

**Analyse der Interaktionen der ESCRT-III Untereinheit Shrub  
mit Lethal (2) giant discs, Vps20 und der endosomalen  
Membran**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

**Thomas Breuer**

aus Duisburg

Düsseldorf, Juni 2022

---

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

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

Berichtersteller:

1. Prof. Dr. Thomas Klein
2. Jun.-Prof. Dr. Mathias Beller

Tag der mündlichen Prüfung: 08.08.2022

---

---

<b>1.</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Der Notch-Signalweg.....	1
1.2	Der endosomale Transportweg .....	4
1.3	Die ESCRT-Maschinerie.....	6
1.3.1	Die ESCRT-III Komponente Shrub .....	10
1.3.2	Die ESCRT-III Komponente Vps20.....	12
1.4	Der Tumorsuppressor Lethal (2) giant discs.....	14
1.4.1	Die Interaktion von Lgd mit Shrub .....	18
1.5	Ziele der Arbeit.....	20
<b>2.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>21</b>
2.1	Die Bindung von Shrub an Lgd.....	21
2.1.1	Das Rettungsvermögen der ersten DM14-Domäne von Lgd .....	21
2.1.2	Integration der Shrub-bindenden Aminosäuren in geradzahlige DM14-Domänen von Lgd.....	27
2.1.3	Integration der Interaktionshelix von DM14-3 in DM14-4.....	32
2.1.4	Analyse der Aminosäuren 558-664 in Lgd .....	39
2.1.5	Analyse der Struktur von vollständigem Lgd mit Hilfe von Alphafold2.....	45
2.2	Die Interaktion von Shrub mit Vps20 .....	49
2.2.1	Analyse der Struktur von Vps20 mit Hilfe von Alphafold2 .....	49
2.2.2	Analyse des Ausfalls von Vps20 in Flügelimaginalscheiben.....	51
2.2.3	Analyse der Überexpression von Vps20 in Flügelimaginalscheiben.....	58
2.2.4	Etablierung eines Expressionssystems für Vps20-Transgene.....	61
2.2.5	Potentielle Shrub-Bindestellen in Vps20 .....	66
2.2.6	Die Myristoylierung von Vps20 .....	76
2.2.7	Analyse der subzellulären Lokalisation von Vps20 .....	78
2.3	Die Interaktion von Shrub mit der endosomalen Membran.....	82
<b>3.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>89</b>
3.1	Die Bindung von Shrub an Lgd.....	89
3.1.1	DM14-1 und DM14-3 in Lgd zeigen partielle Redundanz .....	89
3.1.2	KARR R kann nicht als minimales Shrub Bindemotiv in den DM14-Domänen definiert werden .....	91
3.1.3	Der Aminosäurebereich 558-664 in Lgd interagiert mit dem C-Terminus und wird für die Stabilität von Lgd benötigt.....	94
3.2	Die Bindung von Shrub an Vps20.....	99

---

---

3.2.1	<i>vps20</i> mutante Zellen zeigen stark vergrößerte Endosomen und die Reduktion von Vps20 führt zur ektopischen Aktivierung des Notch-Signalwegs.....	99
3.2.2	Die Funktion von Vps20 wird vermutlich durch die Rekrutierung durch Vps25 an das Endosom initiiert.....	101
3.2.3	Charakterisierung von Vps20resQ und Kriterien für das Anfügen eines Tags an Vps20.....	102
3.2.4	Analyse der Bindung von Shrub an Vps20 über elektrostatische Wechselwirkungen in zwei Orientierungen.....	105
3.3	Die Bindung von Shrub an die endosomale Membran.....	111
3.3.1	Shrub bindet über basische Aminosäuren an die endosomale Membran.	111
<b>4.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>115</b>
<b>5.</b>	<b>Summary.....</b>	<b>116</b>
<b>6.</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>117</b>
6.1	Material.....	117
6.1.1	Puffer, Lösungen und Medien (allgemein).....	117
6.1.2	Enzyme .....	118
6.1.3	Reaktions-Kits.....	118
6.1.4	Primer .....	119
6.1.5	Vektoren.....	122
6.1.6	Material für proteinbiochemische Arbeiten.....	123
6.1.7	Material für die Zellkultur .....	124
6.1.8	Antikörper .....	125
6.1.9	<i>Drosophila</i> Zelllinie .....	125
6.1.10	Chemisch kompetente Bakterien .....	126
6.1.11	Fliegenstämme.....	126
6.1.12	Geräte, Software und Datenbanken.....	128
6.2	Molekularbiologische Methoden .....	129
6.2.1	Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	129
6.2.2	Mutagenese PCR.....	130
6.2.3	Single-Fly PCR.....	131
6.2.4	Ligation von DNA Fragmenten .....	132
6.2.5	Gibson Assembly.....	132
6.2.6	Transformation chemisch kompetenter Bakterien.....	133
6.2.7	Mini DNA-Präparation.....	133

---

6.2.8	Midi DNA-Präparation.....	134
6.2.9	DNA-Konzentrationsbestimmung.....	134
6.2.10	DNA Sequenzierung.....	134
6.2.11	Restriktionsspaltung.....	135
6.2.12	Gelextraktion.....	135
6.2.13	Herstellung von <i>LgdΔDM14 3+4, DM14 1-1</i> .....	136
6.2.14	Herstellung von <i>LgdΔDM14 1-3, 4 Helix 3</i> .....	136
6.2.15	Herstellung von <i>Lgd LAP statt 558-664</i> .....	137
6.2.16	Herstellung von <i>LgdΔC</i> .....	137
6.2.17	Etablierung des Expressionssystems <i>Vps20resQ</i> .....	138
6.2.18	Herstellung von <i>V5-Vps20, Vps20-V5</i> und <i>Vps20-NeonGreen</i> .....	138
6.3	Genetische Methoden.....	139
6.3.1	Fliegenhaltung.....	139
6.3.2	Erzeugung transgener Fliegen.....	139
6.3.3	Indirekte Antikörperfärbung an Flügelimaginalscheiben.....	140
6.3.4	Eiablagen.....	141
6.3.5	Gal4/UAS/Gal80 <sup>ts</sup> -System.....	141
6.3.6	Flp/FRT-System.....	143
6.3.7	Notch-Reporter Gbe+Su(H).....	144
6.3.8	Kultivierung und Passagieren von S2R <sup>+</sup> -Zellen.....	145
6.3.9	Transfektion von Zellen.....	145
6.4	Proteinbiochemische Methoden.....	146
6.4.1	Proteingewinnung aus Zellen.....	146
6.4.2	Proteingewinnung aus <i>Drosophila</i> Larven.....	146
6.4.3	Co-Immunopräzipitation.....	147
6.4.4	SDS-PAGE und Western Blot.....	149
6.5	Bioinformatische Methoden.....	150
6.5.1	Struktursimulation mittels Alphafold2 in ChimeraX und Komplexmodellierung mit Alphafold2-Multimer und ColabFold.....	150
6.5.2	Molekulardynamik-Simulation der Bindung von Shrub an Vps20.....	151
6.5.3	Molekulardynamik-Simulation der Membranbindung von Shrub.....	152
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>153</b>
<b>8.</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>167</b>
<b>9.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>185</b>

<b>10.</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>188</b>
<b>11.</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung.....</b>	<b>189</b>

## 1. Einleitung

In Metazoen muss die Zellproliferation und -spezifikation in Geweben koordiniert werden, um eine normale Entwicklung einzelner Organe und des Organismus als Ganzen zu ermöglichen. Diese Koordination geschieht über Signaltransduktionsnetzwerke, welche Zellkommunikation mit benachbarten Zellen über verschiedene Signalwege mit unterschiedlichen Oberflächenrezeptoren vermitteln. Die Regulation dieser Netzwerke ist essentiell und kann über die Änderung der Rezeptor- und Ligandenmenge an der Zelloberfläche geschehen. Die fehlerhafte Regulation kann zur unkontrollierten Proliferation und der Entwicklung von gut- oder bösartigen Tumoren führen (Übersicht in Sever und Brugge, 2015).

### 1.1 Der Notch-Signalweg

Der Notch-Signalweg ist ein Signalweg, in dem Rezeptor und Liganden Transmembranproteine sind. Die Regulation dieses Signalwegs geschieht unter anderem durch die regulierte Endozytose der Rezeptoren und Liganden. Fehlregulationen dieses Signalwegs stehen in Verbindung mit vielen Krankheitsbildern (Übersicht in Allenspach et al., 2002; Harper et al., 2003; Louvi und Artavanis-Tsakonas, 2012).

Dieser hochkonservierte Signalweg kommt in allen Metazoen vor und vermittelt die Signalübertragung zwischen direkt benachbarten Zellen. Der Rezeptor, der für die Signaltransduktion in der signalempfangenden Zelle exprimiert ist, besteht aus einer extrazellulären Domäne, die durch eine Transmembrandomäne mit der intrazellulären Domäne verbunden ist. In der extrazellulären Domäne befinden sich 36 EGF- (Epidermal Growth Factor-) ähnliche Wiederholungen, über die die Interaktion mit dem Liganden der signalsendenden Zelle vermittelt wird (Rebay et al., 1991; Übersicht in Bray, 2006; Übersicht in Hori et al., 2013). Zusätzlich zu dieser trans-Aktivierung des Rezeptors kann der Rezeptor über die EGF-ähnlichen Wiederholungen auch mit Liganden der gleichen Zelle interagieren. Da diese cis-Interaktion die Signalweiterleitung verhindert, wird sie als cis-Inhibierung bezeichnet (Sprinzak et al., 2010; del Alamo et al., 2011). Zusätzlich befindet sich in der extrazellulären Domäne die NRR (Negative Regulatory Region) des Rezeptors (Übersicht in Kopan und Ilagan, 2009).

In der intrazellulären Domäne des Rezeptors befinden sich eine RAM- (RBP-associated module-) Domäne, Ankyrin Wiederholungen, mehrere Kernlokalisations-Signale und eine PEST- ((P) Prolin, (E) Glutamat, (S) Serin, (T) Threonin) Domäne (Bray, 2006).

Nach der Synthese wird der Rezeptor im Golgi-Apparat durch eine Furin-ähnliche Konvertase geschnitten (S1-Schnitt) und anschließend als zusammengesetztes Heterodimer an die Plasmamembran transportiert (Blaumueller et al. (1997); Logeat et al. (1998); Abbildung 1.1 ①). An der Plasmamembran kann der Rezeptor nun einkommende Signale empfangen.

Die Signaltransduktion wird durch die Bindung der DSL- (Delta und Serrate in *D.melanogaster*, Lag-2 in *C.elegans*) Liganden Delta oder Serrate der signalsendenden Zelle an den Rezeptor initiiert (Abbildung 1.1 ②). Die Bindung wird über die extrazellulären EGF-ähnlichen Wiederholungen des Rezeptors an die DSL-Domäne des Liganden vermittelt (Rebay et al., 1991; Parks et al., 2006; Shimizu et al., 2014; Luca et al., 2015). Es wird vermutet, dass mit beginnender Endozytose des Liganden und des daran gebundenen Rezeptors in die signalsendende Zelle die NRR (Negative Regulatory Region) des Rezeptors freigelegt wird (Parks et al. (2000); Nichols et al. (2007); Meloty-Kapella et al. (2012); Abbildung 1.1 ③). Die Endozytose der Liganden wird durch Ubiquitinierung der E3-Ubiquitin-Ligasen Mindbomb (Mib) und Neuralized (Neur) induziert (Le Borgne et al., 2005; Wang und Struhl, 2005). Durch die Freilegung der NRR im Rezeptor kann die ADAM10- (A Disintegrin And Metalloproteinase Domain-containing Protein 10-) Metalloprotease (Kuzbanian in *Drosophila*) den proteolytischen S2-Schnitt durchführen (Pan und Rubin (1997); Sotillos et al. (1997); Brou et al. (2000), Abbildung 1.1 ④). Dieser S2-Schnitt führt zur Freisetzung der extrazellulären Domäne des Notch-Rezeptors, die dann zusammen mit dem Liganden in die signalsendende Zelle trans-endozytiert wird (Parks et al. (2000); Abbildung 1.1 ⑤). Die intrazelluläre Domäne des Rezeptors verbleibt mit der Transmembrandomäne an der Plasmamembran der signalempfangenden Zelle. Dort wird sie durch Presenilin, einer Komponente des  $\gamma$ -Sekretase Komplexes, erneut proteolytisch geschnitten (S3) (Lecourtois und Schweisguth (1998); De Strooper et al. (1999); Struhl und Greenwald (1999); Ye et al. (1999); Abbildung 1.1 ⑥). Die in das Zytoplasma freigesetzte intrazelluläre Domäne wird mit Hilfe der Kernlokalisations-Signale in den Zellkern transportiert (Kidd et al., 1998; Struhl und Adachi, 1998; Struhl und Greenwald, 1999). Dort bindet sie an das DNA-bindende CSL Protein Suppressor of Hairless (CSL: Vertebraten: CBF1/RBP-JK, *D.melanogaster*: Su(H), *C.elegans*: Lag1) und kann so mit Mastermind (Mam) und weiteren Co-Aktivatoren (Co-A) einen Transkriptionsaktivator-Komplex bilden (Furriols und Bray, 2000). Dieser Komplex aktiviert die Expression der Notch-Zielgene (z.B. *wg*) (Abbildung 1.1 ⑦). In der

Abwesenheit der intrazellulären Domäne des Notch-Rezeptors liegt Su(H) zusammen mit Co-Repressoren als Repressorkomplex vor, der die Expression der Zielgene hemmt (Morel und Schweisguth (2000); Furriols und Bray (2001); Abbildung 1.1 ⑧).

Auch nicht aktivierter Notch-Rezeptor wird kontinuierlich von der Plasmamembran endozytiert und anschließend recycelt oder endolysosomal abgebaut (Übersicht in Schnute et al. (2018); Vaccari et al. (2008); Abbildung 1.1 ⑨). Durch Defekte im endolysosomalen Abbau des Notch-Rezeptors kann eine Fraktion des Rezeptors auch während des Abbaus Liganden-unabhängig aktiviert werden, indem hier die Freisetzung der intrazellulären Domäne des Rezeptors geschieht (Abbildung 1.1 ⑩). Es kommt zum Beispiel beim Verlust von Lgd zum gestörten Abbau des Notch-Rezeptors (s. 1.4).

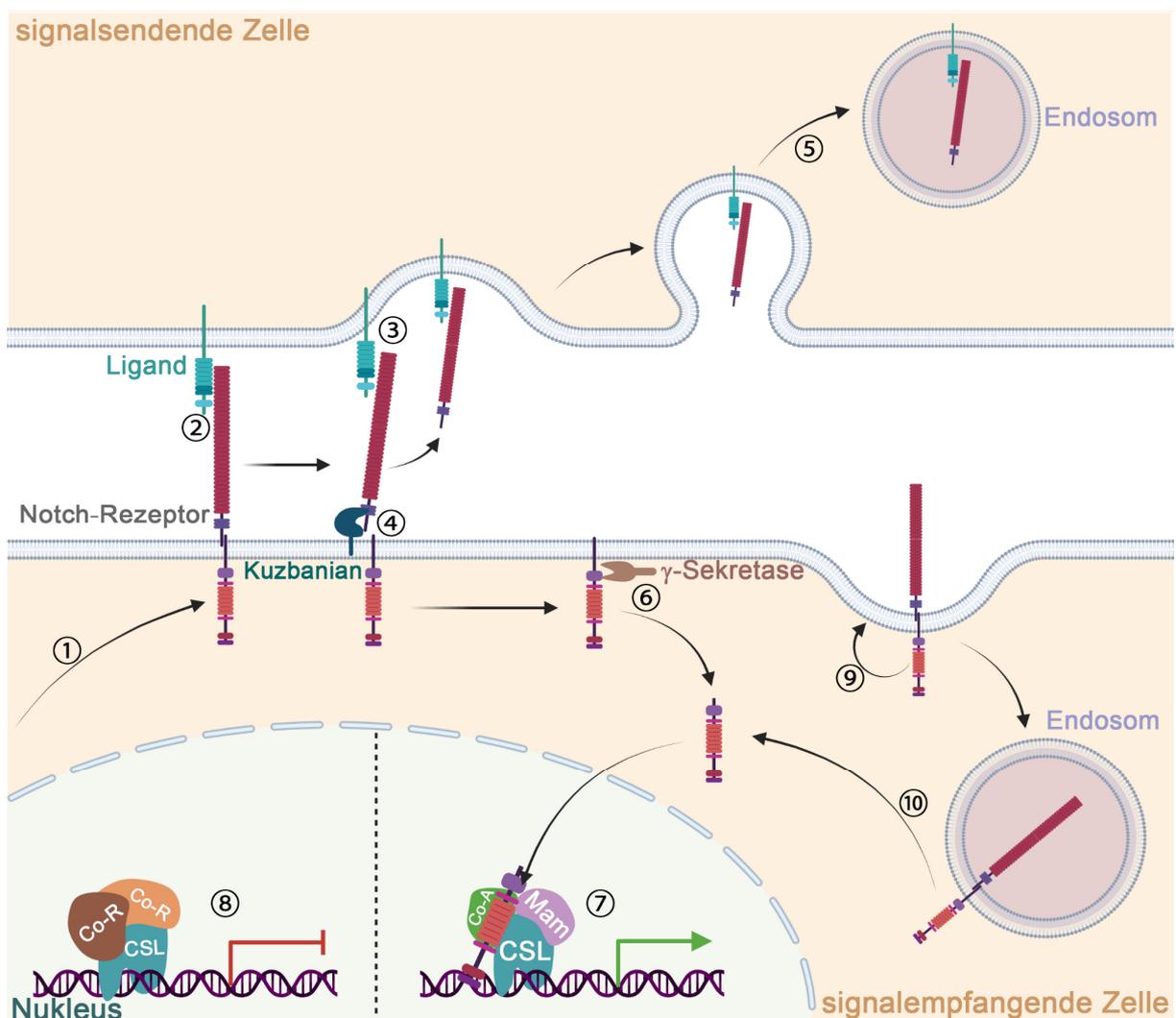


Abbildung 1.1: Der Notch-Signalweg vermittelt Zell-Zell Kommunikation zwischen direkt benachbarten Zellen. Der Notch-Rezeptor wird nach der Synthese einmal proteolytisch gespalten (S1-Schnitt) und als erneut zusammengesetztes Heterodimer an die Plasmamembran transportiert ①. Hier kann er an die Liganden Delta oder Serrate der signalsendenden Zelle binden ②. Durch die beginnende Endozytose des

Liganden in die signalsendende Zelle wird die NRR des Rezeptors in der signalempfangenden Zelle freigelegt ③. Dadurch kann die ADAM10 Metalloprotease (Kuzbanian) den proteolytischen S2-Schnitt durchführen ④, was dazu führt, dass die extrazelluläre Domäne des Rezeptors zusammen mit dem Liganden in die signalsendende Zelle endozytiert wird ⑤. Die an der Plasmamembran verbleibende Transmembran- und intrazelluläre Domäne des Rezeptors kann anschließend durch Presenilin, eine Untereinheit des  $\gamma$ -Sekretase Komplexes, erneut proteolytisch geschnitten werden (S3-Schnitt) ⑥. Das führt zur Freisetzung der intrazellulären Domäne des Notch-Rezeptors in das Zytoplasma. Durch mehrere NLS innerhalb der intrazellulären Domäne transloziert sie in den Zellkern, wo sie an Su(H) bindet und einen Transkriptionsaktivator-Komplex bildet. Zusammen mit Mam und weiteren Co-Aktivatoren wird dadurch die Expression von Notch-Zielgenen aktiviert ⑦. In der Abwesenheit der intrazellulären Domäne des Notch-Rezeptors im Zellkern bildet Su(H) mit Co-Repressoren einen Repressorkomplex, was die Expression der Zielgene des Signalwegs unterdrückt ⑧. Auch nicht aktivierter Notch-Rezeptor wird kontinuierlich von der Plasmamembran endozytiert und kann anschließend abgebaut oder recycelt werden ⑨. Durch Defekte im endosomalen Transport kann der Notch-Rezeptor auch Liganden-unabhängig aktiviert werden ⑩.

---

Die Aktivität des Signalwegs kann über die Expression des Notch-Zielgens *wingless* (*wg*) und die Aktivierung des Reportergenkonstruktes Gbe+Su(H) in Flügelimaginalscheiben nachgewiesen werden (s. 6.3.7; Furriols und Bray (2001)).

## 1.2 Der endosomale Transportweg

Wie bereits beschrieben wird der Notch-Signalweg unter anderem über den endosomalen Transportweg reguliert. Durch den Abbau und das Recycling von Transmembranproteinen, wie dem Notch-Rezeptor, wird beim endosomalen Transport ein Gleichgewicht von Rezeptoren an der Zelloberfläche geschaffen, welche für die Aufnahme von Signalen bereitstehen (Übersicht in Huotari und Helenius, 2011). Die Endozytose von Transmembranproteinen geschieht Clathrin- oder Caveolin-abhängig oder auch unabhängig von solchen Hüllproteinen. Nach der Endozytose von Transmembranproteinen können die entstehenden Vesikel miteinander (Abbildung 1.2 ①) oder mit bestehenden frühen Endosomen fusionieren (Abbildung 1.2 ②) (Salzman und Maxfield, 1988). Durch die Fusion mit weiteren frühen Endosomen und endozytotischen Vesikeln reifen die Endosomen weiter (Abbildung 1.2 ③). Diese Fusion wird durch die GTPase Rab5 vermittelt (Gorvel et al., 1991; Rubino et al., 2000). Die intrazelluläre Domäne der Transmembranproteine, die sich durch die Fusion endosomaler Vesikel mit Endosomen, in der limitierenden Membran der Endosomen befinden, ist in Richtung des Zytoplasmas ausgerichtet. Für den vollständigen Abbau der Transmembranproteine ist die Aufnahme dieser von der limitierenden Membran der Endosomen in intraluminalen Vesikel (ILV) ein essentieller Schritt (Abbildung 1.2 ④). Durch die Bildung von ILV werden die entstehenden Endosomen als multivesikuläre Endosomen bezeichnet. In multivesikulären Endosomen wird Rab5 gegen die GTPase Rab7 ausgetauscht und es

kommt zur Ansäuerung des Lumens durch H<sup>+</sup>-ATPasen (Yamashiro et al., 1983; Maxfield und Yamashiro, 1987; Rink et al., 2005). Rab7 vermittelt die Fusion der multivesikulären Endosomen mit dem Lysosom (Futter et al., 1996; Vanlandingham und Ceresa, 2009). Nach der Fusion mit dem Lysosom werden die Transmembranproteine durch lysosomale Hydrolasen vollständig abgebaut (Abbildung 1.2 ⑤, Übersicht in Luzio et al. (2007)). Zu verschiedenen Zeitpunkten während des endosomalen Transports können Transmembranproteine zurück an die Plasmamembran recycelt werden (Abbildung 1.2 ⑥). Die GTPase Rab4 vermittelt direktes Recycling von frühen Endosomen an die Plasmamembran (van der Sluijs et al., 1992) und Rab11 vermittelt Recycling über Recycling-Endosomen (Ullrich et al., 1996).

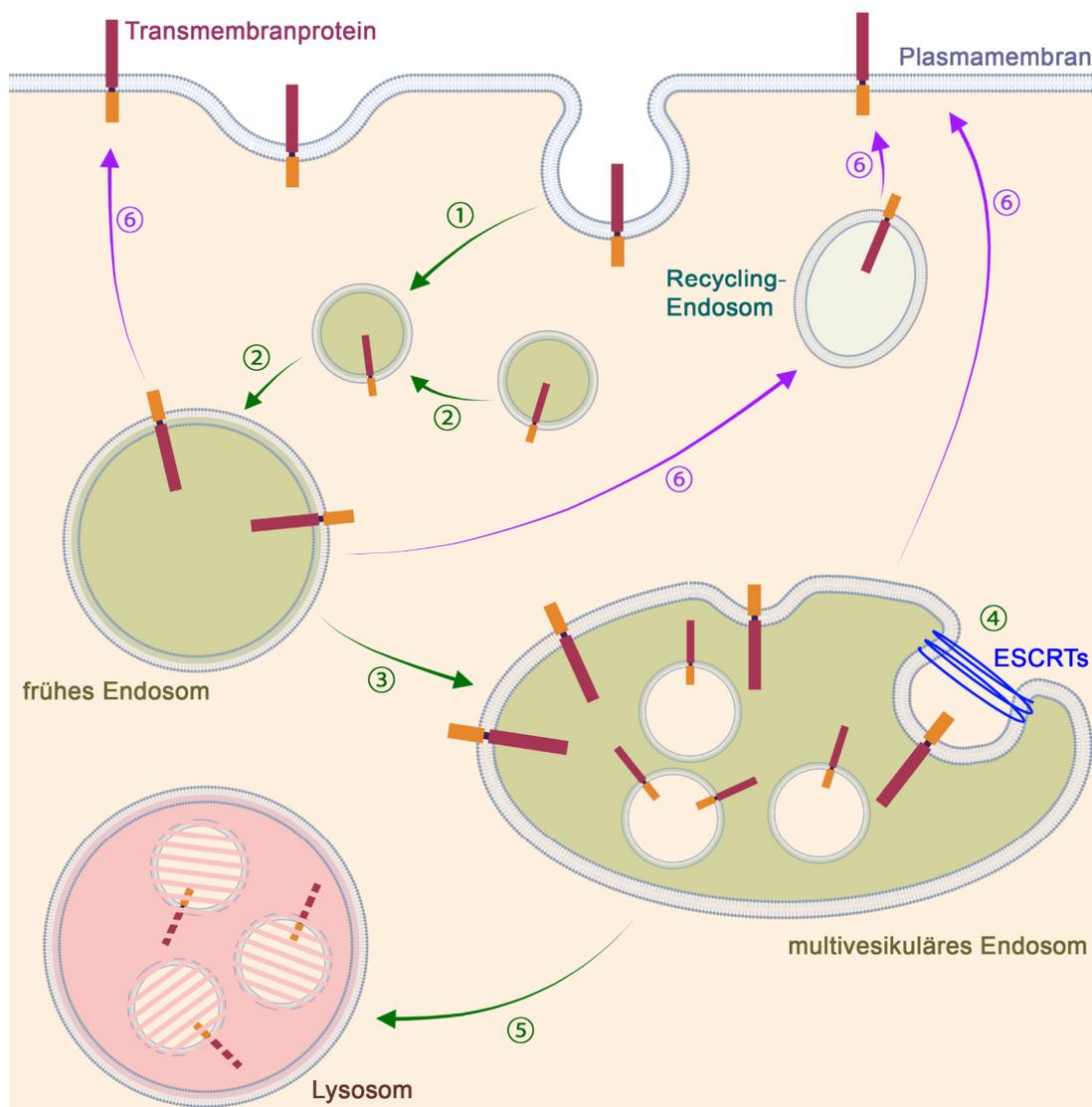


Abbildung 1.2: Der endosomale Transportweg. Transmembranproteine (rot/orange), wie der Notch-Rezeptor werden von der Plasmamembran in endozytotische Vesikel abgeschnürt ①. Diese können miteinander oder mit frühen Endosomen fusionieren ②. Durch die Ansäuerung der Endosomen und die

Bildung intraluminaler Vesikel (ILV) bilden sich multivesikuläre Endosomen ③. Die Bildung von ILV wird durch die ESCRT-Maschinerie (blau) vermittelt ④. Sie sorgt dafür, dass die intrazellulären Domänen der endozytierten Transmembranproteine (gelb) vollständig vom Zytoplasma isoliert sind. Durch die Fusion mit dem Lysosom werden die Transmembranproteine durch lysosomale Hydrolasen vollständig abgebaut ⑤. Zu verschiedenen Zeitpunkten während des endosomalen Transports können Transmembranproteine wieder an die Plasmamembran recycelt werden ⑥.

---

### 1.3 Die ESCRT-Maschinerie

Durch die Abschnürung der Plasmamembran während der Endozytose befinden sich die Transmembranproteine während des endosomalen Transports wie bereits beschrieben in der limitierenden Membran der Endosomen. Hierbei ragt die intrazelluläre Domäne der Transmembranproteine in das Zytoplasma und die extrazelluläre Domäne in das Lumen des Endosoms. Damit die Signaltransduktions-Fähigkeit von Transmembranrezeptoren, wie dem Notch-Rezeptor, verhindert wird und der vollständige Abbau im Lysosom möglich ist, müssen sie vollständig vom Zytoplasma getrennt werden. Dies geschieht über die Aufnahme in ILV (Übersicht in Sorkin und von Zastrow, 2009).

Die Bildung von ILV wird durch die evolutionär konservierte ESCRT- (Endosomal Sorting Complex Required for Transport-) Maschinerie und die AAA-ATPase Vps4 (Vacuolar protein sorting 4) vermittelt (Übersicht in Katzmann et al., 2002). Die ESCRT-Maschinerie besteht aus vier nacheinander agierenden Proteinkomplexen: ESCRT-0 - ESCRT-III.

ESCRT-0 bindet an die Endosomen-spezifischen Phosphatidylinositol-(3)-Phosphate (PI(3)P) der endosomalen Membran und initiiert damit die ILV-Bildung (Burd et al., 1998; Gaullier et al., 1998; Gillooly et al., 2000). ESCRT-0 besteht aus den Untereinheiten Hrs (Hepatocyte growth factor regulated tyrosine kinase substrate) und Stam (Signal transducing adaptor molecule) (Bache et al., 2003). Die Membran-gebundenen Untereinheiten von ESCRT-0 erkennen die für die lysosomale Degradation durch Ubiquitinierung markierten Transmembranproteine, binden sie und konzentrieren sie damit an der Position, wo sich das ILV formen wird (Wollert und Hurley, 2010). Die ESCRT-0 - ESCRT-II Untereinheiten besitzen Ubiquitin-bindende Domänen über die sie an die ubiquitinierten Transmembranproteine binden (Katzmann et al., 2001; Bilodeau et al., 2002; Shih et al., 2002; Mizuno et al., 2003; Slagsvold et al., 2005; Ren und Hurley, 2010). Zusätzlich sorgt ESCRT-0 für die Rekrutierung von ESCRT-I.

Der ESCRT-I Komplex besteht aus Tsg101 (Tumor susceptibility gene 101), Vps28 (Vacuolar protein sorting 28), Vps37 und Mvb12 (Multivesicular body sorting factor 12)

(Gill et al., 2007; Kostelansky et al., 2007). Zusammen mit ESCRT-II induziert ESCRT-I die beginnende Einstülpung der endosomalen Membran (Abbildung 1.3 ①) (Wollert und Hurley, 2010).

ESCRT-II besteht aus Vps22 und Vps36, an die zwei Vps25-Moleküle gebunden sind. Durch die Bindung von Vps25 an Vps22 und Vps36 entsteht ein Komplex mit einer „Y“-Form (Hierro et al., 2004; Teo et al., 2004; Im und Hurley, 2008). Die beiden Vps25-Moleküle initiieren durch ihre Bindung die Assemblierung der ESCRT-III Untereinheiten (Teo et al., 2004; Im et al., 2009). Anders, als die früher während der ILV-Bildung agierenden ESCRT-Untereinheiten (ESCRT-0-ESCRT-II), die im Zytoplasma bereits als Komplexe vorliegen, assemblieren die ESCRT-III Untereinheiten erst durch die Rekrutierung an die endosomale Membran. Vor dieser Rekrutierung liegen die ESCRT-III Untereinheiten autoinhibiert im Zytoplasma vor (Bajorek et al., 2009). Alle ESCRT-III Untereinheiten weisen strukturelle Ähnlichkeiten auf (Muzioł et al., 2006). Wie die Rekrutierung der ESCRT-III Untereinheiten letztendlich zur Abschnürung von ILV in das endosomale Lumen führen, ist nicht abschließend geklärt.

Im aktuell vorherrschenden Modell für die Abschnürung der ILV durch ESCRT-III werden zwei Vps20-Moleküle von Vps25 an das Endosom rekrutiert, was dann die Polymerisation der häufigsten ESCRT-III Untereinheit, Shrub, initiiert (Abbildung 1.3 ②) (Teo et al., 2004; Teis et al., 2010). Wie Vps20 die Polymerisation von Shrub initiiert, ist nicht vollständig verstanden. Die Polymere, die durch Shrub geformt werden, umschließen die aufkonzentrierten Transmembranproteine spiralförmig (Abbildung 1.3 ②). In einer möglichen Erklärung wurden Hinweise dafür gezeigt, dass die geformten Spiralen eine bevorzugte Krümmung besitzen. Durch die Polymerisation entstehen im sich formenden Polymer Krümmungen, die stärker oder schwächer als die bevorzugte Krümmung sind. Um die dadurch entstehende Spannung in diesen Polymeren zu senken, entstehen in diesem Modell aus den eher flachen Spiralen Membran-verformende Helices, die den Hals des formenden ILV umschließen (Abbildung 1.3 ②) (Shen et al., 2014; Chiaruttini et al., 2015; Jukic et al., 2022).

Die Polymerisation von ESCRT-III wird durch die Rekrutierung der ESCRT-III Untereinheiten Vps24 und Vps2 terminiert (Abbildung 1.3 ②) (Babst et al., 2002a; Teis et al., 2008; Henne et al., 2012).

Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass sich erst durch die Disassemblierung der ESCRT-III Untereinheiten durch die AAA-ATPase Vps4 der Hals des formenden ILV

zusammenzieht, was wahrscheinlich letztendlich zur Abschnürung der ILV in das endosomale Lumen führt (Abbildung 1.3 ③). Vermutlich funktioniert Vps4 dabei als Hexamer an der endosomalen Membran und liegt als Monomer im Zytoplasma vor (Abbildung 1.3 ④) (Monroe et al., 2014; Caillat et al., 2015). Für die Disassemblierung bindet Vps4 über MIT- (Microtubule Interaction and Transport-) Domänen die MIM- (MIT-interacting Motifs-) Domänen der ESCRT-III Untereinheiten (Yang et al., 2015a; Han et al., 2017; Monroe et al., 2017). Shrub, Vps2 und Vps24 besitzen MIM1-Domänen. Shrub besitzt zusätzlich wie Vps20 eine MIM2-Domäne (Obita et al. (2007); Kieffer et al. (2008); Übersicht in Davies et al. (2009); Schöneberg et al. (2017)).

Aktuelle Studien weisen darauf hin, dass Vps4 nicht nur für die Disassemblierung der ESCRT-III Untereinheiten sorgt, sondern für eine kontinuierliche Ummodellierung des ESCRT-III Polymers durch den Austausch von Untereinheiten verantwortlich ist und dadurch aktiv an der ILV Bildung beteiligt ist (Adell et al., 2014; Adell et al., 2017; Mierzwa et al., 2017; Schöneberg et al., 2018; Pfitzner et al., 2020).

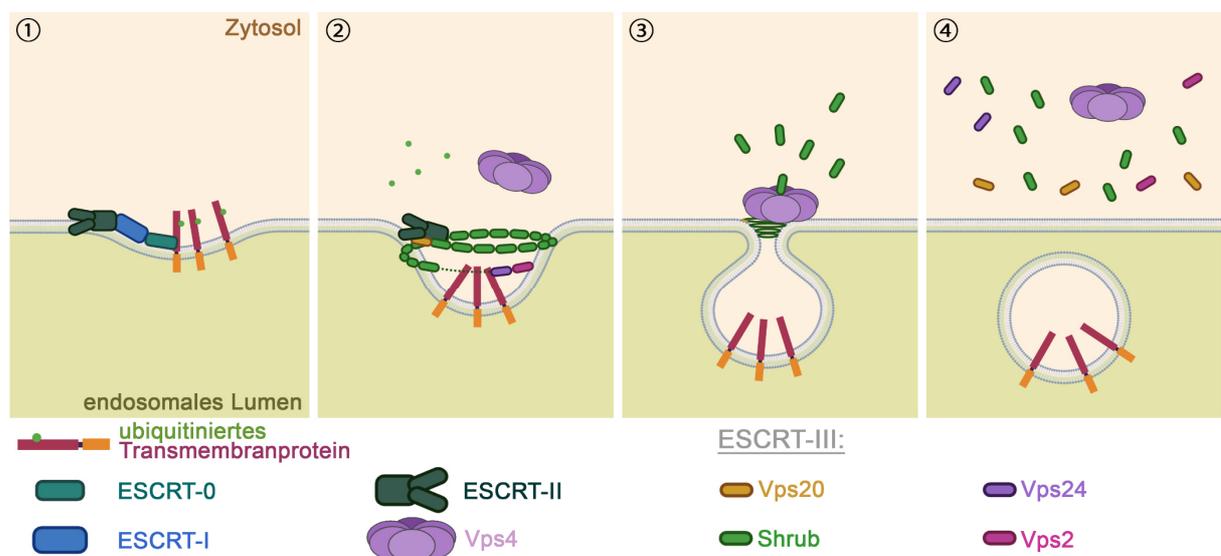


Abbildung 1.3: Modellvorstellung für die ILV-Bildung an der endosomalen Membran durch die ESCRT-Maschinerie. Hierbei werden die für den endolysosomalen Abbau mit Ubiquitin markierten Transmembranproteine durch ESCRT-0 erkannt, gebunden und an der Position des formenden ILV konzentriert ①. Zusammen mit ESCRT-I ist ESCRT-0 für die initiale Einstülpung der endosomalen Membran verantwortlich ①. ESCRT-I rekrutiert zusätzlich ESCRT-II an die endosomale Membran ①. Die zwei Vps25-Moleküle in ESCRT-II die zusammen mit Vps22 und Vps36 einen „Y“-förmigen Komplex bilden, rekrutieren die erste ESCRT-III Untereinheit Vps20 ②. Vps20 initiiert anschließend die Polymerisation von Shrub ②. Die Polymerisation wird durch die Bindung von Vps2 und Vps24 terminiert ②. Durch die Disassemblierung der ESCRT-III Untereinheiten durch die AAA-ATPase Vps4 wird der Hals des sich formenden ILV abgeschnürt, was zur Freisetzung der ILV in das endosomale Lumen führt ③. ESCRT-III und Vps4 liegen anschließend zytoplasmatisch in einzelnen Untereinheiten vor ④.

Der genaue Zeitpunkt und Mechanismus für die Disassemblierung der ESCRT-Untereinheiten ESCRT-0 - ESCRT-II von der endosomalen Membran ist nicht vollständig bekannt. Nur für einige Untereinheiten konnte gezeigt werden, wo sie sich während der ILV-Bildung bis zur Abschnürung der ILV befinden.

So ist die früh während der ILV-Bildung agierende ESCRT-0 Untereinheit Hrs bis kurz vor der endgültigen Abschnürung der ILV in Bereichen der formenden ILV nachweisbar (Wenzel et al., 2018).

Die ESCRT-II Untereinheiten konnten bei einer *in vitro* Rekonstruktion der ILV-Bildung nie innerhalb der ILV nachgewiesen werden, weshalb sie wahrscheinlich vorher disassembliert werden (Wollert und Hurley, 2010). Wie diese Disassemblierung vor dem Abschnüren der ILV geschehen soll ist nicht abschließend geklärt.

Die endosomale Fracht wird von Deubiquitinasen vor der Abschnürung der ILV deubiquitiniert (Dupré und Haguenauer-Tsapis, 2001; Odorizzi et al., 2003; Luhtala und Odorizzi, 2004).

Die ESCRT-Maschinerie ist nicht nur an der ILV-Bildung beteiligt, sondern in verschiedenen Zusammensetzungen für fast alle Prozesse verantwortlich, in denen Membranausstülpungen weg vom Zytoplasma stattfinden. So ist die ESCRT-Maschinerie unter anderem an der Knospung viraler Partikel des humanen Immundefizienz Virus (HIV), der Plasmamembrantrennung bei der Zytokinese und der Reparatur der Plasmamembran beteiligt (Übersicht in Hurley, 2015).

Die Untereinheiten der ESCRT-Maschinerie sind hochkonserviert. Für mehrere Prozesse mit Beteiligung der ESCRT-Maschinerie konnte gezeigt werden, dass die molekularen Mechanismen in unterschiedlichen Spezies ähnlich sind (Übersicht in Schöneberg et al., 2017). Das Verständnis der molekularen Prozesse in *Drosophila* hat demnach eine hohe Relevanz.

Es konnte gezeigt werden, dass der Ausfall der ESCRT-Untereinheiten ESCRT-I - ESCRT-III und die Expression einer dominant negativen Form von Vps4 zur Bildung von neoplastischen Tumoren führt, weshalb die kodierenden Gene dieser Komponenten auch neoplastische Tumorsuppressor-Gene genannt werden (Thompson et al., 2005; Vaccari und Bilder, 2005; Herz et al., 2006; Menut et al., 2007; Rodahl et al., 2009; Vaccari et al., 2009).

### 1.3.1 Die ESCRT-III Komponente Shrub

Die ESCRT-III Untereinheit Shrub bildet wie bereits beschrieben bei der Abschnürung von ILV auf der Membran von multivesikulären Endosomen Polymere. Die Interaktion mit weiteren Untereinheiten des ESCRT-III Komplexes ist für diese Abschnürung essentiell. Shrub kommt im Vergleich zu den anderen ESCRT-III Untereinheiten in der größten Anzahl vor und ist die zentrale Untereinheit dieses Komplexes (Teis et al., 2008). Durch die Bindung an Vps20 wird wahrscheinlich die Polymerisation auf der endosomalen Membran initiiert, die letztendlich zur Abschnürung der ILV führt. Für das hochkonservierte Shrub existieren drei Orthologe in Säugetieren: CHMP4A (Charged Multivesicular Body Protein 4A), CHMP4B und CHMP4C. Das Hefeortholog von Shrub ist Snf7 und das Ortholog aus *C.elegans* ist Vps32.

Shrub bildet wie die anderen ESCRT-III Untereinheiten eine zentrale helikale Haarnadel (Muzioł et al., 2006; Martinelli et al., 2012; Tang et al., 2015; McMillan et al., 2016). Es besitzt auf gegenüberliegenden Seiten basische und saure Oberflächenladungen. Bei der Polymerisation binden Shrub-Monomere über elektrostatische Wechselwirkungen dieser Oberflächen aneinander. Die daran beteiligten Aminosäuren konnten identifiziert werden (McMillan et al., 2016). Die sauren Aminosäuren Glutaminsäure40, Asparaginsäure79, Glutaminsäure86 und Glutaminsäure90 (E40, D79, E86 und E90) der helikalen Haarnadel eines Shrub-Moleküls binden dabei an die basischen Aminosäuren Arginin59 und Arginin70 (R59 und R70) der Kopfreion der helikalen Haarnadel eines weiteren Shrub-Moleküls (McMillan et al. (2016); Abbildung 1.4).

Für Orthologe von Shrub konnte gezeigt werden, dass bei der Polymerisation ohne früher agierende ESCRT Untereinheiten das Polymer an beiden Enden länger werden kann. So lässt sich die Polymerisation des Hefeortholog Snf7 auf gestützten Lipideinzelschichten in zwei Richtungen und eine Paarung der Polymere nachweisen, wenn sie gegenläufig länger werden (Henne et al., 2012). Auch spontan auf gestützten Lipiddoppelschichten polymerisierendes Snf7 kann an beiden Enden des formenden Polymers weitere Snf7-Moleküle binden (Chiaruttini et al., 2015; Mierzwa et al., 2017).

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass das Shrub-Ortholog aus *C.elegans* (Vps32) bei der Polymerisation sowohl links- als auch rechtsdrehende Spiralen bildet, die ineinandergreifen können (Shen et al., 2014). Auch diese Ergebnisse zeigen, dass Shrub-Orthologe in zwei Richtungen polymerisieren können.

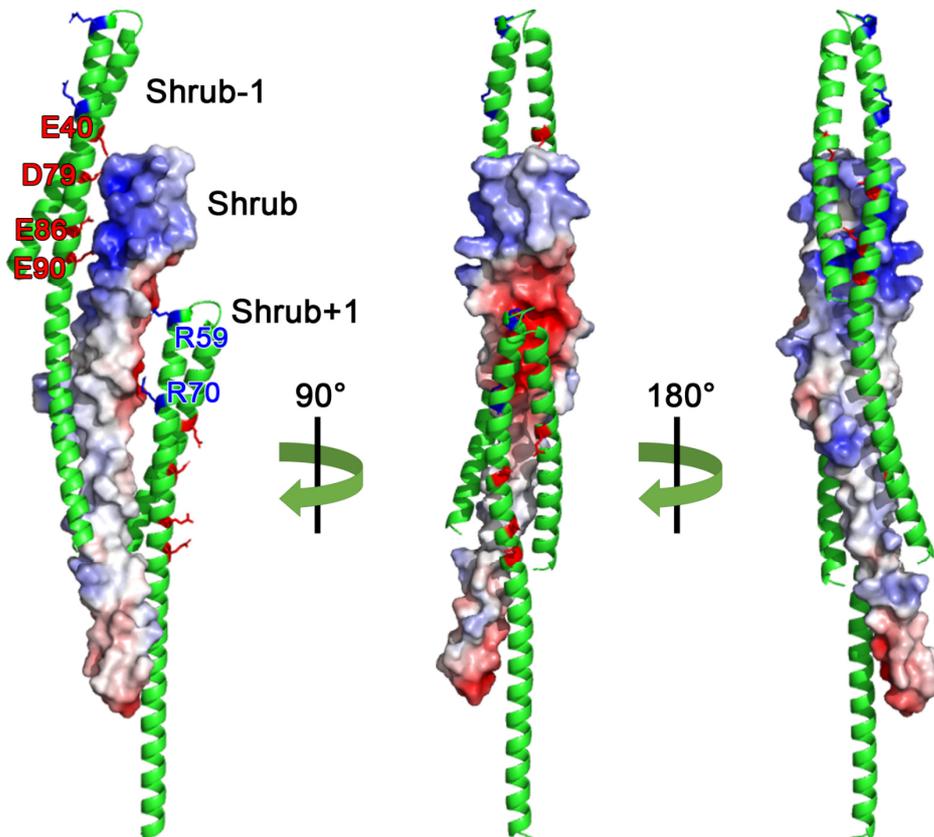


Abbildung 1.4: Die ESCRT-III Untereinheit Shrub bildet eine zentrale helikale Haarnadel und polymerisiert über elektrostatische Wechselwirkungen. Die sauren Aminosäuren E40, D79, E86 und E90 eines Shrub-Moleküls binden an die basischen Aminosäuren R59 und R70 des nächsten Shrub-Moleküls im sich formenden Polymer. Struktur für Aminosäure 10-143 von 226 aus PDB (ID: 5J45; McMillan et al. (2016)). Im mittleren Shrub-Molekül im gezeigten Polymer ist das Oberflächenpotential angezeigt (berechnet durch ABPS-electrostatics). Rot repräsentiert hierbei saures und Blau basisches Oberflächenpotential.

Für die Abschnürung von ILV durch die Polymerisation von Shrub, muss es an die endosomale Membran binden. Wie Shrub an die endosomale Membran bindet ist noch nicht aufgeklärt. In dieser Arbeit soll deshalb die Bindung von Shrub an die endosomale Membran simuliert und die Beteiligung von Aminosäuren an dieser Bindung analysiert werden.

Erste Hinweise für die Interaktion zwischen Shrub und der endosomalen Membran liefern Analysen der Membranbindung der Shrub-Orthologe. Für humanes CHMP4B konnte gezeigt werden, dass es über die hauptsächlich basische N-terminale Hälfte mit Membranen assoziiert ist (Lin et al., 2005).

Das Hefeortholog Snf7 bindet die Membran zuerst über hydrophobe Wechselwirkungen einer amphipathischen Helix (Buchkovich et al., 2013). Die anschließende Bindung an die Phospholipide der Membran über basische Aminosäuren konnte simuliert, aber nicht *in vivo* bestätigt werden (Tang et al., 2015).

Ob die Bindung in Shrub ähnlich wie für die Orthologe gezeigt abläuft, sollen die Analysen dieser Arbeit in *Drosophila* zeigen.

Der Ausfall von Shrub ist in *Drosophila* embryonal letal, führt zur ektoptischen Aktivierung des Notch-Signalwegs und zum Verlust der epithelialen Integrität (Sweeney et al., 2006; Vaccari und Bilder, 2009; Hori et al., 2011; Pannen et al., 2020).

Obwohl Shrub an der endosomalen Membran agiert, ist es dort nur schwer nachweisbar. Shrub lässt sich *in vivo* hauptsächlich zytoplasmatisch nachweisen (Masterarbeit: Brüser, 2013; Bäumers et al., 2019). Für die Bildung von ILV pendelt es zwischen Zytoplasma und endosomaler Membran. Es konnte gezeigt werden, dass die Assemblierung und Disassemblierung der ESCRT-Komponenten ein sehr dynamischer Prozess ist (Adell et al., 2017; Mierzwa et al., 2017; Pfitzner et al., 2020). Diese Dynamik führt wahrscheinlich dazu, dass der Nachweis von Shrub hauptsächlich zytoplasmatisch ist.

Die temporäre Reduktion der Funktion der ATPase Vps4 kann jedoch dafür genutzt werden, um die ESCRT-III Untereinheiten an vergrößerten Endosomen zu akkumulieren. Durch die Reduktion von Vps4-Funktion werden die ESCRT-III Komponenten nicht mehr vom Endosom disassembliert und akkumulieren an stark vergrößerten Endosomen (Babst et al., 1998; Bäumers et al., 2019).

Diese verstärkte Membranakkumulation wird für die Analyse der Membranbindung von Shrub-Varianten in dieser Arbeit genutzt.

### **1.3.2 Die ESCRT-III Komponente Vps20**

Wie bereits beschrieben, ist Vps20 die erste ESCRT-III Untereinheit, die von der ESCRT-II Untereinheit Vps25 an die endosomale Membran rekrutiert wird, was die Polymerisation von Shrub initiiert (Babst et al., 2002a; Teis et al., 2008; Teis et al., 2010).

Wie genau Vps20 die Polymerisation von Shrub initiiert ist nicht bekannt. In dieser Arbeit soll deshalb die Bindung von Shrub an Vps20, die für die Initiierung der Polymerisation von Shrub wahrscheinlich notwendig ist, analysiert werden.

Vps20 ist hochkonserviert. Das Ortholog in Hefe wird auch Vps20 genannt. Das Humanortholog ist CHMP6. Für die Bindung von Vps20 an Shrub konnten erste Hinweise durch die Analyse der Orthologe gefunden werden. So konnte gezeigt werden, dass die Interaktion der strukturell sehr ähnlichen Humanorthologe CHMP6 mit CHMP4B über die N-terminale Hälfte (Yorikawa et al., 2005), oder im Hefe-Vps20 mit Snf7 über den  $\alpha 1$ - $\alpha 2$

Loop von Vps20 (Teis et al., 2010) vermittelt wird. Die Beteiligung einzelner Aminosäuren an der Bindung zwischen Vps20 und Shrub wird in dieser Arbeit überprüft.

*vps20* liegt bei *Drosophila* auf dem zweiten Chromosom auf dem rechten Chromosomenarm. Der Ausfall von Vps20 ist in *Drosophila* embryonal letal (Vaccari et al., 2009).

Für die Orthologe von Vps20 konnte gezeigt werden, dass eine N-terminale Myristoylierung für die korrekte Lokalisation von Vps20 und den korrekten Transport von endosomaler Fracht benötigt wird (Babst et al., 2002a; Yorikawa et al., 2005).

Die Notwendigkeit dieser Myristoylierung in *Drosophila* und die Folgen der fehlenden Myristoylierung wurde bis jetzt nicht für Metazoen untersucht und sind deshalb Teil der Analysen dieser Arbeit.

Durch den Vergleich der Aminosäuresequenzen von CHMP6 mit anderen ESCRT-III Untereinheiten und der Aminosäuresequenzen der ESCRT-III Untereinheiten verschiedener Spezies wird davon ausgegangen, dass CHMP6 ähnlich wie CHMP3 (humanes Vps24 Ortholog) eine zentrale helikale Haarnadelstruktur ( $\alpha 1$ - $\alpha 2$ ) mit drei weiteren kleineren Helices ( $\alpha 3$ - $\alpha 5$ ) ausbildet (Muzioł et al. (2006); Abbildung 1.5 B).

Die Struktur und die Ladungsverteilung auf der Oberfläche von Vps20 sind nicht bekannt. In dieser Arbeit wird deshalb die Struktur mit Hilfe der Alphafold2 Datenbank analysiert.

Vps20 wird, wie bereits beschrieben, von der ESCRT-II Untereinheit Vps25 an die endosomale Membran rekrutiert. Die Interaktion zwischen Vps25 und Vps20 konnte im Detail für die Humanorthologe gezeigt werden (Im et al. (2009); Abbildung 1.5). Vps25 interagiert über die Aminosäuren Valin124, Threonin126, Glutaminsäure129 und Isoleucin165 mit den Aminosäuren Leucin21, Lysin24, Arginin27 und Asparaginsäure28 von CHMP6 um es an die endosomale Membran zu rekrutieren (Im et al. (2009); Abbildung 1.5). Die Aminosäuren in Vps20, die an dieser Bindung beteiligt sind, sind konserviert (Anhang, Abbildung 8.2). Durch die Mutationen L21R, R27A und D28A in Vps20 (Vps20<sup>ΔESCRT-II</sup>) konnte die Bindung an Vps25 verhindert werden (Im et al., 2009). Die Auswirkungen dieser Mutationen wurden nicht für Metazoen gezeigt, weshalb in dieser Arbeit die beteiligten Aminosäuren in Vps20 analysiert werden.

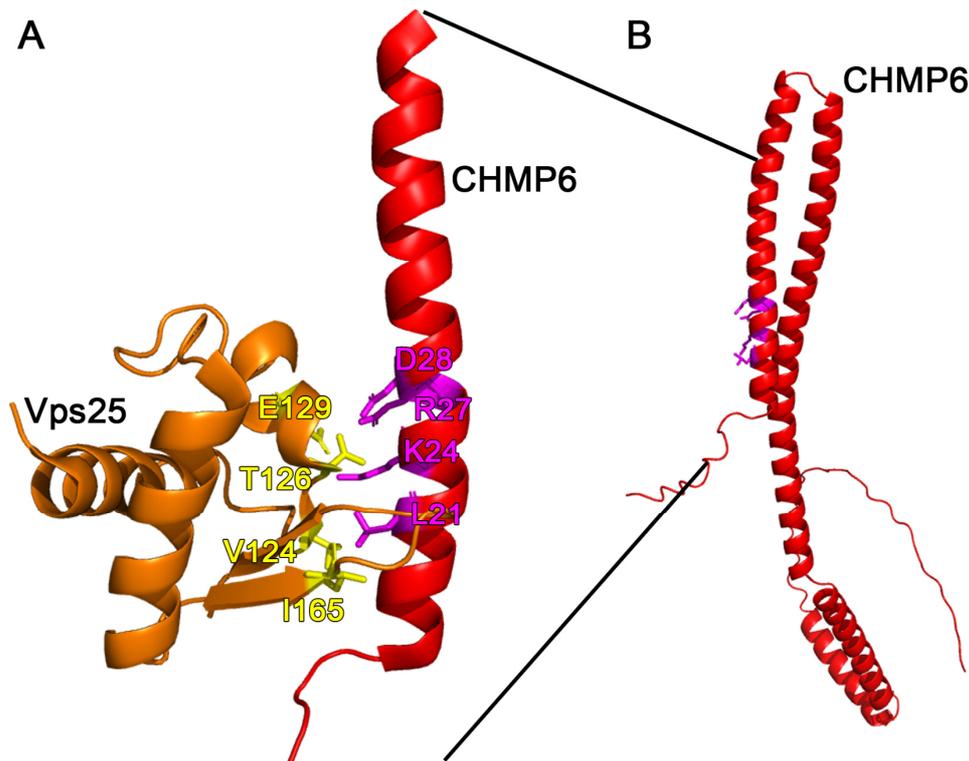


Abbildung 1.5: Interaktion von Vps25 und CHMP6. A: Vps25 (orange) interagiert über die Aminosäuren Valin124, Threonin126, Glutaminsäure129 und Isoleucin165 (gelb markierte Aminosäuren) mit den Aminosäuren Leucin21, Lysin24, Arginin27 und Asparaginsäure28 (pink markierte Aminosäuren) von CHMP6 (Rot). Bindung aus PDB (ID: 3HTU; Im et al. (2009)). B: Strukturvorhersage für CHMP6 (AlphaFold Datenbank ID: AF-Q96FZ7-F1).

Für CHMP6 konnte gezeigt werden, dass die Überexpression zelluläre Auswirkungen hat. Die Überexpression von C-terminal Myc und 6xHis markiertem CHMP6 mit Hilfe des CMV- (Cytomegalovirus-) Promotors führt in HeLa Zellen zur Induktion von Onkose (Fu et al., 2009). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass das Recycling des Transferrin Rezeptors (TfR) durch die Überexpression von C-terminal Fluorophor markierten CHMP6 gestört ist und die Überexpression einen negativen Einfluss auf die Sortierung der endosomalen Fracht hat (Yorikawa et al., 2005).

Welchen Effekt die Überexpression von Vps20 *in vivo* hat, wurde noch nicht gezeigt und wird deshalb in dieser Arbeit charakterisiert.

#### 1.4 Der Tumorsuppressor Lethal (2) giant discs

Lethal (2) giant discs (Lgd) ist ein Tumorsuppressor, welcher für die Regulation direkt mit der ESCRT-III Untereinheit Shrub interagiert (Troost et al., 2012; McMillan et al., 2017). Diese Interaktion ist für die vollständige Funktion von Shrub notwendig (Troost et al., 2012; Baeumers et al., 2020). Lgd ist in allen Metazoen konserviert und besitzt in Säugetieren zwei Orthologe (Lgd1/CC2D1B und Lgd2/CC2D1A) (Childress et al., 2006;

Jaekel und Klein, 2006). Lgd besitzt vier DM14-Domänen (*Drosophila melanogaster* 14), die einzigartig für Lgd und seine Orthologe sind, und eine C2- (Protein kinase C conserved region 2) Domäne am C-Terminus (Abbildung 1.6 A; Gallagher und Knoblich (2006)). Die C2-Domäne scheint wichtig für die korrekte Lokalisation von Lgd im Zytoplasma und die Stabilität des Proteins zu sein (Troost et al., 2012; Ventimiglia et al., 2018). Zusätzlich ermöglicht die C2-Domäne eine Assoziation mit Phospholipiden (Gallagher und Knoblich, 2006; Ventimiglia et al., 2018). Der Aminosäurebereich 558-664 von Lgd befindet sich zwischen der vierten DM14-Domäne und der C2-Domäne. Fehlt dieser Bereich führt das zum Funktionsverlust von Lgd (unveröffentlicht, AG Klein). Für diesen Bereich ist keine funktionelle Domäne durch Datenbankabfragen vorhergesagt, es konnte jedoch gezeigt werden, dass dieser Bereich mit dem C-Terminus von Lgd interagiert (Ventimiglia et al., 2018).

Lgd ist in Flügelimaginalscheiben ubiquitär schwach exprimiert und zytoplasmatisch lokalisiert (Childress et al., 2006; Gallagher und Knoblich, 2006; Jaekel und Klein, 2006; Troost et al., 2012).

Der Ausfall von Lgd führt in *Drosophila* zur ektopischen, Liganden-unabhängigen Aktivierung des Notch-Signalwegs. Diese Aktivierung führt zur hyperplastischen Überproliferation der Flügelimaginalscheiben (Abbildung 1.6 B, Childress et al. (2006); Gallagher und Knoblich (2006); Jaekel und Klein (2006)). Der Phänotyp entsteht durch einen gestörten endosomalen Abbau des Notch-Rezeptors. Durch das Fehlen von Lgd ist die Funktion der ESCRT-III Untereinheit Shrub reduziert, wodurch wahrscheinlich die Aufnahme des Notch-Rezeptors in ILV reduziert ist (Troost et al., 2015; Baeumers et al., 2020). Als Folge dessen verbleibt im aktuellen Modell, was die Auswirkungen des Verlustes von Lgd auf den Abbau des Notch-Rezeptors beschreibt, eine Fraktion des Notch-Rezeptors beim Abbau an der limitierenden Membran der multivesikulären Endosomen (Abbildung 1.6). Die intrazelluläre Domäne des Notch-Rezeptors ist dabei in Richtung des Zytoplasmas ausgerichtet (Abbildung 1.6; Couturier et al. (2014)). Durch die Fusion mit dem Lysosom und dem beginnenden Abbau der extrazellulären Domäne des Rezeptors kann die intrazelluläre Domäne des Rezeptors durch einen alternativen Schnitt in das Zytoplasma gelangen (Schneider et al., 2013). Dieser alternative Schnitt ist abhängig von der Aktivität des  $\gamma$ -Sekretase Komplexes, jedoch unabhängig von der Metalloprotease (Gallagher und Knoblich, 2006; Jaekel und Klein, 2006; Schneider et al., 2013). Durch das Freiwerden der intrazellulären Domäne des Notch-Rezeptors kann sie

in den Zellkern translozieren. Das führt zur Aktivierung der Expression von Zielgenen des Signalwegs, wie zum Beispiel *wingless (wg)* (vgl. Abbildung 1.6 B, linke und rechte Hälfte; Jaekel und Klein (2006); Schneider et al. (2013)).

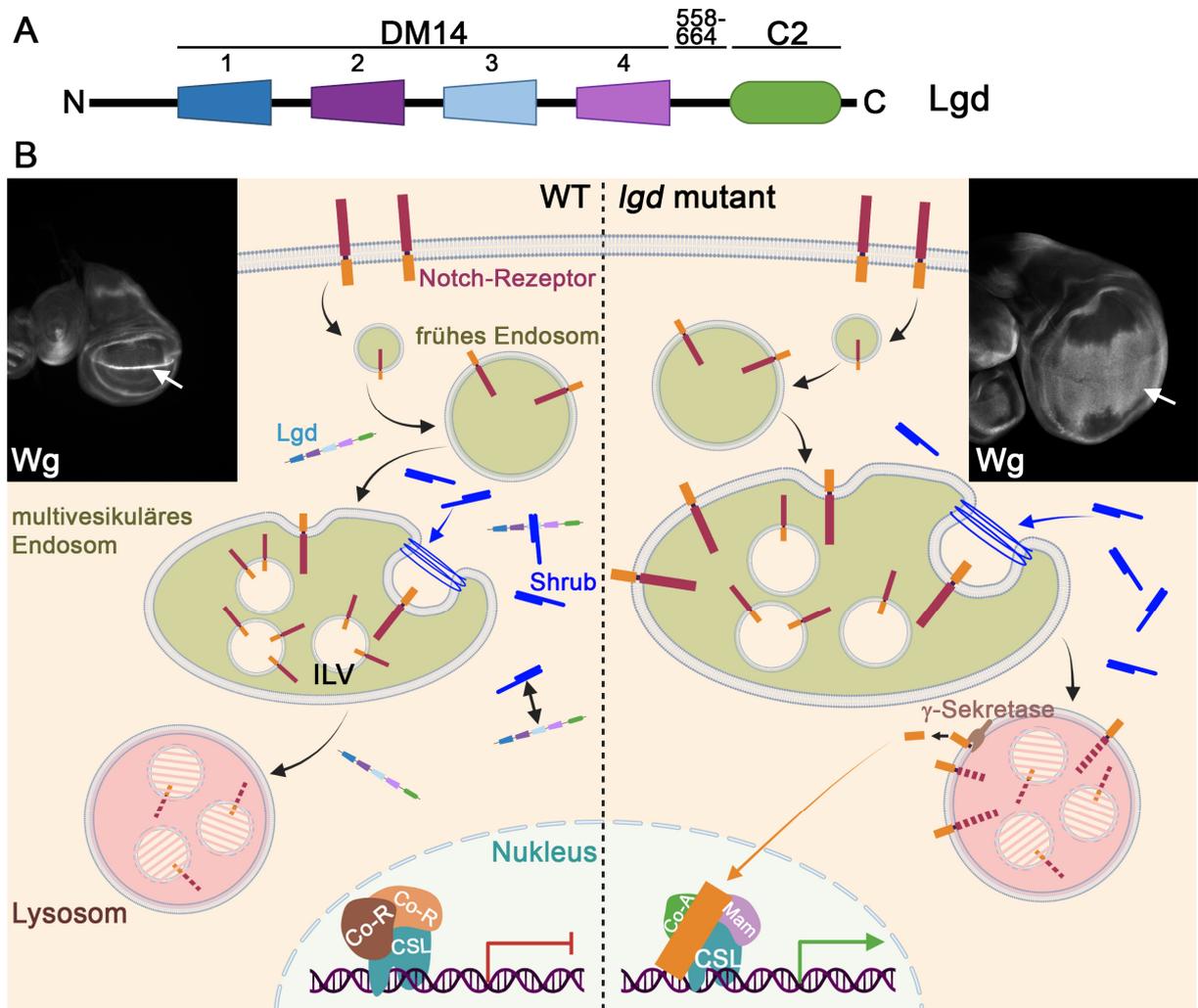


Abbildung 1.6: Der Tumorsuppressor Lgd. A: Lgd besteht aus vier DM14-Domänen und einer C2-Domäne. Die vier DM14-Domänen werden für Protein-Protein Interaktionen benötigt und die C2-Domäne ist für die Protein-Stabilität und für die Assoziation mit Phospholipiden notwendig. B: Möglicher Mechanismus der Aktivierung des Notch-Signalwegs bei Verlust von Lgd. Links ist die wildtypische Situation und rechts die *lgd* mutante Situation schematisiert. Der Ausfall von Lgd führt zur ektopischen, Liganden-unabhängigen Aktivierung des Notch-Signalwegs. Die Aktivität der ESCRT-III Untereinheit Shrub ist reduziert, was wahrscheinlich dazu führt, dass während der ILV-Bildung eine Fraktion des Notch-Rezeptors an der limitierenden Membran des Endosoms verbleibt. Die intrazelluläre Domäne des Notch-Rezeptors ist dabei in Richtung des Zytoplasmas orientiert. Durch die Fusion mit dem Lysosom und dem beginnenden Abbau der extrazellulären Domäne des Notch-Rezeptors kann die intrazelluläre Domäne vom  $\gamma$ -Sekretase-Komplex geschnitten und in das Zytoplasma freigesetzt werden. Dadurch kann sie in den Zellkern translozieren und dort die Expression der Notch-Zielgene aktivieren. Das Notch-Zielgen *wingless (wg)* ist in der wildtypischen Situation entlang der dorso-ventralen (D/V) Grenze, in zwei kreisförmigen Domänen um das Flügelfeld und im Notum der Flügelimaginalscheibe exprimiert (B, Imaginalscheibe links). Durch den Ausfall von Lgd kommt es zur Verbreiterung der Expressionsdomäne von *wg* an der D/V-Grenze (Pfeile). Die Imaginalscheiben sind aufgrund des Lgd-Ausfalls überproliferiert (Imaginalscheibe rechts).

Des Weiteren konnte eine Beteiligung von Lgd an der Regulation des Dpp/BMP Signalwegs gezeigt werden. Durch den Ausfall von Lgd kommt es zur verlängerten Aktivierung des Signalwegs in der Keimbahn weiblicher *Drosophila* (Morawa et al., 2015). Auch hier ist der beobachtete Effekt auf eine Störung des endosomalen Transports und den Abbau von Transmembranproteinen zurückzuführen.

Zusätzlich zu den beobachteten zellulären Effekten kommt es zu einem verlängerten Larvenstadium und zur Letalität im Puppenstadium (Bryant und Schubiger, 1971; Buratovich und Bryant, 1995).

Für die Analyse von Lgd-Varianten können Transgene erstellt werden, die mit Hilfe eines Lgd-Expressionssystems exprimiert werden können (lgdP, Troost et al. (2012)). Es beinhaltet die ungefähr 500 Basenpaare upstream und downstream der kodierenden Region von Lgd gelegenen Bereiche (Troost et al., 2012). Die Expression einer Kopie der Lgd-Varianten in diesem Expressionsvektor führt zur Expressionsstärke die mit endogenem Lgd vergleichbar ist. Die Varianten können im *lgd* mutanten Hintergrund (*lgd<sup>d7</sup>*) exprimiert werden und auf ihre Rettungsfähigkeit des mutanten Phänotyps überprüft werden. Der genetische Hintergrund des Rettungsexperiments kann durch die zusätzlich heterozygote Situation von Shrub sensitiviert werden (*lgd<sup>d7</sup>, shrub<sup>4-1</sup>/lgd<sup>d7</sup>*). Dadurch lassen sich noch geringere Funktionsunterschiede der Lgd-Varianten identifizieren (Troost et al., 2012; Dissertation: Tibbe, 2019). Nachkommen mit dem sensitivierten genetischen Hintergrund sterben im späten zweiten oder frühen dritten Larvenstadium (Troost et al., 2012; Dissertation: Schulz, 2015).

Die meisten Untersuchungen der Lgd-Orthologe sind für Lgd2/CC2D1A durchgeführt worden. Für Lgd2/CC2D1A konnte dabei die Beteiligung an einer Vielzahl von zellulären Prozessen gezeigt werden. So konnte für Lgd2/CC2D1A zum Beispiel gezeigt werden, dass es als positiv-Regulator des NF- $\kappa$ B-Signalwegs (Matsuda et al., 2003; Zhao et al., 2010) und des cAMP/PKA-Signalweg (Al-Tawashi et al., 2012; Al-Tawashi und Gehring, 2013) agiert. Im EGFR-Signalweg ist Lgd2/CC2D1A als Gerüstprotein beteiligt um PDK1/Akt zu rekrutieren und zu aktivieren (Nakamura et al., 2008).

Für das Lgd-Ortholog Lgd1/CC2D1B konnte gezeigt werden, dass es an der Schließung der Kernmembran nach der Zellteilung beteiligt ist und dabei den zeitlichen Ablauf reguliert (Ventimiglia et al., 2018). Hierbei bindet es an das ESCRT-III Protein CHMP7.

Für Lgd1/CC2D1B und Lgd2/CC2D1A konnten Hinweise für die Funktion im endosomalen Transportweg gezeigt werden. Sie sind in der Lage Lgd in *Drosophila* funktionell zu ersetzen und lokalisieren bei Reduktion der Vps4-Funktion an vergrößerten Endosomen (Drusenheimer et al., 2015). Auch die Interaktion mit ESCRT-Untereinheiten liefert einen Hinweis darauf, dass die Funktion im endosomalen Transportweg auch für die Orthologe von Lgd konserviert ist (Martinelli et al., 2012; Usami et al., 2012; Ventimiglia et al., 2018).

#### **1.4.1 Die Interaktion von Lgd mit Shrub**

Wie Lgd die Aktivität von Shrub erhöht ist nicht abschließend aufgeklärt. Eine aktuelle Theorie ist, dass Lgd Shrub im Zytoplasma bindet und so die Polymerisation von Shrub verhindert. Shrub würde durch die Bindung von Lgd in seiner monomeren Form gehalten werden. Durch das Fehlen von Lgd im Zytoplasma kommt es vermutlich zur Bildung von unproduktiven Shrub-Polymeren im Zytoplasma, welche dann nicht für die Polymerisation auf der endosomalen Membran für die ILV-Bildung bereitstehen (McMillan et al. (2017); Baeumers et al. (2020); Dissertation: Bäumers (2020)).

Lgd interagiert über die ungeradzahligen DM14-Domänen mit Shrub. Die Interaktion der dritten DM14-Domäne, die eine helikale Haarnadel bildet, mit Shrub konnte mittels Röntgenkristallographie gezeigt werden (McMillan et al., 2017). Hierbei binden die basischen Aminosäuren Lysin387, Arginin389, Arginin390 und Arginin393 der Interaktionshelix der DM14-Domäne über elektrostatische Wechselwirkungen an die saure Oberfläche von Shrub, die hauptsächlich durch die Aminosäuren Glutaminsäure40, Asparaginsäure79 und Glutaminsäure86 gebildet wird (Abbildung 1.7, McMillan et al. (2017)). Die basischen Aminosäuren in Lgd, an die Shrub bindet, werden als KARR R Motiv bezeichnet und kommen auch in der ersten DM14-Domäne vor.

Ob die Aminosäuren des KARR R Motivs alleine ausreichend für die Interaktion der DM14-Domänen mit Shrub sind, ist nicht bekannt. In dieser Arbeit soll das KARR R Motiv deshalb weiter untersucht werden. Hierbei soll überprüft werden, ob noch weitere Eigenschaften der DM14-Domänen für die Interaktion mit Shrub benötigt werden.

Auch für die Orthologe Lgd1 und Lgd2 konnten Interaktionen der DM14-Domänen mit den Shrub-Orthologen CHMP4A, B und C gezeigt werden (Tsang et al., 2006; Martinelli et al., 2012; Usami et al., 2012).

Da Lgd an die gleichen Aminosäuren in Shrub bindet, wie ein weiteres Shrub-Monomer bei der Polymerisation, schließt die Bindung von Lgd an Shrub die Polymerisation von Shrub aus (vgl. Abbildung 1.4 und Abbildung 1.7, McMillan et al. (2016); McMillan et al. (2017)). Es konnte gezeigt werden, dass die ungeradzahigen DM14-Domänen für die vollständige Funktion von Lgd wichtiger sind, als die geradzahigen, und dass sie eine funktionale Redundanz zeigen (McMillan et al. (2017); Dissertation: Tibbe (2019)). Ob diese funktionelle Redundanz vollständig oder partiell ist konnte nicht abschließend aufgeklärt werden und soll in dieser Arbeit analysiert werden.

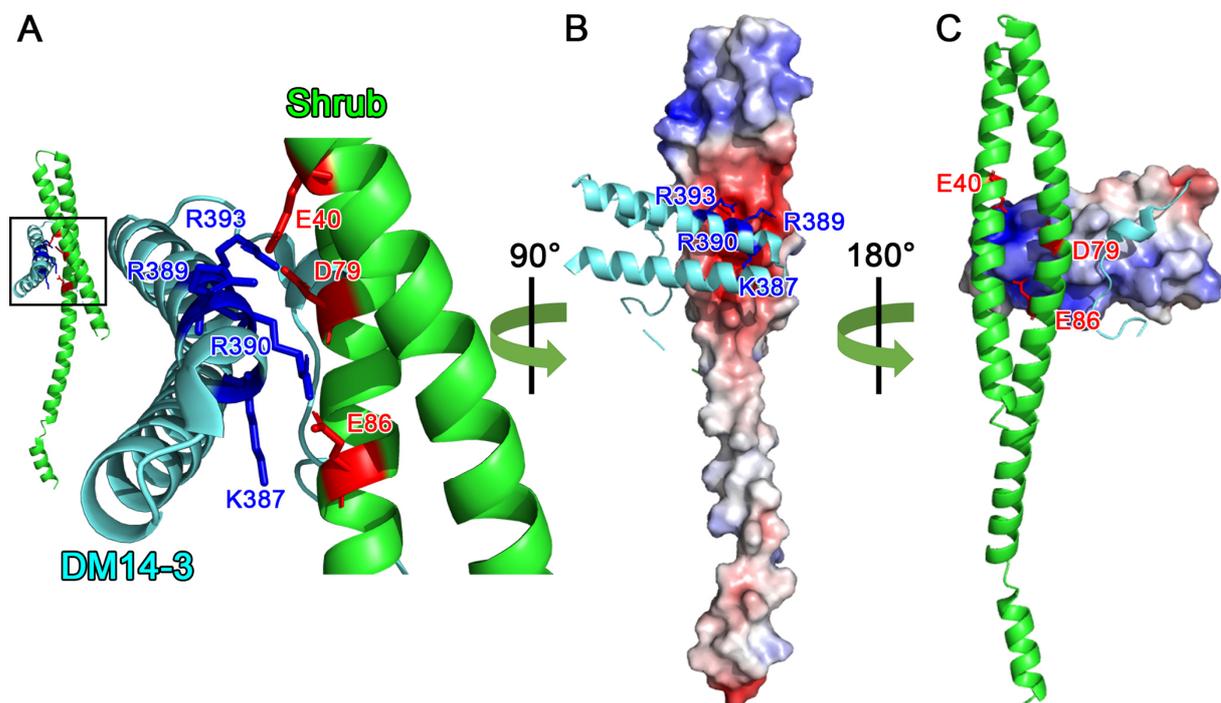


Abbildung 1.7: Lgd bindet über seine ungeradzahigen DM14-Domänen an die ESCRT-III Untereinheit Shrub. Hier ist die Bindung von DM14-3 (türkis mit blauen basischen Aminosäuren) an Shrub (grün mit rot markierten sauren Aminosäuren) gezeigt. Die basischen Aminosäuren (K387, R389, R390 und R393 = KARR R Motiv) der helikalen Haarnadel von DM14-3 interagieren mit sauren Aminosäuren (E40, D79 und E86) in Shrub über elektrostatische Wechselwirkungen (A; PDB (ID: 3HTU); McMillan et al. (2017)). Die Interaktion zwischen der dritten DM14-Domäne und Shrub schließt die Polymerisation von Shrub aus. Berechnung des Oberflächenpotentials mit APBS-electrostatics (Jurrus et al., 2018). Rot repräsentiert saure Bereiche, basische Bereiche sind blau dargestellt. In B ist das Oberflächenpotential von Shrub dargestellt, an das die basischen Aminosäuren von DM14-3 binden. C entspricht B um 180° gedreht und mit angezeigtem Oberflächenpotential von DM14-3.

## 1.5 Ziele der Arbeit

Die Regulation von Signalwegen mit Transmembranrezeptoren wird unter anderem durch den endosomalen Transport und die Aktivität der ESCRT-Maschinerie bei der Bildung von intraluminalen Vesikeln (ILV) vermittelt. Die häufigste ESCRT-Untereinheit ist Shrub, welche durch seine Polymerisation die Abschnürung von ILV realisiert. Für die vollständige Funktion von Shrub, sind die Interaktionen mit Lgd, Vps20 und der endosomalen Membran essentiell, welche in dieser Arbeit analysiert werden. Die bereits erwähnten Fragestellungen die in dieser Arbeit bearbeitet wurden, sind hier zusammenfassend dargestellt:

Es konnte gezeigt werden, dass DM14-1 und DM14-3 in Lgd die Interaktion mit Shrub vermitteln. Die beiden Domänen zeigen funktionale Redundanz. Ob diese vollständig oder nur partiell ist, soll in dieser Arbeit überprüft werden. Was die minimalen Anforderungen an diese ungeradzahligen DM14-Domänen sind, konnte bis jetzt nicht herausgefunden werden. In dieser Arbeit soll deshalb überprüft werden, ob das KARR R Motiv als minimale Shrub-Bindestelle der DM14-Domänen ausreicht.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass das Fehlen des Aminosäurebereichs 558-664 zum Funktionsverlust von Lgd führt. Wodurch dieser Funktionsverlust zustande kommt, wird hier analysiert.

Wie die Abschnürung von ILV in das endosomale Lumen durch die Polymerisation der ESCRT-III Untereinheiten geschieht, ist bis jetzt nicht abschließend aufgeklärt. Zur weiteren Aufklärung der Prozesse die zu dieser Abschnürung führen, wird in dieser Arbeit die Bindung von Shrub an den Polymerisations-Initiator Vps20 und an die endosomale Membran analysiert. Hierbei wird die Bindung von Shrub an Vps20 über elektrostatische Wechselwirkungen überprüft. Für die Analysen der Bindung von Shrub an Vps20 wird eine Kombination aus Molekulardynamik-Simulationen und *in vivo* Rettungsexperimenten verwendet.

Zusätzlich sollen Aminosäuren in Shrub identifiziert werden, über die die Interaktion mit den Phospholipiden der endosomalen Membran vermittelt wird. Auch die Beteiligung von Aminosäuren in Shrub an der Membranbindung wird durch Molekulardynamik-Simulationen und Lokalisationsanalysen *in vivo* charakterisiert.

## 2. Ergebnisse

### 2.1 Die Bindung von Shrub an Lgd

Für die Analyse der Shrub Interaktion mit Lgd wurden in dieser Arbeit mit verschiedenen Lgd-Konstrukten Rettungsexperimente durchgeführt. Es wurde überprüft in welchem Maße die, im *lgd* null-mutanten Hintergrund (*lgd<sup>d7</sup>*, Klein (2003)) exprimierten Konstrukte, die Funktion des wildtypischen Lgd ersetzen können.

Für die Rettungsexperimente werden Flügelimaginalscheiben von Larven im späten dritten Larvenstadium präpariert und mittels Antikörperfärbungen analysiert. Durch die Nutzung des endogenen Lgd-Promotors (*lgdP*) werden die Lgd-Rettungskonstrukte ubiquitär in den Flügelimaginalscheiben auf endogenem Expressionslevel exprimiert (Troost et al., 2012). Um Positionseffekte zu neutralisieren, wurden alle Lgd-Konstrukte in die künstliche Integrationsstelle 86Fb im *Drosophila* Genom integriert (Bischof et al., 2007). Kann der Phänotyp des mutanten Hintergrundes vollständig gerettet werden, wurde im Anschluss überprüft, ob auch der Phänotyp des sensitivierten Hintergrundes (*lgd<sup>d7</sup>, shrub<sup>4-1</sup>/lgd<sup>d7</sup>*) gerettet werden kann (*shrub<sup>4-1</sup>* aus Sweeney et al. (2006).

Da es bei dem Ausfall von Lgd zur ektopischen Aktivierung des Notch-Signalwegs kommt, wird in den Rettungsexperimenten die Aktivität des Signalwegs analysiert. Die Aktivität des Notch-Signalwegs wird mithilfe des direkten Zielgens Wingless (*Wg*) oder des Reportergenkonstruktes *Gbe+Su(H)* (6.3.7, Furriols und Bray (2001)) sichtbar gemacht.

#### 2.1.1 Das Rettungsvermögen der ersten DM14-Domäne von Lgd

Es wurde gezeigt, dass die ungeradzahligen DM14-Domänen in Lgd wichtiger für die vollständige Funktion sind, als die geradzahligen. Durch Röntgenkristallographie konnte die Bindung der dritten DM14-Domäne an Shrub gezeigt werden (McMillan et al., 2017). Die Bindung der ersten DM14-Domäne an Shrub konnte in dieser Arbeit mit Hilfe von AlphaFold2-Multimer simuliert werden (Jumper et al., 2021; Mirdita et al., 2022). Der simulierte Komplex liefert einen Hinweis auf die Bindung über elektrostatische Wechselwirkungen (Abbildung 2.1). Hierbei bindet auch die erste DM14-Domäne, wie für DM14-3 gezeigt, über einen basischen Bereich an die saure Oberfläche eines Shrub-Moleküls (Abbildung 2.1 C-E). Die Shrub-bindenden Aminosäuren, die für die dritte DM14-Domäne identifiziert wurden (Lysin387 (K), Arginin389 (R), Arginin390 (R) und Arginin393 (R) =KARR R Motiv) befinden sich auch an gleicher Position in der ersten DM14-Domäne (K167, R169, R170 und R173) (Abbildung 2.1 A). Bei der Berechnung des

Oberflächenpotentials mit Hilfe von APBS-electrostatics (Jurrus et al., 2018) trägt ihre basische Ladung, wie für DM14-3 gezeigt, hauptsächlich zur Ausbildung des basischen Oberflächenpotentials bei (Abbildung 2.1 A'+B).

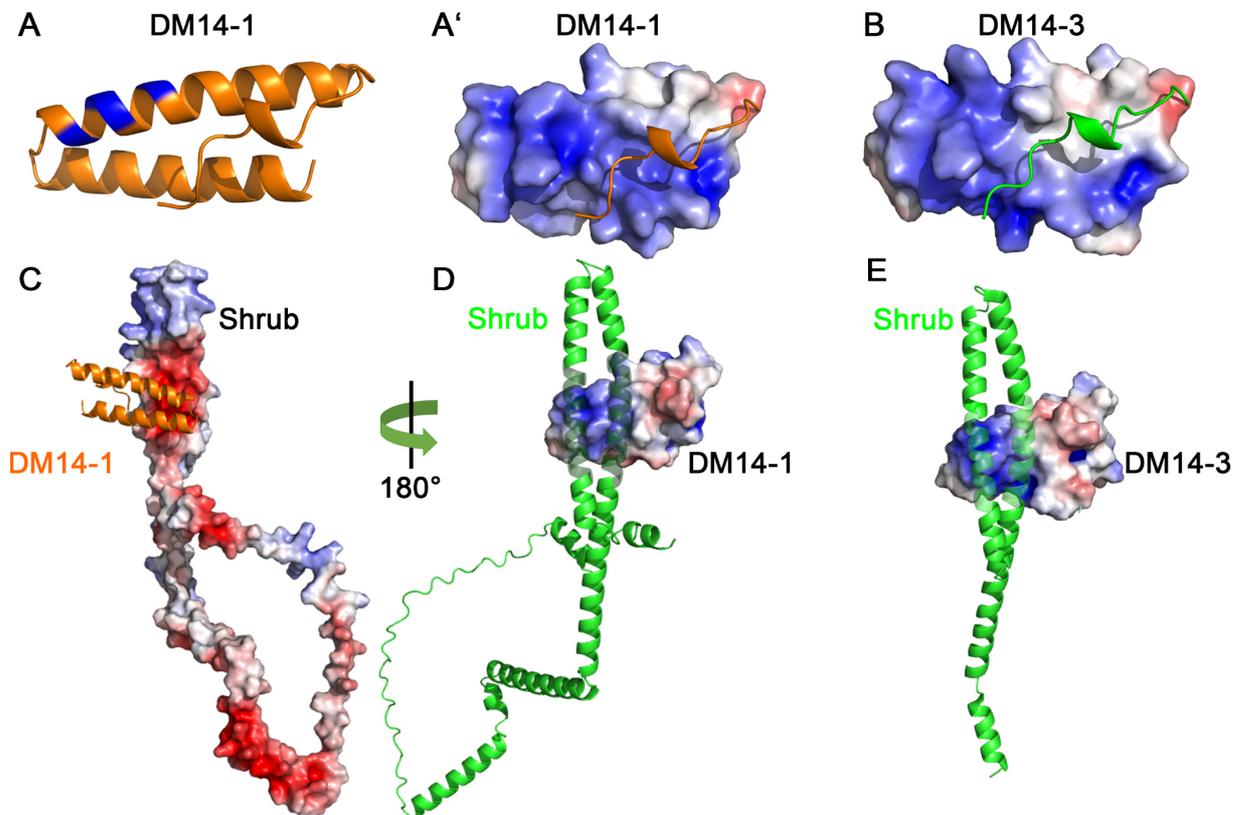


Abbildung 2.1: Die erste DM14-Domäne von Lgd kann in einer AlphaFold2-Multimer Simulation über elektrostatische Wechselwirkungen an Shrub binden. Berechnung des Oberflächenpotentials mit APBS-electrostatics (Jurrus et al., 2018). Rot repräsentiert saure Bereiche, basische Bereiche sind blau dargestellt. Das KARR R Motiv ist in DM14-1 an gleicher Position wie in DM14-3 vorhanden (A). Es verleiht DM14-1 ein ähnliches basisches Oberflächenpotential wie DM14-3 (A'+B). In C ist das Oberflächenpotential von Shrub gezeigt und die helikale Haarnadel der ersten DM14-Domäne in Orange dargestellt. In D ist die Ansicht um 180° gedreht und das Oberflächenpotential ist von DM14-1 angezeigt und Shrub ist in Grün dargestellt. DM14-1 bindet über eine basische Oberfläche, die durch die basischen Aminosäuren der Interaktionshelix gebildet wird, an die saure Oberfläche von Shrub. Diese Bindung ähnelt der Bindung von DM14-3 und Shrub, die mittels Röntgenkristallographie ermittelt wurde (E; (PDB (ID: 3HTU) McMillan et al. (2017))).

Für die geradzahigen DM14-Domänen konnte hier trotz geringer Sequenzähnlichkeit gegenüber der ungeradzahigen DM14-Domänen (Dissertation: Tibbe, 2019) eine helikale Haarnadelstruktur simuliert werden (Abbildung 2.5 B+D). Eine AlphaFold2-Multimer Simulation konnte jedoch keine Bindung der geradzahigen DM14-Domänen an Shrub mit hoher Wahrscheinlichkeit liefern (Jumper et al., 2021; Mirdita et al., 2022).

In Rettungsexperimenten konnte gezeigt werden, dass die Verdoppelung der dritten DM14-Domäne zu einer Steigerung des Rettungsvermögens des Lgd-Konstrukts führt, die

vollständige Funktion aber nur von Lgd mit beiden ungeradzahigen DM14-Domänen übernommen werden kann (McMillan et al. (2017); Dissertation: Tibbe (2019)). Um die funktionale Redundanz zwischen DM14-3 und DM14-1 weiter zu untersuchen, wurden Rettungsexperimente mit verschiedenen Lgd-Konstrukten durchgeführt (Abbildung 2.2). Es sollte herausgefunden werden, ob DM14-1 und DM14-3 vollständig oder nur partiell redundant sind.

Die hier untersuchten Lgd-Konstrukte besitzen die N- und C-terminal der DM14-Domänen gelegenen Regionen, die C2-Domäne und für den Nachweis einen C-terminalen HA-Tag. Es wurde ein Lgd-Deletionskonstrukt analysiert, bei dem die DM14-Domänen zwei bis vier fehlen (bereits untersucht in Dissertation: Tibbe (2019)). Damit verglichen wurde ein Lgd-Konstrukt, dem ebenfalls die zweite bis vierte DM14-Domäne fehlen, jedoch die erste DM14-Domäne doppelt eingefügt ist. (Abbildung 2.2)

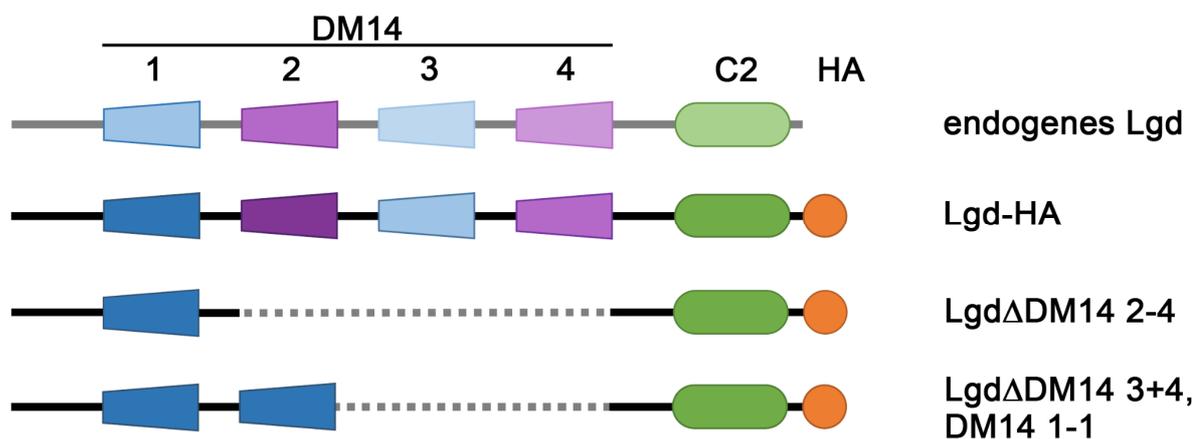


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der analysierten Lgd-Deletionskonstrukte zur dosisabhängigen Rettung der ersten DM14-Domäne. DM14-Domänen sind in Blau (ungeradzahlig) und Violett (geradzahlig) dargestellt. Die C2-Domäne ist in Grün dargestellt. Alle Lgd-Transgene besitzen einen HA-Tag (orange). Deletierte Bereiche sind grau gestrichelt dargestellt. Das Rettungsvermögen von Lgd $\Delta$ DM14 2-4 wurde bereits in Dissertation: Tibbe (2019) gezeigt und dient hier zum Vergleich mit Lgd $\Delta$ DM14 3+4, DM14 1-1.

*wg* ist wildtypisch entlang der dorso-ventralen Grenze (D/V-Grenze) in einem zwei Zellen breiten Streifen exprimiert (Abbildung 2.3 A, Pfeilspitze). Hier kann es als direkter Nachweis für die Aktivierung des Notch-Signalwegs genutzt werden. Weitere Notch-unabhängige Expressionsdomänen von *wg* befinden sich kreisförmig um das Flügelfeld und im Notum der Flügelimaginalscheibe (Abbildung 2.3 A, Pfeile und Sternchen; Klein (2001)). Das Reporter-genkonstrukt *Gbe+Su(H)* zeigt ebenfalls die Aktivierung des Notch-

---

Signalwegs entlang der D/V-Grenze und zusätzlich in einem spezifischen Muster in der gesamten Flügelimaginalscheibe an (Abbildung 2.3 A'; Furriols und Bray (2001)).

Durch den Verlust von Lgd (*lgd<sup>d7</sup>*) kommt es zu einer ektopische Aktivierung des Notch-Signalwegs, die durch die Verbreiterung der Expressionsdomäne von *wg* an der D/V-Grenze und die Aktivierung von Gbe+Su(H) in der gesamten Flügelimaginalscheibe sichtbar ist (Abbildung 2.3 B+B', Jaekel und Klein (2006)). Des Weiteren ist eine Überproliferation der Flügelimaginalscheibe zu beobachten.

Die Expression von Lgd rettet den *lgd<sup>d7</sup>* Phänotyp vollständig (Troost et al., 2012). Dies zeigt sich an der normalisierten Expression von *Wg* und Gbe+Su(H) (vgl. Abbildung 2.3 C+C' und A+A'). Auch die Expression von Lgd im sensitivierten Hintergrund führt zur vollständigen Rettung des mutanten Phänotyps. Die Analyse der Flügelimaginalscheiben zeigt ebenfalls *wg* und Gbe+Su(H) in einem wildtypischen Expressionsmusters. (vgl. Abbildung 2.3 D+D' und A+A'). Die Expression eines Lgd-Konstrukts dem die DM14-Domänen zwei bis vier fehlen (Lgd $\Delta$ DM14 2-4), ist ebenfalls in der Lage den *lgd* mutanten Phänotyp zu retten (bereits gezeigt in McMillan et al. (2017); Abbildung 2.3 E+E').

Wird die Expression des Konstrukts im sensitivierten Hintergrund betrachtet, ist eine partielle Rettung festzustellen. Die Larven erreichen das Puppenstadium und in Flügelimaginalscheiben des späten dritten Larvenstadiums ist die *wg*-Expressionsdomäne etwas verbreitert. Zusätzlich ist eine starke ektopische Aktivität des Reportergenkonstrukts Gbe+Su(H) zu erkennen (Abbildung 2.3 F+F', bereits gezeigt in Dissertation: Tibbe (2019)). Wird nun die Anzahl der ersten DM14-Domäne in diesem Lgd-Konstrukt verdoppelt (Lgd $\Delta$ DM14 3+4, DM14 1-1), führt das ebenfalls zur vollständigen Rettung des *lgd* mutanten Phänotyps (Abbildung 2.3 G+G') und zusätzlich zur deutlich verbesserten Rettung des sensitivierten Hintergrundes im Vergleich zur Rettung mit Lgd $\Delta$ DM14 2-4. Die Notch-abhängige Expression von *wg* ist fast vollständig auf die D/V-Grenze beschränkt, das Reportergenkonstrukt Gbe+Su(H) ist jedoch weiterhin ektopisch aktiviert (vgl. Abbildung 2.3 H+H', Pfeilspitze und F+F').

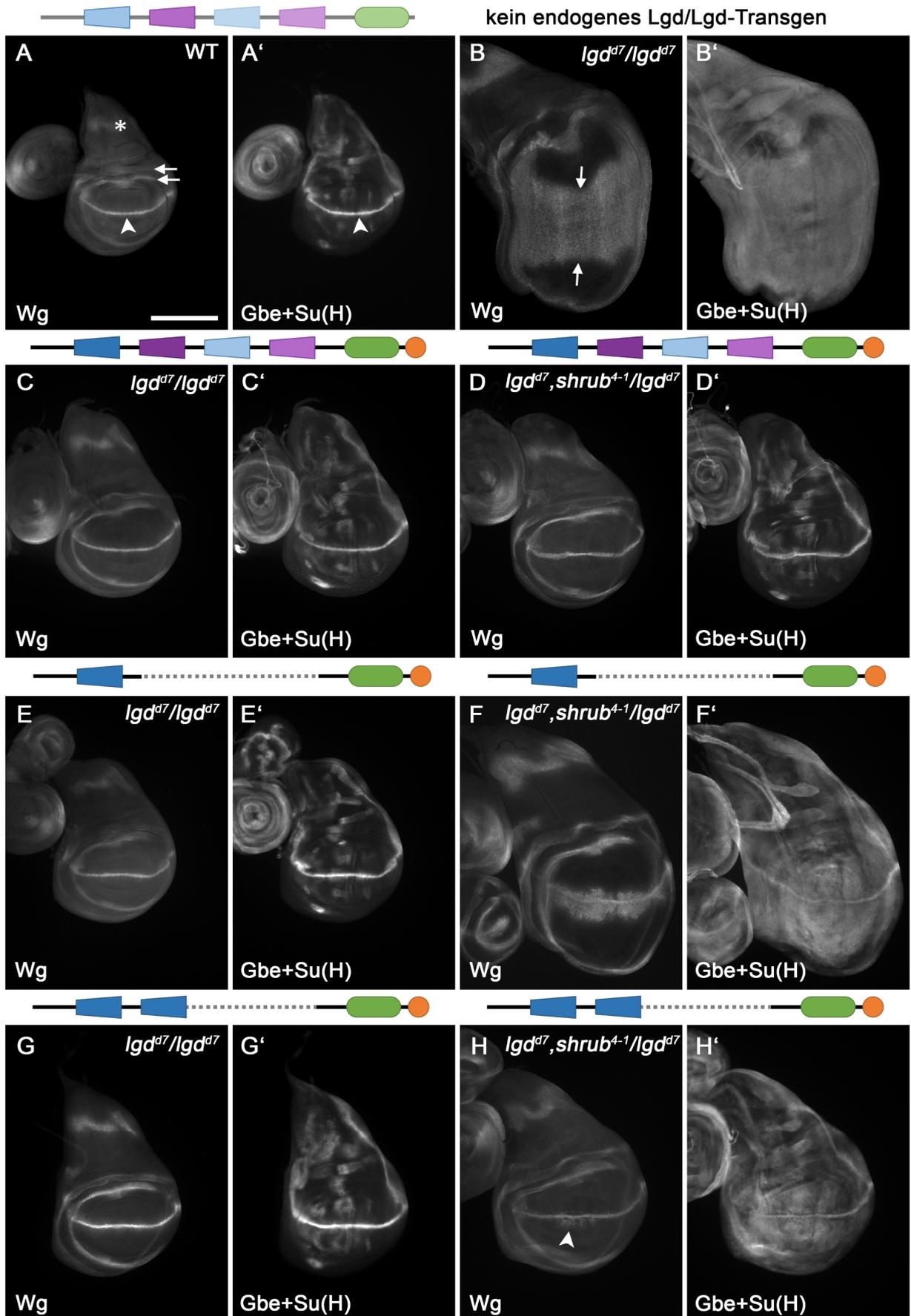


Abbildung 2.3: Rettungsexperiment mit *Lgd*-Deletionskonstrukten zur Analyse der dosisabhängigen Rettung der ersten DM14-Domäne. In C, E und G wird der *lgd* mutante Hintergrund (*lgd*<sup>d7</sup>/*lgd*<sup>d7</sup>) gerettet, D,

F und H zeigen die Rettung im sensitivierten Hintergrund (*lgd<sup>d7</sup>, shrub<sup>4-1</sup>/lgd<sup>d7</sup>*). Oberhalb der Imaginalscheiben sind schematisch die exprimierten Lgd-Konstrukte dargestellt. Die Aktivität des Notch-Signalwegs ist durch Antikörperfärbung gegen Wingless (Wg) dargestellt (A-H). Zusätzlich ist die Aktivität des Notch-Signalwegs über die Expression des sensitiveren Reportergenkonstrukts Gbe+Su(H) gezeigt (A'-H'). A und A' zeigen eine wildtypische Flügelimaginalscheibe. In A ist Wg Notch-abhängig entlang der D/V-Grenze in einem schmalen Streifen exprimiert (Pfeilspitze). Zusätzlich ist es in zwei Kreisen um das Flügelfeld (Pfeile) und in einer Domäne im Bereich des Notums der Flügelimaginalscheibe exprimiert (Sternchen). A' zeigt das wildtypische Expressionsmuster von Gbe+Su(H). Das Reportergenkonstrukt ist entlang der D/V-Grenze (Pfeilspitze) und in einem spezifischen Muster in der restlichen Flügelimaginalscheibe exprimiert. Der Ausfall von *lgd* führt zur starken Verbreiterung der Expressionsdomäne von *wg* (B, Pfeile) und zur Aktivierung von Gbe+Su(H) in jeder Zelle der Flügelimaginalscheibe. Die *lgd* mutanten Flügelimaginalscheiben sind überproliferiert. Die Expression eines vollständigen Lgd-Konstrukts mit HA-Tag führt sowohl im *lgd* mutanten als auch im sensitivierten Hintergrund zur Wiederherstellung der wildtypischen Expression von Wg und Gbe+Su(H) (C-D'). E und E' zeigen die vollständige Rettung des *lgd* mutanten Hintergrundes durch die Expression eines Lgd-Konstrukts ohne DM14-Domänen zwei bis vier. F und F' zeigen die Rettung durch ein Lgd-Konstrukt ohne die DM14-Domänen zwei bis vier im sensitivierten Hintergrund. Es ist noch eine deutliche ektopische Aktivierung des Notch-Signalwegs zu erkennen, jedoch erreichen die Larven das späte dritte Larvenstadium (bereits gezeigt in Dissertation: Tibbe (2019)). G und G' zeigen die vollständige Rettung des *lgd* mutanten Hintergrundes durch ein Lgd-Deletionskonstrukt mit zwei ersten DM14-Domänen. H und H' zeigen die Rettung dieses Konstrukts im sensitivierten Hintergrund. Hier ist noch eine leichte ektopische Aktivierung der Wg-Expression zu erkennen (H, Pfeilspitze). Gbe+Su(H) ist in fast jeder Zelle der Imaginalscheibe aktiv (H'). Der Maßstabsbalken in A für A-H' entspricht 200µm. Die Imaginalscheiben sind so orientiert, dass anterior links und dorsal oben ist.

Wie bereits gezeigt wurde, ist das Vorhandensein einer einzigen ungeradzahligen DM14-Domäne in einem Rettungskonstrukt ausreichend um den Verlust von Lgd zu kompensieren (Dissertation: Tibbe, 2019). Die Rettung des sensitivierten Hintergrundes ist jedoch deutlich stärker, wenn die Anzahl dieser ungeradzahligen DM14-Domänen verdoppelt wird, wenn sie als einzige DM14-Domänen in den Lgd-Rettungskonstrukten vorhanden sind.

Diese Ergebnisse zeigen ebenfalls, dass wie schon für die dritte DM14-Domäne gezeigt, die ungeradzahligen DM14-Domänen wichtig für die vollständige Funktion von Lgd sind und vergleichbar mit der dritten DM14-Domäne auch die Verdoppelung der ersten DM14-Domäne einen positiven Einfluss auf die Rettungsvermögen hat. Die unvollständige Rettung von Lgd mit zwei ersten oder zwei dritten DM14-Domänen im Vergleich zur vollständigen Rettung von Lgd mit erster und dritter DM14-Domäne als einzige DM14-Domänen weist auf eine partielle Redundanz zwischen DM14-1 und DM14-3 hin.

### 2.1.2 Integration der Shrub-bindenden Aminosäuren in geradzahlige DM14-Domänen von Lgd

Wie bereits beschrieben interagieren Lgd und Shrub über elektrostatische Wechselwirkungen des KARR R Motivs in den ungeradzahligen DM14-Domänen miteinander (McMillan et al., 2017). In den geradzahligen DM14-Domänen ist das KARR R Motiv nicht vorhanden. In dieser Arbeit soll herausgefunden werden, ob das KARR R Motiv alleine für die Funktion der DM14-Domänen ausreichend ist und ob es als minimales Shrub-Bindemotiv definiert werden kann.

Um zu überprüfen, ob das KARR R Motiv für die Bindung an Shrub und die vollständige Funktion der DM14-Domäne ausreichend ist, wurde das KARR R Motiv in die nicht Shrub-bindenden geradzahligen DM14-Domänen integriert (Abbildung 2.4 A+B). Es sollte überprüft werden, ob die Integration des KARR R-Motivs ausreicht, um das minimale Rettungsvermögen dieser DM14-Domänen zu erhöhen. Um zu überprüfen, wie sich ein Lgd mit vier potentiellen Shrub-bindenden Motiven verhält, wurde ein Lgd-Konstrukt hergestellt, in welchem das KARR R Motiv in die zweite und vierte DM14-Domäne integriert wurde (Lgd DM14 2+4 KARR R). Zusätzlich dazu wurden auch Deletionskonstrukte mit dieser Integration untersucht. So wurde ein Lgd-Konstrukt ohne die ungeradzahligen DM14-Domänen mit zusätzlicher KARR R Integration in der zweiten und vierten DM14-Domäne untersucht (Lgd $\Delta$ DM14 1+3 DM14 2+4 KARR R). Um das Rettungsvermögen eines Konstrukts nur mit der vierten DM14-Domäne mit KARR R Motiv zu analysieren wurde ein Lgd-Konstrukt ohne die ersten drei DM14-Domänen mit modifizierter vierter DM14-Domäne analysiert (Lgd $\Delta$ DM14 1-3 DM14 4 KARR R). (Abbildung 2.4)

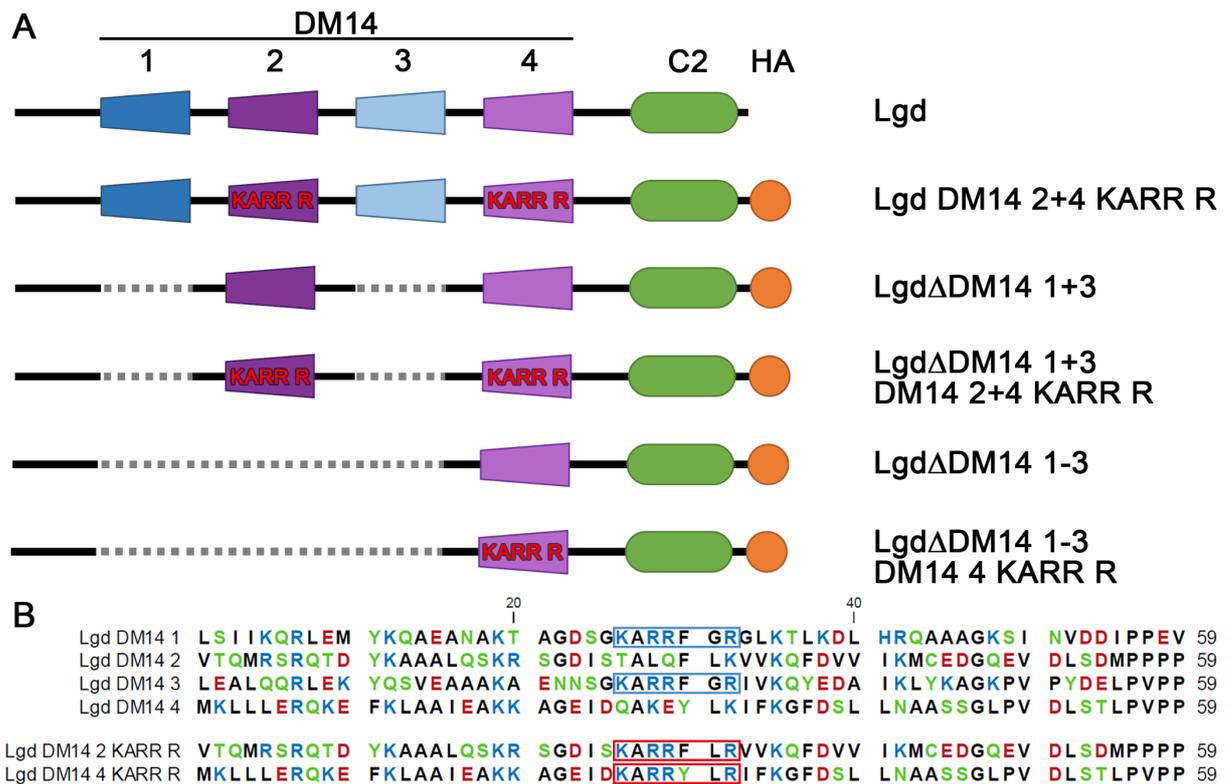


Abbildung 2.4: A: Schematische Darstellung der Lgd-Deletionskonstrukte zur Analyse der Shrub-bindenden Aminosäuren in geradzahlichen DM14-Domänen. DM14-Domänen sind in Blau (ungeradzahlig) und Violett (geradzahlig) dargestellt. Die C2-Domäne ist in Grün dargestellt. Alle Lgd-Transgene besitzen einen HA-Tag (orange). Deletierte Bereiche sind grau gestrichelt dargestellt. DM14-Domänen mit integriertem KARR R Motiv sind mit „KARR R“ gekennzeichnet (rot). B: Sequenzalignment der wildtypischen und modifizierten DM14-Domänen. KARR R Motive, die in den ungeradzahlichen DM14-Domänen vorkommen, sind in blau markiert. Künstlich eingefügte KARR R Motive in den modifizierten DM14-Domänen sind in Rot gekennzeichnet.

Um den Einfluss des KARR R Motivs auf das Oberflächenpotential der DM14-Domänen analysieren zu können, wurden für die wildtypischen und veränderten DM14-Domänen mit Hilfe des AlphaFold2 Algorithmus Strukturvorhersagen gemacht (s. 6.5.1, Jumper et al. (2021); Mirdita et al. (2022)). Die dritte DM14-Domäne, für die eine Kristallstruktur bekannt ist (McMillan et al., 2017), dient als Beispiel für eine Shrub-bindende ungeradzahlige DM14-Domäne. Mit Hilfe des Plugins APBS-electrostatics wurde das Oberflächenpotential von den simulierten Proteinstrukturen der DM14-Domänen berechnet (Jurrus et al., 2018). DM14-3 besitzt an der Spitze der helikalen Haarnadel den basischen Bereich, der über elektrostatische Wechselwirkungen an einen sauren Bereich von Shrub bindet (KARR R, Abbildung 2.5 A+A'). Auch für die zweite und vierte DM14-Domäne werden helikale Haarnadelstrukturen vorhergesagt (Abbildung 2.5 B+D). Das Oberflächenpotential von DM14-2 und DM14-4 unterscheiden sich jedoch deutlich von der dritten DM14-Domäne. Die zweite DM14-Domäne weist eine vergleichsweise

schwach basisch geladene Oberfläche mit zusätzlichen sauren Bereichen an der Spitze der helikalen Haarnadel auf. Die basische Oberfläche von DM14-4 ist sogar noch schwächer ausgeprägt und es wurde noch stärkeres saures Oberflächenpotential berechnet als für DM14-2 (Abbildung 2.5 B'+D').

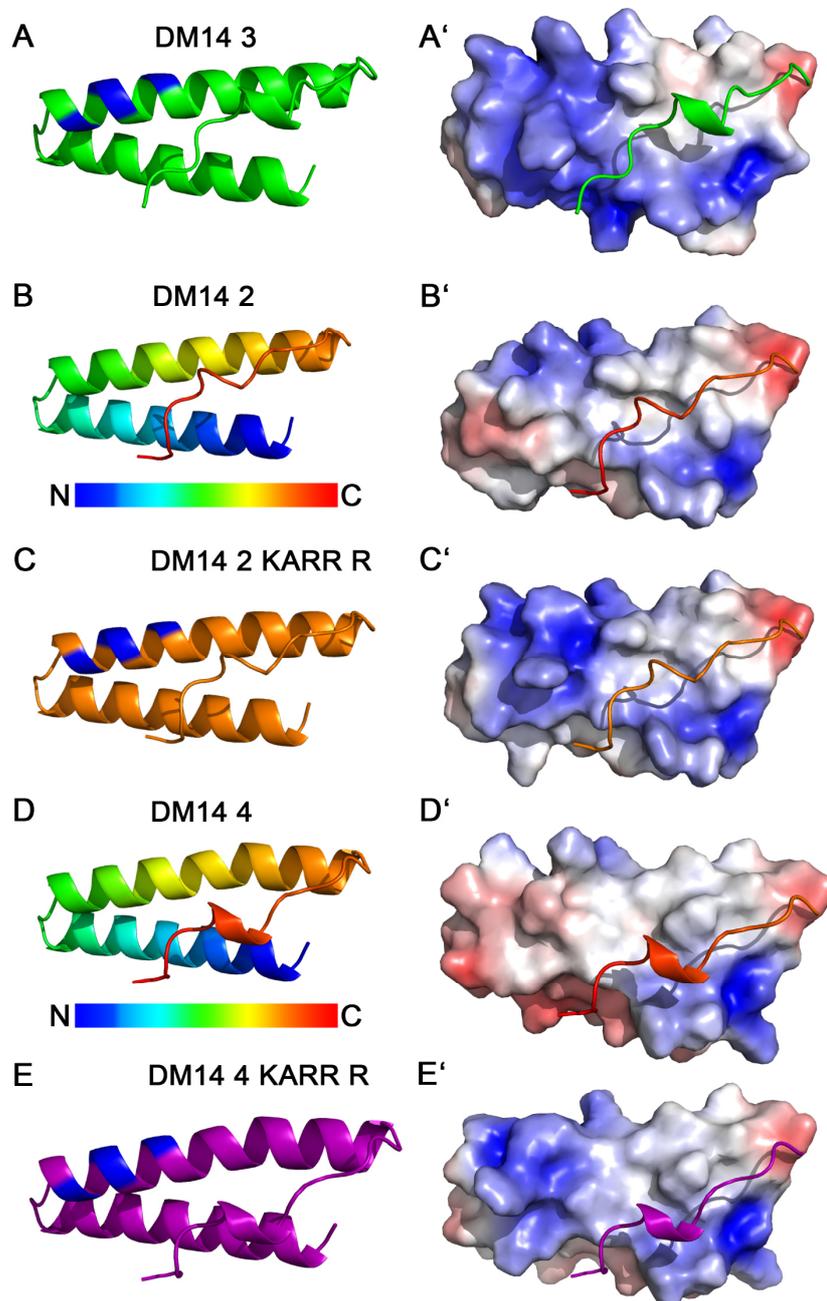


Abbildung 2.5: Die Einführung des KARR R Motivs in die geradzahigen DM14-Domänen ändert das Oberflächenpotential der helikalen Haarnadel. Wie für die dritte DM14-Domäne gezeigt (McMillan et al., 2017), wird für die geradzahigen DM14-Domänen eine helikale Haarnadel mittels AlphaFold2 vorhergesagt (A, B, D). Die dritte DM14-Domäne (grün mit blau markiertem KARR R Motiv, A) besitzt an der Spitze der helikalen Haarnadel ein stark basisches Oberflächenpotential (A'). Dieser Bereich ist in den geradzahigen DM14-Domänen schwächer (bei DM14 2, B') oder nicht vorhanden (bei DM14 4, D'). Für die zweite (B und C, orange) und vierte (D und E, violett) DM14-Domäne wurden helikale Haarnadel Strukturen simuliert (B

und D, die Strukturen sind farblich von N-Terminus (blau) bis C-Terminus (rot) markiert). Das eingeführte KARRR Motiv ist in den DM14-Domänen blau markiert (C, E). Die Einführung von KARRR in die geradzahigen DM14-Domänen führt zur Ausbildung einer stärkeren basischen Oberfläche (C', E'). A'-E': Oberflächenpotential berechnet mit APBS-electrostatics (Jurrus et al., 2018). Rot repräsentiert saure Bereiche, Blau repräsentiert basische Bereiche.

---

Das fehlende basische Oberflächenpotential der geradzahigen DM14-Domänen weist darauf hin, dass die Shrub-Bindung über diese DM14-Domänen unwahrscheinlich ist und konnte auch in bereits veröffentlichten Daten nicht gezeigt werden (McMillan et al., 2017). Dadurch eignen sie sich als strukturell ähnliche Domänen für die Überprüfung, ob durch das Einfügen des KARRR Motivs ein minimales Shrub Bindemotiv definiert werden kann. Das Einfügen des KARRR Motivs in DM14-2 und DM14-4 in den gleichen Sequenzbereich wie in der dritten DM14-Domäne (vgl. Abbildung 2.5 A, C, E blau markierte Bereiche) führt dazu, dass das vorhergesagte Oberflächenpotential dieser modifizierten DM14-Domänen an der Spitze der helikalen Haarnadel deutlich stärker basisch ist (vgl. Abbildung 2.5 B' mit C' und D' mit E').

Die in den Strukturvorhersagen gezeigten Hinweise auf die deutliche Erhöhung der basischen Oberflächenladung könnte die Affinität zu Shrub erhöhen, was möglicherweise einen Einfluss auf die Funktionsweise und damit auf das Rettungsvermögen der geradzahigen DM14-Domänen hat (vgl. Abbildung 2.5 B' und D' mit C' und E').

Der Einfluss der Einführung des KARRR Motivs sollte in Rettungsexperimenten ermittelt werden. Die Einführung der Aminosäuren in die zweite und vierte DM14-Domäne in vollständigem Lgd ändert das Rettungsvermögen des Lgd-Konstrukts nicht. Sowohl der *lgd* mutante Phänotyp, als auch der Phänotyp des sensitivierten Hintergrundes werden durch die Expression vollständig gerettet. Die Aktivierung des Notch-Signalwegs entspricht der wildtypischen Situation. Sowohl Wg als auch Gbe+Su(H) zeigen wildtypische Expressionen (vgl. Abbildung 2.3 A+A' mit Abbildung 2.6 A+A'). Durch die Einführung weiterer Shrub-bindenden Domänen hätte auch ein dominant-negativer Effekt durch die Erhöhung der Affinität zu Shrub auftreten können.

Fehlen in einem Lgd Rettungskonstrukt die ungeradzahigen DM14-Domänen eins und drei (Lgd $\Delta$ DM14 1+3), ist das Rettungsvermögen stark eingeschränkt. Die *wg* Expressionsdomäne an der D/V-Grenze ist deutlich verbreitert (Abbildung 2.6 B, Pfeile) und Gbe+Su(H) ist in allen Zellen der Flügelimaginalscheibe exprimiert (Abbildung 2.6 B'). Die Einführung des Shrub-Bindemotivs KARRR in die geradzahigen DM14-

Domänen verbessert dieses Rettungsvermögen des Lgd-Deletionskonstrukts nicht (Lgd $\Delta$ DM14 1+3, 2+4 KARR R). Wie bei der Rettung durch Lgd $\Delta$ DM14 1+3 ist die *wg*-Expressionsdomäne an der D/V-Grenze verbreitert und Gbe+Su(H) in jeder Zelle aktiv.

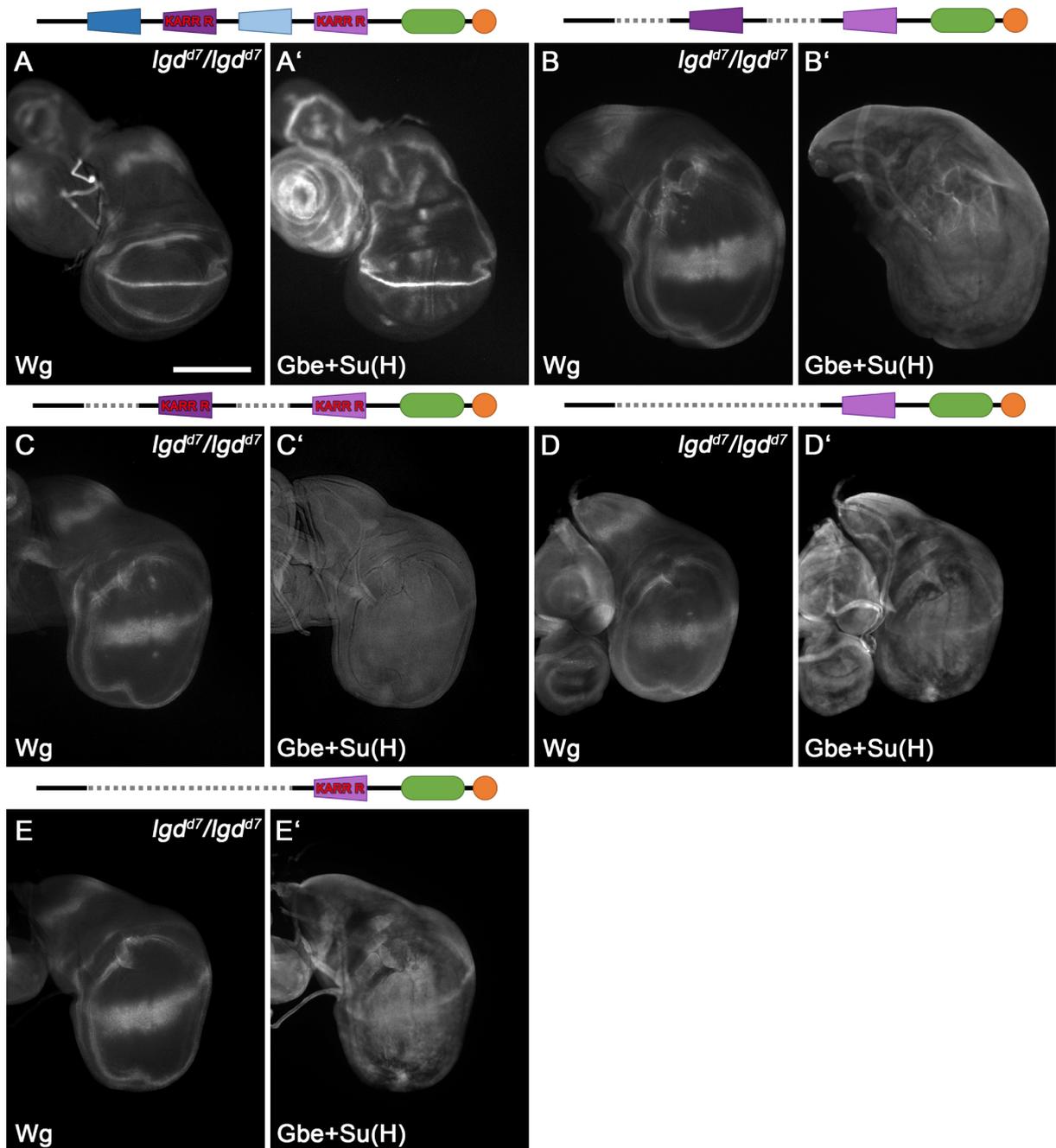


Abbildung 2.6: Rettungsexperimente mit Lgd-Deletionskonstrukten zur Analyse des KARR R Motivs in geradzahigen DM14-Domänen. Oberhalb der Imaginalscheiben sind schematisch die Rettungskonstrukte, die im *lgd* mutanten Hintergrund (*lgd*<sup>d7</sup>/*lgd*<sup>d7</sup>) exprimiert wurden, dargestellt. Die Aktivität des Notch-Signalwegs ist durch Antikörperfärbung gegen Wingless (Wg) dargestellt an (A-E). Zusätzlich ist die Aktivität des Notch-Signalwegs über die Expression des sensitiveren Reportergenkonstrukts Gbe+Su(H) gezeigt (A'-E'). Die Einführung des KARR R Motivs in die geradzahigen DM14-Domänen von vollständigem Lgd verändert das Rettungsvermögen nicht. *wg* zeigt eine wildtypische Expression entlang der D/V-Grenze. Auch Gbe+Su(H) ist wildtypisch exprimiert (A+A'). Fehlen die ungeradzahigen DM14-Domänen in Lgd,

---

führt das zur deutlichen Verschlechterung des Rettungsvermögens. Sowohl Wg-Expression als auch Gbe+Su(H) sind ektopisch aktiviert (B+B'). Die Einführung des KARR R Motivs in die geradzahigen DM14-Domänen dieses Deletionskonstrukts verbessert das Rettungsvermögen nicht (C+C'). Auch das geringe Rettungsvermögen von Lgd $\Delta$ DM14 1-3 lässt sich auch durch die Einführung von KARR R in DM14-4 nicht verbessern. Sowohl die Wg-Expression als auch Gbe+Su(H) sind ektopisch aktiviert (D-E'). Der Maßstabsbalken in A entspricht 200 $\mu$ m. Die Imaginalscheiben sind so orientiert, dass anterior links und dorsal oben ist.

---

Um zusätzlich zu überprüfen, ob die Einführung des KARR R Motivs dieses Rettungsvermögen einer einzelnen geradzahigen DM14-Domäne verbessern kann, wurden die Rettungsvermögen eines Lgd-Transgens, in dem nur die vierte DM14-Domäne vorhanden ist, analysiert (Lgd $\Delta$ DM14 1-3). Das Rettungsvermögen ist mit und ohne Shrub-Bindemotiv vergleichbar und nur minimal (vgl. Abbildung 2.5 D+D' mit E+E'). Die Wg-Expression an der D/V-Grenze ist verbreitert und Gbe+Su(H) ist in allen Zellen der Flügelimaginalscheibe aktiv (Abbildung 2.6 D-E').

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass das geringe Rettungsvermögen von Lgd-Konstrukten, die nur geradzahige DM14-Domänen besitzen, nicht durch die Einführung des KARR R Motivs verbessert werden kann und somit KARR R nicht als minimales Shrub-Bindemotiv definiert werden kann. Das KARR R Motiv ist also für die Bindung an Shrub essentiell, reicht jedoch alleine nicht für die vollständige Funktion der DM14-Domäne aus. Die ungeradzahigen DM14-Domänen müssen also noch weitere Eigenschaften besitzen, die für die Bindung an Shrub benötigt werden, die die geradzahigen DM14-Domänen nicht besitzen.

### **2.1.3 Integration der Interaktionshelix von DM14-3 in DM14-4**

Die dritte DM14-Domäne bildet eine zentralen helikalen Haarnadel aus (McMillan et al., 2017). Diese lässt sich in die Interaktionshelix mit den Shrub-bindenden Aminosäuren und die nicht interagierende Helix aufteilen. Da die Integration des KARR R Motivs in die geradzahigen DM14-Domänen ihr Rettungsvermögen nicht erhöht hat und als minimales Shrub-Bindemotiv nicht ausreichte, sollten nun weitere Hinweise auf mögliche Eigenschaften der ungeradzahigen DM14-Domänen gesammelt werden. Hierfür wurde eine Hybrid-DM14-Domäne erstellt, indem die gesamte Interaktionshelix der dritten DM14-Domäne inklusive des Bereichs, der den Loop zwischen den beiden Helices ausbildet, an entsprechender Stelle in die vierte DM14-Domäne integriert wurde (Abbildung 2.7 A+B) Der N- und C-Terminus der Hybrid-DM14-Domäne ist ebenfalls aus

DM14-4. Hierdurch kann untersucht werden, ob sich weitere, für die Bindung benötigte, Bereiche in der Interaktionshelix befinden.

Für Rettungsexperimente wurde ein Lgd-Deletionskonstrukt verwendet, in dem die Hybrid-DM14-Domäne die einzige DM14-Domäne darstellt (Abbildung 2.7 A, Lgd $\Delta$ DM14 1-3 4 Helix 3). Als Kontrolle dient ein Lgd-Konstrukt, welches die vierte DM14-Domäne als einzige DM14-Domäne besitzt (Abbildung 2.7 A, Lgd $\Delta$ DM14 1-3).

Die hergestellten Lgd-Varianten wurden strukturell untersucht. Hierfür wurden Strukturvorhersagen mit Alphafold2 durchgeführt (s. 6.5.1, Jumper et al. (2021); Mirdita et al. (2022)). Die dritte DM14-Domäne bildet wie bereits gezeigt eine helikale Haarnadel aus. Die Interaktionshelix die basischen Aminosäuren die Shrub binden (Abbildung 2.7 C, violette Helix mit blau markierten KARR R Motiv). Die nicht interagierende Helix liegt dieser gegenüber (Abbildung 2.7 C, orange).

Das KARR R Motiv wird mit der Interaktionshelix aus der dritten DM14-Domäne in die vierte DM14-Domäne eingeführt (Abbildung 2.7 B, Abbildung 2.7 D, violett mit blau markiertem KARR R Motiv). In der Strukturvorhersage bildet die eingefügte Interaktionshelix aus der dritten DM14-Domäne erneut mit der nicht interagierenden Helix der vierten DM14-Domäne eine helikale Haarnadel. Die für die Shrub-Bindung notwendigen Aminosäuren sind hierbei in die gleiche Richtung orientiert, wie in der dritten DM14-Domäne (Abbildung 2.7 D').

Die Berechnung des Oberflächenpotentials (durch APBS-electrostatics, Jurrus et al. (2018)) zeigt die basische Oberfläche der dritten DM14-Domäne, die für die Interaktion mit Shrub benötigt wird (McMillan et al. (2017); Abbildung 2.7 C'). Durch die Integration der Interaktionshelix DM14-4 ist eine deutliche Zunahme des basischen Oberflächenpotentials an der Spitze der helikalen Haarnadel zu erkennen, was sie ähnlicher zu DM14-3 macht (vgl. Abbildung 2.7 E mit E').

Die strukturelle Analyse der simulierten Strukturen gibt einen Hinweis darauf, dass die Interaktionshelix der dritten DM14-Domäne so in die vierte DM14-Domäne integriert ist, wie sie es auch in der dritten DM14-Domäne der Fall ist. Das Oberflächenpotential der vierten DM14-Domäne an der Spitze der helikalen Haarnadel wird deutlich basischer. Diese basische Oberfläche und das integrierte KARR R Motiv könnte die Bindung an Shrub vermitteln, was in Rettungsexperimenten überprüft wurde.

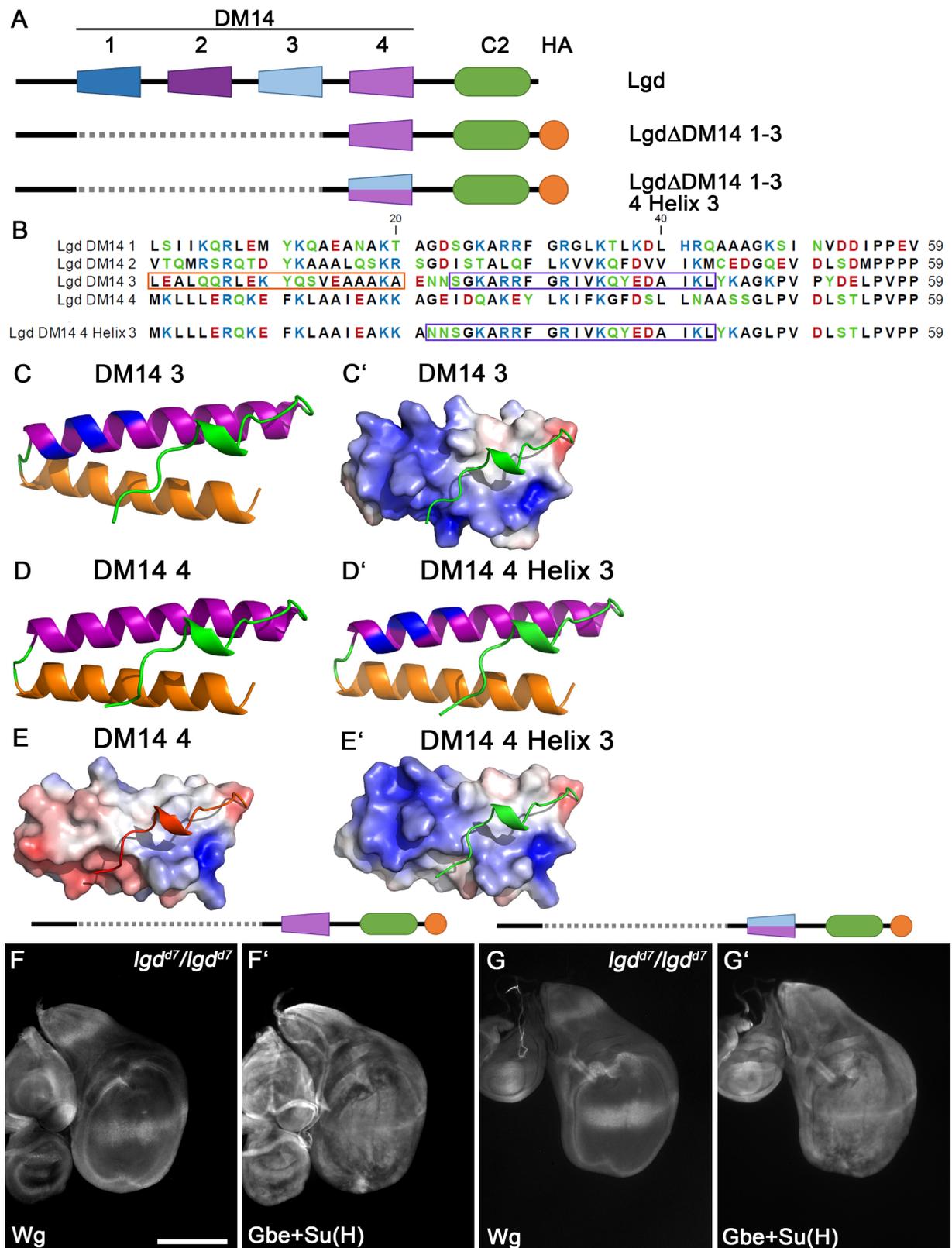


Abbildung 2.7 A: Schematische Darstellung der analysierten Lgd-Rettungskonstrukte zur Analyse der Integration der Interaktionshelix von DM14-3 in DM14-4. DM14-Domänen sind in Blau (ungeradzahlig) und Violett (geradzahlig) dargestellt. Die C2-Domäne ist in Grün dargestellt. Alle Lgd-Transgene besitzen einen HA-Tag (orange). Deletierte Bereiche sind grau gestrichelt dargestellt. DM14-Domänen, in die die Interaktionshelix integriert wurde, sind zweifarbig dargestellt. B: Sequenzalignment der wildtypischen und modifizierten DM14-Domänen. Aminosäuren der Interaktionshelix sind violett markiert und Aminosäuren

der nicht interagierenden Helix in orange. C-E': Strukturelle Untersuchung der Integration der Interaktionshelix aus DM14-3 in DM14-4. Die Strukturen der modifizierten DM14-Domänen wurden mittels Alphafold2 vorhergesagt. Das KARR R Motiv der Interaktionshelix der dritten DM14-Domäne ist in Blau dargestellt (C, D'). Alphafold2 sagt die Struktur der Integration der Interaktionshelix in die vierte DM14-Domäne wie für die wildtypische vierte DM14-Domäne als helikale Haarnadel voraus (D+D'). Durch die Integration der Interaktionshelix der dritten DM14-Domäne wird in die vierte DM14-Domäne ein basisches Oberflächenpotential eingefügt, was mit APBS-electrostatics berechnet wurde (Juruss et al., 2018). Blau repräsentiert hierbei basische und Rot saure Bereiche (E+E'). F-G': Rettungsexperimente mit Lgd-Konstrukten, in denen die Interaktionshelix der dritten DM14-Domäne in die vierte integriert wurde. Oberhalb der Imaginalscheiben sind schematisch die Rettungskonstrukte, die im *lgd* mutanten Hintergrund (*lgd<sup>d7</sup>/lgd<sup>d7</sup>*) exprimiert wurden, dargestellt. Die Aktivität des Notch-Signalwegs ist durch Antikörperfärbung gegen Wingless (Wg) dargestellt (F+G). Zusätzlich ist die Aktivität des Notch-Signalwegs über die Expression des sensitiveren Reportergenkonstrukts Gbe+Su(H) gezeigt (F'+G'). Lgd in dem nur die vierte DM14-Domäne vorhanden ist zeigt nur ein sehr schwaches Rettungsvermögen. Wg und Gbe+Su(H) sind ektopisch aktiviert (F+F'). Die Integration der Interaktionshelix aus der dritten DM14-Domäne in die vierte DM14-Domäne verbessert das Rettungsvermögen des Lgd-Konstrukts, in dem nur die vierte DM14-Domäne vorhanden ist nicht. Sowohl die Wg-Expression als auch Gbe+Su(H) sind ektopisch aktiviert (G+G'). Der Maßstabsbalken in F für F-G' entspricht 200µm. Die Imaginalscheiben sind so orientiert, dass anterior links und dorsal oben ist.

Die Rettungsexperimente mit der Lgd-Variante, die die Hybrid-DM14-Domäne aus DM14- und DM14-4 besitzt zeigen, dass das Rettungsvermögen des Konstrukts nicht gegenüber der Kontrolle erhöht wurde. Ähnlich wie bei der Rettung eines Lgd, welches nur die vierte DM14-Domäne besitzt, ist auch durch die Einführung der Interaktionshelix nur eine sehr schwache Rettung des *lgd* mutanten Phänotyps nachweisbar. In den überproliferierten Flügelimaginalscheiben ist die *wg* Expressionsdomäne an der D/V-Grenze stark verbreitert und Gbe+Su(H) ist in fast jeder Zelle aktiv (vgl. Abbildung 2.7 F+F' mit Abbildung 2.7 G+G').

Während der strukturellen Analysen der DM14-Domänen ist aufgefallen, dass sich in den nicht interagierenden Helices der DM14-Domänen Aminosäuren befinden, die die Ausrichtung der Interaktionshelix sterisch beeinflussen könnten. Hierbei könnten Aminosäuren, die der Interaktionshelix gegenüberstehen durch ihre Größe oder Ladung die Konformation der Interaktionshelix oder der Aminosäuren, die für die Interaktion mit Shrub benötigt werden, beeinflussen. In der vierten DM14-Domäne befindet sich in dem Äquivalent der nicht interagierenden Helix an Position 506 ein Glutamin (Q506), welches in Richtung der zweiten Helix orientiert ist (Abbildung 2.8 A, pink markierter Aminosäurerest, D, pink markierte Aminosäure). In LgdΔDM14 1-3 4 Helix 3 befindet sich die Interaktionshelix gegenüber dieser Aminosäure (Abbildung 2.8 A, pink markierter Aminosäurerest). Da sich in der dritten DM14-Domäne an gleicher Position ein Leucin befindet (L369, Abbildung 2.8 B, pink markierter Aminosäurerest; D, pink markierte

Aminosäure), wurde das Glutamin in der nicht interagierenden Helix der Hybrid-DM14-Domäne an Position 506 gegen Leucin getauscht (Abbildung 2.8 A' pink markierte Aminosäurerest, C: Lgd $\Delta$ DM14 1-3 4 Helix 3 Q506L). Die Größenänderung bei diesem Aminosäureaustausch und die Einführung der hydrophoben Eigenschaft des Leucins in Q506L könnte einen Einfluss auf die Ausrichtung der Interaktionshelix haben, was durch Rettungsexperimente überprüft wurde. Der Austausch der Glutamins506 zu Leucin in Lgd $\Delta$ DM14 1-3 4 Helix 3 Q506L verbessert das Rettungsvermögen der vierten DM14-Domäne mit der Interaktionshelix der dritten DM14-Domäne jedoch nicht. Es ist eine ektopische Aktivierung der Wg Expression an der D/V-Grenze zu erkennen und Gbe+Su(H) ist in fast jeder Zelle der Flügelimaginalscheibe aktiv (Abbildung 2.8 E-F').

Parallel dazu wurde auch der Einfluss des Leucins369 in der dritten DM14-Domäne analysiert. L369 ist in der nicht interagierenden Helix der dritten DM14-Domäne in Richtung der Interaktionshelix ausgerichtet (Abbildung 2.8 B, pink markierter Aminosäurerest; D, pink markierte Aminosäure). Lgd, in dem die ersten beiden DM14-Domänen fehlen (Lgd $\Delta$ DM14 1+2), kann den *lgd* mutanten Hintergrund vollständig retten (Abbildung 2.8 G+G', Troost et al. (2012)). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass auch einzelne Mutationen in Aminosäuren der dritten DM14-Domäne zum Verlust des Rettungsvermögens von Lgd-Varianten führen können (Dissertation: Tibbe, 2019). In einem Rettungsexperiment wurde der sterische Einfluss durch die Größe der Aminosäure L369 überprüft, indem sie in die deutlich kleinere Aminosäure Alanin getauscht wurde (Lgd $\Delta$ DM14 1+2 L369A). Das Rettungsvermögen von Lgd $\Delta$ DM14 1+2 wird durch den Austausch (L369A) nicht verschlechtert. Lgd $\Delta$ DM14 1+2 L369A rettet den Phänotyp des *lgd* mutanten Hintergrundes vollständig (Abbildung 2.8 H+H'). Die Expression von Wg und die Aktivierung von Gbe+Su(H) sind wildtypisch. Auch die Rettung des sensitivierten Hintergrundes durch diese beiden Lgd-Varianten ist vergleichbar (nicht gezeigt).

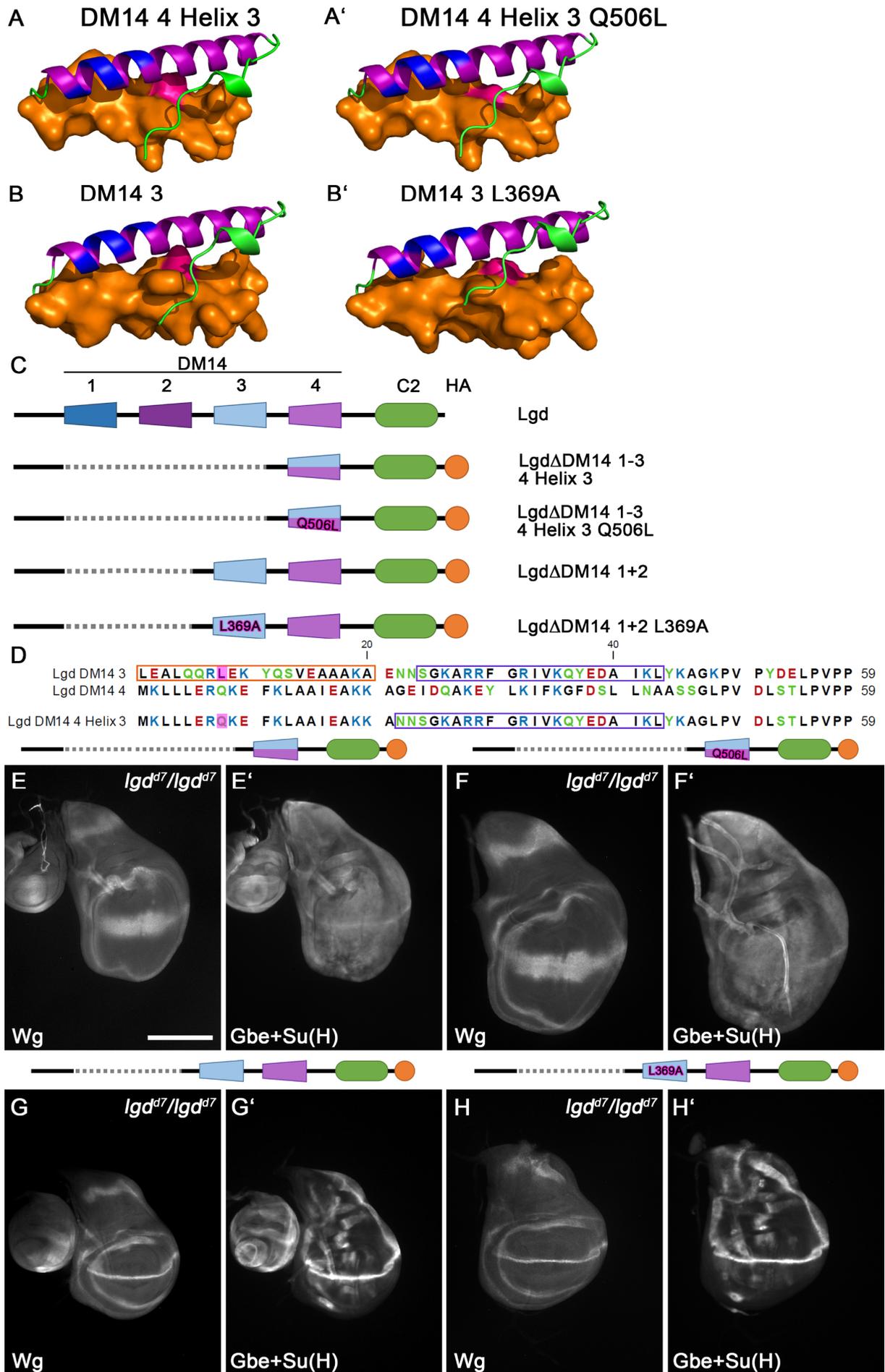


Abbildung 2.8: A-B': Strukturelle Untersuchung der Integration der Interaktionshelix aus DM14-3 in DM14-4 und der Einfluss von Aminosäuren der nicht interagierenden Helix auf die Interaktionshelix. Die Strukturen der modifizierten DM14-Domänen wurden mittels AlphaFold2 vorhergesagt. Das KARR R Motiv in der Interaktionshelix der dritten DM14-Domäne ist in DM14-3 und DM14-4 Helix 3 in Blau dargestellt (A-B'). Wird die nicht interagierende Helix der vierten DM14-Domäne betrachtet, ist an Position 506 ein Glutamin zu erkennen was in Richtung des Äquivalents der Interaktionshelix ausgerichtet ist (Q506, A, pink markierte Aminosäurerest). Der Austausch zu Leucin verringert die Größe der Aminosäure (Q506L, A', pink markierte Aminosäurerest). In der dritten DM14-Domäne befindet sich an der gleichen Position im nicht interagierenden Helix ein Leucin, was in Richtung der Interaktionshelix ausgerichtet ist (L369, B, pink markierte Aminosäurerest). Durch den Austausch zu Alanin wird die Größe der Aminosäure an dieser Position deutlich reduziert (L369A, B', pink markierte Aminosäurerest). C: Schematische Darstellung der analysierten Lgd-Rettungskonstrukte zur Analyse der Integration der Interaktionshelix von DM14-3 in DM14-4. DM14-Domänen sind in Blau (ungeradzahlig) und Violett (geradzahlig) dargestellt. Die C2-Domäne ist in Grün dargestellt. Alle Lgd-Transgene besitzen einen HA-Tag (orange). Deletierte Bereiche sind grau gestrichelt dargestellt. DM14-Domänen, in die die Interaktionshelix integriert wurde, sind zweifarbig dargestellt. Aminosäuren, die zusätzlich mutiert wurden sind in Pink markiert. Lgd $\Delta$ DM14 1-3 4 Helix 3 besitzt die Interaktionshelix der dritten DM14-Domäne. In Lgd $\Delta$ DM14 1-3 4 Helix 3 Q506L ist das Glutamin506 in Leucin getauscht. Lgd ohne die ersten beiden DM14-Domänen dient als Kontrolle (Lgd $\Delta$ DM14 1+2, (Troost et al., 2012)). In Lgd $\Delta$ DM14 1+2 L369A ist das Leucin369 zu Alanin getauscht. D: Sequenzalignment der modifizierten DM14-Domänen. Aminosäuren der Interaktionshelix sind violett markiert und Aminosäuren der nicht interagierenden Helix in Orange dargestellt. Die in den Rettungskonstrukten veränderten Aminosäuren sind im Alignment pink markiert. E-H': Rettungsexperimente mit Lgd-Konstrukten, in denen die Interaktionshelix der dritten DM14-Domäne in die vierte integriert wurde. Oberhalb der Imaginalscheiben sind schematisch die Rettungskonstrukte, die im *lgd* mutanten Hintergrund (*lgd<sup>dl7</sup>/lgd<sup>dl7</sup>*) exprimiert wurden, dargestellt. Die Aktivität des Notch-Signalwegs ist durch Antikörperfärbung gegen Wingless (Wg) dargestellt (E-H). Zusätzlich ist die Aktivität des Notch-Signalwegs über die Expression des sensitiveren Reportergenkonstrukts Gbe+Su(H) gezeigt (E'+H'). Lgd in dem die Interaktionshelix der dritten DM14-Domäne in die vierte integriert wurde, kann den Phänotyp des *lgd* mutanten Hintergrundes nicht retten. Wg und Gbe+Su(H) sind ektopisch aktiviert (E+E'). Der Austausch von Glutamin506 zu Leucin in diesem Konstrukt verbessert das Rettungsvermögen nicht (F+F'). Lgd ohne die ersten beiden DM14-Domänen kann den *lgd* mutanten Hintergrund vollständig retten (G+G', Troost et al. (2012)). Der Austausch von Leucin369 zu Alanin verschlechtert dieses Rettungsvermögen nicht (H+H'). Sowohl die Wg Expression als auch Gbe+Su(H) sind wildtypisch. Der Maßstabsbalken in E für E-H' entspricht 200 $\mu$ m. Die Imaginalscheiben sind so orientiert, dass anterior links und dorsal oben ist.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Einführung der Interaktionshelix der dritten DM14-Domäne in die vierte DM14-Domäne das schwache Rettungsvermögen der vierten DM14-Domäne nicht verbessern kann. Auch führen die hier untersuchten Änderungen in der nicht interagierenden Helix nicht zu einem verändertem Rettungsvermögen von Lgd Konstrukten. Die Aktivität der ungeradzahlig DM14-Domänen scheinen durch sehr spezifische Interaktionen mit Shrub gekennzeichnet zu sein, die durch die hier vorgenommenen Veränderungen in den geradzahlig DM14-Domänen nicht nachgeahmt werden können.

#### 2.1.4 Analyse der Aminosäuren 558-664 in Lgd

Die Aminosäuren 558-664 von Lgd sind der Bereich zwischen der vierten DM14-Domäne und der C2-Domäne von Lgd. Die Sequenz dieses Bereichs besitzt keine Sequenzhomologie zu bekannten funktionellen Domänen, wodurch bei Datenbankabfragen keine vorhergesagte funktionelle Domäne für diesen Bereich angegeben werden konnte. Für diesen Bereich war zu Beginn der Analysen keine Funktion bekannt. Ein Lgd-Konstrukt ohne diesen Aminosäurebereich (Lgd $\Delta$ 558-664) zeigt jedoch ein stark eingeschränktes Rettungsvermögen im *lgd* mutanten Hintergrund (AG Klein, unveröffentlicht, Abbildung 2.11 B+B'). In dieser Arbeit sollen Hinweise für die Funktion dieses Bereichs gesammelt werden.

Zu Beginn der Analysen war auch die Struktur dieses Aminosäurebereichs 558-664 nicht bekannt, weshalb eine Analyse einer vorhergesagten Struktur für diesen Bereich durchgeführt wurde. Hierbei wurde I-Tasser für die Vorhersage der Struktur verwendet (Yang et al., 2015b). Die Vorhersage ergab, wie die hier gezeigte durch AlphaFold2 vorhergesagte Struktur, eine helikale Haarnadel mit einer weiteren kleinen Helix und flexiblen Teilen (Abbildung 2.9 A). Die helikale Haarnadelstruktur konnte mit hoher Wahrscheinlichkeit vorhergesagt werden (Abbildung 2.9 A'). Zeitgleich zu diesen Analysen bestätigten Ventimiglia und Kollegen die Struktur dieses Bereichs als helikale Haarnadel durch die Veröffentlichung der Kristallstruktur des Bereichs 558-664 inklusive der C2-Domäne und dem C-Terminus für *Drosophila* Lgd (Ventimiglia et al., 2018).

Da der Bereich 558-664 eine helikale Haarnadel ausbildet (Abbildung 2.9 A-B'), war eine Idee, dass es sich hierbei um eine nicht beschriebene DM14-Domäne handelt, die aufgrund von zu starken Sequenzunterschieden zu bekannten DM14-Domänen nicht durch Datenbanken vorhergesagt wurde. Die Analyse des Oberflächenpotentials der helikalen Haarnadelstruktur des Aminosäurebereichs 558-664 zeigt jedoch keinen auffälligen basischen Bereich, wie ihn die, mit Shrub interagierenden, ungeradzahligen DM14-Domänen besitzen (vgl. Abbildung 2.9 B mit B'' (rote Ellipsen)). Die Reduktion der Funktion von Lgd aufgrund reduzierter Interaktion mit Shrub ist nicht ausgeschlossen. Eine Interaktion zwischen Lgd und Shrub ist über den Aminosäurebereich 558-664 aufgrund der fehlenden basischen Oberfläche auf die bereits beschriebene Weise über elektrostatische Wechselwirkungen (McMillan et al., 2017) jedoch unwahrscheinlich.

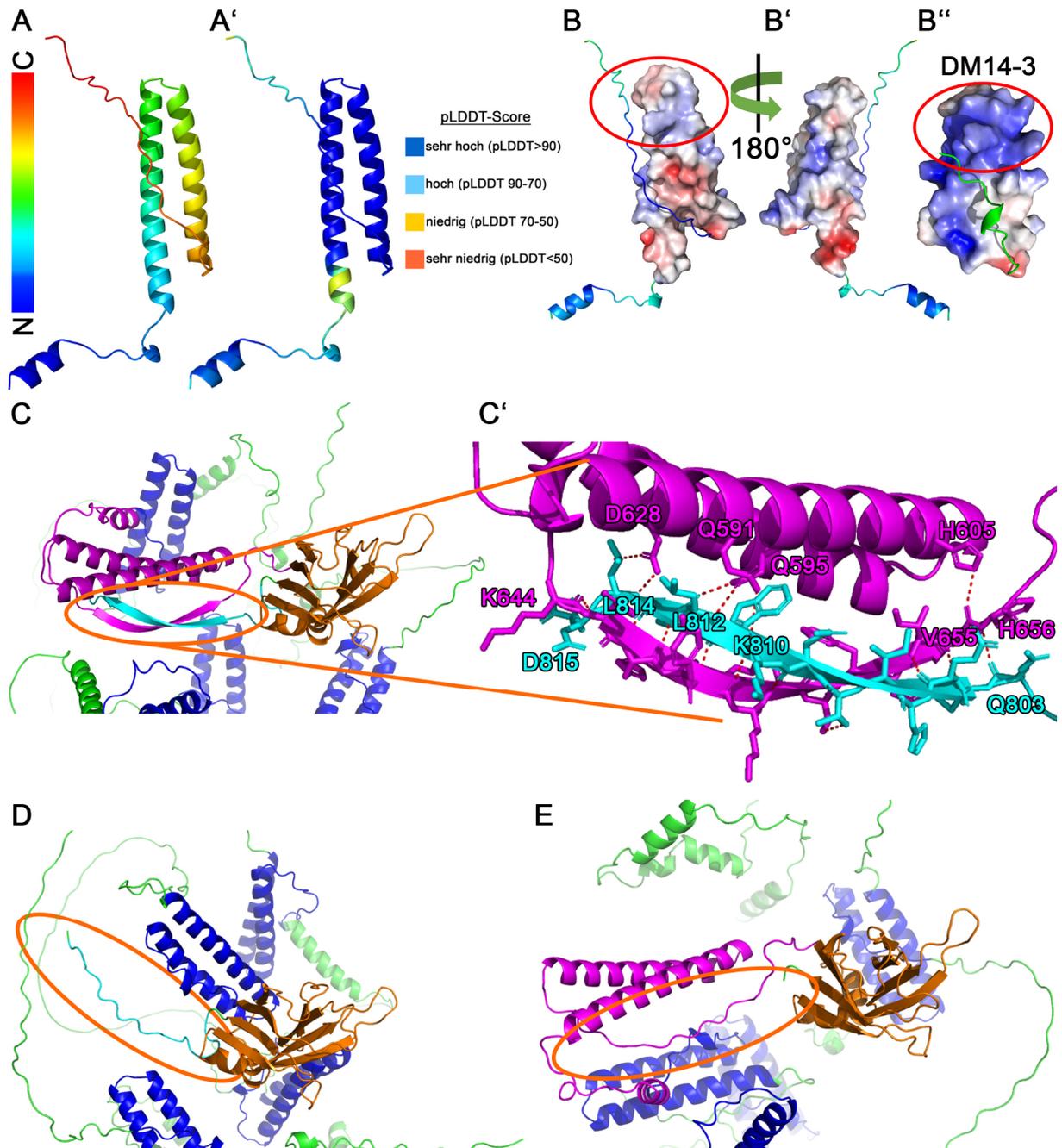


Abbildung 2.9: Strukturelle Analyse des Aminosäurebereichs 558-664 in Lgd. Die Struktur des Aminosäurebereichs 558-664 wird durch AlphaFold2 als helikale Haarnadel vorhergesagt (A, die Struktur ist farblich von N-Terminus (blau) bis C-Terminus (rot) markiert). Fast die gesamte Struktur wird mit hoher Wahrscheinlichkeit angegeben (A': pLDDT-Score: Blau entspricht sehr hoch (>90), Cyan 90-70, Gelb 70-50 und Orange <50). Die simulierte helikale Haarnadel zeigt keine auffälligen basischen Bereiche im Oberflächenpotential, wie es die Shrub-bindenden DM14 Domänen besitzen (B+B'', rote Ellipsen). Zum Vergleich ist das Oberflächenpotential der Shrub-bindenden DM14-3 dargestellt (B-B'', Berechnung mit APBS-electrostatics, Blau repräsentiert basische und Rot saure Bereiche). In C-E sind Ausschnitte der vollständigen vorhergesagten Struktur von Lgd dargestellt. Die DM14-Domänen sind in Blau, Die C2-Domäne in Orange, die Aminosäure 558-664 in Magenta und der C-Terminus in Cyan dargestellt. Die restlichen Bereiche sind in Grün dargestellt. Es ist eine Integration des C-Terminus in einen Bereich, der außerhalb der helikalen Haarnadel des Bereichs 558-664 liegt, zu erkennen. Es entsteht ein antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt durch die Interaktion von Lysin644-Histidin656 (K644, H656) mit Glutamin803-

---

Asparaginsäure815 (Q803, D815) (C, orange Markierung). Die Interaktionen von Glutamin591 (Q591), Glutamin595 (Q595) und Asparagin628 (D628) der helikalen Haarnadel mit Lysin810 (K810), Leucin812 (L812) und Leucin814 (L814) des antiparallelen  $\beta$ -Faltblatts und die Interaktion zwischen Histidin605 (H605) und Valin655 (V655) richten das  $\beta$ -Faltblatt zur helikalen Haarnadel spezifisch aus. Ausgebildete Bindungen sind mit rot gestrichelten Linien dargestellt. Sowohl durch das Fehlen des C-Terminus, als auch des Bereichs 558-664 kommt diese Interaktion nicht zustande (D+E, orange Markierung). Die Ergebnisse der Simulation in C' wurden auch schon in Ventimiglia et al. (2018) gezeigt.

---

Um den Grund für das reduzierte Rettungsvermögen weiter zu untersuchen, wurde in der mit Alphafold2 simulierten Struktur von vollständigem Lgd der Aminosäurebereich 558-664 analysiert. Der Ausschnitt, in dem die helikale Haarnadel des Aminosäurebereichs 558-664 dargestellt ist, zeigt eine Interaktion mit dem C-Terminus (Abbildung 2.9 C, orange Markierung). Die Integration des C-Terminus in den Bereich 558-664 geschieht über die Bindung zwischen Lysin644 bis Histidin656 mit den Aminosäuren Glutamin803 bis Asparagin815 des C-Terminus. Durch mehrere Bindungen entsteht ein antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt. Die Interaktionen von Glutamin591, Glutamin595 und Asparagin628 der helikalen Haarnadel mit Lysin810, Leucin812 und Leucin814 des antiparallelen  $\beta$ -Faltblatts und die Interaktion zwischen Histidin605 und Valin655 führt dazu, dass die helikale Haarnadel zu dem  $\beta$ -Faltblatt in einer festen Position ausgerichtet wird (Abbildung 2.9 C', bereits gezeigt in Ventimiglia et al. (2018)). Sowohl in einem Lgd-Konstrukt ohne Aminosäurebereich 558-664 als auch in einem Lgd-Konstrukt ohne C-Terminus ist diese Interaktion nicht möglich (Abbildung 2.9 C+D, orange Markierung).

Um die Auswirkung der fehlenden Integration *in vivo* zu untersuchen, wurden die Lgd-Konstrukte in Abbildung 2.10 hergestellt. Die Aminosäuren 558-664 wurden zunächst durch einen flexiblen Linker (LAP=Localization and Affinity Purification Tag) ersetzt und somit einen gewissen Abstand zwischen der vierten DM14-Domäne und der C2-Domäne zu gewährleisten, jedoch ohne eine besondere strukturegebende Domäne einzufügen (Abbildung 2.10, Lgd LAP statt 558-664). Da die Analyse der vollständigen Struktur von Lgd eine Integration des C-Terminus in den Bereich zwischen DM14-4 und der C2-Domäne gezeigt hat, wurde auch die Auswirkung des Entfernens der letzten 20 Aminosäuren des C-Terminus überprüft (Abbildung 2.10, Lgd $\Delta$ C).

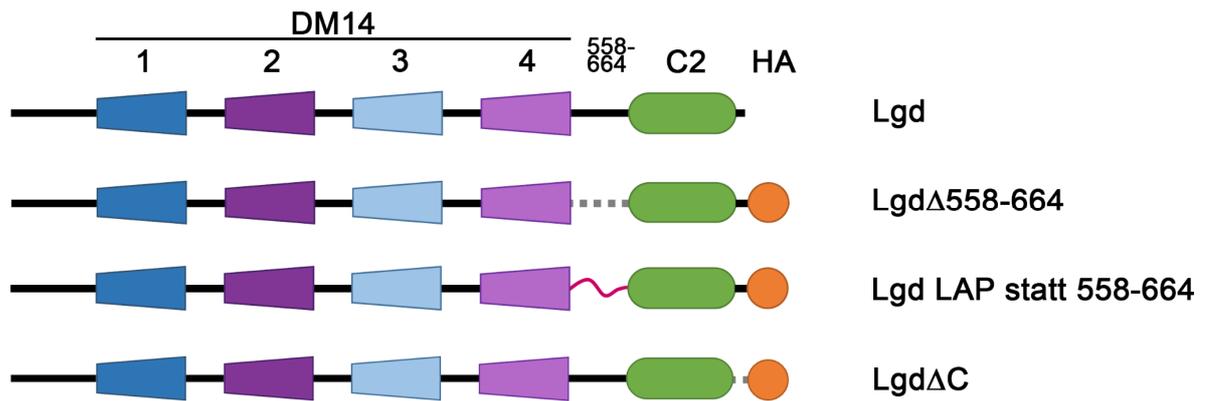


Abbildung 2.10: Schematische Darstellung der Lgd-Konstrukte für die Rettungsexperimente zur Analyse der Aminosäuren 558-664 in Lgd. Der Aminosäurebereich 558-664 stellt die Verbindung zwischen der vierten DM14-Domäne und der C2-Domäne dar. DM14-Domänen sind in Blau (ungeradzahlig) und Violett (geradzahlig) dargestellt. Die C2-Domäne ist in Grün dargestellt. Alle Lgd-Transgene besitzen einen HA-Tag (orange). Deletierte Bereiche sind grau gestrichelt dargestellt. Der eingefügte LAP-Tag ist als rote Linie dargestellt.

Das Fehlen des Aminosäurebereichs 558-664 führt zu keinem klar nachweisbaren Rettungsvermögen eines ansonsten vollständigen Lgd-Konstrukts (Abbildung 2.11 B+B'). Die ektopische Aktivierung des Notch-Signalwegs ist fast so stark wie bei Ausfall von Lgd (Abbildung 2.11 C+C'). Die ektopische Aktivierung des Notch-Signalwegs ist sogar stärker, als in einem Rettungsexperiment mit Lgd, ohne die Shrub-bindenden ungeradzahlig DM14-Domänen (Abbildung 2.11 D+D').

Wird dieser Bereich durch einen flexiblen Linker ersetzt, verbessert dies das Rettungsvermögen des Lgd-Konstrukts im Vergleich mit der Deletion der Aminosäuren 558-664 nicht (Abbildung 2.11 E+E'). Der flexibler Linker kann die Funktion der Aminosäuren 558-664 nicht übernehmen. Es gibt also wahrscheinlich weitere Funktionen dieses Bereichs, als nur die Gewährleistung der Distanz zwischen DM14-4 und der C2-Domäne.

Ein Lgd-Konstrukt ohne die 20 C-terminalen Aminosäuren kann den *lgd* mutanten Phänotyp nicht vollständig retten (Abbildung 2.11 F). Die nachgewiesene ektopische Wg Expression ist hierbei ventral stärker als dorsal und insgesamt schwächer als die ektopische Aktivierung der Expression bei fehlendem Aminosäurebereich 558-664 (vgl. Abbildung 2.11 B und F). Gbe+Su(H) ist jedoch auch in der gesamten Flügelimagnalscheibe aktiv (Abbildung 2.11 F').

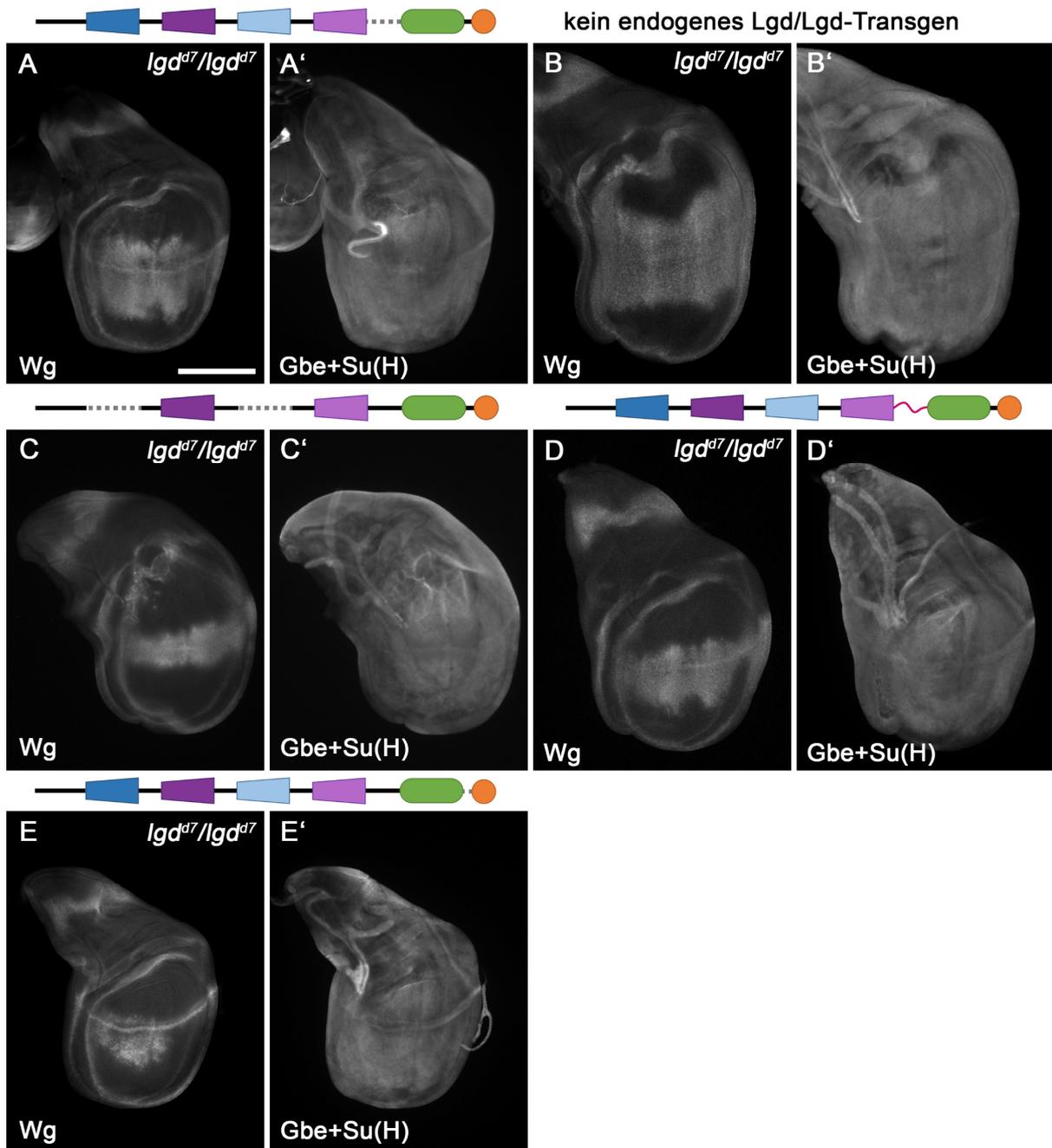


Abbildung 2.11: Rettungsexperiment zur Analyse des Aminosäurebereichs 558-664 in Lgd. Oberhalb der Imaginalscheiben sind schematisch die Rettungskonstrukte, die im *lgd* mutanten Hintergrund (*lgd<sup>d7</sup>/lgd<sup>d7</sup>*) exprimiert wurden, dargestellt. Die Aktivität des Notch-Signalwegs ist durch Antikörperfärbung gegen Wingless (Wg) dargestellt (B-F). Zusätzlich ist die Aktivität des Notch-Signalwegs über die Expression des sensitiveren Reporter-genkonstrukts Gbe+Su(H) gezeigt (B'-F'). Fehlt der Aminosäurebereich zwischen der vierten DM14-Domäne und der C2-Domäne in einem Lgd-Konstrukt, ist kein eindeutiges Rettungsvermögen dieses Konstrukts zu erkennen. Sowohl Wingless, als auch Gbe+Su(H) sind stark ektopisch aktiviert (B+B'). Die ektopische Aktivierung ist fast so stark wie bei Ausfall von Lgd (C+C') und stärker als die Aktivierung bei Rettung des *lgd* mutanten Phänotyps durch ein Lgd-Konstrukt ohne die Shrub-bindenden ungeradzahligen DM14-Domänen (D+D'). Durch die Einführung eines flexiblen Linkers in diesen Bereich wird das Rettungsvermögen gegenüber der Deletion der Aminosäuren 558-664 nicht verbessert (E+E'). Ein etwas schwächerer Phänotyp lässt sich beobachten, wenn die letzten 20 Aminosäuren am C-Terminus von Lgd in einem Rettungskonstrukt fehlen. Hierbei ist die Aktivierung der

Wg-Expression dorsal der D/V-Grenze deutlich schwächer als ventral (F). Gbe+Su(H) ist jedoch in allen Zellen der Flügelimagnalscheibe aktiv (F'). Der Maßstabsbalken in B für B-F' entspricht 200µm. Die Imaginalscheiben sind so orientiert, dass anterior links und dorsal oben ist.

Diese Ergebnisse zeigen, dass sowohl der Aminosäurebereich 558-664, als auch die 20 C-terminalen Aminosäuren von Lgd für die vollständige Funktion notwendig sind.

Bei den Analysen fiel auf, dass die Lgd-Konstrukte mit Antikörperfärbungen im Gewebe nicht nachgewiesen werden konnten (nicht gezeigt). Deshalb wurde die korrekte Integration des Expressionsvektors in das Genom der Fliegen in mehreren Transformanten durch Single-Fly-PCR (s. 6.2.3) und Sequenzierung überprüft. Alle untersuchten Fliegen hatten den Expressionsvektor mit der cDNA für die jeweiligen Lgd-Konstrukte korrekt in das Genom integriert. Von Larven, die diese Lgd-Konstrukte exprimieren, wurden zusätzlich Proteinlysate hergestellt (s. 6.4.2) welche mittels SDS-PAGE und Western Blot untersucht wurden. Es ist zu erkennen, dass im Gegensatz zu Lgd-HA die Lgd-Varianten mit Modifikationen in 558-664 oder ohne C-Terminus auf dem Western Blot nicht nachweisbar sind (Abbildung 2.9 E).

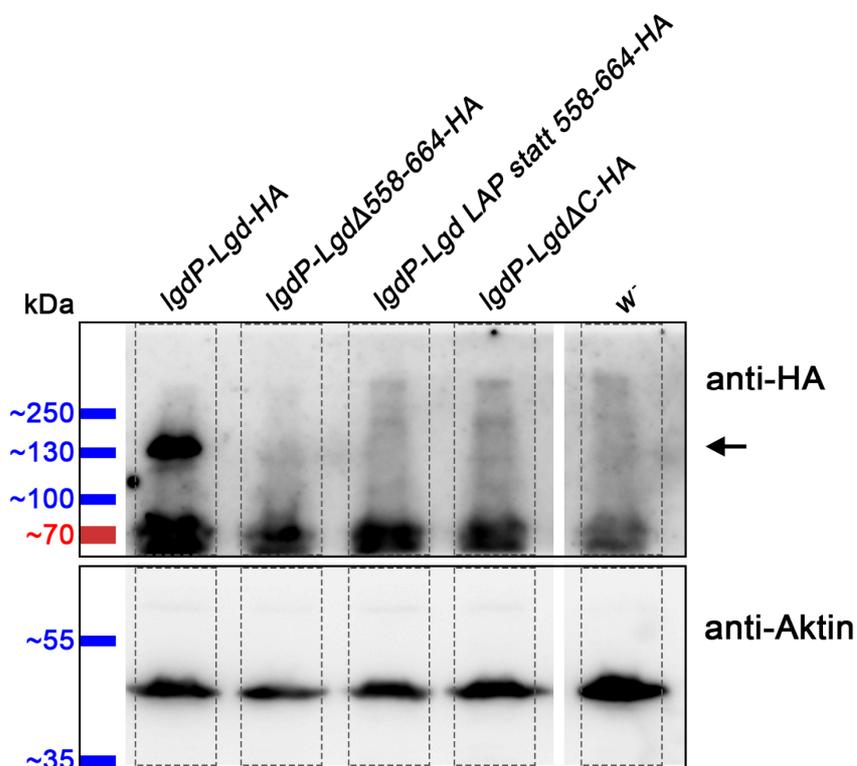


Abbildung 2.12: Durch das Fehlen des C-Terminus oder des Bereichs zwischen DM14-4 und der C2-Domäne werden die Lgd-Konstrukte instabil und sind auf dem Western Blot nicht wie wildtypisches Lgd-HA nachweisbar (vollständiges Lgd ist auf Höhe von ca. 190kDa nachweisbar (E, Pfeil)). Bei den zusätzlichen Banden auf Höhe von 70kDa handelt es sich wahrscheinlich um eine Hintergrundfärbung durch den HA-Antikörper.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die Interaktion des Bereichs zwischen der vierten DM14-Domäne und der C2-Domäne und dem C-Terminus wahrscheinlich wichtig für die Proteinstabilität ist. Das verringerte Rettungsvermögen der Lgd-Konstrukte resultiert also wahrscheinlich aus der verringerten Proteinstabilität und nicht aus einer reduzierten Aktivität. Es ist noch Rettungsvermögen nachweisbar, was durch die Funktion einer geringen Proteinmenge von funktionalem Lgd in den Zellen möglich wäre, bevor es zum Abbau kommt.

### **2.1.5 Analyse der Struktur von vollständigem Lgd mit Hilfe von Alphafold2**

Für Lgd existieren bereits Kristallstrukturen für die dritte DM14-Domäne (McMillan et al., 2017) und für die C-terminal der vierten DM14-Domäne gelegenen Domänen (Ventimiglia et al., 2018). In dieser Arbeit wurde durch die Strukturvorhersage mittels Alphafold2 die vollständige Struktur von Lgd analysiert, die Hinweise darüber gibt, wie die einzelnen Domänen möglicherweise zueinander angeordnet sind (Alphafold Datenbank ID: AF-Q9VKJ9-F1; Jumper et al. (2021)). Alphafold2 modelliert die Struktur für die in Lgd vorhandenen funktionellen Domänen mit hoher berechneter Wahrscheinlichkeit (Abbildung 2.13 A+B). Es sind die Strukturen der vier DM14-Domänen, die C2-Domäne und die funktionelle Einheit zwischen der vierten DM14-Domäne und der C2-Domäne (AS 558-664) zu erkennen. Die vier DM14-Domänen bilden helikale Haarnadelstrukturen. Die C2-Domäne bildet die, für C2-Domänen typische,  $\beta$ -Sandwich-Konformation (Übersicht in Nalefski und Falke, 1996). Der Aminosäurebereich 558-664 bildet eine helikale Haarnadel und durch die Integration des C-Terminus ein antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt (Abbildung 2.13 D).

Die entstehende kompakte Anordnung der Domänen zueinander kann jedoch irreführend sein. Alphafold2 versucht Strukturen eher ein kompaktes Volumen zu geben. Werden die von Alphafold2 berechneten Wahrscheinlichkeiten der Orientierung der Domänen zueinander betrachtet ist zu erkennen, dass die Ausrichtung der Aminosäuren innerhalb der Domänen mit höherer Genauigkeit berechnet wurden, als die Bereiche dazwischen. Die Domänen besitzen also keine spezifische Ausrichtung zueinander (Abbildung 2.13 C). Bis auf drei Helices sind die Bereiche zwischen den Domänen ohne feste Struktur und flexibel. Es sind jedoch auch einige Interaktionen zwischen funktionellen Domänen und weiter entfernten Bereichen zu erkennen.

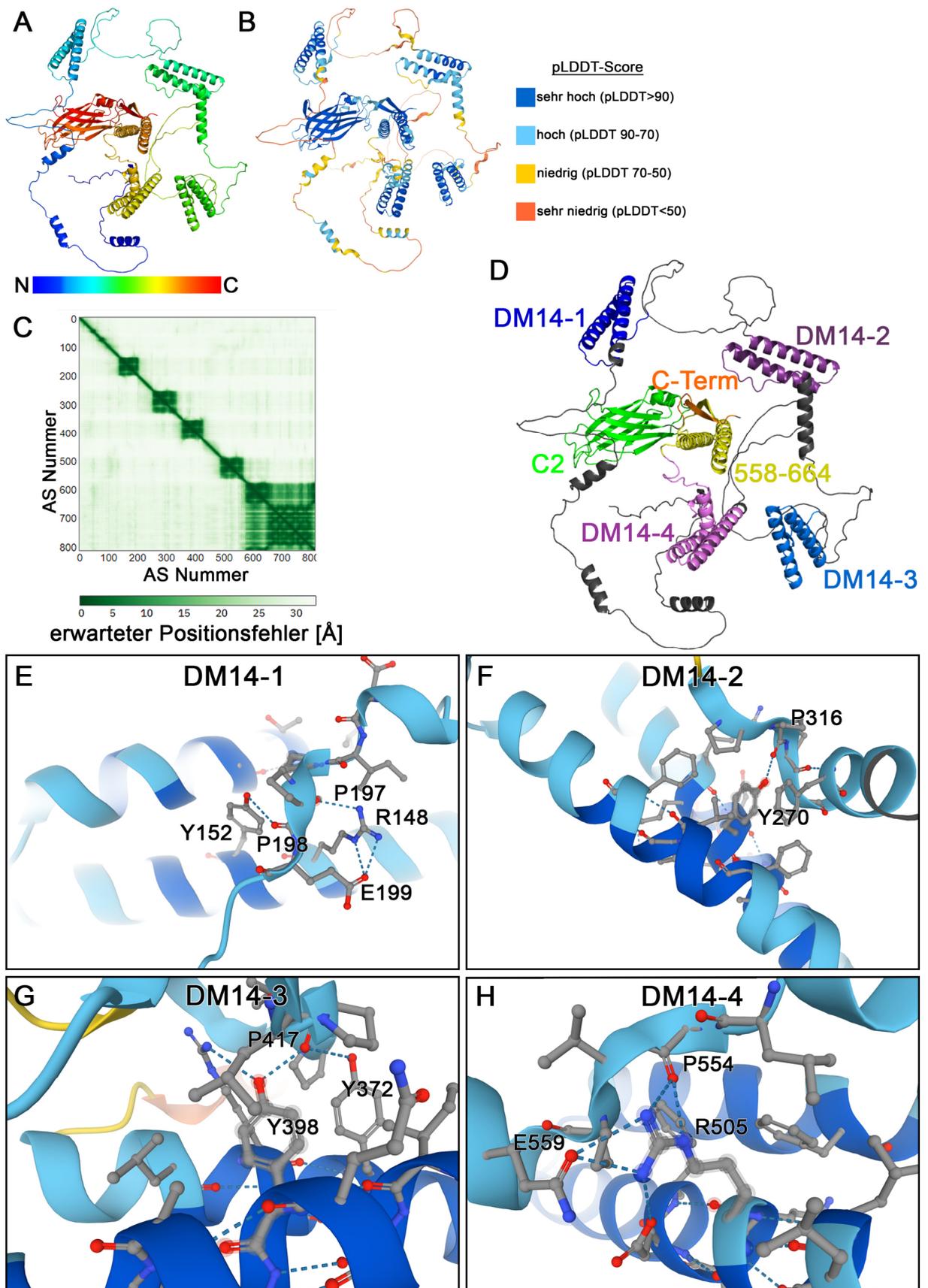


Abbildung 2.13: Strukturvorhersage und -analyse von vollständigem Lgd. AlphaFold2 simuliert die Strukturen der funktionalen Domänen in Lgd (A, B, D). Bereiche zwischen diesen Domänen haben keine feste Struktur und sind flexibel (D). A: Die Struktur ist farblich vom N-Terminus (blau) bis C-Terminus (rot)

markiert. Die Wahrscheinlichkeit, wie genau die Struktur vorhergesagt werden konnte, ist farblich in B als pLDDT-Score angegeben (Blau entspricht sehr hoch (>90), Cyan 90-70, Gelb 70-50 und Orange <50). C zeigt die Wahrscheinlichkeit, mit der ein Positionsfehler einer Aminosäure von Lgd (1-816) im Vergleich zu einer anderen in Lgd (1-816) auftritt. Sie zeigt an, wie genau die Position einer bestimmten Aminosäure, ausgehend von einer anderen, vorhergesagt werden kann. Die vier kleineren Quadrate bilden die DM14-Domänen mit ihren Interaktionen mit ihrem C-Terminus ab. Das große Quadrat bildet den Bereich 558-664, die C2-Domäne und den C-Terminus ab. Die Ausrichtung der letzten Domänen zueinander ist durch die Integration des C-Terminus deutlich vorgegeben. In D sind die einzelnen funktionellen Domänen farblich markiert. In Blau sind die ungeradzahigen DM14-Domänen dargestellt, In Violett die geradzahigen. In Gelb ist der Bereich zwischen der vierten DM14-Domäne und der C2-Domäne dargestellt. Die C2-Domäne ist in Grün dargestellt. Der C-Terminus ist in Orange dargestellt. Innerhalb der vier DM14-Domänen interagiert die helikale Haarnadel mit dem C-Terminus der DM14-Domänen. Die interagierenden Aminosäuren sind markiert. Bindungen sind durch gestrichelte Linien dargestellt, Stickstoffatome sind in Blau und Sauerstoffatome in Rot dargestellt (E-H).

Die bereits in Abbildung 2.9 gezeigte Interaktion des C-Terminus mit dem Aminosäurebereich 558-664 ist deutlich zu erkennen und spiegelt sich auch in der Angabe des Positionsfehlers wieder. Der erwartete Positionsfehler ist eine Angabe, welche die Wahrscheinlichkeit, mit der sich, ausgehend von einer Aminosäure, eine andere Aminosäure an einer bestimmten Position befindet, widerspiegelt (Abbildung 2.13 C). Diese Angabe der Positionsfehler spiegelt die Anordnung der DM14-Domänen als vier kleine Quadrate wider, was bedeutet, dass sie zueinander keine spezifische Ausrichtung haben, ihre eigene Struktur jedoch mit hoher Wahrscheinlichkeit simuliert ist. Die Ausrichtung der Domänen am C-Terminus von Lgd zueinander ist hingegen durch die Integration des C-Terminus mit den Aminosäuren 558-664 deutlich vorgegeben, was durch ein größeres Quadrat für alle diese Domänen repräsentiert wird. Die Ausrichtung der simulierten Domänen zueinander ist hierbei nicht variabel.

Die Interaktion zwischen dem Aminosäurebereich 558-664 und der C-terminal der C2-Domäne gelegenen Bereichen ist auch in den Säugerorthologen von Lgd CC2D1A und CC2D1B zu finden (z.B.: Humanorthologe: AlphaFold Datenbank ID: AF-Q6P1N0-F1 und AF-Q5T0F9-F1 (nicht gezeigt)). Das spiegelt erneut die Wichtigkeit dieser Interaktion wieder.

Eine Hybrid-DM14-Domäne aus der Interaktionshelix von DM14-3 und der nicht interagierenden Helix aus DM14-4 konnte die Funktion ungeradzahigen DM14 Domäne nicht übernehmen. Hinweise warum diese Integration nicht zu einer funktionellen DM14-Domäne geführt hat, liefert die Analyse der vorhergesagten Struktur der DM14-Domänen im vollständigen Lgd. Es sind auffällige Interaktionen in den DM14-Domänen zu erkennen, die grundsätzlich in allen DM14-Domänen von Lgd vorkommen, sich jedoch in

Details unterscheiden. Innerhalb der DM14-Domänen interagieren Aminosäuren der helikalen Haarnadel mit Strukturen einer Prolin-reichen Region, die am C-Terminus jeder der vier DM14-Domänen zu finden ist (Anhang, Abbildung 8.1). In der ersten DM14-Domäne interagieren Tyrosin152 und Arginin148 aus der helikalen Haarnadel mit Prolin197, Prolin198 und Glutamin199 (Abbildung 2.13 E, Anhang, Abbildung 8.1). In der zweiten DM14-Domäne interagiert Tyrosin270 der helikalen Haarnadel mit Prolin316 (Abbildung 2.13 F, Anhang, Abbildung 8.1). Tyrosin372 und Tyrosin398 aus der helikalen Haarnadel interagieren mit Prolin417 am C-Terminus innerhalb der dritten DM14-Domäne, wobei Tyrosin398 zusätzlich Arginin368 bindet. (Abbildung 2.13 G, Anhang, Abbildung 8.1). Zuletzt zeigt so eine Interaktion auch die vierte DM14-Domäne. Hier interagiert Arginin505 der helikalen Haarnadel mit Prolin554 des C-Terminus und Glutamin559 außerhalb der DM14-Domäne (Abbildung 2.13 H, Anhang, Abbildung 8.1). Auch diese Interaktionen zwischen der helikalen Haarnadel und der Prolin-reichen Region am C-Terminus der DM14-Domänen sind in den Säugerorthologen wiederzufinden (nicht gezeigt).

Vollständiges Lgd könnte auch anders als hier vorhergesagt bis auf die Interaktion im C-Terminus und die Interaktionen innerhalb der DM14-Domänen eine Kette aneinander gereihter, funktioneller Einheiten bilden.

Zusammenfassend zeigt die Analyse der simulierten Struktur von vollständigem Lgd, dass die funktionalen Domänen strukturiert vorliegen. Die Bereiche zwischen diesen Domänen zeigen jedoch bis auf wenige Ausnahmen keine besondere strukturelle Integrität. Hierbei bilden wenige Interaktionen, bei denen die Bereiche außerhalb von funktionalen Domänen mit den Domänen verbunden werden, die Ausnahme. In allen DM14-Domänen liegt eine Interaktion der helikalen Haarnadel mit einer Prolin-reichen Region des C-Terminus der DM14-Domänen vor. Das Vorhandensein dieser Interaktionen in den Säugerorthologen von Lgd legt nahe, dass die Prolin-reiche Region, zusätzlich zu der helikalen Haarnadel, als funktionaler Teil einer DM14-Domäne gewertet wird.

## 2.2 Die Interaktion von Shrub mit Vps20

Die Polymerisation von Shrub an der endosomalen Membran wird durch Vps20 (Vacuolar protein sorting 20) initiiert (Teis et al., 2008). Vps20 wird wiederum von der ESCRT-II Untereinheit Vps25 an die endosomale Membran rekrutiert (Babst et al., 2002b; Teo et al., 2004; Yorikawa et al., 2005). Wie die Polymerisation von Shrub durch Vps20 initiiert wird und wie die beiden ESCRT-III Untereinheiten interagieren, ist nicht im Detail aufgeklärt. Hier sollen durch die Ermittlung der Struktur von Vps20 und mit Hilfe von Rettungsexperimenten des *vps20* mutanten Hintergrund Hinweise gefunden werden, wie Shrub und Vps20 interagieren.

### 2.2.1 Analyse der Struktur von Vps20 mit Hilfe von Alphafold2

Um zu überprüfen ob Vps20 eine ähnliche Struktur wie die andere ESCRT-III Untereinheiten ausbildet, wurde die Proteinstruktur mithilfe von Alphafold2 simuliert (s.6.5.1, Jumper et al. (2021); Mirdita et al. (2022)). In der Modellierung mit Alphafold2 ist Vps20 als zentrale helikale Haarnadelstruktur beschrieben ( $\alpha1$ - $\alpha2$ ), an die sich zwei weitere Helices anknüpfen ( $\alpha3$ - $\alpha4$ , Abbildung 2.14 A+A'). Diese vier Helices werden mit hoher Genauigkeit vorhergesagt (Abbildung 2.14 A''). Die Bereiche zwischen  $\alpha2$  und  $\alpha3$  und zwischen  $\alpha3$  und  $\alpha4$  sind flexibel, weshalb ihre Ausrichtung zueinander nicht sicher vorhergesagt werden kann. N- und C-terminal dieser vier Helices befinden sich Bereiche, dessen genaue Strukturen nicht modelliert werden können. Vps20 bildet also wie für die meisten anderen ESCRT-III Untereinheiten und deren Orthologe gezeigt (Muzioł et al., 2006; McMillan et al., 2016) vermutlich eine zentrale helikale Haarnadel aus.

Ein Alignment der Proteinstruktur von Vps20 (Abbildung 2.14 C, grün) mit der Proteinstruktur von Shrub (Abbildung 2.14 C, rot) zeigt starke Ähnlichkeit. Auch Shrub bildet eine zentrale helikale Haarnadel, über die die Interaktion mit Lgd und die Polymerisation vermittelt wird (McMillan et al. (2016); McMillan et al. (2017); Abbildung 1.4; Abbildung 1.7 B). Shrub weist jedoch drei weitere kleinere Helices C-terminal der zentralen helikalen Haarnadel auf (Abbildung 2.14 C). Die strukturelle Ähnlichkeit zwischen Shrub und Vps20 liefert erste Hinweise über die Interaktion miteinander. Shrub polymerisiert über elektrostatische Wechselwirkungen. Möglicherweise kann Shrub an Vps20 ähnlich wie bei der Polymerisation über elektrostatische Wechselwirkungen binden. Um Hinweise auf die Grundlage für die Interaktion zwischen Vps20 und Shrub

über elektrostatische Wechselwirkungen zu finden, wurden das Oberflächenpotential der beiden Moleküle verglichen (berechnet mit APBS-electrostatics (Jurrus et al., 2018)).

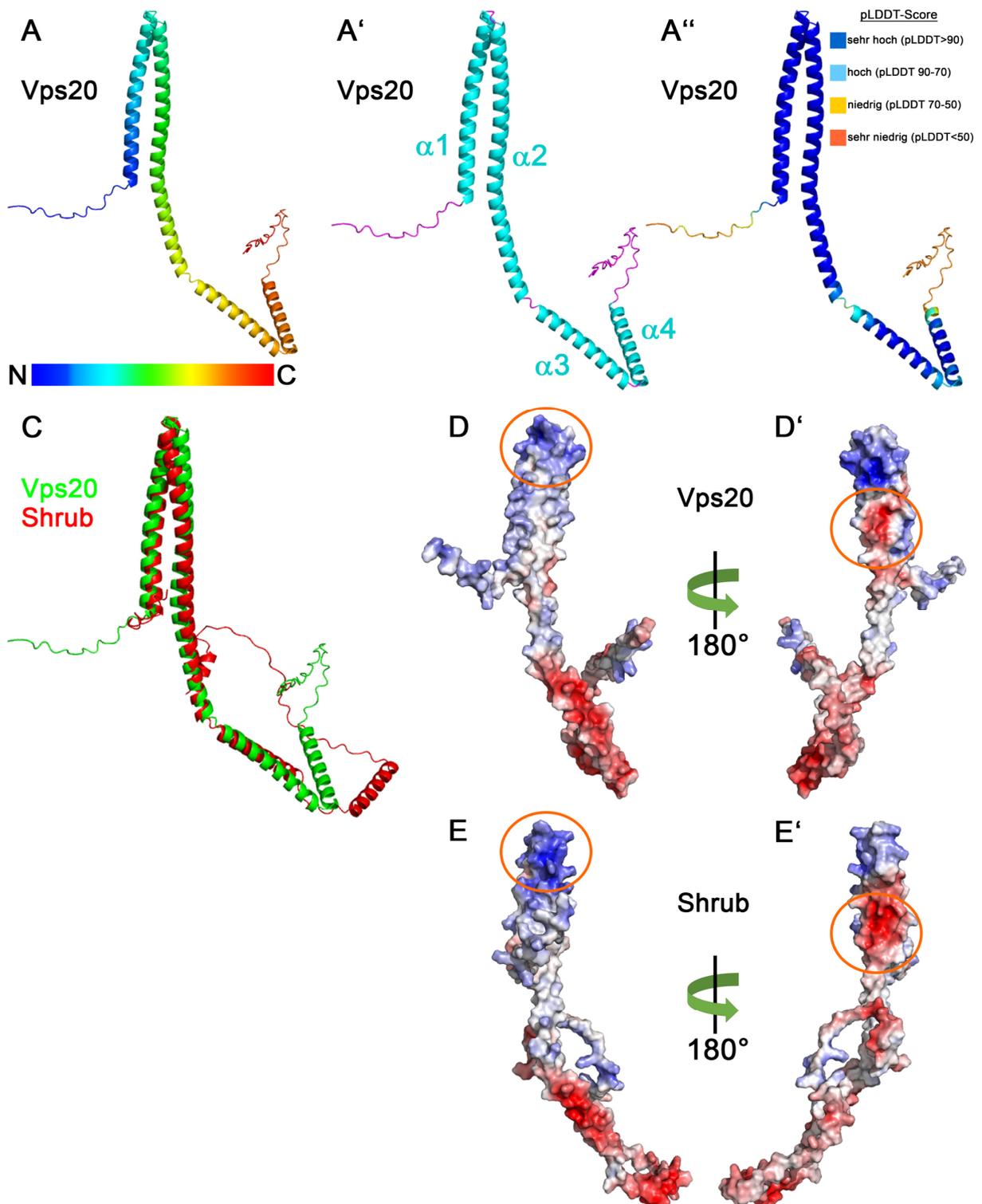


Abbildung 2.14: Strukturvorhersage und -analyse von Vps20. AlphaFold2 sagt für Vps20 eine zentrale helikale Haarnadelstruktur voraus, die durch zwei weitere Helices ergänzt wird (A-A''). Hierbei werden gerade die Helices mit hoher Wahrscheinlichkeit vorhergesagt (A', hellblau:  $\alpha 1$ - $\alpha 4$ ). Die Bereiche zwischen den Helices sind ohne besondere Struktur und wahrscheinlich flexibel (A'', pLDDT Score: Blau entspricht sehr hoch (>90), Cyan 90-70, Gelb 70-50 und Orange <50). Werden die vorhergesagten Strukturen von

---

Vps20 (grün) und Shrub (Rot) übereinander gelegt, lässt sich eine starke Ähnlichkeit erkennen. Auch Shrub bildet eine helikale Haarnadel und weitere kleinere Helices (C). In D-E' ist das Oberflächenpotential von Vps20 und Shrub gegenüber gestellt (mit APBS-electrostatics berechnet; Blau repräsentiert basische und Rot saure Bereiche (Jurrus et al., 2018)). Ähnlich wie Shrub, besitzt Vps20 an der Spitze der helikalen Haarnadel ein basisches Oberflächenpotential, welches jedoch schwächer als in Shrub ist (D+E, orange Ellipsen). Das für die Polymerisation von Shrub benötigte saure Oberflächenpotential ist auch in Vps20 vorhanden, der Bereich ist jedoch deutlich kleiner (D'+E', orange Ellipsen). In der Nähe des sauren Bereichs, besitzt Vps20 noch eine stark basische Oberfläche (D'). Die  $\alpha 3$  und  $\alpha 4$  Helices von Shrub und Vps20 zeigen eine saure Oberfläche

---

Ähnlich wie bei Shrub ist bei Vps20 an der Spitze der zentralen helikalen Haarnadel eine Anreicherung von basischen Ladungen zu erkennen. Im Vergleich mit Shrub ist dieses basische Oberflächenpotential jedoch schwächer (vgl. Abbildung 2.14 D+E, orange Ellipsen). Zusätzlich bilden die  $\alpha 1$ - und  $\alpha 2$ -Helices einen sauren Bereich auf der anderen Seite des Proteins aus (Abbildung 2.14 D', orange Ellipse). Auch dieses saure Oberflächenpotential ist an ähnlicher Position in Shrub zu finden (Abbildung 2.14 E', orange Ellipse). Der saure Bereich in Shrub ist an dieser Position jedoch größer, als in Vps20 (vgl. Abbildung 2.14 D'+E'). Zusätzlich besitzt Vps20 auch noch eine stärker basische Oberfläche in der Nähe der sauren Oberfläche, als sie in Shrub vorhanden ist (Abbildung 2.14 D'). Die  $\alpha 3$ - und  $\alpha 4$ -Helices von Vps20 und Shrub zeigen ein saures Oberflächenpotential (Abbildung 2.14 D-E').

Zusammenfassend liefern die strukturelle Ähnlichkeit und die ähnlichen Oberflächenpotentiale von Shrub und Vps20 Hinweise auf eine mögliche Interaktion über elektrostatische Wechselwirkungen. Diese möglichen Interaktionen werden im Folgenden mittels Molekulardynamik-Simulationen und Rettungsexperimenten überprüft.

### 2.2.2 Analyse des Ausfalls von Vps20 in Flügelimaginalscheiben

Voraussetzung für die Rettungsexperimente ist die Charakterisierung des *vps20* mutanten Phänotyps in Flügelimaginalscheiben und die Charakterisierung weiterer Eigenschaften von Vps20. Hierfür wurden zwei Allele von *vps20* verwendet, die nicht im Detail beschrieben wurden: *vps20<sup>rG270</sup>* (Bellen et al., 2004) und *vps20<sup>I3</sup>* (Vaccari et al., 2009). Bei dem *vps20<sup>rG270</sup>*-Allel handelt es sich um eine P-Element Insertion in Exon zwei von *vps20* (Bellen et al., 2004). Das *vps20<sup>I3</sup>*-Allel wurde über Ethylmethansulfonat- (EMS-) Mutagenese hergestellt (Vaccari et al., 2009). Beide *vps20*-Allele sind homozygot embryonal letal.

Bei initialen Rettungsexperimenten während der Analyse der beiden Allele ist aufgefallen, dass sich auf dem jeweiligen Chromosom zusätzlich mindestens eine letale Hintergrundmutation befindet. Die Hintergrundmutationen der beiden Allele führte dazu, dass die Rettungsexperimente in trans-Heterozygose ( $vps20^{rG270}/vps20^{l3}$ ) durchgeführt werden mussten. Um Effekte durch diese Hintergrundmutation auszuschließen, wurde das  $vps20^{rG270}$ -Allel mit der FRT (flippase recognition target) Sequenz-Insertion  $FRT^{G13}$  rekombiniert (Chou und Perrimon, 1996). Hierbei wurden Hintergrundmutationen mit phänotypischen Auswirkungen entfernt, was nachfolgende Rettungsexperimente gezeigt haben (2.2.4). Das  $vps20^{rG270}$ -Allel eignet sich so, von Hintergrundmutationen bereinigt, für Rettungsexperimente. Die  $FRT^{G13}$  Sequenz, die sich auf demselben Chromosomenarm wie  $vps20^{rG270}$  befindet, konnte für die klonale Analyse des  $vps20^{rG270}$ -Allels ohne Hintergrundmutationen verwendet werden.

Der Ausfall von Vps20 führt in  $vps20^{rG270}$  zur embryonalen Letalität in *Drosophila* (Vaccari et al., 2009). Für die Charakterisierung der zellulären Effekte des Ausfalls von Vps20 in späteren Entwicklungsstadien, wurden mit Hilfe der klonalen Analyse genetische Mosaikgewebe erstellt werden (Flp/FRT-System: s. 6.3.6; Xu und Rubin (1993)). Die  $vps20^{rG270}$  mutanten Zellklone sind durch die Abwesenheit von GFP-Fluoreszenz markiert. Werden in der Flügelimaginalscheibe  $vps20$  mutante Zellklone induziert, fällt auf, dass die mutanten Bereiche deutlich kleiner als die entstehenden wildtypischen Bereiche sind (vgl. Abbildung 2.15 A+A', rote ( $vps20$  mutant) und gelbe (wildtypisch) Umrandung). Dieser Effekt, der auch für *shrub* mutante Zellklone beobachtet werden kann (Abbildung 2.15 E), lässt sich durch Zelltod und Zellkonkurrenz erklären. In dem stark proliferierenden Gewebe der Flügelimaginalscheiben überleben diese stark geschwächten Zellen wahrscheinlich nicht die gesamte Entwicklung bis zur adulten Fliege (Übersicht in Morata und Calleja, 2020).

Da die ESCRT-Maschinerie für die Regulation des Notch-Signalwegs benötigt wird, wurde die Auswirkung des Vps20 Ausfalls auf die Aktivierung des Signalwegs überprüft. Im Gegensatz zu *shrub* mutanten Zellklonen, werden in  $vps20$  mutanten Zellklonen weder die Expression des direkten Zielgens *wg*, noch die Expression des Reportergenkonstrukts  $Gbe+Su(H)$  ektopisch aktiviert (Abbildung 2.15 B, C, D+D', E+E').

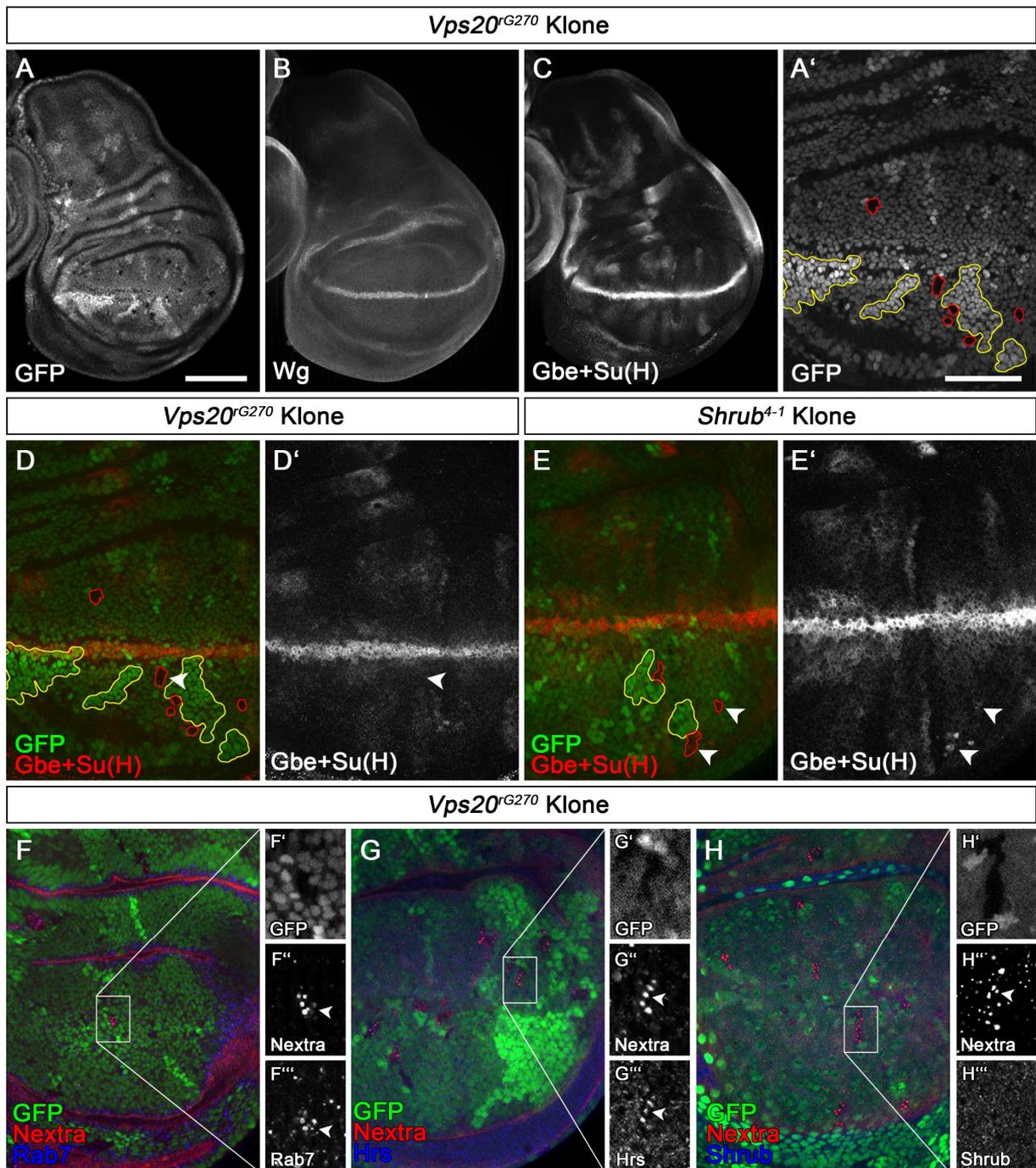


Abbildung 2.15: Analyse des Ausfalls von Vps20 in Flügelimaginalscheiben. Mit Hilfe des Flp/FRT-Systems wurden *vps20<sup>G270</sup>*- oder *shrub<sup>4-1</sup>*-Klone induziert. Homozygot mutante Zellen sind durch die Abwesenheit von GFP Fluoreszenz markiert (A, A' (rote Markierungen), D-E (rote Markierungen), F-I). Die wildtypischen Klone fluoreszieren durch zwei Kopien GFP im Genom der Zellen heller (A'+E, gelbe Markierungen). In *vps20<sup>G270</sup>* Klonen ist keine ektopische Aktivierung des Notch-Signalwegs nachweisbar. Die Antikörperfärbung gegen Wingless (Wg) und das Reporter-genkonstrukt Gbe+Su(H) zeigt eine wildtypische Verteilung (B, C, D, D'). In *shrub<sup>4-1</sup>* Klonen lässt sich eine ektopische Aktivierung des Notch-Signalwegs durch Gbe+Su(H) nachweisen (E+E'). Durch den Ausfall von Vps20 akkumuliert der Notch-Rezeptor in vergrößerten Endosomen (F-F'''). An diesen Endosomen ist auch Hrs nachweisbar (G-G'''), Shrub verbleibt jedoch im Zytoplasma (H-H'''). Der Maßstabsbalken in A für A-C entspricht 100µm, der Maßstabsbalken in A' für A' bis H entspricht 50µm. Die Imaginalscheiben sind so orientiert, dass anterior links und dorsal oben ist.

Um die Auswirkung des Ausfalls von Vps20 auf den endosomalen Transport des Notch-Rezeptors zu untersuchen, wurden *vps20* mutante Zellklone auf die Lokalisation des Notch-Rezeptors in den Klonen überprüft. Wie für Shrub bereits beschrieben (Baeumers et al., 2020), akkumuliert der Notch-Rezeptor auch bei Ausfall von Vps20 in deutlich vergrößerten Endosomen, die für den Marker für reife Endosomen, Rab7, positiv sind (Abbildung 2.15 F, F', F'', Pfeilspitze). Eine verstärkte Akkumulation an der Plasmamembran ist in *vps20* mutante Zellklone nicht zu erkennen. Zusätzlich lokalisiert die früher wirkende ESCRT-0 Komponente Hrs (Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate) an diesen vergrößerten Endosomen. Das in wildtypischen Bereichen hauptsächlich zytoplasmatisch lokalisierte Hrs akkumuliert bei Ausfall von Vps20 zusammen mit Notch an vergrößerten Endosomen (Abbildung 2.15 G, G', G''). Da Vps20 Shrub aus dem Zytoplasma an die endosomale Membran rekrutiert, ist wie erwartet bei Ausfall von Vps20 keine Akkumulation von Shrub an den vergrößerten Endosomen sichtbar. Shrub zeigt eine zytoplasmatische Lokalisation (Abbildung 2.15 H, H', H'').

Diese Beobachtungen bestätigen die in der Literatur beschriebene sequenzielle Rekrutierung der ESCRT-Komplexe und die Notwendigkeit der Vps20 Rekrutierung, um die Shrub Polymerisation zu initiieren (Saksena et al., 2007; Teis et al., 2008). Hrs, welches bis zur endgültigen Abschnürung an den Endosomen verbleibt (Wenzel et al., 2018), ist auch an den vergrößerten Endosomen lokalisiert.

Der Phänotyp des *vps20<sup>G270</sup>*-Allels ähnelt in einigen Punkten dem Nullmutanten Phänotyp aus Studien in der Hefe *S.cerevisiae* (Kranz et al., 2001; Babst et al., 2002a) und dem *vps20<sup>Δ3</sup>*-Allel (Vaccari et al., 2009). Die Insertion des P-Elements in das zweite Exon von *vps20* stellt eine starke Manipulation des möglicherweise entstehenden Fusionsproteins dar. Anhand der oben gezeigten Ergebnisse ist es wahrscheinlich, dass *vps20<sup>G270</sup>* ein Nullallel von *vps20* ist, da keine Rekrutierung von Shrub an die endosomale Membran beobachtet werden kann. Auch die Ähnlichkeit des Phänotyps zum Ausfallphänotyp von Shrub liefert einen Hinweis, dass es sich hierbei um ein Nullallel von *vps20* handelt.

Für den Ausfall von Vps20 konnte anders als bei Ausfall von Shrub keine Aktivierung des Notch-Signalwegs gezeigt werden. Da die ESCRT-III Untereinheiten der Reihe nach agieren und Vps20 die Polymerisation von Shrub initiiert, war auch bei Ausfall von Vps20 eine Aktivierung des Notch-Signalwegs zu erwarten. Um zu überprüfen, ob die Reduktion

von Vps20 zur Aktivierung des Notch-Signalwegs führt, wurden zusätzlich zu klonalen Analyse RNAi- (RNA-Interferenz) Experimente durchgeführt. Mit Hilfe von RNAi konnte Vps20 soweit reduziert werden, dass die Zellen größtenteils überleben, jedoch der Phänotyp analysiert werden konnte. Die RNAi wurde mit dem *ptc-* (*patched-*) Gal4 Treiber in der *ptc*-Expressionsdomäne überexprimiert und der Effekt auf die Aktivierung des Notch-Signalwegs überprüft. Die *ptc*-Expressionsdomäne verläuft von der anterior-posterioren Grenze (A/P Grenze) der Flügelimaginalscheibe mit abnehmender Expressionsstärke in die anteriore Hälfte (Abbildung 2.16 A, GFP + B, violett markierter Bereich). Durch die Verwendung von Gal80<sup>ts</sup> kann die Dauer der Expression gesteuert werden (s. 6.3.5; McGuire et al. (2004)). Bei 92-stündiger Expression der RNAi konnte bereits vereinzelt Zelltod beobachtet werden (Abbildung 2.16 B, Pfeilspitze). Zu diesem Zeitpunkt ist eine Aktivierung des Notch-Signalwegs sichtbar. Sowohl die Expression des Notch-Zielgens *wg*, als auch die Expression von Gbe+Su(H) ist ektopisch in der *ptc*-Expressionsdomäne aktiviert (Abbildung 2.16 C, C' + D, D').

Eine ähnliche ektopische Aktivierung konnte auch für die Reduzierung von Shrub durch RNAi gezeigt werden. Auch hier ist in Zellen, die die RNAi exprimieren eine starke ektopische Aktivierung des Notch-Signalwegs sichtbar (Abbildung 2.16 E, E' + F, F', Hori et al. (2011); Baeumers et al. (2020)). Hierbei ist die zusätzliche Überexpression des Apoptose-Inhibitors p35 notwendig, damit die Zellen überleben und analysiert werden können (Hay et al., 1994; Pannen et al., 2020).

Ein Hinweis auf den Mechanismus der Notch-Aktivierung bei Vps20-RNAi ist in Abbildung 2.16 G-H zu sehen. Hier wurde die RNAi in Verbindung mit einem doppelt Fluorophor-markiertem Notch-Rezeptor exprimiert (NiGFP4Cherry5, Couturier et al. (2014)). Der Notch-Rezeptor wurde unter endogenen Bedingungen ubiquitär und die Vps20-RNAi mit Hilfe des *en-* (*engrailed-*) Gal4 Treibers im posterioren Kompartiment der Flügelimaginalscheibe für 72h exprimiert. Durch die zwei intrazellulären Fluorophore (GFP und mCherry), lässt sich der Notch-Rezeptor während des endosomalen Abbaus verfolgen. In diesem System werden die verschiedenen Chromophor-Reifungsgeschwindigkeiten der Fluorophore und die pH-Sensitivität des GFP ausgenutzt. Schnellreifendes GFP markiert den Notch-Rezeptor an der Plasmamembran, wo das mCherry Fluorophor noch nicht gereift ist und keine Fluoreszenz nachgewiesen werden kann. Durch den hohen Umsatz des Notch-Rezeptors beginnt, schon bevor das mCherry Fluorophor fluoreszieren kann, die Endozytose des Rezeptors und der Abbau in endosomalen Vesikeln (Übersicht in

---

Schnute et al., 2018). Das mCherry in NiGFP4Cherry5 ist also hauptsächlich in Vesikeln nachweisbar. Das GFP in NiGFP4Cherry5 wird während des Abbaus und Eintritt in ein Kompartiment mit niedrigem pH-Wert wie im Lysosom gequencht. Ein Abbaufekt des Notch-Rezeptors resultiert in einer Verschiebung der Verteilung von grüner und roter Fluoreszenz, die in den Vesikeln gemessen werden kann. Sollte der Abbau des Rezeptors verzögert sein, würde mehr Notch-Rezeptor in Vesikeln sowohl grüne, als auch rote Fluoreszenz aufweisen (Couturier et al., 2014).

Bei Vps20 Reduktion ist eine starke Akkumulation des NiGFP4Cherry5 in doppelt Fluoreszenz markierten Endosomen, die auch für Rab7 positiv sind sichtbar (Abbildung 2.16 G-G'' + H-H''). Hier ist sowohl Fluoreszenz von GFP, als auch von mCherry nachweisbar. Das lässt sich mit der Position der Fluorophore und der Ausrichtung des NiGFP4Cherry5 in der endosomalen Membran erklären. Durch die Reduktion von Vps20 wird NiGFP4Cherry5 nicht vollständig in intraluminalen Vesikel (ILV) verpackt. Eine Fraktion des Rezeptors bleibt vermutlich mit der intrazellulären Domäne in Richtung des Zytoplasmas gerichtet an der limitierenden Membran des Endosoms. Hier kommt das GFP Fluorophor nicht in Berührung mit dem saurer werdenden Milieu des reifenden Endosoms und des Lysosoms und wird nicht gequencht.

Im wildtypischen anterioren Kompartiment der Flügelimaginalscheibe wird der Notch-Rezeptor nach der Aufnahme in Endosomen in ILV verpackt, und im Lysosom abgebaut. Hierbei sind die beiden Fluorophore der intrazellulären Domäne in Richtung des saurer werdenden Lumens ausgerichtet was zum Quenchen der grünen Fluoreszenz führt und die Vesikel hauptsächlich rot fluoreszieren, es gibt jedoch auch Vesikel, die positiv für beide Fluorophore sind. Grüne Fluoreszenz von NiGFP4Cherry5 ist bis auf wenige Vesikel hauptsächlich an der Plasmamembran detektierbar (Abbildung 2.16 I+I').

Die Experimente zeigen den gestörten Abbau des Notch-Rezeptors bei stark reduzierter Aktivität von Vps20 und liefern eine mögliche Erklärung für die ektopische Aktivierung des Signalwegs (Schneider et al., 2013; Schnute et al., 2022).

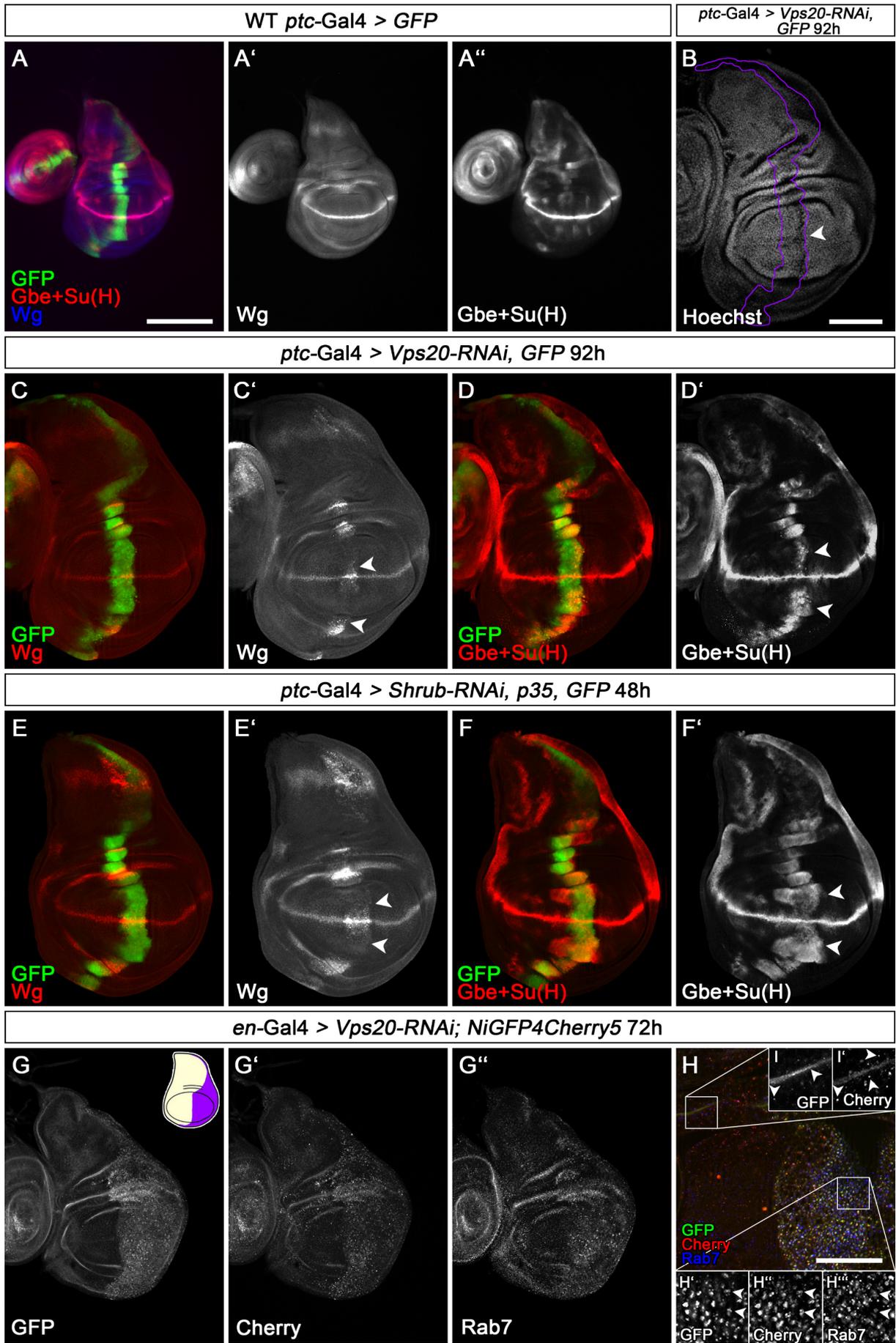


Abbildung 2.16: Analyse der Reduktion von Vps20 durch RNAi in Flügelimaginalscheiben. Mit Hilfe von *ptc*-Gal4 werden UAS-RNAi-Konstrukte entlang der anterior/posterioren Grenze in einem Streifen exprimiert (A, GFP, B, violett markierter Bereich). Wird hier Vps20-RNAi für 92 Stunden überexprimiert, ist Zelltod in den Zellen der stärksten Expression zu erkennen (B, Pfeilspitze). Die Reduktion von Vps20 führt zur Aktivierung des Notch-Signalwegs (C-D'). Sowohl die Wg-Expression als auch Gbe+Su(H) sind ektopisch in der *ptc*-Expressionsdomäne aktiv. Diese Aktivierung ist auch bei der Reduktion von Shrub durch RNAi und zusätzlicher Expression von p35 zu beobachten (E-F'). Die Expression von Vps20-RNAi mit *en*-Gal4 in der posterioren Hälfte der Imaginalscheibe führt zu einem Abbaufekt von doppelt Fluorophor-markiertem Notch-Rezeptor (NiGFP4Cherry5) und zur Akkumulation in Rab7 positiven Endosomen (G-H'''). Das Kompartiment, in dem die Expression aktiviert wurde ist in der schematischen Flügelimaginalscheiben in Violett gezeigt (G). Im anterioren, wildtypischen Kompartiment der Flügelimaginalscheibe ist GFP-Fluoreszenz von NiGFP4Cherry5 hauptsächlich an der Plasmamembran nachweisbar, es sind jedoch auch einige Vesikel GFP-positiv (I, Pfeilspitzen). mCherry-Fluoreszenz von NiGFP4Cherry5 ist direkt unterhalb der Membran in kleinen Vesikeln und in größeren Vesikeln in den Zellen nachweisbar (I', Pfeilspitzen). In seltenen Fällen sind Vesikel GFP- und mCherry-positiv (I+I' Pfeilspitzen, links unten). Der Maßstabsbalken in A für A-G'' entspricht 100µm, der Maßstabsbalken in H entspricht 50µm. Die Imaginalscheiben sind so orientiert, dass anterior links und dorsal oben ist.

Diese Ergebnisse zeigen, dass Vps20 für den vollständigen Abbau des Notch-Rezeptors benötigt wird. Durch die Reduktion akkumuliert Notch in vergrößerten Endosomen und verbleibt dort wahrscheinlich zum Teil an der limitierenden Membran. Von dort aus kann Notch durch die Fusion mit dem Lysosom aktiviert werden. Das führt dann zur ektopischen Aktivierung der Zielgene des Signalwegs (Schneider et al., 2013; Schnute et al., 2022). Zellen, die mutant für *vps20* sind, überleben in stark proliferierenden Geweben nicht und werden wahrscheinlich durch Zellkonkurrenz aussortiert (Übersicht in Morata und Calleja, 2020). Die Reduktion und der Ausfall von Vps20 führen, wie für Shrub gezeigt, zu Zelltod.

Die hier gezeigten Phänotypen für den Ausfall und die Reduktion der Funktion von Vps20 ähneln dem Ausfallphänotyp von Shrub. Der beobachtete Zelltod und die Aktivierung des Notch-Signalwegs lässt sich für den Ausfall oder die Reduktion von Vps20 und Shrub zeigen. Da Vps20 vor Shrub während der ILV-Bildung agiert und für die Rekrutierung und Initiierung der Polymerisation von Shrub benötigt wird, ist die Ähnlichkeit der Phänotypen zu erwarten.

### 2.2.3 Analyse der Überexpression von Vps20 in Flügelimaginalscheiben

Da für die Überexpression des Vps20-Orthologs CHMP6 eine Auswirkung auf den endolysosomalen Abbau von Transmembranproteinen und die Induktion von Onkose gezeigt werden konnte (Yorikawa et al., 2005; Fu et al., 2009), wird hier die

Überexpression von Vps20 untersucht. Eine durchgehende Überexpression von Vps20 mit dem Gal4/UAS-System (s. 6.3.5; Phelps und Brand (1998)) führt zur Letalität der Tiere. Hier wurde die cDNA von Vps20 deshalb für verschiedenen Zeiträume mit Verwendung von Gal80<sup>ts</sup> (s. 6.3.5; McGuire et al. (2004)) überexprimiert. Neben dem Einfluss auf die Aktivierung des Notch-Signalwegs, wurde die subzelluläre Lokalisation des Notch-Rezeptors untersucht. Bei 48-stündiger Überexpression (Abbildung 2.17 A') wird der Notch-Signalweg nicht aktiviert. Weder die Expression des direkten Zielgens *wg* noch *Gbe+Su(H)* werden ektopisch aktiviert (Abbildung 2.17 A''+A'''). Die Induktion von Zelltod, wie sie bei Überexpression mit *Shrub* zu erkennen ist, ist nicht nachweisbar (vgl. Abbildung 2.17 A und B+B'). Bei *Shrub* Überexpression ist eine Narbenbildung entlang der *ptc*-Expressionsdomäne zu erkennen und die Breite des Streifens der exprimierenden Zellen ist stark reduziert (Abbildung 2.17 B+B'). Wird Vps20 mit *engrailed-* (*en-*) Gal4 im posterioren Kompartiment der Flügelimaginalscheibe überexprimiert, führt das nicht zur Veränderung der Lokalisation von Notch oder der Vesikelgröße und -anzahl (Abbildung 2.17 C+C', Pfeilspitzen).

Durch die Überexpression von Vps20 kann jedoch das Überleben von *vps20* mutanten Zellklonen und die durch den Ausfall von Vps20 hervorgerufene Vergrößerung der Notch-positiven Endosomen gerettet werden. In Abbildung 2.17 D ist zu erkennen, dass in der gesamten Flügelimaginalscheibe Klone induziert wurden. Die Kloninduktion erfolgte unter Kontrolle des *heatshock-* (*hs-*) Promotors. Auffällig ist, dass es in Bereichen der Vps20 Überexpression im gesamten anterioren Kompartiment (*cubitus interruptus-* (*ci-*) Gal4) zum Überleben der *vps20<sup>RG270</sup>*-Klonen kommt. Posterior können hingegen ausschließlich wildtypische Klone beobachtet werden, was erneut die Zellletalität bei Ausfall von Vps20 zeigt (Abbildung 2.17 D Pfeile und Pfeilspitzen, E-F gelbe wildtypische und rote mutante Klonegrenzen). Innerhalb dieser geretteten Klone ist auch die Verteilung des Notch-Rezeptors in Endosomen wildtypisch. Der Rezeptor lokalisiert, sowohl in den durch Überexpression geretteten als auch in den heterozygoten Zellen, in gleichgroßen Rab7 positiven Endosomen (Abbildung 2.17 F-F'' Pfeilspitzen).

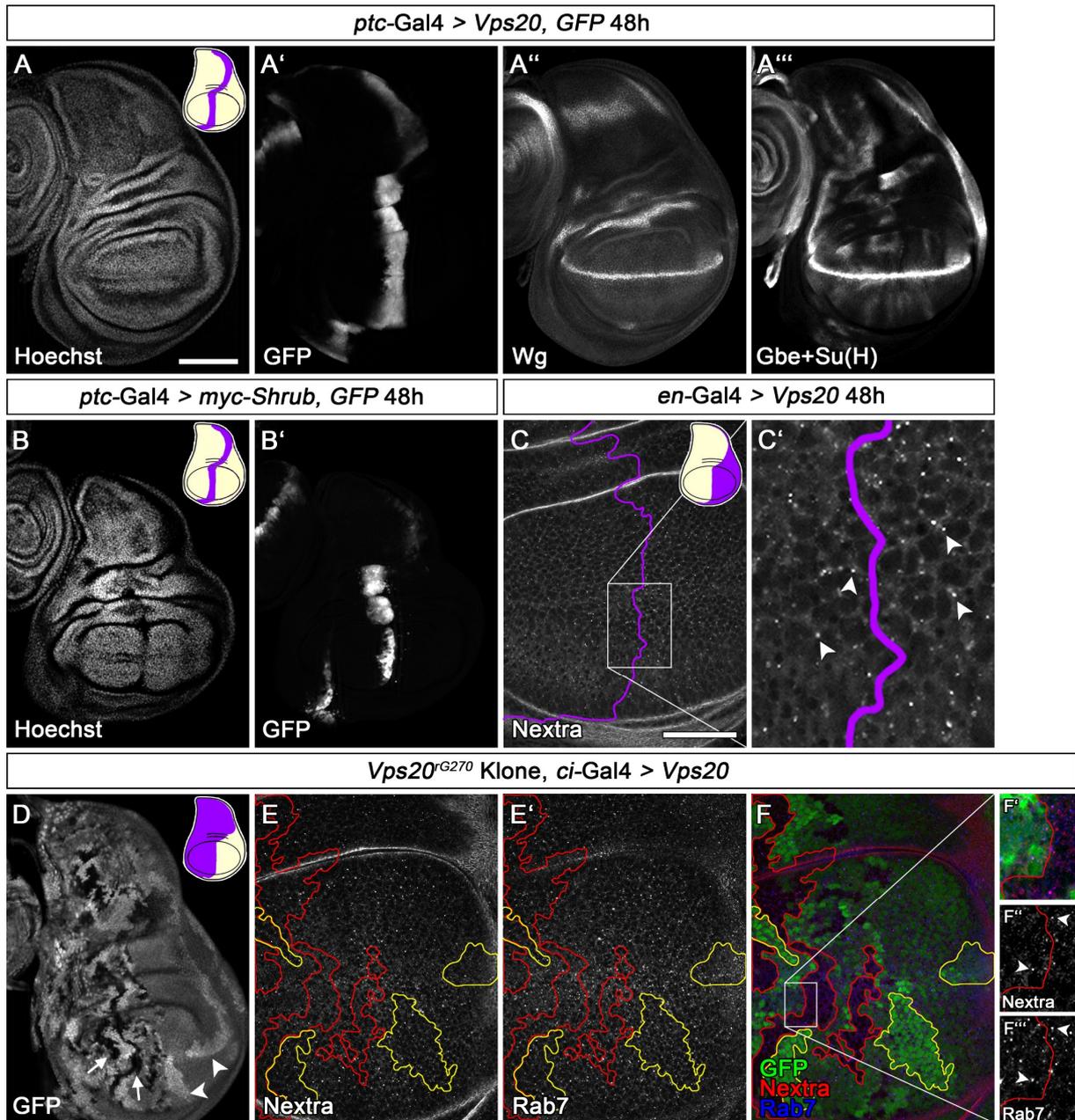


Abbildung 2.17: Analyse der Überexpression von Vps20 in Flügelimaginalscheiben. Mit *ptc*-Gal4 (A+B, violette Markierung in schematischer Flügelimaginalscheibe) für 48 Stunden überexprimiertes Vps20 führt nicht zu Zelltod oder zur Aktivierung von *wg*-Expression oder Gbe+Su(H) (A-A'''). Bei Shrub Überexpression ist Zelltod zu erkennen. Es entsteht eine Narbe und die Anzahl der exprimierenden Zellen ist stark reduziert (B+B'). Wird Vps20 in der posterioren Hälfte mit *en*-Gal4 überexprimiert (C, violette Markierung in schematischer Flügelimaginalscheibe), hat das keinen Einfluss auf die Größe und Verteilung von Notch-Vesikeln in den Zellen (C). D: Induzierte *vps20<sup>rG270</sup>*-Klone sind durch die Abwesenheit von GFP Fluoreszenz markiert. Der durch den Ausfall von Vps20 induzierte Zelltod und die Größe der Endosomen kann durch die gleichzeitige Überexpression von Vps20 gerettet werden (D-F''). Im anterioren Kompartiment der Flügelimaginalscheibe, wo Vps20 mit *ci*-Gal4 überexprimiert wurde (D, violette Markierung in schematischer Flügelimaginalscheibe), entstehen große Zellklone mit *vps20* mutantem Hintergrund (E-F'', rote Markierungen). Posterior, wo keine Überexpression stattfindet, sind nach Induktion von Zellklonen mit *hs*-Flp keine mutanten Zellklone mehr zu detektieren. Nur die wildtypischen Zwillingklone sind zu erkennen (E-F, gelbe Markierungen). Der Maßstabsbalken in A für A-B' und D entspricht 100µm, der

---

Maßstabsbalken in C für C und E-F entspricht 50µm. Die Imaginalscheiben sind so orientiert, dass anterior links und dorsal oben ist.

---

Die Überexpression von Vps20 führt also, anders als für die Überexpression von Shrub gezeigt, auch in hohen Mengen zu keinem negativen zellulären Effekt und ist in der Lage, *vps20* mutante Zellklone zu retten.

#### **2.2.4 Etablierung eines Expressionssystems für Vps20-Transgene**

Die durchgehende Überexpression von Vps20 führt dazu, dass keine Nachkommen überleben und analysiert werden können. In dieser Arbeit wurde deshalb für die Verwendung in Rettungsexperimenten ein Expressionssystem etabliert, welches die Expression von Vps20-Konstrukten auf einem physiologischen Niveau gewährleistet.

Um die Interaktion von Shrub und Vps20 *in vivo* analysieren zu können, soll hier charakterisierte mutante Phänotyp von *vps20* mit Hilfe von Vps20-Transgenen gerettet werden, die mit Hilfe dieses Expressionssystems exprimiert werden. Hierbei liefert das Rettungsvermögen verschiedener Vps20-Transgene einen Hinweis auf die Fähigkeit, die Hauptfunktion von Vps20 zu übernehmen, welche vermutlich die Rekrutierung von Shrub an das Endosom und damit der Start der Polymerisation von Shrub ist (Teis et al., 2008).

*vps20* mutante Tiere sterben im embryonalen Stadium. Die Einführung eines BAC (Bacterial Artificial Chromosome) in das Genom von *Drosophila*, welches den gesamten Vps20 Genlokus beinhaltet führt zur vollständigen Rettung des mutanten Phänotyps. Die Tiere erreichen das adulte Stadium und sind fertil (Abbildung 2.18 B). Der verwendete BAC CH322-09008 (Venken et al., 2009) beinhaltet neben der genomischen Region von Vps20 auch die des Ribosomal proteins S16 (RpS16), CG4294, CG4269, CG4329 und Teile von CG33143.

Da sekundäre Effekte auf zellulärer Ebene durch das Einführen zusätzlicher Kopien dieser Gene nicht ausgeschlossen werden können, wurde hier ein Expressionssystem erstellt, mit dem die cDNA von Vps20-Transgenen exprimiert werden kann. Das System wird Vps20resQ genannt. Hierfür wurden 542 Basenpaare upstream und 502 Basenpaare downstream der kodierenden Region von Vps20 zusammen mit der cDNA der Transgene in einen Vektor kloniert (Abbildung 2.18 A). Der Vektor mit dem Expressionssystem wurde in das Fliegen-genom inseriert. Um Positionseffekte zu neutralisieren, wurden alle Vps20-Transgene in die künstliche Integrationsstelle 86Fb im *Drosophila* Genom integriert (Bischof et al., 2007). Die regulatorischen Bereiche von Vps20, die durch die up-

und downstream gelegenen Bereiche eingeführt wurden, führen zur Expression der Transgen cDNA.

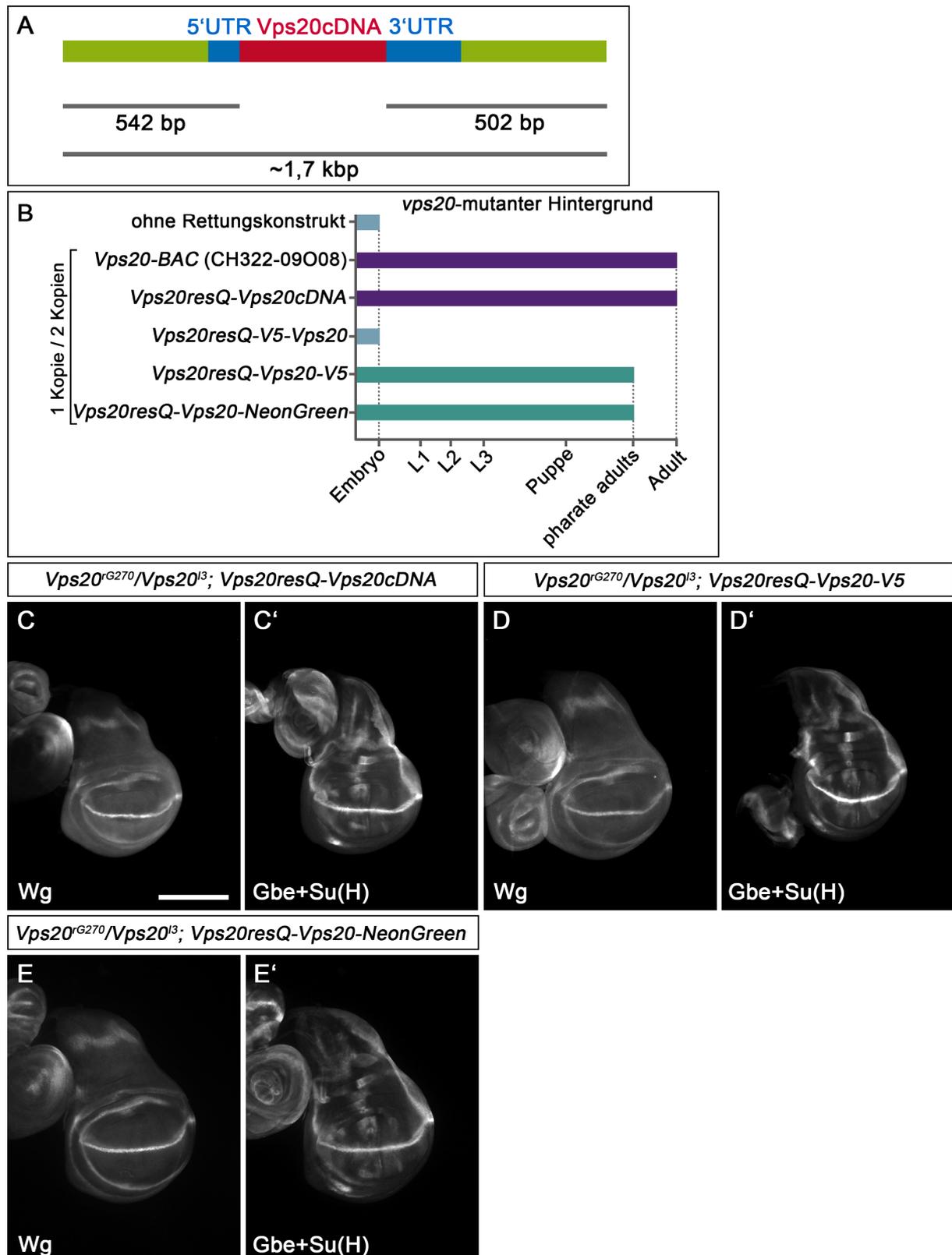


Abbildung 2.18: Etablierung eines Expressionssystems für *Vps20*-Transgene (*Vps20resQ*). Um *Vps20*-Transgene auf physiologischem Niveau exprimieren zu können, wurden 542 Basenpaare (bp) upstream und 502 bp downstream der codierenden genomischen Region von *Vps20* in einen Vektor kloniert (A,

---

Vps20resQ). In diesen Vektor können unterschiedliche cDNAs von Rettungskonstrukten eingebracht werden und in das *Drosophila* Genom inseriert werden. Die Letalität des *vps20* mutanten Hintergrundes (*vps20<sup>rG270</sup>/vps20<sup>l3</sup>*) kann mit Hilfe des BACs (CH322-09008) vollständig gerettet werden. Auch die cDNAs für Vps20, Vps20-V5 oder Vps20-NeonGreen, die mit Hilfe des Expressionssystems (Vps20resQ) exprimiert werden, können diese Letalität mindestens bis zum pharate adult Stadium retten. V5-Vps20 kann den mutanten Phänotyp nicht retten und die Tiere sterben embryonal (B). Wird die Regulation des Notch-Zielgens *wingless* (*wg*) durch Antikörperfärbung überprüft (Wg), ist eine vollständige Rettung durch die Expression der verschiedenen Vps20-Konstrukte, welche die Letalität retten (Vps20cDNA, Vps20-V5 oder Vps20-NeonGreen) zu erkennen (C-E'). Auch die Aktivität des Reporters Gbe+Su(H) ist wildtypisch (C'-E'). Der Maßstabsbalken in C für C-E' entspricht 200µm. Die Imaginalscheiben sind so orientiert, dass anterior links und dorsal oben ist.

---

Das entstehende Vps20, was durch die Insertion des Expressionsvektors mit Vps20 cDNA exprimiert wird, kann die embryonale Letalität vollständig retten und es entstehen fertile Adulte (Abbildung 2.18 B). Diese Rettung ist mit einer Kopie und mit zwei Kopien des Expressionsvektors mit der Vps20 cDNA zu beobachten. Auch die Aktivierung des Notch-Signalwegs, die bei Reduktion von Vps20 zu beobachten ist (Abbildung 2.16 C'-D'), ist in den Flügelimaginalscheiben nicht sichtbar. Das Notch-Zielgen *wg* ist wildtypisch entlang der D/V-Grenze exprimiert. Auch das sensitivere Reporter-gen Gbe+Su(H) zeigt eine wildtypische Expression (Abbildung 2.18 C, C'). Ein Stamm in dem sich auf dem zweiten Chromosom das *vps20<sup>rG270</sup>*-Allel und auf dem dritten Chromosom *Vps20resQ-Vps20cDNA* befindet, wird vollständig homozygot. Das weist darauf hin, dass die letalen Hintergrundmutationen im *vps20<sup>rG270</sup>*-Allel entfernt wurden.

Als nächstes wurde überprüft, ob durch das Anfügen eines Protein-Tags die Funktion des Proteins beeinträchtigt wird. Hierfür wurde die Kurzform eines V5-Tags (Aminosäuresequenz: IPNPLLGLD) sowohl N-, als auch C-terminal an Vps20 angefügt. Die Verwendung der Kurzform des V5-Tags fügt kein zusätzliches Lysin in das entstehende Fusionsprotein ein, welches sonst einen Einfluss auf den Abbau des Fusionsproteins nehmen könnte.

Das Hinzufügen eines N-terminalen V5-Tags verhindert das Rettungsvermögen von Vps20 und die embryonale Letalität ist nicht gerettet (Abbildung 2.18 B). Das Anfügen eines C-terminalen V5-Tags verringert das Rettungsvermögen des Vps20-Transgens minimal. Die Tiere erreichen nur das pharate adult Stadium. Auch in zwei Kopien des Expressionsvektors wird das Rettungsvermögen nicht verbessert (Abbildung 2.18 B). Freipräparierte Tiere dieses Phänotyps zeigen keinen offensichtlichen Entwicklungsdefekt. Wird die Aktivität des Notch-Signalwegs in Flügelimaginalscheiben aus, mit Vps20-V5 geretteten, Larven des späten dritten Larvenstadiums betrachtet, ist

keine Veränderung zum Wildtyp festzustellen (Abbildung 2.18 D+D'). Auch die Fusion mit einem besonders hellen, grünen Fluorophor (NeonGreen, Shaner et al. (2013)) am C-Terminus von Vps20 beeinträchtigt die Funktion nur gering. Das Rettungsexperiment zeigt bei der Expression durch eine oder zwei Kopien des Expressionsvektors vergleichbare Ergebnisse wie beim Anfügen eines C-terminalen V5-Tags. Die geretteten Tiere erreichen nur das pharate adult Stadium und die Aktivierung des Notch-Signalwegs ist nicht beeinträchtigt (Abbildung 2.18 B+E, E').

Diese Ergebnisse zeigen, dass die embryonale Letalität die durch den Verlust von Vps20 entsteht, durch die Expression von Transgenen (Vps20cDNA, Vps20-V5 und Vps20-NeonGreen) mit Hilfe von Vps20resQ gerettet werden kann. Hierbei ist das Rettungsvermögen durch das Anfügen eines C-terminalen Tags leicht eingeschränkt. Die ektopische Aktivierung des Notch-Signalwegs, welche aus der Reduktion von Vps20 resultiert, kann durch die Expression von Vps20-Transgenen (Vps20cDNA, Vps20-V5 und Vps20-NeonGreen) vollständig gerettet werden.

Da in den *vps20* mutanten Zellklonen stark vergrößerte Endosomen zu beobachten sind, wurde überprüft, ob mit Hilfe des Expressionssystems exprimierte Vps20-Konstrukte auch diesen Phänotyp retten können. Hierfür wurden Notch (Nextra) und der Marker für reifende Endosomen Rab7 in Flügelimaginalscheiben des Rettungsexperiments analysiert. Die Vps20-Transgene (Vps20-V5 und Vps20-NeonGreen) sind in der Lage, eine wildtypische Verteilung von Notch und Rab7 in der Flügelimaginalscheibe zu gewährleisten (vgl. Abbildung 2.19 A-B'' mit C-D'' und E-F''). Notch ist an der Plasmamembran und in Endosomen nachweisbar. Rab7 ist als Endosomenmarker an Vesikeln lokalisiert, welche teilweise mit der Notch-Färbung überlappen (Abbildung 2.19 B'', D'', F'' Ausschnitts-vergrößerungen).

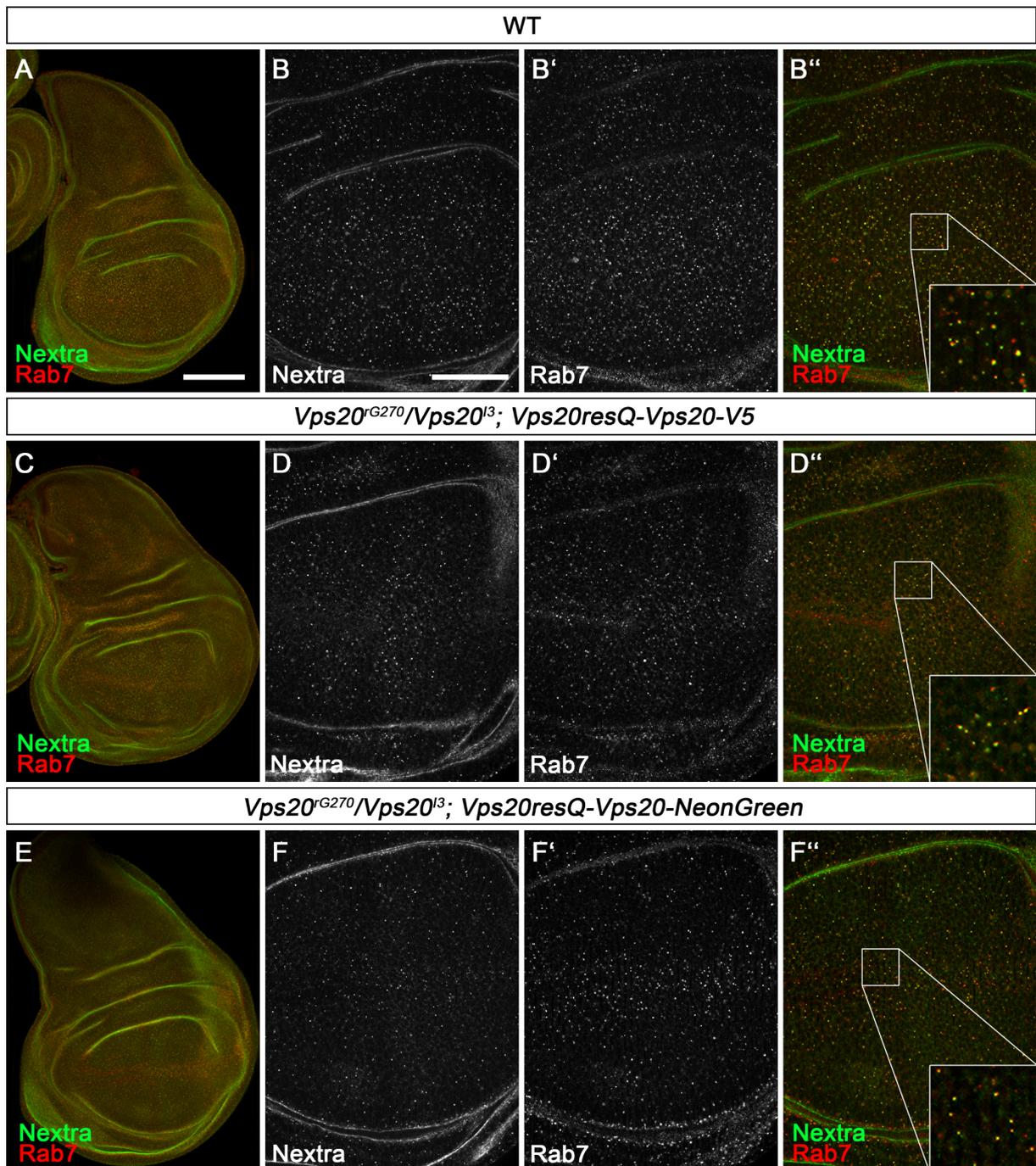


Abbildung 2.19: Überprüfung des Rettungsvermögens durch *Vps20resQ* in Bezug auf die Verteilung der endosomalen Fracht Notch. Der Notch-Rezeptor (Nextra) ist im Wildtyp an der Plasmamembran der Zellen und in Vesikeln nachweisbar, von denen einige positiv für den Marker für reife Endosomen, Rab7, sind (A-B''). Zusätzlich gibt es auch Endosomen, die zwar Rab7 positiv sind, jedoch kein Notch beinhalten. Dieser wildtypische Phänotyp ist auch für die Rettung des *vps20* mutanten Hintergrunds (*vps20<sup>G270/vps20<sup>I3</sup></sup>*) durch *Vps20-V5* und *Vps20-NeonGreen*, die mit *Vps20resQ* exprimiert wurden, zu beobachten. Der Maßstabsbalken in A für A, C, E und G entspricht 100µm, Der Maßstabsbalken in B für B-B'', D-D'' und F-F'' entspricht 50µm. Die Imaginalscheiben sind so orientiert, dass anterior links und dorsal oben ist.

Im et al. (2009) haben, wie bereits erwähnt, für CHMP6 die notwendigen Aminosäuren für die Bindung an Vps25 beschrieben. Durch Aminosäuresequenz-Vergleiche konnte in

dieser Arbeit gezeigt werden, dass die für die Bindung an Vps25 benötigten Aminosäuren in Vps20 in Wirbeltieren und weiteren Metazoen konserviert sind (Abbildung 8.2, gelbe Kästen). Um die Auswirkungen der Mutation dieser Aminosäuren zu zeigen, wurden die Aminosäuren wie beschrieben ausgetauscht: Leucin<sup>25</sup>Arginin, Arginin<sup>31</sup>Alanin und Asparaginsäure<sup>32</sup>Alanin (Vps20<sup>ΔESCRT-II</sup>). Mit Hilfe von Vps20resQ lassen sich die eingefügten Mutationen erstmals für Metazoen unter physiologischen Bedingungen charakterisieren. Die mit Vps20<sup>ΔESCRT-II</sup> geretteten Tiere sterben embryonal, es ist also keine Rettung nachweisbar. Die nicht nachweisbare Rettung von Vps20<sup>ΔESCRT-II</sup> zeigt, dass das Expressionssystem Vps20resQ auch sensitiv gegenüber unfunktionalen Vps20-Varianten ist.

Diese Ergebnisse zeigen, dass Vps20resQ die Möglichkeit für Rettungsexperimente im *vps20* mutanten Hintergrund bietet. Vps20-Transgene werden durch die Integration der regulatorischen Elemente von *vps20* auf physiologischem Niveau exprimiert. Zusätzlich ist das Erstellen von neuen Vps20-Konstrukten deutlich einfacher als mit dem BAC-System. Das System reagiert sensitiv auf nicht funktionale Vps20-Varianten und es konnte gezeigt werden, dass auch Tag- und Fluorophor-markierte Vps20-Varianten für Rettungsexperimente genutzt werden können.

### 2.2.5 Potentielle Shrub-Bindestellen in Vps20

Mit Hilfe des Expressionssystems können nun Vps20-Varianten getestet werden in denen Änderungen in Aminosäuren vorgenommen wurden, die möglicherweise für die Bindung an Shrub benötigt werden. Das Rettungsvermögen des *vps20* mutanten Hintergrundes durch diese Vps20-Varianten liefert dann Hinweise darauf, ob die Bindung von Vps20 an Shrub gestört ist.

Wie bereits gezeigt, besitzt Vps20 wie das strukturell ähnliche Shrub basische und saure Oberflächen. Die Moleküle besitzen an der Spitze der helikalen Haarnadel eine eher basische Oberfläche und auf der anderen Seite des Moleküls einen sauren Bereich (Abbildung 2.14 D-E'). Die Interaktion zwischen Vps20 und Shrub könnte über elektrostatische Wechselwirkungen wie bei der Polymerisation von Shrub geschehen (Abbildung 1.4; McMillan et al. (2016)). Hierbei könnte die basische Spitze der zentralen helikalen Haarnadel von Vps20 mit der sauren Oberfläche von Shrub interagieren (Abbildung 2.20 A). Da beide Moleküle basische und die saure Oberflächenladungen

besitzen, wäre jedoch auch eine Interaktion über die basische Spitze der helikalen Haarnadel von Shrub mit der sauren Oberfläche von Vps20 möglich (Abbildung 2.20 B).

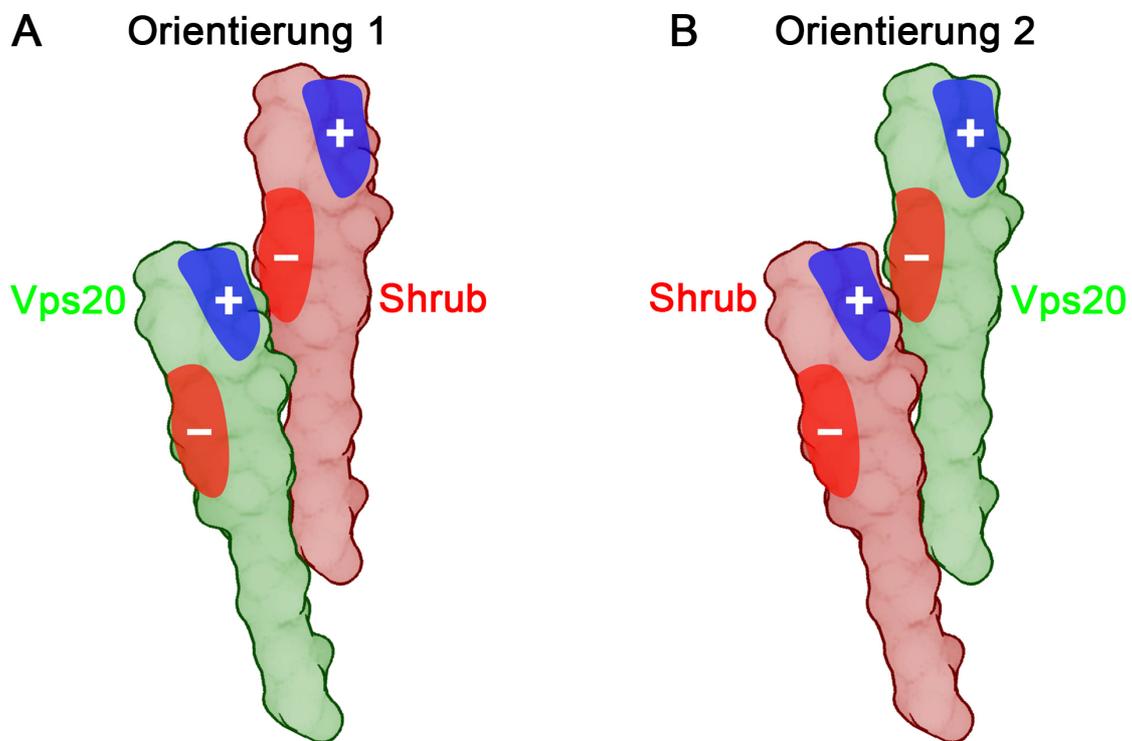


Abbildung 2.20: Vps20 und Shrub besitzen jeweils basische und saure Bereiche auf ihrer Oberfläche. Über elektrostatische Wechselwirkungen könnten diese beiden Oberflächen bei der Bindung interagieren. Hierbei wäre die Bindung in zwei Orientierungen möglich (A+B). Das Schema deutet die elektrostatischen Interaktionen zwischen negativen (rote Bereiche mit „-“) und positiven (blaue Bereiche mit „+“) Bereichen der beiden Moleküle an.

Um die beiden Interaktionsorientierungen zu überprüfen, wurden Molekulardynamik-(MD-) Simulationen durchgeführt (s. 6.5.2). In den MD-Simulationen wurden Hinweise auf die Bindungsbeteiligung verschiedener Aminosäuren in Vps20 bei der Interaktion von Vps20 und Shrub gesammelt. Diese Aminosäuren wurden dann in Vps20-Varianten ausgetauscht und in Rettungsexperimenten überprüft.

Die MD-Simulationen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Stephan Schott-Verdugo (Institut für Bio- und Geowissenschaften; Bioinformatik (IBG-4); FZ Jülich; AG Prof. Dr. Holger Gohlke) durchgeführt. Hierbei wurden Fragmente von Shrub (Aminosäuren (AS) 18-129) und Vps20 (AS 20-123) verwendet, die den Großteil des  $\alpha 1$ - $\alpha 2$ -Loops beinhalten. Es wurden zwei Shrub-Moleküle, deren Bindung aneinander bekannt ist (McMillan et al., 2016), und ein Vps20-Molekül verwendet. Die Verwendung von zwei Shrub-Moleküle sollte das wachsende Shrub-Polymer simulieren, was die Bindung von Vps20 auf Bereiche reduziert, die auch während der Polymerisation zugänglich sind. Vps20 wurde für die

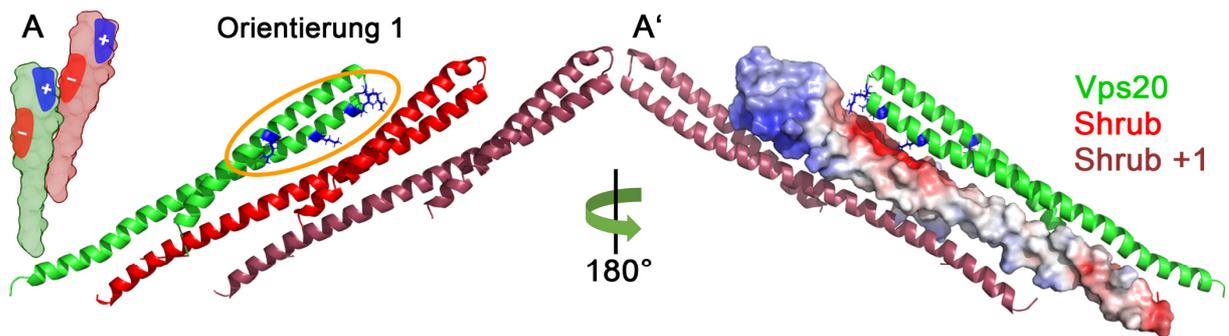
---

MD-Simulation in den beiden, in Abbildung 2.20 gezeigten, Orientierungen neben dem Shrub-Dimer platziert.

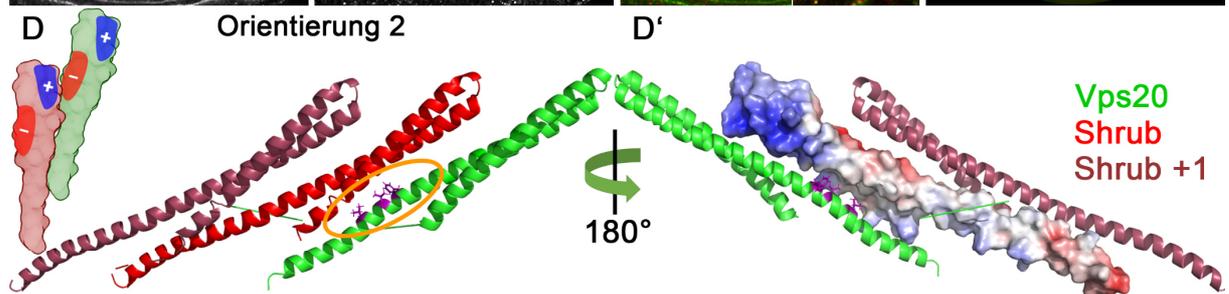
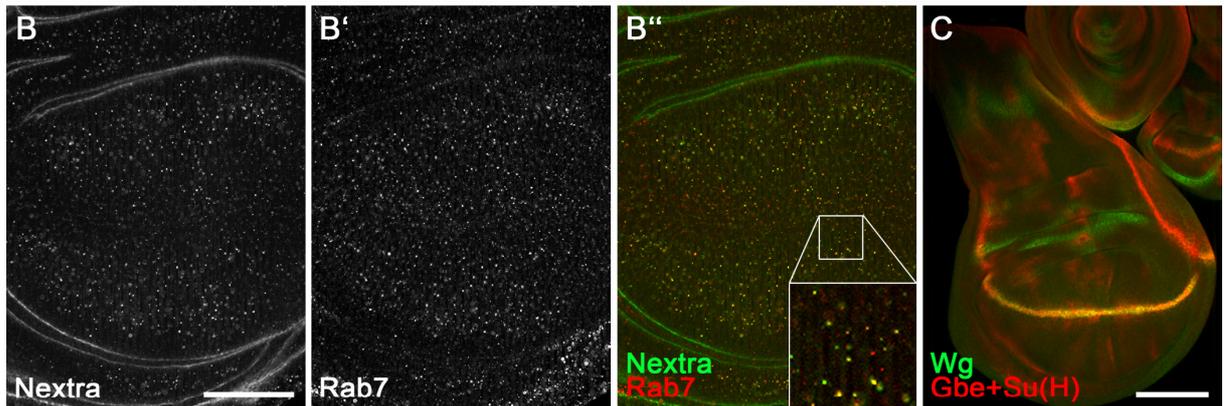
Die MD-Simulation für die zwei unterschiedlichen Orientierungen haben mögliche Bindungen von Shrub an Vps20 identifiziert (Abbildung 2.21 A-A'+D-D', Anhang, Abbildung 8.3). Hierbei bindet Vps20 an Shrub, sodass sich auf gegenüberliegender Seite das zweite Shrub-Molekül befindet. Die strukturell ähnlichen Moleküle bilden ein Trimer in dem die  $\alpha 1$ - $\alpha 2$ -Helices parallel ausgerichtet sind (Abbildung 2.21 A-A', D-D').

In der ersten Orientierung, welche in den Simulationen als am wahrscheinlichsten identifiziert wurde, wird die Hauptbindung von Vps20 an Shrub über basische Aminosäurereste in Vps20 vermittelt: Arginin40 (R40), Arginin60 (R60), Arginin63 (R63) und Lysin70 (K70). Diese Aminosäuren bzw. der basische Charakter sind hochkonserviert (vgl. Anhang, Abbildung 8.2). In dem simulierten Komplex ist zu erkennen, dass diese Aminosäuren einen sauren Bereich in dem gebundenen Shrub kontaktieren (Abbildung 2.21 A'). Die beteiligten Aminosäuren könnten also elektrostatische Wechselwirkungen ausbilden.

Durch den Austausch der Aminosäuren zu Alaninen ist die basische Ladung der Aminosäuren (R40, R60, R63 und K70) neutralisiert (Vps20 R40A, R60A, R63A, K70A). Dadurch ist die Bindung über elektrostatische Wechselwirkungen, wie sie in der Orientierung eins der Simulation gezeigt wurde, wahrscheinlich nicht mehr möglich. Die Vps20-Variante, in der diese basischen Aminosäuren zu Alaninen getauscht wurden, kann den *vps20* mutanten Phänotyp in einem Rettungsexperiment jedoch vollständig retten. Die Expression von Vps20 R40A, R60A, R63A, K70A rettet die embryonale Letalität und die endosomale Verteilung von Notch ist wildtypisch (Abbildung 2.21 B-B''). Der Notch-Rezeptor ist wie im Wildtyp an der Plasmamembran und in Rab7 positiven Endosomen nachweisbar. Auch die Aktivierung des Notch-Signalwegs ist wildtypisch (Abbildung 2.21 C). Sowohl *wg* als auch *Gbe+Su(H)* zeigen ein wildtypisches Expressionsmuster. Parallel wurden auch Einzelaustausche der Aminosäuren analysiert, welche den *vps20* mutanten Phänotyp erwartungsgemäß auch alle vollständig retten (nicht gezeigt).



*Vps20<sup>G270</sup>/Vps20<sup>3</sup>; Vps20 R40A, R60A, R63A, K70A*



*Vps20<sup>G270</sup>/Vps20<sup>3</sup>; Vps20 F97A, V100A, V104A*

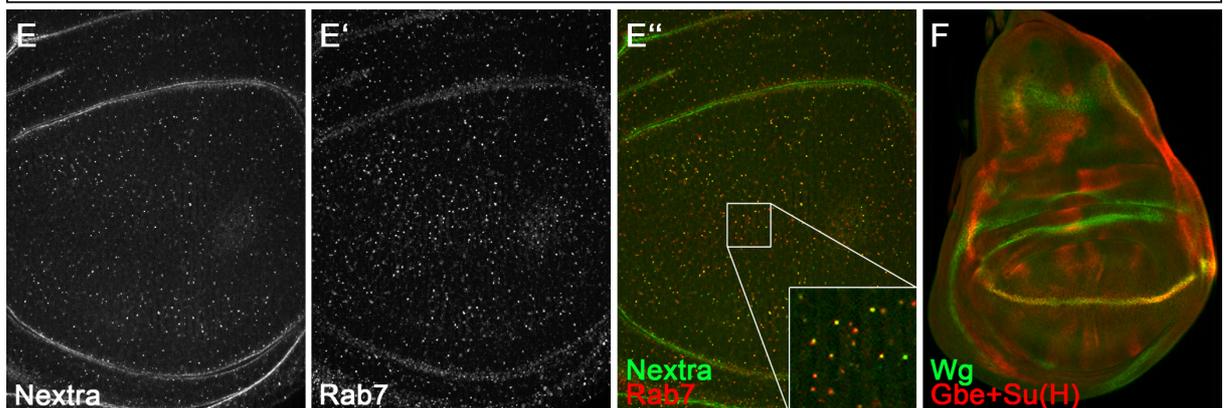


Abbildung 2.21: Überprüfung der möglichen Shrub-bindenden Aminosäuren in Vps20. Molekulardynamik Simulationen haben für die Bindung von Vps20 an ein Shrub Dimer zwei mögliche Orientierungen vorhergesagt. In Orientierung eins vermitteln basische Aminosäuren in Vps20 (R40, R60, R63, K70, Aminosäuren in blau als Stäbchenmodell gezeigt) die Bindung an die saure Oberfläche von Shrub (A+A', orange Ellipse). A' ist A um 180° gedreht und im Shrub-Molekül, an das Vps20 bindet, ist das Oberflächenpotential gezeigt, welches mit ABPS-electrostatics berechnet wurde. Rot repräsentiert hierbei die saure und Blau die basische Oberfläche. In Orientierung zwei vermitteln F97, V100 und V104 die Bindung an Shrub über hydrophobe Wechselwirkungen (B+B', orange Ellipse: Aminosäuren in Pink als

---

Stäbchenmodell gezeigt). B' ist B um 180° gedreht und im Shrub-Molekül, an das Vps20 bindet, ist das Oberflächenpotential gezeigt, welches mit ABPS-electrostatics berechnet wurde. Rot repräsentiert hierbei saure und Blau basische Oberfläche. Die Rettung des *vps20* mutanten Hintergrundes (*vps20<sup>rG270</sup>/vps20<sup>l3</sup>*) durch Vps20-Varianten in denen die Aminosäuren dieser beiden möglichen Bindungen zu Alaninen mutiert wurden, zeigen vollständige Rettung. Sowohl die Endosomengröße, die Verteilung von Notch in Endosomen (Nextra, Rab7), als auch die Regulation des Notch-Signalwegs sind wildtypisch (Wg, Gbe+Su(H)) (C-D, E-F). Der Maßstabsbalken in C für C-C'' und E-E'' entspricht 50µm, der Maßstabsbalken in D für D und F entspricht 100µm. Die Imaginalscheiben sind so orientiert, dass anterior links und dorsal oben ist.

---

In der zweiten Orientierung wird in der Simulation die Hauptbindung von Shrub an Vps20 nicht über elektrostatische, sondern über hydrophobe Wechselwirkungen durch die Aminosäuren Phenylalanin97 (F97), Valin100 (V100) und Valin104 (V104) vermittelt. Der Austausch dieser Aminosäuren zu Alaninen sollte die Größe der unpolaren Aminosäuren reduzieren und dadurch die hydrophoben Wechselwirkungen, die zur Bindung führen, schwächen. Die Vps20-Variante, in der die Aminosäuren für die hydrophoben Wechselwirkungen (F97, V100 und V104) zu Alaninen mutiert wurden (Vps20 F97A, V100A, V104A), kann den Phänotyp des *vps20* mutanten Hintergrundes in einem Rettungsexperiment jedoch ebenfalls vollständig retten kann. Es entstehen fertile Nachkommen. Die endosomale Fracht Notch lokalisiert wildtypisch an der Plasmamembran und in Rab7 positiven Endosomen in den Zellen der Flügelimaginalscheibe (Abbildung 2.21 E-E''). Die Aktivierung des Notch-Signalwegs ist ebenfalls wildtypisch (Abbildung 2.21 F).

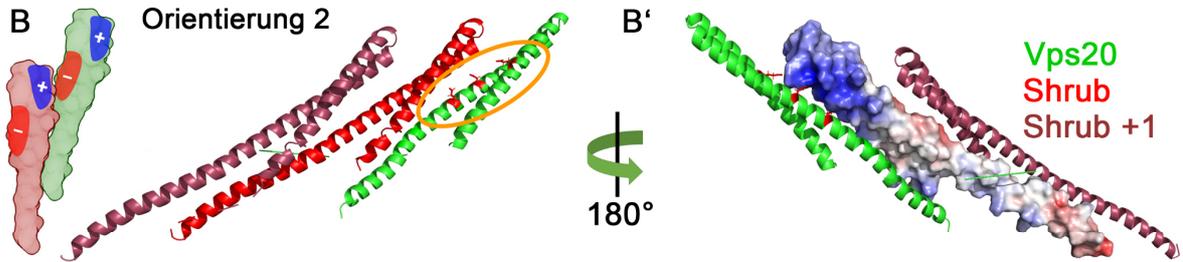
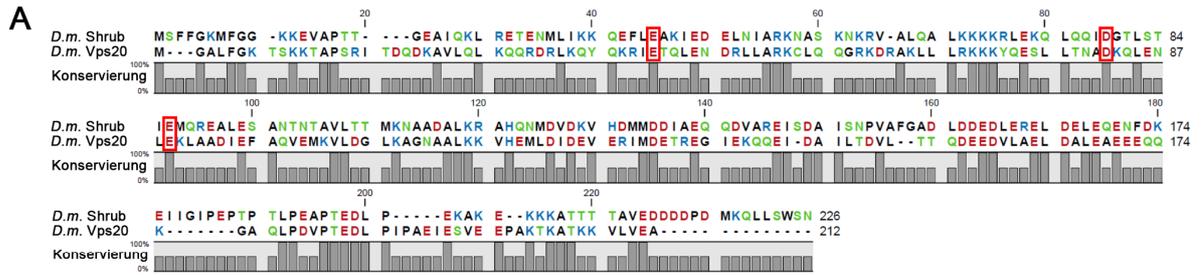
Diese Mutationen in den für die simulierte Bindung hauptsächlich notwendigen Aminosäuren hat keinen Einfluss auf das Rettungsvermögen der Vps20-Varianten. Durch die Neutralisation der basischen Aminosäuren und die Veränderung der Größe der Aminosäuren für hydrophobe Wechselwirkungen ändert sich das Rettungsvermögen der Vps20-Varianten bei der Betrachtung einzelner Austausche nicht.

Die MD-Simulation hat für die Orientierung zwei die Hauptbindung über hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Vps20 und Shrub identifiziert. Um auch in Orientierung zwei die Möglichkeit der Interaktion von Shrub und Vps20 über elektrostatische Wechselwirkungen zu überprüfen wurde nach sauren Aminosäuren in Vps20 gesucht, die an der Bindung beteiligt sein könnten. Hierfür wurde ein Aminosäure-Sequenzalignment der beiden Proteine durchgeführt. Shrub und Vps20 besitzen zu 28% identische Aminosäuren und 45% ähnliche Aminosäuren (berechnet durch EMBOSS Needle). Durch den Vergleich der Aminosäuresequenz von Vps20 und Shrub fiel auf, dass drei saure Aminosäuren, die für die Shrub Polymerisation benötigt werden, an gleicher Position

auch in Vps20 vorkommen. Glutaminsäure<sup>40</sup>, Asparaginsäure<sup>79</sup> und Glutaminsäure<sup>86</sup> in Shrub (McMillan et al., 2016) befinden sich an gleicher Position auch in Vps20 (Glutaminsäure<sup>42</sup> (E42), Asparaginsäure<sup>82</sup> (D82) und Glutaminsäure<sup>89</sup> (E89)) (Abbildung 2.22 A). Auch in den Bindungssimulationen, die mit Hilfe des GB<sup>OBC II</sup>-Models analysiert wurden ist die Beteiligung dieser Aminosäuren an der Bindung zu finden (Anhang, Abbildung 8.5, (Onufriev et al., 2004)). Die sauren Reste der Aminosäuren kontaktieren in der simulierten Bindung einen basischen Bereich in Shrub (Abbildung 2.22 B').

Um die mögliche Beteiligung dieser sauren Aminosäuren an der Bindung von Vps20 und Shrub zu überprüfen, wurde eine Vps20-Variante erstellt, in der die Aminosäuren durch Ersetzen mit Alaninen neutralisiert wurden (E42A, D82A und E89A). Elektrostatische Wechselwirkungen über diese Aminosäuren wurden so vermutlich verhindert. Wird diese Variante (Vps20 E42A, D82A, E89A) in einem Rettungsexperiment eingesetzt, in dem der Phänotyp des *vps20* mutanten Hintergrundes gerettet werden soll, kann diese Variante nicht vollständig retten. Der Notch-Rezeptor akkumuliert in vergrößerten Rab7-positiven Endosomen (Abbildung 2.22 C-C'). Diese Notch-Vesikel kommen jedoch nicht in jeder Zelle der Imaginalscheibe vor. Auch auf die Aktivierung des Notch-Signalwegs ist ein deutlicher Einfluss zu erkennen. Sowohl Wg-Expression, als auch der Notch-Reporter Gbe+Su(H) sind ektopisch aktiviert (Abbildung 2.22 D-D'). Hierbei ist die Aktivität der beiden Marker besonders im Bereich der späteren Gelenkregion des Flügels erhöht. Diese Aktivierung ist mit Gbe+Su(H) in Flecken zu beobachten. Besonders in den Gelenkregionen ist zusätzlich dazu auch Überproliferation der Imaginalscheibe zu beobachten (Abbildung 2.22 D'').

Die weitere Analyse der Endosomen in dem, durch Vps20 E42A, D82A, E89A geretteten Phänotyp des *vps20* mutanten Hintergrundes, in denen sich der Notch-Rezeptor befindet, zeigen, dass diese an diesen vergrößerten Endosomen auch die früher agierende ESCRT-0 Untereinheit Hrs akkumuliert. Eine Akkumulation von Shrub ist in diesen Endosomen nicht nachweisbar (Abbildung 2.22 E-F'''). Shrub liegt zytoplasmatisch vor. Nachkommen aus diesem Rettungsexperiment sterben im frühen Puppenstadium. Die beobachtete Rettungsfähigkeit dieser Vps20-Variante lässt sich auch nicht durch die Expression von zwei Kopien des Expressionsvektors verbessern.



*Vps20<sup>G270</sup>/Vps20<sup>I3</sup>; Vps20 E42A, D82A, E89A*

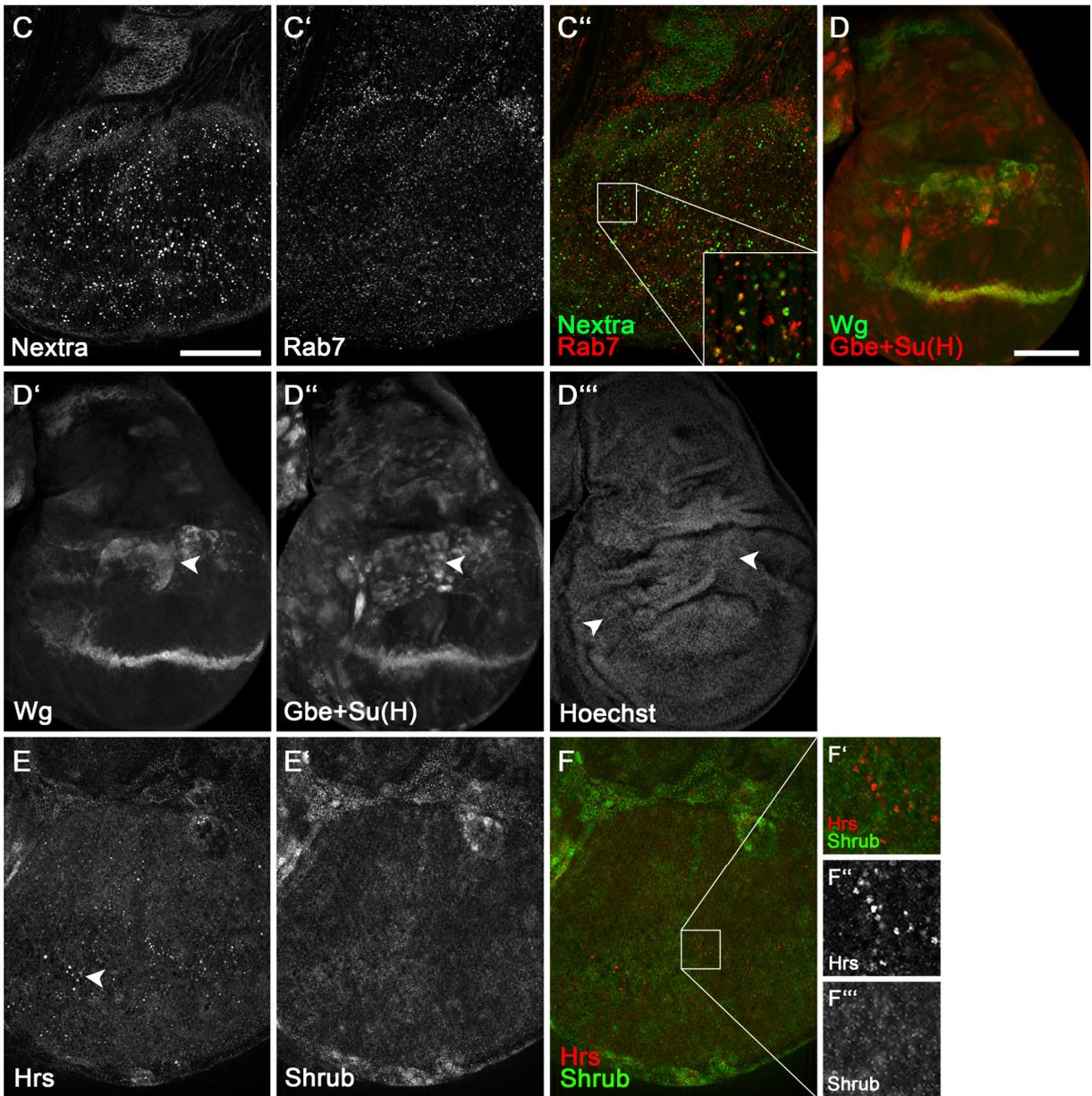


Abbildung 2.22 Analyse von sauren Aminosäuren in Vps20 bei der möglichen Beteiligung an der Shrub Bindung durch Rettungsexperimente im *vps20* mutanten Hintergrund. Das Aminosäure-Sequenzalignment von *Drosophila (D.m.)* Vps20 und *D.m.* Shrub zeigt, dass drei für die Polymerisation von Shrub benötigte saure Aminosäuren (E40, D79 und E86; McMillan et al. (2016)) auch in Vps20 vorkommen (E42, D82 und E89) (A). Diese sauren Aminosäuren könnten bei einer Bindung von Vps20 an Shrub in Orientierung zwei einen basischen Bereich in Shrub kontaktieren und so die Bindung vermitteln (B+B', orange Ellipse, Aminosäuren in Rot als Stäbchenmodell dargestellt). Ein Rettungsexperiment des *vps20* mutanten Hintergrundes (*vps20<sup>rG270</sup>/vps20<sup>l3</sup>*) mit einer Vps20-Variante, in der diese Aminosäuren neutralisiert wurden (Vps20 E42A, D82A, E89A), zeigt eine Vergrößerung der Endosomen in denen der Notch-Rezeptor (Nextra) lokalisiert (C-C'). Die Imaginalscheiben sind überproliferiert (D'', Pfeilspitzen). Die Aktivierung von Wingless und die Aktivität von Gbe+Su(H) sind ektopisch nachweisbar (D-D'). Diese ektopische Aktivierung, sowie die Überproliferation ist besonders in der Gelenkregion des zukünftigen Flügels nachweisbar (D'-D'', Pfeilspitzen). In den vergrößerten Endosomen ist auch Hrs nachweisbar (E, Pfeilspitze, E''), Shrub ist hingegen zytoplasmatisch lokalisiert. Der Maßstabsbalken in C für C-C' und E-F entspricht 50µm, der Maßstabsbalken in D für D-D'' entspricht 100µm. Die Imaginalscheiben sind so orientiert, dass anterior links und dorsal oben ist.

Dieser beobachtete Phänotyp des Rettungsexperiments durch Vps20 E42A, D82A, E89A stellt vermutlich eine Vps20-hypomorphe Situation dar. Die embryonale Letalität ist in das Puppenstadium gerettet, jedoch ist die Aktivierung des Notch-Signalwegs nicht auf seine wildtypischen Bereiche begrenzt. Auch die Endosomen in denen sich Notch befindet sind vergrößert. Die früh bei der ILV Bildung agierende ESCRT-Untereinheit (Hrs) ist an den vergrößerten Endosomen nachweisbar, Shrub, welches durch Vps20 rekrutiert wird, ist dort jedoch nicht verstärkt akkumuliert.

Zusammen zeigen die Ergebnisse, dass die in den Simulationen für die Shrub-Bindung identifizierten Bereiche in Vps20 durch Mutationen in einem Rettungsexperiment nicht den Ausfall von Vps20 zeigen. Die Neutralisation mehrerer saurer Aminosäuren in Vps20 führt jedoch zu einem hypomorphen *vps20* Phänotyp. Die Rettungsexperimente weisen darauf hin, dass Shrub durch die Mutationen in Aminosäuren in Vps20, die eine Bindungsorientierung im Einzelnen betreffen immer noch gebunden werden könnte. Dadurch könnte eine Rekrutierung an das Endosom vermutlich weiter möglich sein.

Um die Bindung von Vps20 an Shrub und die Beteiligung der hier analysierten Aminosäuren weiter zu charakterisieren, wurden Co-Immunopräzipitationen von Shrub mit verschiedenen Vps20-Varianten durchgeführt (s. 6.4.3). Die Vps20-Varianten mit den analysierten Aminosäureaustauschen (Vps20 R40A, R60A, R63A, K70A; Vps20 V97A, F100A, F104A und Vps20 E42A, D82A, E89A) wurden in *Drosophila* S2-Zellen zusammen mit HA markiertem Shrub exprimiert (Abbildung 2.23 A) und nach Lysis durch V5-Antikörper-gekoppelte Beads immobilisiert. Anschließend wurden sie auf die Co-

Präzipitation von Shrub untersucht. HA markiertes Shrub kann über Vps20-V5 präzipitiert werden. Durch die Aminosäureaustausche der hier analysierten Vps20-Varianten wird die Präzipitation von Shrub nicht verhindert (Abbildung 2.23 B). In Vps20-V5 R40A, R60A, R63A, K70A ließ sich eine reduzierte Shrub Präzipitation in allen erfolgreichen Versuchen nachweisen (n=3, Abbildung 2.23 B). Die hier durchgeführten Aminosäureaustausche in Vps20 verhindern die Bindung an Shrub also nicht vollständig.

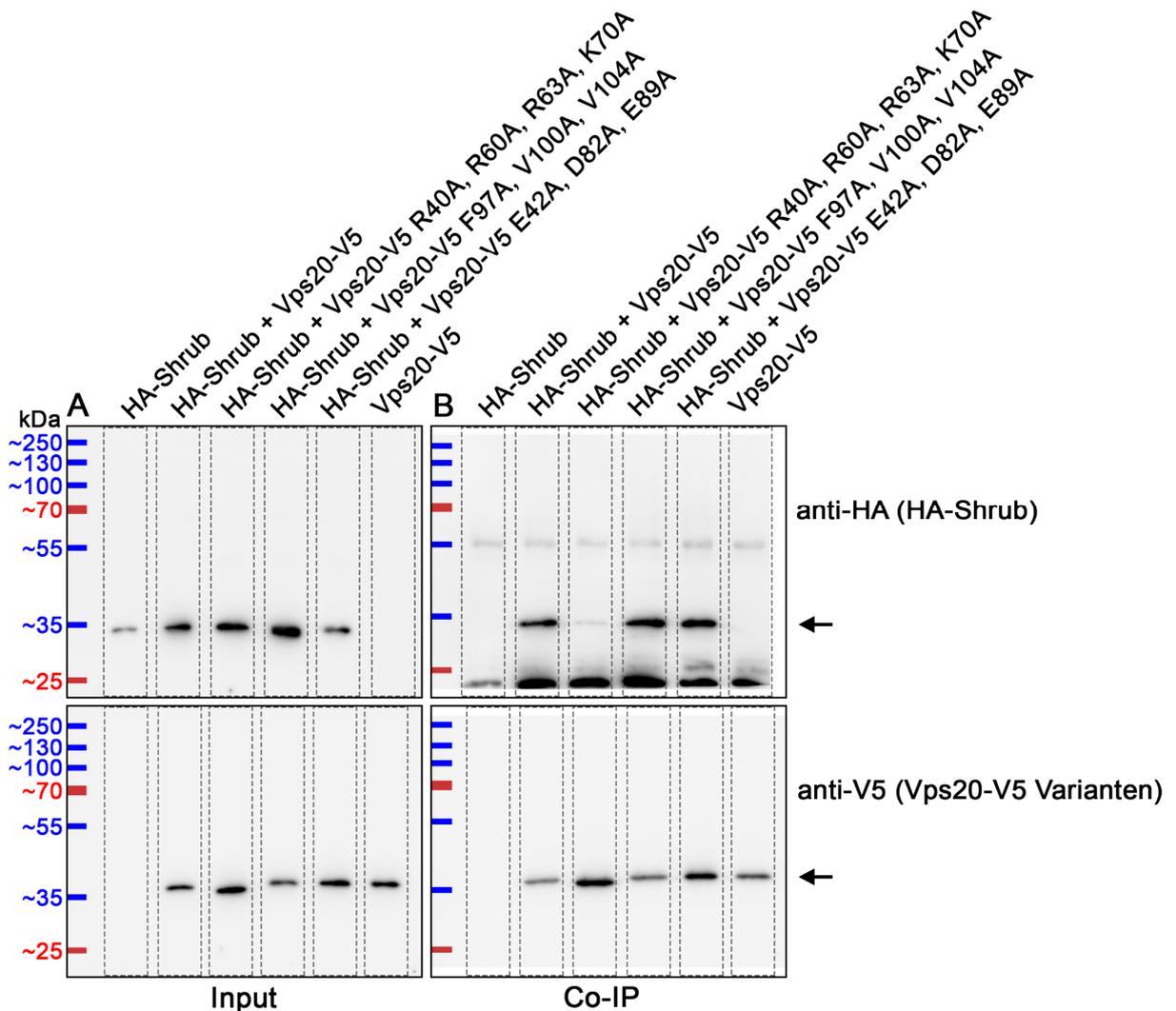


Abbildung 2.23: Co-Immunopräzipitation von HA-Shrub durch Vps20-V5-Varianten. SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot. Die Proben für den Input und die CoIP wurden jeweils auf zwei unterschiedliche Gele aufgeteilt um sie mit unterschiedlichen Antikörpern färben zu können. A: HA-Shrub wurde zusammen mit Vps20-Varianten (Vps20-V5, Vps20-V5 R40A, R60A, R63A, K70A; Vps20-V5 V97A, F100A, F104A und Vps20-V5 E42A, D82A, E89A) in S2-Zellen exprimiert (Input). HA-Shrub ist minimal unterhalb des 35kDa Markers nachweisbar. Die Vps20-V5-Varianten laufen minimal oberhalb des 35kDa Markers. B: Shrub wird durch alle Vps20-Varianten mit den hier analysierten Aminosäureaustauschen co-präzipitiert (Co-IP). Der Nachweis von HA-Shrub, was durch Vps20-V5 R40A, R60A, R63A, K70A co-präzipitiert wurde, ist jedoch schwächer.

Vps20 wird durch Vps25 an das Endosom rekrutiert und kann dort die Polymerisation von Shrub initiieren (Babst et al., 2002b; Teo et al., 2004; Yorikawa et al., 2005). Um eine mögliche Beteiligung von Vps25 an der Bindung zwischen Vps20 und Shrub zu untersuchen, wurden erneut in Zusammenarbeit mit Stephan Schott-Verdugo MD-Simulationen durchgeführt. In diesen Simulationen wurde zusätzlich zu Vps20 (AS 20-123) und zwei Shrub-Molekülen (AS 18-129) Vps25 (AS 90-174) einbezogen. Vps25 sitzt in der simulierten Anordnung auf Vps20 (Abbildung 2.24). Diese Bindung von Vps25 an Vps20 basiert auf der Kristallstruktur für die Bindung der Humanorthologe von Vps25 und Vps20 aneinander (Im et al., 2009). Die Bindung von Shrub an Vps20 ist mit Vps25 in beiden hier untersuchten Orientierungen möglich (vgl. Abbildung 2.21, Anhang, Abbildung 8.3 mit Anhang, Abbildung 8.10). Orientierung zwei ist dabei als wahrscheinlicher identifiziert worden (Anhang, Abbildung 8.10). Bei den Simulationen konnte ein Hinweis auf die Bindung von Vps25 an Shrub gesammelt werden. Vps25 kann hierbei, wenn Shrub an Vps20 in Orientierung zwei bindet, die Bindung stabilisieren, indem es über die Aminosäuren Glutaminsäure132, Asparagin133 und Histidin136 an Shrub bindet (Abbildung 2.24, türkis markierte Aminosäuren in Vps25 (Orange)).

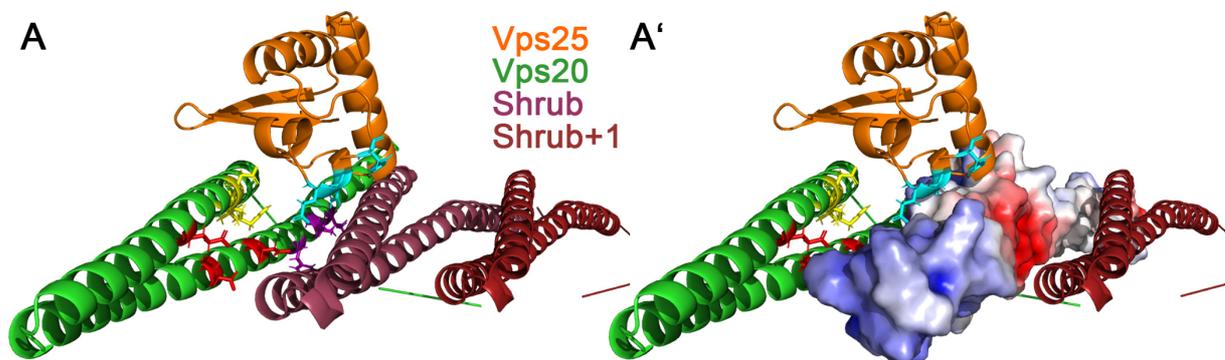


Abbildung 2.24: Simulierte Bindung von Vps20 an Shrub in Orientierung zwei mit einbezogenem Vps25. Vps20 (grün) bindet Shrub (dunkel violett) in Orientierung zwei. Ein weiteres Shrub-Molekül ist an das an Vps20 gebundene Shrub gebunden, was das wachsende Polymer darstellen soll (Shrub+1, dunkelrot). Vps25 (orange) bindet Vps20 von oben. Die Aminosäuren, die mögliche Bindungen ausbilden können, sind unterschiedlich farbig markiert und als Stäbchenmodell gezeigt. Die rot markierten Aminosäuren in Vps20 sind die sauren Aminosäuren, für die eine mögliche Beteiligung der Bindung zwischen Vps20 und Shrub in Orientierung zwei gezeigt wurde (E42, D82, E89). Die pink markierten Aminosäuren in Vps20 sind die Aminosäuren, die hydrophobe Wechselwirkungen zu Shrub ausbilden (F97, V100, V104). In Gelb sind die Aminosäuren in Vps20 dargestellt, die wahrscheinlich an der Interaktion mit Vps25 beteiligt sind (L25, R31, D32). In Türkis sind die durch die Simulation identifizierten Aminosäuren in Vps25 dargestellt, die möglicherweise an Shrub binden (E132, N133, H136). In A' ist von Shrub, an das Vps20 und Vps25 gebunden sind das Oberflächenpotential dargestellt, welches mit ABPS-electrostatics berechnet wurde. Rot repräsentiert hierbei die saure und Blau die basische Oberfläche.

### 2.2.6 Die Myristoylierung von Vps20

Das hier etablierte Expressionssystem (Vps20resQ) bietet die Möglichkeit die Notwendigkeit der Myristoylierung von Vps20 in *Drosophila* zu untersuchen. Hierbei wurde neben der Lokalisation auch die Notwendigkeit der Myristoylierung für die Funktion von Vps20 analysiert.

Durch die Verwendung von Vps20resQ wird die Auswirkung fehlender Myristoylierung von Vps20 erstmals *in vivo* auf physiologischem Niveau analysiert. Das N-terminale Glycin, was für die Myristoylierung benötigt wird (Übersicht in Farazi et al., 2001), ist in *Drosophila*, wie auch in anderen Spezies, konserviert vorhanden (Abbildung 2.25 A).

Für die Analyse der Myristoylierung wurde eine Vps20-Variante erstellt, in der das N-terminale Glycin für die Myristoylierung entfernt wurde (Vps20ΔMyr). In einem Rettungsexperiment im *vps20* mutanten Hintergrund ist durch die Expression von Vps20ΔMyr nur eine partielle Rettung des Phänotyps des *vps20* mutanten Hintergrundes nachweisbar. Die Nachkommen sterben im frühen Puppenstadium. Die Flügel-imaginalscheiben sind besonders im Bereich der zukünftigen Gelenkregion des Flügels überproliferiert (Abbildung 2.25 B, Pfeilspitze). Die Betrachtung der Aktivierung des Notch-Signalwegs zeigt, dass sowohl die Wg-Expression als auch Gbe+Su(H) ektopisch aktiviert sind (Abbildung 2.25 B'+B'', Pfeilspitzen). Die Expression von *wg* zeigt sich besonders in der Gelenkregion, wohingegen Gbe+Su(H) auch im Flügelfeld und in weiteren Expressionsdomänen aktiviert wird. Es kommt in der Gelenkregion zu Zelltod (Abbildung 2.25 C, Pfeil). Der Notch-Rezeptor befindet sich in stark vergrößerten Endosomen, die Rab7 positiv sind (Abbildung 2.25 D-D').

Um die Auswirkung der fehlenden Myristoylierung von Vps20 auf die zelluläre Lokalisation zu überprüfen, wurde V5-markiertes Vps20 (Vps-V5) sowohl mit, als auch ohne Myristoylierungs-Glycin (Vps20ΔMyr-V5) in der posterioren Hälfte der Imaginalscheibe überexprimiert. Hierfür wurde die Expression mit dem *hh*-Gal4 Treiber für 48 Stunden induziert. Der Nachweis von überexprimiertem Vps20-V5 in der Imaginalscheibe zeigt eine zytoplasmatische Lokalisation mit zusätzlicher Akkumulation an der Plasmamembran der Zellen (Abbildung 2.25 E'', F). Eine Kolokalisation mit Notch-Vesikeln ist nicht nachweisbar (Abbildung 2.25 F). Vps20 ohne das, für die Myristoylierung notwendige, Glycin ist im Zytoplasma nachweisbar (Abbildung 2.25 G'').

Die Überexpression dieser Vps20-Variante hat keinen Einfluss auf die Lokalisation des Notch-Rezeptors oder die Vesikelgröße (Abbildung 2.25 G').

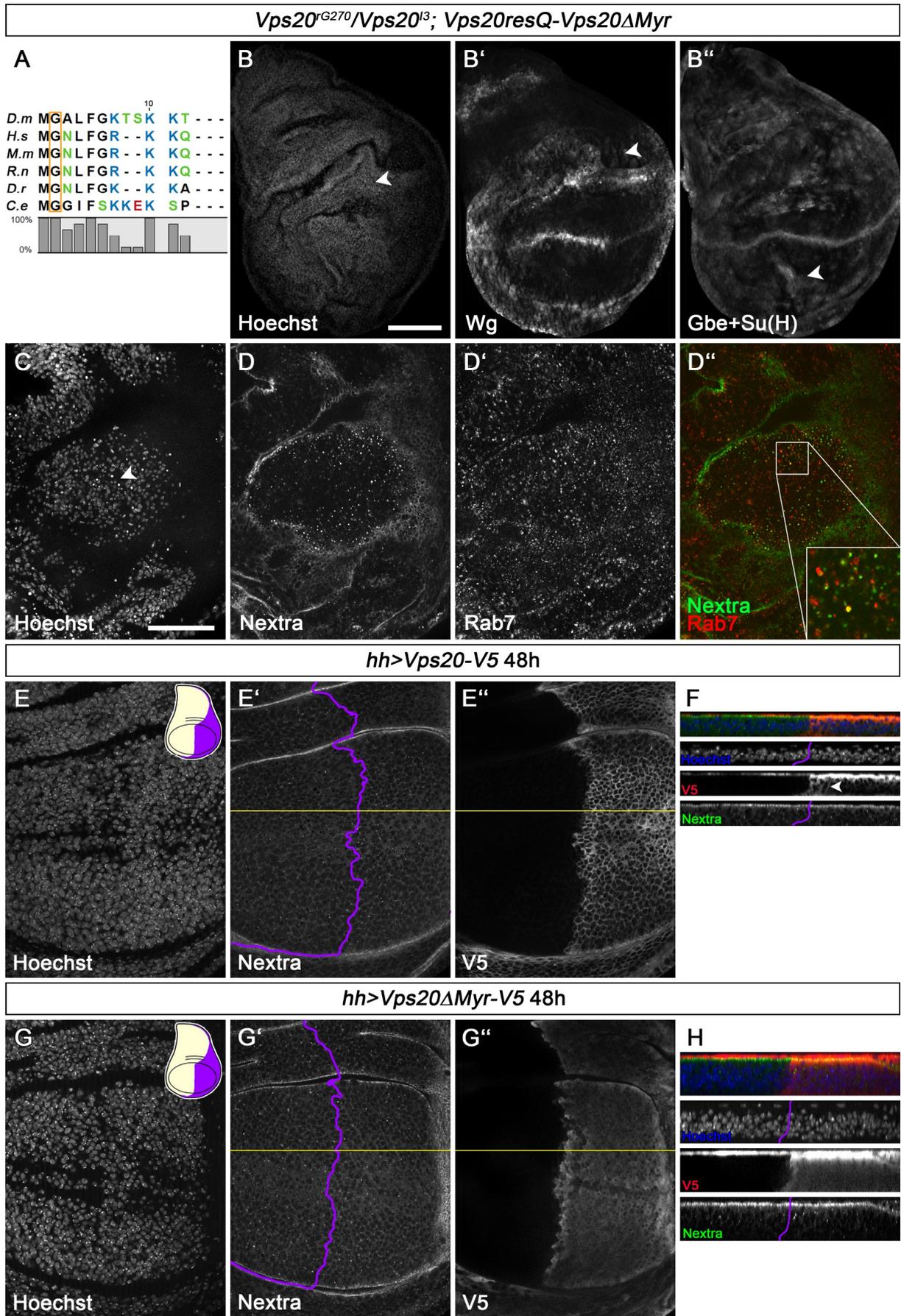


Abbildung 2.25: Analyse der Myristoylierung von Vps20 in Flügelimaginalscheiben. Das Aminosäuresequenzalignment der ersten 10-12 Aminosäuren von Vps20 Orthologen aus verschiedenen Spezies zeigt, dass das für die Myristoylierung notwendige Glycin konserviert ist (A, *D.m.*=*Drosophila melanogaster*; *H.s.*=*Homo sapiens*; *M.m.*=*Mus musculus*; *R.n.*=*Rattus norvegicus*; *D.r.*=*Danio rerio*; *C.e.*=*Caenorhabditis elegans*). Die Rettung des *vps20* mutanten Hintergrundes (*vps20<sup>G270</sup>/vps20<sup>l3</sup>*) mit einer Vps20-Variante, in der das Glycin für die Myristoylierung fehlt (Vps20ΔMyr), zeigt eine unvollständige Rettung. Die Imaginalscheiben sind besonders im Bereich der Gelenkregion überproliferiert (B, Pfeilspitze) und zeigen eine ektopische Aktivierung der *wingless* Expression (Wg) und Gbe+Su(H) (B'+B'', Pfeilspitzen). Es ist Zelltod festzustellen (C, Pfeilspitze) und die Endosomen sind vergrößert. Der Notch-Rezeptor (Nextra) und der endosomale Marker Rab7 sind in diesen vergrößerten Endosomen nachweisbar (D-D'). Der Nachweis von überexprimiertem Vps20-V5 in der posterioren Hälfte der Flügelimaginalscheibe zeigt eine zytoplasmatische Lokalisation von Vps20 mit zusätzlicher Membranlokalisation (D''+F, Pfeilspitze). Der gelbe Strich in E'' markiert die Position, an der die Z-Projektion der Ebenen eines Z-Stapels in F erstellt wurde. Eine Kolokalisation von Vps20-V5 mit Notch-Vesikeln ist nicht nachweisbar (F). Die zusätzliche Membranlokalisation ist bei der Überexpression von Vps20ΔMyr nicht mehr nachweisbar (G''+H). Der gelbe Strich in G'' markiert die Position, an der die Z-Projektion der Ebenen eines Z-Stapels in H erstellt wurde. Das Kompartiment, in dem die Expression aktiviert wurde ist in den schematischen Flügelimaginalscheiben in Violett gezeigt (E+G). Die Expressionsgrenzen sind in Violett markiert (E', F, G', H). Der Maßstabsbalken in B für B-B'' entspricht 100µm, der Maßstabsbalken in C für C-E'' und G-G'' entspricht 50µm. Die Imaginalscheiben sind so orientiert, dass anterior links und dorsal oben ist. In den Z-Projektionen (F+H) befindet sich apikal oben.

Die Analyse der Myristoylierung zeigt die Notwendigkeit für die vollständige Funktion und die korrekte subzelluläre Lokalisation von Vps20 in *Drosophila*. In dem Rettungsexperiment mit nicht-myristoyliertem Vps20 ist ein hypomorpher Phänotyp zu beobachten, was darauf hinweist, dass die Myristoylierung den Prozess der Membranassoziation von Vps20 zwar effektiver macht, die Rekrutierung von Vps20 durch Vps25 jedoch noch möglich scheint.

### 2.2.7 Analyse der subzellulären Lokalisation von Vps20

Um die Lokalisation von Vps20 in den Zellen der Flügelimaginalscheiben zu untersuchen, wurden die auf endogenem Niveau exprimierte Vps20-Varianten mit einem V5-Tag versehen. Der Nachweis von V5 markiertem Vps20 ist in Geweben auf endogenem Niveau nicht möglich (nur in Überexpression, s. Abbildung 2.25), wohingegen eine Vps20-Variante, die mit einem Fluorophor markiert ist, die Möglichkeit des Nachweises bietet.

Vps20-NeonGreen ist hauptsächlich zytoplasmatisch lokalisiert (Abbildung 2.26 A, B', C'). Werden verschiedene Ebenen einer Z-Stapel Aufnahme betrachtet, ist Vps20 mit Aussparung des Zellkerns im Zytoplasma lokalisiert. Hierbei zeigt es nur wenig offensichtliche Kolokalisation mit endosomaler Fracht (Notch) oder endosomalen

Markern (Rab7, Abbildung 2.26 B, C, E). In seltenen Fällen ist Vps20 an Endosomen nachweisbar. Hier kolokalisiert es mit Notch und dem endosomalen Marker Rab7 (Abbildung 2.26 C-C''). Die Beobachtung, dass wenig endosomale Lokalisation nachweisbar ist, wurde auch für endogen exprimiertes Shrub gezeigt. Auch dieses endosomal assoziierte Protein ist nur in seltenen Fällen am Endosom nachweisbar (Masterarbeit: Brüser (2013)).

Die Reduktion der ATPase Vps4 kann in Zellen dafür genutzt werden, um die ESCRT-III Untereinheiten an vergrößerten Endosomen zu akkumulieren. Durch die Reduktion von Vps4-Aktivität werden weniger ESCRT-III Komponenten vom Endosom disassembliert, was dazu führt, dass sie dort verweilen und die ILV-Bildung in diesen Endosomen gestört ist (Babst et al., 1998). Hier wurde die Aktivität von Vps4 im posterioren Kompartiment durch die Expression von Vps4-RNAi mit dem *hh-* (*hedgehog-*) Gal4 Treiber für 26 Stunden reduziert. Die reduzierte Aktivität von Vps4 führt dazu, dass Vps20-NeonGreen an vergrößerten Endosomen zusammen mit Notch und der ESCRT-III Komponente Shrub akkumuliert (Abbildung 2.26 D-F'').

Vps20-NeonGreen kann, anders als die V5-markierten Varianten, für die Analyse der Lokalisation von Vps20 auf endogenem Expressionsniveau genutzt werden. Zusammen zeigen diese Ergebnisse, dass Vps20-NeonGreen, welches ein funktionales Fusionsprotein darstellt, sowohl zytoplasmatische als auch endosomale Lokalisation zeigt. Die endosomale Lokalisation lässt sich, wie für die ESCRT-III Untereinheit Shrub gezeigt, durch die Reduktion der ATPase Vps4 erhöhen.

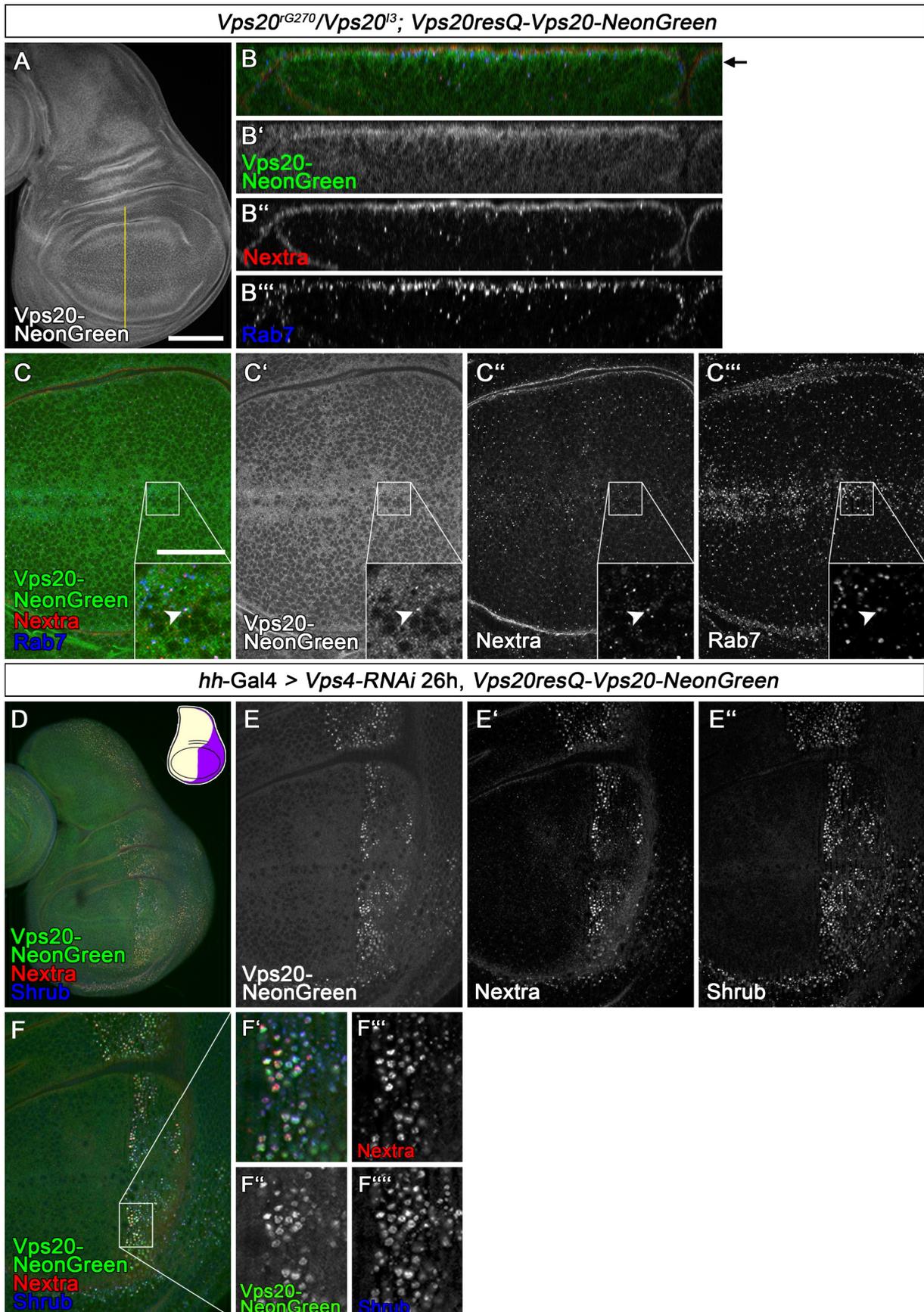


Abbildung 2.26: Analyse der Lokalisation von Vps20-NeonGreen in Flügelimaginalscheiben. Auf endogenem Niveau mit *Vps20resQ* exprimiertes Vps20-NeonGreen lokalisiert im Zytoplasma (A, B', C'). B-B''' zeigen eine Z-Projektion eines Z-Stapels an der Position, die in A mit einem gelben Strich markiert ist. Neben B ist

mit einem Pfeil die unten gezeigte Z-Ebenen markiert. In seltenen Fällen lokalisiert Vps20-NeonGreen mit der endosomalen Fracht (Nextra) an Endosomen (Rab7) (Ausschnittsvergrößerungen in C-C''). Durch die Expression von Vps4-RNAi in der posterioren Hälfte der Flügelimaginalscheibe mit *hh*-Gal4 für 26 Stunden akkumuliert Vps20-NeonGreen in stark vergrößerten Endosomen (D, E, F). Hier kolokalisiert es zusammen mit der endosomalen Fracht Notch (Nextra) und Shrub (E'-F''). Das Kompartiment, in dem die RNAi-Expression aktiviert wurde ist in den schematischen Flügelimaginalscheiben in Violett gezeigt (D). Der Maßstabsbalken in A für A und D entspricht 100µm, der Maßstabsbalken in C für C-C'' und E-F entspricht 100µm. Die Imaginalscheiben sind so orientiert, dass anterior links und dorsal oben ist. In den Z-Projektionen (B-B'') befindet sich apikal oben.

### 2.3 Die Interaktion von Shrub mit der endosomalen Membran

Die Polymerisation von Shrub wird durch die Rekrutierung durch Vps20 gestartet (Teis et al., 2008). Vps20 ist durch Myristoylierung in der Membran verankert und an Vps25 gebunden (Babst et al., 2002a; Babst et al., 2002b; Teo et al., 2004; Yorikawa et al., 2005). Für Shrub oder dessen Orthologe konnte kein Hinweis auf eine Myristoylierung gefunden werden. Um an die Membran zu binden und Einfluss auf dessen Krümmung zu nehmen und letztendlich das Abschnüren von intraluminalen Vesikeln zu gewährleisten, muss Shrub über Aminosäurereste direkt mit der Membran interagieren.

Um herauszufinden, über welche Aminosäurereste diese Bindung stattfindet, wurden in Zusammenarbeit mit Stephan Schott-Verdugo (AG Prof. Dr. Holger Gohlke) erneut MD-Simulationen durchgeführt (s. 6.5.3). Hierbei wurde ein monomeres Shrub-Molekül verwendet, das aus der zentralen helikalen Haarnadel besteht, die durch Röntgenkristallographie bestimmt wurde (Aminosäure 18-129, McMillan et al. (2016)). In der Simulation wurde das monomere Shrub-Molekül in einem simulierten Membransystem (Schott-Verdugo und Gohlke, 2019) positioniert und anschließend wurde die Position des Shrub-Moleküls um 25Å über die Membran verschoben. Das Membransystem besaß eine Lipidkomposition von DOPC:DOPE:DOPS von 100:25:10. Während der Simulation wurde der Abstand zwischen den Phospholipiden der Membran und den Aminosäureresten von Shrub über die Zeit (500ns) beobachtet. Situationen, in denen der Abstand zwischen Aminosäureresten von Shrub und den Phospholipiden der Membran kleiner als 4,5Å ist, wurden als direkte Kontakte gezählt. Ihre Bindung wurde mit Hilfe der CPPTRAJ nativecontacts routine evaluiert (Roe und Cheatham, 2013).

Nachdem sich das wildtypische Shrub-Monomer (AS 10-143) oberhalb der Membran frei bewegen und drehen kann, ist nach kurzer Zeit eine Assoziation mit der Membran zu erkennen (Abbildung 2.27 A). Auch bei weiteren Wiederholungen wird diese Assoziation deutlich (Abbildung 2.27 B). In einigen Versuchen bewegt sich das Molekül etwas länger oberhalb der Membran, jedoch nähert es sich immer über die Zeit der Membran an (Abbildung 2.27 B vgl. grüner und blauer Graph).

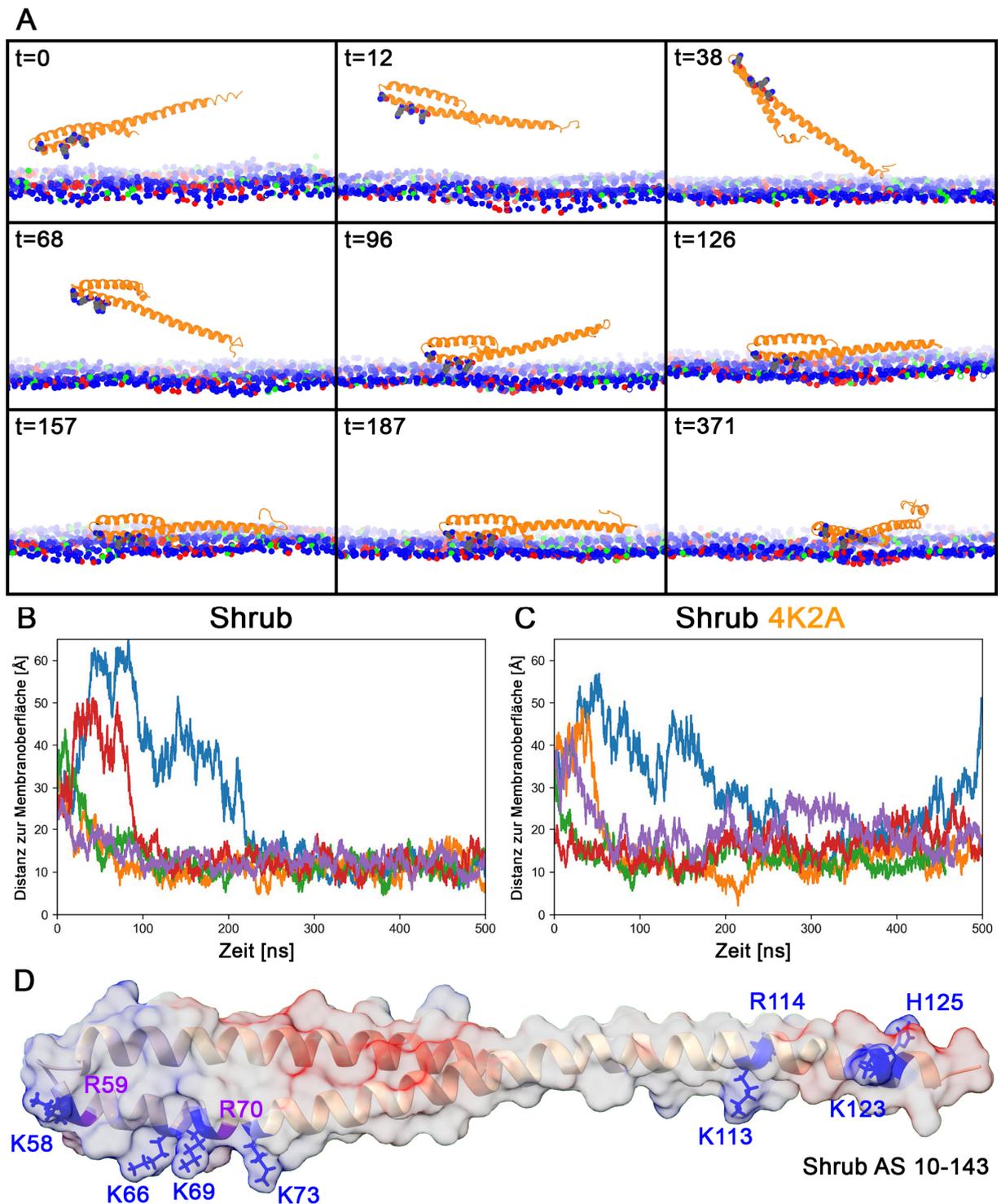


Abbildung 2.27: Molekulardynamik Simulation der Bindung von Shrub an die endosomale Membran. Das in der Simulation verwendete Shrub Fragment (AS 10-143) lagert sich über die Zeit an die simulierte Membran an (A). Von der Membran sind nur die Phosphate dargestellt: Phosphatidylcholin in Blau, Phosphatidylethanolamin in Rot und Phosphatidylserin in Grün. Im Shrub Fragment (orange) sind die vier Lysine, die die Hauptbindung vermitteln, hervorgehoben und die Aminosäurereste als Stäbchenmodell dargestellt. Auch in mehreren Wiederholungen ist eine Anlagerung des Shrub Fragments über die Zeit (500ns) zu beobachten (B). Durch die Neutralisation der vier Lysine ist die Membranassoziation deutlich verringert (C). Die Messungen der einzelnen Simulationen sind durch unterschiedliche Farben gekennzeichnet (B, C). D: Verwendetes Shrub Fragment für die Simulationen (Monomer). Die Aminosäuren

---

für die Membranbindung sind in Blau dargestellt und die basischen Aminosäuren für die Polymerisation in Violett. Die transparente Oberfläche zeigt das Oberflächenpotential: Rot=sauer, Blau=basisch (berechnet mit APBS-electrostatics, Jurrus et al. (2018)).

---

Die Kontakte mit der Membran werden bei den Simulationen mit dem Shrub-Monomer hauptsächlich über vier konservierte Lysine vermittelt: K58, K66, K69 und K73 (Anhang, Abbildung 8.7) Diese Lysine befinden sich im Shrub-Molekül an der Spitze der helikalen Haarnadel, in der Nähe der für die Polymerisation benötigten Aminosäuren R59 und R70 (McMillan et al. (2016); Abbildung 2.27 D).

Um den Einfluss der vier Lysine auf die Membranassoziation zu untersuchen, wurden diese in dem Molekül für die Simulationen durch Alanine ersetzt (Shrub 4K2A). Die Simulationen zeigen, dass die Membranassoziation von Shrub 4K2A deutlich abgeschwächt ist (Abbildung 2.27 C).

Um diese Beobachtung *in vivo* zu untersuchen, wurden verschiedene Shrub-Varianten hergestellt und mit Hilfe eines Expressionssystems exprimiert. Dieses Expressionssystem führt zu einer Expressionsstärke der Varianten, die dem endogenen Expressionsniveau von Shrub entsprechen (*shrubP*, Masterarbeit: Bäumers (2015)).

Da Shrub in Geweben fast ausschließlich im Zytoplasma der Zellen nachweisbar ist (Masterarbeit: Brüser, 2013), wird wie bereits beschrieben auch bei den Untersuchungen der Shrub-Varianten die Reduktion von Vps4 dafür genutzt, um Shrub an einem endosomalen Kompartiment zu arretieren und so auf die Membranbindung zu überprüfen. Die Reduktion von Vps4 geschieht erneut mit Hilfe von Vps4-RNAi, welche im posterioren Kompartiment der Flügelimaginalscheibe exprimiert wird. Durch die entstehende Reduktion von Vps4, lokalisiert endogenes Shrub zusammen mit der endosomalen Fracht Notch an stark vergrößerten Rab7 positiven Endosomen (Abbildung 2.28 A-A'''). Auch das transgene Myc-Shrub, was mit Hilfe von *shrubP* exprimiert wird, ist zusammen mit Notch in stark vergrößerten Endosomen nachweisbar (Abbildung 2.28 B-B'''). Die Shrub-Variante ohne die vier potentiell membranbindenden Lysine (Myc-Shrub 4K2A) ist ebenfalls noch an vergrößerten Endosomen nachweisbar und kolokalisiert mit Notch (Abbildung 2.28 C-C''').

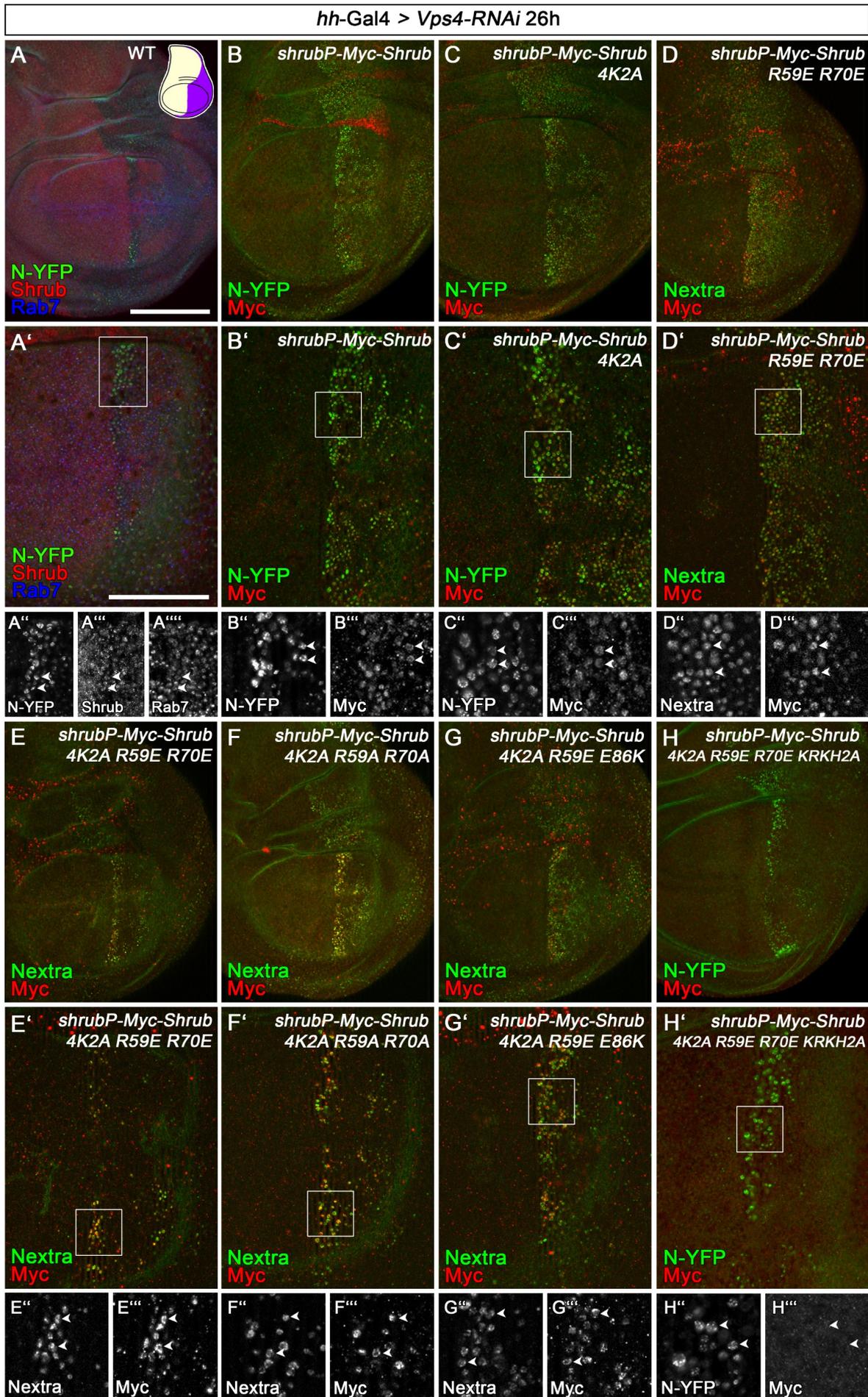


Abbildung 2.28: Endosomale Lokalisation von Shrub-Varianten durch Vps4-RNAi. Die Vps4-RNAi wird mit Hilfe des *hh*-Gal4 Treibers für 26 Stunden in der posterioren Hälfte der Flügelimaginalscheibe exprimiert. Das Kompartiment, in dem die Expression der RNAi aktiviert wurde, ist in der schematischen Flügelimaginalscheibe in Violett markiert (A). Durch die Expression wird endogenes Shrub an der Membran von stark vergrößerten Endosomen arretiert (A+A'). Hier kolokalisiert es mit der endosomalen Fracht Notch (Notch-YFP, N-YFP) und dem endosomalen Marker Rab7. Auch Myc markiertes Shrub, was mit *shrubP* exprimiert wird (*shrubP-Myc-Shrub*) kann nach Vps4-RNAi an der endosomalen Membran durch eine Myc-Antikörperfärbung nachgewiesen werden (B+B'). Die Neutralisation der vier membranbindenden Lysine (K58, K66, K69 und K73, *shrubP-Myc-Shrub 4K2A*) hat keinen Einfluss auf diese Lokalisation (C+C'). Auch Monomeres Shrub (*shrubP-Myc-Shrub R59E R70E*) lokalisiert an der endosomalen Membran (D+D'). Monomeres Shrub ohne die vier membranbindenden Lysine (*shrubP-Myc-Shrub 4K2A R59E R70E*, *shrubP-Myc-Shrub 4K2A R59A R70A*) lokalisiert an der endosomalen Membran (E+E', F+F'). Auch wenn zusätzlich die saure Polymerisationsseite von Shrub verändert wird (*shrubP-Myc-Shrub 4K2A R59E E86K*) ist noch endosomale Lokalisation nachweisbar (G+G'). Die Neutralisation des zweiten basischen membranbindenden Teils (K113A R114A K123A H125A) von Shrub (*shrubP-Myc-Shrub 4K2A R59E R70E KKKH2A*) führt dazu, dass Shrub nicht mehr am Endosom nachweisbar ist und zytoplasmatisch lokalisiert (H+H'). Der Maßstabsbalken in A für A-H) entspricht 100µm, der Maßstabsbalken in A' für A'-H' entspricht 50µm. Die Imaginalscheiben sind so orientiert, dass anterior links und dorsal oben ist.

*shrub* mutante Tiere sterben embryonal und erreichen somit nicht das dritte Larvenstadium (Sweeney et al., 2006), in dem die Flügelimaginalscheiben für die Experimente analysiert wurden. Myc-Shrub ist in der Lage den Phänotyp des *shrub* mutanten Hintergrundes zu retten (Dissertation: Bäumers, 2020). Myc-Shrub 4K2A kann (wie die weiteren analysierten Shrub-Varianten) den *shrub* mutanten Hintergrund jedoch nicht retten (Tabelle 2.1). Somit muss im *shrub* wildtypischen Hintergrund gearbeitet werden, in dem endogenes Shrub in den Zellen vorhanden ist.

Tabelle 2.1: Rettungsvermögen der verwendeten Shrub-Konstrukte unter Kontrolle von *shrubP* im *shrub* mutanten Hintergrund (*shrub<sup>4-1</sup>*)

<b>shrubP-Konstrukt (<i>shrub<sup>4-1</sup></i>-Hintergrund)</b>	<b>Rettungsvermögen (eine Kopie im Genom)</b>
<i>Myc-Shrub</i>	<i>pharate adults</i>
<i>Myc-Shrub 4K2A</i>	keine L3 Larven
<i>Myc-Shrub R59E R70E</i>	keine L3 Larven
<i>Myc-Shrub 4K2A R59E R70E</i>	keine L3 Larven
<i>Myc-Shrub 4K2A R59A R70A</i>	keine L3 Larven
<i>Myc-Shrub 4K2A R59E E86K</i>	keine L3 Larven
<i>Myc-Shrub 4K2A R59E R70E KKKH2A</i>	keine L3 Larven

Die endosomale Lokalisation von Myc-Shrub 4K2A lässt sich durch eine mögliche gemeinsame Polymerisation von Myc-Shrub 4K2A mit dem endogenen Shrub erklären. Durch den Einbau in das formende Shrub Polymer auf der endosomalen Membran, würde

Myc-Shrub 4K2A an Endosomen nachweisbar sein. Um diese Möglichkeit zu reduzieren, wurden verschieden weitere Shrub-Varianten untersucht, die neben den vier neutralisierten membranbindenden Lysinen zusätzliche Änderungen in den Aminosäuren besitzen, die für die Polymerisation benötigt werden (McMillan et al., 2016).

Eine Shrub-Variante, in der die basische Polymerisationsseite durch Austausch zu Glutaminsäure in der Ladung umgekehrt wurde (Myc-Shrub R59E R70E), kann weiter an die endosomale Membran binden. Dieses wahrscheinlich monomere Shrub lokalisiert zusammen mit Notch an vergrößerten Endosomen (Abbildung 2.28 D-D“). Einen Hinweis auf die fehlende Polymerisation gibt eine Komplexvorhersage von drei Shrub-Molekülen mit den Mutationen in den basischen Aminosäuren (R59E, R70E, Anhang, Abbildung 8.9). Anders als wildtypisches Shrub ist die Komplexbildung unregelmäßig und findet hauptsächlich über die längere Helix der helikalen Haarnadel statt. Die zusätzliche Neutralisation der vier membranbindenden Lysine (Myc-Shrub 4K2A R59E R70E) ändert an dieser endosomalen Lokalisation nichts. Auch diese Shrub-Variante lokalisiert noch an der endosomalen Membran (Abbildung 2.28 E-E“). Auch eine Shrub-Variante, in der die basische Polymerisationsseite durch Austausch in Alanine nur neutralisiert ist (Myc-Shrub 4K2A R59A R70A) lokalisiert weiterhin an der endosomalen Membran (Abbildung 2.28 F-F“).

Um die Möglichkeit der Shrub Polymerisation der getesteten Shrub-Varianten weiter zu reduzieren, wurde zusätzlich zur basischen Polymerisationsseite auch die saure Seite modifiziert. Hierfür wurde Glutaminsäure<sup>86</sup> in Lysin mutiert. Zusammen mit der Neutralisation der membranbindenden Lysine (Myc-Shrub 4K2A R59E E86K) entsteht eine Shrub-Variante, die nicht mehr polymerisieren und an die endosomale Membran binden sollte. Es ist jedoch die Lokalisation an der endosomalen Membran nachweisbar. Auch diese Variante lokalisiert zusammen mit Notch an vergrößerten Endosomen (Abbildung 2.28 G-G“).

Für vier Lysine konnte eine Beteiligung an der Membranbindung von Shrub simuliert werden. Die Neutralisation dieser führt jedoch nicht zum Verbleib der Shrub-Varianten im Zytoplasma. Shrub bindet die endosomale Membran während der Polymerisation. Hierbei ist es möglich, dass sich die Shrub-Moleküle im formende Shrub Polymer bei der Membranbindung anders verhalten als einzelne Shrub-Moleküle. Um Hinweise für die

---

Beteiligung weiterer Aminosäuren an der Membranbindung zu sammeln, wurden erneut MD-Simulationen durchgeführt. Hierfür wurde ein Shrub Trimer verwendet.

Die Simulation zeigt, dass zusätzlich zu den bereits untersuchten Lysinen (K58, K66, K69 und K73) weitere basische Aminosäuren an der langen  $\alpha$ 2-Helix der zentralen helikalen Haarnadel von Shrub die Membran kontaktieren. Es handelt sich um Lysin113, Arginin114, Lysin123 und Histidin125 (Abbildung 2.28 D, Anhang, Abbildung 8.8). Eine Shrub-Variante in der zusätzlichen zu diesen vier basischen Aminosäuren, die vier membranbindenden Lysine und die basische Polymerisationsseite mutiert sind (Myc-Shrub 4K2A R59E R70E KRKH2A), lokalisiert nicht mehr an der endosomalen Membran (Abbildung 2.28 H-H''). Shrub 4K2A R59E R70E KRKH2A ist im Zytoplasma nachweisbar und es ist keine Akkumulation an den durch Vps4-RNAi stark vergrößerten Endosomen zu erkennen.

Zusammen zeigen diese Ergebnisse, dass Shrub sowohl über einen basischen Bereich an der Spitze der helikalen Haarnadel als auch über einen weiteren basischen Bereich am Ende der  $\alpha$ 2-Helix mit den Phospholipiden der endosomalen Membran interagiert. Eine Neutralisation dieser basischen Bereiche führt zur deutlich verringerten Membranbindung und zum Funktionsverlust der Shrub-Varianten. Es konnte auch gezeigt werden, dass monomeres Shrub an die endosomale Membran binden kann.

Abschließend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit erneut, dass die Funktion von Shrub durch die Bindung von Interaktionspartnern stark beeinflusst wird. Für die vollständige Funktion von Shrub wird die Bindung durch Lgd benötigt. Diese Bindung wird über basische Bereiche von, sowohl der ersten als auch der dritten DM14-Domäne von Lgd an die saure Oberfläche von Shrub vermittelt. Für die Initiierung der Polymerisation an der endosomalen Membran wird Shrub durch myristoyliertes Vps20 gebunden, was durch die Rekrutierung von ESCRT-II an der endosomalen Membran lokalisiert. Die Bindung von Shrub durch Vps20 wird durch Mutationen in zwei potentiellen Bindestellen nicht beeinflusst, wenn diese einzeln vorliegen. Durch basische Aminosäuren in Shrub ist die Interaktion mit den Phospholipiden der endosomalen während der Polymerisation möglich, was letztendlich zur Bildung von intraluminalen Vesikeln führt.

### 3. Diskussion

Die Bildung von intraluminalen Vesikeln (ILV) während der Endosomenreifung ist ein essentieller Schritt für den Abbau von Transmembranproteinen und terminiert unter anderem die Signaltransduktionsfähigkeit von Transmembran-Rezeptoren. Die ILV-Bildung wird durch die ESCRT- (Endosomal Sorting Complex Required for Transport) Maschinerie vermittelt, wobei die ESCRT-III Untereinheit Shrub eine zentrale Rolle spielt. Die Polymerisation von Shrub an der endosomalen Membran ist ein Prozess, der durch die Bindung an Interaktionspartner streng reguliert ist. Shrub interagiert mit dem Tumorsuppressor Lethal (2) giant discs (Lgd) vermutlich im Zytoplasma. Hierbei verhindert diese Bindung wahrscheinlich die unkontrollierte Polymerisation von Shrub im Zytoplasma (McMillan et al. (2017); Baeumers et al. (2020); Dissertation: Bäumers (2020)). An der endosomalen Membran wird die Polymerisation von Shrub durch die Bindung an Vps20 (Vacuolar protein sorting 20) initiiert (Babst et al., 2002a; Teis et al., 2008). Hierbei bindet Shrub direkt an die endosomale Membran, während sich das Polymer formt.

#### 3.1 Die Bindung von Shrub an Lgd

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die für die vollständige Funktion von Shrub benötigte Bindung an Lgd weiter untersucht. Hierbei sollte die Rolle der ersten DM14-Domäne in Lgd untersucht werden und darüber hinaus weitere Hinweise für die benötigten Eigenschaften der ungeradzahligen DM14-Domänen für die Bindung an Shrub gesammelt werden. Durch die Ermittlung des Rettungsvermögens von Lgd-Konstrukten wurden Informationen über Kriterien einer funktionalen Shrub-Bindestelle in den DM14-Domänen analysiert. Da die Rettung eines Lgd-Konstrukts ohne den Aminosäurebereich 558-664 kein offensichtlich nachweisbares Rettungsvermögen gezeigt hat, sollte die Funktion dieses Bereichs weiter untersucht werden.

##### 3.1.1 DM14-1 und DM14-3 in Lgd zeigen partielle Redundanz

Die Bindung von Shrub an Lgd geschieht über die ungeradzahligen DM14- (*Drosophila melanogaster* 14) Domänen von Lgd (Troost et al., 2012). Die vier in Lgd vorhandenen DM14-Domänen sind einzigartig für die Lgd Proteinfamilie (Jaekel und Klein, 2006). Es konnte gezeigt werden, dass Shrub direkt über elektrostatische Wechselwirkungen mit DM14-3 von Lgd interagiert und auch DM14-1 für die Interaktion mit Shrub benötigt wird

---

(McMillan et al., 2017). Für DM14-1 konnte in dieser Arbeit, zusätzlich zu den bereits veröffentlichten Daten, eine Interaktion mit Shrub simuliert werden (Abbildung 2.1).

Ein Lgd-Rettungskonstrukt ohne die erste und dritte DM14-Domäne (Lgd $\Delta$ DM14 1+3) kann den *lgd* mutanten Phänotyp nicht retten (Dissertation: Tibbe (2019); Abbildung 2.6 B+B'). Ein Lgd-Konstrukt, in welchem die zweite und vierte DM14-Domäne fehlen (Lgd $\Delta$ DM14 2+4), kann im Gegensatz dazu vollständig retten (Dissertation: Tibbe, 2019).

Die erste und die dritte DM14-Domäne können in einem Lgd-Konstrukt ohne weitere DM14-Domänen den Phänotyp des *lgd* mutanten Hintergrundes vollständig retten (McMillan et al., 2017). Den sensitivierten Hintergrund können Lgd-Konstrukte mit einzelnen ungeradzahigen DM14-Domänen jedoch nicht vollständig retten. Es konnte gezeigt werden, dass die Verdopplung von DM14-3 in einem Lgd-Konstrukt ohne weitere DM14-Domänen zu einem verbesserten Rettungsvermögen im sensitivierten Hintergrund führt (McMillan et al., 2017). Diese Verbesserung des Rettungsvermögens konnte in dieser Arbeit auch für die DM14-1 gezeigt werden. Ein Lgd-Konstrukt, welches zwei erste DM14-Domänen als einzige DM14-Domänen besitzt (Lgd $\Delta$ DM14 3+4, DM14 1-1), kann den *lgd* mutanten Phänotyp vollständig, den Phänotyp des sensitivierten Hintergrundes jedoch nicht vollständig retten (Abbildung 2.3 F-H').

Zusätzlich zu Funktionen, die durch beide ungeradzahigen DM14-Domänen vermittelt werden können, gibt es scheinbar noch weitere Funktionen, die ausschließlich von den individuellen ungeradzahigen DM14-Domänen ausgeführt werden. DM14-1 und DM14-3 weisen also partielle Redundanz auf. Das wird dadurch deutlich, dass durch die Rettung der Lgd-Varianten mit zwei ersten oder zwei dritten DM14-Domänen noch eine leichte ektopische Aktivierung des Notch-Signalwegs im sensitivierten Hintergrund nachweisbar ist (Abbildung 2.3 H+H', McMillan et al. (2017)). Im Vergleich dazu rettet Lgd ohne die zweite und vierte DM14-Domäne vollständig (Dissertation: Tibbe, 2019).

Basierend auf den bisherigen Daten zur genetischen und biochemischen Interaktion wäre es möglich, dass Lgd zwei Shrub-Moleküle über die ungeradzahigen DM14 Domänen binden kann. Einen weiteren Hinweis darauf liefert auch die Analyse der simulierten Struktur von vollständigem Lgd. Hierbei sind die Bereiche zwischen den DM14 Domänen ohne die Bindung an Interaktionspartner eher unstrukturiert, was die Bindung zweier Shrub Moleküle sterisch nicht verhindern würde. Die Bindung eines Shrub Moleküls über eine ungeradzahige DM14 Domäne könnte jedoch auch eine Konformationsänderung

---

bewirken, die dann die Bindung über die andere ungeradzahlige DM14 Domäne ausschließt. In weiteren Untersuchungen könnten mit aufgereinigtem Lgd und Shrub mittels Massenspektrometrie die Stöchiometrie der Bindung aneinander ermittelt werden (Übersicht in Smits und Vermeulen, 2016). Diese Bindungskapazität von Lgd für zwei Shrub-Moleküle könnte eine Robustheit für die Regulation von Shrub darstellen.

### **3.1.2 KARR R kann nicht als minimales Shrub Bindemotiv in den DM14-Domänen definiert werden**

In den geradzahligen DM14-Domänen kommt das KARR R Motiv, welches die Interaktion zwischen den ungeradzahligen DM14-Domänen und Shrub vermittelt, nicht vor (Abbildung 2.4 B; McMillan et al. (2017)).

Um die Bindung von Lgd über die DM14-Domänen an Shrub weiter zu untersuchen, wurde in die geradzahligen DM14-Domänen das KARR R Motiv integriert. Hierdurch sollte überprüft werden, ob KARR R als minimales Bindemotiv für Shrub in den DM14-Domänen ausreicht.

Durch die Einführung des KARR R Motivs in die nicht Shrub bindende zweite und vierte DM14-Domäne konnte den simulierten helikalen Haarnadelstrukturen ein basisches Oberflächenpotential verliehen werden (Abbildung 2.5 C'+E'). Dieses basische Oberflächenpotential, welches sonst nicht in den geradzahligen DM14-Domänen vorhanden ist, und die Shrub bindenden Aminosäuren könnten zur Interaktion mit Shrub über elektrostatische Wechselwirkungen führen. Dadurch könnte die Shrub bindende Funktion der ungeradzahligen DM14-Domäne von den geradzahligen DM14-Domänen imitiert werden. Die Integration des KARR R Motivs in die geradzahligen DM14-Domänen hat das Rettungsvermögen von Lgd-Konstrukten ohne die ungeradzahligen DM14-Domänen jedoch nicht verbessert (Abbildung 2.6). Das zeigt, dass das KARR R Motiv alleine nicht für die Interaktion der DM14-Domänen mit Shrub ausreicht.

Da die Einführung des KARR R Motivs als minimale Shrub Bindestelle in die ungeradzahligen DM14-Domänen nicht zu erhöhtem Rettungsvermögen geführt hat, wurde die gesamte Interaktionshelix der dritten DM14-Domäne in die vierte DM14-Domäne integriert (Abbildung 2.7). Diese Integration sollte weitere Hinweise auf benötigte Eigenschaften der Interaktionshelix für die Bindung an Shrub liefern. Die Interaktionshelix der dritten DM14-Domäne wurde verwendet, da die dritte DM14-Domäne detailliert charakterisiert wurde und es eine Kristallstruktur für die Interaktion

der dritten DM14-Domäne mit Shrub gibt (McMillan et al. (2017); Dissertation: Tibbe (2019)). Durch die Integration der Interaktionshelix von DM14-3 in DM14-4 wurde für diese, nicht Shrub bindende DM14-Domäne ein deutlich basischeres Oberflächenpotential in der simulierten Struktur berechnet (Abbildung 2.7 E'). Das basische Oberflächenpotential und die weiteren Aminosäuren der Interaktionshelix der dritten DM14-Domäne könnten der vierten DM14-Domäne die Möglichkeit zur Interaktion mit Shrub über elektrostatische Wechselwirkungen verleihen. Die Integration der Interaktionshelix der dritten DM14-Domäne in die vierte DM14-Domäne führt jedoch nicht zur Verbesserung des Rettungsvermögens eines Lgd-Konstrukts ohne weitere DM14-Domänen (Abbildung 2.7). Auch Modifikationen in der nicht interagierenden Helix der vierten DM14-Domäne, die der Interaktionshelix der dritten DM14-Domäne in Lgd $\Delta$ DM14 1-3 DM14-4 Helix 3 gegenübersteht, konnten keinen Einfluss auf das Rettungsvermögen nehmen (Abbildung 2.8).

Einen Hinweis darauf, warum die Integration des KARRR Motivs oder der Interaktionshelix für die Nachahmung der Funktion der dritten DM14-Domäne durch die geradzahligen DM14-Domänen nicht ausreichend war, liefert die Analyse der vollständigen Struktur von Lgd, die durch Alphafold2 simuliert wurde (Alphafold Datenbank ID: AF-Q9VKJ9-F1, Abbildung 2.13; Jumper et al. (2021)). Innerhalb der vier DM14-Domänen sind jeweils Interaktionen zwischen der helikalen Haarnadel und einer Prolin-reichen Region am C-Terminus der jeweiligen DM14-Domäne zu erkennen. Die Wichtigkeit der Interaktion mit der Prolin-reichen Region wird in bereits durchgeführten Rettungsexperimenten deutlich.

In DM14-3 interagiert Tyrosin398 (Y398) mit Prolin417 (P417) (Abbildung 2.13 E-H). Diese Interaktion ist in den anderen DM14-Domänen nicht zu beobachten (Anhang, Abbildung 8.1). Durch den Austausch von P417 zu Alanin in einem Lgd-Konstrukt, in dem die ersten beiden DM14-Domänen fehlen, wird das Rettungsvermögen dieses Konstrukts deutlich verschlechtert (Masterarbeit: Benschmidt, 2013).

In DM14-4 wird die Interaktion mit der Prolin-reichen Region über R505 vermittelt, welches an der gleichen Position auch in den anderen DM14-Domänen vorkommt (R148 (DM14-1), R266 (DM14-2) und R368 (DM14-3)) (Abbildung 2.13 E-H, Anhang, Abbildung 8.1). R368 bindet in DM14-3 nicht selbst an die Prolin-reiche Region, jedoch an das Y398, welches dann P417 bindet (Abbildung 2.13 E-H, Anhang, Abbildung 8.1). Die Mutation von R368 zu Glutaminsäure führt zu deutlich abgeschwächtem Rettungsvermögen eines

Lgd-Konstrukts, in dem die ersten beiden DM14-Domänen fehlen (Dissertation: Tibbe, 2019), was die Notwendigkeit dieser Aminosäure für die Interaktion mit der Prolinreichen Region verdeutlicht. Die Besonderheit, dass die Bindung von R368 über Y389 an P417 geschieht ist für die dritte DM14-Domäne einzigartig (Abbildung 2.13, Anhang, Abbildung 8.1).

Dadurch, dass nur in DM14-3 die Bindung über die Y389 geschieht, würde die Integration der Interaktionshelix der ersten DM14-Domäne in die zweite DM14-Domäne vermutlich eher zur erfolgreichen Nachahmung der Funktion der Shrub-bindenden DM14-Domänen führen. In DM14-2 sind die Aminosäuren, die die Interaktion mit der Prolinreichen Domäne eingehen, an gleicher Position wie in DM14-1 vorhanden (R148, Y152, P197, P198 in DM14-1; R266, Y270, P316, P317 in DM14-2). Die Integration der Interaktionshelix der ersten DM14-Domäne in die zweite DM14-Domäne könnte weitere Hinweise über die Funktionalität der DM14-Domänen liefern und auch zum Verständnis der exklusiven, zusätzlichen Funktionen der Shrub-bindenden DM14-Domänen beitragen. Die Analyse des Y398 in der Interaktionshelix der dritten DM14-Domäne würde für die weitere Aufklärung der Notwendigkeit der Interaktion mit der Prolinreichen Region beitragen, da es die Interaktion von R368 mit P417 stabilisiert.

Zusätzlich könnte in Lgd ohne die ersten drei DM14-Domänen und mit Integration der Interaktionshelix der dritten DM14-Domäne in die vierte DM14-Domäne (Lgd $\Delta$ DM14 1-3 DM14-4 Helix 3) das Phenylalanin (F) an Position 509 durch ein Tyrosin ersetzt werden. Dieser Austausch könnte die Interaktion zwischen diesem Tyrosin mit P554 ermöglichen. Diese Interaktion kommt so zwischen den Aminosäuren in der dritten DM14-Domäne an gleicher Position vor (Abbildung 8.1). In diesem Lgd-Konstrukt könnte dann vermutlich R505 über Y535, welches über die Integration der Interaktionshelix der dritten DM14-Domäne in die vierte DM14-Domäne eingeführt wurde, an P554 binden. Y509 könnte dann vermutlich direkt an P554 binden. Diese Bindungen würden dann wie in der dritten DM14-Domäne vorhanden sein.

Die Interaktion der helikalen Haarnadel der DM14-Domänen mit der Prolinreichen Region am C-Terminus der DM14-Domänen könnte die notwendige Stabilität für die korrekte Faltung der DM14-Domänen vermitteln. Sollte diese Faltung nicht korrekt sein, könnten die ungeradzahligen DM14-Domänen ihre Fähigkeit an Shrub zu binden verlieren, was zum Ausfall der Funktion der DM14-Domänen führen würde.

Die Prolin-reichen Domänen am C-Terminus der zweiten, dritten und vierten DM14-Domäne erfüllen die Voraussetzungen für die minimale Konsensussequenz der Bindedomäne einer SH3- (Src-Homology 3) Domäne (PXXP, X=beliebige AS) (Yu et al., 1994). Ob diese Prolin-reiche Domäne in den DM14-Domänen von Lgd für die Bindung an Interaktionspartner, die eine SH3-Domäne besitzen, notwendig ist, könnte durch die Identifikation neuer Interaktionspartner mit SH3-Domänen aufgeklärt werden. Die Fusion von Lgd mit BioID könnte dafür genutzt werden, Interaktionspartner von Lgd, die sich in der Zelle im direkten Umfeld befinden, zu biotinylieren (Sears et al., 2019). Die Untersuchung mittels Massenspektrometrie könnte anschließend Proteine identifizieren, die biotinyliert wurden, sich also im direkten Umfeld von Lgd befanden. Durch weitere Untersuchungen könnte dann die genetische Interaktion mit Lgd überprüft werden.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Einführung des KARR R Motivs in die geradzahigen DM14-Domänen als minimales Shrub-Bindemotiv nicht ausreicht. Auch die Integration der Interaktionshelix von DM14-3 in DM14-4 führt nicht zur Übernahme der Shrub bindenden Funktion durch DM14-4, sie liefert jedoch Hinweise für die möglichen Gründe der fehlenden Rettungsfähigkeit durch diese modifizierte DM14-Domäne. Mögliche Gründe konnten durch die Kombination von *in vivo* Rettungsexperimenten mit der Analyse der simulierten Struktur von vollständigem Lgd gefunden werden. Innerhalb der DM14-Domänen scheinen spezifische Bindungen benötigt werden, die vermutlich die Integrität der Struktur der DM14-Domänen sicherstellen und so die Interaktion der ungeradzahigen DM14-Domänen mit Shrub ermöglichen.

### **3.1.3 Der Aminosäurebereich 558-664 in Lgd interagiert mit dem C-Terminus und wird für die Stabilität von Lgd benötigt**

Der Aminosäurebereich 558-664 befindet sich zwischen DM14-4 und der C2-Domäne. Für den Bereich ist durch Datenbankanalysen keine Vorhersage für eine funktionale Domäne möglich. Bei strukturellen Untersuchungen der simulierten Struktur ist jedoch aufgefallen, dass der Bereich unter anderem eine helikale Haarnadel bildet (Abbildung 2.11). Diese Struktur könnte eine funktionale Domäne darstellen, da bei der Analyse von Deletionskonstrukten von Lgd aufgefallen ist, dass durch das Fehlen des Aminosäurebereichs 558-664 oder des C-Terminus in Lgd-Rettungskonstrukten das Rettungsvermögen stark eingeschränkt ist (AG Klein, unveröffentlicht, Abbildung 2.11 B+B', D+D').

Der Aminosäurebereich 558-664 bildet eine helikale Haarnadel aus und in dem Rettungsexperiment durch Lgd ohne diesen Bereich wurde keine offensichtliche Rettung beobachtet. Eine hypothetische Erklärung für die beobachtete ektopische Aktivierung des Notch-Signalwegs war die Vermutung, dass es sich bei der helikalen Haarnadel um eine DM14-Domäne handeln könnte, die bis jetzt noch nicht beschrieben ist. Die ektopische Aktivierung des Notch-Signalwegs könnte durch den Verlust dieser potentiellen, unbeschriebenen DM14-Domäne durch die reduzierte Bindung an Shrub entstehen. Die Analyse des Oberflächenpotentials der Struktur und der Aminosäuresequenz des Bereichs 558-664 deutet jedoch darauf hin, dass eine Bindung an Shrub über elektrostatische Wechselwirkungen unwahrscheinlich ist. Das basische Oberflächenpotential und die Shrub-bindenden basischen Aminosäuren der ungeradzahligen DM14-Domänen sind im Aminosäurebereich 558-664 nicht zu finden (Abbildung 2.9). Dadurch ist die Bindung an die saure Oberfläche von Shrub wahrscheinlich nicht möglich.

Vielmehr fehlt durch die Deletion des Aminosäurebereichs 558-664 die Aminosäuresequenz, die eine Interaktion mit dem C-Terminus von Lgd bildet (Abbildung 2.9 B-D, Ventimiglia et al. (2018)). Der C-Terminus von Lgd interagiert mit den Aminosäuren Lysin644 bis Histidin656 (K644-H656) und bildet ein antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt. Lgd-Konstrukte ohne C-Terminus oder die Aminosäuren 558-664 sind in Larvenlysaten, im Gegensatz zu vollständigem Lgd, mit Hilfe von SDS-PAGE und Western Blot nicht nachweisbar (Abbildung 2.12). Die korrekte Insertion des Expressionsvektors dieser Lgd-Varianten in das *Drosophila* Genom wurde mittels PCR und Sequenzierung überprüft (6.2.3). Da die Integration des Expressionsvektors erfolgreich war und alle Komponenten des Expressionssystems vorhanden sind, könnte es möglich sein, dass die fehlende Interaktion des C-Terminus mit dem Aminosäurebereich 558-664 die Proteinstabilität dieser Varianten negativ beeinflusst. Die nachgewiesene Restfunktion der Lgd-Konstrukte (Lgd $\Delta$ 558-664, Lgd LAP statt 558-664, Lgd $\Delta$ C) in Rettungsexperimenten weist darauf hin, dass die Varianten zumindest schwach exprimiert sind (Abbildung 2.11).

Da die Integration des Expressionsvektors in das *Drosophila* Genom korrekt ist, könnte zusätzlich die korrekte Transkription der cDNA für die Lgd-Varianten mit Hilfe von RT-(Reverse Transkriptase) qPCR (quantitative PCR) überprüft werden. Hierbei wird die Menge der gebildeten mRNA in Lysaten von Zellen gemessen (Übersicht in Freeman et al.,

1999). Sollte die mRNA-Menge der Lgd-Varianten mit fehlender Interaktion zwischen C-Terminus und Aminosäurebereich 558-664 (Lgd $\Delta$ 558-664, Lgd LAP statt 558-664, Lgd $\Delta$ C) vergleichbar mit der mRNA-Menge von vollständigem Lgd sein, würde das erneut auf eine geringere Stabilität der Lgd-Varianten ohne Interaktion zwischen C-Terminus und Aminosäurebereich 558-664 hinweisen.

Die Beobachtung, dass durch Modifikationen am C-Terminus von Lgd der Nachweis der Lgd-Variante in Larven-Lysaten deutlich reduziert ist, konnte auch schon für ein Lgd-Konstrukt gemacht werden, in dem die C2-Domäne und der C-Terminus fehlen (Troost et al. (2012): Lgd $\Delta$ C2). Bei dem Nachweis in Larven war die nachgewiesene Proteinmenge von Lgd $\Delta$ C2 deutlich geringer als die Menge von vollständigem Lgd. Das Rettungsvermögen dieses Konstrukts ist minimal (Troost et al., 2012).

Das geringe Rettungsvermögen des Lgd ohne C2-Domäne und C-Terminus konnte durch die Erhöhung der Kopien des Expressionsvektors im *Drosophila* Genom und die daraus wahrscheinlich resultierende verstärkte Expression verbessert werden (Troost et al., 2012). Auch für die hier analysierten Lgd-Varianten könnte eine zusätzliche Integration im Genom das Expressionsniveau erhöhen. Eine verbesserte Rettung könnte erneut einen Hinweis auf die reduzierte Stabilität der Lgd-Varianten liefern.

Durch die Überexpression von Lgd $\Delta$ C2 ließ sich eine Fehllokalisierung im Zellkern feststellen (Troost et al., 2012). Das Anfügen eines NES (Nuclear Export Signal) erhöhte das Rettungsvermögen von Lgd $\Delta$ C2, welches auf endogenem Niveau exprimiert wurde wieder. Ob diese Fehllokalisierung auch für die hier analysierten Lgd-Varianten (Lgd $\Delta$ 558-664, Lgd LAP statt 558-664, Lgd $\Delta$ C) zutrifft, könnte durch deren Überexpression überprüft werden. Der Nachweis der Lgd-Varianten im Zellkern würde auch hier darauf hinweisen, dass die Interaktion des C-Terminus mit K644-H656 für die korrekte Lokalisation von Lgd im Zytoplasma notwendig ist. Anschließend könnte durch Anfügen eines NES an die hier analysierten Konstrukte überprüft werden, ob die so wieder hergestellte zytoplasmatische Lokalisation das Rettungsvermögen wieder verbessert.

Es konnte gezeigt werden, dass Lgd bei Reduktion der ATPase Vps4 an vergrößerten Endosomen lokalisiert (Baeumers et al., 2020). Die C2-Domäne in Lgd wird für die Bindung an Phospholipide benötigt (Gallagher und Knoblich, 2006). Durch die Deletion von Aminosäure 558-664 oder des C-Terminus könnte die Interaktion der C2-Domäne mit Phospholipiden der Membran vermutlich beeinträchtigt sein. Die Interaktion

---

zwischen K644-H656 und C-Terminus würde Bereiche vor und hinter der C2-Domäne miteinander verbinden, was die C2-Domäne umschließen und ausrichten würde (Abbildung 2.9). Die fehlende Interaktion könnte dazu führen, dass die Ausrichtung der C2-Domäne im vollständigen Protein gestört ist. Dadurch könnte sie ihre Membranbindende Funktion verlieren. Experimente mit überexprimierten Lgd-Varianten mit den Deletionen (Lgd $\Delta$ 558-664, Lgd $\Delta$ C) in Kombination mit Vps4-Reduktion könnten einen Hinweis auf die Membranbindung über die C2-Domäne liefern. Durch den Nachweis der Lgd-Varianten an den vergrößerten Endosomen könnte die Notwendigkeit der C2-Domäne für die Interaktion mit Membranen untersucht werden.

Durch die hier gezeigten Experimente zur Deletion der Aminosäuren 558-664 lassen sich keine Aussagen zur spezifischen Bedeutung der helikalen Haarnadel in diesem Bereich treffen, da durch die Deletion des Bereichs K644-H656 die Proteinstabilität der Lgd-Variante beeinflusst ist. Hinweise auf die Interaktion des C-Terminus und K644-H656 konnten erst durch die simulierte Struktur des vollständigen Lgd durch AlphaFold2 gesammelt werden. In weiteren Experimenten sollten Deletionen untersucht werden, in denen nur die helikale Haarnadel zwischen DM14-4 und C2-Domäne (Aminosäuren 580-636) deletiert ist. Sollte die Lgd-Variante auf einem vergleichbaren Niveau wie vollständiges Lgd nachweisbar sein, könnten durch Rettungsexperimente Aussagen über die Funktionalität dieser Domäne getroffen werden.

Einen Hinweis auf eine spezifische Funktion der helikalen Haarnadel, zusätzlich zur Aufrechterhaltung der Proteinstabilität, zeigt der Vergleich des Rettungsvermögens von Lgd $\Delta$ 558-664 und Lgd $\Delta$ C. Lgd $\Delta$ 558-664 zeigt kein offensichtliches Rettungsvermögen, wobei Lgd $\Delta$ C noch ein schwaches Rettungsvermögen zeigt.

Die beobachtete Interaktion des C-Terminus mit dem Bereich zwischen DM14-4 und C2-Domäne von Lgd ist auch in den vorhergesagten Strukturen der Säugerorthologe von Lgd (Lgd1 und Lgd2) zu finden. Diese strukturelle Konservierung zeigt erneut die Wichtigkeit dieser Interaktion. Für Lgd2 konnte gezeigt werden, dass die Entfernung der C2-Domäne und dem Bereich hinter der C2-Domäne wie bei *Drosophila* Lgd zur reduzierten Proteinstabilität führt (Lgd2 $\Delta$ C2: Dissertation: Schulz (2015)). Die Interaktion, die die C2-Domäne umschließt kann bei Lgd2 $\Delta$ C2 nicht stattfinden. Die Entfernung der C2-Domäne in Lgd1 führt nicht zu Instabilität des Proteins, jedoch trotzdem zum Funktionsverlust, was auf eine spezifische Funktion der C2-Domäne hinweist (Dissertation: Schulz, 2015).

Lgd1 würde sich also, durch seine höhere Stabilität, für weitere Analysen der spezifischen Funktion der helikalen Haarnadel zwischen DM14-4 und C2- Domäne eignen.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die fehlende Interaktion des Aminosäurebereichs 558-664 mit dem C-Terminus von Lgd die Stabilität von Lgd verringert. Durch die daraus resultierende geringere Verfügbarkeit könnte eine verringerte Rettungsfähigkeit der Lgd-Varianten entstehen, ohne dass die Interaktion mit Shrub gestört ist.

### 3.2 Die Bindung von Shrub an Vps20

Vps20 wird für die Initiierung der Polymerisation von Shrub an der endosomalen Membran benötigt, indem es Shrub an die endosomale Membran rekrutiert (Babst et al., 2002a; Teis et al., 2010). Im Rahmen dieser Arbeit sollte herausgefunden werden, wie Shrub für die Rekrutierung an Vps20 bindet. Hierfür wurde versucht, den Phänotyp des *vps20* mutanten Hintergrundes mit verschiedenen Vps20-Varianten zu retten. Basis dafür war die Herstellung eines Expressionssystems, mit dem die verschiedenen Vps20-Varianten auf endogenem Niveau exprimiert wurden (Vps20resQ). In diese Vps20-Varianten wurden Mutationen eingefügt, welche die Bindung von Vps20 an Shrub beeinflussen sollten. Hinweise für benötigte Aminosäuren, welche die Bindung vermitteln, wurden durch Molekulardynamik-Simulationen gesammelt. Zusätzlich lieferte das Expressionssystem die Möglichkeit, weitere Eigenschaften von Vps20 zu untersuchen.

#### 3.2.1 *vps20* mutante Zellen zeigen stark vergrößerte Endosomen und die Reduktion von Vps20 führt zur ektopischen Aktivierung des Notch-Signalwegs

Zunächst wurde für die anschließenden Rettungsexperimente der Ausfallphänotyp von Vps20 in Flügelimaginalscheiben analysiert. Der Ausfall von Vps20 ist embryonal letal (Vaccari et al., 2009). In mutanten Zellklonen sind stark vergrößerte Endosomen zu beobachten (Abbildung 2.15). An den stark vergrößerten Endosomen lokalisiert die früh während der ILV Bildung agierende ESCRT-0 Untereinheit Hrs (Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate) und die endosomale Fracht Notch. Shrub ist an diesen Endosomen nicht nachweisbar, was durch die erwartbare fehlende Rekrutierung zu erklären ist. Wenn Vps20 Shrub nicht an das Endosom rekrutieren kann, verbleibt Shrub im Zytoplasma und die ILV Bildung ist wahrscheinlich nicht möglich. Ähnlich wie bei dem Ausfall von *shrub*, überleben die mutanten Zellen im schnell proliferierenden Gewebe der Imaginalscheibe nicht. Die Zellen sterben so früh, dass innerhalb der Zellen keine Aktivierung des Notch-Signalwegs nachweisbar ist (Abbildung 2.15 D'). Im Gegensatz dazu scheinen die Zellen bei Shrub Ausfall etwas länger zu überleben. Die Aktivierung des Notch-Signalwegs ist hier noch nachweisbar bevor die Zellen sterben (Abbildung 2.15 E').

Durch die temporäre Expression eines RNAi-Konstrukts (RNAi) kann die Aktivität von Vps20 in den Zellen soweit reduziert werden, dass die Zellen noch überleben, jedoch ein zellulärer Effekt beobachtet werden kann. Ähnlich wie bei Ausfall von Shrub kommt es

bei der Reduktion von Vps20 zur ektopischen Aktivierung des Notch-Signalwegs (Abbildung 2.16 C'+D'). Die Aktivierung des Notch-Signalwegs geschieht, wie bei reduzierter Shrub Funktion, durch die reduzierte Aufnahme des Notch-Rezeptors in ILV während des endosomalen Abbaus. Dadurch verbleibt eine Fraktion des Notch-Rezeptors an der endosomalen Membran, von wo aus er aktiviert werden kann (Troost et al. (2012); Schneider et al. (2013); Baeumers et al. (2020); Abbildung 2.16 G-I).

Um die Lokalisation des Notch-Rezeptors in der limitierenden Membran des Endosoms noch genauer analysieren zu können, könnte in weiteren Experimenten ein Notch-Rezeptor untersucht werden, an den ein Fluorophor gebunden ist, welches für die korrelative Licht- und Elektronenmikroskopie (CLEM) geeignet ist. Alternativ könnte für CLEM Analysen eine Antikörperfärbung gegen die extrazelluläre Domäne des Rezeptors auf Gefrierschnitten der Imaginalscheiben durchgeführt werden. Das würde die Untersuchung von elektronenmikroskopischen Aufnahmen mit zusätzlicher Fluoreszenzmikroskopie ermöglichen, wodurch die genaue Lokalisation des Rezeptors innerhalb der endosomalen Membran oder in intraluminalen Vesikeln sichtbar gemacht werden könnte. Durch die Lokalisation der Fluoreszenz könnte ein Hinweis auf die Orientierung des Rezeptors innerhalb der endosomalen Membran gezeigt werden.

Da durch längere Expression der Vps20-RNAi Zelltod induziert wird, könnten durch zusätzliche Expression des Apoptose-Inhibitors p35 Effekte analysiert werden, die durch längere Abwesenheit von Vps20 in den Zellen entstehen (Hay et al., 1994). Es konnte gezeigt werden, dass durch die Reduktion von Shrub mittels RNAi und gleichzeitiger Expression von p35 das Gewebe seine epitheliale Integrität verliert und neoplastische Tumore entstehen (Pannen et al., 2020). Da Shrub von Vps20 an die endosomale Membran rekrutiert wird, sollte bei Ausfall oder starker Reduktion ein ähnlicher Effekt beobachtet werden. Hierfür wäre die Expression von p35, um die Apoptose zu verhindern, notwendig (Hay et al., 1994).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass der Ausfall von Vps20, wie der Ausfall von Shrub, in Geweben zu Zelltod führt. Durch die Reduktion von Vps20 kommt es zur ektopischen Aktivierung des Notch-Signalwegs. Diese Aktivierung ist, ähnlich wie bei reduzierter Shrub-Funktion, durch den Verbleib des endozytierten Rezeptors an der limitierenden Membran von stark vergrößerten Endosomen zu erklären, von wo aus er aktiviert wird.

### 3.2.2 Die Funktion von Vps20 wird vermutlich durch die Rekrutierung durch Vps25 an das Endosom initiiert

Um Vps20 und Shrub weiter auf gemeinsame Eigenschaften überprüfen zu können, wurde auch die Überexpression von Vps20 analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von Shrub einen stark dominant-negativen Effekt zeigt. Es ist Zelltod in den überexprimierten Bereichen zu erkennen (Abbildung 2.17). Der Überschuss an Shrub-Monomeren könnte zur spontanen, nicht funktionalen Polymerisation im Zytoplasma führen, da die Regulation durch Lgd nicht mehr möglich ist (Dissertation: Bäumers (2020); Troost et al. (2012); Baeumers et al. (2020)). Diese unproduktiven Polymere ständen dann nicht mehr für die Polymerisation an der Membran zur Verfügung, was zu einem ähnlichen Effekt führt, wie er auch bei Ausfall von Shrub zu beobachten ist. Die Stöchiometrie zwischen Shrub und Lgd hat eine wichtige physiologische Relevanz (Dissertation: Bäumers, 2020).

Bei der Überexpression von Vps20 konnte hier jedoch kein dominant negativer Effekt auf zellulärer Ebene gefunden werden. Durch überexprimiertes Vps20 könnte die Initiierung der Shrub-Polymerisation unkontrolliert an der endosomalen Membran starten, an die Vps20 binden könnte. Die veränderte Stöchiometrie von Vps20 gegenüber anderer ESCRT-III Untereinheiten scheint jedoch keinen dominant-negativen Effekt zu haben. So hat die Überexpression von Vps20 weder einen Effekt auf die Lokalisation der endosomalen Fracht, noch zeigt sie einen Effekt auf das Überleben der Zellen (Abbildung 2.17). Lediglich bei durchgehender Expression mit Hilfe des Gal4/UAS-Systems lassen sich keine Nachkommen beobachten. Dieser Effekt ist wahrscheinlich mit der generell starken Überexpression durch das Gal4/UAS-System und mit der Haltung der Fliegen auf 29°C während der Expression zu erklären. Zelluläre Effekte wie die Initiierung von Apoptose oder Effekte auf das Recycling des Transmembranrezeptoren, wie sie für die Überexpression des Humanorthologs CHMP6 beschrieben wurden (Yorikawa et al., 2005; Fu et al., 2009), konnten in *Drosophila* nicht beobachtet werden. In den Studien zu CHMP6 wurden die C-terminal markierten Proteine mit Hilfe des CMV- (Cytomegalovirus-) Promotors in kultivierten Zellen exprimiert. Möglicherweise ist diese starke Überexpression von CHMP6, was durch die C-terminale Markierung wahrscheinlich eine geringe Funktionseinschränkung besitzt (vgl. 3.2.3), für die beobachteten Effekte verantwortlich. Auch die verwendete Zelllinie könnte sensitiver auf die Überexpression von CHMP6 reagieren, wodurch ein Effekt sichtbar wird.

Die Rekrutierung von Shrub durch Vps20 an die endosomale Membran scheint abhängig von der Bindung von Vps20 an Vps25 zu sein. Bei der Überexpression von Vps20 ist Vps25 also wahrscheinlich der limitierende Faktor für die Rekrutierung von Vps20 an die endosomale Membran. Durch Überexpression überschüssig vorhandenes Vps20 verbleibt im Zytoplasma oder an der Plasmamembran und kann dort vermutlich nicht die Polymerisation von Shrub initiieren. Überexprimiertes Vps20 ist zusätzlich in der Lage, den Ausfall von Vps20 in mutanten Zellklonen zu retten und sorgt nicht für einen dominant-negativen Effekt (Abbildung 2.17 D-F').

Die Notwendigkeit der Rekrutierung von Vps20 durch Vps25 an das Endosom wird durch das fehlende Rettungsvermögen einer Vps20-Variante mit Modifikationen in den Vps25-Bindestellen (L25R, R31A, D32A) deutlich (Vps20<sup>ΔESCRT-II</sup>, Mutationen basierend auf Im et al. (2009)). Durch die fehlende Bindung von Vps20 an Vps25 ist die Rekrutierung von Shrub durch Vps20 vermutlich nicht möglich. Die fehlende Rekrutierung von Vps20 durch Vps25 an die endosomale Membran könnte durch die Einführung der Vps20<sup>ΔESCRT-II</sup>-Mutationen in ein Fluorophor-markiertes Vps20 weiter untersucht werden. Sollte diese Vps20-Variante nicht am Endosom nachweisbar sein, ist das ein weiterer Hinweis auf die benötigte Rekrutierung von Vps20 durch Vps25.

Die hier gezeigte ausbleibende Rettung durch Vps20<sup>ΔESCRT-II</sup> weist nicht nur darauf hin, dass die für die Interaktion von Vps20 und Vps25 benötigten Aminosäuren konserviert sind (vgl. Abbildung 8.2), sondern zeigt auch, dass der molekulare Mechanismus, der zur vollständigen Funktion von Vps20 führt, wahrscheinlich konserviert ist. Einen weiteren Hinweis darauf liefert die beobachtete vollständige Rettung durch einen Vps20-BAC (-Bacterial Artificial Chromosome), der die CHMP6 cDNA unter Kontrolle der regulatorischen Elemente von Vps20 exprimiert (nicht gezeigt).

### **3.2.3 Charakterisierung von Vps20resQ und Kriterien für das Anfügen eines Tags an Vps20**

Mit dem in dieser Arbeit etablierten Expressionssystem für Vps20-Varianten (Vps20resQ) lassen sich, durch Rettungsexperimente des hier charakterisierten Ausfallphänotyps von Vps20, unterschiedliche Eigenschaften von Vps20 *in vivo* untersuchen. Um die exprimierten Vps20-Varianten im Gewebe nachweisen zu können, wurden verschiedene Protein-Tags angefügt. Vps20 ohne Tag kann den *vps20* mutanten Phänotyp vollständig retten (Abbildung 2.18 B). Das Anfügen von Protein-Tags an Vps20 führt dazu, dass die N-terminal markierte Variante (V5-Vps20) nicht mehr in der Lage ist,

den *vps20* mutanten Phänotyp zu retten. Die C-terminal markierte Variante (Vps20-V5) zeigt eingeschränktes Rettungsvermögen in Bezug auf das Überleben der geretteten Nachkommen (Abbildung 2.18 B), auf zellulärer Ebene ist die Rettung jedoch vollständig (Abbildung 2.18, Abbildung 2.19). Mit Vps20-V5 gerettete Nachkommen sterben als pharate adults. Auch die C-terminale Fusion von Vps20 mit einem Fluorophor (Vps20-NeonGreen) ist möglich und die Expression führt zur fast vollständigen Rettung des mutanten *vps20* Phänotyps. Gerettete Nachkommen sterben ebenfalls als pharate adults, die Rettung auf zellulärer Ebene ist jedoch auch vollständig (Abbildung 2.18 B). Da auch andere Signalwege durch die ILV-Bildung durch die ESCRT-Maschinerie reguliert werden, könnte die gestörte Regulation eines anderen Signalwegs die Ursache für das reduzierte Überleben der Tiere haben. Weitere Signalwege (EGFR, Dpp/BMP), die möglicherweise sensibler auf die veränderte Aktivität der ESCRT-Maschinerie reagieren, könnten in weiteren Experimenten auf ihre korrekte Regulation überprüft werden.

Mit Vps20-NeonGreen lässt sich Vps20 im Gewebe auch auf endogen exprimiertem Niveau nachweisen, was durch die Antikörperfärbung des V5-Tags bei Vps20-V5 nicht möglich ist. Vps20 ist, wie Shrub, hauptsächlich zytoplasmatisch lokalisiert und nur selten an Endosomen nachweisbar (Abbildung 2.26, Masterarbeit: Brüser (2013); Bäumers et al. (2019)). Wahrscheinlich pendelt es wie Shrub zwischen Zytoplasma und endosomaler Membran. Die Verweildauer an der endosomalen Membran ist hierbei wahrscheinlich gering, weshalb der Nachweis schwierig ist. In dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass sich die Disassemblierung von Vps20 von der endosomalen Membran durch die temporäre Reduktion der Aktivität von Vps4 verhindern lässt, wodurch es an den entstehenden stark vergrößerten Endosomen zusammen mit Shrub nachweisbar ist (Abbildung 2.26; Babst et al. (1998)).

Anders als für Vps20 konnte für Shrub gezeigt werden, dass die C-terminale Markierung mit einem Protein-Tag nicht möglich ist. Die Anfügung verschiedener Tags oder Fluorophore am C-Terminus führt zum Funktionsverlust von Shrub (Sweeney et al. (2006); Dissertation: Bäumers (2020)). Auch für weitere ESCRT-III Untereinheiten konnte eine Einschränkung der Funktion durch C-terminale Protein-Tag Markierung nachgewiesen werden (Ward et al., 2005; Zamborlini et al., 2006). Der Funktionsverlust wird mit der Störung der autoinhibitorischen Domäne am C-Terminus begründet.

Zusätzlich besitzen Shrub, Vps2 und Vps24 am C-Terminus eine MIM1- (MIT Interacting Motif 1-) Domäne, die für die Interaktion und Disassemblierung durch Vps4 benötigt wird

(Übersicht in Davies et al., 2009; Schöneberg et al., 2017). Diese Domäne ist in Vps20 nicht vorhanden. Vps20 besitzt eine MIM2 Domäne, die an die MIT- (Microtubule Interacting and Trafficking-) Domäne von Vps4 für die Disassemblierung bindet (Kieffer et al., 2008). Die MIM2 Domäne von Vps20 befindet sich nicht wie die MIM1 Domäne der anderen ESCRT-III Untereinheiten am unmittelbaren C-Terminus, sondern direkt hinter der  $\alpha$ 4-Helix von Vps20 (Übersicht in Schöneberg et al., 2017). Das Anfügen eines Protein-Tags könnte dadurch weniger störend sein, als bei anderen ESCRT-III Untereinheiten.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die N-terminale Markierung von Vps20 mit einem V5-Tag nicht möglich ist. Das ist so zu erwarten, da die hier gezeigten Rettungsexperimente mit Vps20 ohne N-terminales Glycin (Vps20 $\Delta$ Myr) gezeigt haben, dass für die vollständige Funktion von Vps20 eine N-terminale Myristoylierung vorhanden sein muss (Abbildung 2.25 B-D'). Durch das Anfügen eines N-terminalen V5-Tags befindet sich das für die Myristoylierung benötigte Glycin nicht mehr am N-Terminus (Übersicht in Farazi et al., 2001). Anders als der hier beobachtete Verlust des Rettungsvermögens von V5-Vps20, zeigt die Rettung durch Vps20 $\Delta$ Myr einen hypomorphen Vps20 Phänotyp. Der N-terminale V5-Tag scheint die Funktion von Vps20 also noch weiter zu stören.

In dieser Arbeit konnte die Auswirkung der fehlenden Myristoylierung das erste Mal für Metazoen gezeigt werden. In *Drosophila* führt die fehlende Myristoylierung nicht zum Funktionsverlust von Vps20, sondern nur zu reduzierter Funktion. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass Vps20 durch Vps25 auch ohne Myristoylierung an die endosomale Membran rekrutiert werden kann. Die Rekrutierung von Vps20 an die endosomale Membran könnte jedoch durch die initiale Membranbindung durch Myristoylierung effizienter sein.

Die fehlende Myristoylierung von Vps20 hat eine Auswirkung auf die subzelluläre Lokalisation von Vps20. Überexprimiertes Vps20-V5 zeigt eine zytoplasmatische Lokalisation mit zusätzlich Akkumulation an der Plasmamembran. Diese Plasmamembranassoziation ist bei Vps20 $\Delta$ Myr nicht mehr nachweisbar. Eine endosomale Lokalisation der Vps20-Varianten lässt sich in Überexpression jedoch nicht nachweisen. Möglicherweise ist das Fluoreszenzsignal der Plasmamembran-lokaliserten und zytoplasmatischen Fraktion von Vps20 bei dem Nachweis am Mikroskop so stark, dass es bei den Aufnahmen die Vps20-Fraktion an den kleinen endosomalen Strukturen überstrahlt. In zukünftigen Analysen könnte die Lokalisation von Vps20 $\Delta$ Myr als

Fluorophor-markierte Variante, die auf endogenem Niveau exprimiert ist, überprüft werden. Zusätzlich hierzu könnte die Assoziation mit der endosomalen Membran durch die Reduktion der Aktivität von Vps4 erhöht werden um zu überprüfen, ob die Variante auch ohne Myristoylierung durch die Rekrutierung von Vps25 an die endosomale Membran binden kann.

Für Rettungsexperimente wurden in dieser Arbeit auch Vps20-Varianten verwendet, die einen N-terminalen V5-Tag besitzen. Diese Varianten konnten anders als erwartet den *vps20* mutanten Phänotyp vollständig retten. In den Varianten wurde jedoch das zusätzliche ATG der cDNA nach dem V5-Tag nicht entfernt. Eine mögliche Erklärung für die vollständige Rettung dieser V5-markierten Vps20-Varianten könnte eine alternative Translationsinitiierung sein. Hierbei könnte das Ribosom beim Binden an die mRNA das erste Startcodon des V5-Tags überspringen und an das vorhandene Startcodon, das durch die cDNA kodiert wird, binden, um von dort aus die Translation zu starten (Kozak, 1995). Als Resultat daraus würde zusätzlich zu V5-markiertem Vps20 auch unmarkiertes Vps20 mit zugänglichem Myristoylierungs-Glycin translatiert werden. Das unmarkierte Vps20 könnte so die vollständige Rettung des mutanten Phänotyps bedingen. Wenn das zweite ATG entfernt wird, führt das zum Funktionsverlust von Vps20 (Abbildung 2.18).

Der Nachweis des V5-Tags der V5-markierten Vps20-Varianten mit zweitem ATG ist in Geweben oder in Larvenlysaten nicht möglich (nicht gezeigt). Das weist erneut darauf hin, dass der Tag möglicherweise nicht vorhanden ist und unmarkiertes Vps20 translatiert wurde.

### **3.2.4 Analyse der Bindung von Shrub an Vps20 über elektrostatische Wechselwirkungen in zwei Orientierungen**

Da Shrub und Vps20 strukturelle Ähnlichkeiten aufweisen und sowohl Shrub, als auch Vps20 saures und basisches Oberflächenpotential auf gegenüberliegenden Seiten besitzen, wurde die Möglichkeit überprüft, ob die beiden Proteine über elektrostatische Wechselwirkungen interagieren (Abbildung 2.14, Abbildung 2.20). Ähnliche elektrostatische Wechselwirkungen wurden für die Polymerisation von Shrub gezeigt (McMillan et al., 2016). Das Modell der Bindung über elektrostatische Wechselwirkungen wird durch die Beobachtung gestärkt, dass die Humanorthologe CHMP6 und CHMP4B über die N-terminale Hälfte ( $\alpha 1$ - $\alpha 2$ -Loop) aneinander binden (Yorikawa et al., 2005; Teis et al., 2010), die aus der zentralen helikale Haarnadel mit den sauren und basischen Oberflächenpotentialen besteht. Weitere veröffentlichte Daten zeigen, dass die  $\alpha 1$ - $\alpha 2$

helikale Haarnadel von Vps20 aus der Hefe für die Initiierung der ILV-Bildung ausreicht (Tang et al., 2016). Die Beteiligung bestimmter Aminosäuren wurde bis jetzt jedoch nicht ermittelt.

Hier wurde deshalb die Beteiligung von Aminosäuren an der Bindung von Vps20 an Shrub über elektrostatische Wechselwirkungen in zwei möglichen Bindungs-Orientierungen in Zusammenarbeit mit Dr. Stephan Schott-Verdugo in MD-Simulationen überprüft (Abbildung 2.21). Die identifizierten Aminosäuren wurden anschließend in Rettungsexperimenten charakterisiert.

In der ersten simulierten Orientierung wird die Bindung von Shrub an Vps20 über elektrostatische Wechselwirkungen von vier basischen Aminosäuren in Vps20 (R40, R60, R63 und K70) an die saure Oberfläche eines Shrub-Monomers vermittelt (Abbildung 2.21). Diese Art der Bindung ist laut der Simulation am wahrscheinlichsten, da durch die Bindung die größere Änderung von freier Energie in verschiedenen Umgebungen simuliert wurde (Anhang, Abbildung 8.3). Die Neutralisation dieser vier basischen Aminosäuren in Vps20, durch den Austausch zu Alaninen (R40A, R60A, R63A und K70A), beeinflusst das Rettungsvermögen der Vps20-Variante jedoch nicht (Abbildung 2.21). Es entstehen fertile Nachkommen aus dem Rettungsexperiment. Dieses Ergebnis steht in Kontrast zu dem Ergebnis der Co-Immunoprecipitation, in der die Interaktion von Shrub mit dieser Vps20-Variante (Vps20 R40A, R60A, R63A, K70A) reduziert war (Abbildung 2.23). Diese Diskrepanz lässt sich zum jetzigen Zeitpunkt mit den verfügbaren Daten nicht genau erklären.

In der zweiten simulierten Orientierung wird die Haupt-Bindung über hydrophobe Wechselwirkungen der Aminosäuren F97, V100 und V104 zwischen Vps20 und Shrub vermittelt. Der Austausch der hydrophoben Aminosäuren zu Alaninen in Vps20 (F97A, V100A und V104A) rettet den Phänotyp des *vps20* mutanten Hintergrundes vollständig und es entstehen fertile Adulte (Abbildung 2.21 E-F). Auch die Co-Immunoprecipitation dieser Vps20-Variante mit Shrub zeigt in Bezug auf die Bindung keine Veränderung im Vergleich zu wildtypischem Vps20 (Abbildung 2.23). Bei der Analyse der hydrophoben Wechselwirkungen, die diese Bindung vermitteln, könnte die Reduktion der Größe der hydrophoben Aminosäuren (durch den Austausch zu Alaninen) möglicherweise nicht drastisch genug sein, um die Bindung von Shrub an Vps20 zu stören. Hier könnten Austausche zu polaren Aminosäuren in weiteren Experimenten zur Aufklärung beitragen.

Auch elektrostatische Wechselwirkungen wurden in der Bindungssimulation in Orientierung zwei identifiziert. Über saure Aminosäuren in Vps20 (E42, D82 und E89) wird hierbei die Interaktion mit der basischen Oberfläche von Shrub vermittelt (Abbildung 2.22, Anhang: Abbildung 8.5, Abbildung 8.12). Die Neutralisation dieser Aminosäuren (E42A, D82A und E89A) führt in einem Rettungsexperiment zu einem hypomorphen Vps20 Phänotyp (Abbildung 2.22). Bei der Analyse der entstandenen vergrößerten Endosomen ist aufgefallen, dass Shrub hier nicht mehr nachweisbar war. Das ist nicht zu erwarten, denn bei fehlender Rekrutierung von Shrub würde ein deutlich stärkerer Phänotyp, als der hier nachgewiesene hypomorphe Phänotyp, erwartet werden. Bei fehlender Rekrutierung von Shrub würde der Ausfallphänotyp von Vps20 erwartet werden. Falls die Shrub Proteinmenge an den Endosomen reduziert ist, könnte der hier verwendete Shrub Antikörper möglicherweise nicht mehr in der Lage sein, Shrub nachzuweisen.

Diese unvollständige Rettung steht im Kontrast zu den Ergebnissen der Co-Immunopräzipitation, in der eine Bindung dieser Vps20-Variante (Vps20 E42A, D82A, E89A) und Shrub wie mit wildtypischem Vps20 nachgewiesen wurde (Abbildung 2.23).

Durch Mutationen in den Aminosäuren, für die in den MD-Simulationen eine mögliche Beteiligung an der Bindung von Vps20 an Shrub simuliert wurde, kann kein Ausfallphänotyp von Vps20 beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass Vps20 Shrub-Monomere möglicherweise in beiden Orientierungen für die simultane Polymerisationsinitiierung in zwei Richtungen binden kann. Hierbei würde wie bei der Shrub Polymerisation ein Shrub-Molekül an die basische Oberfläche von Vps20 und ein Shrub-Molekül an die saure Oberfläche von Vps20 binden. Dadurch könnten zwei Shrub Polymere entstehen, die in unterschiedlichen Orientierungen zu Vps20 beginnen. Die Störung der Bindung in einer Orientierung könnte dann durch den Polymerisationsstart in der anderen Orientierung kompensiert werden. Das würde auch erklären, warum durch Mutationen in der sauren Interaktionsoberfläche von Vps20 in der Co-Immunopräzipitation noch die Bindung an Shrub nachgewiesen werden kann und die Bindung durch den Austausch der basischen Aminosäuren nur reduziert ist.

Eine Voraussetzung für Polymerisationsinitiierung in zwei Orientierungen ist, dass das Shrub-Polymer sowohl von der basischen, als auch von der sauren Seite aus wachsen kann. Diese bidirektionale Polymerisation wurde bereits für die Shrub-Orthologe Snf7 und Vps32 beobachtet (Henne et al., 2012; Shen et al., 2014; Chiaruttini et al., 2015;

Mierzwa et al., 2017). In den veröffentlichten Experimenten bildeten die Shrub-Orthologe Polymere auf gestützten Lipideinzelschichten oder Lipiddoppelschichten die an beiden Enden länger wurden.

Ein weiterer Hinweis auf die mögliche Fähigkeit von Shrub an Vps20 in beiden Orientierungen binden zu können, zeigt eine AlphaFold2-Multimer Simulation. Hier wurden AlphaFold2 die Aminosäuresequenzen der zentralen helikalen Haarnadeln von Vps20 und zwei Shrub-Molekülen zur Verfügung gestellt. Der simulierte Komplex zeigt die Bindung der Shrub-Moleküle an die beiden hier analysierten Oberflächen von Vps20 (Abbildung 3.1). Die hier untersuchten Aminosäuren könnten in diesem simulierten Komplex die in den MD-Simulationen simulierten Bindungen eingehen.

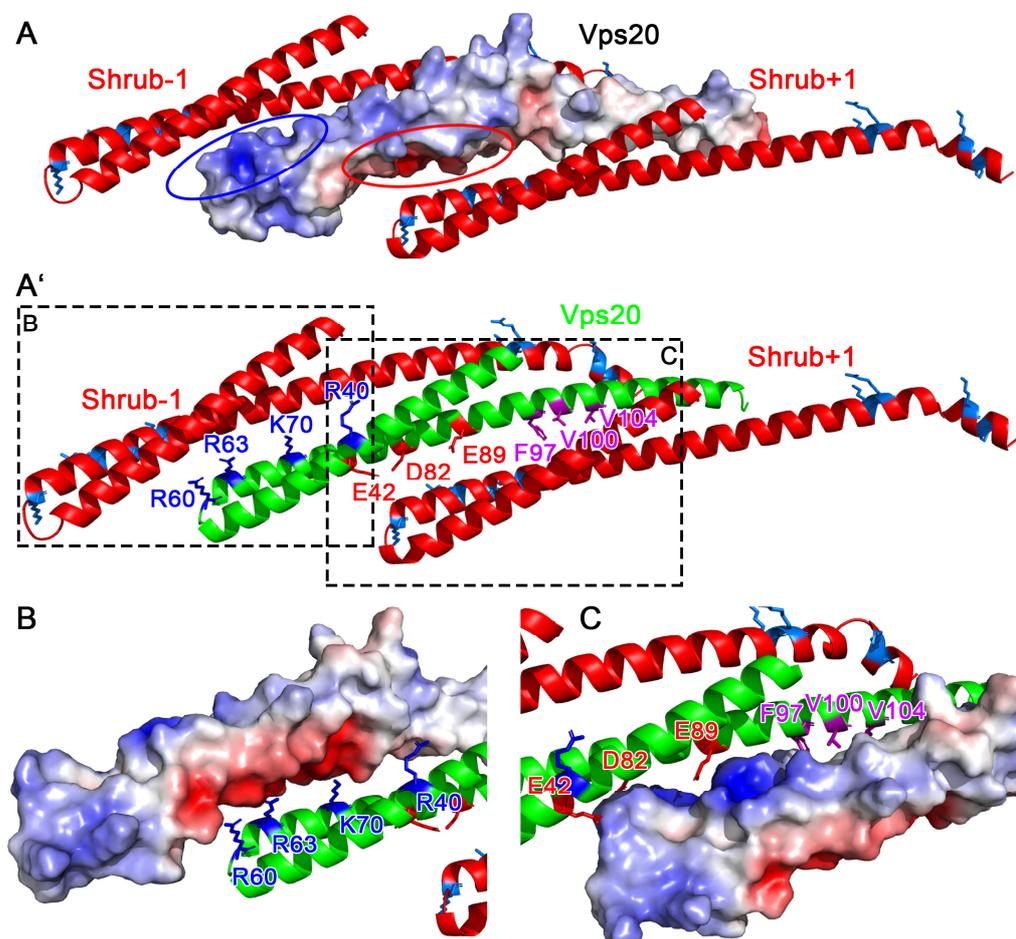


Abbildung 3.1: Durch AlphaFold2-Multimer simulierter Komplex aus Vps20 (Grün) und zwei Shrub-Molekülen (Rot). A zeigt das Oberflächenpotential von Vps20, woran zwei Shrub-Moleküle gebunden sind. Ein Shrub-Molekül interagiert über elektrostatische Wechselwirkungen mit der basischen Oberfläche von Vps20, die hauptsächlich durch die Aminosäuren R40, R60, R63 und K70 gebildet wird (A (blaue Ellipse), A', B). Das andere Shrub-Molekül bindet über hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen an die saure Oberfläche von Vps20 (A (rote Ellipse), A', C). Hierbei bilden E42, D82 und E89 die saure Oberfläche von Vps20 und F97, V100 und V104 die hydrophoben Wechselwirkungen. In A' sind die in B und C vergrößerten Ausschnitte durch gestrichelte Kästen markiert. In den Shrub-Molekülen sind in Hellblau die

---

analysierten membranbindenden Aminosäuren in Shrub markiert, die in Richtung der membranbindenden Oberfläche von Shrub ausgerichtet sind. Oberflächenpotential: Rot=sauer, Blau=basisch (berechnet mit APBS-electrostatics, Jurrus et al. (2018)).

---

Um weiter zu untersuchen, ob Shrub Vps20 in beiden Orientierungen binden kann, und durch die Veränderungen in einer Orientierung die Polymerisation trotzdem noch stattfinden kann, muss eine Vps20-Variante analysiert werden, in der die Shrub-Bindung durch Mutationen der Aminosäuren beider analysierter Orientierungen gestört ist (R40A, R60A, R63A, K70A; F97A, V100A, V104A und E42A, D82A, E89A). Hierbei könnten die Mutationen auch in Vps20-NeonGreen eingefügt werden, was in Kombination mit der Expression von Vps4-RNAi die Überprüfung der endosomalen Lokalisation zusammen mit Shrub ermöglichen würde. Hierbei könnte eine verringerte Shrub-Rekrutierung an den vergrößerten Endosomen durch Antikörperfärbung überprüft werden.

Die Bindung von zwei Vps20-Molekülen an zwei Vps25-Moleküle könnte auch die Polymerisation von zwei Shrub-Polymeren in die gleichen Richtung initiieren, wodurch zwei parallele Polymere entstehen würden (Teis et al., 2010). Dafür müsste eine Bindungsorientierung von Shrub an Vps20 bevorzugt werden. In dieser Arbeit konnten Ergebnisse gezeigt werden, die für die Bevorzugung der Bindungsorientierung zwei sprechen. In dieser Orientierung wird die Bindung an Shrub durch saure und hydrophobe Aminosäuren in Vps20 vermittelt. Bei MD-Simulationen der Bindungen, in die Vps25 einbezogen wurde, welches an Vps20 gebunden ist, konnte die Bevorzugung dieser Bindungsorientierung gezeigt werden. Vps25 interagiert in dieser Orientierung mit Shrub. Diese Interaktion wird durch die Aminosäuren Glutaminsäure132, Asparagin133 und Histidin136 in Vps25 vermittelt (Abbildung 2.24, Anhang, Abbildung 8.10, Abbildung 8.11, Abbildung 8.12). Der Start der Polymerisation in Orientierung zwei könnte durch diese Bindung stabilisiert werden und gegenüber der ersten Orientierung bevorzugt werden, da sie, wahrscheinlich durch die zusätzlichen Bindungen, energetisch stabiler ist. Durch die Einführung neutralisierender Mutationen dieser Aminosäuren in Vps25 könnte die Stabilisierung der Bindung von Vps20 an Shrub weiter analysiert werden.

Einen Hinweis auf die höhere physiologische Relevanz dieser Bindung zeigt sich dadurch, dass bei der Rettung durch eine Vps20-Variante mit neutralisierter basischer Oberfläche ein hypomorpher Vps20 Phänotyp zu beobachten war. Die Diskrepanz zwischen dem Ergebnis des Rettungsexperiments und der unveränderten Bindung, die in der Co-Immunopräzipitation gezeigt wurde, kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht weiter erklärt werden. Weitere Analysen der MD-Simulationen müssen durchgeführt werden, um die an

der Bindung von Vps25 beteiligten Aminosäuren in Shrub zu identifizieren. Durch Mutationen dieser Aminosäuren könnte die Bindung von Vps20 und Shrub in Bindungsorientierung weiter untersucht werden. Mutationen in diesen Aminosäuren könnten die Bindung destabilisieren.

Um die Bindung von Vps20 an Shrub und deren Affinität zueinander genauer als mittels Co-Immunopräzipitation zu überprüfen, könnten mit aufgereinigten Proteinen MST- (Microscale Thermophoresis-) Untersuchungen durchgeführt werden. Hierbei werden die Dissoziationskonstanten der Proteine gemessen (Übersicht in Jerabek-Willemsen et al., 2014). Dadurch können auch geringe Affinitätsänderungen von Shrub zu Vps20 durch eingefügte Mutationen aufgezeigt werden. Zusätzlich werden bei dieser Analyse nur die beiden Proteine eingesetzt und die Bindungsaffinität ohne Beteiligung weiterer Interaktionspartner analysiert.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass es durch Mutationen in den durch MD-Simulationen identifizierten Aminosäuren in Vps20 nicht zum Ausfall der Funktion von Vps20 kommt. Die Interaktion mit Shrub ist weiter möglich.

Eine mögliche Erklärung dafür ist der Polymerisationsstart von Shrub durch die Bindung an Vps20 in beiden hier untersuchten Orientierungen. Störungen der Bindung in einer Orientierung werden möglicherweise durch die Bindung in der anderen Orientierung kompensiert. Hierbei hätte die Bindungsorientierung in der Shrub mit Vps20 über saure und hydrophobe Aminosäuren in Vps20 interagiert vermutlich eine höhere physiologische Relevanz. Diese Bindung wird in den MD-Simulationen durch die Bindung von Vps25 an Shrub stabilisiert. Durch Mutationen in den sauren Aminosäuren kommt es zu einem hypomorphen Phänotyp.

### 3.3 Die Bindung von Shrub an die endosomale Membran

Shrub wird durch myristoyliertes Vps20 an die endosomale Membran rekrutiert (Babst et al., 2002a; Teis et al., 2008). Shrub selbst besitzt keine Myristoylierung. Die Assoziation mit der Membran muss also über die Aminosäurereste in Shrub geschehen.

In dieser Arbeit wurde die Bindung von Shrub an die endosomale Membran durch eine Kombination aus MD-Simulationen und *in vivo* Analyse charakterisiert.

#### 3.3.1 Shrub bindet über basische Aminosäuren an die endosomale Membran

Für Snf7 konnte gezeigt werden, dass die amphipathische Helix am N-Terminus die Bindungsenergie durch die initiale Bindung eines Snf7-Moleküls an die Membran herabsetzt, die Hauptbindung jedoch über die basischen Aminosäuren des Moleküls vermittelt werden (Buchkovich et al., 2013; Nepal et al., 2020). Für Shrub kann keine amphipathische Helix am N-Terminus vorhergesagt werden (AlphaFold2 Struktur-ID: Q8T0Q4, Abbildung 2.14 D). Für die Simulation der Bindung von Shrub an die endosomale Membran wurde aus diesem Grund in dieser Arbeit die zentrale helikale Haarnadel (Aminosäure 18-129) verwendet, für die eine Kristallstruktur existiert (McMillan et al., 2016) und für die in Snf7 die Membranbindung gezeigt wurde (Tang et al., 2015). In den Molekulardynamik Simulationen wurde ein Shrub-Monomer 25Å oberhalb einer simulierten Membran platziert, wobei es sich frei bewegen und rotieren konnte. Die Abstände zwischen den Aminosäuren und den Phospholipiden der Membran wurden dann über den Zeitraum der Simulation (500ns) beobachtet. Sollte der Abstand eines Aminosäurerestes von Shrub und einem Phospholipid der Membran unter 4,5Å fallen, wurde das als direkter Kontakt gezählt. Durch die Auswertung der Kontakte zwischen Aminosäureresten von Shrub-Monomeren und der Membran konnte für vier Lysine in Shrub eine Membraninteraktion identifiziert werden (K58, K66, K69 und K73; Abbildung 2.27 A-C, Anhang, Abbildung 8.7). Die so identifizierten Aminosäuren wurden durch *in vivo* Experimente untersucht.

Shrub pendelt zwischen Zytoplasma und endosomaler Membran (Masterarbeit: Brüser, 2013) weshalb die Disassemblierung von Shrub von der endosomalen Membran durch die temporäre Reduktion der Funktion von Vps4 unterbunden wurde. Shrub akkumuliert durch die Reduktion von Vps4 an der endosomalen Membran an stark vergrößerten Endosomen (Abbildung 2.28). Durch die Neutralisation der vier durch die Simulation identifizierten, membranbindenden Lysine in Shrub (Myc-Shrub 4K2A) wird diese

Membranassoziation nicht verändert (Abbildung 2.28 C-C''). Myc-Shrub 4K2A ist jedoch nicht mehr in der Lage den *shrub* mutanten Phänotyp zu retten, was die Wichtigkeit der basischen Ladung für die Funktion von Shrub unterstreicht. Die verringerte Membranassoziation dieser Variante, die durch die Simulation gezeigt wurde, führt also schon zum Funktionsverlust. (Abbildung 2.27, Tabelle 2.1). Die Neutralisation der vier Lysine reicht jedoch nicht aus, um die Membraninteraktion zu verhindern (Abbildung 2.28).

Shrub interagiert bei der Polymerisation mit bereits Membran-gebundenem Shrub und der endosomalen Membran. Für ShrubE86R und ShrubR59E konnte gezeigt werden, dass eine spontane Polymerisation der Shrub-Varianten durch die eingefügten Mutationen verhindert wird (McMillan et al., 2016). Durch das Einfügen von Mutationen in die Aminosäuren, die für die Polymerisation von Shrub benötigt werden, wurde verhindert, dass die veränderten Shrub-Moleküle in das Polymer, was durch endogenes Shrub geformt wird, eingebaut werden.

Durch die Mutationen in den für die Polymerisation benötigten Aminosäuren konnte die Membranassoziation jedoch nicht reduziert werden und auch monomeres Shrub kann an die Membran binden (Myc-Shrub R59E, R70E; Abbildung 2.28). Bei der Überprüfung der Shrub-Varianten in, welchen die vier membranbindenden Lysine neutralisiert wurden, wurden sowohl Mutationen in die basischen, als auch in die sauren Aminosäuren, die für die Polymerisation benötigt werden, eingefügt (Myc-Shrub 4K2A, R59E, R70E; Myc-Shrub 4K2A, R59E, E86K). Alle Varianten mit vier ausgetauschten Lysininen binden weiter an die endosomale Membran.

Da wie bereits erwähnt die Polymerisation von Shrub durch die Interaktion mit bereits Membran-gebundenen Shrub-Molekülen stattfindet, wurde überprüft, ob in den Shrub-Molekülen in dem formenden Polymer noch weitere Aminosäuren an der Membranbindung beteiligt sind.

Um die Membranbindung in einem sich formenden Shrub Polymer zu simulieren, wurde für weitere MD-Simulationen ein Shrub-Trimer aus drei zentralen helikalen Haarnadeln verwendet. Simulationen der Membranbindung dieses Shrub-Trimers zeigen eine Beteiligung von Aminosäuren am Ende der langen Helix der zentralen helikalen Haarnadel von Shrub (K113, R114, K123, H124, Abbildung 2.27 D, Anhang, Abbildung 8.8). Erst die zusätzliche Neutralisation dieser basischen Aminosäuren verhindert die Membraninteraktion von monomeren Shrub (Myc-Shrub 4K2A, R59E, R70E, KRKH2A; Abbildung 2.28).

Die Wichtigkeit dieser zusätzlichen Aminosäuren für die Membranbindung von Shrub zeigen auch die bereits veröffentlichten Analysen zu der Membranbindung von Snf7. Durch die Ladungsumkehr von basischen Aminosäuren an der Spitze der helikalen Haarnadel von Snf7 konnte die Membranassoziation lediglich reduziert werden (Buchkovich et al., 2013). Möglicherweise sind auch in Snf7 weitere Aminosäuren an der Membranbindung beteiligt. Hinweise für die Beteiligung von weiteren basischen Aminosäuren an der langen Helix der helikalen Haarnadel von Snf7 konnte von Tang et al. (2015) durch Simulationen gezeigt werden. Eine der von Tang und Kollegen identifizierten Lysine an der langen Helix der helikalen Haarnadel ist konserviert und wurde in dieser Arbeit überprüft (Anhang, Abbildung 8.6: K115 in Snf7 = K113 in Shrub). Hier konnte die Beteiligung dieser Aminosäure an der Membranbindung *in vivo* gezeigt werden.

Zusätzlich zu den vier neutralisierten Lysinen an der Spitze der helikalen Haarnadel von Shrub, die in der Simulation mit monomeren Shrub eine Membranassoziation gezeigt haben (K58, K66, K69, K73), wurden weitere vier Aminosäuren neutralisiert (K113, R114, K123, H124). Es ist nicht auszuschließen, dass die vier zusätzlich neutralisierten Aminosäuren nicht alle für die Membranbindung benötigt werden. Aufbauend auf den hier gezeigten Ergebnissen sollten die zusätzlichen Aminosäureaustausche einzeln betrachtet werden. Hierbei sollten die neutralisierenden Mutationen der Aminosäuren K113, R114, K123 und H124 einzeln in Shrub4K2A eingebracht werden und die entstehenden Shrub-Varianten auf ihre endosomale Lokalisation überprüft werden. Möglicherweise ist auch die Summe der basischen Ladungen, die über die membranbindende Oberfläche von Shrub verteilt ist, für die Membraninteraktion notwendig. Hier könnte erneut die Reduktion der Aminosäureaustausche Aufschluss darüber geben, wie viele basische Ladungen für die Membranbindung benötigt werden.

Die hier für die Membranbindung von Shrub identifizierten Aminosäuren könnten auch für die Analyse der Membranbindung von Shrub-Konstrukten mit Giant Unilamellar Vesicles (GUVs) verwendet werden. Hierbei könnten aufgereinigte Proteine der Shrub-Varianten auf GUVs gegeben und die spontane Polymerisation auf der Membran beobachtet werden. Die Membranbindung kann dabei auch in Polymeren analysiert werden, da kein weiteres wildtypisches, endogenes Shrub vorhanden ist. Endogenes Shrub könnte vermutlich auch mit Shrub-Varianten Polymere bilden, deren Membranbindung geschwächt ist.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente konnten nur im wildtypischen *shrub* Hintergrund durchgeführt werden, da die Neutralisation der vier Lysine an der Spitze der helikalen Haarnadel schon dazu führt, dass die Shrub-Varianten den *shrub* mutanten Hintergrund in einer Kopie im Genom nicht retten können (Tabelle 2.1). Eine Interaktion mit endogen vorhandenem Shrub ist trotz der gestörten Polymerisationsstellen nicht auszuschließen, da für Snf7 auch Hinweise für eine laterale Interaktion von Polymeren gezeigt werden konnten (Tang et al., 2015). Die kontrollierten Bedingungen ohne endogenem Shrub in GUV-Experimenten könnten die Ergebnisse für die Beteiligung der Aminosäuren an der Membranbindung zusätzlich bestätigen.

In dieser Arbeit konnte in MD-Simulationen die Beteiligung von basischen Aminosäuren in Shrub an der Membranbindung gezeigt werden. Diese Beteiligung konnte *in vivo* bestätigt werden. Monomeres Shrub interagiert über vier Lysine an der Spitze der helikalen Haarnadel mit den Phospholipiden der endosomalen Membran. In Trimer Simulationen wurde für vier weitere basische Aminosäuren die Beteiligung an der Membraninteraktion gezeigt. Erst die Neutralisation dieser acht Aminosäuren konnte *in vivo* in vermutlich monomeren Shrub die Membraninteraktion verhindern.

In dieser Arbeit konnte die Bindung von Shrub an Interaktionspartner und die endosomale Membran weiter charakterisiert werden. Diese Interaktionen sind für die vollständige Funktion von Shrub notwendig.

Der Interaktionspartner Lgd bindet im Zytoplasma Shrub-Monomere, was wahrscheinlich die Menge an freiem Shrub im Zytoplasma reguliert. Die Fähigkeit der Bindung von Shrub-Monomeren durch die zwei ungeradzahligen DM14-Domänen verleiht diesem Vorgang funktionelle Robustheit. Hier konnte für DM14-1 und DM14-3 eine partielle Redundanz gezeigt werden.

An die endosomale Membran wird Shrub durch die Interaktion mit Vps20 rekrutiert. Hierbei wurde die Möglichkeit der Bindung von Shrub und Vps20 über elektrostatische Wechselwirkungen in zwei unterschiedlichen Bindungsorientierungen überprüft. Die Störung der Bindung in einer dieser Orientierungen führt nicht dazu, dass es zum Ausfall von Shrub kommt.

Durch basische Aminosäuren in Shrub ist die Interaktion mit den Phospholipiden der endosomalen Membran während der Polymerisation möglich, was letztendlich zur Bildung von intraluminalen Vesikeln führt.

## 4. Zusammenfassung

Die ESCRT-Maschinerie ist während des endosomalen Transports von Transmembranproteinen für die Bildung von intraluminalen Vesikeln (ILV) zuständig. Die Maschinerie (ESCRT-0-ESCRT-III) arbeitet sequentiell, wobei die finale Abschnürung der ILV durch ESCRT-III zusammen mit Vps4 vermittelt wird. Shrub ist die häufigste ESCRT-III Untereinheit. Die Polymerisation von Shrub in spiralförmigen Polymeren wird durch die Rekrutierung an die endosomale Membran über die Interaktion mit Vps20 initiiert. Für die vollständige Funktion von Shrub ist zusätzlich die Interaktion mit Lgd notwendig.

In dieser Arbeit konnte eine partielle Redundanz zwischen DM14-1 und DM14-3 in Lgd gezeigt werden. Zusätzlich wurde herausgefunden, dass das KARRR Motiv nicht als minimales Shrub-Bindemotiv in den DM14-Domänen ausreicht. Auch die Integration der Interaktionshelix von DM14-3 in die nicht Shrub-bindende DM14-4 ist für die Interaktion mit Shrub nicht ausreichend. In dieser Arbeit konnten Interaktionen zwischen der helikalen Haarnadel und einer Prolin-reichen Region am C-Terminus der DM14-Domänen gefunden werden, die möglicherweise für ihre strukturelle Integrität und damit für die Interaktion mit Shrub notwendig sind.

Es konnte gezeigt werden, dass der Aminosäurebereich 558-664 in Lgd über die Integration des C-Terminus für die Stabilität des Proteins benötigt wird.

Shrub und Vps20 ähneln sich strukturell. Das weist zusammen mit den ähnlichen Oberflächenpotentialen auf eine Bindung über elektrostatische Wechselwirkungen hin. Hier wurden elektrostatische Wechselwirkungen von Shrub und Vps20 in zwei Orientierungen durch MD-Simulationen überprüft. Mit *in vivo* Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Störung einzelner Interaktionsoberflächen in Vps20 nicht zum Verlust der Vps20 Funktion führt. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung wäre die Initiierung der Polymerisation von Shrub in beiden Orientierungen. Bei Störung der Bindung in einer Orientierung, könnte die Polymerisation weiterhin über die andere Orientierung in die entgegengesetzte Richtung initiiert werden.

Shrub muss die endosomale Membran bei der Polymerisation binden um sie verformen zu können. Durch die Kombination von MD-Simulationen und *in vivo* Analysen konnten in dieser Arbeit eine mögliche Membranbindung von Shrub über die Interaktion von basischen Aminosäuren mit den Phospholipiden der endosomalen Membran gezeigt werden. Hierbei konnte gezeigt werden, dass auch monomeres Shrub Membranen binden kann.

## 5. Summary

The ESCRT machinery mediates the formation of intraluminal vesicles (ILV) during endosomal transport of membrane proteins. The machinery (ESCRT-0-ESCRT-III) works in sequence, with the final pinch-off of the ILV being mediated by ESCRT-III together with Vps4. Shrub is the most abundant ESCRT-III subunit. Its polymerization in spirals is initiated by recruitment to the endosomal membrane via interaction with Vps20. The interaction of Shrub and Lgd is needed for the full function of Shrub.

In this work it could be shown that DM14-1 and DM14-3 function in a partially redundant manner.

In addition, it was found that the KARR R motif is not sufficient for Shrub binding and cannot act as a minimal shrub-binding motif in the DM14 domains.

The integration of the DM14-3 interaction helix into the non-shrub-binding DM14-4 is also not sufficient for the interaction with Shrub

In this work, interactions between the helical hairpin and a proline-rich region at the C-terminus of the DM14 domains could be found, which might be necessary for the structural integrity of the DM14 domains.

Evidence was collected that the amino acid 558-664 in Lgd are required for the stability of the protein via the integration of the C-terminus.

Shrub and Vps20 are structurally similar which together with the similar surface potentials indicates binding through electrostatic interactions. Here the binding of Shrub and Vps20 was examined in two orientations using a combination of molecular dynamics simulations and *in vivo* experiments. Perturbation of individual interaction surfaces in Vps20 does not lead to loss of Vps20 function. A possible explanation for this observation would be the initiation of the polymerization of Shrub in both orientations. If binding is disrupted in one orientation, polymerization could still be initiated in the opposite direction via the other orientation.

Shrub has to bind the endosomal membrane during polymerization in order to be able to deform it. By combining molecular dynamics simulation and *in vivo* analysis again, a possible membrane binding of Shrub via the interaction of basic amino acids with the phospholipids of the endosomal membrane could be shown in this work. It was shown here that monomeric Shrub can also bind to membranes.

## 6. Material und Methoden

### 6.1 Material

#### 6.1.1 Puffer, Lösungen und Medien (allgemein)

CutSmart™-Puffer (10x)	- New England Biolabs
Q5®-High Fidelity DNA Polymerase Puffer (5x)	- New England Biolabs
T4-DNA-Ligase Puffer (10x)	- New England Biolabs
Vectashield® H-1000 Einbettungsmedium	- Vector Laboratories Inc.
1xPBS (phosphate buffered saline)	137mM NaCl; 2,7mM KCl; 10mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 2mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; pH 7,4
0,3% PBT (1x PBS + Triton-X-100)	500ml 1x PBS; 1,5ml Triton-X-100
4% PFA (Paraformaldehyd)	4% Paraformaldehyd in PBS
1xTAE	40mM Tris-Acetat; pH 8,0; 1mM EDTA
Gibson Assembly 5x ISO-Puffer	3ml 1M Tris-HCL pH 7,5; 150 µl 2M MgCl <sub>2</sub> ; 60µl 100mM dGTP, 60µl 100mM dATP, 60µl 100mM dTTP, 60µl 100mM dCTP, 300µl 1M DTT; 1,5g PEG-8000; 300µl 100mM NAD; dH <sub>2</sub> O auf 6ml
Squishing-Buffer	10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 25mM NaCl; pH 8,2

#### LB-Medium zur Kultivierung von Bakterien:

Flüssigmedium:	10g Bactotrypton; 5g Hefeextrakt; 10g NaCl; 1l dH <sub>2</sub> O; autoklavieren; Zugabe von Antibiotikum nach Bedarf
LB-Agar-Platten:	LB-Medium; 1,5% Agar; aufkochen; Zugabe von Antibiotikum nach Bedarf; in Petrischalen zum Aushärten verteilt.

#### Futtermedium zur Kultivierung von *Drosophila melanogaster*:

100g Agar; 1,4kg Maismehl; 336g Trockenhefe; 190g Sojamehl; 900g Malzextrakt; 800g Zuckerrübensirup; 90ml Propionsäure; 30g Nipagin-Pulver; gemischt in 20l dH<sub>2</sub>O

Apfelsaft-Agar-Platten:

40g Agar auf 1l mit dH<sub>2</sub>O auffüllen; gemischt mit 340ml 100% Apfelsaft; 17g Zucker; 30ml Nipagin; aufkochen; auf 5cm Petrischalen verteilen.

**6.1.2 Enzyme**

T4-DNA-Ligase	– New England Biolabs
Q5®-High Fidelity – DNA Polymerase	– New England Biolabs
OneTaq®-DNA Polymerase	– New England Biolabs
<i>Pfu</i> -DNA Polymerase	– Promega
<i>Bam</i> HI-HF-Endonuklease	– New England Biolabs
<i>Dpn</i> I-Endonuklease	– New England Biolabs
<i>Eco</i> RI-HF-Endonuklease	– New England Biolabs
<i>Kpn</i> I-HF-Endonuklease	– New England Biolabs
<i>Xba</i> I-Endonuklease	– New England Biolabs
<i>Xho</i> I-Endonuklease	– New England Biolabs

Gibson-Assembly Enzym Mastermix:

320µl 5x ISO-Puffer	
0,64µl 10 U/µl T5 Exonuklease	– Biozym
20µl 2U/µl Phusion HF DNA-Polymerase	– New England Biolabs
160µl 40U/µl <i>Taq</i> Ligase	– New England Biolabs
1,2ml dH <sub>2</sub> O	

**6.1.3 Reaktions-Kits**

Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit	– Zymo Research
NucleoBond® Xtra Midi	– Macherey-Nagel
pGEM®-T Easy Vektor System	– Promega

### 6.1.4 Primer

Tabelle 6.1: Sequenzen verwendeter Primer.

Bezeichnung	Sequenz 5'→3'
<b>Klonierungsprimer</b>	
KpnI-HA-shrb FW	GGGGTACCCAAAATGTACCCATACGACGTTCCAGACTACGCTAGTTTC TTCGGGAAGATGTTTCG
KpnI-Vps20-V5 FWn	GGGGTACCCAAAATGGGAGCTTTGTTTGGAAAAACC
IgdC2-HAdeltaC-KpnI Rev	GGGGTACCTCAAGCGTAATCTGGCACATCGTATGGGTAAGCGCGAAC GCGTATCTTGACTTCC
NotI VPS20 FW	GTTAGTCGCGGCCGCATGGGAGC
Not-V5-Vps20 FWn:	AAGGAAAAAAGCGGCCGCATGATCCCCAACCCCTGCTGGGCCTGGAT GGAGCTTTGTTTGGAAAAACC
shrb-NotI Rev	TTTTCTTTTGGCGGCCGCTTAGTTGGACCAGGATAAAAAGCTGC
VPS20 Down FW	GGGGTACCAACCTATAGTAAAACGAAACCAATGCC
VPS20 Down Rev	GCTCTAGAGAGTGCCTGCACTCCATCTGC
VPS20 KpnI Rev2	GTTGGTACCCTATGCCTCCAC
VPS20 UP FW	CGGGATCCCGAGTAGTTTTGTTCTATAAAGTGGG
VPS20 UP Rev	TTTTCTTTTGGCGGCCGCGACTAACTACGTGGCTGTGTAGGC
Vps20DelMyr FW	AAGGAAAAAAGCGGCCGCATGGCTTTGTTTGGAAAAACCAGC
VPS20-V5-KpnI Rev	GGGGTACCCTAATCCAGGCCAGCAGGGGGTTGGGGATTGCCTCCACC AGGACTTCTTGG
Vps20-V5-NotI REVn	TTTTCTTTTGGCGGCCGCTAATCCAGGCCAGCAGGGGGTTGGGGAT TGCCTCCACCAGGACTTCTTGG
<b>Gibson-Assembly-Primer</b>	
Gibson C2-pattB Rev	GCGTTCCTATTTTATTTAAATTTTCTTGTTTAGCCGGTACCTCAAGCG TAATCTGG
Gibson DM14 1 Überhang 558 Rev	CAATGGCAAAGGAGGCTTCTAGATTATCCCTTTGTGAGACTTCAGGT GGAATGTCATCC
Gibson DM14 1 Überhang DM14 1 Rev	GCTTGTACATTTCCAGGCGCTGTTTGATAATGCTTAAAAGAGGATTA GGGGGAGATGTG
Gibson DM14 4 Überhang Helix Rev 2	GCTTACAATCCTTCCAAAGCGTCTTGCTTTTCCGCTATTGTTCGCTT TTTTGGCCTCTATAGC
Gibson DM14-4 LAP REV	GGCGGCGCCCTGAAAATAAAGATTCTCAGGCGGGACGGGAAGAGTGC
Gibson Helix 3 an C2 FW 2	GCTATAGAGGCCAAAAAAGCGAACAATAGCGGAAAAGCAAGACGCTT TGGAAGGATTGTGAAGCATACGAAGATGCCATAAAGTTGTACAAGGC AGGATTGCCAGTGGACCTCAGC
Gibson LAP Überhang C2 Rev	CCCCGGACCACAACAATTTCAAGCTCCGAACCCGAGGGACCGCTCGAC
Gibson Überhang DM14 1 558 C2 FW	CAAGTCCATTAACGTGGATGACATTCCACCTGAAGTCTCACAAAGGG ATAATCTAGAAGC
Gibson Überhang DM14 1 DM14 1 FW	CTACATCTGTGGCTCCACATCTCCCCCTAATCCTCTTTTAAGCATT TCAAACAGCG
Gibson Überhang DM14 4 LAP FW	GGACCTCAGCACTTCCCGTCCCGCCTGAGAATCTTTATTTTCAGGG CGCCGCC
Gibson Überhang LAP C2 FW	GCCCCTGTCGTCGAGCGGTCCCTCGGGTTCGGAGCTTGAAATTGTTGT GGTCCGGGG

<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz 5'→3'</b>
Gibson Überhang pattB-lgd FW	GTTAATAAACAGCCTCTGTGCAATCAAGGGCGGCCGCATGTTCTCCA GAAAGAAGCC
Gibson-Neon-pattB Rev	GGCATTGGTTTTCGTTTTACTATAGGTTGGTACCTTACTTGTACAGCTC GTCC
Gibson-pattB-Vps20 FW	CACAGCCACGTAGTTAGTCGCGGCCGCATGGGAGCTTTGTTTGG
Gibson-Vps20-Neon FW	CCAAAGCAACCAAGAAAGTCTGGTGGAGGCAATGGTGAAGCAAGGGC GAGGAG
Gibson-Vps20-NeonGreen Rev	CCATGTTATCCTCCTCGCCCTTGCTCACCATTGCCTCCACCAGGACTT TC
<b>Mutagenese-Primer</b>	
F97AV100AV104A FW	GCTGCGGACATTGAGGCCGCCAGGCCGAGATGAAGGCCCTGGACGGC CTC
F97AV100AV104A Rev	GAGGCCGTCCAGGGCCTTCATCTCGGCCTGGGCGGCCTCAATGTCCGC AGC
L369A FW	GGCTCTGCAGCAACGTGCCGAGAAATATCAATCTG
L369A Rev	CAGATTGATATTTCTCGGCACGTTGCTGCAGAGCC
mut lgd DM14 2+4 KARR K291R FW	GCCCGTCGGTTTCTCCGCGTGGTCAAGCAATTTGACG
mut lgd DM14 2+4 KARR K291R Rev	CGTCAAATTGCTTGACCACGCGGAGAAACCGACGGGC
mut lgd DM14 2+4 KARR K530R FW	GGCGAGGCGCTACCTCCGCATCTTCAAGGGATTTCG
mut lgd DM14 2+4 KARR K530R Rev	CGAATCCCTTGAAGATGCGGAGGTAGCGCCTCGCC
Q506L FW	CTGCTCCTCGAGCGCCTGAAGGAGTTTAAGC
Q506L Rev	GCTTAAACTCCTTCAGGCGCTCGAGGAGCAG
shrb_K58A+R59A-for	GCGTCTAAAAACGCAGCAGTGGCCCTGCAAGC
shrb_K58A+R59A-rev	GCTTGCAGGGCCACTGCTGCGTTTTTTAGACGC
shrb_K66A_K69A_K73A +R70A-for	CGCGAAAAAGGCGGCGCTGGAGGCGCAAC
shrb_K66A_K69A_K73A +R70A-for	GTTGCGCCTCCAGCGCCGCTTTTTTCGCG
shrb_R59E+K58A-for	GAATGCGTCTAAAAACGCCGAGGTGGCCCTGC
shrb_R59E+K58A-rev	GCAGGGCCACCTCGGCGTTTTTTAGACGCATTC
shrb_R70E+K66A-for	GCCCTGCAAGCACTCGCGAAAAAGAAGGAGCTG
shrb_R70E+K66A-rev	CAGCTCCTTCTTTTTCGCGAGTGCTTGCAGGGC
Shrub E86K For	CACCCTGTCCACAATCAAGATGCAGCGGAGGCTC
Shrub E86K Rev	GAGCCTCGCGCTGCATCTTGATTGTGGACAGGGTG
shrub R59E For	GAATGCGTCTAAAAACAAAGAGGTGGCCCTGCAAGCACTCAAG
shrub R59E Rev	CTTGAGTGCTTGCAGGGCCACCTCTTTGTTTTTAGACGCATTC
shrub R70E For	GCACTCAAGAAAAAGAAGGAGCTGGAGAAGCAACTCCAG
shrub R70E Rev	CTGGAGTTGCTTCTCCAGCTCCTTCTTTTTCTTGAGTGC
ShrubK113R114A FW	CGCGGATGCCCTCGCCGCCGCCATCAGAATATG
ShrubK113R114A Rev	CATATTCTGATGGGCGGCGGAGGGCATCCGCG
ShrubK123H125A FW	GAATATGGACGTGGACGCCGTGGCCGACATGATGGATGAC

<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz 5'→3'</b>
ShrubK123H125A Rev	GTCATCCATCATGTGCGGCCACGGCGTCCACGTCCATATTC
Vps20 K70A FW	CAAGCTGCTGCTGCGCGCCAAGAAGTACCAGGAG
Vps20 K70A Rev	CTCCTGGTACTTCTTGGCGCGCAGCAGCAGCTTG
Vps20 R40A FW	GAAGCAGTACCAAAAAGCCATCGAGACGCAGTTGG
Vps20 R40A Rev	CCAACTGCGTCTCGATGGCTTTTTGGTACTGCTTC
Vps20 R60A FW	GTGCCTACAGCAAGGTGCCAAGGACCGGGCCAAGC
Vps20 R60A R63A FW	GTGCCTACAGCAAGGTGCCAAGGACGCCGCAAGCTGCTGCTG
Vps20 R60A R63A Rev	CAGCAGCAGCTTGGCGGGCTCCTTGGCACCTTGCTGTAGGCAC
Vps20 R60A Rev	GCTTGGCCCGTCTTGGCACCTTGCTGTAGGCAC
Vps20 R63A FW	CAAGGTCGCAAGGACGCCGCAAGCTGCTGCTG
Vps20 R63A Rev	CAGCAGCAGCTTGGCGGGCTCCTTGGCACCTTG
Vps20D82A FW	CTGCTGACCAATGCCGCCAAACAGCTGGAAAACC
Vps20D82A REV	GGTTTTCCAGCTGTTTGGCGGCATTGGTCAGCAG
VPS20deltaESCRT2 FW	CCAGGACAAGGCGGTTCCGAATTGAAGCAACAGGCCGCCCGTCTGA AGCAGTACC
VPS20deltaESCRT2 REV	GGTACTGCTTCAGACGGGCGGCCTGTTGCTTCAATTGGCGAACCGCT TGTCCTGG
Vps20E42A FW	CAGTACCAAAAACGCATCGCCACGCAGTTGGAGAATG
Vps20E42A REV	CATTCTCCAAGTGGCGATGCGTTTTTGGTACTG
Vps20E89A FW	CAGCTGGAAAACCTGGCCAAGCTGGCTGCGGAC
Vps20E89A REV	GTCCGCAGCCAGCTTGGCCAGTTTTCCAGCTG
<b>Sequenzierungs-Primer</b>	
L1	ATATGGTGAGGACGATGGGG
L10	AGCTGTGGCTATCATTTTG
L2	AGACCTTTCTGCCCACGAC
L3	TGAAGTCAGTGTAAGCC
L4	AAATGTGTGAAGACGGACAGG
L5	ACAAGGCAGGCAAACCAG
L6	CAAAAAGCGGGAGAAATAG
L7	TATGGGAGATGTAGCAGG
P01	CTGAAATCTGCCAAGAAG
P02	GTGTATTTTAGATTCCAACCT
SeqF1	GATTTCACTGGAAGTAGG
SeqR1	GAGCTTGGCGTAATCATG
SeqVPS20 FW	GCTACAAAGTAGCTAAGTTGCC
SeqVPS20 FW 2	CAGGAGAGTCTGCTGACCAATG
<b>Standard Sequenzierungs-Primer</b>	
SP6	ATTTAGGTGACACTATAG
T7	TAATACGACTCACTATAGGG
<b>Single-Fly PCR Primer</b>	

Bezeichnung	Sequenz 5'→3'
Vps20 geno FW	GGCCAGACCATGATGAAATAAC
Vps20 geno Rev	CTACTGGTGAATGGGTATCGATC
lgd Ctrl FW	GCCTCTGTGCAATCAAGG
lgd Ctrl 1 Rev	CGATGTGCCAGATTACGC

Die verwendeten Primer wurden durch die Firma Sigma-Aldrich synthetisiert.

### 6.1.5 Vektoren

Tabelle 6.2: Lister verwendeter Vektoren

Bezeichnung	Bezugsquelle/Referenz	Beschreibung/Verwendung
BAC-Vps20 (BAC-Klon, CH322-09008)	Venken et al. (2009)	Bacterial artificial Chromosome (BAC). Beinhaltet genomische Region von Vps20, RpS16, CG4294, CG4269, CG4329 und Teile von CG33143 von <i>D.melanogaster</i>
mNeongreen	Shaner et al. (2013)	Vektor mit der cDNA für mNeongreen aus <i>B.lanceolatum</i>
pattB	Bischof et al. (2007)	Vektor zur Erzeugung transgener Fliegen; beinhaltet attB-Region zur $\Phi$ C31-Integrase basierter Insertion in das Genom von <i>D.melanogaster</i>
pattB-LgdP	Troost et al. (2012)	Expressionsvektor für Lgd-Konstrukte; basierend auf pattB, enthält der Vektor zusätzlich 553bp upstream und 548bp downstream der kodierenden Region von Lgd
pattB-LgdP-Lgd-HA	Troost et al. (2012)	Expressionsvektor für Lgd-Konstrukte mit cDNA für vollständiges Lgd
pattB-LgdP-Lgd $\Delta$ DM14 1+3	Tibbe (2019)	Expressionsvektor für Lgd-Konstrukte mit cDNA für Lgd ohne die erste und dritte DM14-Domäne
pattB-LgdP-Lgd $\Delta$ DM14 1-3	Troost et al. (2012)	Expressionsvektor für Lgd-Konstrukte mit cDNA für Lgd ohne die ersten drei DM14-Domäne
pattB-shrubP-myc-shrub	Bäumers (2020)	Expressionsvektor für Shrub-Konstrukte; basierend auf pattB, enthält der Vektor zusätzlich 510bp upstream und 510bp downstream der kodierenden Region von Shrub und die Shrub-cDNA mit N-terminalen Myc-Tag
pattB-shrubP-eGFP-LAP-shrub-cDNA	AG Klein	Expressionsvektor für Shrub-Konstrukte; enthält die cDNA für eGFP, eines LAP-Tags und Shrub.
pMT	Thermo Fisher Scientific V412020	Expressionsvektor mit Metallothionein-Promotor; für die Verwendung in S2-Zellen; Die Expression der eingefügten cDNA kann durch die Zugabe von 1mM Kupfersulfat in das Zellkulturmedium induziert werden
pUAST-attB	Bischof et al. (2007)	Expressionsvektor mit UAS Promotor und SV40 poly-Adenin 3' UTR; zur Herstellung

Bezeichnung	Bezugsquelle/Referenz	Beschreibung/Verwendung
		transgener Fliegen über attB-Region durch $\Phi$ C31-Integrase basierter Insertion in das Genom von <i>D.melanogaster</i>
pUC57-Vps20	BaseClear BV	Durch BaseClear BV synthetisierte Vps20cDNA

### 6.1.6 Material für proteinbiochemische Arbeiten

#### Puffer und Lösungen:

PBT (Tween)	1x PBS; 0,1% (v/v) Tween 20
4x Trenngelpuffer	1,5M Tris; 0,04% (w/v) SDS; pH 8,8 mit HCl einstellen
4x Sammelgelpuffer	0,5M Tris; 0,4% (w/v) SDS; pH 6,8 mit HCl einstellen
APS (Ammoniumperoxidsulfat) 10% (w/v)	0,2 g APS zu 2ml dH <sub>2</sub> O
10x Transferpuffer (Western Blot)	250mM Tris, pH 8,3; 1,5M Glycin; 10-20% (v/v) Methanol; 0,0375% (w/v) SDS
10x Elektrophoresepuffer	0,25M Tris; 1,92M Glycin; 1%(w/v) SDS
Blockierlösung	5% Magermilchpulver (Sucofin) in 1x PBS
Färbelösung	2% Magermilchpulver (Sucofin) in 1x PBS
4x Laemmli-Puffer	16ml 100% Glycerin; 3,2g SDS; 1,6mg Bromphenol-Blau; 9,6ml 1M Tris-HCl pH 6,8; 2,4g DTT
<i>Drosophila</i> Lysispuffer	10% Glycerin; 50mM HEPES (pH7,5); 150mM NaCl; 0,5% Triton-X-100; 1,5mM MgCl <sub>2</sub> ; 1mM EGTA; vor Benutzung mit 4 $\mu$ l Protease-Inhibitor-Cocktail (Sigma) pro 1 ml Puffer versetzen

Chemikalien/Materialien:

Rotiphorese Gel 30 (30% (w/v))	– Roth
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)	– Merck
Transfermembran Roti-PVDF	– Roth
Whatman Filterpapier	– Bio-Rad-Laboratories

Größenstandard:

PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	– Thermo Fisher Scientific
--	----------------------------

HRP-Chemilumineszenz-Reaktion-Reaktionskit:

WesternBright ECL HRP Substrate	– Advansta
---------------------------------	------------

Beads für die CoIP:

Protein G Sepharose™ 4 Fast Flow	Cytiva
Anti-V5-tag mAb-Magnetic Beads	MBL International

**6.1.7 Material für die Zellkultur**Nährmedium:

Schneider's <i>Drosophila</i> Medium mit Glutamin	– PAN Biotech (P04-915000)
---	----------------------------

Transfektionsreagenz:

TransIT®-Insect Transfection Reagent	– Mirus Bio LLC
--------------------------------------	-----------------

Sonstige Chemikalien:

Kupfersulfat Stammlösung	– 100 mM CuSO <sub>4</sub> in dH <sub>2</sub> O
Penicillin-Streptomycin Stammlösung	– Invitrogen

Zellkultur-Serum:

Fetal Bovine Serum South Africa Premium	– Pan Biotech (P30-1502)
---	--------------------------

### 6.1.8 Antikörper

Tabelle 6.3: Liste verwendeter Primärantikörper für immunohistochemische Färbungen in Geweben (IHC) und auf dem Western-Blot (WB)

Antigen	generiert in	eingesetzte Verdünnung	Hersteller/Referenz
Aktin	Kaninchen	1:5000 (WB)	Invitrogen 17H19L35
c-Myc	Maus	1:500 (IHC)	Cell Signaling 9B11
c-Myc	Kaninchen	1:500 (IHC)	Cell Signaling D84C12
HA	Ratte	1:3000 (WB)	Roche 3F10
Hrs	Meerschweinchen	1:1000 (IHC)	Lloyd et al. (2002)
Nextra	Maus	1:100 (IHC)	DSHB (C458.2H)
Rab7	Kaninchen	1:3000 (IHC)	Tanaka und Nakamura (2008)
Shrub	Kaninchen	1:100 (IHC)	Brüser (2013)
V5	Maus	1:500 (IHC) ,1:5000 (WB)	Invitrogen R960-25
V5-HRP	Maus	WB: 1:7500	Invitrogen R961-25
Wingless	Maus	1:50 (IHC)	DSHB (4D4)
β-Galaktosidase	Kaninchen	1:1500 (IHC)	MP Biomedicals 0856032

Tabelle 6.4: Liste verwendeter Sekundärantikörper für immunohistochemische Färbungen (IHC) in Geweben oder auf dem Western Blot (WB)

Antigen	gekoppelt mit	generiert in	eingesetzte Verdünnung	Hersteller/Referenz
Kaninchen	Alexa-488	Ziege	1:500 (IHC)	Invitrogen
Kaninchen	Alexa-568	Ziege	1:500 (IHC)	Invitrogen
Kaninchen	HRP	Ziege	1:5000 (WB)	Jackson Immuno Research
Maus	Alexa-488	Ziege	1:500 (IHC)	Invitrogen
Maus	Alexa-568	Ziege	1:500 (IHC)	Invitrogen
Maus	Alexa-647	Ziege	1:500 (IHC)	Invitrogen
Maus	HRP	Ziege	1:5000 (WB)	Jackson Immuno Research
Meerschweinchen	Alexa-568	Ziege	1:500 (IHC)	Invitrogen
Ratte	HRP	Ziege	1:5000 (WB)	Jackson Immuno Research

### 6.1.9 *Drosophila* Zelllinie

In dieser Arbeit wurde die *D.melanogaster* S2R+ Zelllinie verwendet. Hierbei handelt es sich um ein Isolat der original Schneider S2-Zelllinie (Schneider, 1972).

### 6.1.10 Chemisch kompetente Bakterien

Tabelle 6.5: Liste verwendeter chemisch kompetenter Bakterienstämme

Bezeichnung	Hersteller	Genotyp
DH5- $\alpha$	Invitrogen	F- $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ (lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(r <sub>k</sub> <sup>-</sup> , m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 $\lambda$
Mach1	Invitrogen	F- $\phi$ 80(lacZ) $\Delta$ M15 $\Delta$ lacX74 hsdR(rK-mK+) $\Delta$ recA1398 endA1 tonA
TOP10	Invitrogen	F- mcrA $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC) $\Phi$ 80lacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ lacX74 recA1 araD139 $\Delta$ (araleu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG

### 6.1.11 Fliegenstämme

Tabelle 6.6: Liste verwendeter Fliegenstämme

Genotyp	Referenz
<b>Für Transgenese verwendete Stämme</b>	
<i>y, w, M(eGFP.vas.int.Dm)ZH-2A ; M(3xP3-RFP.attP) ZH-86Fb</i>	Bischof et al. (2007)
<b>Für Balancierung verwendete Stämme</b>	
<i>w; If/CyO<sup>wg-lacZ</sup>; TM6B/MKRS</i>	Stammsammlung AG Klein
<i>w; If/SM6a-TM6B</i>	Stammsammlung AG Klein
<i>w; If/CyO<sup>Tb1</sup>; TM6B/MKRS</i>	Stammsammlung AG Klein
<b>Transgene Fliegenstämme</b>	
<i>w; If/CyO<sup>wg-lacZ</sup>; BAC<sup>Vps20</sup>(CH322-09008)/TM6B</i>	Venken et al. (2009)
<i>w; If/CyO<sup>wg-lacZ</sup>; lgdP-Lgd DM14 2+4KARR K291R K530R/TM6B</i>	diese Arbeit
<i>w; If/CyO<sup>wg-lacZ</sup>; lgdP-Lgd-HA/TM6B</i>	Troost et al. (2012)
<i>w; If/CyO<sup>wg-lacZ</sup>; lgdP-Lgd<math>\Delta</math>558-664, LAP-C2 /TM6B</i>	diese Arbeit
<i>w; If/CyO<sup>wg-lacZ</sup>; lgdP-Lgd<math>\Delta</math>558-664/TM6B</i>	Stammsammlung AG Klein
<i>w; If/CyO<sup>wg-lacZ</sup>; lgdP-Lgd<math>\Delta</math>C/TM6B</i>	diese Arbeit
<i>w; If/CyO<sup>wg-lacZ</sup>; lgdP-Lgd<math>\Delta</math>DM14 1+2 L369A/TM6B</i>	diese Arbeit
<i>w; If/CyO<sup>wg-lacZ</sup>; lgdP-Lgd<math>\Delta</math>DM14 1+2/TM6B</i>	Troost et al. (2012)
<i>w; If/CyO<sup>wg-lacZ</sup>; lgdP-Lgd<math>\Delta</math>DM14 1+3, 2+4KARR K291R K530R/TM6B</i>	diese Arbeit
<i>w; If/CyO<sup>wg-lacZ</sup>; lgdP-Lgd<math>\Delta</math>DM14 1+3/TM6B</i>	Tibbe (2019)
<i>w; If/CyO<sup>wg-lacZ</sup>; lgdP-Lgd<math>\Delta</math>DM14 1-3 Helix 3in4 Q506L/TM6B</i>	diese Arbeit
<i>w; If/CyO<sup>wg-lacZ</sup>; lgdP-Lgd<math>\Delta</math>DM14 1-3 Helix 3in4/TM6B</i>	diese Arbeit
<i>w; If/CyO<sup>wg-lacZ</sup>; lgdP-Lgd<math>\Delta</math>DM14 1-3, DM14 4 KARR, K530R/TM6B</i>	diese Arbeit
<i>w; If/CyO<sup>wg-lacZ</sup>; lgdP-Lgd<math>\Delta</math>DM14 1-3/TM6B</i>	Troost et al. (2012)
<i>w; If/CyO<sup>wg-lacZ</sup>; lgdP-Lgd<math>\Delta</math>DM14 2-4/TM6B</i>	Helle (2017)
<i>w; If/CyO<sup>wg-lacZ</sup>; lgdP-Lgd<math>\Delta</math>DM14 3+4, DM14 1-1/TM6B</i>	diese Arbeit
<i>w; If/CyO<sup>wg-lacZ</sup>; shrubP-Myc-Shrub 4K2A R59A, R70A/TM6B</i>	diese Arbeit
<i>w; If/CyO<sup>wg-lacZ</sup>; shrubP-Myc-Shrub 4K2A R59E, E86K/TM6B</i>	diese Arbeit

<b>Genotyp</b>	<b>Referenz</b>
<i>w; If/CyO<sup>wg-lacZ</sup>; shrubP-Myc-Shrub 4K2A R59E, R70E KRKH2A/TM6B</i>	diese Arbeit
<i>w; If/CyO<sup>wg-lacZ</sup>; shrubP-Myc-Shrub 4K2A R59E, R70E/TM6B</i>	diese Arbeit
<i>w; If/CyO<sup>wg-lacZ</sup>; shrubP-Myc-Shrub 4K2A/TM6B</i>	diese Arbeit
<i>w; If/CyO<sup>wg-lacZ</sup>; shrubP-Myc-Shrub R59E, R70E/TM6B</i>	diese Arbeit
<i>w; If/CyO<sup>wg-lacZ</sup>; shrubP-Myc-Shrub/TM6B</i>	Bäumers (2015)
<i>w; If/CyO<sup>wg-lacZ</sup>; UAS-Vps20/TM6B</i>	diese Arbeit
<i>w; If/CyO<sup>wg-lacZ</sup>; UAS-Vps20-V5/TM6B</i>	diese Arbeit
<i>w; If/CyO<sup>wg-lacZ</sup>; UAS-Vps20ΔMyr-V5/TM6B</i>	diese Arbeit
<i>w; If/CyO<sup>wg-lacZ</sup>; Vps20resQ-V5-Vps20 (ohne ATG)/TM6B</i>	diese Arbeit
<i>w; If/CyO<sup>wg-lacZ</sup>; Vps20resQ-V5-Vps20/TM6B</i>	diese Arbeit
<i>w; If/CyO<sup>wg-lacZ</sup>; Vps20resQ-V5-Vps20 E42A, D82A, E89A/TM6B</i>	diese Arbeit
<i>w; If/CyO<sup>wg-lacZ</sup>; Vps20resQ-V5-Vps20 F97, F100, F104/TM6B</i>	diese Arbeit
<i>w; If/CyO<sup>wg-lacZ</sup>; Vps20resQ-V5-Vps20 K70/TM6B</i>	diese Arbeit
<i>w; If/CyO<sup>wg-lacZ</sup>; Vps20resQ-V5-Vps20 R40, R60, R63, K70/TM6B</i>	diese Arbeit
<i>w; If/CyO<sup>wg-lacZ</sup>; Vps20resQ-V5-Vps20 R40/TM6B</i>	diese Arbeit
<i>w; If/CyO<sup>wg-lacZ</sup>; Vps20resQ-V5-Vps20 R60/TM6B</i>	diese Arbeit
<i>w; If/CyO<sup>wg-lacZ</sup>; Vps20resQ-V5-Vps20 R63/TM6B</i>	diese Arbeit
<i>w; If/CyO<sup>wg-lacZ</sup>; Vps20resQ-Vps20cDNA/TM6B</i>	diese Arbeit
<i>w; If/CyO<sup>wg-lacZ</sup>; Vps20resQ-Vps20-NeonGreen/TM6B</i>	diese Arbeit
<i>w; If/CyO<sup>wg-lacZ</sup>; Vps20resQ-Vps20-V5/TM6B</i>	diese Arbeit
<i>w; If/CyO<sup>wg-lacZ</sup>; Vps20resQ-Vps20<sup>ΔESCRT-II</sup>/TM6B</i>	diese Arbeit
<i>w; If/CyO<sup>wg-lacZ</sup>; Vps20resQ-Vps20ΔMyr/TM6B</i>	diese Arbeit
<b>Gal4-Treiberlinien</b>	
<i>Gbe+Su(H)-lacZ; ptc-Gal4, UAS-GFP; tub-Gal80<sup>ts</sup></i>	Stammsammlung AG Klein
<i>hh-Gal4, tub-Gal80<sup>ts</sup></i>	<i>hh-Gal4</i> : Tanimoto et al. (2000); <i>tub-Gal80<sup>ts</sup></i> : BL#7018
<i>N-YFP; ; hh-Gal4, tub-Gal80<sup>ts</sup>/TM6B</i>	N-YFP: Lowe et al. (2014)
<i>w; en-Gal4, Gal80<sup>ts</sup>; NiGFP4Cherry5/SM6a-TM6B</i>	<i>en-Gal4</i> : BL#30564; <i>NiGFP4Cherry5</i> : Couturier et al. (2014)
<b>RNAi-Linien und Allele</b>	
<i>UAS-shrub-RNAi, UAS-p35 (III)</i>	Sweeney et al. (2006)
<i>UAS-vps20-RNAi (III)</i>	VDRC#47653
<i>UAS-Vps4-RNAi (II)</i>	VDRC#103383
<i>w; lgd<sup>d7</sup> FRT40A/CyO<sup>wg-lacZ</sup>; MKRS/TM6B</i>	Jaekel und Klein (2006)
<i>w; lgd<sup>d7</sup>, shrub<sup>4-1</sup>/CyO<sup>wg-lacZ</sup>; MKRS/TM6B</i>	Stammsammlung AG Klein
<i>w; shrub<sup>4-1</sup> FRTG13/CyO<sup>wg-lacZ</sup>; MKRS/TM6B</i>	Sweeney et al. (2006)
<i>w; vps20<sup>I3</sup>, FRT42D/CyO<sup>wg-lacZ</sup>; MKRS/TM6B</i>	Vaccari et al. (2009)

<b>Genotyp</b>	<b>Referenz</b>
<i>w; vps20<sup>RG270</sup>, FRTG13/CyO<sup>wg-lacZ</sup>; MKRS/TM6B</i>	Rekombination: diese Arbeit; Allel: Bellen et al. (2004)
<b>Reportergenkonstrukte</b>	
<i>Gbe+Su(H)-lacZ (III)</i>	Furriols und Bray (2001)
<b>Für klonale Analysen verwendete Stämme</b>	
<i>hs-Flp; FRTG13, 2xGFP/CyO<sup>Tb1</sup>; Ci-Gal4</i>	<i>hs-Flp</i> : Struhl und Basler (1993); <i>Ci-Gal4</i> : Croker et al. (2006)
<i>Ubx-Flp; FRTG13, 2xGFP/CyO<sup>Tb1</sup></i>	

### 6.1.12 Geräte, Software und Datenbanken

Tabelle 6.7: Liste verwendeter Geräte, Software oder Datenbanken

<b>Anwendung/Typ</b>	<b>Gerät/Software/Datenbank</b>	<b>Hersteller/Referenz</b>
Konzentrationsbestimmung	NanoDrop™ 2000	Thermo Fisher Scientific
	NanoDrop™ One	Thermo Fisher Scientific
Mikroskopie	Axio Imager Z1 mit Apotome und AxioCam MRm	Carl Zeiss AG
	Axio Imager Z1 mit Apotome.2 und AxioCam 712	Carl Zeiss AG
Zentrifugation	Fresco 21	Heraeus Instruments
	Avanti J-26 XP	Heraeus Instruments
	Biofuge Pico	Heraeus Instruments
Rollenmischer	RM 5	CAT
Rotator	Intelli-Mixer™ RM2Lt	ELMI
Taumler	Polymax 2040	Heidolph Instruments
Schüttler	SM30	Edmund Bühler GmbH
Thermocycler	Professional Thermo Cycler Gradient	Biometra
Geldokumentation	Transilluminator, Quantumsystem	Peqlab
Gewebe-/Zellaufschluss	Batteriebetriebener Mikro-Pistill für 1,5ml Reaktionsgefäße	Faust Labscience GmbH
Netzgerät	peqPOWER	Peqlab
Agarose-Gelelektrophorese	Eigenbau	Werkstatt HHU
SDS-Gelelektrophorese	Mini-PROTEAN Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories
Western Blot	Trans-Blot Turbo	Bio-Rad Laboratories
Western Blot Imager	Amersham ImageQuant 800	Cytiva
Sterilbank	Herasafe™ KS	Thermo Fisher Scientific

Anwendung/Typ	Gerät/Software/Datenbank	Hersteller/Referenz
Magnetischer Reaktionsgefäß-Ständer	12-Tube Magnetic Separation Rack	New England Biolabs
Software	Axio Vision Rel. 4.8 und Rel. 4.9	Carl Zeiss AG
	Grafikprogramm für wissenschaftliche Darstellungen: <a href="https://biorender.com/">https://biorender.com/</a>	BioRender
	Chromas 2.6.2	Technelysium Pty Ltd
	CLC Genomics Workbench	Qiagen Bioinformatics
	ColabFold: <a href="https://github.com/sokrypton/ColabFold">https://github.com/sokrypton/ColabFold</a>	Mirdita et al. (2022)
	Endnote X9	Clarivate Analytics
	Office Professional Plus 2019	Microsoft
	Photoshop CS6	Adobe
	PyMol	DeLano Scientific LLC, Schrödinger
	Serial Cloner	Serial Basics
	SnapGene Viewer	SnapGene
	UCSF ChimeraX 1.4dev	Pettersen et al. (2021)
	Zen (blue edition) 3.2 und 3.3	Carl Zeiss AG
	Datenbanken	<a href="https://alphafold.ebi.ac.uk/">https://alphafold.ebi.ac.uk/</a>
<a href="https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/">https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/</a>		EMBOSS Needle
<a href="https://flybase.org">https://flybase.org</a>		FlyBase
<a href="https://www.ebi.ac.uk/interpro/">https://www.ebi.ac.uk/interpro/</a>		InterPro
<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov">https://www.ncbi.nlm.nih.gov</a>		NCBI Pubmed
<a href="https://www.rcsb.org/">https://www.rcsb.org/</a>		RCSB Protein Databank
<a href="https://www.uniprot.org/">https://www.uniprot.org/</a>		UniProt

## 6.2 Molekularbiologische Methoden

### 6.2.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) stellt eine Methode der *in vitro*-DNA-Amplifikation dar. PCRs wurden nach Herstellerangaben mit den unten genannten Ansätzen und Programmen durchgeführt. Die PCR-Fragmente wurden mit der Q5® High Fidelity DNA Polymerase von New England Biolabs (Art. M0491) hergestellt.

Tabelle 6.8: Standard PCR-Ansatz zur Vervielfältigung von DNA-Fragmenten

Komponente	Volumen
Q5-Polymerase 5x Puffer	10µl
10mM dNTPs	1µl
10µM Forward-Primer	2,5µl
10µM Reverse-Primer	2,5µl
Template DNA 500ng	1µl
Q5-Polymerase	0,5µl
dH <sub>2</sub> O	auf 50µl auffüllen

Tabelle 6.9: Standard PCR-Programm zur Vervielfältigung von DNA-Fragmenten

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit	
Initiale Denaturierung	98°C	2 Min.	
Denaturierung	98°C	30 Sek.	x 35
Annealing	65-72°C	30 Sek.	
Elongation	72°C	30 Sek./kbp	
Finale Elongation	72°C	2 Min.	
Lagerung	8°C	∞	

### 6.2.2 Mutagenese PCR

Für Basenpaaraustausche in DNA Fragmenten wurde nach dem Protokoll des QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kits von Agilent Technologies (Art. 200523) vorgegangen. Mit Hilfe speziell gestalteter Primer wurden gezielt Basenaustausche in DNA-Fragmenten vorgenommen. Tabelle 6.1 zeigt die hierfür verwendeten Primer. Die Mutagenese PCRs wurden für Lgd, Vps20 und Shrub durchgeführt. Nachdem die erfolgreiche PCR durch Sequenzierung bestätigt wurde, wurde die cDNA durch Restriktionsspaltung ausgeschnitten und zurück in das Backbone kloniert. Für die PCRs wurden der unten gezeigte Ansatz und das Programm verwendet.

Tabelle 6.10: Standard PCR-Ansatz für die Mutagenese PCR

Komponente	Volumen
Promega <i>Pfu</i> -Polymerase 10x Puffer	5µl
10mM dNTPs	1µl
10µM Forward-Mutagenese-Primer	1µl
10µM Reverse-Mutagenese -Primer	1µl
Template DNA 50ng	1µl
Promega <i>Pfu</i> -Polymerase	0,5µl
dH <sub>2</sub> O	auf 50µl auffüllen

Tabelle 6.11: Standard PCR-Programm für die Mutagenese PCR

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit	
Initiale Denaturierung	95°C	2 Min.	
Denaturierung	95°C	30 Sek.	x 15
Annealing	55°C	1 Min.	
Elongation	72°C	1Min./kbp	
Lagerung	8°C	∞	

Im Anschluss an das durchgeführte PCR Programm wurden 10µl des Ansatzes in Mach1-Zellen transformiert (6.2.6) und dem restlichen Ansatz 0,75µl des Restriktionsenzym *DpnI* zugegeben. Es folgte eine Inkubation für eine Stunde auf 37°C. Anschließend wurden 10µl des Ansatzes in Mach1 Zellen transformiert.

### 6.2.3 Single-Fly PCR

Für die Überprüfung von genomischer DNA kann eine Single-Fly PCR durchgeführt werden. In dieser Arbeit wurde diese Methode für die Kontrolle der erfolgreichen Insertion von Transgenen in die Insertionsstelle 86Fb im *Drosophila* Genom verwendet. Lgd-Insertionen wurden mit Hilfe der Primer „lgd Ctrl FW“ und „lgd Ctrl 1 Rev“ überprüft. Vps20-Insertionen wurden mit Hilfe der Primer „Vps20 geno FW“ und „Vps20 geno Rev“ überprüft.

Zur Überprüfung wurde eine transgene Fliege in ein 1,5ml Reaktionsgefäß in 50µl Squishing-Buffer gegeben und mit der Pipettenspitze zerstoßen. Es folgte eine Inkubation für 30 Minuten auf 37°C und 2 Minuten auf 90°C. 1µl dieses Ansatzes wurde in einem Standard-PCR-Ansatz vervielfältigt (6.2.1). Nach Aufreinigung des PCR-Produktes konnte die amplifizierte genomische DNA zur Sequenzierung verwendet werden (6.2.10).

### 6.2.4 Ligation von DNA Fragmenten

Um DNA-Fragmente in ein Plasmidrückgrat zu ligieren wurden sowohl die Fragmente als auch das Zielplasmid einer präparativen Restriktionsspaltung unterzogen. Nach Aufreinigung wurden diese Fragmente dann im Verhältnis 7:1 bis 5:1 zum Plasmidrückgrat eingesetzt. Die genauen eingesetzten Mengen wurden mit folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Größe DNA-Fragment [bp]}}{\text{Größe Plasmidrückgrat [bp]}} * \text{Masse Plasmidrückgrat} * (5 \text{ bis } 7) [\text{ng}] = \text{Masse DNA-Fragment [ng]}$$

Tabelle 6.12: Ligationsansatz

Komponente	Volumen
T4-Ligase 10x Puffer	2µl
Plasmidrückgrat	Berechnung oben
DNA-Fragment	Berechnung oben
(DNA-Fragment II)	Berechnung oben
T4-Ligase	1µl
dH <sub>2</sub> O	auf 20µl auffüllen

Der Ansatz wurde für 10 Minuten auf Raumtemperatur oder über Nacht auf 18°C inkubiert und anschließend 10µl des Ansatzes in Mach1 Zellen transformiert.

### 6.2.5 Gibson Assembly

Das Gibson Assembly ist eine Methode zur Zusammenfügung einzelner DNA-Fragmente mit überlappenden Sequenzen (Gibson et al., 2009). Hierfür wurden mit Hilfe von PCR den vervielfältigten DNA-Fragmenten Überhänge angefügt, die komplementär zueinander sind. Die Überhänge wurden so gestaltet, dass eine 32 Basenpaare lange komplementäre Sequenz bei Bindung aneinander entsteht. Nach Mischen der DNA-Fragmente wurden sie in einer einzelnen isothermalen Reaktion mit dem durch Restriktionsspaltung linearisierten Plasmidrückgrat zusammengefügt. Für diese Reaktion sind drei Enzyme notwendig: die T5-Exonuklease erzeugt an den Überhängen der doppelsträngigen DNA-Fragmenten einzelsträngige Enden, wodurch die Hybridisierung der homologen Einzelstränge ermöglicht wird; die Phusion-HF DNA-Polymerase und die Taq-Ligase füllen die entstehenden Lücken nach der Hybridisierung im Doppelstrang auf. Die DNA-Fragmente und das linearisierte Plasmidrückgrat wurden in folgendem Verhältnis eingesetzt:

$$\text{Masse Plasmidrückgrat [ng]} = \text{Größe Plasmidrückgrat [kbp]} * 12$$

$$\text{Masse DNA-Fragment [ng]} = \text{Masse Plasmidrückgrat [ng]} * \frac{\text{Größe DNA-Fragment [kbp]}}{\text{Größe Plasmidrückgrat [kbp]}} * 8$$

Die DNA-Fragmente und das Plasmidrückgrat wurden auf 5µl mit dH<sub>2</sub>O aufgefüllt und mit 15µl Gibson-Mastermix versetzt. Es folgte eine 60-minütige Inkubation auf 50°C. Die Reaktion wurde durch die Inkubation für 3 Minuten auf Raumtemperatur und 3 Minuten auf 4°C abgestoppt. 2-5µl dieses Ansatzes wurden dann in Mach1 Zellen transformiert.

### **6.2.6 Transformation chemisch kompetenter Bakterien**

Durch Ligation oder Gibson Assembly zusammengefügte Plasmide wurden zur Vervielfältigung und Selektion in chemisch kompetente Bakterien transformiert. Hierbei wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen:

- Bakterienzellen langsam auf Eis auftauen
- Je nach vorangegangener Reaktion 2-10µl des Ansatzes zu den Zellen pipettieren
- 15 Minuten auf Eis inkubieren
- 1,5 Minuten Hitzeschock bei 42°C
- 2 Minuten auf Eis inkubieren
- 750µl LB-Medium ohne Antibiotikum zugeben
- 30 Minuten schütteln bei 37°C
- 20 Sekunden zentrifugieren bei 8000x g
- Überstand fast vollständig verwerfen
- Pellet in restlichem Überstand resuspendieren
- Ausplattieren auf LB-Agar Platten mit Antibiotikum
- Über Nacht bei 37°C inkubieren

### **6.2.7 Mini DNA-Präparation**

Von LB-Agar Platten wurden einzelne Bakterienkolonien ausgewählt und mit ihnen 3ml flüssig-LB Kulturen angeimpft. Nach einer Übernachtinkubation auf einem Schüttler bei 37°C wurden die Plasmide mit dem nachfolgenden Protokoll präpariert. Resuspensions-, Lysis- und Neutralisationspuffer wurden aus dem Macherey-Nagel™ NucleoBond™ Xtra Midi Kit entnommen.

**Mini DNA-Präparation Protokoll:**

- 2ml der Übernachtskulturen in 2ml Reaktionsgefäße geben und bei 13000rpm pelletieren
- Überstand verwerfen und Pellet in 300µl Resuspensionspuffer resuspendieren
- 300µl Lysispuffer zugeben und 5 Minuten auf Raumtemperatur inkubieren
- 300µl Neutralisationspuffer zugeben und bis zur Entfärbung des Lysispuffers invertieren
- 5 Minuten auf 4°C inkubieren
- 30 Minuten auf Raumtemperatur bei 13000rpm zentrifugieren
- 750µl der Überstands in frische 1,5ml Reaktionsgefäße geben und mit 500µl Isopropanol versetzen und vortexen
- 30 Minuten bei 4°C und 13000rpm zentrifugieren
- Überstand verwerfen und 500µl 70%iges Ethanol zugeben
- 10 Minuten bei 4°C zentrifugieren
- Ethanol verwerfen und Pellet trocknen
- Zugabe von 20µl dH<sub>2</sub>O um Pellet zu lösen

**6.2.8 Midi DNA-Präparation**

Für die Midi DNA-Präparation wurden 100µl aus den durch Mini DNA-Präparation, Testrestriktionsspaltung und Sequenzierung kontrollierten Übernachtskulturen in 200ml LB-Flüssigmedium gegeben und über Nacht auf einem Schüttler bei 37°C inkubiert. Die Midi Präparation wurde mit Hilfe des NucleoBond™ Xtra Midi Kits von Macherey-Nagel™ nach Herstellerangaben durchgeführt. Die so präparierte DNA wurde in 50-100µl dH<sub>2</sub>O gelöst.

**6.2.9 DNA-Konzentrationsbestimmung**

Die DNA Konzentration wurde mit Hilfe des NanoDrop™ 2000 oder des NanoDrop™ One von Thermo Scientific durchgeführt.

**6.2.10 DNA Sequenzierung**

DNA Sequenzierungen wurden von der Firma Seqlab Göttingen durchgeführt. Hierbei wurde der Single-Tube-Sequencing Economy Run Service verwendet.

### 6.2.11 Restriktionsspaltung

#### Test-Restriktionsspaltung:

Zur Kontrolle erfolgter Ligation oder Gibson Assembly wurde als erster Schritt nach der DNA-Präparation eine Test-Restriktionsspaltung durchgeführt. Hierbei wurde folgender Ansatz verwendet:

Tabelle 6.13: Ansatz für eine Test-Restriktionsspaltung

Komponente	Volumen
Plasmid DNA aus Mini DNA-Präparation	1µl
CutSmart™ 10xPuffer	2µl
Restriktionsenzym 1	0,25µl bei HF, 0,5µl bei Standard
Restriktionsenzym 2	0,25µl bei HF, 0,5µl bei Standard
dH <sub>2</sub> O	auf 20µl auffüllen

Der Ansatz wurde für mindestens eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Auftrennung der entstandenen Fragmente erfolgte mittels Gelelektrophorese in 0,8%iger Agarose.

#### Präparative Restriktionsspaltung:

Um größere Mengen geschnittener DNA-Fragmente in Reaktionen wie Ligation und Gibson Assembly einsetzen zu können wurden Plasmid DNA oder PCR Produkte wie in folgendem Ansatz beschrieben eingesetzt:

Tabelle 6.14: Ansatz für die präparative Restriktionsspaltung

Komponente	Volumen
Plasmid DNA aus Midi DNA-Präparation oder PCR Produkt	5-10µg
CutSmart™ 10xPuffer	2µl
Restriktionsenzym 1	1µl
Restriktionsenzym 2	1µl
dH <sub>2</sub> O	auf 20µl auffüllen

Der Ansatz wurde über Nacht auf 37°C inkubiert. Die Auftrennung der entstandenen Fragmente erfolgte mittels Gelelektrophorese in 0,8%iger Agarose.

### 6.2.12 Gelextraktion

Mit Hilfe von Gelelektrophorese wurden DNA-Fragmente ihrer Größe nach aufgetrennt. Um mit den Fragmenten gewünschter GröÙer weiterarbeiten zu können, wurden sie aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit Hilfe des Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kits von Zymo Research extrahiert. Es wurde nach Herstellerangaben vorgegangen und die

Elution der DNA erfolgte mit 10µl Elutionspuffer. Vor der Elution wurde der Elutionspuffer auf 50°C erwärmt.

### **6.2.13 Herstellung von *LgdΔDM14 3+4, DM14 1-1***

*LgdΔDM14 3+4, DM14 1-1* wurde mit Hilfe eines Gibson Assembly hergestellt. Hierfür wurden die drei Fragmente mittels PCR hergestellt. Das erste Fragment (851bp), welches die cDNA des N-Terminus und der ersten DM14-Domäne von *Lgd* beinhaltet, wurde mit den Primern „Gibson Überhang pattB-*lgd* FW“ und „Gibson DM14 1 Überhang DM14 1 Rev“ hergestellt. Als Template-DNA diente dabei pattB-*LgdP-Lgd-HA*. Dieses erste Fragment wurde dadurch mit einem 5'-Überhang zum *Lgd*-Promotor im pattB-Vektor und einem 3'-Überhang zur ersten DM14-Domäne versehen. Das zweite Fragment (252bp), welches die cDNA einer zweiten DM14-1 beinhaltet wurde mit den Primern „Gibson Überhang DM14 1 DM14 1 FW“ und „Gibson DM14 1 Überhang 558 Rev“ und dem Template pattB-*LgdP-Lgd-HA* hergestellt. Der cDNA für die erste DM14-Domäne wurden damit ein 5'-Überhang zur ersten DM14-1 und einem 3'-Überhang zur kodierenden Sequenz der Aminosäuren 558-664 angefügt. Das dritte Fragment (888bp) wurde mit Hilfe der Primer „Gibson Überhang DM14 1 558 C2 FW“ und „Gibson C2-pattB Rev“ und dem Template pattB-*LgdP-Lgd-HA* hergestellt. Der cDNA-Sequenz der Aminosäuren 558-664, der C2-Domäne und des C-Terminus wurden so ein 5'-Überhang zur zweiten DM14-1 und ein 3'-Überhang zum *Lgd*-Promotor in pattB angefügt. Die Fragmente wurden zusammen mit dem Plasmidrückgrat pattB-*LgdP* für das Gibson Assembly eingesetzt. pattB-*LgdP* wurde dafür mit Hilfe von *NotI*-HF und *KpnI*-HF linearisiert.

### **6.2.14 Herstellung von *LgdΔDM14 1-3, 4 Helix 3***

*LgdΔDM14 1-3, 4 Helix 3* wurde mit Hilfe eines Gibson Assembly hergestellt. Hierfür wurden zwei Fragmente mittels PCR hergestellt, die für das Gibson Assembly mit linearisiertem pattB-*LgdP* (linearisiert mit *NotI*-HF und *KpnI*-HF) eingesetzt wurden. Das erste Fragment (566bp) beinhaltet die cDNA des N-Terminus und einen Teil der vierten DM14-Domäne. Es wurde mit den Primern „Gibson Überhang pattB-*lgd* FW“ und „Gibson DM14 4-Überhang Helix 3 Rev 2“ und dem Template pattB-*LgdP-LgdΔDM14 1-3* hergestellt. Diesem Fragment wurden durch die PCR ein 5'-Überhang zum *Lgd*-Promotor in pattB und ein 3'-Überhang zur cDNA der Interaktionshelix der dritten DM14-Domäne angefügt. Das zweite Fragment (986bp) beinhaltet die cDNA der Aminosäuren 558-664, der C2-Domäne und des C-Terminus und wurde mit den Primern „Gibson Helix3 an C2

FW 2“ und „Gibson C2-pattB Rev“ und dem Template pattB-LgdP-Lgd $\Delta$ DM14 1-3 hergestellt. Durch die PCR wurden diesem Fragment ein 5'-Überhang zur vierten DM14-Domäne, die cDNA der Interaktionshelix der dritten DM14-Domäne und ein 3'-Überhang zum Lgd-Promotor in pattB angefügt. Durch das Gibson Assembly wurden die beiden Fragmente mit linearisiertem pattB-LgdP verbunden.

#### **6.2.15 Herstellung von *Lgd LAP statt 558-664***

*Lgd LAP statt 558-664* wurde mit Hilfe eines Gibson Assembly hergestellt. Hierfür wurden drei Fragmente mittels PCR hergestellt. Das erste Fragment (1735bp) enthält die cDNA des N-Terminus und der vier DM14-Domänen von Lgd. Es wurde mit Hilfe der Primer „Gibson Überhang pattB-lgd FW“ und „Gibson DM14-4 LAP Rev“ und dem Template pattB-LgdP-Lgd-HA hergestellt. Dem Fragment wurden ein 5'-Überhang zum Lgd-Promotor in pattB und ein 3'-Überhang zum LAP-Tag angefügt. Das zweite Fragment (222bp) beinhaltet den LAP-Tag. Er wurde mit Hilfe der Primer „Gibson Überhang DM14 4 LAP FW“ und „Gibson LAP Überhang C2 Rev“ aus pattB-shrbP-eGFP-LAP-shrbcDNA vervielfältigt. Der Sequenz für den LAP-Tag wurde so ein 5'-Überhang zur vierten DM14-Domäne und ein 3'-Überhang zur C2-Domäne angefügt. Das dritte Fragment (561bp) beinhaltet die cDNA der C2-Domäne und des C-Terminus von Lgd. Es wurde mit Hilfe der Primer „Gibson Überhang LAP C2 FW“ und „Gibson C2-pattB Rev“ und dem Template pattB-LgdP-Lgd-HA hergestellt. Durch die PCR wurden der cDNA der C2-Domäne und des C-terminus ein 5'-Überhang zur Sequenz der LAP-Tags und ein 3'-Überhang zum Lgd-Promotor in pattB angefügt. Die drei Fragmente wurden zusammen mit linearisiertem pattB-LgdP (linearisiert mit *NotI*-HF und *KpnI*-HF) in einem Gibson Assembly zusammengefügt.

#### **6.2.16 Herstellung von *Lgd $\Delta$ C***

Für die Herstellung von *Lgd $\Delta$ C* wurde mit den Primern „Gibson Überhang pattB-lgd FW“ und „lgdC2-HAdeltaC-KpnI Rev“ eine PCR auf das Template pattB-LgdP-Lgd-HA durchgeführt. Hierbei wurde die cDNA von Lgd ohne die 20 N-terminalen Aminosäuren vervielfältigt. Am 5'-Ende wurde eine *NotI*-Schnittstelle und ein Überhang zum Lgd-Promotor in pattB angefügt. Am 3'-Ende wurde die cDNA eines HA-Tags, ein Stop-Codon (TAG) und eine *KpnI*-Schnittstelle angefügt. Nachdem mit dem PCR-Produkt eine Restriktionsspaltung mit *NotI*-HF und *KpnI*-HF durchgeführt wurde, wurde es für die Ligation in linearisiertem pattB-LgdP (linearisiert mit *NotI*-HF und *KpnI*-HF) eingesetzt.

### 6.2.17 Etablierung des Expressionssystems *Vps20resQ*

Für die Expression von *Vps20*-Varianten auf physiologischem Expressionsniveau wurde in dieser Arbeit ein Expressionssystem erstellt (*Vps20resQ*). Hierfür wurden die up- und downstream der kodierenden Region von *Vps20* liegenden Abschnitte amplifiziert und in *pattB* für die Integration in das *Drosophila* Genom kloniert. Die upstream-Region wurde mit den Primern „VPS20 UP FW“ und „VPS20 UP Rev“ amplifiziert. Als Template für diese PCR diente der BAC-Klon CH322-09008, der die gesamte genomische Region von *Vps20* beinhaltet (Venken et al., 2009). Der 542bp langen upstream-Region wurden durch die PCR am 5'-Ende eine *Bam*HI-Restriktionsschnittstelle und am 3'-Ende eine *Not*I-Restriktionsschnittstelle angefügt. Die downstream-Region wurde mit Hilfe der Primer „VPS20 DOWN FW“ und „VPS20 DOWN Rev“ aus dem BAC-Klon CH322-09008 als Template amplifiziert. Der 502bp langen downstream-Region von *Vps20* wurden mit der PCR am 5'-Ende eine *Kpn*I- und am 3'-Ende eine *Xba*I-Restriktionsschnittstelle angefügt. Bei der Firma BaseClear BV wurde die cDNA von *Vps20* bestellt, welche 5' eine *Not*I-Restriktionsschnittstelle und 3' eine *Kpn*I-Schnittstelle besitzt (*pUC57-Vps20*). Die *Vps20* cDNA und die amplifizierten up- und downstream-Regionen wurden mit Restriktionsenzymen entsprechend der angefügten Schnittstellen einer Restriktionsspaltung unterzogen und anschließend in einer Ligation mit linearisiertem *pattB*-Plasmidrückgrat (linearisiert mit *Bam*HI und *Xba*I) eingesetzt.

### 6.2.18 Herstellung von *V5-Vps20*, *Vps20-V5* und *Vps20-NeonGreen*

Für die Herstellung von *V5-Vps20* und *Vps20-V5* wurden auf die cDNA von *Vps20* PCRs durchgeführt und damit der die kodierende Sequenz für den V5-Tag angefügt. *V5-Vps20* wurde mit den Primern „Not-V5-Vps20 FWn“ und „VPS20 KpnI Rev2“ hergestellt. *Vps20-V5* wurde mit den Primern „NotI VPS20 FW“ und „VPS20-V5-KpnI Rev“ hergestellt. Den so entstandenen PCR-Fragmenten wurden am 5'-Ende eine *Not*I-Restriktionsschnittstelle und am 3'-Ende eine *Kpn*I-Restriktionsschnittstelle angefügt. Durch die Restriktionsspaltung der Fragmente und *pattB-Vps20resQ-Vps20cDNA* oder *pUAST-attB* mit Hilfen von *Not*I-HF und *Kpn*I-HF konnte die Ligation der Fragmente mit dem Plasmidrückgrat des Rettungsvektors (*pattB-Vps20resQ*) oder *pUAST-attB* durchgeführt werden.

*Vps20-NeonGreen* wurde mit Hilfe eines Gibson Assembly hergestellt. Hierfür wurden zwei Fragmente mittels PCR hergestellt. Das erste Fragment (704bp) beinhaltet die cDNA

von Vps20 und wurde mit den Primern „Gibson-pattB-Vps20 FW“ und „Gibson-Vps20-NeonGreen Rev“ hergestellt. Als Template wurde die Vps20 cDNA verwendet. Durch die PCR wurden der Vps20 cDNA ein 5'-Überhang zu Vps20resQ und ein 3'-Überhang zu NeonGreen-cDNA angefügt. Das zweite Fragment (778bp) beinhaltet die NeonGreen cDNA und wurde mit den Primern „Gibson-Vps20-Neon FW“ und „Gibson-Neon-pattB Rev“ und dem Template mNeongreen hergestellt. Der NeonGreen cDNA wurden durch die PCR ein 5'-Überhang zur Vps20 cDNA und ein 3'-Überhang zu Vps20resQ angefügt. Zusammen mit linearisiertem pattB-Vps20resQ (linearisiert durch *NotI* und *KpnI*) wurden die Fragmente für ein Gibson Assembly verwendet.

## **6.3 Genetische Methoden**

### **6.3.1 Fliegenhaltung**

Fliegen wurden in Kunststoffröhrchen gehalten, die zu etwa einem Drittel mit Futtermedium gefüllt sind und mit einem Stopfen verschlossen sind. Beim Ansetzen von Kreuzungen und frisch etablierten Stämmen wurde ein Stück angefeuchtetes Filterpapier in den Brei gesteckt.

Die Fliegenstämme wurden auf Raumtemperatur oder bei 18°C gehalten. Kreuzungen wurden auf 25°C durchgeführt. Um die Expression von UAS-Konstrukten, die mit Hilfe des Gal4/UAS/Gal80<sup>ts</sup>-Systems (6.3.5) exprimiert werden, zu ermöglichen, wurden die Larven je nach Expressionszeit bis zum zweiten oder dritten Larvenstadium auf 18°C und dann auf 29°C gehalten.

Um Kreuzungen anzusetzen, wurden die benötigten jungfräulichen Weibchen aus Stämmen gesammelt und mit Männchen verpaart. Hierbei war das Verhältnis von Männchen zu jungfräulichen Weibchen 1:3 bis 1:5.

### **6.3.2 Erzeugung transgener Fliegen**

Für die Erzeugung transgener Fliegen wurde das Protokoll aus Bachmann und Knust (2008) verwendet. Alle in dieser Arbeit erstellten Konstrukte wurden dabei in die künstliche Insertionsstelle 86Fb in das *Drosophila* Genom inseriert (Bischof et al., 2007). Für die Injektion der Plasmid-DNA wurde der Injektionsmix in Tabelle 6.15 vorbereitet und für 30 Minuten bei 13000rpm zentrifugiert. Der Injektionsmix wurde in das posteriore Ende von 30 Minuten alten dechorionisierten Embryonen injiziert. Am

posterioren Ende entstehen aus dem snyzytialen Blastoderm die Polzellen, welche die Vorläufer der Keimbahnzellen darstellen. Bei der Zellularisierung kann die Plasmid-DNA aus dem Injektionsmix in die Zellen aufgenommen werden, wo sie in den Zellkern gelangen kann. Im Zellkern kann sie durch die  $\phi$ C31-Integrase-vermittelte Rekombination zwischen attB-Sequenz im Plasmid-Backbone und der attP-Sequenz der Insertionsstelle in das Genom integriert werden.

Tabelle 6.15: Injektionsmix für die Erzeugung transgener Fliegen

Komponente	Volumen
Plasmid-DNA (1 $\mu$ g/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
2% Phenolrot	1 $\mu$ l
1 $\mu$ l Injektionspuffer	1 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	17 $\mu$ l

Adulte Fliegen der geschlüpften Embryonen werden gegen den Multi-Balancer (MB) Stamm gekreuzt und die F1-Generation dieser Kreuzung auf das Vorhandensein von roten Augen überprüft. Diese werden durch die Expression eines Mini-*white*-Gens des Plasmid-Backbones im *w*-Hintergrund des MB-Stamms vermittelt.

Zusätzlich wurden Insertion von Transgenen auch durch BestGene Inc, Chino Hills, CA, U.S.A durchgeführt.

### 6.3.3 Indirekte Antikörperfärbung an Flügelimaginalscheiben

Für die Antikörperfärbung wurden Larven des dritten Larvenstadiums in PBS präpariert. Hierbei wurden sie in der Hälfte durchtrennt, wobei die posteriore Hälfte verworfen wurde. Die anteriore Hälfte wurde auf links gestülpt, sodass die Imaginalscheiben außen liegen. Nachdem der Großteil des Fettkörpers, das Gehirn und die Speicheldrüsen entfernt wurden, wurden die Larvenvorderhälften in einem Siebchen in einer 24-Well Platte in PBS gesammelt.

Die indirekte Antikörperfärbung der Flügelimaginalscheiben wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- Fixierung der Larvenhälften durch Zugabe von 500 $\mu$ l 4% PFA in PBS
- 3x 10 Minuten waschen mit 0,3% PBT (Triton X-100)
- 30 Minuten blockieren der unspezifischen Bindestellen für Antikörper mit 500 $\mu$ l 5% NGS in 0,3% PBT (Triton X-100)

- 2 Stunden Inkubation des Primärantikörpers (Tabelle 6.3) in 5% NGS in 0,3% PBT (Triton X-100)
- 3x 15 Minuten waschen mit 0,3% PBT (Triton X-100)

An dieser Stelle wurde das Protokoll unterbrochen und am Folgetag fortgesetzt. Die Lagerung erfolgte in PBS auf 4°C.

- 2 Stunden Inkubation des Sekundärantikörpers (Tabelle 6.4) in 5% NGS in 0,3% PBT (Triton X-100)
- 10 Minuten waschen mit 0,3% PBT (Triton X-100)
- 10 Minuten Inkubation mit 500µl Hoechst 33342 (1:10000) in 0,3% PBT (Triton X-100)
- 2x 10 Minuten waschen mit 0,3% PBT (Triton X-100)

Im Anschluss an die Antikörperfärbung erfolgte das Freipräparieren der Flügelimaginalscheiben in PBS. Der Rest der Larvenvorderhälfte wurden verworfen. Die Flügelimaginalscheiben wurden mit 10µl PBS in eine gelbe Pipettenspitze aufgenommen, die vorher mit PBT gespült wurde und in einen Tropfen Vectashield auf einen Objektträger für die Mikroskopie eingebettet.

### **6.3.4 Eiablagen**

Zur Überprüfung der Entwicklung von Nachkommen aus Rettungsexperimenten wurden Eiablagen auf Apfelsaftagar-Platten durchgeführt. Hierbei wurden die Parentalgeneration der Kreuzung des Rettungsexperiments in einen Flugkäfig gesetzt, die mit einer Petrischale verschlossen wurden, in der sich Apfelsaftagar und eine Spatelspitze frische Bäckerhefe befand. Die Eiablage wurde über Nacht durchgeführt. Ab dem folgenden Tag konnten die Entwicklungsstadien der Nachkommen mit Hilfe eines Binokulars überprüft werden.

### **6.3.5 Gal4/UAS/Gal80<sup>ts</sup>-System**

Das Gal4/UAS-System kann für die ortsspezifische Überexpression von Proteinen in *Drosophila* verwendet werden (Brand und Perrimon, 1993; Phelps und Brand, 1998). Das aus *S.cerevisiae* stammende System kommt in *Drosophila* natürlicherweise nicht vor und besteht aus zwei Komponenten: Dem Transkriptionsfaktor Gal4 und seiner DNA bindenden Sequenz UAS (upstream activating sequence). Gal4 wird in Treiberlinien unter Kontrolle von endogenen Promotoren exprimiert. In dieser Arbeit wurden *ptc*-Gal4, *en*-Gal4, *hh*-Gal4 und *ci*-Gal4 als Treiberlinien verwendet. Durch die Kreuzung mit einer

Effektorlinie kann in den Nachkommen exprimiertes Gal4 an die UAS im Genom binden und die Expression nachgeschalteter Zielsequenzen aktivieren. Bei diesen Zielsequenzen handelte es sich um cDNA von zu untersuchenden Proteinen oder Fluorophore oder codierende Sequenzen für dsRNA für die RNAi (Abbildung 6.1 A).

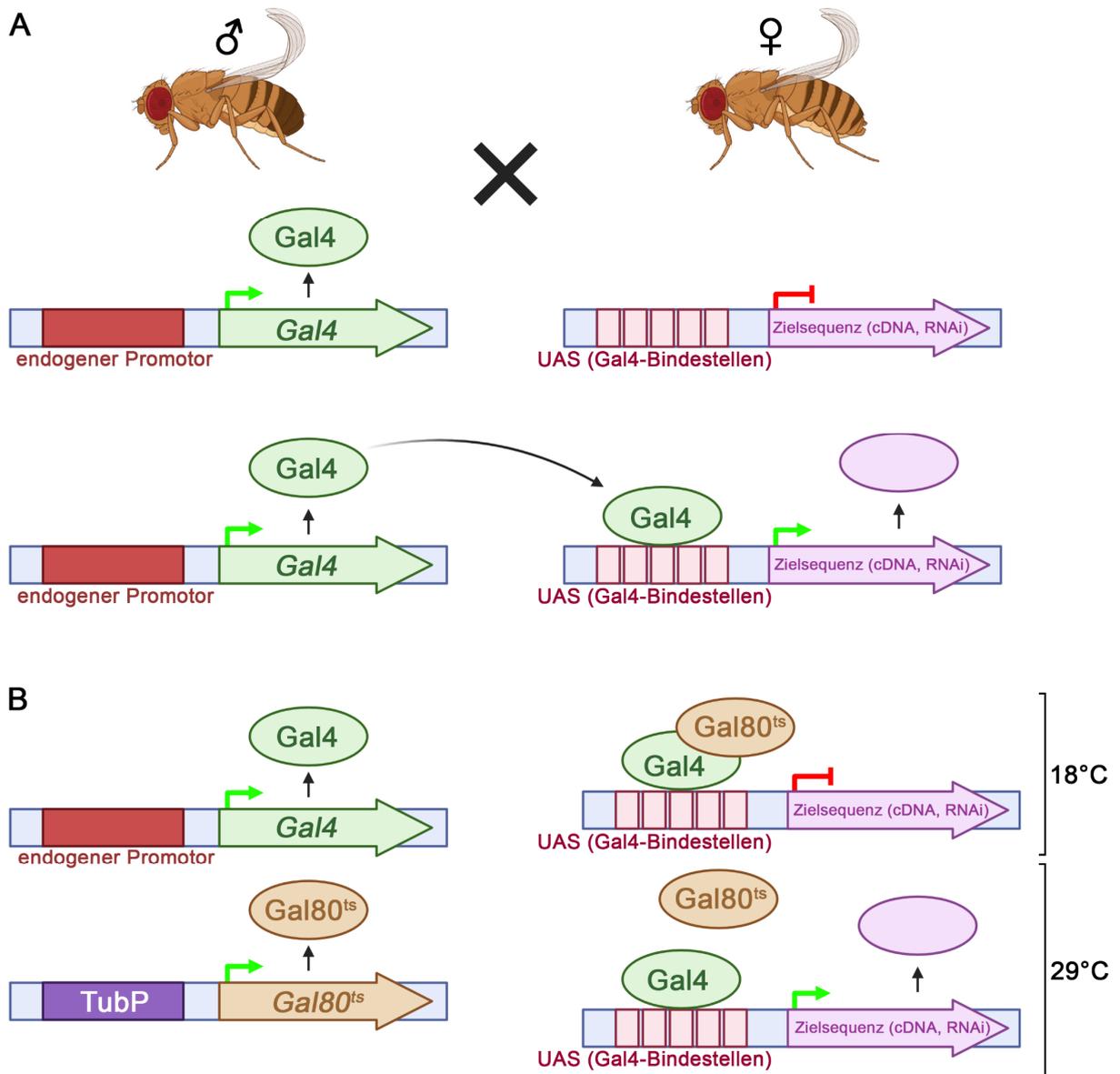


Abbildung 6.1: Das Gal4/UAS/Gal80<sup>ts</sup>-System dient der zeitlich gesteuerten, Gewebe-spezifischen Expression von Genen. A: Gal4 wird unter Kontrolle endogener Promotoren in der Treiberlinie exprimiert. Durch Kreuzung mit einer Effektorlinie kann Gal4 an die UAS binden und so die Expression von Zielsequenzen aktivieren. Bei den Zielsequenzen handelt es sich um cDNA oder codierende Sequenzen für die dsRNA für RNAi. B: Durch die zusätzliche ubiquitäre Expression von Gal80<sup>ts</sup> unter Kontrolle des Tubulin-Promotors (TubP), wird das Gal4/UAS-System erweitert. Durch die Verwendung von Gal80<sup>ts</sup> kann die Expression der Zielsequenzen zeitlich durch eine Temperaturveränderung gesteuert werden. Der Repressor Gal80<sup>ts</sup> ist bei 18°C aktiv und bindet Gal4, wodurch die Expression von Zielsequenzen verhindert wird. Bei 29°C löst sich die Bindung zwischen Gal80<sup>ts</sup> und Gal4 und die Expression von Zielsequenzen, die der UAS nachgeschaltet sind, wird aktiviert.

Das System lässt sich um einen weiteren Faktor erweitern. Wird in der Treiberlinie zusätzlich der Repressor Gal80 exprimiert, kann dieser an Gal4 binden, welches die UAS gebunden hat. Die Expression der Zielsequenzen wird dadurch verhindert. Durch die Verwendung einer Temperatur-sensitiven Variante von Gal80 (Gal80<sup>ts</sup>) lässt sich die Expression zeitlich durch Temperaturveränderung steuern (McGuire et al., 2003). Gal80<sup>ts</sup> wird ubiquitär unter Kontrolle des Tubulin Promotors exprimiert. Bei 18°C bildet Gal80<sup>ts</sup> zusammen mit Gal4 einen Repressorkomplex, wodurch die Expression der Zielsequenzen verhindert wird. Bei 29°C wird die Bindung von Gal80<sup>ts</sup> an Gal4 verhindert und die Expression der Zielsequenzen wird aktiviert (Abbildung 6.1 B).

### **6.3.6 Flp/FRT-System**

Um embryonal-letale Mutationen in Geweben des späten dritten Larvenstadiums untersuchen zu können, wurde die klonale Analyse mit Hilfe des Flp/FRT-Systems verwendet (Xu und Rubin, 1993). Hierbei vermittelt eine Flippase (Flp) die gewebespezifische mitotische Rekombination zwischen zwei künstlich in *Drosophila* eingeführten FRT- (flippase recognition target) Sequenzen (Golic und Lindquist, 1989; Golic, 1991). Die Flippase wurde in dieser Arbeit unter Kontrolle des ubiquitär exprimierenden *Ubx*-Promotors oder mit Hilfe des *heatshock*- (*hs*-) Promotors exprimiert. Die FRT-Sequenzen befinden sich auf dem Chromosom der zu untersuchenden Mutation und einem homologen Marker-Chromosom, welches zum Beispiel für die Expression von GFP sorgt (Abbildung 6.2). Durch die Flp-vermittelte homologe Rekombination zwischen den FRT-Sequenzen entsteht nach der Mitose eine Zelle, in der die zu untersuchende Mutation homozygot vorliegt und eine wildtypische Zelle, in der das GFP-Marker-Chromosom homozygot vorliegt (Abbildung 6.2). Die homozygot mutanten Zellen sind durch die Abwesenheit von GFP markiert, wohingegen die entstandenen wildtypischen Zwillingklone doppelt GFP markiert sind.

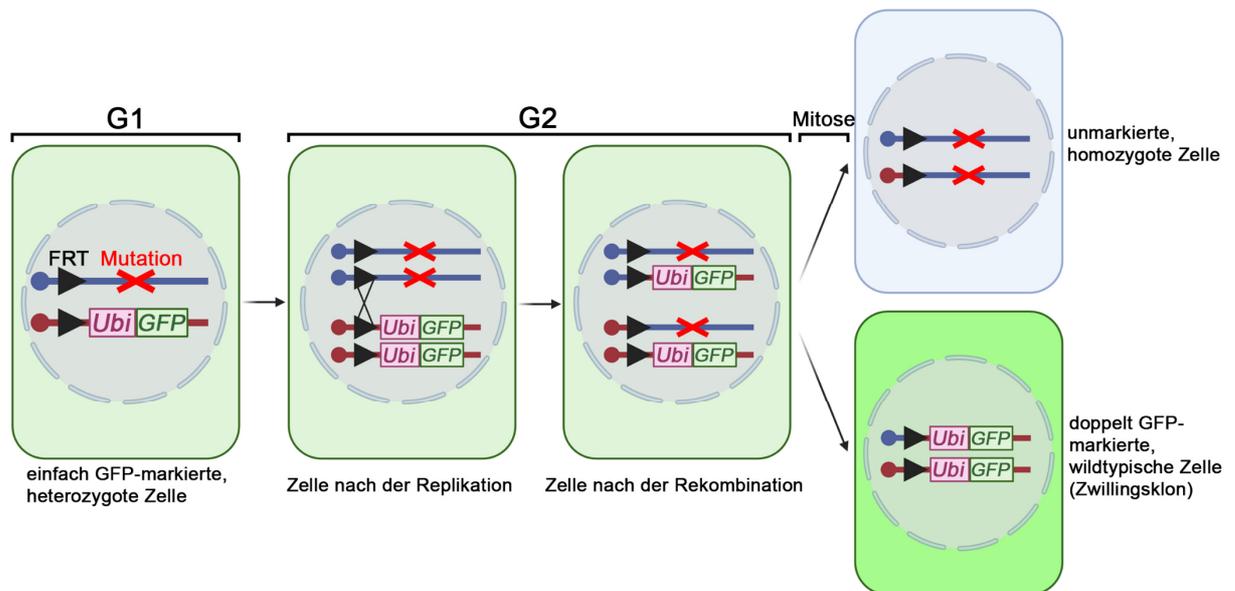


Abbildung 6.2: Das Fp/FRT-System kann zur Analyse embryonal-letaler Mutationen in späteren Entwicklungsstadien in *Drosophila* genutzt werden. Die zu untersuchende Mutation liegt in der Ausgangssituation heterozygot auf einem Chromosom mit FRT-Sequenz vor. Ihr gegenüber liegt ein GFP-exprimierendes Marker-Chromosom. Durch die Fp-vermittelte mitotische Rekombination zwischen den FRT-Sequenzen dieser homologen Chromosomen entsteht nach der Mitose eine unmarkierte homozygote mutante Zelle und eine doppelt GFP-markierte wildtypische Zelle.

### 6.3.7 Notch-Reporter Gbe+Su(H)

Das synthetische Reportergenkonstrukt Gbe+Su(H) kann als direkter Readout für die Aktivität des Notch-Signalwegs genutzt werden (Furriols und Bray, 2001). Hierbei ist der Nachweis der Aktivität des Reportergenkonstrukts sensitiver als der Nachweis der Expression direkter Zielgene des Signalwegs.

Gbe+Su(H)-lacZ besitzt drei Grainyhead binding elements (Gbe), zwei Suppressor of Hairless- (Su(H)-) Bindestellen und den *hsp70*-Minimalpromotor. Diesen regulatorischen Elementen nachgeschaltet liegt das Reportergen *lacZ*. Der in Flügelimaginalscheiben ubiquitär exprimierte Transkriptionsfaktor Grainyhead (Grh) bindet an Gbe. In Abwesenheit der intrazellulären Domäne des Notch-Rezeptors (Nintra) bindet Su(H) die Bindestellen und bildet mit Co-Repressoren (Co-R) einen Repressorkomplex, der die Expression des *lacZ* Gens verhindert (Abbildung 6.3 A). Durch die Aktivierung des Notch-Signalwegs wird die intrazelluläre Domäne des Notch-Rezeptors in das Zytoplasma abgespalten, von wo aus sie anschließend in den Zellkern translozieren kann. Hier kann sie direkt an Su(H) binden, welches an die Su(H)-Bindestellen in Gbe+Su(H)-lacZ gebunden hat. Diese Bindung führt zusammen mit Mam und weiteren Co-Aktivatoren (Co-A) zur Aktivierung der Expression des *lacZ*-Gens. Die exprimierte  $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -Gal)

kann dann in Zellen nachgewiesen werden, in denen der Notch-Signalweg aktiviert wurde (Abbildung 6.3 B).

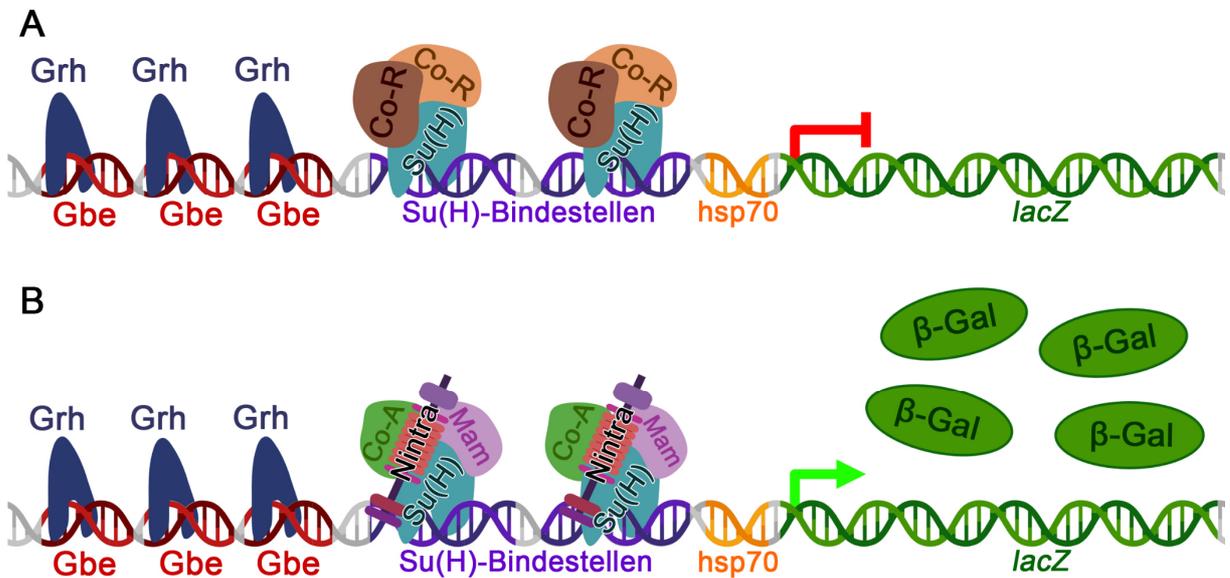


Abbildung 6.3: Das Reportergenkonstrukt Gbe+Su(H)-lacZ dient dem Nachweis der Aktivität des Notch-Signalwegs. Der ubiquitäre Transkriptionsfaktor Grainyhead (Grh, Dunkelblau) bindet an Gbe (Grainyhead binding element, Rot). Su(H) (türkis) bindet die beiden Su(H)-Bindestellen. A: In Abwesenheit der intrazellulären Domäne des Notch-Rezeptors (Nintra), bildet Su(H) zusammen mit Co-Repressoren (Co-R) einen Repressorkomplex. Die Expression von *lacZ* ist inhibiert. B: Nintra kann durch die Aktivierung des Notch-Signalwegs in den Zellkern translozieren, wo es direkt an Su(H) bindet. Das führt dazu, dass die Expression von *lacZ* durch Su(H), Mam und weiteren Co-Aktivatoren (Co-A) aktiviert wird. In Zellen, wo der Notch-Signalweg aktiv ist, kann  $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -Gal) nachgewiesen werden.

### 6.3.8 Kultivierung und Passagieren von S2R+-Zellen

*Drosophila* S2R+-Zellen wurden in 10cm Zellkulturschalen in einem 25°C-Inkubator kultiviert. Bei einer Konfluenz von ca. 80-100% wurde das Schneider's *Drosophila* Medium entfernt. Anschließend wurden die Zellen durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren mit 10ml frischen Schneider's *Drosophila* Medium vom Boden der 10cm Zellkulturschale abgelöst. 2ml dieser Suspension wurde anschließend in 8ml frisches Schneider's Medium in einer frischen 10cm Zellkulturschale gegeben. Hierbei wurden die Zellen durch erneutes, mehrfaches Auf- und Abpipettieren gleichmäßig verdünnt. Das Passagieren der S2R+-Zellen wurde ca. zweimal pro Woche durchgeführt.

### 6.3.9 Transfektion von Zellen

Die Transfektion von S2R+ *Drosophila*-Zellen wurde mit Hilfe des TransIT®-Insect Transfection Reagent von Mirus Bio LLC durchgeführt. Hierbei wurde nach

Herstellerangaben vorgegangen. Für die CoIP wurden Ansätze in 6-Well Platten angesetzt.

Die zu exprimierenden Shrub- und Vps20-Konstrukte befanden sich für die Expression in einem pMT-Vektor, in dem die kodierenden Bereiche für die V5- und 6xHis-Markierungen mittels Site-directed mutagenesis entfernt wurden.

24h nach der Transfektion wurde die Expression der Konstrukte durch die Zugabe von 1mM Kupfersulfat in das Nährmedium induziert.

## **6.4 Proteinbiochemische Methoden**

### **6.4.1 Proteingewinnung aus Zellen**

Nachdem die Expression in den S2R+-Zellen induziert wurde, wurden die Zellen für weitere 20h auf 25°C wachsen gelassen. Anschließend wurden die Zellen mit eiskaltem 1xPBS gewaschen. Nachdem das PBS entfernt wurde, wurde für die Zellyse pro 6-Well 200µl *Drosophila* Lysispuffer mit Protease-Inhibitor-Cocktail (PIC) auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden 20 Minuten auf 4°C geschüttelt und anschließend wurde das Lysat in 1,5µl Reaktionsgefäße überführt. Nach 10-minütiger Zentrifugation auf 4°C bei 13000rpm wurde der Überstand in frische 1,5µl Reaktionsgefäße überführt. Die so gewonnen Proteine wurden auf -70°C gelagert oder direkt für weitere Analysen verwendet.

### **6.4.2 Proteingewinnung aus *Drosophila* Larven**

Für die Proteingewinnung aus *Drosophila* Larven wurden Larven des dritten Larvenstadium mit dem gewünschten Genotyp in 1xPBS gewaschen und so von Futterresten befreit. Nach kurzem Trockentupfen wurden die Larven in *Drosophila*-Lysispuffer mit Protease-Inhibitor-Cocktail (PIC) in einem 1,5ml Reaktionsgefäß gegeben. Hierbei wurden 3µl Lysispuffer pro Larve verwendet. Mit Hilfe eines Batterie-betriebenen Mikropistills wurden die Larven zerstoßen, bis keine intakten Kutikulas mehr zu erkennen waren. Zwischendurch wurde das Reaktionsgefäß immer wieder auf Eis gekühlt. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 4°C bei 13000rpm wurde der Überstand abgenommen. Der oben auf der Flüssigkeit schwimmende Fettdeckel, bleibt an der Pipettenspitze haften. Bevor der Überstand in ein frisches 1,5ml Reaktionsgefäß überführt wurde, wurde das Fett mit einem Papiertuch von der Pipettenspitze entfernt.

Die so gewonnen Proteinlysate können in flüssigem Stickstoff eingefroren und auf -70°C gelagert werden, oder direkt mit 4x Lämmli-Puffer versetzt werden und für 10 Minuten bei 95°C aufgekocht werden.

### **6.4.3 Co-Immunopräzipitation**

Die Co-Immunopräzipitation (CoIP) dient als Nachweismethode für Proteininteraktionen in Proteinlysaten, welche aus Zellen oder Geweben gewonnen wurden. In dieser Arbeit wurde die CoIP für die Analyse der Interaktion von HA-markiertem Shrub und V5-markierten Vps20-Varianten verwendet. Für die CoIP wurden die Vps20-Varianten zusammen mit Shrub in S2R+-Zellen exprimiert und anschließend Proteinlysate der Zellen hergestellt.

Bei der CoIP wurden V5-Antikörper-gekoppelte Beads mit den Zelllysaten inkubiert, wobei die V5-markierten Vps20-Varianten von den Antikörpern gebunden wurden. In dieser Arbeit wurden Protein G Sepharose™ 4 Fast Flow von Cytiva oder Anti-V5-Tag mAb-Magnetic Beads von MBL International für die CoIP verwendet.

30µl der Proteinlysate wurden jeweils für die Analyse des Protein-Inputs in separate Reaktionsgefäße überführt und mit 4x Lämmli-Puffer versetzt und für 10 Minuten bei 95°C aufgekocht. Der Rest der Proteinlysate wurde für die CoIP verwendet. Es wurde je nach eingesetzten Beads nach den untenstehenden Protokollen vorgegangen:

#### CoIP mit Protein G Sepharose™ 4 Fast Flow von Cytiva:

- Die restlichen 170µl der Proteinlysate werden mit V5-Primärantikörper versetzt (1:333) und über Nacht auf 4°C auf dem Rotator inkubiert.
- Protein G Sepharose vorsichtig vortexen und anschließend 40µl der Beads pro Probe in ein frisches 1,5ml Reaktionsgefäß geben und mit 1ml *Drosophila*-Lysispuffer mit PIC versetzen.
- Zentrifugieren bei 2000rpm für 30 Sekunden und anschließend den Überstand verwerfen.
- Beads mit 1ml Lysispuffer mit PIC und 1% BSA für 1h bei 4°C blockieren.
- Zentrifugieren bei 2000rpm für 30 Sekunden und anschließend den Überstand verwerfen.
- Mit 1ml Lysispuffer mit PIC waschen.
- Zentrifugieren bei 2000rpm für 30 Sekunden und anschließend den Überstand verwerfen.

- 1ml Lysispuffer zugeben, invertieren und auf separate 1,5ml Reaktionsgefäße verteilen.
- Zugabe der Proteinlysate, welche mit dem V5-Antikörper inkubiert wurden.
- Inkubation auf dem Rotator bei 4°C über Nacht.
- Zentrifugieren bei 2000rpm für 30 Sekunden und anschließend den Überstand verwerfen.
- Mit 400µl Lysispuffer mit PIC waschen.
- Zentrifugieren bei 2000rpm für 30 Sekunden und anschließend den Überstand verwerfen.
- Waschschritte zweimal wiederholen
- Nachdem der Lysispuffer des letzten Waschschrittes vollständig entfernt wurde, 30µl Lämmli-Puffer auf die Beads geben und für 10 Minuten bei 95°C aufkochen
- Lagerung bei -70°C

#### CoIP mit Anti-V5-Tag mAb-Magnetic Beads von MBL International:

- Beads vorsichtig vortexen und anschließend pro Probe 30µl der Beads in ein frisches 1,5ml Reaktionsgefäß geben.
- 1ml *Drosophila*-Lysispuffer mit PIC hinzugeben und mehrfach invertieren.
- Reaktionsgefäße in magnetischen Reaktionsgefäß-Ständer stellen und warten bis sich die magnetischen Beads an der Wand des Reaktionsgefäßes gesammelt haben.
- Überstand abnehmen und die restlichen 170µl der Proteinlysate in der Reaktionsgefäße geben.
- Solange invertieren, bis die sich die Beads komplett von der Wand der Reaktionsgefäße gelöst haben.
- Reaktionsgefäße mit Parafilm verschließen und auf dem Rotator bei 4°C über Nacht inkubieren.
- Magnetische Beads im magnetischen Reaktionsgefäß-Ständer von der Flüssigkeit trennen.
- Zum Waschen der Beads 1ml frischen Lysispuffer mit PIC zugeben und solange invertieren, bis sich die Beads komplett von der Wand des Reaktionsgefäßes gelöst haben.
- Magnetische Beads im magnetischen Reaktionsgefäß-Ständer von der Flüssigkeit trennen.
- Waschschritte zweimal wiederholen.

- Nachdem der Lysispuffer des letzten Waschschrilles vollständig entfernt wurde, 30µl Lämmli-Puffer auf die Beads geben und für 10 Minuten bei 95°C aufkochen.
- Lagerung bei -70°C

#### **6.4.4 SDS-PAGE und Western Blot**

##### SDS-PAGE:

Proteinlysate oder Proben der CoIP können mit Hilfe Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) unter denaturierenden Bedingungen ihrer Masse nach in einem elektrischen Feld aufgetrennt werden. Hierfür wurde ein zweiteiliges Polyacrylamidgel zwischen zwei Glasplatten gegossen. Der untere Teil bildete das Trenngel indem die Proteine ihrer Masse nach aufgetrennt wurden. Darüber wurde das Sammelgel gegossen, in welches ein Kunststoffkamm eingesetzt wurde, der Taschen in dem fertigen Gel geformt hat. In dem Sammelgel wurden die Proben nach dem Einfüllen in die Taschen bei angelegter elektrischer Spannung verdichtet. Um die Größe der Proteine bestimmen zu können, wurde ein Protein-Längenstandard zusätzlich zu den Proben aufgetragen. Durch das Anlegen eines elektrischen Feldes (70V) treten die Proben aus den Geltaschen in das Sammelgel ein. Haben sie das Trenngel erreicht, wurde die Spannung auf 120V erhöht. Nach ausreichender Auftrennung der Proben im Trenngel, wurden die Gele für den Western Blot verwendet.

##### Western-Blot:

Für den Western Blot im semi-dry Verfahren können die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen werden, wo sie mittels immunohistochemischer Färbung spezifisch nachgewiesen werden können. Für die Übertragung der Proteine werden Whatman Filterpapiere und die Polyacrylamidgele in Transferpuffer gelegt. Parallel dazu wird pro Gel eine PVDF Membran in Methanol inkubiert. Nachdem die PVDF Membran mit dH<sub>2</sub>O abgespült wurde, wird der Blot nach Herstellerangaben mit dem Trans-Blot Turbo System von Bio-Rad aufgebaut und durchgeführt. Der Western-Blot wurde für 30 Minuten bei 1A Stromstärke und maximal 25 Volt Spannung durchgeführt.

Im Anschluss an die Übertragung der Proteine auf die PVDF-Membran wurde die immunohistochemische Färbung der Membran nach folgendem Protokoll durchgeführt:

### Immunohistochemische Färbung der PVDF-Membran:

- Die PVDF-Membranen in 50ml Reaktionsgefäße geben und mit 7,5ml Blockierlösung (5% Milchpulver in PBS) für eine Stunde auf Raumtemperatur auf dem Rollenmischer inkubieren.
- Blockierlösung entfernen und 7,5ml Färbelösung (2% Milchpulver in PBS) mit dem Primärantikörper hinzugeben.
- Inkubation auf dem Rollenmischer bei 4°C über Nacht.
- Färbelösung verwerfen und dreimal mit 0,1% PBT (Tween20) waschen.

Sollte der Primärantikörper mit einer Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelt sein, erfolgte an dieser Stelle die Detektion. Andernfalls wurde ein HRP-gekoppelter Sekundärantikörper für die weitere Färbung verwendet:

- Inkubation mit 7,5ml Färbelösung mit HRP-gekoppeltem Sekundärantikörper für 1h auf Raumtemperatur.
- Färbelösung verwerfen und dreimal mit 0,1% PBT (Tween20) waschen.
- Lagerung in PBS oder direkte Detektion.

Die Detektion der Proteine erfolgt mit Hilfe des WesternBright ECL HRP Substrate von Advansta am Amersham ImageQuant 800 von Cytiva.

## **6.5 Bioinformatische Methoden**

### **6.5.1 Struktursimulation mittels Alphafold2 in ChimeraX und Komplexmodellierung mit Alphafold2-Multimer und ColabFold**

Alphafold2 ist mit Hilfe eines deep-learning-Algorithmus in der Lage, Proteinstrukturen anhand der Aminosäuresequenz über Homologiemodellierung vorherzusagen (Jumper et al., 2021). Für viele Proteine ist bereits eine simulierte Struktur in der Alphafold-Datenbank vorhanden (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>). Alphafold2 produziert bei der Simulation einen per-residue confidence score (pLDDT) zwischen 0 und 100, der angibt, wie wahrscheinlich die vorhergesagte Struktur simuliert wurde. Je höher dieser Wert ist, desto genauer soll die Vorhersage sein. Strukturen mit einem Wert unter 50 gelten im einzelnen Protein betrachtet als unstrukturiert.

Um Proteinstrukturen zu simulieren, die nicht in der Datenbank vorhanden sind, wurde auf Programme zurückgegriffen, die die Simulation mit Hilfe des Alphafold2 Algorithmus durchführen können. ChimeraX (Version 1.4dev) besitzt ein Plugin, mit dem direkt durch

die Eingabe von Aminosäuresequenzen die Struktursimulation über den AlphaFold2 Algorithmus durchgeführt werden konnten.

Für größere simulierte Proteinkomplexe wurde das AlphaFold2\_mmseq2 Notebook von ColabFold verwendet (Mirdita et al., 2022). Hierbei wurde der `template_mode` auf „none“ gesetzt. Als MSA-Methode wurde „MMseqs2 (UniRef+Environmental)“ mit der `pair_mode` „unpaired+paired“ verwendet.

Für die Analysen wurden immer die Strukturen mit den höchsten pLDDT-Scores oder die als am wahrscheinlichsten bewerteten Komplexe verwendet.

### **6.5.2 Molekulardynamik-Simulation der Bindung von Shrub an Vps20**

Die Molekulardynamik-Simulationen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Stephan Schott-Verdugo (Institut für Bio- und Geowissenschaften - Bioinformatik (IBG-4); Forschungszentrum Jülich; AG Prof. Dr. Holger Gohlke) durchgeführt.

Für die Molekulardynamik-Simulationen der Bindung von Shrub an Vps20 wurde die Struktur von *D.melanogaster* Shrub (AS 18-129) aus PDB verwendet (PDB: ID 5J45, McMillan et al. (2016)). Als Ausgangssituation für die Simulation wurden Trimere zwischen zwei Shrub-Molekülen und Vps20 gebildet. Hierbei wurde Vps20 in zwei Orientierungen so neben einem Shrub-Dimer platziert, wie auch weitere Shrub-Moleküle bei der Polymerisation von Shrub binden würden (McMillan et al., 2016). Die Struktur von Vps20 (AS 20-146) wurde mit TopModel modelliert (Mulnaes et al., 2020) und die lange  $\alpha$ 2-Helix der helikalen Haarnadel so gekürzt, dass für die Simulation der Aminosäurebereich 20-123 verwendet wurde.

Für die Bindungssimulationen von Shrub an Vps20, in die Vps25 einbezogen wurde, wurde ein Teil (AS 99-174) von *Drosophila*-Vps25 aus der AlphaFold-Datenbank verwendet (AlphaFold Datenbank ID: AF-Q7JXV9-F1). Für diesen Teil von Vps25 wurde die Bindung an Vps20 in den humanen Orthologen gezeigt (PDB: ID 3HTU, Im und Hurley (2008)). Für die Simulation wurde *Drosophila* Vps25 in gleicher Orientierung wie für die humanen Orthologe gezeigt auf Vps20 platziert, welches in der Ausgangsposition, wie oben beschrieben, neben ein Shrub-Dimer platziert wurde.

Um die Beteiligung verschiedener Aminosäuren an der Bindung von Shrub an Vps20 zu identifizieren, wurde die AMBER 18-Suite verwendet (Case et al., 2018). Die vorbereiteten Trimere wurden dafür gelöst und parametrisiert. Hierbei wurde LEaP mit

ff14SB verwendet um die Proteine zu beschreiben (Maier et al., 2015) und TIP3P wurde als Wassermolekülmodell verwendet (Jorgensen et al., 1983). Nach Thermalisierung auf 300K mit Hilfe des Langevin-Thermostats und Dichteanpassung in einem NPT-Ensemble (Isotherm-isobares Ensemble) wurden fünf unabhängige Molekulardynamik-Simulationen von 100ns Länge durchgeführt. Die Trimer-Bildung ist dabei in einem NVT-Ensemble (Kanonisches Ensemble) mit dem Berendsen Thermostat mit Hilfe der pmemd GPU Implementierung durchgeführt worden (Darden et al., 1993; Le Grand et al., 2013). Kovalente Bindungen zu Wasserstoffatomen wurden in allen Simulationen mit dem SHAKE-Algorithmus eingeschränkt, was die Verwendung von 2fs Zeitschritten ermöglichte (Ryckaert et al., 1977).

Die Bindungsenergien der interagierenden Aminosäuren zwischen Shrub und Vps20 oder Vps20/Vps25 wurden aus der Nachbearbeitung der Trajektorien mit MM-PBSA.py erhalten (Miller et al., 2012). Jeder Trimer Komplex wurde unter Verwendung des GB<sup>OC II</sup>-Modells (Onufriev et al., 2004) oder mit kanonischem PBSA mit 0,15M Ionenstärke und ansonsten Standardoptionen analysiert.

### **6.5.3 Molekulardynamik-Simulation der Membranbindung von Shrub**

Um die Beteiligung von Aminosäuren in Shrub an der Membranbindung zu identifizieren, wurden Molekulardynamik-Simulationen in Zusammenarbeit mit Dr. Stephan Schott-Verdugo (Institut für Bio- und Geowissenschaften - Bioinformatik (IBG-4); Forschungszentrum Jülich; AG Prof. Dr. Holger Gohlke) durchgeführt.

Für den Ausgangszustand wurde ein Shrub-Molekül oder ein Shrub-Trimer (Struktur aus PDB: ID 5J45, McMillan et al. (2016)) mit Hilfe von Packmol-MEMGEN in ein modelliertes Membransystem gepackt (Schott-Verdugo und Gohlke, 2019). Anschließend wurde die Proteinposition um 25Å zur Membranoberfläche verschoben. Für die Membranzusammensetzung des modellierten Membransystem wurden DOPC:DOPE:DOPS (Dipalmitoylphosphatidylcholin:Dipalmitoylphosphatidylethanolamin:Dipalmitoylphosphatidylserin) im Verhältnis 100:25:10 eingesetzt. Nach Thermalisierung auf 300K mit Hilfe des Langevin-Thermostats und Dichteanpassung in einem NPT-Ensemble wurden fünf Wiederholungen der Molekulardynamik-Simulation unter gleichen Bedingungen für 500ns durchgeführt. Aminosäurereste in Shrub, die in den Trajektorien einen Abstand unter 4,5Å zu den Phospholipiden der Membran erreichten, wurden mit Hilfe der CPPTRAJ nativecontacts Routine als Bindung evaluiert (Roe und Cheatham, 2013).

---

## 7. Literaturverzeichnis

- Adell, M. A., Vogel, G. F., Pakdel, M., Müller, M., Lindner, H., Hess, M. W. und Teis, D.** (2014). Coordinated binding of Vps4 to ESCRT-III drives membrane neck constriction during MVB vesicle formation. *J Cell Biol* **205**, 33-49.
- Adell, M. A. Y., Migliano, S. M., Upadhyayula, S., Bykov, Y. S., Sprenger, S., Pakdel, M., Vogel, G. F., Jih, G., Skillern, W., Behrouzi, R., Babst, M., Schmidt, O., Hess, M. W., Briggs, J. A., Kirchhausen, T. und Teis, D.** (2017). Recruitment dynamics of ESCRT-III and Vps4 to endosomes and implications for reverse membrane budding. *Elife* **6**.
- Al-Tawashi, A. und Gehring, C.** (2013). Phosphodiesterase activity is regulated by CC2D1A that is implicated in non-syndromic intellectual disability. *Cell Commun Signal* **11**, 47.
- Al-Tawashi, A., Jung, S. Y., Liu, D., Su, B. und Qin, J.** (2012). Protein implicated in nonsyndromic mental retardation regulates protein kinase A (PKA) activity. *J Biol Chem* **287**, 14644-58.
- Allenspach, E. J., Maillard, I., Aster, J. C. und Pear, W. S.** (2002). Notch signaling in cancer. *Cancer Biol Ther* **1**, 466-76.
- Babst, M., Katzmann, D. J., Estepa-Sabal, E. J., Meerloo, T. und Emr, S. D.** (2002a). Escrt-III: an endosome-associated heterooligomeric protein complex required for mvb sorting. *Dev Cell* **3**, 271-82.
- Babst, M., Katzmann, D. J., Snyder, W. B., Wendland, B. und Emr, S. D.** (2002b). Endosome-associated complex, ESCRT-II, recruits transport machinery for protein sorting at the multivesicular body. *Dev Cell* **3**, 283-9.
- Babst, M., Wendland, B., Estepa, E. J. und Emr, S. D.** (1998). The Vps4p AAA ATPase regulates membrane association of a Vps protein complex required for normal endosome function. *Embo j* **17**, 2982-93.
- Bache, K. G., Raiborg, C., Mehlum, A. und Stenmark, H.** (2003). STAM and Hrs are subunits of a multivalent ubiquitin-binding complex on early endosomes. *J Biol Chem* **278**, 12513-21.
- Bachmann, A. und Knust, E.** (2008). The use of P-element transposons to generate transgenic flies. *Methods Mol Biol* **420**, 61-77.
- Baeumers, M., Ruhnau, K., Breuer, T., Pannen, H., Goerlich, B., Kniebel, A., Haensch, S., Weidtkamp-Peters, S., Schmitt, L. und Klein, T.** (2020). Lethal (2) giant discs (Lgd)/CC2D1 is required for the full activity of the ESCRT machinery. *BMC Biol* **18**, 200.
- Bajorek, M., Schubert, H. L., McCullough, J., Langelier, C., Eckert, D. M., Stubblefield, W. M., Uter, N. T., Myszka, D. G., Hill, C. P. und Sundquist, W. I.** (2009). Structural basis for ESCRT-III protein autoinhibition. *Nat Struct Mol Biol* **16**, 754-62.
- Bäumers, M.** (2015). Masterarbeit: Interaktionsstudien zwischen dem ESCRT-III Protein Shrub und dem Tumorsuppressor Lgd sowie deren Säugerorthologen in *Drosophila melanogaster*: Heinrich-Heine-Universität.
- Bäumers, M.** (2020). Dissertation: Analyse der funktionalen Beziehung zwischen der ESCRT-III Komponente Shrub/CHMP4 und ihrem Regulator Lgd/CC2D1: Heinrich-Heine-Universität.

- Bäumers, M., Klose, S., Bruser, C., Haag, C., Hansch, S., Pannen, H., Weidtkamp-Peters, S., Feldbrugge, M. und Klein, T.** (2019). The auxiliary ESCRT complexes provide robustness to cold in poikilothermic organisms. *Biol Open* **8**.
- Bellen, H. J., Levis, R. W., Liao, G., He, Y., Carlson, J. W., Tsang, G., Evans-Holm, M., Hiesinger, P. R., Schulze, K. L., Rubin, G. M., Hoskins, R. A. und Spradling, A. C.** (2004). The BDGP gene disruption project: single transposon insertions associated with 40% of *Drosophila* genes. *Genetics* **167**, 761-81.
- Benscheidt, C.** (2013). Masterarbeit: Charakterisierung der DM14 Domänen von *lgd* und Analyse der Prozessierung des Notch Rezeptors in *Drosophila melanogaster*: Heinrich-Heine-Universität.
- Bilodeau, P. S., Urbanowski, J. L., Winistorfer, S. C. und Piper, R. C.** (2002). The Vps27p Hse1p complex binds ubiquitin and mediates endosomal protein sorting. *Nat Cell Biol* **4**, 534-9.
- Bischof, J., Maeda, R. K., Hediger, M., Karch, F. und Basler, K.** (2007). An optimized transgenesis system for *Drosophila* using germ-line-specific phiC31 integrases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 3312-7.
- Blaumueller, C. M., Qi, H., Zagouras, P. und Artavanis-Tsakonas, S.** (1997). Intracellular cleavage of Notch leads to a heterodimeric receptor on the plasma membrane. *Cell* **90**, 281-91.
- Brand, A. H. und Perrimon, N.** (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**, 401-15.
- Bray, S. J.** (2006). Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 678-89.
- Brou, C., Logeat, F., Gupta, N., Bessia, C., LeBail, O., Doedens, J. R., Cumano, A., Roux, P., Black, R. A. und Israel, A.** (2000). A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. *Mol Cell* **5**, 207-16.
- Brüser, C.** (2013). Masterarbeit: 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 Schubiger, G.** (1971). Giant and duplicated imaginal discs in a new lethal mutant of *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* **24**, 233-63.
- Buchkovich, N. J., Henne, W. M., Tang, S. und Emr, S. D.** (2013). Essential N-terminal insertion motif anchors the ESCRT-III filament during MVB vesicle formation. *Dev Cell* **27**, 201-214.
- Buratovich, M. A. und Bryant, P. J.** (1995). Duplication of l(2)gd imaginal discs in *Drosophila* is mediated by ectopic expression of *wg* and *dpp*. *Dev Biol* **168**, 452-63.
- Burd, C. G., Babst, M. und Emr, S. D.** (1998). Novel pathways, membrane coats and PI kinase regulation in yeast lysosomal trafficking. *Semin Cell Dev Biol* **9**, 527-33.
- Caillat, C., Macheboeuf, P., Wu, Y., McCarthy, A. A., Boeri-Erba, E., Effantin, G., Göttlinger, H. G., Weissenhorn, W. und Renesto, P.** (2015). Asymmetric ring structure of Vps4 required for ESCRT-III disassembly. *Nat Commun* **6**, 8781.

- Case, D. A., Ben-Shalom, I. Y., Brozell, S. R., Cerutti, D. S., Cheatham, T. E., Cruzeiro, V. W. D., Darden, T. A., Duke, R. E., Ghoreishi, D., Gilson, M. K., Gohlke, H., Goetz, A. W., Greene, D., Harris, R., Homeyer, N., Huang, Y., Izadi, S., Kovalenko, A., Kurtzman, T., Lee, T. S., LeGrand, S., Li, P., Lin, C., Liu, J., Luchko, T., Luo, R., Mermelstein, D. J., Merz, K. M., Miao, Y., Monard, G., Nguyen, C., Nguyen, H., Omelyan, I., Onufriev, A., Pan, D., Qi, R., Roe, D. R., Roitberg, A., Sagui, C., Schott-Verdugo, S., Shen, J., Simmerling, C. L., Smith, J., SalomonFerrer, R., Swails, J., Walker, R. C., Wang, J., Wei, H., Wolf, R. M., Wu, X., Xiao, L., York, D. M. und Kollman, P. A. (2018). AMBER 2018. *University of California, San Francisco*.
- Chiaruttini, N., Redondo-Morata, L., Colom, A., Humbert, F., Lenz, M., Scheuring, S. und Roux, A. (2015). Relaxation of Loaded ESCRT-III Spiral Springs Drives Membrane Deformation. *Cell* **163**, 866-79.
- Childress, J. L., Acar, M., Tao, C. und Halder, G. (2006). Lethal giant discs, a novel C2-domain protein, restricts notch activation during endocytosis. *Curr Biol* **16**, 2228-33.
- Chou, T. B. und Perrimon, N. (1996). The autosomal FLP-DFS technique for generating germline mosaics in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **144**, 1673-9.
- Couturier, L., Trylinski, M., Mazouni, K., Darnet, L. und Schweisguth, F. (2014). A fluorescent tagging approach in *Drosophila* reveals late endosomal trafficking of Notch and Sanpodo. *J Cell Biol* **207**, 351-63.
- Crocker, J. A., Ziegenhorn, S. L. und Holmgren, R. A. (2006). Regulation of the *Drosophila* transcription factor, Cubitus interruptus, by two conserved domains. *Dev Biol* **291**, 368-81.
- Darden, T., York, D. und Pedersen, L. (1993). Particle mesh Ewald: An N·log(N) method for Ewald sums in large systems. *The Journal of Chemical Physics* **98**, 10089-10092.
- Davies, B. A., Lee, J. R., Oestreich, A. J. und Katzmann, D. J. (2009). Membrane protein targeting to the MVB/lysosome. *Chem Rev* **109**, 1575-86.
- De Strooper, B., Annaert, W., Cupers, P., Saftig, P., Craessaerts, K., Mumm, J. S., Schroeter, E. H., Schrijvers, V., Wolfe, M. S., Ray, W. J., Goate, A. und Kopan, R. (1999). A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature* **398**, 518-22.
- del Alamo, D., Rouault, H. und Schweisguth, F. (2011). Mechanism and significance of cis-inhibition in Notch signalling. *Curr Biol* **21**, R40-7.
- Drusenheimer, N., Migdal, B., Jackel, S., Tveriakhina, L., Scheider, K., Schulz, K., Groper, J., Kohrer, K. und Klein, T. (2015). The Mammalian Orthologs of *Drosophila* Lgd, CC2D1A and CC2D1B, Function in the Endocytic Pathway, but Their Individual Loss of Function Does Not Affect Notch Signalling. *PLoS Genet* **11**, e1005749.
- Dupré, S. und Haguenaer-Tsapis, R. (2001). Deubiquitination step in the endocytic pathway of yeast plasma membrane proteins: crucial role of Doa4p ubiquitin isopeptidase. *Mol Cell Biol* **21**, 4482-94.
- Farazi, T. A., Waksman, G. und Gordon, J. I. (2001). The biology and enzymology of protein N-myristoylation. *J Biol Chem* **276**, 39501-4.
- Freeman, W. M., Walker, S. J. und Vrana, K. E. (1999). Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *Biotechniques* **26**, 112-22, 124-5.

- Fu, D., Tian, L., Peng, Z., Deng, W., Yuan, J., Ma, D., Shi, T., Li, D. und Wang, Y.** (2009). Overexpression of CHMP6 induces cellular oncosis and apoptosis in HeLa cells. *Biosci Biotechnol Biochem* **73**, 494-501.
- Furriols, M. und Bray, S.** (2000). Dissecting the mechanisms of suppressor of hairless function. *Dev Biol* **227**, 520-32.
- Furriols, M. und Bray, S.** (2001). A model Notch response element detects Suppressor of Hairless-dependent molecular switch. *Curr Biol* **11**, 60-4.
- Futter, C. E., Pearse, A., Hewlett, L. J. und Hopkins, C. R.** (1996). Multivesicular endosomes containing internalized EGF-EGF receptor complexes mature and then fuse directly with lysosomes. *J Cell Biol* **132**, 1011-23.
- Gallagher, C. M. und Knoblich, J. A.** (2006). The conserved c2 domain protein lethal (2) giant discs regulates protein trafficking in *Drosophila*. *Dev Cell* **11**, 641-53.
- Gaulier, J. M., Simonsen, A., D'Arrigo, A., Bremnes, B., Stenmark, H. und Aasland, R.** (1998). FYVE fingers bind PtdIns(3)P. *Nature* **394**, 432-3.
- Gibson, D. G., Young, L., Chuang, R. Y., Venter, J. C., Hutchison, C. A., 3rd und Smith, H. O.** (2009). Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat Methods* **6**, 343-5.
- Gill, D. J., Teo, H., Sun, J., Perisic, O., Veprintsev, D. B., Emr, S. D. und Williams, R. L.** (2007). Structural insight into the ESCRT-I/-II link and its role in MVB trafficking. *Embo j* **26**, 600-12.
- Gillooly, D. J., Morrow, I. C., Lindsay, M., Gould, R., Bryant, N. J., Gaulier, J. M., Parton, R. G. und Stenmark, H.** (2000). Localization of phosphatidylinositol 3-phosphate in yeast and mammalian cells. *Embo j* **19**, 4577-88.
- Golic, K. G.** (1991). Site-specific recombination between homologous chromosomes in *Drosophila*. *Science* **252**, 958-61.
- Golic, K. G. und Lindquist, S.** (1989). The FLP recombinase of yeast catalyzes site-specific recombination in the *Drosophila* genome. *Cell* **59**, 499-509.
- Gorvel, J. P., Chavrier, P., Zerial, M. und Gruenberg, J.** (1991). rab5 controls early endosome fusion in vitro. *Cell* **64**, 915-25.
- Han, H., Monroe, N., Sundquist, W. I., Shen, P. S. und Hill, C. P.** (2017). The AAA ATPase Vps4 binds ESCRT-III substrates through a repeating array of dipeptide-binding pockets. *Elife* **6**.
- Harper, J. A., Yuan, J. S., Tan, J. B., Visan, I. und Guidos, C. J.** (2003). Notch signaling in development and disease. *Clin Genet* **64**, 461-72.
- Hay, B. A., Wolff, T. und Rubin, G. M.** (1994). Expression of baculovirus P35 prevents cell death in *Drosophila*. *Development* **120**, 2121-9.
- Helle, M.** (2017). Bachelorarbeit: Charakterisierung der Interaktion zwischen dem ESCRT-III-Hilfsfaktor DChmp5 und dem Tumorsuppressor Lgd in *Drosophila melanogaster in vivo*: Heinrich-Heine-Universität.

- Henne, W. M., Buchkovich, N. J., Zhao, Y. und Emr, S. D.** (2012). The endosomal sorting complex ESCRT-II mediates the assembly and architecture of ESCRT-III helices. *Cell* **151**, 356-71.
- Herz, H. M., Chen, Z., Scherr, H., Lackey, M., Bolduc, C. und Bergmann, A.** (2006). vps25 mosaics display non-autonomous cell survival and overgrowth, and autonomous apoptosis. *Development* **133**, 1871-80.
- Hierro, A., Sun, J., Rusnak, A. S., Kim, J., Prag, G., Emr, S. D. und Hurley, J. H.** (2004). Structure of the ESCRT-II endosomal trafficking complex. *Nature* **431**, 221-5.
- Hori, K., Sen, A. und Artavanis-Tsakonas, S.** (2013). Notch signaling at a glance. *J Cell Sci* **126**, 2135-40.
- Hori, K., Sen, A., Kirchhausen, T. und Artavanis-Tsakonas, S.** (2011). Synergy between the ESCRT-III complex and Deltex defines a ligand-independent Notch signal. *J Cell Biol* **195**, 1005-15.
- Huotari, J. und Helenius, A.** (2011). Endosome maturation. *Embo j* **30**, 3481-500.
- Hurley, J. H.** (2015). ESCRTs are everywhere. *Embo j* **34**, 2398-407.
- Im, Y. J. und Hurley, J. H.** (2008). Integrated structural model and membrane targeting mechanism of the human ESCRT-II complex. *Dev Cell* **14**, 902-13.
- Im, Y. J., Wollert, T., Boura, E. und Hurley, J. H.** (2009). Structure and function of the ESCRT-II-III interface in multivesicular body biogenesis. *Dev Cell* **17**, 234-43.
- Jaekel, R. und Klein, T.** (2006). The *Drosophila* Notch inhibitor and tumor suppressor gene lethal (2) giant discs encodes a conserved regulator of endosomal trafficking. *Dev Cell* **11**, 655-69.
- Jerabek-Willemsen, M., André, T., Wanner, R., Roth, H. M., Duhr, S., Baaske, P. und Breitsprecher, D.** (2014). MicroScale Thermophoresis: Interaction analysis and beyond. *Journal of Molecular Structure* **1077**, 101-113.
- Jorgensen, W. L., Chandrasekhar, J., Madura, J. D., Impey, R. W. und Klein, M. L.** (1983). Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *The Journal of Chemical Physics* **79**, 926-935.
- Jukic, N., Perrino, A. P., Humbert, F., Roux, A. und Scheuring, S.** (2022). Snf7 spirals sense and alter membrane curvature. *Nat Commun* **13**, 2174.
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., Back, T., Petersen, S., Reiman, D., Clancy, E., Zielinski, M., Steinegger, M., Pacholska, M., Berghammer, T., Bodenstein, S., Silver, D., Vinyals, O., Senior, A. W., Kavukcuoglu, K., Kohli, P. und Hassabis, D.** (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* **596**, 583-589.
- Jurrus, E., Engel, D., Star, K., Monson, K., Brandi, J., Felberg, L. E., Brookes, D. H., Wilson, L., Chen, J., Liles, K., Chun, M., Li, P., Gohara, D. W., Dolinsky, T., Konecny, R., Koes, D. R., Nielsen, J. E., Head-Gordon, T., Geng, W., Krasny, R., Wei, G. W., Holst, M. J., McCammon, J. A. und Baker, N. A.** (2018). Improvements to the APBS biomolecular solvation software suite. *Protein Sci* **27**, 112-128.

- Katzmann, D. J., Babst, M. und Emr, S. D.** (2001). Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell* **106**, 145-55.
- Katzmann, D. J., Odorizzi, G. und Emr, S. D.** (2002). Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 893-905.
- Kidd, S., Lieber, T. und Young, M. W.** (1998). Ligand-induced cleavage and regulation of nuclear entry of Notch in *Drosophila melanogaster* embryos. *Genes Dev* **12**, 3728-40.
- Kieffer, C., Skalicky, J. J., Morita, E., De Domenico, I., Ward, D. M., Kaplan, J. und Sundquist, W. I.** (2008). Two distinct modes of ESCRT-III recognition are required for VPS4 functions in lysosomal protein targeting and HIV-1 budding. *Dev Cell* **15**, 62-73.
- Klein, T.** (2001). Wing disc development in the fly: the early stages. *Curr Opin Genet Dev* **11**, 470-5.
- 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**, 313-33.
- Kopan, R. und Ilagan, M. X.** (2009). The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell* **137**, 216-33.
- Kostelansky, M. S., Schluter, C., Tam, Y. Y., Lee, S., Ghirlando, R., Beach, B., Conibear, E. und Hurley, J. H.** (2007). Molecular architecture and functional model of the complete yeast ESCRT-I heterotetramer. *Cell* **129**, 485-98.
- Kozak, M.** (1995). Adherence to the first-AUG rule when a second AUG codon follows closely upon the first. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 2662-6.
- Kranz, A., Kinner, A. und Kölling, R.** (2001). A family of small coiled-coil-forming proteins functioning at the late endosome in yeast. *Mol Biol Cell* **12**, 711-23.
- Le Borgne, R., Remaud, S., Hamel, S. und Schweisguth, F.** (2005). Two distinct E3 ubiquitin ligases have complementary functions in the regulation of delta and serrate signaling in *Drosophila*. *PLoS Biol* **3**, e96.
- Le Grand, S., Götz, A. W. und Walker, R. C.** (2013). SPFP: Speed without compromise - A mixed precision model for GPU accelerated molecular dynamics simulations. *Computer Physics Communications* **184**, 374-380.
- Lecourtois, M. und Schweisguth, F.** (1998). Indirect evidence for Delta-dependent intracellular processing of notch in *Drosophila* embryos. *Curr Biol* **8**, 771-4.
- Lin, Y., Kimpler, L. A., Naismith, T. V., Lauer, J. M. und Hanson, P. I.** (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**, 12799-809.
- Lloyd, T. E., Atkinson, R., Wu, M. N., Zhou, Y., Pennetta, G. und Bellen, H. J.** (2002). Hrs regulates endosome membrane invagination and tyrosine kinase receptor signaling in *Drosophila*. *Cell* **108**, 261-9.

- Logeat, F., Bessia, C., Brou, C., LeBail, O., Jarriault, S., Seidah, N. G. und Israel, A.** (1998). The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 8108-12.
- Louvi, A. und Artavanis-Tsakonas, S.** (2012). Notch and disease: a growing field. *Semin Cell Dev Biol* **23**, 473-80.
- Lowe, N., Rees, J. S., Roote, J., Ryder, E., Armean, I. M., Johnson, G., Drummond, E., Spriggs, H., Drummond, J., Magbanua, J. P., Naylor, H., Sanson, B., Bastock, R., Huelsmann, S., Trovisco, V., Landgraf, M., Knowles-Barley, S., Armstrong, J. D., White-Cooper, H., Hansen, C., Phillips, R. G., Lilley, K. S., Russell, S. und St Johnston, D.** (2014). Analysis of the expression patterns, subcellular localisations and interaction partners of *Drosophila* proteins using a pigP protein trap library. *Development* **141**, 3994-4005.
- Luca, V. C., Jude, K. M., Pierce, N. W., Nachury, M. V., Fischer, S. und Garcia, K. C.** (2015). Structural biology. Structural basis for Notch1 engagement of Delta-like 4. *Science* **347**, 847-53.
- Luhtala, N. und Odorizzi, G.** (2004). Bro1 coordinates deubiquitination in the multivesicular body pathway by recruiting Doa4 to endosomes. *J Cell Biol* **166**, 717-29.
- Luzio, J. P., Pryor, P. R. und Bright, N. A.** (2007). Lysosomes: fusion and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 622-32.
- Maier, J. A., Martinez, C., Kasavajhala, K., Wickstrom, L., Hauser, K. E. und Simmerling, C.** (2015). ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from ff99SB. *J Chem Theory Comput* **11**, 3696-713.
- Martinelli, N., Hartlieb, B., Usami, Y., Sabin, C., Dordor, A., Miguet, N., Avilov, S. V., Ribeiro, E. A., Jr., Göttinger, H. und Weissenhorn, W.** (2012). CC2D1A is a regulator of ESCRT-III CHMP4B. *J Mol Biol* **419**, 75-88.
- Matsuda, A., Suzuki, Y., Honda, G., Muramatsu, S., Matsuzaki, O., Nagano, Y., Doi, T., Shimotohno, K., Harada, T., Nishida, E., Hayashi, H. und Sugano, S.** (2003). Large-scale identification and characterization of human genes that activate NF-kappaB and MAPK signaling pathways. *Oncogene* **22**, 3307-18.
- Maxfield, F. R. und Yamashiro, D. J.** (1987). Endosome acidification and the pathways of receptor-mediated endocytosis. *Adv Exp Med Biol* **225**, 189-98.
- McGuire, S. E., Le, P. T., Osborn, A. J., Matsumoto, K. und Davis, R. L.** (2003). Spatiotemporal rescue of memory dysfunction in *Drosophila*. *Science* **302**, 1765-8.
- McGuire, S. E., Mao, Z. und Davis, R. L.** (2004). Spatiotemporal gene expression targeting with the TARGET and gene-switch systems in *Drosophila*. *Sci STKE* **2004**, pl6.
- McMillan, B. J., Tibbe, C., Drabek, A. A., Seegar, T. C. M., Blacklow, S. C. und Klein, T.** (2017). Structural Basis for Regulation of ESCRT-III Complexes by Lgd. *Cell Rep* **19**, 1750-1757.
- McMillan, B. J., Tibbe, C., Jeon, H., Drabek, A. A., Klein, T. und Blacklow, S. C.** (2016). Electrostatic Interactions between Elongated Monomers Drive Filamentation of *Drosophila* Shrub, a Metazoan ESCRT-III Protein. *Cell Rep* **16**, 1211-1217.
- Meloty-Kapella, L., Shergill, B., Kuon, J., Botvinick, E. und Weinmaster, G.** (2012). Notch ligand endocytosis generates mechanical pulling force dependent on dynamin, epsins, and actin. *Dev Cell* **22**, 1299-312.

- Menut, L., Vaccari, T., Dionne, H., Hill, J., Wu, G. und Bilder, D.** (2007). A mosaic genetic screen for *Drosophila* neoplastic tumor suppressor genes based on defective pupation. *Genetics* **177**, 1667-77.
- Mierzwa, B. E., Chiaruttini, N., Redondo-Morata, L., Moser von Filseck, J., König, J., Larios, J., Poser, I., Müller-Reichert, T., Scheuring, S., Roux, A. und Gerlich, D. W.** (2017). Dynamic subunit turnover in ESCRT-III assemblies is regulated by Vps4 to mediate membrane remodelling during cytokinesis. *Nat Cell Biol* **19**, 787-798.
- Miller, B. R., 3rd, McGee, T. D., Jr., Swails, J. M., Homeyer, N., Gohlke, H. und Roitberg, A. E.** (2012). MMPBSA.py: An Efficient Program for End-State Free Energy Calculations. *J Chem Theory Comput* **8**, 3314-21.
- Mirdita, M., Schütze, K., Moriwaki, Y., Heo, L., Ovchinnikov, S. und Steinegger, M.** (2022). ColabFold - Making protein folding accessible to all. *bioRxiv*, 2021.08.15.456425.
- Mizuno, E., Kawahata, K., Kato, M., Kitamura, N. und Komada, M.** (2003). STAM proteins bind ubiquitinated proteins on the early endosome via the VHS domain and ubiquitin-interacting motif. *Mol Biol Cell* **14**, 3675-89.
- Monroe, N., Han, H., Gonciarz, M. D., Eckert, D. M., Karren, M. A., Whitby, F. G., Sundquist, W. I. und Hill, C. P.** (2014). The oligomeric state of the active Vps4 AAA ATPase. *J Mol Biol* **426**, 510-25.
- Monroe, N., Han, H., Shen, P. S., Sundquist, W. I. und Hill, C. P.** (2017). Structural basis of protein translocation by the Vps4-Vta1 AAA ATPase. *Elife* **6**.
- Morata, G. und Calleja, M.** (2020). Cell competition and tumorigenesis in the imaginal discs of *Drosophila*. *Semin Cancer Biol* **63**, 19-26.
- Morawa, K. S., Schneider, M. und Klein, T.** (2015). Lgd regulates the activity of the BMP/Dpp signalling pathway during *Drosophila* oogenesis. *Development* **142**, 1325-35.
- Morel, V. und Schweisguth, F.** (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**, 377-88.
- Mulnaes, D., Porta, N., Clemens, R., Apanasenko, I., Reiners, J., Gremer, L., Neudecker, P., Smits, S. H. J. und Gohlke, H.** (2020). TopModel: Template-Based Protein Structure Prediction at Low Sequence Identity Using Top-Down Consensus and Deep Neural Networks. *J Chem Theory Comput* **16**, 1953-1967.
- Muzioł, T., Pineda-Molina, E., Ravelli, R. B., Zamborlini, A., Usami, Y., Göttlinger, H. und Weissenhorn, W.** (2006). Structural basis for budding by the ESCRT-III factor CHMP3. *Dev Cell* **10**, 821-30.
- Nakamura, A., Naito, M., Tsuruo, T. und Fujita, N.** (2008). Freud-1/Aki1, a novel PDK1-interacting protein, functions as a scaffold to activate the PDK1/Akt pathway in epidermal growth factor signaling. *Mol Cell Biol* **28**, 5996-6009.
- Nalefski, E. A. und Falke, J. J.** (1996). The C2 domain calcium-binding motif: structural and functional diversity. *Protein Sci* **5**, 2375-90.
- Nepal, B., Sepehri, A. und Lazaridis, T.** (2020). Mechanisms of negative membrane curvature sensing and generation by ESCRT III subunit Snf7. *Protein Sci* **29**, 1473-1485.

- Nichols, J. T., Miyamoto, A., Olsen, S. L., D'Souza, B., Yao, C. und Weinmaster, G.** (2007). DSL ligand endocytosis physically dissociates Notch1 heterodimers before activating proteolysis can occur. *J Cell Biol* **176**, 445-58.
- Obita, T., Saksena, S., Ghazi-Tabatabai, S., Gill, D. J., Perisic, O., Emr, S. D. und Williams, R. L.** (2007). Structural basis for selective recognition of ESCRT-III by the AAA ATPase Vps4. *Nature* **449**, 735-9.
- Odorizzi, G., Katzmann, D. J., Babst, M., Audhya, A. und Emr, S. D.** (2003). Bro1 is an endosome-associated protein that functions in the MVB pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci* **116**, 1893-903.
- Onufriev, A., Bashford, D. und Case, D. A.** (2004). Exploring protein native states and large-scale conformational changes with a modified generalized born model. *Proteins* **55**, 383-94.
- Pan, D. und Rubin, G. M.** (1997). Kuzbanian controls proteolytic processing of Notch and mediates lateral inhibition during *Drosophila* and vertebrate neurogenesis. *Cell* **90**, 271-80.
- Pannen, H., Rapp, T. und Klein, T.** (2020). The ESCRT machinery regulates retromer-dependent transcytosis of septate junction components in *Drosophila*. *Elife* **9**.
- Parks, A. L., Klueg, K. M., Stout, J. R. und Muskavitch, M. A.** (2000). Ligand endocytosis drives receptor dissociation and activation in the Notch pathway. *Development* **127**, 1373-85.
- Parks, A. L., Stout, J. R., Shepard, S. B., Klueg, K. M., Dos Santos, A. A., Parody, T. R., Vaskova, M. und Muskavitch, M. A.** (2006). Structure-function analysis of delta trafficking, receptor binding and signaling in *Drosophila*. *Genetics* **174**, 1947-61.
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Meng, E. C., Couch, G. S., Croll, T. I., Morris, J. H. und Ferrin, T. E.** (2021). UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers. *Protein Sci* **30**, 70-82.
- Pfitzner, A. K., Mercier, V., Jiang, X., Moser von Filseck, J., Baum, B., Šarić, A. und Roux, A.** (2020). An ESCRT-III Polymerization Sequence Drives Membrane Deformation and Fission. *Cell* **182**, 1140-1155.e18.
- Phelps, C. B. und Brand, A. H.** (1998). Ectopic gene expression in *Drosophila* using GAL4 system. *Methods* **14**, 367-79.
- Rebay, I., Fleming, R. J., Fehon, R. G., Cherbas, L., Cherbas, P. und Artavanis-Tsakonas, S.** (1991). Specific EGF repeats of Notch mediate interactions with Delta and Serrate: implications for Notch as a multifunctional receptor. *Cell* **67**, 687-99.
- Ren, X. und Hurley, J. H.** (2010). VHS domains of ESCRT-0 cooperate in high-avidity binding to polyubiquitinated cargo. *Embo j* **29**, 1045-54.
- Rink, J., Ghigo, E., Kalaidzidis, Y. und Zerial, M.** (2005). Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell* **122**, 735-49.
- Rodahl, L. M., Haglund, K., Sem-Jacobsen, C., Wendler, F., Vincent, J. P., Lindmo, K., Rusten, T. E. und Stenmark, H.** (2009). Disruption of Vps4 and JNK function in *Drosophila* causes tumour growth. *PLoS One* **4**, e4354.

- Roe, D. R. und Cheatham, T. E., 3rd.** (2013). PTRAJ and CPPTRAJ: Software for Processing and Analysis of Molecular Dynamics Trajectory Data. *J Chem Theory Comput* **9**, 3084-95.
- Rubino, M., Miaczynska, M., Lippé, R. und Zerial, M.** (2000). Selective membrane recruitment of EEA1 suggests a role in directional transport of clathrin-coated vesicles to early endosomes. *J Biol Chem* **275**, 3745-8.
- Ryckaert, J. P., Ciccotti, G. und Berendsen, H. J. C.** (1977). Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes. *Journal of Computational Physics* **23**, 327-341.
- Saksena, S., Sun, J., Chu, T. und Emr, S. D.** (2007). ESCRTing proteins in the endocytic pathway. *Trends Biochem Sci* **32**, 561-73.
- Salzman, N. H. und Maxfield, F. R.** (1988). Intracellular fusion of sequentially formed endocytic compartments. *J Cell Biol* **106**, 1083-91.
- Schneider, I.** (1972). Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. *J Embryol Exp Morphol* **27**, 353-65.
- Schneider, M., Troost, T., Grawe, F., Martinez-Arias, A. und Klein, T.** (2013). Activation of Notch in lgd mutant cells requires the fusion of late endosomes with the lysosome. *J Cell Sci* **126**, 645-56.
- Schnute, B., Shimizu, H., Lyga, M., Baron, M. und Klein, T.** (2022). Ubiquitylation is required for the incorporation of the Notch receptor into intraluminal vesicles to prevent prolonged and ligand-independent activation of the pathway. *BMC Biol* **20**, 65.
- Schnute, B., Troost, T. und Klein, T.** (2018). Endocytic Trafficking of the Notch Receptor. *Adv Exp Med Biol* **1066**, 99-122.
- Schöneberg, J., Lee, I. H., Iwasa, J. H. und Hurley, J. H.** (2017). Reverse-topology membrane scission by the ESCRT proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* **18**, 5-17.
- Schöneberg, J., Pavlin, M. R., Yan, S., Righini, M., Lee, I. H., Carlson, L. A., Bahrami, A. H., Goldman, D. H., Ren, X., Hummer, G., Bustamante, C. und Hurley, J. H.** (2018). ATP-dependent force generation and membrane scission by ESCRT-III and Vps4. *Science* **362**, 1423-1428.
- Schott-Verdugo, S. und Gohlke, H.** (2019). PACKMOL-Memgen: A Simple-To-Use, Generalized Workflow for Membrane-Protein-Lipid-Bilayer System Building. *J Chem Inf Model* **59**, 2522-2528.
- Schulz, K.** (2015). Dissertation: Analyse der Funktion der humanen LGDs und hLGD2<sup>MR</sup> in humanen Zellen und in *Drosophila melanogaster*: Heinrich-Heine-Universität.
- Sears, R. M., May, D. G. und Roux, K. J.** (2019). BioID as a Tool for Protein-Proximity Labeling in Living Cells. *Methods Mol Biol* **2012**, 299-313.
- Sever, R. und Brugge, J. S.** (2015). Signal transduction in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med* **5**.
- Shaner, N. C., Lambert, G. G., Chamma, A., Ni, Y., Cranfill, P. J., Baird, M. A., Sell, B. R., Allen, J. R., Day, R. N., Israelsson, M., Davidson, M. W. und Wang, J.** (2013). A bright monomeric green fluorescent protein derived from *Branchiostoma lanceolatum*. *Nat Methods* **10**, 407-9.

- Shen, Q. T., Schuh, A. L., Zheng, Y., Quinney, K., Wang, L., Hanna, M., Mitchell, J. C., Otegui, M. S., Ahlquist, P., Cui, Q. und Audhya, A.** (2014). Structural analysis and modeling reveals new mechanisms governing ESCRT-III spiral filament assembly. *J Cell Biol* **206**, 763-77.
- Shih, S. C., Katzmann, D. J., Schnell, J. D., Sutanto, M., Emr, S. D. und Hicke, L.** (2002). Epsins and Vps27p/Hrs contain ubiquitin-binding domains that function in receptor endocytosis. *Nat Cell Biol* **4**, 389-93.
- Shimizu, H., Woodcock, S. A., Wilkin, M. B., Trubenova, B., Monk, N. A. und Baron, M.** (2014). Compensatory flux changes within an endocytic trafficking network maintain thermal robustness of Notch signaling. *Cell* **157**, 1160-74.
- Slagsvold, T., Aasland, R., Hirano, S., Bache, K. G., Raiborg, C., Trambaiolo, D., Wakatsuki, S. und Stenmark, H.** (2005). Eap45 in mammalian ESCRT-II binds ubiquitin via a phosphoinositide-interacting GLUE domain. *J Biol Chem* **280**, 19600-6.
- Smits, A. H. und Vermeulen, M.** (2016). Characterizing Protein-Protein Interactions Using Mass Spectrometry: Challenges and Opportunities. *Trends Biotechnol* **34**, 825-834.
- Sorkin, A. und von Zastrow, M.** (2009). Endocytosis and signalling: intertwining molecular networks. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 609-22.
- Sotillos, S., Roch, F. und Campuzano, S.** (1997). The metalloprotease-disintegrin Kuzbanian participates in Notch activation during growth and patterning of *Drosophila* imaginal discs. *Development* **124**, 4769-79.
- Sprinzak, D., Lakhanpal, A., Lebon, L., Santat, L. A., Fontes, M. E., Anderson, G. A., Garcia-Ojalvo, J. und Elowitz, M. B.** (2010). Cis-interactions between Notch and Delta generate mutually exclusive signalling states. *Nature* **465**, 86-90.
- Struhl, G. und Adachi, A.** (1998). Nuclear access and action of notch in vivo. *Cell* **93**, 649-60.
- Struhl, G. und Basler, K.** (1993). Organizing activity of wingless protein in *Drosophila*. *Cell* **72**, 527-40.
- Struhl, G. und Greenwald, I.** (1999). Presenilin is required for activity and nuclear access of Notch in *Drosophila*. *Nature* **398**, 522-5.
- Sweeney, N. T., Brenman, J. E., Jan, Y. N. und Gao, F. B.** (2006). The coiled-coil protein shrub controls neuronal morphogenesis in *Drosophila*. *Curr Biol* **16**, 1006-11.
- Tanaka, T. und Nakamura, A.** (2008). The endocytic pathway acts downstream of Oskar in *Drosophila* germ plasm assembly. *Development* **135**, 1107-17.
- Tang, S., Buchkovich, N. J., Henne, W. M., Banjade, S., Kim, Y. J. und Emr, S. D.** (2016). ESCRT-III activation by parallel action of ESCRT-I/II and ESCRT-0/Bro1 during MVB biogenesis. *Elife* **5**.
- Tang, S., Henne, W. M., Borbat, P. P., Buchkovich, N. J., Freed, J. H., Mao, Y., Fromme, J. C. und Emr, S. D.** (2015). Structural basis for activation, assembly and membrane binding of ESCRT-III Snf7 filaments. *Elife* **4**.
- Tanimoto, H., Itoh, S., ten Dijke, P. und Tabata, T.** (2000). Hedgehog creates a gradient of DPP activity in *Drosophila* wing imaginal discs. *Mol Cell* **5**, 59-71.

- Teis, D., Saksena, S. und Emr, S. D.** (2008). Ordered assembly of the ESCRT-III complex on endosomes is required to sequester cargo during MVB formation. *Dev Cell* **15**, 578-89.
- Teis, D., Saksena, S., Judson, B. L. und Emr, S. D.** (2010). ESCRT-II coordinates the assembly of ESCRT-III filaments for cargo sorting and multivesicular body vesicle formation. *Embo j* **29**, 871-83.
- Teo, H., Perisic, O., González, B. und Williams, R. L.** (2004). ESCRT-II, an endosome-associated complex required for protein sorting: crystal structure and interactions with ESCRT-III and membranes. *Dev Cell* **7**, 559-69.
- Thompson, B. J., Mathieu, J., Sung, H. H., Loeser, E., Rørth, P. und Cohen, S. M.** (2005). Tumor suppressor properties of the ESCRT-II complex component Vps25 in *Drosophila*. *Dev Cell* **9**, 711-20.
- Tibbe, C.** (2019). Dissertation: Struktur- und Funktionsanalyse der Lgd DM14 Domänen und der Interaktion dieser mit der ESCRT-III Untereinheit Shrub in *Drosophila melanogaster*: Heinrich-Heine-Universität.
- Troost, T., Jaeckel, S., Ohlenhard, N. und Klein, T.** (2012). The tumour suppressor Lethal (2) giant discs is required for the function of the ESCRT-III component Shrub/CHMP4. *J Cell Sci* **125**, 763-76.
- Troost, T., Schneider, M. und Klein, T.** (2015). A re-examination of the selection of the sensory organ precursor of the bristle sensilla of *Drosophila melanogaster*. *PLoS Genet* **11**, e1004911.
- Tsang, H. T., Connell, J. W., Brown, S. E., Thompson, A., Reid, E. und Sanderson, C. M.** (2006). A systematic analysis of human CHMP protein interactions: additional MIT domain-containing proteins bind to multiple components of the human ESCRT III complex. *Genomics* **88**, 333-46.
- Ullrich, O., Reinsch, S., Urbe, S., Zerial, M. und Parton, R. G.** (1996). Rab11 regulates recycling through the pericentriolar recycling endosome. *J Cell Biol* **135**, 913-24.
- Usami, Y., Popov, S., Weiss, E. R., Vriesema-Magnuson, C., Calistri, A. und Göttlinger, H. G.** (2012). Regulation of CHMP4/ESCRT-III function in human immunodeficiency virus type 1 budding by CC2D1A. *J Virol* **86**, 3746-56.
- Vaccari, T. und Bilder, D.** (2005). The *Drosophila* tumor suppressor vps25 prevents nonautonomous overproliferation by regulating notch trafficking. *Dev Cell* **9**, 687-98.
- Vaccari, T. und Bilder, D.** (2009). At the crossroads of polarity, proliferation and apoptosis: the use of *Drosophila* to unravel the multifaceted role of endocytosis in tumor suppression. *Mol Oncol* **3**, 354-65.
- Vaccari, T., Lu, H., Kanwar, R., Fortini, M. E. und Bilder, D.** (2008). Endosomal entry regulates Notch receptor activation in *Drosophila melanogaster*. *J Cell Biol* **180**, 755-62.
- Vaccari, T., Rusten, T. E., Menut, L., Nezis, I. P., Brech, A., Stenmark, H. und Bilder, D.** (2009). Comparative analysis of ESCRT-I, ESCRT-II and ESCRT-III function in *Drosophila* by efficient isolation of ESCRT mutants. *J Cell Sci* **122**, 2413-23.
- van der Sluijs, P., Hull, M., Webster, P., Male, P., Goud, B. und Mellman, I.** (1992). The small GTP-binding protein rab4 controls an early sorting event on the endocytic pathway. *Cell* **70**, 729-40.

- Vanlandingham, P. A. und Ceresa, B. P.** (2009). Rab7 regulates late endocytic trafficking downstream of multivesicular body biogenesis and cargo sequestration. *J Biol Chem* **284**, 12110-24.
- Venken, K. J., Carlson, J. W., Schulze, K. L., Pan, H., He, Y., Spokony, R., Wan, K. H., Koriabine, M., de Jong, P. J., White, K. P., Bellen, H. J. und Hoskins, R. A.** (2009). Versatile P[acman] BAC libraries for transgenesis studies in *Drosophila melanogaster*. *Nat Methods* **6**, 431-4.
- Ventimiglia, L. N., Cuesta-Geijo, M. A., Martinelli, N., Caballe, A., Macheboeuf, P., Miguet, N., Parnham, I. M., Olmos, Y., Carlton, J. G., Weissenhorn, W. und Martin-Serrano, J.** (2018). CC2D1B Coordinates ESCRT-III Activity during the Mitotic Reformation of the Nuclear Envelope. *Dev Cell* **47**, 547-563.e6.
- Wang, W. und Struhl, G.** (2005). Distinct roles for Mind bomb, Neuralized and Epsin in mediating DSL endocytosis and signaling in *Drosophila*. *Development* **132**, 2883-94.
- Ward, D. M., Vaughn, M. B., Shiflett, S. L., White, P. L., Pollock, A. L., Hill, J., Schnegelberger, R., Sundquist, W. I. und Kaplan, J.** (2005). The role of LIP5 and CHMP5 in multivesicular body formation and HIV-1 budding in mammalian cells. *J Biol Chem* **280**, 10548-55.
- Wenzel, E. M., Schultz, S. W., Schink, K. O., Pedersen, N. M., Nähse, V., Carlson, A., Brech, A., Stenmark, H. und Raiborg, C.** (2018). Concerted ESCRT and clathrin recruitment waves define the timing and morphology of intraluminal vesicle formation. *Nat Commun* **9**, 2932.
- Wollert, T. und Hurley, J. H.** (2010). Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes. *Nature* **464**, 864-9.
- Xu, T. und Rubin, G. M.** (1993). Analysis of genetic mosaics in developing and adult *Drosophila* tissues. *Development* **117**, 1223-37.
- Yamashiro, D. J., Fluss, S. R. und Maxfield, F. R.** (1983). Acidification of endocytic vesicles by an ATP-dependent proton pump. *J Cell Biol* **97**, 929-34.
- Yang, B., Stjepanovic, G., Shen, Q., Martin, A. und Hurley, J. H.** (2015a). Vps4 disassembles an ESCRT-III filament by global unfolding and processive translocation. *Nat Struct Mol Biol* **22**, 492-8.
- Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J. und Zhang, Y.** (2015b). The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nat Methods* **12**, 7-8.
- Ye, Y., Lukinova, N. und Fortini, M. E.** (1999). Neurogenic phenotypes and altered Notch processing in *Drosophila* Presenilin mutants. *Nature* **398**, 525-9.
- Yorikawa, C., Shibata, H., Waguri, S., Hatta, K., Horii, M., Katoh, K., Kobayashi, T., Uchiyama, Y. und Maki, M.** (2005). Human CHMP6, a myristoylated ESCRT-III protein, interacts directly with an ESCRT-II component EAP20 and regulates endosomal cargo sorting. *Biochem J* **387**, 17-26.
- Yu, H., Chen, J. K., Feng, S., Dalgarno, D. C., Brauer, A. W. und Schreiber, S. L.** (1994). Structural basis for the binding of proline-rich peptides to SH3 domains. *Cell* **76**, 933-45.

- Zamborlini, A., Usami, Y., Radoshitzky, S. R., Popova, E., Palu, G. und Gottlinger, H.** (2006). Release of autoinhibition converts ESCRT-III components into potent inhibitors of HIV-1 budding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 19140-5.
- Zhao, M., Li, X. D. und Chen, Z.** (2010). CC2D1A, a DM14 and C2 domain protein, activates NF-kappaB through the canonical pathway. *J Biol Chem* **285**, 24372-80.

## 8. Anhang

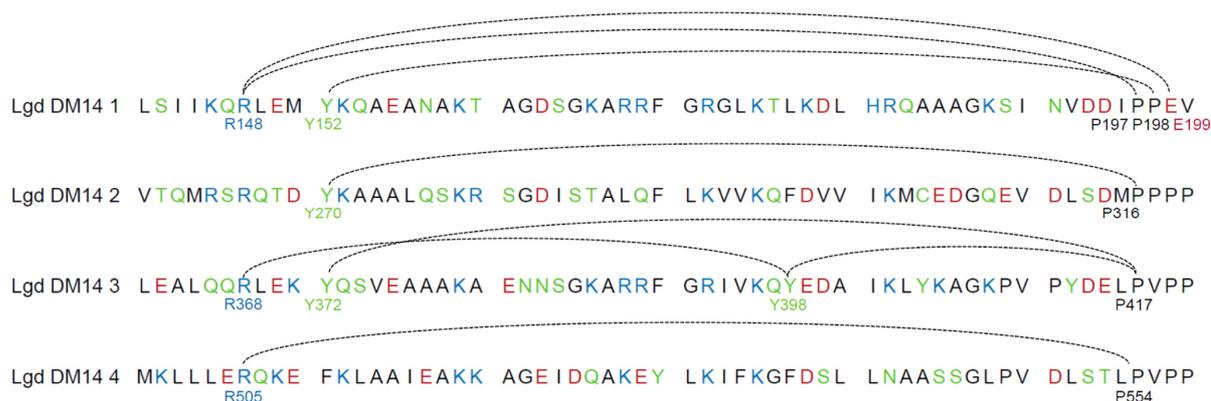


Abbildung 8.1: Interaktionen innerhalb der vier DM14-Domänen von Lgd, die anhand der durch Alphafold2 simulierte Struktur von vollständigem Lgd ermittelt werden konnten. Die gestrichelten Linien verbinden die interagierenden Aminosäuren in den Aminosäuresequenzen miteinander. In der ersten DM14-Domäne interagieren Tyrosin152 und Arginin148 mit Prolin197, Prolin198 und Glutamin199. In der zweiten DM14-Domäne interagiert Tyrosin270 mit Prolin316. In der dritten DM14-Domäne interagieren Tyrosin372 und Tyrosin398 mit Prolin417. Hierbei bindet Tyrosin398 zusätzlich Arginin368. In der vierten DM14-Domäne interagiert Arginin505 mit Prolin554. Die Aminosäuren sind anhand ihrer chemischen Eigenschaften farbig markiert. Unpolare/hydrophobe Aminosäuren sind schwarz dargestellt, basische Aminosäuren sind in Blau markiert, saure Aminosäuren sind rot markiert und polare/neutrale Aminosäuren sind in Grün dargestellt.



CHMP6, *D.rerio* CHMP6, *S.pombe* und *S.cerevisiae* verglichen. Das N-terminale Glycin, was für die Myristoylierung benötigt wird, ist mit einem orangen Kästchen markiert. Basische Aminosäuren, welche die Bindung von Shrub an Vps20 über elektrostatische Wechselwirkungen in Orientierung eins vermitteln, sind mit blauen Kästchen markiert. Aminosäuren, an die Vps25 bindet sind mit gelben Kästchen markiert. Saure Aminosäuren, welche die Bindung von Shrub an Vps20 über elektrostatische Wechselwirkungen in Orientierung zwei vermitteln, sind mit roten Kästchen markiert. Aminosäuren, welche die Bindung von Shrub an Vps20 über hydrophobe Wechselwirkungen vermitteln sind mit pinken Kästchen markiert. Die Aminosäuren sind anhand ihrer chemischen Eigenschaften farbig markiert. Unpolare/hydrophobe Aminosäuren sind schwarz dargestellt, basische Aminosäuren sind in Blau markiert, saure Aminosäuren sind rot markiert und polare/neutrale Aminosäuren sind in Grün dargestellt. Unterhalb der Sequenzvergleiche ist die Höhe der Konservierung in Prozent dargestellt.

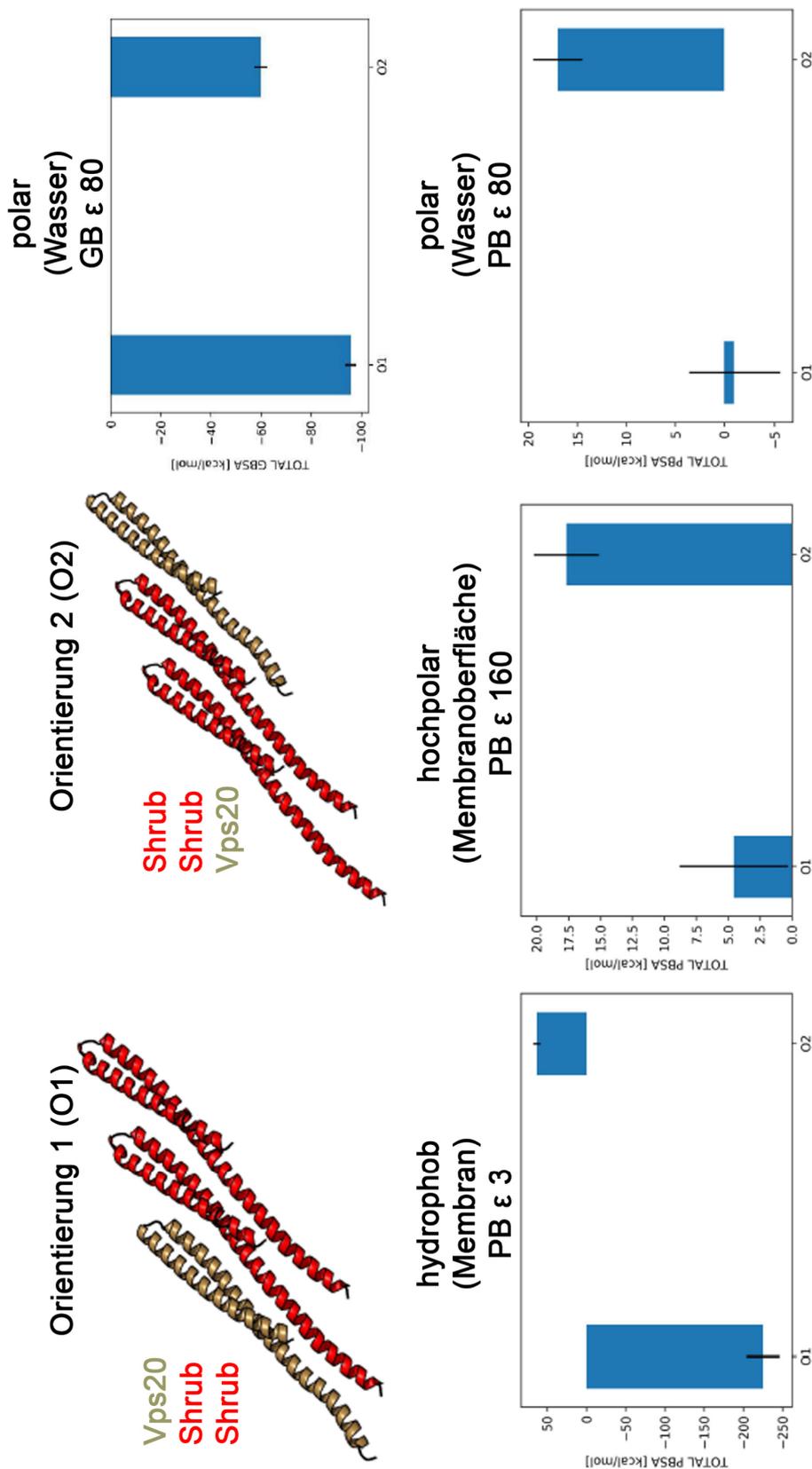


Abbildung 8.3: Molekulardynamik-Simulation der Bindung von Shrub an Vps20 in zwei Orientierungen. Für die Simulationen wurden die zentrale helikale Haarnadel von Vps20 (AS 20-143) und von zwei Shrub-Molekülen (AS 18-129) verwendet. Die Verwendung von zwei Shrub-Molekülen soll das formende Polymer

darstellen und die Bindung an Vps20 auf die Bereiche im Molekül beschränken, die während der Polymerisation zugänglich sind. Vps20 wurde neben dem Shrub-Dimer in zwei Orientierungen platziert um die Interaktionen zwischen Vps20 und Shrub zu beobachten (O1, O2). MM-PBSA.py wurde verwendet um die freie Energie der Bindung der Komplexe in beiden Orientierungen in unterschiedlichen Umgebungen zu berechnen (Miller et al., 2012). Die Komplexe wurden mit Hilfe des GB<sup>OBC II</sup>-Modells (Onufriev et al., 2004) oder mit kanonischem PBSA mit 0,15M Ionenstärke berechnet. Die Berechnung dieser freien Energie weist auf eine wahrscheinlichere Bindung von Vps20 an Shrub in Orientierung eins hin. Es wurden fünf unabhängige Molekulardynamik-Simulationen durchgeführt (n=5).





von MM-PBSA.py prozessiert und mit Hilfe des GB<sup>OB</sup>II-Modells analysiert (Onufriev et al., 2004). Die berechneten Interaktionsenergien, weisen auf die Beteiligung von vier basischen Aminosäuren in Vps20 bei der Bindung von Vps20 und Shrub in Orientierung 1 hin (R40, R60, R63 und K70). Für Orientierung 2 zeigen die berechneten Interaktionsenergien eine Beteiligung von F97, V100 und V104 in Vps20 an der Bindung von Shrub. Zusätzlich zeigt die Berechnung der Interaktionsenergien in Orientierung 2 eine mögliche Beteiligung der Aminosäuren E42, E75, D82, E86 und E89. Es wurden fünf unabhängige Molekulardynamik-Simulationen durchgeführt (n=5).

---

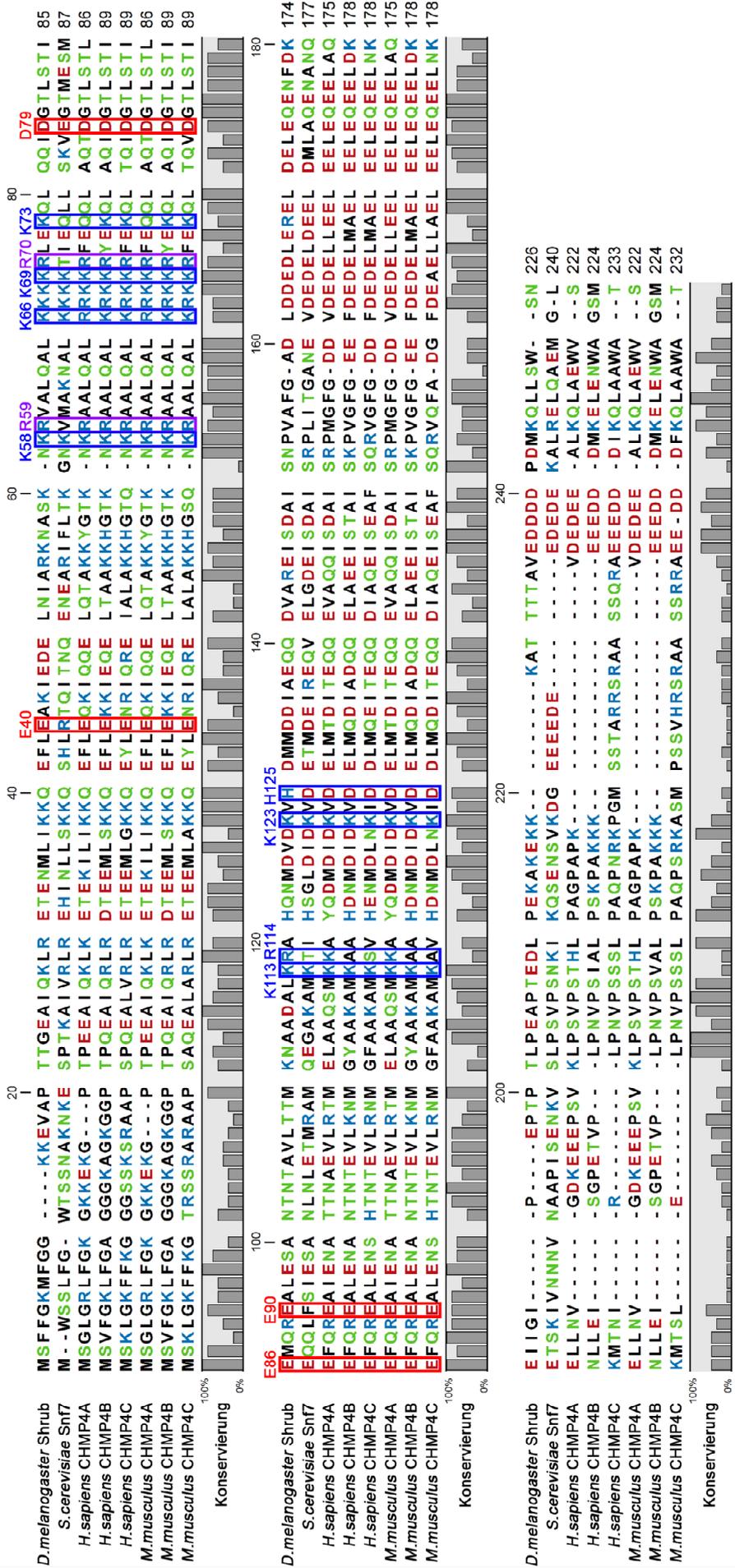


Abb.-Legende auf S.176

Abbildung 8.6: Aminosäuresequenz-Alignment von Shrub und Orthologen aus anderen Spezies. Es wurden die Sequenzen von *D.melanogaster* Shrub, *S.cerevisiae* Snf7, *H.sapiens* CHMP4A, CHMP4B, CHMP4C und *M.musculus* CHMP4A, CHMP4B und CHMP4C miteinander verglichen. Die Nummer der hervorgehobenen Aminosäuren entspricht der Position in Shrub. Mit blauen Kästen sind die identifizierten Membranbindenden Aminosäuren in Shrub hervorgehoben. Mit roten Kästen sind die für die Polymerisation von Shrub benötigten sauren Aminosäuren hervorgehoben. Mit violetten Kästen sind die basischen Aminosäuren hervorgehoben, die für die Polymerisation von Shrub benötigt werden. (für die Polymerisation identifizierte Aminosäuren aus McMillan et al. (2016)) Unterhalb der Sequenzvergleiche ist die Höhe der Konservierung in Prozent dargestellt. Die Aminosäuren sind anhand ihrer chemischen Eigenschaften farbig markiert. Unpolare/hydrophobe Aminosäuren sind schwarz dargestellt, basische Aminosäuren sind in Blau markiert, saure Aminosäuren sind rot markiert und polare/neutrale Aminosäuren sind in Grün dargestellt.

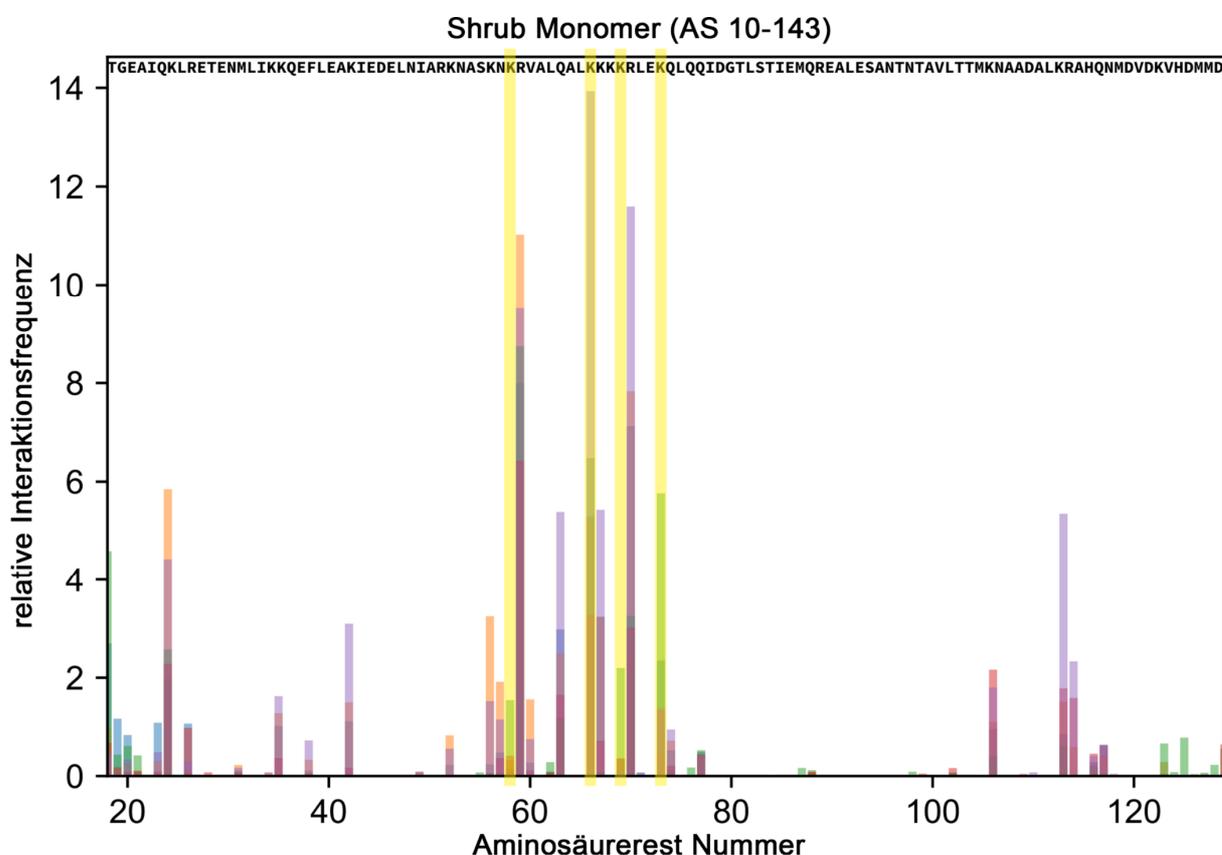


Abbildung 8.7: Relative Interaktionsfrequenz zwischen Aminosäureresten eines Shrub-Monomers und den Phospholipiden der Membran. Die zentrale helikale Haarnadel eines Shrub-Monomers (AS 18-129) wurde in einer Simulation in einem simulierten Membransystem (Schott-Verdugo und Gohlke, 2019) platziert. Anschließend wurde die Position des Moleküls um 25Å über die Membran verschoben. Das Membransystem besaß eine Lipidkomposition von DOPC:DOPE:DOPS von 100:25:10. Wenn Aminosäurereste von Shrub einen Abstand von 4,5Å zu den Phospholipiden der Membran unterschreiten, wurde das als Kontakt gezählt. Die Simulation identifiziert vier Lysine auf der Membranbindenden Oberfläche von Shrub, die eine hohe relative Interaktionsfrequenz aufweisen (K58, K66, K69 und K73, gelber Markierungen). Die Bindung dieser Aminosäurereste an die Membran wurde im Anschluss mit Hilfe der CPPTRAJ nativecontacts routine evaluiert (Roe und Cheatham, 2013). Die Simulation wurde in fünf unabhängigen Wiederholungen durchgeführt (n=5).

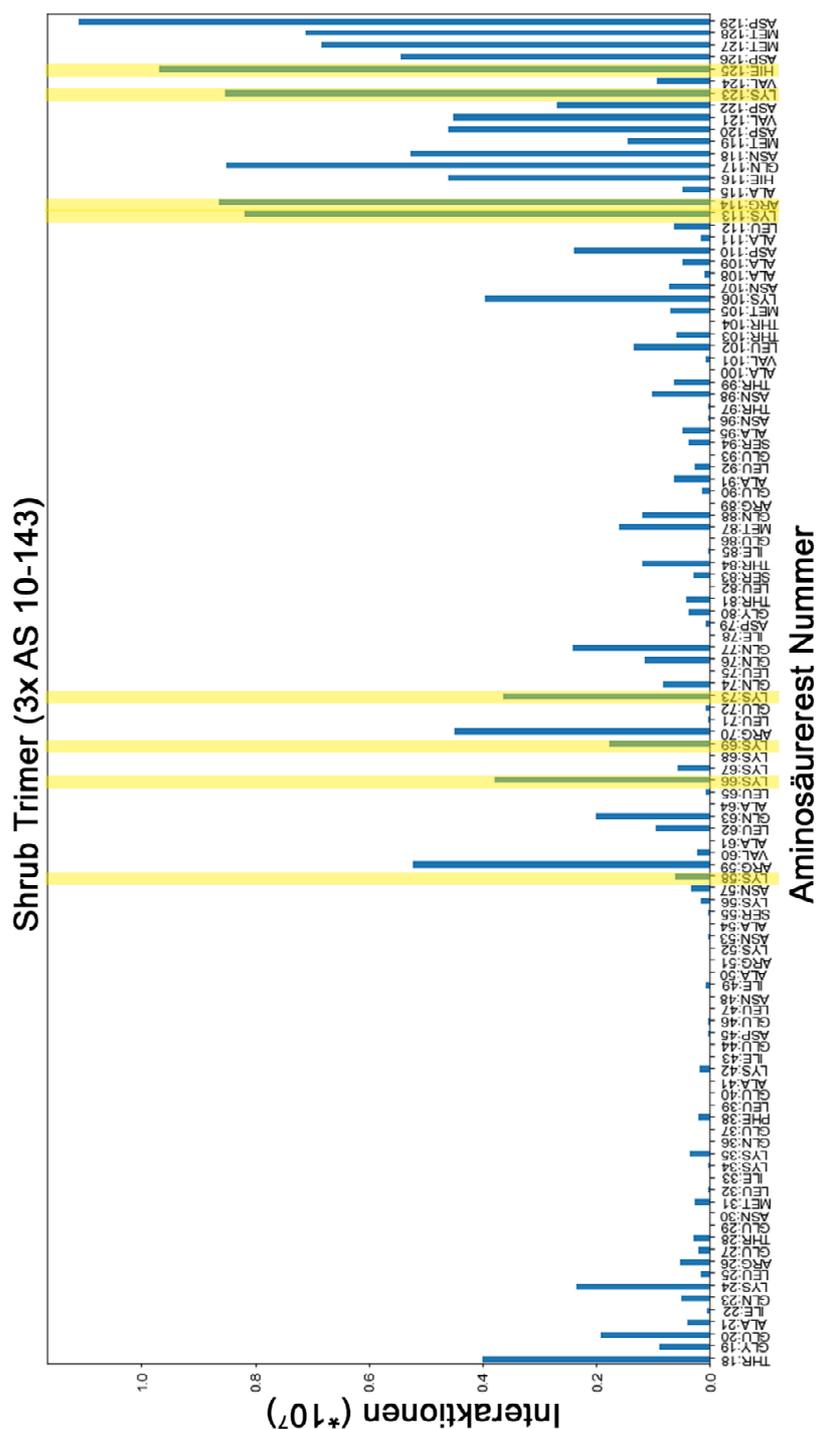


Abbildung 8.8: Interaktionen zwischen den Aminosäureresten eines Shrub-Trimers und den Phospholipiden der Membran. Ein Shrub-Trimer, welches aus drei zentralen helikalen Haarnadeln von Shrub (3x AS 18-129) besteht, wurde in einer Simulation in einem simulierten Membransystem (Schott-Verdugo und Gohlke, 2019) platziert. Anschließend wurde die Position des Trimers um 25Å über die Membran verschoben. Das Membransystem besaß eine Lipidkomposition von DOPC:DOPE:DOPS von 100:25:10. Wenn Aminosäurereste des Shrub-Trimers einen Abstand von 4,5Å zu den Phospholipiden der Membran unterschreiten, wurde das als Kontakt gezählt. Zusätzlich zu den vier Lysinen (K58, K66, K69, K73), die in der Shrub-Monomer-Simulation identifiziert wurden, konnte in der Trimer-Simulation die Beteiligung von K113, R114, K123 und H125 gezeigt werden (gelbe Markierungen). Die Bindung dieser Aminosäurereste an die Membran wurde im Anschluss mit Hilfe der CPPTRAJ nativecontacts routine

evaluiert (Roe und Cheatham, 2013). Die Simulation wurde in fünf unabhängigen Wiederholungen durchgeführt (n=5).

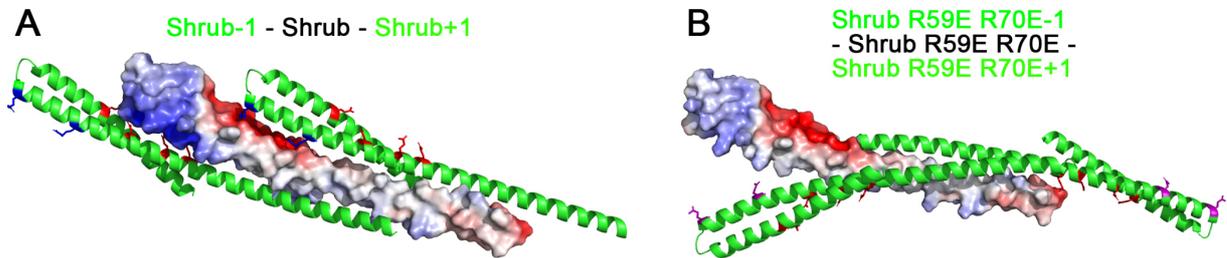


Abbildung 8.9: Alphafold2-Multimer Simulation für Shrub-Trimere. Mit Hilfe von Alphafold2-Multimer wurde die Polymerisation von jeweils drei Shrub-Molekülen simuliert. Hierfür wurde die zentrale helikale Haarnadel (AS 10-143) verwendet. A: Für die drei wildtypischen Shrub-Fragmente konnte eine Trimer simuliert werden, in dem die bereits veröffentlichten Aminosäuren elektrostatische Wechselwirkungen ausbilden (McMillan et al., 2016). E40, D79, E86 und E90 (rot markierte Aminosäuren in grünen Shrub-Molekülen) interagieren mit R59 und R70 (blau markierte Aminosäuren in grünen Shrub-Molekülen). B: Durch die Ladungsumkehr der basischen Aminosäuren R59E und R70E (pink markierte Aminosäuren in grünen Shrub-Molekülen) ist die Trimerbildung so nicht mehr möglich. Das basische Oberflächenpotential an der Spitze der helikalen Haarnadel von Shrub ist stark reduziert. Das Oberflächenpotential, welches mit ABPS-electrostatics berechnet wurde ist jeweils für das mittlere Shrub-Molekül des Trimers gezeigt (Jurrus et al., 2018). Rot repräsentiert hierbei saures und Blau basisches Oberflächenpotential.

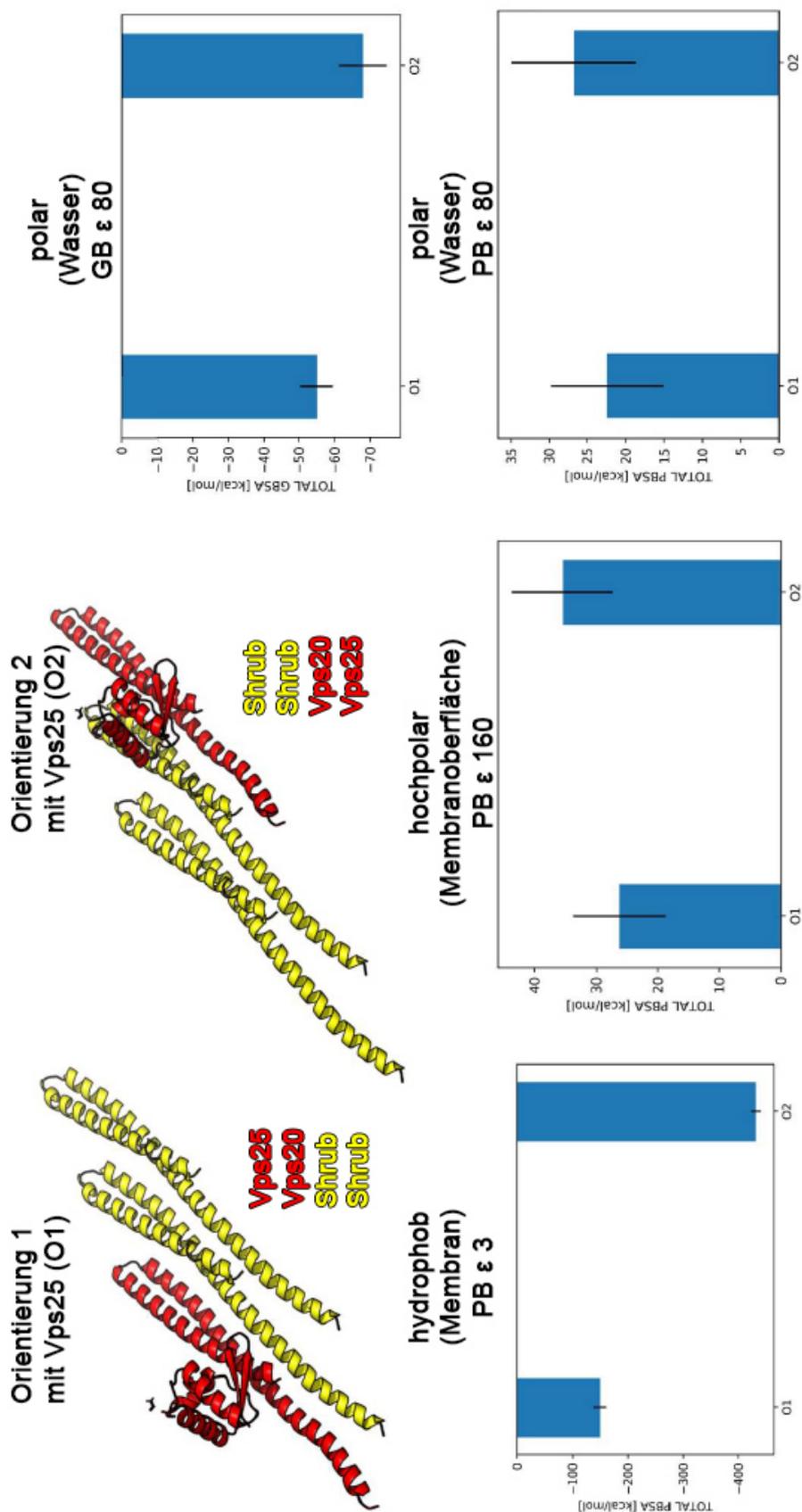


Abbildung 8.10: Molekulardynamik-Simulation der Bindung von Shrub an Vps20 in zwei Orientierungen mit Einbeziehung von Vps25. Für die Simulationen wurden die zentrale helikale Haarnadel von Vps20 (AS

20-143) und von zwei Shrub-Molekülen (AS 18-129) verwendet. Von Vps25 wurde das Vps20-bindende Fragment verwendet (AS 99-174). Die Verwendung von zwei Shrub-Molekülen soll das formende Polymer darstellen und die Bindung an Vps20 auf die Bereiche im Molekül beschränken, die während der Polymerisation zugänglich sind. Vps20, an das Vps25 wie für die Human-Orthologe gezeigt gebunden ist (Im et al., 2009), wurde neben dem Shrub-Dimer in zwei Orientierungen platziert um die Interaktionen zwischen Vps20 und Shrub zu beobachten (O1, O2). MM-PBSA.py wurde verwendet um die freie Energie der Bindung der Komplexe in beiden Orientierungen in unterschiedlichen Umgebungen zu berechnen (Miller et al., 2012). Die Komplexe wurden mit Hilfe des GB<sup>OC II</sup>-Modells (Onufriev et al., 2004) oder mit kanonischem PBSA mit 0,15M Ionenstärke berechnet. Die Berechnung dieser freien Energie weist auf eine wahrscheinlichere Bindung von Vps20 an Shrub in Orientierung zwei hin, wenn Vps25 in die Simulation einbezogen ist. Es wurden fünf unabhängige Molekulardynamik-Simulationen durchgeführt (n=5).

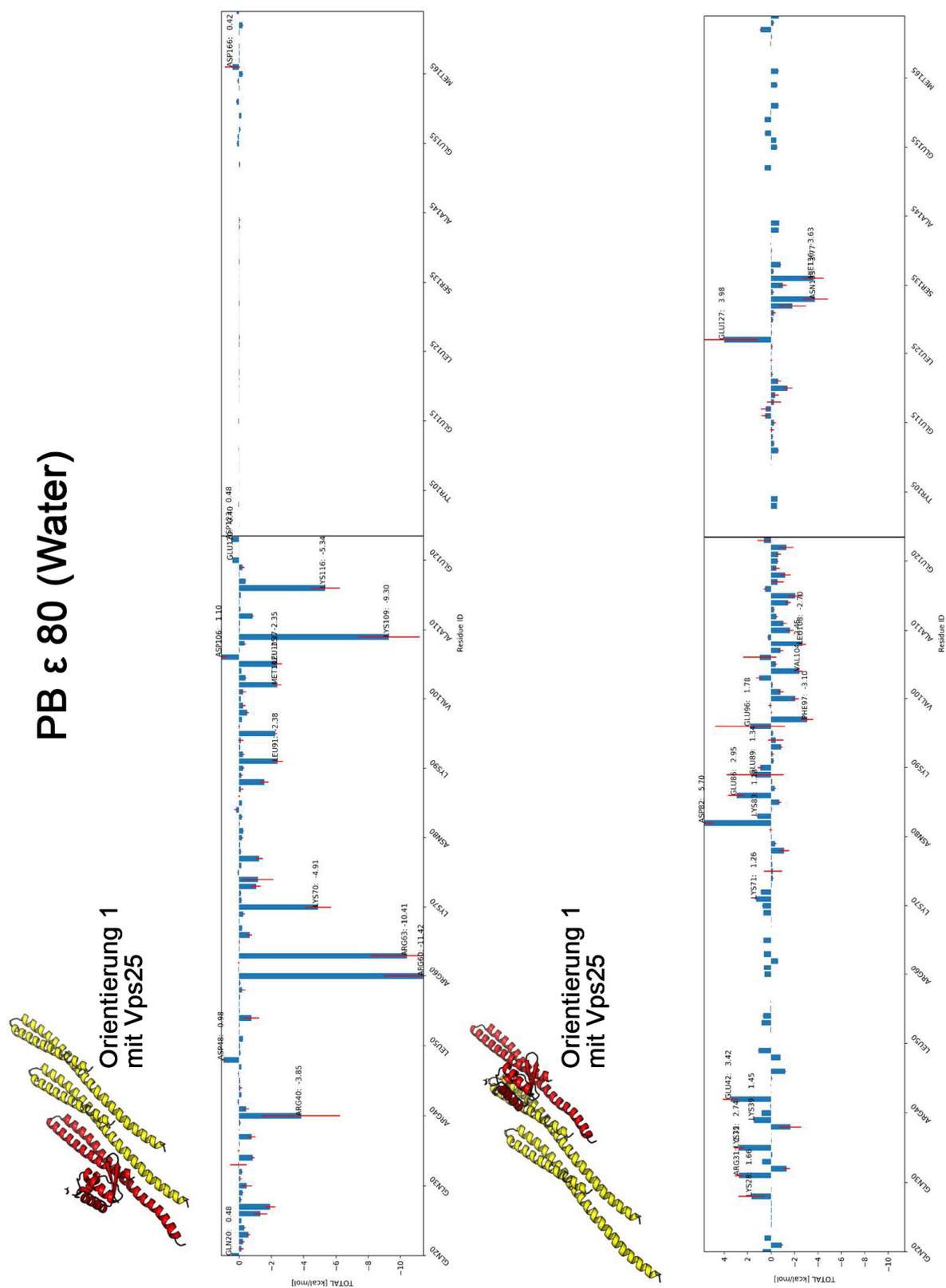
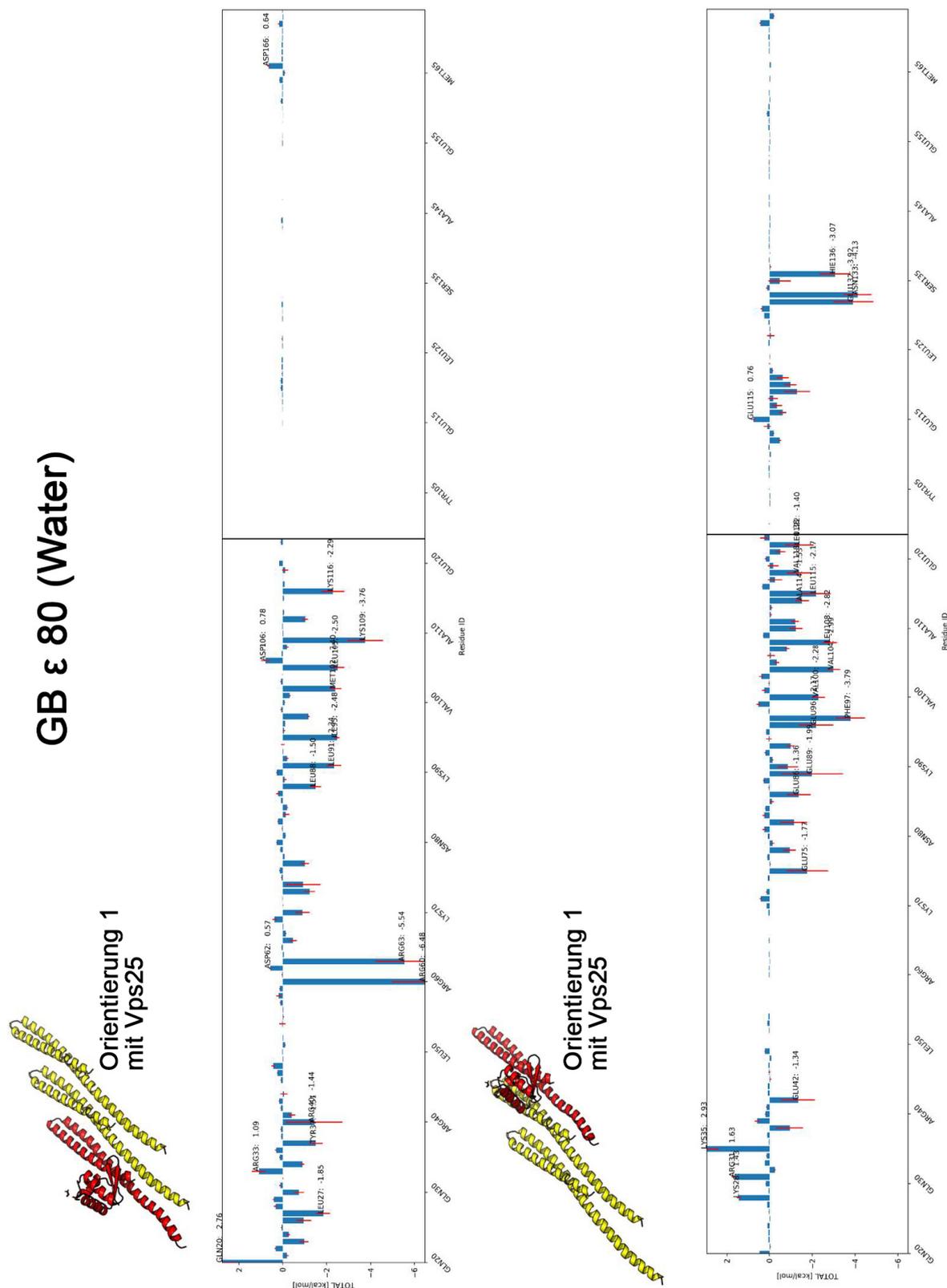


Abbildung 8.11: Interaktionsenergien der einzelnen Aminosäurereste bei der Interaktion zwischen Vps20, Vps25 und Shrub in zwei Orientierungen. Die Ergebnisse der Molekulardynamik-Simulationen wurden mit Hilfe von MM-PBSA.py prozessiert und mit kanonischem PBSA mit 0,15M Ionenstärke und ansonsten Standardeinstellungen analysiert (Miller et al., 2012). Die berechneten Interaktionsenergien, weisen auf die Beteiligung von vier basischen Aminosäuren in Vps20 bei der Bindung von Vps20 und Shrub in Orientierung 1 hin (R40, R60, R63 und K70). Für Orientierung 2 zeigen die berechneten

Interaktionsenergien eine Beteiligung von F97, V100 und V104 in Vps20 an der Bindung von Shrub. In Orientierung 2 kann zusätzlich eine Interaktion von Vps25 mit Shrub über die Aminosäuren E132, N133 und H136 in Vps25 gezeigt werden. Es wurden fünf unabhängige Molekulardynamik-Simulationen durchgeführt (n=5).



von Shrub. Zusätzlich zeigt die Berechnung der Interaktionsenergien in Orientierung 2 eine mögliche Beteiligung der Aminosäuren E42, E75, D82, E86 und E89. In Orientierung 2 kann zusätzlich eine Interaktion von Vps25 mit Shrub über die Aminosäuren E132, N133 und H136 in Vps25 gezeigt werden. Es wurden fünf unabhängige Molekuldynamik-Simulationen durchgeführt (n=5).

## 9. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
A	Alanin
Abb.	Abbildung
ADAM10	A Disintegrin And Metalloproteinase Domain containing Protein 10
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C2	Protein kinase C conserved region 2
CHMP	Charged Multivesicular Body Protein
<i>ci</i>	<i>cubitus interruptus</i>
CSL	Vertebraten: CBF1/RBP-JK, <i>D.melanogaster</i> : Su(H), <i>C.elegans</i> : Lag1
C-terminal	am Carboxy-Terminus befindlich
CyO	Curly of Oster – Balancerchromosom für das zweite Chromosom
D	Asparaginsäure
D/V	dorso-ventral
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DI	Delta
DM14	<i>Drosophila melanogaster</i> 14
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DSL	Delta und Serrate in <i>D.melanogaster</i> , Lag-2 in <i>C.elegans</i>
E	Glutaminsäure
<i>en</i>	<i>engrailed</i>
ESCRT	Endosomal sorting complex required for transport
Flp	Flippase
FRT	Flippase recombination target
G	Guanin
Gbe	Grainyhead binding element
Grh	Grainyhead

GTP	Guanosintriphosphat
H	Histidin
HF	high fidelity
<i>hh</i>	<i>hedgehog</i>
HIV	humaner Immundefizienz Virus
Hrs	hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate
<i>hs</i>	<i>heatshock</i>
I	Isoleucin
If	irregular facettes – Marker für das zweite Chromosom
ILV	intraluminale Vesikel
K	Lysin
Kuz	Kuzbanian
L	Leucin
LAP	Localization and Affinity Purification tag
LB	Lysogeny Broth
Lgd	Lethal (2) giant discs
Mam	Mastermind
Mib	Mindbomb
MIM	MIT-interacting Motifs
Min	Minute
MIT	Microtubule Interaction and Transport
MKRS	Marker für das dritte Chromosom
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MVB	multi vesicular body
Mvb12	Multivesicular body sorting factor 12
Myr	Myristoylierung
N	Asparagin
Neur	Neuralized
Nextra	Notch – extrazelluläre Domäne
NGS	normal goat serum
Nintra	Notch – intrazelluläre Domäne
NRR	Notch regulatory region
N-terminal	am Amino-Terminus befindlich

P	Prolin
P	Promotor
PBS	phosphate buffered saline
PBT	PBS mit Triton-X-100
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PI(3)P	Phosphatidylinositol-(3)-Phosphat
<i>ptc</i>	<i>patched</i>
Q	Glutamin
R	Arginin
RNAse	Ribonuklease
rpm	revolutions per minute – Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
Ser	Serrate
Stam	Signal transducing adaptor molecule
Su(H)	Suppressor of Hairless
Tab.	Tabelle
TM6B	Balancerchromosom für das dritte Chromosom
Tsg101	Tumor susceptibility gene 101
UAS	upstream activating sequence
Ubx	Ultrabithorax
V	Valin
vgl.	vergleiche
Vps	Vacuolar protein sorting
w	<i>white</i>
wg, Wg	<i>wingless</i> , Wingless
WT	Wildtyp
x	-fach
Y	Tyrosin
β-Gal	β-Galaktosidase
Δ	Delta – als Zeichen für Deletion

## **10. Danksagung**

Zuerst möchte ich mich bei Prof. Dr. Thomas Klein bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat im Rahmen vieler interessanter Projekte meine Doktorarbeit in seinem Institut anfertigen zu können. Vielen Dank für die vielen anregenden Diskussionen und die gute Betreuung.

Als nächstes danke ich Jun.-Prof. Dr. Mathias Beller für die Übernahme des Koreferats dieser Arbeit und die Diskussionen im Rahmen des Notch-Clubs.

Weiter möchte ich allen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern des Instituts für Genetik danken, die die Jahre zu einer unvergesslichen Zeit mit jeder Menge Spaß gemacht haben. Vielen Dank für die „wichtigen Telefonkonferenzen“, Filmabende und immer ausreichende Versorgung mit Kuchen.

Ich danke meinen Studenten Frank, Julian, Marie, Denise und Ertaib für die Unterstützung.

Sylvia und Stefan danke ich für die zahlreichen Injektionen.

Danke an Stephan für die Durchführung der MD-Sims und die vielen Erklärungen und Diskussionen.

Des Weiteren bedanke ich mich bei den Herren des Tea-Clubs. Vielen Dank für eure Hilfe und die Momente mit feinstem Bergamotten-Aroma und atmosphärisch knisterndem Kandis im Raum.

Ein besonderer Dank geht an Christine! Danke für Alles!

Vielen Dank an Basti, der mir immer zur Seite gestanden hat.

Bei meiner Familie möchte ich mich fürs immer für mich da sein bedanken!

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Frau Christina bedanken. Ohne deine Liebe und Unterstützung wäre das nicht möglich gewesen!

## **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, Juni 2022

---

Thomas Breuer