i>
<b>loxP</b>	<i>locus of crossover in P1</i>
<b>LS</b>	Lysosom

**M**

<b>M</b>	Molar (mol/L)
<b>mm</b>	Millimeter
<b>MDA5</b>	<i>melanoma differentiation antigen 5</i>

---

<b>MEFs</b>	<i>mouse embryonic fibroblasts</i>
<b>mg</b>	Milligramm
<b>mHprt</b>	murine Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
<b>MPL</b>	<i>Molecular Proteomics Laboratory</i>
<b>mRNA</b>	<i>messenger RNA</i>
<b>MS</b>	Massenspektrometrie
<b>MVBs</b>	<i>multivesicular bodies</i>
<b><u>N</u></b>	
<b>NaCl</b>	Natriumchlorid
<b>NaF</b>	Natriumfluorid
<b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Natriumdihydrogenphosphat
<b>NICD</b>	<i>Notch intracellular domain</i>
<b>NaOH</b>	Natronlauge
<b>Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub></b>	Natriumorthovanadat
<b>NGS</b>	<i>Normal goat serum</i>
<b>NFκB</b>	<i>Nuclear Factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells</i>
<b>Nrarp</b>	<i>Notch-regulated ankyrin repeat-containing protein</i>
<b><u>P</u></b>	
<b>PBS</b>	<i>Phosphate buffered saline</i>
<b>PCR</b>	<i>polymerase chain reaction</i>
<b>PDE4</b>	<i>Phosphodiesterase 4</i>
<b>PDK1</b>	<i>phosphoinositide-dependent kinase-1</i>
<b>PFA</b>	Paraformaldehyd
<b>PIC</b>	<i>Protease Inhibitor Cocktail</i>
<b>PKA</b>	Proteinkinase A
<b>PLA</b>	<i>Proximity Ligation Assay</i>
<b>PMSF</b>	Phenylmethylsulfonylfluorid
<b>polyA</b>	Polyadenylierungssequenz
<b>PVDF</b>	Polyvinylidenfluorid
<b><u>Q</u></b>	
<b>qRT-PCR</b>	quantitative reverse transcription pcr
<b><u>R</u></b>	
<b>RAB</b>	<i>Ras genes from rat brain</i>
<b>RE</b>	Reifendes Endosom
<b>rev</b>	<i>reverse</i>
<b>RFP</b>	Rot Fluoreszierendes Protein
<b>RIG-I</b>	<i>retinoic acid inducible gene 1</i>

---

---

<b>RLR</b>	<i>RIG-I like receptor</i>
<b>RNA</b>	<i>ribonucleic acid</i>
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b><u>S</u></b>	
<b>siRNA</b>	<i>small interfering RNA</i>
<b>sm</b>	single molecule
<b>Scc1</b>	sister chromatid cohesion protein 1
<b>SDS</b>	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
<b>SEC</b>	<i>Size Exclusion Chromatography</i> (Größenausschlusschromatographie)
<b>sek.</b>	Sekunden
<b>STAM</b>	Signal Transducing Adaptor Molecule
<b><u>I</u></b>	
<b>TAE</b>	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
<b>TAK1</b>	Transforming growth factor beta-activated kinase 1
<b>TAPE</b>	<i>TBK1-associated protein in endolysosomes</i>
<b>Taq</b>	<i>Thermus aquaticus</i>
<b>TBK1</b>	<i>TANK-binding kinase 1</i>
<b>TEM</b>	Transmissionselektronen-Mikroskopie
<b>TEMED</b>	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
<b>TEV</b>	Tobacco Etch Virus
<b>TLR</b>	<i>Toll-like receptor</i>
<b>TM6b</b>	Balancerchromosom
<b>TRAF6</b>	<i>TNF associated Factor 6</i>
<b>TRIF</b>	<i>TIR domain-containing adapter including IFN-<math>\beta</math></i>
<b>TRIS</b>	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
<b>TSG101</b>	Tumor Susceptibility Gene 101
<b><u>U</u></b>	
<b>UV</b>	Ultraviolett
<b><u>V</u></b>	
<b>VPS</b>	<i>Vacuolar Protein Sorting</i>
<b>Vta1</b>	<i>Vesicle trafficking 1</i>
<b><u>W</u></b>	
<b>wg</b>	<i>wingless</i>

## 8. Anhang

### 8.1 Rohdaten Massenspektrometrie

Tabelle 8.1: Übersicht der identifizierten Proteine in der „130 kDa“-Probe

UniProt-Bezeichnung	Proteinname	Score
<b>Q5T0F9</b>	<b>Coiled-coil and C2 domain-containing protein 1B OS=Homo sapiens GN=CC2D1B PE=1 SV=1 - [C2D1B_HUMAN]</b>	<b>2037634,27</b>
P0A6Y8	Chaperone protein DnaK OS=Escherichia coli (strain K12) GN=dnaK PE=1 SV=2 - [DNAK_ECOLI]	62865,12
P09546	Bifunctional protein PutA OS=Escherichia coli (strain K12) GN=putA PE=1 SV=3 - [PUTA_ECOLI]	43596,16
P60422	50S ribosomal protein L2 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rplB PE=1 SV=2 - [RL2_ECOLI]	6515,56
P0A705	Translation initiation factor IF-2 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=infB PE=1 SV=1 - [IF2_ECOLI]	972,82
P0A9K9	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase SlyD OS=Escherichia coli (strain K12) GN=slyD PE=1 SV=1 - [SLYD_ECOLI]	750,72
P04264	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6 - [K2C1_HUMAN]	567,87
Q86W26	NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 10 OS=Homo sapiens GN=NLRP10 PE=1 SV=1 - [NAL10_HUMAN]	466,48
P0A7M2	50S ribosomal protein L28 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rpmB PE=1 SV=2 - [RL28_ECOLI]	409,76
Q2M296	Methylenetetrahydrofolate synthase domain-containing protein OS=Homo sapiens GN=MTHFS PE=1 SV=2 - [MTHSD_HUMAN]	374,73

Tabelle 8.2: Übersicht der identifizierten Proteine in der „70 kDa“-Probe

UniProt-Bezeichnung	Proteinname	Score
<b>P0A6Y8</b>	<b>Chaperone protein DnaK OS=Escherichia coli (strain K12) GN=dnaK PE=1 SV=2 - [DNAK_ECOLI]</b>	<b>2762977,24</b>
<b>P77398</b>	<b>Bifunctional polymyxin resistance protein ArnA OS=Escherichia coli (strain K12) GN=arnA PE=1 SV=1 - [ARNA_ECOLI]</b>	<b>54774,94</b>
P11021	78 kDa glucose-regulated protein OS=Homo sapiens GN=HSPA5 PE=1 SV=2 - [GRP78_HUMAN]	21160,22
P60422	50S ribosomal protein L2 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rplB PE=1 SV=2 - [RL2_ECOLI]	19385,02
Q9H444	Charged multivesicular body protein 4b OS=Homo sapiens GN=CHMP4B PE=1 SV=1 - [CHM4B_HUMAN]	12957,68
P37127	Protein AegA OS=Escherichia coli (strain K12) GN=aegA PE=3 SV=2 - [AEGA_ECOLI]	9209,72
P04264	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6 - [K2C1_HUMAN]	8759,60
P0A9K9	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase SlyD OS=Escherichia coli (strain K12) GN=slyD PE=1 SV=1 - [SLYD_ECOLI]	8082,97
P27302	Transketolase 1 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=tktA PE=1 SV=5 - [TKT1_ECOLI]	5168,04
P0CE47	Elongation factor Tu 1 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=tufA PE=1 SV=1 - [EFTU1_ECOLI]	5025,53
P64588	Transcriptional regulator YqjI OS=Escherichia coli (strain K12) GN=yqjI PE=1 SV=1 - [YQJI_ECOLI]	4628,55
P0AFG8	Pyruvate dehydrogenase E1 component OS=Escherichia coli (strain K12) GN=aceE PE=1 SV=2 - [ODP1_ECOLI]	4481,16
P17169	Glutamine--fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing] OS=Escherichia coli (strain K12) GN=glmS PE=1 SV=4 - [GLMS_ECOLI]	4429,76
P0A6Z3	Chaperone protein HtpG OS=Escherichia coli (strain K12) GN=htpG PE=1 SV=1 - [HTPG_ECOLI]	4322,15
P0A6X3	RNA-binding protein Hfq OS=Escherichia coli (strain K12) GN=hfq PE=1 SV=2 - [HFQ_ECOLI]	3009,44
P0AC41	Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit OS=Escherichia coli (strain K12) GN=sdhA PE=1 SV=1 - [SDHA_ECOLI]	2921,14
P02925	Ribose import binding protein RbsB OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rbsB PE=1 SV=1 - [RBSB_ECOLI]	2832,07

P35908	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Homo sapiens GN=KRT2 PE=1 SV=2 - [K22E_HUMAN]	2677,40
P13645	Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KRT10 PE=1 SV=6 - [K1C10_HUMAN]	2603,88
P35527	Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT9 PE=1 SV=3 - [K1C9_HUMAN]	2518,91
P09373	Formate acetyltransferase 1 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=pf1B PE=1 SV=2 - [PFLB_ECOLI]	2115,11
Q5T0F9	Coiled-coil and C2 domain-containing protein 1B OS=Homo sapiens GN=CC2D1B PE=1 SV=1 - [C2D1B_HUMAN]	2044,41
P04036	4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate reductase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=dapB PE=1 SV=1 - [DAPB_ECOLI]	1961,09
P00490	Maltodextrin phosphorylase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=malP PE=1 SV=7 - [PHSM_ECOLI]	1833,01
P0A9P6	ATP-dependent RNA helicase DeaD OS=Escherichia coli (strain K12) GN=deaD PE=1 SV=2 - [DEAD_ECOLI]	1795,26
P0A853	Tryptophanase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=tnaA PE=1 SV=1 - [TNAA_ECOLI]	1763,25
P37773	UDP-N-acetylmuramate--L-alanyl-gamma-D-glutamyl-meso-2,6-diaminoheptandioate ligase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=mpl PE=1 SV=3 - [MPL_ECOLI]	1755,28
P63284	Chaperone protein ClpB OS=Escherichia coli (strain K12) GN=clpB PE=1 SV=1 - [CLPB_ECOLI]	1740,45
P33602	NADH-quinone oxidoreductase subunit G OS=Escherichia coli (strain K12) GN=nuoG PE=1 SV=4 - [NUOG_ECOLI]	1447,81
P0AG67	30S ribosomal protein S1 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rpsA PE=1 SV=1 - [RS1_ECOLI]	1443,78
P0A8N5	Lysine--tRNA ligase, heat inducible OS=Escherichia coli (strain K12) GN=lysU PE=1 SV=2 - [SYK2_ECOLI]	1412,42
P0A8M3	Threonine--tRNA ligase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=thrS PE=1 SV=1 - [SYT_ECOLI]	1278,08
P13029	Catalase-peroxidase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=katG PE=1 SV=2 - [KATG_ECOLI]	995,82
P06959	Dihydrolypoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex OS=Escherichia coli (strain K12) GN=aceF PE=1 SV=3 - [ODP2_ECOLI]	927,97
P15038	DNA helicase IV OS=Escherichia coli (strain K12) GN=helD PE=1 SV=2 - [HELD_ECOLI]	866,34
Q96DT5	Dynein heavy chain 11, axonemal OS=Homo sapiens GN=DNAH11 PE=1 SV=4 - [DYH11_HUMAN]	827,65
P23367	DNA mismatch repair protein MutL OS=Escherichia coli (strain K12) GN=mutL PE=1 SV=2 - [MUTL_ECOLI]	805,14
P0ADY1	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase D OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ppiD PE=1 SV=1 - [PPID_ECOLI]	731,92
P00961	Glycine--tRNA ligase beta subunit OS=Escherichia coli (strain K12) GN=glyS PE=1 SV=4 - [SYGB_ECOLI]	729,76
P21179	Catalase HPII OS=Escherichia coli (strain K12) GN=katE PE=1 SV=1 - [CATE_ECOLI]	669,52
P76104	Uncharacterized protease YdcP OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ydcP PE=1 SV=2 - [YDCP_ECOLI]	622,88
P28903	Anaerobic ribonucleoside-triphosphate reductase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=nrdD PE=1 SV=2 - [NRDD_ECOLI]	579,48
P16659	Proline--tRNA ligase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=proS PE=1 SV=4 - [SYP_ECOLI]	512,22
P21889	Aspartate--tRNA ligase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=aspS PE=1 SV=1 - [SYD_ECOLI]	465,20
P0A6P9	Enolase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=eno PE=1 SV=2 - [ENO_ECOLI]	441,96
P0ABH9	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpA OS=Escherichia coli (strain K12) GN=clpA PE=1 SV=1 - [CLPA_ECOLI]	398,32
P00562	Bifunctional aspartokinase/homoserine dehydrogenase 2 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=metL PE=1 SV=3 - [AK2H_ECOLI]	386,81
P0AFG3	2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component OS=Escherichia coli (strain K12) GN=sucA PE=1 SV=1 - [ODO1_ECOLI]	356,80

Tabelle 8.3: Übersicht der identifizierten Proteine in der „37 kDa“-Probe

UniProt-Bezeichnung	Proteinname	Score
<b>Q9H444</b>	<b>Charged multivesicular body protein 4b OS=Homo sapiens GN=CHMP4B PE=1 SV=1 - [CHM4B_HUMAN]</b>	<b>701749,79</b>
P0A6Y8	Chaperone protein DnaK OS=Escherichia coli (strain K12) GN=dnaK PE=1 SV=2 - [DNAK_ECOLI]	172153,46
P60422	50S ribosomal protein L2 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rplB PE=1 SV=2 - [RL2_ECOLI]	78308,53
P0A9K9	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase SlyD OS=Escherichia coli (strain K12) GN=slyD PE=1 SV=1 - [SLYD_ECOLI]	14727,02
P37773	UDP-N-acetylmuramate--L-alanyl-gamma-D-glutamyl-meso-2,6-diaminoheptandioate ligase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=mpl PE=1 SV=3 - [MPL_ECOLI]	9129,45
P64588	Transcriptional regulator YqjI OS=Escherichia coli (strain K12) GN=yqjI PE=1 SV=1 - [YQJI_ECOLI]	6563,33
P0A836	Succinate--CoA ligase [ADP-forming] subunit beta OS=Escherichia coli (strain K12) GN=sucC PE=1 SV=1 - [SUCC_ECOLI]	5694,84
P0A6X3	RNA-binding protein Hfq OS=Escherichia coli (strain K12) GN=hfq PE=1 SV=2 - [HFQ_ECOLI]	5186,98
P04264	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6 - [K2C1_HUMAN]	3824,57
P02925	Ribose import binding protein RbsB OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rbsB PE=1 SV=1 - [RBSB_ECOLI]	3654,13
P0A9S3	Galactitol 1-phosphate 5-dehydrogenase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=gatD PE=1 SV=1 - [GATD_ECOLI]	2624,95
P42596	Ribosomal RNA large subunit methyltransferase G OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rlmG PE=1 SV=2 - [RLMG_ECOLI]	2616,29
P0ABJ9	Cytochrome bd-I ubiquinol oxidase subunit 1 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=cydA PE=1 SV=1 - [CYDA_ECOLI]	2334,05
P02931	Outer membrane protein F OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ompF PE=1 SV=1 - [OMPF_ECOLI]	2289,15
P0A853	Tryptophanase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=tnaA PE=1 SV=1 - [TNAA_ECOLI]	2189,06
P0AGJ5	Uncharacterized tRNA/rRNA methyltransferase YfiF OS=Escherichia coli (strain K12) GN=yfiF PE=1 SV=1 - [YFIF_ECOLI]	2155,19
P11021	78 kDa glucose-regulated protein OS=Homo sapiens GN=HSPA5 PE=1 SV=2 - [GRP78_HUMAN]	1983,71
P0AA25	Thioredoxin 1 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=trxA PE=1 SV=2 - [THIO_ECOLI]	1963,73
P05459	Erythronate-4-phosphate dehydrogenase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=pxdB PE=2 SV=2 - [PDXB_ECOLI]	1857,82
P0A9X4	Rod shape-determining protein MreB OS=Escherichia coli (strain K12) GN=mreB PE=1 SV=1 - [MREB_ECOLI]	1730,39
P0AEX9	Maltose-binding periplasmic protein OS=Escherichia coli (strain K12) GN=malE PE=1 SV=1 - [MALE_ECOLI]	1503,81
P0A7Z4	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rpoA PE=1 SV=1 - [RPOA_ECOLI]	1252,45
P0ACB2	Delta-aminolevulinic acid dehydratase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=hemB PE=1 SV=2 - [HEM2_ECOLI]	1240,71
P0A799	Phosphoglycerate kinase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=pgk PE=1 SV=2 - [PGK_ECOLI]	1132,25
P0AB71	Fructose-bisphosphate aldolase class 2 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=fbaA PE=1 SV=2 - [ALF_ECOLI]	1107,18
P39377	Isoaspartyl dipeptidase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=iadA PE=1 SV=1 - [IADA_ECOLI]	1102,26
P07913	L-threonine 3-dehydrogenase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=tdh PE=1 SV=1 - [TDH_ECOLI]	1089,89
P0AG44	50S ribosomal protein L17 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rplQ PE=1 SV=1 - [RL17_ECOLI]	1009,94
P35527	Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT9 PE=1 SV=3 - [K1C9_HUMAN]	989,34
P0A7S3	30S ribosomal protein S12 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rpsL PE=1 SV=2 - [RS12_ECOLI]	971,56
P0CE47	Elongation factor Tu 1 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=tufA PE=1 SV=1 - [EFTU1_ECOLI]	951,82

P13645	Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KRT10 PE=1 SV=6 - [K1C10_HUMAN]	739,80
P09546	Bifunctional protein PutA OS=Escherichia coli (strain K12) GN=putA PE=1 SV=3 - [PUTA_ECOLI]	732,62
P0AB77	2-amino-3-ketobutyrate coenzyme A ligase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=kbl PE=1 SV=1 - [KBL_ECOLI]	470,53
P0A7M2	50S ribosomal protein L28 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rpmB PE=1 SV=2 - [RL28_ECOLI]	459,85
P03023	Lactose operon repressor OS=Escherichia coli (strain K12) GN=lacI PE=1 SV=3 - [LACI_ECOLI]	450,78
P0A7R1	50S ribosomal protein L9 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rplI PE=1 SV=1 - [RL9_ECOLI]	423,94
P0A9A6	Cell division protein FtsZ OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ftsZ PE=1 SV=1 - [FTSZ_ECOLI]	398,07
P0AFG8	Pyruvate dehydrogenase E1 component OS=Escherichia coli (strain K12) GN=aceE PE=1 SV=2 - [ODP1_ECOLI]	382,81
P04036	4-hydroxy-tetrahydronicotinamide reductase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=dapB PE=1 SV=1 - [DAPB_ECOLI]	347,98
P00509	Aspartate aminotransferase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=aspC PE=1 SV=1 - [AAT_ECOLI]	346,77
P39347	Putative protein IntB OS=Escherichia coli (strain K12) GN=intB PE=5 SV=1 - [INTB_ECOLI]	321,13
P0AGE9	Succinate--CoA ligase [ADP-forming] subunit alpha OS=Escherichia coli (strain K12) GN=sucD PE=1 SV=2 - [SUCD_ECOLI]	277,63

Tabelle 8.4: Übersicht der identifizierten Proteine in der „30 kDa“-Probe

UniProt-Bezeichnung	Proteinname	Score
<b>P60422</b>	<b>50S ribosomal protein L2 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rplB PE=1 SV=2 - [RL2_ECOLI]</b>	<b>1589551,22</b>
P0A6Y8	Chaperone protein DnaK OS=Escherichia coli (strain K12) GN=dnaK PE=1 SV=2 - [DNAK_ECOLI]	127526,11
P0A9K9	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase SlyD OS=Escherichia coli (strain K12) GN=slyD PE=1 SV=1 - [SLYD_ECOLI]	66362,74
P0AA43	Ribosomal small subunit pseudouridine synthase A OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rsuA PE=1 SV=1 - [RSUA_ECOLI]	59529,86
P0ACR4	Uncharacterized HTH-type transcriptional regulator YeiE OS=Escherichia coli (strain K12) GN=yeiE PE=4 SV=1 - [YEIE_ECOLI]	26510,90
Q9H444	Charged multivesicular body protein 4b OS=Homo sapiens GN=CHMP4B PE=1 SV=1 - [CHM4B_HUMAN]	16973,10
P69797	PTS system mannose-specific EIIAB component OS=Escherichia coli (strain K12) GN=manX PE=1 SV=2 - [PTNAB_ECOLI]	10542,97
P37773	UDP-N-acetylmuramate--L-alanyl-gamma-D-glutamyl-meso-2,6-diaminoheptandioate ligase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=mpl PE=1 SV=3 - [MPL_ECOLI]	10505,91
P46068	HTH-type transcriptional regulator DsdC OS=Escherichia coli (strain K12) GN=dsdC PE=2 SV=2 - [DSDC_ECOLI]	9357,68
Q99996	A-kinase anchor protein 9 OS=Homo sapiens GN=AKAP9 PE=1 SV=3 - [AKAP9_HUMAN]	7609,78
P0A8P8	Tyrosine recombinase XerD OS=Escherichia coli (strain K12) GN=xerD PE=1 SV=1 - [XERD_ECOLI]	7329,98
P0AGE9	Succinate--CoA ligase [ADP-forming] subunit alpha OS=Escherichia coli (strain K12) GN=sucD PE=1 SV=2 - [SUCD_ECOLI]	4562,67
P77567	N-hydroxyarylamine O-acetyltransferase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=nhoA PE=1 SV=1 - [NHOA_ECOLI]	4491,24
P02925	Ribose import binding protein RbsB OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rbsB PE=1 SV=1 - [RBSB_ECOLI]	4433,74
P0A6X3	RNA-binding protein Hfq OS=Escherichia coli (strain K12) GN=hfq PE=1 SV=2 - [HFQ_ECOLI]	4253,20
P03030	Transcriptional activator protein LysR OS=Escherichia coli (strain K12) GN=lysR PE=4 SV=1 - [LYSR_ECOLI]	3928,54
P61889	Malate dehydrogenase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=mdh PE=1 SV=1 - [MDH_ECOLI]	3572,01
P11021	78 kDa glucose-regulated protein OS=Homo sapiens GN=HSPA5 PE=1 SV=2 - [GRP78_HUMAN]	3403,31



P04264	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6 - [K2C1_HUMAN]	3358,96
P0A894	RNase adapter protein RapZ OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rapZ PE=1 SV=1 - [RAPZ_ECOLI]	3053,63
P0A910	Outer membrane protein A OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ompA PE=1 SV=1 - [OMPA_ECOLI]	2555,31
P0AEK4	Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase [NADH] FabI OS=Escherichia coli (strain K12) GN=fabI PE=1 SV=2 - [FABI_ECOLI]	2403,01
P0A9B2	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A OS=Escherichia coli (strain K12) GN=gapA PE=1 SV=2 - [G3P1_ECOLI]	2299,73
P0A8R9	HTH-type transcriptional regulator HdfR OS=Escherichia coli (strain K12) GN=hdfR PE=3 SV=1 - [HDFR_ECOLI]	2155,45
P0A9D8	2,3,4,5-tetrahydropyridine-2,6-dicarboxylate N-succinyltransferase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=dapD PE=1 SV=1 - [DAPD_ECOLI]	1741,22
P0A715	2-dehydro-3-deoxyphosphooctonate aldolase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=kdsA PE=1 SV=1 - [KDSA_ECOLI]	1614,63
P13645	Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KRT10 PE=1 SV=6 - [K1C10_HUMAN]	1502,52
P0A853	Tryptophanase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=tnaA PE=1 SV=1 - [TNAA_ECOLI]	1490,99
P16528	Transcriptional repressor IclR OS=Escherichia coli (strain K12) GN=iclR PE=1 SV=1 - [ICLR_ECOLI]	1349,77
P0A6P1	Elongation factor Ts OS=Escherichia coli (strain K12) GN=tsf PE=1 SV=2 - [EFTS_ECOLI]	1299,92
P0CE47	Elongation factor Tu 1 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=tufA PE=1 SV=1 - [EFTU1_ECOLI]	1257,55
P0A8I5	tRNA (guanine-N(7)-)-methyltransferase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=trmB PE=1 SV=1 - [TRMB_ECOLI]	1252,07
P32677	Uncharacterized HTH-type transcriptional regulator YijO OS=Escherichia coli (strain K12) GN=yijO PE=4 SV=1 - [YIJO_ECOLI]	1237,29
P0A6L2	4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate synthase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=dapA PE=1 SV=1 - [DAPA_ECOLI]	1061,00
P0ACR2	Uncharacterized HTH-type transcriptional regulator YdhB OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ydhB PE=4 SV=1 - [YDHB_ECOLI]	1046,57
P0ABD5	Acetyl-coenzyme A carboxylase carboxyl transferase subunit alpha OS=Escherichia coli (strain K12) GN=accA PE=1 SV=2 - [ACCA_ECOLI]	947,86
P02538	Keratin, type II cytoskeletal 6A OS=Homo sapiens GN=KRT6A PE=1 SV=3 - [K2C6A_HUMAN]	923,49
P0A7B3	NAD kinase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=nadK PE=1 SV=1 - [NADK_ECOLI]	870,32
P36999	23S rRNA (guanine(745)-N(1))-methyltransferase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rlmA PE=1 SV=1 - [RLMA_ECOLI]	869,32
P0A7V8	30S ribosomal protein S4 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rpsD PE=1 SV=2 - [RS4_ECOLI]	831,72
P0A8P6	Tyrosine recombinase XerC OS=Escherichia coli (strain K12) GN=xerC PE=1 SV=1 - [XERC_ECOLI]	823,61
P45523	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FkpA OS=Escherichia coli (strain K12) GN=fkpA PE=1 SV=1 - [FKBA_ECOLI]	700,97
P0A717	Ribose-phosphate pyrophosphokinase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=prs PE=1 SV=2 - [KPRS_ECOLI]	659,68
P08660	Lysine-sensitive aspartokinase 3 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=lysC PE=1 SV=2 - [AK3_ECOLI]	639,57
P35527	Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT9 PE=1 SV=3 - [K1C9_HUMAN]	613,60
P0C0U4	Ribosomal protein S6--L-glutamate ligase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rimK PE=1 SV=1 - [RIMK_ECOLI]	593,33
P60709	Actin, cytoplasmic 1 OS=Homo sapiens GN=ACTB PE=1 SV=1 - [ACTB_HUMAN]	516,97
P0A7V0	30S ribosomal protein S2 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rpsB PE=1 SV=2 - [RS2_ECOLI]	506,27
P0A9A9	Ferric uptake regulation protein OS=Escherichia coli (strain K12) GN=fur PE=1 SV=1 - [FUR_ECOLI]	485,93
P08203	L-ribulose-5-phosphate 4-epimerase AraD OS=Escherichia coli (strain K12) GN=araD PE=1 SV=2 - [ARAD_ECOLI]	458,83
P0A9Q5	Acetyl-coenzyme A carboxylase carboxyl transferase subunit beta OS=Escherichia coli (strain K12) GN=accD PE=1 SV=1 - [ACCD_ECOLI]	436,99

Tabelle 8.5: Übersicht der identifizierten Proteine in der „25 kDa“-Probe

UniProt-Bezeichnung	Proteinname	Score
<b>P0A9K9</b>	<b>FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase SlyD OS=Escherichia coli (strain K12) GN=slyD PE=1 SV=1 - [SLYD_ECOLI]</b>	<b>871631,45</b>
P60422	50S ribosomal protein L2 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rplB PE=1 SV=2 - [RL2_ECOLI]	171325,65
P0A8I5	tRNA (guanine-N(7)-)-methyltransferase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=trmB PE=1 SV=1 - [TRMB_ECOLI]	125152,08
P0A6Y8	Chaperone protein DnaK OS=Escherichia coli (strain K12) GN=dnaK PE=1 SV=2 - [DNAK_ECOLI]	79266,05
P36999	23S rRNA (guanine(745)-N(1))-methyltransferase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rlmA PE=1 SV=1 - [RLMA_ECOLI]	47997,86
P32677	Uncharacterized HTH-type transcriptional regulator YijO OS=Escherichia coli (strain K12) GN=yijO PE=4 SV=1 - [YIJO_ECOLI]	29060,11
P0A894	RNase adapter protein RapZ OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rapZ PE=1 SV=1 - [RAPZ_ECOLI]	27791,86
Q9H444	Charged multivesicular body protein 4b OS=Homo sapiens GN=CHMP4B PE=1 SV=1 - [CHM4B_HUMAN]	24523,99
P02925	Ribose import binding protein RbsB OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rbsB PE=1 SV=1 - [RBSB_ECOLI]	24115,64
P0A7V0	30S ribosomal protein S2 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rpsB PE=1 SV=2 - [RS2_ECOLI]	17192,48
P0AA43	Ribosomal small subunit pseudouridine synthase A OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rsuA PE=1 SV=1 - [RSUA_ECOLI]	13778,45
P32664	NADH pyrophosphatase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=nudC PE=1 SV=2 - [NUDC_ECOLI]	13718,38
P77567	N-hydroxyarylamine O-acetyltransferase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=nhoA PE=1 SV=1 - [NHOA_ECOLI]	9398,46
P0A6X3	RNA-binding protein Hfq OS=Escherichia coli (strain K12) GN=hfq PE=1 SV=2 - [HFQ_ECOLI]	8642,89
P04264	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6 - [K2C1_HUMAN]	7189,98
P28635	D-methionine-binding lipoprotein MetQ OS=Escherichia coli (strain K12) GN=metQ PE=1 SV=2 - [METQ_ECOLI]	7005,56
P76422	Hydroxymethylpyrimidine/phosphomethylpyrimidine kinase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=thiD PE=1 SV=1 - [THID_ECOLI]	6515,59
P0A8P6	Tyrosine recombinase XerC OS=Escherichia coli (strain K12) GN=xerC PE=1 SV=1 - [XERC_ECOLI]	6442,83
P37773	UDP-N-acetylmuramate--L-alanyl-gamma-D-glutamyl-meso-2,6-diaminoheptandioate ligase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=mpl PE=1 SV=3 - [MPL_ECOLI]	6377,53
P13645	Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KRT10 PE=1 SV=6 - [K1C10_HUMAN]	4923,64
P0A7V3	30S ribosomal protein S3 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rpsC PE=1 SV=2 - [RS3_ECOLI]	4814,19
P16528	Transcriptional repressor IclR OS=Escherichia coli (strain K12) GN=iclR PE=1 SV=1 - [ICLR_ECOLI]	4689,15
P0ACK8	L-fucose operon activator OS=Escherichia coli (strain K12) GN=fucR PE=4 SV=1 - [FUCR_ECOLI]	4117,83
P62707	2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=gpmA PE=1 SV=2 - [GPMA_ECOLI]	3975,49
P0A853	Tryptophanase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=tnaA PE=1 SV=1 - [TNAA_ECOLI]	3749,23
P0A7L0	50S ribosomal protein L1 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rplA PE=1 SV=2 - [RL1_ECOLI]	3608,16
P35527	Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT9 PE=1 SV=3 - [K1C9_HUMAN]	3288,91
P0A9X1	Zinc import ATP-binding protein ZnuC OS=Escherichia coli (strain K12) GN=znuC PE=1 SV=1 - [ZNUC_ECOLI]	3147,20
P0A7V8	30S ribosomal protein S4 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rpsD PE=1 SV=2 - [RS4_ECOLI]	3074,41
P67087	Ribosomal RNA small subunit methyltransferase I OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rsmI PE=1 SV=1 - [RSMI_ECOLI]	3053,58
P0CE47	Elongation factor Tu 1 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=tufA PE=1 SV=1 - [EFTU1_ECOLI]	2904,58

P0AFG8	Pyruvate dehydrogenase E1 component OS=Escherichia coli (strain K12) GN=aceE PE=1 SV=2 - [ODP1_ECOLI]	2828,22
P0A910	Outer membrane protein A OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ompA PE=1 SV=1 - [OMPA_ECOLI]	2679,74
Q46857	2,5-diketo-D-gluconic acid reductase A OS=Escherichia coli (strain K12) GN=dkgA PE=1 SV=3 - [DKGA_ECOLI]	2599,76
P77398	Bifunctional polymyxin resistance protein ArnA OS=Escherichia coli (strain K12) GN=arnA PE=1 SV=1 - [ARNA_ECOLI]	2586,46
P0A9Q1	Aerobic respiration control protein ArcA OS=Escherichia coli (strain K12) GN=arcA PE=1 SV=1 - [ARCA_ECOLI]	2170,64
P0AEZ3	Septum site-determining protein MinD OS=Escherichia coli (strain K12) GN=minD PE=1 SV=2 - [MIND_ECOLI]	1998,42
P35908	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Homo sapiens GN=KRT2 PE=1 SV=2 - [K22E_HUMAN]	1936,58
P0ACM9	Uncharacterized HTH-type transcriptional regulator YihL OS=Escherichia coli (strain K12) GN=yihL PE=4 SV=1 - [YIHL_ECOLI]	1855,91
P0A794	Pyridoxine 5'-phosphate synthase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=pdxJ PE=1 SV=2 - [PDXJ_ECOLI]	1845,99
P0A9E0	Arabinose operon regulatory protein OS=Escherichia coli (strain K12) GN=araC PE=1 SV=1 - [ARAC_ECOLI]	1834,88
P04036	4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate reductase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=dapB PE=1 SV=1 - [DAPB_ECOLI]	1702,79
P38684	TorCAD operon transcriptional regulatory protein TorR OS=Escherichia coli (strain K12) GN=torR PE=1 SV=2 - [TORR_ECOLI]	1631,20
P0A9L8	Pyroline-5-carboxylate reductase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=proC PE=1 SV=1 - [P5CR_ECOLI]	1612,05
P0ABA6	ATP synthase gamma chain OS=Escherichia coli (strain K12) GN=atpG PE=1 SV=1 - [ATPG_ECOLI]	1560,49
P08660	Lysine-sensitive aspartokinase 3 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=lysC PE=1 SV=2 - [AK3_ECOLI]	1361,20
P15006	Protein McrC OS=Escherichia coli (strain K12) GN=mcrC PE=1 SV=3 - [MCRC_ECOLI]	1213,17
P0A6T5	GTP cyclohydrolase 1 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=foIE PE=1 SV=2 - [GCH1_ECOLI]	1169,88
P0A8R9	HTH-type transcriptional regulator HdfR OS=Escherichia coli (strain K12) GN=hdfr PE=3 SV=1 - [HDFR_ECOLI]	1151,94
P0ABQ2	2-hydroxy-3-oxopropionate reductase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=garR PE=1 SV=1 - [GARR_ECOLI]	1140,03
P0ACJ8	cAMP-activated global transcriptional regulator CRP OS=Escherichia coli (strain K12) GN=crp PE=1 SV=1 - [CRP_ECOLI]	1118,99
P39383	Uncharacterized protein YjiL OS=Escherichia coli (strain K12) GN=yjiL PE=4 SV=2 - [YJIL_ECOLI]	1108,77
P31057	3-methyl-2-oxobutanoate hydroxymethyltransferase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=panB PE=1 SV=1 - [PANB_ECOLI]	1033,76
P64588	Transcriptional regulator YqjI OS=Escherichia coli (strain K12) GN=yqjI PE=1 SV=1 - [YQJI_ECOLI]	1016,65
P69441	Adenylate kinase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=adk PE=1 SV=1 - [KAD_ECOLI]	989,19
P32144	Uncharacterized HTH-type transcriptional regulator YihW OS=Escherichia coli (strain K12) GN=yihW PE=4 SV=2 - [YIHW_ECOLI]	988,90
P0AEU0	Histidine-binding periplasmic protein OS=Escherichia coli (strain K12) GN=hisJ PE=1 SV=1 - [HISJ_ECOLI]	894,26
P0ABK2	Cytochrome bd-I ubiquinol oxidase subunit 2 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=cydB PE=1 SV=1 - [CYDB_ECOLI]	853,40
P02413	50S ribosomal protein L15 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rplO PE=1 SV=1 - [RL15_ECOLI]	768,32
P0ABU5	Glyoxalase ElbB OS=Escherichia coli (strain K12) GN=elbB PE=1 SV=1 - [ELBB_ECOLI]	759,60
P0A722	Acyl-[acyl-carrier-protein]-UDP-N-acetylglucosamine O-acyltransferase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=lpxA PE=1 SV=1 - [LPXA_ECOLI]	746,30
P0ADK6	Protein YibA OS=Escherichia coli (strain K12) GN=yibA PE=1 SV=1 - [YIBA_ECOLI]	744,38
P45577	RNA chaperone ProQ OS=Escherichia coli (strain K12) GN=proQ PE=1 SV=2 - [PROQ_ECOLI]	688,24
P0A9N4	Pyruvate formate-lyase 1-activating enzyme OS=Escherichia coli (strain K12) GN=pfIA PE=1 SV=2 - [PFLA_ECOLI]	686,96
P12758	Uridine phosphorylase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=udp PE=1 SV=3 - [UDP_ECOLI]	667,48

P76008	Murein tetrapeptide carboxypeptidase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ldcA PE=1 SV=1 - [LDCA_ECOLI]	650,41
P0AA16	Transcriptional regulatory protein OmpR OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ompR PE=1 SV=1 - [OMPR_ECOLI]	584,50
P0A9A9	Ferric uptake regulation protein OS=Escherichia coli (strain K12) GN=fur PE=1 SV=1 - [FUR_ECOLI]	574,80
P0A9B2	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A OS=Escherichia coli (strain K12) GN=gapA PE=1 SV=2 - [G3P1_ECOLI]	464,30
P0C8J8	D-tagatose-1,6-bisphosphate aldolase subunit GatZ OS=Escherichia coli (strain K12) GN=gatZ PE=1 SV=1 - [GATZ_ECOLI]	462,12
P0A8I3	UPF0246 protein YaaA OS=Escherichia coli (strain K12) GN=yaaA PE=1 SV=1 - [YAAA_ECOLI]	432,27
P0ABH7	Citrate synthase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=glcA PE=1 SV=1 - [CISY_ECOLI]	361,40
P76472	Probable 4-deoxy-4-formamido-L-arabinose-phosphoundecaprenol deformylase ArnD OS=Escherichia coli (strain K12) GN=arnD PE=1 SV=1 - [ARND_ECOLI]	361,17
P0A8Y5	Sugar phosphatase YidA OS=Escherichia coli (strain K12) GN=yidA PE=1 SV=1 - [YIDA_ECOLI]	340,55
P0A9G6	Isocitrate lyase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=aceA PE=1 SV=1 - [ACEA_ECOLI]	330,17
P0A759	Glucosamine-6-phosphate deaminase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=nagB PE=1 SV=1 - [NAGB_ECOLI]	310,41
P77333	HTH-type transcriptional regulator PgrR OS=Escherichia coli (strain K12) GN=pgrR PE=1 SV=1 - [PGRR_ECOLI]	298,98
P77433	Uncharacterized protein YkgG OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ykgG PE=3 SV=2 - [YKGG_ECOLI]	275,11

**Tabelle 8.6: Übersicht der identifizierten Proteine in der „37 kDa“-Bande (Analyse der offenen Konformation)**

UniProt-Bezeichnung	Proteinname	Score
<b>XXXXX1</b>	<b>HIS_CHMP4 OS=XY GN=HIS_CHMP4 PE=1 SV=2</b>	<b>63906,18</b>
A0A140NGA6	L-ribulose-5-phosphate 4-epimerase OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=araD PE=3 SV=1	2892,78
A0A140NEX7	Periplasmic binding protein/LacI transcriptional regulator OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=ECBD_3806 PE=4 SV=1	2873,49
A0A140NAP3	L-arabinose-binding periplasmic protein OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=ECBD_1740 PE=3 SV=1	2615,94
A0A140N8Q7	Periplasmic binding protein/LacI transcriptional regulator OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=ECBD_0923 PE=4 SV=1	1659,46
A0A140N9M6	Extracellular solute-binding protein family 3 OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=ECBD_2996 PE=4 SV=1	1423,79
A0A140N5D3	Glutathione S-transferase domain protein OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=ECBD_0749 PE=4 SV=1	1057,81
A0A140N856	Cationic amino acid ABC transporter, periplasmic binding protein OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=ECBD_1350 PE=3 SV=1	1023,8
A0A140N6Q3	Substrate-binding region of ABC-type glycine betaine transport system OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=ECBD_1040 PE=4 SV=1	961,2
A0A140N5I0	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=ECBD_0402 PE=3 SV=1	957,1
A0A140NDW9	2,3,4,5-tetrahydropyridine-2,6-dicarboxylate N-succinyltransferase OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=dapD PE=3 SV=1	891,09
A0A140N9G2	Succinate--CoA ligase [ADP-forming] subunit alpha OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=sucD PE=3 SV=1	770,05
A0A140N534	Phosphoglycolate phosphatase OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=gph PE=3 SV=1	745,86
A0A140NFD7	Elongation factor Ts OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=tsf PE=3 SV=1	737,08
A0A140N9C2	Sulfate ABC transporter, periplasmic sulfate-binding protein OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=ECBD_1256 PE=4 SV=1	693,1

A0A140N783	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=ECBD_1865 PE=3 SV=1	633,8
A0A140NHP0	Branched-chain-amino-acid aminotransferase OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=ilvE PE=3 SV=1	531,71
A0A140NC97	Alkyl hydroperoxide reductase C OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=ECBD_3047 PE=1 SV=1	518,55

**Tabelle 8.7: Übersicht der identifizierten Proteine in der „27 kDa“-Probe (Analyse der geschlossenen Konformation)**

UniProt-Bezeichnung	Proteinname	Score
<b>XXXXX1</b>	<b>HIS_CHMP4 OS=XY GN=HIS_CHMP4 PE=1 SV=2</b>	<b>45711,17</b>
A0A140N821	Fructose-bisphosphate aldolase, class II OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=ECBD_0813 PE=3 SV=1	4138,92
A0A140NCI6	Elongation factor Tu OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=tuf PE=3 SV=1	1623,46
A0A140N6W0	Elongation factor Tu OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=tuf PE=1 SV=1	1623,46
A0A140N783	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=ECBD_1865 PE=3 SV=1	980,72
A0A140N1Y4	L-threonine 3-dehydrogenase OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=tdh PE=3 SV=1	726,42
A0A140ND59	Aspartate--ammonia ligase OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=asnA PE=3 SV=1	446,59
A0A140N9W3	Malate/L-lactate dehydrogenase OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=ECBD_2822 PE=3 SV=1	374,55
A0A140NAP3	L-arabinose-binding periplasmic protein OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=ECBD_1740 PE=3 SV=1	293,84

**Tabelle 8.8: Übersicht der identifizierten Proteine in der „>70 kDa Probe“ (Analyse der polymeren Konformation)**

UniProt-Bezeichnung	Proteinname	Score
<b>XXXXX1</b>	<b>HIS_CHMP4 OS=XY GN=HIS_CHMP4 PE=1 SV=2</b>	<b>34751,87</b>
A0A140NGF8	Tryptophanase OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=tnaA PE=3 SV=1	10840,67
A0A140N810	Transketolase OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=ECBD_0803 PE=3 SV=1	7243,34
A0A140NDL0	Pyruvate dehydrogenase E1 component OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=ECBD_3505 PE=4 SV=1	7097,61
A0A140ND02	Extracellular solute-binding protein family 5 OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=ECBD_2379 PE=4 SV=1	6743,95
A0A140N6E5	D-tagatose-1,6-bisphosphate aldolase subunit GatZ OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=gatZ PE=3 SV=1	6319,99
A0A140NC97	Alkyl hydroperoxide reductase C OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=ECBD_3047 PE=1 SV=1	5499,82
A0A140NFP9	Aconitate hydratase B OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=ECBD_3501 PE=3 SV=1	5414,02
A0A140NDR1	L-arabinose isomerase OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=araA PE=3 SV=1	5234,56
A0A140NF66	Catalase-peroxidase OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=katG PE=3 SV=1	4883,27
A0A140NCI6	Elongation factor Tu OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=tuf PE=3 SV=1	4862,63
A0A140N6W0	Elongation factor Tu OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=tuf PE=1 SV=1	4820,9
A0A140NE14	Lysine--tRNA ligase OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=lysS PE=3 SV=1	4751,43
A0A140NBS3	Dihydrolipoyl dehydrogenase OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=ECBD_3503 PE=3 SV=1	4409,39
A0A140SS80	DNA-directed RNA polymerase subunit beta OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=rpoB PE=3 SV=1	3843,63

A0A140ND61	Chaperone protein HtpG OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=htpG PE=3 SV=1	3821,26
A0A140NE66	2-oxoglutarate dehydrogenase, E1 subunit OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=ECBD_2935 PE=4 SV=1	3699,09
A0A140NBA5	30S ribosomal protein S1 OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=ECBD_2684 PE=3 SV=1	3357,82
A0A140NHS0	ATP synthase subunit beta OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=atpD PE=3 SV=1	3217,42
A0A140N821	Fructose-bisphosphate aldolase, class II OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=ECBD_0813 PE=3 SV=1	3210,79
A0A140NBE7	Formate acetyltransferase OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=ECBD_2692 PE=4 SV=1	3133,9
A0A140N7C7	Elongation factor G OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=fusA PE=3 SV=1	3131,45
A0A140NFV3	Chaperone protein DnaK OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=dnaK PE=2 SV=1	2964,95
A0A140NAN3	Isocitrate dehydrogenase [NADP] OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=ECBD_2463 PE=4 SV=1	2940,09
A0A140N510	Phosphoenolpyruvate carboxykinase (ATP) OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=pckA PE=3 SV=1	2939,06
A0A140NH65	60 kDa chaperonin OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=groL PE=3 SV=1	2854,99
A0A140NBF7	Catalase OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=ECBD_1913 PE=3 SV=1	2709,96
A0A140NEX7	Periplasmic binding protein/LacI transcriptional regulator OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=ECBD_3806 PE=4 SV=1	2416,44
A0A140NEY8	2',3'-cyclic-nucleotide 2'-phosphodiesterase OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=ECBD_3816 PE=3 SV=1	2405
A0A140ND72	ATP synthase subunit alpha OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=atpA PE=3 SV=1	2344,29
A0A140N4M0	50S ribosomal protein L17 OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=rplQ PE=3 SV=1	2142,41
A0A140NCE4	Aldehyde-alcohol dehydrogenase OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=ECBD_2383 PE=3 SV=1	2107,67
A0A140NC10	Citrate synthase OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=ECBD_2941 PE=3 SV=1	2025,54
A0A140ND10	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=ECBD_3133 PE=3 SV=1	1946,65
A0A140N8S8	Lysine--tRNA ligase OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=lysS PE=3 SV=1	1902,94
A0A140N7E6	Threonine--tRNA ligase OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=thrS PE=3 SV=1	1882,67
A0A140N9P3	NADH-quinone oxidoreductase OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=ECBD_1378 PE=3 SV=1	1846,56
A0A140N6A5	Chaperone protein ClpB OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=clpB PE=3 SV=1	1742,53
A0A140N9T5	NAD-dependent malic enzyme OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=maeA PE=3 SV=1	1716,02
A0A140NF15	Isocitrate lyase OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=ECBD_4022 PE=4 SV=1	1685,4
A0A140NE25	Glutamine--fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing] OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=glmS PE=3 SV=1	1662,42
A0A140N9E5	Glutamate--tRNA ligase OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=gltx PE=3 SV=1	1596,78
A0A140N3X6	Extracellular solute-binding protein family 5 OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=ECBD_0192 PE=4 SV=1	1524,55
A0A140N783	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=ECBD_1865 PE=3 SV=1	1522,92
A0A140NBF1	Glucans biosynthesis protein G OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=mdoG PE=3 SV=1	1469,39
A0A140NDX4	Dihydrodipolyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=ECBD_2934 PE=3 SV=1	1378,01
A0A140N782	Sulfatase OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=ECBD_2141 PE=4 SV=1	1377,64
A0A140NDT0	Amino peptidase N OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=ECBD_2663 PE=4 SV=1	1368,22

A0A140N420	L-fucose isomerase OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=fucl PE=3 SV=1	1347,9
A0A140N8Y0	Fumarate hydratase class I OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=ECBD_2034 PE=3 SV=1	1346,38
A0A140N5F4	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=pnp PE=3 SV=1	1322,51
A0A140N649	Aldehyde dehydrogenase (NAD(+)) OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=ECBD_0142 PE=3 SV=1	1272,68
A0A140NE27	Acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=ECBD_3504 PE=3 SV=1	1250,88
A0A140N9J8	Transketolase OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=ECBD_1225 PE=3 SV=1	1249
A0A140N6G0	Enolase OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=eno PE=3 SV=1	1206,03
A0A140N6F6	Oligopeptidase A OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=ECBD_0243 PE=3 SV=1	1189,28
A0A140N9N5	Phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=ECBD_1265 PE=3 SV=1	1187,67
A0A140NAP3	L-arabinose-binding periplasmic protein OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=ECBD_1740 PE=3 SV=1	1183,6
A0A140N9G2	Succinate--CoA ligase [ADP-forming] subunit alpha OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=sucD PE=3 SV=1	1181,95
A0A140NDV9	Transaldolase OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=tal PE=3 SV=1	1180,73
A0A140SSA2	Glutamine synthetase OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=ECBD_4157 PE=3 SV=1	1149,54
A0A140NDB1	Aminoacyl-histidine dipeptidase OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=ECBD_3384 PE=4 SV=1	1129,81
A0A140NBF4	Succinate--CoA ligase [ADP-forming] subunit beta OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=sucC PE=3 SV=1	1117,07
A0A140N7U4	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=ECBD_1630 PE=3 SV=1	1095,05
A0A140NE28	Glycoside hydrolase family 4 OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=ECBD_3912 PE=3 SV=1	1036,89
A0A140N4G4	Glycine dehydrogenase (decarboxylating) OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=gcvP PE=3 SV=1	967,79
A0A140NAB7	Glutamine--tRNA ligase OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=glnS PE=1 SV=1	938,9
A0A140N844	Glycine cleavage system H protein OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=gcvH PE=3 SV=1	906,36
A0A140N8E1	Phosphoglycerate kinase OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=pgk PE=3 SV=1	895,19
A0A140NHC7	GTP-binding protein TypA OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=ECBD_4156 PE=4 SV=1	861,33
A0A140N7J1	50S ribosomal protein L2 OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=rplB PE=3 SV=1	852,07
A0A140ND68	Aminotransferase OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=ECBD_2667 PE=3 SV=1	841,06
A0A140N7D6	Transcription termination/antitermination protein NusA OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=nusA PE=3 SV=1	809,84
A0A140N1Y4	L-threonine 3-dehydrogenase OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=tdh PE=3 SV=1	803,97
A0A140N745	NADH-quinone oxidoreductase subunit C/D OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=nuoC PE=3 SV=1	800,94
A0A140NE18	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=ECBD_3494 PE=3 SV=1	798,01
A0A140NET2	Trigger factor OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=tig PE=3 SV=1	792,61
A0A140NGA6	L-ribulose-5-phosphate 4-epimerase OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=araD PE=3 SV=1	787,84
A0A140NGN0	Aspartate ammonia-lyase OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=ECBD_3892 PE=3 SV=1	762,81
A0A140N6I5	Selenide, water dikinase OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=selD PE=3 SV=1	761,94
A0A140N9G9	Beta-ketoacyl synthase OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=ECBD_1336 PE=3 SV=1	721,32



A0A140NDW9	2,3,4,5-tetrahydropyridine-2,6-dicarboxylate N-succinyltransferase OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=dapD PE=3 SV=1	719,42
A0A140NAN1	Quinone-dependent D-lactate dehydrogenase OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=dld PE=3 SV=1	718,27
A0A140NCD7	Glucose-6-phosphate isomerase OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=pgi PE=3 SV=1	701,73
A0A140NDE0	Proline--tRNA ligase OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=proS PE=3 SV=1	685,98
A0A140N5L9	Cysteine synthase OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=ECBD_1267 PE=3 SV=1	662,56
A0A140NBF5	Serine--tRNA ligase OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=serS PE=3 SV=1	651,19
A0A140NGG3	Two component transcriptional regulator, winged helix family OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=ECBD_3619 PE=4 SV=1	639,89
A0A140N7V6	D-tagatose-1,6-bisphosphate aldolase subunit KbaZ OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=kbaZ PE=3 SV=1	626,35
A0A140NBF0	Superoxide dismutase OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=ECBD_1987 PE=3 SV=1	624,53
A0A140NA84	Phosphate acetyltransferase OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=ECBD_1362 PE=3 SV=1	611,18
A0A140NH27	DNA-directed RNA polymerase subunit beta' OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=rpoC PE=3 SV=1	610,01
A0A140N508	Bacterioferritin OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=ECBD_0415 PE=3 SV=1	596,71
A0A140ND57	Uncharacterized protein OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=ECBD_2548 PE=4 SV=1	590,77
A0A140NHM8	Soluble pyridine nucleotide transhydrogenase OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=sthA PE=3 SV=1	581,17
A0A140NH84	Fumarate hydratase class I OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=ECBD_3909 PE=3 SV=1	554,01
A0A140ND98	Isoleucine--tRNA ligase OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=ileS PE=3 SV=1	546,04
A0A140NA80	Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=ECBD_2937 PE=3 SV=1	541,61
A0A140N6C6	Elongation factor 4 OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=lepA PE=3 SV=1	541,46
A0A140N627	S-adenosylmethionine synthase OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=metK PE=3 SV=1	522,71
A0A140N340	50S ribosomal protein L27 OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=rpmA PE=3 SV=1	519,09
A0A140N3T4	Translation initiation factor IF-2 OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=infB PE=3 SV=1	515,5
A0A140N870	Alcohol dehydrogenase GroES domain protein OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=ECBD_1566 PE=3 SV=1	514,67
A0A140N6Z3	Succinic semialdehyde dehydrogenase OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=ECBD_1058 PE=3 SV=1	514,51
A0A140N8X9	Serine hydroxymethyltransferase OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=glyA PE=3 SV=1	513,26
A0A140SS73	Glycerol kinase OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=glpK PE=3 SV=1	501,17
A0A140NEV1	Probable cytosol aminopeptidase OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=pepA PE=3 SV=1	494,69
A0A140NCS9	Ribose-phosphate pyrophosphokinase OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=prs PE=3 SV=1	493,64
A0A140NEF7	Phosphopentomutase OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=deoB PE=3 SV=1	481,61
A0A140N548	30S ribosomal protein S4 OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=rpsD PE=3 SV=1	465,92
A0A140N996	Aspartate--tRNA ligase OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=aspS PE=3 SV=1	452,8
A0A140N831	Glycoside hydrolase family 3 domain protein OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=ECBD_1526 PE=3 SV=1	449,76
A0A140NCE2	Pyrraline-5-carboxylate reductase OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=proC PE=3 SV=1	445,98
A0A140N8Q9	Asparagine--tRNA ligase OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=asnS PE=3 SV=1	439,14



A0A140N2U0	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=rpoA PE=3 SV=1	437,59
A0A140N3T1	Peptidase M24 OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=ECBD_0829 PE=4 SV=1	433,65
A0A140N9X9	Glutaredoxin OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=ECBD_1989 PE=3 SV=1	427,29
A0A140NCK8	Aconitate hydratase OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=ECBD_2343 PE=3 SV=1	422,68
A0A140N6W9	Alanine--tRNA ligase OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=alaS PE=3 SV=1	417,82
A0A140NFY3	Carbamoyl-phosphate synthase large chain OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=carB PE=3 SV=1	409,6
A0A140NG49	Multicopper oxidase type 3 OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=ECBD_3496 PE=4 SV=1	407,77
A0A140NB77	Phosphoenolpyruvate synthase OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=ECBD_1944 PE=3 SV=1	403,49
A0A140NCY2	Anthranilate phosphoribosyltransferase OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=trpD PE=3 SV=1	388,45
A0A140N564	Signal recognition particle receptor FtsY OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=ftsY PE=3 SV=1	387,3
A0A140N8N4	Phenylalanine--tRNA ligase beta subunit OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=pheT PE=3 SV=1	369,86
A0A140NFD7	Elongation factor Ts OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=tsf PE=3 SV=1	367,07
A0A140N9M6	Extracellular solute-binding protein family 3 OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=ECBD_2996 PE=4 SV=1	357,24
A0A140NE23	Asparagine synthase (Glutamine-hydrolyzing) OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=ECBD_2988 PE=4 SV=1	356,72
A0A140N645	Ecotin OS=Escherichia coli (strain B / BL21-DE3) OX=469008 GN=eco PE=3 SV=1	343,36

## 8.2 Teilpublikationen im Rahmen dieser Arbeit

### Eingereicht bei BMC Biology (Mai 2020)

Bäumers, M., Ruhнау, K., Breuer, T., Kniebel, A., Görlich, B., Hänsch, S., Weidtkamp-Peters, S., Schmitt, L. and Klein, T. "Lethal (2) giant discs (Lgd)/CC2D1 is required for the full activity of the ESCRT machinery".

#### Eigenanteil an dem angegebenen Manuskript

- Klonierung von His10-CC2D1B und His10-CHMP4B<sup>redox</sup> in den Expressionsvektor zur bakteriellen Expression / Textverfassung zum entsprechenden Methodenabschnitt
- Etablierung der Expressions- und Reinigungsbedingungen für His10-CC2D1B und His10-CHMP4B<sup>redox</sup> / Textverfassung zum Abschnitt „Proteinexpression / Proteinreinigung / Pufferaustausch und Konzentrierung der Proteine“
- Durchführung und Auswertung der Co-IP zur Analyse der Renaturierung von CHMP4B<sup>redox</sup> / Schematische Darstellung des Co-IP-Prinzips und bildliche Darstellung der Ergebnisse / Textverfassung zum Methodenabschnitt „Co-IP“
- Experimentelle Durchführung der klonalen Analyse zur Überprüfung der Funktionalität von CHMP4B<sup>redox</sup> / Bildliche Darstellung der Ergebnisse
- Experimentelle Durchführung und quantitative Auswertung der Experimente basierend auf Cystein-vermittelter Quervernetzung von CHMP4B<sup>redox</sup> zur Analyse der CHMP4B-Konformation sowie eines möglichen Einflusses von CC2D1B auf die CHMP4B-Konformation / Bildliche Darstellung der Ergebnisse / Textverfassung zum entsprechenden Methodenabschnitt

#### In dieser Arbeit angepassten Abbildungen aus dem angegebenen Manuskript

- Abbildung 2.23: Erzeugung der *shrub*-mutanten Klone zur Analyse der CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup>-Funktionalität in der Flügelimaginalscheibe von *D. melanogaster*
- Abbildung 2.32 B: Endergebnis der Reinigung von His10-CC2D1B und His10-CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup> sowie Co-IP-Analyse zur Überprüfung der Renaturierung von His10-CHMP4B<sup>A54C;L180C</sup>
- Abbildung 2.33 B: Konformationsanalyse von CHMP4B

## 9. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Thomas Klein für die Aufnahme in sein Institut und seine Betreuung über die Jahre, angefangen von meiner Bachelorarbeit bis hin zu meiner Doktorarbeit, herzlich bedanken. Ich bedanke mich für die experimentelle Freiheit, die mir ermöglicht hat, im Institut für klassische Genetik einen eigenen Weg zu gehen und mich in die Welt der Proteinbiochemie zu versetzen. Ich bedanke mich für sein volles Vertrauen, das mir erlaubt hat, meine Experimente vom Start bis zum Ziel selbst zu planen und zu gestalten und mich auf diese Weise permanent neuen experimentellen Herausforderungen zu stellen. Diese Herausforderungen haben mir nicht nur neue fachspezifische Qualifikationen verliehen, sondern haben mich auch gelehrt, Probleme aus unterschiedlichen Blickwinkeln zu betrachten und beim Lösen dieser Probleme querdenken zu können.

Ebenfalls bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Lutz Schmitt für die Übernahme des Koreferats sowie für die hilfreichen Gespräche zum Thema der Proteinbiochemie. Seine zahlreichen praktischen Vorschläge sowie die Tipps seiner Arbeitsgruppe haben mir ermöglicht, in die Welt der Proteinbiochemie einzusteigen und mich in diesen Bereich der Biologie zu vertiefen.

Ich bedanke mich bei allen Mitgliedern der AG Klein für eine unvergesslich tolle Atmosphäre. Speziell danke ich dem Hendrik für seine immer unbegründeten und unerwarteten Ausbrüche der „Albernheit“ während unserer Mittagspause, dem Stefan für seinen Beitrag in die gute Laune alleine schon beim Anblick seiner Tausend von T-Shirts mit der „Botschaft des Tages“ und für sein einzigartiges „Okaaay...“, dem Tobi T. für die Unterstützung beim Lösen von Software-Problemen, der Katja für die Möglichkeit, zu den eigenen Wurzeln zurückkehren und mal zwischendurch an einer oder anderer Ecke Russisch sprechen zu können.

Ich danke meinem Studenten Santh und meinen Studentinnen Michelle, Conny und Isabelle für ihre experimentelle Unterstützung.

Ich bedanke mich bei Sebastian Hänsch für die Etablierung der „ILASTIK“-basierter Analyse der Zellkerne und bei Gereon Poschmann für die Durchführung der MS-Messungen.

Zusätzlich bedanke ich mich bei Nadja Drusenheimer und Daniela Lichtblau für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt der Person, die mir alles bedeutet: meiner Mutter. Danke Mama, dass du mich in jeder Situation mit Rat und Tat unterstützt. Meine Zielstrebigkeit und meine Sturheit, die mich zu dem Punkt gebracht haben, an dem ich heute stehe, sind einzig dir zu verdanken. Danke dir vom ganzen Herzen!

## **10. Eidesstattliche Erklärung**

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbstständig 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, Mai 2020

Kristina Ruhnau