

**Analyse der funktionalen Beziehung zwischen
der ESCRT-III Komponente Shrub/CHMP4
und ihrem Regulator Lgd/CC2D1**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Miriam Bäumers

aus Düsseldorf

Düsseldorf, September 2020

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

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

Berichterstatter:

1. Prof. Dr. Thomas Klein
2. Prof. Dr. Dieter Willbold

Tag der mündlichen Prüfung: 10.11.2020

Publikation im Rahmen dieser Dissertation

Ein Großteil des Kapitels 2.2 der Dissertation findet sich in folgendem Manuskript wieder:

Bäumers M., Ruhnau K., Breuer T., Kniebel A., Görlich B., Hänsch S., Weidtkamp-Peters S., Schmitt L., Klein T. (2020) Lethal (2) giant discs (Lgd)/CC2D1 is required for the full activity of the ESCRT machinery. in Revision BMC Biology

Miriam Bäumers hat zu dieser Publikation beigetragen:

- einen Großteil der *in vivo* Daten:
 - elektronenmikroskopische Analysen
 - fluoreszenzmikroskopische Analysen des genetischen Zusammenspiels des Tumorsuppressors Lgd und der ESCRT-III Komponente Shrub
- Konzept, Aufbau und planerische Durchführung
- statistische Analyse der Daten
- entscheidend am Schreibprozess beteiligt

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Der Notch-Signalweg	1
1.2	Der endosomale Transportweg	4
1.3	Die ESCRT-Maschinerie	6
1.4	Die ESCRT-III Komponente Shrub.....	10
1.5	Der Tumorsuppressor Lethal (2) giant discs (Lgd)	14
1.6	Ziele der Arbeit.....	21
2	Ergebnisse.....	22
2.1	Expressionssysteme zur endogenen Expression von Shrub-Varianten	22
2.2	Lgd reguliert die Aktivität der ESCRT-III Komponente Shrub	27
2.2.1	Eine Erhöhung der Shrub Konzentration rettet den Funktionsverlust von <i>lgd</i>	27
2.2.2	<i>lgd^{d7}</i> mutante Endosomen sind vergrößert, weisen aber einen unveränderten ILV-Anteil auf.....	34
2.2.3	Eine Erhöhung der Shrub-Konzentration (<i>2xBAC^{shrub}</i>) hat keinen Einfluss auf die Morphologie und Größe der Endosomen	44
2.2.4	Die ESCRT-invagination sites von <i>lgd^{d7}</i> mutanten Endosomen sind vergrößert	46
2.2.5	Eine Reduktion der Shrub-Aktivität verursacht einen Phänotyp der einer <i>lgd</i> mutanten Situation ähnelt	52
2.2.6	Lgd reguliert die Aktivität von Shrub und nicht dessen Expressionslevel...61	
2.3	Analyse der funktionalen Beziehung der humanen Orthologe von Shrub und Lgd	64
2.3.1	Charakterisierung der drei humanen Orthologe von Shrub.....	64
2.3.2	Analyse der CHMP4B-Polymerisation <i>in vivo</i>	70
2.3.3	Genetische Hinweise für eine Heteropolymerisation zwischen den drei humanen Shrub-Orthologen in einem Organismus	76

2.3.4	Rekrutierung der humanen CHMP4-Proteine zur endosomalen Membran in <i>Drosophila</i>	82
2.3.5	Heteropolymerisation zwischen humanem CHMP4B und <i>Drosophila</i> Shrub..	89
2.3.6	Humanes CHMP4B benötigt Lgd/hLGD für seine vollständige Aktivität.....	97
2.3.7	Analyse der Interaktion zwischen hLGD1 und CHMP4B – Mutation des potenziellen Shrub/CHMP4-Bindemotivs in hLGD1	103
2.3.8	Heteropolymerisation von CHMP4 in Anwesenheit von hLGD <i>in vivo</i>	111
2.4	Funktionsanalyse des Shrub-Orthologs Snf7 aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	117
2.5	DChmp7 und seine mögliche Funktion im endosomalen Transportweg	120
3	Diskussion.....	128
3.1	Eine reduzierte Shrub-Aktivität in <i>lgd</i> mutanten Zellen beeinträchtigt wahrscheinlich die dynamische Assemblierung der ESCRT-III Polymere	128
3.1.1	Ein Funktionsverlust von <i>lgd</i> verursacht eine Reduktion der Shrub-Aktivität	129
3.1.2	Ein Defekt bei der Inkorporation der Transmembranproteine in ILVs verursacht den Verbleib von Notch an der endosomalen Membran in <i>lgd</i> mutanten Zellen	136
3.1.3	Lgd und seine Interaktionspartner.....	142
3.2	Zusammenspiel der humanen Orthologe von Lgd und Shrub im endosomalen Transportweg.....	143
3.2.1	Konservierung der endosomalen Funktion von Lgd	144
3.2.2	CHMP4-Polymerisation und CHMP4B-LGD1 Interaktion <i>in vivo</i>	146
3.2.3	Funktionelle Unterschiede zwischen den humanen CHMP4-Proteinen....	149
3.3	Charakterisierung von <i>Dchmp7</i> (CG5498) mit Fokus auf dem endosomalen Transportweg.....	154
4	Zusammenfassung.....	159
5	Summary	160
6	Methoden	161

6.1	Material.....	161
6.1.1	Puffer, Lösungen und Medien.....	161
6.1.2	Enzyme und Chemikalien.....	163
6.1.3	Reaktions-Kits und Arbeitsmaterialien.....	164
6.1.4	Primer/Oligonukleotide.....	164
6.1.5	Vektoren.....	166
6.1.6	Antikörper.....	168
6.1.7	Chemisch kompetente Bakterienstämme.....	169
6.1.8	Fliegenstämme.....	170
6.1.9	Geräte und Software.....	174
6.2	Molekularbiologische Methoden.....	176
6.2.1	Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	176
6.2.2	Gibson Assembly.....	177
6.2.3	Transformation chemisch kompetenter Bakterien.....	179
6.2.4	Plasmid-DNA-Präparation (Mini).....	179
6.2.5	Plasmid-DNA-Präparation (Midi).....	180
6.2.6	Genomische DNA-Isolation.....	180
6.2.7	Sequenzierung.....	181
6.2.8	Restriktionsspaltung.....	181
6.2.9	Gelextraktion von DNA-Fragmenten aus einem Agarose-Gel.....	182
6.2.10	Ligation.....	182
6.3	Proteinbiochemische Methoden.....	182
6.3.1	Proteingewinnung aus <i>Drosophila</i> Flügelimaginalscheiben.....	182
6.3.2	SDS-Page und Western Blot.....	183
6.4	Transmissionselektronenmikroskopie.....	184
6.4.1	Eponeinbettung der Flügelimaginalscheiben.....	184
6.4.2	Färbung der Semidünnschnitte:.....	185

6.4.3	Kontrastieren der Ultradünnschnitte.....	185
6.5	Quantitative Analyse des ILV-Anteils von MVBs.....	186
6.6	Genetische Methoden	187
6.6.1	Immunhistochemische Färbung an Flügelimaginalscheiben.....	187
6.6.2	Erzeugung transgener Fliegen.....	188
6.6.3	Fliegenhaltung	189
6.6.4	Das Gal4/UAS-System.....	189
6.6.5	RNA-Interferenz.....	190
6.6.6	Klonale Analyse mittels Flp/FRT System.....	191
6.6.7	Erzeugung der <i>Dchmp7</i> mutanten Allele mit Hilfe von CRISPR/Cas.....	191
6.6.8	Der Notch-Reporter <i>Gbe+Su(H)-lacZ</i>	193
7	Literaturverzeichnis	195
8	Abkürzungsverzeichnis	209
9	Anhang.....	211
10	Danksagung.....	221
11	Eidesstattliche Erklärung.....	222

1 Einleitung

Die präzise Regulation von Signalwegen ist von fundamentaler Bedeutung für einen Organismus. Ihre Deregulation ist mit zahlreichen Krankheiten assoziiert, darunter eine Vielzahl an Krebsarten (Sanchez-Vega et al. 2018).

1.1 Der Notch-Signalweg

Der Notch-Signalweg ist ein evolutionär hochkonservierter Signalweg, der in allen Metazoen vorhanden ist. Über ihn werden viele verschiedene Prozesse wie Zellproliferation, Zelldifferenzierung/-schicksal und Apoptose reguliert (Übersicht in Artavanis-Tsakonas et al. 1999). Voraussetzung für den Notch-Signalweg ist ein direkter Zell-Zellkontakt, da sowohl Ligand als auch Rezeptor Transmembranproteine sind. Die kanonische, ligandenabhängige Aktivierung des Notch-Signalweges erfolgt durch Bindung eines DSL-Liganden (Delta, Serrate, Lag-2) der signalsendenden Zelle an den Notch-Rezeptor einer signalempfangenden Zelle (Abb. 1-1) (Übersicht in Bray 2016).

Die Endozytose und der sich ihr anschließende endosomale Transportweg (siehe 1.2) sind für die Regulation des Notch-Signalweges von entscheidender Bedeutung. Durch ihr Zusammenspiel wird die Konzentration und Verteilung des Notch-Rezeptors und seiner Liganden an der Zelloberfläche reguliert. Es herrscht ein Gleichgewicht aus konstanter Synthese, Recycling und konstitutivem, endosomalem Abbau dieser Kernkomponenten im Lysosom (Übersicht in Yamamoto et al. 2010, Übersicht in Schnute et al. 2018). Eine Deregulation des Notch-Signalweges hat fatale Auswirkungen für den Organismus und steht in Verbindung mit der Entstehung von zahlreichen Krankheiten wie beispielsweise Krebs (Übersicht in Aster et al. 2017).

Der Notch-Rezeptor wird im rauen endoplasmatischen Retikulum als Vorläuferprotein synthetisiert und im *trans*-Golgi-Apparat durch die Furin-ähnliche Konvertase prozessiert (S1-Schnitt) (Logeat et al. 1998). Durch zusätzliche posttranslationale Modifizierungen, wie Glykosylierungen, wird seine Liganden-Bindungsaffinität beeinflusst (Sakamoto et al. 2002). Der fertige Notch-Rezeptor gelangt anschließend als Heterodimer an die Plasmamembran (Blaumueller et al. 1997). Seine Aktivierung erfolgt durch die Bindung des DSL-Liganden in *trans* (Abb. 1-1). Dies führt zu zwei unmittelbar aufeinanderfolgenden proteolytischen Schnitten des Notch-Rezeptors.

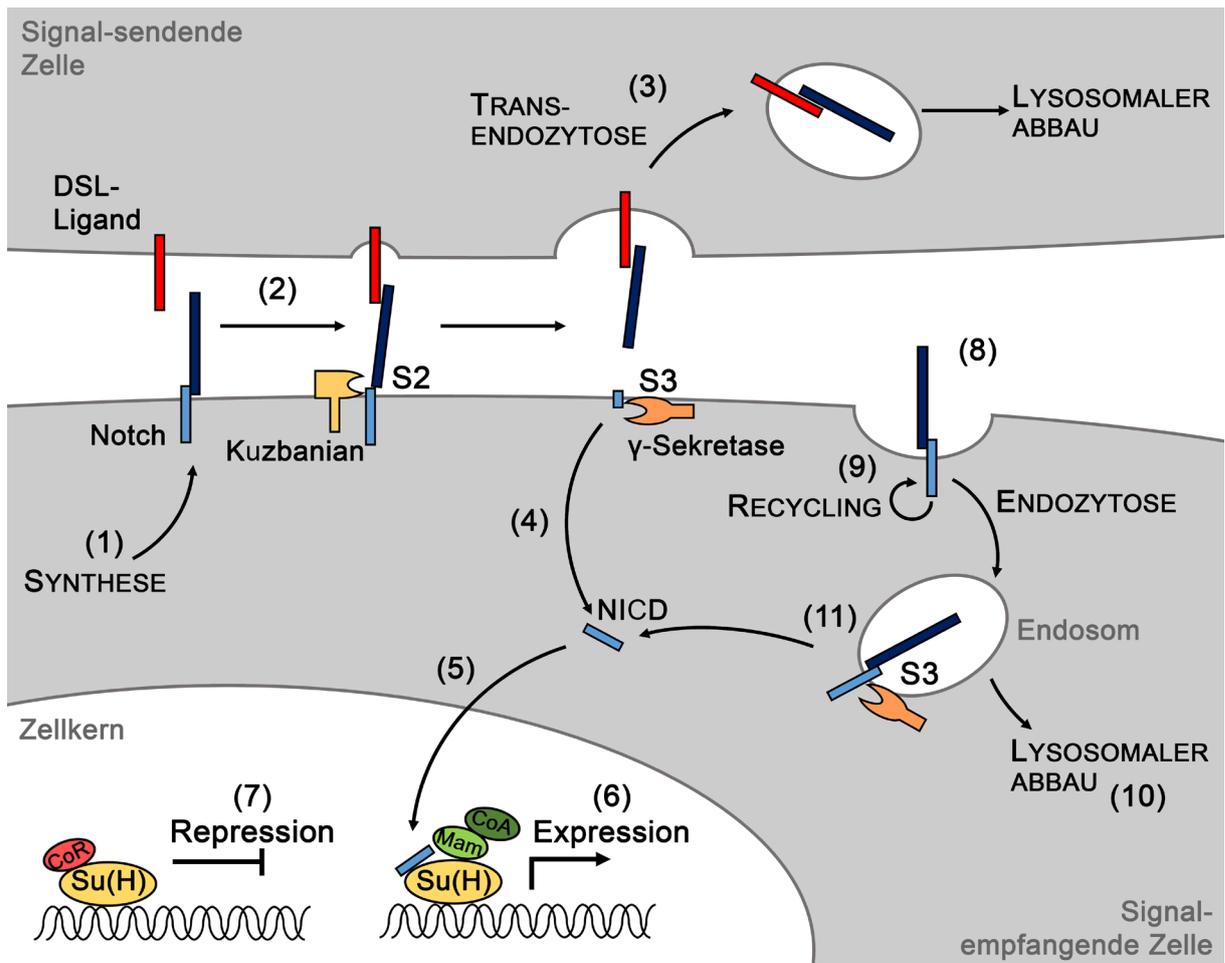


Abb. 1-1: Schematische Darstellung des Notch-Signalweges: (1) Der Notch-Rezeptor gelangt nach seiner Synthese und Prozessierung [S1-Schnitt (nicht gezeigt)] als Heterodimer an die Plasmamembran. (2) Bei einer kanonischen Aktivierung des Notch-Signalweges bindet ein DSL-Ligand der signalsendenden Zelle an einen Notch-Rezeptor der signalempfangenden Zelle. Es kommt zu zwei konsekutiven, proteolytischen Spaltungen des Notch-Rezeptors (S2- und S3-Schnitt). Der S2-Schnitt erfolgt durch die Metalloprotease Kuzbanian in der extrazellulären Domäne des Rezeptors (NECD – Notch extracellulär domän). Dieser Prozess wird auch als *ectodomain shedding* bezeichnet. (3) Hierbei wird NECD vom Notch-Rezeptor getrennt und zusammen mit dem Liganden von der signalsendende Zelle endozytiert. Das verbleibende Fragment, auch als NEXT (Notch extracellulär truncation)-Fragment bezeichnet, wird im nächsten Schritt durch den γ -Sekretase-Komplex erkannt und durch diesen innerhalb seiner Transmembrandomäne geschnitten (S3-Schnitt). (4) Hierbei wird die intrazelluläre Domäne des Notch-Rezeptors (NICD) ins Zytoplasma freigesetzt. (5) NICD transloziert in den Zellkern und bindet dort an Su(H) (Suppressor of Hairless). (6) Zusammen mit Mastermind (Mam) und weiteren Co-Aktivatoren (CoA) bilden sie einen transkriptionsaktivierenden Komplex, der die Expression der Notch-Zielgene auslöst. (7) In Abwesenheit von NICD bildet Su(H) zusammen mit Co-Repressoren (CoR) einen Repressorkomplex, welcher die Expression der Notch-Zielgene unterdrückt. (8) Es findet eine permanente, konstitutive Fluktuation des Notch-Rezeptors an der Plasmamembran statt. (9) Ein Teil der endozytierten Rezeptoren wird hierbei recycelt. (10) Der Großteil der Rezeptoren verbleibt allerdings im endosomalen System, da die Rezeptoren für den lysosomalen Abbau bestimmt sind und degradiert werden. (11) Defekte im endosomalen Transport,

wie beispielsweise bei einem Ausfall der ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required For Transport)-Maschinerie (siehe 1.4) oder einem Funktionsverlust des Tumorsuppressors *lethal (2) giant disc (lgd)* (siehe 1.5) führen zu einer unkontrollierten ligandenunabhängigen, ektopischen Aktivierung des Notch-Signalweges während des endosomalen Transports. Hier kommt es zu einem alternativen *ectodomain shedding*, so dass der γ -Sekretase Komplex, der auch an der endosomalen und auch lysosomalen Membran aktiv ist, das NEXT-ähnliche Fragment schneidet. Als Konsequenz wird NICD frei, transloziert in den Zellkern und aktiviert dort die Transkription von Notch-Zielgenen.

Der erste Schnitt (S2) wird durch die Metalloprotease ADAM10/Kuzbanian (Kuz) vermittelt (Mumm et al. 2000). Ohne Bindung des Liganden ist die Schnittstelle in der extrazellulären Domäne des Notch-Rezeptors für die Protease unzugänglich. Grund hierfür ist die Struktur der negativ-regulatorischen Region (NRR – negative regulatory region) des Rezeptors. Durch sie wird die S2-Schnittstelle geschützt und eine ligandenunabhängige Aktivierung verhindert (Greenwald und Seydoux 1990, Sanchez-Irizarry et al. 2004, Gordon et al. 2007). Es wird vermutet, dass diese Schnittstelle erst durch eine mechanische Zugkraft, ausgeübt auf den Notch-Rezeptor durch die beginnende Endozytose des Liganden, freigelegt wird (Meloty-Kapella et al. 2012). Erfolgt der S2-Schnitt durch Kuzbanian, führt dieser zur Freisetzung der extrazellulären Domäne des Rezeptors (NECD – Notch ExtraCellular Domain) und zum Verbleib eines membrangebundenen NEXT (Notch Extracellular Truncation)-Fragmentes. Dieser Prozess wird auch als *ectodomain shedding* bezeichnet. Nach dem S2-Schnitt wird NECD zusammen mit dem Liganden von der signalsendende Zelle endozytiert (Parks et al. 2000). Das verbleibende NEXT-Fragment fungiert als Substrat für den γ -Sekretase-Komplex. Der γ -Sekretase-Komplex vermittelt den S3-Schnitt innerhalb der Transmembrandomäne des NEXT-Fragments und setzt dadurch die intrazelluläre Domäne des Rezeptors (NICD – Notch IntraCellular Domain) in das Zytoplasma frei (Lecourtois und Schweisguth 1998, De Strooper et al. 1999, Struhl und Greenwald 1999, Ye et al. 1999). NICD transloziert in den Zellkern und fungiert dort als Transkriptionsaktivator (Kidd et al. 1998, Schroeter et al. 1998, Struhl und Adachi 1998, Struhl und Greenwald 1999). Dieser S3-Schnitt durch den γ -Sekretase-Komplex kann nicht nur an der Plasmamembran stattfinden, sondern auch an Endosomen und Lysosomen (Pasternak et al. 2003, Vaccari et al. 2008).

Im Zellkern bindet NICD an einen Transkriptionsfaktor der CSL-Familie (CBF1/RBP- κ in Vertebraten, Su(H) in *D. melanogaster*, Lag1 in *C. elegans*) und bildet zusammen mit

Mastermind (Mam) und weiteren Co-Aktivatoren einen transkriptionsaktivierenden Komplex, der die Expression der Notch-Zielgene auslöst (Furriols und Bray 2000). In Abwesenheit von NICD ist Su(H) zusammen mit weiteren Co-Repressoren (H), darunter Hairless, Teil eines Repressorkomplexes, welcher die Expression der Notch-Zielgene reprimiert (Morel und Schweisguth 2000, Furriols und Bray 2001).

Eine Störung im endosomalen Transportweg durch den Ausfall der ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required For Transport)-Maschinerie (siehe 1.4) oder Funktionsverlust des Tumorsuppressors *lethal (2) giant disc (lgd)* (siehe 1.5) verursacht eine ligandenunabhängige Aktivierung des Notch-Signalweges. Dabei kommt es aufgrund eines Abbaudefekts zur unkontrollierten Freisetzung der intrazellulären Domäne von Notch, welche im Zellkern Notch-Zielgene aktiviert.

1.2 Der endosomale Transportweg

Der endosomale Transportweg spielt wie bereits angedeutet eine essentielle Rolle bei der Regulation von Signalwegen. Durch ihn wird die Anzahl, Konzentration und auch Verteilung von Rezeptoren und Liganden an der Zelloberfläche reguliert. Dies hat wiederum Einfluss auf die Sensitivität der Zelle für externe Stimuli. Zudem bestimmt der endosomale Transportweg, neben anderen Faktoren, auch die Dauer und Stärke der Signalweiterleitung. Defekte während dieses Prozesses beeinflussen daher, sowohl direkt als auch indirekt, das Zusammenspiel von Signalwegen und verursachen Krankheiten wie Krebs (Übersicht in Platta und Stenmark 2011, Übersicht in Engedal und Mills 2014).

Deswegen ist der Abbau von Transmembranproteinen, darunter Rezeptoren und Liganden, durch das endosomale System ein fundamentaler und streng regulierter Prozess. Ausgangspunkt ist die Endozytose dieser Transmembranproteine an der Plasmamembran (Abb. 1-2). Hierbei wird ein Teil der Plasmamembran zusammen mit den Transmembranproteinen eingestülpt und anschließend abgeschnürt (Übersicht in Huotari und Helenius 2011). Die dabei entstehenden Vesikel fusionieren, durch die GTPase Rab5 vermittelt, miteinander oder mit bereits existierenden frühen Endosomen (Gorvel et al. 1991, Rubino et al. 2000). Von diesen frühen oder auch sortierenden Endosomen werden die Proteine je nach Bestimmung beispielsweise recycelt und zurück zur Plasmamembran transportiert, im *trans*-Golgi-Apparat modifiziert oder im Lysosom abgebaut (Übersicht in Jovic et al. 2010). Transmembranproteine, die für den endosomalen Abbau bestimmt sind, sind durch Ubiquitin markiert (Katzmann et al. 2001)

und verbleiben im Endosom (Abb. 1-2). Zu diesem Zeitpunkt befindet sich zwar die extrazelluläre Domäne der Transmembranproteine im endosomalen Lumen, die intrazelluläre Domäne ist jedoch immer noch in Kontakt mit dem Zytoplasma (Abb. 1-2). Während des Reifungsprozesses des Endosoms werden die Transmembranproteine, durch die ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required For Transport)-Maschinerie (siehe 1.3) vermittelt, von der endosomalen Membran in intraluminale Vesikel (ILVs) inkorporiert (Übersicht in Frankel und Audhya 2018). Hierdurch wird die intrazelluläre Domäne vom Zytoplasma getrennt, sodass die Transmembranproteine vollständig abgebaut werden können (Abb. 1-2). Dieser Schritt terminiert im Fall von aktivierten Rezeptoren die Signalweiterleitung und verhindert auch eine unkontrollierte ektopische Aktivierung während des weiteren endosomalen Transports, wie sie beispielsweise beim Notch-Signalweg auftreten kann (Felder et al. 1990, Vaccari et al. 2008, Übersicht in Sorkin und von Zastrow 2009).

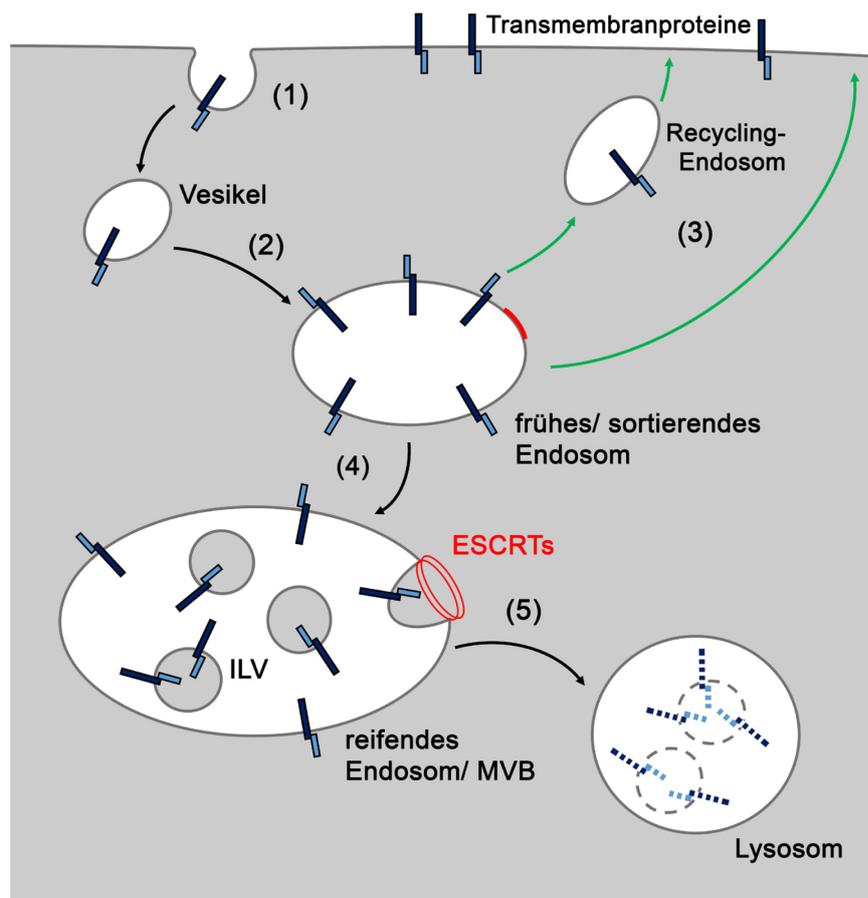


Abb. 1-2: Endosomaler Transportweg mit Fokus auf den lysosomalen Abbau. (1) Endozytose der Transmembranproteine an der Plasmamembran. (2) Die dabei entstehenden Vesikel fusionieren miteinander oder mit bereits existierenden frühen Endosomen. Von diesen frühen oder auch sortierenden Endosomen können die Proteine beispielsweise (3) recycelt und daher zurück zu Plasmamembran

transportiert werden oder (4) sie verbleiben im endosomalen Transportsystem und werden im Lysosom abgebaut. Proteine, die für den endosomalen Abbau bestimmt sind, sind durch Ubiquitin markiert. Zu diesem Zeitpunkt ist die intrazelluläre Domäne der Transmembranproteine noch in Kontakt mit dem Zytoplasma. Ihre vollständige Inkorporation in das endosomale Lumen der Endosomen und damit ihre Trennung vom Zytoplasma wird durch die ESCRT-Maschinerie vermittelt. Durch diese Maschinerie werden die Transmembranproteine in ILVs verpackt. Dieser Schritt ist essentiell für den vollständigen Abbau der Proteine und daher im Fall von aktivierten Rezeptoren entscheidend für die Terminierung der Signalweiterleitung. Zusätzlich erfolgt während des Reifungsprozess der Endosomen eine Ansäuerung ihres Lumen. (5) Die reifenden Endosomen fusionieren letztendlich mit dem Lysosom. Dort werden die Proteine durch die lysosomalen Hydrolasen abgebaut.

Aufgrund der ILVs innerhalb des reifenden Endosoms wird dies auch als MVB (Multivesicular Body) bezeichnet. Während des Reifungsprozesses erhöht sich die Anzahl an ILVs innerhalb des endosomalen Lumens. Zusätzlich wird die GTPase Rab5 durch Rab7 ersetzt. Dieser Austausch wird auch als Rab5/Rab7 Konversion bezeichnet (Rink et al. 2005). Außerdem kommt es durch vakuoläre H⁺-ATPasen (vATPasen) zur Ansäuerung des endosomalen Lumens (Yamashiro et al. 1983, Maxfield und Yamashiro 1987). Abschließend erfolgt, durch Rab7 vermittelt, die Fusion mit dem Lysosom (Futter et al. 1996, Bucci et al. 2000, Vanlandingham und Ceresa 2009). Hier werden die Transmembranproteine durch die lysosomalen Hydrolasen vollständig abgebaut (Übersicht in Hu et al. 2015).

1.3 Die ESCRT-Maschinerie

Die evolutionär konservierte ESCRT-Maschinerie wurde benannt nach ihrer zentralen Rolle in der ILV-Biogenese während des lysosomalen Abbaus von Transmembranproteinen (Babst et al. 1997, Katzmann et al. 2001, Bilodeau et al. 2002, Babst et al. 2002a, Babst et al. 2002b). Identifiziert wurden die einzelnen Komponenten dieser Maschinerie mit Hilfe von genetischen Screens in *S. cerevisiae* (Bankaitis et al. 1986, Rothman und Stevens 1986, Raymond et al. 1992, Kranz et al. 2001). Dabei wurde nach Genen gefahndet, deren Ausfall einen Defekt im endosomalen Transport von Transmembranproteinen verursacht. Dieser Defekt wird auch durch die drastische Veränderung der Morphologie der Endosomen sichtbar. Es kommt aufgrund einer Hyperaktivität von Rab5 zu einer Anhäufung von Membranen und einer Akkumulation von endozytierten

Transmembranproteinen und Hydrolasen in anormal, vergrößerten Endosomen, den sogenannten Class E-Kompartimenten (Russell et al. 2012).

Mit der Zeit stellte sich heraus, dass die ESCRT-Maschinerie auch an weiteren Prozessen beteiligt ist. Dazu zählen u.a. die Cytokinese (Carlton und Martin-Serrano 2007), die Virus-Knospung (Garrus et al. 2001), die Reparatur der Plasmamembran (Jimenez et al. 2014) und die Kernmembranreformierung bei der Zellteilung (Olmos et al. 2015, Vietri et al. 2015). All diese Prozesse zeichnen sich durch Membranabschnürungen weg vom Zytoplasma aus (Übersicht in Schöneberg et al. 2017).

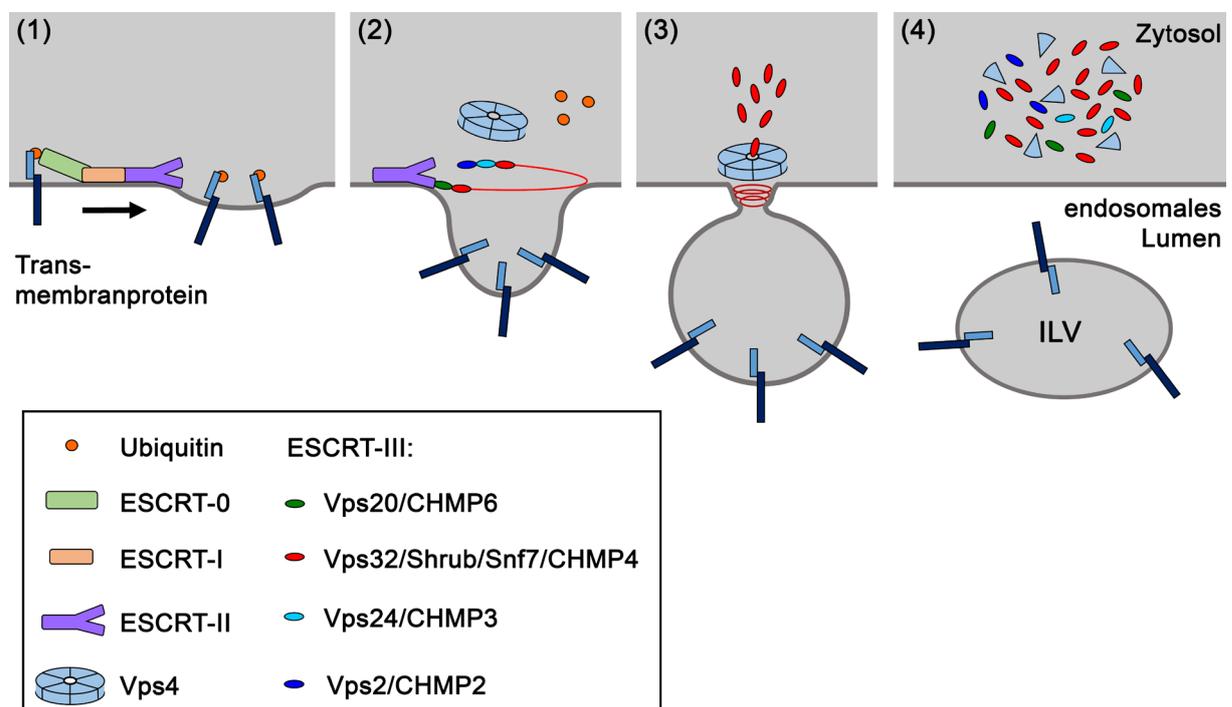


Abb. 1-3: Zusammenspiel der ESCRT-Maschinerie während der ILV-Bildung an der endosomalen Membran. (1) Transmembranproteine, die für den lysosomalen Abbau bestimmt sind, sind durch Ubiquitin markiert. Durch diese Markierung erkennen und binden die ersten drei Komplexe (ESCRT-0 bis -II) die Transmembranproteine (endosomale Fracht) und konzentrieren sie auf. Hierbei wird durch ESCRT-I und ESCRT-II eine erste Einstülpung der endosomalen Membran induziert, in die sie die endosomale Fracht sortieren. (2) ESCRT-III assembliert an der limitierenden Membran des Endosoms in Spiralen, die die endosomale Fracht umschließen. (3) Zusammen mit Vps4 vermittelt ESCRT-III die Deformierung/Remodellierung der Membran und den Abschnürungsprozess des ILVs. Zusätzlich disassembliert Vps4 ESCRT-III von der limitierenden Membran. (4) Im Anschluss liegen die ESCRT-III Untereinheiten wieder als Monomere im Zytosol vor und können für eine erneute ILV-Bildung zur endosomalen Membran rekrutiert werden.

Die ILV-Bildung basiert auf der Erkennung und Konzentrierung der mit Ubiquitinmarkierten Transmembranproteine (endosomale Fracht) in Clustern, gefolgt von ihrer anschließenden Internalisierung von der limitierenden Membran in das endosomale Lumen (Abb. 1-3). Beteiligt an diesem Prozess sind fünf in Serie agierende Komplexe, die als ESCRT-0 bis ESCRT-III und Vps4 (Vacuolar protein sorting-4) bezeichnet werden (Babst et al. 1997, Katzmann et al. 2001, Bilodeau et al. 2002, Babst et al. 2002a, Babst et al. 2002b). Ausgangspunkt ist der ESCRT-0-Komplex, der über seine Untereinheit Hrs (Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate) an das Endosomen-spezifische Phospholipid, Phosphatidylinositol(3)-Phosphat (PI(3)P), bindet (Gaulhier et al. 2000, Gillooly et al. 2000, Raiborg et al. 2001). An der endosomalen Membran interagiert dieser Komplex zudem mit den ubiquitinierten Membranproteinen, wodurch er diese erfasst, sortiert und aufkonzentriert (Wollert und Hurley 2010). Das durch den ESCRT-0-Komplex rekrutierte Gerüstprotein Clathrin unterstützt diesen Prozess. Zudem wird angenommen, dass durch Clathrin die ESCRT-Maschinerie auf bestimmte Mikrodomänen begrenzt wird (Raiborg et al. 2001, Clague 2002, Sachse et al. 2002, Raiborg et al. 2006).

Zusätzlich rekrutiert ESCRT-0 ESCRT-I (Katzmann et al. 2003, Lu et al. 2003), welches wiederum ESCRT-II rekrutiert (Teo et al. 2006, Gill et al. 2007). Die ersten drei ESCRT-Komplexe sind alle in der Lage an die ubiquitinierte Fracht zu binden (Bilodeau et al. 2002, Pornillos et al. 2002, Raiborg et al. 2002, Mizuno et al. 2003, Alam et al. 2004, Slagsvold et al. 2005, Hirano et al. 2006, Shields et al. 2009). Jedoch interagieren nur ESCRT-0 und ESCRT-II direkt mit dem Endosomen-spezifischen Phospholipid, PI(3)P (Raiborg et al. 2001, Slagsvold et al. 2005, Kostelansky et al. 2007). Gemeinsam vermitteln ESCRT-I und -II eine erste Einstülpung und sortieren die ubiquitinierte Fracht durch ihren sequentiellen Transfer von einem ESCRT-Komplex zum nächsten ESCRT-Komplex in diese Einstülpung (Abb. 1-3, (1)) (Wollert und Hurley 2010). Der ESCRT-II Komplex induziert außerdem die Assemblierung des ESCRT-III Komplex an der limitierenden Membran des Endosoms (Abb. 1-3, (2)) (Babst et al. 2002b, Teo et al. 2004, Teis et al. 2010).

Die Untereinheiten von ESCRT-III liegen als inaktive Monomeren im Zytoplasma vor (Lata et al. 2008b, Saksena et al. 2009, Xiao et al. 2009, Bajorek et al. 2009b, Henne et al. 2012, Tang et al. 2015). Erst an der endosomalen Membran assemblieren sie zu einem Komplex

(Teis et al. 2008, Saksena et al. 2009). Im Gegensatz dazu, liegen ESCRT-0 bis ESCRT-II als stabile Komplexe vor (Übersicht in Henne et al. 2011). ESCRT-III ist ein Heteropolymer, das sich aus vier Kernkomponenten Vps20/CHMP6, Shrub/Snf7/Vps32/CHMP4, Vps24/CHMP3 und Vps2/CHMP2 zusammensetzt (Babst et al. 2002a). Es assembliert an der limitierenden Membran des Endosoms in Spiralen. Obwohl alle ESCRT-III Untereinheiten einen ähnlichen Aufbau aufweisen und daher zur CHMP (Charged Multivesicular Body Protein)-Familie gezählt werden, haben sie alle eine spezifische Aufgabe im Polymer (Übersicht in Schöneberg et al. 2017).

Die ESCRT-II Untereinheit Vps25 aktiviert die ESCRT-III Komponente Vps20 (Im et al. 2009, Teis et al. 2010). Vps20 induziert die Homooligomerisation der ESCRT-III Untereinheit Shrub/Snf7, der am häufigsten vorkommenden Untereinheit im ESCRT-III Polymer. Dabei umschließen die sich bildenden, spiralförmigen ESCRT-III Heteropolymere die aufkonzentrierte Fracht. Diese ESCRT-III Assemblierung wird durch Vps24 und Vps2 beendet (Teis et al. 2008, Henne et al. 2012). ESCRT-III und vor allem seine Untereinheit Shrub/Snf7/CHMP4 sind entscheidend für die Membranmodellierung und den Abschnürungsprozess des ILVs an sich (Abb. 1-3 (2)-(3)) (Wollert et al. 2009). Über die ESCRT-III Untereinheiten wird die ATPase Vps4 rekrutiert, wobei Vps2 eine zentrale Rolle spielt (Obita et al. 2007, Adell et al. 2014). Vps4 bildet bei seiner Rekrutierung ein Hexamer (Monroe et al. 2014, Caillat et al. 2015).

Die ATPase Vps4 scheint nicht nur für die Disassemblierung des ESCRT-III Komplexes essentiell zu sein (Babst et al. 1998, Lata et al. 2008a, Saksena et al. 2009, Yang et al. 2015), sondern auch für die Membranremodellierung und die Abschnürung des ILVs durch ESCRT-III (Abb. 1-3 (3)) (Adell et al. 2014, Mierzwa et al. 2017, Schöneberg et al. 2018). Neuste Studien deuten an, dass der Prozess dynamischer ist als ursprünglich angenommen (Adell et al. 2017, Mierzwa et al. 2017). Ihre Daten deuten darauf hin, dass die Aktivität von Vps4 für eine ständige Assemblierung/Disassemblierung der ESCRT-III Polymere verantwortlich ist. Durch diesen dynamischen Prozess wird die Krümmung und Deformierung der Membran vorangetrieben. Der genaue Mechanismus hinter der Membrandeformierung/-remodellierung, der dann zur Abschnürung des ILVs führt, ist jedoch noch nicht aufgeklärt (Übersicht in Chiaruttini und Roux 2017, Übersicht in Schöneberg et al. 2017).

Vor der endgültigen Abschnürung der ILVs wird die endosomale Fracht deubiquitiniert. Die Deubiquitinasen werden hierbei durch verschiedene ESCRT-III Untereinheiten und über Bro1/ALIX (BCK1-like resistance to osmotic shock protein-1/Apoptosis-Linked gene-2 Interacting protein X) ein ESCRT-III Adapterprotein rekrutiert (Amerik et al. 2000, Dupre und Haguenaer-Tsapis 2001, Luhtala und Odorizzi 2004).

Neben den Haupt-Komponenten des ESCRT-III Komplexes existieren noch weitere assoziierte ESCRT-III Proteine, auch Hilfs-ESCRTs genannt. Sie scheinen mit Blick auf ihre Ausfallphänotypen, die von keinem bis zu einem schwachen endosomalen Transportdefekt reichen, weniger bedeutend für die grundlegende Funktion von ESCRT-III und Vps4 zu sein (Dimaano et al. 2008, Rue et al. 2008, Agromayor et al. 2009, Bäumers et al. 2019). Zusammen sind sie jedoch u.a. ausschlaggebend für die vollständige Aktivität und auch die Rekrutierung von Vps4 (Azmi et al. 2006, Lottridge et al. 2006, Nickerson et al. 2006, Azmi et al. 2008, Dimaano et al. 2008, Rue et al. 2008)

Ein assoziiertes ESCRT-III Protein, welches unter den CHMP-Proteinen des ESCRT-III Komplexes einzigartig ist und zu Beginn dieser Arbeit erst ansatzweise charakterisiert war, ist CHMP7. Es scheint durch eine Duplikation des Vorfahren von Snf7 entstanden und rasch evolviert zu sein (Horii et al. 2006). Es fungiert als eine Art Membranadapter für ESCRT-III Assemblierung während der Reformierung der Kernhülle bei der Zellteilung. (Vietri et al. 2015, Olmos et al. 2016).

Bei den verschiedenen ESCRT-vermittelten Prozessen variiert zwar die Komposition der ESCRT-Maschinerie, jedoch ist immer der ESCRT-III Komplex, abgesehen von seiner Untereinheit Vps20/CHMP6, zusammen mit der ATPase Vps4 für die Membranremodellierung und den Abschnürungsprozess verantwortlich. Nur die Startermoleküle und damit die Adapter für die ESCRT-III Assemblierung variieren (Übersicht in Schöneberg et al. 2017).

1.4 Die ESCRT-III Komponente Shrub

Eine Schlüsselkomponente des ESCRT-III Komplexes ist Shrub. Sie ist die am häufigsten vorkommende Untereinheit im ESCRT-III Polymer (Teis et al. 2008). Ihre Polymerisation an der endosomalen Membran ist entscheidend für die Bildung und Abschnürung von intraluminalen Vesikeln (ILVs) während der Reifung von Endosomen (Teis et al. 2008,

Wollert et al. 2009). Durch eine erfolgreiche Kristallisation der N-terminalen Kernregion von Shrub (Abb. 1-4), die eine langgestreckte helikale Haarnadelstruktur bildet, konnte bereits die strukturelle Basis für die Homopolymerisation von Shrub in *Drosophila* aufgeklärt werden (McMillan et al. 2016). Sie basiert auf elektrostatischen Wechselwirkungen. Im Polymer bindet die positiv geladene Kopfregion eines Monomers an die negativ geladene Region des vorherigen Monomers (Abb. 1-4). Fast zeitgleich zur Kristallstruktur der N-terminalen Kernregion von Shrub [10-143 aa von 226 aa (McMillan et al. 2016)] wurde auch eine Struktur von Snf7 [12-150 aa von 240 aa (Tang et al. 2015)], dem Shrub-Ortholog aus *Saccharomyces cerevisiae*, publiziert. Hierbei zeigte sich, dass die Homopolymerisation von Snf7 vorrangig auf hydrophoben Interaktionen (Tang et al. 2015) beruht.

Wie diese Homopolymerisation in Säugern abläuft, ist hingegen erst ansatzweise untersucht worden. Hier könnten ebenfalls elektrostatische Wechselwirkungen im Polymer entscheidend sein (Martinelli et al. 2012).

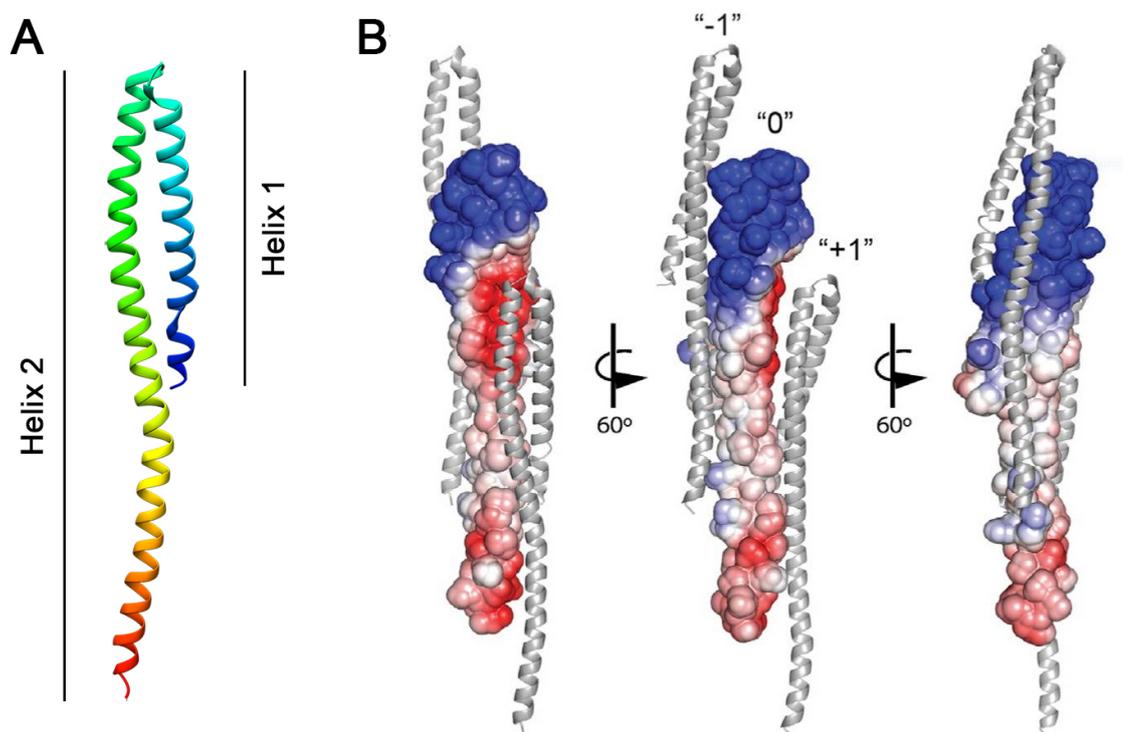


Abb. 1-4: Struktur und Homopolymerisation der ESCRT-III Untereinheit Shrub. Die N-terminale Kernregion von Shrub zeichnet sich durch eine helikale Haarnadelstruktur aus (*rainbow coloring*: blau N-Terminus und rot C-Terminus) PDB Eintrag: 5J45 (McMillan et al. 2016). (B) Elektrostatische Wechselwirkungen im Shrub-Polymer: Die positiv geladene Kopfregion eines Shrub-Monomers bindet an die negativ geladene Oberfläche des vorherigen Monomers [(B) aus (McMillan et al. 2016)].

Shrub/Snf7 scheint wie die anderen ESCRT-III Untereinheiten zwischen einer geschlossenen, inaktiven Konformation und einer offenen, aktiven Form, die fähig ist zu polymerisieren, zu wechseln. Bei der geschlossenen Konformation blockiert die autoinhibitorische Region (Abb. 1-5) eine der Polymerisationsoberflächen (Muziol et al. 2006, Lata et al. 2008b, Saksena et al. 2009, Xiao et al. 2009, Bajorek et al. 2009b, Henne et al. 2012, Tang et al. 2015).

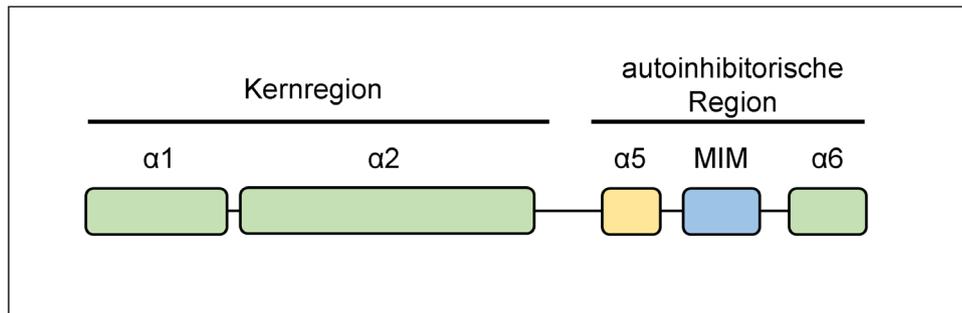


Abb. 1-5: Aufbau der ESCRT-III Untereinheit Shrub. Basierend auf der veröffentlichten Kristallstruktur von Shrub (McMillan et al. 2016), die die ersten 10-143 aa von Shrub (226 aa) umfasst, setzt sich die Kernregion von Shrub wahrscheinlich aus zwei α -Helices und nicht wie ursprünglich angenommen aus vier zusammen. Die Kernregion liegt am N-Terminus. Über sie erfolgt die Polymerisation der ESCRT-III Untereinheit (McMillan et al. 2016) und die Bindung an die endosomale Membran (Henne et al. 2012, Buchkovich et al. 2013). Am C-Terminus befindet sich die autoinhibitorische Region (Zamborlini et al. 2006, Shim et al. 2007, Lata et al. 2008b, Bajorek et al. 2009b). Sie zeichnet sich durch eine MIM (MIT Interacting Motif)-Domäne (blau) aus. Diese ist verantwortlich für die Bindung der ATPase Vps4 (Obita et al. 2007, Stuchell-Brereton et al. 2007, Bajorek et al. 2009a). Die fünfte α -Helix (α 5, gelb) ist entscheidend für die Autoinhibition, indem sie bei der geschlossenen Konformation von Shrub eine der Polymerisationsoberflächen blockiert (Lata et al. 2008b, Henne et al. 2012). Über die sechste α -Helix (α 6) interagiert Shrub mit Bro1/ALIX (McCullough et al. 2008).

In *Drosophila* führt der Funktionsverlust von *shrub*, wie auch der von anderen ESCRT-I bis ESCRT-III Komponenten, zu einer Deregulierung von Signalwegen. Betroffen sind unter anderem der EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor)-, der BMP (Bone Morphogenetic Protein)/Dpp (Decapentaplegic)- und der Wnt (Wingless-INT)/Wg (Wingless)-Signalweg. Außerdem verursacht ein solcher Funktionsverlust eine ligandenunabhängige, ektopische Aktivierung des Notch-Signalweges. Zusätzlich geht die epitheliale Integrität/Polarität verloren. Dies führt in Kombination mit der auftretenden Zell-Überproliferation zur Bildung von mehrschichtigem unorganisiertem Gewebe (neoplastischer Phänotyp). (Moberg et al. 2005, Thompson et al. 2005, Vaccari und Bilder

2005, Herz et al. 2006, Vaccari et al. 2009, Hori et al. 2011, Aoyama et al. 2013, Morawa et al. 2015). Aus diesem Grund werden Gene, welche für Komponenten von ESCRT-I bis -III codieren, auch als neoplastische Tumorsuppressorgene bezeichnet (Vaccari et al. 2009). Summa summarum ist es aufgrund dieser Pleiotropie nicht verwunderlich, dass ein Funktionsverlust von *shrub* in *Drosophila* bereits embryonal letal ist (Sweeney et al. 2006).

Im Gegensatz zu *Drosophila* umfasst das humane Genom nicht nur ein Snf7-Ortholog, sondern drei: CHMP4A, CHMP4B und CHMP4C (Kato et al. 2003, Peck et al. 2004). Grundsätzlich weisen bereits publizierte Studien nicht daraufhin, dass es eine distinkte Aufteilung der CHMP4-Proteine auf verschiedene ESCRT-vermittelte Abschnürungsprozesse gegeben hat. Im Gegenteil alle drei CHMP4-Proteine scheinen gemeinsam zu agieren. So gibt es Hinweise, dass beispielsweise alle drei an der Cytokinese (Carlton et al. 2012) und HIV-1-Knospung beteiligt sind (Morita et al. 2011, Carlton et al. 2012). Alle drei CHMP4-Proteine konnten unter anderem während der Cytokinese am Midbody detektiert werden (Morita et al. 2007, Elia et al. 2011, Carlton et al. 2012, Capalbo et al. 2016). Bei einer Überexpression von YFP-CHMP4-Fusionsproteinen zeigt sich bei allen dreien ein negativer Effekt auf die HIV-Knospung und die Cytokinese. Dabei hat YFP-CHMP4C die stärkste inhibitorische Wirkung auf die Cytokinese, YFP-CHMP4B hingegen auf die HIV-Knospung (Carlton et al. 2008). Zudem offenbart sich erst bei einer simultanen Reduktion aller drei CHMP4-Proteine mittels RNA-Interferenz der stärkste Defekt bei der Knospung von Herpes-simplex-Viren 1 (HSV-1) (Arii et al. 2018). Darüber hinaus konnten alle drei bei ihrer Überexpression in Zellkultur an Endosomen detektiert werden (Peck et al. 2004, Dissertation Migdal 2016). Zusätzlich scheint zumindest auch CHMP4A, neben CHMP4B fähig zu sein, Membranen zu modellieren. Bei einer Überexpression von CHMP4A oder CHMP4B in COS-7 Zellen bilden sich membrangebundene zirkuläre Filamente. Diese krümmen die Plasmamembran der Zellen nach außen, sodass sich Ausstülpungen formen können (Lin et al. 2005, Hanson et al. 2008).

Einige Studien deuten auch auf eine partielle Spezialisierung der einzelnen CHMP4-Proteine während der ESCRT-vermittelten Prozesse hin. Eine solche Spezialisierung konnte vor allem bei Cytokinese beobachtet werden. CHMP4B scheint hier entscheidend für den eigentlichen Abschnürungsprozess zu sein, wohingegen über CHMP4C der

Prozess reguliert und eine zu frühe Teilung der Zellen verhindert wird (Elia et al. 2011, Carlton et al. 2012, Christ et al. 2016). Hierbei handelt es sich um einen Sicherheitsmechanismus, der eine DNA-Schädigung und Aneuploidie verhindert (Sadler et al. 2018). Beides sind Phänomene die mit Karzinogenese assoziiert sind (Übersicht in Holland und Cleveland 2012, Übersicht in Hayashi und Karlseder 2013).

Auch unterschiedlich starke Bindungsaffinitäten zur ESCRT-Komponente ALIX konnten zwischen den CHMP4-Proteinen bereits aufgedeckt werden (Katoh et al. 2004). Mit Hilfe einer Northern Blot-Analyse konnte des Weiteren gezeigt werden, dass die einzelnen *CHMP4*-mRNAs ein unterschiedliches Expressionsmuster im menschlichen Gewebe besitzen. Das Expressionslevel von *CHMP4B* ist hierbei in allen untersuchten menschlichen Geweben höher als das von *CHMP4A* und *CHMP4C* (Katoh et al. 2004).

Insgesamt haben jedoch erst wenige Studien funktionelle Unterschiede oder auch Redundanzen zwischen den drei Homologen herausgearbeitet. Ungeklärt ist, ob eine solche Spezialisierung, wie sie bei der Cytokinese beobachtet wurde, ebenfalls bei anderen ESCRT-vermittelten Prozessen existiert. Vor allem fehlt eine getrennte Charakterisierung der einzelnen Funktionen von CHMP4A/B und C während des endosomalen Transportweges.

1.5 Der Tumorsuppressor Lethal (2) giant discs (Lgd)

Der Tumorsuppressor Lethal (2) giant disc (Lgd) ist ein direkter Interaktionspartner der ESCRT-III Komponente Shrub. Diese Interaktion scheint wichtig für die vollständige Shrub-Aktivität zu sein (Troost et al. 2012). Lgd gehört zu einer evolutionär konservierten Protein-Familie, die Vertreter in allen Metazoen hat (Jaekel und Klein 2006). Charakteristisch für Lgd-Proteine sind vier einzigartige N-terminale DM14 Domänen (*Drosophila melanogaster* 14) und eine C2 Domäne (Ponting et al. 2001, Childress et al. 2006, Gallagher und Knoblich 2006, Jaekel und Klein 2006). Die DM14 Domänen sind entscheidend für die Funktionalität, denn sie vermitteln beispielsweise die direkte Interaktion mit der ESCRT-III Komponente Shrub. Zudem erhöhen diese vier Domänen die funktionale Robustheit von Lgd (Troost et al. 2012). So wirken jeweils die ungeradzahligen (DM14 1 und DM14 3) und die geradzahligen DM14 Domänen (DM14 2 und DM14 4) untereinander funktional redundant. Hierbei sind vor allem die ungeradzahligen DM14 Domänen entscheidend für die Funktion von Lgd in *Drosophila*.

(Troost et al. 2012, McMillan et al. 2017, Dissertation Tibbe 2019). Die C2 Domäne ist fundamental für die Protein-Lokalisation und -Stabilität von Lgd (Troost et al. 2012). Zudem können die Mitglieder der Familie über sie an spezifische Phospholipide binden (Gallagher und Knoblich 2006, Ventimiglia et al. 2018).

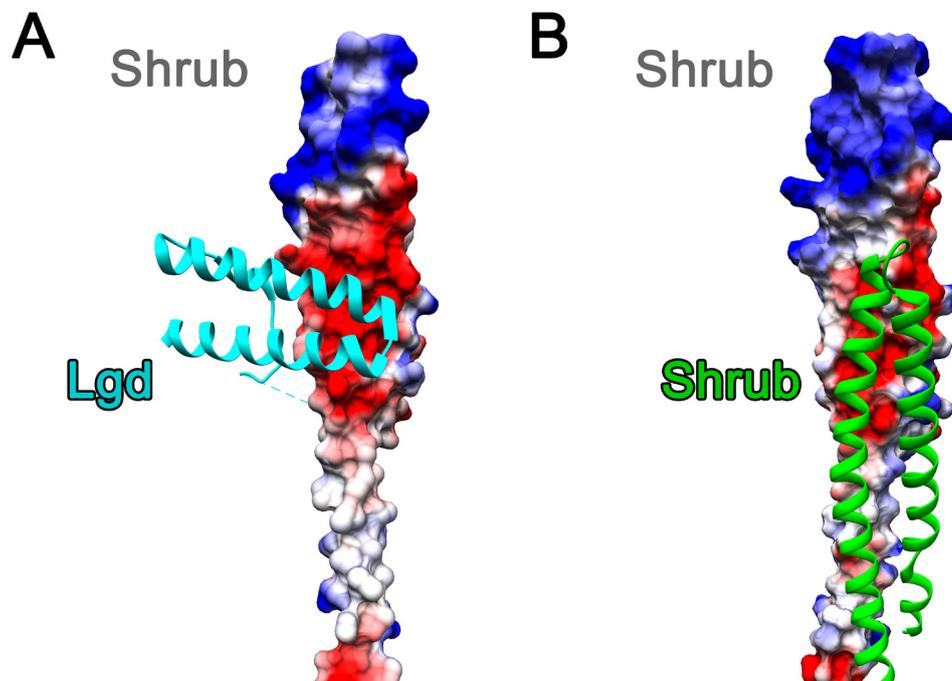


Abb. 1-6: Elektrostatische Wechselwirkung bei der Interaktion von Lgd mit Shrub und bei der Homopolymerisation von Shrub. (A-B) Darstellung der molekularen Oberfläche der N-terminalen Kernregion der ESCRT-III Untereinheit Shrub mit entsprechendem elektrostatischen Potential (in rot negativ, in blau positiv). (A) Die dritten DM14 Domäne von Lgd, die eine helikale Haarnadelstruktur bildet (türkis), bindet über ihre positiv geladene Oberfläche (nicht gezeigt) an die negativ geladene Oberfläche der N-terminalen Kernregion von Shrub. PDB Eintrag: 5V05 (McMillan et al. 2017). (B) An dieselbe negativ geladene Oberfläche bindet im Shrub-Polymer auch das nächste Shrub-Monomer (grün). PDB Eintrag: 5J45 (McMillan et al. 2016).

Mit Hilfe einer Kristallstrukturanalyse konnte nicht nur die Struktur der dritten DM14 Domäne von Lgd entschlüsselt werden, sondern auch die genaue Interaktionsschnittstelle dieser Domäne mit Shrub (McMillan et al. 2017). Die dritte DM14 Domäne formt eine kurze helikale Haarnadel, die eine konservierte, positiv geladene Oberfläche enthält (Abb. 1-6).

Sowohl die Homopolymerisation von Shrub als auch die Bindung von Lgd und Shrub beruhen auf elektrostatischen Wechselwirkungen (McMillan et al. 2016, McMillan et al. 2017). Eine gleichzeitige Homopolymerisation von Shrub und eine Interaktion von Shrub

mit Lgd schließen sich gegenseitig aus. Grund hierfür ist, dass die positiv geladene Oberfläche der dritten DM14 Domäne von Lgd an die negativ geladene Oberfläche von Shrub bindet, die gleichzeitig essentiell für die Homopolymerisation von Shrub ist (Abb. 1-6). Dabei sind die Aminosäuren eines Shrub-Monomer, die Salzbrückenbindungen mit basischen Aminosäuren der dritten DM14 Domäne von Lgd ausbilden, dieselben, die während der Homopolymerisation auch mit dem benachbarten Shrub-Monomer interagieren (McMillan et al. 2017).

In *Drosophila* ist ein vollständiger Funktionsverlust von *lgd* nach einer verlängerten larvalen Phase im frühen Puppenstadium letal (Bryant und Schubiger 1971). Der Ausfall von *lgd* führt zu einer ligandenunabhängigen und ektopischen Aktivierung des Notch-Signalweges und seiner Zielgene (Buratovich und Bryant 1995, Klein 2003, Childress et al. 2006, Gallagher und Knoblich 2006, Jaekel und Klein 2006). Eine Konsequenz dieser ektopischen Aktivierung ist eine Überproliferation der Imaginalscheiben der Larven (Klein 2003).

Imaginalscheiben sind undifferenzierte, einschichtige Epithelien, aus denen sich der größte Teil der Epidermis sowie die Körperanhänge (Flügel, Beine, Antennen etc.) des Imagos entwickeln. Sie werden bereits während der Embryogenese angelegt (Bate und Arias 1991).

Die epitheliale Organisation der Imaginalscheiben wird bei einem Funktionsverlust von *lgd* nicht beeinträchtigt, weshalb Lgd auch den hyperplastischen Tumorsuppressorgen zuzuordnen ist (hyperplastischer Phänotyp) (Bryant und Schubiger 1971, Schneider et al. 2013). Ferner verursacht ein Funktionsverlust von *lgd* nicht nur eine ektopische Aktivierung des Notch-Signalweges, sondern auch des Dpp/BMP-Signalweges (Buratovich und Bryant 1995, Buratovich und Bryant 1997, Klein 2003, Morawa et al. 2015). Eine verlängerte Aktivität des Dpp/BMP-Signalweges tritt beispielsweise während der Oogenese von *Drosophila* auf (Morawa et al. 2015).

Die ektopische Aktivierung bzw. Deregulierung dieser Signalwege ist auf einen Defekt im allgemeinen endosomalen Transport und Abbau von Transmembranproteinen/Rezeptoren zurückzuführen (Childress et al. 2006, Gallagher und Knoblich 2006, Jaekel und Klein 2006, Schneider et al. 2013). Dieser Defekt äußert sich in einer moderaten Vergrößerung der Endosomen, vermutlich verursacht durch einen verzögerten lysosomalen Abbau der Transmembranproteine (Schneider et al. 2013). Es

wird vermutet, dass bei einem Funktionsverlust von *lgd* die Aktivität der ESCRT-III Komponente Shrub reduziert ist (Troost et al. 2012, Schneider et al. 2013). Als Konsequenz verbleibt ein Teil der Rezeptoren an der limitierenden Membran des Endosoms und damit ihre intrazellulären Domänen, die entscheidend für die Signalweiterleitung sind (siehe 1.1), in Kontakt mit dem Zytoplasma (Schneider et al. 2013, Couturier et al. 2014).

Im Vorfeld dieser Arbeit wurde bereits gezeigt, dass die ektopische Aktivierung des Notch-Signalweges in *lgd* mutanten Zellen zwar ligandenunabhängig erfolgt, aber abhängig vom γ -Sekretase Komplex ist (Childress et al. 2006, Gallagher und Knoblich 2006, Jaekel und Klein 2006). Dieser Komplex vermittelt bei der kanonischen Aktivierung des Notch-Signalweges den sogenannten S3-Schnitt des NEXT-Fragments, der zur Freisetzung der intrazellulären Domäne von Notch (NICD) führt (siehe 1.1). Darüber hinaus benötigt die ektopische Aktivierung die Fusion des reifenden Endosoms mit dem Lysosom und sie ist abhängig von der Aktivität der vATPase (Schneider et al. 2013). Die vATPase säuert das Lumen des Endosom an, was wiederum Voraussetzung für die Aktivierung der sauren Hydrolasen im Lumen ist (Übersicht in Huotari und Helenius 2011).

All dies zusammen bildet die folgende Arbeitshypothese (Abb. 1-7 und (Schneider et al. 2013)): Aufgrund des Funktionsverlusts von *lgd* verbleibt ein Teil der Notch-Rezeptoren an der endosomalen Membran und wird nicht in die ILVs inkorporiert. Nach der Fusion mit dem Lysosom wird die extrazelluläre Domäne dieser Notch-Rezeptoren durch die aktivierten Hydrolasen und das saure Milieu degradiert. Dadurch entsteht ein NEXT-ähnliche Fragment, das durch den γ -Sekretase-Komplex erkannt und geschnitten werden kann. Dabei kommt es zur Freisetzung der intrazellulären Domäne des Notch-Rezeptors (NICD) in das Zytoplasma. NICD transloziert in den Zellkern und verursacht die für den Funktionsverlust von *lgd* charakteristische, ektopische Aktivierung des Notch-Signalweges (Abb. 1-7).

Ungeklärt ist bisher, wieso trotz stattfindender ILV-Bildung (Schneider et al. 2013) in *lgd* mutanten Zellen eine Fraktion der Notch-Rezeptoren an der endosomalen Membran verbleibt.

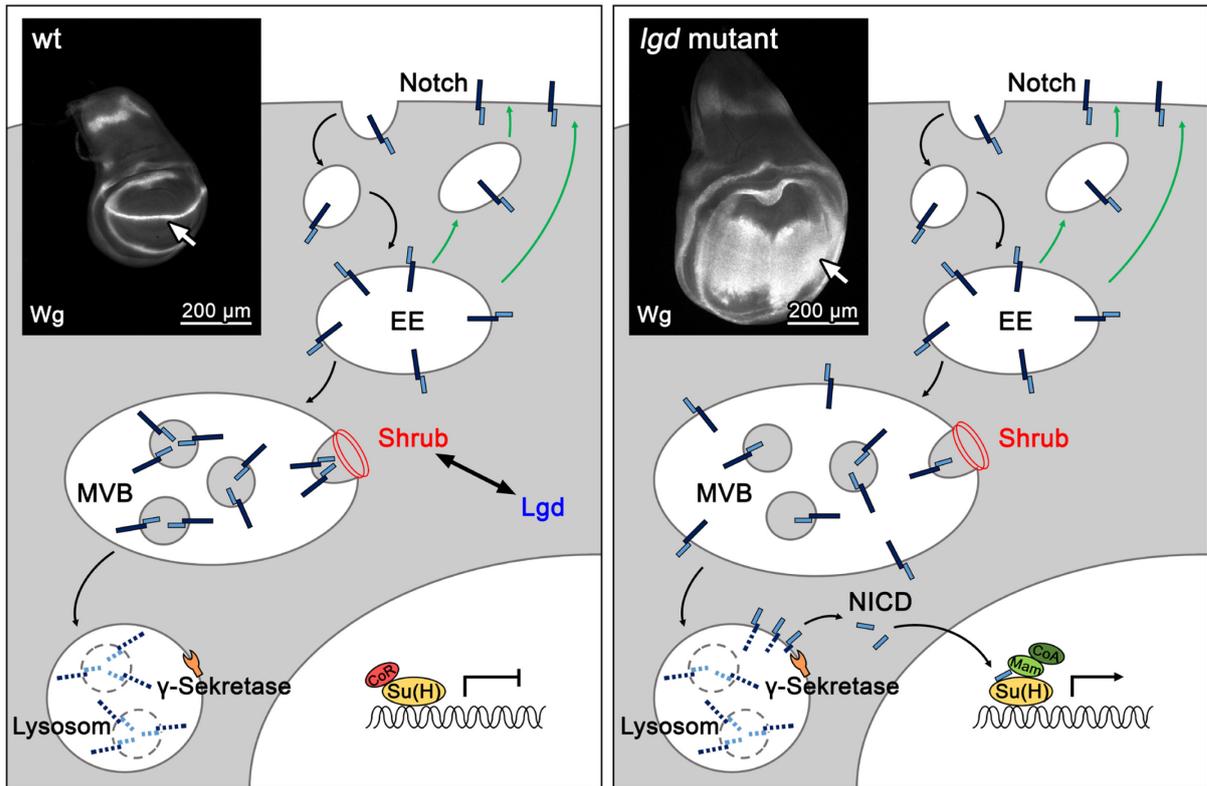


Abb. 1-7: Modellvorstellung zur Aktivierung des Notch-Signalweges in *lgd* mutanten Zellen. Endosomal Abbau des Notch-Rezeptors in wildtypischen Zellen (links): Endozytierte Notch-Rezeptoren, die sich an der limitierenden Membran des Endosoms befinden, werden durch ihre Internalisierung in ILVs vollständig vom Zytoplasma getrennt und anschließend im Lysosom abgebaut (siehe 1.3). Wildtypisches Expressionsmuster des Notch-Zielgens *wingless* (*wg*) in einer Flügelimaginalscheibe des dritten Larvenstadiums von *Drosophila melanogaster*. Die Expression ist auf einen schmalen Streifen entlang der dorsoventralen Grenze (D/V-Grenze) begrenzt (Pfeil). Aktivierung des Notch-Signalweges während des endosomal Abbau in *lgd* mutanten Zellen (rechts): Als Folge des Funktionsverlusts von *lgd* ist die Aktivität von Shrub reduziert. Ein Teil der Notch-Rezeptoren verbleibt daher an der limitierenden Membran des reifenden Endosoms und wird nicht in ILVs inkorporiert. Nach der Fusion mit dem Lysosom, wird ihre extrazelluläre Domäne durch die aktivierten Hydrolasen, vermutlich in Kombination mit dem sauren Milieu, degradiert. Dadurch entsteht ein NEXT-ähnliches Fragment, das durch den γ -Sekretase-Komplex erkannt und prozessiert werden kann. Als Folge wird die intrazelluläre Domäne der Notch-Rezeptoren (NICD) in das Zytoplasma freigesetzt, transloziert in den Zellkern und aktiviert dort unkontrolliert Notch-Zielgene. Ligandenunabhängige, ektopische Aktivierung des Notch-Signalweges in einer *lgd* mutanten Flügelimaginalscheibe. Die Expressionsdomäne des Notch-Zielgens *wingless* ist stark verbreitert und zeigt daher eine ektopische Aktivierung des Notch-Signalweges an (Pfeil).

In Säugetieren existieren zwei Orthologe von Lgd, LGD2/CC2D1A und LGD1/CC2D1B (CC2D1-Coiled-coil and C2 Domain-containing protein 1). *Lgd2/Cc2d1a* mutante Mäuse sterben kurz nach der Geburt aufgrund eines Atemdefekts (Zhao et al. 2011, Al-Tawashi et al. 2012, Chen et al. 2012, Drusenheimer et al. 2015). Ein Funktionsverlust von

Lgd1/Cc2d1b zeigt hingegen keine offensichtlichen Konsequenzen bezüglich der Entwicklung oder Lebensdauer homozygot mutanter Tiere (Drusenheimer et al. 2015). Doppelmutante Mäuse sterben dagegen bereits vor der Geburt (E11,5) (Zamarbide et al. 2018). Dieser verfrühte Todeszeitpunkt impliziert eine gewisse funktionelle Redundanz zwischen den beiden Lgd-Orthologen. Die Diskrepanz in der Letalität deutet jedoch zusätzlich auf funktionelle Unterschiede hin.

Interessanterweise ist ein Funktionsverlust von LGD2/CC2D1A im Menschen nicht letal, führt aber zu einer „nonsyndromic intellectual disability“ (NSID) und zu einer Autismus-Spektrum-Störung (ASD – atism spectrum disorder) (Basel-Vanagaite et al. 2006, Manzini et al. 2014).

Im Gegensatz zu LGD1/CC2D1B wurde für LGD2/CC2D1A bereits eine Vielzahl an Funktionen beschrieben. Diese scheinen jedoch in erster Linie nicht mit einer endosomalen Funktion verbunden zu sein. Ferner ist LGD2/CC2D1A an der Regulation diverser Signalwegen beteiligt. So ist LGD2/CC2D1A ein positiver Regulator des NFκB Signalweges (Matsuda et al. 2003, Zhao et al. 2010) und des cAMP/PKA Signalweges (Al-Tawashi et al. 2012, Al-Tawashi und Gehring 2013) und fungiert während des EGFR-Signalweges als Gerüstprotein, um PDK1/Akt zu rekrutieren und aktivieren (Nakamura et al. 2008, Yamada et al. 2013). Außerdem reguliert LGD2/CC2D1A während der angeborenen Immunantwort neben dem TLR- auch den RLR-Signalweg (Chang et al. 2011, Chen et al. 2012). Zumindest beim TLR- und EGFR-Signalweg lassen sich Effekte, die mit einer Reduktion oder Funktionsstörung von LGD/CC2D1-Proteinen einhergehen, teilweise auf einen Defekt in der ESCRT-Funktion oder zumindest auf eine mögliche Störung des endosomalen Systems zurückführen (Chang et al. 2011, Deshar et al. 2016).

Zusätzlich konnten weitere zelluläre Prozesse mit LGD2/CC2D1A in Verbindung gebracht werden. Centrosom-assoziiertes CC2D1A soll beispielsweise die Kohäsion der Zentriolen regulieren, indem es eine vorzeitige Trennung dieser verhindert (Nakamura et al. 2009). Überraschenderweise scheint LGD2/CC2D1A auch als transkriptioneller Repressor des Dopamin-D2 Rezeptors-Gens (*DRD2*) zu fungieren und so Einfluss auf die Neurotransmission von Dopamin zu nehmen (Rogaeva et al. 2007). Zudem scheinen beide humanen Orthologe (LGD/CC2D1) als Repressoren des Serotonin Rezeptor-Gens (*5-HT1A*) zu agieren (Ou et al. 2003, Rogaeva und Albert 2007).

Für LGD1/CC2D1B konnte kürzlich gezeigt werden, dass es an einem ESCRT-vermittelten Prozess beteiligt ist. Es ist essentiell für den korrekten zeitlichen Ablauf bei Reformierung und Schließung der Kernmembran während der Zellteilung (Ventimiglia et al. 2018).

Darüber hinaus deuten einige wenige vorangegangene Studien bereits an, dass eine endosomale Funktion, die für *Drosophila* Lgd beschrieben wurde, auch in Säugern konserviert sein könnte. So konnte bei einer Reduktion von LGD2/CC2D1A in HeLa-Zellen mit Hilfe einer quantitativen Multiparameteranalyse ein schwach negativer Effekt auf die EGF- und TF- (Transferrin) Endozytose bzw. ihren endosomalen Transport detektiert werden (Collinet et al. 2010). Zudem sind die Endosomen von *Cc2d1a*-mutanten MEF (Mouse Embyronic Fibroblasts)-Zellen wie auch die Endosomen in *lgd* mutanten Zellen in *Drosophila* signifikant vergrößert (Schneider et al. 2013, Drusenheimer et al. 2015). Des Weiteren kann endogenes LGD2/CC2D1A an der endosomalen Membran detektiert werden, sobald beispielsweise die ESCRT-Maschinerie durch Reduktion von Vps4 dort arretiert wird (Drusenheimer et al. 2015). Außerdem interagieren beide humanen Lgd-Orthologe mit allen drei Shrub-Orthologen, CHMP4A, CHMP4B und CHMP4C (Tsang et al. 2006, Usami et al. 2012). Zusätzlich interagiert LGD1/CC2D1B mit Vps2/CHMP2A und CHMP7, zwei weiteren Mitgliedern der CHMP-Familie (Ventimiglia et al. 2018). Außerdem können beide humane LGD/CC2D1-Proteine *Drosophila* Lgd, welches erwiesenermaßen im endosomalen Transportweg agiert, funktional ersetzen (Drusenheimer et al. 2015). Zusammen deuten diese bereits publizierten Daten an, dass die endosomale Funktion von Lgd-Proteinen auch in höheren Organismen konserviert sein könnte.

1.6 Ziele der Arbeit

Der Tumorsuppressor Lgd ist ein direkter Interaktionspartner der ESCRT-III Komponente Shrub. Über Shrub nimmt Lgd direkten Einfluss auf die ESCRT-Maschinerie und spielt daher in *Drosophila* eine entscheidende Rolle im lysosomalen Abbau von Transmembranproteinen der Plasmamembran (Troost et al. 2012, Schneider et al. 2013). Gegenstand dieser Arbeit ist eine genetische Analyse des Zusammenspiels von Lgd und Shrub im endosomalen Transportweg. Hierbei stehen u.a. die Auswirkungen des Funktionsverlusts von *lgd* auf Shrub und die ESCRT-vermittelte MVB-Biogenese im Mittelpunkt der Untersuchung. Die Analyse erfolgt u.a. mittels Transmissionselektronenmikroskopie. Es gilt zu klären, wie sich der Funktionsverlust von *lgd* auf den dynamischen Prozess der ILV-Bildung auswirkt.

Das humane Genom umfasst drei Shrub-Orthologe, CHMP4A, CHMP4B und CHMP4C (Katoh et al. 2003, Peck et al. 2004). Ihre direkte Interaktion mit den humanen Lgd-Orthologen (hLGD1/CC2D1B und hLGD2/CC2D1B) konnte bereits nachgewiesen werden (Tsang et al. 2006, Usami et al. 2012). Eine biologische Relevanz dieser Interaktionen vor allem im endosomalen Transportweg ist für höhere Metazoen unbekannt. Ferner sind mögliche Präferenzen und funktionale Unterschiede nur ansatzweise erforscht. Gegenstand dieser Arbeit ist daher nicht nur eine Charakterisierung der humanen CHMP4-Proteine und ihrer Funktionsweise im endosomalen Transportweg *in vivo*, sondern auch die Analyse ihres Zusammenspiels mit den beiden humanen Lgd-Orthologen. Hier gilt es zu klären, ob die hLGD1 und hLGD2 auf die gleiche Art und Weise im endosomalen Transportweg agieren wie ihr *Drosophila* Ortholog. Eine Expression der humanen Orthologe auf physiologischem Level unter Kontrolle des endogenen Promotors von *shrub* oder *lgd* ermöglicht in dieser Arbeit eine Analyse der humanen Komponenten *in vivo* in *Drosophila*.

Zusätzlich soll das assoziierte ESCRT-III Protein Dchmp7, welches unter den CHMP-Proteinen des ESCRT-III Komplexes einzigartig ist, charakterisiert werden. Da die ESCRT-Maschinerie u.a. die ILV-Biogenese vermittelt, stellt sich hier die Frage, ob Dchmp7, als Teil dieser Maschinerie, ebenfalls eine Rolle im endosomalen Transportweg spielt. Seine Funktionsanalyse erfolgt u.a. mit Hilfe von CRISPR/Cas9 in *Drosophila*. Hierdurch konnte zum ersten Mal der Funktionsverlust von *Dchmp7* in einem Organismus analysiert werden.

2 Ergebnisse

Gegenstand dieser Arbeit ist eine detaillierte, genetische Analyse der Interaktion von Lgd und Shrub (siehe 2.2). Zudem erfolgt mit Hilfe des Modelorganismus *Drosophila* eine ausführliche Charakterisierung ihrer humanen Orthologe *in vivo* (siehe 2.3). Dabei wird nicht nur ihre jeweilige Funktion analysiert, sondern auch ihr Zusammenspiel im endosomalen Transportweg. Entscheidend für die Analyse von Lgd und Shrub sowie ihrer humanen Orthologe ist ihre physiologische Expression auf endogenem Level (siehe 2.1). Zusätzlich erfolgt eine Charakterisierung des assoziierten ESCRT-III Proteins DChmp7 (siehe 2.5).

2.1 Expressionssysteme zur endogenen Expression von Shrub-Varianten

Die perfekte Abstimmung der einzelnen ESCRT-Komponenten aufeinander und ihr zeitliches Zusammenspiel sind entscheidend für die Funktionsfähigkeit der ESCRT-Maschinerie (Wenzel et al. 2018). In dieser Arbeit wurde daher für die Analyse der ESCRT-III Komponente Shrub und ihres Zusammenspiels mit dem Tumorsuppressor Lgd eine Überexpression vermieden. Es wurde auf eine physiologische Expression auf endogenem Level unter Kontrolle des *shrub*-Promotors zurückgegriffen. So wird das Risiko für mögliche Effekte aufgrund einer zu hohen bzw. niedrigen, zeitlich und räumlich inkorrekten Expression minimiert.

In früheren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass der Funktionsverlust von *shrub* durch das Transgen *shrubP-shrub* gerettet werden kann. Dieses Transgen umfasst die cDNA von *shrub*, die auf dem endogenen Level von Shrub exprimiert wird (Abb. 2-1 A). Hierfür wurde sie mit den genomischen Sequenzen, welche *upstream* bzw. *downstream* des Start- bzw. Stopp-Codons des *shrub* Gens liegen, flankiert und zielgerichtet mit Hilfe des attB/attP Systems in das Genom von *Drosophila* inseriert (Bischof et al. 2007). Diese Sequenzen (im folgenden *shrubP*) umfassen jeweils 510 bp, enthalten die 5' und 3'UTR und anscheinend alle notwendigen regulatorischen Elemente des *shrub* Gens (Abb. 2-1 A und (Masterarbeit Bäumers 2015, McMillan et al. 2016)).

Ein weiteres, zeitgleich entwickeltes System zur physiologischen Expression auf endogenem Level basiert auf einem BAC (Bacterial Artificial Chromosome) (Abb. 2-1 B) der den Genlocus von *shrub* enthält (*BAC^{shrub}*, CH322-47020 (Venken et al. 2009)). Er

wurde ebenfalls mit Hilfe des attB/attP System zielgerichtet ins Genom inseriert (Bischof et al. 2007).

Anzumerken ist, dass weder eine Insertion des Transgens *shrubP-shrub* noch des BAC-kлона, *BAC^{shrub}*, in die *landing site attP 86Fb* (drittes Chromosom), einen erkennbaren Einfluss auf die Entwicklung und Lebensfähigkeit der Fliegen hat. Fliegen, die homozygot für *shrubP-shrub* oder *BAC^{shrub}* sind, also zusätzlich zwei Kopien *shrubP-shrub* oder *BAC^{shrub}* exprimieren, zeigen keine offensichtlichen Defekte.

Des Weiteren sind alle im Verlauf dieser Arbeit analysierten *shrubP*- oder *BAC^{shrub}*-Transgene in die *landing site attP 86Fb* inseriert. Dadurch sollten Positionseffekte neutralisiert und eine identische Expressionsstärke zwischen den verschiedenen *shrubP*- aber auch zwischen den *BAC^{shrub}*-Konstrukten erreicht werden.

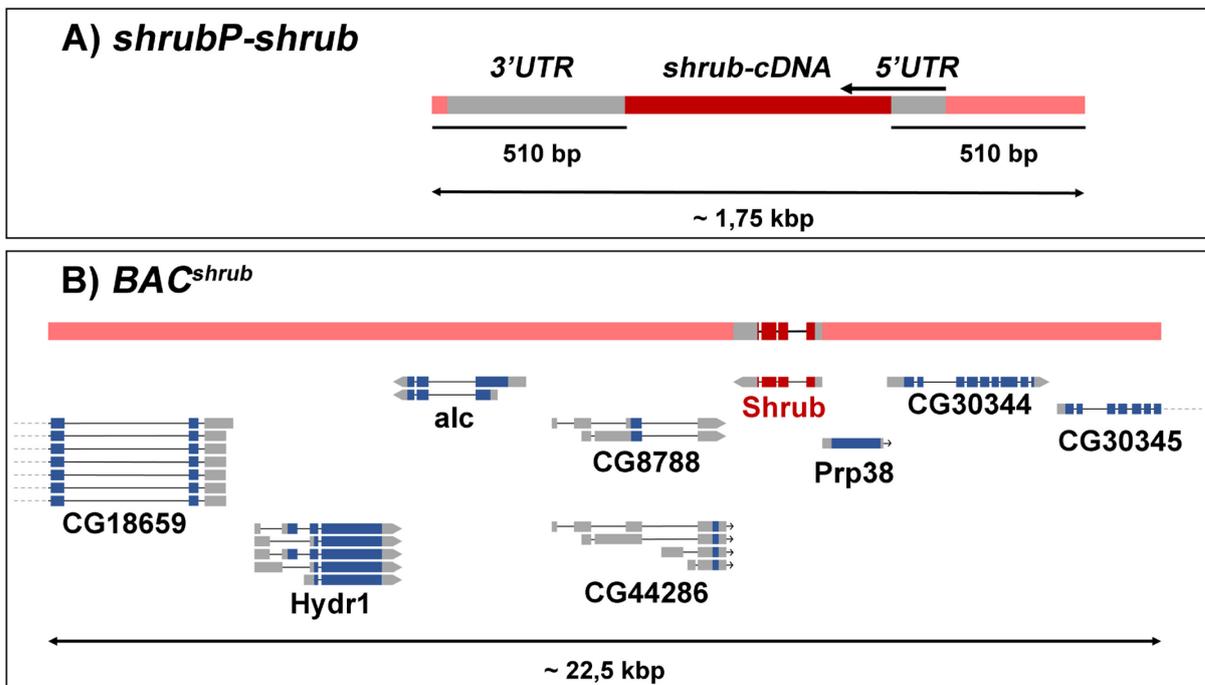


Abb. 2-1: Graphische Darstellung der zwei verschiedenen Expressionssysteme, (A) *shrubP-shrub* und (B) *BAC^{shrub}*. (A) Aufbau des kleineren, reduzierten Transgens *shrubP-shrub*: Es besteht aus der cDNA von *shrub* (dunkelrot), flankiert von jeweils 510 bp der genomischen Sequenz *upstream* bzw. *downstream* des Start- bzw. Stopp-Codons des *shrub*-Gens. Diese Sequenzen umfassen die 5' UTR und die 3' UTR des *shrub*-Gens (grau) (Masterarbeit Bäumers 2015, McMillan et al. 2016). (B) *BAC*-basiertes Expressionssystem: Der *BAC*-Klon (*BAC^{shrub}*, CH322-47020) ist Teil der "CHORI" *BAC*-Bibliothek, die durch einen partiellen Restriktionsverdau des Genoms von *Drosophila melanogaster* mit dem Enzym MboI und anschließender Klonierung in den attB-P[acman]-Vektor entstanden ist (Venken et al. 2009). *BAC^{shrub}* enthält nicht nur die gesamte genomische von *shrub* (dunkelrot), sondern auch noch angrenzende Bereiche. Insgesamt umfasst dieser angrenzende Bereich die genomischen Sequenzen von sechs annotierten Genen. Darunter befinden

sich vier bereits zum Teil charakterisierte Gene [(1) *Hydr1* (α/β hydrolase 1, *CG8058*), (2) *alicorn* (*alc*, *CG8057*), (3) *Prp38* (*CG30342*) und (4) *CG30344*] und zwei bisher nicht charakterisierte Gene [*CG8788* und *CG44286*]. *CG18659* und *CG30345* sind an den jeweiligen Enden der genomischen Sequenz des *BAC*-Klons. Sie sind nicht vollständig vorhanden. (Anmerkungen zu den einzelnen Genen siehe 6.1.5).

Die Funktionsfähigkeit dieser beiden Expressionssysteme, *shrubP-shrub* und *BAC^{shrub}*; lässt sich anhand ihrer Rettungsfähigkeit gegenüber der *shrub* mutanten Situation festmachen (Abb. 2-2). Ein Funktionsverlust von *shrub* in *Drosophila* führt zur ektopischen Aktivierung des Notch-Signalweges, zum Verlust der epithelialen Integrität und zu einer Letalität während der Embryogenese (Thompson et al. 2005, Sweeney et al. 2006, Vaccari et al. 2009, Hori et al. 2011). Für die folgenden Rettungsexperimente wurde auf das amorphe *shrub⁴⁻¹*-Allel zurückgegriffen (Sweeney et al. 2006). Dieses Allel ist in Homozygose embryonal letal, in Heterozygose sind die Fliegen lebensfähig und haben keine äußerlichen phänotypischen Auffälligkeiten (Abb. 2-2). Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine Kopie des Transgens *BAC^{shrub}* den *shrub⁴⁻¹* mutanten Phänotyp komplett retten kann (Diplomarbeit Bohnen 2014, Masterarbeit Bäumers 2015). Die geretteten Fliegen erscheinen äußerlich wildtypisch und sind fertil. Die Entwicklung von fertilen, adulten Fliegen bestätigt, dass alle notwendigen regulatorischen Elemente vorhanden sind (Abb. 2-2).

Auch die Expression des kleineren und daher reduzierten Transgens *shrubP-shrub* führt in zwei Kopien zur kompletten Rettung (Masterarbeit Bäumers 2015). Allerdings konnte während dieser Arbeit gezeigt werden, dass Fliegen, die nur eine Kopie dieses Transgens in sich tragen, als sogenannte *pharate adults* im späten Puppenstadium sterben. Die ausdifferenzierten Fliegen verbleiben hierbei in der Puppe und schlüpfen nicht. Vereinzelt sind adulte Tiere, sogenannte *escapers* zu finden, die aber zeitnah sterben (Abb. 2-2).

Dies impliziert, dass bei einer erhöhten Anzahl von *shrubP*-Transgenen im Genom eine erhöhte *Shrub*-Expression vorliegt (vgl. das Rettungsvermögen von einer Kopie mit dem von zwei Kopien *shrubP-shrub*, Abb. 2-2). Andernfalls wäre eine verbesserte Rettung nicht erklärbar. Auch nachfolgende Experimente mit dem *BAC^{shrub}*-System legen den Schluss nahe (siehe beispielsweise 2.2.1), dass bei einer Erhöhung von einer Kopie auf zwei Kopien des *BAC^{shrub}*-Transgens mehr Protein exprimiert wird. Zur genauen Bestimmung der Veränderung des Expressionslevels sollte in einem zukünftigen Experiment jedoch eine Western Blot-Analyse durchgeführt werden.

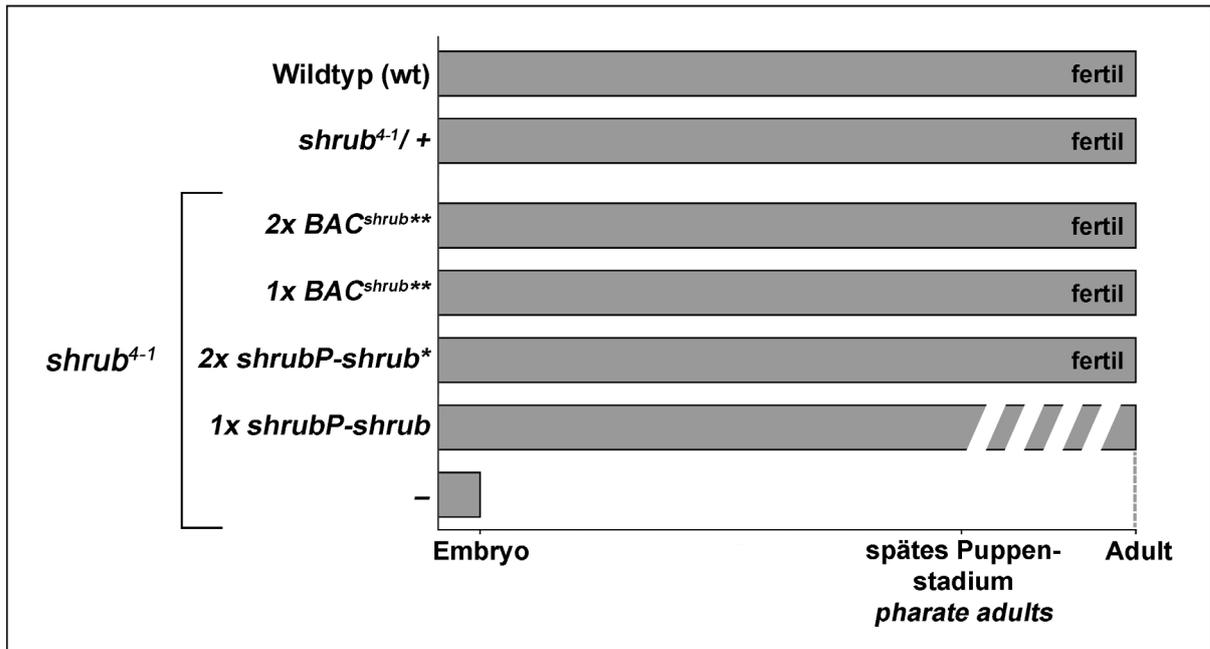


Abb. 2-2: $shrubP-shrub$ und BAC^{shrub} können den $shrub^{4-1}$ mutanten Hintergrund retten. Die Funktionalität der beiden Systeme lässt sich anhand des Rettungsvermögens gegenüber der $shrub$ null-mutanten Situation ($shrub^{4-1}$) festmachen. Das Nullallel $shrub^{4-1}$ verursacht in Heterozygose keinen äußerlich erkennbaren Defekte (fertile adulte Fliegen), in Homozygose ist es hingegen embryonal letal (Sweeney et al. 2006). Bereits eine Kopie BAC^{shrub} ist ausreichend um den Funktionsverlust von $shrub$ ($shrub^{4-1}$ homozygot) vollständig zu retten. Im Gegensatz dazu benötigt es zwei Kopien des reduzierten Transgens $shrubP-shrub$. Bei nur einer Kopie sterben die Fliegen meist als *pharate adults*. Es gibt zwar vereinzelt *escapers*, diese sterben jedoch zeitnah. Bereits veröffentlichte Daten: * (Masterarbeit Bäumers 2015), ** (Diplomarbeit Bohnen 2014, Masterarbeit Bäumers 2015).

Mit Hilfe der beiden Expressionssysteme können auch verschiedener Shrub-Varianten (siehe 2.2) oder -Orthologe (siehe 2.3, 2.4) auf dem endogenen Level von *Drosophila* Shrub exprimiert werden. Beide Systeme ermöglichen für sich jeweils eine vergleichbare, physiologische Expression unter Kontrolle des $shrub$ -Promotors und seiner regulatorischen Elemente.

Seit Jahren existiert im Feld der ESCRT-Forschung eine große Kontroverse darüber, ob durch einen Protein-Tag die Funktionalität der ESCRT-III Untereinheiten gestört wird oder nicht. Auch ist umstritten, ob hierbei eine C- oder N-terminale Markierung sinnvoller ist. Oft basieren die durchgeführten Studien auf Zellkultur-Experimenten, kombiniert mit einer Überexpression des zu untersuchenden ESCRT-III Proteins. Dies erschwert eine solide Bewertung der Funktionalität. An dieser Stelle bietet sich *Drosophila melanogaster* als *in vivo* Testsystem an. Durch Rettungsexperimente kann überprüft werden, ob Shrub

trotz Protein-Tag funktional ist. Für diese Analyse wurde eine Vielzahl an unterschiedlich markierten Shrub-Varianten generiert (Anhang, Abb. 9-1). Der Fokus lag vor allem auf einer N-terminalen Markierung, da am C-Terminus von Shrub eine autoinhibitorische Region ist (Zamborlini et al. 2006, Shim et al. 2007, Lata et al. 2008b, Bajorek et al. 2009b). Ihre Flexibilität/Beweglichkeit ist entscheidend für die Konformationsänderung des ESCRT-III Proteins (Lata et al. 2008b, Saksena et al. 2009, Henne et al. 2012, Tang et al. 2015). Zudem haben mehre Studien bereits gezeigt, dass eine Markierung am C-Terminus der ESCRT-III Proteine, die Funktion negativ beeinflusst. Es wird u.a. die richtige Polymerisierung an der endosomalen Membran verhindert (Ward et al. 2005, Sweeney et al. 2006, Zamborlini et al. 2006). Die Funktionalität der generierten Shrub-Konstrukte (Anhang, Abb. 9-1) wurde mit Hilfe von *in vivo* Rettungsexperimenten untersucht. Alle analysierten Shrub-Konstrukte wurden dafür mit Hilfe des reduzierten Expressionssystems (*shrubP*) auf endogenen Level im *shrub* null-mutanten Hintergrund (*shrub⁴⁻¹*) exprimiert. So konnte aufgedeckt werden, ob die exprimierten Shrub-Varianten den Verlust des endogenen Proteins kompensieren können, indem sie dessen Funktion übernehmen (Anhang, Tabelle 9-1). Drei der acht generierten Shrub-Konstrukte sind funktional, darunter Myc-Shrub, V5-Shrub und HA-Shrub (Anhang, Tabelle 9-1). Alle Drei zeichnen sich durch einen kleinen N-terminalen Protein-Tag ohne eine Linkersequenz aus (Myc-Tag 10 Aminosäuren (aa); HA-Tag und V5-Tag 9 aa). Eine Markierung am C-Terminus, ein größerer Protein-Tag am N-Terminus oder auch nur ein flexibler Linker zwischen HA-Tag und Protein sind schädlich für die Funktion von Shrub (Anhang, Tabelle 9-1).

2.2 Lgd reguliert die Aktivität der ESCRT-III Komponente Shrub

Zentrales Element dieser Arbeit ist die Analyse von Lgd und seiner Funktion im endosomalen Transportweg. Hierbei soll der Einfluss von Lgd auf die ESCRT-Maschinerie insbesondere auf die ESCRT-III Untereinheit Shrub untersucht werden. Dabei wird auf die in 2.1 beschriebenen, endogenen Expressionssysteme von Shrub (*BAC^{shrub}* und *shrubP*) zurückgegriffen. Da die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung in ihrer Auflösung begrenzt ist, erfolgt zusätzlich eine Analyse der Auswirkungen, u.a. auf Morphologie und ILV-Bildung der Endosomen, auf ultrastruktureller Ebene mittels Transmissions-elektronenmikroskopie (TEM).

2.2.1 Eine Erhöhung der Shrub Konzentration rettet den Funktionsverlust von *lgd*

Bei einem Funktionsverlust des Tumorsuppressor *lgd* kommt es zu einer ektoptischen, ligandenunabhängigen Aktivierung des Notch-Signalweges und seiner Zielgene (Buratovich und Bryant 1995, Klein 2003, Childress et al. 2006, Gallagher und Knoblich 2006, Jaekel und Klein 2006). Dies ist auf einen Defekt im endosomalen Transportweg zurückzuführen. Ursache hierfür scheint eine Reduktion der Aktivität der ESCRT-III Komponente Shrub zu sein (Troost et al. 2012, Schneider et al. 2013). Experimente, basierend auf einer Erhöhung der endogenen Shrub-Konzentration in *lgd* mutanten Fliegen, stützen diese Annahme (Masterarbeit Bäumers 2015). Hierbei konnte bereits gezeigt werden, dass, durch die Expression von zwei zusätzlichen Kopien des endogenen Genlocus von *shrub* (*BAC^{shrub}*), der Funktionsverlust von *lgd* kompensiert werden kann (Abb. 2-3). Die Fliegen sterben nicht mehr wie für den Funktionsverlust von *lgd* charakteristisch, während des frühen Puppenstadiums nach verlängerter larvaler Lebensphase (Bryant und Schubiger 1971), sondern entwickeln sich zu adulten Tieren. Diese adulten Tiere sind jedoch steril (beide Geschlechter) (Abb. 2-3 und (Masterarbeit Bäumers 2015)).

Die für den *lgd*-Funktionsverlust typische ektoptische Aktivierung des Notch-Signalweges (Klein 2003) lässt sich in der Flügelimaginalscheibe von späten L3-Larven mit Hilfe des endogenen Notch-Zielgens *wingless* und dem sensitiveren, synthetischen Notch-Reportergenkonstrukt *Gbe+Su(H)* detektieren (siehe 6.6.8) (Furriols und Bray 2001). Im Wildtyp (wt) ist die Notch-abhängige *Wg*-Expression (Abb. 2-4 A, Pfeil) auf einen

schmalen Streifen entlang der D/V-Grenze beschränkt. Zusätzlich wird *wg* Notch-unabhängig im Notum (Abb. 2-4 A, Stern) und in zwei Kreisen (Abb. 2-4 A, Pfeilkopf), welche das Flügelfeld einrahmen, exprimiert (Übersicht in Klein 2001). Die Expression kann mittels indirekter Antikörperfärbung gegen *Wg* detektiert werden. Bei einem Funktionsverlust von *lgd*, wie es unter Verwendung des amorphen Allel *lgd^{dl7}* (Jaekel und Klein 2006) der Fall ist, kommt es zur deutlichen Verbreiterung der *wg*-Expressionsdomäne an dieser Grenze im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 2-4, vgl. B mit A) (Buratovich und Bryant 1995, Buratovich und Bryant 1997). Auch *Gbe+Su(H)* hat in wildtypischen Flügelimagnalscheiben ein charakteristisches Expressionsmuster, mit einer starken Expression entlang der D/V-Grenze (Abb. 2-4 A') (Furriols und Bray 2001). Hier führt der Verlust von *lgd* zu einer ubiquitären Expression von *Gbe+Su(H)* in der Flügelimagnalscheibe ohne spezifisches Muster (Abb. 2-4 B') (Jaekel und Klein 2006). Als Konsequenz der ektopischen Aktivierung des Notch-Signalweges kommt es zudem zur Überproliferation der Imaginalscheibe (Abb. 2-4 B, B') (Klein 2003).

Diese ektopische Aktivierung des Notch-Signalweges kann durch die zusätzliche Expression von zwei Kopien *BAC^{shrub}* unterbunden werden (Masterarbeit Bäumers 2015). Hierbei zeigen sowohl das endogene Notch-Zielgen *wg* als auch *Gbe+Su(H)* ein wildtypisches Expressionsmuster (Abb. 2-4 D, D'). Bereits die Expression von nur einer Kopie *BAC^{shrub}* unterdrückt in der Flügelimagnalscheibe die ektopische Aktivierung des Notch-Signalweges beinahe vollständig (Abb. 2-4 C, C'). Die Expression von *wg* ist auf den schmalen Streifen entlang der D/V-Grenze begrenzt (Abb. 2-4 C). Nur das sensitivere Reportergerkonstrukt *Gbe+Su(H)* zeigt noch eine schwache ektopische Aktivierung (Abb. 2-4 C'). Die Tiere sterben als *pharate adults* und schlüpfen nicht, wie es bei zwei Kopien *BAC^{shrub}* der Fall ist (Abb. 2-3) (Masterarbeit Bäumers 2015).

Die Beobachtung, dass eine Erhöhung der Shrub-Konzentration den Funktionsverlust von *lgd* rettet, wird durch neue Erkenntnisse in dieser Arbeit gestützt.

BAC^{shrub-mut2} ist eine *BAC^{shrub}*-Variante, bei der nur durch den Austausch von drei Aminosäuren (E86R, E90R und E93R in Shrub, angelehnt an CHMP4B^{mut2} (E90R, E94R, E97R (Martinelli et al. 2012))), die negative Oberfläche von Shrub zerstört und damit ihre Fähigkeit zu polymerisieren unterbunden ist (Martinelli et al. 2012, Diplomarbeit Bohnen 2014, McMillan et al. 2016). Eine Expression von *BAC^{shrub-mut2}*, zusätzlich zum endogenen *shrub*, rettet den *lgd* mutanten Phänotyp nicht (Abb. 2-3). Im Gegenteil, die

Fliegen sterben in Anwesenheit von zwei Kopien $BAC^{shrub-mut2}$ sogar früher und zwar schon vor dem dritten Larvenstadium (L3) (vereinzelt frühe L3 Larven, wie lgd^{d7} , $shrub^{4-1}/lgd^{d7}$, + (Troost et al. 2012)) (Abb. 2-3). Dies unterstreicht, dass die Transkriptionseinheit von *shrub* in BAC^{shrub} für die Rettung von lgd^{d7} verantwortlich ist. Anzumerken ist hier, dass adulte Fliegen, die rein homozygot für $BAC^{shrub-mut2}$ sind, keine offensichtlichen Defekte aufweisen.

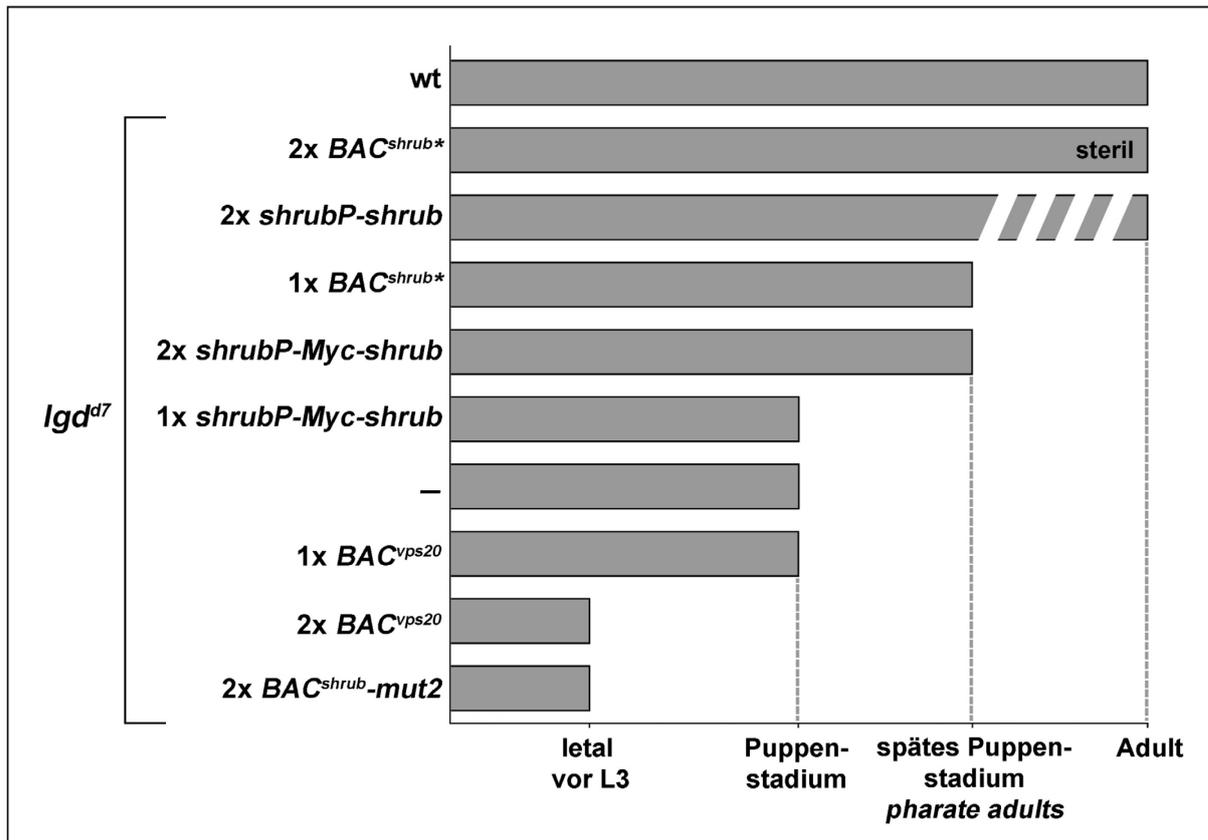


Abb. 2-3: Graphische Übersicht über die Entwicklungsstadien, die lgd^{d7} mutante Fliegen aufgrund einer Insertion verschiedener Transgene erreichen. lgd mutante Tiere sterben während des frühen Puppenstadiums (Bryant und Schubiger 1971). Eine Erhöhung der Proteinkonzentration der ESCRT-III Komponente Shrub durch BAC^{shrub} oder durch das reduzierte System *shrubP* hat einen positiven Einfluss auf die Entwicklung. Hierbei werden mehrere Abstufungen des lgd^{d7} mutanten Phänotyps bis zu einer vollständigen Rettung der Letalität sichtbar. Bei zwei zusätzlichen Kopien *shrubP-shrub* werden vereinzelt adulte Tiere gesichtet. Meist sterben sie jedoch vor dem Schlüpfen als *pharate adults*. Eine Erhöhung der Konzentration der ESCRT-III Komponente Vps20 hat hingegen einen negativen Einfluss auf die Entwicklung von lgd^{d7} mutanten Fliegen. In Anwesenheit von zwei Kopien BAC^{vps20} sterben sie vor dem dritten Larvenstadium (L3) und damit früher als für den Funktionsverlust von *lgd* charakteristisch. Die Expression einer nicht-funktionalen Shrub-Variante, $Shrub^{mut2}$ (Diplomarbeit Bohnen 2014), hat ebenfalls einen negativen Einfluss auf die Entwicklung. Aufgrund einer Ladungsumkehr der ursprünglich negativ geladenen Oberfläche von Shrub, kann diese Shrub-Variante nicht mehr polymerisieren (Martinelli et al.

2012, McMillan et al. 2016) und die *lgd^{d7}* mutanten Tiere sterben vor dem späten dritten Larvenstadium. Die mit * markierten Ergebnisse wurden bereits veröffentlicht (Masterarbeit Bäumers 2015).

Weiterhin reicht auch nur die Expression von *shrub^{cDNA}* mit Hilfe des alternativen und reduzierten Expressionssystems *shrubP* (siehe 2.1) aus, um den Funktionsverlust von *lgd* beinahe vollständig zu retten. Bei einer Expression von zwei Kopien des Transgens *shrubP-shrub* sind vereinzelt adulte Tiere zu beobachten (Abb. 2-3). Meist sterben die Fliegen jedoch in der Puppe, da sie scheitern zu schlüpfen. Auch N-terminal markiertes Myc-Shrub (siehe 2.1) ist in der Lage den *lgd^{d7}* mutanten Phänotyp partiell zu retten. In Anwesenheit von zwei Kopien des Transgens *shrubP-Myc-shrub* sterben die Fliegen nicht mehr, wie für den *lgd*-Verlust charakteristisch während des Puppenstadiums, sondern entwickeln sich zu *pharate adults* (Abb. 2-3). Zudem ist keine ektopische Aktivierung mit Hilfe des endogenen Notch-Zielgens *wg* in der Flügelimaginalscheibe detektierbar (Abb. 2-4 F). Auch im Fall von nur einer Kopie *shrubP-Myc-shrub* zeigt sich bereits eine Unterdrückung der ektopischen Aktivierung des Notch-Signalweges (Abb. 2-4 E, E'). Das endogene Zielgen *wg* ist nur noch in einigen wenigen Zellen unterhalb der D/V-Grenze aktiv (Abb. 2-4 E, Pfeil), wohingegen *Gbe+Su(H)* weiterhin verstärkt in der gesamten Scheibe exprimiert wird (Abb. 2-4, E'). Diese Expression ist jedoch schwächer als in *lgd* mutanten Flügelimaginalscheiben (Abb. 2-4, vgl. E' mit B'). Es ist bereits das für *Gbe+Su(H)* spezifische Expressionsmuster zu erahnen. Eine Konsequenz dieser reduzierten ektopischen Aktivität ist die schwächere Überproliferation der Imaginalscheibe. Allerdings sterben die Tiere, mit nur einer zusätzlichen Kopie *shrubP-Myc-shrub*, im frühen Puppenstadium, wie für *lgd^{d7}* mutante Tiere typisch (Abb. 2-3).

Zusätzlich stellt sich die Frage, ob auch durch Erhöhung der Konzentration einer anderen ESCRT-III Untereinheit der Funktionsverlust von *lgd* kompensiert werden kann. Hierfür wurde wiederum auf einen *BAC* zurückgegriffen, der den Genlocus von *vps20* enthält (*BAC^{vps20}*, CH322-09008) (Venken et al. 2009). *Vps20* ist die erste ESCRT-III Untereinheit und der Initiator für die Shrub-Polymerisation an der endosomalen Membran (Teis et al. 2008).

Zunächst wurde überprüft, ob *BAC^{vps20}* den Funktionsverlust von *vps20* kompensieren kann und daher funktional ist. Zu diesem Zweck wurde auf zwei bereits publizierte Allele von *vps20* zurückgegriffen. Dabei handelt es sich zum einen um das Allel *vps20^{l3}* (Vaccari et al. 2009), ein potenzielles Nullallel aufgrund einer Leserasterverschiebung durch eine

Punktmutation nach Aminosäure 61 (Vps20 212 aa), und zum anderen um das Allel *vps20^{rG270}* (Kahsai et al. 2016). Während *vps20^{l3}* mit Hilfe von EMS (Ethylmethansulfonat)-Mutagenese erzeugt wurde (Vaccari et al. 2009), basiert *vps20^{rG270}* auf einer P-Element Transposition/Insertion (Kahsai et al. 2016). *vps20^{l3}* ist sowohl in Homozygose also auch in Hemizygotie über einer entsprechenden Deletion, die den *vps20* Locus umfasst, im L1 Larvenstadium letal (Vaccari et al. 2009). Fliegen, die homozygot für *vps20^{rG270}* oder hemizygot für *vps20^{rG270}* über der passenden Deletion (*Df(2R)X58-12*) sind, sterben ebenfalls früher und erreichen daher nicht das adulte Stadium (Kahsai et al. 2016).

BAC^{vps20} kann bereits in einer Kopie (*attP 68E*) den *vps20^{rG270}* mutanten Hintergrund retten. Es finden sich adulte Tiere, wobei ein Teil der ausdifferenzierten Tiere nicht schlüpft. Liegt *vps20^{l3}/vps20^{rG270}* in Transheterozygose vor, ist ebenfalls die Expression von einer Kopie für die Rettung ausreichend. Hier schlüpfen alle Tiere und sterben nicht wie für *vps20^{l3}/vps20^{rG270}* charakteristisch bereits vor dem frühen dritten Larvenstadium (L3). Folglich ist *BAC^{vps20}* funktional, da es den Funktionsverlust von *vps20* retten kann. Aufbauend auf diesem Ergebnis wurde anschließend *BAC^{vps20}* im *lgd* null-mutanten Hintergrund (*lgd^{d7}/lgd^{d7}*) exprimiert. Im Gegensatz zu *BAC^{shrub}* zeigt die Expression von einer Kopie *BAC^{vps20}* keine Rettung des *lgd^{d7}* mutanten Phänotyps (Abb. 2-3). Es ist weiterhin eine starke ektopische Aktivierung des Notch-Signalweges zu beobachten (Abb. 2-4 G, G'). Im Fall des Zielgens *wg* scheint die ektopische Aktivierung sogar minimal stärker zu sein. Hier reicht die *Wg*-Expression bis an den Rand der Imaginalscheibe (Abb. 2-4 G, Peil). Die Expression von zwei Kopien *BAC^{vps20}* führt hingegen zu einer verfrühten Letalität (Abb. 2-3). Die Larven sterben vor Erreichen des dritten Larvenstadiums (L3) und somit vor dem frühen Puppenstadium wie es für den Verlust von *lgd* allein charakteristisch ist.

Dies zeigt, dass hier eine Spezifität für die ESCRT-III Untereinheit Shrub vorliegt und eine Erhöhung der Konzentration einer anderen Komponente wie Vps20 den *lgd* mutanten Phänotyp verschlechtert.

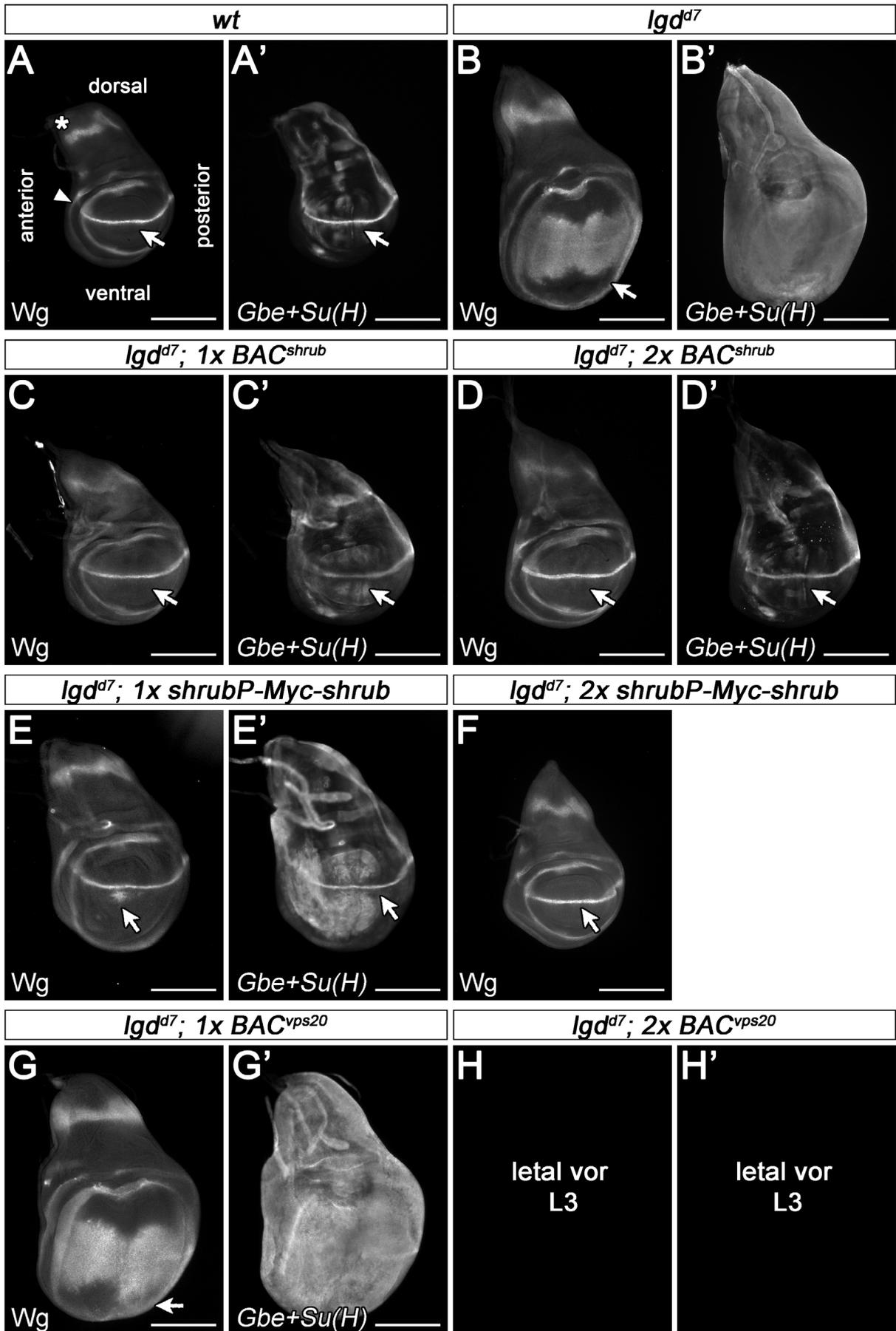


Abb. 2-4: Eine Erhöhung der Shrub-Konzentration verhindert eine, durch den *lgd*-Funktionsverlust verursachte, ektopische Aktivierung des Notch-Signalweges. (A-F) Rettung des *lgd^{d7}* mutanten Hintergrundes durch Expression verschiedener *shrub*-Transgene oder (G-H') durch die Anwesenheit eines BACs, der den endogenen Genlocus von *vps20* enthält. Die Analyse der Notch-Aktivität erfolgt mit Hilfe von Flügelimaginalscheiben des dritten Larvenstadiums von *Drosophila melanogaster*. (A-H) Detektion der Wg Expression mittels indirekter Antikörperfärbung. (A'-H') Nachweis der Notch-Aktivität durch Verwendung des Reportergenkonstrukts *Gbe+Su(H)*. (A, A') Abbildung einer wildtypischen Imaginalscheibe. Die Pfeile zeigen auf die Expressionsdomänen entlang der D/V-Grenze. (A) Zusätzliche Kennzeichnung der Ausrichtung und Orientierung der Imaginalscheiben und Markierung der Notch-unabhängigen Aktivierung von *wg* im Notum (Stern) und im Flügelfeld (Pfeilspitze). (B, B') Bei einem Funktionsverlust von *lgd* (*lgd^{d7}*) kommt es zu einer Verbreiterung der Notch-abhängigen Expressionsdomäne von Wg (B, Pfeil) und einer gleichmäßigen Aktivierung von *Gbe+Su(H)* (B) in der gesamten Imaginalscheibe. (C-D') Rettung des *lgd* mutanten Phänotyp durch zusätzliche Expression einer Kopie *BAC^{shrub}* (C, C') oder zwei Kopien *BAC^{shrub}* (D, D'). Nur in Anwesenheit von einer Kopie *BAC^{shrub}* ist noch eine leichte ektopische Aktivierung von *Gbe+Su(H)* sichtbar (C'), ansonsten sind *wg* (C, D) und *Gbe+Su(H)* (D') wildtypisch exprimiert. (E, F) Expression von einer oder zwei Kopien des reduzierten *shrub*-Transgens *shrubP-Myc-shrub* im *lgd^{d7}* mutanten Hintergrund. Hier zeigt sich eine Reduktion der ektopischen Aktivierung (E, E', *1x shrubP-Myc-shrub*) und eine wildtypische Expression von *wg* in Anwesenheit von zwei Kopien des Transgens *shrubP-Myc-shrub* (F). (G-H') Konsequenzen einer schrittweisen Erhöhung der Konzentration der ESCRT-III Untereinheit Vps20 auf die ektopische Notch-Aktivität bei Funktionsverlust von *lgd*. (G, G') Expression von einer Kopie *BAC^{vps20}* oder (H, H') zwei Kopien *BAC^{vps20}* im *lgd^{d7}* mutanten Hintergrund. (G, G') In Gegenwart von einer Kopie *BAC^{vps20}* zeigt sich keine Reduktion der ektopischen Aktivierung des Notch-Signalweges. Im Gegenteil, eine Antikörperfärbung gegen Wg offenbart eher eine minimale Verschlechterung, da dessen ektopische Expression nun bis zum Rand der Imaginalscheibe reicht (G, Pfeil, vergleiche mit B). (H, H') In Anwesenheit von zwei Kopien *BAC^{vps20}* sterben die Tiere vor Erreichen des dritten Larvenstadiums. (A, A', C-D' aus der eigenen Masterarbeit übernommen (Masterarbeit Bäumers 2015)). Maßstabsbalken: (A-G') 200 µm.

Insgesamt bestätigen diese Ergebnisse, dass der Funktionsverlust von *lgd* durch eine spezifische Erhöhung der Shrub-Konzentration in der Zelle kompensiert werden kann. Dies unterstützt die Annahme, dass Lgd für die vollständige Aktivität der ESCRT-III Untereinheit Shrub gebraucht wird.

2.2.2 *lgd^{d7}* mutante Endosomen sind vergrößert, weisen aber einen unveränderten ILV-Anteil auf

Für eine Aktivierung des Notch-Signalweges ist es notwendig, dass die intrazelluläre Domäne des Notch-Rezeptors (NICD) in Kontakt mit dem Zytosol ist. Anderenfalls kann diese Domäne nicht ins Zytosol freigesetzt werden, in den Zellkern translozieren und dort Notch-Zielgene wie *wg* aktivieren (siehe 1.1). Während des regulären endosomalen Transports wird Notch jedoch in ILVs verpackt (siehe 1.2). Die intrazelluläre Domäne kann dann nicht mehr in den Zellkern gelangen und dort als Transkriptionsaktivator fungieren (Übersicht in Schnute et al. 2018). Allein diese Tatsache deutet bereits an, dass in *lgd^{d7}* mutanten Zellen ein Teil der Notch-Rezeptoren an der limitierenden Membran der Endosomen verbleiben muss. Andernfalls wäre eine ektopische Aktivierung des Notch-Signalweges während des lysosomalen Abbaus, wie sie in *lgd^{d7}* mutanten Zellen beobachtet wird (siehe 1.5 (Schneider et al. 2013)), nicht möglich. Bereits durchgeführte Experimente, basierend auf einer Notch-Rezeptor-Variante, die simultan mit GFP und mCherry markiert wurde, unterstützen diese Annahme (Couturier et al. 2014). Dort konnte gezeigt werden, dass eine Fraktion von Notch in *lgd^{d7}* mutanten Zellen an der endosomalen Membran verbleibt, anstatt in das Lumen inkorporiert zu werden (ILV-Biogenese). Eine Erklärung für den Verbleib dieser Fraktion ist, dass aufgrund einer reduzierten Shrub-Aktivität bei Funktionsverlust von *lgd* (Troost et al. 2012) keine, beziehungsweise eine reduzierte ILV-Bildung stattfindet oder ein Teil der Notch-Rezeptoren nicht in die sich bildende ILVs inkorporiert wird.

Bisherige elektronenmikroskopische (EM-) Analysen haben bereits gezeigt, dass eine ILV-Bildung in *lgd-RNAi* exprimierenden Zellen weiterhin stattfindet, aber die Endosomen signifikant vergrößert sind (Schneider et al. 2013, Dissertation Troost 2013). Um daher eine mögliche reduzierte ILV-Bildung aufzudecken, wurde in dieser Arbeit der Anteil an elektronendichtem Material innerhalb der reifenden Endosomen in den EM-Aufnahmen mit Hilfe eines Makros für die Bildbearbeitungs-Software „Fiji“ quantifiziert (Abb. 2-5) (siehe 6.5). Da sich das elektronendichte Material aus den inkorporierten ILVs zusammensetzt, fungiert die Erfassung und Quantifizierung dieses Materials innerhalb der reifenden Endosomen als Indikator für die ILV-Bildung. Aufgrund dieser ILVs werden diese reifenden Endosomen auch als MVBs bezeichnet (siehe 1.2).

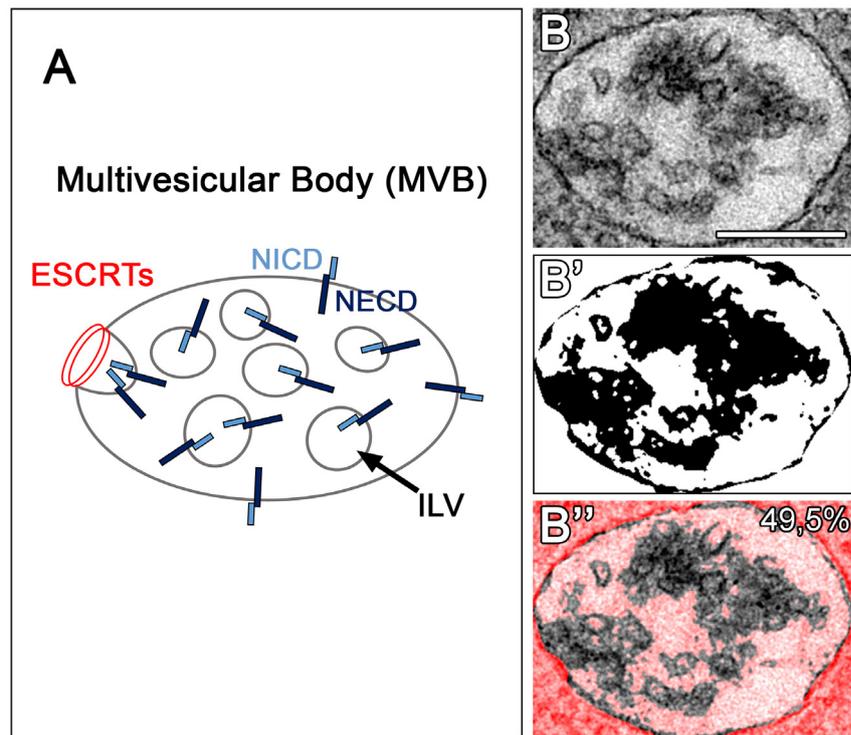


Abb. 2-5: Quantifizierung des ILV-Anteils am Beispiel eines wildtypischen MVBs. (A) Schematische Darstellung eines MVBs inklusive Notch-Rezeptoren (NICD – Intrazelluläre Domäne von Notch; NECD – Extrazelluläre Domäne von Notch). (B-B'') Funktionsweise des entwickelten Makros (neu entwickelte Analysetechnik) anhand eines repräsentativen, wildtypischen MVBs: Ziel ist die Erfassung und Quantifizierung des elektronendichten Materials innerhalb des MVBs. Das elektronendichte Material dient als Indikator für die ILV-Bildung. (B') Binäre Maske des von der Umgebung abgegrenzten MVBs. Basis ist der „Huang-Algorithmus“. Mit diesem Algorithmus wird ein Schwellenwert bzw. ein Graustufenwert festgelegt, ab dem ein Pixel innerhalb des endosomalen Lumens zum elektronendichten Material gezählt wird. In Schwarz eingezeichnet ist hier der als elektronendicht erfasste Bereich. (B'') Überlagerung des MVBs mit seiner binären Maske. In rot eingefärbt ist der Bereich der nicht als elektronendicht erfasst wurde. Angegeben ist der berechnete ILV-Anteil des MVBs. In diesem Fall machen 49,5 % der Gesamtfläche des MVBs elektronendichtes Material/ILVs aus. Maßstabsbalken: (B) 250 nm.

Zunächst wurde die Anwendbarkeit der selbstentwickelten Analysetechnik (Abb. 2-5) zur Bestimmung des elektronendichten Materials innerhalb der MVBs überprüft. Hierfür wurde eine genetische Situation generiert, bei der eine Veränderung des ILV-Anteils aufgrund einer direkten Manipulation der ESCRT-III Komponente Shrub zu erwarten ist. Diese Manipulation erfolgte durch eine Überexpression von N-terminal Myc-markiertem Shrub oder Shrub Δ auto (Abb. 2-6) für 13 h durch das Gal4/UAS-System (siehe 6.6.4). Für eine Expression im posterioren Kompartiment der Flügelimaginalscheibe wurde auf die Gal4-Treiberlinie *hedgehogGal4* (*hhGal4*) zurückgegriffen. Diese ermöglicht einen

direkten Vergleich von wildtypischen Zellen anterior und Konstrukt-exprimierenden Zellen posterior in derselben Imaginalscheibe.

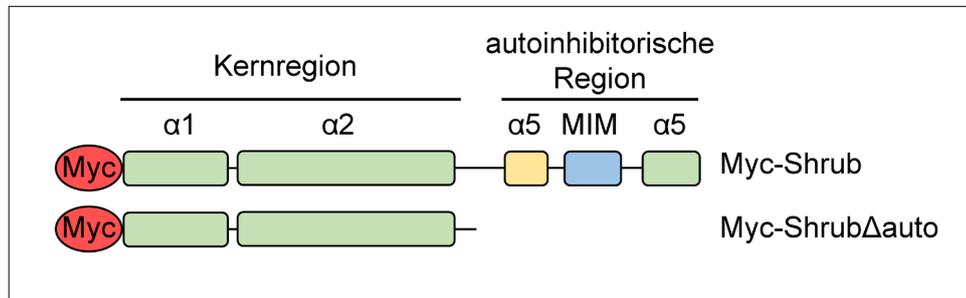


Abb. 2-6: Graphische Darstellung von Myc-Shrub und Myc-ShrubΔauto. Die Kernregion von Shrub liegt am N-Terminus und ist entscheidend für die Polymerisation der ESCRT-III Untereinheit (McMillan et al. 2016). Am C-Terminus befindet sich die autoinhibitorische Region (Zamborlini et al. 2006, Shim et al. 2007, Lata et al. 2008b, Bajorek et al. 2009b). Sie zeichnet sich durch eine MIM-Domäne aus, über welche die ATPase Vps4 bindet (Obita et al. 2007, Stuchell-Brereton et al. 2007, Bajorek et al. 2009a). Sowohl Myc-Shrub als auch Myc-ShrubΔauto weisen am N-Terminus einen Myc-Tag auf, jedoch besteht Myc-ShrubΔauto, im Gegensatz zu Myc-Shrub, nur noch aus der Kernregion und besitzt keine autoinhibitorische Region (Dissertation Jäckel 2010).

Myc-ShrubΔauto hat im Gegensatz zum vollständigen Myc-Shrub keinen autoinhibitorischen C-Terminus (Abb. 2-6), ist daher permanent aktiv (Zamborlini et al. 2006, Shim et al. 2007, Lata et al. 2008b) und wird zur endosomalen Membran rekrutiert (Buchkovich et al. 2013). Dort akkumuliert es (Masterarbeit Brüser 2013), da aufgrund der fehlenden MIM-Domäne, die Teil des autoinhibitorischen C-Terminus ist, die Rekrutierung von Vps4 beeinträchtigt ist (Obita et al. 2007, Bajorek et al. 2009a). Da die Aktivität von Vps4 jedoch nicht nur für die Disassemblierung der ESCRT-III Komponenten von der endosomalen Membran notwendig ist, sondern auch für den Abschnürungsprozess des ILVs an sich (Adell et al. 2014, Mierzwa et al. 2017, Schöneberg et al. 2018), ist anzunehmen, dass die ILV-Bildung gestört ist.

Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie ist bereits eine Vergrößerung der Rab7- und Notch-positiven Endosomen bei einer Überexpression von Myc-ShrubΔauto zu beobachten (Abb. 2-7 B, B') (Bachelorarbeit Bäumers 2013, Masterarbeit Brüser 2013). Hierfür wurde eine Antikörperfärbung gegen die extrazelluläre Domäne von Notch (NECD) durchgeführt und als Marker für reife Endosomen Rab7-YFP unter Kontrolle des α -*tubulin*-Promotors exprimiert (*tub-rab7-YFP*) (Marois et al. 2006).

Die Vergrößerung der Endosomen könnte bereits auf eine beeinträchtigte ILV-Bildung hindeuten. Bei jeder ILV-Bildung wird ein Teil der Membran von der endosomalen Membran inkorporiert. Prinzipiell könnten daher MVBs, die weniger ILVs bilden, größer sein. Die vergrößerten Endosomen könnten aber auch eine Konsequenz einer beeinträchtigten Fusion mit dem Lysosom sein. Eine Studie in *S. cerevisiae* deutet an, dass eine Fehlfunktion in der ESCRT-Maschinerie eine Störung der Rab5/Rab7 Konversion verursacht (Russell et al. 2012) (siehe 1.2). Die Endosomen könnten daher mehr homotypische Fusionen untereinander durchlaufen und größer werden, bevor sie mit einem Lysosom fusionieren.

Bei einer Überexpression von Myc-Shrub finden sich hingegen nur sehr weit apikal vergrößerte Akkumulationen, die Rab7 und Notch-positiv sind (Abb. 2-7 A, A', Pfeile). Basaler haben die Endosomen weiterhin eine für den Wildtyp charakteristische Größe (Abb. 2-7 A, A') (Bachelorarbeit Bäumers 2013, Masterarbeit Brüser 2013).

Eine Analyse der EM-Aufnahmen bestätigt, dass die Endosomen bei einer Expression von Myc-Shrub Δ auto signifikant vergrößert sind (Abb. 2-7 D, D', E). Zudem zeigt die neu entwickelte Analysetechnik (Abb. 2-5) auch, dass das elektronendichte Material innerhalb dieser Endosomen und somit ihr ILV-Anteil wie erwartet verringert ist (Abb. 2-7 F). Eine Analyse der EM-Aufnahmen bei der Expression von Myc-Shrub offenbart keinen signifikanten Effekt auf die Endosomengröße und ihren ILV-Anteil (Abb. 2-7 E, F). Dies ist überraschend, da zumindest apikal mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie vergrößerte Endosomen zu detektieren sind (Abb. 2-7 A, A', Pfeile). Bei der EM-Analyse finden sich jedoch sowohl apikal als auch basal keine vergrößerten MVBs. Daher wird in der Statistik keine Unterscheidung zwischen apikalen und basalen MVBs vorgenommen (Abb. 2-7 E, F). Zu beachten ist hierbei jedoch, dass nur eine 13-stündige Expression vorliegt, die aufgrund von vermehrt auftretendem Zelltod bei einer längeren Expression von Myc-Shrub Δ auto (Dissertation Jäckel 2010) gewählt wurde. Eine längere Expression von Myc-Shrub könnte möglicherweise einen Effekt auf beide Parameter, Endosomengröße und ILV-Anteil, haben.

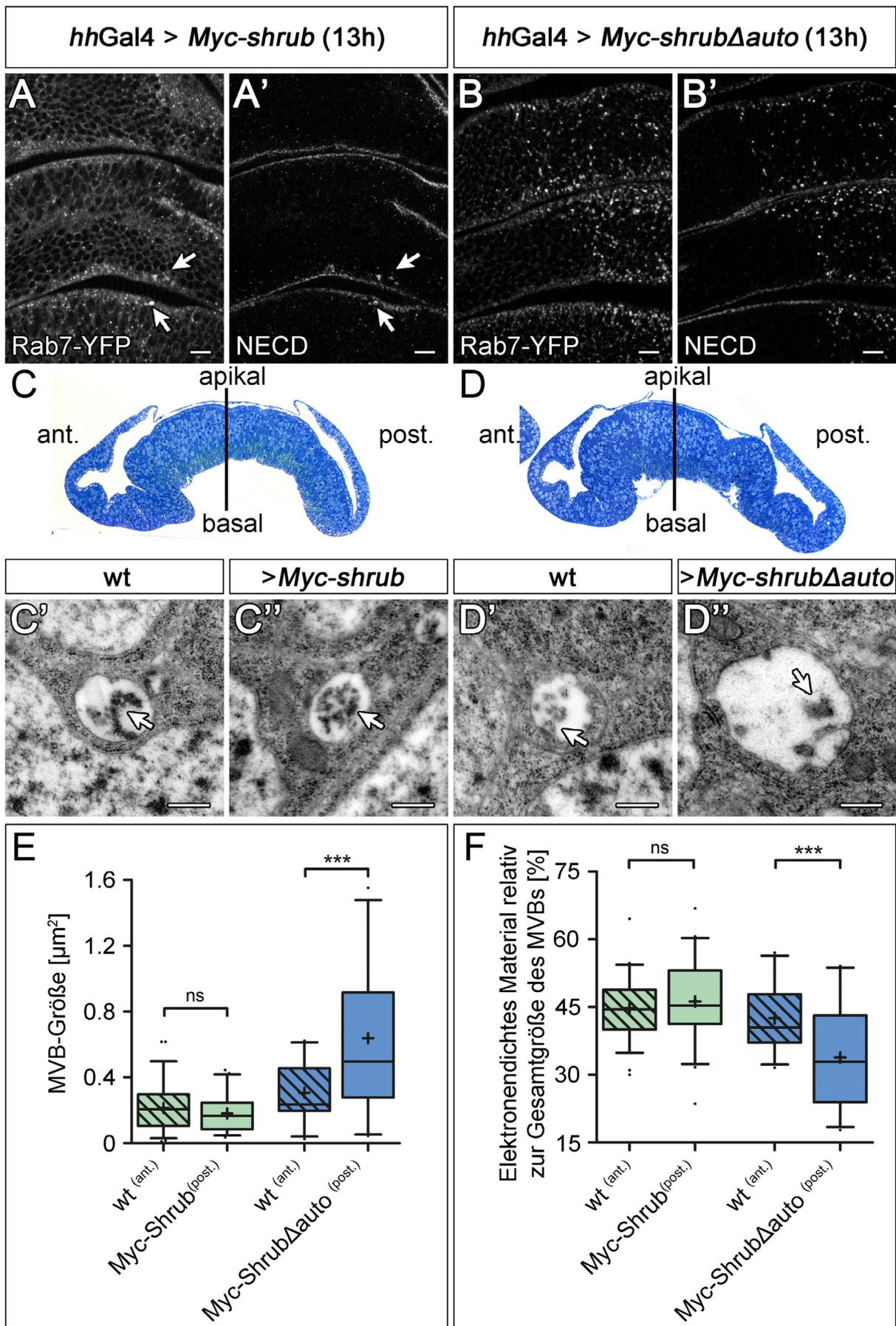


Abb. 2-7: Die Überexpression des dominant-negativ wirkenden Deletionskonstrukts Myc-Shrub Δ auto führt zu einer Vergrößerung der Endosomen und zu einer Störung der ILV-Bildung.

Vergleichende Analyse der Konsequenzen einer Überexpression von Myc-Shrub und Myc-Shrub Δ auto in Flügelimaginalscheiben. Eine auf das posteriore (post.) Kompartiment begrenzte Expression der beiden Shrub-Varianten, UAS *Myc-shrub* (A, A', C-C'') und UAS *Myc-shrub Δ auto* (B, B', D-D'') für 13 h, wird durch *hhGal4* kombiniert mit *tubGal80^{ts}* erreicht. (B, B') Bereits die Fluoreszenzmikroskopie offenbart bei der Expression von Myc-Shrub Δ auto im gesamten posterioren Bereich vergrößerte Rab7 und Notch-positive Endosomen. Hierfür wurde eine Antikörperfärbung gegen die extrazelluläre Domäne von Notch (NECD) durchgeführt und als Marker für reifende Endosomen Rab7-YFP, exprimiert unter Kontrolle des *α -tubulin*-Promotors (*tub-rab7-YFP*), verwendet (Marois et al. 2006) [Aufnahmen in (B, B') aus (Bachelorarbeit Bäumers 2013)]. (A, A') Bei einer Überexpression von Myc-Shrub finden sich hingegen nur stark apikal vergrößerte Rab7- und Notch-positive Akkumulationen in vesikelartigen Strukturen (A, A', Pfeile). (C-F) EM-Analyse der Überexpression von Myc-Shrub und Myc-Shrub Δ auto: (C, D) Semidünnschnitt durch das Flügelfeld einer Imaginalscheibe entlang der dorsoventralen Achse (vgl. mit Abb. 2-4 A), die im posterioren (post.) Kompartiment jeweils Myc-Shrub (C) oder Myc-Shrub Δ auto (D) exprimiert. Die Schnitte sind mit Tuloidinblau angefärbt. Das Gewebe zeigt, trotz Überexpression der Shrub-Varianten, keinen vermehrten Zelltod. (C', C'', D' D'') Repräsentative MVBs aufgenommen mit dem Transmissions-elektronenmikroskop (TEM) der wildtypischen Kontrollzellen (anterior(ant.)) und der Zellen, die Myc-Shrub (C'') oder Myc-Shrub Δ auto (D'') exprimieren (posterior (post.)). (E) Quantifizierung der Größe der reifenden Endosomen/MVBs. Die durchschnittliche MVB-Größe von Myc-Shrub Δ auto exprimierenden Zellen (blau, post.) ist gegenüber der von wildtypischen Zellen (blau gestreift, ant.) signifikant vergrößert. Jedoch ist die durchschnittliche MVB-Größe von Zellen, die Myc-Shrub (hellgrün, post.) für 13 h exprimieren unverändert gegenüber der von wildtypischen Zellen im anterioren Kompartiment (hellgrün gestreift, ant.). (F) Statistische Analyse des elektronendichten Material innerhalb der MVBs als Indikator für die ILV-Bildung. Der Anteil an elektronendichten Material (C'-D'', Pfeile) relativ zur Gesamtgröße eines MVBs wurde erfasst (Abb. 2-5) und in einem Box-Whisker-Plot dargestellt. Der ILV-Anteil der MVBs in Zellen, die Myc-Shrub exprimieren ist vergleichbar mit dem der wildtypischen Zellen, wohingegen er in Zellen, die Myc-Shrub Δ auto exprimieren signifikant reduziert ist. [(E, F) Überexpression von Myc-Shrub (hellgrün): wt-Kontrolle (ant.) n=52 MVBs, Myc-Shrub (post.) n=46 MVBs. Überexpression von Myc-Shrub Δ auto (blau): wt-Kontrolle (ant.) n=25 MVBs, Myc-Shrub Δ auto (post.) n=33 MVBs. (E) Überexpression von Myc-Shrub (hellgrün): Mann Whitney Test, zweiseitig; Überexpression von Myc-Shrub Δ auto (blue): ungepaarter, zweiseitiger t-Test, p<0,001 (***). (F) Überexpression von Myc-Shrub und Myc-Shrub Δ auto: jeweils ungepaarter, zweiseitiger t-Test, p<0,001 (***). (E, F) Box-Whisker-Plot: 5-95 Perzentile; Mittelwert durch ein "+" markiert]. Maßstabsbalken: (A-B') 10 μ m; (C', C'' und D', D'') 250 nm.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass auch in *Drosophila* bei einer Störung der ESCRT-Maschinerie die ILV-Bildung negativ beeinflusst wird und, dass durch die neu

entwickelte Analysetechnik die ILV-Bildung quantifiziert werden kann. Sie ermöglicht es daher elektronendichtes Material als Indikator für die ILV-Bildung zu erfassen.

Eine Analyse von *lgd^{d7}* mutanten Endosomen bestätigt zunächst, dass es bei einem Funktionsverlust von *lgd* zu einer signifikanten Vergrößerung der durchschnittlichen MVB-Größe kommt und dass weiterhin eine ILV-Bildung stattfindet (Abb. 2-8 B, D) (Schneider et al. 2013). Die statistische Analyse des ILV-Anteils in *lgd^{d7}* mutanten Endosomen mit Hilfe des neu entwickelten Assays deutet daraufhin, dass der ILV-Anteil in *lgd^{d7}* mutanten MVBs gegenüber dem in wildtypischen MVBs unverändert ist (Abb. 2-9 D). Das elektronendichte Material (ILVs) im endosomalen Lumen macht im Durchschnitt 46,2 % (wt) und 46,4 % (*lgd^{d7}*) der Gesamtfläche der MVBs aus (Abb. 2-9 D). Es scheint daher keine Reduktion der ILV-Bildung in *lgd^{d7}* mutanten MVBs vorzuliegen, die einen Verbleib des Notch-Rezeptors an der endosomalen Membran (Couturier et al. 2014) erklären würde.

Um zu untersuchen, inwiefern eine Erhöhung der Shrub-Konzentration in *lgd^{d7}* mutanten Zellen Einfluss auf die Endosomengröße hat, erfolgte ebenfalls eine elektronenmikroskopische Analyse. *lgd^{d7}* mutante Zellen, die zusätzlich zwei Kopien von *BAC^{shrub}* exprimieren, haben im Vergleich zu *lgd^{d7}* mutanten Zellen durchschnittlich kleinere MVBs (Abb. 2-8 D). Hier scheint also nicht nur eine Aufhebung der ektopischen Aktivierung des Notch-Signalweges (siehe 2.2.1, Abb. 2-4 D, D') und der pupalen Letalität (siehe 2.2.1, Abb. 2-3) vorzuliegen, sondern auch eine partielle Rettung des endosomalen Phänotyps in *lgd^{d7}* mutanten Zellen. Im Durchschnitt liegt die Endosomengröße von den geretteten *lgd^{d7}* mutanten MVBs (*lgd^{d7}; 2x BAC^{shrub}*) zwischen der von wildtypischen und der von *lgd^{d7}* mutanten Zellen (Abb. 2-8 D). Allerdings gibt es auch hier, wie in *lgd^{d7}* mutanten Zellen, einen größeren Anteil an Endosomen, die eine Fläche von mehr als 0,3 μm^2 aufweisen (Abb. 2-8 E). Im Wildtyp erreichen nur 3,3 % der erfassten Endosomen eine solche Größe. Im Vergleich dazu besitzen 19,1 % der analysierten MVBs im *lgd^{d7}* mutanten Hintergrund und immerhin noch 16,2 % in *lgd^{d7}; 2x BAC^{shrub}*-Zellen eine solche Größe (Abb. 2-8 E). In *lgd^{d7}* mutanten Zellen ist der Anteil an MVBs, die kleiner als 0,1 μm^2 sind, von 50 % im Wildtyp auf die Hälfte gesunken. In geretteten *lgd^{d7}* mutanten Zellen (*lgd^{d7}; 2x BAC^{shrub}*) macht er hingegen wieder 40 % der MVBs aus.

Ferner haben *lgd^{d7}* mutante Zellen eine MVB-Fraktion (ca. 5,2 %), die eine Größe ($> 0,4 \mu\text{m}^2$) aufweisen, die nicht im Wildtyp gefunden werden kann¹. Diese MVB-Fraktion umfasst in den geretteten *lgd^{d7}* mutanten Zellen sogar 7,6 % der analysierten MVBs.

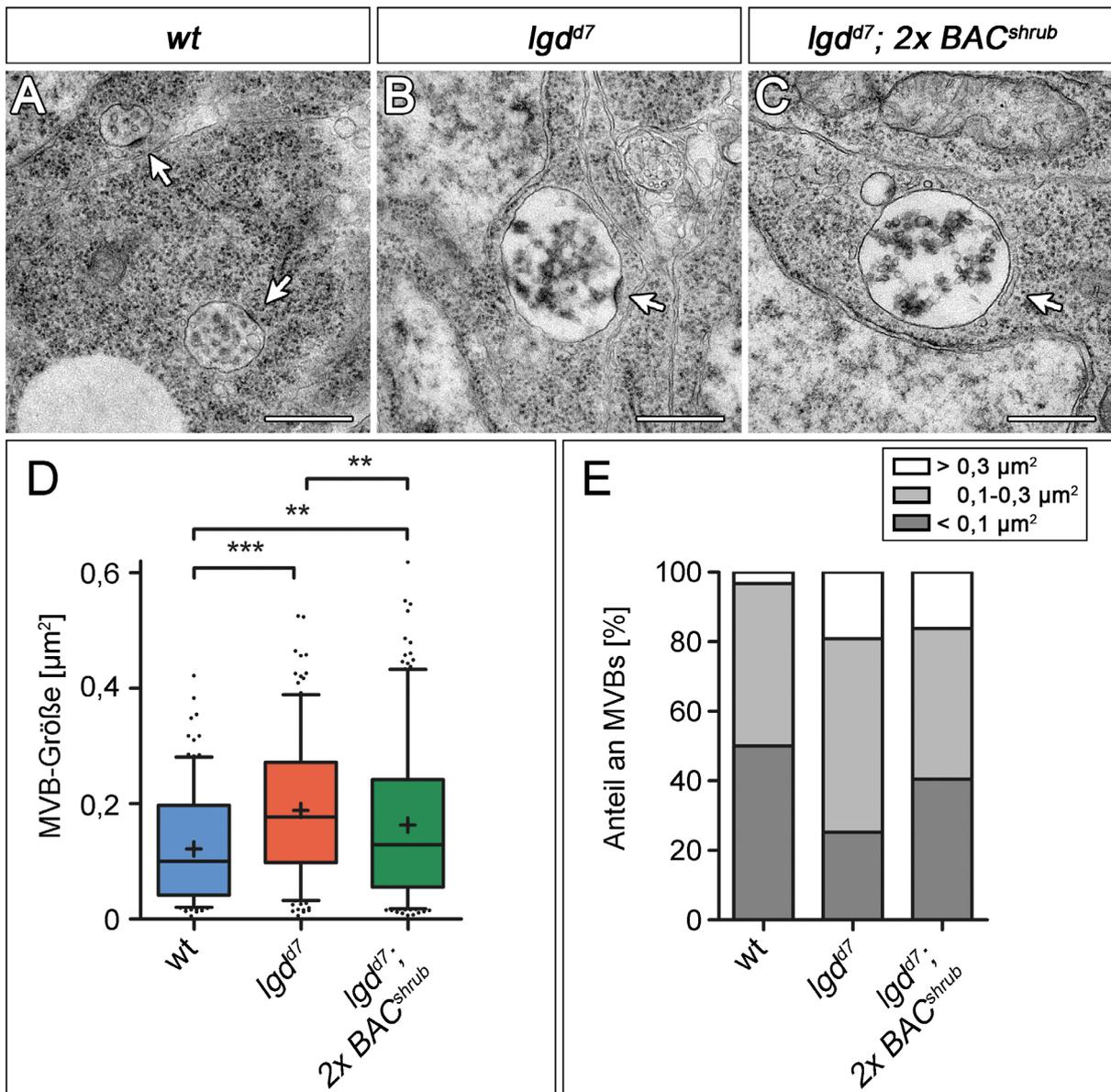


Abb. 2-8: *lgd^{d7}* mutante Endosomen sind im Vergleich zum Wildtyp vergrößert. Ultrastrukturelle Analyse des endosomalen Phänotyps von *lgd^{d7}* mutanten Zellen und der Konsequenzen ihrer Rettung durch eine erhöhte Shrub-Expression (*lgd^{d7}; 2x BAC^{shrub}*). Repräsentative TEM-Aufnahmen von wildtypischen (A), *lgd^{d7}* mutanten (B) und geretteten *lgd^{d7}* mutanten MVBs (C): Die Morphologie der MVBs in *lgd^{d7}* mutanten Zellen (B) und in den geretteten *lgd^{d7}* mutanten Zellen (C) der Flügelimaginalscheibe scheint nicht beeinträchtigt zu sein. (D) Statistische Auswertung der Endosomengröße in wildtypischen (blau), *lgd^{d7}*

¹ Hierbei nicht eingerechnet, eins von 212 wildtypischen MVBs, welches eine Größe von $0,422 \mu\text{m}^2$ erreicht hat und damit weit über der durchschnittlichen wildtypischen MVB-Größe liegt.

mutanten (rot) und geretteten Zellen (grün): *lgd^{d7}* mutante Endosomen sind im Vergleich zu wildtypischen signifikant vergrößert. Diese Vergrößerung der Endosomen ist in *lgd^{d7}* mutanten Zellen partiell gerettet, die zusätzlich zwei Kopien von *BAC^{shrub}* exprimieren (*lgd^{d7}; 2x BAC^{shrub}*, grün). Jedoch finden sich wie bei *lgd^{d7}* mutanten Zellen (blau) noch vergrößerte Endosomen, die eine Größe aufweisen, die im Wildtyp nicht bzw. sehr selten gefunden werden kann. (E) Einteilung der quantifizierten MVBs in drei verschiedene Größenkategorien: (1) MVBs kleiner als 0,1 μm^2 , (2) MVBs zwischen 0,1 und 0,3 μm^2 und (3) MVBs größer als 0,3 μm^2 . Hierbei zeigt sich, dass die dritte Kategorie, welche MVBs größer als 0,3 μm^2 beinhaltet, bei *lgd^{d7}* mutanten Zellen um ca. das 5,8-fache vergrößert ist und sie daher nicht nur 3,3 % der quantifizierten MVBs wie beim Wildtyp umfasst, sondern 19,1 %. Auch bei den geretteten Zellen gehören noch 16,2 % der erfassten MVBs zu dieser Kategorie. In *lgd^{d7}* mutanten Zellen ist der Anteil an der ersten Kategorie, die MVBs kleiner als 0,1 μm^2 umfasst, von 50 % im Wildtyp auf die Hälfte gesunken. In geretteten *lgd^{d7}* mutanten Zellen macht er hingegen wieder 40 % der MVBs aus. [(D, E) wt n=212 MVBs; *lgd^{d7}* n= 230 MVBs; *lgd^{d7}; 2x BAC^{shrub}* n= 277 MVBs. (D) Kruskal-Wallis Test, Dunn's Multiple Comparison Test, p<0,001 (***), p<0,01 (**); Box-Whisker-Plot: 5-95 Perzentile; Mittelwert durch ein "+" markiert]. Maßstabsbalken: (A-C) 500 nm.

Diese Ergebnisse bestätigen erstens, dass die Endosomen in *lgd^{d7}* mutanten Zellen im Mittel signifikant vergrößert sind und zweitens, dass durch eine Erhöhung der Shrub-Konzentration dieser endosomale Phänotyp partiell gerettet werden kann (Abb. 2-8). Jedoch sind in den geretteten *lgd^{d7}* mutanten Zellen (*lgd^{d7}; 2x BAC^{shrub}*) immer noch 16,2 % der analysierten Endosomen größer als 96,7 % aller erfassten MVBs im Wildtyp (Abb. 2-8 E). Daher sind die Endosomen im Vergleich zum Wildtyp weiterhin signifikant vergrößert (Abb. 2-8 D). Die verzögerte Fusion der Endosomen mit dem Lysosom, wie sie für *lgd^{d7}* mutante Zellen charakteristisch ist, scheint in den geretteten *lgd^{d7}* mutanten Zellen (*lgd^{d7}; 2x BAC^{shrub}*) nur partiell aufgehoben zu sein.

Interessanterweise ist der ILV-Anteil der geretteten *lgd^{d7}* mutanten MVBs (*lgd^{d7}; 2x BAC^{shrub}*) sowohl im Vergleich zu den wildtypischen MVBs also auch zu den *lgd^{d7}* mutanten MVBs signifikant reduziert (Abb. 2-9 D). Im Mittel machen bei den geretteten *lgd^{d7}* mutanten MVBs nur 40,7 % der Fläche elektronendichtes Material aus, wohingegen wildtypische und *lgd^{d7}* mutante MVBs ca. einen Anteil von je 46,2 % und 46,4 % aufweisen.

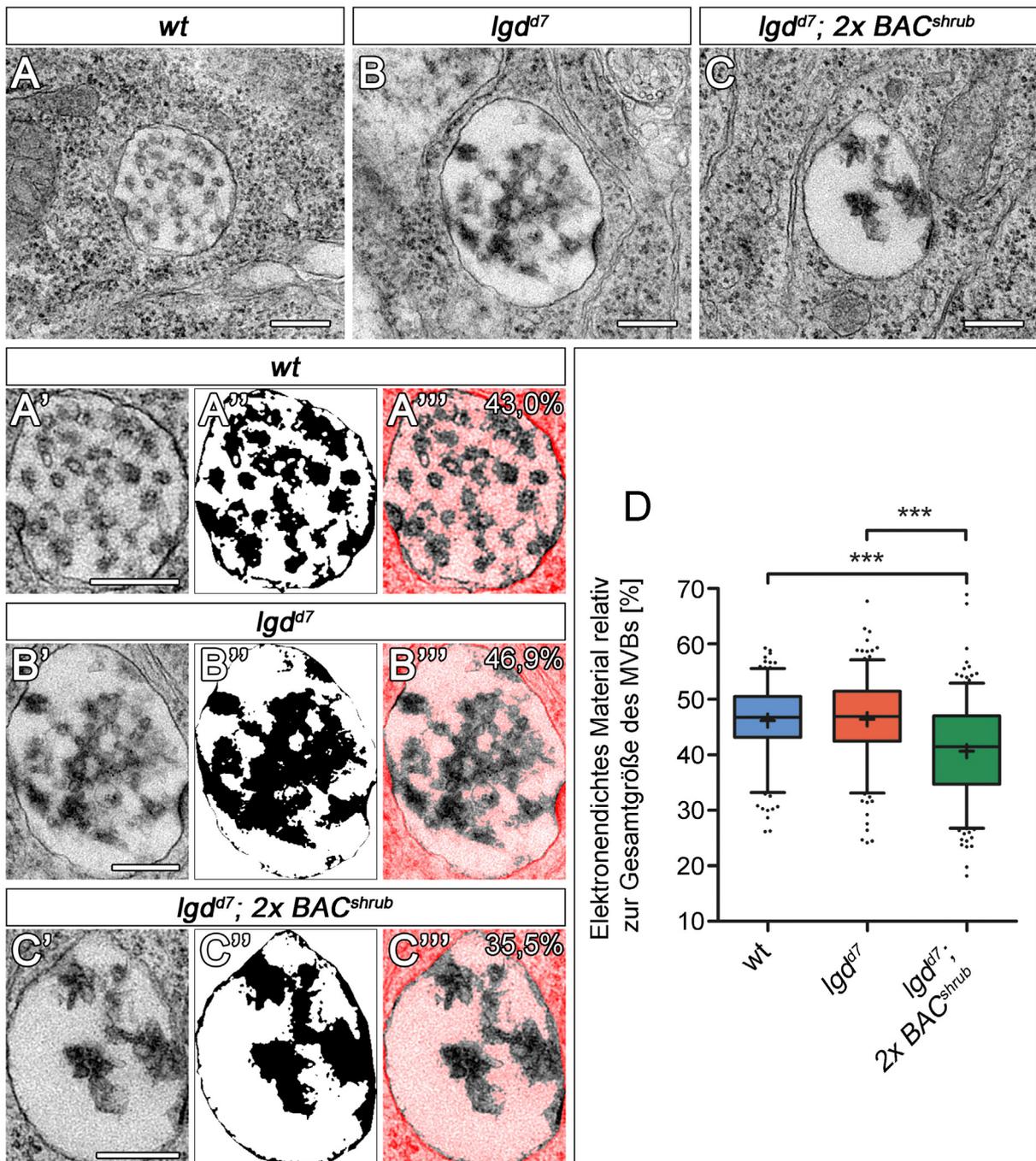


Abb. 2-9: Ein Funktionsverlust von *lgd* hat keinen Effekt auf den ILV-Anteil der reifenden Endosomen. Ultrastrukturelle Analyse und Quantifizierung des ILV-Anteils von wildtypischen (A-A'') *lgd^{d7}* mutanten (B-B'') und geretteten *lgd^{d7}* mutanten (*lgd^{d7}; 2x BAC^{shrub}*; C-C''). Beispielhafte Darstellung der Erfassung und Quantifizierung des elektronendichten Material als Indikator für die ILV-Bildung anhand von drei repräsentativen MVBs in (A, A', B, B' und C, C'). (A'', B'' und C'') Binäre-Maske des von der Umgebung abgegrenzten MVBs nach Verwendung des „Huang-Algorithmus“ zur Festlegung eines distinkten Schwellenwertes bzw. Graustufenwertes. Ab diesem Wert wird ein Pixel innerhalb des endosomalen Lumens als Teil des elektronendichten Material erfasst. Schwarz dargestellt ist der als elektronendicht erkannte Bereich im Lumen des jeweiligen MVBs in (A, A', B, B' und C, C'). (A''', B''' und C''') Überlagerung des jeweiligen MVBs mit seiner binären-Maske. In rot eingefärbt ist der Bereich der nicht als

elektronendicht und somit nicht als ILVs identifiziert wurde. Angegeben ist der berechnete ILV-Anteil der repräsentativen MVBs. (D) Statistische Analyse der ILV-Bildung durch Berechnung des Anteils an elektronendichtem Material innerhalb des Lumens von wildtypischen (blau) und *lgd^{d7}* mutanten (rot) und geretteten *lgd^{d7}* mutanten MVBs (grün). Die Quantifizierung erfolgte wie anhand von (A'-C'') beispielhaft dargestellt. Der ILV-Anteil an der Gesamtgröße des MVBs ist in einem Box-Whisker-Plot dargestellt. Der ILV-Anteil von *lgd^{d7}* mutanten MVBs ist gegenüber dem von wildtypischen MVBs unverändert. Allerdings ist dieser Anteil in den geretteten *lgd^{d7}* mutanten MVBs gegenüber dem wildtypischen als auch dem *lgd^{d7}*-mutanten Anteil reduziert. Im Mittel weisen die reifenden Endosomen nur noch einen ILV-Anteil von 40,7 % auf. Im Wildtyp beträgt er 46,2 % und bei Funktionsverlust von *lgd^{d7}* 46,4 %. [(E) wt n=212 MVBs; *lgd^{d7}* n=230 MVBs; *lgd^{d7}; 2x BAC^{shrub}* n= 276 MVB. (D) Kruskal-Wallis Test, Dunn's Multiple Comparison Test, p<0,001 (***)]; Box-Whisker-Plot: 5-95 Perzentile; Mittelwert durch ein "+" markiert]. Maßstabsbalken: (A-C'') 250 nm.

2.2.3 Eine Erhöhung der Shrub-Konzentration (*2xBAC^{shrub}*) hat keinen Einfluss auf die Morphologie und Größe der Endosomen

Der Funktionsverlust von *lgd* kann durch die Expression von zwei zusätzlichen Kopien des endogenen Genlocus von *shrub* (*BAC^{shrub}*) kompensiert werden (siehe 2.2.1) (Masterarbeit Bäumers 2015). Dabei werden die pupale Letalität und die ektopische Aktivierung des Notch-Signalweges aufgehoben (siehe 2.2.1, Abb. 2-3 u. Abb. 2-4), jedoch sind die Endosomen im Vergleich zum Wildtyp weiterhin signifikant vergrößert (siehe 2.2.2, Abb. 2-8).

Um auszuschließen, dass die zusätzliche Expression von *BAC^{shrub}* bei der Rettung (*lgd^{d7}; 2x BAC^{shrub}*) die vergrößerten Endosomen verursacht, wurden in einem weiteren Experiment zwei zusätzliche Kopien *BAC^{shrub}* im wildtypischen Hintergrund exprimiert. Als Kontrolle dient dabei *BAC^{shrub}-mut2* (siehe 2.2.1). Es codiert im Gegensatz zu *BAC^{shrub}* für eine nicht funktionale Shrub-Variante (*Shrub^{mut2}*).

Dabei zeigt eine statistische Analyse der TEM-Aufnahmen weder bei zusätzlicher Expression von Shrub (*2x BAC^{shrub}*) noch von *Shrub^{mut2}* (*2x BAC^{shrub}-mut2*) einen Einfluss auf die Morphologie (Abb. 2-10 A-C) und Größe der Endosomen (Abb. 2-10 D). Folglich verursacht nicht die zusätzliche Expression von *BAC^{shrub}* die vergrößerten Endosomen bei der Rettung des *lgd^{d7}* mutanten Hintergrundes. Dementsprechend ist die Vergrößerung Resultat einer nur partiellen Rettung des endosomalen *lgd^{d7}* mutanten Phänotyps (siehe 2.2.2, Abb. 2-8 D, E).

Zudem ist anzumerken, dass eine zusätzliche Expression von Shrub oder *Shrub^{mut2}* für die Fliegen nicht letal ist. In beiden Fällen werden die etablierten Stämme homozygot für

BAC^{shrub} oder *BAC^{shrub-mut2}* (nicht gezeigt). Interessanterweise verringert sich jedoch sowohl bei zusätzlicher Expression von Shrub als auch *Shrub^{mut2}* der durchschnittliche ILV-Anteil der Endosomen gegenüber dem Wildtyp signifikant (Abb. 2-10 E). Dies ist auch bei den geretteten *lgd^{d7}*-mutanten Endosomen (*lgd^{d7}; 2x BAC^{shrub}*) der Fall (vgl. mit Abb. 2-9 D).

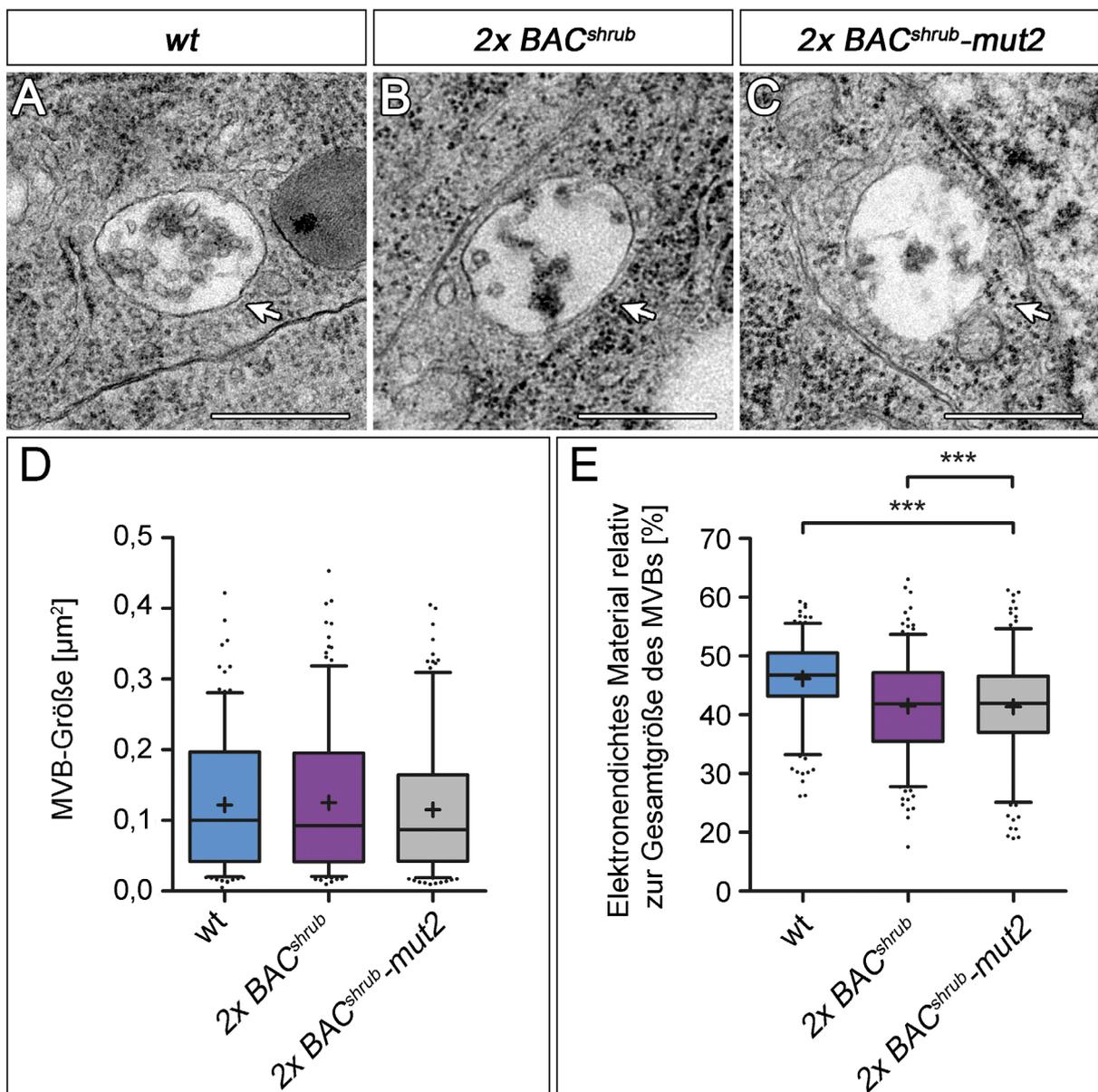


Abb. 2-10: Die Expression von zwei Kopien *BAC^{shrub}* in wildtypischen Fliegen hat keinen Einfluss auf die durchschnittliche Größe der Endosomen, führt aber zu einer Reduktion ihres ILV-Anteils.

(A-E) Ultrastruktureller TEM-Analyse wildtypischer Zellen und Zellen, die zusätzlich zwei Kopien *BAC^{shrub}* und *BAC^{shrub-mut2}* exprimieren. EM-Aufnahmen eines wildtypischen MVBs (A), eines MVBs in Anwesenheit von zwei zusätzlichen Kopien *BAC^{shrub}* (B) oder *BAC^{shrub-mut2}* (C). (D, E) Statistische Analyse der MVB-Größe (D) und des ILV-Anteils (E) der Endosomen in wildtypischen Zellen (blau), sowie in Zellen mit zwei Kopien

BAC^{shrub} (lila) oder *BAC^{shrub-mut2}* (grau). (D) Die statistische Auswertung der MVB-Größen [μm^2], dargestellt in einem Box-Whisker-Plot, zeigt keinen sichtbaren Größenunterschied zwischen den wildtypischen MVBs und den MVBs in Anwesenheit von *BAC^{shrub}* oder *BAC^{shrub-mut2}*. (E) Quantifizierung des elektronendichten Materials innerhalb des MVBs relativ zu dessen Gesamtgröße als Indikator für die ILV-Bildung. Der durchschnittliche ILV-Anteil von MVBs in Zellen, die zusätzlich *Shrub* oder *Shrub^{mut2}* exprimieren, ist verringert. Im Wildtyp liegt er bei ca. 46 % in den beiden anderen Fällen (*BAC^{shrub}* und *BAC^{shrub-mut2}*) bei ca. 41 %. [(D, E) wt n=212 MVBs; 2x *BAC^{shrub}* n= 240 MVBs; (D) 2x *BAC^{shrub-mut2}* n=229 und (E) 2x *BAC^{shrub-mut2}* n=218 (bei 11 MVBs ist die Qualität der EM-Aufnahme zur Berechnung des ILV-Anteils nicht gut genug). (D, E) Kruskal-Wallis Test, Dunn's Multiple Comparison Test $p < 0,001$ (***)]; (D) Werte größer als $0,5 \mu\text{m}^2$ sind nicht gezeigt (2x *BAC^{shrub-mut2}*: eins von 229 MVBs ist größer als $0,5 \mu\text{m}^2$). Box-Whisker-Plot: 5-95 Perzentile; Mittelwert durch ein "+" markiert]. Maßstabsbalken: (A-C) 500 nm.

Die gewonnenen Daten zeigen, dass bei einer zusätzliche Expression von zwei Kopien *BAC^{shrub}* die MVB-Größe unverändert gegenüber dem Wildtyp ist (Abb. 2-10 D). Dabei scheint jedoch die ILV-Bildung negativ beeinflusst zu werden. Eine solche Beeinträchtigung zeigt sich auch bei einer Expression von zwei Kopien *BAC^{shrub-mut2}* (Abb. 2-10 E). *Shrub^{mut2}* kann aufgrund einer Ladungsumkehr nicht mehr polymerisieren (McMillan et al. 2016). Dies deutet an, dass bereits allein durch eine Erhöhung der *Shrub*-Konzentration das Zusammenspiel der ESCRT-Maschinerie beeinflusst wird. Dafür muss *Shrub* scheinbar nicht einmal polymerisationsfähig sein.

Erstaunlicherweise ist bei einer Überexpression von Myc-*Shrub* mit Hilfe des Gal4/UAS-System kein Effekt auf die ILV-Bildung detektierbar (siehe 2.2.2, Abb. 2-7 F). Dort wurde Myc-*Shrub* jedoch auch nur für 13 h exprimiert und auch nicht wie hier unter Kontrolle des endogenen *shrub*-Promotors.

2.2.4 Die ESCRT-invagination sites von *lgd^{d7}* mutanten Endosomen sind vergrößert

Während der fortwährenden EM-Analysen in dieser Arbeit konnten regelmäßig Einstülpungen an der limitierenden Membran einiger MVBs beobachtet werden (Abb. 2-11 A-B'). Diese zeichnen sich durch eine hohe Konzentration an elektronendichtem Material aus. Bei diesen Einstülpungen handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um Regionen an denen, durch die ESCRT-Maschinerie vermittelt, zum Zeitpunkt der Fixierung, neue ILVs entstanden wären. Diese charakteristischen „Plaques“ auf der zytosolischen Seite der endosomalen Membran wurde bereits in mehreren Studien beschreiben (Raiborg et al. 2002, Sachse et al. 2002, Murk et al. 2003). Mit Hilfe von Kryo-

Immunelektronenmikroskopie (Kryo-EM) konnte in diesen Plaques neben dem Gerüstprotein Clathrin auch Hrs, eine Komponente des ESCRT-0-Komplexes, identifiziert werden. Zusätzlich fanden sich dort auch durch Ubiquitin markierte und somit für den Abbau bestimmte Transmembranproteine wie der EGF (Epidermal Growth Factor)-Rezeptor und der humane Transferrin Rezeptor (Raiborg et al. 2002, Sachse et al. 2002). Neuste Untersuchungen unterstützen zudem die Annahme, dass diese elektronendichten Plaques nicht nur durch Clathrin definiert werden, sondern auch ein Resultat der Akkumulation von ESCRT-Proteinen und der zu internalisierenden Transmembranproteine sind (Wenzel et al. 2018).

Bei einer Analyse der Größe dieser Regionen, im Folgenden als ESCRT-invagination sites (EIS) bezeichnet, zeigt sich, dass *lgd^{d7}* mutante MVBs signifikant vergrößerte EIS im Vergleich zum Wildtyp besitzen (Abb. 2-11, C). Weiterhin ist der Anteil an EIS, die größer als 150 nm sind, in *lgd^{d7}* mutanten Zellen um das 5,5-fache gegenüber dem Wildtyp gestiegen (Abb. 2-11, D). In *lgd^{d7}* mutanten Zellen erreichen ca. 36,9 % der EIS eine Länge von mehr als 150 nm. Im Wildtyp sind es nur 6,7 %. Dementsprechend weisen nur noch 17,1 % der erfassten *lgd^{d7}* mutanten ESCRT-invagination sites eine Länge von weniger als 100 nm auf. Im Fall des Wildtyps sind es jedoch 1/3 aller gemessenen EIS (Abb. 2-11, D). Insgesamt ist bei *lgd^{d7}* mutanten MVBs im Vergleich zu wildtypischen eine Verschiebung in Richtung größerer ESCRT-invagination sites (EIS) zu beobachten.

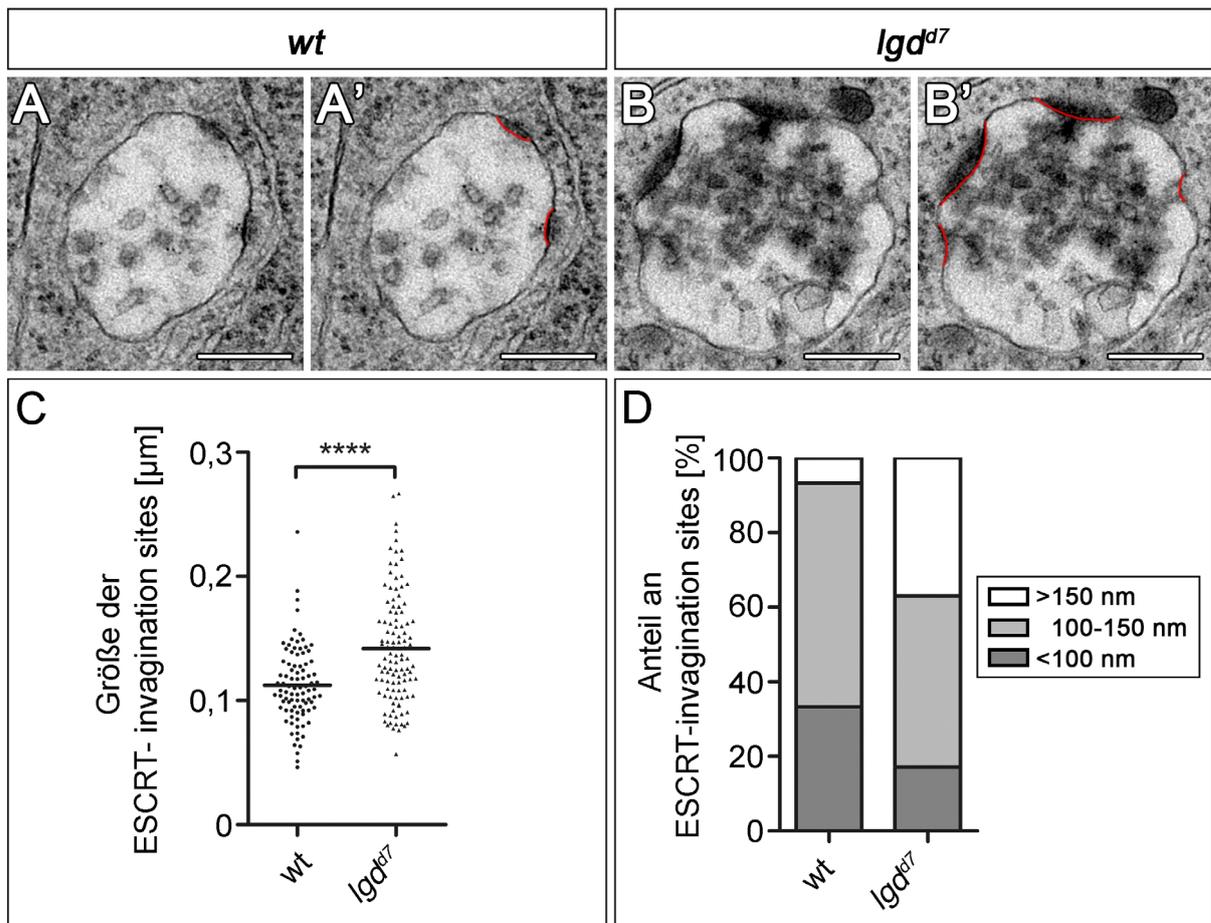


Abb. 2-11: Die ESCRT-Invagination sites der *lgd^{d7}* mutanten MVBs sind signifikant vergrößert.

(A-B') Repräsentative TEM-Aufnahmen von wildtypischen (A, A') und *lgd^{d7}* mutanten (B, B') MVBs. In Rot eingezeichnet sind hier die identifizierten und gemessenen ESCRT-invagination sites (EIS) der MVBs. Die Morphologie der MVBs ist in *lgd^{d7}* mutanten Zellen der Flügelimaginalscheibe nicht verändert. (C-D) Statistische Auswertung der Größe dieser ESCRT-invagination sites von wildtypischen und *lgd^{d7}* mutanten Endosomen. (C) Die durchschnittliche Größe der ESCRT-invagination sites [μm] von *lgd^{d7}* mutanten MVBs ist im Vergleich zu der im Wildtyp signifikant vergrößert. (D) Einteilung der quantifizierten EIS in drei verschiedene Größenkategorien: (1) EIS kleiner als 100 nm, (2) EIS zwischen 100 und 150 nm und (3) EIS größer als 150 nm. Hierbei zeigt sich, dass die dritte Kategorie (>150 nm) bei *lgd^{d7}* mutanten Zellen um ca. das 5,5-fache vergrößert ist und sie daher nicht nur 6,7 % der quantifizierten MVBs wie beim Wildtyp umfasst, sondern 36,9 %. In *lgd^{d7}* mutanten Zellen ist der Anteil an der ersten Kategorie (<100 nm) von 33,3 % im Wildtyp auf 17,1 % gesunken. [(C, D) wt n= 72 MVBs (90 ESCRT-invagination sites); *lgd^{d7}* n= 87 MVBs (111 ESCRT-invagination sites); (C) Mann Whitney Test, zweiseitig p< 0,0001 (****); Streudiagramm, Mittelwert durch eine "Linie" markiert]. Maßstabsbalken: (A-B') 250 nm.

Eine Vergrößerung der ESCRT-invagination sites könnte einerseits ein nicht-spezifischer Effekt der generell vergrößerten MVBs sein, andererseits ein spezifischer Effekt, der von einer beeinträchtigten ESCRT-Maschinerie bei einem Funktionsverlust von *lgd* herrührt.

Um herauszufinden, ob die Vergrößerung der EIS spezifisch oder nicht spezifisch für den Funktionsverlust von *lgd* ist, wurde in dieser Arbeit eine genetische Situation generiert, bei der zwar vergrößerte MVBs auftreten, aber die ESCRT-vermittelte ILV-Bildung nicht gestört wird. Dafür wurde mit Hilfe von RNA-Interferenz (RNAi) die Genaktivität von *rab7* posttranskriptionell unterdrückt (siehe 6.6.5). Die GTPase Rab7 vermittelt die Fusion der reifenden Endosomen/MVBs über den HOPS Komplex mit dem Lysosom (Balderhaar et al. 2010, Übersicht in Huotari und Helenius 2011, Übersicht in Balderhaar und Ungermann 2013). Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine Reduktion von Rab7 zu vergrößerten MVBs führt (Vanlandingham und Ceresa 2009, Yousefian et al. 2013), ähnlich wie sie bei einem Funktionsverlust von *lgd* zu beobachten ist (siehe 2.2.2, Abb. 2-8). Es kommt allerdings in diesen Rab7-reduzierten Zellen zu keiner ektopischen Aktivierung des Notch-Signalweges und auch zu keinem offensichtlichen Defekt bei der ILV-Bildung (Vanlandingham und Ceresa 2009, Russell et al. 2012, Yousefian et al. 2013). Der Vorteil einer auf dem Gal4/UAS-System basierenden Expression der *rab7*-RNAi liegt hier wieder in der räumlichen Begrenzung der Expression (siehe 6.6.4 und 6.6.5). Für eine konstitutive Expression auf 29°C im posterioren Kompartiment der Flügelimaginalscheibe wurde abermals auf die Gal4-Treiberlinie *hedgehogGal4* (*hhGal4*) zurückgegriffen (Abb. 2-12). Eine Antikörperfärbung gegen Rab7 bestätigt die Effizienz der *rab7*-RNAi-Linie (#VDRC 40337) (Abb. 2-12 A', A). Die erkennbare Akkumulation von Notch in vesikulären Strukturen im posterioren Kompartiment in den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen deutet bereits auf eine Vergrößerung der Endosomen hin (Abb. 2-12 B, B', Pfeil). Eine ultrastrukturelle Analyse (Abb. 2-12 C-F) bestätigt nicht nur, dass die MVBs von Rab7-reduzierten Zellen wie erwartet vergrößert sind, sondern auch, dass sie im Durchschnitt minimal mehr ILVs aufweisen (Abb. 2-12 D, E). Der Anteil der ILVs an der jeweiligen Gesamtfläche des MVBs ist größer. Bei Rab7-reduzierten MVBs (post.) machen durchschnittlich 50,5 % ihrer Gesamtfläche elektronendichtes Material aus. Im Vergleich dazu sind es beim Wildtyp (ant.) nur 45,8 % (Abb. 2-12 E). Rab7-reduzierte MVBs, die eine hohe Anzahl an ILVs aufweisen, wurden auch in HeLa-Zellen beobachtet (Vanlandingham und Ceresa 2009). Die Vergrößerung und der erhöhte ILV-Anteil der MVBs in Rab7-reduzierten Zellen lässt sich durch die gestörte Fusion mit dem Lysosom erklären. Die MVBs fusionieren miteinander anstatt mit dem Lysosom. Aus diesem Grund akkumulieren über die Zeit mehr und mehr ILVs. Entscheidend ist, dass die gemessenen ESCRT-invagination sites dennoch gleich groß wie im Wildtyp sind (Abb. 2-12 F).

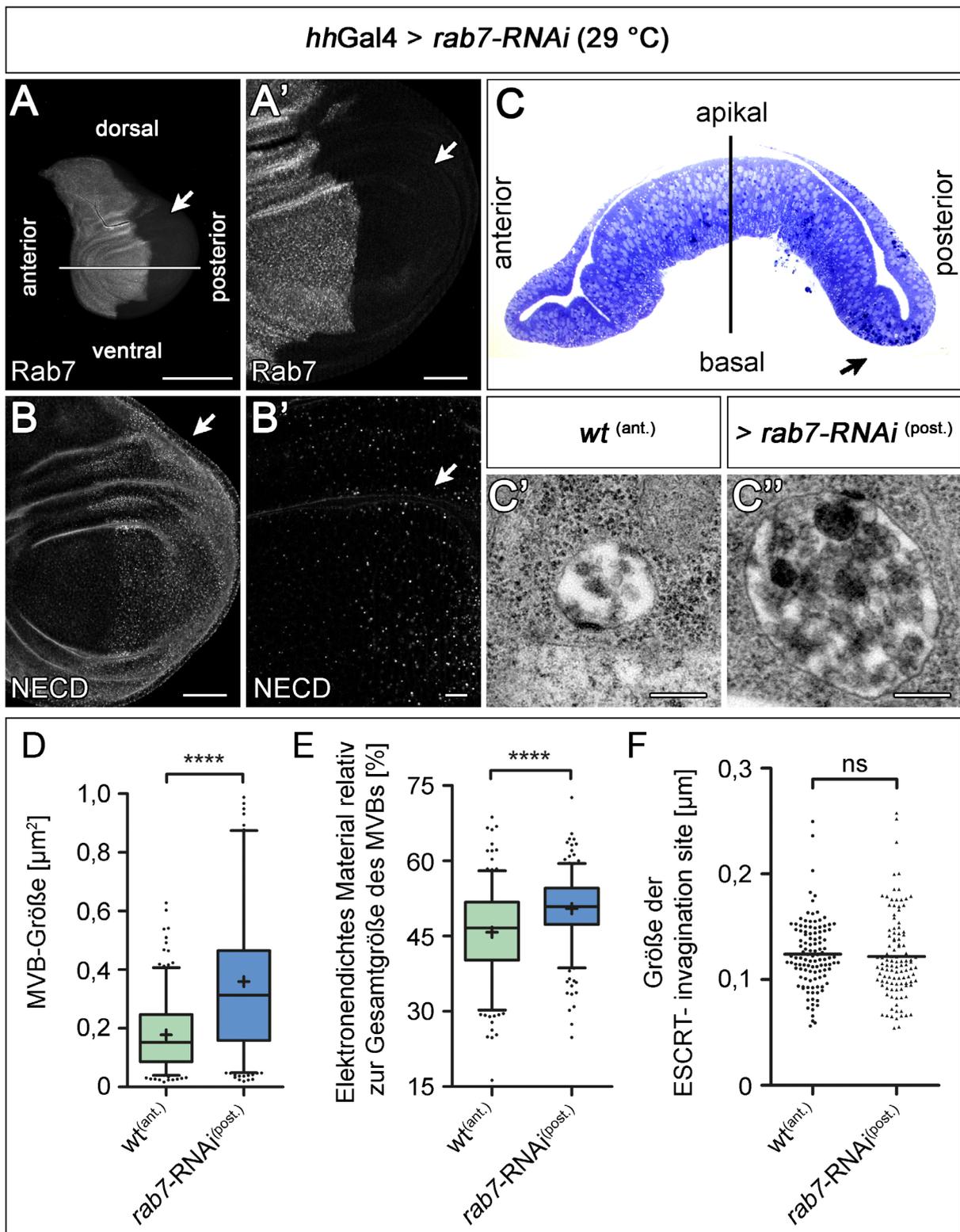


Abb. 2-12: Die aus einer Reduktion von Rab7 resultierende Vergrößerung der reifen Endosomen geht nicht mit einer Vergrößerung der ESCRT-invagination sites einher. Fluoreszenzmikroskopische (A-B') und ultrastrukturelle (C-F) Analyse der Konsequenzen einer Reduktion von Rab7 auf die MVB-Biogenese. Eine auf das posterior (post.) Kompartiment begrenzte, konstitutive Expression (29 °C) der *rab7-RNAi* wird durch die Treiberlinie *hhGal4* erreicht. Für einen direkten Vergleich befinden sich daher anterior wildtypische und posterior *rab7-RNAi* exprimierende Zellen. (A) Nachweis der Effektivität der

verwendeten *rab7*-RNAi-Linie (#VDRC 40337) durch eine Antikörperfärbung gegen das Protein Rab7. Zusehen ist eine starke Reduktion von Rab7 im posterioren Kompartiment (A, A' Pfeil). (B, B') Eine Antikörperfärbung gegen die extrazelluläre Domäne von Notch (NECD) offenbart eine Akkumulation des Notch-Rezeptors in vergrößerten vesikelartigen Strukturen (B, B', Pfeil), bei denen es sich um Endosomen handelt. (C-F) Vergleichende Analyse auf ultrastrukturellem Level von wildtypischen und Rab7-reduzierten Zellen: (C) Semidünnschnitt durch das Flügelfeld einer Imaginalscheibe entlang der dorsoventralen Achse (eingezeichnet in A), die im posterioren Kompartiment *rab7*-RNAi exprimiert. Die Schnitte sind mit der Färbelösung nach Richardson angefärbt (siehe 6.4.2). Posterior finden sich vereinzelt tote Zellen, zu erkennen an der stärkeren Blaufärbung (C, Pfeil). Repräsentative MVB-Aufnahmen von wildtypischen Kontrollzellen anterior (C') und Rab7-reduzierten Zellen posterior (C''). (D-F) Statistische Analyse der MVB-Größe (D), des ILV-Anteils (E) und der Größe der ESCRT-invagination sites (F) von wildtypischen (hellgrün) und Rab7-reduzierten Zellen (blau): Während die durchschnittliche MVB-Größe [μm^2] in Rab7-reduzierten Zellen signifikant gegenüber dem Wildtyp vergrößert ist, gibt es keinen Unterschied und somit keine Veränderung bezüglich der Größe der EISs. (D) Die durchschnittliche Gesamtfläche der analysierten wildtypischen MVBs (ant.) beträgt $0,18 \mu\text{m}^2$. Die der Rab7-reduzierten MVBs (post.) ist mit $0,36 \mu\text{m}^2$ doppelt so groß. (E) Das elektronendichte Material und somit der ILV-Anteil der Rab7-reduzierten MVBs (post.) ist marginal höher als der der wildtypischen MVBs (ant.). Im Mittel machen bei Rab7-reduzierte Zellen 50,5 %, der Gesamtfläche eines MVB elektronendichtes Material bzw. ILVs aus, wohingegen wildtypische MVBs nur einen ILV-Anteil von 45,8 % besitzen. (F) Das Streudiagramm zeigt eine ähnliche Verteilung der EIS-Größe von wildtypischen und Rab7-reduzierten MVBs. Im Mittel sind wildtypische EISs ($0,124 \mu\text{m}$) gleich groß wie EISs von Rab7-reduzierten Zellen ($0,122 \mu\text{m}$). [(D, E) wt (ant.) n= 253 MVBs; (D) *rab7*-RNAi (post.) n= 282 MVBs; (E) *rab7*-RNAi (post.) n= 280 MVBs (bei zwei MVBs ist die Qualität der EM-Aufnahme zur Berechnung des ILV-Anteils nicht gut genug); (D, E) Mann Whitney Test, zweiseitig; $p < 0,0001$ (****); Box-Whisker-Plot: 5-95 Perzentile; Mittelwert durch ein "+" markiert. (D) Werte größer als $1 \mu\text{m}^2$ werden nicht gezeigt (*rab7*-RNAi (post.): 8 von 282 MVBs nicht gezeigt). (F) wt (ant.) n= 86 MVBs (114 ESCRT-invagination sites); *rab7*-RNAi (post.) n= 92 MVBs (110 ESCRT-invagination sites) Mann Whitney Test, zweiseitig; Streudiagramm; Mittelwert durch eine "Linie" markiert]. Maßstabsbalken: (A) 200 μm ; (A', B) 50 μm ; (B') 10 μm ; (C', C'') 250 nm.

Die Vergrößerung der EIS ist also ein spezifischer Effekt für den Funktionsverlust von *lgd* und nicht ein genereller Effekt, der mit einer Vergrößerung von MVBs einhergeht. Diese Vergrößerung deutet auf eine Störung der ESCRT-Maschinerie in *lgd^{d7}* mutanten Zellen hin. Da Lgd ein direkter Interaktionspartner von Shrub ist (Troost et al. 2012), könnte die Dynamik bei der Assemblierung von Shrub und somit die der ESCRT-Maschinerie betroffen sein.

2.2.5 Eine Reduktion der Shrub-Aktivität verursacht einen Phänotyp der einer *lgd* mutanten Situation ähnelt

Ein Defekt im endosomalen Abbau von Transmembranproteinen der Plasmamembran ist charakteristisch für den Funktionsverlust von *lgd* (Schneider et al. 2013, Dissertation Troost 2013). Diese Störung äußert sich in einer Vergrößerung der Endosomen (siehe 2.2.2, Abb. 2-8) und ihrer ESCRT-invagination sites (siehe 2.2.4, Abb. 2-11) und führt wiederum zu einer ektopischen Aktivierung des Notch-Signalweges. Eine Konsequenz dieser ektopischen Aktivierung ist eine Überproliferation der Imaginalscheiben in *Drosophila* (Klein 2003).

Ursache für diesen hyperplastischen Phänotyp bei einem Funktionsverlust von *lgd* (siehe 1.5) scheint eine Reduktion der Aktivität der ESCRT-III Komponente Shrub zu sein (siehe 2.2.1) (Troost et al. 2012, Schneider et al. 2013). Eine Erklärung für den Unterschied zwischen den Phänotypen bei Funktionsverlust von *shrub* und von *lgd* könnte der Grad des Aktivitätsverlusts von Shrub sein. Es ist vorstellbar, dass eine Reduktion der Shrub-Aktivität, im Gegensatz zu einem kompletten Verlust der *shrub*-Funktion, nur zu einem hyperplastischen Phänotyp führt, der durch die ektopische Aktivierung des Notch-Signalweges verursacht wird. Erst bei einem kompletten Funktionsverlust von *shrub* würde es dann zu einem neoplastischen Phänotyp kommen, bei dem zusätzlich die epitheliale Integrität verloren geht (Thompson et al. 2005, Vaccari und Bilder 2005, Vaccari et al. 2009).

Um diese Annahme zu überprüfen, wurde in dieser Arbeit eine hypomorphe *shrub* mutante Situation kreiert. Dafür wurde die Tatsache genutzt, dass das humane Ortholog von Shrub, CHMP4B, bei einem Funktionsverlust von *shrub*, Shrub nicht vollständig ersetzen kann (Diplomarbeit Bohnen 2014, Masterarbeit Bäumers 2015). Für eine endogene Expression von CHMP4B auf dem physiologischen Level von Shrub wurde hierbei die Transkriptionseinheit von *shrub* zwischen Start- und Stopp-Codon (CDS (Coding Sequence) plus Introns) in BAC^{shrub} (siehe 2.1) durch die cDNA von CHMP4B ($BAC^{shrub-CHMP4B}$) oder als Kontrolle durch die cDNA von *shrub* ($BAC^{shrub-cDNA}$) ersetzt (Diplomarbeit Bohnen 2014, Masterarbeit Bäumers 2015). Durch $BAC^{shrub-cDNA}$ sollten mögliche Enhancer-Elemente innerhalb der Introns von *shrub* ausgeschlossen werden. *shrub*⁴⁻¹ mutante Fliegen sterben während der Embryogenese (Sweeney et al. 2006). Eine Kopie von BAC^{shrub} oder von $BAC^{shrub-cDNA}$ kann den *shrub*⁴⁻¹ mutanten Phänotyp komplett retten. Die Fliegen sehen wildtypisch aus und sind fertil. Zwei Kopien von

BAC^{shrub}-CHMP4B retten ebenfalls den *shrub⁴⁻¹* mutanten Hintergrund, obwohl beide Geschlechter der adulten Tiere steril sind. Allerdings zeigt sich bei einer Kopie von *BAC^{shrub}-CHMP4B* nur eine partielle Rettung (Diplomarbeit Bohnen 2014, Masterarbeit Bäumers 2015). Die Fliegen erreichen nur, nach einer um ca. zwei Tage verlängerten larvalen Phase, das frühe Puppenstadium und sterben dann (Masterarbeit Bäumers 2015). Dies impliziert, dass nicht genug „Shrub“- Aktivität für die komplette Entwicklung vorhanden ist und es sich daher um eine hypomorphe *shrub* mutante Situation handelt.

Bemerkenswerterweise sterben nicht nur *shrub* hypomorphe (*shrub⁴⁻¹*, *1x BAC^{shrub}-CHMP4B*), sondern auch *lgd* mutante Fliegen nach einer verlängerten larvalen Phase im frühen Puppenstadium. Sie kommen in ihrer Entwicklung also gleich weit (Bryant und Schubiger 1971, Masterarbeit Bäumers 2015).

Im ersten Schritt wurde die Aktivität des Notch-Signalweges in dieser neu generierten *shrub* hypomorphen Situation analysiert. Bei Fliegen, die durch eine Kopie *BAC^{shrub}-cDNA* oder zwei Kopien *BAC^{shrub}-CHMP4B* gerettet wurden, ist sie wildtypisch (Abb. 2-13 C-D'). Allerdings resultiert die partielle Rettung durch nur eine Kopie *BAC^{shrub}-CHMP4B* in einer ektopischen Aktivierung des Notch-Signalweges (Abb. 2-13 E, E') (Diplomarbeit Bohnen 2014, Masterarbeit Bäumers 2015), die vergleichbar ist mit der einer *lgd* hypomorphen Situation, z.B. *lgd^{SH495}/lgd^{d7}* (Abb. 2-13 F, F') (Jaekel und Klein 2006, Troost et al. 2012, Dissertation Troost 2013). In beiden Fällen zeigt sich nur eine leichte ektopische Expression des Notch-Zielgens *wg* (Abb. 2-13 E und F), gleichwohl eine stärkere ektopische Aktivierung des sensitiveren Reportergenkonstrukts *Gbe+Su(H)* (Abb. 2-13 E', F'). Folge dieser ektopischen Aktivierung des Notch-Signalweges ist sowohl bei der partiellen Rettung durch *BAC^{shrub}-CHMP4B* als auch bei *lgd^{SH495}/lgd^{d7}* eine leichte Überproliferation der Flügelimaginalscheibe (Abb. 2-13 E-F').

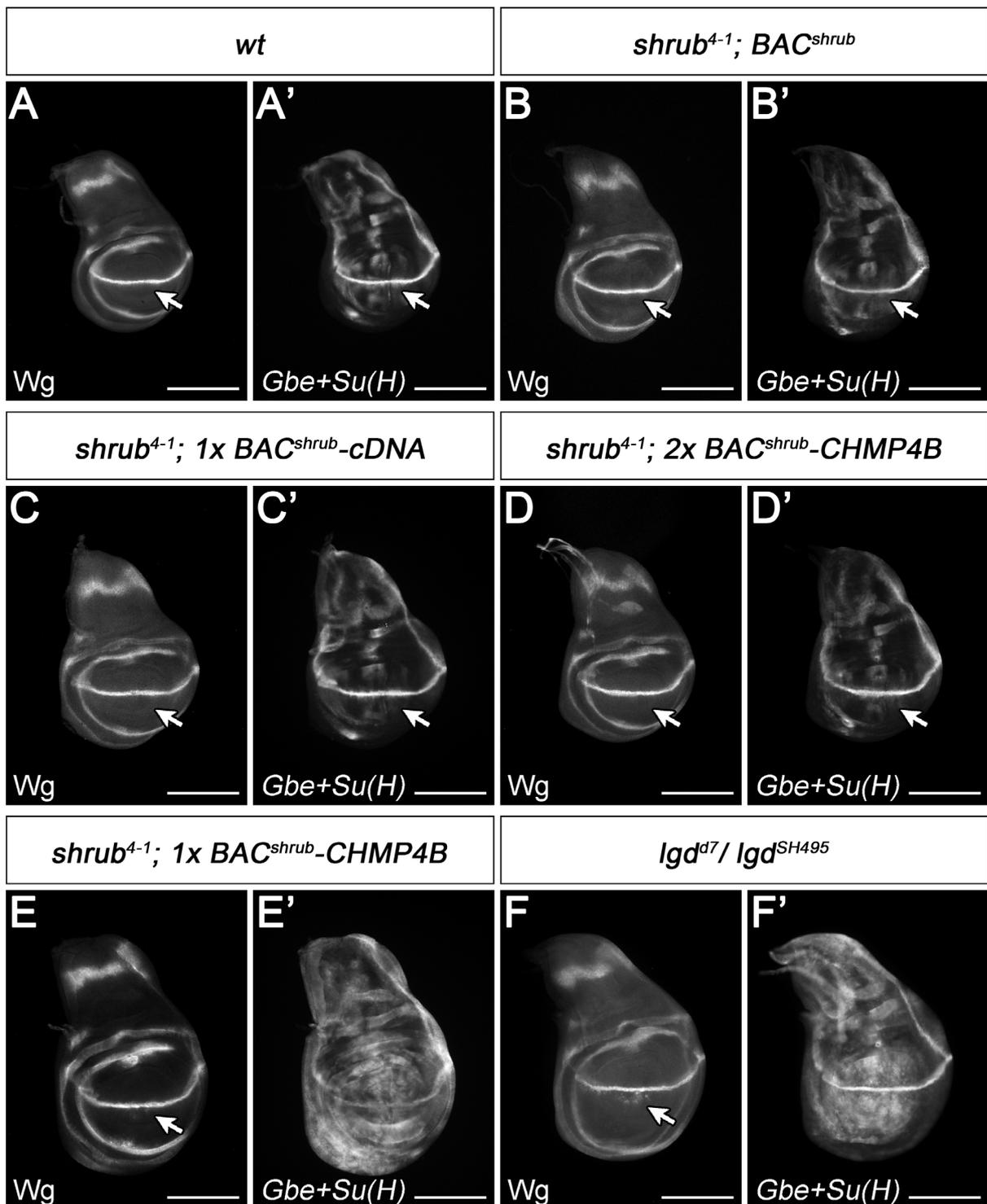


Abb. 2-13: Eine Reduktion der Shrub-Aktivität (*shrub*⁴⁻¹, 1x *BAC*^{*shrub*}-*CHMP4B*) verursacht einen Phänotyp der einer *lgd* hypomorphen Situation (*lgd*^{SH495}/*lgd*^{d7}) ähnelt. (A, A') Expression von *wg* und *Gbe+Su(H)* in einer wildtypischen Kontroll-Imaginalscheibe des dritten Larvenstadiums von *Drosophila*. *Wg* wird entlang der D-V Grenze Notch-abhängig exprimiert (Pfeil). *Gbe+Su(H)* offenbart neben einer deutlichen Aktivität von Notch an der D/V-Grenze, eine schwächere aber definierte Expression in der gesamten Flügelimaginalscheibe. (B-D') Rettung der *shrub*⁴⁻¹ mutanten Situation durch eine Kopie *BAC*^{*shrub*} (B, B'), *BAC*^{*shrub*}-*cDNA* (C, C') oder zwei Kopien *BAC*^{*shrub*}-*CHMP4B* (D, D'). (B, C und D) Die Expression von *wg*

ist wie im Wildtyp auf einen schmalen Streifen entlang der D/V-Grenze beschränkt und (B', C' und D') auch die Expression des künstlichen Reportergenkonstrukts *Gbe+Su(H)* ist wildtypisch. (E, E') Partielle Rettung des *shrub⁴⁻¹* Phänotyps durch eine Kopie *BAC^{shrub}-CHMP4B*. Wg ist einigen Zellen neben der D/V-Grenze exprimiert (Pfeil), wohingegen *Gbe+Su(H)* deutlich ektopisch aktiviert ist. Diese ektopische Aktivierung ähnelt der Aktivierung in einer *lgd* hypomorph mutanten Situation (*lgd^{SH495}/lgd^{d7}*) (vgl. E, E' mit F, F'). Die ektopische Aktivierung des Notch-Signalweges führt sowohl bei partieller Shrub-Funktion (E, E') als auch bei einer *lgd* hypomorphen Situation (F, F') zur leichten Überproliferation der Flügelimagnalscheibe. [(A-B', D-E') aus der eigenen Masterarbeit übernommen (Masterarbeit Bäumers 2015)]. Maßstabsbalken: (A-F') 200 µm.

Im zweiten Schritt wurde die epitheliale Integrität analysiert. Ein Verlust dieser würde für einen neoplastischen Phänotyp sprechen, wie er bei einem Funktionsverlust der ESCRT-I-III Komponenten zu beobachten ist (Moberg et al. 2005, Thompson et al. 2005, Vaccari und Bilder 2005, Vaccari et al. 2009, Aoyama et al. 2013), und gegen einen hyperplastischen Phänotyp, wie er bei einem Verlust von *lgd* zu beobachten ist.

Die Zellen zeigen bei der partiellen Rettung (*shrub⁴⁻¹; 1x BAC^{shrub}-CHMP4B*) und somit einer *shrub* hypomorphen Situation keinen Defekt in der epithelialen Polarität. Dies ist anhand der wildtypischen Lokalisation des basolateralen Markers Discslarge (Dlg) (Woods et al. 1996) und des Markers für die Adherens Junctions, E-cadherin (E-cad), (Übersicht in Perez-Moreno et al. 2003) zu sehen (Abb. 2-14).

Diese Ergebnisse legen nahe, dass durch eine Reduktion der Shrub-Aktivität nur eine ektopische Aktivierung des Notch-Signalweges verursacht wird (Abb. 2-13 E, E'). Sie geht nicht mit einem Verlust der epitheliale Polarität einher (Abb. 2-14). Dies trifft auch auf den Funktionsverlust von *lgd* zu. Hier bleibt die epitheliale Integrität ebenfalls erhalten und es kommt nur zu einer ektopischen Aktivierung des Notch-Signalweges (Klein 2003, Troost et al. 2012, Schneider et al. 2013).

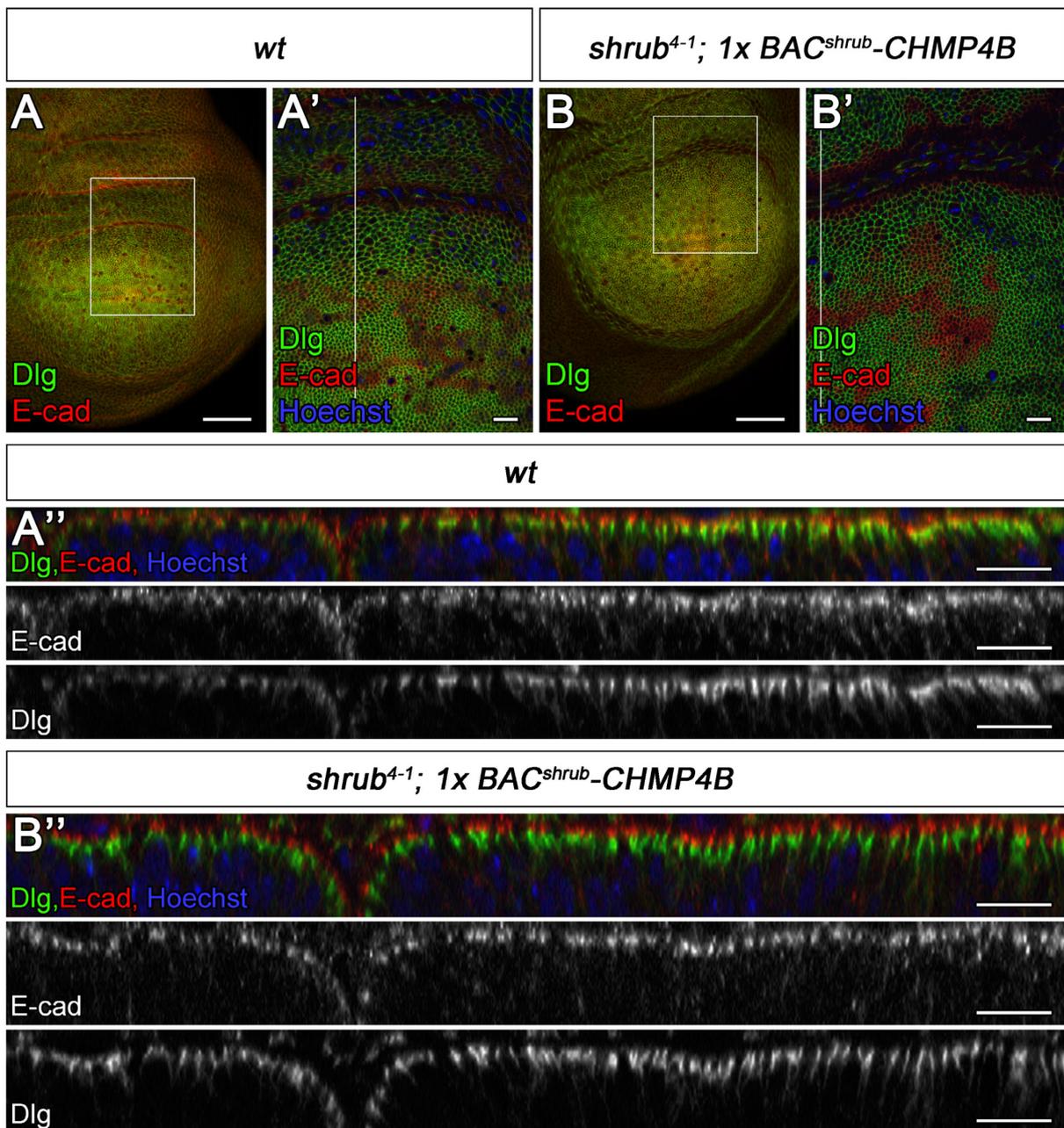


Abb. 2-14: Eine reduzierte Shrub-Funktion (*shrub* hypomorph), wie bei der partiellen Rettung des *shrub*⁴⁻¹ mutanten Phänotyps durch CHMP4B, hat augenscheinlich keinen Effekt auf die apikobasale Polarität. Vergleichende Analyse der apikobasalen Polarität von wildtypischen (A-A'') und *shrub*⁴⁻¹ mutanten (B-B'') Flügelimaginalscheiben, die durch eine Kopie von *BAC*^{*shrub*}-*CHMP4B* partiell gerettet wurden (*shrub*⁴⁻¹; 1x *BAC*^{*shrub*}-*CHMP4B*). E-Cad ist im Wildtyp (A-A'') apikal in den Adherens Junctions lokalisiert und zeigt auch bei der reduzierten Shrub-Funktion (B-B'') keine Veränderung in seiner Lokalisation. Dlg offenbart ebenfalls eine wildtypische basolaterale Lokalisation in den partiell geretteten Flügelimaginalscheiben (vgl. A-A'' mit B-B''). (A-B') apikale Aufsicht auf die Flügelimaginalscheibe. (A', B') Vergrößerung der durch ein weißes Kästchen markierten Region in (A) und (B). Die weiße Linie in (A') und (B') gibt die Position des optischen Querschnitts in (A'') und (B'') an. Maßstabsbalken: (A, B) 50 µm, (A'-B'') 10 µm.

Um weitere Ähnlichkeiten zum *lgd* mutanten Phänotyp aufzudecken, wurde als nächstes der endosomale Transportweg in den partiell geretteten *shrub⁴⁻¹* mutanten Zellen genauer betrachtet. Grund hierfür ist die Tatsache, dass es bei einem Funktionsverlust von *lgd* zu einer Vergrößerung der Endosomen aufgrund einer verzögerten Fusion dieser mit dem Lysosom kommt (siehe 2.2.2) (Schneider et al. 2013). Um auch minimale Unterschiede beispielsweise in der Endosomengröße aufdecken zu können, wurde hierfür zunächst auf die klonale Analyse mit Hilfe des FLP/FRT Systems zurückgegriffen (siehe 6.6.6) (Xu und Rubin 1993).

shrub-mutante Zellklone sind sehr selten und klein, da der Funktionsverlust von *shrub* Zell-letal ist (Schneider et al. 2013, Bäumers et al. 2019). Meist werden *shrub⁴⁻¹* mutante Zellen aufgrund ihrer stark reduzierten Zellfitness durch Zellkompetition in der Flügelimaginalscheibe aus dem Gewebe entfernt (Übersicht in Levayer und Moreno 2013), bevor größere Klone entstehen können. Daher finden sich nach Induktion der Klone, wenn überhaupt nur sehr kleine *shrub*-mutante Zellklone. Sie umfassen nur einige wenige Zellen. Stattdessen sind meist nur sogenannte wildtypische Zwillingsklone (markiert durch zwei Kopien GFP) zu beobachten (Abb. 2-15 A-E). Im Gegensatz dazu können große und häufig vorkommende *shrub⁴⁻¹* mutante Zellklone gesichtet werden, sobald zusätzlich eine Kopie von *BAC^{shrub}-CHMP4B* im Hintergrund exprimiert wird. Die Zellen in diesen geretteten Zellklonen zeigen eine erhöhte Anzahl an Notch-positiven vesikelartigen Strukturen im Vergleich zum umgebenden Gewebe (Abb. 2-15 F-H). Zusätzlich erscheinen sie vergrößert. Dies ist auch bei einem Funktionsverlust von *lgd* zu beobachten (Abb. 2-15 I-K'). Bei diesen vesikelartigen Strukturen handelt es sich um Endosomen (Übersicht in Schnute et al. 2018).

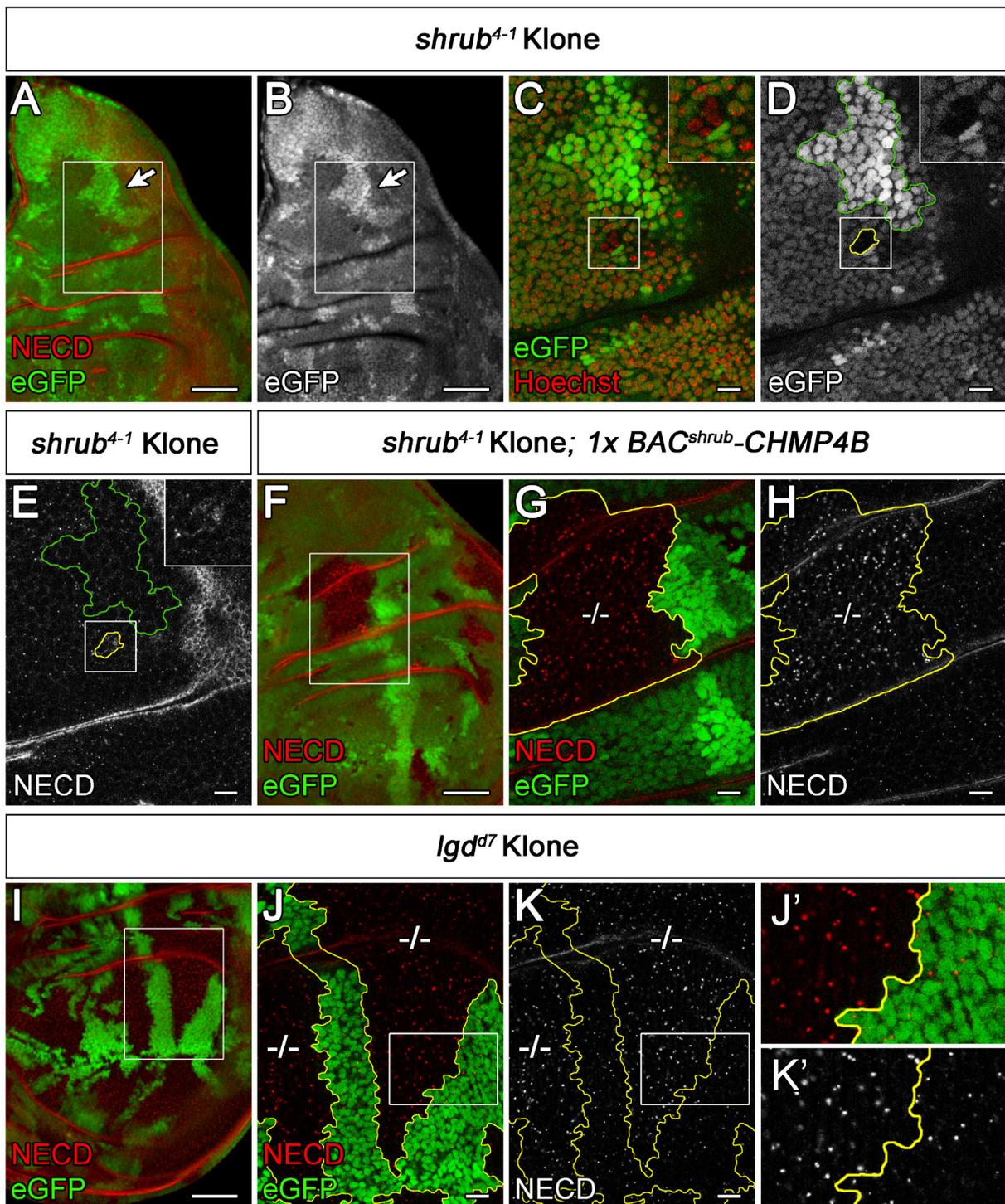


Abb. 2-15: Notch-positive Endosomen treten, sowohl bei einer partiellen Rettung der *shrub*-Funktion (*shrub*⁴⁻¹; 1x BAC^{*shrub*}-CHMP4B) als auch bei einem Funktionsverlust von *lgd* (*lgd*^{d7}), vermehrt auf und sind zudem vergrößert. Vergleichende klonale Analyse des endosomalen Phänotyps einer *shrub* hypomorphen Situation (F-H) mit dem bei einem Funktionsverlust von *lgd* (I-K'). (A-K') Homozygot-mutante Zellklone sind durch die Abwesenheit von GFP markiert und in den Vergrößerungen (D, E, G, H und J-K') gelb umrandet. (A-E) *shrub*⁴⁻¹ mutante Klone sind selten und klein. (A, B) Notum einer Flügelimaginalscheibe, die neben einem *shrub*⁴⁻¹ mutanten Klon, bestehend aus nur wenigen Zellen, einen großen wildtypischen Zwillingsklon aufweist (markiert durch zwei Kopien GFP, Pfeil (A, B), umrandet von

einer grünen Linie (D, E)). Der weiß umrandete Ausschnitt in (A, B) ist vergrößert in (C-E). (C-E) Eine Vergrößerung des *shrub*⁴⁻¹ mutanten Zellklons (weißes Kästchen) befindet sich rechts oben in der jeweiligen Aufnahme. (E) Die wenigen überlebenden Zellen des *shrub*⁴⁻¹ mutanten Klons zeigen eine verstärkte Akkumulation des Notch-Rezeptors (Antikörperfärbung gegen NECD). Im Gegensatz dazu weisen die verwaisten wildtypischen Zwillingklone (markiert durch zwei Kopien GFP, Pfeil in A und B, umrandet von einer grünen Linie in (D und E)), sowie die *shrub*⁴⁻¹-heterozygoten Zellen (markiert durch eine Kopie GFP) eine entsprechend wildtypische Größe und Verteilung von Notch in vesikelartigen Strukturen/Endosomen auf. (C) Die Zellkerne wurden durch Hoechst-33258 markiert (rot). Hierdurch wird sichtbar, dass im Fall des *shrub*-mutanten Klons, Zellen vorhanden sind und keine Lücke im Gewebe vorliegt. (F-H) *shrub*⁴⁻¹ mutante Zellklone, die durch die Anwesenheit von einer Kopie *BAC^{shrub}-CHMP4B* partiell gerettet wurden. (F) Das Vorhandensein von großen *shrub*⁴⁻¹ mutanten Zellklonen impliziert, dass durch eine Kopie *BAC^{shrub}-CHMP4B*, die für den Funktionsverlust von *shrub* charakteristische Zellletalität unterdrückt wird. (G, H) Vergrößerung der weiß umrandeten Region in (F), die einen homozygot mutanten Zellklon enthält. Die partiell geretteten Zellen der *shrub*⁴⁻¹ mutanten Klone zeigen einen endosomalen Defekt, der sich durch eine erhöhte Anzahl an Notch-positiven Endosomen äußert, die zudem vergrößert sind. Dieser endosomale Defekt ähnelt dem der Zellen eines *lgd*^{d7} mutanten Klons (I-K'). (J-K) Auch hier sind die Notch-positiven Endosomen vergrößert. (I) Flügelfeld einer Imaginalscheibe, die einige *lgd*^{d7} mutante Zellklone aufweist. Die wildtypischen Zwillingklone sind hier kleiner als die mutanten Klone, was auf eine Überproliferation der *lgd*^{d7} mutanten Zellklone hindeutet. Dies ist auch bei der partiellen Rettung der *shrub*⁴⁻¹ mutanten Zellklone (F) der Fall. Der weiß umrandete Ausschnitt in (I) ist vergrößert in (J, K). Eine Vergrößerung zur detaillierten Ansicht des endosomalen Phänotyps in (J, K) (weißes Quadrat) ist jeweils in (J') und (K') zu sehen. Maßstabsbalken: (A, B, F und I) 50 µm, (C-E, G, H, J, K) 10 µm.

Eine anschließende Ultrastrukturelle Analyse der *shrub* hypomorphen Situation (Abb. 2-16), wie sie zuvor bei einem Funktionsverlust von *lgd* durchgeführt wurde (siehe 2.2.2), bestätigt, dass die Endosomen der partiell geretteten *shrub*⁴⁻¹ mutanten Zellen gegenüber dem Wildtyp vergrößert sind (Abb. 2-16 C). Außerdem enthalten sie trotz reduzierter Shrub-Aktivität ILVs. Zudem ist der Anteil an ILVs, erfasst durch eine Quantifizierung des elektronendichten Material innerhalb der Endosomen (Abb. 2-5 und siehe 6.5), wie bei *lgd*^{d7} mutanten MVBs nicht verringert (vgl. Abb. 2-16 D mit Abb. 2-9). In diesem Versuchsaufbau haben wildtypische MVBs im Durchschnitt einen ILV-Anteil von 41,2 % und MVBs bei einer partiellen Rettung durch *BAC^{shrub}-CHMP4B* 42,8 %.

Diese Untersuchung zeigt, dass eine reduzierte Shrub-Aktivität in den partiell geretteten Zellen (*shrub*⁴⁻¹; 1x *BAC^{shrub}-CHMP4B*) nicht mit einer Reduktion der ILV-Bildung einhergeht. Der endosomale Phänotyp in dieser *shrub* hypomorphen Situation ähnelt daher in beiden gemessenen Parametern, MVB-Größe und ILV-Anteil, dem *lgd* mutanten Phänotyp.

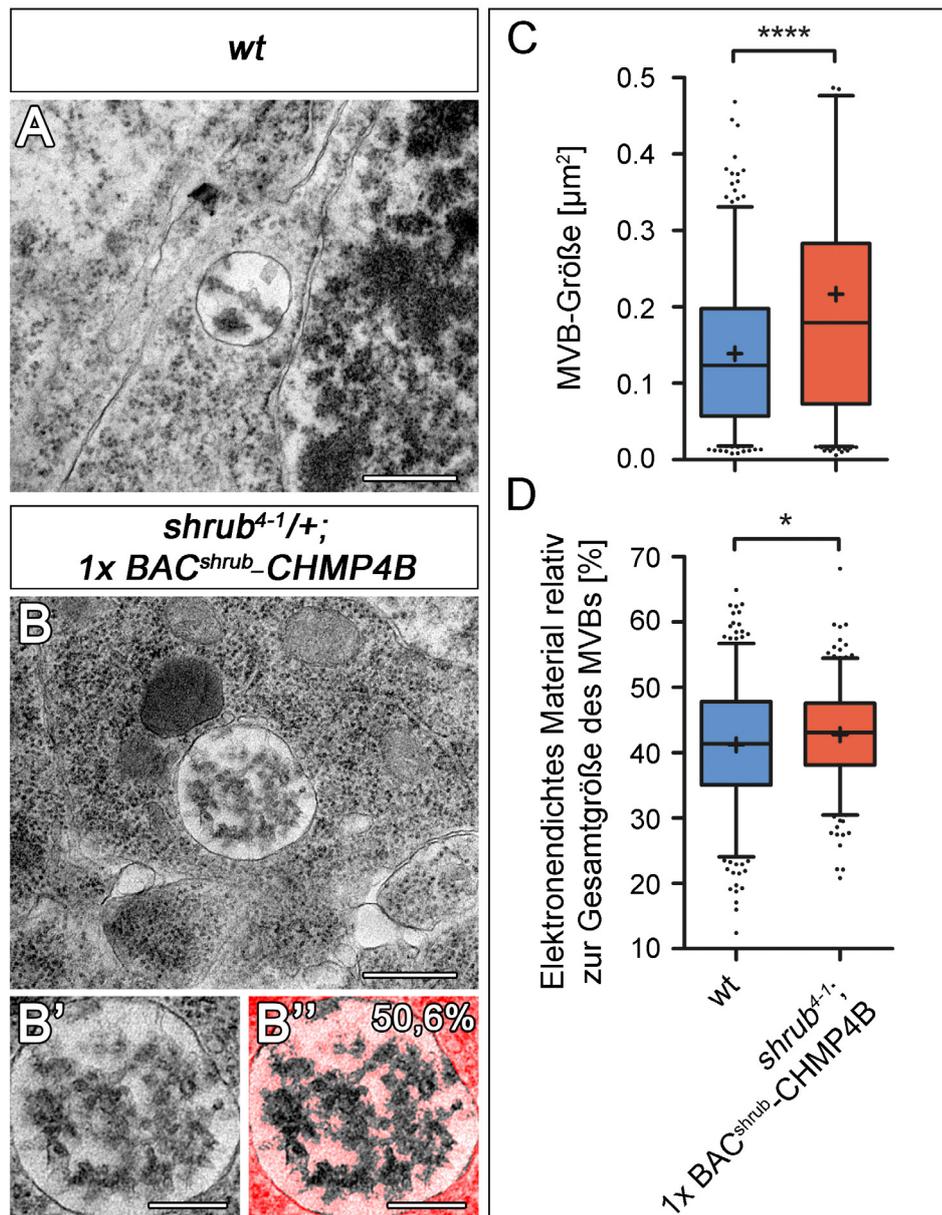


Abb. 2-16: Eine Reduktion der Shrub-Aktivität resultiert in einer signifikanten Vergrößerung der MVBs, hat aber keinen negativen Einfluss auf die ILV-Bildung. Ultrastrukturelle Analyse von *shrub*⁴⁻¹ mutanten Zellen, die durch die Anwesenheit von einer Kopie *BAC*^{*shrub*}-*CHMP4B* partiell gerettet wurden (*shrub*⁴⁻¹; 1x *BAC*^{*shrub*}-*CHMP4B*). Repräsentative TEM-Aufnahmen von wildtypischen (A) und partiell geretteten *shrub*⁴⁻¹ mutanten (B) Zellen (Flügelimaginalscheiben). (B', B'') Beispielhafte Bestimmung des ILV-Anteils anhand des MVBs in (B). Die Überlagerung in (B'') zeigt den Bereich, der nicht als elektronendichtes Material innerhalb des MVBs erkannt wurde, in rot unterlegt. Bei diesem MVB machen 50,6 % der Gesamtfläche elektronendichtes Material und somit ILVs aus. (C) Statistische Analyse der Größe von wildtypischen (blau) und partiell geretteten *shrub*⁴⁻¹ mutanten Zellen (rot). Die durchschnittliche MVB-Größe von den geretteten *shrub*⁴⁻¹ mutanten Zellen ist signifikant vergrößert im Vergleich zum Wildtyp. (D) Quantifizierung des elektronendichten Material im Lumen von wildtypischen MVBs (blau) und MVB mit reduzierter Shrub-Aktivität (rot), um einen möglichen Einfluss auf die ILV-Bildung aufzudecken. Der durchschnittliche ILV-Anteil ist in der *shrub* hypomorphen Situation (*shrub*⁴⁻¹; 1x *BAC*^{*shrub*}-*CHMP4B*) nur

marginal gegenüber dem Wildtyp erhöht. Er beträgt 42,8 % anstatt der wildtypischen 41,2 %. [(C-D) wt n=337 MVBs; (C) *shrub*⁴⁻¹; 1x *BAC*^{*shrub*}-*CHMP4B* n=271, (D) *shrub*⁴⁻¹; 1x *BAC*^{*shrub*}-*CHMP4B*n=263 (bei acht MVBs ist die Qualität der EM-Aufnahme zur Berechnung des ILV-Anteils nicht gut genug); (C) Mann Whitney test, zweiseitig p< 0,0001 (****). (C) Werte größer als 0,5 µm² werden nicht gezeigt (wt: 1 von 337 MVBs; *shrub*⁴⁻¹; 1x *BAC*^{*shrub*}-*CHMP4B*: 10 von 271 MVBs); (D) Ungepaarte, zweiseitiger t-Test, p< 0,05 (*); Box-Whisker-Plot: 5-95 Perzentile; Mittelwert durch ein "+" markiert]. Maßstabsbalken: (A, B) 500 nm; (B', B'') 250 nm.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass der Phänotyp einer *shrub* hypomorphen Situation (reduzierte Shrub-Aktivität: *shrub*⁴⁻¹; 1x *BAC*^{*shrub*}-*CHMP4B*) dem bei einem Funktionsverlust von *lgd* ähnelt. In beiden genetischen Situation kommt es erstens zu einer ektopischen Aktivierung des Notch-Signalweges (Abb. 2-13), zweitens zu keiner Störung der apikobasale Polarität (Abb. 2-14) (Troost et al. 2012), drittens zu einer Vergrößerung der Endosomen (Abb. 2-15 und vgl. Abb. 2-16 mit Abb. 2-8) und viertens zu keiner Reduzierung des ILV-Anteils (vgl. Abb. 2-16 mit Abb. 2-9).

2.2.6 Lgd reguliert die Aktivität von Shrub und nicht dessen Expressionslevel

Der *lgd* mutante Phänotyp ist auf einen allgemeinen Defekt im endosomalen Abbau von Transmembranproteinen der Plasmamembran zurückzuführen (Schneider et al. 2013, Dissertation Troost 2013). Ursache hierfür scheint eine Reduktion der Aktivität der ESCRT-III Komponente Shrub während der ILV-Bildung zu sein (siehe 2.2.1 und 2.2.5) (Troost et al. 2012, Schneider et al. 2013). Diese, beobachtete unzureichende Aktivität, (siehe 2.2.1 und 2.2.5) könnte jedoch auch durch eine reduzierte Genexpression von *shrub* in *lgd* mutanten Zellen verursacht werden und nicht wie vermutet durch eine posttranslationale Reduktion der Aktivität des Proteins Shrub. Letztere Theorie beruht unter anderem darauf, dass Lgd ein direkter Interaktionspartner von Shrub ist und durch seine Bindung Einfluss auf die Polymerisation von Shrub nimmt (Troost et al. 2012, McMillan et al. 2017).

Um daher einen Effekt auf das Expressionslevel von Shrub bei einem Funktionsverlust von *lgd* auszuschließen, wurde an dieser Stelle eine klonale Analyse (siehe 6.6.6 (Xu und Rubin 1993)) in Flügelimaginalscheiben durchgeführt (Abb. 2-17 A-D'). Dabei zeigt eine Antikörperfärbung gegen Shrub keinen erkennbaren Unterschied im Expressionslevel von Shrub zwischen den *lgd* mutanten Zellen und den wildtypischen angrenzenden Zellen

(Abb. 2-17 D, D'). Folglich scheint der Tumorsuppressor *Lgd* notwendig für die vollständige Aktivität des Shrub-Proteins zu sein und nicht für seine Expression.

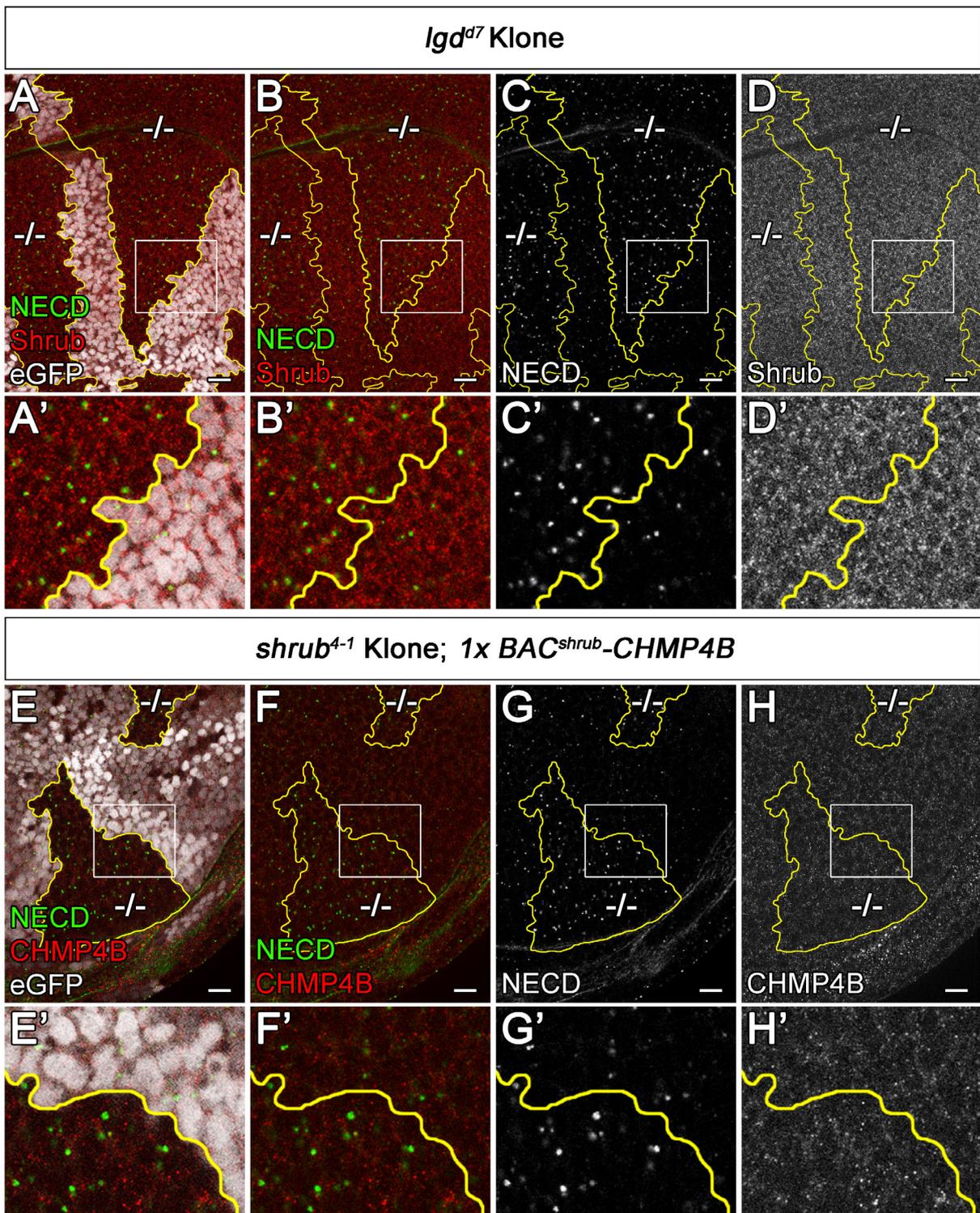


Abb. 2-17: Der Funktionsverlust von *lgd* hat keinen Einfluss auf das Expressionslevel von Shrub. Zudem zeigt sich keine veränderte Lokalisation von Shrub/CHMP4B in *lgd^{d7}* mutanten Zellen oder bei der partiellen Rettung des *shrub⁴⁻¹* mutanten Phänotyps. (A-D') Klonale Analyse des Expressionslevels von Shrub in *lgd^{d7}* mutanten Zellen im Vergleich zu wildtypischen Zellen. Homozygot-mutante

Zellklone sind durch die Abwesenheit von GFP markiert (A, A') und gelb umrandet (A-D'). (B-C') In *lgd^{Δ7}* mutanten Zellklonen sind die Notch-positiven Endosomen im Vergleich zu denen in den angrenzenden wildtypischen Zellen (GFP positive) vergrößert. (D, D') Entscheidend ist, dass es keinen erkennbaren Unterschied zwischen dem Expressionslevel von Shrub in *lgd^{Δ7}* mutanten Zellklonen und in den angrenzenden wildtypischen Zellen gibt. (B, B') Zudem ist keine klare Akkumulation von Shrub an Notch-positiven Endosomen bei einem Funktionsverlust von *lgd* zu erkennen. (A'-D') Vergrößerung des weißumrandeten Ausschnitts in (A-D). (E-H') Klonale Analyse der CHMP4B Lokalisation bei der partiellen Rettung des Funktionsverlusts von *shrub* durch humanes CHMP4B (*shrub^{Δ1}; 1x BAC^{shrub}-CHMP4B*). Auch hier sind homozygot-mutante Zellklone durch die Abwesenheit von GFP markiert (E, E') und gelb umrandet (E-H'). (G, G') Die partiell geretteten Zellen des *shrub^{Δ1}* mutanten Klons weisen eine erhöhte Anzahl an Notch-positiven Endosomen auf, die zudem vergrößert sind. (H, H') Des Weiteren zeigt sich bei einer Antikörperfärbung eine zytoplasmatische Lokalisation von CHMP4B und (F, F') keine Akkumulation von CHMP4B an Notch-positiven Endosomen. Interessanterweise gibt es keinen erkennbaren Unterschied zwischen der CHMP4B Lokalisation in *shrub^{Δ1}* mutanten Zellen und in den angrenzenden Zellen. (E'-H') Vergrößerung des weißumrandeten Ausschnitts in (E-H). Maßstabsbalken: (A-H) 10 μm.

Zudem stellte sich die Frage, ob der Funktionsverlust von *lgd* einen Einfluss auf die Lokalisation von Shrub im Gewebe hat. Während der klonalen Analyse zeigt sich hier keine offensichtliche Veränderung in der Lokalisation von Shrub in *lgd* mutanten Zellen gegenüber der in wildtypischen Zellen (Abb. 2-17 B, D). In *lgd* mutanten Zellen scheint Shrub weiterhin vorwiegend diffus im Zytoplasma lokalisiert zu sein. Es zeigt sich keine distinkte Koloakalisation mit den vergrößerten Notch-positiven Endosomen (Abb. 2-17 B, B') (Masterarbeit Brüser 2013). Eine solch diffuse Verteilung, einer an der endosomalen Membran agierenden ESCRT-III Untereinheit, wurde bereits für Shrub (Sweeney et al. 2006) aber auch für sein Orthologs aus *Saccharomyces cerevisiae*, Snf7 (Babst et al. 2002a), in wildtypischen Epithelzellen bzw. Hefezellen beobachtet.

Interessanterweise zeigt sich auch bei reduzierter Shrub-Funktion (*shrub* hypomorph), wie bei der partiellen Rettung des Funktionsverlusts von *shrub* durch CHMP4B (siehe 2.2.5), bei einer Antikörperfärbung eine zytoplasmatische Lokalisation von CHMP4B (Abb. 2-17 F, H). Auch hier ist keine klare Assoziation mit den vergrößerten Notch-positiven Endosomen zu erkennen (Abb. 2-17 F, F') und auch kein Unterschied in der Lokalisation von CHMP4B in *shrub^{Δ1}* mutanten Zellklonen und den angrenzenden Zellen (Abb. 2-17 H' H). Folglich, ähnelt auch in diesem Aspekt die *shrub* hypomorphe Situation einer *lgd* mutanten Situation. Bei beiden ist keine offensichtliche Veränderung in der Lokalisation der ESCRT-III Komponente Shrub/CHMP4B detektierbar.

2.3 Analyse der funktionalen Beziehung der humanen Orthologe von Shrub und Lgd

Das humane Genom umfasst drei Shrub-Orthologe, CHMP4A, CHMP4B und CHMP4C (Kato et al. 2003, Peck et al. 2004). Ihre bisherige Analyse ist meist auf Zellkultur- und *in vitro*-Experimente beschränkt. Zwar konnte bereits die Interaktion von allen drei humanen CHMP4-Proteinen mit den humanen Lgd-Orthologen, hLGD1/CC2D1B und hLGD2/CC2D1B (im Folgenden nur noch hLGD1 und hLGD2), nachgewiesen werden (Tsang et al. 2006, Usami et al. 2012), jedoch ist die biologische Relevanz dieser Interaktionen u.a. im endosomalen Transportweg unbekannt. Ferner sind mögliche Präferenzen bei den Interaktionen nur ansatzweise erforscht. Ziel dieser Arbeit ist daher nicht nur eine Charakterisierung der humanen CHMP4-Proteine und ihrer Funktionsweise *in vivo*, sondern auch die Analyse ihrer Interaktion mit den beiden humanen Lgd-Orthologen.

Hierbei wurde unter anderem auf das unter 2.1 beschriebene endogene Expressionssystem BAC^{shrub} zurückgegriffen. Für eine endogene Expression der humanen Shrub-Orthologe wurde dabei die Transkriptionseinheit von *shrub* zwischen Start und Stopp-Codon (CDS (Coding Sequence) plus Introns) in BAC^{shrub} durch die cDNA der humanen Orthologe ersetzt. Dies führt zu einer vergleichbaren, endogenen Expression der drei Shrub-Orthologe unter Kontrolle des *Drosophila shrub* Promotors und seiner regulatorischen Elemente (Diplomarbeit Bohnen 2014, Masterarbeit Bäumers 2015). Für jedes der drei humanen Shrub-Orthologe gibt es daher jeweils einen BAC : Für CHMP4A ist es $BAC^{shrub-CHMP4A}$, für CHMP4B $BAC^{shrub-CHMP4B}$ und für CHMP4C $BAC^{shrub-CHMP4C}$. Um auszuschließen, dass mögliche Enhancer-Elemente in den Introns der Transkriptionseinheit von *shrub* Einfluss auf die Expression nehmen, wurde als Kontrolle in den folgenden Experimenten $BAC^{shrub-cDNA}$ (siehe 2.2.5) verwendet.

2.3.1 Charakterisierung der drei humanen Orthologe von Shrub

Hinweise auf funktionelle Unterschiede, aber auch Redundanzen zwischen den drei humanen Shrub-Orthologen wurden erst in wenigen Zellkulturstudien gefunden (siehe 1.4). Oft wird allgemein von CHMP4-Proteinen gesprochen oder nur eins der drei in einer Studie analysiert. Beliebte molekulare Werkzeuge sind hierbei die einfache

Überexpression der ESCRT-Proteine und RNA-Interferenz. Eine detaillierte Analyse in einem vielzelligen Organismus steht noch aus.

Seit Ende Februar 2020 findet sich in der Datensammlung von NCBI (National Center for Biotechnology Information), neben der ursprünglichen Aminosäuresequenz von CHMP4A, eine weitere Sequenz. Bei dieser fehlt der für CHMP4A charakteristische, verlängerte N-Terminus. Das in den folgenden Experimenten vorkommende CHMP4A beruht auf der ursprünglichen CHMP4A-Isoform (265 aa, NP_054888.2), einschließlich des verlängerten N-Terminus.

Tabelle 2-1: Bioinformatische Analyse (EMBOSS Needle). Übersicht über die Sequenzidentitäten und -ähnlichkeiten (angegeben in Klammern) zwischen *Drosophila* Shrub und den humanen CHMP4-Orthologen. Analyse mit CHMP4A ohne (222 aa, NP_054888.2) und mit verlängertem N-Terminus (265 aa, NP_054888.3). In rot markiert ist jeweils die höchste Sequenzidentität pro Spalte.

	Shrub	CHMP4B	CHMP4C
CHMP4A 265 aa NP_054888.2	44,5 % (59,5 %)	52,2 % (67,0 %)	44,2 % (62,1 %)
CHMP4A 222 aa NP_054888.3	52,8 % (70,6 %)	62,1 % (79,7 %)	52,1 % (73,1 %)
CHMP4B 224 aa NP_789782.1	58,1 % (70,9 %)	—	—
CHMP4C 233 aa NP_689497.1	49,6 % (67,5 %)	61,0 % (76,3 %)	—

Ein erster Vergleich aller drei humanen Orthologe untereinander zeigt, dass CHMP4A (265 aa, NP_054888.2) am stärksten von den anderen humanen Orthologen abweicht (Tabelle 2-1). Grund hierfür ist sein verlängerter N-Terminus. Ohne diesen N-Terminus (CHMP4A, 222 aa, NP_054888.3) ähneln CHMP4A und CHMP4C dem dritten Ortholog CHMP4B gleich stark. Beide haben dann eine Sequenzidentität von über 60 % gegenüber CHMP4B (Tabelle 2-1). Die geringere Sequenzidentität der beiden untereinander impliziert, dass sie zumindest zum Teil in unterschiedlichen Position mit CHMP4B

übereinzustimmen. CHMP4B ähnelt aufgrund seiner Sequenz unter den humanen Orthologen am stärksten Shrub (Tabelle 2-1).

Im Vorfeld dieser Arbeit offenbarte bereits eine erste *in vivo* Studie in *Drosophila* mögliche funktionelle Unterschiede zwischen den beiden humanen CHMP4-Proteinen, CHMP4B und CHMP4C (Masterarbeit Bäumers 2015). Hierbei wurde das Rettungsvermögen der humanen Orthologe gegenüber dem *shrub* mutanten Phänotyp analysiert. Die Grundlage bildet dabei das Nullallel *shrub*⁴⁻¹ (Sweeney, Brenman et al. 2006). Humanes CHMP4B ähnelt mit einer Identität von 58,1 % unter den drei humanen Orthologen am stärksten Shrub (Tabelle 2-1). Es konnte bereits gezeigt werden, dass es in der Lage ist, den Funktionsverlust von Shrub zu kompensieren und dabei dessen Funktion zu übernehmen. Für eine Expression von CHMP4B auf dem endogenen Level von Shrub wurde dabei auf *BAC^{shrub}-CHMP4B* zurückgegriffen. In Anwesenheit von zwei Kopien *BAC^{shrub}-CHMP4B* ist beinahe eine vollständige Rettung des Funktionsverlusts von *shrub* sichtbar. *shrub*⁴⁻¹ mutante Fliegen, die eigentlich während der Embryogenese sterben (Sweeney et al. 2006), entwickeln sich dann zu adulten Fliegen. Hier sind jedoch beide Geschlechter steril (Abb. 2-18). In Anwesenheit von nur einer Kopie erreichen 75 % der genetisch zu erwartenden Tiere in ihrer Entwicklung noch das frühe Puppenstadium (Abb. 2-18) (Diplomarbeit Bohnen 2014, Masterarbeit Bäumers 2015).

Humanes CHMP4C ähnelt mit einer Sequenzidentität von 49,6 % und einer -ähnlichkeit von 67,5 % Shrub weitaus weniger als CHMP4B. Es zeigt kein offensichtliches Rettungsvermögen gegenüber der *shrub*⁴⁻¹ mutanten Situation. Sogar in Anwesenheit von zwei Kopien *BAC^{shrub}-CHMP4C* sterben die Tiere vor dem späten zweiten bzw. frühen dritten Larvenstadium (Abb. 2-18) (Masterarbeit Bäumers 2015).

In dieser Arbeit konnte darüber hinaus das dritte Shrub-Ortholog, CHMP4A (NP_054888.2), hier mit verlängertem N-Terminus und daher der niedrigsten Sequenzidentität gegenüber Shrub, analysiert werden (Tabelle 2-1). Genauso wie CHMP4C scheint CHMP4A nicht in der Lage zu sein, die Funktion von *Shrub* in *Drosophila* zu übernehmen. Auch hier kann der Funktionsverlust von *shrub* nicht kompensiert werden. *shrub*⁴⁻¹ mutante Fliegen mit zwei Kopien *BAC^{shrub}-CHMP4A* sterben auch vor dem späten zweiten bzw. frühen dritten Larvenstadium (Abb. 2-18). Eine weitere Eingrenzung

der Entwicklung auf Stadien vor dem späten zweiten Larvenstadium (L2) ist aufgrund des verwendeten Markers (*Tubby*) in diesem Versuchsaufbau nicht möglich.

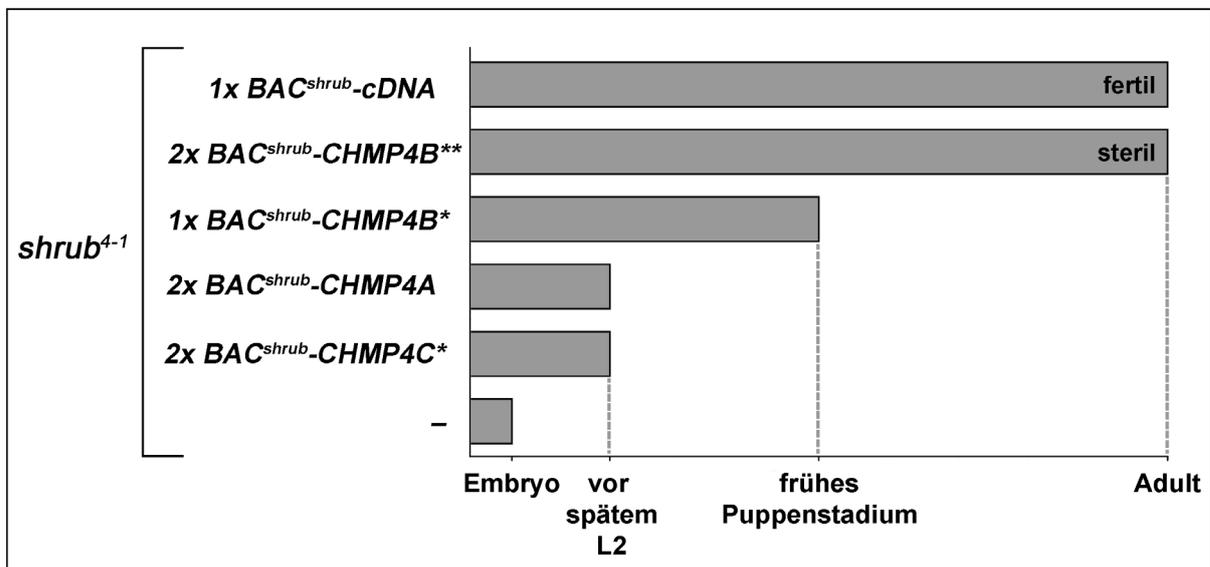


Abb. 2-18: Graphischer Vergleich der Entwicklung von *shrub⁴⁻¹* mutanten Fliegen in Anwesenheit eines der drei verschiedenen humanen Shrub-Orthologe. *shrub⁴⁻¹* mutante Fliegen sterben während der Embryogenese (Sweeney et al. 2006). Eine Expression einer Kopie $BAC^{shrub-cDNA}$ zeigt eine vollständige Rettung und hebt diese embryonale Letalität auf. Beim humanen Ortholog CHMP4B müssen hingegen zwei Kopien $BAC^{shrub-CHMP4B}$ vorhanden sein. Hier sind jedoch beide Geschlechter der adulten Tiere steril. In Anwesenheit von nur einer Kopie $BAC^{shrub-CHMP4B}$ sterben die Fliegen nach einer verlängerten larvalen Phase von ca. zwei Tagen im frühen Puppenstadium. CHMP4A und CHMP4C zeigen kein offensichtliches Rettungsvermögen gegenüber der *shrub⁴⁻¹* mutanten Situation. Die Fliegen sterben in Anwesenheit von zwei Kopien $BAC^{shrub-CHMP4A}$ oder $BAC^{shrub-CHMP4C}$ vor dem späten zweiten Larvenstadium (L2). Bereits veröffentlichte Daten: * (Masterarbeit Bäumers 2015), ** (Diplomarbeit Bohnen 2014, Masterarbeit Bäumers 2015).

Um auszuschließen, dass aufgrund des vorherigen Versuchsaufbaus, eine mögliche Aktivität von CHMP4A und CHMP4C in *Drosophila* übersehen wurde, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine klonale Analyse durchgeführt. Mit Hilfe dieser Analyse besteht die Möglichkeit auch ein marginales Rettungsvermögen von CHMP4A und CHMP4C aufzudecken.

shrub⁴⁻¹ mutante Zellklone sind sehr selten und bestehen nur aus wenigen Zellen (siehe 2.2.5, Abb. 2-15 A-E). Ursache hierfür ist der Funktionsverlust von *shrub*. Er ist stark Zellletal. Nach einer Kloninduktion sind daher meist nur wildtypische Zwillingsklone vorhanden (siehe 2.2.5, Abb. 2-15 A-E). Sobald zusätzlich eine Kopie BAC^{shrub} oder als Kontrolle $BAC^{shrub-cDNA}$ exprimiert wird, entwickeln sich große *shrub⁴⁻¹* mutante

Zellklone (Abb. 2-19 A-C' und Anhang, Abb. 9-2 A-C'). Die Zellen der geretteten Klone unterscheiden sich nicht von den Zellen des angrenzenden wildtypischen Epithels der Flügelimaginalscheibe. Eine Antikörperfärbung gegen die extrazelluläre Domäne von Notch zeigt auch keinerlei Vergrößerung der Notch-positiven Endosomen. Auch bei einer Kopie *BAC^{shrub}-CHMP4B* können *shrub⁴⁻¹* mutante Zellklone beobachtet werden (siehe 2.2.5, Abb. 2-15 F-H). Hier offenbaren die partiell geretteten Zellen des *shrub⁴⁻¹* mutanten Klons jedoch eine Störung im endosomalen Transport (siehe 2.2.5), die sich durch vergrößerte Endosomen äußert (siehe 2.2.5, Abb. 2-15 F-H und Abb. 2-16).

Im Fall der beiden humanen Shrub-Orthologe, CHMP4A und CHMP4C, ist auch mit Hilfe der klonalen Analyse keinerlei Rettungsvermögen gegenüber der *shrub⁴⁻¹* mutanten Situation detektierbar. Es finden sich wie bei einem kompletten Funktionsverlust von *shrub* nur vereinzelt *shrub⁴⁻¹* mutante Zellklone in den Flügelimaginalscheiben. Diese bestehen auch nur aus wenigen Zellen und unterscheiden sich nicht von Zellen, die homozygot mutant für *shrub* sind (vgl. Abb. 2-19 D-G und H-K mit 2.2.5, Abb. 2-15 A-E). Durch Expression der beiden humanen Orthologe wird die Zellletalität nicht aufgehoben. Demzufolge können CHMP4A und CHMP4C auch nicht ansatzweise die Funktion von Shrub in *Drosophila* übernehmen. Ansonsten wären bei ihrer Expression größere Klone zu beobachten (Abb. 2-19, vgl. D-K mit A-C'). Denn nur durch Kompensation des *shrub* Verlusts kann die stark reduzierte Fitness der *shrub⁴⁻¹* mutanten Zellen angehoben und ein Zelltod verhindert werden. Die mutanten Klone würden dann nicht mehr aufgrund der Zellkompetition aus dem epithelialen Gewebe entfernt.

Diese Ergebnisse implizieren, dass, im Gegensatz zu CHMP4B, die humanen Orthologe, CHMP4A und CHMP4C, nicht die Funktion von Shrub übernehmen können. Es scheint daher funktionale Unterschiede zwischen den drei humanen Orthologen zu geben. CHMP4B ist, nicht nur wegen seiner Aminosäuresequenz (Tabelle 2-1), sondern auch aufgrund seiner Funktionalität in *Drosophila*, Shrub am ähnlichsten.

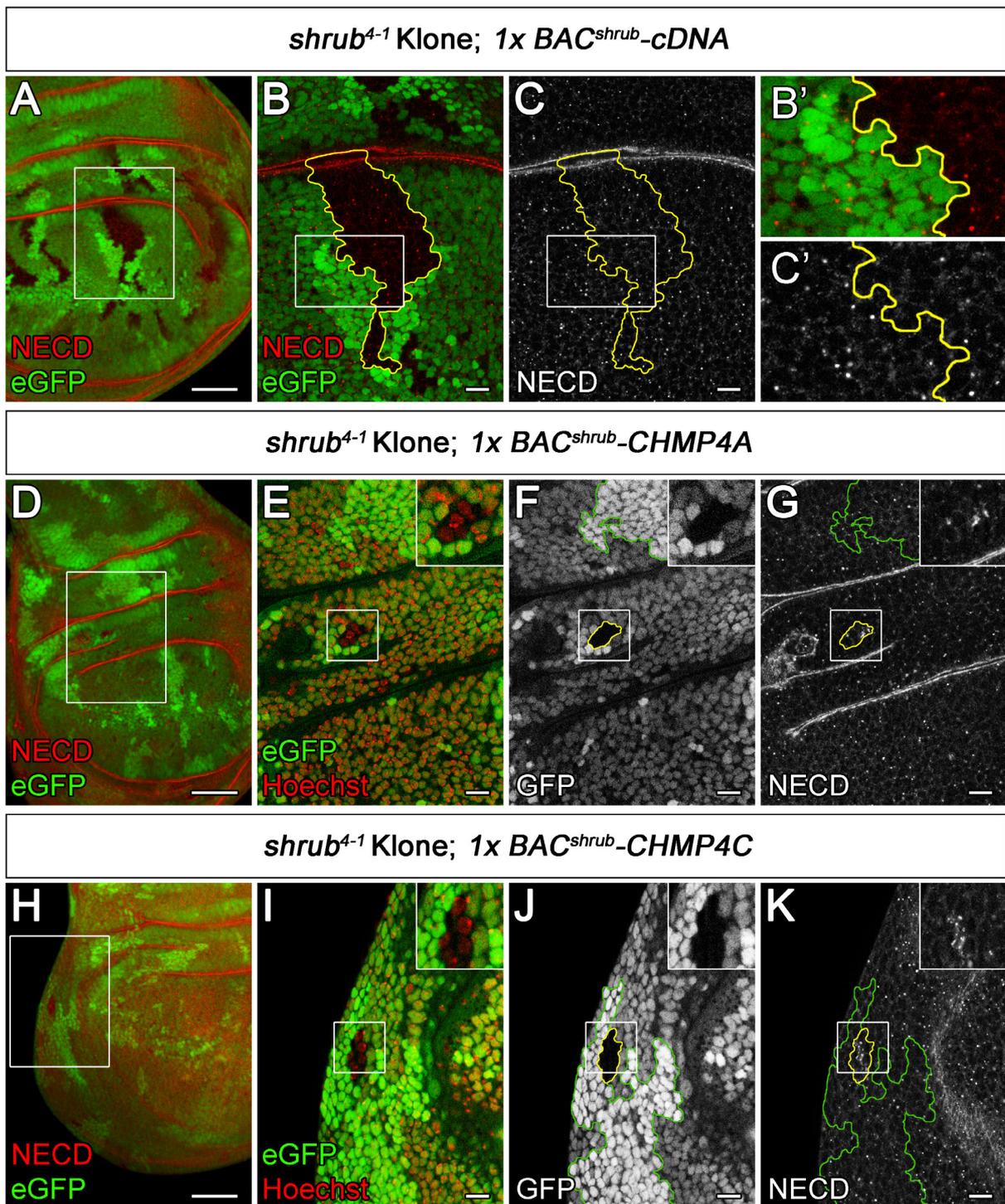


Abb. 2-19: CHMP4A und CHMP4C können nicht den Funktionsverlust von *shrub* in *Drosophila* kompensieren und daher nicht die Funktion von Shrub übernehmen. Klonale Analyse des Rettungsvermögens von humanen CHMP4A (D-G) und CHMP4C (H-K) gegenüber der *shrub*⁴⁻¹ mutanten Situation. Homozygot mutante Zellklone sind durch den Verlust von GFP markiert und in den Vergrößerungen (B-C', F, G, J, K) gelb umrandet. Die Zwillingsklone zeichnen sich hingegen durch zwei Kopien GFP aus und sind in (F, G) und (J, K) grün umrandet. *shrub*⁴⁻¹ heterozygote Zellen, die weiterhin die genetische Ausgangssituation für eine Kloninduktion besitzen, sind durch eine Kopie GFP markiert. (A-C') Flügelfeld einer Imaginalscheibe, das aufgrund der Expression einer Kopie *BAC*^{*shrub*}-*cDNA* mehrere

*shrub*⁴⁻¹ mutante Zellklone beherbergt, darunter einen großen zentralgelegenen Klon. Vergrößerung dieses Zellklons in (B, C). Im Gegensatz dazu bestehen *shrub*⁴⁻¹ mutante Zellklone sonst, aufgrund der hohen Zellletalität, nur aus einigen wenigen Zellen (nicht gezeigt, siehe 2.2.5, Abb. 2-15. A-E). Es liegt hier eine vollständige Rettung vor. Die für den Funktionsverlust von *shrub* charakteristische Zellletalität ist aufgeboben. (C, C') Die Größe der Notch-positiven Endosomen in den geretteten *shrub*⁴⁻¹ mutanten Zellklonen ist wildtypisch. (D-K) Expression der beiden humanen Orthologe, CHMP4A (D-G) und CHMP4C (H-K), in einer Kopie mit Hilfe des *BAC*-Systems: Die *shrub*-mutante Zellklone bestehen aufgrund einer zu hohen Zellletalität nur aus wenigen Zellen. Die geringe Zellzahl ist charakteristisch für den kompletten Funktionsverlust von *shrub* (siehe 2.2.5, Abb. 2-15. A-E). Oft ist auch hier nur noch der wildtypische Zwillingsklon auffindbar (grün umrandet). (E, I) Die Zellkerne wurden durch Hoechst-33258 markiert (rot). Zudem zeigen die *shrub*⁴⁻¹ mutanten Zellklone weiterhin eine Akkumulation von Notch, wie sie ebenfalls für einen kompletten Verlust von *shrub* typisch ist. Es offenbart sich demnach keine Aktivität und damit auch kein Rettungsvermögen von CHMP4A und CHMP4C. Eine detaillierte Vergrößerung des *shrub*⁴⁻¹ mutanten Zellklons (weißes Quadrat) in Anwesenheit von CHMP4A (E-G) und CHMP4C (I-K) befindet sich rechts oben in der jeweiligen Aufnahme. Maßstabsbalken: (A, D, H) 50 µm, (B, C, E-G, I-K) 10 µm.

2.3.2 Analyse der CHMP4B-Polymerisation *in vivo*

Die Polymerisation der ESCRT-III Untereinheit Shrub an der endosomalen Membran ist essentiell für Bildung und Abschnürung von intraluminalen Vesikeln (ILVs) während der Reifung von Endosomen (Teis et al. 2008). Durch eine erfolgreiche Kristallisation der N-terminalen Kernregion von Shrub (10-143 aa) konnte bereits die strukturelle Basis für diese Polymerisation in *Drosophila* aufgeklärt werden (siehe 1.4 (McMillan et al. 2016)). Sie basiert auf elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen der positiv geladenen Kopf-Region eines Shrub-Monomers und der negativ geladenen Region des benachbarten Monomers (McMillan et al. 2016). Eine Kristallisation der Kernregion von Snf7, dem Shrub-Ortholog aus der einzelligen Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*), zeigt hingegen, dass dessen Homopolymerisierung vorrangig auf hydrophoben Interaktionen beruht (Tang et al. 2015).

Das Netzwerk aus elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen zwei Shrub-Monomeren, das mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse aufgedeckt wurde, beinhaltet einige Salzbrückenbindungen (Abb. 2-20). Diese, dank der Kristallisation identifizierten, elektrostatischen Interaktionen im Shrub-Polymer wurden bereits mit Hilfe eines *in vivo* Rettungsassays, der auf dem reduzierten Expressionssystem *shrubP* (siehe 2.1) beruht, evaluiert und bestätigt. Hierfür wurden einzelne Aminosäuren in der basischen oder sauren Polymerisationsoberfläche von Shrub ausgetauscht und das Rettungsvermögen

CHMP4B (23-97 aa (Martinelli et al. 2012)) offenbart zusätzlich ein vergleichbares elektrostatisches Oberflächenpotential (Abb. 2-21). Auffällig ist zudem die Ähnlichkeit in der räumlichen Anordnung der konservierten Aminosäuren, die im Shrub-Polymer, die Salzbrückenbindungen ausbilden.

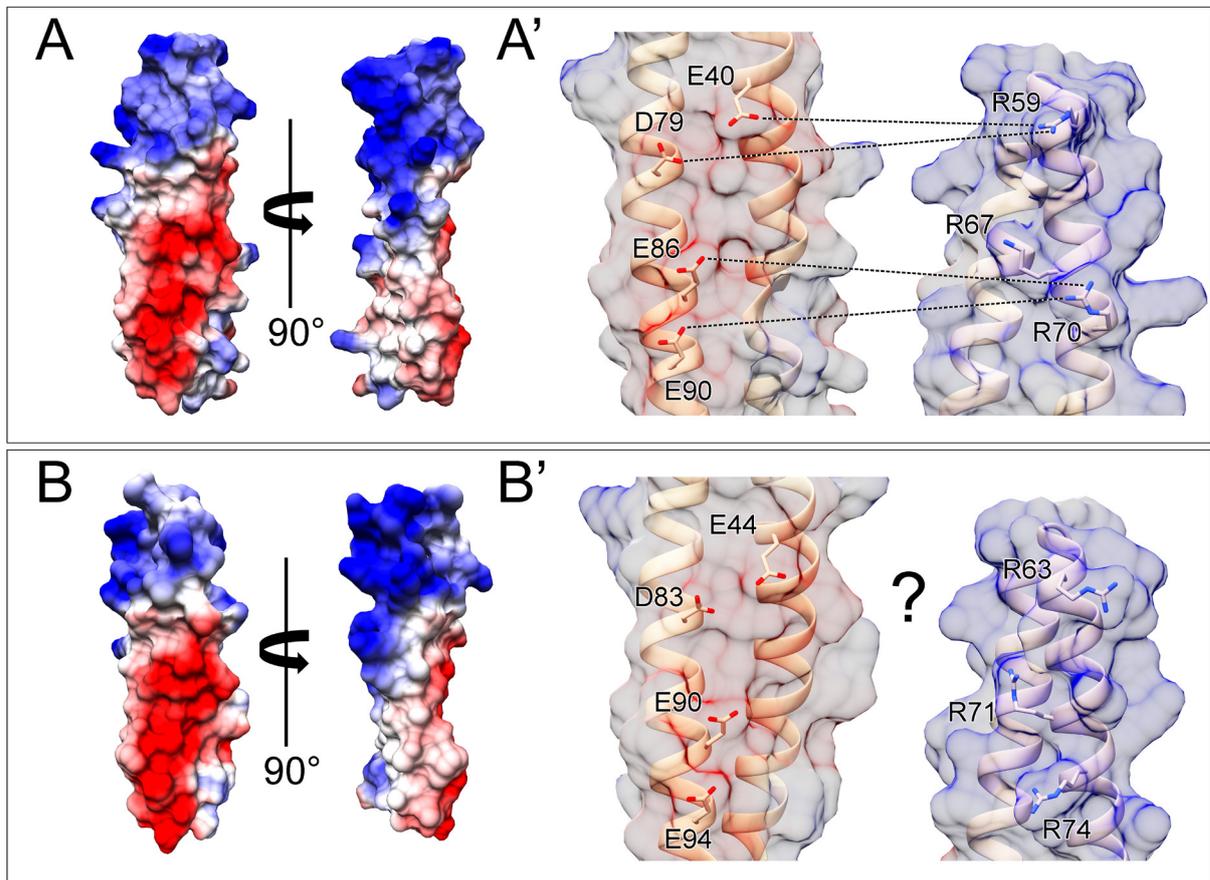


Abb. 2-21: Struktur der Kopffregion der N-terminalen, helikalen Haarnadelstruktur von (A) Shrub (19-93aa) und (B) CHMP4B (23-97aa). (A) Darstellung der molekularen Oberfläche von Shrub (19-93aa) mit entsprechendem elektrostatischen Potential ((-10;+10) in rot negativ, in blau positiv) [PDB Eintrag 5j45 (McMillan et al. 2016)]. (A') „open book“-Darstellung der elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen zwei interagierenden Shrub-Monomeren. Die gestrichelten Linien geben die Salzbrückenbindungen, basierend auf den Kristallisationsergebnissen, zwischen den positiv geladenen Aminosäuren des einen Shrub-Monomers und negativ geladenen Aminosäureresten des Anderen wieder [PDB Eintrag 5j45 (McMillan et al. 2016)]. Die jeweilige molekulare Oberfläche der Kristallstruktur ist transparent dargestellt. (B) Darstellung der molekularen Oberfläche der Kristallstruktur von CHMP4B (23-97aa) mit entsprechendem elektrostatischen Potential ((-10;+10) in rot negativ, in blau positiv) [PDB Eintrag 4ABM (Martinelli et al. 2012)]. (B') Illustration zweier CHMP4B Monomere, ähnlich ausgerichtet und orientiert wie die Shrub-Proteine in (A'). Die jeweiligen Reste der konservierten und für die Shrub-Polymerisation als entscheidend identifizierten Aminosäuren sind hier in den zwei CHMP4B-Monomeren angezeigt. Es handelt

sich bei diesen basischen und sauren Aminosäuren um diejenigen, die im Shrub-Polymer, die Salzbrückenbindungen ausbilden.

Die Polymerisation von humanen CHMP4B wurde aufgrund der hohen Konservierung (Abb. 2-20) mit Hilfe des zuvor beschriebene *in vivo* Rettungsassays (McMillan et al. 2016) analysiert. Ausgangspunkt ist die auffällige embryonale Letalität bei einem Funktionsverlust von *shrub* (Sweeney et al. 2006). Für eine endogene Expression von CHMP4B auf dem physiologischen Level von Shrub wurde zwischen 5' UTR und 3' UTR von *shrubP* die cDNA von *CHMP4B* kloniert. Es wurde für die folgenden Experimente auf dieses reduzierte Expressionssystem *shrubP* (2.1) zurückgegriffen, da sich hier CHMP4B leichter manipulieren lässt (siehe 6.2.1, Mutagenese PCR). Voraussetzung für diesen Assay ist, dass CHMP4B exprimiert mit Hilfe von *shrubP* den Funktionsverlust von *shrub* merklich kompensieren kann. Dies ist der Fall. Die Letalität kann durch die Expression von zwei Kopien des Transgens *shrubP-CHMP4B* oder *shrubP-Myc-CHMP4B* soweit aufgehoben werden, dass zeitweise vereinzelt *pharate adults* gesichtet werden konnten. Erstaunlicherweise treten in den etablierten Stämmen, *shrub⁴⁻¹; shrubP-CHMP4B/ SM6a-TM6b* und *shrub⁴⁻¹; shrubP-Myc-CHMP4B/ SM6a-TM6b*, nach einiger Zeit keine *pharate adults* mehr auf. Stattdessen sterben die Fliegen meist schon vor dem dritten Larvenstadium. Die Etablierung wurde daher dreimal unabhängig durchgeführt und zwar mit transgenen Fliegen, die auf zwei unterschiedlich Insertionsevents zurückgehen. Jedoch wiederholte sich dieses Phänomen. Nur direkt nach der Etablierung der Stämme konnte eine Rettung durch die Anwesenheit von zwei Kopien *shrubP-CHMP4B* oder *shrubP-Myc-CHMP4B* beobachtet werden. Anzumerken ist, dass aufgrund des Markers *Tubby (Tb)* bei diesem Versuchsaufbau eine Eingrenzung der Entwicklung auf Stadien vor dem späten zweiten Larvenstadium nicht möglich ist.

In einem ersten Schritt wurden die entsprechend konservierten sauren Aminosäuren der negativen Polymerisations-Oberfläche von Shrub (E40, D79, E86) in CHMP4B (E44, D83 und E90) jeweils einzeln durch ein basisches Lysin ausgetauscht (Tabelle 2-2). Hierbei zeigten zu keinem Zeitpunkt weder *shrubP-Myc-CHMP4B E44K*, *shrubP-Myc-CHMP4B D83K* noch *shrubP-Myc-CHMP4B E90K*, ein offensichtliches Rettungsvermögen gegenüber der *shrub⁴⁻¹* mutanten Situation (Tabelle 2-2). Selbst in Anwesenheit von zwei Kopien sterben die Fliegen vor dem dritten Larvenstadium. Sie scheinen den Funktionsverlust von *shrub* nicht ausgleichen zu können. Folglich führt eine Ladungsumkehr durch

Austausch einer der sauren Aminosäuren in der negativ geladenen, potenziellen Polymerisations-Oberfläche von CHMP4B, wie bei Shrub (McMillan et al. 2016), zu einem Funktionsverlust.

Als nächstes wurden die entsprechenden konservierten basischen Aminosäuren (R59 und R70 in Shrub) in der positiv geladenen, potenziellen Polymerisation-Oberfläche von CHMP4B (R63 und R74) unabhängig voneinander durch saure Glutaminsäuren ersetzt (Tabelle 2-2).

Ein Austausch des Arginins an Position 63 in CHMP4B (59 in Shrub) durch eine Glutaminsäure hat keinen offensichtlichen, negativen Einfluss auf die Polymerisationsfähigkeit von CHMP4B. Im Gegenteil, *shrub⁴⁻¹* mutante Fliegen die zwei Kopien des Transgens *shrubP-Myc-CHMP4B R63E* tragen entwickeln sich zu adulten, jedoch sterilen Fliegen. Sie kommen also in ihrer Entwicklung weiter als Fliegen die zwei Kopien des Transgens *shrubP-Myc-CHMP4B* tragen. Selbst bei einer Kopie erreicht ein Teil der Fliegen das frühe Puppenstadium, wohingegen bei einer Kopie *shrubP-Myc-CHMP4B* die Fliegen vor dem frühen dritten Larvenstadium (L3) sterben (Tabelle 2-2). Eine Ladungsumkehr durch Austausch dieses Arginins (Shrub R59 und CHMP4B R63) in der basischen Region verursacht also weder bei Shrub (Dissertation Tibbe 2019) noch CHMP4B einen Funktionsverlust und damit eine Defekt in der Polymerisation.

Im Fall des Arginins an Position 74 in CHMP4B zeigt sich der erste große Unterschied zwischen CHMP4B und Shrub. Der Austausch dieses Arginins (in Shrub R70) durch eine Glutaminsäure führt im Fall von CHMP4B zu einem Verlust der Funktion. Das Transgen *shrubP-Myc-CHMP4B R74E* ist auch in zwei Kopien nicht in der Lage die *shrub⁴⁻¹* mutante Situation zu retten. Die Fliegen sterben vor dem frühen dritten Larvenstadium. Im Vergleich dazu, kann *shrubP-Myc-shrub R70E* den Ausfall des endogenen *shrub* in zwei Kopien vollständig retten (Dissertation Tibbe 2019).

Tabelle 2-2: Übersicht über das Rettungsvermögen verschiedener *shrubP*-Transgene, in einer und zwei Kopien, gegenüber dem *shrub* null-mutanten Hintergrund (*shrub⁴⁻¹*). Links in der Tabelle befinden sich die Ergebnisse für *Drosophila* Shrub und rechts die entsprechenden Ergebnisse für das humane Ortholog CHMP4B. In einer Zeile befinden sich daher die Ergebnisse für einen Aminosäureaustausch in Shrub (links) und für den entsprechenden Austausch der konservierten Aminosäure in CHMP4B (rechts). Rot unterlegt sind die Ergebnisse für die sauren Aminosäuren, in blau, die

für die basischen Aminosäuren. Bereits veröffentlichte Daten: * (Masterarbeit Bäumers 2015), ** (McMillan et al. 2016), *** (Dissertation Tibbe 2019).

<i>shrubP-...</i>	1 Kopie	2 Kopien	<i>shrubP-...</i>	1 Kopie	2 Kopien
<i>shrub</i>	<i>pharate adults, Escapers</i>	fertile Adulte*	<i>CHMP4B</i>	-	vereinzelt <i>pharate adults</i>
<i>Myc-shrub</i>	<i>pharate adults</i>	fertile Adulte	<i>Myc-CHMP4B</i>	Vor früh L3	vereinzelt <i>pharate adults</i>
<i>shrub E40K</i> **	-	vor frühem L3	<i>Myc-CHMP4B E44K</i>	-	vor frühem L3
<i>shrub D79K</i> **	-	vor frühem L3	<i>Myc-CHMP4B D83K</i>	-	vor frühem L3
<i>shrub E86K</i> **	-	vor frühem L3	<i>Myc-CHMP4B E90K</i>	-	vor frühem L3
<i>Myc-shrub R59E</i> ***	Vor früh L3	fertile Adulte	<i>Myc-CHMP4B R63E</i>	Puppenstadium	sterile Adulte
<i>Myc-shrub R70E</i> ***	Vor früh L3	fertile Adulte	<i>Myc-CHMP4B R74E</i>	-	vor frühem L3

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Polymerisation von CHMP4B wahrscheinlich auf ähnlichen elektrostatischen Wechselwirkungen beruht wie die von Shrub. Hierbei ist, wie bei *Drosophila* Shrub, die negativ geladene molekulare Oberfläche der verlängerten helikalen Haarnadelstruktur entscheidend für die Funktion von CHMP4B *in vivo*. Auch scheint die positive geladene Kopfregion eines CHMP4B-Monomers, wie die von Shrub, robuster zu sein, was eine Ladungsumkehr durch den Austausch einer einzelnen Aminosäure angeht. Dennoch gibt es hier einen Unterschied zwischen CHMP4B und Shrub. Der Austausch des Arginins an Position 74 in CHMP4B (in Shrub R70) führt im Gegensatz zu einem Austausch bei Shrub zu einem kompletten Funktionsverlust von CHMP4B und nicht nur zu einer Reduktion der Funktionalität.

2.3.3 Genetische Hinweise für eine Heteropolymerisation zwischen den drei humanen Shrub-Orthologen in einem Organismus

Im Rahmen dieser Arbeit konnten bereits Hinweise auf funktionale Unterschiede zwischen den drei humanen Shrub-Orthologen, CHMP4A, CHMP4B und CHMP4C, gesammelt werden (siehe 2.3.1) Im Gegensatz zu CHMP4B können CHMP4A und CHMP4C nicht den Funktionsverlust von *shrub* kompensieren. Sie scheinen daher Shrub nicht funktional in *Drosophila* ersetzen zu können (siehe 2.3.1).

Ein genauerer Blick auf die Aminosäuresequenzen (Abb. 2-22) und die vorhergesagte molekulare Oberfläche von CHMP4A und CHMP4C (Anhang, Abb. 9-3) offenbart jedoch eine hohe Konservierung, der für die Shrub-Polymerisation und die Lgd-Interaktion entscheidenden Regionen. Es lassen sich sogar die einzelnen Aminosäuren, die zwischen den Shrub-Monomeren und mit der dritten DM14 Domäne von Lgd Salzbrückenbindungen ausbilden (McMillan et al. 2016, McMillan et al. 2017), wiederfinden (Abb. 2-22).

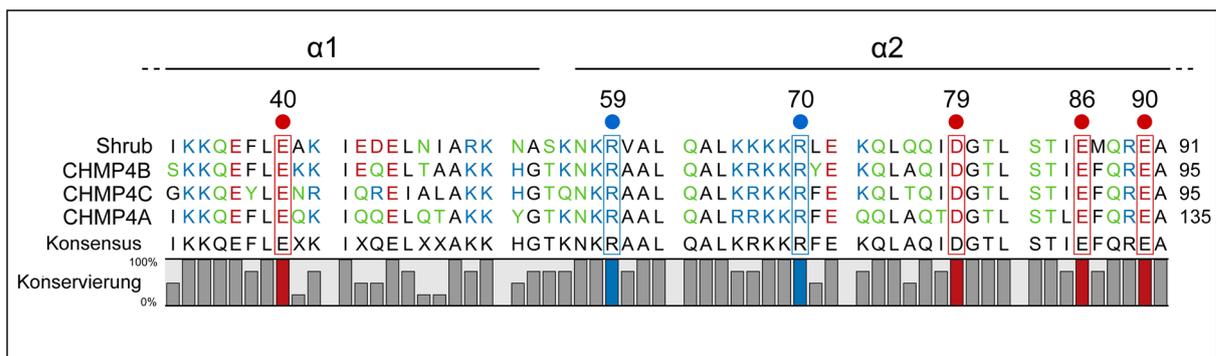


Abb. 2-22: Aminosäuresequenzvergleich eines Ausschnitts der N-terminalen Kernregion der drei humanen CHMP4-Orthologe [CHMP4B (37-95 aa), CHMP4C (37-95 aa) und CHMP4A (77-135 aa)] mit der von *Drosophila* Shrub (33-91 aa). Aminosäuren, die während der Homopolymerisation Salzbrücken zwischen den Shrub-Monomeren ausbilden (McMillan et al. 2016), sind mit ihrer entsprechenden Position im Shrub-Protein angegeben und durch einen farbigen Punkt markiert. Die sauren Aminosäuren (roter Punkt) bilden zusätzlich auch die Salzbrücken mit der dritten DM14 von Lgd aus (McMillan et al. 2017). Eine gleichzeitige Homopolymerisation von Shrub und eine Interaktion von Shrub mit Lgd schließen sich daher gegenseitig aus. Es zeigt sich, dass alle Aminosäuren, die als entscheidend für die Interaktion mit dem benachbarten Shrub-Monomer und der dritten DM14 von Lgd identifiziert wurden, in allen drei humanen Orthologen konserviert sind. Oberhalb des Sequenzvergleich sind passend zur Shrub-Sequenz die zwei in der Kristallstruktur identifizierten Helices eingezeichnet ($\alpha 1$ und $\alpha 2$). Unterhalb des Sequenzvergleichs ist die Konsensussequenz und die Höhe der Konservierung in Prozent angegeben. Die Aminosäuren sind im Ein-Buchstabencode wiedergegeben. Die Farben der Aminosäuren im

Sequenzvergleich entsprechen ihrer Polarität: grün = polar, schwarz = unpolar, blau = basisch und rot = sauer.

Aufgrund der Konservierung, der für die Shrub-Polymerisation entscheidenden Aminosäuren, ist es vorstellbar, dass die beiden humanen Orthologe CHMP4A und CHMP4C zwar auf ähnliche Weise wie Shrub polymerisieren (siehe 2.3.2), jedoch nicht mit den restlichen Komponenten der ESCRT-Maschinerie in *Drosophila* interagieren können. So könnte beispielsweise eine fehlende Interaktion mit der ESCRT-III Komponente Vps20 ausschlaggebend für das nicht vorhandene Rettungsvermögen von CHMP4A und CHMP4C sein. Vps20 ist der Initiator für die Shrub-Polymerisation an der endosomalen Membran (Teis et al. 2008, Teis et al. 2010). Dies würde erklären warum CHMP4A und CHMP4C kein Rettungsvermögen gegenüber dem Funktionsverlust von *shrub* zeigen (siehe 2.3.1). Um diese Annahme zu überprüfen, wurde daher eine genetische Situation generiert, die es CHMP4A und CHMP4C ermöglicht mit der ESCRT-Maschinerie in *Drosophila* zu interagieren. Da das humane Ortholog CHMP4B in *Drosophila* funktional ist, wurde in den folgenden Experimenten als Ausgangspunkt eine Kopie *BAC^{shrub}-CHMP4B* im *shrub⁴⁻¹* mutanten Hintergrund exprimiert. Hier war der Grundgedanke, dass CHMP4A und CHMP4C aufgrund der hohen Konservierung zwischen den drei humanen Orthologen (siehe 2.3.1, Tabelle 2-1) über CHMP4B mit der ESCRT-Maschinerie in *Drosophila* interagieren können.

Eine Expression von nur einer Kopie *BAC^{shrub}-CHMP4B* resultiert in der bereits beschriebenen, partiellen Rettung des *shrub⁴⁻¹* mutanten Phänotyps (siehe 2.3.1 und (Diplomarbeit Bohnen 2014, Masterarbeit Bäumers 2015)). Diese partielle Rettung zeichnet sich durch eine pupale Letalität (Abb. 2-24) und eine leichte ektopische Aktivierung des Notch-Signalweges aus (Abb. 2-23 C, C'). Eine zusätzliche Expression von CHMP4A (+ 1x *BAC^{shrub}-CHMP4A*, Abb. 2-23 F, F') oder CHMP4C (+ 1x *BAC^{shrub}-CHMP4C*, Abb. 2-23 G, G') führt bei dieser partiellen Rettung zu einer Reduktion der ektopischen Notch-Aktivität und der Überproliferation der Imaginalscheibe (Abb. 2-23, vgl. C, C' mit F-G'). Im Fall vom humanen CHMP4C zeigt sich eine wildtypische Aktivität von *wg* und *Gbe+Su(H)* (Abb. 2-23 G, G'). Bei CHMP4A ist hingegen in einigen wenigen Imaginalscheiben eine marginale ektopische Aktivierung von *Gbe+Su(H)* direkt an der D/V-Grenze sichtbar (nicht gezeigt). Die meisten Imaginalscheiben zeigen jedoch ein wildtypisches Expressionsmuster von *wg* und *Gbe+Su(H)* (Abb. 2-23 F, F').

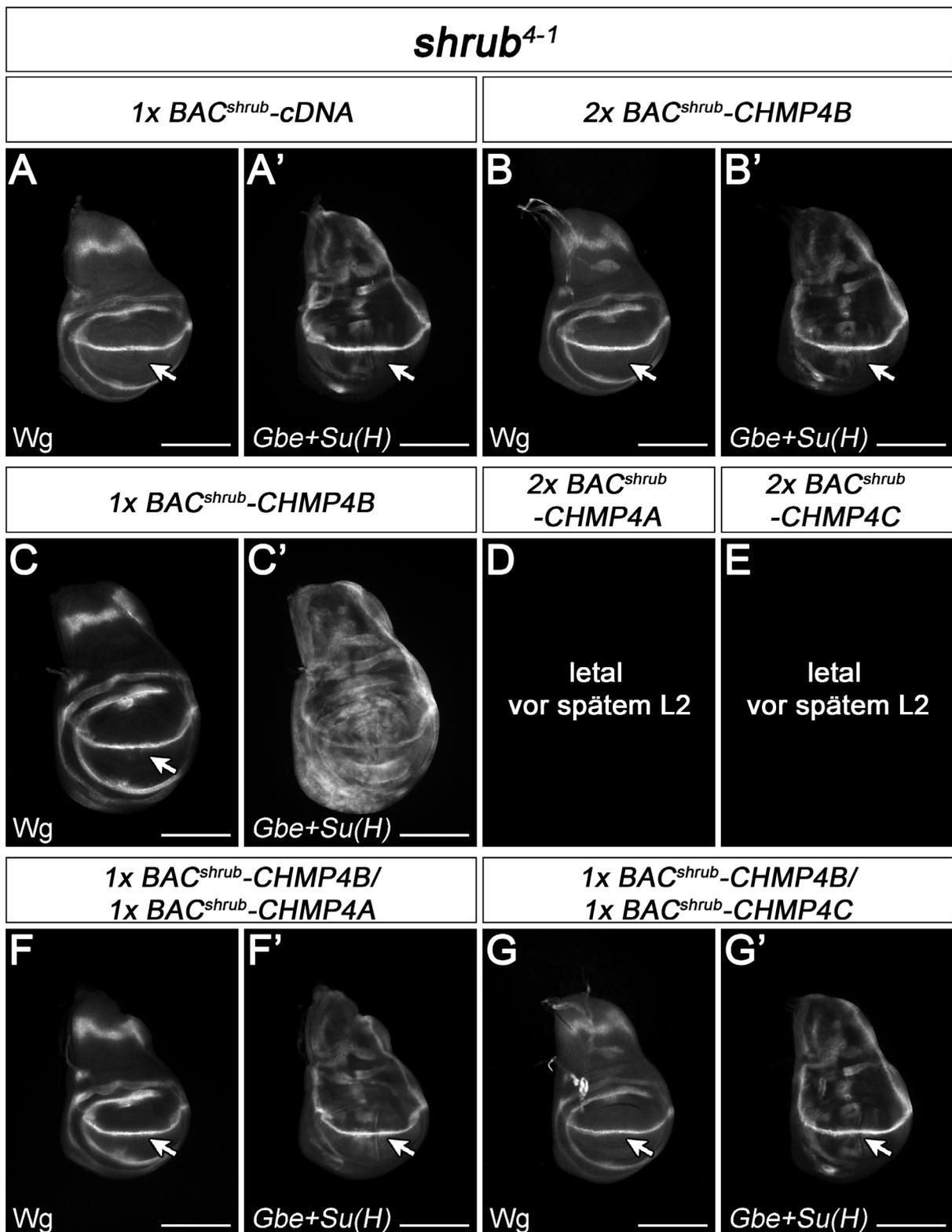


Abb. 2-23: Rettung des *shrub*⁴⁻¹ mutanten Phänotyps durch Kombination der drei humanen Shrub-Orthologe, CHMP4A, CHMP4B und CHMP4C. (A-G') Rettungsvermögen der humanen Orthologe gegenüber der *shrub* null-mutanten Situation (*shrub*⁴⁻¹). Ein vollständiger Funktionsverlust von *shrub* ist embryonal letal (nicht gezeigt (Sweeney et al. 2006)). Eine Detektion der Notch-Aktivität erfolgt zum einen mit Hilfe einer Antikörperfärbung gegen Wg (A-G) und zum anderen durch das sensitivere Reporterergenkonstrukt *Gbe+Su(H)* (A'-G'). Rettung der *shrub*⁴⁻¹ mutanten Situation durch eine Kopie

BAC^{shrub}-cDNA (A, A') oder zwei Kopien *BAC^{shrub}-CHMP4B* (B, B'). Die Expression von Wg (A, B) ist auf einen schmalen Streifen entlang der D/V-Grenze begrenzt und auch das Expressionsmuster von *Gbe+Su(H)* ist wildtypisch (A', B'). (C, C') Die partielle Rettung des *shrub⁴⁻¹* Phänotyps durch eine Kopie *BAC^{shrub}-CHMP4B* verursacht eine ektopische Aktivierung des Notch-Signalweges. (D, E) *shrub⁴⁻¹* mutante Tiere sterben trotz zwei Kopien *BAC^{shrub}-CHMP4A* (D) oder zwei Kopien *BAC^{shrub}-CHMP4C* (E) vor dem späten zweiten Larvenstadium (L2). (F-G') Zusätzliche Expression von CHMP4A (+ 1x *BAC^{shrub}-CHMP4A* (F, F')) oder CHMP4C (+ 1x *BAC^{shrub}-CHMP4C*, (G, G')) in den partiell geretteten *shrub⁴⁻¹* mutanten Fliegen. Die ektopische Aktivierung des Notch-Signalweges ist unterdrückt (vgl. mit C, C'). (F-G') Zudem sind die Imaginalscheiben nicht überproliert (vgl. mit C, C'). [(A-C') aus der eigenen Masterarbeit übernommen (Masterarbeit Bäumers 2015)]. Maßstabsbalken: (A-F') 200 µm.

Ein Blick auf die Entwicklung der Fliegen bestätigt, dass die partiell geretteten *shrub⁴⁻¹* mutanten Tiere (*shrub⁴⁻¹; 1x BAC^{shrub}-CHMP4B*) in ihrer Entwicklung weiterkommen, wenn zusätzlich eine Kopie *BAC^{shrub}-CHMP4A* oder *BAC^{shrub}-CHMP4C* im Genom vorhanden ist (Abb. 2-24). Hierbei offenbart sich jedoch ein Unterschied zwischen dem Rettungsvermögen von CHMP4A und CHMP4C.

In Anwesenheit von CHMP4C entwickeln sich die Fliegen zu *pharate adults*, in Anwesenheit von CHMP4A erreichen sie hingegen nur eine Zwischenstufe zwischen frühem und spätem Puppenstadium (Abb. 2-24). Es sind hier bereits morphologische Strukturen in der Puppe erkennbar, jedoch noch keine vollständig entwickelte Fliege wie es bei *pharate adults* der Fall ist. Auffällig ist dennoch, dass CHMP4A und CHMP4C auch in Anwesenheit von CHMP4B ein schlechteres Rettungsvermögen als eine zweite Kopie CHMP4B zeigen (Abb. 2-24). *shrub⁴⁻¹* mutante Fliegen entwickeln sich zu adulten Fliegen, wenn zwei Kopien *BAC^{shrub}-CHMP4B* vorhanden sind. Die Fliegen sterben jedoch früher sobald eine Kopie von *BAC^{shrub}-CHMP4B* durch *BAC^{shrub}-CHMP4A* oder *BAC^{shrub}-CHMP4C* ersetzt wird (Abb. 2-24).

Die humanen Orthologe CHMP4A und CHMP4C scheinen also über CHMP4B mit den restlichen Komponenten der ESCRT-Maschinerie in *Drosophila* funktional interagieren zu können.

Um diese Annahme zu bestätigen, wurden weitere *in vivo* Rettungsexperimente mit Hilfe einer nicht-funktionalen CHMP4B-Variante (CHMP4B^{mut2}) durchgeführt (Martinelli et al. 2012, Diplomarbeit Bohnen 2014, Masterarbeit Bäumers 2015). CHMP4B^{mut2} basiert auf einer Variante bei der die Glutaminsäuren an Position 90, 94 und 97 in der zweiten α -Helix durch Arginine ersetzt wurden. Diese Ladungsumkehr führt vermutlich zu einer Störung der Polymerisationsfähigkeit von CHMP4B (siehe 2.3.2) (Martinelli et al. 2012).

Wie zu erwarten, zeigt eine Expression von zwei Kopien *BAC^{shrub}-CHMP4B-mut2* aufgrund der Ladungsumkehr in der sauren Oberfläche von CHMP4B kein offensichtliches Rettungsvermögen gegenüber dem *shrub⁴⁻¹* mutanten Phänotyp (Masterarbeit Bäumers 2015). Die Fliegen sterben vor Erreichen des späten zweiten bzw. frühen dritten Larvenstadiums (Abb. 2-24). Zudem hat eine zusätzliche Expression von einer Kopie *BAC^{shrub}-CHMP4B-mut2* bei der partiellen Rettung des *shrub⁴⁻¹* mutanten Hintergrundes durch eine Kopie von *BAC^{shrub}-CHMP4B* keinen offensichtlichen Einfluss auf das Rettungsvermögen des funktionalen CHMP4Bs. Dies impliziert, dass die Funktionalität des humanen Orthologs CHMP4B nicht negativ beeinflusst wird und es weiter mit der ESCRT-Maschinerie in *Drosophila* interagieren kann. Entscheidend ist, dass CHMP4A und CHMP4C hingegen, bei gleichzeitiger Expression mit dem nichtfunktionalen CHMP4B^{mut2} anstatt mit dem Funktionalen, kein Rettungsvermögen mehr gegenüber dem Funktionsverlust von *shrub* zeigen. Hier sterben die *shrub⁴⁻¹* mutanten Tiere, trotz einer Kopie *BAC^{shrub}-CHMP4A* oder *BAC^{shrub}-CHMP4C*, vor dem späten zweiten Larvenstadium (Abb. 2-24). In Gegenwart des funktionsfähigen CHMP4B können sie, wie bereits beschrieben, teilweise die Funktion von Shrub übernehmen. Dies lässt sich anhand eines positiven Effekts auf die Entwicklung festmachen (Abb. 2-24). Weder CHMP4A noch CHMP4C sind, ohne ein funktionsfähiges und damit polymerisationsfähiges CHMP4B, in der Lage den Funktionsverlust von *shrub* zu kompensieren.

Folglich scheinen CHMP4A und CHMP4C über CHMP4B mit der ESCRT-Maschinerie in *Drosophila* funktional interagieren zu können. Jedoch haben sie auch in Anwesenheit von CHMP4B ein schlechteres Rettungsvermögen als CHMP4B (Abb. 2-24).

Insgesamt sind diese Ergebnisse dennoch ein erster Hinweis auf Heteropolymere zwischen CHMP4-Proteinen in einem Organismus. Zudem ist diese Rettung ein Beweis dafür, dass die drei humanen Orthologe wenigstens partiell eine redundante molekulare Funktion haben, die sie gemeinsam mit Shrub in *Drosophila* teilen.

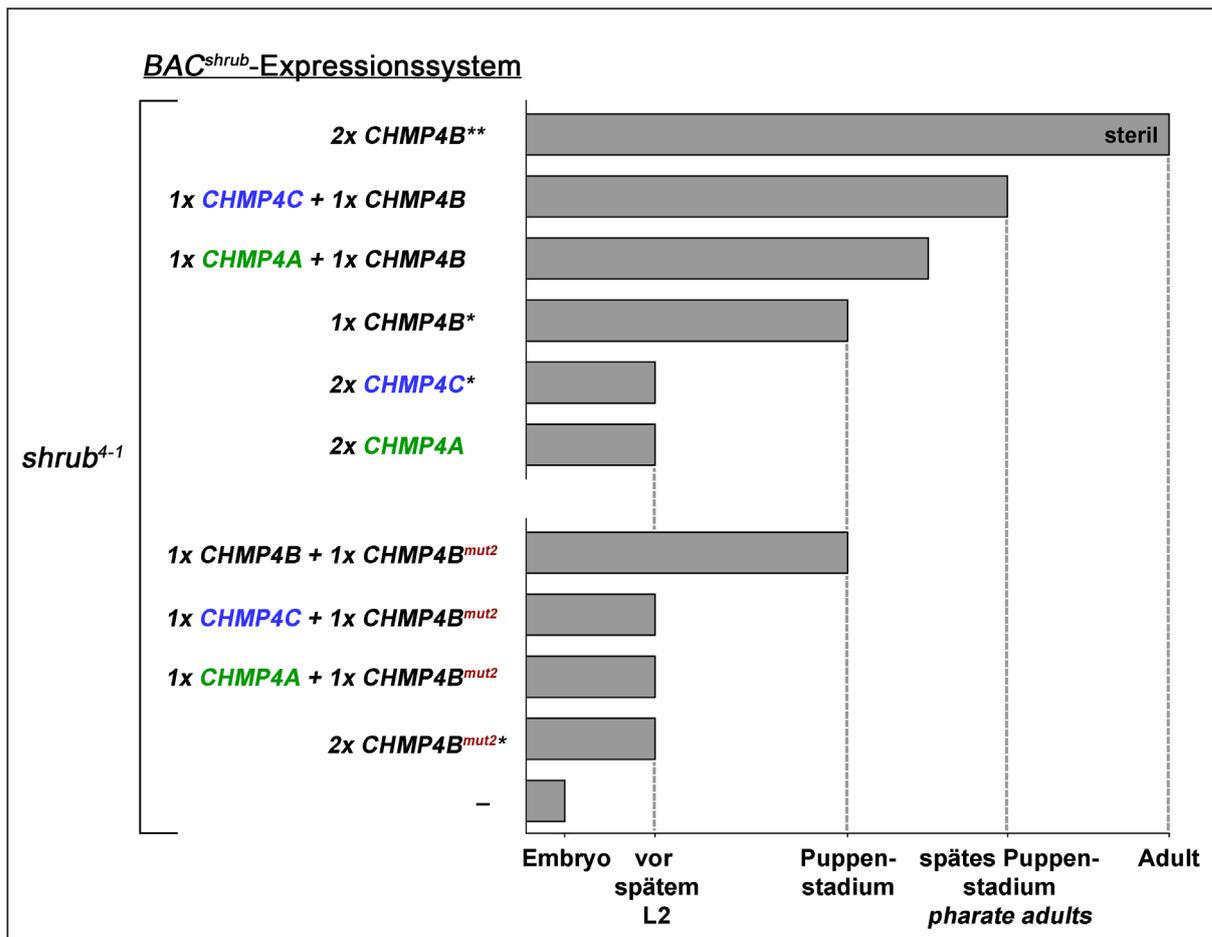


Abb. 2-24: Graphische Übersicht über die Entwicklung von *shrub*⁴⁻¹ mutanten Fliegen bei zusätzlicher Expression der drei humanen Shrub-Orthologe, CHMP4A, CHMP4B und CHMP4C. Rettung des *shrub* null-mutanten Hintergrundes (*shrub*⁴⁻¹) durch Kombination der drei humanen Shrub-Orthologe. Das humane Ortholog CHMP4B kann die Funktion von Shrub in *Drosophila* übernehmen, jedoch nicht eins zu eins ersetzen. Deutlich wird dies im Vergleich mit *shrub*⁴⁻¹ mutanten Fliegen, die durch eine Kopie *BAC*^{shrub}-*cDNA* vollständig gerettet werden (nicht gezeigt, siehe 2.3.1, Abb. 2-18). Sie entwickeln sich zu fertilen adulten Fliegen, während *shrub*⁴⁻¹ mutante Tiere gerettet durch eine Kopie *BAC*^{shrub}-*CHMP4B* im frühen Puppenstadiums sterben. Zwei Kopien *BAC*^{shrub}-*CHMP4B* retten die embryonale Letalität vollständig. Im Gegensatz dazu zeigen CHMP4A und CHMP4C kein offensichtliches Rettungsvermögen gegenüber der *shrub*⁴⁻¹ mutanten Situation. Die Fliegen sterben vor Erreichen des späten zweiten Larvenstadiums. CHMP4A und CHMP4C können nur in Anwesenheit des funktionalen CHMP4B ein Teil der Shrub-Funktion übernehmen. Ihre Nachkommen kommen in ihrer Entwicklung weiter und sterben nicht wie für die partielle Rettung (*shrub*⁴⁻¹; 1x *BAC*^{shrub}-*CHMP4B*) charakteristisch im frühen Puppenstadium. In Gegenwart der nichtfunktionalen CHMP4B-Variante, CHMP4B^{mut2}, ist dieser positive Einfluss auf die Entwicklung der *shrub*⁴⁻¹ mutanten Fliegen nicht mehr vorhanden. Erstaunlicherweise hat die Expression der vermutlich nicht polymerisationsfähigen CHMP4B-Variante, *BAC*^{shrub}-*CHMP4B-mut2*, bei der partiellen Rettung durch eine Kopie *BAC*^{shrub}-*CHMP4B* keinen offensichtlichen negativen Einfluss auf die Rettungsfähigkeit des funktionalen CHMP4Bs. Hier finden sich immer noch vereinzelt frühe Puppen. Bereits veröffentlichte Daten: * (Masterarbeit Bäumers 2015), ** (Diplomarbeit Bohnen 2014, Masterarbeit Bäumers 2015).

2.3.4 Rekrutierung der humanen CHMP4-Proteine zur endosomalen Membran in *Drosophila*

Die ILV-Bildung an Endosomen ist entscheidend für den endosomalen Abbau von Transmembranproteinen (siehe 1.2 und 1.3). Hierfür werden die, im Zytoplasma als inaktive Monomere vorliegenden, ESCRT-III Untereinheiten (Zamborlini et al. 2006, Shim et al. 2007) zur endosomalen Membran rekrutiert, wo sie polymerisieren. Zusammen mit der ATPase Vps4 vermittelt ESCRT-III anschließend die Abschnürung des ILVs in das endosomale Lumen (Adell et al. 2014, Schöneberg et al. 2018). Gleichzeitig werden dabei die Untereinheiten des ESCRT-III Komplexes durch Vps4 von der endosomalen Membran disassembliert (Babst et al. 1998, Lata et al. 2008a, Saksena et al. 2009, Yang et al. 2015).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass die humanen Orthologe, CHMP4A und CHMP4C, nur in Kombination mit CHMP4B ein Rettungsvermögen gegenüber der *shrub*⁴⁻¹ mutanten Situation zeigen (siehe 2.3.3). Ohne CHMP4B können sie die Funktion von Shrub in *Drosophila* nicht übernehmen (siehe 2.3.1). Es scheint daher, dass CHMP4A und CHMP4C über CHMP4B mit der ESCRT-Maschinerie in *Drosophila* funktional interagieren (siehe 2.3.3). Hier stellt sich die Frage, ob die humanen Orthologe, CHMP4A und CHMP4C, zur endosomalen Membran in *Drosophila* rekrutiert werden und falls ja, ob dies nur in Anwesenheit von CHMP4B passiert.

In wildtypischen Epithelzellen kann Shrub nicht eindeutig an Endosomen detektiert werden. Hier ist Shrub vorwiegend diffus im Zytoplasma lokalisiert (Sweeney et al. 2006), genauso wie sein Ortholog, Snf7, in Hefezellen (Babst et al. 2002a). Eine wahrscheinliche Erklärung ist, dass Shrub zwischen Zytoplasma und endosomaler Membran zirkuliert und, dass dabei nur ein kleiner Pool von Shrub, für eine kurze Zeit, an der endosomalen Membran zur ILV-Bildung verbleibt (Babst et al. 2002a, Teis et al. 2008, Adell et al. 2017). Es ist daher für eine eindeutige Detektion vorteilhaft, die ESCRT-Maschinerie an der endosomalen Membran zu arretieren. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Snf7 (Babst et al. 1998) und Shrub (Bäumers et al. 2019) an Endosomen akkumulieren, sobald eine Vps4-Reduktion oder ein Funktionsverlust von *vps4* vorliegt.

Daher wurde in den folgenden Experimenten mit Hilfe von RNA-Interferenz (RNAi) die Genaktivität von *vps4* posttranskriptionell herunterreguliert (siehe 6.6.5). Für eine räumlich und zeitlich begrenzte RNAi-Expression wurde auf das Gal4/UAS-System in

Kombination mit Gal80^{ts} zurückgegriffen (siehe 6.6.4). Die Expression erfolgte im posterioren Kompartiment der Flügelimaginalscheibe durch die Gal4-Treiberlinie *engrailedGal4* (*enGal4*) für 29 h. Anterior befinden sich daher weiterhin Zellen, die eine wildtypische Lokalisation der ESCRT-III Proteine zeigen. Eine längere Expression der *vps4*-RNAi führt zu vermehrtem Zelltod und zum Verlust der Integrität des Gewebes (nicht gezeigt).

Bei diesem Versuchsaufbau ist das endogene Shrub weiterhin vorhanden. Lokalisationsstudien von CHMP4A und CHMP4C im *shrub⁴⁻¹* mutanten Hintergrund sind in der Flügelimaginalscheibe, aufgrund der embryonalen Letalität bei einem Funktionsverlust von *shrub*, nicht durchführbar.

Für eine Expression der humanen Orthologe wurde auf das reduzierte Expressionssystem (*shrubP*) zurückgegriffen (siehe 2.1). CHMP4A und CHMP4C wurden N-terminal mit einem Myc-Tag versehen, CHMP4B hingegen mit einem HA-Tag. Eine Voraussetzung für das nachfolgende Experiment ist, dass die Expressionsmenge von einer Kopie des jeweiligen *shrubP*-Transgens für eine sichtbare Lokalisation der einzelnen Shrub-Orthologe am Endosomen ausreichend ist.

In einem ersten Schritt wurde daher überprüft, ob Myc-Shrub, exprimiert mit Hilfe des Expressionssystems (*shrubP*), wie erwartet bei einer Reduktion des Proteinlevels von Vps4 an der endosomalen Membran arretiert. Dies ist der Fall. Myc-Shrub akkumuliert an vergrößerten Notch-positiven Endosomen (Anhang, Abb. 9-4 A-D). Die Expressionsmenge von *shrubP* reicht also prinzipiell für eine Detektion am Endosom aus. Leider ist aufgrund des starken Hintergrundsignals bei der Myc-Antikörperfärbung eine genaue Bestimmung der Lokalisation von Myc-Shrub anterior, in den wildtypischen Zellen, nicht zweifelsfrei möglich.

Den Erwartungen entsprechend akkumuliert bei einer Reduktion von Vps4 auch humanes HA-CHMP4B an vergrößerten Endosomen (Abb. 2-25 B-B''). Im Gegensatz dazu, zeigt sich im anterioren Kompartiment, ohne *vps4*-RNAi-Expression, eine diffuse Verteilung von HA-CHMP4B im Zytoplasma (Abb. 2-25 B'''), wie sie bereits für Snf7 (Babst et al. 2002a) und Shrub (Sweeney et al. 2006) beobachtet wurde. Dies impliziert, dass HA-CHMP4B auch in *Drosophila* zwischen Zytoplasma und endosomaler Membran zirkuliert.

Zudem kolokalisieren Myc-Shrub und HA-CHMP4B bei einer Vps4-Reduktion in vesikelartigen Strukturen (Abb. 2-25 A-A''). Diese Kolokalisation ist ein erster

Hinweise auf eine mögliche Heteropolymerisation zwischen Shrub und CHMP4B an der endosomalen Membran (siehe 2.3.5).

Erstaunlicherweise akkumulieren bei einer Reduktion des Vps4-Proteinlevels nicht nur Shrub und CHMP4B (Abb. 2-25 B-B'' u. Anhang, Abb. 9-4 A-D), sondern auch die humanen Orthologe, CHMP4A und CHMP4C, an vergrößerten Notch-positiven Endosomen (Abb. 2-25 C-D''). Diese Akkumulationen treten bereits ohne zusätzliche Expression von CHMP4B auf. Dies impliziert, dass beide Orthologe CHMP4B-unabhängig zur endosomalen Membran rekrutiert werden können und an dieser aufgrund der reduzierten Vps4-Konzentration arretieren. In Anbetracht des starken Hintergrundsignals bei der Myc-Antikörperfärbung ist nicht auszuschließen, dass bereits, ohne Vps4-Reduktion CHMP4A und CHMP4C an den Endosomen akkumulieren und, dass dies bei einer Reduktion einfach verstärkt wird. Eine mögliche Akkumulation von CHMP4A und CHMP4C an Endosomen in den wildtypischen Zellen, spricht jedoch ebenfalls für eine Rekrutierung dieser zur endosomalen Membran.

Hier stellt sich daher als nächstes die Frage, wie CHMP4A und CHMP4C zur endosomalen Membran gelangen. In den Experimenten zuvor benötigt es CHMP4B um ein Rettungsvermögen von CHMP4A oder CHMP4C gegenüber dem Funktionsverlust von *shrub* zu beobachten. Ohne CHMP4B können sie die Funktion von Shrub in *Drosophila* nicht übernehmen (siehe 2.3.3). Bei den *vps4*-RNAi basierten Lokalisationsexperimenten in diesem Kapitel ist jedoch endogenes Shrub vorhanden.

Es ist daher vorstellbar, dass die humanen Orthologe, CHMP4A und CHMP4C, über das endogene Shrub zur endosomalen Membran rekrutiert werden. In einem nächsten Experiment wurde daher untersucht, ob CHMP4A und CHMP4C in Anwesenheit von endogenem Shrub in *Drosophila* funktionsfähig sind. Um diese Annahme zu überprüfen, wurde daher eine genetische Situation generiert, die es erlaubt, eine mögliche Funktionalität von CHMP4A und CHMP4C in Anwesenheit von endogenem Shrub zu detektieren.

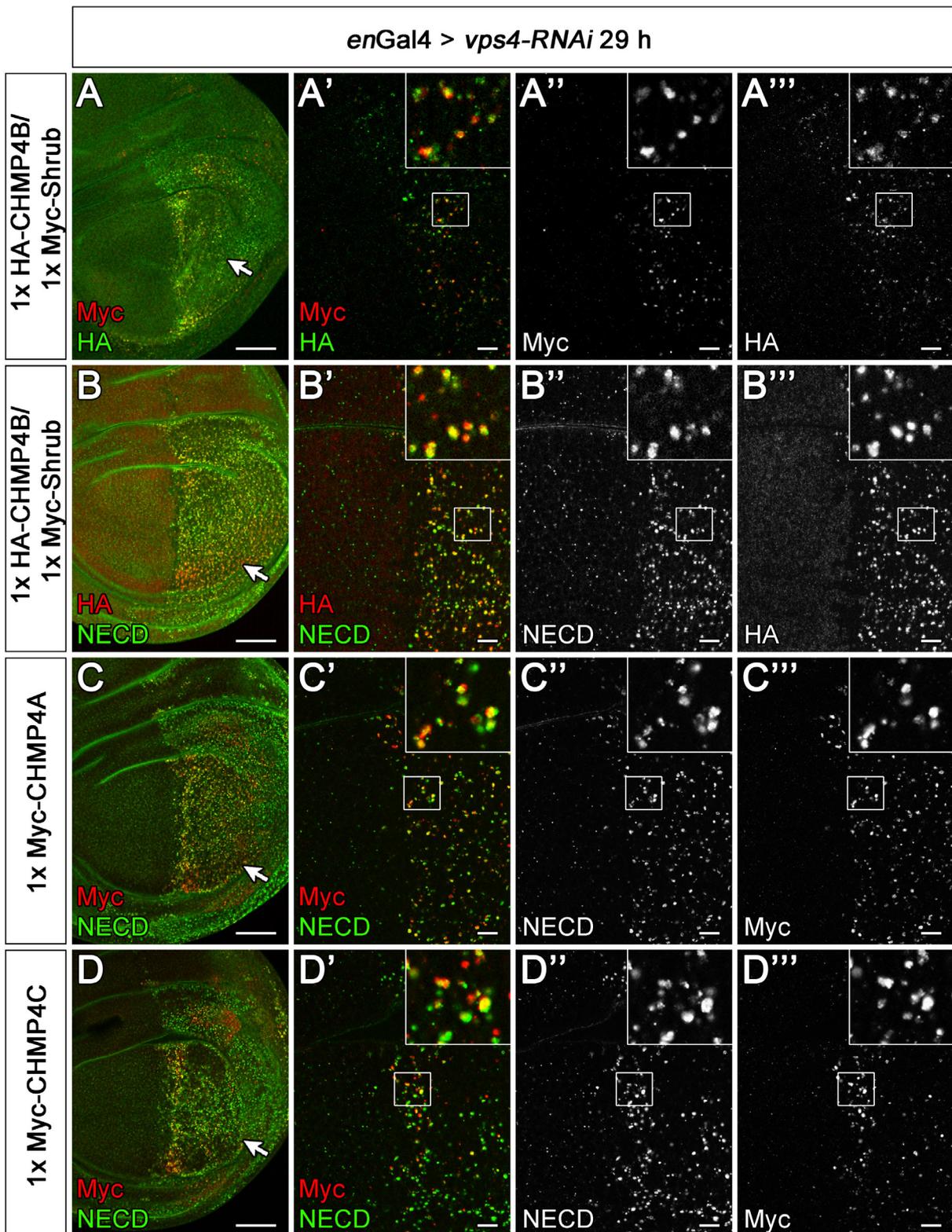


Abb. 2-25: Die humanen Shrub-Orthologe, CHMP4A, CHMP4B und CHMP4C, arretieren, bei einer Reduktion von Vps4 an der limitierenden Membran der vergrößerten Notch-positiven Endosomen. (A-C''') Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Auswirkungen einer Reduktion des Vps4-Proteinlevels auf die Lokalisierung der drei humanen Shrub-Orthologe, CHMP4B (A-B'''), CHMP4A (C-C'''), CHMP4C (D-D'''): Die Expression der *vps4*-RNAi (29 h) ist auf das posteriore Kompartiment begrenzt (Pfeile in (A), (B), (C) und (D)). Anterior finden sich daher für einen direkten Vergleich wildtypische Zellen, die keine *vps4*-RNAi

exprimieren. Zusätzlich wird mit Hilfe des Expressionssystems *shrubP* jeweils eins der humanen Orthologe CHMP4B (A-B'''), CHMP4A (C-C''') oder CHMP4C (D-D''') exprimiert (in der gesamten Flügelimaginalscheibe). (A-B''') Expression von je einer Kopie *shrubP-Myc-shrub* und einer Kopie *shrubP-HA-CHMP4B*: (A'-A''') Zeitgleicher Nachweis von Myc-Shrub und HA-CHMP4B bei einer Reduktion von Vps4. Myc-Shrub und HA-CHMP4B kolokalisieren gemeinsam in vesikelartigen Strukturen. (B-B''') Detektion von HA-CHMP4B und NECD (extrazelluläre Domäne von Notch) mittels Antikörperfärbungen. NECD wurde hier als Marker für Endosomen verwendet. Aufgrund der Reduktion von Vps4 akkumuliert HA-CHMP4B an vergrößerten Notch-positiven Endosomen. (B''') Ohne eine Reduktion von Vps4 (siehe anterior) offenbart sich eine diffuse zytoplasmatische Verteilung von HA-CHMP4B. (C-C''') Expression von humanem CHMP4A (1x *shrubP-Myc-CHMP4A*): Als Folge der Vps4 Reduktion im posterioren Kompartiment (C, Pfeil) akkumuliert rekrutiertes Myc-CHMP4A distinkt an vergrößerten Notch-positiven Endosomen. (D-D''') Zusätzlich zur Vps4-RNAi, wird hier eine Kopie *shrubP-Myc-CHMP4C* exprimiert. Hier akkumuliert Myc-CHMP4C nach seiner Rekrutierung aufgrund der Reduktion von Vps4 ebenfalls an den vergrößerten Notch-positiven Endosomen. (A'-A''', B'-B''', C'-C''', D'-D''') Eine Ausschnittsvergrößerung (weißes Quadrat) des endosomalen Phänotyps findet sich oben rechts in der jeweiligen Aufnahme. Maßstabsbalken: (A, B, C, D) 50 µm; (A'-A''', B'-B''', C'-C''', D'-D''') 10 µm.

Der Funktionsverlust von *shrub* wird bereits durch die Expression einer Kopie *BAC^{shrub}* bzw. *shrubP-shrub* vollständig bzw. größtenteils gerettet (siehe 2.1). Auch *shrub⁴⁻¹* heterozygot-mutante Fliegen (Reduktion von *shrub* um 50 %) sind lebensfähig und zeigen äußerlich keine phänotypischen Auffälligkeiten (siehe 2.1). Diese drei genetischen Situationen sind daher nicht sensitiv genug. Sie eignen sich nicht als Ausgangspunkt, um eine direkte genetische Interaktion von *CHMP4A/C* mit *shrub* anhand eines *in vivo* Rettungsexperiments zu analysieren. Da jedoch eine Erhöhung der Shrub-Konzentration den *lgd^{d7}* mutanten Phänotyp rettet (*lgd^{d7}; 2x BAC^{shrub}*) (siehe 2.2.1 und (Masterarbeit Bäumers 2015)), bietet sich der *lgd^{d7}* mutante Hintergrund als Basis zur Detektion von möglichen Heteropolymeren zwischen Shrub und CHMP4A/C an.

Im Vorfeld dieser Arbeit, konnte bereits gezeigt werden, dass auch das humane Shrub-Ortholog CHMP4B, exprimiert mit Hilfe des *BAC*-Expressionssystem (*BAC^{shrub}-CHMP4B*), den *lgd^{d7}* mutanten Phänotyp partiell retten kann (Masterarbeit Bäumers 2015). Die charakteristische ektopische Aktivierung des Notch-Signalweges bei einem Funktionsverlust von *lgd* (Abb. 2-26 A, A') (Klein 2003) wird durch die zusätzliche Expression von zwei Kopien *BAC^{shrub}-CHMP4B* wirksam reduziert (Abb. 2-26 C, C'). Im Fall des endogenen Notch-Zielgens *wg* exprimieren nur noch einige wenige Zellen unterhalb der D/V-Grenze *wg* ektopisch (Abb. 2-26 C, Pfeil). Beim sensitiveren Notch-

Reportergenkonstrukt ist die ektopische Aktivierung soweit reduziert, dass sich bereits das ursprüngliche wildtypische Expressionsmuster abzeichnet (Abb. 2-26 C', Pfeil). Die Fliegen sterben nicht mehr wie für den Ausfall von *lgd* charakteristisch, während des frühen Puppenstadiums nach verlängerter larvaler Lebensphase (Bryant und Schubiger 1971), sondern sie erreichen eine Entwicklungsstufe zwischen frühem und spätem Puppenstadium (Abb. 2-26 E). Es sind bereits morphologische Strukturen in der Puppe erkennbar, jedoch noch keine vollständig entwickelte Fliege wie es im späten Puppenstadium der Fall ist (Masterarbeit Bäumers 2015). Bereits bei einer Expression von nur einer Kopie *BAC^{shrub}-CHMP4B* wird die ektopische Aktivierung des Notch Signalweges minimal abgeschwächt (Abb. 2-26 B, B') (Masterarbeit Bäumers 2015).

Um nun eine Funktionalität von CHMP4C in Anwesenheit von endogenem Shrub zu detektieren, wurde das Rettungsvermögen von CHMP4C gegenüber dem *lgd^{d7}* mutanten Phänotyp analysiert. Dabei zeigt sich selbst bei einer Expression von zwei Kopien *BAC^{shrub}-CHMP4C* keine offensichtliche Reduktion der ektopischen Aktivierung des Notch-Signalweges in *lgd^{d7}* mutanten Imaginalscheiben (Abb. 2-26 D, D'). Dementsprechend sterben die *lgd^{d7}* mutanten Tiere weiterhin im frühen Puppenstadium (Abb. 2-26 E). Insgesamt zeigt sich kein erkennbarer Effekt auf den *lgd^{d7}* mutanten Phänotyp (Abb. 2-26).

Humanes CHMP4C ist in den bisherigen Experimenten nur in Anwesenheit von CHMP4B (siehe 2.3.3) funktional. Die Experimente im *lgd^{d7}* mutanten Hintergrund legen nahe, dass endogenes Shrub nicht als alternativer Adapter für eine funktionale Interaktion von CHMP4C mit den restlichen Komponenten der ESCRT-Maschinerie fungieren kann. Dies bekräftigt folglich weiter die Theorie von funktionalen Heteropolymeren zwischen den CHMP4-Proteinen (CHMP4A, CHMP4B, CHMP4C).

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass alle drei humanen Orthologe zur endosomalen Membran in *Drosophila* rekrutiert werden (Abb. 2-25). Hierbei ist für eine Rekrutierung von CHMP4A und CHMP4C das humane CHMP4B, welches zuvor in den Experimenten für die funktionale Interaktion von CHMP4A/C mit der ESCRT-Maschinerie benötigt wurde (siehe 2.3.3), nicht erforderlich.

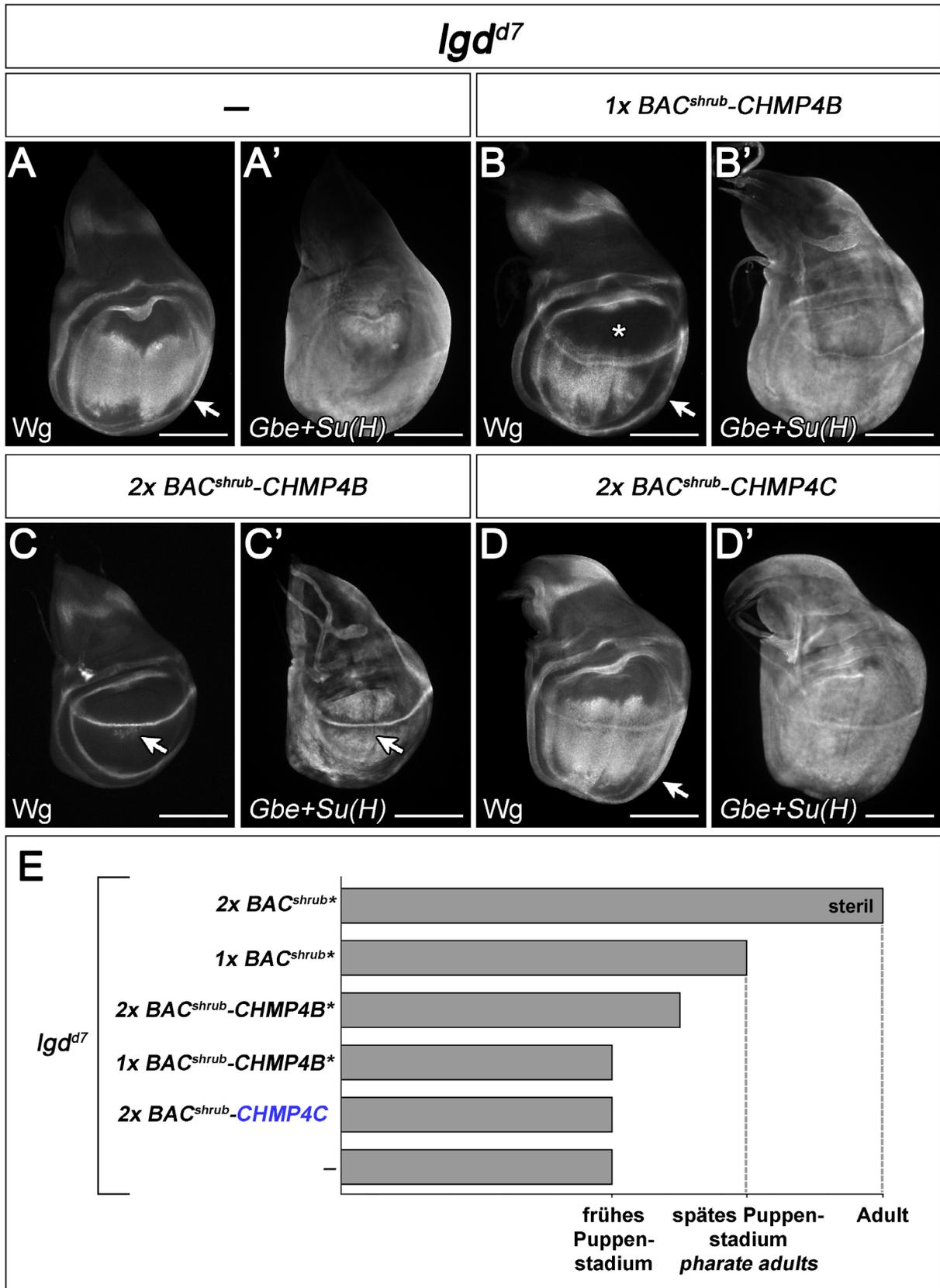


Abb. 2-26: Eine zusätzliche Expression von CHMP4B in *lgd^{d7}* mutanten Flügelimaginalscheiben reduziert die ektopische Aktivierung des Notch-Signalweges, wohingegen eine zusätzliche Expression von CHMP4C keine Auswirkungen auf den *lgd^{d7}* mutanten Phänotyp hat.

(A-D') Fluoreszenzmikroskopische Analyse des Rettungsvermögens von humanem CHMP4B (B-C') und CHMP4C (D-D') gegenüber dem *lgd* null-mutanten Hintergrund (*lgd^{d7}*): (A, A') Bei einem Funktionsverlust von *lgd* kommt es zu einer Verbreiterung der Notch-abhängigen Expressionsdomäne von *Wg* (A, Pfeil) und einer gleichmäßigen Aktivierung von *Gbe+Su(H)* (A') in der gesamten Flügelimaginalscheibe. Diese ektopische Aktivierung resultiert in einer Überproliferation der Imaginalscheibe. (B-C') Rettung des *lgd^{d7}* mutanten Phänotyps durch die Expression von einer (B, B') oder zwei Kopien (C, C') *BAC^{shrub}-CHMP4B*: (B, B') In Anwesenheit von einer Kopie sind *Gbe+Su(H)* und *wg* weiterhin stark ektopisch aktiviert, wobei die Expression von *wg* dorsal der D/V-Grenze gegenüber der *lgd^{d7}* mutanten Situation schwächer ist (B, Stern). Insgesamt ist die Flügelimaginalscheibe dennoch weiterhin stark überproliferiert. (C, C') Im Gegensatz dazu, ist diese Aktivierung bei einer Expression von zwei Kopien *BAC^{shrub}-CHMP4B* stärker reduziert. Hier zeigt sich nur eine leichte ektopische Aktivierung von *wg* (C, Pfeil) in einigen Zellen unterhalb der D/V-Grenze. (C') Das sensitivere Reportergerkonstrukt *Gbe+Su(H)* offenbart hingegen noch eine ektopische Aktivierung in der gesamten Imaginalscheibe. Diese ist jedoch im Vergleich zu (A') schwächer. (D, D') Expression von zwei Kopien *BAC^{shrub}-CHMP4C* im *lgd^{d7}* mutanten Hintergrund: Es zeigt sich keine Reduktion der ektopischen Aktivierung des Notch-Signalweges. (B, B' und C, C' aus der eigenen Masterarbeit übernommen (Masterarbeit Bäumers 2015)). (E) Graphische Übersicht über die Entwicklung von *lgd^{d7}* mutanten Fliegen bei zusätzlicher Expression von *Drosophila Shrub*, humanem CHMP4B oder CHMP4C: *lgd^{d7}* mutante Tiere sterben während des frühen Puppenstadiums (Bryant und Schubiger 1971). Eine schrittweise Erhöhung der Konzentration von *Drosophila Shrub* durch eine Kopie oder zwei *BAC^{shrub}* hat einen positiven Einfluss auf die Entwicklung der *lgd^{d7}* mutanten Tiere. Hierbei wird eine Abstufung des *lgd^{d7}* mutanten Phänotyps bis zur vollständigen Rettung der Letalität sichtbar. Eine Expression des humanen *Shrub*-Orthologs CHMP4B in *lgd^{d7}* mutanten Fliegen zeigt ebenfalls einen, wenn auch schwächeren, positiven Effekt auf die Entwicklung der Tiere. Humanes CHMP4C offenbart kein offensichtliches Rettungsvermögen gegenüber der *lgd^{d7}* mutanten Situation. Sogar in Anwesenheit von zwei Kopien *BAC^{shrub}-CHMP4BC* sterben die Fliegen weiter während des frühen Puppenstadiums. Die mit * markierten Ergebnisse wurden bereits veröffentlicht (Masterarbeit Bäumers 2015). Maßstabsbalken: (A-D') 200 µm.

2.3.5 Heteropolymerisation zwischen humanem CHMP4B und *Drosophila Shrub*

Im Rahmen dieser Arbeit konnte mit Hilfe von *in vivo* Rettungsexperimenten gezeigt werden, dass die Funktionalität der ESCRT-III Komponente *Shrub* bereits durch einen kleineren Protein-Tag am C-Terminus gravierend gestört wird (siehe 2.1 und Anhang, Tabelle 9-1).

Bereits publizierte Experimente mit *Snf7*, dem *Shrub*-Ortholog aus *Saccharomyces cerevisiae*, deuten an, dass sich funktionelle Heteropolymere, bestehend aus endogenem *Snf7* und *Snf7*-LAP-GFP, formieren können (Adell et al. 2017). Basierend auf vorherigen Untersuchungen des *Snf7*-Polymers (Shen et al. 2014, Tang et al. 2015) wird hier

angenommen, dass sich mindestens zwei endogene Snf7-Monomere zwischen zwei GFP-Markierten befinden müssen, um eine sterische Beeinträchtigung durch das GFP auf die Snf7-Polymerisation zu vermeiden (Adell et al. 2017).

Diese Theorie eines funktionalen Heteropolymers aus Snf7 und Snf7-LAP-GFP (Adell et al. 2017), ermöglicht im Rahmen dieser Arbeit einen neuen Ansatz zur Charakterisierung der CHMP4-Polymerisation. Eine mögliche funktionale Heteropolymerisation zwischen humanen CHMP4B und eGFP markierten Shrub in *Drosophila*, würde ebenfalls für eine Konservierung der Polymerisationsweise sprechen (siehe 2.3.2). Dies würde die Annahme bekräftigen, dass die Homopolymerisation in höheren Organismen auf den gleichen elektrostatischen Wechselwirkungen wie in *Drosophila* beruht (siehe 2.3.2). Ausgangspunkt für die Detektion von möglichen Heteropolymeren ist die partielle Rettung durch eine Kopie *BAC^{shrub}-CHMP4B* (siehe 2.3.1) und das fehlende Rettungsvermögen von *shrubP-eGFP-LAP-shrub* (Anhang, Tabelle 9-1).

Ein Ausfall von *shrub* (*shrub⁴⁻¹*) führt in *Drosophila* zur Letalität im Embryonalstadium (Sweeney et al. 2006). Im Gegensatz zu Myc-markiertem Shrub ist eine Shrub-Variante mit einem eGFP-LAP-Tag am N-terminus nicht in der Lage diesen *shrub⁴⁻¹* mutanten Phänotyp zu retten. Hier sterben die mutanten Fliegen vor Erreichen des späten zweiten Larvenstadiums (Abb. 2-27). Eine weitere Eingrenzung der Entwicklung auf Stadien vor dem späten zweiten Larvenstadium (L2) ist aufgrund des verwendeten Markers *Tubby* (*Tb*) in diesem Versuchsaufbau nicht möglich.

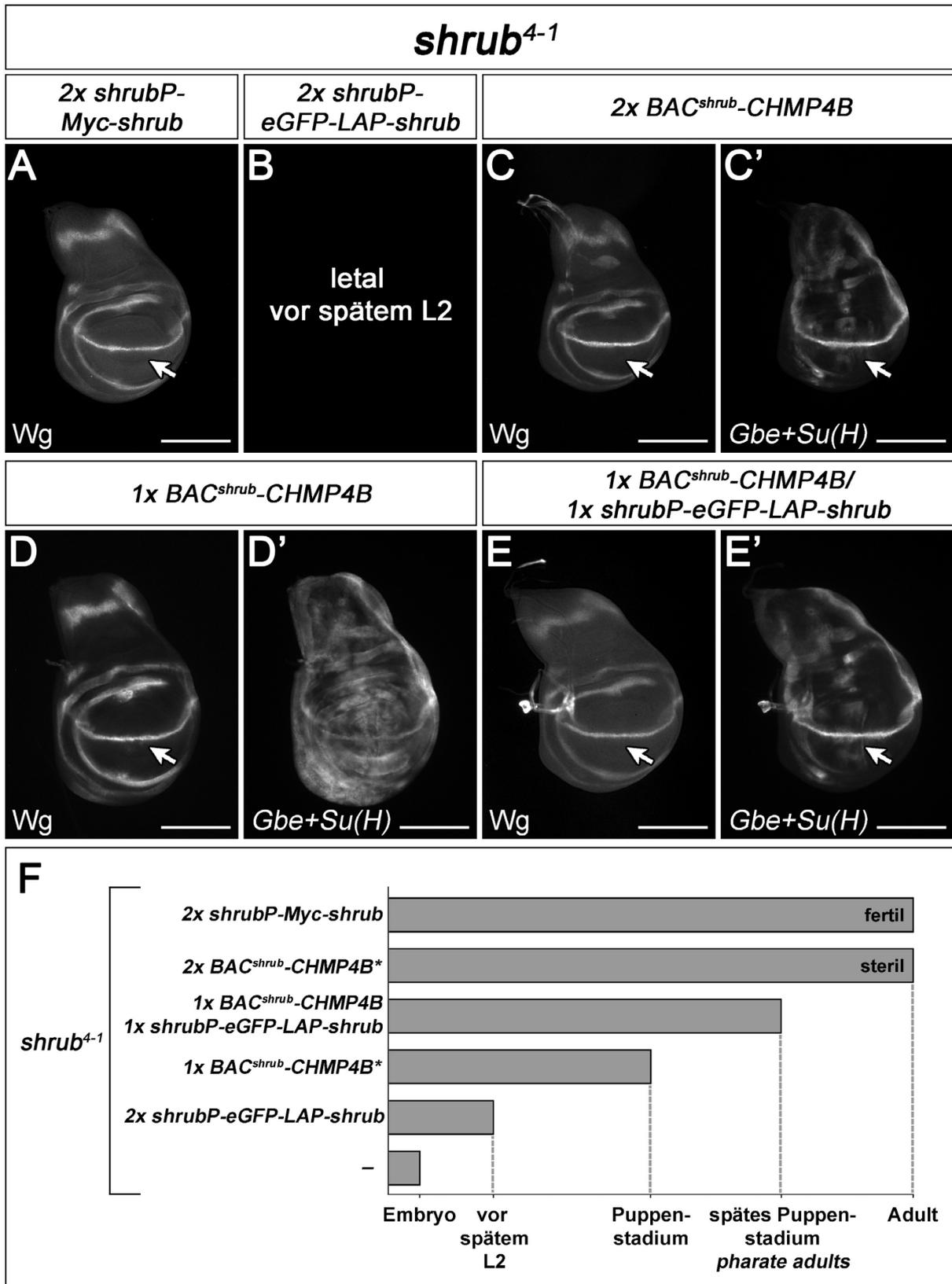


Abb. 2-27: Funktionale Heteropolymerisation zwischen CHMP4B und eGFP-LAP-Shrub. (A-F) Rettung des *shrub* null-mutanten Hintergrundes (*shrub*⁴⁻¹) durch Expression verschiedener Transgen-Kombinationen. Ein vollständiger Verlust von *shrub* ist embryonal letal (Sweeney et al. 2006). (A-E') Fluoreszenzmikroskopische Analyse: Nachweis der Notch-Aktivität mit Hilfe des endogenen Notch-

Zielgens *wingless* (*wg*) (A, C-E) und durch Verwendung des Reportergenkonstrukts *Gbe+Su(H)* (C'-E'). (A) Vollständige Rettung des *shrub*⁴⁻¹ mutanten Hintergrundes durch Expression von zwei Kopien *shrubP-Myc-shrub*. (B) In Anwesenheit von zwei Kopien *shrubP-eGFP-LAP-shrub* sterben die *shrub*⁴⁻¹ mutanten Tiere vor dem späten zweiten Larvenstadium (L2). (C-D') Rettung des *shrub*⁴⁻¹ mutanten Phänotyps durch zwei Kopien (C, C') oder eine Kopie (D, D') *BAC^{shrub}-CHMP4B*. (D, D') Bei der partiellen Rettung des *shrub*⁴⁻¹ mutanten Hintergrundes durch Expression von einer Kopie *BAC^{shrub}-CHMP4B* ist eine ektopische Aktivierung von *Gbe+Su(H)* detektierbar (D). Auch *Wg* wird in einigen Zellen unterhalb der D/V-Grenze ektopisch exprimiert (Pfeil, D). (E, E') Expression von je einer Kopie *shrubP-eGFP-LAP-shrub* und einer Kopie *BAC^{shrub}-CHMP4B* im *shrub*⁴⁻¹ mutanten Hintergrund. Die ektopische Aktivierung, die bei der partiellen Rettung des *shrub*⁴⁻¹ mutanten Phänotyps in (D, D') zu sehen ist, ist hier aufgrund der zusätzlichen Expression von eGFP-LAP-Shrub aufgehoben. [C, C' und D, D' aus der eigenen Masterarbeit übernommen (Masterarbeit Bäumers 2015)]. (F) Graphischer Vergleich der unterschiedlichen Entwicklung von *shrub*⁴⁻¹ mutanten Fliegen in Anwesenheit verschiedener Transgen-Kombinationen, darunter *shrubP-eGFP-LAP-shrub*. Eine Expression von zwei Kopien *shrubP-Myc-shrub* kompensiert den Funktionsverlust von *shrub* vollständig, wohingegen eGFP-LAP-Shrub kein offensichtliches Rettungsvermögen zeigt. Trotz Expression von zwei Kopien *shrubP-eGFP-LAP-shrub* sterben die *shrub*⁴⁻¹ mutanten Fliegen vor dem späten zweiten Larvenstadium (L2). Humanes CHMP4B kann Shrub in *Drosophila* funktional ersetzen. Eine Expression von nur einer Kopie *BAC^{shrub}-CHMP4B* führt jedoch nur zu einer partiellen Rettung. Die Fliegen sterben im frühen Puppenstadium. Bei einer zusätzlichen Expression von einer Kopie *shrubP-eGFP-LAP-shrub* in dieser partiell geretteten Situation kommen die *shrub*⁴⁻¹ mutanten Tiere in ihrer Entwicklung weiter und erreichen das späte Puppenstadium (*pharate adults*). Die mit * markierten Ergebnisse wurden bereits veröffentlicht (Diplomarbeit Bohnen 2014, Masterarbeit Bäumers 2015). Maßstabsbalken: (A-E') 200 µm.

Humanes CHMP4B kann den Funktionsverlust von *shrub* in *Drosophila* kompensieren. Es ist jedoch nicht in der Lage Shrub komplett (eins zu eins) zu ersetzen (siehe 2.3.1 und (Diplomarbeit Bohnen 2014, Masterarbeit Bäumers 2015)). In Anwesenheit von einer Kopie *BAC^{shrub}-CHMP4B* kommt es nur zu einer partiellen Rettung des *shrub*⁴⁻¹ mutanten Phänotyps. Die Fliegen sterben nach einer verlängerten larvalen Phase im frühen Puppenstadium (Abb. 2-27 F). Hierbei offenbart sich eine deutliche ektopische Aktivierung des Notch-Signalweges (Abb. 2-27 D, D'). Diese ektopische Aktivierung ist bei einer zusätzlichen Expression von einer Kopie *shrubP-eGFP-LAP-shrub* aufgehoben (*shrub*⁴⁻¹; 1x *BAC^{shrub}-CHMP4B*/ 1x *shrubP-eGFP-LAP-shrub*). *Wg* wird hier entlang der D/V-Grenze in einem schmalen Streifen exprimiert (Abb. 2-27 E). Auch das sensitivere Notch-Reportergenkonstrukt *Gbe+Su(H)* zeigt keine ektopische Aktivierung an (Abb. 2-27, vgl. E' mit D'). Zudem entwickeln sich die Fliegen zu *pharate adults*. Sie kommen also in ihrer Entwicklung weiter als *shrub*⁴⁻¹ homozygot mutante Tiere mit nur einer Kopie

BAC^{shrub}-CHMP4B. Sie sterben dennoch früher als *shrub⁴⁻¹* mutante Tiere, die zwei Kopien *BAC^{shrub}-CHMP4B* exprimieren (Abb. 2-27 F).

Folglich scheint eine funktionelle Heteropolymerisation zwischen humanem CHMP4B und *Drosophila* Shrub stattzufinden. Anderenfalls wäre die spätere Letalität nicht erklärbar, denn eGFP-LAP-Shrub ist alleine nicht funktional (Anhang, Tabelle 9-1). Dementsprechend unterstützt diese Beobachtung die Annahme, dass die Art und Weise wie die ESCRT-III Untereinheit Shrub polymerisiert über die Metazoen hinweg konserviert ist (siehe 2.3.2). Sie scheint in höheren Organismen auf den gleichen elektrostatischen Wechselwirkungen wie in *Drosophila* zu beruhen.

Zudem unterstützt dieses Ergebnis die Theorie von funktionalen Heteropolymeren zwischen nicht-markiertem und markiertem Snf7/Shrub (Adell et al. 2017). eGFP-LAP-Shrub scheint daher zwar prinzipiell funktional zu sein, doch verhindert sein eGFP-Tag eine funktionale Polymerisation. Aufgrund der Größe von eGFP kommt es vermutlich zu einer sterischen Beeinträchtigung bei der Assemblierung des Polymers. Humanes CHMP4B scheint daher, wie Snf7 im Snf7/ Snf7-LAP-GFP-Polymer (Adell et al. 2017), als Abstandshalter zu fungieren und die einzelnen eGFP-LAP-Shrub-Monomere im Polymer voneinander zu trennen.

Eine solch funktionale Heteropolymerisation ermöglicht eine nähere Untersuchung der Polymerisation während der ILV-Bildung an der endosomalen Membran. Daher wurde in einem anschließenden Experiment die Lokalisation von eGFP-LAP-Shrub im epithelialen Gewebe analysiert. In Anwesenheit von endogenem Shrub lokalisiert eGFP-LAP-Shrub diffus im Zytoplasma (Abb. 2-28 A-H). Hierbei macht es scheinbar keinen Unterschied, ob eine (Abb. 2-28 A-D) oder zwei (Abb. 2-28 E-H) zusätzliche Kopien *shrubP-eGFP-LAP-shrub* exprimiert werden. eGFP-LAP-Shrub bleibt gleichmäßig im Zytoplasma verteilt und zeigt keine distinkte Kolokalisation mit Notch (Abb. 2-28 B, D u. F, H). Ferner hat die Expression von eGFP-LAP-Shrub keinen offensichtlichen Einfluss auf die Entwicklung der Fliegen. Adulte Fliegen, die homozygot oder heterozygot für *shrubP-eGFP-LAP-shrub* sind, zeigen augenscheinlich keinerlei Defekte.

Bei der partiellen Rettung des *shrub⁴⁻¹* mutanten Phänotyps durch eine Kopie *BAC^{shrub}-CHMP4B*, akkumuliert eGFP-LAP-Shrub hingegen in punktartigen Strukturen (Abb. 2-28 L). Diese kolokalisieren größtenteils mit Notch, was auf Endosomen schließen lässt (Abb. 2-28 J-L). eGFP-LAP-Shrub ist also nicht, wie in Anwesenheit des endogenen Shrub, diffus im Zytoplasma lokalisiert (Abb. 2-28, vgl. L mit D, H).

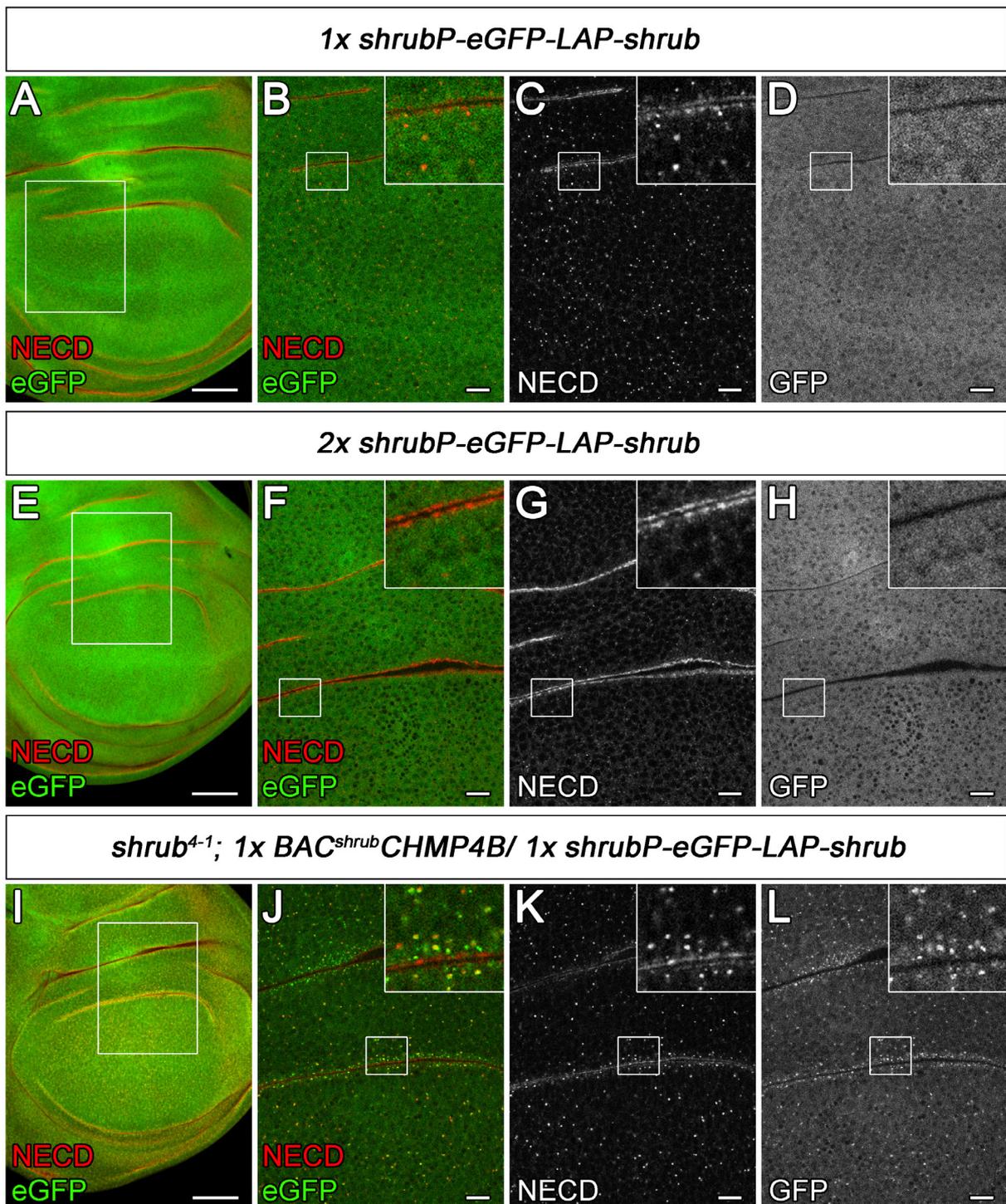


Abb. 2-28: Bei der partiellen Rettung des *shrub*⁴⁻¹ mutanten Phänotyps durch humanes CHMP4B lokalisiert eGFP-LAP-Shrub an Endosomen. Detektion von eGFP-LAP-Shrub in den Epithelzellen der Flügelimaginalscheibe in Gegenwart von endogenem Shrub (A-H) oder humanem CHMP4B (I-L). Eine Vergrößerung des quadratischen Ausschnitts in (B-D, F-H, J-L) befindet sich jeweils oben rechts in der Aufnahme. (A-H) Expression von *shrubP*-eGFP-LAP-*Shrub* in einer (A-D) oder zwei (E-H) Kopien. In beiden Fällen ist eGFP-LAP-Shrub gleichmäßig im Zytoplasma verteilt und zeigt keine spezifische Kollokalisierung mit Notch (Antikörperfärbung gegen NECD). (I-L) Bei der partiellen Rettung, also in Gegenwart von humanem CHMP4B und in Abwesenheit von endogenem Shrub, akkumuliert eGFP-LAP-Shrub in

punktartigen Strukturen, die mit dem Notch-Rezeptor kolokalisieren (J-L). Maßstabsbalken: (A, E, I) 50 μm , (B-D, F-H, J-L) 10 μm .

Da eGFP-LAP-Shrub bei der partiellen Rettung durch CHMP4B an Endosomen arretiert (Abb. 2-28 J-L), scheint die Disassemblierung des ESCRT-III Polymers beeinträchtigt zu sein. Ursache hierfür könnte einerseits das humane CHMP4B, andererseits der eGFP-Tag von eGFP-LAP-Shrub sein. Wäre der eGFP-Tag verantwortlich, würde eGFP-LAP-Shrub nicht in die endogenen Shrub-Polymere eingebaut werden. Andernfalls müsste eGFP-LAP-Shrub auch in Anwesenheit von endogenem Shrub an Endosomen arretieren und nicht nur im Zytoplasma lokalisiert sein (Abb. 2-28 A-H).

Daher gilt es zu klären, ob eGFP-markiertes Shrub funktional in die Shrub-Polymere eingebaut wird. Es benötigt eine genetische Situation, die es erlaubt, funktionelle Heteropolymere aufzudecken. Hier bietet sich der *lgd^{d7}* mutante Phänotyp an, da dieser durch Erhöhung der Shrub-Konzentration gerettet werden kann (siehe 2.2.1 und (Masterarbeit Bäumers 2015)). Eine Rettung durch eine zusätzliche Expression von eGFP-LAP-Shrub würde für eine funktionale Heteropolymerisation zwischen Shrub und eGFP-LAP-Shrub sprechen.

Myc-markiertes Shrub ist in der Lage den *lgd^{d7}* mutanten Phänotyp partiell zu retten (Abb. 2-29 C). In Anwesenheit von zwei Kopien des Transgens *shrubP-Myc-shrub* sterben die Fliegen nicht mehr wie für den Funktionsverlust von *lgd* charakteristisch im frühen Puppenstadium, sondern sie entwickeln sich zu *pharate adults* (Abb. 2-29). Zudem ist die ebenfalls typische ektopische Aktivierung in der Flügelimaginalscheibe aufgehoben (siehe 2.2.1, Abb. 2-4 F). Auch bei nur einer Kopie ist bereits eine Reduktion zu detektieren (siehe 2.2.1, Abb. 2-4 E, E'). Entgegen der Erwartung zeigt sich keine Verminderung der ektopischen Aktivierung, wenn eGFP-LAP-Shrub im *lgd^{d7}* mutanten Hintergrund exprimiert wird (Abb. 2-29 A, A'). Im Gegenteil *lgd^{d7}* mutanten Fliegen sterben bei der Expression von zwei Kopien des Transgens *shrubP-eGFP-LAP-shrub* sogar früher und zwar bereits vor dem frühen dritten Larvenstadium (Abb. 2-29 B, C). Dies legt nahe, dass Shrub und eGFP-LAP-Shrub keine funktionsfähigen Heteropolymere bilden können. Im Gegenteil im *lgd^{d7}* mutanten Hintergrund wirkt eGFP-LAP-Shrub dominant-negativ.

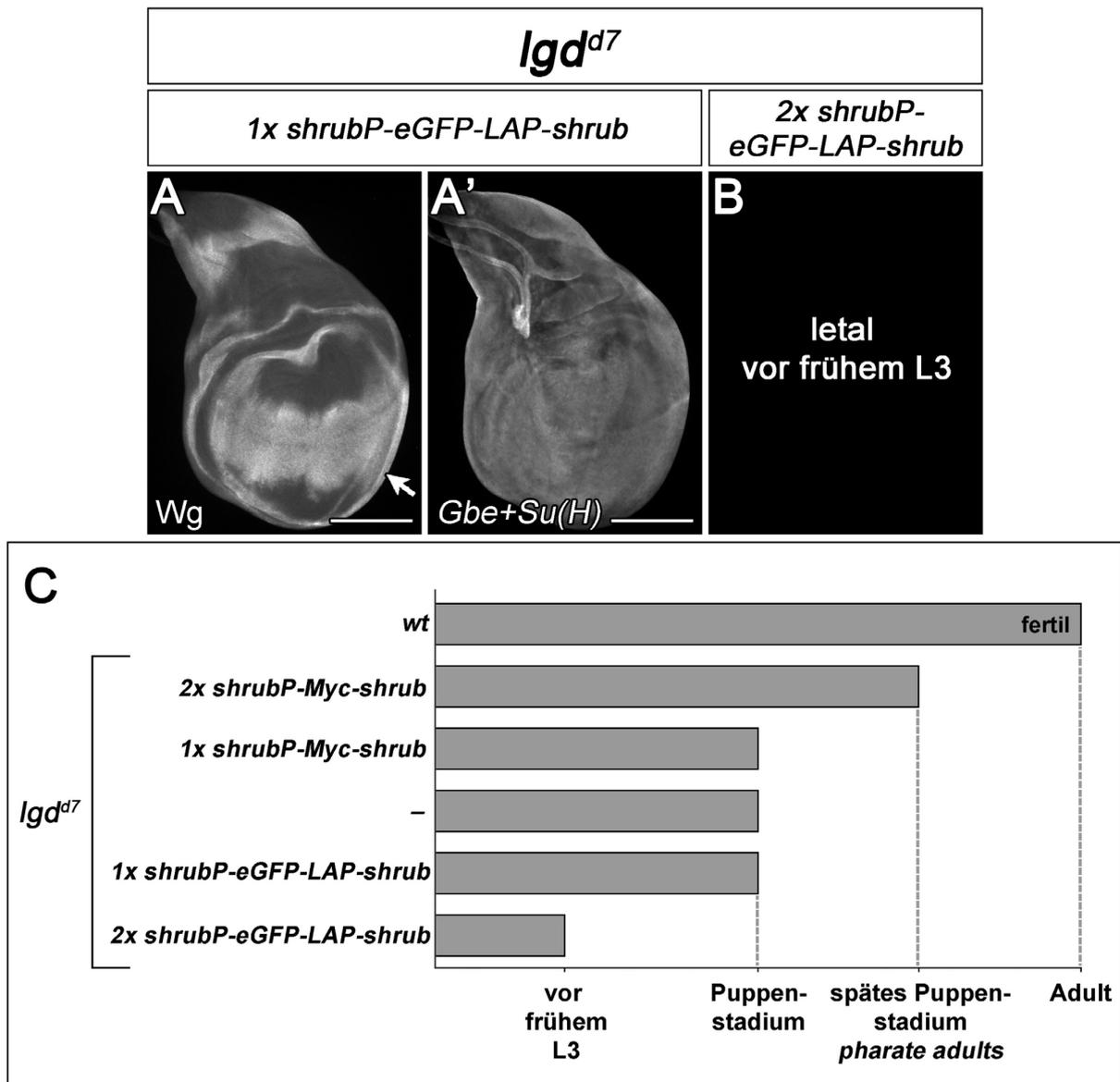


Abb. 2-29: eGFP-LAP-Shrub wirkt bei einem Funktionsverlust von *lgd* dominant-negativ. Ein Funktionsverlust von *lgd* verursacht eine ektopische Aktivierung des Notch-Signalweges (nicht gezeigt, siehe 2.3.4, Abb. 2-26 A, A'). (A, A') Eine solche Aktivierung bleibt trotz der zusätzlichen Expression von einer Kopie *shrubP-eGFP-LAP-shrub* erhalten. (B) Zwei Kopien verursachen eine verfrühte Letalität. (C) Graphische Übersicht über die Entwicklungsstadien die *lgd^{d7}* mutante Fliegen bei der Expression verschiedener *shrub*-Transgene erreichen. *lgd^{d7}* mutante Tiere sterben während des frühen Puppenstadiums (Bryant und Schubiger 1971). Eine Erhöhung des Expressionslevels der ESCRT-III Komponente Shrub durch *shrubP-Myc-shrub* hat einen positiven Einfluss auf die Entwicklung. Bei der Expression von zwei Kopien des Transgens *shrubP-Myc-shrub* entwickeln sich die mutanten Tiere zu *pharate adults* und kommen damit in ihrer Entwicklung weiter. Die Expression von eGFP-LAP-Shrub hat einen negativen Einfluss auf die Entwicklung. In Gegenwart von zwei Kopien des Transgenes *shrubP-eGFP-LAP-shrub* sterben die Fliegen vor dem frühen dritten Larvenstadium (L3). Diese verfrühte Letalität der Fliegen zeigt, dass eGFP-LAP-Shrub bei einem Funktionsverlust von *lgd* dominant-negativ wirkt. Maßstabsbalken: (A-D) 200 μ m.

2.3.6 Humanes CHMP4B benötigt Lgd/hLGD für seine vollständige Aktivität

Die humanen Proteine hLGD1 und hLGD2 gehören zu einer evolutionär konservierten Lgd-Protein Familie, die in allen Metazoen Vertreter hat (Jaekel und Klein 2006). Dabei ist vor allem hLGD2 in verschiedene biologische Prozesse involviert, von der Zentrosomen-spaltung (Nakamura et al. 2009) über die Immunantwort (Chang et al. 2011) bis zu einer Vielzahl von Signalwegen (siehe 1.5). Darüber hinaus deuten einige wenige, voran-gegangene *in vitro* und *in vivo* Studien bereits an, dass eine endosomale Funktion von Lgd auch in Säugern konserviert sein könnte (Collinet et al. 2010, Drusenheimer et al. 2015). Zudem wurde bereits eine direkte Interaktion zwischen allen drei humanen CHMP4-Proteinen und den zwei humanen Lgd-Orthologen nachgewiesen (Tsang et al. 2006, Usami et al. 2012). Die biologische Relevanz dieser Interaktion in Säugern ist jedoch bisher nur ansatzweise erforscht.

In *Drosophila* konnte hingegen gezeigt werden, dass Lgd eine Funktion im endosomalen Transportweg hat. Lgd wird für die vollständige Aktivität der ESCRT-III Komponente Shrub benötigt (siehe 2.2 und (Troost et al. 2012, Masterarbeit Bäumers 2015)). Es stellt sich daher die Frage, ob diese Funktionsweise konserviert ist und die humanen Lgd-Orthologe auch über Shrub/CHMP4 Einfluss auf den ESCRT-III Komplex im endosomalen Transportweg nehmen.

Drosophila, als Modellsystem, ermöglicht an diesem Punkt eine funktionale Charakterisierung des Zusammenspiels der humanen Lgd- und Shrub-Orthologe *in vivo*.

Im Vorfeld dieser Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass sich die ekto-pische Aktivierung des Notch-Signalweges in den partiell durch eine Kopie *BAC^{shrub-CHMP4B}* geretteten *shrub⁴⁻¹* mutanten Zellen verstärkt, sobald zusätzlich eine Kopie von *lgd* entfernt wird (*shrub⁴⁻¹, lgd^{d7}/shrub⁴⁻¹, +; BAC^{shrub-CHMP4B}/+*) (Masterarbeit Bäumers 2015). Folglich scheint zumindest CHMP4B wie Shrub mit Lgd *in vivo* zu interagieren, wobei diese Interaktion auch für die Aktivität von CHMP4B notwendig zu sein scheint.

Zudem haben frühere Studien bereits gezeigt, dass die zwei humanen Orthologe hLGD1 und hLGD2 die Lgd-Funktion in *Drosophila* übernehmen können (Drusenheimer et al. 2015). Sie wurden dabei unter Kontrolle des endogenen *lgd* Promotors (*lgdP*) exprimiert. Hierfür wurde auf das Transgen *lgdP-lgd-HA* zurückgegriffen (Troost et al. 2012). Es umfasst die codierende Sequenz (CDS) von *lgd* sowie ca. 550 bp der umliegenden genomischen Region. Die Expression einer Kopie dieses Transgens reicht bereits aus, um

den *lgd^{d7}* mutanten Phänotyp vollständig zu retten (Troost et al. 2012). Für eine endogene Expression der humanen Orthologe auf dem physiologischen Level von Lgd, wurde zwischen die 5' UTR und 3' UTR von *lgdP* die cDNA von *hLGD1* oder *hLGD2* kloniert (Drusenheimer et al. 2015, Dissertation Schulz 2015). Die Expression einer Kopie des Transgens *lgdP-hLGD1-HA*, inseriert in die *landing site attP 86Fb*, rettet den *lgd^{d7}* mutanten Phänotyp vollständig. Die *lgd^{d7}* mutanten Tiere entwickeln sich zu fertilen, adulten Fliegen, wohingegen *lgdP-hLGD2-HA att86Fb* nicht komplett den *lgd*-Ausfallphänotyp aufhebt. Selbst wenn zwei Kopien inseriert sind, sterben die Tiere als *pharate adults* im späten Puppenstadium. Dies impliziert neben funktionellen Unterschieden, dass humanes LGD1 dem *Drosophila* Lgd funktional ähnlicher ist als hLGD2 (Drusenheimer et al. 2015). Passend zu diesen Ergebnissen, stimmt hLGD1 auch von der Aminosäuresequenz in Bezug auf Sequenzidentität und -ähnlichkeit stärker mit *Drosophila* Lgd überein als hLGD2 (Dissertation Schulz 2015).

Um weitere Hinweise auf eine Konservierung der Lgd-Funktion im endosomalen Transportweg zu erhalten, wurde im Rahmen dieser Arbeit, untersucht, ob und in welchem Umfang, die humanen Orthologe einen simultanen Funktionsverlust von *shrub* und *lgd* in *Drosophila* kompensieren können. Hierdurch soll die Funktionsweise der einzelnen humanen Orthologe und natürlich auch ihr funktionales Zusammenspiel analysiert werden.

Aufgrund des Aufbaus der folgenden Rettungsexperimente mussten die Transgene *lgdP-hLGD1-HA* und *lgdP-hlgd2-HA* neu in die *landings site attP 68E* auf dem Chromosom III (3L linker Arm) inseriert werden. In einem ersten Schritt wurde daher überprüft, ob die Transgene *lgdP-lgd-HA*, *lgdP-hLGD1-HA* und *lgdP-hLGD2-HA*, inseriert in *attP 68E*, das gleiche Rettungsvermögen gegenüber dem *lgd^{d7}* mutanten Phänotyp zeigen, wie dieselben Transgene zuvor in *attP 86Fb* (s.o.).

Eine Kopie des Transgens *lgdP-lgd-HA att68E* oder des Transgens *lgdP-hLGD1-HA att68E* rettet ebenfalls den *lgd^{d7}* mutanten Hintergrund vollständig. Bereits bei einer Kopie des Transgens *lgdP-hLGD2-HA att68E* entwickeln sich die *lgd^{d7}* mutanten Fliegen zu *pharate adults* (nicht bekannt für *lgdP-hLGD2-HA attP 86Fb* (Dissertation Schulz 2015)).

Die etablierten Stämme wurden nicht homozygot, weder im wildtypischen noch im *lgd^{d7}* mutanten Hintergrund. Die Tiere sterben vor dem frühen dritten Larvenstadium. Ursache

hierfür ist vermutlich die *landing site attP 68E*. An dieser Stelle kann daher keine Aussage über die Rettungsfähigkeit der jeweiligen Transgene in zwei Kopien getroffen werden.

Anschließend wurde das gemeinsame Rettungsvermögen von *hLGD1/2* und *CHMP4B* gegenüber dem simultanen Funktionsverlust von *lgd* und *shrub* analysiert. Hier bestand die Hoffnung weitere Hinweise auf eine Konservierung der Lgd-Funktion zu erlangen. Es sollte aufgedeckt werden, ob Lgd auch in höheren Metazoen als Regulator der Shrub/CHMP4-Aktivität fungiert.

Ein simultaner Funktionsverlust von *lgd* und *shrub* ist vermutlich schon aufgrund der Homozygose von *shrub⁴⁻¹* embryonal letal. Eine Expression von zwei Kopien *BAC^{shrub}-CHMP4B* hebt diese embryonale Letalität auf. Trotzdem sterben die Fliegen bereits im späten zweiten Larvenstadium (L2) (Abb. 2-31) (Masterarbeit Bäumers 2015). Zwei Kopien von *BAC^{shrub}-CHMP4B* zusammen mit zwei Kopien *lgdP-hLGD1-HA* (Masterarbeit Bäumers 2015) oder als Kontrolle *lgdP-lgd-HA* retten den *lgd^{d7}, shrub⁴⁻¹* mutanten Hintergrund wiederum beinahe vollständig. Die geretteten *lgd^{d7}, shrub⁴⁻¹* mutanten Tiere entwickeln sich in beiden Fällen zu sterilen adulten Fliegen (Abb. 2-31). Zudem ist keine ektopische Aktivierung des Notch-Signalweges, wie sie typisch für einen Funktionsverlust von *lgd* (Klein 2003) oder auch von *shrub* (Thompson et al. 2005, Vaccari et al. 2009, Hori et al. 2011) wäre, sichtbar (Abb. 2-30 C u. D, D'). In Anwesenheit von zwei Kopien *lgdP-hLGD2-HA* ist der Notch-Signalweg ebenfalls nicht ektopisch aktiviert (Abb. 2-30 E, E'). Allerdings schlüpfen die ausdifferenzierten Fliegen nicht (*pharate adults*) (Abb. 2-31).

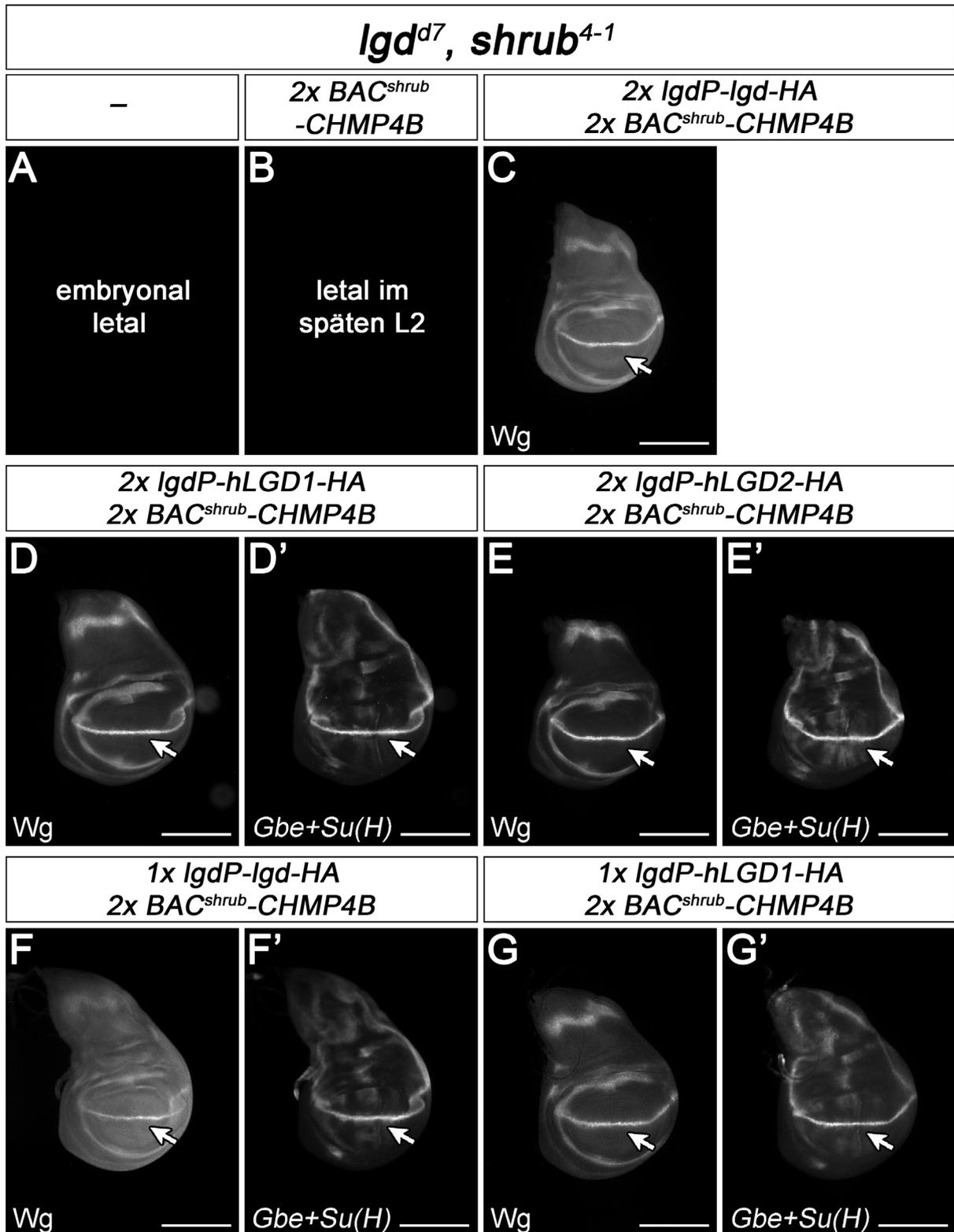


Abb. 2-30: Rettung des simultanen Funktionsverlusts von *lgd* und *shrub* durch humanes CHMP4B zusammen mit hLGD1 oder hLGD2. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Rettung des *lgd shrub* mutanten Hintergrundes (*shrub⁴⁻¹ lgd^{d7}*) durch Expression von CHMP4B in Kombination mit *Drosophila* Lgd (C), hLGD1 (D, D') oder hLGD2 (E, E'). Nachweis der Notch-Aktivität durch das Zielgen *wg* und das sensitivere Reportergenkonstrukt *Gbe+Su(H)*. (A) Ein simultaner Funktionsverlust von *lgd* und *shrub* ist vermutlich schon aufgrund der Homozygose von *shrub⁴⁻¹* embryonal letal. (B) Eine Expression von zwei

Kopien *BAC^{shrub-CHMP4B}* hebt diese embryonale Letalität auf. Trotzdem sterben die Fliegen bereits im späten zweiten Larvenstadium (L2) (Masterarbeit Bäumers 2015). (C) Rettung des *lgd^{d7} shrub⁴⁻¹* mutanten Phänotyps durch Expression von jeweils zwei Kopien *BAC^{shrub-CHMP4B}* und *lgdP-lgd-HA* (Kontrolle). Die Expression von Wg ist auf einen schmalen Streifen entlang der D/V Grenze beschränkt. (D-E') Expression von jeweils zwei Kopien *BAC^{shrub-CHMP4B}* mit zwei Kopien *lgdP-hLGD1-HA* (D, D') oder *lgdP-hLGD2-HA* (E, E') im *lgd^{d7} shrub⁴⁻¹* mutanten Hintergrund. In beiden Fällen ist die Expression des Notch-Zielgens *wg* und auch die von *Gbe+Su(H)* wildtypisch. Diese Notch-Aktivität bleibt unverändert, auch wenn eine Kopie *lgdP-lgd-HA* (F, F') oder eine Kopie *lgdP-hLGD1-HA* (G, G') entfernt wird. [D, D' aus der eigenen Masterarbeit übernommen (Masterarbeit Bäumers 2015)]. Maßstabsbalken: (A-E') 200 µm.

Humanes CHMP4B kann zusammen mit hLGD1 oder hLGD2 den simultanen Funktionsverlust von *lgd* und *shrub* in *Drosophila* kompensieren. Beide Kombinationen können jeweils deren Funktionen übernehmen. Allerdings erfolgt dies in einem unterschiedlichen Umfang. Die Kombinationen weisen ein ungleich gutes Rettungsvermögen gegenüber *lgd^{d7} shrub⁴⁻¹* mutanten Zellen auf. Dies legt nahe, dass es funktionale Unterschiede zwischen der genetischen Interaktion von *CHMP4B* mit *hLGD1* und der von *CHMP4B* mit *hLGD2* gibt. CHMP4B kann besser mit hLGD1 als mit hLGD2 die Funktionen von Shrub und Lgd übernehmen. Unter Einbeziehung der Entdeckung, dass auch humanes CHMP4B *Drosophila* Lgd für seine vollständige Aktivität benötigt (Masterarbeit Bäumers 2015), impliziert dieses Ergebnis, dass hLGD1 besser als hLGD2 die Aktivität von CHMP4B erhöht. Trotzdem sind die gewonnenen Daten auch ein Beweis dafür, dass die genetische Interaktion von *CHMP4B* mit *hLGD1* und die von *CHMP4B* mit *hLGD2* eine redundante molekulare Funktion haben. Diese teilen sie mit der genetischen Interaktion von *shrub* und *lgd* in *Drosophila*. Insgesamt bekräftigen die Ergebnisse die Annahme, dass es eine funktionale Beziehung zwischen den humanen Komponenten CHMP4B und hLGD1/2 im endosomalen Transportweg gibt. Deutlich wird dies durch die ausbleibende ektopische Aktivierung des Notch-Signalweges in den *lgd^{d7} shrub⁴⁻¹* mutanten Zellen (Abb. 2-30 D-E') und durch den positiven Effekt auf die Entwicklung der *lgd^{d7} shrub⁴⁻¹* mutanten Fliegen (Abb. 2-31).

In *Drosophila* konnte bereits gezeigt werden, dass Lgd über Shrub Einfluss auf den endosomalen Abbau von Transmembranproteinen nimmt. Hierbei scheint Lgd wichtig für die vollständige Aktivität von Shrub zu sein (siehe 2.2 (Dissertation Troost et al. 2012, Schneider et al. 2013, Troost 2013)). Das folgende *in vivo* Experiment gibt nun Hinweise darauf, dass dies auch auf hLGD1 und CHMP4B zutrifft.

lgd^{d7} shrub⁴⁻¹ mutante Tiere, die durch die Expression von jeweils zwei Kopien *BAC^{shrub}-CHMP4B* und *lgdP-hLGD1-HA* gerettet wurden, sterben als *pharate adults* und entwickeln sich nicht mehr zu adulten Tieren, sobald eine Kopie *lgdP-hLGD1-HA* entfernt wird (*shrub⁴⁻¹, lgd^{d7}; BAC^{shrub}-CHMP4B, lgdP-hLGD1-HA/BAC^{shrub}-CHMP4B, +*) (Abb. 2-31). Hier ist zu beachten, dass *shrub⁴⁻¹* mutante Tiere, die durch zwei Kopien *BAC^{shrub} CHMP4B* gerettet wurden, und auch *lgd^{d7}* mutante Tiere, die durch eine Kopie *lgdP-hLGD1-HA* gerettet wurden, vital sind und keine offensichtlichen äußerlichen Defekte zeigen (s.o. und (Diplomarbeit Bohnen 2014, Drusenheimer et al. 2015)). Folglich deutet diese verfrühte Letalität daraufhin, dass humanes LGD1 für die vollständige Aktivität von humanem CHMP4B notwendig ist. Wird eine Kopie *lgdP-hLGD1-HA* entfernt, sinkt scheinbar die Aktivität von CHMP4B. Allerdings nicht so stark, dass es zur ektopischen Aktivierung des Notch-Signalweges kommt (Abb. 2-30 G, G'). Ungeachtet dessen deutet dieses Ergebnis zum ersten Mal an, dass ein humanes LGD-Protein funktional auf diese Weise mit einem humanen CHMP4-Protein in einem Organismus interagiert.

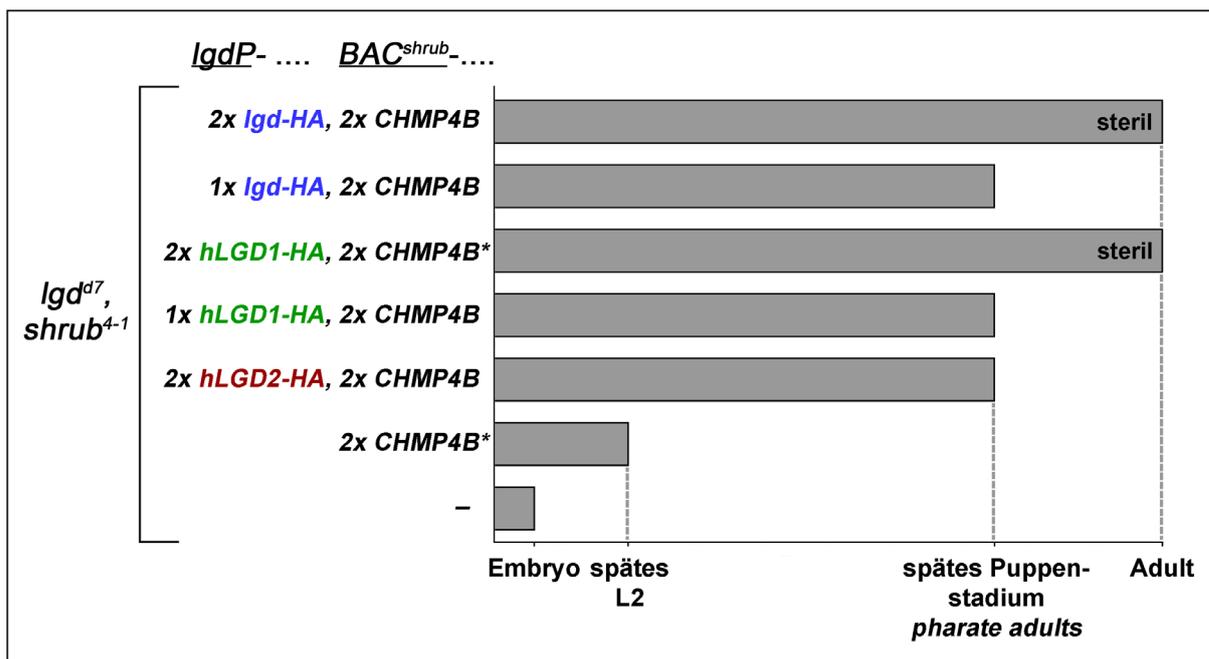


Abb. 2-31: Graphische Übersicht über das Rettungsvermögen von humanem CHMP4B zusammen mit hLGD1 oder hLGD2 gegenüber dem *lgd^{d7} shrub⁴⁻¹* mutanten Phänotyp. Ein simultaner Funktionsverlust von *lgd* und *shrub* ist vermutlich bereits aufgrund der Homozygose von *shrub⁴⁻¹* embryonal letal. Eine Expression von zwei Kopien *BAC^{shrub}-CHMP4B* hebt diese embryonale Letalität auf. Trotzdem sterben die Fliegen schon im späten zweiten Larvenstadium (L2). Es zeigt sich kein Unterschied im Rettungsvermögen von CHMP4B in Anwesenheit von *Drosophila* Lgd oder humanem LGD1. Die mutanten Tiere entwickeln sich in beiden Fällen zu sterilen adulten Fliegen. Sobald eine Kopie *lgdP-lgd-HA*

oder *lgdP-hLGD1-HA* entfernt wird, kommt es auch in beiden Fällen zu einer verfrühten Letalität. Die ausdifferenzierten Fliegen schlüpfen nicht mehr, sondern sterben bereits im späten Puppenstadium als *pharate adults*. In Anwesenheit von jeweils zwei Kopien *BAC^{shrub}-CHMP4B* und *lgdP-hLGD2-HA* sterben die ausdifferenzierten Fliegen ebenfalls in der Puppe (*pharate adults*). Es zeigen sich daher funktionelle Unterschiede zwischen dem Rettungsvermögen von CHMP4B in Anwesenheit von hLGD1 oder hLGD2 gegenüber dem *lgd shrub* mutanten Hintergrund (*lgd^{d7}, shrub⁴⁻¹*). Die mit * markierten Ergebnisse wurden bereits veröffentlicht (Masterarbeit Bäumers 2015).

Eine verfrühte Letalität ist auch bei *lgdP-lgd-HA* zu beobachten. Wird eine Kopie *lgdP-lgd-HA* bei der Rettung von *lgd^{d7} shrub⁴⁻¹* mutanten Tieren durch *BAC^{shrub}-CHMP4B* und *lgdP-lgd-HA* entfernt, sterben die Tiere ebenfalls als *pharate adults* (Abb. 2-31). Sie entwickeln sich nicht mehr zu adulten Tieren und das obwohl bereits eine Kopie *lgdP-lgd-HA* zur vollständigen Rettung des *lgd* mutanten Phänotyps ausreicht (s.o. und (Troost et al. 2012)). Allerdings ist bei (*shrub⁴⁻¹, lgd^{d7}; BAC^{shrub}-CHMP4B, lgdP-lgd-HA/BAC^{shrub}-CHMP4B, +*)-mutanten Tieren keine ektopische Aktivierung des Notch-Signalweges zu detektieren (Abb. 2-30 F, F'). Ungeachtet dessen unterstreicht dieses Ergebnis dennoch nochmals, dass humanes CHMP4B für seine vollständige Aktivität Lgd/hLGD1 benötigt.

2.3.7 Analyse der Interaktion zwischen hLGD1 und CHMP4B – Mutation des potenziellen Shrub/CHMP4-Bindemotivs in hLGD1

Die elektrostatische Interaktion zwischen Lgd und Shrub, wurde bereits eingehend untersucht (siehe 1.5). Hier stellt sich die Frage, ob diese Interaktion in höheren Organismen auf den gleichen elektrostatischen Wechselwirkungen wie in *Drosophila* beruht (siehe 1.5).

Für eine erste grundlegende *in vivo* Analyse bieten sich das humane Shrub-Ortholog CHMP4B und das humane Lgd-Ortholog LGD1 an. Beide sind in *Drosophila* funktionsfähig. Sie können den Funktionsverlust ihres *Drosophila* Orthologs unter den humanen Homologen am besten kompensieren (siehe 2.3.1, 2.3.6 und (Masterarbeit Bäumers 2015, Drusenheimer et al. 2015)).

Vier Aminosäuren in der dritten DM14 Domäne von Lgd offenbarten sich in vorangegangenen Experimenten als entscheidend für die Interaktion mit Shrub (Abb. 2-32) (McMillan et al. 2017, Dissertation Tibbe 2019). Sie bilden bei der Interaktion Salzbrückenbindungen aus. Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen des humanen LGD1

mit *Drosophila* Lgd bestätigt, dass drei dieser vier identifizierten Aminosäuren in der dritten DM14 Domäne von hLGD1 konserviert sind (Abb. 2-32). Nur das Arginin an Position 390 in Lgd findet sich in der dritten DM14 Domäne von hLGD1 nicht wieder. Dort ist anstelle einer basischen Aminosäure ein unpolares Methionin. In CHMP4B sind hingegen alle relevanten Aminosäuren von Shrub für die Interaktion mit Lgd konserviert (Abb. 2-32).

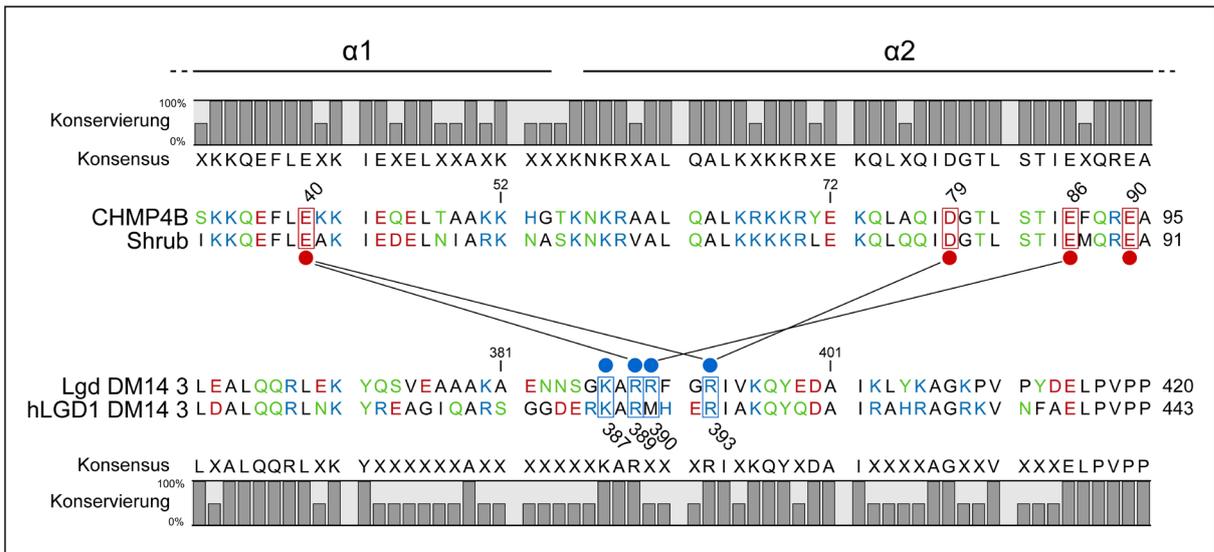


Abb. 2-32: Graphische Darstellung der Interaktion von Shrub und Lgd anhand ihrer Aminosäuresequenz. Aminosäuresequenzvergleich zwischen der dritten DM14 Domäne von *Drosophila* Lgd (362-420 aa) und der des humanen LGD1s (385-443 aa). Sequenzvergleich der Kopfreion der N-terminalen Haarnadelstruktur von *Drosophila* Shrub (33-91 aa) und der des humanen CHMP4Bs (37-95 aa). Aminosäuren, die Salzbrücken zwischen der dritten DM14 Domäne von Lgd und der Kernregion von Shrub ausbilden, sind mit ihrer entsprechenden Position im jeweiligen Protein angegeben und durch einen farbigen Punkt markiert (McMillan et al. 2017). Salzbrücken zwischen den zwei Proteinen sind durch Linien dargestellt. Unter- bzw. oberhalb des jeweiligen Sequenzvergleichs ist die Konsensussequenz und die Stärke der Konservierung in Prozent angegeben. Die Aminosäuren sind im Ein-Buchstabencode wiedergegeben. Die Farbe der Aminosäuren in dem jeweiligen Sequenzvergleich entspricht ihrer Polarität: grün = polar, schwarz = unpolar, blau = basisch und rot = sauer.

Für eine Analyse der Interaktion zwischen hLGD1 und Shrub/CHMP4B wurden Ladungsumkehrmutationen in der potenziellen Interaktionsschnittstelle von hLGD1 vorgenommen und anschließend Rettungsexperimente durchgeführt. Mutationen in der Bindestelle von Shrub/CHMP4B wurden hierbei vermieden, da über diese Bindestelle auch die Homopolymerisation der ESCRT-III Komponente erfolgt (siehe 1.4, 1.5 und 2.3.2,

Abb. 2-20). In den folgenden Experimenten lag daher der Fokus auf der dritten DM14 Domäne von hLGD1.

Frühere Analysen mit hLGD1-Deletionskonstrukten deuten bereits auf mögliche funktionelle Redundanzen zwischen den DM14 Domänen hin (Dissertation Schulz 2015). Zudem sind in *Drosophila* jeweils die ungeradzahigen (DM14 1 und DM14 3) und die geradzahigen (DM14 2 und DM14 4) DM14 Domänen von Lgd funktional redundant (Troost et al. 2012, McMillan et al. 2017, Dissertation Tibbe 2019). In den folgenden Rettungsexperimenten wurde daher als Basis das Deletionskonstrukt hLGD1 Δ DM14 1-2-HA verwendet. Bei diesem Konstrukt fehlen die ersten beiden DM14 Domänen (*lgdP-hLGD1 Δ DM14 1-2-HA*) (Abb. 2-33). Es ist aufgebaut wie das Lgd-Deletionskonstrukt, welches bei den Interaktionsanalysen von *Drosophila* Lgd verwendet wurde (McMillan et al. 2017, Dissertation Tibbe 2019). Durch diese Deletion sollte vermieden werden, dass mögliche Effekte durch die Anwesenheit einer anderen funktionsfähigen DM14 Domäne verschleiert werden. Denn ein Blick auf die Aminosäuresequenz zeigt, dass nicht nur die dritte, sondern auch die erste DM14 Domäne von Lgd/hLGD1 ein potenzielles Shrub-Interaktionsmotiv besitzt (Dissertation Tibbe 2019). Mögliche Folgen einer Unterbrechung der Interaktion mit Shrub über die dritte DM14 Domäne könnten daher von der ersten DM14 Domäne verdeckt werden.

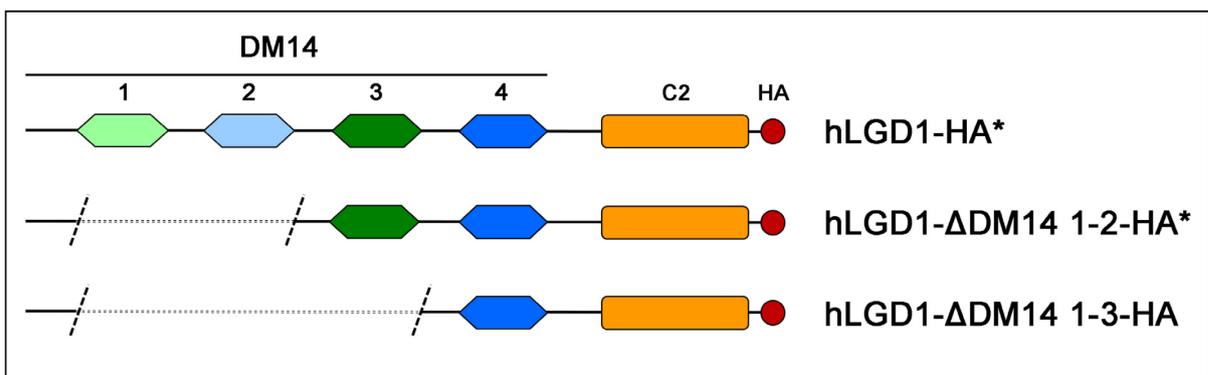


Abb. 2-33: Graphische Darstellung der analysierten hLGD1-Deletionskonstrukte. Die vier DM14 Domänen befinden sich N-terminal. Die ungeradzahigen DM14 Domänen (1+3) sind grün, die geradzahigen (2+4) blau unterlegt. C-terminal liegt die C2 Domäne (gelb). Ein HA-Tag befindet sich am C-Terminus. Bei hLGD1 Δ DM14 1-2-HA fehlen die ersten beiden DM14 Domänen. Es bildet die Grundlage für die hLGD1-Mutationskonstrukte, bei denen durch einen Aminosäureaustausch in der konservierten basischen Interaktionsstelle der dritten DM14 Domäne das Oberflächenpotential verändert wurde.

hLGD1 Δ DM14 1-3-HA besteht nur noch aus der vierten DM14 Domäne und der C2 Domäne. Die mit * markierten Konstrukte wurden bereits publiziert (Drusenheimer et al. 2015, Dissertation Schulz 2015).

In einem ersten Schritt wurde die genetische Interaktion zwischen dem humanem *lgdP-hLGD1* und *Drosophila shrub* analysiert. Hierbei sollte sich zeigen, ob hLGD1 über die gleichen elektrostatischen Wechselwirkungen wie *Drosophila Lgd* mit der ESCRT-III Komponente *Shrub* interagiert. Daher wurde eine Kopie der verschiedenen *lgdP*-Transgene im *lgd* null-mutanten Hintergrund (*lgd^{d7}*) exprimiert.

Das vollständige Transgen *lgdP-hLGD1-HA* rettet den *lgd^{d7}* mutanten Phänotyp komplett (Drusenheimer et al. 2015). Es ist keine ektopische Aktivierung des Notch-Signalweges erkennbar. *wg* und *Gbe+Su(H)* werden wildtypisch exprimiert (Abb. 2-34 B, B'). Zudem entwickeln sich fertile adulte Fliegen.

Ein hLGD1-Deletionskonstrukt, bei dem die ersten beiden DM14 Domänen fehlen (*lgdP-hLGD1 Δ DM14 1-2-HA*) (Abb. 2-33), unterdrückt die für den Funktionsverlust von *lgd* charakteristische ektopische Aktivierung des Notch-Signalweges annähernd vollständig (Abb. 2-34, vgl. C, C' mit A, A') (Dissertation Schulz 2015). Das Notch-Zielgen *wingless* ist nur noch in einigen wenigen Zellen unterhalb der D/V-Grenze ektopisch aktiviert (Abb. 2-34 C, Pfeil). Das Reportergenkonstrukt *Gbe+Su(H)* ist zwar weiterhin ektopisch aktiviert, jedoch im Vergleich zum kompletten Verlust der *lgd*-Funktion viel schwächer (Abb. 2-34, vgl. C' mit A'). Im Gegensatz zu *lgd^{d7}* mutanten Fliegen ohne Rettungskonstrukt sterben die Fliegen nicht im frühen, sondern im späten Puppenstadium als *pharate adults*.

In den folgenden Experimenten wurde durch Austausch einzelner Aminosäuren in der dritten DM14 Domäne von hLGD1 Δ DM14 1-2-HA die Funktion dieser Domäne beeinträchtigt. Als Kontrolle wurde daher zusätzlich das Rettungsvermögen von hLGD1 Δ DM14 1-3-HA analysiert. Dieses Konstrukt hat keine dritte DM14 Domäne mehr. Es umfasst nur noch die vierte DM14 und die C2 Domäne (*lgdP-hLGD1 Δ DM14 1-3-HA*) (Abb. 2-33). Es zeigt kein offensichtliches Rettungsvermögen gegenüber dem Funktionsverlust von *lgd*. Die Imaginalscheiben sind überproliferiert und bei einer Antikörperfärbung gegen *Wg* zeigt sich eine Verbreiterung der *wg*-Expressionsdomäne an der D/V Grenze nach dorsal und ventral (Abb. 2-34 D). Zudem ist *Gbe+Su(H)* in jeder Zelle stark aktiviert (Abb. 2-34 D'). Die Fliegen sterben wie für den *lgd*-Funktionsverlust charakteristisch im Puppenstadium. Demzufolge verhält sich das humane LGD1 auch hier wie

Drosophila Lgd. Nur die vierte DM14 Domäne reicht nicht aus, um den *lgd*-Funktionsverlust zu retten (Troost et al. 2012).

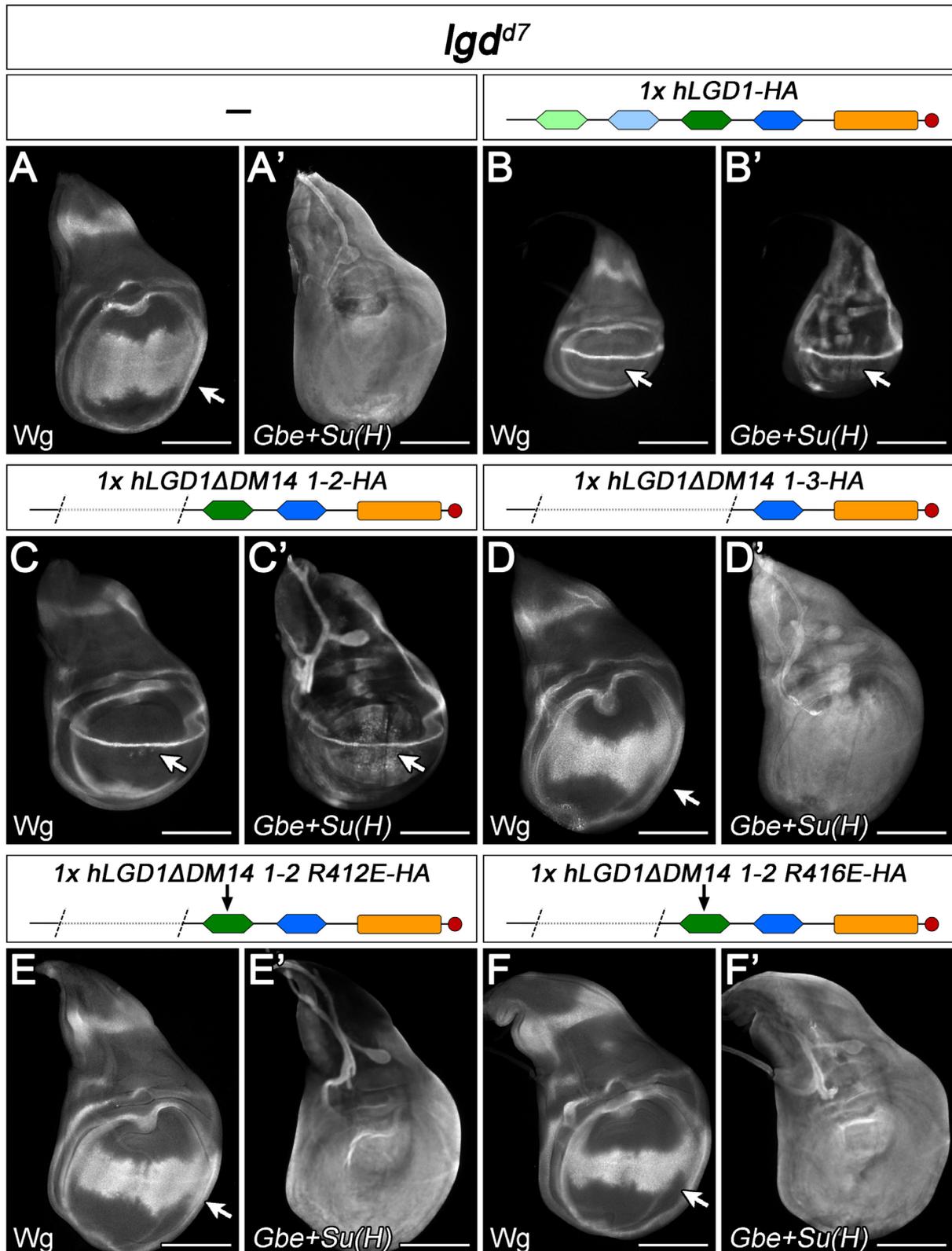


Abb. 2-34: Rettung des *lgd^{d7}* mutanten Phänotyps durch hLGD1, darunter verschiedene hLGD1-Deletionskonstrukte. Zwei der Konstrukte haben Ladungsumkehrmutationen in der potenziellen

Shrub-Interaktionsstelle der dritten DM14 Domäne. (A-F') Rettungsvermögen des humanen Lgd-Orthologs LGD1 und verschiedener hLGD1-Deletionskonstrukte gegenüber der *lgd* null-mutanten Situation (*lgd^{d7}*). Die Expression erfolgt auf einem vergleichbaren Level unter Kontrolle des endogenen *lgd* Promotors (*lgdP*). Die *landing site* der hLGD1-Transgene ist *attP 68E*. Nachweis der Notch-Aktivität durch das endogene Notch-Zielgen *wg* sowie durch *Gbe+Su(H)*. (A, A') Der Funktionsverlust von *lgd* resultiert in einer ektopischen Aktivierung des Notch-Signalweges und in einer Überproliferation der Imaginalscheibe. (B, B') Rettung des *lgd^{d7}* mutanten Phänotyps durch eine Kopie des vollständigen hLGD1-Transgens (*lgdP-hLGD1-HA*): Die Expression von *Wg* und *Gbe+Su(H)* ist wildtypisch. (C, C') Partielle Rettung des Funktionsverlusts von *lgd* durch Expression von einer Kopie *lgdP-hLGD1ΔDM14 1-2-HA*: Die Flügelimaginalscheibe ist aufgrund einer leichten ektopischen Aktivierung des Notch-Signalweges weiterhin überproliferiert. *Wg* wird ektopisch in einigen Zellen unterhalb der D/V Grenze exprimiert (C, Pfeil). *Gbe+Su(H)* zeigt ebenfalls eine erhöhte Notch-Aktivität (C'). (D, D') Rettungsvermögen von *lgdP-hLGD1ΔDM14 1-3* gegenüber der *lgd^{d7}* mutanten Situation: Ein Konstrukt nur aus vierter DM14 Domäne und C2 Domäne reicht nicht aus, um den *lgd^{d7}* mutanten Hintergrund zu retten. (E-F') Rettung des *lgd^{d7}* mutanten Hintergrundes durch eine Kopie *lgdP-hLGD1ΔDM14 1-2 R412E-HA* oder *lgdP-hLGD1ΔDM14 1-2 R416E-HA*. Beide Deletionskonstrukte weisen eine Ladungsumkehr durch den Austausch eines Arginins mit einer Glutaminsäure in der potenziellen Shrub-Interaktionsstelle der dritten DM14 Domäne auf. Beide Konstrukte zeigen kein signifikantes Rettungsvermögen gegenüber dem Funktionsverlust von *lgd*, sondern ähneln dem *lgd^{d7}* mutanten Phänotyp bei Expression einer Kopie *lgdP-hLGD1ΔDM14 1-3-HA* (vgl. mit D, D'). Maßstabsbalken: (A-F') 200 μm.

Basis für die folgenden Ladungsumkehrmutationen ist, wie oben beschrieben, das Deletionskonstrukt hLGD1ΔDM14 1-2-HA (Abb. 2-33). Es besitzt nur noch eine der beiden als entscheidend für die Funktion von *Drosophila* Lgd identifizierten, ungeradzahligen DM14 Domänen und zwar DM14 3 (Dissertation McMillan et al. 2017, Tibbe 2019). Der Austausch einer Aminosäure, die Teil des potenziellen Shrub-Interaktionsmotivs dieser dritten DM14 Domäne ist, könnte daher zu einem Verlust der Interaktion von hLGD1ΔDM14 1-2-HA und Shrub und somit der Funktionalität von hLGD1ΔDM14 1-2-HA führen. In den Rettungsexperimenten wäre dann ein Phänotyp wie bei der Rettung durch hLGD1ΔDM14 1-3-HA zu beobachten.

Eine Ladungsumkehr durch Austausch eines einzelnen basischen Arginins mit einer Glutaminsäure (E) (R412 und R416 in hLGD1, R389 und R393 in Lgd (Abb. 2-32) in diesem mutmaßlichen Interaktionsmotiv führt wie erwartet zu einem Verlust des Rettungsvermögens. Entlang der D/V-Grenze ist bei beiden Konstrukten *lgdP-hLGD1ΔDM14 1-2 R412E-HA* und *lgdP-hLGD1ΔDM14 1-2 R416E-HA* eine starke, ektopische Aktivierung von *Wg* zu beobachten und auch *Gbe+Su(H)* ist in jeder Zelle der Imaginalscheibe aktiviert (Abb. 2-34 E-F'). Es kommt zu Überproliferation der

Imaginalscheibe. Der Phänotyp ähnelt dem bei einer Rettung durch *lgdP-hLGD1ΔDM14 1-3-HA* (Abb. 2-34, vgl. E-F' mit D, D'). Die dritte DM14 Domäne von LGD1 ist durch den Austausch des Arginins an Position R412 oder R416 funktionslos. Die Fliegen sterben hier, wie bei nur der vierten DM14 Domäne (*lgdP-hLGD1ΔDM14 1-3-HA*), im Puppenstadium.

Folglich führt wie bei *Lgd* eine Ladungsumkehr in der potenziellen Shrub-Interaktionsschnittstelle der dritten DM14 Domäne von *hLGD1ΔDM14 1-2-HA* zum Funktionsverlust. Dies deutet an, dass zumindest die Interaktion zwischen humanen LGD1 und *Drosophila* Shrub auf den gleichen elektrostatischen Wechselwirkungen beruht wie die zwischen *Lgd* und Shrub.

Um weitere Hinweise auf eine Konservierung der elektrostatischen Interaktionen von *Lgd* und Shrub in höheren Organismen zu erhalten, wurden als nächstes die verschiedenen *hLGD1*-Konstrukte (Abb. 2-33) in Kombination mit humanem CHMP4B analysiert. Dafür wurde untersucht, ob und in welchem Umfang der simultane Funktionsverlust von *shrub* und *lgd* kompensiert werden kann.

Eine Kopie des Transgens *lgdP-hLGD1-HA* rettet zusammen mit zwei Kopien *BAC^{shrub}-CHMP4B* den *lgd^{d7} shrub⁴⁻¹* mutanten Hintergrund soweit, dass die Fliegen sich innerhalb der Puppe ausdifferenzieren können (*pharate adults*). Es liegt keine ektopische Aktivierung des Notch-Signalweges in der Flügelimaginalscheibe vor (Abb. 2-35 B, B'). Eine Kopie des Transgens *lgdP-hLGD1ΔDM14 1-2-HA* rettet in Kombination mit zwei Kopien *BAC^{shrub}-CHMP4B* partiell (Abb. 2-35 D, D'). Es ist eine leichte ektopische Aktivierung von *wg* in einigen wenigen Zellen unterhalb der D/V Grenze erkennbar (Abb. 2-35 D, Pfeil). Zudem ist das Reportertransgenkonstrukt *Gbe+Su(H)* ektopisch aktiviert (Abb. 2-35 D'). Die Fliegen sterben im frühen Puppenstadium und zwar selbst wenn zwei Kopien *lgdP-hLGD1ΔDM14 1-2-HA* vorliegen.

Wie zu erwarten zeichnet sich bei *lgdP-hLGD1ΔDM14 1-3-HA* in Kombination mit zwei Kopien *BAC^{shrub}-CHMP4B* kein offensichtliches Rettungsvermögen gegenüber dem simultanen Funktionsverlust von *lgd* und *shrub* ab. Die *lgd^{d7} shrub⁴⁻¹* mutanten Fliegen sterben vor dem dritten Larvenstadium (L3) (Abb. 2-35 C). Daran ändert sich auch nichts, wenn zwei Kopien *lgdP-hLGD1ΔDM14 1-3-HA* exprimiert werden.

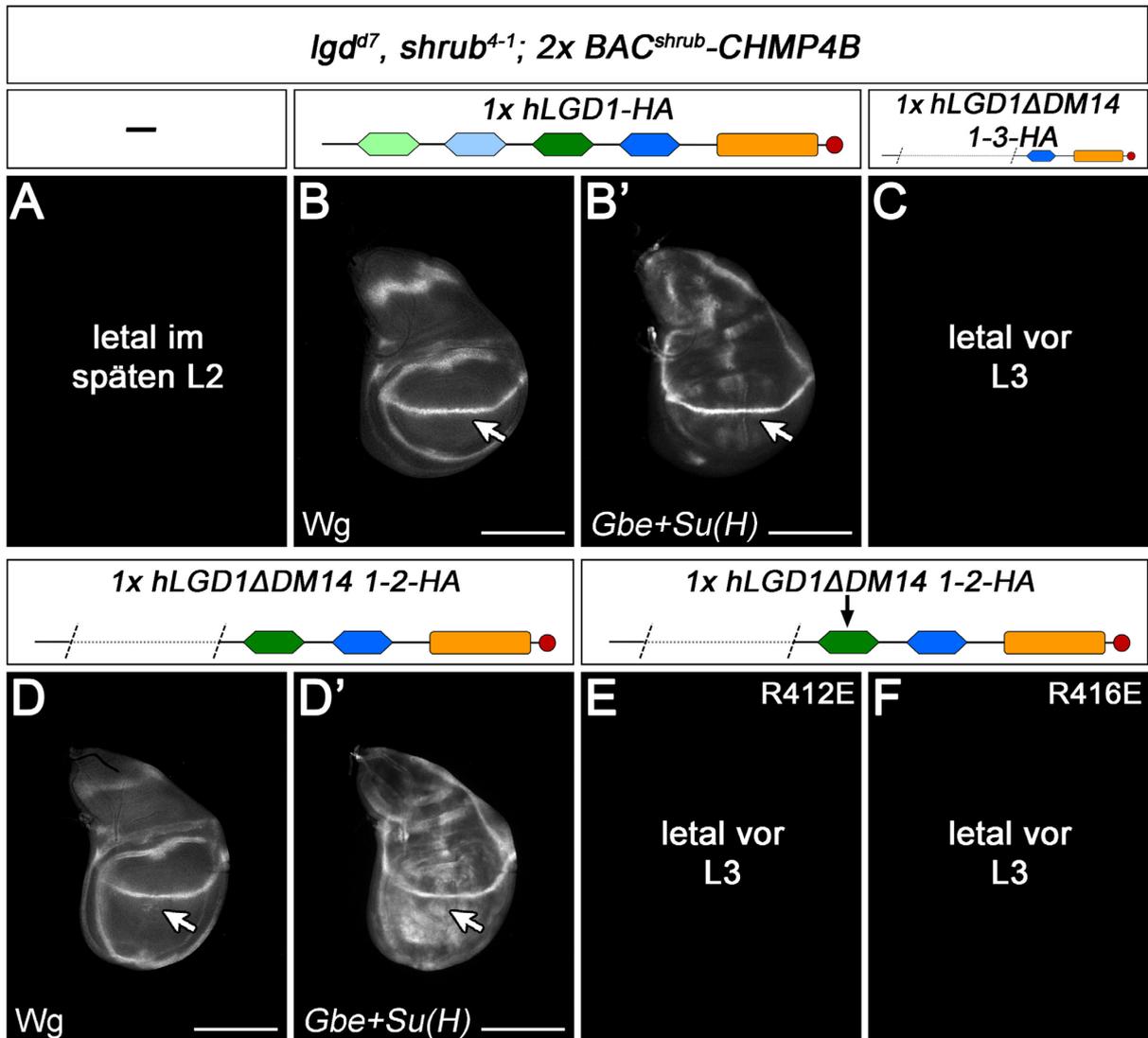


Abb. 2-35: Rettung des *lgd^{d7} shrub⁴⁻¹* mutanten Phänotyps durch humanes CHMP4B in Kombination mit hLGD1 oder verschiedenen hLGD1-Deletionskonstrukten, darunter zwei mit Ladungsumkehrmutation in der potenziellen CHMP4B-Interaktionsstelle der dritten DM14 Domäne. (A-F) Rettungsversmögen des humanes Lgd-Orthologs LGD1 und verschiedener hLGD1-Deletionskonstrukte zusammen mit humanem CHMP4B gegenüber der *lgd^{d7} shrub⁴⁻¹* mutanten Situation. Die Expression von hLGD1 und seiner Deletionskonstrukte erfolgt auf einem vergleichbaren Level unter Kontrolle des endogenen *lgd* Promotors (*lgdP*) (*attP 68E*). Bei allen gezeigten Rettungsexperimenten (A-F) sind anstatt des endogenen *shrub* zwei Kopien *BAC^{shrub}-CHMP4B attP 86Fb* im Genom vorhanden. Eine Detektion der Notch-Aktivität erfolgt durch eine Antikörperfärbung gegen *Wg* und durch das Reportergerkonstrukt *Gbe+Su(H)*. (A) Ohne hLGD1 sterben die *lgd^{d7} shrub⁴⁻¹* mutanten Fliegen bereits im späten zweiten Larvenstadium (L2). (B, B') Rettung durch die zusätzliche Expression von einer Kopie *lgdP-hLGD1-HA*. Es ist keine ektopische Aktivierung des Notch-Signalweges erkennbar, weder *wg* noch *Gbe+Su(H)* sind ektopisch exprimiert. (C) Rettungsversmögen von einer Kopie *lgdP-hLGD1ΔDM14 1-3-HA*. Trotz hLGD1ΔDM14 1-3-HA sterben die *lgd^{d7} shrub⁴⁻¹* mutanten Fliegen, die zusätzlich zwei Kopien *BAC^{shrub}-CHMP4B* exprimieren vor dem dritten Larvenstadium (L3). (D, D') Partielle Rettung des Funktionsverlusts von *lgd* und *shrub* durch Expression von einer Kopie *lgdP-hLGD1ΔDM14 1-2-HA* und zwei Kopien *BAC^{shrub}-CHMP4B*. *Wg* wird in einigen Zellen

unterhalb der D/V-Grenze ektopisch exprimiert (D, Pfeil). Das Reportergenkonstrukt *Gbe+Su(H)* ist ebenfalls verstärkt aktiv (D'). (E, F) Rettung des *lgd^{d7} shrub⁴⁻¹* mutanten Hintergrundes durch eine Kopie *lgdP-hLGD1ΔDM14 1-2 R412E-HA* oder *lgdP-hLGD1ΔDM14 1-2 R416E-HA* zusammen mit zwei Kopien *BAC^{shrub}-CHMP4B*. Beide Deletionskonstrukte weisen eine Ladungsumkehrmutation (Arginin zu Glutaminsäure) in der potenziellen CHMP4B-Interaktionschnittstelle der dritten DM14 Domäne auf. Beide Konstrukte zeigen kein erkennbares Rettungsvermögen. Der Phänotyp ähnelt dem bei einer Expression von einer Kopie *lgdP-hLGD1ΔDM14 1-3-HA* (vgl. mit C). Maßstabsbalken: (A-F) 200 µm.

Ein Austausch einer der als entscheidend für die Interaktion mit Shrub identifizierten Aminosäuren (Abb. 2-32) in *hLGD1ΔDM14 1-2-HA* könnte zu einem Verlust der Interaktion zwischen *hLGD1ΔDM14 1-2-HA* und CHMP4B führen. Die dritte DM14 Domäne von *hLGD1ΔDM14 1-2-HA* hätte dann ihre Funktion verloren. Wäre dies der Fall, wäre in den Rettungsexperimenten ein Phänotyp zu erwarten, wie er bei der Rettung des *lgd^{d7} shrub⁴⁻¹* mutanten Hintergrundes durch zwei Kopien *BAC^{shrub}-CHMP4B* und eine Kopie *lgdP-hLGD1ΔDM14 1-3-HA* zu beobachten ist. Dies ist auch der Fall. Aufgrund der Ladungsumkehr sind beide Konstrukte *hLGD1ΔDM14 1-2 R412E-HA* und *hLGD1ΔDM14 1-2 R416E-HA* nicht in der Lage zusammen mit humanem CHMP4B den *lgd^{d7} shrub⁴⁻¹* mutanten Phänotyp zu retten (Abb. 2-35 E, F). Beide Konstrukte zeigen aufgrund des Austauschs eines Arginins in der potenziellen Interaktionsoberfläche einen Verlust des Rettungsvermögens. Die *lgd^{d7} shrub⁴⁻¹* mutanten Tiere sterben vor dem dritten Larvenstadium. Am Zeitpunkt der Letalität ändert sich auch nichts, wenn zwei Kopien *lgdP-hLGD1ΔDM14 1-2 R412E-HA* oder *lgdP-hLGD1ΔDM14 1-2 R416E-HA* exprimiert werden.

Diese Ergebnisse deutet an, dass durch Ladungsumkehr in der dritten DM14 Domäne von *hLGD1* die Interaktion mit humanem CHMP4B unterbunden wird. Vermutlich beruht daher die Interaktion zwischen humanem LGD1 und CHMP4B auf den gleichen elektrostatischen Wechselwirkungen wie die zwischen *Lgd* und *Shrub*.

2.3.8 Heteropolymerisation von CHMP4 in Anwesenheit von *hLGD in vivo*

Im Rahmen dieser Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass es funktionelle Unterschiede zwischen den zwei humanen *Lgd*-Orthologen (siehe 2.3.6), aber auch zwischen den drei humanen *Shrub*-Orthologen gibt (siehe 2.3.1). Zusätzlich offenbarten *in vivo* Rettungsexperimente jedoch auch, dass die analysierten Orthologe teilweise eine redundante Funktion besitzen, die sie gemeinsam mit ihren jeweiligen Orthologen in

Drosophila teilen (siehe 2.3.3 und 2.3.6). Dabei konnte u.a. gezeigt werden, dass CHMP4B sowohl mit hLGD1 als auch mit hLGD2 die Funktion von Shrub und Lgd übernehmen kann, jedoch in einem unterschiedlichen Ausmaß (siehe 2.3.6 und 2.3.7).

Hier stellt sich nun die Frage, ob weitere Präferenzen bei den Interaktionen zwischen den humanen Orthologen existieren.

Es bietet sich daher auch hier an mit Hilfe von Rettungsexperimenten gegenüber der *lgd^{d7} shrub⁴⁻¹* mutanten Situation mögliche Tendenzen *in vivo* aufzudecken. Es gilt zu klären, ob CHMP4A oder CHMP4C ein höheres Rettungsvermögen und damit eine höhere Aktivität zeigen, sobald an Stelle von *Drosophila* Lgd eins seiner humanen Orthologe (hLGD1 oder hLGD2) exprimiert wird.

Eine Expression von zwei Kopien *lgdP-hLGD1-HA* zusammen mit zwei Kopien *BAC^{shrub}-CHMP4B* rettet den *lgd^{d7} shrub⁴⁻¹* mutanten Hintergrund (Masterarbeit Bäumers 2015). Die mutanten Tiere entwickeln sich zu sterilen adulten Fliegen (Abb. 2-37). Außerdem ist keine ektopische Aktivierung des Notch-Signalweges, wie sie charakteristisch für den Funktionsverlust von *lgd* (Klein 2003) oder *shrub* (Thompson et al. 2005, Vaccari et al. 2009, Hori et al. 2011) wäre, in der Flügelimaginalscheibe erkennbar (Abb. 2-36 A, A') (Masterarbeit Bäumers 2015). In Anwesenheit von zwei Kopien *lgdP-hLGD2-HA* und zwei Kopien *BAC^{shrub}-CHMP4B* differenzieren sich die *lgd^{d7} shrub⁴⁻¹* mutanten Fliegen in der Puppe, schlüpfen jedoch nicht (*pharate adults*) (Abb. 2-37).

Im Gegensatz dazu, zeigen CHMP4A und CHMP4C auch in Anwesenheit von humanen LGD1 oder LGD2 kein offensichtliches Rettungsvermögen. Hier sterben die *lgd^{d7} shrub⁴⁻¹* mutanten Fliegen trotz einer Expression von je zwei Kopien *BAC^{shrub}-CHMP4A* oder *BAC^{shrub}-CHMP4C* zusammen mit zwei Kopien *lgdP-hLGD1/2-HA* vor dem späten zweiten bzw. frühen dritten Larvenstadium (Abb. 2-37). Es offenbart sich in diesem Versuchsaufbau daher nicht, ob die humanen Orthologe hLGD1/2 einen positiven Effekt auf die Funktionalität bzw. Aktivität von CHMP4A und CHMP4C haben.

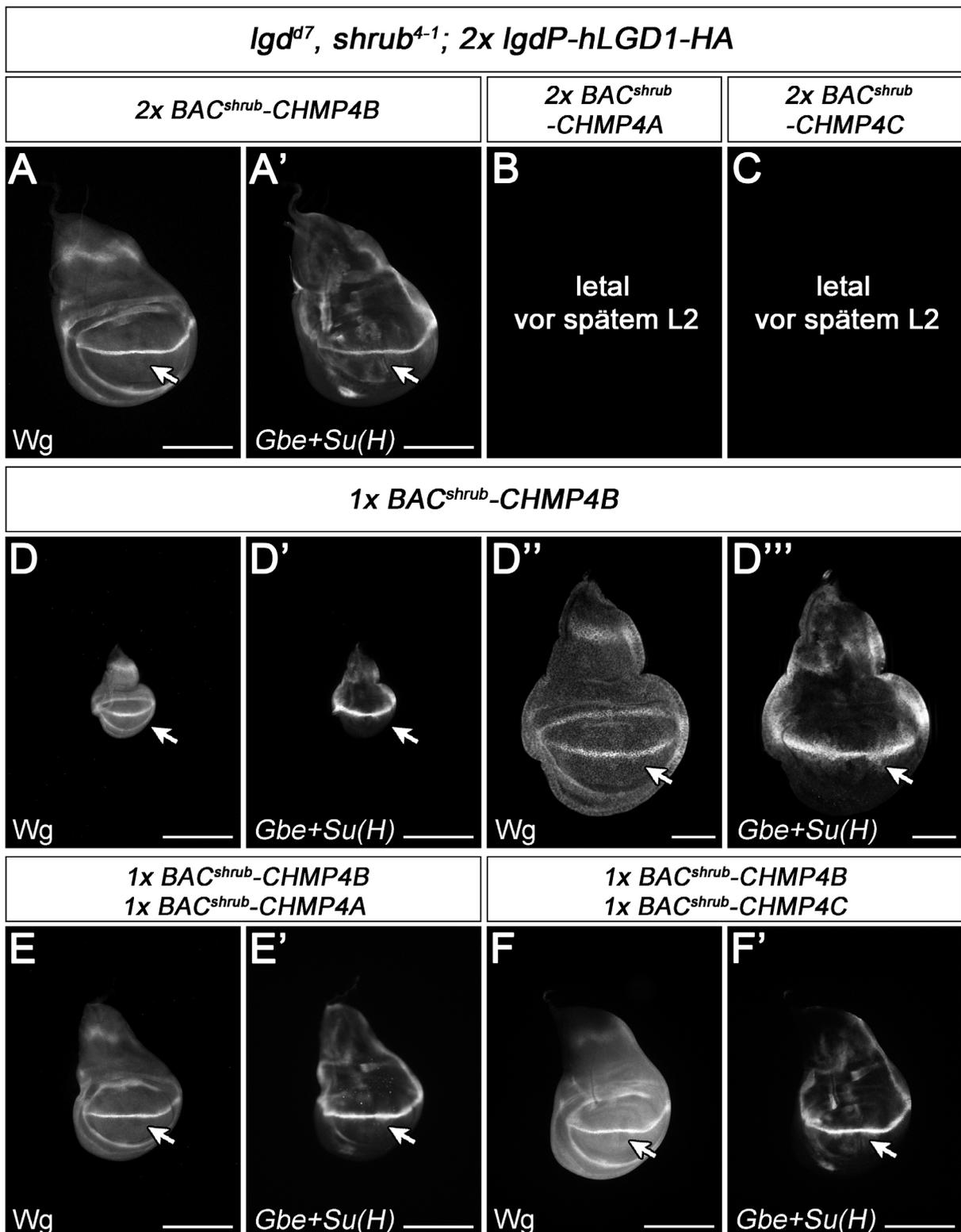


Abb. 2-36: Rettung des *lgd^{d7} shrub⁴⁻¹* mutanten Phänotyps durch Kombination der drei humanen Shrub-Orthologe (CHMP4A, CHMP4B und CHMP4C) und hLGD1. Ein simultaner Funktionsverlust von *lgd* und *shrub* ist vermutlich bereits aufgrund der Homozygose von *shrub⁴⁻¹* embryonal letal (nicht gezeigt). Bei allen gezeigten Rettungsexperimenten (A-F') werden anstatt des endogenen *lgd* zwei Kopien *lgdP-hLGD1-HA* (*attP 68Fb*) exprimiert. Ein Nachweis der Notch-Aktivität erfolgt zum einen durch eine Antikörperfärbung gegen Wg (A, D, D'', E, F) und zum anderen durch das sensitivere Reporter-genkonstrukt

Gbe+Su(H) (A', D', D''', E', F'). (A, A') Vollständige Rettung der *lgd^{d7} shrub⁴⁻¹* mutanten Situation durch Expression von jeweils zwei Kopien *BAC^{shrub}-CHMP4B* und *lgdP-hLGD1-HA*. Es zeigt sich eine wildtypische Aktivität des Notch-Signalweges. (B, C) Trotz Expression von zwei Kopien *BAC^{shrub}-CHMP4A* oder *BAC^{shrub}-CHMP4C* zusammen mit humanem LGD1 sterben *lgd^{d7} shrub⁴⁻¹* mutanten Fliegen vor dem späten zweiten Larvenstadium (L2). (D-D''') Rettung des *lgd^{d7} shrub⁴⁻¹* mutanten Phänotyps durch nur eine Kopie *BAC^{shrub}-CHMP4B* in Anwesenheit von zwei Kopien *lgdP-hLGD1-HA*. Hier erreichen die Fliegen nur vereinzelt das frühe dritte Larvenstadium (L3). Die Flügelimaginalscheiben sind daher deutlich kleiner als die der späten L3 Larven (vgl. mit A, A'). (D, D'') Es zeigt sich trotzdem eine wildtypische Expression von *wg* entlang der D/V. (D'', D''') *Gbe+Su(H)* offenbart ein wildtypisches Expressionsmuster, deutlich zu sehen in der Vergrößerung. (E-F') Zusätzliche Expression von CHMP4A (+ 1x *BAC^{shrub}-CHMP4A* (E, E')) oder CHMP4C (+ 1x *BAC^{shrub}-CHMP4C*, (F, F')) in den durch eine Kopie *BAC^{shrub}-CHMP4B* und zwei Kopien *lgdP-hLGD1-HA* partiell geretteten *lgd^{d7} shrub⁴⁻¹* mutanten Fliegen. Auch hier zeigen *wg* und *Gbe+Su(H)* ein wildtypisches Expressionsmuster. Zudem sind die Imaginalscheiben der späten L3 Larven aufgrund der starken Proliferation während des L3-Stadiums deutlich größer als bei nur einer Kopie *BAC^{shrub}-CHMP4B* (vgl. mit D, D'). [(A, A') aus der eigenen Masterarbeit übernommen (Masterarbeit Bäumers 2015)]. Maßstabsbalken: (A-D', E-F') 200 µm. (D'', D''') 50 µm.

Ferner konnte in dieser Arbeit bereits gezeigt werden, dass CHMP4A und CHMP4C über CHMP4B mit der restlichen ESCRT-Maschinerie in *Drosophila* funktional interagieren können (siehe 2.3.3). Sie sind in Anwesenheit eines funktionsfähigen CHMP4B-Proteins in der Lage zu einem gewissen Teil den Funktionsverlust von *shrub* zu kompensieren.

Hier stellt sich die Frage, ob CHMP4A und CHMP4C auch in Verbindung mit humanem LGD in Anwesenheit von CHMP4B in *Drosophila* aktiv sind. Diese Aktivität liegt vor, wenn der Funktionsverlust des endogenen *shrub* zumindest partiell kompensiert wird.

Zunächst stand das humane Ortholog LGD1 aufgrund seiner Ähnlichkeit zu *Drosophila* Lgd im Zentrum der Untersuchung. Ausgangspunkt für diese Analyse ist der simultane Funktionsverlust von *lgd* und *shrub* gerettet durch zwei Kopien *lgdP-hLGD1-HA* in Kombination mit einer Kopie *BAC^{shrub}-CHMP4B*. Hier erreichen die Fliegen nur vereinzelt das frühe dritte Larvenstadium (L3) (Abb. 2-37). Dies ist ein deutlicher Rückgang des Rettungsvermögens. In Anwesenheit von zwei Kopien *BAC^{shrub}-CHMP4B* können noch adulte Fliegen beobachtet werden (Abb. 2-37). Die Flügelimaginalscheiben dieser frühen L3-Larven sind deutlich kleiner als die von späten L3 Larven (Abb. 2-36 D-D'''). Dies ist nicht überraschend, da die Proliferation dieses einschichtigen Epithels hauptsächlich während des dritten Larvenstadiums stattfindet, nachdem die *wg* Expression im Flügel Feld an der D/V-Grenze durch den Notch-Signalweg ab dem frühen L3 Stadium etabliert wurde (Übersicht in Klein 2001). Darüber hinaus ist die Expression von *wg* bei

der Rettung des *lgd^{d7} shrub⁴⁻¹* mutanten Hintergrundes wie im Wildtyp auf einen schmalen Streifen entlang der D/V-Grenze beschränkt (Abb. 2-36 D, D''). Zudem offenbart auch das sensitivere Notch-Reportergenkonstrukt keine ektopische Aktivierung des Notch-Signalweges (Abb. 2-36 D', D''').

Bereits bei einer zusätzlichen Expression von einer Kopie *BAC^{shrub}-CHMP4A* im *lgd^{d7} shrub⁴⁻¹* mutanten Hintergrund zusammen mit hLGD1 und CHMP4B erreichen die Fliegen vereinzelt das frühe Puppenstadium (Genotyp: *lgd^{d7} shrub⁴⁻¹; 2x lgdP-hLGD1-HA, 1x BAC^{shrub}-CHMP4B/ 1x BAC^{shrub}-CHMP4A*). Sie kommen damit in ihrer Entwicklung weiter als Fliegen ohne CHMP4A-Expression (Abb. 2-37). Ein Blick auf die Flügelimaginalscheiben des dritten Larvenstadiums zeigt ein wildtypisches Expressionsmuster des Notch-Zielgens *wg* und des Notch-Reportergenkonstrukts *Gbe+Su(H)* (Abb. 2-36 E, E'). Im Fall einer zusätzlichen Expression von *BAC^{shrub}-CHMP4C*, entwickeln sich einige Fliegen zu *pharate adults* und sterben nicht im frühen dritten Larvenstadium (Abb. 2-37). Auch hier zeigt sich keine ektopische Aktivierung des Notch-Signalweges wie sie charakteristisch für einen Funktionsverlust von *lgd* oder *shrub* wäre (Abb. 2-36 F, F').

Folglich zeigen die beiden Orthologe, CHMP4A und CHMP4C, auch in Anwesenheit von humanen LGD1 ein Rettungsvermögen, sobald CHMP4B exprimiert wird. Sie scheinen über CHMP4B mit der ESCRT-Maschinerie in *Drosophila* funktional interagieren zu können. Dies ist ein weiterer Hinweis auf Heteropolymere zwischen CHMP4-Proteinen in einem Organismus und zwar in Anwesenheit von hLGD1.

Als nächstes wurde hLGD2 und sein Einfluss auf die CHMP4-Proteine untersucht. Hierfür wurde das Rettungsvermögen von CHMP4C zusammen mit hLGD2 in Anwesenheit von CHMP4B gegenüber dem simultanen Funktionsverlust von *lgd* und *shrub* analysiert.

Ausgangspunkt ist der simultane Funktionsverlust von *lgd* und *shrub* gerettet durch zwei Kopien *lgdP-hLGD2-HA* zusammen mit einer Kopie *BAC^{shrub}-CHMP4B*. Hier zeigt sich keine offensichtliche Rettung. Die Larven sterben vor dem späten zweiten bzw. frühen dritten Larvenstadium. Auch bei hLGD2 verschlechtert sich also das Rettungsvermögen gegenüber dem *lgd^{d7} shrub⁴⁻¹* mutanten Phänotyp dramatisch, sobald nur noch eine Kopie *BAC^{shrub}-CHMP4B* exprimiert wird (Abb. 2-37). Entscheidend ist, dass eine zusätzliche Expression von *BAC^{shrub}-CHMP4C* keinerlei positiven Effekt auf die Entwicklung der Fliegen in diesem Versuchsaufbau hat. Sie sterben weiterhin vor dem späten L2 bzw. frühen L3 (Abb. 2-37).

Dieses Ergebnis legt nahe, dass CHMP4C in Gegenwart von hLGD2 trotz CHMP4B-Expression in *Drosophila* nicht funktional ist. Im Gegensatz dazu zeigt CHMP4C in Anwesenheit von Lgd oder hLGD1 ein deutliches Rettungsvermögen, sobald es zusammen mit CHMP4B exprimiert wird. Allerdings lässt sich nicht auszuschließen, dass unter den vorliegenden Bedingungen ein mögliches Rettungsvermögen von CHMP4C in Anwesenheit von hLGD2 zu schwach ist, um detektiert zu werden.

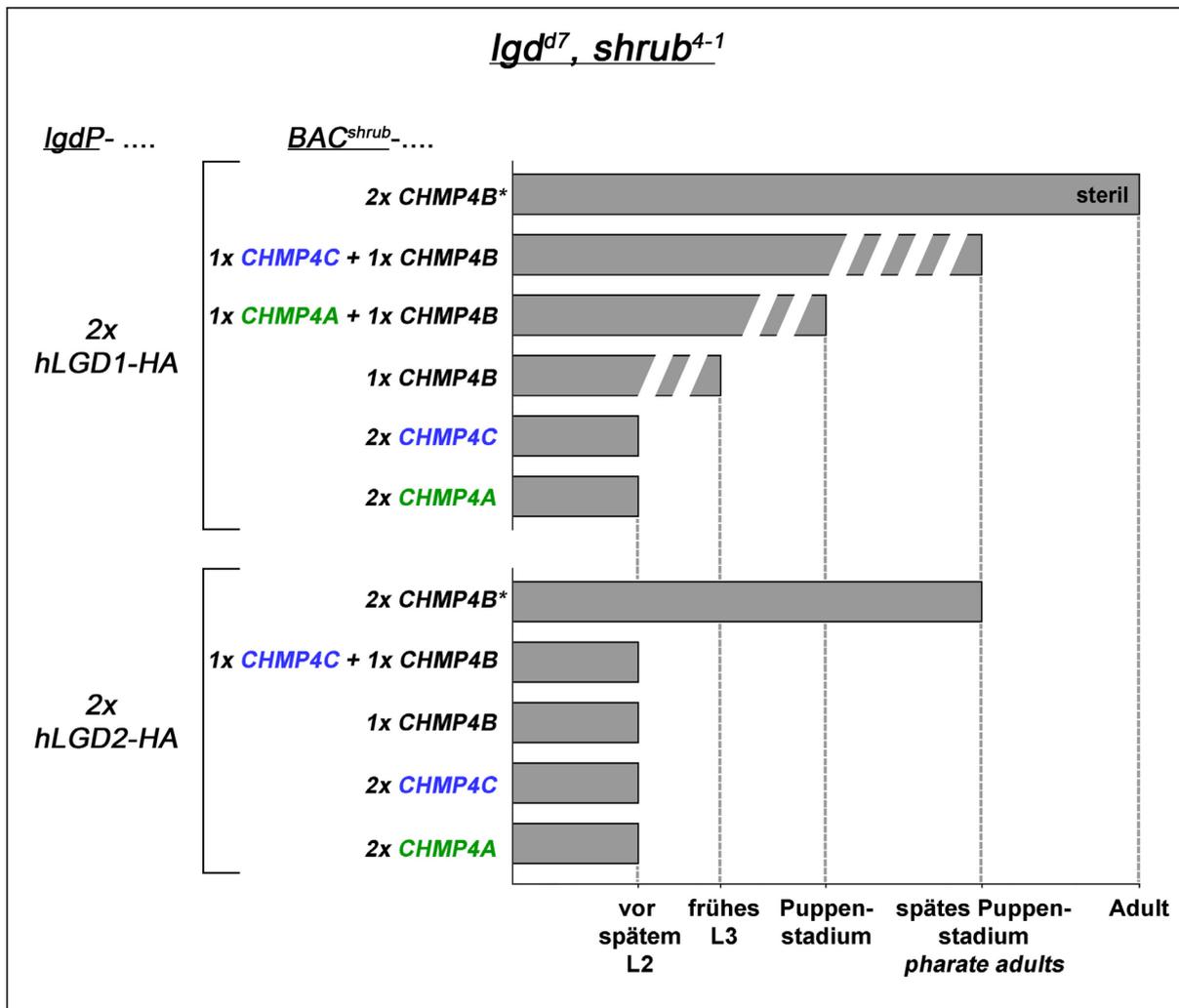


Abb. 2-37: Graphische Übersicht über das Rettungsvermögen der humanen CHMP4- und LGD-Proteine gegenüber dem *lgd^{d7} shrub⁴⁻¹* mutanten Phänotyp. CHMP4B hebt in Kombination mit hLGD1 oder hLGD2 den Funktionsverlust von *lgd* und *shrub* auf, jedoch unterschiedlich stark. Im Gegensatz dazu zeigen CHMP4A und CHMP4C trotz der humanen Orthologe LGD1 und LGD2 keinerlei offensichtliches Rettungsvermögen gegenüber dem *lgd^{d7} shrub⁴⁻¹* mutanten Phänotyp. Nur in Anwesenheit von CHMP4B und hLGD1 offenbart sich ein leichtes Rettungsvermögen der beiden Shrub-Orthologe. Sie scheinen dabei über CHMP4B funktional mit der ESCRT-Maschinerie in *Drosophila* interagieren zu können. Dies äußert sich in

einem positiven Effekt auf die Entwicklung der Fliegen. In Gegenwart von hLGD2 zeigt zumindest CHMP4C trotz CHMP4B kein Rettungsvermögen.

2.4 Funktionsanalyse des Shrub-Orthologs Snf7 aus *Saccharomyces cerevisiae*

Die Homopolymerisation von Snf7, dem Shrub-Ortholog aus *S. cerevisiae*, beruht nicht wie die von Shrub auf elektrostatischen Wechselwirkungen (McMillan et al. 2016), sondern vorrangig auf hydrophoben Interaktionen (Tang et al. 2015) (siehe 1.4).

Möglicherweise kann Snf7 dennoch Shrub in *Drosophila* ersetzen, indem es funktional mit dem Rest der ESCRT-Maschinerie interagiert.

In einem ersten Experiment wurde daher das Rettungsvermögen von Snf7 gegenüber der *shrub*⁴⁻¹ mutanten Situation analysiert. Für eine endogene Expression von Snf7 auf dem physiologischen Level von Shrub wurde auch hier auf das *BAC*^{*shrub*}-Expressionssystem zurückgegriffen (siehe 2.1). Dafür wurde die Transkriptionseinheit von *shrub* zwischen Start und Stopp-Codon (CDS (Coding Sequence) plus Introns) in *BAC*^{*shrub*} durch die cDNA des Hefe-Orthologs Snf7 ersetzt (*BAC*^{*shrub*}-*snf7*) (Masterarbeit Bäumers 2015). Eine Western Blot-Analyse bestätigt, dass Snf7 mit Hilfe dieses BACs in *Drosophila* exprimiert wird (Abb. 2-38 G). Dennoch zeigt sich bei einer Expression von zwei Kopien *BAC*^{*shrub*}-*snf7*, im Gegensatz zu der von *BAC*^{*shrub*}-*cDNA* (siehe 2.2.5, Abb. 2-13 C, C'), keinerlei erkennbares Rettungsvermögen gegenüber dem Funktionsverlust von *shrub* (Abb. 2-38 C, H). Die Fliegen sterben vor dem späten zweiten bzw. frühen dritten Larvenstadium. Sie entwickeln sich nicht wie bei der Expression von einer Kopie *BAC*^{*shrub*}-*cDNA* zu fertilen adulten Fliegen (siehe 2.3.1, Abb. 2-18). Folglich ist *Snf7* in *Drosophila* nicht funktional und kann daher nicht die Shrub-Funktion übernehmen.

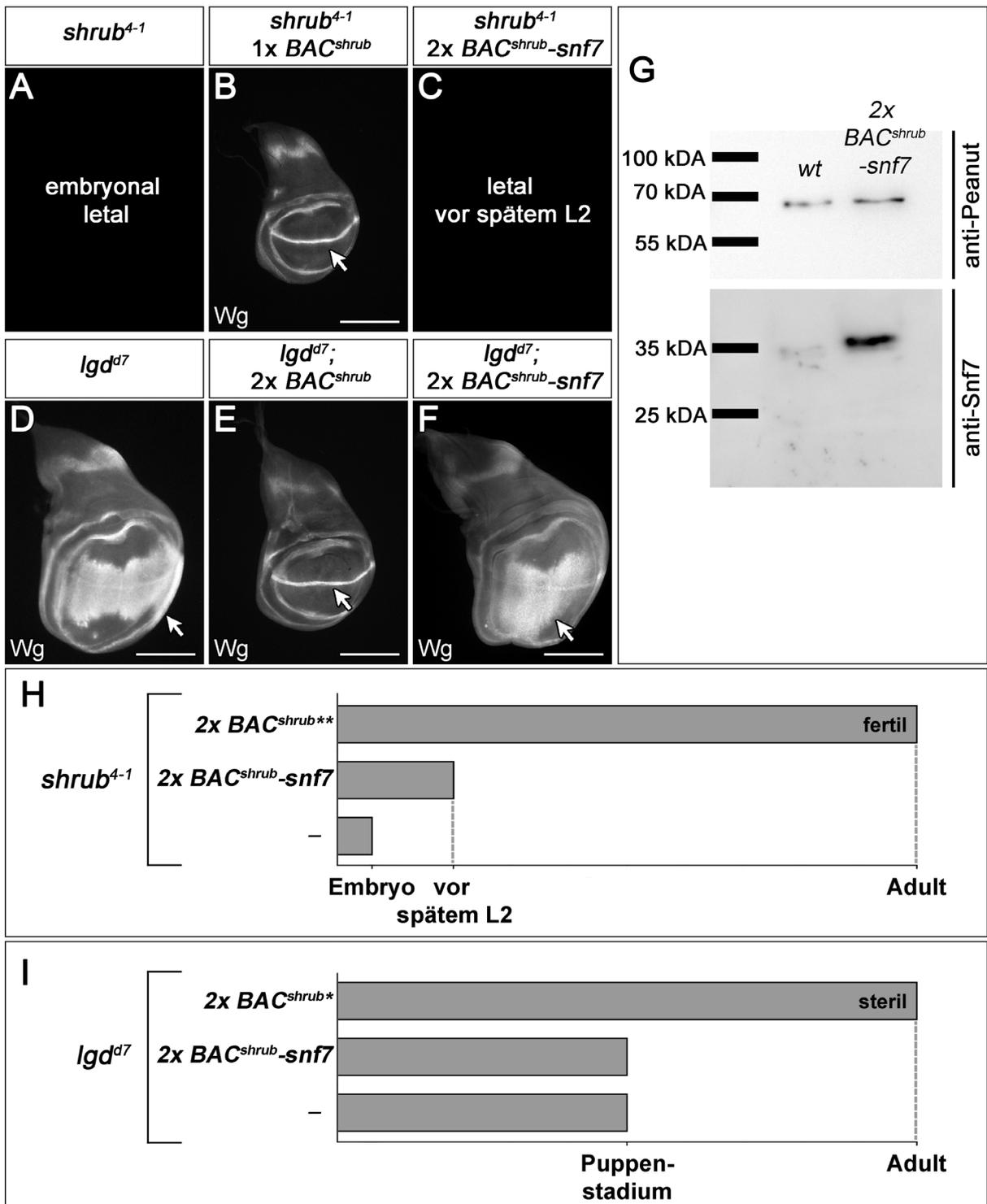


Abb. 2-38: Snf7, das Shrub-Ortholog aus *Saccharomyces cerevisiae*, ist in *Drosophila melanogaster* nicht funktional. (A-C, H) Rettungsvermögen von Snf7 gegenüber dem *shrub*⁴⁻¹ mutanten Phänotyp. (B, H) Eine Expression von einer Kopie *BAC*^{*shrub*} reicht aus, um den *shrub*⁴⁻¹ mutanten Phänotyp vollständig zu retten. Die embryonale Letalität bei einem Funktionsverlust von *shrub* (Sweeney et al. 2006) ist aufgehoben. Es entwickeln sich fertile adulte Fliegen. Es zeigt sich eine wildtypische Expression von Wg (B, Pfeil) und somit eine wildtypische Notch-Aktivität in der Flügelimaginalscheibe. (C, H) Im Gegensatz dazu, ist keinerlei Rettungsvermögen bei einer Expression von zwei Kopien *BAC*^{*shrub-snf7*} erkennbar. Die Fliegen

sterben vor dem späten zweiten Larvenstadium (L2). Eine weitere Eingrenzung der Entwicklung auf Stadien vor dem späten L2 ist aufgrund des verwendeten Markers (*Tubby*) in diesem Versuchsaufbau nicht möglich. (D-F, I) Rettung des *lgd^{d7}* mutanten Hintergrundes durch Expression von *BAC^{shrub}* oder *BAC^{shrub-snf7}*: (D) Charakteristisch für den Funktionsverlust von *lgd* ist die ektopische Aktivierung des Notch-Signalweges, hier anhand der verbreiterten Expressionsdomäne des Notch-Zielgens *wg* zu sehen (Pfeil). (I) Die Fliegen sterben aufgrund des Verlusts von *lgd* im frühen Puppenstadium. (E, I) Rettung des *lgd^{d7}* mutanten Phänotyps durch die Expression von zwei zusätzlichen Kopien des endogenen Genlocus von *shrub* (*BAC^{shrub}*). (E) Die ektopische Aktivierung ist hier aufgehoben und (I) die *lgd^{d7}* mutanten Fliegen entwickeln sich zu sterilen adulten Tieren. (F, I) Eine Expression von zwei zusätzlichen Kopien *BAC^{shrub-snf7}* hat keinen positiven Effekt auf den *lgd^{d7}* mutanten Phänotyp. (I) Die Fliegen sterben unverändert im frühen Puppenstadium. (F) Die ektopische Aktivierung des Notch-Signalweges in den *lgd^{d7}* mutanten Imaginalscheiben scheint sogar marginal verstärkt zu sein. Hier reicht die *Wg*-Expression bis an den Rand der Imaginalscheibe (vgl. mit D). (G) Nachweis der Expression von *Snf7* (*BAC^{shrub-Snf7}*) mit Hilfe einer Western Blot-Analyse. Im Vergleich zum Wildtyp (wt) ist eine distinkte Bande auf der zu erwartenden Höhe erkennbar. Als Ladekontrolle dient das Haushaltsprotein Peanut. [B, D und E aus der eigenen Masterarbeit übernommen (Masterarbeit Bäumers 2015)]. Bereits veröffentlichte Daten: ** (Diplomarbeit Bohnen 2014), * (Masterarbeit Bäumers 2015). Maßstabsbalken: 200 µm.

Snf7 kann den Ausfall von *shrub* nicht kompensieren. Um zu überprüfen, ob das Hefe-Ortholog möglicherweise in Anwesenheit von endogenem *Shrub* funktionsfähig ist, wurde es im *lgd^{d7}* mutanten Hintergrund exprimiert. Denn eine Erhöhung des *Shrub*-Protein-Levels rettet den Funktionsverlust von *lgd* (siehe 2.2.1 und (Masterarbeit Bäumers 2015)).

Es zeigt sich bei einer Expression von zwei Kopien *BAC^{shrub-snf7}* keinerlei Rettungsvermögen gegenüber dem *lgd^{d7}* mutanten Phänotyp. Im Gegenteil, wenn überhaupt scheint sich die ektopische Aktivierung von *wg* in den *lgd^{d7}* mutanten Imaginalscheiben sogar zu verstärken. Die Expressionsdomäne reicht hier bis zum Rand der Imaginalscheibe (Abb. 2-38 F, Pfeil). Trotzdem sterben die Fliegen wie für *lgd* charakteristisch während des frühen Puppenstadiums. Dies spricht für eine fehlende funktionale Interaktion von *Snf7* mit *Shrub* und dem Rest der ESCRT-Maschinerie in *Drosophila*. Demnach ist *Snf7* auch in Anwesenheit von endogenem *Shrub* in *Drosophila* nicht funktional.

2.5 DChmp7 und seine mögliche Funktion im endosomalen Transportweg

DChmp7 ist unter den CHMP-Proteinen des ESCRT-III Komplexes einzigartig, da es ca. doppelt so groß wie die anderen CHMP-Proteine ist. Dabei scheint es durch eine Duplikation des Vorfahren von Snf7 entstanden und rasch evolviert zu sein (Horii et al. 2006). Da die ESCRT-Maschinerie entscheidend für die MVB-Biogenese während des endosomalen Abbaus von Transmembranproteinen ist und sie dort auch zuerst entdeckt wurde (Raymond et al. 1992, Odorizzi et al. 1998, Katzmann et al. 2001), stellt sich hier die Frage, ob DChmp7 auch eine Rolle im endosomalen Transportweg spielt.

In einem ersten Schritt wurde daher mit Hilfe des Gal4/UAS-Systems HA-DChmp7 exprimiert. Trotz konstitutiver Expression mit *hhGal4* (29 °C) sind adulte Fliegen zu beobachten. Als Marker für reife Endosomen wurde Rab7-YFP verwendet (*tub-rab7-YFP*) (Marois et al. 2006). Hierbei zeigt sich aufgrund der Expression von HA-DChmp7 eine Vergrößerung der Endosomen. Zudem scheint ihre Anzahl erhöht (Abb. 2-39 B, C, F, G). Zusätzlich kolokalisiert HA-DChmp7 mit einem Teil dieser vergrößerten Rab7- und/oder Notch-positiven Endosomen (Abb. 2-39 E-H'). Dies könnte ein Hinweis auf eine Funktion im endosomalen Transportweg sein.

Da eine Überexpression von HA-DChmp7 den endosomalen Transport von Notch zu stören scheint (Abb. 2-39), stellt sich Frage, ob es zu einer ektopischen Aktivierung des Notch-Signalweges aufgrund eines Abbaufekts kommt. Hierbei zeigt sich allerdings, weder bei einer konstitutiven Expression (25 °C), noch bei einer Expression für 48 h auf 29 °C, ein Effekt auf den Notch-Signalweg in der Flügelimaginalscheibe des dritten Larvenstadiums (Anhang, Abb. 9-5). Dies impliziert, dass die Aktivität des Notch-Signalweges durch eine Überexpression von HA-DChmp7 nicht verändert wird. Interessanterweise, zeigt sich bei einer Überexpression von HA-DChmp7, während der Mitose von Zellen der apikal gelegenen Peripodialmembran der Flügelimaginalscheibe, eine Relokalisierung von HA-DChmp7 gegenüber den Zellen in der Interphase (Anhang, Abb. 9-6).

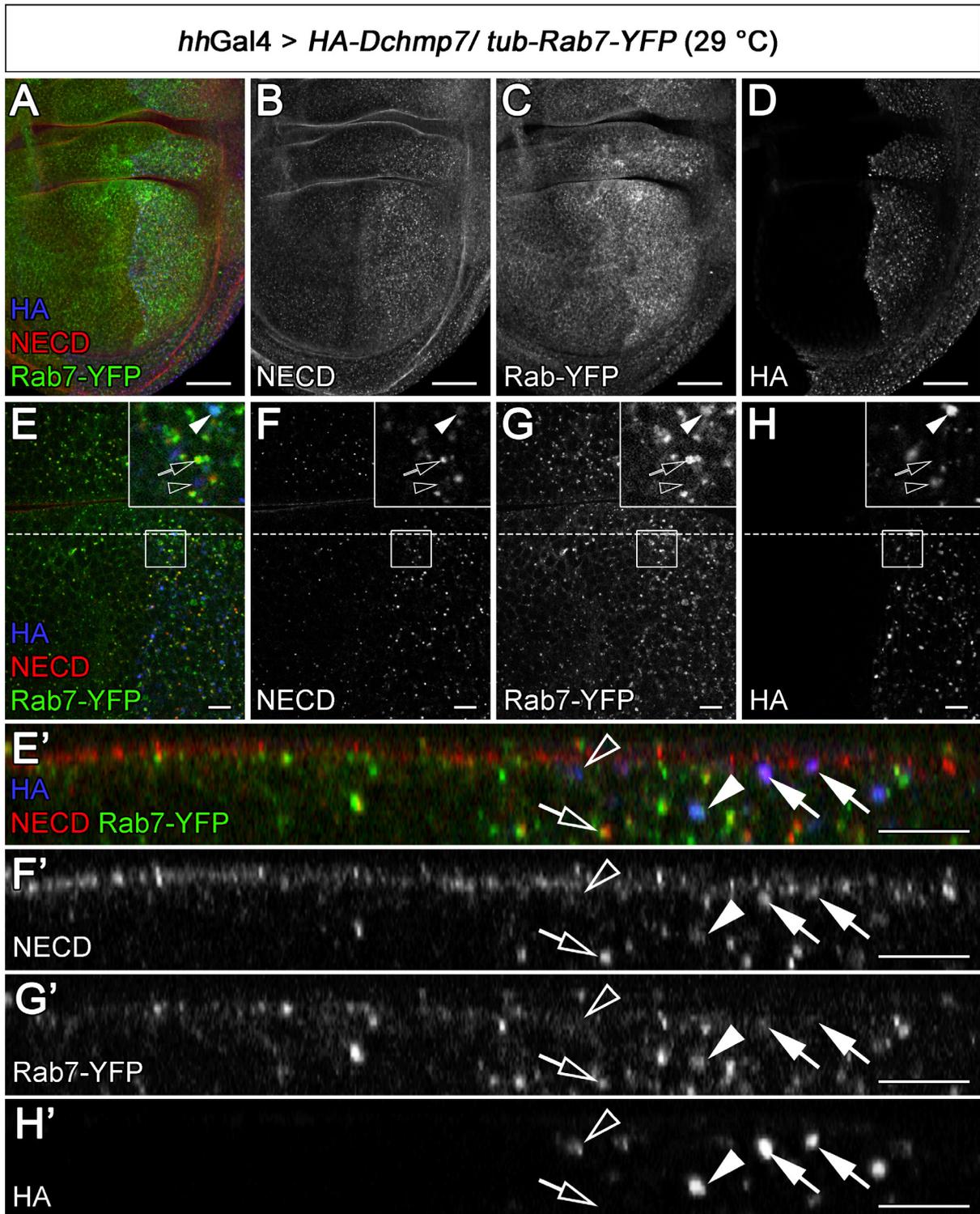


Abb. 2-39: Überexpression von HA-DChmp7 führt zu vergrößerten Endosomen. (A-H') Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Konsequenzen einer Überexpression von HA-DChmp7 auf den endosomalen Transportweg. Hierfür wurde eine Antikörperfärbung gegen die extrazelluläre Domäne von Notch (NECD) durchgeführt und als Marker für späte Endosomen Rab7-YFP (*tub-rab7-YFP*) verwendet (Marois et al. 2006). Eine auf das posteriore Kompartiment begrenzte, konstitutive Expression (29 °C) von HA-DChmp7 wird durch die Gal4-Treiberlinie *hhGal4* erreicht (siehe D, H). Die Überexpression von HA-DChmp7 führt zu vergrößerten Endosomen. HA-DChmp7 kolokalisiert dabei teilweise mit Notch- und Rab7-positiven

Endosomen (E-H', ausgefüllter Pfeilkopf). Dabei finden sich auch Endosomen, die nicht HA-DChmp7-positiv sind, sondern nur Notch- und Rab7-positiv (E-H', Pfeil, nur Kontur), oder auch apikale Endosomen, die distinkt Notch und HA-DChmp7-positiv sind, jedoch nicht eindeutig Rab7 (E'-H', ausgefüllte Pfeile). Jedoch gibt es auch HA-DChmp7-positiv Strukturen, die weder eindeutig Notch noch Rab7-positiv sind (E-H, Pfeilkopf, nur Kontur). Maßstabsbalken: (A-D) 50 µm; (E-H') 10 µm.

Um auch den Funktionsverlust von *Dchmp7* in *Drosophila* analysieren zu können, wurden durch CRISPR/Cas9 induziertes „*non-homologous end joining*“ (NHEJ) *Dchmp7*-mutante Allele erzeugt (Abb. 2-40) (siehe 6.6.7). Da der Genlocus von *Dchmp7* sehr nah am Centromer liegt, wurden die Allele für eine nachfolgende klonale Analyse direkt auf dem FRT-Chromosom (FRT2A, flybase ID: FBti0002046 (Golic und Lindquist 1989)) generiert. Eine zeitaufwendige und in diesem Fall schwierige meiotische Rekombination aller generierten Allele mit einer FRT-Erkennungssequenz ließ sich somit vermeiden.

Die Genom-Editierung mittels CRISPR/Cas9 wurde zweimal unabhängig voneinander durchgeführt. Hierbei wurde auf zwei verschiedene *single guide* RNAs (sgRNA) zurückgegriffen (Abb. 2-40). Dadurch konnte bei den anschließenden Experimenten die Wahrscheinlichkeit einer Fehlinterpretation durch potenzielle Hintergrundmutationen (*off-targets*) minimiert werden. Es konnte eine Vielzahl unterschiedlicher Allele generiert werden, die mit hoher Wahrscheinlichkeit Null-Allele sind. Eine Sequenzierung ihres jeweiligen *Dchmp7* Genlocus, zeigt bei allen Allelen eine Leserasterverschiebung aufgrund einer Deletion oder Insertion von einer bis zu fünf Basenpaaren. Diese führt in allen Fällen zu einem vorzeitigen Translationsabbruch (Stopp-Codon) (Abb. 2-40).

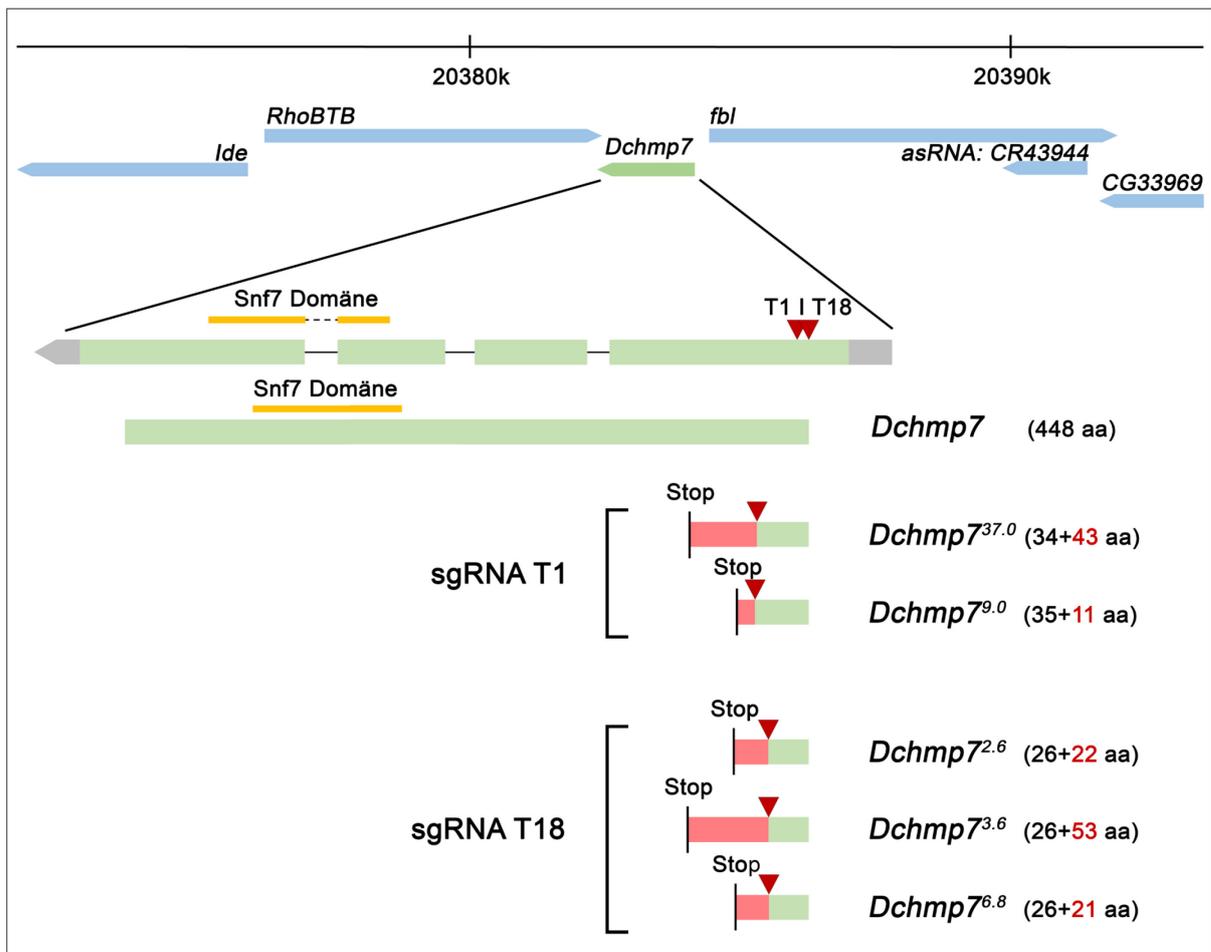


Abb. 2-40: Graphische Übersicht über die mit Hilfe von CRISPR/Cas9 generierten *Dchmp7*-Allele.

Darstellung der genomischen Region von *Dchmp7* (CG5498), Vergrößerung der Transkriptionseinheit von *DChmp7* und Skizzierung des DChmp7-Proteins (448 aa). Eingezeichnet ist zudem die Snf7-Domäne (gelb, CDD [(Conserved Domain Database) accession number cI21588]). Beim Transkript von *Dchmp7* sind die vier Exons durch grüne Kästchen, die drei Introns durch schwarze Linien und die 5' und 3' UTR durch graue Kästchen dargestellt. Zweimal unabhängig voneinander wurde eine Vielzahl von *Dchmp7*-Allelen durch Genom-Editierung mittels CRISPR/Cas9 generiert (unabhängige CRISPR/Cas9-Ereignisse). Dabei basiert ein Teil der Allele auf der *single guide* RNA (sgRNA) T1 und ein anderer Teil auf der sgRNA T18. Die roten Dreiecke oberhalb von *Dchmp7* symbolisieren, die Position der jeweiligen Zielsequenz der beiden sgRNAs. Bei den Allelen zeigen sie die Position der Basenpaar-Insertion oder -Deletion an. Ab dieser Position ändert sich aufgrund einer Leserasterverschiebung die Aminosäuresequenz bei der Translation (rotes Kästchen). *Dchmp7^{37.0}* und *Dchmp7^{9.0}* gehen auf T1 zurück und *Dchmp7^{2.6}*, *Dchmp7^{3.6}* sowie *Dchmp7^{6.8}* basieren auf der sgRNA T18. Bei allen Allelen kommt es aufgrund einer Leserasterverschiebung zu einem vorzeitigen Translationsabbruch. Hinter den Allelen ist die jeweilige Aminosäureposition in schwarz angegeben, nach der es zu einer Deletion oder Insertion von Basenpaaren gekommen ist. In rot markiert sind die nachfolgenden und somit von der Sequenz abweichenden Aminosäuren bis zum Translationsabbruch. Bei T1 kam es zu einer Deletion von jeweils fünf (*Dchmp7^{37.0}*) oder vier (*Dchmp7^{9.0}*) Basenpaaren. Bei T18 erfolgte im Fall von *Dchmp7^{6.8}* eine Deletion von einem Basenpaar. *Dchmp7^{2.6}* und *Dchmp7^{3.6}* gehen auf eine Insertion von 2 bp (*Dchmp7^{2.6}*) oder 1 bp (*Dchmp7^{3.6}*) zurück.

Erstaunlicherweise sind *Dchmp7* null-mutante Fliegen überlebensfähig, fertil und zeigen keine offensichtlichen Musterbildungsdefekte (18°C und 25°C). Eine klonale Analyse zeigt zudem keinen erkennbaren Defekt im endosomalen Transportweg (Anhang, Abb. 9-7). Es offenbart sich auch keine ligandenunabhängige ektopische Aktivierung des Notch-Signalweges (Anhang, Abb. 9-8), wie sie bei einem Funktionsverlust von ESCRT-I bis -III aber auch von *Dchmp5*, einem weiteren assoziierten ESCRT-III Protein, auftritt (Thompson et al. 2005, Vaccari et al. 2008, Vaccari et al. 2009, Bäumers et al. 2019).

Ein Störung der ESCRT-Funktion führt zudem auch zu einer Deregulierung von anderen Signalwegen wie dem Dpp/BMP-Signalweg (Moberg et al. 2005, Thompson et al. 2005, Vaccari und Bilder 2005, Vaccari et al. 2009) (siehe 1.4). Unter anderem kommt es aufgrund des Funktionsverlust der ESCRT-Maschinerie während der Oogenese in *Drosophila* zu einer ektopischen Aktivierung dieses Signalweges. Sie führt in den Keimzellen zu einer zusätzlichen Teilungsrunde, sodass die betroffenen Eikammern 32 statt 16 Keimzellen aufweisen (Morawa et al. 2015). Daher kann die Anzahl der Keimzellen in den Eikammern als Indikator für eine ektopische Aktivierung des Dpp/BMP-Signalweges verwendet werden. So weisen Eikammern von *shrub⁴⁻¹* heterozygoten Weibchen in 29 % der Fälle 32 statt der 16 Keimzellen auf (Morawa et al. 2015). Eine Analyse von *Dchmp7* mutanten weiblichen Fliegen zeigt jedoch keinerlei Verdopplung der Keimzellen in den Eikammern (*Dchmp7^{37.0}*, Eikammern: n=47) (Anhang, Abb. 9-8 B, B'). Dies spricht gegen eine ektopische Aktivierung des Dpp/BMP-Signalweges bei einem Funktionsverlust von *Dchmp7* während der Oogenese.

In der Hoffnung eine genetische Interaktion von *Dchmp7* mit den Kernkomponenten der ESCRT-Maschinerie aufzudecken, wurde im *Dchmp7* mutanten Hintergrund jeweils eine Kopie eines der Gene von ESCRT-0, -II oder -III entfernt. Hierbei offenbart sich weder eine genetische Interaktion von *Dchmp7* mit *hrs* [ESCRT-0 (*hrs^{D28}/+*)], *vps25* [ESCRT-II (*vps25^{Pb2931}/+*)] oder *shrub* [ESCRT-III (*shrub⁴⁻¹/+*)]. Die Fliegen sind in allen drei Fällen weiterhin vital und zeigen keinerlei erkennbare äußerliche Defekte.

Bereits 2011 wurde in einem genetischen Screen in *Drosophila* eine Defizienz isoliert, die einen Genlocus einschließt der funktional mit dem Tumorsuppressor Lgd interagiert (Bachelorarbeit Brüser 2011). Diese Defizienz umfasst u.a. den Genlocus von *Dchmp7*

(CG5498). Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit die genetische Interaktion von *Dchmp7* und *lgd* analysiert. Hierbei zeigt sich, dass *lgd Dchmp7* mutante Fliegen deutlich früher sterben als rein *lgd* mutante Fliegen (Abb. 2-41, Anhang, Abb. 9-9). Diese verfrühte Letalität tritt auch bei der Kombination von Allelen auf, die auf unterschiedlichen sgRNA beruhen (Anhang, Abb. 9-9). Hierdurch lassen sich mögliche Hintergrundmutationen auf den Chromosomen als Ursache ausschließen.

Grundsätzlich bestätigt die verfrühte Letalität eine funktionale Beziehung zwischen den zwei Proteinen Lgd und DChmp7. Überraschenderweise zeigt sich kein Effekt bei der Vitalität der Fliegen, wenn *Dchmp7* mutante Fliegen gleichzeitig heterozygot mutant für *lgd* und *shrub* sind (Genotyp: *lgd^{d7}, shrub^{4-1/+}; Dchmp7^{9.0}/ Dchmp7^{37.0}*). Hier wäre aufgrund der Beobachtung, dass Lgd für die vollständige Aktivität von Shrub benötigt wird (siehe 2.2 und (Troost et al. 2012, Schneider et al. 2013, Masterarbeit Bäumers 2015)), ein Effekt zu erwarten gewesen.

Erstaunlicherweise hat der zusätzliche Funktionsverlust von *Dchmp7* in *lgd^{d7}* mutanten Zellen weder einen Effekt auf die ektopische Notch-Aktivierung (Abb. 2-41 F-F'') noch auf den endosomalen Phänotyp (Abb. 2-41 G-G''). Die ektopische Aktivierung ist unverändert und auch die Notch-positiven Endosomen sind weiterhin vergrößert. Dies impliziert, dass die verfrühte Letalität bei *lgd Dchmp7* mutanten Fliegen von einem Entwicklungsdefekt herrührt. Sie scheint nicht auf einer Verstärkung des endosomalen Defekts zu beruhen, der bereits in *lgd* mutanten Fliegen beobachtet wird.

Eine Überexpression von HA-Dchmp7 in *lgd^{d7}* mutanten Fliegen unterdrückt hingegen die ektopische Aktivierung des Notch Signalweges, die durch einen Defekt in der endosomalen Funktion verursacht wird (Abb. 2-41 E). Diese Entdeckung unterstützt wiederum die Annahme, dass DChmp7 in den endosomalen Transportweg involviert ist.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass es eine funktionelle Beziehung zwischen dem Tumorsuppressor Lgd und dem ESCRT-Protein DChmp7 gibt. Jedoch konnte bis hierher nur bei einer Überexpression HA-DChmp7 ein Effekt auf den endosomalen Transportweg festgestellt werden. Es ist daher weiterhin unklar, ob Lgd und DChmp7 im endosomalen Transportweg zusammen agieren.

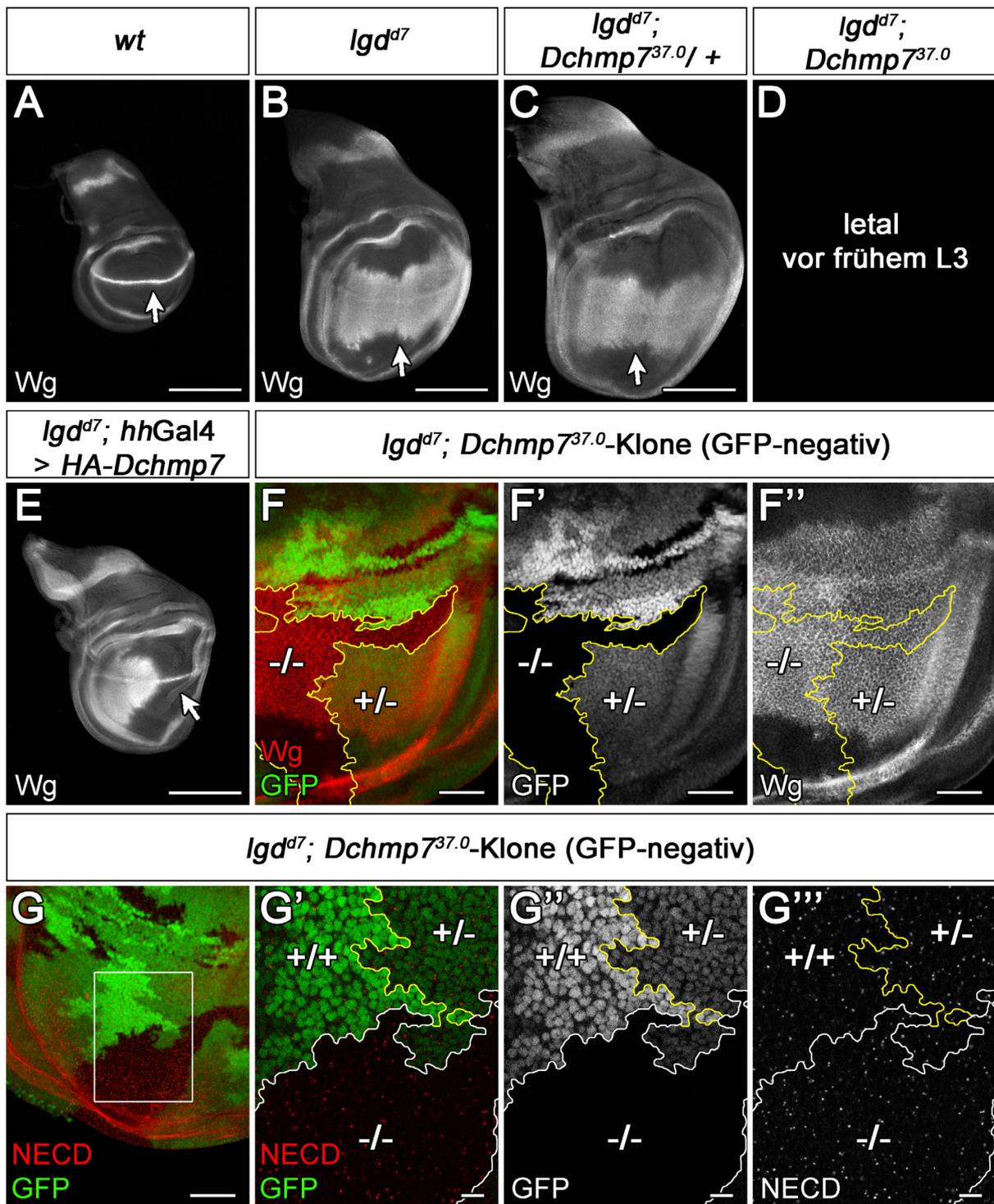


Abb. 2-41: Genetische Interaktion von *Dchmp7* und *lgd* in *Drosophila*. Fluoreszenzmikroskopische Analyse der funktionalen Beziehung zwischen der assoziierten ESCRT-III Komponente *DChmp7* und dem Tumorsuppressor *Lgd*. (A-F'') Eine Analyse der Notch-Aktivität in den Flügelimaginalscheiben erfolgt durch eine Antikörperfärbung gegen *Wg*. (A) Aufnahme einer wildtypischen Imaginalscheibe. Die Notch-abhängige Expression von *Wg* ist auf die D/V-Grenze beschränkt (A, Pfeil). (B) Bei einem Funktionsverlust von *lgd* kommt es zu einer Verbreiterung der Notch-abhängigen Expressionsdomäne von *Wg* an dieser D/V-Grenze (B, Pfeil). (C) Es zeigt sich kein Effekt auf die ektoische Aktivierung in *lgd^{d7}* mutanten Zellen bei zusätzlicher Heterozygose von *Dchmp7^{37.0}*. Die ektoische Aktivierung von *wg* ist gegenüber der bei einem

Funktionsverlust von *lgd* (*lgd^{d7}*) unverändert und die Flügelimaginalscheibe ist weiterhin überproliferiert (vgl. C mit B). (D) *lgd^{d7} Dchmp^{737.0}* mutante Fliegen sterben bereits vor dem dritten Larvenstadium (L3) und damit früher als *lgd^{d7}* mutante Fliegen, die noch das frühe Puppenstadium erreichen (nicht gezeigt). (E) Eine konstitutive Überexpression von HA-DChmp7 mit Hilfe von *hhGAL4* (29 °C) im posterioren Kompartiment (Pfeil) unterdrückt die ektopische Aktivierung des Notch-Signalweges in *lgd^{d7}* mutanten Flügelimaginalscheiben. (F-G'') Klonale Analyse der Auswirkungen eines Funktionsverlusts von *Dchmp7* auf den endosomalen Phänotyp (G-G'') und die ektopische Aktivierung des Notch-Signalweges (F-F'') in *lgd^{d7}* mutanten Flügelimaginalscheiben. *Dchmp^{737.0}* homozygot mutante Zellklone sind durch den Verlust von GFP markiert (-/-, umrandet). Die Zwillingsklone, bei denen *Dchmp7* wildtypisch ist, zeichnen sich durch zwei Kopien GFP aus (markiert durch +/+). *Dchmp^{737.0}* heterozygote Zellen, die weiterhin die genetische Ausgangssituation für die Kloninduktion besitzen, sind durch eine Kopie GFP markiert (markiert durch +/-). (F-F'') Ein zusätzlicher Verlust von *Dchmp7* in *lgd^{d7}* mutanten Zellen hat keinen Effekt auf die ektopische Aktivierung des Notch-Signalweges. Hier zeigt sich zudem kein Unterschied zwischen der Heterozygose (+/-) und der Homozygose (-/-) von *Dchmp^{737.0}*. Das Notch-Zielgen *wg* ist weiterhin ektopisch aktiviert. (G-G'') Der endosomale Phänotyp in *lgd^{d7}* mutanten Zellen (+/+, GFP-negativ) ist weder bei einer zusätzlichen Heterozygose von *Dchmp^{737.0}* (+/-, eine Kopie GFP) noch bei einem kompletten Funktionsverlust von *Dchmp7* (-/-, GFP-negativ) verändert. Die für *lgd^{d7}*-charakteristische Vergrößerung der Endosomen bleibt weiterhin bestehen [A und B aus der eigenen Masterarbeit übernommen (Masterarbeit Bäumers 2015)]. Maßstabsbalken: (A-E) 200 µm, (F-G) 50 µm; (G'-G'') 10 µm.

3 Diskussion

3.1 Eine reduzierte Shrub-Aktivität in *lgd* mutanten Zellen beeinträchtigt wahrscheinlich die dynamische Assemblierung der ESCRT-III Polymere

Während des endosomalen Abbaus von Transmembranproteinen ist vor allem bei Rezeptoren die Trennung vom Zytoplasma entscheidend. Durch diese Trennung wird eine Signalweiterleitung terminiert und eine mögliche ektopische Aktivierung der Signalwege verhindert (Übersicht in Huotari und Helenius 2011). Sie erfolgt durch die Inkorporation der ubiquitinierten Transmembranproteine von der endosomalen Membran in ILVs und somit in das Lumen der Endosomen (Haigler et al. 1979, Katzmann et al. 2001). Bei diesem durch die ESCRT-Maschinerie vermittelten Prozess spielt die dynamische Assemblierung des ESCRT-III Polymers an der endosomalen Membran eine bedeutende Rolle (Babst et al. 2002a, Adell et al. 2017, Mierzwa et al. 2017). Hauptkomponente des ESCRT-III Polymers ist dabei Shrub (Teis et al. 2008).

Ein direkter Interaktionspartner dieser ESCRT-III Kernkomponente ist der evolutionär konservierte Tumorsuppressor Lgd (Jaekel und Klein 2006, Troost et al. 2012, McMillan et al. 2017). In *Drosophila* führt ein Funktionsverlust von *lgd* zu einer unkontrollierten ektopischen Aktivierung des Notch-Signalweges (Klein 2003). Ursache hierfür ist ein Defekt im endosomalen Abbau von Transmembranproteinen der Plasmamembran. Er tritt während der endosomalen Reifung auf und äußert sich u.a. in einem verzögerten Abbau der Transmembranproteine (Schneider et al. 2013, Dissertation Troost 2013).

Eine Voraussetzung für die ektopische Aktivierung des Notch-Signalweges in *lgd* mutanten Zellen ist, dass ein Teil der Notch-Rezeptoren während des endosomalen Abbaus nicht in ILVs inkorporiert wird. Andernfalls könnte die intrazelluläre Domäne von Notch (NICD), die als Transkriptionsfaktor fungiert, nicht ins Zytoplasma freigesetzt werden, in den Zellkern gelangen und dort Notch-Zielgene wie *wg* ektopisch aktivieren. Bereits veröffentlichte Ergebnisse, basierend auf einer Notch-Rezeptor-Variante, die simultan mit GFP und mCherry markiert wurde, unterstützen diese Annahme. Dort konnte gezeigt werden, dass eine Fraktion von Notch in *lgd^{d7}* mutanten Zellen an der endosomalen Membran verbleibt anstatt ins Lumen inkorporiert zu werden (Couturier et al. 2014).

Dies und zusätzliche Daten (siehe 1.5) bilden die Arbeitshypothese, dass in *lgd* mutanten Zellen während des endosomalen Transports, ein Teil der Notch-Rezeptoren nicht in die

ILVs inkorporiert wird und an der endosomalen Membran verbleibt. Nach der Fusion mit dem Lysosom wird die extrazelluläre Domäne dieser Notch-Rezeptoren durch die aktivierten Hydrolasen in Kombination mit dem sauren Milieu degradiert. Dadurch entstehen NEXT-ähnliche Fragmente, die durch den γ -Sekretase-Komplex erkannt und prozessiert werden können. Als Konsequenz wird die intrazelluläre Domäne dieser Notch-Rezeptoren (NICD) in das Zytoplasma freigesetzt. Es kommt zur ektopischen Aktivierung des Notch-Signalweges, die sich in der ektopischen Aktivierung der Notch-Zielgene äußert (siehe 1.5, Abb. 1-7) (Schneider et al. 2013).

Allerdings war bisher unklar, wieso eine Fraktion von Notch an der endosomalen Membran verbleibt und nicht während der ILV-Bildung, die trotz Funktionsverlust von *lgd* stattfindet, ins endosomale Lumen gelangt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte diese komplexe Frage partiell beantwortet werden. Hierfür erfolgte neben einer fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung, eine Analyse auf ultrastruktureller Ebene mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM).

3.1.1 Ein Funktionsverlust von *lgd* verursacht eine Reduktion der Shrub-Aktivität

Im Rahmen dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass bei einem Funktionsverlust von *lgd* eine reduzierte Aktivität der ESCRT-III Komponente Shrub vorliegt. Denn eine Erhöhung der Shrub-Konzentration in den Zellen rettet den *lgd* mutanten Phänotyp (siehe 2.2.1, Abb. 2-3 u. Abb. 2-4). Dies scheint spezifisch für Shrub zu sein. Denn eine Erhöhung der Konzentration der ESCRT-III Komponente Vps20 verschlechtert den *lgd* mutanten Phänotyp dramatisch (siehe 2.2.1, Abb. 2-3 u. Abb. 2-4). Vps20 ist die erste ESCRT-III Untereinheit und der Initiator für die Shrub-Polymerisation an der endosomalen Membran (Teis et al. 2008, Teis et al. 2010).

Es gibt anscheinend einen Schwellenwert an Shrub-Aktivität, der für eine einwandfreie Durchführung der ESCRT-vermittelten Prozesse (u.a. ILV-Bildung) notwendig ist. Dieser Schwellenwert kann durch Erhöhung der Shrub-Konzentration in *lgd* mutanten Zellen erreicht werden. Im Umkehrschluss scheint Lgd im Wildtyp die Netto-Aktivität des in der Zelle vorhandenen Shrub anzuheben. Zumal mit Hilfe einer klonalen Analyse in dieser Arbeit gezeigt wurde, dass das Expressionslevel von Shrub und somit die Shrub-Konzentration in *lgd* mutanten Zellen gegenüber wildtypischen Zellen unverändert ist (siehe 2.2.6, Abb. 2-17).

Zudem offenbart sich bei einer hypomorphen *shrub* mutanten Situation, die durch die partielle Rettung des *shrub*⁴⁻¹ mutanten Hintergrundes mit einer Kopie *BAC*^{*shrub*}-*CHMP4B* generiert wurde, ein Phänotyp der dem *lgd* mutanten Phänotyp ähnelt (siehe 2.2.5). Diese Ähnlichkeit spiegelt sich in einer vergleichbaren ektopischen Aktivierung des Notch-Signalweges wider (siehe 2.2.5, Abb. 2-13), zeigt sich jedoch auch auf ultrastrukturellem Level in einer Vergrößerung der Endosomen (siehe 2.2.5, Abb. 2-15 u. Abb. 2-16) und in einem ebenfalls gegenüber dem Wildtyp unveränderten ILV-Anteil (siehe 2.2.5, Abb. 2-16). Auch bleibt die epitheliale Integrität erhalten (siehe 2.2.5, Abb. 2-14), die bei einem kompletten Funktionsverlust von *shrub* oder einer stärkeren Reduktion von Shrub (siRNA) zusätzlich betroffen wäre (Vaccari et al. 2009, Hori et al. 2011, Masterarbeit Pannen 2016). Dies trennt den *lgd* mutanten Phänotyp von einem kompletten Funktionsverlust von *shrub*, mit seinem neoplastischen Phänotyp, und unterstreicht, dass Lgd zwar zur Aktivität von Shrub beiträgt, jedoch nicht absolut dafür gebraucht wird.

Hier stellt sich daher die Frage, wie Lgd die Aktivität von Shrub erhöht. Es konnte bereits gezeigt werden, dass sich die Homopolymerisation von Shrub-Monomeren und die Bindung dieser Monomere an Lgd gegenseitig ausschließen (McMillan et al. 2016, McMillan et al. 2017). Grund hierfür ist, dass die negativ geladene Polymerisationsoberfläche von Shrub nicht nur an das nächste Shrub-Monomer im Polymer bindet, sondern auch an die dritte DM14 Domäne von Lgd. Hierbei sind die Aminosäuren der negativ geladenen Polymerisationsoberfläche, die mit dem benachbarten Monomer Salzbrückenbindungen ausbilden, dieselben die auch Salzbrückenbindungen mit den basischen Aminosäuren in der dritten DM14 Domäne von Lgd ausbilden. Dementsprechend inhibiert Lgd die spontane Polymerisation einer gekürzten und aktivierten Variante von Shrub (10-143 aa) *in vitro* (McMillan et al. 2016, McMillan et al. 2017). Ein ähnliches Zusammenspiel wurde auch zwischen den humanen Lgd-Orthologen LGD/CC2D1 und dem Shrub-Ortholog CHMP4B beobachtet. Hier konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die beiden humanen Orthologe hLGD2 und hLGD1 die Polymerisation von CHMP4B verhindern und daher als negative Regulatoren der ESCRT-III Polymerisation *in vitro* fungieren (Martinelli et al. 2012, Ventimiglia et al. 2018). Zudem blockiert eine Überexpression von LGD2 die CHMP4-abhängige HIV-Knospung in Zellkultur (Usami et al. 2012).

Diese Entdeckungen sind auf den ersten Blick widersprüchlich zu den *in vivo* Daten. Denn die *in vivo* Daten zeigen, dass Lgd die Aktivität von Shrub erhöht (siehe 2.2) (Troost et al. 2012, Schneider et al. 2013). *In vitro* inhibiert Lgd/hLGD wie beschrieben jedoch die Polymerisation von Shrub/CHMP4B (Martinelli et al. 2012, Usami et al. 2012, McMillan et al. 2016, McMillan et al. 2017, Ventimiglia et al. 2018).

Eine Erklärung lässt sich hierfür in der dynamischen Assemblierung des ESCRT-III Polymers finden. Shrub scheint wie die anderen ESCRT-III Untereinheiten zwischen einer geschlossenen inaktiven Konformation und einer offenen aktiven Form, die fähig ist zu polymerisieren, zu wechseln (Lata et al. 2008b, Saksena et al. 2009, Henne et al. 2012, Shen et al. 2014, Schuh et al. 2015). Bereits veröffentlichte Ergebnisse deuten zudem an, dass Snf7, das Shrub-Ortholog aus *S. cerevisiae*, nicht nur wie zuvor allgemein angenommen im Zytoplasma in der geschlossenen Konformation vorliegt, sondern dort dynamisch zwischen geschlossener und offener Konformation wechselt (Tang et al. 2015). Zusätzlich zeigen Studien mit Vps32, dem Shrub-Ortholog aus *C. elegans*, dass Vps32 in einem dynamischen Monomer-Oligomer Gleichgewicht in Lösung vorliegt und dabei spontan ohne einen weiteren Faktor polymerisieren kann (Shen et al. 2014). All dies zusammen erhöht die Wahrscheinlichkeit einer möglichen unproduktiven Polymerisation von Shrub im Zytoplasma.

Hierzu wurden bereits zwei mögliche Szenarien publiziert (McMillan et al. 2017). In einem ersten Szenario ist, aufgrund der möglichen Gefahr das Shrub im Zytoplasma polymerisiert, vorstellbar, dass Lgd eine vorzeitige Polymerisation von Shrub im Zytoplasma verhindert, indem es an die negativ geladene Polymerisationsoberfläche von Shrub bindet. In einem zweiten Szenario, das dem Ersten nicht widerspricht, könnte Lgd Shrub zum Wirkungsort eskortieren, somit dort die Konzentration von zur Verfügung stehendem Shrub vor Ort erhöhen und eine produktive Polymerisation stimulieren bzw. unterstützen. Folglich ist bei beiden Szenarien in *lgd* mutanten Zellen die Netto-Aktivität von Shrub reduziert, obwohl sich die Proteinkonzentration von Shrub bei einem Funktionsverlust von *lgd* in der Zelle nicht ändert (siehe 2.2.6, Abb. 2-17).

Das erste Szenario wird durch die Beobachtung gestützt, dass eine Erhöhung der Shrub-Konzentration in den Zellen den Funktionsverlust von *lgd* kompensiert (siehe 2.2.1, Abb. 2-3 u. Abb. 2-4). In diesem Szenario ist ohne Lgd, der Pool an monomerem Shrub, welches für eine produktive Polymerisation an der endosomalen Membran zur Verfügung

steht, reduziert. Im Umkehrschluss ist daher vorstellbar, dass durch die Bindung von Lgd das Gleichgewicht aus monomerem Shrub und Shrub, das in nichtfunktionalen Polymeren im Zytoplasma vorliegt, in Richtung des Ersteren verschoben (Abb. 3-1, A). Ohne Lgd wären diese beiden Populationen vermutlich im Gleichgewicht, genauso wie es bei den zwei Populationen von Vps32 (Monomer-Oligomer) in Lösung beobachtet wurde (Abb. 3-1, B) (Shen et al. 2014). Durch eine Erhöhung der Shrub-Konzentration in diesen *lgd* mutanten Zellen würde sich daher der gesamte Pool an Shrub und damit beide Populationen vergrößern (Abb. 3-1, C u. D). Ab einer gewissen Konzentration von Shrub wird dann wieder der oben beschriebene Schwellenwert an notwendiger Shrub-Aktivität erreicht. Dieser Schwellenwert wird durch eine ausreichende Menge an Shrub, das für die produktive Polymerisation während der ILV-Bildung zur Verfügung steht, definiert (Abb. 3-1). Dies ist zudem im Einklang mit der Beobachtung, dass der *lgd* mutante Phänotyp durch eine schrittweise Erhöhung der Shrub-Konzentration schrittweise gerettet werden kann (Abb. 3-1, C u. D) (siehe 2.2.1, Abb. 2-3 u. Abb. 2-4) (Masterarbeit Bäumers 2015).

Eine Vollständige Rettung des *shrub* mutanten Phänotyps kann bereits durch eine Kopie des Genlocus von *shrub* (*BAC^{shrub}*) erreicht werden (siehe 2.1, Abb. 2-2) (Diplomarbeit Bohnen 2014, Masterarbeit Bäumers 2015). Im Gegensatz dazu benötigt es zwei Kopien, zusätzlich zu den bereits endogenen vorhandenen Kopien des *shrub* Genlocus (vier *shrub* Kopien im Genom), um den Funktionsverlust von *lgd* annähernd vollständig kompensieren zu können (siehe 2.2.1, Abb. 2-3 u. Abb. 2-4) (Masterarbeit Bäumers 2015). Dies unterstreicht, dass ohne endogenes Lgd eine deutlich höhere Shrub-Konzentration für die vollständige Funktionalität der ESCRT-Maschinerie in den Zellen benötigt wird. Hier scheint der Anteil von Shrub, der nicht für eine produktive Polymerisation zur Verfügung steht, da er in zytoplasmischen nicht-funktionale Polymeren vorliegt, ausgeglichen bzw. kompensiert werden zu müssen (Abb. 3-1).

Zu diesem ersten Szenario passt auch, dass es bei einer starken Überexpression von Lgd, wie bei einem Funktionsverlust von *lgd*, zur ektopischen Aktivierung des Notch-Signalweges in *Drosophila* kommt (Gallagher und Knoblich 2006, Jaekel und Klein 2006). Vermutlich liegt in dieser Situation Shrub verstärkt gebunden an Lgd vor und steht daher auch nicht für eine produktive Polymerisation am Wirkungsort zur Verfügung.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten in *lgd* mutanten Zellen jedoch keine Shrub-Aggregate bzw. -Akkumulationen, wie sie bei einer vorzeitigen Polymerisation von Shrub im

Zytoplasma (Szenario 1) zu erwarten wären, beobachtet werden (siehe 2.2.6, Abb. 2-17). Hierfür lassen sich zwei Erklärungen finden. Einerseits könnten mögliche Aggregate von der Zelle zu schnell abgebaut werden. Andererseits könnten diese Akkumulationen zu klein sein, um bei einer Antikörperfärbung gegen Shrub als solche identifiziert zu werden. Um Beweise für diese nichtfunktionale Polymerisation von Shrub in *lgd* mutanten Zellen zu finden, bietet sich die Analyse der Shrub-Lokalisation in den geretteten *lgd* mutanten Zellen an (*lgd^{d7}; BAC^{shrub}*). Zwar liegt hier eine Rettung des *lgd* mutanten Phänotyps vor, jedoch ist auch die Konzentration von Shrub erhöht und daher die Wahrscheinlichkeit höher diese Shrub-Aggregate im Zytoplasma zu detektieren (Abb. 3-1 D). Zur Detektion könnten auch die neu generierten und funktionalen Shrub-Varianten verwendet werden (siehe 2.1, Anhang, Abb. 9-1 u. Tabelle 9-1). Sie zeichnen sich durch eine N-terminale Markierung mit einem Protein-Tag wie HA, Myc oder V5 aus.

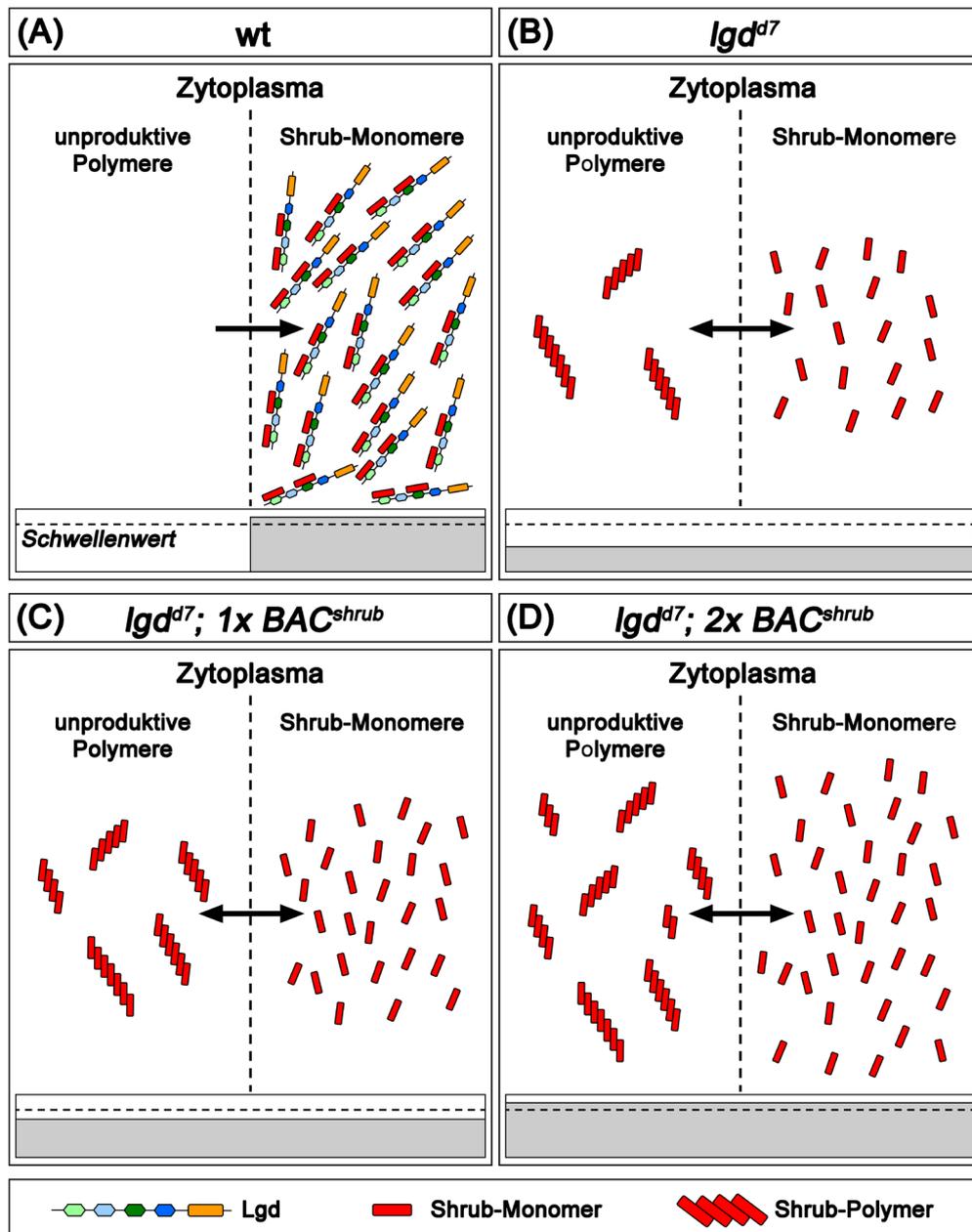


Abb. 3-1: Modell für das Zusammenspiel von Lgd und Shrub (Szenario 1). (A) Durch seine Bindung an Shrub verhindert Lgd dessen spontane, nichtfunktionale Polymerisation im Zytoplasma. Lgd bindet dabei an die saure Polymerisationsoberfläche von Shrub. In dieser Darstellung interagiert nicht nur ein Shrub-Monomer mit einem Lgd-Protein. Basierend auf neusten *in vivo* Rettungsexperimenten scheinen prinzipiell sogar zwei anstatt nur ein Shrub-Monomer an ein Lgd zu binden und zwar über die erste und dritte DM14 Domäne von Lgd (McMillan et al. 2017, Dissertation Tibbe 2019). (B) Ohne Lgd herrscht ein dynamisches Gleichgewicht zwischen monomerem Shrub und oligomerem Shrub, welches in nichtfunktionalen Polymeren im Zytoplasma vorliegt. Dadurch ist der Anteil an Shrub, welches für eine produktive Polymerisation an der endosomalen Membran zur Verfügung steht, reduziert und liegt unterhalb des notwendigen Schwellenwerts. Die Netto-Aktivität von Shrub ist in *lgd* mutanten Zellen reduziert. (C, D) Durch eine Erhöhung der Shrub-Konzentration in den *lgd* mutanten Zellen ((C) *lgd^{d7}; 1x BAC^{shrub}* und (D) *lgd^{d7}; 2x BAC^{shrub}*) vergrößern sich beide Populationen. Dabei verändert sich jedoch nichts am

Gleichgewicht. Ab einer gewissen Erhöhung der Shrub-Konzentration wird der beschriebene Schwellenwert an Netto-Aktivität, der durch eine ausreichende Menge an Shrub, das für die produktive Polymerisation zur Verfügung steht, definiert wird, erreicht. Hierbei muss der Anteil an Shrub der nicht zur Verfügung steht, da er in nichtfunktionalen Polymeren im Zytoplasma vorliegt, ausgeglichen bzw. kompensiert werden. Dies zeigt, dass ohne Lgd eine höhere Konzentration von Shrub für die vollständige Aktivität der ESCRT-Maschinerie benötigt wird.

Für das zweite Szenario spricht, dass die C2 Domäne der Lgd/CC2D1-Proteinfamilie an Phospholipide binden kann. Die erfassten Phospholipide sind u.a. für die endosomale Membran oder die Plasmamembran charakteristisch. Hier haben jedoch verschiedene Studien unterschiedliche Phospholipide identifiziert (Gallagher und Knoblich 2006, Ventimiglia et al. 2018). Außerdem bestätigen Fraktionierungsexperimente, dass Lgd/CC2D1-Proteine *in vivo* sowohl im Zytoplasma als auch membrangebunden vorliegen (Gallagher und Knoblich 2006, Drusenheimer et al. 2015). Zudem konnte im Vorfeld dieser Arbeit gezeigt werden, dass sobald die ATPase Vps4 reduziert wird, Lgd zusammen mit Shrub an der limitierenden Membran der Endosomen akkumuliert (Masterarbeit Kniebel 2016, Masterarbeit Göhrlich 2017). Denn durch die Reduktion von Vps4 mittels RNAi in den Zellen wird die ESCRT-Maschinerie aufgrund einer reduzierten Disassemblierung an der limitierenden Membran arretiert (Babst et al. 1998, Babst et al. 2002a). Ohne eine Reduktion von Vps4 ist Lgd wie Shrub gleichmäßig diffus im Zytoplasma verteilt (Childress et al. 2006, Sweeney et al. 2006). Dies spricht dafür, dass Lgd zusammen mit Shrub zwischen Zytoplasma und endosomaler Membran zirkuliert. Auch LGD2/CC2D1A, eins der zwei humanen Orthologe von Lgd, scheint zwischen endosomaler Membran und Zytoplasma zu kreisen (Drusenheimer et al. 2015).

Um jedoch einen stichhaltigen Beweis für das zweite Szenario zu finden und so nachzuweisen, dass Lgd für eine Rekrutierung von Shrub zum Wirkungsort verantwortlich ist, könnte beispielsweise eine klonale Analyse durchgeführt werden. Bei dieser sollten *lgd* mutante Zellklone bei gleichzeitiger Reduktion von Vps4 beispielsweise im posterioren Kompartiment der Flügelimaginalscheiben generiert werden. So ließe sich zeigen, ob möglicherweise eine geringere Konzentration von Shrub an der endosomalen Membran in *lgd* mutanten Zellen vorhanden ist.

Basierend auf diesen Überlegungen ist vorstellbar, dass beide Szenarien gleichzeitig zutreffen. Sie schließen sich nicht gegenseitig aus. Lgd könnte also sowohl eine vorzeitige Polymerisation von Shrub im Zytoplasma durch seine Bindung verhindern, als auch Shrub

zum Wirkungsort eskortieren, dort die Konzentration von Shrub erhöhen und eine produktive Polymerisation stimulieren. Würde es nämlich beispielsweise nur die Polymerisation von Shrub im Zytoplasma verhindern, stellt sich die Frage wie Shrub zur endosomalen Membran gelangt ohne auf dem Weg dorthin bereits zu polymerisieren.

3.1.2 Ein Defekt bei der Inkorporation der Transmembranproteine in ILVs verursacht den Verbleib von Notch an der endosomalen Membran in *lgd* mutanten Zellen

Eine reduzierte Shrub-Aktivität ist wahrscheinlich die Ursache für das Verbleiben einer Fraktion von Notch-Rezeptoren an der endosomalen Membran in *lgd* mutanten Zellen (siehe 3.1.1). Im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch ausgeschlossen werden, dass als Konsequenz dieser reduzierten Shrub-Aktivität die ILV-Bildung messbar reduziert ist (siehe 2.2.2, Abb. 2-9). Es ist kein Unterschied zwischen dem Anteil an elektronendichtem Material innerhalb der *lgd* mutanten und der wildtypischen MVBs mit Hilfe der neuentwickelten Analysetechnik (siehe 2.2.2, Abb. 2-5 und siehe 6.5) quantifizierbar und das trotz der signifikanten Vergrößerung der MVBs in *lgd* mutanten Zellen (siehe 2.2.2, vgl. Abb. 2-8 mit Abb. 2-9). Jedoch wurde bei der Quantifizierung des elektronendichten Materials innerhalb des endosomalen Lumens nicht zwischen Material direkt unterhalb der limitierenden Membran und Material im Zentrum des MVBs ohne Kontakt zur Membran unterschieden. Hier könnten natürlich Unterschiede existieren.

Trotzdem scheint insgesamt eine reduzierte ILV-Bildung nicht der Grund für den Verbleib an der endosomalen Membran zu sein. Aufschlussreich ist darüber hinaus, dass auch bei einer *shrub* hypomorphen Situation (*shrub*⁴⁻¹; 1x *BAC*^{*shrub*}-*CHMP4B*) die Endosomen vergrößert sind und die ILV-Bildung ebenfalls nicht reduziert ist (siehe 2.2.5, Abb. 2-16). Dies beweist, dass zumindest bis zu einem gewissen Grad eine Reduktion der Shrub-Aktivität nicht zwangsläufig mit einer Reduktion der ILV-Bildung einhergeht.

Folglich scheint die Inkorporation der Transmembranproteine in ILVs und die ILV-Bildung an sich wenigstens teilweise trennbar. Für die Bildung eines ILVs müssen nicht zwangsläufig alle Transmembranproteine inkorporiert werden. Umgekehrt hingegen kann ohne eine ILV-Bildung keine Inkorporation der Transmembranproteine in das endosomale Lumen erfolgen.

Die Ergebnisse deuten daher daraufhin, dass die Inkorporation der Transmembranproteine in ILVs bei einem Funktionsverlust von *lgd* gestört ist, die ILV-Bildung jedoch an sich weiterhin stattfindet. Diese Entdeckung erinnert an die kürzlich beschriebene Rolle von humanem LGD1/CC2D1B in der Koordination der ESCRT-III Polymerisation während der Wiederherstellung der Kernmembran bei der Zellteilung (Ventimiglia et al. 2018). Auch hier kommt es trotz Reduktion von LGD1 mittels RNAi schließlich zu einer Reformierung der Membran, wenn auch verzögert und mit geringen morphologischen Veränderungen.

Passend zu dem Defekt in der Inkorporation der Transmembranproteine in ILVs, konnte in dieser Arbeit eine Vergrößerung der ESCRT-invagination sites (EIS) in *lgd* mutanten Zellen beobachtet werden (siehe 2.2.4, Abb. 2-11). Hierbei zeigte sich, dass eine Vergrößerung dieser EIS ein spezifischer Effekt bei einem Funktionsverlust von *lgd* ist und nicht ein genereller Effekt, der gemeinhin mit einer Vergrößerung von MVBs einhergeht (siehe 2.2.4, vgl. Abb. 2-11 mit Abb. 2-12). Neuste Arbeiten deuten an, dass die ILV-Bildung dynamischer ist als ursprünglich angenommen (Adell et al. 2017). Es scheint eine ständige Assemblierung und Disassemblierung mehrerer Snf7/Shrub Polymere gleichzeitig stattzufinden. Dieser dynamische Prozess scheint die Transmembranproteine zu Clustern zusammenzudrängen, wobei eine Einstülpung entsteht, gefolgt von einer Verengung am Hals des neu entstehenden ILVs bis hin zu seiner Abschnürung (Adell et al. 2017). Die Vergrößerung der EIS in *lgd* mutanten Zellen könnte ein Hinweis auf eine Störung im dynamischen Prozess der ESCRT-III Polymerisation sein. Diese Störung könnte das Clustern der Transmembranproteine durch die ESCRT-III Polymere beeinflussen und dazu führen, dass einige der Transmembranproteine nicht in das entstehende ILV inkorporiert werden. Ursache für diese Störung wäre wiederum die reduzierte Shrub-Aktivität in *lgd* mutanten Zellen (siehe 3.1.1). Dabei ist zu bedenken, dass Shrub Hauptbestandteil des ESCRT-III Polymers ist (Teis et al. 2008). Eine reduzierte Shrub-Aktivität, bedingt durch eine Reduktion der Shrub-Monomere, die zeitgleich für eine produktive Polymerisation zur Verfügung stehen (siehe 3.1.1), könnte daher ohne Weiteres diesen dynamischen Prozess beeinträchtigen.

ESCRT-III Polymere scheinen generell durch das Einkreisen/Umschließen der Transmembranproteine als physikalische Barriere zu fungieren, die eine laterale Diffusion der Transmembranproteine verhindert (Teis et al. 2008, Teis et al. 2010, De Franceschi et al.

2018, Übersicht in Frankel und Audhya 2018). Ein Defekt im zeitlich perfekt aufeinander abgestimmtem Zusammenspiel bei der Assemblierung der ESCRT-III Untereinheiten könnte dazu führen, dass eine Fraktion der Transmembranproteine vom Wirkungsort wegdiffundiert und nicht in die ILVs inkorporiert wird. Vor allem unter dem Aspekt, dass die Transmembranproteine vor ihrer Inkorporation in das endosomale Lumen ubiquitiniert werden (Amerik et al. 2000, Richter et al. 2007). In diesem Moment verliert die ESCRT-Maschinerie den direkten Kontakt zu den einzelnen Transmembranproteinen und zwar bevor die ILV-Bildung abgeschlossen ist. Zudem besitzen nur Untereinheiten von ESCRT-0 bis -II Domänen mit denen sie direkt an die ubiquitinierten Transmembranproteine binden können (Bilodeau et al. 2002, Pornillos et al. 2002, Mizuno et al. 2003, Alam et al. 2004, Slagsvold et al. 2005, Hirano et al. 2006, Ren und Hurley 2010). Die ESCRT-III Untereinheiten scheinen hingegen nicht direkt mit den Transmembranproteinen zu interagieren.

Des Weiteren deuten bereits veröffentlichte Daten an, dass humanes LGD1/CC2D1B für eine zeitlich korrekte Rekrutierung der ESCRT-III Untereinheit CHMP4B zu der sich neubildenden Kernmembran während der Mitose entscheidend ist. Bei diesem Prozess scheint LGD1/CC2D1B die Polymerisierung von CHMP4B an der Kernmembran zu regulieren und zeitlich zu begrenzen (Ventimiglia et al. 2018). Diese Beobachtung unterstützt die Theorie, dass in *lgd* mutanten Zellen bei einer ILV-Bildung der dynamische Prozess der Shrub-Polymerisierung gestört ist. Zumal in beiden Fällen trotz Störung der Prozess letztendlich stattfindet. Es kommt ungeachtet des *lgd* Funktionsverlusts zur ILV-Bildung (siehe 2.2.2, Abb. 2-9) bzw. ungeachtet der Reduktion von LGD1/CC2D1B zur Reformierung der Kernmembran (Ventimiglia et al. 2018). Im Fall der Reformierung der Kernmembran gibt es zusätzlich Hinweise, dass sie verzögert stattfindet. Außerdem zeigen sich leichte Defekte in der Morphologie der Kernmembran (Ventimiglia et al. 2018). Eine Verzögerung bei der ILV-Bildung und/oder auch morphologische Veränderungen der ILVs selbst wären daher in *lgd* mutanten Zellen auch vorstellbar.

Es gibt bereits Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der Größe der ESCRT-III Filamente und der Größe der ILVs. Denn bei einer Überexpression von Snf7 in *Saccharomyces cerevisiae* entstehen längere Snf7/Shrub-Filamente, die untereinander in ihrer Gesamtlänge variieren (Teis et al. 2010). Diese führen wiederum zu einer Bildung von wenigeren aber größeren ILVs, wobei sie auch bezüglich ihrer Größe untereinander

heterogener gegenüber den wildtypischen ILVs sind (Teis et al. 2010). Im Umkehrschluss wäre also vorstellbar, dass, im Fall eines Funktionsverlusts von *lgd* aufgrund der reduzierten Shrub-Aktivität, MVBs entstehen, die sich durch kleinere aber dafür mehr ILVs auszeichnen. In diesem Szenario würde sich theoretisch der ILV-Anteil selbst nicht ändern, sondern nur die Morphologie der ILVs. Dies wäre im Einklang mit dem scheinbar gleichbleibenden ILV-Anteil in *lgd* mutanten Zellen (siehe 2.2.2, Abb. 2-9). Natürlich müsste dieses Szenario in zukünftigen Experimenten verifiziert werden.

Interessanterweise deuten die gewonnene Daten während der Mitose auch daraufhin, dass bei einer Reduktion von LGD1/CC2D1B die ESCRT-III Komponente CHMP4B zu früh zu der sich neubildenden Kernmembran gelangt (Ventimiglia et al. 2018). Diese Beobachtung widerspricht ebenfalls nicht den unter 3.1.1 beschriebenen Szenarien. Lgd könnte daher nicht nur eine unproduktive, vorzeitige Polymerisierung im Zytoplasma (Szenario 1) inhibieren und die Konzentration am Wirkungsort erhöhen, indem es Shrub dorthin eskortiert (Szenario 2), sondern dadurch auch eine zu frühe unproduktive Polymerisierung an der endosomalen Membran verhindern (Szenario 3). Zumal in *Saccharomyces cerevisiae*, wo ein Lgd-Ortholog scheinbar fehlt, gezeigt werden konnte, dass wahrscheinlich 20 % der Vps4 und ESCRT-III Rekrutierungsereignisse nicht produktiv sind und daher nicht zur ILV-Bildung führen (Adell et al. 2017).

All dies deutet zudem daraufhin, dass Lgd eine regulatorische Rolle einnimmt und nicht für die grundlegende Assemblierung des Polymers und die ESCRT-Funktion entscheidend ist. Dies wird auch durch die Tatsache unterstützt, dass die ILV-Bildung an sich weiter in *lgd* mutanten Zellen stattfindet (siehe 2.2.2, Abb. 2-9). Lgd scheint daher die Effizienz der ESCRT-Maschinerie zu erhöhen. Es ist prinzipiell vorstellbar, dass in Metazoen ein vollständiger Abbau der Rezeptoren kritischer als in einzelligen ist. In Metazoen ist es von entscheidender Bedeutung, dass Rezeptoren vom Zytosol getrennt werden, um die Signalweiterleitung zu terminieren und eine mögliche unkontrollierte Aktivierung zu verhindern (Übersicht in Huotari und Helenius 2011, Übersicht in Platta und Stenmark 2011, Übersicht in Engedal und Mills 2014). Dies könnte auch erklären, warum sich Lgd scheinbar erst in den Metazoen entwickelt hat (Jaekel und Klein 2006). Zudem ist der Wechsel von hydrophoben Interaktionen bei der Homopolymerisation des Shrub-Orthologs Snf7 in der einzelligen Hefe (Tang et al. 2015) zu elektrostatischen

Wechselwirkungen bei der von Shrub/CHMP4B in Metazoen (McMillan et al. 2016) auffällig. Durch einen solchen Wechsel könnte Lgd erst notwendig geworden sein.

Basierend auf diesen Überlegungen lässt sich folgendes Modell skizzieren (Abb. 3-2), das einen Verbleib einer Fraktion von Notch an der endosomalen Membran bei einem Funktionsverlust von *lgd* erklärt. Grundlage ist hierbei die reduzierte Aktivität der ESCRT-III Komponente Shrub in *lgd* mutanten Zellen.

Drei bereits ausführlich diskutierte Szenarien (s.o.) könnten eine reduzierte Netto-Aktivität von Shrub bei einem Funktionsverlust von *lgd* verursachen: (1) eine unproduktive Polymerisation von einer Teil-Population von Shrub im Zytoplasma, (2) eine reduzierte Rekrutierung von Shrub zur endosomalen Membran und/oder (3) eine vorzeitige unkoordinierte Polymerisation einer Teil-Population von Shrub an der endosomalen Membran. Bei allen drei Szenarien ist als Konsequenz des Funktionsverlusts von *lgd* die Shrub-Konzentration für eine produktive Polymerisation am Wirkungsort und damit für die ILV-Bildung reduziert. Dies verursacht wahrscheinlich eine Störung in der dynamischen Assemblierung und Disassemblierung der ESCRT-III Polymere während der ILV-Bildung.

Zu Beginn der ILV-Bildung binden die ersten drei Komplexe der ESCRT-Maschinerie, ESCRT-0-II, unbeeinflusst vom Funktionsverlust von *lgd*, die ubiquitinierten Transmembranproteine und konzentrieren diese auf (siehe Abb. 3-2). Die ESCRT-III Polymere, die die ubiquitinierten Transmembranproteine umschließen, fungieren auch in der *lgd* mutanten Situation als physikalische Barriere und umfassen einen Großteil der Transmembranproteine. Jedoch diffundieren wahrscheinlich einzelne der zuvor erfassten Transmembranproteine aufgrund einer unkoordinierten und beeinträchtigten Polymerisation von Shrub aus diesem Bereich. Über verschiedene ESCRT-III Untereinheiten werden direkt oder indirekt auch Deubiquitierungs-Enzyme rekrutiert. (Amerik et al. 2000, Luhtala und Odorizzi 2004, Agromayor und Martin-Serrano 2006, Kyuuma et al. 2007, Richter et al. 2013). Ein Defekt in der dynamischen ESCRT-III Polymerisation aufgrund einer reduzierten Shrub-Aktivität könnte daher das zeitliche Zusammenspiel zwischen Deubiquitinierung und vollständiger Umschließung beeinträchtigen. Eine zu frühe Deubiquitinierung einzelner Transmembranproteine könnte auch erklären, warum diese Transmembranproteine nicht bei anschließenden ILV-Bildungen erfasst werden, sondern weiter an der endosomalen Membran verbleiben. Eine Studie in *S. cerevisiae* deutet zudem daraufhin, dass ubiquitinierte

Transmembranproteine von der limitierenden Membran verschwunden sein müssen, bevor eine Fusion mit der Vakuole/ dem Lysosom stattfindet (Russell et al. 2012). Eine Deubiquitinierung könnte erklären, warum es trotz der Transmembranproteine an der limitierenden Membran zu einer Fusion mit dem Lysosom in *lgd* mutanten Zellen kommt.

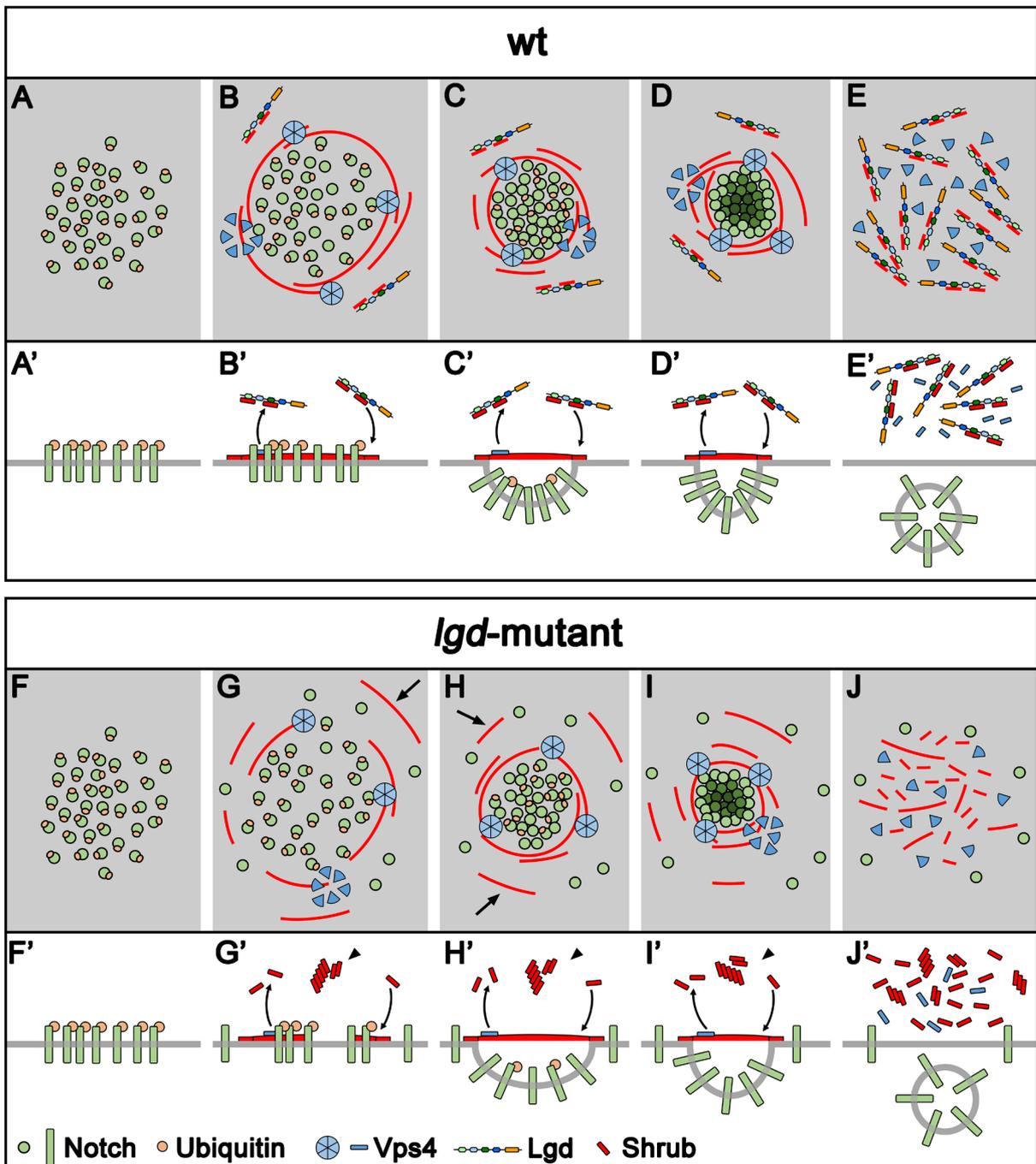


Abb. 3-2: Modell zum Verbleib von Notch an der endosomalen Membran in *lgd* mutanten Zellen. Diese Abbildung zeigt eine schematische Darstellung der verschiedenen Stufen der ILV-Bildung in wildtypischen (A-E') und *lgd* mutanten (F-J') Zellen. Hierbei ist jeweils eine Draufsicht auf die endosomale Membran und eine Seitenansicht skizziert. ESCRT-0-II (nicht gezeigt) binden an die ubiquitinierten

Transmembranproteine, konzentrieren diese auf und initiieren die rapide Assemblierung verschiedener ESCRT-III Filamente. Dabei zeigt sich in wildtypischen Zellen (A-E') eine dynamische Assemblierung und Disassemblierung der ESCRT-III Polymere während der ILV-Bildung. Mehrere Vps4-Hexamere sind während der ILV-Bildung vorhanden, wobei ihre ATPase Aktivität bereits in frühen Stadien und beim endgültigen Abschnürungsprozess benötigt wird. Durch Vps4 vermittelt, führt die ESCRT-III Filamentbewegung zu einem Zusammendrängen der Transmembranproteine, zu einer Invagination der endosomalen Membran und schließlich zur Abschnürung des ILVs (Adell et al. 2017). Während der ILV-Bildung werden die einzelnen Transmembranproteine deubiquitiniert. In wildtypischen Zellen erhöht Lgd die Konzentration von Shrub an der endosomalen Membran, indem es wahrscheinlich eine unproduktive Polymerisation von Shrub im Zytoplasma verhindert (vgl. B' mit G', H', I', siehe Pfeilkopf), (2) Shrub zum Wirkungsort eskortiert (vgl. B'-D' mit G'-I') und möglicherweise dadurch (3) auch eine vorzeitige unkoordinierte Polymerisation von Shrub verhindert (siehe G, H Pfeile). (F-J') Bei einem Funktionsverlust von *lgd* scheint der dynamische Prozess der ESCRT-Polymerisation aufgrund einer geringeren Konzentration von aktivem Shrub am Wirkungsort beeinträchtigt zu sein. Auch hier blockieren ESCRT-III Polymere die laterale Diffusion eines Großteils der Transmembranproteine. Jedoch diffundieren wahrscheinlich einzelne der zuvor erfassten bereits deubiquitinierten Transmembranproteine aufgrund einer unkoordinierten und möglicherweise verzögerten produktiven Polymerisation von Shrub aus dem Bereich der ILV-Bildung. Letztendlich findet jedoch die ILV-Bildung statt, da Lgd nicht für die grundlegende Funktionalität der ESCRT-Maschinerie benötigt wird, sondern durch eine Erhöhung der Shrub-Konzentration am Wirkungsort die produktive Polymerisation stimuliert und dadurch für eine Inkorporation aller Transmembranproteine sorgt.

Letztendlich findet die ILV-Bildung in *lgd* mutanten Zellen statt, da Lgd nicht für die grundlegende Funktionalität der ESCRT-Maschinerie benötigt wird, sondern den Prozess an sich effizienter macht. Es erhöht die Effizienz bei der Inkorporation der Transmembranproteine in ILVs.

3.1.3 Lgd und seine Interaktionspartner

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand bei der Charakterisierung der Lgd-Funktion im endosomalen Transportweg die Interaktion mit Shrub. Jedoch interagiert Lgd nicht nur direkt mit dieser ESCRT-III Schlüsselkomponente (Troost et al. 2012), sondern auch mit weiteren Mitgliedern der CHMP-Familie. So konnte eine direkte Interaktion von Lgd mit DChmp5, einem assoziierten ESCRT-III Protein, nachgewiesen werden (Dissertation Migdal 2016) (Sven Klose – AG Klein unveröffentlicht). DChmp5 erhöht in Kooperation mit Vta1 (*Vps twenty associated*) die Aktivität von Vps4 (Shiflett et al. 2004, Azmi et al. 2006, Azmi et al. 2008, Xiao et al. 2008). Außerdem konnte kürzlich gezeigt werden, dass

das humanen Lgd-Orthologe LGD1/CC2D1B über seine vierte DM14 Domäne direkt mit CHMP7 interagiert (Ventimiglia et al. 2018). Diese Interaktion tritt während der Zellmembranreformierung bei der Mitose auf. Dabei scheint CHMP7 ein Startmolekül für die CHMP4-Polymerisation zu sein (Vietri et al. 2015). Zudem interagiert LGD1/CC2D1B auch direkt mit CHMP2A (Ventimiglia et al. 2018). Diese ESCRT-III Komponente terminiert zusammen mit CHMP3/Vps24 die Shrub-Polymerisation (Teis et al. 2008, Saxena et al. 2009), wobei CHMP2/Vps2 wiederum eine zentrale Rolle in der Rekrutierung von Vps4 einnimmt (Obita et al. 2007, Adell et al. 2014).

Die Bedeutung dieser Interaktionen wurde bisher vernachlässigt, da diese Interaktionspartner, wie Lgd selbst, Einfluss auf die Shrub-Polymerisation und daher auf die Aktivität von Shrub zu nehmen scheinen. Um jedoch Lgd und seine Funktion besser zu verstehen, muss zukünftig auch die genaue Bedeutung dieser Interaktionen für das Zusammenspiel von Lgd und der ESCRT-Maschinerie entschlüsselt werden. In einem ersten Experiment könnte daher beispielsweise die Konzentration dieser ESCRT-III Komponenten in *lgd* mutanten Zellen erhöht werden und dadurch ein möglicher positiver oder auch negativer Einfluss auf die reduzierte Shrub-Aktivität aufgedeckt werden.

3.2 Zusammenspiel der humanen Orthologe von Lgd und Shrub im endosomalen Transportweg

Die humanen Proteine LGD2/CC2D1A und LGD1/CC2D1B gehören zu einer evolutionär konservierten Proteinfamilie, die scheinbar Vertreter in allen Metazoen hat (Jaekel und Klein 2006). Dabei scheinen sie eine gewisse funktionale Redundanz untereinander zu besitzen (Drusenheimer et al. 2015). Darüber hinaus deuten einige wenige vorangegangene *in vitro* und *in vivo* Studien bereits an, dass eine endosomale Funktion von Lgd auch in Säugern konserviert sein könnte (Collinet et al. 2010, Drusenheimer et al. 2015, Deshar et al. 2016). Im Gegensatz zu LGD1/CC2D1B wurde für LGD2/CC2D1A bereits eine Vielzahl an Funktionen beschrieben. Diese scheinen jedoch in erster Linie nicht unbedingt mit einer endosomalen Funktion verbunden zu sein. So ist LGD2/CC2D1A u.a. in verschiedene Signalwege involviert, an der Immunantwort beteiligt und scheint überraschenderweise in zwei Fällen auch als transkriptioneller Repressor zu fungieren (siehe 1.5). Jedoch konnte bereits eine direkte Interaktion von beiden Lgd-Orthologen mit

allen drei humanen CHMP4-Proteinen nachgewiesen werden (Tsang et al. 2006, Usami et al. 2012, Drusenheimer et al. 2015).

In *Drosophila* ist hingegen eine Funktion von Lgd im endosomalen Transportweg ausführlich analysiert worden. Hierbei konnte Lgd als positiver Regulator der Aktivität der ESCRT-III Komponente Shrub *in vivo* identifiziert werden. Durch seine direkte Interaktion mit Shrub nimmt Lgd dabei Einfluss auf die ESCRT-vermittelte ILV-Bildung während des lysosomalen Abbaus von Transmembranproteinen (siehe 3.1) (Troost et al. 2012, Schneider et al. 2013).

Hier stellt sich daher die Frage, ob diese endosomale Funktion von Lgd auch in höheren Organismen konserviert ist und, ob die humanen Lgd-Orthologe, auf die gleiche Art und Weise wie *Drosophila* Lgd, die Netto-Aktivität von Shrub/CHMP4 erhöhen.

3.2.1 Konservierung der endosomalen Funktion von Lgd

Im Rahmen dieser Arbeit konnten weitere Beweise für eine Konservierung der endosomalen Funktion der Lgd-Proteine in Metazoen gesammelt werden. Zudem konnte zum ersten Mal das Zusammenspiel aller humanen Orthologe von Lgd und Shrub in diesem Ausmaß in einen Organismus analysiert werden.

Zunächst konnte bestätigt werden, dass beide humanen LGD/CC2D1 Proteine Lgd funktional ersetzen können (siehe 2.3.6) (Drusenheimer et al. 2015, Dissertation Schulz 2015). In *Drosophila* ist Lgd erwiesenermaßen in den endosomalen Transport von Transmembranproteinen involviert (Troost et al. 2012, Dissertation Troost 2013). Ein Funktionsverlust von *lgd* kann durch hLGD1 vollständig und durch hLGD2 teilweise gerettet werden (siehe 2.3.6) (Drusenheimer et al. 2015). Dementsprechend müssen beide Proteine in der Lage sein, Lgd auch im endosomalen Transportweg funktional zu ersetzen, zumal da durch ihre Expression in *lgd* mutanten Zellen eine ektopische Aktivierung des Notch-Signalweges im endosomalen Transportweg unterbunden wird (Drusenheimer et al. 2015, Dissertation Schulz 2015). Daher passt es auch ins Bild, dass die Endosomen in MEF-Zellen (*mouse embryonic fibroblasts*) bei einem Funktionsverlust von *Cc2d1a* genauso wie die Endosomen in *lgd* mutanten Flügelimaginalscheibenzellen signifikant vergrößert sind (siehe 2.2.2, Abb. 2-8) (Schneider et al. 2013, Drusenheimer et al. 2015).

Zusätzlich konnten hierbei die bereits beobachteten funktionalen Unterschiede (Drusenheimer et al. 2015) zwischen den beiden humanen Lgd-Orthologen bestätigt werden. Diese äußern sich bei den Rettungsexperimenten in *Drosophila* durch die unterschiedlich starke Rettungsfähigkeit gegenüber dem Funktionsverlust von *lgd*. Hierbei zeigt hLGD1/CC2D1B ein stärkeres Rettungsvermögen gegenüber der *lgd* mutanten Situation als hLGD2/CC2D1A (siehe 2.3.6) (Drusenheimer et al. 2015, Dissertation Schulz 2015). Mit verantwortlich, aber nicht ausschlaggebend für das geringere Rettungsvermögen ist scheinbar der verlängerte C-Terminus von hLGD2/CC2D1A (Dissertation Schulz 2015). Er könnte, wie bereits vermutet (Drusenheimer et al. 2015), für die zusätzlichen nicht-redundanten Funktionen, die für hLGD2/CC2D1A identifiziert wurden, essentiell sein (siehe 1.5).

Neben den Unterschieden in der Rettungsfähigkeit, bestätigen die Experimente in dieser Arbeit jedoch auch das hLGD1 und hLGD2 überlappende Funktionen im endosomalen Transportweg haben und daher auch hier eine funktionale Redundanz besitzen (siehe 2.3.6) (Drusenheimer et al. 2015, Dissertation Schulz 2015)

Darüber hinaus zeigte sich, dass das humane Shrub-Ortholog CHMP4B nicht nur funktional mit Lgd, sondern auch mit den beiden humanen Orthologen LGD1 und LGD2 in *Drosophila* interagieren kann (siehe 2.3.6, Abb. 2-30 u. Abb. 2-31) (Masterarbeit Bäumers 2015). Im Vorfeld wurde bereits aufgedeckt, dass die Interaktion von *Drosophila* Lgd mit humanem CHMP4B essentiell für vollständige Aktivität von CHMP4B ist (Masterarbeit Bäumers 2015). Vor diesem Hintergrund impliziert die Beobachtung, dass CHMP4B zusammen mit LGD1 den simultanen Funktionsverlust von *lgd* und *shrub* besser kompensiert als mit LGD2 (siehe 2.3.6, Abb. 2-31), dass LGD1 die Aktivität von CHMP4B stärker anheben kann als LGD2.

Zusätzlich zeigte sich in dieser Arbeit, dass auch die zwei anderen humanen Shrub-Orthologe in Anwesenheit von LGD1 funktional sind (siehe 2.3.8, Abb. 2-36 u. Abb. 2-37). Überraschenderweise offenbart zumindest CHMP4C in Anwesenheit von hLGD2 jedoch kein offensichtliches Rettungsvermögen (siehe 2.3.8, Abb. 2-37). Diese Beobachtung deutet zum ersten Mal an, dass es größere funktionelle Unterschiede zwischen hLGD1 und hLGD2 auch bei ihrer Interaktion mit den humanen Shrub-Orthologen gibt.

Ferner konnte in dieser Arbeit die genetische Interaktion zwischen humanen *LGD1* und humanen *CHMP4B* genauer analysiert werden. Es bestätigte sich, dass hLGD1 für die

vollständige Aktivität von CHMP4B benötigt wird (siehe 2.3.6). Seine Aktivität ist bereits reduziert, sobald nur eine Kopie *lgdP-hLGD1-HA* anstatt zwei Kopien im Genom vorhanden sind (siehe 2.3.6, Abb. 2-31). Im Vorfeld dieser Arbeit stellte sich bereits heraus, dass *lgdP-hLGD2/CC2D1A* genetisch mit *shrub* in *Drosophila* interagiert. Auch *hLGD2/CC2D1A* scheint daher zumindest über Shrub Einfluss auf Aktivität der ESCRT-Maschinerie im endosomalen Transportweg nehmen zu können (Drusenheimer et al. 2015).

Zusammen implizieren diese Ergebnisse, dass die humanen Lgd-Orthologe ebenfalls als positive Regulatoren der Aktivität der ESCRT-III Komponente Shrub/CHMP4B in *Drosophila* fungieren und daher scheinbar auch diese Funktion konserviert ist.

3.2.2 CHMP4-Polymerisation und CHMP4B-LGD1 Interaktion *in vivo*

Die Art und Weise wie Lgd und Shrub interagieren, ist entscheidend für ihr Zusammenspiel im endosomalen Transportweg. Sie verrät auch wie Lgd die Aktivität von Shrub wahrscheinlich erhöht. Vermutlich verhindert Lgd durch seine Bindung eine unproduktive nichtfunktionale Polymerisation von Shrub und erhöht dadurch den Pool an monomeren Shrub, der für eine produktive Polymerisation am Wirkungsort zur Verfügung steht (siehe 3.1.1 und 3.1.2).

Ob die endosomale Funktion von Lgd und seine Rolle als positiver Regulator der Aktivität von Shrub wirklich konserviert ist, spiegelt sich daher auch in der Polymerisation der humanen Orthologe von Shrub und in ihrer Interaktion mit den humanen Lgd-Orthologen wider. Interagieren sie auf die gleiche Art und Weise, erhöht dies die Wahrscheinlichkeit, dass die humanen Lgd-Orthologe die Aktivität von CHMP4B über den gleichen Mechanismus erhöhen, wie Lgd die Aktivität von Shrub in *Drosophila* anhebt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zum ersten Mal die Funktion und auch die Polymerisation der humane Shrub-Orthologe in einem Organismus analysiert. Hierbei fanden sich mehrere Hinweise, dass deren Homopolymerisation möglicherweise auf den gleichen elektrostatischen Wechselwirkungen wie bei Shrub beruht.

Erstens die elektrostatischen Oberflächen, die als entscheidend für die Shrub-Homopolymerisation identifiziert wurden (McMillan et al. 2016), sind in allen drei humanen Orthologen konserviert (siehe 2.3.2, 2.3.3 und Anhang, Abb. 9-3). Zweitens CHMP4B kann Shrub in *Drosophila* funktional ersetzen (siehe 2.3.1 und 2.3.3). Im

Gegensatz dazu, ist Snf7, das Shrub-Ortholog aus *S. cerevisiae*, dessen Polymerisation vorwiegend auf hydrophoben Interaktionen beruht (Tang et al. 2015), in *Drosophila* nicht funktional und kann die Funktion von Shrub nicht übernehmen (siehe 2.4, Abb. 2-38). Drittens es konnten funktionale Heteropolymere zwischen CHMP4B und Shrub in *Drosophila* beobachtet werden (siehe 2.3.5, Abb. 2-27). Viertens ist bei humanen CHMP4B wie bei *Drosophila* Shrub die konservierte, negativ geladene Oberfläche, über die Shrub nachgewiesener Weise im Polymer interagiert, entscheidend für die Funktionalität *in vivo* (siehe 2.3.2, Tabelle 2-2) (McMillan et al. 2016). Eine Ladungsumkehr in dieser Region (E44K, D83K oder E90K) führt wie bei Shrub (E40K, D79K oder E86K) zu einem Verlust der Rettungsfähigkeit gegenüber der *shrub* mutanten Situation (siehe 2.3.2, Tabelle 2-2) (McMillan et al. 2016). Ursache hierfür ist vermutlich eine gestörte Homopolymerisation von CHMP4B. Bereits veröffentlichte Daten unterstützen diese Annahme. Sie deuten ebenfalls an, dass diese negativ geladene Oberfläche essentiell für die Homopolymerisation von CHMP4B ist (Martinelli et al. 2012). Sie implizieren, dass bei einer Ladungsumkehr durch den simultanen Austausch der drei Aminosäuren (E90R, E94R und E97R) in CHMP4B die Homopolymerisation beeinträchtigt wird. Dies äußert sich in den durchgeführten Experimenten dadurch, dass eine C-terminal verkürzte CHMP4B-Variante, deren Expression sich erwiesenermaßen dominant-negativ auf die HIV-Knospung auswirkt, nach dem Aminosäureaustausch keinerlei negativen Effekt mehr zeigt. Entscheidend ist hierbei, dass die Variante trotz Ladungsumkehr weiterhin an die Plasmamembran binden kann und so eine fehlende Bindung als Ursache für den ausbleibenden negativen Effekt ausgeschlossen werden kann (Martinelli et al. 2012). All dies zusammen impliziert, dass die Art und Weise wie die ESCRT-III Untereinheit Shrub polymerisiert über die Metazoen hinweg konserviert ist und in höheren Organismen auf den gleichen elektrostatischen Wechselwirkungen wie in *Drosophila* beruht.

Erste *in vivo* Rettungsexperimente innerhalb dieser Arbeit signalisieren außerdem, dass die Interaktion zwischen humanen LGD1 und CHMP4B auf den gleichen elektrostatischen Wechselwirkungen wie bei Lgd und Shrub beruht (siehe 2.3.7).

Drei der vier basischen Aminosäuren, die als entscheidend für die Interaktion von Lgd und Shrub identifiziert wurden, sind in der dritten DM4 Domäne von hLGD1 konserviert (siehe 2.3.7, Abb. 2-32). Eine Ladungsumkehr in der positiv geladenen Oberfläche der

dritten Domäne von hLGD1 durch den einzelnen Austausch von zwei dieser konservierten Aminosäuren führt wie bei Lgd zu einem Funktionsverlust der dritten DM14 Domäne (siehe 2.3.7, Abb. 2-34 u. Abb. 2-35) (McMillan et al. 2017). Hier ist entscheidend, dass der Funktionsverlust nicht nur im Zusammenspiel mit Shrub (Abb. 2-34), sondern auch mit dessen humanen Ortholog CHMP4B (Abb. 2-35) auftritt. Die dritte DM14 Domäne könnte daher auch bei hLGD1 die potenzielle Shrub/CHMP4B-Interaktionsschnittstelle umfassen. Dennoch wäre es sinnvoll in einem zukünftigen Rettungsexperiment als Kontrolle eine basische Aminosäure in der dritten DM14 Domäne von hLGD1 auszutauschen, die nicht in der potenziellen Interaktionsschnittstelle liegt. Dadurch könnte ausgeschlossen werden, dass eine Ladungsumkehr in der dritten Domäne zwangsläufig mit einem Funktionsverlust einhergeht. Dies wurde bereits für *Drosophila* Lgd ausgeschlossen (Dissertation Tibbe 2019).

Bereits veröffentlichte Daten bekräftigen, dass die humanen Lgd-Orthologe über ihre dritte DM14 Domäne mit CHMP4-Proteinen interagieren. Beispielsweise konnte mit Hilfe eines Pulldown-Assays gezeigt werden, dass ein hLGD1-Deletionskonstrukt (162-493), welches nur die erste bis dritte DM14 Domäne umfasst, CHMP4B weiterhin bindet (Ventimiglia et al. 2018). Zudem signalisieren auch veröffentlichte Daten zu hLGD2, dass die Interaktion mit CHMP4-Proteinen in höheren Organismen auf gleichen elektrostatischen Wechselwirkungen wie in *Drosophila* beruht. Erstens konnte gezeigt werden, dass die Interaktion zwischen hLGD2/CC2D1A und CHMP4B gestört wird, sobald die Salzkonzentration erhöht wird. Dies spricht für elektrostatische Interaktionen zwischen den zwei Proteinen (Martinelli et al. 2012). Zweitens bestätigen verschiedene *in vitro* Experimente, dass die dritte DM14 Domäne von hLGD2/CC2D1A die Bindungsstelle von CHMP4B beinhaltet (Martinelli et al. 2012). Viertens unterbindet auf Seiten von CC2D1A eine Neutralisation der Ladung durch Austausch von sieben konservierten, geladenen Aminosäuren durch Alanin in der dritten DM14 Domäne die Interaktion mit CHMP4B (Martinelli et al. 2012). Dies spricht dafür, dass nicht nur Lgd über diese Region in der dritten DM14 Domäne mit Shrub interagiert, sondern auch seine beiden humanen Orthologe mit CHMP4B.

Ausschlaggebend ist zudem, dass die Interaktion von CHMP4B und CC2D1A/LGD2 auch von CHMP4B her unterbunden werden kann. Hierfür muss nur die negativ geladene, elektrostatische Oberfläche der N-terminalen Haarnadelstruktur von CHMP4B aufgehoben werden. Eine Ladungsumkehr in dieser Oberfläche von CHMP4B (E90R, E94R

und E97R) verhindert scheinbar also nicht nur eine Homopolymerisation, sondern hebt auch die Interaktion mit der dritten DM14 von CC2D1A auf (Martinelli et al. 2012).

Insgesamt deuten all diese Ergebnisse an, dass sowohl die Polymerisation von CHMP4B als auch die Bindung zwischen hLGD/CC2D1 und CHMP4B jeweils auf den gleichen elektrostatischen Wechselwirkungen beruhen wie bei ihren Orthologen in *Drosophila*. Prinzipiell wären die humanen Lgd-Orthologe damit in der Lage auf gleiche Art und Weise eine nichtfunktionale Polymerisation von CHMP4B zu verhindern und im Umkehrschluss wahrscheinlich dessen Aktivität zu erhöhen. Zumal die humanen Lgd-Orthologe bei ihrer Bindung scheinbar ebenfalls die negativ geladene Oberfläche von CHMP4B blockieren, die auch entscheidend für dessen Homopolymerisation zu sein scheint. Unterstützt wird diese Annahme dadurch, dass in verschiedenen *in vitro* Experimenten, durch Bindung der humanen Lgd-Orthologe (hLGD) an CHMP4B, die CHMP4B-Polymerisation unterbunden wird (Martinelli et al. 2012, Usami et al. 2012, Ventimiglia et al. 2018).

3.2.3 Funktionelle Unterschiede zwischen den humanen CHMP4-Proteinen

Im Gegensatz zu *Drosophila* umfasst das humane Genom nicht nur ein Snf7-Ortholog, sondern drei, CHMP4A, CHMP4B und CHMP4C (Kato et al. 2003, Peck et al. 2004). Ihre Analyse ist meist auf *in vitro*- und Zellkulturexperimente beschränkt. Beliebte molekulare Werkzeuge sind hierbei die Überexpression von ESCRT-Proteinen und RNA-Interferenz. Im Rahmen dieser Arbeit konnten funktionelle Unterschiede zwischen den humanen Shrub-Orthologen, CHMP4A, CHMP4B und CHMP4C, erstmals auf einem physiologischem Level in einem Organismus aufgedeckt werden (siehe 2.3.1). Im Gegensatz zu CHMP4B zeigen CHMP4A und CHMP4C auf den ersten Blick kein Rettungsvermögen gegenüber der *shrub* mutanten Situation. Erst in Anwesenheit von CHMP4B können sie die Funktion von Shrub teilweise übernehmen (siehe 2.3.1 u. 2.3.3) (Masterarbeit Bäumers 2015). Folglich scheinen sie über CHMP4B indirekt mit der ESCRT-Maschinerie in *Drosophila* funktional interagieren zu können. Dies ist ein erster Hinweis auf eine funktionale Heteropolymerisation zwischen CHMP4-Proteinen in einem Organismus.

Natürlich lassen sich Unterschiede im CHMP4-Expressionslevel trotz Verwendung des endogenen Expressionssystems (*BAC^{shrub}*) nicht per se ausschließen. Jedoch würden sie nicht das fehlende Rettungsvermögen von CHMP4A und CHMP4C, welches sich nur in Abwesenheit von CHMP4B äußert, erklären.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass CHMP4A und CHMP4C prinzipiell in der Lage sind die Funktion von Shrub im endosomalen Transportweg zu übernehmen (siehe 2.3.3, Abb. 2-23). Dies offenbart sich bei der partiellen Rettung des *shrub*⁴⁻¹ mutanten Hintergrundes durch eine Kopie *BAC^{shrub}-CHMP4B*. Hier führt die reduzierte Shrub-Aktivität, die einen Defekt im endosomalen Abbau verursacht, zu einer ektopischen Aktivierung des Notch-Signalweges (siehe 2.3.1 und 2.3.3). Durch die zusätzliche Expression von CHMP4A oder CHMP4C wird in dieser *shrub* hypomorphen Situation die ektopische Aktivierung von Notch aufgehoben (siehe 2.3.3, Abb. 2-23). Zusammen mit CHMP4B können CHMP4A und CHMP4C daher auch Shrub während der ILV-Bildung teilweise ersetzen.

Insgesamt scheinen daher alle drei humanen Orthologe wenigstens partiell eine redundante molekulare Funktion zu haben, die sie gemeinsam mit Shrub in *Drosophila* teilen. Die grundlegende Funktionsweise ist also trotz einer möglichen Spezialisierung erhalten geblieben. Diese Erkenntnis stimmt mit den bereits publizierten Daten überein. Grundsätzlich bestätigen diese, dass die humanen Shrub-Orthologe an ESCRT-vermittelten Abschnürungsprozessen beteiligt sind, die auf denselben topologischen Prinzipien beruhen und zwar auf einer Membranabschnürung weg vom Zytoplasma (Übersicht in Schöneberg et al. 2017, Übersicht in McCullough et al. 2018).

Die Ergebnisse in dieser Arbeit unterstützen ein Szenario, bei dem CHMP4B die Schlüsselkomponente für die ESCRT-vermittelten Abschnürungsprozesse ist. Von den drei humanen Orthologen ist nur CHMP4B ohne Einschränkungen in der Lage Shrub in *Drosophila* zu ersetzen. Dabei scheint CHMP4B die Funktion von Shrub in den verschiedenen ESCRT-abhängigen Abschnürungsprozessen zu übernehmen. CHMP4B kompensiert den embryonal letalen Funktionsverlust von *shrub* beinahe vollständig. Es entwickeln sich adulte, wenn auch sterile Fliegen ohne Musterbildungsdefekte (siehe 2.3.1, Abb. 2-18) (Diplomarbeit Bohnen 2014, Masterarbeit Bäumers 2015). Dem Szenario entsprechend zeigen CHMP4A und CHMP4C auch erst in Anwesenheit von CHMP4B eine Aktivität in *Drosophila*. Möglicherweise sind sie aufgrund ihrer Spezialisierung nicht mehr in der Lage ohne CHMP4B den Abschnürungsprozess zu vermitteln. Dies erklärt auch wieso CHMP4A und CHMP4C trotz ihrer Rekrutierung zur endosomalen Membran in *Drosophila* (siehe 2.3.4, Abb. 2-25) erst in Anwesenheit von CHMP4B (siehe 2.3.3, Abb. 2-23 u. Abb. 2-24) und scheinbar auch nicht in Anwesenheit

von Shrub (siehe 2.3.4, Abb. 2-26) eine Aktivität in *Drosophila* zeigen. Denn die Rekrutierung spricht eigentlich dafür, dass sie zumindest teilweise funktional mit dem Rest der ESCRT-Maschinerie in *Drosophila* interagieren.

Zudem ist auffällig, dass CHMP4A und CHMP4C auch in Anwesenheit von CHMP4B ein schlechteres Rettungsvermögen als CHMP4B aufzeigen (siehe 2.3.3, Abb. 2-24). Daher beruht das unterschiedliche Rettungsvermögen vermutlich nicht nur auf einer fehlenden Interaktion von CHMP4A und CHMP4C mit der ESCRT-Maschinerie in *Drosophila*, sondern deutet auch auf eine Evolution/Spezialisierung von CHMP4A und CHMP4C weg von der ursprünglichen Funktion hin. Dies unterstützt daher auch das Szenario, in dem CHMP4B die Schlüsselkomponente bei den Abschnürungsprozessen ist. CHMP4A und CHMP4C könnten in dieser Situation als „Zwischenmonomere“ im CHMP4B-Polymer fungieren, über die beispielsweise die Krümmung der Spirale modifiziert wird. So könnte auch je nach Prozess (ILV-Biogenese, Cytokinese etc.) das Polymer an die Gegebenheiten angepasst werden. Vor allem CHMP4A (265 aa, NP_054888.2) mit seinem verlängerten N-Terminus könnte dabei eine besondere Rolle zuteilwerden. Dieses Szenario wird zum einen durch die Hinweise auf eine funktionale Heteropolymerisation zwischen den CHMP4-Proteinen unterstützt (siehe 2.3.3 und 2.3.8), zum anderen konnte bereits mit Hilfe einer Northern Blot-Analyse gezeigt werden, dass die *CHMP4*-mRNAs ein unterschiedliches Expressionsmuster aufweisen (Kato et al. 2004). Entscheidend ist, dass in dieser Studie das mRNA-Level von *CHMP4B* in allen untersuchten menschlichen Geweben höher ist als das von *CHMP4A* und *CHMP4C*. Dies spricht ebenfalls dafür, dass CHMP4B unter den drei CHMP4-Proteinen die Schlüsselkomponente für die ESCRT-vermittelten Abschnürungsprozesse ist.

Vor allem Studien, die ihren Fokus auf der Cytokinese haben, unterstützen diese Theorie. Hier wird der letzte Schritt, bei dem zwei Tochterzellen voneinander getrennt werden, durch die ESCRT-Maschinerie vermittelt (Carlton und Martin-Serrano 2007, Morita et al. 2007, Guizetti et al. 2011). Die ESCRT-III Untereinheit CHMP4B scheint dabei die Schlüsselkomponente für den eigentlichen Abschnürungsprozess zu sein, wohingegen über CHMP4C der Prozess reguliert und eine zu frühe Teilung der Zellen verhindert wird (Elia et al. 2011, Carlton et al. 2012, Christ et al. 2016). Ob das zum *Midbody* rekrutierte CHMP4A (Morita et al. 2007, Elia et al. 2011) ebenfalls eine spezifische Aufgabe während der Zellteilung übernimmt, die sich von der von CHMP4B unterscheidet, ist bisher unklar. Im Gegensatz zu CHMP4B und CHMP4A weist CHMP4C dementsprechend ein Motiv auf,

dessen Phosphorylierung durch die Kinase Aurora B eine vorzeitige Teilung der Zellen verhindert (Capalbo et al. 2012, Carlton et al. 2012).

Unterstützt wird das Szenario auch durch siRNA-basierte Experimente. Diese bekräftigen, dass CHMP4A und CHMP4C im Gegensatz zu CHMP4B entbehrlich für die eigentliche Durchführung der Zellteilung sind und, dass bei ihrer Reduktion auch nur marginal bis moderat die ESCRT-vermittelte HIV-1-Knospung beeinträchtigt wird (Morita et al. 2011, Carlton et al. 2012). Die Effizienz der siRNAs wurde hier mit Hilfe einer Western Blot-Analyse sichergestellt (Morita et al. 2011, Carlton et al. 2012). Zusätzlich konnte bereits gezeigt werden, dass über CHMP4C sogar ein vorzeitiger Abschnürungsprozess blockiert wird (Capalbo et al. 2012, Carlton et al. 2012).

Insgesamt scheint es also auch keine Aufteilung der einzelnen CHMP4-Proteine auf die ESCRT-vermittelten Prozesse zu geben, so sind alle drei wie beschrieben an der Cytokinese beteiligt (Carlton et al. 2012). Dabei konnten jedoch Unterschiede in der zeitlichen und räumlichen Rekrutierung von CHMP4-Proteinen aufgedeckt werden (Carlton et al. 2012).

Basierend auf all diesen Daten ist also vorstellbar, dass CHMP4B prinzipiell die entscheidende Komponente für den jeweiligen ESCRT-vermittelten Abschnürungsprozess ist und daher die Basis bildet. Die beiden anderen Homologe, CHMP4C und CHMP4A, sind hierbei Komponenten, über die Einfluss auf den jeweiligen Prozess genommen wird. Sie ermöglichen vielleicht, wie CHMP4C bei der Cytokinese, eine präzise Regulierung, oder modifizieren die Krümmung der CHMP4B-Polymere, sind aber nicht entscheidend für die Abschnürung an sich.

Alle drei humanen CHMP4-Proteine gehen auf einen gleichen Ursprung zurück. Aufgrund seiner hohen Aktivität in *Drosophila* scheint CHMP4B noch funktional am ähnlichsten zum Ursprungprotein zu sein und daher wahrscheinlich, wie beschrieben, am wichtigsten für den grundlegenden Prozess der Abschnürung. Dennoch kann CHMP4B Shrub nicht eins zu eins ersetzen. Es benötigt die Expression zwei Kopien *BAC^{shrub}-CHMP4B* um den *shrub⁴⁻¹* mutanten Hintergrund zu retten und nur eine von *BAC^{shrub}-cDNA* (siehe 2.3.1, Abb. 2-18) (Masterarbeit Bäumers 2015). CHMP4C rückte in den letzten Jahren hingegen erst aufgrund seiner distinkten Funktion bei der Cytokinese in den Fokus (Carlton et al. 2012). CHMP4A wurde wiederum während verschiedener ESCRT-vermittelter Prozesse detektiert, beispielweise während der Cytokinese am Midbody (Morita et al. 2007, Elia et

al. 2011) und auch bei der Reparatur der endolysosomalen Membran (Skowyra et al. 2018). Die spezifische Aufgabe von CHMP4A ist jedoch weiterhin unklar. CHMP4A (265 aa, NP_054888.2) besitzt einen verlängerten N-Terminus, der bei CHMP4B und CHMP4C fehlt. Er könnte der Grund für das geringste Rettungsvermögen unter den humanen Orthologen in *Drosophila* sein (siehe 2.3.3, Abb. 2-24) und daher möglicherweise notwendig für bisher unbekannte nicht-redundante Funktionen von CHMP4A in Säugern. Eine Analyse von CHMP4A ohne den verlängerten N-Terminus in *Drosophila* würde daher wahrscheinlich mehr über die grundlegende Funktion von CHMP4A verraten. Zumal da ohne den verlängerten N-Terminus die Identität von CHMP4A gegenüber Shrub deutlich steigt (siehe 2.3.1, Tabelle 2-1). Sie ist dann sogar höher als die von CHMP4C. Außerdem scheint humanes CHMP4A auch ohne N-Terminus zu existieren (CHMP4A, 222 aa, NP_054888.3). Zudem wird CHMP4A in allen untersuchten menschlichen Geweben der bereits erwähnten Studie (s.o.) stärker transkribiert als CHMP4C (Katoh et al. 2004).

Interessanterweise offenbaren bereits publizierte *in vitro* Experimente, dass nicht nur CHMP4B, sondern auch CHMP4A aktiv Membranen modellieren kann (Hanson et al. 2008). Bei einer Überexpression von CHMP4-Proteinen in COS-7 Zellen bilden sowohl CHMP4B als auch CHMP4A membrangebundene zirkuläre Filamente, die jeweils eine nach außengehende Ausstülpung der Plasmamembran fördern (Hanson et al. 2008). Zumindest CHMP4A scheint daher prinzipiell wie CHMP4B einen Abschnürungsprozess vermitteln zu können. Hierbei ist jedoch zu bedenken, dass durch die starke Überexpression der CHMP4-Proteine eine künstliche Situation geschaffen und so eine Polymerisation der CHMP4-Proteine forciert wurde. Dies entspricht nicht der natürlichen Situation, vor allem unter dem Aspekt, dass das Expressionslevel von humanem CHMP4B im Menschen scheinbar höher ist als von den anderen beiden CHMP4-Proteinen (Katoh et al. 2004).

Dennoch stellt sich die Frage, wieso CHMP4A und CHMP4C in Abwesenheit von CHMP4B kein Rettungsvermögen in *Drosophila* zeigen (siehe 2.3.1, Abb. 2-18 u. Abb. 2-19). Sie gelangen auch ohne CHMP4B zur endosomalen Membran (siehe 2.3.4, Abb. 2-25). Dabei scheint CHMP4A prinzipiell fähig zu sein, Membranen zu modellieren (Hanson et al. 2008). Eine Erklärung für eine Rekrutierung wäre, dass sie in dieser genetischen Situation über Shrub mit der restlichen ESCRT-Maschinerie in *Drosophila* interagieren können

(2.3.4, Abb. 2-25). Jedoch scheint zumindest CHMP4C in Anwesenheit von Shrub trotz seiner Rekrutierung keine Aktivität im endosomalen Transportweg von *Drosophila* zu haben (siehe 2.3.4, Abb. 2-26). Aufgrund des starken unspezifischen Hintergrundsignals (Myc-Antikörperfärbung) konnte in dieser Arbeit jedoch nicht einwandfrei verifiziert werden, ob CHMP4A und CHMP4C wie Shrub und CHMP4B zwischen Zytoplasma und endosomaler Membran zirkulieren oder, ob sie bereits ohne Vps4 Reduktion an der endosomalen Membran in *Drosophila* arretieren (siehe 2.3.4, Abb. 2-25). Falls sie ohne CHMP4B rekrutiert werden, aber nicht funktionsfähig sind, könnte CHMP4B auch in irgendeiner Form für die Aktivierung von CHMP4A und CHMP4C notwendig sein.

In zukünftigen Experimenten gilt es herauszufinden wieso CHMP4A und CHMP4C keine Aktivität in *Drosophila* zeigen, obwohl sie anscheinend zur endosomalen Membran gelangen bzw. rekrutiert werden. Worin unterscheiden sie sich von CHMP4B? Wie gelangen sie zur endosomalen Membran?: (1) Werden sie über den für ILV-Bildung klassischen Weg rekrutiert (ESCRT-II-Vps20/CHMP6) (Teis et al. 2008)? (2) Erfolgt die Rekrutierung ALIX-abhängig, wie es für CHMP4C bei der Cytokinese der Fall ist (Christ et al. 2016)? Hier ist zu erwähnen, dass zumindest in *S. cerevisiae* Snf7 parallel durch ESCRT-II-Vps20/CHMP6 und Bro1/ALIX während MVB-Biogenese rekrutiert wird (Tang et al. 2016).

3.3 Charakterisierung von *Dchmp7* (CG5498) mit Fokus auf dem endosomalen Transportweg

CHMP7 ist ein assoziiertes ESCRT-III Protein, das allein schon aufgrund seiner Größe einzigartig unter den CHMP-Proteinen des ESCRT-III Komplexes ist. Dennoch ist CHMP7 erst ansatzweise charakterisiert worden. Eine Analyse in einem vielzelligen Organismus fehlt komplett. Erst in den letzten Jahren zeigte sich, dass CHMP7 an der durch die ESCRT-Maschinerie vermittelten Reformierung/Assemblierung der Kernmembran bei der Mitose beteiligt ist. Dort fungiert es als Startkomponente für die ESCRT-III Assemblierung (Olmos et al. 2015, Vietri et al. 2015, Olmos et al. 2016).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine mögliche Funktion von DChmp7 im endosomalen Transportweg nicht bestätigt werden. Zwar deuten die durchgeführten Experimente, die

auf einer Überexpression von HA-DChmp7 basieren, auf eine Funktion im endosomalen Transport hin (siehe 2.5, Abb. 2-39), jedoch konnte bei einem Funktionsverlust von *Dchmp7* kein Effekt detektiert werden (siehe 2.5, Anhang, Abb. 9-7 und Abb. 9-8). Zuvor veröffentlichte Daten zeigen zwar auch, dass eine Überexpression von humanem GFP-CHMP7 in HeLa-Zellen eine Akkumulation von ubiquitinierten Proteinen verursacht und dass wahrscheinlich der endolysosomale Abbau des EGF-Rezeptors beeinträchtigt ist, jedoch lässt sich auch hier aufgrund der Überexpression nicht ausschließen, dass dies unspezifische Effekte sind (Horii et al. 2006).

Diese Experimente verraten jedoch, dass DChmp7 prinzipiell an der endosomalen Membran lokalisieren kann (siehe 2.5, Abb. 2-39). Dabei nimmt es scheinbar Einfluss auf den endosomalen Abbau von Transmembranproteinen durch die ESCRT-Maschinerie. Eine Störung der ESCRT-Maschinerie durch Akkumulation von DChmp7 könnte erklären, warum die ektopische Aktivierung des Notch-Signalweges in *lgd* mutanten Zellen bei der Überexpression von HA-DChmp7 unterdrückt wird (siehe 2.5, Abb. 2-41). Eine bereits erschienene Studie in *S. cerevisiae* deutet an, dass eine Fehlfunktion in der ESCRT-Maschinerie eine Störung der Rab5/Rab7 Konversion verursacht (Russell et al. 2012). Bei dieser Konversion wird während der endosomalen Reifung Rab5 durch die GTPase Rab7 ersetzt (Rink et al. 2005). Rab7 vermittelt wiederum die Fusion der reifenden Endosomen mit dem Lysosom (Bucci et al. 2000, Vanlandingham und Ceresa 2009). Diese Fusion ist Voraussetzung für die ektopische Aktivierung des Notch-Signalweges in *lgd* mutanten Zellen (Schneider et al. 2013). Ein Defekt in der Rab5/Rab7 Konversion aufgrund der Dchmp7-Überexpression könnte daher die Ursache für die Unterdrückung der ektopischen Aktivierung sein (siehe 2.5, Abb. 2-41).

Es ist auffällig, dass *Dchmp7* mutante adulte Fliegen nicht nur keinen Defekt im endosomalen Transportweg offenbaren (Anhang, Abb. 9-7), sondern fertil sind und dabei keinen offensichtlichen Musterbildungsdefekt aufweisen. Diese Beobachtung erinnert an die anderen assoziierten ESCRT-III Proteine. Auch sie zeigen im Vergleich zu den ESCRT-Kernkomponenten schwächere Ausfallphänotypen, die von keinem bis zu einem schwachen endosomalen Transportdefekt reichen (Dimaano et al. 2008, Rue et al. 2008, Agromayor et al. 2009, Bäumers et al. 2019). Diese assoziierten ESCRT-Proteine bilden zwei Wirkkomplexe, die ausschlaggebend für die Aktivität und Rekrutierung der ATPase Vps4 sind (Shiflett et al. 2004, Azmi et al. 2006, Nickerson et al. 2006, Azmi et al. 2008,

Dimaano et al. 2008, Rue et al. 2008). Erst ein simultaner Funktionsverlust von je einer Komponente der beiden Wirkkomplexe verursacht einen „Class E“-Phänotyp, der dem bei einem kompletten Funktionsverlust der ESCRT-Maschinerie ähnelt (Rue et al. 2008). Auch beim assoziierten ESCRT-Protein CHMP7 könnte der Effekt eines Funktionsverlusts zu marginal sein und/oder möglicherweise auch durch die Funktion von anderen Komponenten überdeckt bzw. kompensiert werden. Hierbei könnten funktionelle Redundanzen eine Rolle spielen. Zwar konnte bereits durch eine Sequenzierung gezeigt werden, dass es sich bei den *Dchmp7*-Allelen um Nullallele handelt (siehe 2.5, Abb. 2-40), dennoch wäre es sinnvoll, durch eine Western Blot-Analyse oder Massenspektrometrie den amorphen Charakter der Allele zu bestätigen.

Bereits veröffentlichte Zellkulturstudien zeigen, dass humanes CHMP7 als eine Art Membranadapter bzw. Startkomponente für die CHMP4-Polymerisation während der Reformierung der Kernhülle im Anschluss an die Zellteilung fungiert (Vietri et al. 2015, Olmos et al. 2016). Es wäre daher prinzipiell vorstellbar, dass DChmp7 diese Aufgabe ebenfalls während der ILV-Bildung übernimmt. Zumal CHMP7 ein Hybrid aus zwei ESCRT-Proteinen zu sein scheint (humanes CHMP7: ESCRT-III/ESCRT-III (Horii et al. 2006); *S. cerevisiae* Chm7 ESCRT-II/ESCRT-III (Bauer et al. 2015)) und daher eigentlich vorgeschaltete ESCRT-Komponenten wie Vps20/CHMP6 (Teis et al. 2008) überbrücken könnte. Hier könnte jedoch auch die Erklärung liegen, wieso sich kein endosomaler Defekt bei einem Funktionsverlust von *Dchmp7* zeigt. Selbst wenn DChmp7 in diesem Szenario entfällt, ist immer noch der kanonische Weg für eine CHMP4-Polymerisation über ESCRT-II-Vps20/CHMP6 bei der MVB-Biogenese aktiv (Teis et al. 2008).

Das neben dem kanonischen Weg parallel auch über DChmp7 die ESCRT-III Kernkomponente CHMP4/Shrub rekrutiert werden könnte, wird durch die Beobachtung gestützt, dass während der Cytokinese die Rekrutierung von CHMP4B auch über zwei Wege erfolgt, zum einen über Bro1/ALIX und zum anderen parallel über ESCRT-I-ESCRT-II-Vps20/CHMP6 (Christ et al. 2016). Hier existieren also zwei parallele Wege über die ESCRT-III Polymerisation gestartet wird und die scheinbar partiell redundant agieren. Zudem konnte bereits in *S. cerevisiae* gezeigt werden, dass während der MVB Biogenese die Rekrutierung und Aktivierung von ESCRT-III nicht nur über den kanonischen Weg (ESCRT-II-Vps20/CHMP6) sondern über Bro1/ALIX erfolgt (Tang et al. 2016).

Eine Rekrutierung über DChmp7 wäre daher auch vorstellbar. Falls DChmp7 auf diese Weise, während der ILV-Bildung, agiert, offenbart sich dies möglicherweise erst, wenn zusätzlich zu einem Funktionsverlust von *DChmp7*, die Rekrutierung über den kanonischen Weg und/oder ALIX/Bro1 ausfällt oder zumindest stark reduziert wird.

Eine Reduktion von *vps25* um 50 % (*vps25^{Pb2931}* heterozygot [ESCRT-II (*vps25^{Pb2931}/+*)]) im *Dchmp7* mutanten Hintergrund, wie im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt, reicht aber scheinbar noch nicht aus.

Um jedoch eine Rolle von DChmp7 im endosomalen aufzudecken, ist zukünftig eine Untersuchung der subzellulären Lokalisation von endogenem DChmp7 notwendig. Hier gilt es zu klären, ob endogenes DChmp7 beispielsweise, wie die anderen ESCRT-III Komponenten, an der endosomalen Membran arretiert sobald *Vps4* reduziert wird (Babst et al. 1998, Bäumers et al. 2019). Interessanterweise zeigt Chm7, das DChmp7-Ortholog aus *Saccharomyces cerevisiae*, in biochemischen Fraktionierungsexperimenten keine signifikant veränderte Lokalisation bei einem Funktionsverlust von *vps4* (Bauer et al. 2015). Dies spricht erneut gegen eine generelle Funktion im endosomalen Transportweg. Jedoch hat DChmp7 nur eine Sequenzidentität von 17,3 % (Ähnlichkeit 35,9 %) gegenüber Chm7 aus *S. cerevisiae* [(Bioinformatische Analyse (EMBOSS Needle): Chm7 aus *S. cerevisiae* (NP_012486.3); DChmp7 (flybase CG5498)].

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine funktionale Beziehung zwischen Lgd und DChmp7 in einem Organismus bestätigt werden (siehe 2.5 und Anhang, Abb. 9-9). Da Lgd eine Rolle im endolysomalen Abbau von Transmembranproteinen spielt (Troost et al. 2012, Dissertation Troost 2013), lag hier der Schluss nahe, dass DChmp7 möglicherweise mit Lgd zusammen im endosomalen Transportweg agiert. Bei einem zusätzlichen Funktionsverlust von *Dchmp7* in *lgd* mutanten Zellen zeigt sich allerdings keine Modifikation des endosomalen Phänotyps (siehe 2.5, Abb. 2-41). Auch hier offenbart sich also keine endosomale Funktion von DChmp7.

Allerdings konnte kürzlich eine direkte Interaktion zwischen humanem LGD1/CC2D1B und humanem CHMP7 nachgewiesen werden (Ventimiglia et al. 2018). Dies bekräftigt die identifizierte genetische Interaktion zwischen *lgd* und *Dchmp7* in *Drosophila*. In dieser Studie wurde gezeigt, dass hCHMP7 und hLGD1/CC2D1B am Ende der Reformierung der Kernmembran während der Mitose zusammen agieren (Ventimiglia et al. 2018).

Eine mögliche Funktion von *Drosophila* Chmp7 während der Reformierung der Zellmembran wäre daher auch möglich. Ein erstes Indiz für eine solche Rolle in *Drosophila* äußert sich bei der Überexpression von HA-DChmp7 während der Mitose von Zellen der Peripodialmembran. Hier ist die Lokalisation von HA-DChmp7 in den sich teilenden Zellen gegenüber der von Zellen in der Interphase verändert (siehe 2.5, Anhang, Abb. 9-6). Ob CHMP7 wirklich nur während der Kernmembranreformierung eine distinkte Rolle erfüllt (bisher ist CHMP7 dort das einzig bekannte Adapterprotein für die ESCRT-III Rekrutierung) oder, ob CHMP7 doch, wie die Überexpressionsexperimente suggerieren, im endosomalen Transportweg involviert ist, werden zukünftige Studien zeigen müssen.

4 Zusammenfassung

Ein direkter Interaktionspartner des Tumorsuppressors Lgd ist die ESCRT-III Komponente Shrub. Ihre Polymerisation an der endosomalen Membran ist essentiell für die ESCRT-vermittelte Bildung von intraluminalen Vesikeln (ILVs) während des endosomalen Abbaus von Transmembranproteinen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass bei Funktionsverlust von *lgd* die Aktivität von Shrub reduziert ist. Diese reduzierte Aktivität verursacht keine messbar reduzierte ILV-Bildung, sondern eine Vergrößerung der ESCRT-invagination sites der Endosomen. Eine solche Vergrößerung deutet auf eine Störung im dynamischen Prozess der ESCRT-III Polymerisation hin. Sie könnte die ligandenunabhängige Aktivierung des Notch-Signalweges erklären, die durch das Verbleiben einiger Notch-Rezeptoren an der limitierenden Membran der Endosomen verursacht wird. Lgd wird daher nicht für die grundlegende Funktionalität der ESCRT-Maschinerie benötigt. Es steigert die Effizienz bei der Inkorporation der Transmembranproteine in ILVs, indem es spezifisch die Aktivität von Shrub anhebt. Dabei scheint Lgd den Pool verfügbarer Shrub-Moleküle für eine dynamische Polymerisation zu erhöhen, indem er eine unproduktive vorzeitige Polymerisation von Shrub-Molekülen im Zytoplasma verhindert und Shrub zur endosomalen Membran rekrutiert. Zusätzlich konnten in dieser Arbeit Beweise für eine Konservierung dieser endosomalen Funktion der Lgd-Proteine in Säugetieren gesammelt werden. Die humanen Lgd-Orthologe, LGD1/CC2D1B und LGD2/CC2D1A, scheinen wie Lgd in *Drosophila*, essentiell für die vollständige Aktivität des Shrub-Orthologs CHMP4B zu sein. Dabei scheint die Polymerisation von CHMP4B und seine Interaktion mit hLGD1 über die gleichen elektrostatischen Wechselwirkungen zu erfolgen wie die ihrer *Drosophila* Orthologe. Dies legt nahe, dass der Mechanismus über den Lgd die Aktivität von Shrub steigert in höheren Organismen konserviert sein könnte. Dennoch offenbaren sich auch funktionale Unterschiede zwischen hLGD1 und hLGD2 bei ihrer Interaktion mit den humanen Shrub-Orthologen. So scheint LGD1 die Aktivität von CHMP4B stärker anheben zu können als LGD2. Zudem zeigen sich neben funktionalen Redundanzen auch Unterschiede zwischen den drei humanen Shrub-Orthologen, CHMP4A, CHMP4B und CHMP4C. Die gewonnenen Daten deuten auf eine Schlüsselrolle von CHMP4B für die ESCRT-vermittelten Abschnürungsprozesse hin. Außerdem gibt es Hinweise für eine funktionale Heteropolymerisation zwischen den drei humanen CHMP4-Homologen.

5 Summary

A direct interaction partner of the tumor-suppressor Lgd is Shrub, one of the ESCRT-III subunits. The polymerization of Shrub is essential for the ESCRT-mediated biogenesis of intraluminal vesicles (ILVs) during endosomal degradation of transmembrane proteins. Present Data confirm a reduced activity of Shrub upon *lgd* loss of function. This decrease in activity does not result in reduced ILV formation, but rather in enlarged endosomal ESCRT-invagination sites, suggesting that ESCRT-III polymerization dynamics are affected. This possibly explains ligand-independent activation of the Notch signaling pathway, which is caused by Notch receptors remaining at the limiting membrane of endosomes. Hence, Lgd is not essential for the basic function of the ESCRT machinery. Instead, it raises the efficiency of transmembrane proteins incorporation by raising Shrub activity. Therefore, Lgd seems to increase the free available amount of monomeric Shrub, by preventing premature cytosolic polymerization and recruiting Shrub to the endosomal membrane. In addition, this study provides evidence that the endosomal function of Lgd proteins is conserved in mammals. Both human orthologs (LGD1/CC2D1B and LGD2/CC2D1A) seem to be required for full activity of the human Shrub ortholog CHMP4B. Furthermore, in flies and humans, polymerization of Shrub/CHMP4B and its interaction with Lgd/hLGD1 are based on electrostatic interactions. It is tempting to speculate that the mechanism of Lgd to increase Shrub activity is conserved in higher organisms. Still, there are some functional differences between hLGD1 and hLGD2 regarding their interaction with the human orthologs of Shrub. hLGD1 can activate CHMP4B stronger than hLGD2. Despite some functional redundancy among the human Shrub orthologs, CHMP4A, CHMP4B and CHMP4C, the findings suggest a key role for CHMP4B in ESCRT-mediated abscission processes. Furthermore, the obtained results provide evidence for functional heteropolymers of all CHMP4 homologs.

6 Methoden

6.1 Material

6.1.1 Puffer, Lösungen und Medien

Puffer und Lösungen

Tabelle 6-1: Liste der verwendeten Puffer und Lösungen

1x PBS (phosphate buffered saline)	137 mM NaCl; 27 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ ; 2 mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7,4
0,3 % PBT (1x PBS + Triton-X-100)	1x PBS + 0,3 % Triton
4 % PFA	1x PBS + 4 % Paraformaldehyd
5 % NGS	Normal Goat Serum in 0,3 %PBT
1x TAE-Puffer	40 mM Tris-Acetat; pH 8,0; 1 mM EDTA
Resuspensions-Puffer (S1-Puffer)	50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase, pH 8.0
Lysis-Puffer S2 (S2-Puffer)	200 mM NaOH; 1 % SDS
Neutralisation-Puffer (S3-Puffer)	2,8M KAc; pH 5,1
SB-Puffer (Squishing Buffer)	10 mM Tris-HCl pH = 8,2; 1 mM EDTA; 25 mM NaCl; 200 µg/mL Proteinase K (erst kurz vor Gebrauch hinzufügen)
Antibiotika-Stammlösungen (Sigma Aldrich)	Ampicillin 100 mg/ml in dH ₂ O Kanamycin 50 mg/ml in dH ₂ O
Hoechst 33258 - Verdünnung 1:10000	Sigma Aldrich
dNTPs, dGTP, dATP, dTTP, DCTP	Thermo Fisher Scientific
6x Ladepuffer: 6x MassRuler DNA Loading Dye	Thermo Fisher Scientific
DNA-Längenstandard: GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific
Gibson Assembly 5x ISO-Puffer	3 ml 1 M Tris-HCL pH 7,5; 150 µl 2 M MgCl ₂ ; 60 µl 100 mM dGTP, 60 µl 100 mM dATP, 60 µl 100 mM dTTP, 60 µl 100 mM dCTP, 300 µl 1 M DTT; 1,5 g PEG-8000; 300 µl 100 mM NAD; dH ₂ O auf 6 ml.
0,1 % PBT (1x PBS + Tween)	1x PBS; 1,0 % (v/v) Tween 20
4x-Laemmli-Puffer	250 mM Tris-HCl; 8 % SDS; 40 % Glycerol 8 % Betamercaptoethanol; 0,02 % Bromphenolblau
4x Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl; 10 % SDS; pH 8,8
4x Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-HCl; 0,4 % SDS; pH 6,8
10x SDS-Elektrophorese-Puffer	0,26 M Tris-HCl; 1,92 M Glycin; 1 % SDS pH 8,3
10x Transferpuffer	250 mM Tris-HCl, 1,5 M Glycerin vor Gebrauch:

	1x Transferpuffer: 10 ml Transferpuffer (10x) 10-20 ml Methanol 375 µl 10 % SDS Auf 100 ml auffüllen mit dH ₂ O
Blockierlösung für den Western Blot	5 % Milchpulver in 1x PBS
Färbelösung für den Western Blot	2 % Milchpulver in 1x PBS
Stammlösung: Phosphatpuffer A (Elektronenmikroskopie)	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O (MW 137,99 g/mol; 27,6 g/l)
Stammlösung: Phosphatpuffer B (Elektronenmikroskopie)	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O (MW 177,99 g/mol; 35,7 g/l)
0,2 M Phosphatpuffer pH 7,4	Für 50 ml 0,2 M PO ₄ -Puffer pH 7,4 9,5 ml Phosphatpuffer A 40,5 ml Phosphatpuffer B pH-Wert ggf. einstellen
0,1 M Phosphatpuffer	0,2 M PO ₄ -Puffer pH 7,4, 1:1 mit dH ₂ O verdünnen (frisch ansetzen!)
Glutaraldehyd	50 % Glutaraldehyd EM-Grade
Osmiumtetroxid	4 % wässrig
Ethanol (Elektronenmikroskopie)	auf Molekularsiebperlen, damit es wasserfrei ist (~ 100 %)!
Aceton (Elektronenmikroskopie)	auf Molekularsiebperlen, damit es wasserfrei ist (~ 100 %)!

Medien

Futtermedium zur Kultivierung von *Drosophila melanogaster*

100 g Agar; 1424 g Maisschrot; 190 g Sojamehl; 336 g Trockenhefe; 800 g
Rübensirup; 900 g Malzextrakt; 300 ml Nipaginlösung in Etanol (10 % Gew/Vol);
90 ml Probionsäure; 19,5 l dH₂O; (Volumen: 20 Liter) LB-Medium

LB-Medium

10 g Bactotrypton; 5 g Hefeextrakt; 10 g NaCl; 1 l dH₂O; autoklavieren; Zugabe von
Antibiotikum nach Bedarf

LB-Plattenmedium (LB-Agar-Platten)

LB-Medium wird mit 15 g Agar/Liter angesetzt und autoklaviert; Zugabe von
Antibiotikum nach Bedarf

Vectarshield (Einbettungsmedium für die Fluoreszenzmikroskopie)

Vector Laboratories Inc.

Epon (Einbettungsmedium für die Elektronenmikroskopie)

Herstellung nach Anleitung des Kits (Sigma Epoxy Embedding Kit #45359)

6.1.2 Enzyme und Chemikalien

Die verschiedenen Enzyme wurden, wenn nicht anderes angegeben, mit den entsprechenden Puffern der Hersteller verwendet.

Polymerasen

Pfu DNA Polymerase	Promega
Q5® High-Fidelity DNA Polymerase	New England BioLabs
OneTaq®- DNA Polymerase	New England BioLabs
Phusion® HF DNA-Polymerase	New England BioLabs

Restriktionsenzyme (Restriktionsendonukleasen)

<i>KpnI</i> -HF – Restriktionsendonukleasen	New England BioLabs
<i>NotI</i> -HF – Restriktionsendonukleasen	New England BioLabs
<i>DpnI</i> – Endonuklease	New England BioLabs
T5 Exonuklease	Biozym

Ligase

T4 DNA Ligase	New England BioLabs
<i>Taq</i> DNA Ligase	New England BioLabs

Proteinase

Proteinase K [20 mg/ml]	Roche
-------------------------	-------

Gibson-Assembly Enzym Mastermix

320 µl	Gibson-Assembly 5x ISO-Puffer	
0,64 µl	10 U/µl T5 Exonuklease	Biozym
20 µl	2 U/µl Phusion® HF DNA-Polymerase	New England BioLabs
160 µl	40 U/µl <i>Taq</i> Ligase	New England BioLabs
1,2 ml	dH2O	

Katalysatoren

APS (10 %) (Ammoniumperoxidsulfat)	Merck
<i>TEMED</i> (N,N,N',N'-Tetramethyl ethylenediamine)	Merck

Acrylamid

Rotiphorese Gel30 (37,5:1)

Carl Roth

6.1.3 Reaktions-Kits und Arbeitsmaterialien

Reaktions-Kits

NucleoBond® Xtra Midi Kit

Macherey-Nagel

Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit

Zymo Research

BM Chemiluminescence Western Blot Kit

Sigma Aldrich

Arbeitsmaterialien

Transfermembran:

Roti-PVDF

Roth

Filterpapier „Whatman-Paper“

Rotilabo (0,35 mm)

Roth

6.1.4 Primer/Oligonukleotide

Primer für die klassische Klonierung über Schnittstellen

1) CHMP4-Varianten

Tabelle 6-2: Liste der verwendeten Primer für eine klassische Klonierung über Schnittstellen

Name	Sequenz 5'→ 3'
NotI-CHMP4B-for	AAGGAAAAAAGCGGCCGCATGTCGGTGTTCGGGAAGCTG
NotI-HA-CHMP4B-for	GTAGCGGCCGCATGTACCCATACGATGTGCCAGATTACGCTATG TCGGTGTTCGGGAAGCTG
NotI-Myc-CHMP4B-for	TAGCGGCCGCATGGAACAGAAATTAATTTCTGAAG AAGATTTAATGTCGGTGTTCGGGAAGCTG
KpnI-CHMP4B-1.0-rev	GACGGTACCTTACATGGATCCAGCCCAGTTCTC
NotI-Myc-CHMP4A-for-1.0	AAGGAAAAAAGCGGCCGCATGGAACAGAAATTAATTTCTGAAG AAGATTTAATGTCGCGGCGGCCCTG
KpnI-CHMP4A-rev	GACGGTACCTCAGGATACCCACTCAGCCAACTGC
NotI-Myc-CHMP4C-for	GTAGCGGCCGCATGGAACAGAAATTAATTTCTGAAGAAGATTT AATGAGCAAGTTGGGCAAGTTC
KpnI-CHMP4C-rev	GACGGTACCTTAGGTAGCCCAAGCTGCC

2) Shrub-Varianten

Tabelle 6-3: Liste der verwendeten Primer für die verschiedenen Shrub-Varianten

Name	Sequenz 5'→3'
NotI-shrb-cDNA-for	AAGGAAAAAAGCGGCCGCATGAGTTTCTTCGGGAAGATGTTCCG
NotI-V5-shrb-for	AAGGAAAAAAGCGGCCGCATGATCCCTAACCTCTCCTCGGTCT CGATATGAGTTTCTTCGGGAAGATGTTCCG
NotI-HA-3xGly-shrb-for	ATAAGAATGCGGCCGCATGTACCCATACGACGTTCCAGACT ACGCTGGCGGCCGCATGAGTTTCTTCGGGAAGATG
NotI-HA-shrb-for (ohne 3x Gly Linker)	AAGGAAAAAAGCGGCCGCATGTACCCATACGATGTGCCAGATT ACGCTATGAGTTTCTTCGGGAAGATGTTCCG
KpnI-shrb-rev	GACGGTACCTTAGTTGGACCAGGATAAAAAGCTGC
KpnI-Myc-shrb-cDNA-rev	GACGGTACCTTATAAATCTTCTTCAGAAATTAATTTCTGTT CGTTGGACCAGGATAAAAAGCTGC

Primer für die Mutagenese PCRs**Tabelle 6-4: Liste der verwendeten Primer für die verschiedenen Mutagenese PCRs**

Name	Sequenz 5'→3'
Myc-CHMP4B-E44K-for	CAAGAAACAGGAGTTCCTGAAGAAGAAAATCGAGCAGG
Myc-CHMP4B-E44K-rev	CCTGCTCGATTTTCTTCTTCAGGAACCTCCTGTTTCTTG
Myc-CHMP4B-R63E-for	CGGCACCAAAAACAAGGAGGCGGCCCTCCAGGCA
Myc-CHMP4B-R63E-rev	TGCCTGGAGGGCCGCCTCCTTGTTTTTGGTGCCG
Myc-CHMP4B-R71E-for	GCCCTCCAGGCACTGAAGGAGAAGAAGAGGTATGAGAAGC
Myc-CHMP4B-R71E-rev	GCTTCTCATACCTCTTCTTCTCCTTCAGTGCCTGGAGGGC
Myc-CHMP4B-R74E-for	GCACTGAAGCGTAAGAAGGAGTATGAGAAGCAGCTGG
Myc-CHMP4B-R74E-rev	CCAGCTGCTTCTCATACTCCTTCTTACGCTTCAGTGC
Myc-CHMP4B-D83K-for	GCAGCTGGCGCAGATCAAGGGCACATTATCAACC
Myc-CHMP4B-D83K-rev	GGTTGATAATGTGCCCTTGATCTGCGCCAGCTGC
Myc-CHMP4B-D90K-for	GCACATTATCAACCATCAAGTTCAGCGGGAGGC
Myc-CHMP4B-D90K-rev	GCCTCCCGCTGGAACCTTGATGGTTGATAATGTGC

Primer für das Gibson-Assembly**Tabelle 6-5: Liste der verwendeten Primer für das Gibson-Assembly**

Name	Sequenz 5'→3'
<i>pattB-hLGD1ΔDM14 (1-3)-HA</i>	
5'UTR_NotI_Start_hLGD1_for	TAAACAGCCTCTGTGCAATCAAGGGCGGCCGCATGATGCCA GGCCAAGACCTC
zw-3/4_hLGD1_rev	GGATGGGGGGAAATCCGTGTAGCCCCTGAGATGCTCCG
hLGD1_zw.3/4	CATCTCAGGGGCTACACGGATTTCCCCCATCCCTGGC
3'UTR_KpnI_STOP_HA_hLGD1_rev	TTTTATTTAAATTTTCTTGTTTAGCCGGTACCTCAAGCGTA ATCTGGCACATCGTATGGGTAAGCCAAGCCCCTGGGCTCCAG AAC
<i>pattB-shrubP-eGFP-Shrub</i>	

NotI-eGFP for	GGGTGAAAAAACAGATCAGCCAGGGCGGCCGCATGGTGAGC AAGGGCGAGGAGC
EGFP-shrub rev	TTGCCGCCGAACATCTTCCCAGAAACTCATGCCGCCGCC TTGTACAGCTCGTCCATGCCG

Dchmp7-Oligonukleotide für CRISPR/Cas

Tabelle 6-6: Liste der verwendeten Oligonukleotide für CRISPR/Cas

Name	Sequenz 5'→3'
CR_Dchmp7_T1(-)_sense	GTCGAGTTCGCCATGTTTCGATCG
CR_Dchmp7_T1(-)_antisense	AAACCGATCGAAACATGGCGAACT
CR_Dchmp7_T18(-)_sense	GTCGGCAGGACAACGGTAGAATGC
CR_Dchmp7_T18(-)_antisense	AAACGCATTCTACCGTTGTCCTGC

Sequenzierungs-Primer

Tabelle 6-7: Liste der verwendeten Sequenzierungs-Primer

Name	Sequenz 5'→3'	Herkunft
shrb 5'UTR	CGGCAATCGGTATCGGGTG	(Masterarbeit Bäumers 2015)
shrb 3'UTR	TTCTCTCCCTCGCTTCGAAC	
shrbcDNA-for	GATGGATGACATTGCCGAGCAG	diese Arbeit
pattb_resc_cterm	TGTGAGGGATATTTACAAAC	(Dissertation Schulz 2015)
pattb_resc_nterm	CTGTTGCGACGCAAAAATTT	
hlgd1-1744-F (#35)	ATCTGGCAGACCTGTTGATC	
(S)-CC2D1B-1640 (#5)	TGGAGCGAGTGCAGCCAGTGAT	
Dvps20-Seq_Exon_FOR	GACCAGGACAAGGCGGTTCTG	diese Arbeit
Dvps20-Seq-3'UTR_REV	GGTTCTATGCCTCCACCAGGAC	diese Arbeit

6.1.5 Vektoren

Tabelle 6-8: Liste der verwendeten Vektoren/Plasmide

Name	Herkunft	Verwendung
<i>pattB-shrubP-shrub</i>	(Masterarbeit Bäumers 2015)	Ausgangspunkt für alle <i>pattB-shrubP</i> -Konstrukte Template für: „ <i>HA-shrub</i> “-Insert „ <i>V5-shrub</i> “-Insert „ <i>HA-3xGly-shrub</i> “-Insert „ <i>shrub-Myc</i> “-Insert
<i>BAC^{shrub}-CHMP4A</i>	(Masterarbeit Bäumers 2015)	Template für: „ <i>Myc-CHMP4A</i> “-Insert
<i>BAC^{shrub}-CHMP4B</i>	(Diplomarbeit Bohnen 2014)	Template für:

		„CHMP4B“-Insert „Myc-CHMP4B“-Insert „HA-CHMP4B“-Insert
<i>BAC^{shrub}-CHMP4C</i>	(Diplomarbeit Bohnen 2014)	Template für: „Myc-CHMP4C“-Insert
<i>pIC133</i>	addgene	Template für eGFP
<i>pattB lgdP-hLGD1-HA</i>	(Drusenheimer et al. 2015)	Ausgangspunkt für <i>pattB lgdP-hLGD1ΔDM14 1-3-HA</i>
<i>lgdP-hLGD1ΔDM14 1-2-HA</i>	(Dissertation Schulz 2015)	Ausgangspunkt für Mutagenese PCR
<i>pwhite-pCFD3: U6:3-gRNA</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Ursprungs-Plasmid <i>pCFD3: U6:3-gRNA</i> (Port et al. 2014) - modifiziertes Plasmid <i>pwhite-pCFD3: U6:3-gRNA</i> von Prof. Dr. Herman Aberle (Institut für Funktionelle Zellmorphologie, HHU) 	<p>Zur Expression der beiden sgRNAs T1 und T18</p> <ul style="list-style-type: none"> - das modifizierte Plasmid verfügt über ein <i>mini-white</i> zur besseren Selektion von transgenen Fliegen

BAC^{shrub} (BAC-Klon, CH322-47020 (Venken et al. 2009))

Tabelle 6-9: Informationen zu den annotierten Genen, die *BAC^{shrub}* zusätzlich zu der genomischen Region von *shrub* enthält

<i>α/β hydrolase 1 (Hydr1, CG8058)</i>	scheint an zellulären lipidmetabolischen Prozessen beteiligt zu sein (Wisotzkey et al. 2003) (Flybase ID FBgn0033382)
<i>alicorn (alc, CG8057)</i>	codiert für eine regulatorische Untereinheit der AMP-aktivierten Proteinkinase, AMPK. Dieses Enzym ist entscheidend für den Erhalt der neuronalen Zell-Homöostase und der apico-basalen Zellpolarität im epithelialen Gewebe (Spasic et al. 2008) (Flybase ID FBgn0260972)
<i>pre-mRNA processing factor 38 (Prp38, CG30342)</i>	Das Ribonucleoprotein Prp38 ist sowohl involviert in die Reifung als auch in der Aktivierung des Spliceosomes und reguliert die G2/M Transition im Zellzyklus (Andersen und Tapon 2008) (Flybase ID FBgn0050342)
<i>CG30344</i>	codiert vermutlich für einen an der Sekretion beteiligten Transporter in den malpighischen Gefäßen (Nierentubuli) von <i>Drosophila melanogaster</i> (Chahine und O'Donnell 2009) (FBgn0050344)
<i>CG8788</i> und <i>CG44286</i>	Ihre molekulare Funktion ist unbekannt. Der biologische Prozess, in den sie involviert sind, ist unbekannt.

<i>CG18659</i> und <i>CG30345</i>	Sie sind nicht vollständig im BAC-Klon enthalten. Sie sind an den jeweiligen Enden der genomischen Sequenz des BAC-Klons lokalisiert.
-----------------------------------	--

BAC^{vps20} (BAC-Klon, CH322-09008 (Venken et al. 2009))

Tabelle 6-10: Informationen zu den annotierten Genen, die *BAC^{vps20}* zusätzlich zu der genomischen Region von *vps20* enthält

<i>RpS16</i> (<i>CG4046</i>)	codiert für einen strukturellen Bestandteil von Ribosomen. Ribosomal protein S16 (RpS16) ist involviert in den Prozess der Translation (Alonso und Santaren 2006, Marygold et al. 2007) (FBgn0034743)
<i>CG4329</i>	involviert in sensorische Wahrnehmung von Geräuschen (Senthilan et al. 2012). (FBgn0034745)
<i>CG4269</i> und <i>CG4294</i>	Ihre molekulare Funktion ist unbekannt. Der biologische Prozess, in den sie involviert sind, ist unbekannt. (FBgn0034741 und FBgn0034742)
<i>CG33143</i> und <i>CR45328</i>	Sie sind nicht vollständig im BAC-Klon enthalten. Sie sind an den jeweiligen Enden der genomischen Sequenz des BAC-Klons lokalisiert.
<i>snoRNA:Me28S-G2173-RA</i>	snoRNA (small nucleolar ribonucleic acid) genaue Funktion unbekannt
1) <i>snoRNA:Psi28S-1175a</i> 2) <i>snoRNA:Psi28S-1175b</i> 3) <i>snoRNA:Psi28S-1175c</i>	snoRNA (small nucleolar ribonucleic acid) genaue Funktion unbekannt
<i>snoRNA:Or-aca1</i>	snoRNA (small nucleolar ribonucleic acid) genaue Funktion unbekannt

6.1.6 Antikörper

Primärantikörper

Tabelle 6-11: Auflistung der verwendeten Primärantikörper für Western Blot-Analysen (WB) und immunhistochemische Färbungen (IHC) an Flügelimaginalscheiben. Zusätzlich sind die Herkunft, die eingesetzte Verdünnung und der Hersteller angeben.

Antigen	Generiert in	Verdünnung	Hersteller
HA	Kaninchen	1:2000 (IHC)	Cell Signaling Technology (C29F4)
NECD	Maus	1:100 (IHC)	DSHB (C458.2H)
Rab5	Maus	1:500 (IHC)	Abcam (ab91261)
Wingless (Wg)	Maus	1:500 (IHC)	DSHB (4D4)

c-Myc	Kaninchen	1:1500 (IHC)	abcam (ab9106)
c-Myc	Maus	1:1000 (IHC)	Cell Signaling Technology (9B11)
β -Galaktosidase (β -Gal)	Kaninchen	1:500 (IHC) (präabsorbiert)	MP Biomedicals (urspr. Cappel)
Discs large (Dlg)	Maus	1:500 (IHC)	DSHB (4F3)
E-cadherin (E-cad)	Ratte	1:50 (IHC)	DSHB (DCAD2)
Peanut	Maus	1:1000 (WB)	DSHB (4C9H4)
Snf7	Kaninchen	1:5000 (WB)	(Teis et al. 2008)
Shrub	Kaninchen	1:50 (IHC)	(Bachelorarbeit Brüser 2011)
CHMP4B	Kaninchen	1:200 (IHC)	Santa Cruz C12 sc-82556

Sekundärantikörper

Tabelle 6-12: Auflistung der verwendeten Sekundärantikörper für Western Blot-Analysen (WB) und immunhistochemische Färbungen (IHC) an Flügelimaginalscheiben. Zusätzlich sind die Herkunft, die eingesetzte Verdünnung und der Hersteller angeben.

Antigen + gekoppelt mit	Generiert in	Verdünnung	Hersteller
Maus + Alexa-488	Ziege	1:500 (IHC)	Invitrogen
Maus + Alexa-568	Ziege	1:500 (IHC)	Invitrogen
Maus + Alexa-647	Ziege	1:500 (IHC)	Invitrogen
Kaninchen + Alexa-488	Ziege	1:500 (IHC)	Invitrogen
Kaninchen + Alexa-568	Ziege	1:500 (IHC)	Invitrogen
Kaninchen + Alexa-647	Ziege	1:500 (IHC)	Invitrogen
Ratte + Alexa 647	Ziege	1:500 (IHC)	Invitrogen
Maus + HRP	Ziege	1:5000 (WB)	Jackson Immuno Research
Kanninchen + HRP	Ziege	1:5000 (WB)	Jackson Immuno Research

6.1.7 Chemisch kompetente Bakterienstämme

Tabelle 6-13: Liste der chemisch kompetenten Bakterienstämme

Name	Hersteller	Genotyp
DH5- α	Invitrogen	F- ϕ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ -
TOP10	Invitrogen	F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 araD139 Δ (araleu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG

6.1.8 Fliegenstämme

Tabelle 6-14: Auflistung der verwendeten Fliegenstämme (*Drosophila melanogaster*)

Genotyp	Referenz (Anmerkungen)
<i>wt</i>	Stammsammlung AG Klein
<i>w⁻</i>	Stammsammlung AG Klein
<i>w⁻; If/CyO^{wg-lacZ}; MKRS/TM6B</i>	Multibalancer (MB) Stamm
<i>w⁻; If/SM6a-TM6B</i>	Compound Balancer
<i>y w M(eGFP.vas.int.Dm)ZH-2A ; M(3xP3-RFP.attP)ZH-86Fb</i>	(Bischof et al. 2007) attP 86Fb Chr. 3L
<i>y w M(eGFP.vas.int.Dm) ZH-2A; M(3xP3-RFP.attP')ZH-68E</i>	(Bischof et al. 2007) attP 68E Chr. 3L
Aufstellung der verwendeten Allele	
<i>w⁻; shrub⁴⁻¹ FRTG13/CyO^{wg-lacZ}; MKRS/TM6B</i>	(Sweeney et al. 2006)
<i>w⁻; lgd^{d7} FRT40A/CyO^{wg-lacZ}; MKRS/TM6B</i>	(Jaekel und Klein 2006)
<i>w⁻; lgd^{SH495}/CyO^{wg-lacZ}; MKRS/TM6B</i>	(Oh et al. 2003, Jaekel und Klein 2006)
<i>w⁻; vps20^{l3} FRT42D/CyO^{wg-lacZ}; MKRS/TM6B</i>	(Vaccari et al. 2009)
<i>w⁻; vps20^{rG270}/CyO^{wg-lacZ}; MKRS/TM6B</i>	(Kahsai et al. 2016) #BL 12060
<i>w⁻; vps25^{Pb2931}FRT42D/CyO^{wg-lacZ}; MKRS/TM6B</i>	(Thompson et al. 2005)
<i>w⁻; hrs^{D28} FRT40A/CyO^{wg-lacZ}; MKRS/TM6B</i>	(Lloyd et al. 2002)
<i>w⁻; If/CyO^{wg-lacZ}; Dchmp^{737.0} FRT2A/TM6B</i>	diese Arbeit (sgRNA T1)
<i>w⁻; If/CyO^{wg-lacZ}; Dchmp^{79.0} FRT2A/TM6B</i>	diese Arbeit (sgRNA T1)
<i>w⁻; If/CyO^{wg-lacZ}; Dchmp^{72.6} FRT2A/TM6B</i>	diese Arbeit (sgRNA T18)
<i>w⁻; If/CyO^{wg-lacZ}; Dchmp^{73.6} FRT2A/TM6B</i>	diese Arbeit (sgRNA T18)
<i>w⁻; If/CyO^{wg-lacZ}; Dchmp^{76.8} FRT2A/TM6B</i>	diese Arbeit (sgRNA T18)
weitere Stämme	
<i>w⁻; lgd^{d7} FRT40A; Gbe+Su(H)-lacZ/SM6a-TM6B</i>	Stammsammlung AG Klein
<i>w⁻; lgd^{d7} FRT40A/CyO^{Tb-RFP}</i>	Stammsammlung AG Klein
<i>w⁻; shrub⁴⁻¹ FRTG13; Gbe+Su(H)-lacZ/SM6a-TM6B</i>	Stammsammlung AG Klein
<i>w⁻; shrub⁴⁻¹ FRTG13; +/-SM6a-TM6B</i>	Stammsammlung AG Klein
<i>w⁻; hrs^{D28} FRT40A; Dchmp^{737.0} FRT2A/SM6a-TM6B</i>	diese Arbeit
<i>w⁻; vps25^{Pb2931} FRT42D; Dchmp^{737.0} FRT2A/SM6a-TM6B</i>	diese Arbeit
<i>w⁻; shrub⁴⁻¹ FRTG13; Dchmp^{737.0} FRT2A/SM6a-TM6B</i>	diese Arbeit
<i>w⁻; lgd^{d7} FRT40A; Dchmp^{737.0} FRT2A/SM6a-TM6B</i>	diese Arbeit
Verwendete Gal4-Treiberlinien	
<i>hhGal4</i>	(Tanimoto et al. 2000)
<i>hhGal4 tubGal80^{ts}</i>	<i>hhGal4</i> rekombiniert mit BL#7018 (DissertationTroost 2013)
<i>ciGal4</i>	(Croker et al. 2006)

<i>ptcGal4</i>	(Speicher et al. 1994)
<i>enGal4</i>	FBti0007092
<i>enGal4 tubGal80^{ts}</i>	enGal4 rekombiniert mit BL#7018
<i>w</i> ; <i>NRE-GFP, hhGal4 tubGal80^{ts}/SM6a-TM6b</i>	Stammsammlung AG Klein
Verwendete UAS-Effektorlinien	
<i>UAS vps4-RNAi</i>	VDRC #35126
<i>UAS HA-Dchmp7</i>	diese Arbeit
<i>UAS Rab7-RNAi (III.)</i>	VDRC#40337
<i>UAS Myc-shrub⁹⁵</i>	(Dissertation Jäckel 2010)
<i>UAS Myc-shrubΔauto^{15a}</i>	(Dissertation Jäckel 2010)
Klonale Analyse	
<i>y w UbxFlp^(w+) FRT19A^(ry+); If/CyO^{Tb1}</i>	BL 42730
<i>y w UbxFlp^(w+) FRT19A^(ry+); FRT40A 2xGFP/CyO^{Tb1}</i>	Stammsammlung AG Klein
<i>y w UbxFlp^(w+) FRT19A^(ry+); FRTG13 2x GFP/CyO^{Tb1}</i>	Stammsammlung AG Klein
<i>y w UbxFlp^(w+) FRT19A^(ry+); +; FRT2A His-RFP/TM6B</i>	Stammsammlung AG Klein
<i>w</i> ; <i>ptcGal4 UAS-Flp NRE-GFP/CyO^{wg-lacZ}; FRT2A His-RFP/TM6B</i>	Stammsammlung AG Klein
<i>w</i> ; <i>ciGal4 UAS-Flp /CyO^{wg-lacZ}; 2x GFP FRT2A RFP/TM6B</i>	Stammsammlung AG Klein
<i>hsFlp; lgd^{d7} FRT40A/CyO^{wg-lacZ}; FRT2A 2xGFP/TM6B</i>	diese Arbeit
BAC^{vps20}	
<i>w</i> -; <i>vps20^{l3} FRT42D; attP 68E BAC^{vps20}/SM6a-TM6B</i>	diese Arbeit
<i>w</i> -; <i>vps20^{rG270}; attP 68E BAC^{vps20}/SM6a-TM6B</i>	diese Arbeit
<i>w</i> -; <i>lgd^{d7} FRT40A; attP 68E BAC^{vps20}/SM6a-TM6B</i>	diese Arbeit
verwendete Reportergenkonstrukte und Marker	
<i>tub-Rab7YFP</i>	(Marois et al. 2006)
<i>Gbe+Su(H)-lacZ</i>	(Furriols und Bray 2001), X. und III. Chromosom
<i>NRE-GFP (II)</i>	(Housden et al. 2012)
lgdP-Konstrukte	
<i>w</i> -; <i>lgd^{d7} FRT40A; attP 68E lgdP-lgd-HA/SM6a-TM6B</i>	diese Arbeit
<i>w</i> -; <i>lgd^{d7} FRT40A; attP 68E lgdP-hLGD1-HA/SM6a-TM6B</i>	(Masterarbeit Bäumers 2015)
<i>w</i> -; <i>lgd^{d7} FRT40A; attP 68E lgdP- hLGD1ΔDM14 1-2-HA/SM6a-TM6B</i>	diese Arbeit
<i>w</i> -; <i>lgd^{d7} FRT40A; attP 68E lgdP- hLGD1ΔDM14 1-2 R412E-HA/SM6a-TM6B</i>	diese Arbeit
<i>w</i> -; <i>lgd^{d7} FRT40A; attP 68E lgdP- hLGD1ΔDM14 1-2 R416E-HA/SM6a-TM6B</i>	diese Arbeit
<i>w</i> -; <i>lgd^{d7} FRT40A; attP 68E lgdP-hLGD1ΔDM14 1-3-HA/SM6a-TM6B</i>	diese Arbeit

<i>w</i> -; <i>lgd</i> ^{d7} <i>FRT40A</i> ; <i>attP 68E lgdP-hLGD2-HA/SM6a-TM6B</i>	(Masterarbeit Bäumers 2015)
BAC^{shrub}-Konstrukte	
<i>w</i> ; +/+; <i>BAC^{shrub}</i>	diese Arbeit
<i>w</i> ; +/+; <i>BAC^{shrub-mut2}</i>	diese Arbeit
<i>w</i> ; <i>shrub</i> ⁴⁻¹ <i>FRTG13</i> ; <i>attP 86Fb BAC^{shrub}/SM6a-TM6B</i>	(Diplomarbeit Bohnen 2014)
<i>w</i> ; <i>shrub</i> ⁴⁻¹ <i>FRTG13</i> ; <i>attP 86Fb BAC^{shrub-cDNA}/SM6a-TM6B</i>	diese Arbeit
<i>w</i> ; <i>shrub</i> ⁴⁻¹ <i>FRTG13</i> ; <i>attP 86Fb BAC^{shrub-mut2}/SM6a-TM6B</i>	(Diplomarbeit Bohnen 2014)
<i>w</i> ; <i>shrub</i> ⁴⁻¹ <i>FRTG13</i> ; <i>attP 86Fb BAC^{shrub-snf7}/SM6a-TM6B</i>	diese Arbeit
<i>w</i> ; <i>shrub</i> ⁴⁻¹ <i>FRTG13</i> ; <i>attP 86Fb BAC^{shrub-CHMP4A}/SM6a-TM6B</i>	diese Arbeit
<i>w</i> ; <i>shrub</i> ⁴⁻¹ <i>FRTG13</i> ; <i>attP 86Fb BAC^{shrub-CHMP4A}, Gbe+Su(H)-lacZ/SM6a-TM6B</i>	diese Arbeit
<i>w</i> ; <i>shrub</i> ⁴⁻¹ <i>FRTG13</i> ; <i>attP 86Fb BAC^{shrub-CHMP4B}/SM6a-TM6B</i>	(Diplomarbeit Bohnen 2014)
<i>w</i> ; <i>shrub</i> ⁴⁻¹ <i>FRTG13</i> ; <i>attP 86Fb BAC^{shrub-CHMP4B-mut2}/SM6a-TM6B</i>	(Masterarbeit Bäumers 2015)
<i>w</i> ; <i>shrub</i> ⁴⁻¹ <i>FRTG13</i> ; <i>attP 86Fb BAC^{shrub-CHMP4B}, Gbe+Su(H)-lacZ/SM6a-TM6B</i>	(Masterarbeit Bäumers 2015)
<i>w</i> ; <i>shrub</i> ⁴⁻¹ <i>FRTG13</i> ; <i>attP 86Fb BAC^{shrub-CHMP4B}/SM6a-TM6B</i>	(Diplomarbeit Bohnen 2014)
<i>w</i> ; <i>shrub</i> ⁴⁻¹ <i>FRTG13</i> ; <i>attP 86Fb BAC^{shrub-CHMP4C}/SM6a-TM6B</i>	(Masterarbeit Bäumers 2015)
<i>w</i> ; <i>shrub</i> ⁴⁻¹ <i>FRTG13</i> ; <i>attP 86Fb BAC^{shrub-CHMP4C}, Gbe+Su(H)-lacZ/SM6a-TM6B</i>	diese Arbeit
<i>w</i> ; <i>lgd</i> ^{d7} <i>FRT40A</i> ; <i>attP 86Fb BAC^{shrub}/SM6a-TM6B</i>	(Masterarbeit Bäumers 2015)
<i>w</i> ; <i>lgd</i> ^{d7} <i>FRT40A</i> ; <i>attP 86Fb BAC^{shrub-mut2}/SM6a-TM6B</i>	diese Arbeit
<i>w</i> ; <i>lgd</i> ^{d7} <i>FRT40A</i> ; <i>attP 86Fb BAC^{shrub-snf7}/SM6a-TM6B</i>	diese Arbeit
<i>w</i> ; <i>lgd</i> ^{d7} <i>FRT40A</i> ; <i>attP 86Fb BAC^{shrub-CHMP4B}/SM6a-TM6B</i>	(Masterarbeit Bäumers 2015)
<i>w</i> ; <i>lgd</i> ^{d7} <i>FRT40A</i> ; <i>attP 86Fb BAC^{shrub-CHMP4B}, Gbe+Su(H)-lacZ/SM6a-TM6B</i>	(Masterarbeit Bäumers 2015)
<i>w</i> ; <i>lgd</i> ^{d7} <i>FRT40A</i> ; <i>attP 86Fb BAC^{shrub-CHMP4C}/SM6a-TM6B</i>	diese Arbeit
<i>w</i> ; <i>lgd</i> ^{d7} <i>FRT40A</i> ; <i>attP 86Fb BAC^{shrub-CHMP4C}, Gbe+Su(H)-lacZ/SM6a-TM6B</i>	diese Arbeit
CHMP4 und hLGD-Kombinationen	
<i>w</i> ; <i>lgd</i> ^{d7} , <i>shrub</i> ⁴⁻¹ ; <i>attP 86Fb BAC^{shrub-CHMP4A}, attP 68E lgdP-hLGD1-HA/SM6a-TM6B</i>	diese Arbeit
<i>w</i> ; <i>lgd</i> ^{d7} , <i>shrub</i> ⁴⁻¹ ; <i>attP 86Fb BAC^{shrub-CHMP4A}, attP 68E lgdP-hLGD2-HA/SM6a-TM6B</i>	diese Arbeit

<i>w; lgd^{d7}, shrub⁴⁻¹; attP 86Fb BAC^{shrub}-CHMP4B, attP 68E lgdP-lgd-HA/SM6a-TM6B</i>	diese Arbeit
<i>w; lgd^{d7}, shrub⁴⁻¹; attP 86Fb BAC^{shrub}-CHMP4B, attP 68E lgdP-hLGD1-HA/SM6a-TM6B</i>	(Masterarbeit Bäumers 2015)
<i>Gbe+Su(H)-lacZ; lgd^{d7}, shrub⁴⁻¹; attP 86Fb BAC^{shrub}-CHMP4B, attP 68E lgdP-hLGD1-HA/SM6a-TM6B</i>	(Masterarbeit Bäumers 2015)
<i>w; lgd^{d7}, shrub⁴⁻¹; attP 86Fb BAC^{shrub}-CHMP4B, attP 68E lgdP-hLGD1ΔDM14 1-2-HA/SM6a-TM6B</i>	diese Arbeit
<i>w; lgd^{d7}, shrub⁴⁻¹; attP 86Fb BAC^{shrub}-CHMP4B, attP 68E lgdP-hLGD1ΔDM14 1-2 R412E-HA/SM6a-TM6B</i>	diese Arbeit
<i>w; lgd^{d7}, shrub⁴⁻¹; attP 86Fb BAC^{shrub}-CHMP4B, attP 68E lgdP-hLGD1ΔDM14 1-2 R416E-HA/SM6a-TM6B</i>	diese Arbeit
<i>w; lgd^{d7}, shrub⁴⁻¹; attP 86Fb BAC^{shrub}-CHMP4B, attP 68E lgdP-hLGD1ΔDM14 1-3-HA/SM6a-TM6B</i>	diese Arbeit
<i>w; lgd^{d7}, shrub⁴⁻¹; attP 86Fb BAC^{shrub}-CHMP4B, attP 68E lgdP-hLGD2-HA/SM6a-TM6B</i>	(Masterarbeit Bäumers 2015)
<i>Gbe+Su(H)-lacZ; lgd^{d7}, shrub⁴⁻¹; attP 86Fb BAC^{shrub}-CHMP4B, attP 68E lgdP-hLGD2-HA/SM6a-TM6B</i>	(Masterarbeit Bäumers 2015)
<i>w; lgd^{d7}, shrub⁴⁻¹; attP 86Fb BAC^{shrub}-CHMP4C, attP 68E lgdP-hLGD1-HA/SM6a-TM6B</i>	diese Arbeit
<i>w; lgd^{d7}, shrub⁴⁻¹; attP 86Fb BAC^{shrub}-CHMP4C, attP 68E lgdP-hLGD2-HA/SM6a-TM6B</i>	diese Arbeit
shrubP-Konstrukte	
<i>w; shrub⁴⁻¹FRTG13; attP 86Fb shrubP-shrub/SM6a-TM6B</i>	(Masterarbeit Bäumers 2015)
<i>w; shrub⁴⁻¹FRTG13; attP 86Fb shrubP-Myc-shrub/SM6a-TM6B</i>	diese Arbeit
<i>w; shrub⁴⁻¹FRTG13; attP 86Fb shrubP-shrub-Myc/SM6a-TM6B</i>	diese Arbeit
<i>w; shrub⁴⁻¹FRTG13; attP 86Fb shrubP-V5-shrub/SM6a-TM6B</i>	diese Arbeit
<i>w; shrub⁴⁻¹FRTG13; attP 86Fb shrubP-HA-3xGly-shrub/SM6a-TM6B</i>	diese Arbeit
<i>w; shrub⁴⁻¹FRTG13; attP 86Fb shrubP-HA-shrub/SM6a-TM6B</i>	diese Arbeit
<i>w; shrub⁴⁻¹FRTG13; attP 86Fb shrubP-eGFP-LAP-shrub/SM6a-TM6B</i>	diese Arbeit
<i>w; shrub⁴⁻¹FRTG13; attP 86Fb shrubP-eGFP-shrub/SM6a-TM6B</i>	diese Arbeit
<i>w; shrub⁴⁻¹FRTG13; attP 86 Fb shrubP-Myc-CHMP4A/SM6a-TM6B</i>	diese Arbeit
<i>w; shrub⁴⁻¹FRTG13; attP 86 Fb shrubP-HA-CHMP4B/SM6a-TM6B</i>	diese Arbeit
<i>w; shrub⁴⁻¹FRTG13; attP 86 Fb shrubP-Myc-CHMP4B/SM6a-TM6B</i>	diese Arbeit

<i>w</i> ; <i>shrub</i> ⁴⁻¹ <i>FRTG13</i> ; <i>attP 86 Fb shrubP-Myc-CHMP4C/SM6a-TM6B</i>	diese Arbeit
Rekrutierung zur endosomalen Membran	
<i>w</i> ; <i>enGal4 tubGal80^{ts}</i> ; <i>attP 86 Fb shrubP-Myc-CHMP4A/SM6a-TM6B</i>	diese Arbeit
<i>w</i> ; <i>enGal4 tubGal80^{ts}</i> ; <i>attP 86 Fb shrubP-HA-CHMP4B/SM6a-TM6B</i>	diese Arbeit
<i>w</i> ; <i>enGal4 tubGal80^{ts}</i> ; <i>attP 86 Fb shrubP-Myc-CHMP4C/SM6a-TM6B</i>	diese Arbeit
<i>w</i> ; <i>UAS vps4-RNAi</i> ; <i>attP 86 Fb shrubP-Myc-shrub/SM6a-TM6B</i>	diese Arbeit
CHMP4B-Polymerisation	
<i>w</i> ; <i>shrub</i> ⁴⁻¹ <i>FRTG13</i> ; <i>attP 86 Fb shrubP-Myc-CHMP4B E44K/SM6a-TM6b</i>	diese Arbeit
<i>w</i> ; <i>shrub</i> ⁴⁻¹ <i>FRTG13</i> ; <i>attP 86 Fb shrubP-Myc-CHMP4B R63E/SM6a-TM6b</i>	diese Arbeit
<i>w</i> ; <i>shrub</i> ⁴⁻¹ <i>FRTG13</i> ; <i>attP 86 Fb shrubP-Myc-CHMP4B R71E/SM6a-TM6b</i>	diese Arbeit
<i>w</i> ; <i>shrub</i> ⁴⁻¹ <i>FRTG13</i> ; <i>attP 86 Fb shrubP-Myc-CHMP4B R74E/SM6a-TM6b</i>	diese Arbeit
<i>w</i> ; <i>shrub</i> ⁴⁻¹ <i>FRTG13</i> ; <i>attP 86 Fb shrubP-Myc-CHMP4B D83K/SM6a-TM6b</i>	diese Arbeit
<i>w</i> ; <i>shrub</i> ⁴⁻¹ <i>FRTG13</i> ; <i>attP 86 Fb shrubP-Myc-CHMP4B E90K/SM6a-TM6b</i>	diese Arbeit
CRISPR/Cas9 und sgRNA	
<i>w</i> ; <i>nos-Cas9</i> ; <i>FRT2A/SM6a-TM6B</i>	diese Arbeit Anmerkung nos-Cas9: #BL 78781
<i>w</i> ; <i>att51C U6:3-gRNA T1</i> ; <i>FRT2A/SM6a-TM6B</i>	diese Arbeit
<i>w</i> ; <i>att51C U6:3-gRNA T18</i> ; <i>FRT2A/SM6a-TM6B</i>	diese Arbeit

6.1.9 Geräte und Software

Tabelle 6-15: Auflistung der verwendeten Geräte, Software und Internetdatenbanken

Software	Axio Vision Rel. 4.8 und Rel. 4.9	Carl Zeiss
	Adobe Photoshop CS6	Adobe
	GraphPad Prism 7.0d	GraphPad Software
	CLC Sequence Viewer 8	Qiagen
	Chromas 2.6.2	Technelysium Pty Ltd
	Serial Cloner 2.6.1	SerialBasics
	UCSF Chimera 1.13.1	University of California, USA
	SnapGene Viewer	GSL Biotech LLC

	Fiji 1.51i	ImageJ (Schindelin et al. 2012)
	EndNote™ X8.2	Thomson Reuters
	Zeiss ZEN (blue edition) Version: 1.1.2.0	Carl Zeiss
	Zeiss ZEN (black edition) Version: 2.3 SP1	Carl Zeiss
	Microsoft Office 2019	Microsoft
	ImageSP	SYSPROG & TRS
Internetdatenbanken	NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
	EMBOSS Needle	https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/
	FlyBase	http://flybase.org/
	I-TASSER (Protein Structure & Function Predictions, Zhang Lab, University of Michigan)	https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/
	RCSB PDB (Protein Data Bank)	https://www.rcsb.org/
	flyCRISPR (Target Finder)	https://flycrispr.org/target-finder/
Mikroskope und Binokulare	Axio Imager Z1 mit ApoTome und AxioCam MRm	Carl Zeiss
	Zeiss Axio Plan 2 mit ApoTome und AxioCam MRm	Carl Zeiss
	ZEISS-EM 902A	Carl Zeiss
	Leica MZ16 A	Leica
Zentrifugen	Ultrazentrifuge: Avanti J-26 XP JX508L37	Beckmann Coulter
	Tischzentrifuge: Biofuge pico	Heraeus Instruments
	Tischzentrifuge: Fresco 21	Heraeus Instruments
Thermocycler	peqSTAR 2X	VWR PEQLAB
	TProfessional Thermo Cycler Gradient	Biometra
Taumler	Polymax 2040	Heidolph
Rollinkubator	RM 5	Cat-Ing
Schüttler	SM 30 A	Edmund Bühler GmbH
Inkubator	BE200 Incubator	Memmert GmbH & Co. KG
	Function Line B6	Heraeus
Wasserbad	GFL 1083	GFL
Heizblock	Mixing Block MB-102	Bioer

Konzentrationsbestimmung	NanoDrop™ 2000c Spektralphotometer	PEQLAB
Feinwaage	FA-110-4i	Faust
Geldokumentation	QUANTUM-System	PEQLAB
SDS-PAGE	Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell	Bio-Rad Laboratories
Western Blot	Trans-Blot Turbo	Bio-Rad Laboratories
Western Blot Dokumentation	ImageQuant™ LAS 4000	GE Healthcare
Trimmfräse	Leica EM TRIM2	Leica
Ultradünnschnitte	Ultracut	Reichert-Jung
Diamantmesser		DIATOME
Glasmesserbrecher	KnifeMaker Type7801	LKB

6.2 Molekularbiologische Methoden

6.2.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Standard-PCR

Standard-PCRs zur Amplifikation von DNA-Fragmenten für die klassische Klonierung über Schnittstellen oder auch für das Gibson Assembly wurden mittels Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (New England BioLabs) generiert. Die jeweilige PCR wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Mutagenese PCR

Für den Austausch einzelner Basenpaare in einem bereits existierenden Vektor wurden Mutagenese PCRs nach den Vorgaben des Kits QuikChange II Site-Directed Mutagenesis von Agilent Technologies durchgeführt. Die entsprechenden Primer (siehe 6.1.4) wurden nach Angaben dieses Protokolls designt.

Tabelle 6-16: Mutagenese PCR Ansatz

Menge	Komponente
5 µl	10x Pfu Puffer
1 µl	dNTP Mix
50 ng	Template DNA
125 ng	forward Primer
125 ng	reverse Primer
auf 50 µl	ddH ₂ O
+ 1 µl	Pfu Polymerase

Tabelle 6-17: Mutagenese PCR Programm

Zyklen	Schritt	Temperatur (°C)	Zeit
1x	Initiale Denaturierung	95	30 s
18x	Denaturierung	95	30 s
	Annealing	55	1 min
	Elongation	68	1 min/kb
1x	Pause	8	∞

Im Anschluss an die PCR wurde eine Restriktionsspaltung mit 1 µl *DpnI* (10 U/µl) für 1 h durchgeführt. Es erfolgte eine DNA-Aufreinigung mit Hilfe des Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit von Zymo Research. Hierfür wurden 100 µl des ADB Puffers zu den 52 µl Restriktionsansatz gegeben. Die weiteren Schritte erfolgten nach dem Protokoll des Herstellers. Die DNA wurde in 15 µl eluiert. Anschließend wurden die chemisch kompetenten Bakterien mit 5 µl der eluierten DNA transformiert.

6.2.2 Gibson Assembly

Gibson Assembly ist eine Methode, die es erlaubt mehrere DNA-Fragmente aufgrund von zueinander komplementären Überhängen in einer einzelnen isothermen Reaktion zu verbinden (Gibson et al. 2009). Ziel ist es ein neues Plasmid zu generieren ohne dafür klassische Schnittstellen verwenden zu müssen. Die einzelnen DNA-Fragmente werden so gewählt, dass sie Überhänge von jeweils 32 Basenpaaren mit dem vorherigen und dem nachfolgenden Fragment aufweisen. In dem Reaktionsansatz befinden sich eine 5'-Exonuklease, eine DNA-Polymerase und eine DNA-Ligase. Durch die 5'-Exonuklease werden die Überhänge einzelsträngig, sodass sich die DNA-Fragmente aneinander anlagern können. Die DNA-Polymerase schließt zusammen mit der DNA-Ligase die Lücken in dem neu entstandenen, zirkulären Plasmid.

Die DNA-Fragmente für das Gibson Assembly lassen sich klassisch mittels PCR (siehe 6.2.1) oder Restriktionsspaltung (siehe 6.2.8) generieren.

Der DNA-Mix für das Gibson Assembly lässt sich wie folgt berechnen:

- Vektor-Rückgrat: 12 ng pro 1000 bp
- Die anderen DNA-Fragmente werden entweder im Verhältnis von 4:1 oder 8:1 zu dem Vektor-Rückgrat eingesetzt:

- Verhältnis von 4:1: für Fragmente, die 1/2-1/4 so groß wie das Vektor-Rückgrat sind
- Verhältnis von 8:1: für Fragmente, die < 1/4 so groß wie das Vektor-Rückgrat sind

Exemplarische Berechnung für ein Verhältnis von 8:1

Masse Vektor-Rückgrat [ng] = Größe Vektor-Rückgrat [kbp] x12

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

Gibson Assembly Enzym Mastermix:

Tabelle 6-18: Zusammensetzung des Gibson Assembly Enzym Mastermix

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

- aliquotieren (15µl Ansätze) und Lagerung bei -20 C

Vorgehen:

- 15 µl Gibson Assembly Enzyme Mastermix auf Eis auftauen lassen
- exakt 5 µl DNA-Mix hinzufügen
- auf 50 °C für 60 min inkubieren
- auf Raumtemperatur für 3 min abkühlen lassen
- 3 min auf Eis inkubieren
- Transformation chemisch kompetenter Bakterien (TOP10) mit 2-5 µl des Reaktionsansatzes

6.2.3 Transformation chemisch kompetenter Bakterien

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

- Auftauen der Bakterien auf Eis
- Zugabe der zu transformierenden DNA (Vektor, Ligationsansatz oder Mutagenese PCR-Produkts)
- Inkubation des Transformationsansatzes auf Eis für 10 min
- Hitzeschock für 90 s auf 42 °C
- Inkubation auf Eis für 2 min
- Zugabe von 900 µl LB Medium
- Inkubation für 1h bei 37 °C (Laborschüttler)
- Ausplattieren:
 - o Bei einer Re-Transformation eines bereits fertiggestellten Vektors werden standardmäßig 50 µl der Bakterien-Lösung auf den entsprechenden LB-Agar-Platten ausplattiert.
- oder
 - o Bei einem Ligationsansatz wird die Bakterienlösung für 1 min bei 5000 x g zentrifugiert, der Überstand anschließend verworfen und das Bakterienpellet in 100 µl resuspendiert. Diese werden dann auf die LB-Agar-Platten ausgestrichen
- Inkubation der Platten bei 37 °C über Nacht

6.2.4 Plasmid-DNA-Präparation (Mini)

Das verwendete Protokoll zur Plasmid-DNA-Präparation (Mini) basiert auf dem Prinzip der alkalischen Lyse:

- Animpfen von 3 ml LB-Medium mit einer Bakterienkolonie
- Inkubation der Kultur über Nacht auf 37 °C
- Überführen von 1,5 ml der Kultur
- 5 min Zentrifugation bei 13.000 rpm
- Überstand verwerfen
- Bakterienpellet in 300 µl Resuspensions-Puffer (S1) lösen

- 300 µl Lysis-Puffer (S2) hinzugeben, die Proben fünfmal invertieren und anschließend 5 min bei RT stehen lassen
- Zugabe von 300 µl Neutralisations-Puffer (S3), die Probe erneut fünfmal invertieren und Inkubation für 5 min auf Eis
- mind. 20 min bei 13.000 rpm zentrifugieren
- 500 µl 2-Propanol in neue 1,5 ml Reaktionsgefäße vorlegen und 750 µl des Überstands hinzufügen
- mind. 30 min bei 13.000 rpm zentrifugieren (4 °C), Überstand anschließend verwerfen
- 500 µl 70 %iges Ethanol hinzugeben
- mind. 15 min bei 13.000 rpm zentrifugieren
- Ethanol entfernen und die gewonnene Plasmid-DNA trocknen lassen
- Plasmid-DNA in 20-30 µl dH₂O lösen

6.2.5 Plasmid-DNA-Präparation (Midi)

Für eine Plasmid-DNA-Präparation (Midi) wurden 100 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt. Die Kultur wurde anschließend angeimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Präparation wurde mit dem NucleoBond® Xtra Midi Kit von Macherey-Nagel durchgeführt. Die gewonnene DNA wurde standardmäßig in 50 µl dH₂O gelöst.

6.2.6 Genomische DNA-Isolation

Zur Isolation der genomischen DNA wurde folgendes Protokoll durchgeführt:

- pro Reaktionsgefäß wird eine einzelne Fliege platziert
- mit einer Pipettenspitze, die 50 µl des SB-Puffers enthält, wird die Fliege für 5-10 s zerdrückt, ohne dabei die Flüssigkeit aus der Pipettenspitze freizusetzen
- anschließend wird der in der Pipettenspitze verbliebene SB-Puffer hinzugegeben
- Inkubation bei 25-37 °C für 20-30 min
- Inaktivierung der im Puffer enthaltenen Proteinase K durch Inkubation bei 95 °C für 1-2 min

Die präparierte genomische DNA kann auf 4 °C für mehrere Monate gelagert werden. Für eine PCR reicht meist 1 µl der Lösung. Dabei stören Körperteile der Fliege die PCR nicht.

6.2.7 Sequenzierung

Sequenzierungen der Plasmid-DNA wurden extern von Microsynth Seqlab (Göttingen) durchgeführt.

6.2.8 Restriktionsspaltung

Analytische und präparative DNA-Restriktionsspaltungen wurden mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen der Firma NEB (New England BioLabs) durchgeführt und erfolgten nach den Angaben des Herstellers. Die Enzym-Menge wurde unter Beachtung der jeweiligen Units und abhängig von der eingesetzten DNA-Konzentration gewählt. Die Inkubationszeit betrug bei analytischen und präparativen Restriktionsspaltungen 1 h bei 37 °C. Restriktionsspaltungen wurden anschließend mit Hilfe von Agarose-Gelelektrophorese analysiert und falls nötig die DNA-Fragmente isoliert (siehe 6.2.9).

Tabelle 6-19: Typischer analytischer Restriktionsansatz

Volumen	Komponente
X µl	DNA (1 µg)
2 µl	10x NEB-Puffer
0,25 µl	Restriktionsendonuklease
auf 20 µl	dH ₂ O

Tabelle 6-20 Typischer präparativer Restriktionsansatz

Volumen	Komponente
X µl	DNA (4 µg)
5 µl	10x NEB-Puffer
0,25 µl	Restriktionsendonuklease
0,25 µl	Restriktionsendonuklease
auf 50 µl	dH ₂ O

6.2.9 Gelextraktion von DNA-Fragmenten aus einem Agarose-Gel

Für die DNA-Isolierung im Anschluss an eine Agarose-Gelelektrophorese wurde das gewünschte DNA-Fragment aus dem Gel ausgeschnitten. Die in dem Gelfragment enthaltene DNA wurde mit Hilfe des Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kits von Zymo Research aus dem Gel extrahiert. Die Extraktion wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die DNA wurde in 11 µl eluiert.

6.2.10 Ligation

Um DNA-Fragmente in einen Vektor zu ligieren, wurde die T4 DNA Ligase mit ihrem entsprechenden Puffer von NEB verwendet. Zuvor wurden die zu ligierenden Fragmente und der Vektor einer präparativen Restriktionsspaltung unterzogen, um Überhänge für die anschließende Ligation zu erzeugen. Vektor und Insert wurden in einem Verhältnis von 1:3 bis 1:5 eingesetzt und mit Hilfe der T4-Ligase ligiert. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 18 °C oder alternativ eine Stunde bei Raumtemperatur.

Tabelle 6-21: Ligationsansatz

Komponente	Volumen
1 µl	10 x T4 DNA Ligase Puffer
X µl	Vektor-DNA (100ng)
X µl	Insert-DNA (zwischen 1:3 und 1:5)
0,5 µl	T4 DNA Ligase
auf 10 µl	dH ₂ O

6.3 Proteinbiochemische Methoden

6.3.1 Proteingewinnung aus *Drosophila* Flügelimaginalscheiben

Für die Proteingewinnung wurden L3-Larven des gewünschten Genotyps in 1x PBS auf Eis präpariert. 25 Flügelimaginalscheiben wurden in 15 µl 1xPBS überführt und mit 5 µl 4x Laemmli-Puffer versehen. Anschließend wurde die Probe für 10 min auf 95 °C erhitzt. Ihre Lagerung erfolgte bei -20 C.

6.3.2 SDS-Page und Western Blot

Um Proteine ihrer Größe nach aufzutrennen wurde eine Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Geleelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. 20 µl des Lysats (siehe 6.3.1) wurden auf das Gel aufgetragen.

Tabelle 6-22: Zusammensetzung des Gels für die SDS-PAGE

Komponente	10 %iges Trenngel (1,5 mm Gel)	5 %iges Sammelgel (1,5 mm Gel)
Rotiphorese Gel 30	3,34 ml	500 µl
4x Trenngel- bzw. Sammelgelpuffer	2,5 ml	750 µl
dH ₂ O	4 ml	1688 µl
10 % APS	134 µl	60 µl
TEMED	10 µl	3 µl

Nach der Auftrennung der Proteine erfolgte ein Western Blot (semi-dry blotting). Hierfür wurde eine PVDF-Membran 5 min in Methanol inkubiert. Entscheidend ist zudem, dass die Filterpapiere mit Transferpuffer getränkt wurden. Der Proteintransfer auf die Trägermembran erfolgte im Trans-Blot Turbo von Bio Rad Laboratories bei 1 A Stromstärke und maximal 25 Volt Spannung für 30 min.

Die immunhistochemische Färbung von Western Blots:

- 1 h blockieren der Membran in 5 %igen Milchpulver in 1x PBS
- Inkubation über Nacht mit dem primären Antikörper in 2 %igem Milchpulver in 1x PBS auf 4 °C
- 3x 20 min wachen in 0,1 % PBT (1x PBS + Tween)
- Inkubation für 1 h mit dem HRP- (Meerrettich Peroxidase) gekoppelten sekundären Antikörper in 2 %igem Milchpulver in 1x PBS auf Raumtemperatur
- 3x 20 min wachen in 0,1 % PBT (1x PBS + Tween)
- Lagerung der Membran in 1x PBS auf 4 °C

Die Detektion der Proteine erfolgte über eine Chemilumineszenzreaktion ausgelöst mit Hilfe des BM Chemiluminescence Western Blot Kit von Sigma Aldrich Co. LLC am ImageQuant™ LAS 4000 von GE Healthcare.

6.4 Transmissionselektronenmikroskopie

6.4.1 Eponeinbettung der Flügelimaginalscheiben

Die Präparation der Larven des dritten Larvenstadiums wurde in kaltem Phosphatpuffer (0,1 M PO_4 , pH 7,4) durchgeführt. Hierfür wurde die anteriore Hälfte der L3-Larven umgestülpt und der Darm sowie das Fettgewebe entfernt. Bis zu ihrer Fixierung werden die präparierten Hälften auf Eis in Phosphatpuffer gesammelt.

Fixierung:

- 1 h bei RT (Raumtemperatur) fixieren in 2,5 % Glutaraldehyd in 0,1 M PO_4
 - o (475 μl Puffer + 25 μl 50 % Glutaraldehyd EM-Grade)
- 5x 5 min waschen in 0,1 M PO_4 (RT)
- 1 h Osmierung in 2 % OsO_4 in 0,1 M PO_4 (auf Eis, abgedunkelt!)
- 3x 5 min waschen in 0,1 M PO_4 (auf Eis)
- 3x 5 min waschen in dH_2O (auf Eis)

Entwässerung:

- 7 min 50 % EtOH auf Eis (Wichtig: Alkohole auf Eis stellen!)
- 7 min 70 % EtOH auf Eis
- 7 min 90 % EtOH auf Eis
- 7 min 96 % EtOH auf Eis
- 2x 10 min ~100 % EtOH auf Eis (reines Ethanol in Flasche mit Molekularsieb)
- 2x 10 min ~100 % Aceton auf Eis (reines Aceton in Flasche mit Molekularsieb)

In Epon überführen:

- 1 h Epon: Aceton 1:1 (auf 4 °C)
- 2 h Epon: Aceton 3:1 (auf 4 °C)
- Inkubation über Nacht auf 4 C in reinem Epon
- 2x 2 h Inkubation in reinem Epon (RT)
- Flügelimaginalscheiben freipräparieren und einbetten in frischem Epon in Flachbettformen
- 72 h bei 65 °C aushärten lassen

Die Eponblöcke mit den eingeschlossenen Flügelimaginalscheiben wurde zunächst getrimmt und anschließend erfolgten Semidünnschnitte (500 nm dicke; für die

Lichtmikroskopie) sowie Ultradünnschnitte (70 nm; für die Elektronenmikroskopie). Semidünnschnitte und Ultradünnschnitte wurden von Jessica Hausmann angefertigt (Technische Assistentin des Instituts für Genetik, HHU).

6.4.2 Färbung der Semidünnschnitte:

Um die Semidünnschnitte im Lichtmikroskop analysieren zu können, wurden sie angefärbt:

- Die angefertigten Semidünnschnitte (500 nm) auf einer Heizplatte bei ca. 60 °C trocknen
- 1 min 30 s mit der Färbelösung nach Richardson färben (ein paar Tropfen der gefilterter Färbelösung auf die Schnitte geben)
- gründlich mit H₂O abspülen und trocknen lassen

Semifärbelösung nach Richardson:

Stammlösung 1: 1 % Azur II in H₂O

Stammlösung 2: 1 % Methylenblau in 1 % Borax (Na-Borat) in H₂O

Stammlösungen 1:1 mischen und in einer Spritze mit Membranfilter (0,22 µm) aufbewahren

6.4.3 Kontrastieren der Ultradünnschnitte

Vorbereitungen

- eine Glasplatte mit sauberen Parafilm beschichten, eine Glaspetrischale als Deckel nehmen um die Tropfen mit den Schwermetalllösungen abzudecken

2 % Uranylacetat wässrig: 5 min

- Grids mit der Schnittseite nach unten für 5 min auf die Uranylacetat-Tropfen geben (abgedeckt und lichtgeschützt!)
- 5x kurz mit dH₂O waschen (pro Grid 5 Tropfen dH₂O)
- auf einem Filterpapier mit der Schnittseite nach oben trocknen

Ansetzen der Lösung: 2 % Uranylacetat

- 1 g Uranylacetat in 50 ml dH₂O lösen

- pH-Wert sollte 2-5 sein
- auf 10 ml-Spritzen aufziehen, gut verschlossen und lichtgeschützt im Kühlschrank lagern

Bleicitrat nach Reynolds: 4 min

- ca.6 NaOH-Plättchen unter den Deckel legen und 3-5' warten, so dass das CO₂ aus der Luft gebunden werden kann
- Bleicitrat-tropfen dazugeben (Deckel nur kurz ein wenig öffnen, damit nicht zu viel CO₂ dazu kommt!), kurz warten, dann 4' kontrastieren
- 5x kurz mit dH₂O waschen (pro Grid 5 Tropfen dH₂O)
- auf einem Filterpapier mit der Schnittseite nach oben trocknen

Ansetzen der Lösung: Bleicitrat nach Reynolds:

1,33 g Pb(NO ₃) ₂	Bleinitrat
1,76 g Na ₃ (C ₆ H ₅ O ₇) 2 H ₂ O	Na-Citrat

- in ca. 30 ml dH₂O (autoklaviert oder abgekocht) lösen:
- 1 min kräftig schütteln: die Lösung wird milchig und es bildet sich ein Niederschlag
- 30 s schütteln
- 6-8 ml 1 N NaOH (0,4 g NaOH-Plättchen in 10 ml) tropfenweise zugeben: Lösung wird klar
- pH-Wert sollte bei 12 liegen
- auf 50 ml auffüllen
- auf 10 ml-Spritzen aufziehen und gut verschlossen im Kühlschrank lagern

6.5 Quantitative Analyse des ILV-Anteils von MVBs

Um den ILV-Anteil der MVBs quantifizieren zu können, wurde das elektronendichte Material im endosomalen Lumen der zuvor mit dem TEM aufgenommenen MVBs mit Hilfe eines selbstgeschriebenen Makros für die Bildverarbeitungs-Software „Fiji“ (siehe 6.1.9) quantifiziert. Dieses Makro wurde zusammen mit dem Center for Advanced Imaging (CAi) an der Heinrich-Heine-Universität entwickelt und geschrieben (Bäumers et al. 2019).

Die Analyse beinhaltet folgende Schritte: Die MVBs werden manuell umrissen und als *region of interest* (ROIs) für die Analyse gespeichert. Jedes erfasste MVB wird zunächst

ausgeschnitten. Um Störsignale zu reduzieren, aber den Kontrast so gut wie möglich zu erhalten, wird ein Medianfilter mit einem Umfang von 2 px verwendet. ILVs werden mit Hilfe des „Huang“-Algorithmus erkannt und abgegrenzt (Huang und Wang 1995). Eine binäre Maske wird erstellt, die das elektronendichte Material der ILVs anzeigt. Die Fläche aller erkannten ILVs in einem MVB wird addiert und durch die Gesamtfläche des MVBs dividiert. Dadurch kann der prozentuale Anteil an ILVs pro MVB berechnet werden. Zur Qualitätskontrolle wird eine Überlagerung der binären Maske und der ursprünglichen elektronenmikroskopischen Aufnahme angefertigt und anschließend manuell begutachtet. Der ILV-Anteil mehrerer MVBs wurde gesammelt und in Box-Whisker-Plots dargestellt. Die Daten wurden mit Hilfe von GraphPad Prism 7.0d statistisch ausgewertet.

6.6 Genetische Methoden

6.6.1 Immunhistochemische Färbung an Flügelimaginalscheiben

Für eine Antikörperfärbung an Flügelimaginalscheiben wurden Larven des dritten Larvenstadiums in 1x PBS präpariert. Hierfür wurden die Larven in zwei Hälften geteilt, die posteriore Hälfte verworfen, die anteriore Hälfte umgestülpt sowie Fettgewebe und Darm entfernt. Die umgestülpten Hälften wurden in Siebchen in eine 24er-Multiwellplatte gesammelt. Falls nicht anders angegeben erfolgten alle Schritte des folgenden Färbeprotokolls auf Raumtemperatur:

- Fixierung des Gewebes durch 500 µl 4 % Paraformaldehyd für 30 min
- 3x 10 min waschen in 0,3 % PBT
- 30 min in 500 µl 5 % NGS in 0,3 % PBT inkubieren (unspezifische Bindestellen für die Antikörper werden blockiert), alternativ über Nacht auf 4 °C.
- Inkubation mit den primären Antikörpern in 500 µl 5 % NGS in 0,3 % PBT für mind. 90 min
 - o bei einem schlechten Signal hilft es die Inkubationszeit bis auf 3 h zu verlängern, alternativ über Nacht auf 4 °C. Achtung kann bei einigen Antikörpern auch zu einem stärkeren Hintergrundsignal führen.
- 3x 15 min waschen in 0,3 % PBT
- Inkubation mit den sekundären Antikörpern in 500 µl 5 % NGS in 0,3 % PBT für mind. 60 min

- auch hier kann eine längere Inkubationszeit zu einem besseren Signal führen (2-3 h)
- 10 min in 0,3 % PBT waschen
- Inkubation mit Hoechst 33258 (1:10000) in 500 µl 0,3 % PBT für 10 min
 - (Stammlösung: 5 mg/ml in dH₂O)
- 2x 10 min waschen in 0,3 % PBT
- Lagerung in 1x PBS auf 4 °C möglich

Anschließend wurden die Flügelimaginalscheiben in 1x PBS freipräpariert, auf einen Objektträger überführt und dort in VECTASHIELD® eingebettet.

6.6.2 Erzeugung transgener Fliegen

Für eine zielgerichtete Integration der verschiedenen DNA-Konstrukte/Transgene in das Genom von *Drosophila melanogaster* wurde auf ein ϕ C-31 Integrase basiertes System zurückgegriffen. Hier erfolgt eine gerichtete Insertion der Konstrukte in attP Integrationsstellen (*landing sites*) (Bischof et al. 2007). Diese Integrationsstellen wurden zuvor durch ein M-Element (*Mariner* (M) Transposon, M (3xP3RFP attP)) in das Genom integriert. Für jedes Chromosom stehen mehrere Integrationsstellen zur Verfügung (Bischof et al. 2007). Die Integration der Transgene wird durch eine in der Keimbahn exprimierte ϕ C-31 Integrase erreicht. Dafür ist sie bereits als Transgen stabil auf dem X-Chromosom integriert (*y w* Hintergrund) und wird unter Kontrolle des *vasa*-Promotors exprimiert. Die verwendeten Plasmide umfassen neben dem jeweiligen Transgen, eine attB Sequenz und ein *mini-white* (*w⁺*) als Selektionsmarker. Die ϕ C-31-Integrase vermittelt zwischen der attB-Sequenz des Plasmids und attP Insertionsstelle eine sequenzspezifische Rekombination, sodass das Plasmid ins Genom integriert wird. Die Injektionen wurden von Sylvia Tannebaum und Stefan Kölzer (Institut für Genetik, HHU) vorgenommen. Ein Teil der Injektionen erfolgte durch BestGene Inc, Chino Hills, CA, USA.

Tabelle 6-23: Injektionsmix für die Erzeugung transgener Fliegen

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

Auf 10 μ l	dH ₂ O
----------------	-------------------

Dieser Injektionsmix wird für 30 min bei 13.000 rpm zentrifugiert

Die transgenen Fliegen wurden nach dem folgenden Protokoll erzeugt (Bachmann und Knust 2008): Für eine stabile Integration wird die Plasmid-DNA in 30 min alte, dechorionisierte Embryonen injiziert. Die Injektion erfolgt in das posteriore Ende der Embryonen. Hier entstehen die Polzellen, die Vorläufer der Keimbahn. Da zu diesem Zeitpunkt in der Entwicklung der Embryo ein syncytiales Blastoderm ist, kann die Plasmid-DNA vor der Zellularisierung in den Zellkern gelangen. Die anschließende Selektion nach transgenen Fliegen wird durch den im Vektor enthaltenen Selektionsmarker (*mini-white w⁺*) ermöglicht. Transgene Fliegen können in der nachfolgenden Generation über die roten Augen identifiziert werden. Sie werden in den Multibalancer Hintergrund (siehe 6.1.8) gekreuzt, sodass ein stabiler Fliegenstamm, der das in das Genom integrierte Transgen enthält, etabliert werden kann. Die verwendeten *BAC^{shrub}*- und *shrubP*-Konstrukte in dieser Arbeit wurden in die Integrationsstelle *attP 86Fb* integriert. Alle *lgdP*-Konstrukte wurden in die Integrationsstelle *attP 68E* integriert.

6.6.3 Fliegenhaltung

Die Fliegenhaltung erfolgte in Kunststoffröhrchen, welche bis zu einem Drittel mit Futtermedium (siehe 6.1.1) gefüllt und mit einem Schaumstoffstopfen verschlossen waren. Die Fliegenstämme wurden auf 18 °C oder bei Raumtemperatur (ca. 21 °C) gehalten. Die aktiven Kreuzungen wurden, wenn nicht anders angegeben auf 25 °C gelagert. Kreuzungen wurden angesetzt, indem jungfräuliche Weibchen mit Männchen in einem Verhältnis von 3:1 in einem Röhrchen verpaart wurden.

6.6.4 Das Gal4/UAS-System

Das Gal4/UAS System ermöglicht eine zeitlich und räumlich definierte Expression von Transgenen in *Drosophila melanogaster* (Brand und Perrimon 1993, Phelps und Brand 1998). Dieses Expressionssystem stammt ursprünglich aus *S. cerevisiae*. Es besteht aus zwei Komponenten, dem Transkriptionsfaktor Gal4 und dessen DNA-Bindungssequenz

UAS (Upstream Activating Sequence). Beide Komponenten kommen natürlicherweise nicht in *Drosophila* vor.

Es gibt verschiedene Gal4-Treiberlinien, bei denen Gal4 unter Kontrolle unterschiedlicher Promotoren exprimiert wird. Beim Effektorstamm liegt *downstream* von UAS ein Transgen. Werden beide Komponenten durch Kreuzung zusammengebracht, bindet der Transkriptionsfaktor Gal4 an die UAS-Sequenz und das ihr nachgeschaltete Transgen wird transkribiert.

Eine Erweiterung des Gal4/UAS System durch eine temperatursensitive Variante des Gal4-Repressors Gal80 (Gal80^{ts}) ermöglicht eine zeitliche Regulation der Expression (McGuire et al. 2003). Bei einer Temperatur von 18 °C ist der Repressor aktiv und verhindert die Gal4-vermittelte Expression des Transgens. Bei einer Temperatur von 29 °C kommt es zu einer Inaktivierung des Repressors, sodass die Gal4-vermittelte Expression stattfindet.

6.6.5 RNA-Interferenz

Bei der RNA-Interferenz (RNAi) handelt es sich um einen zellulären Prozess zur Genregulation (Übersicht in Wilson und Doudna 2013). Bei diesem Prozess werden in eukaryotischen Zellen endogene mRNAs sequenzspezifisch abgebaut oder zumindest ihre Translation inhibiert. Mit Hilfe der RNA-Interferenz kann daher die Genfunktion analysiert werden, indem die Genaktivität posttranskriptionell unterdrückt wird. In dieser Arbeit werden die RNAi-Konstrukte mittels Gal4/UAS-System exprimiert (siehe 6.6.4) (Dietzl et al. 2007). Nach ihrer Transkription bildet die RNA eine doppelsträngige Haarnadelstruktur, die durch das Enzym DICER weiterprozessiert wird und letztendlich zusammen mit einem Argonautprotein (AGO) den RISC Komplex (RNA Induced Silencing Complex) bildet. Dieser Komplex erkennt aufgrund der spezifischen Sequenzhomologien der geladenen RNA die entsprechende Ziel-mRNA und induziert die Spaltung oder Degradation der mRNA.

Durch Expression der RNAi mittels Gal4/UAS-System kann eine zeitlich und räumlich begrenzte Herunterregulierung des Proteinlevels erreicht werden.

6.6.6 Klonale Analyse mittels Flp/FRT System

Mit Hilfe der klonalen Analyse lassen sich gewebespezifische Zellklone in *Drosophila melanogaster* erzeugen. Dies ermöglicht beispielsweise die Analyse von embryonal letalen Mutationen und einen direkten Vergleich mit dem angrenzenden, wildtypischen Gewebe. Basis für die klonale Analyse ist die homologe Rekombination während der Mitose. Mit Hilfe des Flp/FRT Systems lässt sich eine solche mitotische Rekombination induzieren. Sie wird durch die Flippase (Flp) zwischen den spezifischen FRT (Flippase Recombinase Target)-Erkennungssequenzen ausgelöst (Golic und Lindquist 1989, Golic 1991, Xu und Rubin 1993). Hierfür muss das mutante Allel in Heterozygose vorliegen und beide Chromosomen müssen die gleiche FRT-Sequenz besitzen. Durch Verwendung von Markern auf dem homologen FRT-Chromosom ist eine Identifizierung der Klone möglich. Die mutanten Zellklone zeichnen sich nach der Kloninduktion durch einen Verlust des Markers (z.B. GFP, RFP) aus, wobei der wildtypische Zwillingsklon zwei Kopien des Markers besitzt. Heterozygote Zellen, die den Genotyp der Ausgangssituation besitzen, haben weiterhin nur eine Kopie des Markers.

6.6.7 Erzeugung der *Dchmp7* mutanten Allele mit Hilfe von CRISPR/Cas

Ursprünglich ist CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) /Cas ein adaptiver Immunabwehrmechanismus der Prokaryoten. CRISPR/Cas ermöglicht es dem Organismus zielgerichtet fremde (virale) Oligonukleotide zu zerschneiden und damit zu zerstören (Barrangou et al. 2007).

Dieses System kann zur Genom-Editierung verwendet werden (Übersicht in Sander und Joung 2014). Grundlage hierfür ist das CRISPR-assoziierte Protein 9 (Cas9), eine Endonuklease, die zielgerichtet Doppelstrangbrüche in der genomischen DNA erzeugen kann. Ein solcher Doppelstrangbruch kann zwei verschiedene Reparaturmechanismen in der Zelle auslösen, „non-homologous end-joining“ (NHEJ) oder „homology-directed repair“ (HDR) (Übersicht in Jasin und Rothstein 2013). Bei NHEJ kommt es aufgrund einer einfachen Ligation der DNA-Enden häufig zur Insertion oder Deletion einzelner Basenpaare im Bereich des Doppelstrangbruches. NHEJ ermöglicht es daher gezielt Nullallele zu erzeugen. Bei HDR verwendet die Zelle homologe Sequenzen als Template zur Reparatur des DNA-Abschnittes. Hier dient beispielsweise die endogene Kopie des betroffenen Gens auf dem homologen Chromosom als Template. HDR ermöglicht es DNA-

Sequenzen präzise zu modifizieren oder gar Neue einzubauen. Hierfür wird ein exogenes Donor-Reparatur-Plasmid mit entsprechenden homologen Sequenzen als Template in die Zelle eingeschleust.

Beim CRISPR-System bildet die Endonuklease Cas9 zusammen mit crRNA (CRISPR-RNA) und tracrRNA (trans-activating crRNA) einen Komplex. Die crRNA zeichnet sich durch eine variable Sequenz (20 bp), die komplementär zur Zielsequenz ist, aus. Über sie kann der Komplex zielgerichtet an die DNA binden. Zudem ist ein Teil der crRNA Sequenz komplementär zur tracrRNA, sodass die beiden miteinander hybridisieren können (Bhaya et al. 2011). Dabei ist die tracrRNA für die Bindung von Cas9 essentiell. Entscheidend ist, dass direkt neben der Zielsequenz der crRNA ein PAM Motiv (5' NGG) liegen muss. Die Endonuklease Cas9 interagiert mit diesem Motiv und schneidet ca. drei Basenpaare *upstream* vom PAM-Motiv (Sternberg et al. 2014).

Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde für die Genom-Editierung eine sgRNA (*s*ingle *g*uide-RNA) konzipiert, die die Eigenschaften und die Struktur des Komplexes aus tracrRNA und crRNA nachempfunden (Jinek et al. 2012). Über sie kann der Cas9-vermittelte Doppelstrangbruch zielgerichtet induziert werden.

Um den Funktionsverlust von *Dchmp7* in dieser Arbeit in *Drosophila* analysieren zu können, wurden durch CRISPR/Cas9 induziertes „*non-homologous end joining*“ (NHEJ) *Dchmp7*-mutante Allele erzeugt (Port et al. 2014). Ausgangspunkt für die Generierung war ein Chromosom, welches bereits einer FRT-Erkennungssequenz trägt. Grund hierfür ist, dass der Genlocus von *Dchmp7* sehr nah am Centromer liegt. Durch die Verwendung eines FRT-Chromosom konnte daher eine zeitaufwendige, meiotische Rekombination aller generierten Allele mit der FRT-Erkennungssequenz FRT2A, für eine anschließende klonale Analyse (siehe 6.6.6), vermieden werden. Um die Wahrscheinlichkeit für ein CRISPR/Cas Ereignis zu erhöhen, wurde die jeweilige sgRNA stabil exprimiert. Hierfür wurde sie als Transgen mit Hilfe des modifizierten Plasmids *pwhite-pCFD3: U6:3-gRNA* in das Genom integriert (siehe 6.1.5 und 6.6.2), sodass sie dort stabil, unter Kontrolle des U6:3 Promotors, einem Typ-III RNA-Polymerase III Promotor, exprimiert wird. Die Cas9 Endonuklease wird ebenfalls stabil unter Kontrolle des *nos*-Promotors in der Keimbahn exprimiert. Dafür liegt sie ebenfalls als Transgen stabil integriert auf dem zweiten Chromosom vor.

Die möglichen Zielsequenzen für die Cas9 Endonuklease im Genom von *Drosophila melanogaster* wurden mit Hilfe des „Target Finder“ von *flyCRISPR* identifiziert (<https://flycrispr.org/target-finder/>). Die Genom-Editierung mittels CRISPR/Cas9 wurde zweimal unabhängig voneinander durchgeführt und zwar mit zwei unterschiedlichen sgRNAs. Es wurde daher immer nur ein Doppelstrangbruch pro CRISPR-Ereignis induziert. Von beiden sgRNAs befinden sich die Zielsequenzen im ersten Exon von *Dchmp7* (siehe 2.5, Abb. 2-40):

- 1) sgRNA T1: Zielsequenz AGTTCGCC|ATGTTTCGATCG AGG
- 2) sgRNA T18: Zielsequenz GCAGGACA|ACGGTAGAATGC AGG

Durch die zwei unterschiedlichen sgRNA konnte bei den anschließenden Experimenten die Wahrscheinlichkeit einer Fehlinterpretation durch potenzielle Hintergrundmutationen (*off-targets*) minimiert werden. Eine Sequenzierung (siehe 6.2.7) der potenziellen Allele bestätigt eine Deletion oder Insertion von einzelnen Basenpaaren (siehe 2.5, Abb. 2-40). Diese verursachen eine Leserasterverschiebung und wahrscheinlich einen Translationsabbruch. Für die Sequenzierung (siehe 6.2.7) wurde die genomische DNA isoliert (siehe 6.2.6) und anschließend der jeweilige *Dchmp7* Genlocus mittels PCR amplifiziert (siehe 6.2.1).

6.6.8 Der Notch-Reporter *Gbe+Su(H)-lacZ*

Das synthetische Reportergenkonstrukt *Gbe+Su(H)-lacZ* ermöglicht eine Detektion der Aktivität des Notch-Signalweges (Furriols und Bray 2001). Es besteht aus drei aufeinanderfolgenden Grainyhead (Grh) Bindeelementen (Gbe), zwei Suppressor of Hairless (Su(H)) Bindestellen, einem *hsp70*-Minimalpromotor und der *lacZ*-Transkriptionseinheit. Diese Transkriptionseinheit codiert für das Enzym β -Galaktosidase. Der Transkriptionsfaktor Grainyhead wird ubiquitär in der Flügel-imaginalscheibe exprimiert (Uv et al. 1997). Su(H) agiert im Notch-Signalweg als molekularer Schalter (siehe 1.1). In Abwesenheit der intrazellulären Domäne des Notch-Rezeptors (NICD) bildet Su(H) zusammen mit Co-Repressoren (CoR) einen Repressorkomplex und verhindert die Expression von *lacZ*. Bei einer Aktivierung des Notch-Signalweges wird NICD freigesetzt, gelangt in den Zellkern und bindet an Su(H). Zusammen mit Co-Aktivatoren (CoA) wie Mastermind (Mam) wird die Expression der *lacZ*-Transkriptionseinheit aktiviert. Durch Anwesenheit des Transkriptionsfaktor Grh

wird die Expression weiter verstärkt und das Reportergenkonstrukt noch sensitiver gegenüber einer Aktivierung des Notch-Signalweges. In Zellen, in denen der Notch-Signalweg aktiviert ist, wird somit die β -Galaktosidase gebildet. Sie kann beispielsweise durch eine Antikörperfärbung nachgewiesen werden.

7 Literaturverzeichnis

- Adell, M. A., G. F. Vogel, M. Pakdel, M. Muller, H. Lindner, M. W. Hess und D. Teis** (2014). "Coordinated binding of Vps4 to ESCRT-III drives membrane neck constriction during MVB vesicle formation." *J Cell Biol* **205**(1): 33-49.
- Adell, M. A. Y., S. M. Migliano, S. Upadhyayula, Y. S. Bykov, S. Sprenger, M. Pakdel, G. F. Vogel, G. Jih, W. Skillern, R. Behrouzi, M. Babst, O. Schmidt, M. W. Hess, J. A. Briggs, T. Kirchhausen und D. Teis** (2017). "Recruitment dynamics of ESCRT-III and Vps4 to endosomes and implications for reverse membrane budding." *Elife* **6**.
- Agromayor, M., J. G. Carlton, J. P. Phelan, D. R. Matthews, L. M. Carlin, S. Ameer-Beg, K. Bowers und J. Martin-Serrano** (2009). "Essential role of hIST1 in cytokinesis." *Mol Biol Cell* **20**(5): 1374-1387.
- Agromayor, M. und J. Martin-Serrano** (2006). "Interaction of AMSH with ESCRT-III and deubiquitination of endosomal cargo." *J Biol Chem* **281**(32): 23083-23091.
- Al-Tawashi, A. und C. Gehring** (2013). "Phosphodiesterase activity is regulated by CC2D1A that is implicated in non-syndromic intellectual disability." *Cell Commun Signal* **11**(1): 47.
- Al-Tawashi, A., S. Y. Jung, D. Liu, B. Su und J. Qin** (2012). "Protein implicated in nonsyndromic mental retardation regulates protein kinase A (PKA) activity." *J Biol Chem* **287**(18): 14644-14658.
- Alam, S. L., J. Sun, M. Payne, B. D. Welch, B. K. Blake, D. R. Davis, H. H. Meyer, S. D. Emr und W. I. Sundquist** (2004). "Ubiquitin interactions of NZF zinc fingers." *EMBO J* **23**(7): 1411-1421.
- Alonso, J. und J. F. Santaren** (2006). "Characterization of the Drosophila melanogaster ribosomal proteome." *J Proteome Res* **5**(8): 2025-2032.
- Amerik, A. Y., J. Nowak, S. Swaminathan und M. Hochstrasser** (2000). "The Doa4 deubiquitinating enzyme is functionally linked to the vacuolar protein-sorting and endocytic pathways." *Mol Biol Cell* **11**(10): 3365-3380.
- Andersen, D. S. und N. Tapon** (2008). "Drosophila MFAP1 is required for pre-mRNA processing and G2/M progression." *J Biol Chem* **283**(45): 31256-31267.
- Aoyama, N., T. Yamakawa, T. Sasamura, Y. Yoshida, M. Otori, H. Okubo, E. Iida, N. Sasaki, R. Ueda und K. Matsuno** (2013). "Loss- and gain-of-function analyses of vacuolar protein sorting 2 in Notch signaling of Drosophila melanogaster." *Genes Genet Syst* **88**(1): 45-57.
- Arii, J., M. Watanabe, F. Maeda, N. Tokai-Nishizumi, T. Chihara, M. Miura, Y. Maruzuru, N. Koyanagi, A. Kato und Y. Kawaguchi** (2018). "ESCRT-III mediates budding across the inner nuclear membrane and regulates its integrity." *Nat Commun* **9**(1): 3379.
- Artavanis-Tsakonas, S., M. D. Rand und R. J. Lake** (1999). "Notch signaling: cell fate control and signal integration in development." *Science* **284**(5415): 770-776.
- Aster, J. C., W. S. Pear und S. C. Blacklow** (2017). "The Varied Roles of Notch in Cancer." *Annu Rev Pathol* **12**: 245-275.
- Azmi, I., B. Davies, C. Dimaano, J. Payne, D. Eckert, M. Babst und D. J. Katzmann** (2006). "Recycling of ESCRTs by the AAA-ATPase Vps4 is regulated by a conserved VSL region in Vta1." *J Cell Biol* **172**(5): 705-717.
- Azmi, I. F., B. A. Davies, J. Xiao, M. Babst, Z. Xu und D. J. Katzmann** (2008). "ESCRT-III family members stimulate Vps4 ATPase activity directly or via Vta1." *Dev Cell* **14**(1): 50-61.
- Babst, M., D. J. Katzmann, E. J. Estepa-Sabal, T. Meerloo und S. D. Emr** (2002a). "Escrt-III: an endosome-associated heterooligomeric protein complex required for mvb sorting." *Dev Cell* **3**(2): 271-282.
- Babst, M., D. J. Katzmann, W. B. Snyder, B. Wendland und S. D. Emr** (2002b). "Endosome-associated complex, ESCRT-II, recruits transport machinery for protein sorting at the multivesicular body." *Dev Cell* **3**(2): 283-289.
- Babst, M., T. K. Sato, L. M. Banta und S. D. Emr** (1997). "Endosomal transport function in yeast requires a novel AAA-type ATPase, Vps4p." *EMBO J* **16**(8): 1820-1831.

- Babst, M., B. Wendland, E. J. Estepa und S. D. Emr** (1998). "The Vps4p AAA ATPase regulates membrane association of a Vps protein complex required for normal endosome function." EMBO J **17**(11): 2982-2993.
- Bachmann, A. und E. Knust** (2008). "The use of P-element transposons to generate transgenic flies." Methods Mol Biol **420**: 61-77.
- Bajorek, M., E. Morita, J. J. Skalicky, S. G. Morham, M. Babst und W. I. Sundquist** (2009a). "Biochemical analyses of human IST1 and its function in cytokinesis." Mol Biol Cell **20**(5): 1360-1373.
- Bajorek, M., H. L. Schubert, J. McCullough, C. Langelier, D. M. Eckert, W. M. Stubblefield, N. T. Uter, D. G. Myszka, C. P. Hill und W. I. Sundquist** (2009b). "Structural basis for ESCRT-III protein autoinhibition." Nat Struct Mol Biol **16**(7): 754-762.
- Balderhaar, H. J., H. Arlt, C. Ostrowicz, C. Brocker, F. Sundermann, R. Brandt, M. Babst und C. Ungermann** (2010). "The Rab GTPase Ypt7 is linked to retromer-mediated receptor recycling and fusion at the yeast late endosome." J Cell Sci **123**(Pt 23): 4085-4094.
- Balderhaar, H. J. und C. Ungermann** (2013). "CORVET and HOPS tethering complexes - coordinators of endosome and lysosome fusion." J Cell Sci **126**(Pt 6): 1307-1316.
- Bankaitis, V. A., L. M. Johnson und S. D. Emr** (1986). "Isolation of yeast mutants defective in protein targeting to the vacuole." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(23): 9075-9079.
- Barrangou, R., C. Fremaux, H. Deveau, M. Richards, P. Boyaval, S. Moineau, D. A. Romero und P. Horvath** (2007). "CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes." Science **315**(5819): 1709-1712.
- 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 und M. Shohat** (2006). "The CC2D1A, a member of a new gene family with C2 domains, is involved in autosomal recessive non-syndromic mental retardation." J Med Genet **43**(3): 203-210.
- Bate, M. und A. M. Arias** (1991). "The embryonic origin of imaginal discs in *Drosophila*." Development **112**(3): 755-761.
- Bauer, I., T. Brune, R. Preiss und R. Kolling** (2015). "Evidence for a Nonendosomal Function of the *Saccharomyces cerevisiae* ESCRT-III-Like Protein Chm7." Genetics **201**(4): 1439-1452.
- Bäumers, M.** (2013). Analyse von *shrub*-Deletionskonstrukten und Herstellung eines Dll1-Serrate Hybridliganden Bachelorarbeit, Heinrich-Heine-Universität.
- Bäumers, M.** (2015). Interaktionsstudien zwischen dem ESCRT-III Protein Shrub und dem Tumorsuppressor Lgd sowie deren Säugerorthologen in *Drosophila melanogaster* Masterarbeit, Heinrich-Heine-Universität.
- Bäumers, M., S. Klose, C. Bruser, C. Haag, S. Hansch, H. Pannen, S. Weidtkamp-Peters, M. Feldbrugge und T. Klein** (2019). "The auxiliary ESCRT complexes provide robustness to cold in poikilothermic organisms." Biol Open **8**(9).
- Bhaya, D., M. Davison und R. Barrangou** (2011). "CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation." Annu Rev Genet **45**: 273-297.
- Bilodeau, P. S., J. L. Urbanowski, S. C. Winistorfer und R. C. Piper** (2002). "The Vps27p Hse1p complex binds ubiquitin and mediates endosomal protein sorting." Nat Cell Biol **4**(7): 534-539.
- Bischof, J., R. K. Maeda, M. Hediger, F. Karch und K. Basler** (2007). "An optimized transgenesis system for *Drosophila* using germ-line-specific phiC31 integrases." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(9): 3312-3317.
- Blaumueller, C. M., H. Qi, P. Zagouras und S. Artavanis-Tsakonas** (1997). "Intracellular cleavage of Notch leads to a heterodimeric receptor on the plasma membrane." Cell **90**(2): 281-291.
- Bohnen, S.** (2014). In vivo und in vitro Interaktionsstudien zwischen der ESCRT-III Komponente Shrub/CHMP4 und dem Tumorsuppressor Lethal (2) gain discs in *Drosophila melanogaster* und die Charakterisierung des ESCRT-III Hilfsprotein DChmp7 Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität.

- Brand, A. H. und N. Perrimon** (1993). "Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes." *Development* **118**(2): 401-415.
- Bray, S. J.** (2016). "Notch signalling in context." *Nat Rev Mol Cell Biol* **17**(11): 722-735.
- Brüser, C.** (2011). Herstellung eines Antikörpers gegen das ESCRT-III-Protein Shrub sowie Identifizierung weiterer Interaktionspartner von Lgd in *Drosophila melanogaster* Arbeit Bachelorarbeit, Heinrich-Heine-Universität.
- Brüser, C.** (2013). Aufklärung der Beziehung zwischen *lgd* und dem ESCRT-Hilfsfaktor Dist1, sowie des Einflusses von *lgd* auf die Regulation des ESCRT-III-Komplexes, Heinrich-Heine-Universität.
- Bryant, P. J. und G. Schubiger** (1971). "Giant and duplicated imaginal discs in a new lethal mutant of *Drosophila melanogaster*." *Dev Biol* **24**(2): 233-263.
- Bucci, C., P. Thomsen, P. Nicoziani, J. McCarthy und B. van Deurs** (2000). "Rab7: a key to lysosome biogenesis." *Mol Biol Cell* **11**(2): 467-480.
- Buchkovich, N. J., W. M. Henne, S. Tang und S. D. Emr** (2013). "Essential N-terminal insertion motif anchors the ESCRT-III filament during MVB vesicle formation." *Dev Cell* **27**(2): 201-214.
- Buratovich, M. A. und P. J. Bryant** (1995). "Duplication of *l(2)gd* imaginal discs in *Drosophila* is mediated by ectopic expression of *wg* and *dpp*." *Dev Biol* **168**(2): 452-463.
- Buratovich, M. A. und P. J. Bryant** (1997). "Enhancement of overgrowth by gene interactions in lethal(2)giant discs imaginal discs from *Drosophila melanogaster*." *Genetics* **147**(2): 657-670.
- Caillat, C., P. Macheboeuf, Y. Wu, A. A. McCarthy, E. Boeri-Erba, G. Effantin, H. G. Gottlinger, W. Weissenhorn und P. Renesto** (2015). "Asymmetric ring structure of Vps4 required for ESCRT-III disassembly." *Nat Commun* **6**: 8781.
- Capalbo, L., I. Mela, M. A. Abad, A. A. Jeyaprakash, J. M. Edwardson und P. P. D'Avino** (2016). "Coordinated regulation of the ESCRT-III component CHMP4C by the chromosomal passenger complex and centralspindlin during cytokinesis." *Open Biol* **6**(10).
- Capalbo, L., E. Montembault, T. Takeda, Z. I. Bassi, D. M. Glover und P. P. D'Avino** (2012). "The chromosomal passenger complex controls the function of endosomal sorting complex required for transport-III Snf7 proteins during cytokinesis." *Open Biol* **2**(5): 120070.
- Carlton, J. G., M. Agromayor und J. Martin-Serrano** (2008). "Differential requirements for Alix and ESCRT-III in cytokinesis and HIV-1 release." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(30): 10541-10546.
- Carlton, J. G., A. Caballe, M. Agromayor, M. Kloc und J. Martin-Serrano** (2012). "ESCRT-III governs the Aurora B-mediated abscission checkpoint through CHMP4C." *Science* **336**(6078): 220-225.
- Carlton, J. G. und J. Martin-Serrano** (2007). "Parallels between cytokinesis and retroviral budding: a role for the ESCRT machinery." *Science* **316**(5833): 1908-1912.
- Chahine, S. und M. J. O'Donnell** (2009). "Physiological and molecular characterization of methotrexate transport by Malpighian tubules of adult *Drosophila melanogaster*." *J Insect Physiol* **55**(10): 927-935.
- 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 und P. Ling** (2011). "TBK1-associated protein in endolysosomes (TAPE) is an innate immune regulator modulating the TLR3 and TLR4 signaling pathways." *J Biol Chem* **286**(9): 7043-7051.
- 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 und P. Ling** (2012). "TBK1-associated protein in endolysosomes (TAPE)/CC2D1A is a key regulator linking RIG-I-like receptors to antiviral immunity." *J Biol Chem* **287**(38): 32216-32221.
- Chiaruttini, N. und A. Roux** (2017). "Dynamic and elastic shape transitions in curved ESCRT-III filaments." *Curr Opin Cell Biol* **47**: 126-135.
- Childress, J. L., M. Acar, C. Tao und G. Halder** (2006). "Lethal giant discs, a novel C2-domain protein, restricts notch activation during endocytosis." *Curr Biol* **16**(22): 2228-2233.

- Christ, L., E. M. Wenzel, K. Liestol, C. Raiborg, C. Campsteijn und H. Stenmark** (2016). "ALIX and ESCRT-I/II function as parallel ESCRT-III recruiters in cytokinetic abscission." *J Cell Biol* **212**(5): 499-513.
- Clague, M. J.** (2002). "Membrane transport: a coat for ubiquitin." *Curr Biol* **12**(15): R529-531.
- Collinet, C., M. Stoter, C. R. Bradshaw, N. Samusik, J. C. Rink, D. Kenski, B. Habermann, F. Buchholz, R. Henschel, M. S. Mueller, W. E. Nagel, E. Fava, Y. Kalaidzidis und M. Zerial** (2010). "Systems survey of endocytosis by multiparametric image analysis." *Nature* **464**(7286): 243-249.
- Couturier, L., M. Trylinski, K. Mazouni, L. Darnet und F. Schweisguth** (2014). "A fluorescent tagging approach in *Drosophila* reveals late endosomal trafficking of Notch and Sanpodo." *J Cell Biol* **207**(3): 351-363.
- Crocker, J. A., S. L. Ziegenhorn und R. A. Holmgren** (2006). "Regulation of the *Drosophila* transcription factor, Cubitus interruptus, by two conserved domains." *Dev Biol* **291**(2): 368-381.
- De Franceschi, N., M. Alqabandi, N. Miguët, C. Caillat, S. Mangenot, W. Weissenhorn und P. Bassereau** (2018). "The ESCRT protein CHMP2B acts as a diffusion barrier on reconstituted membrane necks." *J Cell Sci* **132**(4).
- De Strooper, B., W. Annaert, P. Cupers, P. Saftig, K. Craessaerts, J. S. Mumm, E. H. Schroeter, V. Schrijvers, M. S. Wolfe, W. J. Ray, A. Goate und R. Kopan** (1999). "A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain." *Nature* **398**(6727): 518-522.
- Deshar, R., E. B. Cho, S. K. Yoon und J. B. Yoon** (2016). "CC2D1A and CC2D1B regulate degradation and signaling of EGFR and TLR4." *Biochem Biophys Res Commun* **480**(2): 280-287.
- Dietzl, G., D. Chen, F. Schnorrer, K. C. Su, Y. Barinova, M. Fellner, B. Gasser, K. Kinsey, S. Oettel, S. Scheiblauer, A. Couto, V. Marra, K. Keleman und B. J. Dickson** (2007). "A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*." *Nature* **448**(7150): 151-156.
- Dimaano, C., C. B. Jones, A. Hanono, M. Curtiss und M. Babst** (2008). "Ist1 regulates Vps4 localization and assembly." *Mol Biol Cell* **19**(2): 465-474.
- Drusenheimer, N., B. Migdal, S. Jackel, L. Tveriakhina, K. Scheider, K. Schulz, J. Groper, K. Kohrer und 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 Genet* **11**(12): e1005749.
- Dupre, S. und R. Haguenauer-Tsapis** (2001). "Deubiquitination step in the endocytic pathway of yeast plasma membrane proteins: crucial role of Doa4p ubiquitin isopeptidase." *Mol Cell Biol* **21**(14): 4482-4494.
- Elia, N., R. Sougrat, T. A. Spurlin, J. H. Hurley und J. Lippincott-Schwartz** (2011). "Dynamics of endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) machinery during cytokinesis and its role in abscission." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(12): 4846-4851.
- Engedal, N. und I. G. Mills** (2014). "Endosomal signaling and oncogenesis." *Methods Enzymol* **535**: 179-200.
- Felder, S., K. Miller, G. Moehren, A. Ullrich, J. Schlessinger und C. R. Hopkins** (1990). "Kinase activity controls the sorting of the epidermal growth factor receptor within the multivesicular body." *Cell* **61**(4): 623-634.
- Frankel, E. B. und A. Audhya** (2018). "ESCRT-dependent cargo sorting at multivesicular endosomes." *Semin Cell Dev Biol* **74**: 4-10.
- Furriols, M. und S. Bray** (2000). "Dissecting the mechanisms of suppressor of hairless function." *Dev Biol* **227**(2): 520-532.
- Furriols, M. und S. Bray** (2001). "A model Notch response element detects Suppressor of Hairless-dependent molecular switch." *Curr Biol* **11**(1): 60-64.
- Futter, C. E., A. Pearse, L. J. Hewlett und C. R. Hopkins** (1996). "Multivesicular endosomes containing internalized EGF-EGF receptor complexes mature and then fuse directly with lysosomes." *J Cell Biol* **132**(6): 1011-1023.

- Gallagher, C. M. und J. A. Knoblich** (2006). "The conserved c2 domain protein lethal (2) giant discs regulates protein trafficking in *Drosophila*." *Dev Cell* **11**(5): 641-653.
- Garrus, J. E., U. K. von Schwedler, O. W. Pornillos, S. G. Morham, K. H. Zavitz, H. E. Wang, D. A. Wettstein, K. M. Stray, M. Cote, R. L. Rich, D. G. Myszka und W. I. Sundquist** (2001). "Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding." *Cell* **107**(1): 55-65.
- Gaullier, J. M., E. Ronning, D. J. Gilooley und H. Stenmark** (2000). "Interaction of the EEA1 FYVE finger with phosphatidylinositol 3-phosphate and early endosomes. Role of conserved residues." *J Biol Chem* **275**(32): 24595-24600.
- Gibson, D. G., L. Young, R. Y. Chuang, J. C. Venter, C. A. Hutchison, 3rd und H. O. Smith** (2009). "Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases." *Nat Methods* **6**(5): 343-345.
- Gill, D. J., H. Teo, J. Sun, O. Perisic, D. B. Veprintsev, S. D. Emr und R. L. Williams** (2007). "Structural insight into the ESCRT-I/-II link and its role in MVB trafficking." *EMBO J* **26**(2): 600-612.
- Gilooley, D. J., I. C. Morrow, M. Lindsay, R. Gould, N. J. Bryant, J. M. Gaullier, R. G. Parton und H. Stenmark** (2000). "Localization of phosphatidylinositol 3-phosphate in yeast and mammalian cells." *EMBO J* **19**(17): 4577-4588.
- Göhrlich, B.** (2017). Etablierung eines endogenen Expressionssystems für transgene Notch-Konstrukte in *Drosophila melanogaster* und Untersuchung einer möglichen ESCRT abhängigen Rekrutierung von Lgd an die endosomale Membran Masterarbeit, Heinrich-Heine-Universität.
- Golic, K. G.** (1991). "Site-specific recombination between homologous chromosomes in *Drosophila*." *Science* **252**(5008): 958-961.
- Golic, K. G. und S. Lindquist** (1989). "The FLP recombinase of yeast catalyzes site-specific recombination in the *Drosophila* genome." *Cell* **59**(3): 499-509.
- Gordon, W. R., D. Vardar-Ulu, G. Histén, C. Sanchez-Irizarry, J. C. Aster und S. C. Blacklow** (2007). "Structural basis for autoinhibition of Notch." *Nat Struct Mol Biol* **14**(4): 295-300.
- Gorvel, J. P., P. Chavrier, M. Zerial und J. Gruenberg** (1991). "rab5 controls early endosome fusion in vitro." *Cell* **64**(5): 915-925.
- Greenwald, I. und G. Seydoux** (1990). "Analysis of gain-of-function mutations of the lin-12 gene of *Caenorhabditis elegans*." *Nature* **346**(6280): 197-199.
- Guizetti, J., L. Schermelleh, J. Mantler, S. Maar, I. Poser, H. Leonhardt, T. Müller-Reichert und D. W. Gerlich** (2011). "Cortical constriction during abscission involves helices of ESCRT-III-dependent filaments." *Science* **331**(6024): 1616-1620.
- Haigler, H. T., J. A. McKanna und S. Cohen** (1979). "Direct visualization of the binding and internalization of a ferritin conjugate of epidermal growth factor in human carcinoma cells A-431." *J Cell Biol* **81**(2): 382-395.
- Hanson, P. I., R. Roth, Y. Lin und J. E. Heuser** (2008). "Plasma membrane deformation by circular arrays of ESCRT-III protein filaments." *J Cell Biol* **180**(2): 389-402.
- Hayashi, M. T. und J. Karlseder** (2013). "DNA damage associated with mitosis and cytokinesis failure." *Oncogene* **32**(39): 4593-4601.
- Henne, W. M., N. J. Buchkovich und S. D. Emr** (2011). "The ESCRT pathway." *Dev Cell* **21**(1): 77-91.
- Henne, W. M., N. J. Buchkovich, Y. Zhao und S. D. Emr** (2012). "The endosomal sorting complex ESCRT-II mediates the assembly and architecture of ESCRT-III helices." *Cell* **151**(2): 356-371.
- Herz, H. M., Z. Chen, H. Scherr, M. Lackey, C. Bolduc und A. Bergmann** (2006). "vps25 mosaics display non-autonomous cell survival and overgrowth, and autonomous apoptosis." *Development* **133**(10): 1871-1880.
- Hirano, S., M. Kawasaki, H. Ura, R. Kato, C. Raiborg, H. Stenmark und S. Wakatsuki** (2006). "Double-sided ubiquitin binding of Hrs-UIM in endosomal protein sorting." *Nat Struct Mol Biol* **13**(3): 272-277.

- Holland, A. J. und D. W. Cleveland** (2012). "Losing balance: the origin and impact of aneuploidy in cancer." *EMBO Rep* **13**(6): 501-514.
- Hori, K., A. Sen, T. Kirchhausen und S. Artavanis-Tsakonas** (2011). "Synergy between the ESCRT-III complex and Deltex defines a ligand-independent Notch signal." *J Cell Biol* **195**(6): 1005-1015.
- Horii, M., H. Shibata, R. Kobayashi, K. Katoh, C. Yorikawa, J. Yasuda und M. Maki** (2006). "CHMP7, a novel ESCRT-III-related protein, associates with CHMP4b and functions in the endosomal sorting pathway." *Biochem J* **400**(1): 23-32.
- Housden, B. E., K. Millen und S. J. Bray** (2012). "Drosophila Reporter Vectors Compatible with PhiC31 Integrase Transgenesis Techniques and Their Use to Generate New Notch Reporter Fly Lines." *G3 (Bethesda)* **2**(1): 79-82.
- Hu, Y. B., E. B. Dammer, R. J. Ren und G. Wang** (2015). "The endosomal-lysosomal system: from acidification and cargo sorting to neurodegeneration." *Transl Neurodegener* **4**: 18.
- Huang, L. K. und M. J. J. Wang** (1995). "Image Thresholding by Minimizing the Measures of Fuzziness." *Pattern Recognition* **28**(1): 41-51.
- Huotari, J. und A. Helenius** (2011). "Endosome maturation." *EMBO J* **30**(17): 3481-3500.
- Im, Y. J., T. Wollert, E. Boura und J. H. Hurley** (2009). "Structure and function of the ESCRT-II-III interface in multivesicular body biogenesis." *Dev Cell* **17**(2): 234-243.
- Jäckel, S.** (2010). Identifizierung eines Interaktionspartners von Lethal (2) giant discs (Lgd) in *Drosophila melanogaster* und konditionale Inaktivierung der *lgd*-Orthologen in der Maus
Dissertation, Universität zu Köln.
- Jaekel, R. und T. Klein** (2006). "The Drosophila Notch inhibitor and tumor suppressor gene lethal (2) giant discs encodes a conserved regulator of endosomal trafficking." *Dev Cell* **11**(5): 655-669.
- Jasin, M. und R. Rothstein** (2013). "Repair of strand breaks by homologous recombination." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**(11): a012740.
- Jimenez, A. J., P. Maiuri, J. Lafaurie-Janvore, S. Divoux, M. Piel und F. Perez** (2014). "ESCRT machinery is required for plasma membrane repair." *Science* **343**(6174): 1247136.
- Jinek, M., K. Chylinski, I. Fonfara, M. Hauer, J. A. Doudna und E. Charpentier** (2012). "A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity." *Science* **337**(6096): 816-821.
- Jovic, M., M. Sharma, J. Rahajeng und S. Caplan** (2010). "The early endosome: a busy sorting station for proteins at the crossroads." *Histol Histopathol* **25**(1): 99-112.
- Kahsai, L., G. H. Millburn und K. R. Cook** (2016). "Phenotypes Associated with Second Chromosome P Element Insertions in *Drosophila melanogaster*." *G3 (Bethesda)* **6**(8): 2665-2670.
- Katoh, K., H. Shibata, K. Hatta und M. Maki** (2004). "CHMP4b is a major binding partner of the ALG-2-interacting protein Alix among the three CHMP4 isoforms." *Arch Biochem Biophys* **421**(1): 159-165.
- Katoh, K., H. Shibata, H. Suzuki, A. Nara, K. Ishidoh, E. Kominami, T. Yoshimori und M. Maki** (2003). "The ALG-2-interacting protein Alix associates with CHMP4b, a human homologue of yeast Snf7 that is involved in multivesicular body sorting." *J Biol Chem* **278**(40): 39104-39113.
- Katzmann, D. J., M. Babst und S. D. Emr** (2001). "Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I." *Cell* **106**(2): 145-155.
- Katzmann, D. J., C. J. Stefan, M. Babst und S. D. Emr** (2003). "Vps27 recruits ESCRT machinery to endosomes during MVB sorting." *J Cell Biol* **162**(3): 413-423.
- Kidd, S., T. Lieber und M. W. Young** (1998). "Ligand-induced cleavage and regulation of nuclear entry of Notch in *Drosophila melanogaster* embryos." *Genes Dev* **12**(23): 3728-3740.
- Klein, T.** (2001). "Wing disc development in the fly: the early stages." *Curr Opin Genet Dev* **11**(4): 470-475.

- Klein, T.** (2003). "The tumour suppressor gene *l(2)giant discs* is required to restrict the activity of Notch to the dorsoventral boundary during *Drosophila* wing development." *Dev Biol* **255**(2): 313-333.
- Kniebel, A.** (2016). Etablierung eines Expressionssystems zur Untersuchung der Funktion transgener Notch-Konstrukte unter endogenen Bedingungen und Analysen zur endosomalen Lokalisation von *Lethal (2) giant discs 1* in *Drosophila melanogaster* Masterarbeit, Heinrich-Heine-Universität.
- Kostelansky, M. S., C. Schluter, Y. Y. Tam, S. Lee, R. Ghirlando, B. Beach, E. Conibear und J. H. Hurley** (2007). "Molecular architecture and functional model of the complete yeast ESCRT-I heterotetramer." *Cell* **129**(3): 485-498.
- Kranz, A., A. Kinner und R. Kolling** (2001). "A family of small coiled-coil-forming proteins functioning at the late endosome in yeast." *Mol Biol Cell* **12**(3): 711-723.
- Kyuuma, M., K. Kikuchi, K. Kojima, Y. Sugawara, M. Sato, N. Mano, J. Goto, T. Takeshita, A. Yamamoto, K. Sugamura und N. Tanaka** (2007). "AMSH, an ESCRT-III associated enzyme, deubiquitinates cargo on MVB/late endosomes." *Cell Struct Funct* **31**(2): 159-172.
- Lata, S., M. Roessle, J. Solomons, M. Jamin, H. G. Gottlinger, D. I. Svergun und W. Weissenhorn** (2008b). "Structural basis for autoinhibition of ESCRT-III CHMP3." *J Mol Biol* **378**(4): 818-827.
- Lata, S., G. Schoehn, A. Jain, R. Pires, J. Piehler, H. G. Gottlinger und W. Weissenhorn** (2008a). "Helical structures of ESCRT-III are disassembled by VPS4." *Science* **321**(5894): 1354-1357.
- Lecourtois, M. und F. Schweisguth** (1998). "Indirect evidence for Delta-dependent intracellular processing of notch in *Drosophila* embryos." *Curr Biol* **8**(13): 771-774.
- Levayer, R. und E. Moreno** (2013). "Mechanisms of cell competition: themes and variations." *J Cell Biol* **200**(6): 689-698.
- Lin, Y., L. A. Kimpler, T. V. Naismith, J. M. Lauer und P. I. Hanson** (2005). "Interaction of the mammalian endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) III protein hSnf7-1 with itself, membranes, and the AAA+ ATPase SKD1." *J Biol Chem* **280**(13): 12799-12809.
- Lloyd, T. E., R. Atkinson, M. N. Wu, Y. Zhou, G. Pennetta und H. J. Bellen** (2002). "Hrs regulates endosome membrane invagination and tyrosine kinase receptor signaling in *Drosophila*." *Cell* **108**(2): 261-269.
- Logeat, F., C. Bessia, C. Brou, O. LeBail, S. Jarriault, N. G. Seidah und A. Israel** (1998). "The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(14): 8108-8112.
- Lottridge, J. M., A. R. Flannery, J. L. Vincelli und T. H. Stevens** (2006). "Vta1p and Vps46p regulate the membrane association and ATPase activity of Vps4p at the yeast multivesicular body." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(16): 6202-6207.
- Lu, Q., L. W. Hope, M. Brasch, C. Reinhard und S. N. Cohen** (2003). "TSG101 interaction with HRS mediates endosomal trafficking and receptor down-regulation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(13): 7626-7631.
- Luhtala, N. und G. Odorizzi** (2004). "Bro1 coordinates deubiquitination in the multivesicular body pathway by recruiting Doa4 to endosomes." *J Cell Biol* **166**(5): 717-729.
- 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 und C. A. Walsh** (2014). "CC2D1A regulates human intellectual and social function as well as NF-kappaB signaling homeostasis." *Cell Rep* **8**(3): 647-655.
- Marois, E., A. Mahmoud und S. Eaton** (2006). "The endocytic pathway and formation of the Wingless morphogen gradient." *Development* **133**(2): 307-317.
- Martinelli, N., B. Hartlieb, Y. Usami, C. Sabin, A. Dordor, N. Miguet, S. V. Avilov, E. A. Ribeiro, Jr., H. Gottlinger und W. Weissenhorn** (2012). "CC2D1A is a regulator of ESCRT-III CHMP4B." *J Mol Biol* **419**(1-2): 75-88.

- Marygold, S. J., J. Roote, G. Reuter, A. Lambertsson, M. Ashburner, G. H. Millburn, P. M. Harrison, Z. Yu, N. Kenmochi, T. C. Kaufman, S. J. Leever und K. R. Cook (2007). "The ribosomal protein genes and Minute loci of *Drosophila melanogaster*." *Genome Biol* **8**(10): R216.
- Matsuda, A., Y. Suzuki, G. Honda, S. Muramatsu, O. Matsuzaki, Y. Nagano, T. Doi, K. Shimotohno, T. Harada, E. Nishida, H. Hayashi und S. Sugano (2003). "Large-scale identification and characterization of human genes that activate NF-kappaB and MAPK signaling pathways." *Oncogene* **22**(21): 3307-3318.
- Maxfield, F. R. und D. J. Yamashiro (1987). "Endosome acidification and the pathways of receptor-mediated endocytosis." *Adv Exp Med Biol* **225**: 189-198.
- McCullough, J., R. D. Fisher, F. G. Whitby, W. I. Sundquist und C. P. Hill (2008). "ALIX-CHMP4 interactions in the human ESCRT pathway." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(22): 7687-7691.
- McCullough, J., A. Frost und W. I. Sundquist (2018). "Structures, Functions, and Dynamics of ESCRT-III/Vps4 Membrane Remodeling and Fission Complexes." *Annu Rev Cell Dev Biol* **34**: 85-109.
- McGuire, S. E., P. T. Le, A. J. Osborn, K. Matsumoto und R. L. Davis (2003). "Spatiotemporal rescue of memory dysfunction in *Drosophila*." *Science* **302**(5651): 1765-1768.
- McMillan, B. J., C. Tibbe, A. A. Drabek, T. C. M. Seegar, S. C. Blacklow und T. Klein (2017). "Structural Basis for Regulation of ESCRT-III Complexes by Lgd." *Cell Rep* **19**(9): 1750-1757.
- McMillan, B. J., C. Tibbe, H. Jeon, A. A. Drabek, T. Klein und S. C. Blacklow (2016). "Electrostatic Interactions between Elongated Monomers Drive Filamentation of *Drosophila* Shrub, a Metazoan ESCRT-III Protein." *Cell Rep* **16**(5): 1211-1217.
- Meloty-Kapella, L., B. Shergill, J. Kuon, E. Botvinick und G. Weinmaster (2012). "Notch ligand endocytosis generates mechanical pulling force dependent on dynamin, epsins, and actin." *Dev Cell* **22**(6): 1299-1312.
- Mierzwa, B. E., N. Chiaruttini, L. Redondo-Morata, J. Moser von Filseck, J. König, J. Larios, I. Poser, T. Müller-Reichert, S. Scheuring, A. Roux und D. W. Gerlich (2017). "Dynamic subunit turnover in ESCRT-III assemblies is regulated by Vps4 to mediate membrane remodelling during cytokinesis." *Nat Cell Biol* **19**(7): 787-798.
- Migdal, B. (2016). Analysen zur Funktion von CC2D1A und CC2D1B im endosomalen Transportweg und zur Interaktion mit ESCRT-III Proteinen in Säugern, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Mizuno, E., K. Kawahata, M. Kato, N. Kitamura und M. Komada (2003). "STAM proteins bind ubiquitinated proteins on the early endosome via the VHS domain and ubiquitin-interacting motif." *Mol Biol Cell* **14**(9): 3675-3689.
- Moberg, K. H., S. Schelble, S. K. Burdick und I. K. Hariharan (2005). "Mutations in erupted, the *Drosophila* ortholog of mammalian tumor susceptibility gene 101, elicit non-cell-autonomous overgrowth." *Dev Cell* **9**(5): 699-710.
- Monroe, N., H. Han, M. D. Gonciarz, D. M. Eckert, M. A. Karren, F. G. Whitby, W. I. Sundquist und C. P. Hill (2014). "The oligomeric state of the active Vps4 AAA ATPase." *J Mol Biol* **426**(3): 510-525.
- Morawa, K. S., M. Schneider und T. Klein (2015). "Lgd regulates the activity of the BMP/Dpp signalling pathway during *Drosophila* oogenesis." *Development* **142**(7): 1325-1335.
- Morel, V. und F. Schweisguth (2000). "Repression by suppressor of hairless and activation by Notch are required to define a single row of single-minded expressing cells in the *Drosophila* embryo." *Genes Dev* **14**(3): 377-388.
- Morita, E., V. Sandrin, H. Y. Chung, S. G. Morham, S. P. Gygi, C. K. Rodesch und W. I. Sundquist (2007). "Human ESCRT and ALIX proteins interact with proteins of the midbody and function in cytokinesis." *EMBO J* **26**(19): 4215-4227.
- Morita, E., V. Sandrin, J. McCullough, A. Katsuyama, I. Baci Hamilton und W. I. Sundquist (2011). "ESCRT-III protein requirements for HIV-1 budding." *Cell Host Microbe* **9**(3): 235-242.

- Mumm, J. S., E. H. Schroeter, M. T. Saxena, A. Griesemer, X. Tian, D. J. Pan, W. J. Ray und R. Kopan (2000). "A ligand-induced extracellular cleavage regulates gamma-secretase-like proteolytic activation of Notch1." Mol Cell **5**(2): 197-206.
- Murk, J. L., B. M. Humbel, U. Ziese, J. M. Griffith, G. Posthuma, J. W. Slot, A. J. Koster, A. J. Verkleij, H. J. Geuze und M. J. Kleijmeer (2003). "Endosomal compartmentalization in three dimensions: implications for membrane fusion." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(23): 13332-13337.
- Muziol, T., E. Pineda-Molina, R. B. Ravelli, A. Zamborlini, Y. Usami, H. Gottlinger und W. Weissenhorn (2006). "Structural basis for budding by the ESCRT-III factor CHMP3." Dev Cell **10**(6): 821-830.
- Nakamura, A., H. Arai und N. Fujita (2009). "Centrosomal Aki1 and cohesin function in separase-regulated centriole disengagement." J Cell Biol **187**(5): 607-614.
- Nakamura, A., M. Naito, T. Tsuruo und 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." Mol Cell Biol **28**(19): 5996-6009.
- Nickerson, D. P., M. West und G. Odorizzi (2006). "Did2 coordinates Vps4-mediated dissociation of ESCRT-III from endosomes." J Cell Biol **175**(5): 715-720.
- Obita, T., S. Saksena, S. Ghazi-Tabatabai, D. J. Gill, O. Perisic, S. D. Emr und R. L. Williams (2007). "Structural basis for selective recognition of ESCRT-III by the AAA ATPase Vps4." Nature **449**(7163): 735-739.
- Odorizzi, G., M. Babst und S. D. Emr (1998). "Fab1p PtdIns(3)P 5-kinase function essential for protein sorting in the multivesicular body." Cell **95**(6): 847-858.
- Oh, S. W., T. Kingsley, H. H. Shin, Z. Zheng, H. W. Chen, X. Chen, H. Wang, P. Ruan, M. Moody und S. X. Hou (2003). "A P-element insertion screen identified mutations in 455 novel essential genes in *Drosophila*." Genetics **163**(1): 195-201.
- Olmos, Y., L. Hodgson, J. Mantell, P. Verkade und J. G. Carlton (2015). "ESCRT-III controls nuclear envelope reformation." Nature **522**(7555): 236-239.
- Olmos, Y., A. Perdrix-Rosell und J. G. Carlton (2016). "Membrane Binding by CHMP7 Coordinates ESCRT-III-Dependent Nuclear Envelope Reformation." Curr Biol **26**(19): 2635-2641.
- Ou, X. M., S. Lemonde, H. Jafar-Nejad, C. D. Bown, A. Goto, A. Rogaeva und P. R. Albert (2003). "Freud-1: A neuronal calcium-regulated repressor of the 5-HT1A receptor gene." J Neurosci **23**(19): 7415-7425.
- Pannen, H. (2016). Analyse der Aufrechterhaltung von Zellpolarität und Zell-Zell-Kontakten durch den ESCRT-III-Komplex in Epithelien von *Drosophila melanogaster* Masterarbeit, Heinrich-Heine-Universität.
- Parks, A. L., K. M. Klueg, J. R. Stout und M. A. Muskavitch (2000). "Ligand endocytosis drives receptor dissociation and activation in the Notch pathway." Development **127**(7): 1373-1385.
- Pasternak, S. H., R. D. Bagshaw, M. Guiral, S. Zhang, C. A. Ackerley, B. J. Pak, J. W. Callahan und D. J. Mahuran (2003). "Presenilin-1, nicastrin, amyloid precursor protein, and gamma-secretase activity are co-localized in the lysosomal membrane." J Biol Chem **278**(29): 26687-26694.
- Peck, J. W., E. T. Bowden und P. D. Burbelo (2004). "Structure and function of human Vps20 and Snf7 proteins." Biochem J **377**(Pt 3): 693-700.
- Perez-Moreno, M., C. Jamora und E. Fuchs (2003). "Sticky business: orchestrating cellular signals at adherens junctions." Cell **112**(4): 535-548.
- Phelps, C. B. und A. H. Brand (1998). "Ectopic gene expression in *Drosophila* using GAL4 system." Methods **14**(4): 367-379.
- Platta, H. W. und H. Stenmark (2011). "Endocytosis and signaling." Curr Opin Cell Biol **23**(4): 393-403.
- Ponting, C. P., R. Mott, P. Bork und R. R. Copley (2001). "Novel protein domains and repeats in *Drosophila melanogaster*: insights into structure, function, and evolution." Genome Res **11**(12): 1996-2008.

- Pornillos, O., S. L. Alam, R. L. Rich, D. G. Myszka, D. R. Davis und W. I. Sundquist** (2002). "Structure and functional interactions of the Tsg101 UEV domain." *EMBO J* **21**(10): 2397-2406.
- Port, F., H. M. Chen, T. Lee und S. L. Bullock** (2014). "Optimized CRISPR/Cas tools for efficient germline and somatic genome engineering in *Drosophila*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**(29): E2967-2976.
- Raiborg, C., K. G. Bache, D. J. Gillooly, I. H. Madshus, E. Stang und H. Stenmark** (2002). "Hrs sorts ubiquitinated proteins into clathrin-coated microdomains of early endosomes." *Nat Cell Biol* **4**(5): 394-398.
- Raiborg, C., B. Bremnes, A. Mehlum, D. J. Gillooly, A. D'Arrigo, E. Stang und H. Stenmark** (2001). "FYVE and coiled-coil domains determine the specific localisation of Hrs to early endosomes." *J Cell Sci* **114**(Pt 12): 2255-2263.
- Raiborg, C., J. Wesche, L. Malerod und H. Stenmark** (2006). "Flat clathrin coats on endosomes mediate degradative protein sorting by scaffolding Hrs in dynamic microdomains." *J Cell Sci* **119**(Pt 12): 2414-2424.
- Raymond, C. K., I. Howald-Stevenson, C. A. Vater und T. H. Stevens** (1992). "Morphological classification of the yeast vacuolar protein sorting mutants: evidence for a prevacuolar compartment in class E vps mutants." *Mol Biol Cell* **3**(12): 1389-1402.
- Ren, X. und J. H. Hurley** (2010). "VHS domains of ESCRT-0 cooperate in high-avidity binding to polyubiquitinated cargo." *EMBO J* **29**(6): 1045-1054.
- Richter, C., M. West und G. Odorizzi** (2007). "Dual mechanisms specify Doa4-mediated deubiquitination at multivesicular bodies." *EMBO J* **26**(10): 2454-2464.
- Richter, C. M., M. West und G. Odorizzi** (2013). "Doa4 function in ILV budding is restricted through its interaction with the Vps20 subunit of ESCRT-III." *J Cell Sci* **126**(Pt 8): 1881-1890.
- Rink, J., E. Ghigo, Y. Kalaidzidis und M. Zerial** (2005). "Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes." *Cell* **122**(5): 735-749.
- Rogaeva, A. und P. R. Albert** (2007). "The mental retardation gene CC2D1A/Freud-1 encodes a long isoform that binds conserved DNA elements to repress gene transcription." *Eur J Neurosci* **26**(4): 965-974.
- Rogaeva, A., X. M. Ou, H. Jafar-Nejad, S. Lemonde und P. R. Albert** (2007). "Differential repression by freud-1/CC2D1A at a polymorphic site in the dopamine-D2 receptor gene." *J Biol Chem* **282**(29): 20897-20905.
- Rothman, J. H. und T. H. Stevens** (1986). "Protein sorting in yeast: mutants defective in vacuole biogenesis mislocalize vacuolar proteins into the late secretory pathway." *Cell* **47**(6): 1041-1051.
- Rubino, M., M. Miaczynska, R. Lippe und M. Zerial** (2000). "Selective membrane recruitment of EEA1 suggests a role in directional transport of clathrin-coated vesicles to early endosomes." *J Biol Chem* **275**(6): 3745-3748.
- Rue, S. M., S. Mattei, S. Saksena und S. D. Emr** (2008). "Novel Ist1-Did2 complex functions at a late step in multivesicular body sorting." *Mol Biol Cell* **19**(2): 475-484.
- Russell, M. R., T. Shideler, D. P. Nickerson, M. West und G. Odorizzi** (2012). "Class E compartments form in response to ESCRT dysfunction in yeast due to hyperactivity of the Vps21 Rab GTPase." *J Cell Sci* **125**(Pt 21): 5208-5220.
- Sachse, M., S. Urbe, V. Oorschot, G. J. Strous und J. Klumperman** (2002). "Bilayered clathrin coats on endosomal vacuoles are involved in protein sorting toward lysosomes." *Mol Biol Cell* **13**(4): 1313-1328.
- Sadler, J. B. A., D. M. Wenzel, L. K. Williams, M. Guindo-Martinez, S. L. Alam, J. M. Mercader, D. Torrents, K. S. Ullman, W. I. Sundquist und J. Martin-Serrano** (2018). "A cancer-associated polymorphism in ESCRT-III disrupts the abscission checkpoint and promotes genome instability." *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**(38): E8900-E8908.
- Sakamoto, K., O. Ohara, M. Takagi, S. Takeda und K. Katsube** (2002). "Intracellular cell-autonomous association of Notch and its ligands: a novel mechanism of Notch signal modification." *Dev Biol* **241**(2): 313-326.

- Saksena, S., J. Wahlman, D. Teis, A. E. Johnson und S. D. Emr** (2009). "Functional reconstitution of ESCRT-III assembly and disassembly." *Cell* **136**(1): 97-109.
- Sanchez-Irizarry, C., A. C. Carpenter, A. P. Weng, W. S. Pear, J. C. Aster und S. C. Blacklow** (2004). "Notch subunit heterodimerization and prevention of ligand-independent proteolytic activation depend, respectively, on a novel domain and the LNR repeats." *Mol Cell Biol* **24**(21): 9265-9273.
- Sanchez-Vega, F., M. Mina, J. Armenia, W. K. Chatila, A. Luna, K. C. La, S. Dimitriadoy, D. L. Liu, H. S. Kantheti, S. Saghafinia, D. Chakravarty, F. Daian, Q. Gao, M. H. Bailey, W. W. Liang, S. M. Foltz, I. Shmulevich, L. Ding, Z. Heins, A. Ochoa, B. Gross, J. Gao, H. Zhang, R. Kundra, C. Kandath, I. Bahceci, L. Dervishi, U. Dogrusoz, W. Zhou, H. Shen, P. W. Laird, G. P. Way, C. S. Greene, H. Liang, Y. Xiao, C. Wang, A. Iavarone, A. H. Berger, T. G. Bivona, A. J. Lazar, G. D. Hammer, T. Giordano, L. N. Kwong, G. McArthur, C. Huang, A. D. Tward, M. J. Frederick, F. McCormick, M. Meyerson, N. Cancer Genome Atlas Research, E. M. Van Allen, A. D. Cherniack, G. Ciriello, C. Sander und N. Schultz** (2018). "Oncogenic Signaling Pathways in The Cancer Genome Atlas." *Cell* **173**(2): 321-337 e310.
- Sander, J. D. und J. K. Joung** (2014). "CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes." *Nat Biotechnol* **32**(4): 347-355.
- Schindelin, J., I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, J. Y. Tinevez, D. J. White, V. Hartenstein, K. Eliceiri, P. Tomancak und A. Cardona** (2012). "Fiji: an open-source platform for biological-image analysis." *Nat Methods* **9**(7): 676-682.
- Schneider, M., T. Troost, F. Grawe, A. Martinez-Arias und T. Klein** (2013). "Activation of Notch in lgd mutant cells requires the fusion of late endosomes with the lysosome." *J Cell Sci* **126**(Pt 2): 645-656.
- Schnute, B., T. Troost und T. Klein** (2018). "Endocytic Trafficking of the Notch Receptor." *Adv Exp Med Biol* **1066**: 99-122.
- Schöneberg, J., I. H. Lee, J. H. Iwasa und J. H. Hurley** (2017). "Reverse-topology membrane scission by the ESCRT proteins." *Nat Rev Mol Cell Biol* **18**(1): 5-17.
- Schöneberg, J., M. R. Pavlin, S. Yan, M. Righini, I. H. Lee, L. A. Carlson, A. H. Bahrami, D. H. Goldman, X. Ren, G. Hummer, C. Bustamante und J. H. Hurley** (2018). "ATP-dependent force generation and membrane scission by ESCRT-III and Vps4." *Science* **362**(6421): 1423-1428.
- Schroeter, E. H., J. A. Kisslinger und R. Kopan** (1998). "Notch-1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain." *Nature* **393**(6683): 382-386.
- Schuh, A. L., M. Hanna, K. Quinney, L. Wang, A. Sarkeshik, J. R. Yates, 3rd und A. Audhya** (2015). "The VPS-20 subunit of the endosomal sorting complex ESCRT-III exhibits an open conformation in the absence of upstream activation." *Biochem J* **466**(3): 625-637.
- Schulz, K.** (2015). Analyse der Funktion der humanen LGDs und hLGD2MR in humanen Zellen und in *Drosophila melanogaster*, Heinrich-Heine-Universität.
- Senthilan, P. R., D. Piepenbrock, G. Ovezmyradov, B. Nadrowski, S. Bechstedt, S. Pauls, M. Winkler, W. Mobius, J. Howard und M. C. Gopfert** (2012). "Drosophila auditory organ genes and genetic hearing defects." *Cell* **150**(5): 1042-1054.
- Shen, Q. T., A. L. Schuh, Y. Zheng, K. Quinney, L. Wang, M. Hanna, J. C. Mitchell, M. S. Otegui, P. Ahlquist, Q. Cui und A. Audhya** (2014). "Structural analysis and modeling reveals new mechanisms governing ESCRT-III spiral filament assembly." *J Cell Biol* **206**(6): 763-777.
- Shields, S. B., A. J. Oestreich, S. Winistorfer, D. Nguyen, J. A. Payne, D. J. Katzmann und R. Piper** (2009). "ESCRT ubiquitin-binding domains function cooperatively during MVB cargo sorting." *J Cell Biol* **185**(2): 213-224.
- Shiflett, S. L., D. M. Ward, D. Huynh, M. B. Vaughn, J. C. Simmons und J. Kaplan** (2004). "Characterization of Vta1p, a class E Vps protein in *Saccharomyces cerevisiae*." *J Biol Chem* **279**(12): 10982-10990.
- Shim, S., L. A. Kimpler und P. I. Hanson** (2007). "Structure/function analysis of four core ESCRT-III proteins reveals common regulatory role for extreme C-terminal domain." *Traffic* **8**(8): 1068-1079.

- Skowyra, M. L., P. H. Schlesinger, T. V. Naismith und P. I. Hanson** (2018). "Triggered recruitment of ESCRT machinery promotes endolysosomal repair." *Science* **360**(6384).
- Slagsvold, T., R. Aasland, S. Hirano, K. G. Bache, C. Raiborg, D. Trambaiolo, S. Wakatsuki und H. Stenmark** (2005). "Eap45 in mammalian ESCRT-II binds ubiquitin via a phosphoinositide-interacting GLUE domain." *J Biol Chem* **280**(20): 19600-19606.
- Sorkin, A. und M. von Zastrow** (2009). "Endocytosis and signalling: intertwining molecular networks." *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**(9): 609-622.
- Spasic, M. R., P. Callaerts und K. K. Norga** (2008). "Drosophila alicorn is a neuronal maintenance factor protecting against activity-induced retinal degeneration." *J Neurosci* **28**(25): 6419-6429.
- Speicher, S. A., U. Thomas, U. Hinz und E. Knust** (1994). "The Serrate locus of Drosophila and its role in morphogenesis of the wing imaginal discs: control of cell proliferation." *Development* **120**(3): 535-544.
- Sternberg, S. H., S. Redding, M. Jinek, E. C. Greene und J. A. Doudna** (2014). "DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9." *Nature* **507**(7490): 62-67.
- Struhl, G. und A. Adachi** (1998). "Nuclear access and action of notch in vivo." *Cell* **93**(4): 649-660.
- Struhl, G. und I. Greenwald** (1999). "Presenilin is required for activity and nuclear access of Notch in Drosophila." *Nature* **398**(6727): 522-525.
- Stuchell-Brereton, M. D., J. J. Skalicky, C. Kieffer, M. A. Karren, S. Ghaffarian und W. I. Sundquist** (2007). "ESCRT-III recognition by VPS4 ATPases." *Nature* **449**(7163): 740-744.
- Sweeney, N. T., J. E. Brenman, Y. N. Jan und F. B. Gao** (2006). "The coiled-coil protein shrub controls neuronal morphogenesis in Drosophila." *Curr Biol* **16**(10): 1006-1011.
- Tang, S., N. J. Buchkovich, W. M. Henne, S. Banjade, Y. J. Kim und S. D. Emr** (2016). "ESCRT-III activation by parallel action of ESCRT-I/II and ESCRT-0/Bro1 during MVB biogenesis." *Elife* **5**.
- Tang, S., W. M. Henne, P. P. Borbat, N. J. Buchkovich, J. H. Freed, Y. Mao, J. C. Fromme und S. D. Emr** (2015). "Structural basis for activation, assembly and membrane binding of ESCRT-III Snf7 filaments." *Elife* **4**.
- Tanimoto, H., S. Itoh, P. ten Dijke und T. Tabata** (2000). "Hedgehog creates a gradient of DPP activity in Drosophila wing imaginal discs." *Mol Cell* **5**(1): 59-71.
- Teis, D., S. Saksena und S. D. Emr** (2008). "Ordered assembly of the ESCRT-III complex on endosomes is required to sequester cargo during MVB formation." *Dev Cell* **15**(4): 578-589.
- Teis, D., S. Saksena, B. L. Judson und S. D. Emr** (2010). "ESCRT-II coordinates the assembly of ESCRT-III filaments for cargo sorting and multivesicular body vesicle formation." *EMBO J* **29**(5): 871-883.
- Teo, H., D. J. Gill, J. Sun, O. Perisic, D. B. Veprintsev, Y. Vallis, S. D. Emr und R. L. Williams** (2006). "ESCRT-I core and ESCRT-II GLUE domain structures reveal role for GLUE in linking to ESCRT-I and membranes." *Cell* **125**(1): 99-111.
- Teo, H., O. Perisic, B. Gonzalez und R. L. Williams** (2004). "ESCRT-II, an endosome-associated complex required for protein sorting: crystal structure and interactions with ESCRT-III and membranes." *Dev Cell* **7**(4): 559-569.
- Thompson, B. J., J. Mathieu, H. H. Sung, E. Loeser, P. Rorth und S. M. Cohen** (2005). "Tumor suppressor properties of the ESCRT-II complex component Vps25 in Drosophila." *Dev Cell* **9**(5): 711-720.
- Tibbe, C.** (2019). Struktur- und Funktionsanalyse der Lgd DM14 Domänen und der Interaktion dieser mit der ESCRT-III Untereinheit Shrub in *Drosophila melanogaster* Dissertation.
- Troost, T.** (2013). Analyse der liganden-unabhängigen Aktivierung des Notch Rezeptors in Lgd Mutanten und der liganden-abhängigen Aktivierung des Notch Rezeptors während der Flügelentwicklung in Drosophila, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

- Troost, T., S. Jaeckel, N. Ohlenhard und T. Klein** (2012). "The tumour suppressor Lethal (2) giant discs is required for the function of the ESCRT-III component Shrub/CHMP4." *J Cell Sci* **125**(Pt 3): 763-776.
- Tsang, H. T., J. W. Connell, S. E. Brown, A. Thompson, E. Reid und C. M. Sanderson** (2006). "A systematic analysis of human CHMP protein interactions: additional MIT domain-containing proteins bind to multiple components of the human ESCRT III complex." *Genomics* **88**(3): 333-346.
- Usami, Y., S. Popov, E. R. Weiss, C. Vriesema-Magnuson, A. Calistri und H. G. Gottlinger** (2012). "Regulation of CHMP4/ESCRT-III function in human immunodeficiency virus type 1 budding by CC2D1A." *J Virol* **86**(7): 3746-3756.
- Uv, A. E., E. J. Harrison und S. J. Bray** (1997). "Tissue-specific splicing and functions of the Drosophila transcription factor Grainyhead." *Mol Cell Biol* **17**(11): 6727-6735.
- Vaccari, T. und D. Bilder** (2005). "The Drosophila tumor suppressor vps25 prevents nonautonomous overproliferation by regulating notch trafficking." *Dev Cell* **9**(5): 687-698.
- Vaccari, T., H. Lu, R. Kanwar, M. E. Fortini und D. Bilder** (2008). "Endosomal entry regulates Notch receptor activation in Drosophila melanogaster." *J Cell Biol* **180**(4): 755-762.
- Vaccari, T., T. E. Rusten, L. Menut, I. P. Nezis, A. Brech, H. Stenmark und D. Bilder** (2009). "Comparative analysis of ESCRT-I, ESCRT-II and ESCRT-III function in Drosophila by efficient isolation of ESCRT mutants." *J Cell Sci* **122**(Pt 14): 2413-2423.
- Vanlandingham, P. A. und B. P. Ceresa** (2009). "Rab7 regulates late endocytic trafficking downstream of multivesicular body biogenesis and cargo sequestration." *J Biol Chem* **284**(18): 12110-12124.
- Venken, K. J., J. W. Carlson, K. L. Schulze, H. Pan, Y. He, R. Spokony, K. H. Wan, M. Koriabine, P. J. de Jong, K. P. White, H. J. Bellen und R. A. Hoskins** (2009). "Versatile P[acman] BAC libraries for transgenesis studies in Drosophila melanogaster." *Nat Methods* **6**(6): 431-434.
- Ventimiglia, L. N., M. A. Cuesta-Geijo, N. Martinelli, A. Caballe, P. Macheboeuf, N. Miguet, I. M. Parnham, Y. Olmos, J. G. Carlton, W. Weissenhorn und J. Martin-Serrano** (2018). "CC2D1B Coordinates ESCRT-III Activity during the Mitotic Reformation of the Nuclear Envelope." *Dev Cell* **47**(5): 547-563 e546.
- Vietri, M., K. O. Schink, C. Campsteijn, C. S. Wegner, S. W. Schultz, L. Christ, S. B. Thoresen, A. Brech, C. Raiborg und H. Stenmark** (2015). "Spastin and ESCRT-III coordinate mitotic spindle disassembly and nuclear envelope sealing." *Nature* **522**(7555): 231-235.
- Ward, D. M., M. B. Vaughn, S. L. Shiflett, P. L. White, A. L. Pollock, J. Hill, R. Schnegelberger, W. I. Sundquist und J. Kaplan** (2005). "The role of LIP5 and CHMP5 in multivesicular body formation and HIV-1 budding in mammalian cells." *J Biol Chem* **280**(11): 10548-10555.
- Wenzel, E. M., S. W. Schultz, K. O. Schink, N. M. Pedersen, V. Nahse, A. Carlson, A. Brech, H. Stenmark und C. Raiborg** (2018). "Concerted ESCRT and clathrin recruitment waves define the timing and morphology of intraluminal vesicle formation." *Nat Commun* **9**(1): 2932.
- Wilson, R. C. und J. A. Doudna** (2013). "Molecular mechanisms of RNA interference." *Annu Rev Biophys* **42**: 217-239.
- Wisotzkey, R. G., A. N. Johnson, N. T. Takaesu und S. J. Newfeld** (2003). "Alpha/beta hydrolase2, a predicated gene adjacent to mad in Drosophila melanogaster, belongs to a new global multigene family and is associated with obesity." *J Mol Evol* **56**(3): 351-361.
- Wollert, T. und J. H. Hurley** (2010). "Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes." *Nature* **464**(7290): 864-869.
- Wollert, T., C. Wunder, J. Lippincott-Schwartz und J. H. Hurley** (2009). "Membrane scission by the ESCRT-III complex." *Nature* **458**(7235): 172-177.
- Woods, D. F., C. Hough, D. Peel, G. Callaini und P. J. Bryant** (1996). "Dlg protein is required for junction structure, cell polarity, and proliferation control in Drosophila epithelia." *J Cell Biol* **134**(6): 1469-1482.

- Xiao, J., X. W. Chen, B. A. Davies, A. R. Saltiel, D. J. Katzmann und Z. Xu** (2009). "Structural basis of Ist1 function and Ist1-Did2 interaction in the multivesicular body pathway and cytokinesis." *Mol Biol Cell* **20**(15): 3514-3524.
- Xiao, J., H. Xia, J. Zhou, I. F. Azmi, B. A. Davies, D. J. Katzmann und Z. Xu** (2008). "Structural basis of Vta1 function in the multivesicular body sorting pathway." *Dev Cell* **14**(1): 37-49.
- Xu, T. und G. M. Rubin** (1993). "Analysis of genetic mosaics in developing and adult Drosophila tissues." *Development* **117**(4): 1223-1237.
- 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 und S. Yano** (2013). "Akt kinase-interacting protein1, a novel therapeutic target for lung cancer with EGFR-activating and gatekeeper mutations." *Oncogene* **32**(37): 4427-4435.
- Yamamoto, S., W. L. Charng und H. J. Bellen** (2010). "Endocytosis and intracellular trafficking of Notch and its ligands." *Curr Top Dev Biol* **92**: 165-200.
- Yamashiro, D. J., S. R. Fluss und F. R. Maxfield** (1983). "Acidification of endocytic vesicles by an ATP-dependent proton pump." *J Cell Biol* **97**(3): 929-934.
- Yang, B., G. Stjepanovic, Q. Shen, A. Martin und J. H. Hurley** (2015). "Vps4 disassembles an ESCRT-III filament by global unfolding and processive translocation." *Nat Struct Mol Biol* **22**(6): 492-498.
- Ye, Y., N. Lukinova und M. E. Fortini** (1999). "Neurogenic phenotypes and altered Notch processing in Drosophila Presenilin mutants." *Nature* **398**(6727): 525-529.
- Yousefian, J., T. Troost, F. Grawe, T. Sasamura, M. Fortini und T. Klein** (2013). "Dmon1 controls recruitment of Rab7 to maturing endosomes in Drosophila." *J Cell Sci* **126**(Pt 7): 1583-1594.
- Zamarbide, M., A. W. Oaks, H. L. Pond, J. S. Adelman und M. C. Manzini** (2018). "Loss of the Intellectual Disability and Autism Gene Cc2d1a and Its Homolog Cc2d1b Differentially Affect Spatial Memory, Anxiety, and Hyperactivity." *Front Genet* **9**: 65.
- Zamborlini, A., Y. Usami, S. R. Radoshitzky, E. Popova, G. Palu und H. Gottlinger** (2006). "Release of autoinhibition converts ESCRT-III components into potent inhibitors of HIV-1 budding." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(50): 19140-19145.
- Zhao, M., X. D. Li und Z. Chen** (2010). "CC2D1A, a DM14 and C2 domain protein, activates NF-kappaB through the canonical pathway." *J Biol Chem* **285**(32): 24372-24380.
- Zhao, M., J. Raingo, Z. J. Chen und E. T. Kavalali** (2011). "Cc2d1a, a C2 domain containing protein linked to nonsyndromic mental retardation, controls functional maturation of central synapses." *J Neurophysiol* **105**(4): 1506-1515.

8 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ant.	anterior
CC2D1	<u>C</u> oiled-coil and <u>C2</u> <u>D</u> omain-containing protein <u>1</u>
CHMP	<u>C</u> harged <u>M</u> ultivesicular Body <u>P</u> rotein
C-Terminus/-terminal	<u>C</u> arboxyl-Terminus
CyO	<u>C</u> urly of <u>O</u> ster – Balancer für das 2. Chromosom
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DM14	<i>Drosophila melanogaster</i> <u>14</u> domain
dNTPs, dATP, dCTP, dTTP, dGTP	Desoxynukleosidtriphosphat,-adenosin-, -cytidin-, -thymidin-, -guanosin-
DTT	Dithiothreitol
D/V	<u>d</u> orso- <u>v</u> entral
EDTA	<u>E</u> thylendiamintetraacetat
<i>en</i>	<i><u>e</u>ngrailed</i>
ESCRT	<u>E</u> ndosomal <u>S</u> orting <u>C</u> omplex <u>R</u> equired for <u>T</u> ransport
FRT	<u>F</u> lippase <u>R</u> ecognition <u>T</u> arget
GA	Glutaraldehyd
Gbe	Grainyhead binding element
Grh	Grainyhead
HF	<u>h</u> igh <u>f</u> idelity
<i>hh</i>	<i><u>h</u>edge<u>h</u>og</i>
HIV	<u>H</u> uman <u>I</u> mmunodeficiency <u>V</u> irus
If	<u>I</u> rrregular <u>f</u> acets – Marker für das 2. Chromosom
ILV	<u>i</u> ntra <u>l</u> uminale <u>V</u> esikel
ISO	isothermal
LAP	<u>L</u> ocalization and <u>A</u> ffinity <u>P</u> urification tag
LB	lysogeny broth
Lgd/ <i>lgd</i>	<i>l</i> ethal (2) <i>g</i> iant discs
Mam	Mastermind
MEF	<u>M</u> ouse <u>E</u> mbryonic <u>F</u> ibroblasts

MIM	<u>M</u> IT <u>I</u> nteracting <u>M</u> otif
MKRS	Balancer für das 3. Chromosom
MVB	<u>m</u> ulti <u>v</u> esicular <u>b</u> ody
NEB	New England Biolabs
NECD	<u>N</u> otch <u>E</u> xtra <u>C</u> ellular <u>D</u> omain
NFκB	<i>Nuclear factor-κB</i>
NGS	<u>n</u> ormal <u>g</u> oat <u>s</u> erum
NICD	<u>N</u> otch <u>I</u> ntra <u>C</u> ellular <u>D</u> omain
<i>P</i>	<u>P</u> romotor
PBS	<u>p</u> hosphate <u>b</u> uffered <u>s</u> aline
PDB	<u>P</u> rotein <u>D</u> ata <u>B</u> ank
PDK1/Akt	3- <u>p</u> hosphoinositide- <u>d</u> ependent protein <u>k</u> inase- <u>1</u>
PFA	Paraformaldehyd
post.	posterior
SM6a-TM6b	Compound Balancer: Doppel-Balancer für das 2. und 3. Chromosom
Su(H)	Supressor of Hairless
Tab.	Tabelle
TAE	<u>T</u> ris- <u>A</u> cetate- <u>E</u> DTA
TLR	<u>T</u> oll- <u>l</u> ike <u>r</u> eceptors
TM6b	Balancer für das 3. Chromosom
U	Unit
UAS	<u>u</u> pstream <u>a</u> ctivating <u>s</u> equence
Vps	<u>v</u> acuolar <u>p</u> rotein- <u>s</u> orting
<i>w</i>	<i>white</i>
<i>Wg/wg</i>	<i>Wingless, wingless</i>
wt	Wildtyp
x g/rpm	x-faches der Erdbeschleunigung/ revolutions per minute
vgl.	vergleiche
Δ	Deletion

9 Anhang

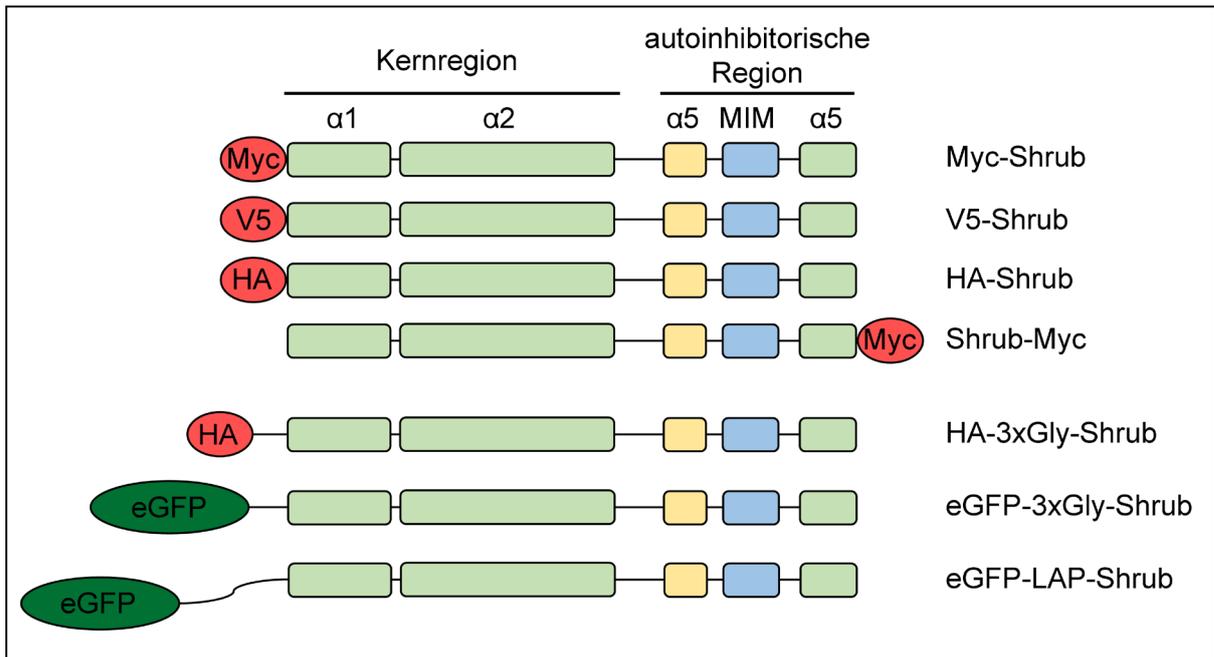


Abb. 9-1: Graphische Darstellung der unterschiedlichen Shrub-Konstrukte mit ihren jeweiligen Protein-Tags. Die Kernregion von Shrub liegt N-terminal und ist entscheidend für die Polymerisation der ESCRT-III Untereinheit (McMillan et al. 2016). Am C-Terminus befindet sich die autoinhibitorische Region (Zamborlini et al. 2006, Shim et al. 2007, Lata et al. 2008b, Bajorek et al. 2009b). Sie zeichnet sich durch eine MIM-Domäne aus, über welche die ATPase Vps4 bindet (Obita et al. 2007, Stuchell-Brereton et al. 2007, Bajorek et al. 2009a). Bei den Konstrukten Myc-Shrub, HA-Shrub und V5-Shrub (V5 gekürzte Form ohne Lysine) befinden sich die jeweiligen Protein-Tags direkt am N-Terminus (keine Linkersequenz). Bei Shrub-Myc ist der Myc-Tag hingegen am C-Terminus von Shrub lokalisiert. HA-3xGly-Shrub hat zusätzlich einen flexiblen Glycin-Linker (3xGly) der den HA-Tag am N-Terminus mit dem Shrub-Protein verbindet. Bei GFP-3xGly-Shrub verknüpft ebenfalls ein Glycin-Linker das eGFP mit Shrub. Bei eGFP-LAP-Shrub ist ein größerer sogenannter LAP (L_ocation and A_{ff}inity P_{urification} tag)-Linker vorhanden (LAP-Sequenz (Mierzwa et al. 2017)).

Tabelle 9-1: Übersicht über das Rettungsvermögen der verschiedenen Shrub-Konstrukte. Rettungsfähigkeit der *shrub*-Transgene in einer oder zwei Kopien im *shrub* null-mutanten (*shrub⁴⁻¹*) Hintergrund (L= Larvenstadium). Eine weitere Eingrenzung der Entwicklungsdauer auf Stadien vor dem späten zweiten Larvenstadium ist aufgrund des verwendeten Markers *Tubby* (Tb) in diesem Versuchsaufbau nicht möglich. Das mit * markierte Ergebnis wurde bereits veröffentlicht (Masterarbeit Bäumers 2015).

Transgen	Rettungsvermögen	
	in einer Kopie	in zwei Kopien
<i>shrubP-shrub</i>	<i>pharate adults</i> , (sehr selten Escapers)	fertile Adulte*
<i>shrubP-Myc-shrub</i>	<i>pharate adults</i>	fertile Adulte
<i>shrubP-V5-shrub</i>	<i>pharate adults</i> , (sehr selten Escapers)	Adulte
<i>shrubP-HA-shrub</i>	sterben vor L3	Adulte
<i>shrubP-HA-3xGly-shrub</i>	–	sterben vor spätem L2
<i>shrubP-GFP-3xGly-shrub</i>	sterben vor spätem L2	sterben vor spätem L2
<i>shrubP-eGFP-LAP-shrub</i>	sterben vor spätem L2	sterben vor spätem L2
<i>shrubP-shrub-Myc</i>	–	sterben vor spätem L2

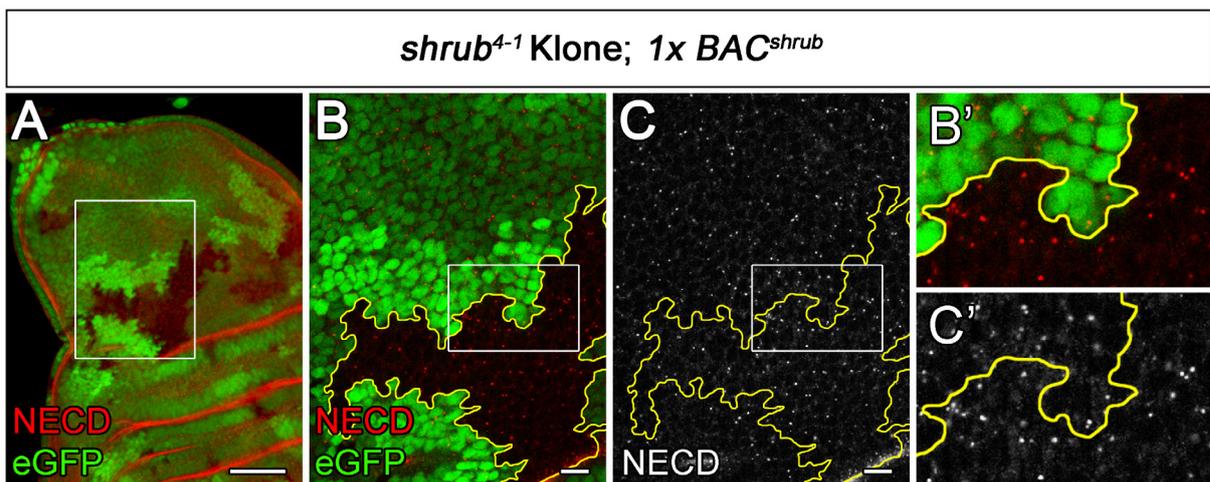


Abb. 9-2: Rettung der Zellletalität bei Funktionsverlust von *shrub* durch Expression von *BAC^{shrub}*. (A-C') Klonale Analyse von geretteten *shrub⁴⁻¹* mutanten Zellklonen durch eine Kopie *BAC^{shrub}*. Homozygot mutante Zellklone sind durch den Verlust von GFP markiert und in den Vergrößerungen (B-C') durch eine gelbe Linie umrandet. *shrub⁴⁻¹* mutante Klone sind selten und bestehen aufgrund der hohen Letalität nur aus wenigen Zellen (nicht gezeigt, siehe 2.2.5, Abb. 2-15 A-E). Eine Expression von einer Kopie *BAC^{shrub}* hebt die für den Funktionsverlust von *shrub* charakteristische Zellletalität auf. Hier sind große *shrub⁴⁻¹* mutante Zellklone im einschichtigen Epithel der Flügelimaginalscheibe vorhanden. Zudem zeigt sich anhand der

Antikörperfärbung gegen die extrazelluläre Domäne von Notch (NECD), dass kein endosomaler Defekt, wie er für den Funktionsverlust von *shrub* charakteristisch wäre, vorliegt. Die Notch-positiven Endosomen in den geretteten *shrub*⁴⁻¹ mutanten Zellklonen besitzen dieselbe Größe wie die in den angrenzenden Zellen. (B') und (C') zeigen die Vergrößerung des weiß umrandeten Ausschnittes in (B) und (C). Maßstabsbalken: (A): 50 μm ; (B, C) 10 μm .

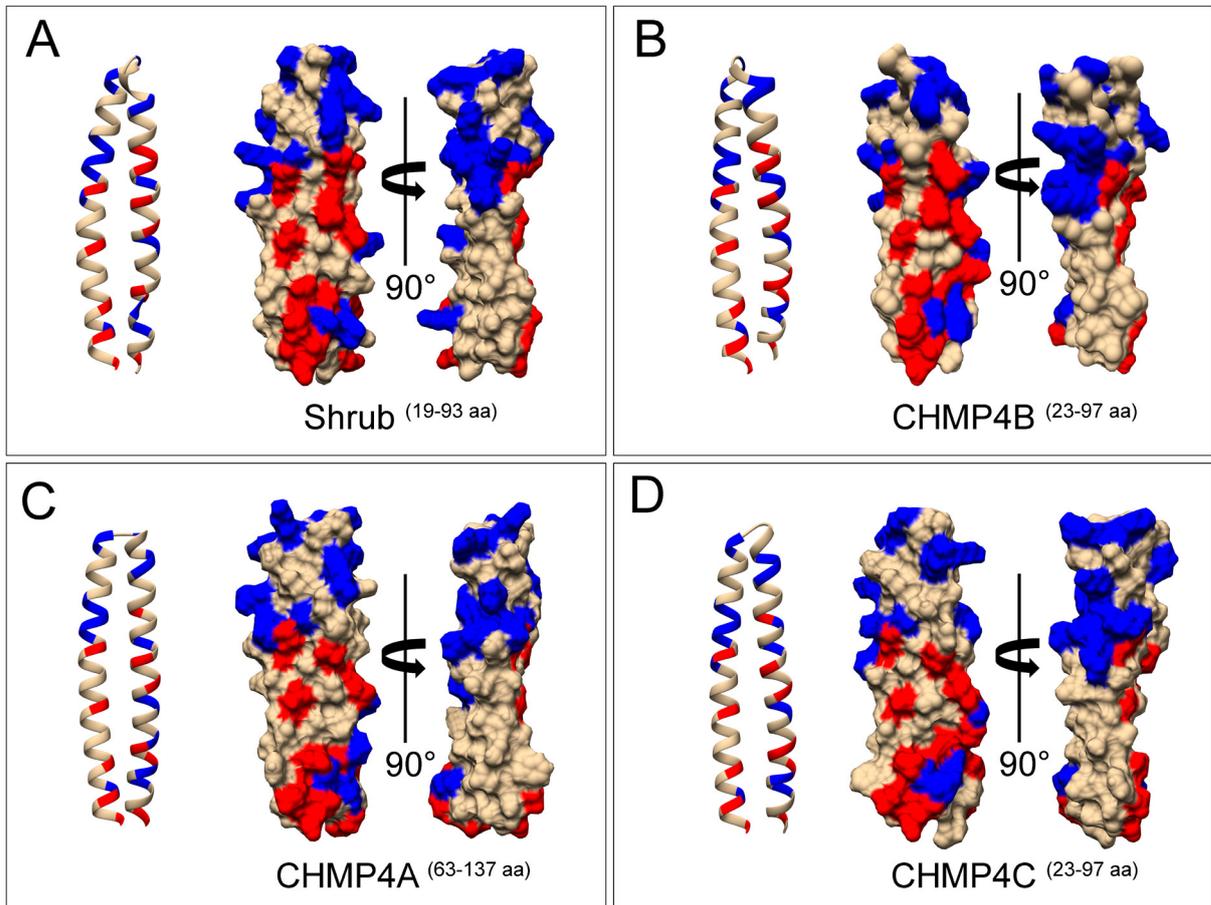


Abb. 9-3: Molekulare Oberflächenrepräsentation des helikalen Haarnadelkopfs (α -Helices 1 und 2 der Kernregion) von Shrub und CHMP4B und Strukturvorhersage dieser Region von CHMP4A und CHMP4C. Dargestellt ist bei allen vier ESCRT-III Untereinheiten die gleiche Region. Die Angabe der jeweiligen Fragmentgröße bezieht sich auf die jeweilige Position im vollständigen Protein. Eingezeichnet sind positiv (blau) und negativ (rot) geladene Aminosäurereste. (A) Kernregion der kristallisierten helikalen Haarnadelstruktur von Shrub (19-93aa) und molekulare Oberflächenrepräsentation [PDB Eintrag: 5j45 (McMillan et al. 2016)] (B) Kristallstruktur des humanen Orthologs CHMP4B (23-97aa) und molekulare Oberflächendarstellung [PDB Eintrag: 4ABM (Martinelli et al. 2012)]. (C, D) Strukturvorhersage der helikalen Kernregion von CHMP4A (C) und CHMP4C (D) mit Hilfe von I-TASSER (Protein Structure & Function Predictions, Zhang Lab, University of Michigan) basierend auf bereits bekannten analogen Strukturen. Die molekulare Oberflächenrepräsentation dieser Strukturvorhersagen, bei der ebenfalls die Aminosäurereste entsprechend ihrer Ladung gefärbt sind, bestätigt die bereits beim Aminosäuresequenzvergleich (vgl. mit Abb. 2-22) zu sehende, hohe Konservierung der für die Shrub-Polymerisation entscheidenden Regionen.

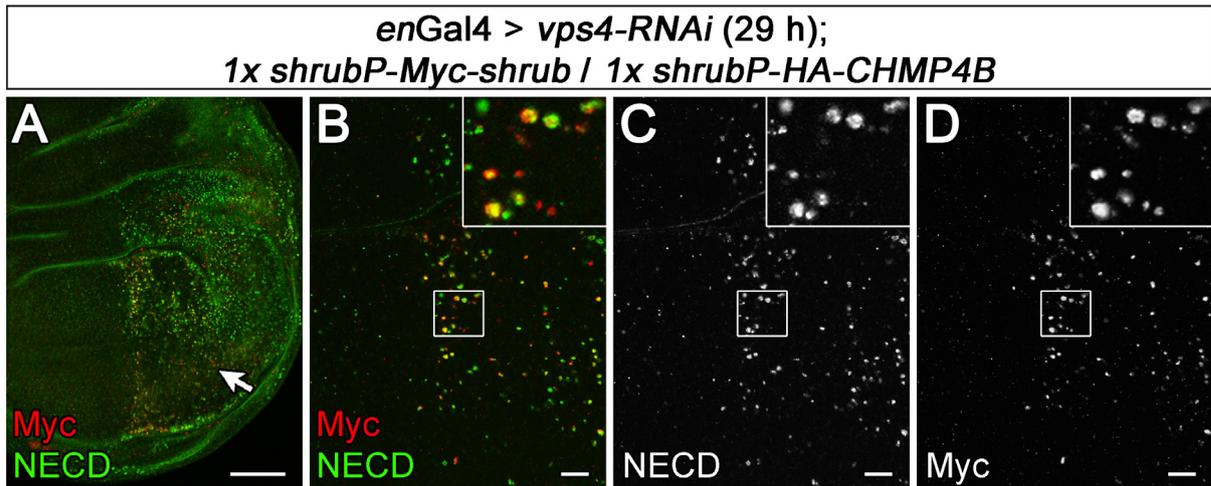


Abb. 9-4: Myc-Shrub akkumuliert bei einer Reduktion von Vps4 an vergrößerten Notch-positiven Endosomen. (A-D) Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Auswirkungen einer Reduktion von Vps4 auf die Lokalisierung von Myc-Shrub. Eine auf das posteriore Kompartiment begrenzte Expression der *vps4-RNAi* wird durch die Treiberlinie *enGal4* erreicht (A, Pfeil). Für einen direkten Vergleich finden sich daher anterior Zellen, die keine *vps4-RNAi* exprimieren. Zusätzlich ist jeweils einer Kopie *shrubP-Myc-shrub* und eine Kopie *shrubP-HA-CHMP4B* im Genom vorhanden. Detektion von Myc-Shrub und NECD (extrazelluläre Domäne von Notch) mittels Antikörperfärbung. NECD wurde hier als Marker für Endosomen verwendet. Die Reduktion von Vps4 im posterioren Kompartiment führt zu vergrößerten Notch-positiven Endosomen (B, C, vgl. posterior mit anterior) und verursacht eine Akkumulation von Myc-Shrub an diesen (B, D). Maßstabsbalken: (A) 50 μm ; (B-C) 10 μm .

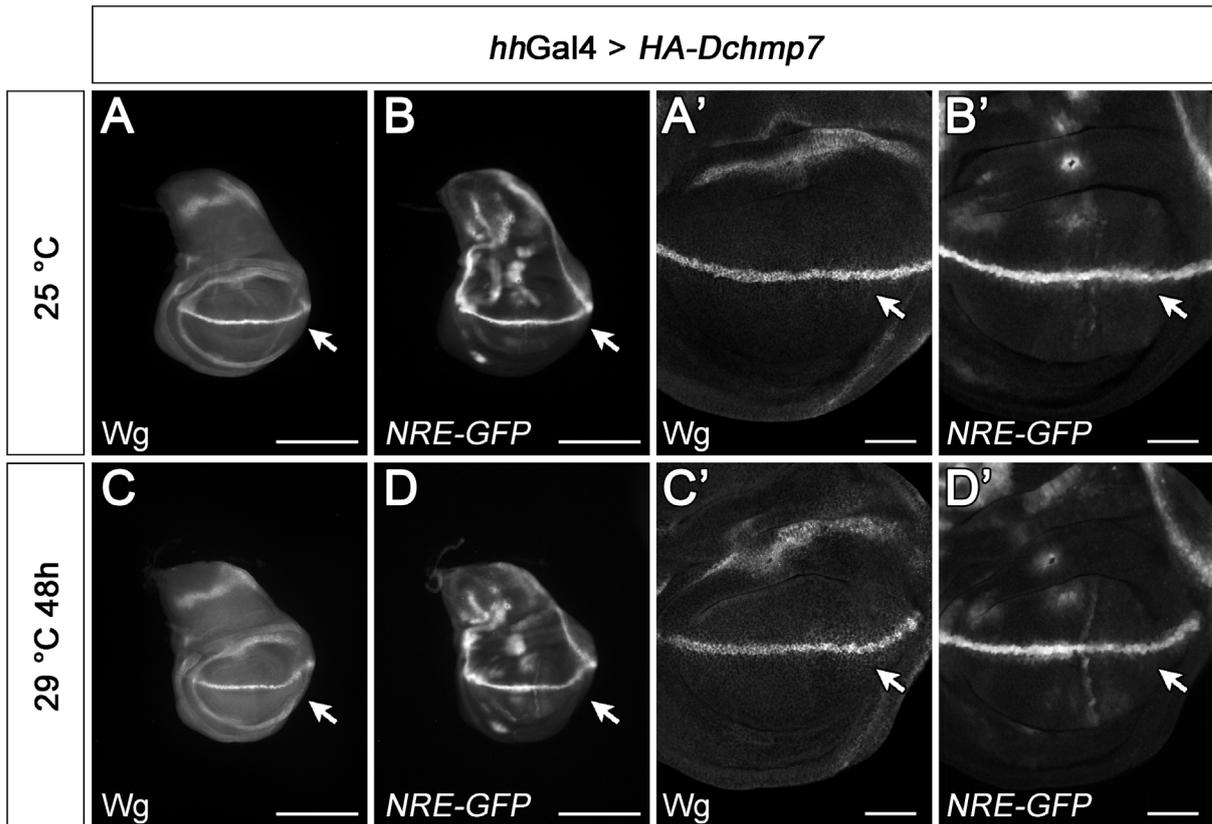


Abb. 9-5: Eine Überexpression von HA-DChmp7 beeinflusst nicht die Notch-Aktivität in der Flügelimaginalscheibe. Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Konsequenzen einer Überexpression von HA-DChmp7 auf die Aktivität des Notch-Signalweges in der Flügelimaginalscheibe. (A, A', C, C') Detektion der Notch-Aktivität mittels einer Antikörperfärbung gegen Wg. (B, B', D; D') Nachweis der Notch-Aktivität durch Verwendung des Reportergenkonstrukts *NRE-GFP* (*Notch responsive element*) (Housden et al. 2012). Eine auf das posteriore Kompartiment (Pfeil) begrenzte Expression von HA-DChmp7 wurde durch *hhGal4* erreicht. (A-B') Konstitutive Expression von HA-DChmp7 bei 25 °C. Hier zeigt sich ein wildtypisches Expressionsmuster von Wg und auch NRE-GFP in der gesamten Flügelimaginalscheibe. Es offenbart sich kein Unterschied in der Notch-Aktivität zwischen den wildtypischen Zellen anterior und den HA-DChmp7-exprimierenden Zellen posterior. (C-D') Zeitlich begrenzte Expression von HA-DChmp7 für 48 h auf 29 °C. HA-DChmp7 wurde hier zeitlich begrenzt exprimiert, da aufgrund der höheren Temperatur HA-DChmp7 stärker exprimiert wird und bereits vermehrter Zelltod auftritt (nicht gezeigt). Auch hier sind Wg und *NRE-GFP* im posterioren Kompartiment wildtypisch exprimiert. (A-D) Übersichtsaufnahme mit dem 10x Objektiv, Maßstabsbalken: 200 µm. (A'-D') Aufnahme mit dem 25x Objektiv, Maßstabsbalken: 50 µm.

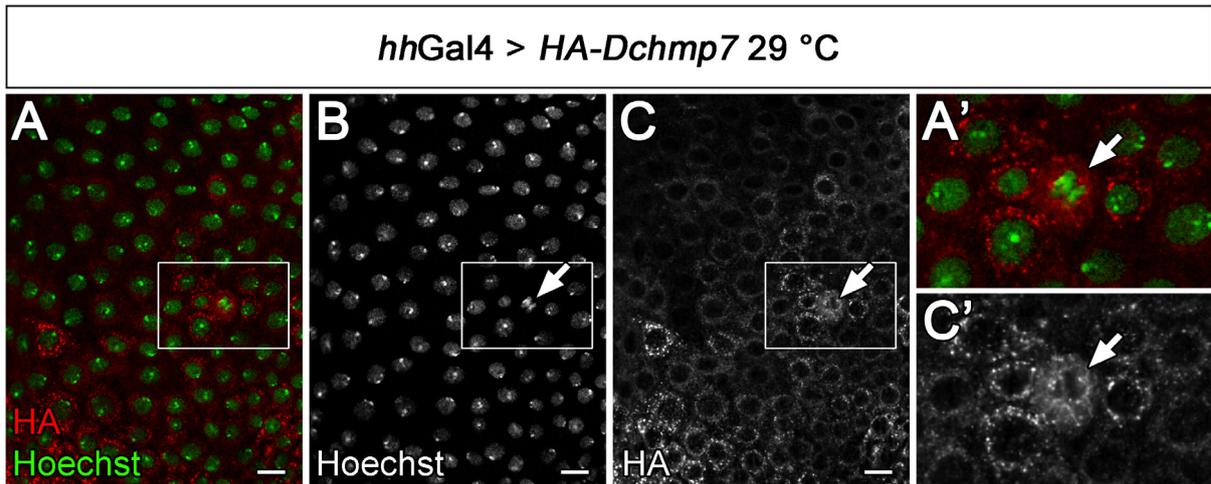


Abb. 9-6: Lokalisierung von HA-DChmp7 in der Peripodialmembran. (A-C') Apikal gelegene Peripodialmembran einer Flügelimaginalscheibe des dritten Larvenstadiums. HA-Dchmp7 ist hier mit Hilfe der Gal4-Treiberlinie *hhGal4* konstitutiv exprimiert (Überexpression). Die Zellkerne der Peripodialmembran wurden durch Hoechst-33258 markiert (grün). Antikörperfärbung gegen den HA-Tag zur Detektion des exprimierten HA-DChmp7. HA-DChmp7 ist in punktaktigen Strukturen um den Zellkern lokalisiert. Die in der Mitose befindliche Zelle (Pfeil) zeigt im Vergleich zu den angrenzenden Zellen in der Interphase eine Veränderung in der Verteilung und Lokalisierung von HA-DChmp7. Maßstabsbalken: (A-C) 10 μ m.

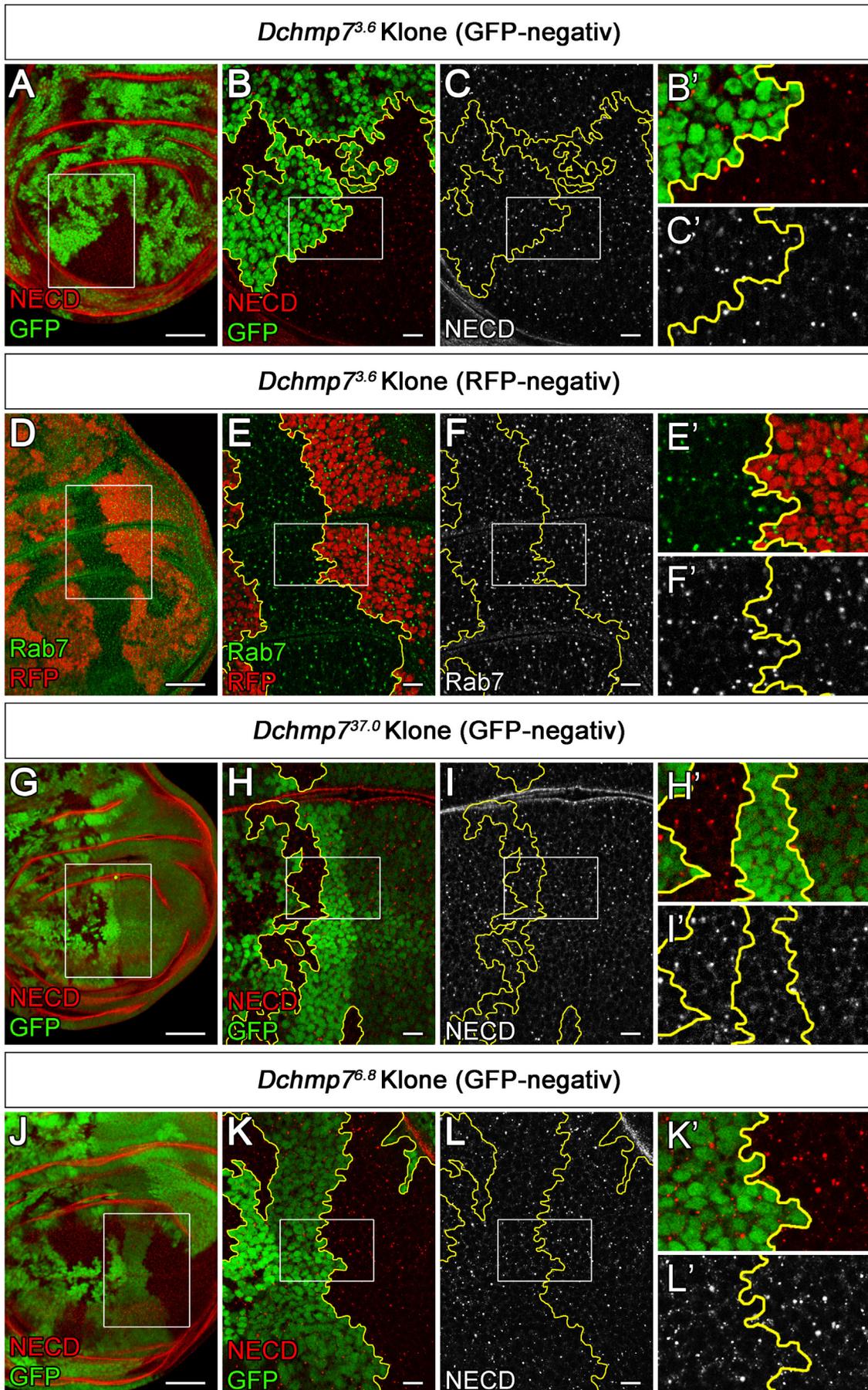


Abb. 9-7: Ein Funktionsverlust von *Dchmp7* verursacht keinen erkennbaren Defekt im endosomalen Transportweg. (A-L) Klonale Analyse des Funktionsverlusts von *Dchmp7* mit Hilfe verschiedener Null-Allele: *Dchmp7^{3.6}* (A-F'), *Dchmp7^{37.0}* (G-I') und *Dchmp7^{6.8}* (J-L'). (A-C', G-L') Antikörperfärbung gegen die extrazelluläre Domäne von Notch (NECD). Homozygot mutante Zellklone sind durch die Abwesenheit von GFP markiert und in (B-C', H-I'; K-L') gelb umrandet. Wildtypische Zwillingsklone sind hingegen durch zwei Kopien GFP markiert. *Dchmp7*-heterozygote Zellen (H, H') besitzen nur eine Kopie GFP. (A-C', H-L') Es zeigt sich kein Unterschied in der Verteilung von Notch. Zudem ist die Größe der Notch-positiven Endosomen in mutanten Zellen gegenüber den wildtypischen unverändert. (D-F') Antikörperfärbung gegen den endosomalen Marker Rab5. Homozygot mutante Zellklone sind durch die Abwesenheit von Histon-RFP markiert und in (E-F') gelb umrandet. Es ist kein Unterschied in der Lokalisation des frühen Endosomenmarkers Rab5 erkennbar. Zudem ist die Größe der Rab5-positiven Endosomen in mutanten Zellen gegenüber den wildtypischen unverändert. Maßstabsbalken: (A, D, G, J) 50 µm, (B, C, E, F, H, I, K, L) 10 µm.

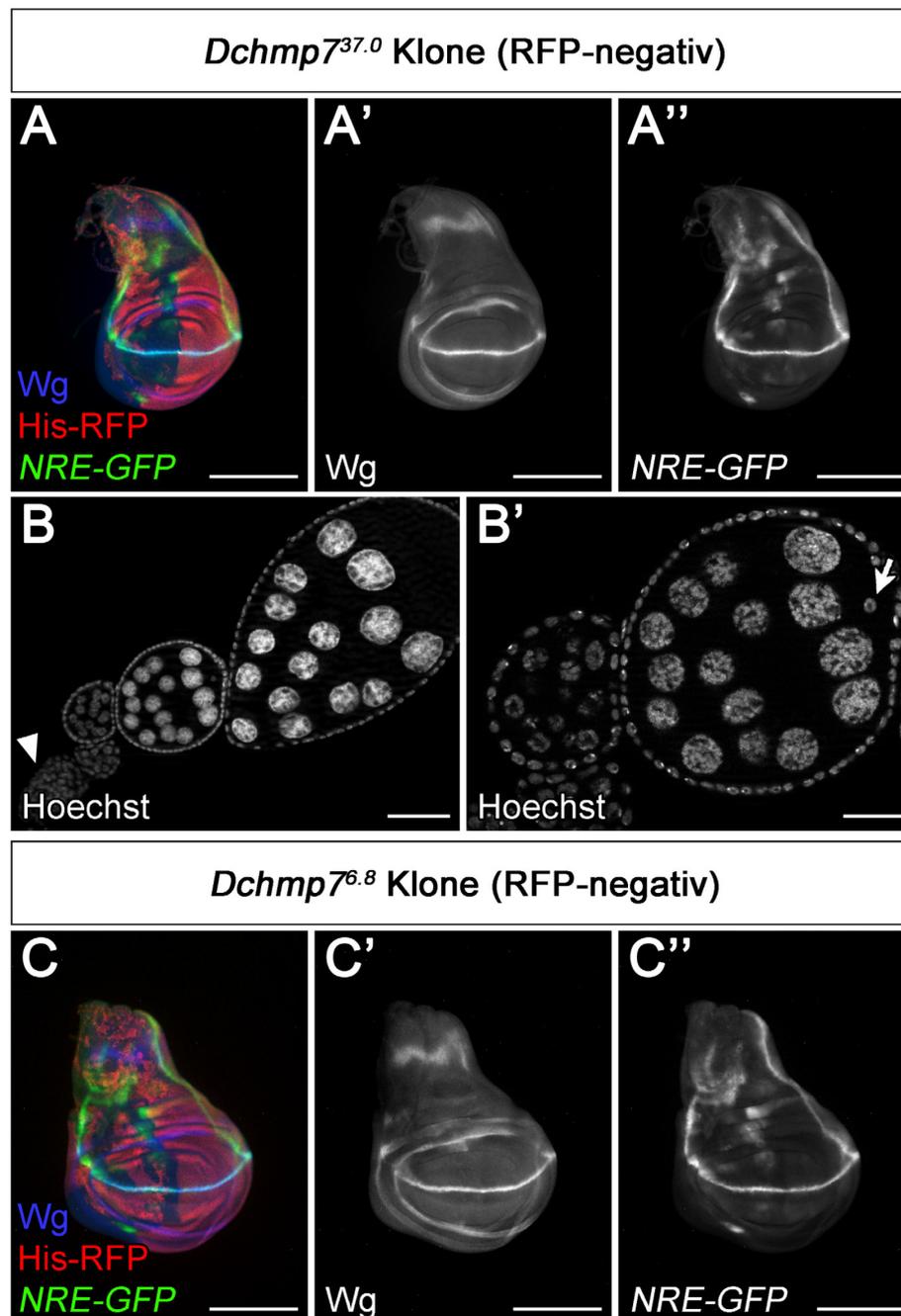


Abb. 9-8: Ein Funktionsverlust von *Dchmp7* verursacht keine ektopische Aktivierung des Notch-Signalweges in der Flügelimaginalscheibe und keine Verdopplung der Keimzellen aufgrund einer ektopischen Aktivierung des Dpp-Signalweges während der Oogenese. (A-A'', C-C'') Klonale Analyse der Konsequenz eines Funktionsverlusts von *Dchmp7* auf die Notch-Aktivität in der Flügelimaginalscheibe. Detektion der Notch-Aktivität mittels einer Antikörperfärbung gegen Wg. Nachweis der Notch-Aktivität durch Verwendung des Reportergenkonstrukts *NRE-GFP* (*Notch responsive element*) (Housden et al. 2012). Homozygot mutante Zellklone sind durch die Abwesenheit von RFP markiert. Hier zeigt sich ein wildtypisches Expressionsmuster von Wg und auch *NRE-GFP* und das trotz *Dchmp7*-mutanter Zell-Klone an der D/V-Grenze. (B, B) Repräsentativer Ovariolschlauch einer *Dchmp7*^{37.0} mutanten weiblichen Fliege. An das anterior gelegene Germarium (Pfeilkopf) schließen sich posterior Eikammern an. Diese setzen sich aus Keimzellen umgeben von einem Follikelepitel zusammen. Von den 16 Keimzellen differenzieren sich 15

zu sogenannten Nährzellen und eine zu Oozyte (Pfeil) aus. Eine Quantifizierung der Keimzellen von 47 analysierten Eikammern zeigt, dass trotz Funktionsverlusts von *Dchmp7* nur 16 Keimzellen pro Eikammer vorhanden sind (nicht gezeigt). Es kommt zu keiner Verdopplung der Keimzellen durch eine zusätzliche Teilungsrunde. Maßstabsbalken: (A-A“, C-C“) 200 µm. (B, B“) 50 µm.

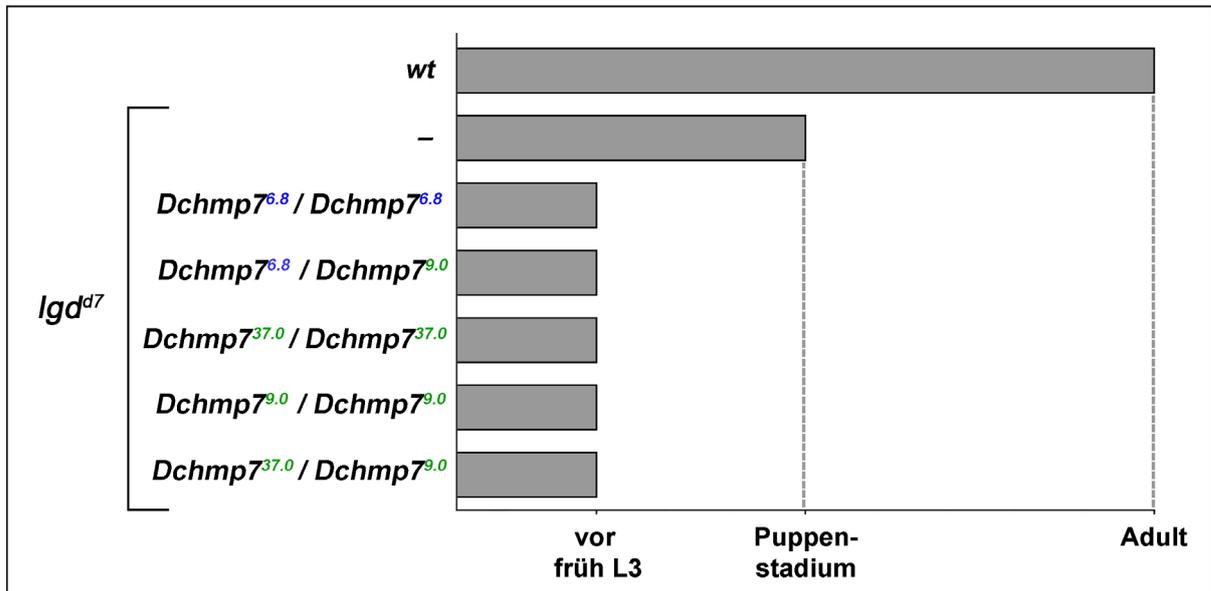


Abb. 9-9: Eine genetische Interaktion von *lgd* und *Dchmp7* spiegelt sich in der vorzeitigen Letalität von *lgd Dchmp7* mutanten Fliegen wider. Verschiedene Allel-Kombinationen von *Dchmp7* mit *lgd*^{d7} bestätigen die vorzeitige Letalität. In grün markiert sind Allele, die auf der sgRNA T1 basieren. In blau markiert das Allel, das auf der sgRNA T18 beruht. Zu beachten ist, dass diese verfrühte Letalität auch bei der Kombination von Allelen auftritt, die auf unterschiedlichen sgRNAs basieren (siehe *Dchmp7*^{6.8}/*Dchmp7*^{9.0}). Dies schließt eine mögliche Hintergrundmutation aufgrund von *off-targets* der sgRNAs als Ursache für die verfrühte Letalität im *lgd*^{d7} mutanten Hintergrund aus.

10 Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Thomas Klein für die Möglichkeit bedanken meine Doktorarbeit im Rahmen des SFB1208 „Identity and Dynamics of Membrane Systems – From Molecules to Cellular Functions“ durchzuführen.

Bedanken möchte ich mich für das spannende Thema, die ausgezeichnete Betreuung, aber auch die eingeräumten experimentellen Freiheiten, welche mir bei der planerischen Gestaltung und Durchführung der Arbeit gelassen wurden.

Herrn Prof. Dr. Dieter Willbold danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Ich danke allen ehemaligen und gegenwärtigen Kollegen im Institut für die großartige Unterstützung, die unglaubliche Hilfsbereitschaft und die tolle Atmosphäre. Ohne euch wäre die Zeit im Labor nicht ansatzweise so schön gewesen. Ich würde einige Freundschaften sehr vermissen.

Ein großer Dank gilt Hansi für ihre tatkräftige Unterstützung bei zahlreichen elektronenmikroskopischen Analysen. Zusätzlich danke ich Sylvia und Stefan. Zusammen haben sie unzählige Embryonen für mich injiziert und sich anschließend mit mir über jede transgene Fliege gefreut. Gisela danke ich für den gemeinsamen Kampf bei der ein oder anderen widerspenstig Klonierung.

Zusätzlich möchte ich mich auch bei Sebastian (CAi) bedanken. Ohne seinen Einsatz wäre die Quantifizierung des ILV-Anteils der Endosomen eine einzige Qual gewesen.

Christine und Thomas danke ich für die zahlreichen Diskussionen rundum Lgd und seine Funktion.

Bedanken möchte ich mich auch bei Thomas für seine Unterstützung bis zur letzten Sekunde. Vielen Dank für das Korrekturlesen meiner gesamten Arbeit!!!

Vielen Dank für die einmalig gute Atmosphäre auf dem gesamten Flur. Ich danke euch allen für unvergessliche schöne Momente im und außerhalb des Labors.

11 Eidesstattliche Erklärung

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

Düsseldorf, September 2020

Miriam Bäumers