

# **Die Rolle von $\gamma$ 2-Adaptin im endo-lysosomalen Proteintransport von Säuger-Zellen**

## **Dissertation**

Zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

Am Fachbereich Biologie

Der Johannes Gutenberg-Universität

Katherina Kirsten Gotthardt

geboren am 13.03.1985 in Wiesbaden

Mainz, Juni 2013

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung:

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>7</b>
1.1	Das $\gamma$ 2-Adaptin-Protein	7
1.1.1	Adapter-Protein Komplexe	9
1.2	Das endo-lysosomale Transportsystem	10
1.2.1	Die Bildung multivesikulärer Endosomen	12
1.3	Rab-Proteine	15
1.3.1	Rab-Proteine im endo-lysosomalen System	17
1.3.2	Rab7	18
1.4	Autophagie	19
1.4.1	Selektive Autophagie	23
1.5	Zielsetzung der Arbeit	25
<b>2</b>	<b>Material</b>	<b>27</b>
2.1	Chemikalien	27
2.2	Puffer und Lösungen	27
2.3	Reagenzien und Kits	27
2.4	Enzyme	28
2.5	Organismen	28
2.5.1	Prokaryotische Zellen	28
2.5.2	Eukaryotische Zellen	28
2.6	Medien und Medienzusätze	28
2.6.1	Bakterienkultur	28
2.6.2	Zellkultur	29
2.7	Oligonukleotide und siRNAs	29
2.7.1	Sequenzierungsprimer	29
2.7.2	Mutageneseprimer	30

2.7.3	siRNAs .....	31
2.8	Vektoren .....	32
2.9	Antikörper .....	35
2.9.1	primäre Antikörper .....	35
2.9.2	sekundäre Antikörper .....	35
2.10	DNA-Längen- / Protein-Molekulargewichts-Standard.....	36
2.11	Software.....	36
<b>3</b>	<b>Methode.....</b>	<b>37</b>
3.1	Molekularbiologische Methoden.....	37
3.1.1	Erzeugung von großen Deletionsmutanten mittels modifizierter PCR-Primer .....	38
3.1.2	DNA-Sequenzierung.....	38
3.2	Zellbiologische Methoden .....	39
3.2.1	Kultivierung und Lagerung von HuH-7 Zellen .....	39
3.2.2	Transfektion von DNA .....	39
3.2.3	Transfektion von siRNA .....	40
3.3	Proteinbiochemische Methoden .....	41
3.3.1	Herstellung von Zelllysaten .....	41
3.3.2	Aufarbeitung von Zellkulturüberständen.....	41
3.3.3	Ko-Immunpräzipitation.....	42
3.3.4	Fraktionierung von Zellextrakten.....	44
3.3.5	Hemmung des lysosomalen Abbaus.....	46
3.3.6	EGF-Assay.....	47
3.3.7	LC3-Western Blot.....	47
3.3.8	Induktion und Inhibition von Autophagie .....	47
3.3.9	LDH-Assay .....	48
3.3.10	Immunfluoreszenzfärbung .....	48

<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>49</b>
4.1	Untersuchungen zur Rolle von $\gamma$ 2-Adaptin im endo-lysosomalen System .....	49
4.2	Untersuchungen zur Rolle von $\gamma$ 2-Adaptin während der MLV.gag-Morphogenese .....	52
4.2.1	Kartierung wichtiger Domänen von $\gamma$ 2-Adaptin .....	54
4.2.2	Phänotypische Charakterisierung der $\gamma$ 2-Mutanten .....	59
4.3	Identifizierung und Charakterisierung von Interaktionspartnern von $\gamma$ 2-Adaptin .....	62
4.3.1	Untersuchungen zum Wechselspiel von $\gamma$ 2-Adaptin und seinen Interaktionspartnern .....	64
4.3.2	Untersuchungen zur Interaktion von Vps28 bzw. Chmp2A und $\gamma$ 2-Mutanten .....	66
4.4	Untersuchungen zur Rolle von Rab7 im endo-lysosomalen System .....	68
4.4.1	Untersuchungen zur Funktion von Rab7 während der MLV.gag-Morphogenese .....	68
4.4.2	Untersuchung zum Wechselspiel von Rab7 und $\gamma$ 2-Adaptin .....	71
4.4.3	Untersuchung zur Rolle von $\gamma$ 2-Adaptin im Wechselspiel mit Rab7: Kartierung funktionell wichtiger Domänen .....	74
4.4.4	Rab7 ist ein Interaktionspartner von $\gamma$ 2-Adaptin .....	76
4.4.5	Die Membranassoziation von $\gamma$ 2-Adaptin ist Rab7-unabhängig .....	78
4.4.6	Untersuchung zur funktionellen Wechselwirkung zwischen $\gamma$ 2-Adaptin und Rab7 .....	79
4.5	Identifikation und Charakterisierung eines potentiellen LIR-Motivs in $\gamma$ 2-Adaptin .....	82
4.5.1	Identifikation und Charakterisierung eines potentiellen LIR-Motivs in $\gamma$ 2-Adaptin: Untersuchungen anhand von $\gamma$ 2.LIR und $\gamma$ 2.Stop501 .....	83
4.5.2	Untersuchungen zu $\gamma$ 2.LIR .....	84
4.5.3	Untersuchungen zu $\gamma$ 2.Stop501 .....	86
4.6	Untersuchungen zum Wechselspiel von $\gamma$ 2-Adaptin und LC3 .....	91
4.7	Untersuchungen zur Rolle von $\gamma$ 2-Adaptin in der Autophagie .....	94

4.7.1	Untersuchungen zu $\gamma$ 2-Adaptin und p62 .....	94
4.7.2	LC3 als Marker für das Maß der Autophagie .....	96
4.7.3	LDH als Marker für das Maß der Autophagie.....	99
4.7.4	Autophagie-Induktion und MLV.gag.....	100
4.7.5	Autophagie-Inhibition und MLV.gag.....	101
4.7.6	Autophagie-Inhibition durch Depletion von Autophagie-Katalysatoren	102
4.8	Identifizierung möglicher $\gamma$ 2-Substrate .....	104
4.8.1	$\gamma$ 2-Adaptin und Proteine der Rab-Familie .....	104
4.8.2	$\gamma$ 2-Adaptin und GFP, RhoB bzw. GFP-8 .....	105
4.8.3	$\gamma$ 2-Adaptin und weitere potentielle Substrate.....	106
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>111</b>
5.1	Modell der physiologischen Funktion von $\gamma$ 2-Adaptin .....	126
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>128</b>
<b>7</b>	<b>Summary .....</b>	<b>130</b>
<b>8</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>132</b>
8.1	Übersichtsdarstellung der $\gamma$ 2- bzw. $\gamma$ 1-Konstrukte .....	132
8.2	Abkürzungsverzeichnis.....	133
8.3	Ein- und Dreibuchstabencodes der Aminosäuren.....	137
<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>138</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Das $\gamma$ 2-Adaptin-Protein

Das Protein  $\gamma$ 2-Adaptin wurde erstmals 1998 von Takatsu *et al.* und Lewin *et al.* in Säugerzellen als potentiell Mitglied der Clathrin-Adapter Protein-Familie beschrieben und kommt in niederen Eukaryonten, wie Zellen der Hefe, nicht vor.  $\gamma$ 2-Adaptin besteht aus einer N-terminalen Kopf- und einer C-terminalen Ohr-Domäne, die über eine Scharnier-Region miteinander verbunden sind (Abbildung 1). Es besitzt neben einer 60 %-igen Sequenzhomologie zu  $\gamma$ 1-Adaptin, einer großen Untereinheit des hetero-tetrameren Clathrin-Adapter-Komplexes AP-1, auch eine signifikante Ähnlichkeit in seiner Domänen-Struktur mit  $\gamma$ 1-Adaptin. Die Ohr-Domäne von  $\gamma$ 2-Adaptin ist im Vergleich zu  $\gamma$ 1-Adaptin verkürzt und besitzt eine 49 %ige Sequenzhomologie zur Ohr-Domäne von  $\gamma$ 1-Adaptin, während die beiden Kopf-Domänen eine 69 %ige Homologie in ihrer Sequenz aufweisen.  $\gamma$ 2-Adaptin ist ein in Säuger-Zellen ubiquitär exprimiertes Protein aus 785 Aminosäuren (ca. 87 kDa) und zeigt eine perinukleare Lokalisation in der Zelle. (Takatsu et al. 1998; Lewin et al. 1998)



**Abbildung 1: Schematische Darstellung von  $\gamma$ 2-Adaptin**

Die N-Terminale Kopf-Domäne (Aminosäuren 1-575) und die C-terminale Ohr-Domäne (Aminosäuren 662-785) sind über eine Scharnier-Region miteinander verbunden.

$\gamma$ 2-Adaptin und  $\gamma$ 1-Adaptin unterscheiden sich aber trotz ihrer sequentiellen und strukturellen Homologie in ihrer physiologischen Funktion. Dies zeigt sich unter anderem darin, dass sie innerhalb der Zelle unterschiedlich lokalisiert sind (Takatsu et al. 1998). Zwar können beide Proteine in zytosolischer und Membran-assoziiierter Form vorliegen.  $\gamma$ 2-Adaptin ist jedoch gleichmäßig an Membranen und im Zytosol lokalisiert, während  $\gamma$ 1-Adaptin hauptsächlich zytosolisch vorliegt (Rost et al. 2008). Zudem ist die Membran-Assoziation von  $\gamma$ 2-Adaptin im Gegensatz zu der von  $\gamma$ 1-Adaptin unabhängig von ARF- (*ADP ribosylation factor*) GTPasen (Guanosintriphosphatasen) (Takatsu et al. 1998; Lewin et al. 1998).

Weitere Hinweise für unterschiedliche Funktionen von  $\gamma 2$ -Adaptin und  $\gamma 1$ -Adaptin liefern die frühe embryonale Letalität von Mäusen, in denen  $\gamma 1$ -Adaptin ausgeschaltet ist (Zizioli et al. 1999) und somit  $\gamma 2$ -Adaptin den Verlust von  $\gamma 1$ -Adaptin nicht kompensieren kann, und die Beobachtung, dass während der Morphogenese von HBV (Hepatitis B Virus) depletiertes  $\gamma 2$ -Adaptin funktionell nicht durch  $\gamma 1$ -Adaptin ersetzt werden kann (Rost et al. 2006). Während der HBV-Morphogenese interagiert  $\gamma 2$ -Adaptin über seine Ohr-Domäne mit der zytosolischen pre-S1 Region des großen HBV-Hüllproteins L (Hartmann-Stühler und Prange 2001) und über seine Kopf-Domäne mit HBV-Core-Protein (Rost et al. 2006). Somit wirkt  $\gamma 2$ -Adaptin vermutlich als verbindender Faktor bzw. zelluläres Adapterprotein zwischen HBV L und dem HBV-Nukleokapsid, welches aus Core-Proteinen gebildet wird. Diese spezielle Rolle bei der HBV-Morphogenese wird dadurch gestützt, dass Veränderungen in der zellulären  $\gamma 2$ -Konzentration die Freisetzung von HBV blockieren (Rost et al. 2006; Lambert et al. 2007) und  $\gamma 2$ -Adaptin mit den HBV-Strukturen an multivesikulären Endosomen (*multivesicular body*, MVB), den angenommenen Orten der HBV Sprossung, ko-lokalisiert (Rost et al. 2006). Auffälligerweise konnte keine Verbindung von  $\gamma 1$ -Adaptin zur Morphogenese von HBV hergestellt werden (Hartmann-Stühler und Prange 2001), was die funktionelle Divergenz der zwei Adaptine untermauert. Im Zuge der Untersuchungen zur Rolle von  $\gamma 2$ -Adaptin bei der HBV-Morphogenese, konnten weitere wichtige Informationen zu seiner physiologischen Funktion gewonnen werden.  $\gamma 2$ -Adaptin besitzt ein funktionelles Ubiquitin-Interaktions-Motiv (UIM), welches unter anderem die Interaktion mit HBV Core vermittelt, und stellt somit einen Ubiquitin-Rezeptor dar (Rost et al. 2006). Das UIM von  $\gamma 2$ -Adaptin vermittelt zudem seine Bindung an die Ubiquitin-Ligase Nedd4, durch die  $\gamma 2$ -Adaptin an seiner Kopf-Domäne selbst mono- bzw. polyubiquitiniert werden kann (Rost et al. 2008).  $\gamma 2$ -Adaptin kann folglich einer Gruppe endosomaler Ubiquitin-Rezeptoren, zu denen u. a. Epsin, Eps15 und Hrs (*hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate*) zählen, zugeordnet werden, die in Ubiquitin-Abhängigkeit selbst ubiquitiniert werden (Hoeller et al. 2006). Diese Verbindung zu Ubiquitin ist spezifisch für  $\gamma 2$  Adaptin und tritt weder bei  $\gamma 1$ -Adaptin noch bei anderen Adaptinen auf. Das UIM von  $\gamma 2$ -Adaptin hat keinen Einfluss auf dessen Membran-Assoziation, obwohl durch Ubiquitin modifiziertes  $\gamma 2$ -Adaptin ausschließlich Membran-gebunden vorliegt (Rost et al. 2008). Zudem konnte gezeigt werden, dass  $\gamma 2$ -Adaptin an CD63-positiven Kompartimenten lokalisiert ist (Rost et al. 2006). CD63 ist ein Marker-Protein für späte Endosomen bzw. MVBs. Dies lässt eine Funktion von  $\gamma 2$ -Adaptin im endo-lysosomalen System vermuten.



Neben der Interaktion mit der Nedd4 Ubiquitin-Ligase wird dies durch folgende Beobachtungen unterstützt:

- ❖ Die Überexpression von  $\gamma$ 2-Adaptin führt zu vergrößerten CD63-positiven Kompartimenten und der Aggregation von Proteinen in schwer-löslichen Strukturen (Lambert et al. 2007). Diese sind vergleichbar zu Kompartimenten der Klasse E, die durch die Blockade der ESCRT-Kaskade (*endosomal sorting complex required for transport*, siehe 1.2.1) entstehen (Bishop und Woodman 2000; Hurley 2008).
- ❖ Überexprimiertes  $\gamma$ 2-Adaptin blockiert die ESCRT-abhängige Freisetzung von HBV und retroviralen VLPs (*virus like particles*) (Lambert et al. 2007; Döring et al. 2010).
- ❖ Die Depletion von  $\gamma$ 2-Adaptin blockiert den endo-lysosomalen Abbau von endozytiertem EGF (*epidermal growth factor*) und verändert die Morphologie multivesikulärer Endosomen (Rost et al. 2008).
- ❖ Die Überexpression von  $\gamma$ 2-Adaptin kann nicht nur zur Aggregation von Proteinen in schwer-löslichen Strukturen, sondern auch zu deren Abbau, vor allem bei dominant-negativen Formen der Proteine, führen (Döring et al. 2010).

Trotz der spezifischen Eigenschaften von  $\gamma$ 2-Adaptin wird diskutiert, ob  $\gamma$ 2- und  $\gamma$ 1-Adaptin ähnliche Funktionen übernehmen, da es neben ihrer Homologie weitere Gemeinsamkeiten gibt. Sowohl  $\gamma$ 2- als auch  $\gamma$ 1-Adaptin können mit  $\sigma$ 1A und  $\sigma$ 1B, den kleinen Ketten der hetero-tetrameren AP1-Komplexe, interagieren (Takatsu et al. 1998).  $\gamma$ 2-Adaptin wurde *in vitro* in AP-1 Komplexen nachgewiesen, wobei sich die AP-1-Komplexe mit  $\gamma$ 1-Adaptin offensichtlich funktionell von denen mit  $\gamma$ 2-Adaptin unterscheiden (Mattera et al. 2011). Zudem interagieren sowohl  $\gamma$ 2- als auch  $\gamma$ 1-Adaptin über ihre Ohr-Domänen mit Rabaptin-5, einem Effektor der Rab5-GTPase, bzw. dem Rabaptin-5-Rabex-5 Komplex, der Rab5-GTP an Membranen stabilisiert und bei der Fusion früher Endosomen eine wichtige Rolle spielt (Lippé et al. 2001; Mattera et al. 2003).

### 1.1.1 Adapter-Protein Komplexe

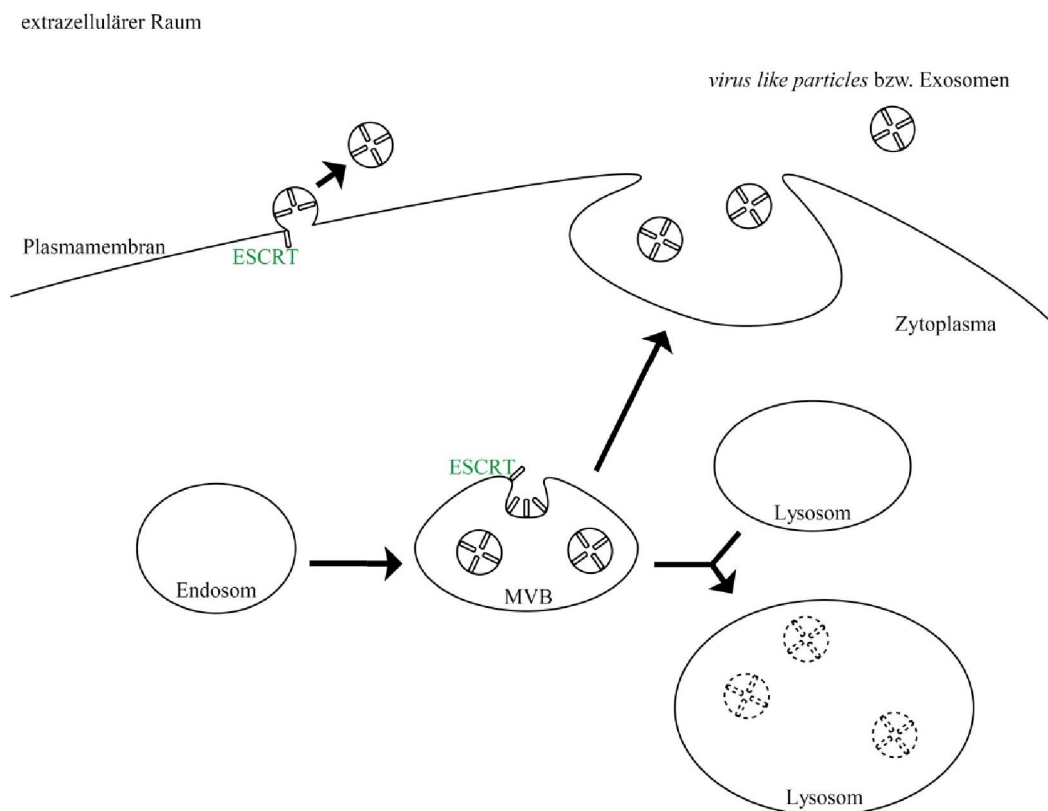
Der Begriff Adapter-Proteine (AP) leitet sich aus dem lateinischen Wort *adaptare* (= anpassen) ab. Adapter-Proteine spielen u.a. eine Schlüsselrolle bei der Assemblierung von Vesikelhüllen für den intrazellulären Transport und der Auswahl der von den Vesikeln transportierten Frachtproteine. AP-Komplexe sind hetero-tetramere Komplexe, die die Verbindung zwischen der Vesikelhülle und den trans-membranen Frachtmolekülen

herstellen. Die Bezeichnung Adaptin wurde zunächst für ca. 100 kDa große Proteine verwendet, die bei der Aufreinigung Clathrin-umhüllter Vesikel mit isoliert wurden, und später auf alle Untereinheiten der AP-Komplexe ausgeweitet. Die AP-Komplexe bestehen jeweils aus zwei großen ( $\gamma/\alpha/\delta/\epsilon/\zeta$  und  $\beta 1-5$ ; ca. 100 kDa), einer mittleren ( $\mu 1-5$ ; ca. 50 kDa) und einer kleinen ( $\sigma 1-5$ , ca. 20 kDa) Untereinheit. Sie wirken im zellulären Transport, indem sie Frachtmoleküle in Clathrin-umhüllte Vesikel verpacken. (Ohno 2006; Hirst et al. 2013) Bisher wurden fünf AP-Komplexe beschrieben. Die AP-Komplexe 1-5 sind unterschiedlich in der Zelle lokalisiert und erfüllen verschiedene Transportfunktionen. AP-1 ist am Transport zwischen dem Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) und dem Endosom bzw. Lysosom beteiligt, AP-2 vermittelt einen Endozytose-Mechanismus an der Plasmamembran und AP-3 den Transport von Endosomen zu Lysosomen. AP-4 und AP-5 sind noch wenig charakterisiert und funktionieren unabhängig von Clathrin. AP-4 vermittelt ähnlich wie AP-1 den Transport zwischen TGN und Endosomen, jedoch von spezifischen Frachtmolekülen. AP-5 wirkt an der endo-lysosomalen Dynamik mit, seine genaue Funktion ist jedoch noch unklar. (Hirst et al. 2013)

## 1.2 Das endo-lysosomale Transportsystem

Das endo-lysosomale Transportsystem eukaryotischer Zellen umfasst den Transport endozytierter und biosynthetischer Vesikel (Gruenberg und Maxfield 1995). Durch Endozytose entstandene Vesikel fusionieren mit bzw. zu frühen Endosomen. Zudem besteht ein Transport zwischen dem TGN und den Endosomen, wobei neu synthetisierte Proteine vom TGN zu den Endosomen transportiert werden, während der *retrograde* Transport Proteine, die wichtig für die Aufrechterhaltung des TGN sind, zurückführt. Endozytierte Proteine, die an die Plasmamembran zurück gewonnen werden sollen, werden von den frühen Endosomen in sog. *recycling*-Vesikeln abgeschnürt, die zur Plasmamembran transportiert werden und mit dieser fusionieren. Die frühen Endosomen reifen dann zu späten bzw. multivesikulären Endosomen (MVBs, *multivesicular bodies*) heran, indem die zum Abbau bestimmten Substrate in intraluminale Vesikel (ILVs) abgeschnürt werden (Felder et al. 1990; Gruenberg und Maxfield 1995). Diese werden nach der Fusion der MVBs mit den Lysosomen hydrolytisch abgebaut (Futter et al. 1996). ILVs können auch durch Fusion der MVBs mit der Plasmamembran als Exosomen freigesetzt werden (Pelchen-Matthews et al. 2004) (Abbildung 2).

Der endo-lysosomale Proteintransport dient zum Einem der Aufrechterhaltung bzw. Steuerung der physiologischen Lokalisation von Proteinen (z.B. lysosomaler Hydrolasen) und zum Anderen dem Abbau endozytierter Proteine. Hierbei spielt die Regulation von Zelloberflächen-Rezeptoren, wie zum Beispiel EGFR (*epidermal growth factor receptor*), eine wichtige Rolle. Dabei wird nach der Aktivierung des Rezeptors durch seinen Liganden wird dieser endozytiert und im endo-lysosomalen Transportsystem zu MVBs transportiert, wo er in ILVs verpackt wird. Die Internalisierung des Rezeptors und sein Abbau dienen der Inaktivierung des von ihm ausgelösten Signals. Nach der Fusion der MVBs mit den Lysosomen wird der Rezeptor abgebaut. (Felder et al. 1990; Carter und Sorkin 1998)



### Abbildung 2: Das endo-lysosome Transportsystem

Die frühen Endosomen reifen zu späten Endosomen bzw. MVBs heran. Die Reifung erfolgt u.a. durch Abschnürung von ILVs (*intraluminal vesicles*) in das Lumen der MVBs hinein. Die Abschnürung der ILVs erfolgt, wie die Knospung von VLPs (*virus like particles*) bzw. Exosomen an der Plasmamembran, ESCRT-abhängig. Die MVBs können mit der Plasmamembran verschmelzen, um die ILVs als Exosomen bzw. VLPs freizusetzen, oder sie fusionieren mit den Lysosomen, worauf die ILVs hydolytisch abgebaut werden.

### 1.2.1 Die Bildung multivesikulärer Endosomen

Multivesikuläre Endosomen leiten sich von frühen Endosomen ab und entstehen durch die Abschnürung ihrer begrenzenden Membran in intraluminale Vesikel (Felder et al. 1990; Gruenberg und Maxfield 1995). An den MVBs werden endozytierte Membranproteine und andere für den lysosomalen Abbau bestimmte Proteine in ILVs verpackt, wobei Ubiquitin als Sortierungssignal dient (Katzmann et al. 2001). Die MVBs verschmelzen mit den Lysosomen, wodurch die ILVs den hydrolytischen Enzymen ausgesetzt und durch diese abgebaut werden (Futter et al. 1996). Ein alternativer Transportweg führt von den MVBs zur Freisetzung von Exosomen, indem die MVBs mit der Plasmamembran verschmelzen (Pelchen-Matthews et al. 2004).

Die Abschnürung der ILVs in das Lumen der MVBs hinein wird durch die ESCRT-Kaskade vermittelt. Diese ist auch an der Erkennung und Sortierung der ubiquitinierten Substrate des MVB-Weges beteiligt. Bei dem Sortierungssignal für den Transport in ILVs handelt es sich um Mono- oder Polyubiquitinierungen an einem oder mehreren zytosolischen Lysinresten der Transmembranproteine (Metcalf und Isaacs 2010). Die Ubiquitinierung erfolgt häufig durch die Familie der Nedd4-Ligasen. Dabei handelt es sich um eine Familie von Ubiquitin-E3 Ligasen, die aus drei charakteristischen Domänen bestehen: C2-, WW- und HECT-Domäne (Ingham et al. 2004). Die N-terminale C2-Domäne vermittelt die Membranassoziation, während die C-terminale HECT-Domäne den katalytisch-aktiven Bereich der Ligase darstellt. Die C2- und die HECT-Domäne sind über eine Region mit mehreren WW-Domänen verbunden, welche Protein-Protein-Interaktionen mit Prolinreichen (PPxY) Sequenzmotiven vermitteln. (Ingham et al. 2004; Scheffner und Staub 2007) Die Erkennung des Ubiquitin-Signals und die lokale Konzentrierung der markierten Frachtproteine erfolgt über einen heterodimeren Proteinkomplex, der auch als ESCRT-0 bezeichnet wird. ESCRT-0 besteht aus zwei Ubiquitin-bindenden Proteinen, Hrs (*hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate*) und STAM (*signal transducing adaptor molecule*). Die Bindung von Ubiquitin erfolgt durch ein UIM in Hrs und jeweils eine VHS-Domäne (VHS ist die Abkürzung für das Auftreten der Domäne in Vps-27, Hrs und STAM) in Hrs bzw. STAM. Hrs wird über das Endosomen-spezifische Lipid Phosphatidylinositol-3-phosphat (PI(3)P) an endosomale Membranen rekrutiert (Raiborg et al. 2001b). Nach der Substraterkennung erfolgt die lokale Konzentration der ubiquitinierten Frachtmoleküle mit Hilfe von Clathrin, welches von HRS rekrutiert wird (Raiborg et al. 2001a; Slagsvold et al. 2006; Carlton 2010)

Tabelle 1: Komponenten der ESCRT-Komplexe in Hefe und Säugern

Komplex	Hefe	Säuger
ESCRT-0	Vps27	Hrs
	Hse1	STAM1, 2
ESCRT-I	Vps23	TSG101
	Vps28	VPS28
	Vps37	VPS37A, B, C, D
	Mvb12	Mvb12A, B
ESCRT-II	Vps36	EAP45
	Vps22	EAP30
	Vps25	EAP20
ESCRT-III	Snf7	CHMP4A, B, C
	Vps20	CHMP6
	Vps2	CHMP2A, B
	Vps24	CHMP3

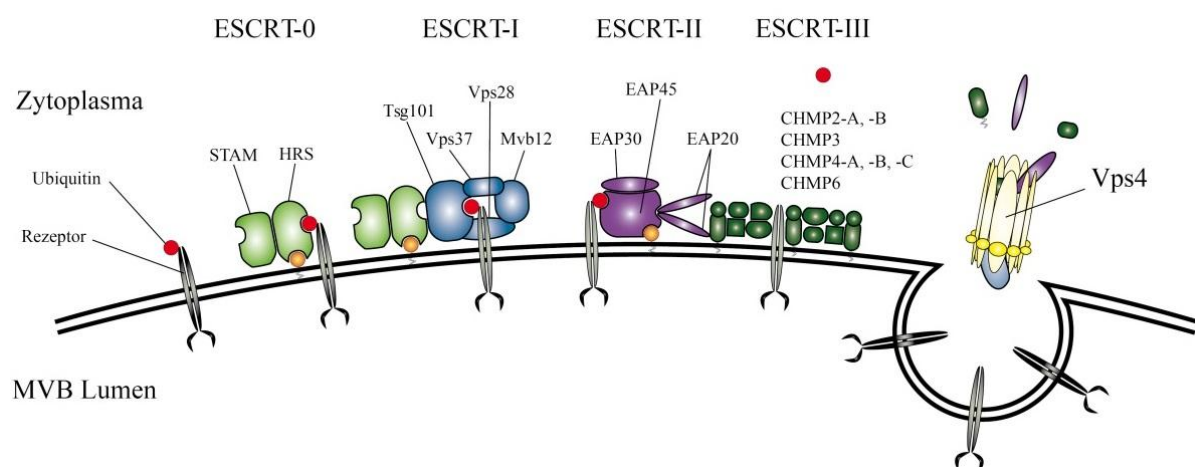
Die ubiquitinierten Proteine werden von ESCRT-0 auf ESCRT-I, einen heterotetrameren Komplex aus Tsg101 (*tumor susceptibility gene 101*), Vps28 (*vacuolar protein sorting 28*), Vps37 und Mvb12 (*multivesicular body 12*) übertragen. Hrs bindet über sein P(S/T)AP-Motiv an die UVE-Domäne (*ubiquitin E2 variant*) in Tsg101, welche auch eine Bindestelle für Ubiquitin darstellt, und induziert somit die Rekrutierung von ESCRT-I an die endosomale Membran. (Katzmann et al. 2001; Henne et al. 2011)

ESCRT-II ist ein heterotetramerer Komplex aus zwei EAP20-Untereinheiten (*ELL-associated protein*) und jeweils einer EAP30- und einer EAP45-Untereinheit. ESCRT-II ist in der ESCRT-Kaskade ESCRT-I funktionell nachgeschaltet. (Babst et al. 2002b) Die Rekrutierung an endosomale Membranen erfolgt über die GLUE-Domäne (*GRAM-Like Ubiquitin-binding in EAP45*) von EAP45, die die Bindung an PI(3)P und Ubiquitin vermittelt (Slagsvold et al. 2005). In der Hefe interagiert Vps36 mit Vps28, wodurch ESCRT-I and der Rekrutierung von ESCRT-II beteiligt ist. In Säugerzellen ist diese Rekrutierung bisher nicht nachgewiesen. (Babst et al. 2002b; Slagsvold et al. 2006)

ESCRT-III bildet den letzten Komplex und besitzt als einziger keine Untereinheit, die mit Ubiquitin interagieren kann. Der heteromultimere ESCRT-III-Komplex besteht aus Chmp4, Chmp6, Chmp2 und Chmp3 (*charged multivesicular body protein*) (Babst et al. 2002a). ESCRT-III wird durch ESCRT-II rekrutiert, wobei EAP20 die myristoylierte Untereinheit Chmp6 bindet. ESCRT-III übernimmt die Schlüsselrolle bei der Bildung der ILVs, indem es neben anderen akzessorischen Proteinen deubiquitinierende Enzyme und die AAA-Typ ATPase Vps4 rekrutiert. Die ATPase Vps4 katalysiert die Dissoziation des ESCRT-III-Komplexes und dadurch indirekt die Dissoziation aller ESCRT-Komplexe. Zeitgleich mit

der Dissoziation erfolgt die Abschnürung der Vesikel, wobei der Mechanismus der Abschnürung noch nicht endgültig geklärt ist. (Henne et al. 2011)

Das auch als „conveyor belt“ bezeichnete Modell der MVB-Morphogenese geht von einer sequenziellen Rekrutierung der ESCRT-Komplexe an die endosomale Membran aus und davon, dass die ESCRT-Komplexe in einer funktionellen Reihe wirken (Nickerson et al. 2007). Es zeichnet sich jedoch ab, dass dieses Modell nicht dem tatsächlichen Bild entspricht. So können z.B. ESCRT-I und -III über das Adapter-ähnliche Protein Alix direkt miteinander interagieren (Strack et al. 2003) und es gibt Mechanismen, die die Sortierung von Proteinen unabhängig von Ubiquitin ermöglichen (van Niel et al. 2006). Zudem gibt es Hinweise, dass ESCRT-II in Säugerzellen nicht für die MVB-Morphogenese notwendig ist (Slagsvold et al. 2006). Gegen die strikt sequentielle Rekrutierung der ESCRT-Komplexe spricht auch, dass ESCRT-I und -II zur Ausbildung von Knospen in das Lumen der MVBs hinein führen und erst danach ubiquitinierte Frachtmoleküle durch ESCRT-0 an diese Knospen rekrutiert werden (Wollert und Hurley 2010). Unumstritten bleibt dabei jedoch die Membran-abschnürende Funktion von ESCRT-III und Vps4.



**Abbildung 3: ESCRT-Kaskade - conveyor belt Modell**

Die ESCRT-Kaskade besteht aus den ESCRT-Komplexen -0, -I, -II, -III und der AAA-Typ ATPase Vps4. Die ESCRT-Komplexe sind mit ihren Untereinheiten (Säuger-Nomenklatur) dargestellt. ESCRT-0 erkennt und bindet ubiquitinierte Substrate und wird dadurch an endosomale Membranen rekrutiert. Anschließend erfolgt die sequentielle Rekrutierung von ESCRT-I, -II und -III, wobei ESCRT-I und -II Ubiquitin-bindende Eigenschaften besitzen. ESCRT-III rekrutiert schließlich deubiquitinierende Enzyme und Vps4, welche die Dissoziation der ESCRT-Komplexe von der endosomalen Membran vermittelt. Gleichzeitig mit der Dissoziation erfolgt die Abschnürung der intraluminalen Vesikel.

Falls Proteine, die an der Morphogenese der MVBs beteiligt sind, mutieren, kommt es zur Ausbildung eines Kompartiments der Klasse E. Dieses ist im Vergleich zu den MVBs stark vergrößert, besteht aus flachen, Zisternen-artigen Membranstapeln und enthält keine ILVs. Zudem ist der post-endosomale Transport der Kompartimente der Klasse E gestört, so dass diese nicht mit dem Lysosom verschmelzen können und es zu einer Anhäufung von Frachtproteinen an ihnen kommt. (Emily M. Coonrod und Tom H. Stevens 2010)

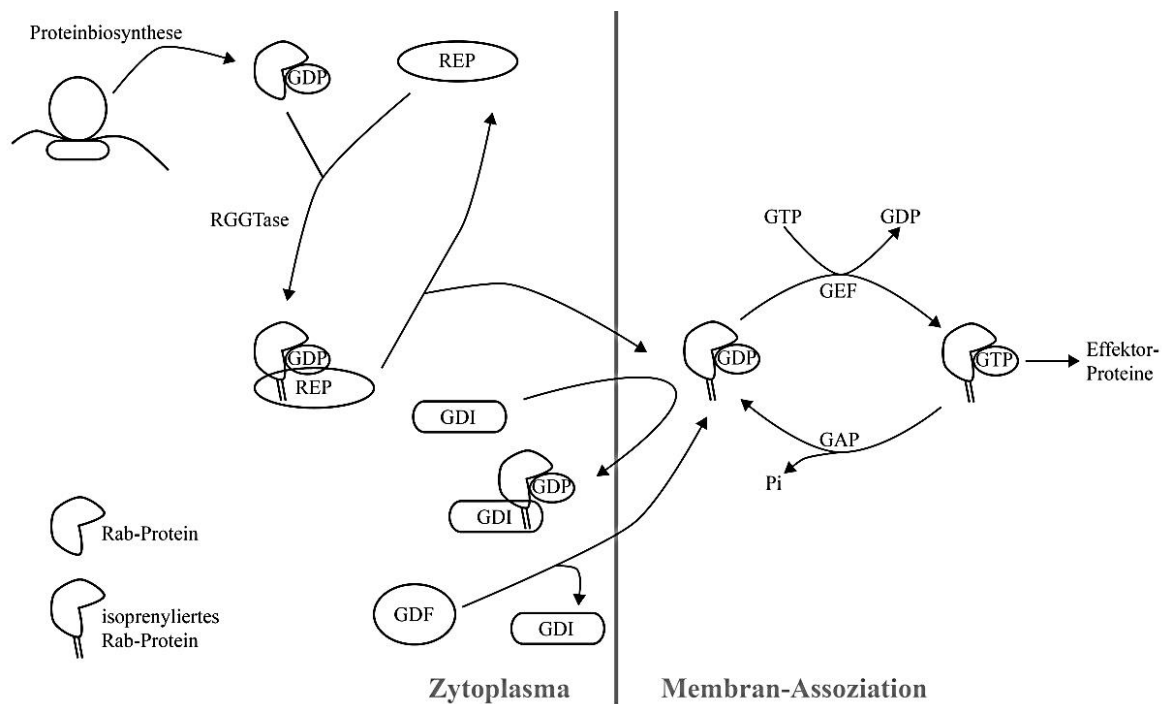
ESCRT-Proteine sind nicht nur an der MVB-Biogenese beteiligt, sondern u.a. auch bei der Abschnürung der Tochterzellen während der Zellteilung (Carlton 2010) und der Autophagie (Rusten und Stenmark 2009a). Bei der Autophagie übernehmen ESCRT-Komponenten wichtige Funktionen bei der Fusion von Autophagosomen mit den Lysosomen (Manil-Segalén et al. 2012). ESCRT-Komponenten spielen auch bei der Fusion von MVBs und Lysosomen eine Rolle (Metcalf und Isaacs 2010). Auch das Knospen von umhüllten Viren an der Plasmamembran oder in das Lumen von MVBs hinein ist topologisch äquivalent zur Abschnürung von ILVs und erfolgt ESCRT-abhängig (Calistri et al. 2009). Beispiele für ESCRT-abhängige Virusknospung bieten die Retroviren HIV (*human immunodeficiency virus*), EIAV (*equine infectious anemia virus*) und MLV (*murine leukemia virus*). Diese rekrutieren die ESCRT-Kaskade über *late* Domänen an den Ort der Virus-Abschnürung. Die *late* Domänen binden dabei direkt an ESCRT-Komponenten oder rekrutieren diese indirekt über akzessorische Proteine. (Bieniasz 2006) Die Morphogenese der Retroviren ist vergleichsweise gut untersucht und wird daher häufig als Model für die Untersuchung ESCRT-abhängiger Prozesse verwendet.

### 1.3 Rab-Proteine

Rab-Proteine (*ras related in brain*) gehören zur Ras-Superfamilie der monomeren GTPasen (Touchot et al. 1987) und stellen mit mehr als 60 Isoformen deren größte Subfamilie dar. Neben den Rab-Proteinen zählen unter anderem Ras-, Ran-, Rho- und Arf-GTPasen zur Ras-Superfamilie.

Rab-Proteine koordinieren intrazelluläre Transportsysteme: sie verleihen Membranidentitäten und katalysieren die Abschnürung von Transportvesikeln, deren Motilität und Anlagerung an die Zielmembran und ihre Fusion mit dieser. Dabei funktionieren Rab-Proteine als molekulare Schalter, da sie in einer GTP-gebundenen aktiven und einer GDP-gebundenen inaktiven Form vorkommen. Zudem wird ihre Aktivität über ihre Lokalisation reguliert. Rab-Proteine können zytosolisch und an Membranen assoziiert

vorliegen. Die Membranassoziation erfolgt unabhängig von ihrer katalytischen Aktivität und wird über eine C-terminale posttranslationale Isoprenylierung vermittelt (Farnsworth et al. 1991; Anant et al. 1998). Membran-assoziierte Rab-Proteine rekrutieren in ihrer GTP-gebundenen Form spezifische Effektor-Proteine und erfüllen so ihre charakteristischen Funktionen. (Stenmark und Olkkonen 2001; Ali und Seabra 2005; Grosshans et al. 2006)



**Abbildung 4: Der Zyklus der Rab-Proteine**

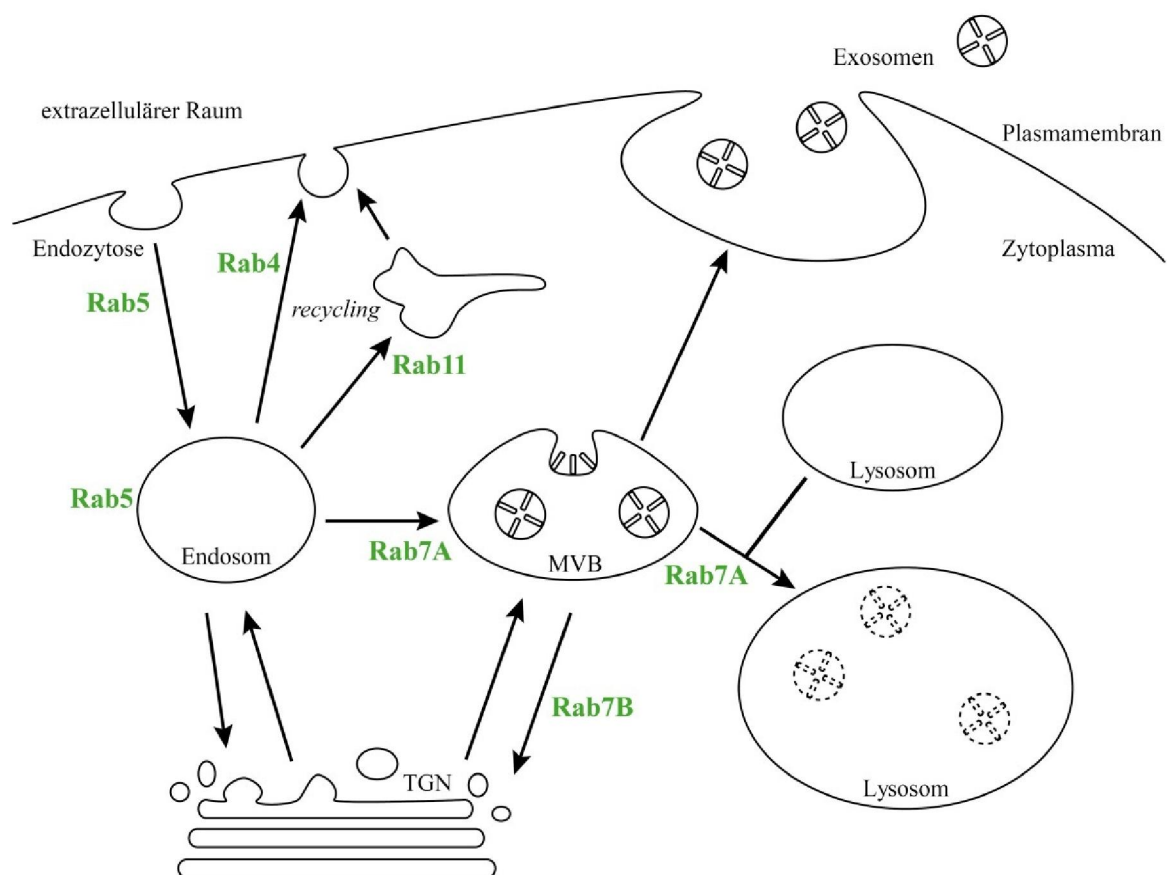
Rab-Proteine werden direkt nach ihrer Synthese von REPs (*Rab escort protein*) gebunden. REPs vermitteln den Kontakt zu den RGGTasen (Rab Geranyl-Geranyl-Transferasen), die die Isoprenylierung der Rab-Proteine katalysieren. Nach der Membran-Assoziation erfolgt der Aktivitäts-Zyklus der Rab-Proteine. GEFs (*GDP/GTP exchange factor*) aktivieren die Rab-Proteine, indem sie GDP gegen GTP austauschen. In ihrer GTP-gebundenen Form sind die Rab-Proteine aktiv und erfüllen ihre Funktion über verschiedene Effektor-Proteine. Ihre Inaktivierung erfolgt durch die GTP-Hydrolyse, die von GAFs (*GTPase activating protein*) gesteuert wird. GDP-gebundene Proteine können von Membranen über GDIs (*GDP dissociation inhibitor*) in das Zytoplasma zurückgewonnen werden. Die erneute Membran-Assoziation der Rab-Proteine erfolgt über GDFs (*GDI displacement factor*) und leitet einen neuen Aktivitäts-Zyklus ein.

Direkt nach ihrer Synthese binden Rab-Proteine an REPs (*Rab escort proteins*), die die Rab-Proteine den RGGTasen (Rab Geranyl-Geranyl-Transferasen) präsentieren, welche die C-terminale Isoprenylierung katalysieren. Anschließend bleiben die modifizierten Rab-Proteine mit den REPs assoziiert, welche deren Isoprenylierung abschirmen und die Rab-Proteine zytosolisch halten. Durch die Assoziation der Rab-Proteine an ihre Zielmembran werden die REPs wieder freigesetzt. Die Aktivierung Membran-assoziiierter Rab-Proteine erfolgt durch GEFs (*GDP / GTP exchange factors*), die den Austausch von GTP gegen GDP katalysieren. Rab-GTPs können nun mit ihren Effektor-Proteinen



interagieren und rekrutieren diese an Membranen. Die Inaktivierung der Rab-Proteine erfolgt durch die Hydrolyse des GTP durch GAPs (*GTPase-activating proteins*). GDP-gebundene Rab-Proteine werden von GDIs (*GDP dissociation inhibitors*) ins Zytoplasma zurück gewonnen und so lange zytoplasmatisch gehalten, bis sie durch GDFs (*GDI displacement factors*) wieder an Membranen rekrutiert werden. (Stenmark und Olkkonen 2001; Ali und Seabra 2005; Grosshans et al. 2006) Der Zyklus der Rab-Proteine ist in Abbildung 4 dargestellt.

### 1.3.1 Rab-Proteine im endo-lysosomalen System



**Abbildung 5: Rab-Proteine im endo-lysosomalen System**

Das endo-lysosomale System umfasst die Biogenese von frühen und späten Endosomen und den Transport zwischen endosomalen Organellen und der Plasmamembran bzw. dem TGN. Den Abschluss des endo-lysosomalen Systems stellt die Fusion später Endosomen bzw. MVBs mit den Lysosomen dar. Die einzelnen Transportprozesse werden durch spezifische Rab-GTPasen reguliert. Rab5 reguliert die Endozytose und die Entstehung früher Endosomen, während Rab4 und Rab11 das *recycling* direkt bzw. über sog. *recycling*-Endosomen vermitteln. Rab7A steuert die Reifung der späten Endosomen bzw. MVBs und deren Fusion mit den Lysosomen, während Rab7B den vesikulären Transport von den MVBs zum TGN katalysiert.

Rab-Proteine sind wichtige Regulatoren im endo-lysosomalen System. Rab5 ist an endozytierten Vesikeln und frühen Endosomen lokalisiert (Gorvel et al. 1991; Bucci et al.

1992), während Rab4 und Rab11 das *recycling* von den frühen Endosomen zur Plasmamembran katalysieren (van der Sluijs et al. 1992; Sheff et al. 1999). Rab7 und Rab9 sind an späten Endosomen und Lysosomen lokalisiert. Rab9 vermittelt das *recycling* von den späten Endosomen zum TGN (Lombardi et al. 1993), ähnlich wie Rab7B (Bucci et al. 2010). Rab7A katalysiert die Reifung der späten Endosomen (Feng et al. 1995) und die Fusion der späten Endosomen mit den Lysosomen (Vanlandingham und Ceresa 2009b). Da Rab-Proteine am gleichen Organell unterschiedliche Funktionen ausüben, kommen sie in distinkten Mikro-Domänen, sog. Rab-Domänen, vor und werden dort durch positive GEF- und Effektor-Rückkopplungen konzentriert (Grosshans et al. 2006).

### 1.3.2 Rab7

Rab7 erfüllt wichtige Funktionen im endo-lysosomalen Transportsystem der Zelle. Rab7A (im Folgenden nur Rab7 genannt) ist sowohl für die Reifung von frühen zu späten Endosomen als auch für deren Fusion mit Lysosomen verantwortlich. (Bucci et al. 2000; Vonderheit und Helenius 2005; Ceresa und Bahr 2006; Vanlandingham und Ceresa 2009b) Die Reifung von frühen zu späten Endosomen erfordert den Austausch von Rab5 gegen Rab7. Dieser wird über einen sog. *cut-out switch* reguliert, wobei ein Rab5-Effektor als Rab7-GEF wirkt, während Rab7 als Effektor ein Rab5-GAP rekrutiert (Del Conte-Zerial et al. 2008). Neben der Reifung von frühen zu späten Endosomen und deren Fusion mit den Lysosomen katalysiert Rab7 auch die Abschnürung von Transportvesikeln am frühen Endosom, die entlang von Mikrotubuli transportiert werden und mit späten Endosomen fusionieren (Vonderheit und Helenius 2005).

RILP (*Rab-interacting lysosomal protein*) ist ein Effektor-Protein von Rab7 (Cantalupo et al. 2001). GTP-gebundenes Rab7 rekrutiert RILP an Membranen der späten Endosomen und Lysosomen. RILP ist für den endo-lysosomalen Abbau notwendig. Es hält Rab7 an den endo- bzw. lysosomalen Membranen, indem es dessen Dissoziation ins Zytoplasma verhindert und so das Rab7-Signal verstärkt (Jordens et al. 2001). Eine weitere Funktion von RILP ist der Transport der späten Endosomen entlang der Mikrotubuli hin zum MTOC (*microtubule-organizing center*), der durch die Interaktion von RILP mit Dynein-Dynaktin-Motorkomplexen gewährleistet wird (Jordens et al. 2001). Zudem ist RILP als Regulator an der Morphogenese von MVBs beteiligt, da es die ESCRT-II-Untereinheiten Vps22 und Vps36 rekrutiert (Wang und Hong 2006) und seine Depletion die Abschnürung von ILVs blockiert (Progida et al. 2006). RILP ist auch an Membran-Fusions-Prozessen beteiligt, da die Fusion von Phagosomen mit späten Endosomen bzw. Lysosomen anhängig von der

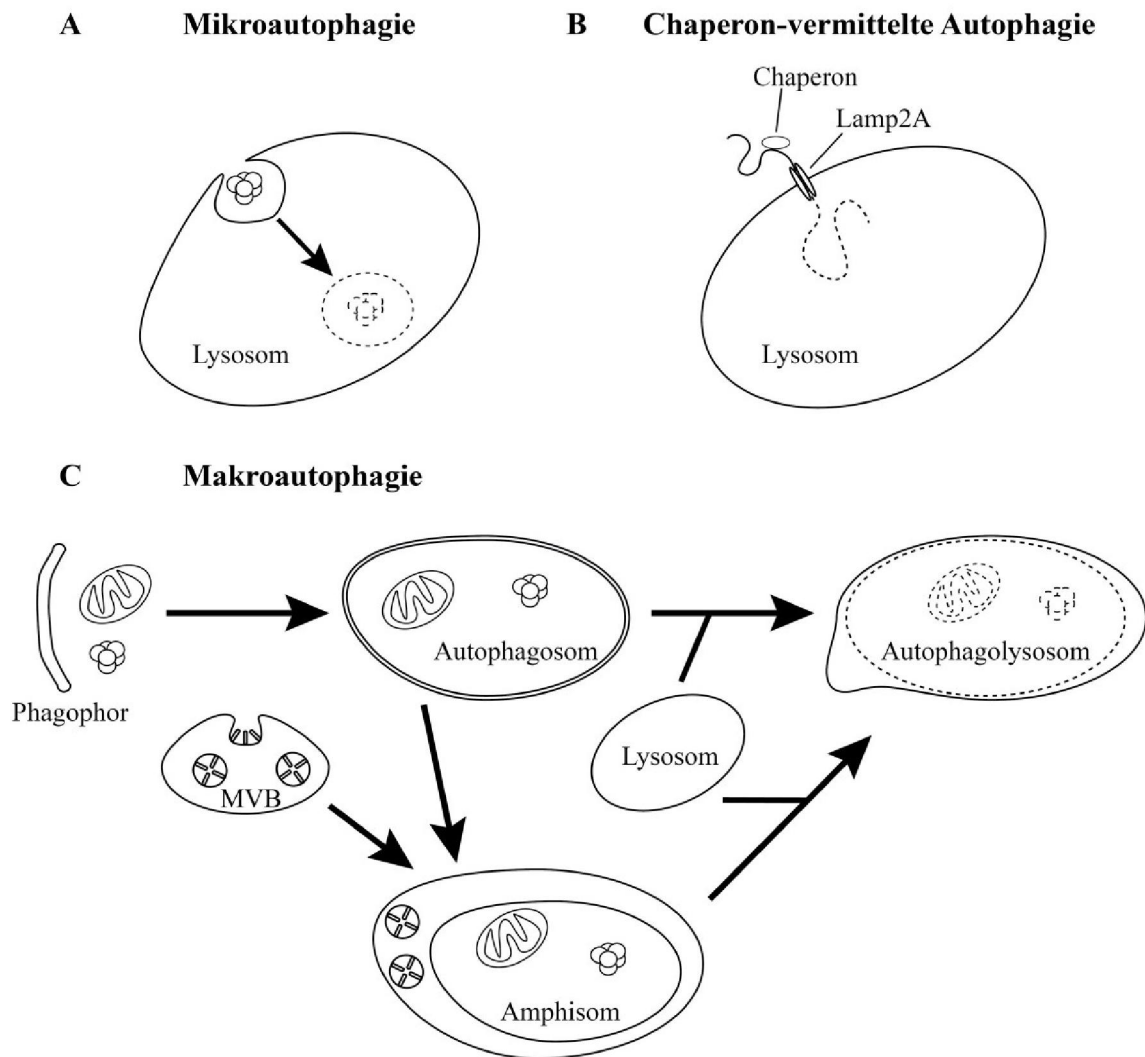
Interaktion von Rab7 mit RILP ist (Sun et al. 2007). Der zum Minus-Ende der Mikrotubuli hin gerichtete Transport von Endosomen und auch Autophagosomen erfolgt über den Rab7-Effektor RILP. Rab7 steuert jedoch auch den zum Plus-Ende der Mikrotubuli erfolgenden Transport über seinen Effektor FYCO1 (*FYVE and coiled-coil domain-containing protein 1*), der mit Kinesin-Motoren interagiert. Endosomen und Autophagosomen werden zunächst während ihrer Reifung zur Zellperipherie und später zur perinuklearen Region transportiert. (Hyttinen et al. 2013)

Generell ist Rab7 ein multifunktionaler Regulator des endo-lysosomalen Transportsystems und der Autophagie. Autophagosomen sind mit Rab7 markiert und ihre Fusion mit den Lysosomen ist abhängig von Rab7. (Hyttinen et al. 2013)

Rab7B katalysiert ähnlich wie Rab9 das *recycling* von späten Endosomen bzw. Lysosomen zum TGN, ist aber im Vergleich zu Rab7 nur wenig erforscht. Rab7B kann nicht mit RILP interagieren und hat keinen Einfluss auf den endo-lysosomalen Abbauweg. (Progida et al. 2010; Bucci et al. 2010)

## 1.4 Autophagie

Der Begriff Autophagie leitet sich aus dem Griechischen (*auto* = selbst; *phago* = essen) ab und beschreibt den lysosomalen Abbau zelleigener Strukturen zur Gewinnung von katabolischen Metaboliten (Duve und Wattiaux 1966). Autophagie ist jedoch kein rein nicht-selektiver Prozess zur Anpassung der Zelle an Nährstoffmangel, sondern besitzt zytrotektive Funktionen zur Aufrechterhaltung der zellulären Homeostase. Die basale Autophagie zur Aufrechterhaltung der Homeostase findet unter normalen Wachstumsbedingungen statt und ist selektiv. Sie dient z.B. dem Abbau von Protein-Aggregaten und beschädigte Zellorganellen. Je nach selektivem Substrat der Autophagie bezeichnet man sie als Mitophagie (Mitochondrien), Pexophagie (Peroxisomen), Aggrephagie (Protein-Aggregate), Retikulophagie (endoplasmatisches Retikulum; ER), Ribophagie (Ribosomen) und Xenophagie (Bakterien, Viren). (Johansen und Lamark 2011) Defekte in der Autophagie sind mit der Entstehung von Krebs, neurodegenerativen Krankheiten, mikrobiellen Infektionen, sowie der Zellalterung und dem Zelltod verknüpft (Mizushima 2007).



#### Abbildung 6: Autophagie

Es gibt drei Arten der Autophagie: Mikroautophagie, Chaperon-vermittelte Autophagie (CMA) und Makroautophagie. (A) Mikroautophagie – Autophagie-Substrate werden am Lysosom selbst invaginiert und lysosomal abgebaut. (B) CMA – Chaperone führen Proteine an den CMA-Rezeptor Lamp2A heran, welcher sie über die Membran in das Lumen der Lysosomen hinein transportiert. (C) Makroautophagie – Phagophore umschließen zytosolische Material, wodurch Autophagosomen entstehen. Autophagosomen können mit MVBs zu Amphisomen fusionieren. Der lysosomale Abbau der Autophagie-Substrate erfolgt nach Fusion des Amphisoms bzw. Autophagosoms mit dem Lysosom.

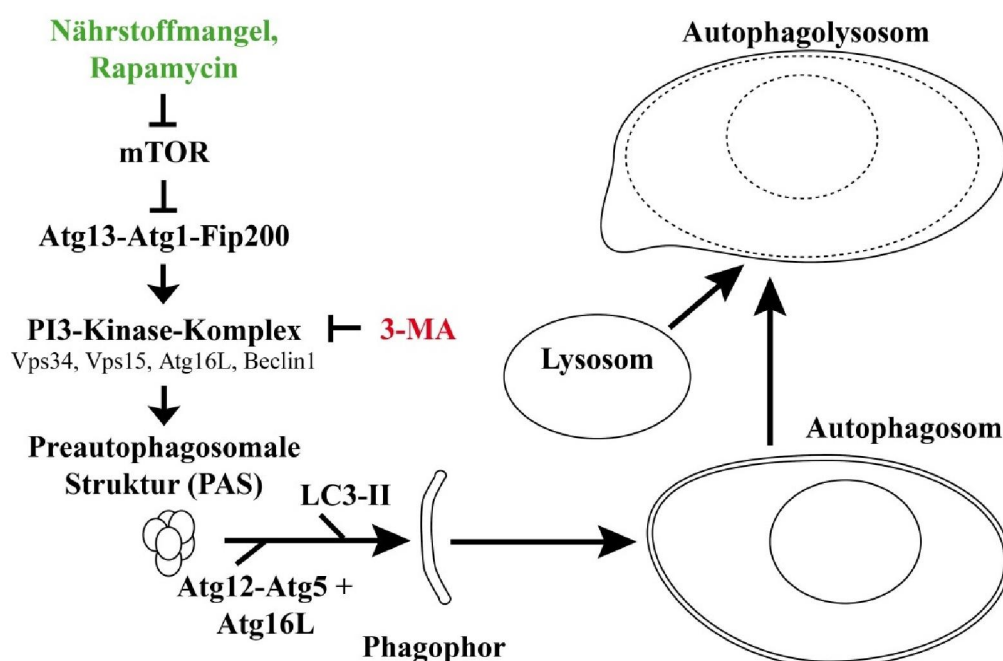
Man unterscheidet drei Arten der Autophagie (Abbildung 6): Makroautophagie, Mikroautophagie und Chaperon-vermittelte Autophagie (CMA, *chaperone-mediated autophagy*). Bei der Mikroautophagie und der CMA werden zytosolische Proteine direkt in das Lysosom aufgenommen. Dies erfolgt im Falle der Mikroautophagie durch Invagination und Abschnürung von Vesikeln in das Lumen der Lysosomen hinein, während bei der CMA zytosolische Proteine von Chaperonkomplexen (u.a. Hsc70) erkannt und durch den CMA-Rezeptor Lamp2A (*lysosome-associated membrane protein type-2A*) über die Lysosomenmembran transportiert werden. Die Makroautophagie (im Folgenden nur noch

Autophagie genannt) ist ein Prozess, bei dem zytoplasmatisches Material von einer Membran, dem Phagophor, umschlossen wird, wodurch ein Autophagosom entsteht. Autophagosomen können mit MVBs zu Amphisomen verschmelzen. Autophagosomen und Amphisomen fusionieren mit Lysosomen zu Autolysosomen und setzen ihren Inhalt somit dem lysosomalen Abbau aus. (Mizushima 2007)

Verschiedene Stress-Faktoren können in eukaryotischen Zellen zur Induktion der Autophagie führen. Eine genaue Regulation der Autophagie ist für die Aufrechterhaltung der Homeostase innerhalb der Zelle essentiell. Die Induktion der Autophagie umfasst drei Signalkomplexe und zwei Ubiquitin-ähnliche (UBL, *ubiquitin-like*) Konjugationssysteme. (Abbildung 7) Der mTOR-Komplex (*mammalian target of rapamycin*) ist ein Sensor für den zellulären Energie- und Aminosäurehaushalt. mTOR ist eine Serin-Threonin-Kinase, die in aktiver, phosphorylierter Form die Autophagie inhibiert und bei Nährstoffmangel dephosphoryliert wird. Rapamycin ist ein Inhibitor von mTOR und wird daher zur Induktion der Autophagie verwendet. Ein weiterer Signalkomplex ist der Atg1-Atg13-FIP200-Komplex (Atg = autophagy-related; FIP200 = *focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kD*), der an der Nukleation der Phagophore beteiligt ist und erst nach der Inaktivierung von mTOR gebildet werden kann. Er induziert die Phagophor-Bildung, indem er den anterograden Transport von nachgeschalteten Faktoren und Bausteinen für die Phagophor-Nukleation vermittelt. Der dritte Signalkomplex ist ein PI3-Kinase-Komplex, wobei es in Säugern drei verschiedene Formen gibt, die unterschiedliche Funktionen ausüben. Beclin-1, Atg16L, Vps34 und p150 induzieren die Phagophor-Bildung, während der Komplex mit UVRAG anstelle von Atg16L die Fusion der Autophagosomen mit den Lysosomen vermittelt. Die Bindung von Rubicon an UVRAG in diesem Komplex inhibiert hingegen die Autophagie. Der Phagophor-induzierende PI3-Kinase-Komplex wird durch den Atg1-Atg13-Komplex aktiviert. 3-Methyladenin (3-MA) ist ein Inhibitor des PI3-Kinase-Komplexes und wird daher häufig als Inhibitor der Autophagie verwendet. (Fader und Colombo 2009; Hamasaki und Yoshimori 2010; Kim et al. 2010)

Nach Bildung der prä-autophagosomalen Struktur vermitteln die beiden UBL-Konjugationssysteme das Wachstum des Phagophors und die Autophagosomen-Bildung. Ähnlich wie bei der Ubiquitinierung erfolgt die Konjugation in drei Schritten: der Aktivierung durch das Enzym E1, die Konjugation durch E2 und die Ligation durch E3. Die UBL-Konjugationssysteme sind notwendig für die Autophagosomen-Bildung, werden jedoch nicht durch Nährstoffmangel induziert und sind konstitutiv aktiv. Zunächst werden Atg12 und Atg5 miteinander konjugiert, wobei Atg7 als E1 und Atg10 als E2 wirkt. Ein

E3-Enzym ist für diese Konjugation bisher nicht bekannt. Das Atg12-Atg5-Konjugat interagiert mit Atg16L. Durch das zweite UBL-Konjugationssystem werden LC3- (*microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3*) bzw. GABARAP-Proteine (*γ-aminobutryate receptor associated protein*) mit Phosphatidylethanolamin (PE) verknüpft, wobei Atg7 als E1 und Atg3 als E2 wirkt. Als E3 für diese Konjugation dient der Atg12-Atg5-Atg16L-Komplex. Vor der Konjugation wird das synthetisierte pro-LC3 durch Atg4 so gespalten, dass das dadurch entstehende LC3-I ein C-terminales Glycin aufweist. LC3-I ist zytoplasmatisch lokalisiert. Nach der Konjugation mit PE liegt LC3 als LC3-II mit der Phagophor-Membran assoziiert vor. LC3-II ist essentiell für das Phagophor-Wachstum. Im Anschluss an die Autophagosomen-Bildung wird das an der zytoplasmatischen Seite der Autophagosomen lokalisierte LC3-II durch Atg4 als LC3-I in das Zytoplasma zurück geführt, während das LC3-II an der Innenseite der Autophagosomen nach Fusion mit den Lysosomen abgebaut wird. (Mariño und López-Otín 2004; Kim et al. 2010; Shaid et al. 2013)



**Abbildung 7: Regulation der Autophagie**

Die Induktion der Autophagie ist strikt reguliert. Die drei Signalkomplexe mTOR, Atg13-Atg1-FIP200 und PI3-Kinase-Komplex spielen bei der Nukleation des Phagophors eine wichtige Rolle. mTOR übernimmt dabei die Funktion eines negativen Regulators der Autophagie. Seine Inaktivierung durch z.B. Nährstoffmangel aktiviert den nachgeschalteten Atg13-Atg1-FIP200-Komplex. Dieser aktiviert wiederum den PI3-Kinase-Komplex und rekrutiert ihn und andere Faktoren zur präautophagosomalen Membran. Das Wachstum des Phagophors und die Reifung zum Autophagosom wird durch Atg12-Atg5-Atg16L und LC3-II vermittelt. Autophagosomen fusionieren dann mit Lysosomen.

Die Frage, woher die Membran für die Phagophor- und Autophagosomen-Bildung stammt, ist noch nicht genau geklärt. Jedoch werden das ER und das TGN als Hauptquellen diskutiert. (Hamasaki und Yoshimori 2010) Rab33 ist am Golgi-Apparat lokalisiert und kann mit Atg16L interagieren, weshalb Rab33 als Vermittler von Golgi-Vesikeln zum Phagophor gilt (Fukuda 2008). Zudem werden u.a. AP-1 und Clathrin eine Rolle im Membran-Transport vom TGN zum Phagophor zugeschrieben (Guo et al. 2012).

### 1.4.1 Selektive Autophagie

Neben der Rolle im Phagophor-Wachstum spielt LC3-II auch eine wichtige Rolle in der selektiven Autophagie. Die Selektivität wird dabei durch Autophagie-Adapter vermittelt.

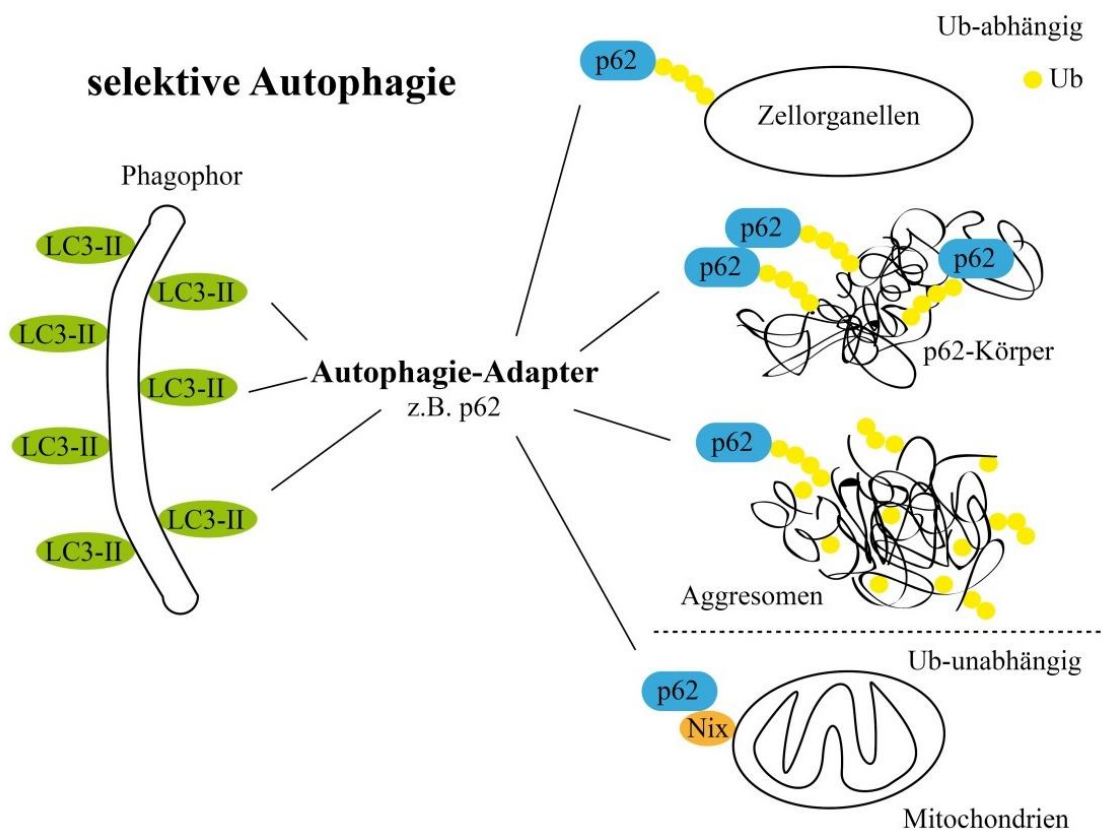
Substrate für den Abbau durch Autophagie werden, ähnlich wie für den Abbau im Proteasom oder im Lysosom über den endo-lysosomalen Weg, durch Ubiquitinierung markiert. Ubiquitinierung durch Poly-K<sub>48</sub>-Ubiquitin-Ketten dienen dabei meist der Markierung für den Abbau im Proteasom, während Monoubiquitinierungen in der Regel Substrate des endo-lysosomalen Transport-Systems markieren und Poly-K<sub>63</sub>-Ubiquitin-Ketten als Marker für Autophagie-Substrate dienen. Diese Unterscheidung ist jedoch stark vereinfacht. (Kirkin et al. 2009b; Shaid et al. 2013)

Autophagie-Adapter besitzen Ubiquitin-bindende Eigenschaften und erkennen somit Autophagie-Substrate. Sie besitzen zudem die Eigenschaft über ein LIR-Motiv (*LC3 interaction region*) mit LC3 zu interagieren. Sie führen so die Autophagie-Substrate an die Phagophore heran und ermöglichen deren Umschließung durch Autophagosomen. Autophagie-Adapter werden in der Regel selbst durch Autophagie abgebaut. Autophagie-Substrate sind z.B. Zellorganellen oder falsch gefaltete Proteine, die vor ihrem Abbau durch Autophagie in Aggregaten konzentriert werden. (Abbildung 8) (Johansen und Lamark 2011; Shaid et al. 2013)

Der am besten charakterisierte Autophagie-Adapter ist p62. p62 besitzt drei für seine Funktion als Autophagie-Adapter wichtige Domänen: eine UBA-Domäne (*ubiquitin-associated*) mit einer höheren Affinität für Poly-K<sub>63</sub>- als Poly-K<sub>48</sub>-Ubiquitin-Ketten, eine PB1-Domäne (*Phox/Bem1p*), über die p62 mit anderen Autophagie-Adaptoren (z.B. NBR1, *neighbour of breast cancer 1*) interagieren bzw. oligomerisieren kann, und ein LIR-Motiv für die Interaktion mit LC3 (Pankiv et al. 2007). Neben der Bindung von Autophagie-Substraten und LC3 ist die Fähigkeit zur Oligomerisierung bzw. die Interaktion mit anderen Autophagie-Adaptoren wichtig, da falsch gefaltete Proteine vor dem Abbau durch Autophagie

zunächst konzentriert werden müssen. Protein-Aggregate, die durch p62 gebildet werden, nennt man p62-Körper. Es gibt auch einen Ubiquitin-unabhängigen selektiven Abbau durch Autophagie, der von p62 vermittelt ist (z.B. über die direkte Interaktion mit dem mitochondrialen Protein Nix). Dieser stellt jedoch eine Ausnahme dar. (Johansen und Lamark 2011)

Weitere Autophagie-Adapter sind z.B. NBR1, welches ähnlich wie p62 aufgebaut ist und funktioniert, und HDAC6 (*histone deacetylase 6*), welches durch hydrophobe Wechselwirkung entstandene, ubiquitinierte Protein-Aggregate bindet und entlang der Mikrotubuli zum MTOC transportiert, wo diese weiter zu Aggresomen konzentriert werden. HDAC6 besitzt im Gegensatz zu p62 und NBR1 kein LIR-Motiv und wird ausschließlich zur Bildung der Aggresomen benötigt, während p62 bzw. NBR1 anschließend ihren Abbau durch Autophagie vermitteln. (Kirkin et al. 2009b; Shaid et al. 2013)



**Abbildung 8: Autophagie-Adapter vermitteln die selektive Autophagie**

Autophagie-Adapter vermitteln die Selektivität der Autophagie, indem sie sowohl Autophagie-Substrate als auch das mit dem Phagophor assoziierte Protein LC3-II binden. Die Erkennung der Autophagie-Substrate erfolgt in der Regel über ihre Ubiquitinierung. p62 ist der am besten untersuchte Autophagie-Adapter und vermittelt den Ubiquitin-abhängigen Abbau durch Autophagie von verschiedenen Zellorganellen (z.B. Mitochondrien, Peroxisomen), sogenannten p62-Körpern und Aggresomen (beides Protein-Aggregate, die entweder p62-abhängig oder -unabhängig gebildet werden). In Ausnahmefällen kann auch eine direkte Interaktion des Autophagie-Adapters zum Abbau durch Autophagie führen (z.B. durch das mitochondriale Protein Nix, welches mit p62 interagiert).



## 1.5 Zielsetzung der Arbeit

Das Protein  $\gamma 2$ -Adaptin wurde erstmals 1998 von Takatzu *et al.* und Lewin *et al.* beschrieben und seine physiologische Funktion ist bis heute noch weitgehend unklar.  $\gamma 2$ -Adaptin besitzt eine starke Homologie zu  $\gamma 1$ -Adaptin, einer großen Untereinheit des AP1-Komplexes. Jedoch deutet bisher alles darauf hin, dass sich die beiden Proteine trotz ihrer sequentiellen und strukturellen Ähnlichkeit funktionell voneinander unterscheiden.

$\gamma 2$ -Adaptin wurde mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems als Interaktionspartner des großen (L) Hüllproteins von HBV identifiziert (Hartmann-Stühler und Prange 2001). Seine spezifische Funktion bei der HBV-Morphogenese ist relativ gut charakterisiert. Hierbei fungiert  $\gamma 2$ -Adaptin als ein Adapter zwischen seinen beiden Interaktionspartnern HBV-L und -Core und ist damit notwendig für die Freisetzung von HBV (Rost et al. 2006).

Neben seiner spezifischen Funktion bei der HBV-Morphogenese und seiner Homologie zu  $\gamma 1$ -Adaptin deuten auch weitere Erkenntnisse darauf hin, dass  $\gamma 2$ -Adaptin als monomerer Adapter fungieren könnte.  $\gamma 2$ -Adaptin besitzt ein Clathrin- und ein Ubiquitin-Interaktionsmotiv (UIM), welches die Bindung an ubiquitinierte Proteine vermittelt (Rost et al. 2008). Die Vermutung, dass  $\gamma 2$ -Adaptin als Ubiquitin-Adapter wirken könnte, wird dadurch bestätigt, dass  $\gamma 2$ -Adaptin selbst ubiquitiniert werden kann und in Ubiquitin-abhängiger Weise mit der Ubiquitin-Ligase Nedd4 interagiert (Rost et al. 2008). Dieser als *coupled monoubiquitination* bezeichnete Prozess ist typisch für Ubiquitin-Adapter (Haglund und Stenmark 2006). Zudem konnte auch ein Zusammenhang von  $\gamma 2$ -Adaptin mit multivesikulären Endosomen (MVBs) (Lambert et al. 2007) und der ESCRT-Kaskade (Döring et al. 2010) nachgewiesen werden. Dies alles deutet darauf hin, dass  $\gamma 2$ -Adaptin als Ubiquitin-Adapter im endo-lysosomalen System fungieren könnte.

Ziel der Arbeit war es, die physiologische Funktion von  $\gamma 2$ -Adaptin zu charakterisieren und zu klären, ob es sich bei  $\gamma 2$ -Adaptin tatsächlich um einen Spieler im endo-lysosomalen Proteintransport handelt. Daher sollten endogene und exogene Substrate des endo-lysosomalen Abbauweges unter Bedingungen der  $\gamma 2$ -Depletion und -Überexpression untersucht werden. Als endogene Substrate wurden dabei EGF und ubiquitinierte Proteine ausgewählt, da EGF bzw. der EGFR zu den am besten untersuchten Substraten dieses Abbauweges zählt und die Ubiquitinierung sowohl als Sortierungssignal in diesem Transportsystem dient, als auch von  $\gamma 2$ -Adaptin über sein UIM erkannt werden kann. Umhüllte Viren nutzen die ESCRT-Kaskade zur extrazellulären Ausschleusung und daher sollte die retrovirale Virus-Morphogenese von MLV.gag als exogenes Substrat im endo-

lysosomalen System betrachtet werden. MLV.gag wurde deshalb ausgewählt, weil es nicht nur ESCRT-abhängig freigesetzt wird, sondern auch in das Lumen der MVBs hinein und nicht an der Plasmamembran knospt. Mit Hilfe von MLV.gag als Modell sollten auch verschiedene  $\gamma 2$ -Mutanten untersucht werden, um funktionell wichtige Domänen in  $\gamma 2$ -Adaptin zu identifizieren und zu kartieren. Potentielle Interaktionspartner von  $\gamma 2$ -Adaptin sollten anhand von Protein-Protein-Interaktionsstudien identifiziert und charakterisiert werden.

Rab7 erfüllt wichtige Funktionen im endo-lysosomalen System (Bucci et al. 2000). Daher sollte die Rolle von  $\gamma 2$ -Adaptin im Vergleich zu der von Rab7 näher untersucht werden, welches u.a. die Fusion der MVBs mit den Lysosomen katalysiert (Vanlandingham und Ceresa 2009b).

Es sollten charakteristische Merkmale für  $\gamma 2$ -Substrate, die dem Lysosom zugeführt werden, mittels *screening* gefunden und die Frage geklärt werden, ob und auf welchem Weg  $\gamma 2$ -Adaptin Substrate dem lysosomalen Abbau zuführt.

## 2 Material

### 2.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, sofern im Text nicht anders erwähnt, von den Firmen Life Technologies GmbH (Darmstadt), Merck KGaA (Darmstadt), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen.

### 2.2 Puffer und Lösungen

Die Puffer und Lösungen wurden, soweit nicht anders vermerkt, nach den Protokollen in *Molecular cloning: a laboratory manual* (Sambrook et al. NY : Cold Spring Harbor Laboratory Press) und *Current protocols in molecular biology Vol. 1-3* (Ausubel) angefertigt.

### 2.3 Reagenzien und Kits

Die im Folgenden aufgeführten Reagenzien und Kits wurden nach Herstellerangaben eingesetzt:

Cytotoxicity Detection Kit <sup>PLUS</sup>	Roche
Dynabeads <sup>®</sup> M-280 Sheep anti-Mouse IgG	Life Technologies
EGF Alexa Fluor 488	Molecular Probes
Fluoprep	bioMérieux
High Pure PCR Product Purification Kit	Roche
Lipofectamine <sup>™</sup> Reagent	Life Technologies
Lipofectamine <sup>™</sup> RNAiMax	Life Technologies
3-Methyladenin (3-MA)	Sigma-Aldrich
peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I	peqlab
PLUS <sup>™</sup> Reagent	Life Technologies
QuickChange <sup>®</sup> Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene
Rapamycin (2,5 mg/ml)	Sigma-Aldrich
Rapid DNA Dephos & Ligation Kit	Roche
Westernlightning Plus-ECL	PerkinElmer
Xtra Maxi/Midi Kit	NukleoBond

## 2.4 Enzyme

Alkalische Phosphatase (CIP)	New England BioLabs
DNA Polymerase I (Klenow)	New England BioLabs
PfuUltra™ HF DNA Polymerase	Stratagene
Restriktionsendonukleasen	New England BioLabs
T4 DNA Ligase	Fermentas
T7 Gen 6 Exonuklease	New England BioLabs
Trypsin (2,5%)	BioWhittaker

## 2.5 Organismen

### 2.5.1 Prokaryotische Zellen

<i>E.coli</i> NEB5α	chemisch kompetente Zellen; bezogen von New England BioLabs
<i>E.coli</i> DH5α	chemisch kompetente Zellen; konditioniert nach Inoue <i>et al.</i> (1990)

### 2.5.2 Eukaryotische Zellen

HuH-7 Zellen	humane Hepatoma-Zelllinie (JCRB Cell Bank)
--------------	--

## 2.6 Medien und Medienzusätze

### 2.6.1 Bakterienkultur

LB-Medium (Luria-Bertani-Medium)	0,5 % Hefeextrakt
	1 % Trypton
	1 % NaCl
	5 mM NaOH
LB-Agarplatten	1,5 % Agar in LB-Medium

## 2.6.2 Zellkultur

Ciprofloxacin Kabi 2 mg/ml (5 µg/ml)	Fresenius Kabi
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; High Glucose 4,5 g/l + L-Glutamine)	PAA Laboratories
EBSS (Earle's Balanced Salt Solution)	Life Technologies
FCS (Fötale Kälberserum) (10 % v/v)	Life Technologies
OPTIMEM <sup>®</sup> I + GlutaMax <sup>™</sup> -I	Life Technologies

## 2.7 Oligonukleotide und siRNAs

Die verwendeten Oligonukleotide und siRNAs wurden von den Firmen Life Technologies und Sigma-Aldrich und die *siGENOME smart pools* von Thermo Scientific bezogen.

### 2.7.1 Sequenzierungsprimer

Tabelle 2: Sequenzierungsprimer

Name	Sequenz 5'→3'
CMV-forward	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG
APIG2_SEQ-P_F1	GTGGCTCTGACATCTTTGTT

## 2.7.2 Mutageneseprimer

**Tabelle 3: Mutageneseprimer**

Veränderungen in der Nukleotidsequenz sind rot markiert und eingeführte diagnostische Restriktionsschnittstellen unterstrichen. Sind keine zusätzlichen Restriktionsschnittstellen markiert, kommt es durch die Mutation zu einem Verlust einer bereits vorhandenen Schnittstelle. Modifikationen der Primer durch Phosphorothioat sind mit \* nach dem modifizierten Nukleotid markiert.

Name	Sequenz 5'→3'
GFP-8.f	GGCATGGACGAGCTGTACAAG <u>TGCATCAACTGCTGCAAGGTGCT</u> GTAATCAGCCAT ACCACATTTGTAGAGG
GFP-8.r	CCTCTACAAATGTGGTATGGCTGATTA <u>CAGCACCTTGCAGCAGTTGATGCA</u> CTTGT ACAGCTCGTCCATGCC
Rab7 Q67L.f	AGGCCAGGAACGGTTC <u>CTAAGCTT</u> AGGTGTGGCCTTCTACAGAGGTGC
Rab7 Q67L.r	GCACCTCTGTAGAAGGCCACACCT <u>TAAGCTT</u> AGGAACCGTTCCTGGCCT
Rab7 ΔC.f	GCAGAAAGC <u>GCT</u> AGT <u>GCCT</u> GAGCGGCCGCC
Rab7 ΔC.r	GGCGGCCGCTCAG <u>GC</u> ACT <u>AGC</u> GCTTTCTGC
γ2.LIR.f	GAGCCCCTT <u>A</u> AGGTGGACGAAGAGGAA <u>TGGACGC</u> ACTTGTGGAAAAGGTG
γ2.LIR.r	CACCTTTTCCAGCAAGT <u>GCCT</u> CATTCTCTTCGTCCACCT <u>TAAG</u> GGGCTC
γ2.Stop501.f	TGCGAGGAGATTGAGCCCCTT <u>AAGT</u> AGGACGAAGAGGAAGTGCT
γ2.Stop501.r	AGCACTTCCTCTTCGTCC <u>TACTTAAG</u> GGGCTCAATCTCCTCGCA
γ2_C180T.f	CCTCCCACCC <u>ACC</u> GCCCAACTGC
γ2_C180T.r	GCAGTTGGGC <u>GGT</u> GGGTGGGAGG
γ2_HpaI@220.f	GTGGTACCC <u>CAGGTTAAC</u> CACATCCTCCGACTCTG
γ2_HpaI@220.r	CAGAGTCCGGAGGATGTG <u>GTTAAC</u> CTGGGGTACCAC
γ2_HpaI@240.f	CACAGCATATCTG <u>TTAAC</u> CAGCGACCCCTTCCTGC
γ2_HpaI@240.r	GCAGGAAGGGTTCGCTG <u>TTAAC</u> CAGATATGCTGTG
γ2_HpaI@260.f	CGGATCCTGGGCCGG <u>GTTAAC</u> GAGGAGAGCAGTGAGACC
γ2_HpaI@260.r	GGTCTCACTGCTCTCCTCGT <u>TAAC</u> CCGGCCAGGATCCG
γ2_HpaI@280.f	GCCACTAACACGGT <u>TTAAC</u> CAGCCGAAATGCCGG
γ2_HpaI@280.r	CCGGCATTTTCGGCTG <u>TTAAC</u> CGTGTTAGTGGC
γ2_NEKNH.f	GCCCAACTGCTT <u>AATGAGAAAAAT</u> CATGGCATCCTGCTGGGC
γ2_NEKNH.r	GCCCAGCAGGATGCCATGAT <u>TTTT</u> TCTCAT <u>TAAG</u> CAGTTGGGC
γ2Δ180-193.f	CCACCCGGCACCA*T*C*A*CGCTGATC
γ2Δ180-193.r	GGTGCCGGGTGGG*A*T*C*A*AAGACACT

## 2.7.3 siRNAs

Tabelle 4: siRNAs

Name	<i>sense</i> -Sequenz 5' → 3'
siAtg16	GAGCAUAGUUCGAGAGAUG UGUGGAUGAUUAUCGAUUA GAUCUACGCAGCAAAGUCU GUACCAAACAGGCACGAGA
siAtg5	GGAAUAUCCUGCAGAAGAA CAUCUGAGCUACCCGGAUA GACAAGAAGACAUUAGUGA CAAUUGGUUUGCUAUUUGA
siLC3b1	GAUAAUAGAACGAUACAAGdTdT
siLC3b2	AGGAGACGUUCGGGAUGAAdTdT
siLC3A	GGACGGCUUCCUCUAUAUG CGGUGAUCAUCGAGCGCAU ACAUGAGCGAGUUGGUCAA CGCCCAUCGCGGACAUCUA
siNedd4-1	CACAUCAACAUGAGCUGAAdTdT
sip62-1	GGGTGCAAGAAGCCATTTdTdT
sip62-3	GGAGGATCCGAGTGTGAATdTdT
siRab33a	GCGAGAAGAUCAAGGUUCA GUGCUUGGCUUGCCGAUUG GCAUUACUACCGCAACGUA AGAAAUCCUGCUGUAUCG
siRab33b	CACAAACCAUUAUUGCUUA GAUAGAAGAAUGCAAACAA GAUAUACCACGGAUUCUUG GGUGGAUUUCCGAGAACGA
siRab7a-1	GGAUGACCUCUAGGAAGAAdTdT
siRab7a-3	CUAGAUAGCUGGAGAGAUGdTdT
siRab7b	UCACCGACCUGGAGUCUUU UACCAGAGCAUCUUAGAAA UAUCAUAUUGGGUGACACA GAGCCAUUGGUGUGGGAAA
siγ2	AAACCCUGCUUUGCUGUAAUdTdT
siγ2-S1	GGAGUACAGCUGAAUCUGUdTdT
siγ2-S2	GAGGUUUGCUCCAACCAAAdTdT

## 2.8 Vektoren

Tabelle 5: Bei der DNA-Transfektion eingesetzte Vektoren

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz
$\gamma 2$ -HA	pcDNA3-HA- $\gamma 2$	(Takatsu et al. 1998)
$\gamma 2$ _C180T	Punktmutante von $\gamma 2$ -HA mit AS-Austausch an Position 180 (C-T) durch Mutageneseprimer $\gamma 2$ _C180T.f und $\gamma 2$ _C180T.r	
$\gamma 2\Delta 1$ -522	pcDNA3-HA- $\gamma 2\Delta 1$ -522	(Rost et al. 2008)
$\gamma 2\Delta 120$ -300	Deletionsmutante von $\gamma 2$ -HA, bei der die Region AS 120-300 durch Restriktion entfernt wurde	
$\gamma 2\Delta 180$ -193	Deletionsmutante, bei der die Region AS 180-193 durch Mutagenese ( $\gamma 2\Delta 180$ -193.f und $\gamma 2\Delta 180$ -193.r) entfernt wurde	
$\gamma 2\Delta 180$ -300	Deletionsmutante von $\gamma 2$ -HA, bei der die Region AS 180-300 durch Restriktion entfernt wurde	
$\gamma 2\Delta 220$ -300	Deletionsmutante von $\gamma 2$ -HA, bei der zunächst an Position AS 220 eine HpaI-Schnittstelle eingeführt wurde ( $\gamma 2$ _HpaI@220.f und $\gamma 2$ _HpaI@220.r) und anschließend die Region AS 220-300 durch Restriktion entfernt wurde	
$\gamma 2\Delta 240$ -300	Deletionsmutante von $\gamma 2$ -HA, bei der zunächst an Position AS 240 eine HpaI-Schnittstelle eingeführt wurde ( $\gamma 2$ _HpaI@240.f und $\gamma 2$ _HpaI@240.r) und anschließend die Region AS 240-300 durch Restriktion entfernt wurde	
$\gamma 2\Delta 260$ -300	Deletionsmutante von $\gamma 2$ -HA, bei der zunächst an Position AS 260 eine HpaI-Schnittstelle eingeführt wurde ( $\gamma 2$ _HpaI@260.f und $\gamma 2$ _HpaI@260.r) und anschließend die Region AS 260-300 durch Restriktion entfernt wurde	
$\gamma 2\Delta 280$ -300	Deletionsmutante von $\gamma 2$ -HA, bei der zunächst an Position AS 280 eine HpaI-Schnittstelle eingeführt wurde ( $\gamma 2$ _HpaI@280.f und $\gamma 2$ _HpaI@280.r) und anschließend die Region AS 280-300 durch Restriktion entfernt wurde	
$\gamma 2\Delta 528$ -785	pcDNA3-HA- $\gamma 2\Delta 528$ -785	(Hartmann-Stühler und Prange 2001)
$\gamma 2\Delta$ UIM	pcDNA3-HA- $\gamma 2\Delta$ UIM	(Rost et al. 2006)
$\gamma 2$ .LIR	Punktmutante von $\gamma 2$ -HA mit Veränderungen im potentiellen LIR-Motiv (Optimierung zur LIR-Konsensussequenz)	
$\gamma 2$ _NEKNH	Punktmutante von $\gamma 2$ -HA, bei der die AS HERHH innerhalb der Region 180-193 von $\gamma 2$ -HA zu NEKNH aus der korrespondierenden Region von $\gamma 1$ -HA substituiert wurden	
$\gamma 2$ .Stop501	Mutante von $\gamma 2$ -HA, bei der an AS-Position 501 ein Stop-Codon eingeführt wurde ( $\gamma 2$ .Stop501.f und $\gamma 2$ .Stop501.r)	



<b><math>\gamma 2:\gamma 1_{300}</math></b>	Mutante von $\gamma 2$ -HA, bei der die AS 120-300 durch die entsprechende Region aus $\gamma 1$ -HA ersetzt wurde	
<b><math>\gamma 1</math>-HA</b>	pcDNA3-HA- $\gamma 1$	(Takatsu et al. 1998)
<b>Alix</b>	pCAGGS.Alix mit N-terminalem HA-Tag	(Sakaguchi et al. 2005)
<b>Alix<math>\Delta</math>Bro</b>	Deletionsmutante von Alix, bei der die Bro-Domäne deletiert wurde	(Bardens et al. 2011)
<b>Alix<math>\Delta</math>V</b>	Deletionsmutante von Alix, der die Ubiquitin-bindende V-Domäne fehlt	(Bardens et al. 2011)
<b>Chmp2A</b>	p3xFlag-CMV-14-Chmp2A	(Döring et al. 2010)
<b>Chmp4B</b>	p3xFlag-CMV-14-Chmp4B	(Döring et al. 2010)
<b>Chmp4C</b>	p3xFlag-CMV-14-Chmp4C	(Döring et al. 2010)
<b>EIAV.gag.GFP</b>	pcDNA3-GFP-EIAV.gag	(Fang et al. 2007)
<b>Eps15 D3</b>	pEGFP-Eps15 D3 Endozytose-defiziente Form von Epsin15	(Spoden et al. 2008)
<b>Eps15 D3<math>\Delta</math>2</b>	pEGFP-Eps15 D3 $\Delta$ 2	(Spoden et al. 2008)
<b>Flag</b>	p3xFlag-CMV-10	Sigma-Aldrich
<b>Flag</b>	p3xFlag-CMV-14	Sigma-Aldrich
<b>GFP-8</b>	pEGFP-C1 mit C-terminaler Signalsequenz für die endo-lysosomale Proteinlokalisierung und -degradation (CINCKVL) von RhoB	
<b>GFP-NLS</b>	pEGFP-GFP-NLS (NLS aus HPV33 L1)	(Giroglou et al. 2001)
<b>GFP-RhoB</b>	pEGFP-C2-RhoB	addgene
<b>HIV.gag.GFP</b>	pEGFP-HIV-1.gag	NIH AIDS Research and Reference Reagent Program
<b>HPV16 L1</b>	pUV3-HPV16-L1	(Leder et al. 2001)
<b>HPV16 L2</b>	pUV3-HPV16-L2	(Leder et al. 2001)
<b>Hsc70.dn</b>	pEGFP-Hsc70.dn	(Florin et al. 2004)
<b>Hsc70.wt</b>	pEGFP-Hsc70.dn	(Florin et al. 2004)
<b>LC3-GFP</b>	pEGFP-LC3B	addgene
<b>LC3-GFP precleaved</b>	pEGFP-LC3B bis AS 120	(Kirkin et al. 2009a)
<b>MLV.gag.YFP</b>	pcDNA3-YFP-MLV.gag	addgene
<b>Nedd4-Flag</b>	pCMV.Flag.Nedd4	(Rost et al. 2008)
<b>pEGFP-C1</b>	pEGFP-C1	Invitrogen
<b>pEGFP-N3</b>	pEGFP-N3	Invitrogen
<b>pEYFP-ER</b>	pEYFP mit einer N-terminalen ER-Zielsequenz aus Calreticulin und einer C-terminalen ER- <i>retrieval sequence</i>	(Mades et al. 2012)
<b>pEYFP-Golgi</b>	pEYFP N-terminal fusioniert mit einem Fragment der humanen $\beta$ -1,4-Galactosyltransferase	(Mades et al. 2012)
<b>Rab4.dn</b>	pEGFP-Rab4a.dn S28N	(Rzomp et al. 2003)
<b>Rab4.wt</b>	pEGFP-Rab4a.wt	(Rzomp et al. 2003)
<b>Rab5.dn</b>	pEGFP-C3-Rab5a.dn S34N	(Sönnichsen et al. 2000)
<b>Rab5.wt</b>	pEGFP-C3-Rab5a.wt	(Sönnichsen et al. 2000)
<b>Rab7.ca.GFP</b>	pEGFP-C1-Rab7A.ca Q67L (Rab7-Q67L.f und Rab7_Q67L.r)	
<b>Rab7<math>\Delta</math>C</b>	pEGFP-C1-Rab7 $\Delta$ C	

	Rab7-Mutante, der die Isoprenylierungsstelle im C-Terminus fehlt (Rab7 $\Delta$ C.f und Rab7 $\Delta$ C.r)	
<b>Rab7.dn.GFP</b>	pEGFP-C1-Rab7A.dn (T22N)	(Vonderheit und Helenius 2005)
<b>Rab7.wt.GFP</b>	pEGFP-C1-Rab7A.wt	(Vonderheit und Helenius 2005)
<b>Rab11.ca</b>	pEGFP-Rab11.ca Q70A	addgene
<b>Rab11.dn</b>	pEGFP-Rab11.dn S25N	addgene
<b>Rab11.wt</b>	pEGFP-Rab11.wt	addgene
<b>Rab33.ca</b>	pEGFP-Rab33.ca Q92L	(Itoh et al. 2008)
<b>Rab33.dn</b>	pEGFP-Rab33.dn T47N	(Itoh et al. 2008)
<b>Rab33.wt</b>	pEGFP-Rab33.wt	(Itoh et al. 2008)
<b>Ub-HA</b>	pHA.Ubiquitin	(Treier et al. 1994)
<b>Vps28</b>	p3xFlag-CMV14-Vps28.wt	(Döring et al. 2010)

## 2.9 Antikörper

### 2.9.1 primäre Antikörper

Tabelle 6: primäre Antikörper

Die primären Antikörper sind mit ihren Verdünnungen im Western Blot (WB) und in der Immunfluoreszenz (IF) angegeben.

Antikörper	Verdünnung		Spezies	Referenz / Bezugsquelle
	WB	IF		
anti -AP1G2	1:2000	1:100	Kaninchen	Sigma
Anti-CD63		1:100	Maus	Santa Cruz
anti -FK2	1:5000	1:200	Maus	BIOMOL
anti -Flag	1:10 000	1:1000	Maus	Sigma
anti -HA		1:100	Ratte	Roche
anti -HA	1:10 000	1:1000	Maus	Babco
anti -JL8	1:10 000		Maus	Clontech
anti -L2-1	1:350		Maus	(Volpers et al. 1995)
anti -LC3	1:2500		Kaninchen	Sigma
anti -Nedd4	1:1000	1:50	Kaninchen	Santa Cruz
anti -Rab5	1:500	1:200	Maus	Santa Cruz
anti -Rab7	1:2500	1:100	Maus	Santa Cruz
anti - $\beta$ -Aktin	1:20 000	1:1000	Maus	Sigma
anti -312F	1:200		Maus	(Volpers et al. 1995)
anti -830	1:5000	1:50	Kaninchen	Eurogentech

### 2.9.2 sekundäre Antikörper

Tabelle 7: Peroxidase-gekoppelte sekundäre Antikörper für den Western Blot

Antikörper	Verdünnung	Spezies	Bezugsquelle
anti -Kaninchen-POX	1:20 000	Ziege	Dianova
anti -Maus-POX	1:20 000	Ziege	Dianova
anti -Ziege-POX	1:20 000	Kaninchen	Dianova

Tabelle 8: Fluorophor-gekoppelte sekundäre Antikörper für die Immunfluoreszenz

Antikörper	Verdünnung		Spezies	Bezugsquelle
anti -Kaninchen-Alexa Fluor®	488	1:250	Ziege	Molecular Probes
	546	1:250	Ziege	Molecular Probes
anti -Maus-Alexa Fluor®	488	1:250	Esel	Molecular Probes
	488	1:400	Ziege	Molecular Probes
	546	1:400	Ziege	Molecular Probes
anti -Maus-DyLight®	549	1:250	Esel	Dianova
anti -Ratte-DyLight®	549	1:250	Ziege	Dianova

## 2.10 DNA-Längen- / Protein-Molekulargewichts-Standard

Als DNA-Längenstandard diente die 1 kb bzw. 50 bp DNA-Leiter von peqlab und als Protein-Molekulargewichtsstandard die *PAGE Ruler<sup>TM</sup> Prestained Protein Ladder* von Fermentas.

## 2.11 Software

AxioVision	Carls Zeiss MicroImaging GmbH (Jena); <a href="http://www.zeiss.com/AxioVision">http://www.zeiss.com/AxioVision</a>
GENtle	Magnus Manske, University of Cologne, licensed under GPL; <a href="http://gentle.magnusmanske.de">http://gentle.magnusmanske.de</a>
NCBI/BLAST	National Center for Biotechnology Information (NCBI), USA; <a href="http://ncbi.nlm.nih.gov/blast">http://ncbi.nlm.nih.gov/blast</a>
TINA	Version 2.09g, 1993, Isotopenmessgeräte GmbH

## 3 Methoden

### 3.1 Molekularbiologische Methoden

Die hier aufgelisteten, grundlegenden molekularbiologischen Methoden wurden in Anlehnung an die Protokolle nach *Molecular cloning: a laboratory manual* (Sambrook et al. NY : Cold Spring Harbor Laboratory Press) und *Current protocols in molecular biology Vol.1-3 (Ausubel)* angewandt. Die Restriktionsendonukleasen und andere Enzyme wurden hierbei nach Herstellerangaben verwendet.

- ❖ das Kultivieren von Bakterien in flüssigen und auf festen Kulturmedien
- ❖ die Lagerung von Bakterien in Glycerin-haltigem Kulturmedium bei -80°C
- ❖ die Herstellung chemisch kompetenter Zellen nach der CaCl<sub>2</sub>-Methode (Inoue et al. 1990)
- ❖ die Ethanol-Fällung der Plasmid-DNA aus wässrigen Lösungen
- ❖ die spektrometrische Bestimmung der DNA-Konzentration wässriger Lösungen
- ❖ die Fragmentierung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen
- ❖ die Manipulation der Enden linearer DNA-Fragmente
  - die Dephosphorylierung mittels *calf intestinal phosphatase* (CIP)
  - das Auffüllen überhängender Enden mittels *Klenow*-Polymerase
- ❖ die Auftrennung von DNA anhand ihrer Größe mittels Agarose-Gelelektrophorese
- ❖ die Transformation von Plasmid-DNA in chemisch kompetente *E.coli*
- ❖ die DNA-Sequenzierung nach Sanger (Sanger et al. 1977)
- ❖ die Proteinfällung mittels Trichloressigsäure (TCA)
- ❖ die Auftrennung von Proteinen gemäß ihrer Größe mittels SDS-PAGE
- ❖ der Transfer von Proteinen auf eine Nitrocellulose-Membran (Western Blot)
- ❖ der Proteinnachweis durch verstärkte Chemilumineszenz (ECL)

Für die folgenden grundlegenden Methoden wurden molekularbiologische Kits verwendet und nach Herstellerangaben eingesetzt.

- ❖ die Präparation von Plasmid-DNA
- ❖ die Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen und Reaktionsansätzen
- ❖ die Ligation von DNA-Fragmenten
- ❖ die gerichtete Mutagenese mittels Polymerase-Ketten-Reaktion

### 3.1.1 Erzeugung von großen Deletionsmutanten mittels modifizierter PCR-Primer

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ist eine Methode zur Vervielfältigung von DNA. Verwendet man hierbei Primer, die sich in der Nukleotidsequenz geringfügig von der Sequenz der eingesetzten DNA unterscheiden, kann man gezielt Mutationen in diese DNA einführen. Dabei kann es sich um die Einführung von Punktmutationen oder kleinen Deletionen bzw. Insertionen (bis zu 25 Nukleobasen) handeln. Für das Einfügen größerer Deletionen wird standardmäßig die Restriktion und Ligation angewandt. Größere Deletionen können jedoch auch mittels PCR erzeugt werden. Hierzu verwendet man Primer, deren Nukleotide zum Teil über Phosphorothioat-Bindungen verknüpft sind (Stoyanova et al. 2004). Diese Primer werden so konstruiert, dass die Deletion ausgespart wird und die beiden die Deletion flankierenden Nukleotidpaare über Phosphorothioat-Bindungen verbunden sind. Nach der PCR und dem anschließenden Dpn1-Verdau erfolgt der Verdau mittels der T7 Gene 6 Exonuklease. Diese Exonuklease baut DNA in 5'→3'-Richtung ab, kann aber die Phosphorothioat-Bindungen nicht angreifen, so dass ein offenes Plasmid entsteht. Diesem fehlt die zu deletierende Region und es weist überhängende Enden auf, die nach der Transformation in kompetente *E.coli* ligiert werden.

### 3.1.2 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde von der Firma StarSEQ® Sequencing Service in Mainz mit Hilfe der in Tabelle 2 aufgeführten Sequenzierungsprimer durchgeführt.

## 3.2 Zellbiologische Methoden

In der Zellkultur werden alle Arbeiten unter sterilen Bedingungen an Zellkultur-Werkbänken durchgeführt, um Kontaminationen zu vermeiden. Es werden ausschließlich sterile Lösungen und Verbrauchsmaterialien verwendet.

### 3.2.1 Kultivierung und Lagerung von HuH-7 Zellen

Die HuH-7 Zellen wurden in DMEM mit 10 % FCS und 5 µg/ml Ciprofloxacin bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank kultiviert. Die Zellen wurden zwei Mal wöchentlich passagiert, um ihnen eine ausreichende Substratfläche für optimale Wachstumsbedingungen zu bieten. Hierzu wurden die Zellen mit PBS / 2,5 mM EDTA und 0,25 % Trypsin überschichtet, die Lösung abgenommen und die Zellen für 5 Minuten im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in frischem Zellkulturmedium resuspendiert. Für die weitere Kultivierung wurde 1/10 der Zellsuspension mit frischem Zellkulturmedium in eine Zellkulturflasche überführt.

Häufiges Passagieren schädigt die Effizienz der Zelllinie, daher wurden in Abständen von maximal 2 Monaten frische Zellen in Kultur genommen. Die Lagerung der HuH-7 Zellen erfolgte in DMEM mit 10 % DMSO in flüssigem Stickstoff, wobei die Zellen zunächst für mindestens 24 Stunden bei -70°C eingefroren wurden.

### 3.2.2 Transfektion von DNA

Die DNA-Transfektion bezeichnet das Einbringen von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen und wurde nach dem Prinzip der Lipofektion, der Transfektion mit kationischen Lipiden (Hawley-Nelson und Ciccarone 2001), durchgeführt. Hierfür wurden die Reagenzien Lipofectamine<sup>TM</sup> und PLUS<sup>TM</sup> von Life Technologies eingesetzt, wobei ein für HuH-7 Zellen optimiertes Protokoll verwendet wurde (Tabelle 9).

Die HuH-7 Zellen wurden am Tag vor der DNA-Transfektion so ausgesät, dass sie zum Zeitpunkt der Transfektion zu 80 % konfluent vorlagen. Zunächst wurde in einem Ansatz die DNA mit dem PLUS<sup>TM</sup>-Reagenz und in einem anderen das Lipofectamine<sup>TM</sup>-Reagenz in OptiMem<sup>®</sup> verdünnt. Beide Ansätze wurden nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur vereint und für weitere 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurde das Zellkulturmedium von den HuH-7 Zellen abgenommen und durch OptiMem<sup>®</sup> ersetzt, zu welchem der Transfektionsansatz nach Ende der Inkubation

zugegeben wurde. Nach vierstündiger Inkubation bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> wurde der Optimem<sup>®</sup>-Transfektionsansatz durch Zellkulturmedium ersetzt und die HuH-7 Zellen bis zur weiteren Aufarbeitung bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

Tabelle 9: Mengenangaben zur DNA-Transfektion in HuH-7 Zellen mittels Lipofectamine<sup>™</sup>/PLUS<sup>™</sup>

Kulturschale	DNA + Optimem <sup>®</sup>	PLUS <sup>™</sup>	Lipofectamine <sup>™</sup> + Optimem <sup>®</sup>	Zell-Optimem <sup>®</sup>
12-well	2 µg + 2,4 µl + 40 µl		1,6 µl + 40 µl	0,32 ml
6-well	4 µg + 6 µl + 100 µl		4 µl + 100 µl	0,8 ml
Ø 6 cm	8 µg + 8 µl + 250 µl		16 µl + 250 µl	2 ml
Ø 10 cm	10 µg + 20 µl + 750 µl		30 µl + 750 µl	5 ml

### 3.2.3 Transfektion von siRNA

Die RNA-Interferenz, ein natürlicher Regulationsmechanismus eukaryotischer Zellen zur posttranskriptionellen Hemmung der Expression einzelner Gene (Fire et al. 1998), wird in gentechnischen Versuchen genutzt, um mit Hilfe von synthetischen siRNAs gezielt die Neusynthese bestimmter Proteine zu unterdrücken. Man spricht hierbei auch von Depletion. Die Transfektion der siRNA in HuH-7 Zellen erfolgte mit Hilfe des Lipofectamine<sup>™</sup> RNAiMAX Reagenzes von Life Technologies (Tabelle 10). Hierzu wurden die HuH-7 Zellen am Tag vor der Transfektion so ausgesät, dass sie zum Zeitpunkt der Transfektion eine 50 %ige Konfluenz aufwiesen. Die siRNA und das Lipofectamine<sup>™</sup> RNAiMAX Reagenz wurden jeweils in Optimem<sup>®</sup> verdünnt und die beiden Ansätze wurden direkt miteinander vereint. Nach 20 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Transfektionsansatz auf die Zellen gegeben, wobei das Zellkulturmedium vorher durch DMEM / 10 % FCS ohne Zusatz eines Antibiotikums ersetzt worden war. Anschließend wurden die HuH-7 Zellen bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert, wobei die Zeitspanne der Depletion abhängig von den verschiedenen Versuchsprotokollen variiert.

Tabelle 10: Mengenangaben zur siRNA-Transfektion in HuH-7 Zellen mittels Lipofectamine<sup>™</sup> RNAiMAX

Kulturschale	siRNA + Optimem <sup>®</sup>	RNAiMAX + Optimem <sup>®</sup>	DMEM / 10 % FCS
12-well	1,8 µl (20 µM) + 100 µl	2 µl + 100 µl	1 ml
6-well	4,5 µl (20 µM) + 250 µl	5 µl + 250 µl	2,5 ml
Ø 6 cm	9 µl (20 µM) + 500 µl	10µl + 500 µl	5 ml



## 3.3 Proteinbiochemische Methoden

### 3.3.1 Herstellung von Zelllysaten

Zur Analyse der überexprimierten und endogenen Proteine müssen die Zellen zunächst aufgebrochen werden. Zum Aufbrechen der Zellen und zur Extraktion der Proteine gibt es verschiedene mechanische und chemische Vorgehensweisen. Dabei richtet sich die Art der Aufschlussmethode nach den Löslichkeiten der zu untersuchenden Proteine und den anschließenden Analyseverfahren.

Soweit nicht anders beschrieben wurden die Zellen, nachdem sie mit TBS gewaschen wurden, entweder mit Triton- (TBS / 0,5 % Triton X 100) bzw. NP40-Lysepuffer lysiert oder direkt in SDS-Probenpuffer aufgenommen und für 6 Minuten bei 100°C hitzedenaturiert. Bei der Triton- bzw. NP40-Lyse wurden die Zellen mit dem Lysepuffer für 20 Minuten auf Eis inkubiert, danach zusammen geschabt, in Reaktionsgefäße überführt und für 5 Minuten bei 13 000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das klare Lysat wurde in frische Reaktionsgefäße überführt und für die Analyse im Western Blot mit SDS-Probenpuffer versetzt und bei 100°C für 6 Minuten hitzedenaturiert. Die bei der Zentrifugation entstandenen Pellets wurden entweder in SDS-Probenpuffer aufgenommen und direkt 6 Minuten bei 100°C hitzedenaturiert, oder verworfen.

### 3.3.2 Aufarbeitung von Zellkulturüberständen

Zur Analyse der Zellkultur-Überstände wurden diese über einem Sucrose-Kissen zentrifugiert, wodurch Partikel (z.B. VLPs) pelletiert wurden, während einzelne Proteine im Überstand verblieben. Die hierbei erhaltenen Proben wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

Die Zellkulturüberstände wurden zunächst filtriert (Porengröße 0,45 µm), um sie von Zelltrümmern zu reinigen, und dann in einem Ultrazentrifugenröhrchen mit einem Sucrose-Kissen (20 % w/v Sucrose, 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7,5; 600 µl im SW60- bzw. SW55-Röhrchen) unterschichtet. Die Ultrazentrifugation erfolgte für 4 Stunden und 40 000 rpm bei 4°C. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet über Nacht in TBS resuspendiert, mit SDS-Probenpuffer versetzt und für 6 Minuten bei 100°C hitzedenaturiert.

### 3.3.3 Ko-Immunitprazipitation

Die Ko-Immunitprazipitation dient dem Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen. Hierzu werden bestimmte Proteine mit einem an eine Tragersubstanz gekoppelten primaren Antikrper aus einem Zelllysate isoliert, wobei Interaktionspartner dieser Proteine ko-prazipitieren. Die Analyse der Proben erfolgt uber SDS-PAGE und Western Blot.

Es wurden *Dynabeads® M-280 Sheep anti-Mouse IgG* als Tragersubstanz fur die zur Fallung verwendeten primaren Antikrper verwendet. Dies sind magnetische Partikel, die bereits mit einem Spezies-spezifischen Antikrper (anti-Maus) gekoppelt sind. Pro Probe wurden 25 µl dieser Partikel eingesetzt und zunachst zwei Mal mit je 1 ml PBS / 0,1% BSA gewaschen, bevor sie uber Nacht bei 4°C im Uberkopfschuttler mit dem gegen das zu fallende Protein gerichteten primaren Antikrper beschichtet wurden. Hierzu wurden die Partikel im Ausgangsvolumen bzw. in mindestens jedoch 300 µl PBS / 0,1% BSA aufgenommen und mit dem primaren Antikrper (anti-Flag: 2 µl pro Probe; anti-JL8: 1 µl pro Probe) versetzt. Am folgenden Tag erfolgte das *crosslinking*, das Vernetzen der primaren mit den an die Partikel gekoppelten Antikrpern. Hierzu wurden die Partikel zunachst zwei Mal mit 0,2 M Triethanolamin gewaschen und anschliessend fur 30 Minuten in 20 mM DMP (2,4,6-Tris(dimethylamino)phenol) und 0,2 M Triethanolamin im Uberkopfschuttler bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Partikel fur 15 Minuten in 50mM Tris pH 7,5 und drei Mal mit PBS / 0,1% BSA gewaschen, anschliessend im Ausgangsvolumen PBS / 0,1% BSA aufgenommen und bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

#### 3.3.3.1 Ko-Immunitprazipitation mit Triton-Lyse

Tabelle 11: Lyse- und Waschpuffer fur die Ko-Immunitprazipitation mit Triton-Lyse

Lysepuffer	Waschpuffer
150 mM NaCl	150 mM NaCl
1 % Triton	1 % NP40
50 mM Tris Cl pH 8	0,5 % DOC
	0,1 % SDS
	50 mM Tris Cl pH 8

Die Ko-Immunitprazipitation erfolgte 2 bzw. 3 Tage nach der DNA-Transfektion. Die Zellen wurden in PBS aufgenommen und fur 5 Minuten bei 2500 rpm und 4°C pelletiert. Die Pellets wurden einem Gefrier-Auftau-Zyklus (-80°C) unterzogen. Anschliessend erfolgte die Lyse in 1 ml Lysepuffer (Tabelle 11) bei 4°C im Uberkopfschuttler fur eine Stunde, wobei nach 30 Minuten 3 Mal 20 Ultraschallzyklen (30% duty cycle, 30% output control; Branson,

Sonifier 250) durchgeführt wurden. Danach wurden die Zellysate für 10 Minuten bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand für die Fällung verwendet. Vor der Zugabe der Partikel wurden 60 µl der Probe als Kontrolle für den Western Blot abgenommen. Dem restlichen Lysat wurden die beschichteten Partikel zugesetzt und das Gemisch bei 4°C für 4 Stunden bzw. über Nacht auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Anschließend wurden die Partikel drei Mal mit Waschpuffer (Tabelle 11) und einmal mit PBS gewaschen und dann in 75 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen und 6 Minuten bei 100°C hitzedenaturiert. Für die weitere Analyse der Proben mittels SDS-PAGE und Western Blot wurden die Präzipitate von den Partikeln abgenommen und die Partikel verworfen.

### 3.3.3.2 Ko-Immunpräzipitation mit CHAPS-Lyse

**Tabelle 12: Lyse- und Waschpuffer für die Ko-Immunpräzipitation mit Chaps-Lyse**

Lysepuffer	Waschpuffer
200 mM NaCl	200 mM NaCl
50 mM HEPES pH 7,5	50 mM HEPES pH 7,5
2 % CHAPS	0,5 % CHAPS
20 mM NEM	
1x Proteaseinhibitor-Mix	

Die Ko-Immunpräzipitation erfolgte nach dreitägiger Expression. Die Zellen wurden mit 1x TBS gewaschen, für 20 Minuten in CHAPS-Lysepuffer (Tabelle 12) auf Eis lysiert, zusammen geschabt und in Reaktionsgefäße überführt. Die Lysate wurden für 20 Minuten bei 13 000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und das Lysat für die Immunpräzipitation verwendet, nachdem 60 µl als Kontrolle für den Western Blot abgenommen wurden. Dem restlichen Lysat wurden die beschichteten Partikel zugesetzt und die Immunpräzipitation erfolgte bei 4°C für 4 Stunden auf dem Überkopfschüttler. Anschließend wurden die Partikel drei Mal mit Waschpuffer (Tabelle 12) und einmal mit PBS gewaschen und dann in 75 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen und 6 Minuten bei 100°C hitzedenaturiert. Für die weitere Analyse der Proben mittels SDS-PAGE und Western Blot wurden die Präzipitate von den Partikeln abgenommen und die Partikel verworfen.

### **3.3.4 Fraktionierung von Zellextrakten**

Für die Fraktionierung von Zellextrakten wurden die Zellen zunächst durch hypotonischen Schock und mechanische Scherkräfte aufgebrochen. Hierfür wurde der Zellkulturüberstand zunächst abgenommen und die Zellen mit TBS gewaschen. Die Zellen wurden per hypotonischen Schock aufgebrochen, indem sie für 10 Minuten mit 0,1 x TBS auf Eis inkubiert wurden. Danach wurden die Zellen zusammen geschabt, in Reaktionsgefäße überführt und die Zellsuspension durch 4-maliges Aufziehen durch eine 26G-Kanüle und 20 Hübe mit einem Potter-Homogenisator mechanisch aufgebrochen. Die Zellsuspension wurde mit 10 x TBS auf eine isotonische Konzentration eingestellt und anschließend für 15 Minuten bei 2500 rpm und 4°C zentrifugiert, wobei größere Zelltrümmer, Zellkerne und nicht aufgebrochene Zellen pelletieren. Das Pellet wurde in SDS-Probenpuffer aufgenommen und für 6 Minuten bei 100°C hitzedenaturiert. Der postnukleare Überstand wurde wie folgt weiter verarbeitet.

#### **3.3.4.1 Fraktionierung in Zytosol- und Membranfraktion**

Bei der Fraktionierung in Zytosol- und Membranfraktion werden die aufgebrochenen Zellen in drei Fraktionen unterteilt. Die Fraktion 1 beinhaltet die Zellkerne und nicht aufgebrochenen Zellen und dient als Kontrolle. Die Fraktion 2 umfasst Membranen und mit ihnen assoziierte Proteine und die Fraktion 3 das Zytosol.

Der postnukleare Überstand wurde in Ultrazentrifugenröhrchen auf ein Sucrose-Kissen (10 % w/v in TBS) aufgeschichtet und für 45 Minuten bei 45 000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Pellet (= Fraktion 2) wurde in SDS-Probenpuffer aufgenommen und hitzedenaturiert, während die Proteine aus dem Überstand mittels TCA gefällt und in SDS-Probenpuffer aufgenommen und hitzedenaturiert wurden. Die Proben wurden anschließend mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

#### **3.3.4.2 Präparation von Mikrosomen**

Um intakte Mikrosomen aus den Zellen zu isolieren, wurden diese unter nativen Bedingungen aufgeschlossen, wobei das nukleare Pellet verworfen wurde. Der postnukleare Überstand wurde in Ultrazentrifugenröhrchen (SW 60) auf ein Sucrose-Kissen (10 % w/v in TBS) geschichtet und bei 40 000 rpm und 4°C für eine Stunde zentrifugiert, wobei die Mikrosomen pelletieren. Das Mikrosomenpellet wurde in TBS (500 µl) gelöst. Die präparierten Mikrosomen wurden im LDH-Assay weiter analysiert.

### 3.3.4.3 Subzelluläre Fraktionierung mittels Sucrose-Gradient

Mittels des Sucrose-Gradienten lässt sich der postnukleare Überstand feiner auftrennen als bei der Auftrennung in Membran- und Zytosol-Fraktion und der Mikrosomen-Präparation und sogar frühe und späte Endosomen voneinander unterscheiden. Diese Methode wurde nach *Current Protocols in Protein Science* (Aniento und Gruenberg 2003) angewandt.

Die Zellen wurden in PBS aufgenommen, in Reaktionsgefäße überführt und für 5 Minuten bei 1700 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 2 ml Homogenisierungspuffer resuspendiert und für 10 Minuten bei 4000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Homogenisierungspuffer (0,5 ml; Tabelle 13), der mit Proteaseinhibitoren und 0,5 mM EDTA versetzt wurde, resuspendiert und die Zellen durch 10-maliges Aufziehen durch eine 22G-Kanüle mechanisch aufgebrochen. Das Homogenat wurde für 10 Minuten bei 4000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das nukleare Pellet wurde als Kontrolle in SDS-Probenpuffer aufgenommen und bei 100°C für 6 Minuten hitzedenaturiert. Der postnukleare Überstand wurde mit einer 62 %-igen Sucrose-Lösung (Tabelle 13) auf 40,6 % Sucrose eingestellt (ca. 400 µl), auf den Boden eines Ultrazentrifugenröhrchens (SW 60) pipettiert und dann mit 1,5 ml 35 %-iger und mit 1 ml 25 %-iger Sucrose-Lösung (Tabelle 13) überschichtet. Anschließend wurden die Ultrazentrifugenröhrchen mit Homogenisierungspuffer aufgefüllt und austariert. Die Flotation erfolgte für 90 Minuten bei 35 000 rpm und 4°C, wobei sich frühe Endosomen an der Interphase zwischen 35 und 25 %-iger Sucrose-Lösung ansammeln und späte Endosomen in der Interphase zwischen 25 %-iger Sucrose-Lösung und Homogenisierungspuffer. Die Fraktionierung der Proben nach der Zentrifugation erfolgte von oben durch Abnahme von je 300 µl. Die Analyse der Fraktionen erfolgte mittels SDS-PAGE und Western Blot.

Tabelle 13: Puffer und Lösungen für den Sucrose-Gradienten

Homogenisierungspuffer	25 % (w/w) Sucrose in H <sub>2</sub> O	35 % (w/w) Sucrose in H <sub>2</sub> O	62 % (w/w) Sucrose in H <sub>2</sub> O
250 mM Sucrose	0,806 M Sucrose	1,177 M Sucrose	2,351 M Sucrose
3 mM Imidazol	3 mM Imidazol	3 mM Imidazol	3 mM Imidazol
pH 7,4	pH 7,4	pH 7,4	pH 7,4
10 mM Tris-Cl	Refraktionsindex	Refraktionsindex	Refraktionsindex
pH 7,4	1,3723 (20°C)	1,3904 (20°C)	1,4463 (20°C)

### 3.3.5 Hemmung des lysosomalen Abbaus

Zur Hemmung des lysosomalen Abbaus wurden Versuche mit Chloroquin und  $\text{NH}_4\text{Cl}$  durchgeführt. Bei der Betrachtung einer Protein-Population im Zeitverlauf, wurde zunächst die Proteinbiosynthese durch Zugabe von Cycloheximid gehemmt und anschließend die Protein-Population in An- und Abwesenheit von Chloroquin und  $\text{NH}_4\text{Cl}$  untersucht.

Die Zellen wurden im doppelten Ansatz transfiziert, wobei der eine Ansatz dem Protokoll A und der andere dem Protokoll B (für Protokoll A und B siehe

Tabelle 14) unterzogen wurde. Die verwendeten Medien sind in

Tabelle 15 aufgeführt. Anschließend wurden die Proben mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

**Tabelle 14: Protokoll A und B für die Inkubation der Zellen Versuchen zu Hemmung des lysosomalen Abbaus**  
Zwischen den einzelnen Schritten wird das Medium verworfen.

<b>A: ohne lysosomale Hemmstoffe</b>	<b>B: mit lysosomalen Hemmstoffen</b>
2 ml <b>Medium 1</b> auf die Zellen geben → 1 h bei 37°C, 5% $\text{CO}_2$ inkubieren	2 ml <b>Medium 1</b> auf die Zellen geben → 1 h bei 37°C, 5% $\text{CO}_2$ inkubieren
2 ml <b>Medium 1</b> auf die Zellen geben → 1 h bei 37°C, 5% $\text{CO}_2$ inkubieren	2 ml <b>Medium 2</b> auf die Zellen geben → 1 h bei 37°C, 5% $\text{CO}_2$ inkubieren
2,5 ml <b>Medium 4</b> auf die Zellen geben → 3 h bei 37°C, 5% $\text{CO}_2$ inkubieren	2,5 ml <b>Medium 3</b> auf die Zellen geben → 3 h bei 37°C, 5% $\text{CO}_2$ inkubieren
Lyse in 250 $\mu\text{l}$ 1x Laemmli	Lyse in 250 $\mu\text{l}$ 1x Laemmli

**Tabelle 15: Medien für den in Tabelle 14 beschriebenen Versuch zum lysosomalen Abbau**

<b>Medium 1</b>	<b>Medium 2</b>	<b>Medium 3</b>	<b>Medium 4</b>
DMEM (serumfrei)	DMEM (serumfrei)	DMEM / 2% FCS	DMEM / 2% FCS
100 $\mu\text{g/ml}$ Cycloheximid	100 $\mu\text{g/ml}$ Cycloheximid	30 $\mu\text{M}$ Chloroquin	
	30 $\mu\text{M}$ Chloroquin	20 mM $\text{NH}_4\text{Cl}$	
	20 mM $\text{NH}_4\text{Cl}$		

Des Weiteren wurden Versuche durchgeführt, bei welchen die Hemmung des lysosomalen Abbaus ausschließlich über die Inkubation der Zellen mit 20 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  für 4 Stunden bei 37°C und 5 %  $\text{CO}_2$  erfolgte.

### 3.3.6 EGF-Assay

Um die Aufnahme und den Abbau von EGF zu untersuchen, wurden sogenannte *pulse-chase* Versuche durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen einer Transfektion auf 2 Deckgläschen ausgesät. Die Zellen wurden für eine Stunde mit serumfreiem Optimem / 10 µg/ml Cycloheximed bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert und mit Optimem gewaschen, bevor der *pulse* für 20 Minuten mit 0,2 mg/ml EGF-Alexa-Fluor-488 in Optimem bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> erfolgte. Das eine Deckgläschen wurde danach direkt für 10 Minuten in Methanol fixiert und das andere für eine *chase*-Periode von 2 Stunden in Optimem / 10 µg/ml Cycloheximed bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach der Fixierung mit Methanol erfolgten die Immunfluoreszenz-Färbung (3.3.10) und die Analyse mit dem Fluoreszenz-mikroskop.

### 3.3.7 LC3-Western Blot

LC3 wird als Markerprotein für die Autophagie verwendet. LC3 kommt in einer zytosolischen (LC3-I) und einer Membran-gebundenen Form (LC3-II) vor. Änderungen im Verhältnis von LC3-I zu LC3-II geben Aufschluss über das Maß der Autophagie, wenn Proben in An- und Abwesenheit von lysosomalen Hemmstoffen betrachtet werden. (Mizushima und Yoshimori 2007) Daher wurden Proben, die dem Nachweis von LC3 im Western Blot dienen, vor der Lyse für 4 Stunden in An- und Abwesenheit von 20 mM NH<sub>4</sub>Cl bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

### 3.3.8 Induktion und Inhibition von Autophagie

Autophagie kann durch Nährstoff-arme Bedingungen oder die Zugabe von Rapamycin induziert werden, während die Zugabe von 3-MA die Autophagie inhibiert. Daher wurden Zellen zur Induktion von Autophagie in Aminosäure-freiem Medium (EBSS) oder in Medium (EBSS oder DMEM) mit 10 µg/ml Rapamycin für mindestens 4 Stunden bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Hemmung der Autophagie erfolgte durch gleiche Inkubation der Zellen unter Zugabe von 10 mM 3-MA. Anschließend wurden die Zellen in der Immunfluoreszenz analysiert oder lysiert und mittels SDS-PAGE und Western Blot untersucht.

### 3.3.9 LDH-Assay

Als LDH-Assay wurde das *Cytotoxicity Detection Kit<sup>PLUS</sup>* von Roche nach Herstellerangaben verwendet, wobei die Lysate vor der Analyse im Verhältnis 1:100 verdünnt wurden.

### 3.3.10 Immunfluoreszenzfärbung

Zur Untersuchung der Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie wurden diese nach der DNA- bzw. siRNA-Transfektion auf sterilen Deckgläschen ausgesät und vor der Färbung auf diesen fixiert. Das Fixieren erfolgte mit Paraformaldehyd (3 % PFA in PBS; Inkubation für 20 Minuten bei RT). Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit PBS / 1 % BSA für 30 Minuten bei RT blockiert. Die Inkubation der primären Antikörper unter Zugabe von 0,05 % Saponin (Verdünnungen Tabelle 6) erfolgte für 1 Stunde bei 37°C. Die Entfernung ungebundener Antikörper erfolgte anschließend durch mehrmaliges Waschen (2 x 10 Minuten in PBS; 1 x 10 Minuten in PBS / 0,1 % BSA). Die sekundären Antikörper (Verdünnungen Tabelle 8) wurden für 50 Minuten bei 37°C auf die Zellen gegeben. Das Anfärben der Zellkerne mittels Höchst-Farbstoff 33342 (Verdünnung 1:20 000) erfolgte für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Zellen 30 Minuten mit PBS gewaschen und mit Fluoprep Einbettungsmedium auf einem Objektträger fixiert. Die mikroskopische Darstellung erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200 M, Zeiss) und der Software Axiovision Release 4.6.



## 4 Ergebnisse

Die von mir durchgeführten Versuche zur Charakterisierung von  $\gamma$ 2-Adaptin beruhen auf vorausgegangenen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe. Ursprünglich wurde  $\gamma$ 2-Adaptin als Interaktionspartner des HBV-L-Hüllproteins identifiziert (Hartmann-Stühler und Prange 2001). Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass überexprimiertes (im Folgenden auch als überschüssig oder exogen bezeichnet)  $\gamma$ 2-Adaptin einen inhibitorischen Effekt auf die Ausschleusung von HBV und retroviraler VLPs zeigt (Lambert et al. 2007; Döring et al. 2010). Zudem konnte eine Verbindung zwischen Ubiquitin und  $\gamma$ 2-Adaptin nachgewiesen werden, da  $\gamma$ 2-Adaptin Ubiquitin binden (Rost et al. 2006) und durch die Interaktion mit der Ubiquitin-Ligase Nedd4 selbst ubiquitiniert werden kann (Rost et al. 2008). Neben der Verbindung zu Ubiquitin und dem inhibitorischen Effekt auf die Ausschleusung von VLPs deutet auch die Inhibition des Abbaus von EGF bei Depletion von  $\gamma$ 2-Adaptin (Rost et al. 2008) darauf hin, dass  $\gamma$ 2-Adaptin eine Rolle im endo-lysosomalen Transport- bzw. Abbauweg spielt.

### 4.1 Untersuchungen zur Rolle von $\gamma$ 2-Adaptin im endo-lysosomalen System

Um die Funktion von  $\gamma$ 2-Adaptin näher zu charakterisieren, wurde dessen Wirkweise im endo-lysosomalen System untersucht. Hierzu wurden zunächst Immunfluoreszenz-Studien durchgeführt, bei denen die Gleichgewichtskonzentration von ubiquitinierten Proteinen und von EGF untersucht wurde.

Die Ubiquitinierung von Proteinen dient u. a. als Signal für deren lysosomalen Abbau. Die Blockade des endo-lysosomalen Abbauweges führt zur Akkumulation von ubiquitinierten Proteinen an endosomalen Strukturen. (Piper und Katzmann 2007; Raiborg und Stenmark 2009) Daher wurde zunächst untersucht, ob die Überexpression und die Depletion von  $\gamma$ 2-Adaptin einen Einfluss auf den Abbau ubiquitiniertes Proteine haben. EGF ist ein epidermaler Wachstumsfaktor, der nach Bindung an seinen Rezeptor an der Zelloberfläche ein Signal auslöst und anschließend internalisiert wird. Aufgenommenes EGF wird über MVBs zum Lysosom transportiert, wo es abgebaut wird. (White et al. 2006) In Ergänzung zu den bereits durchgeführten Experimenten zum Abbau von EGF bei Depletion von

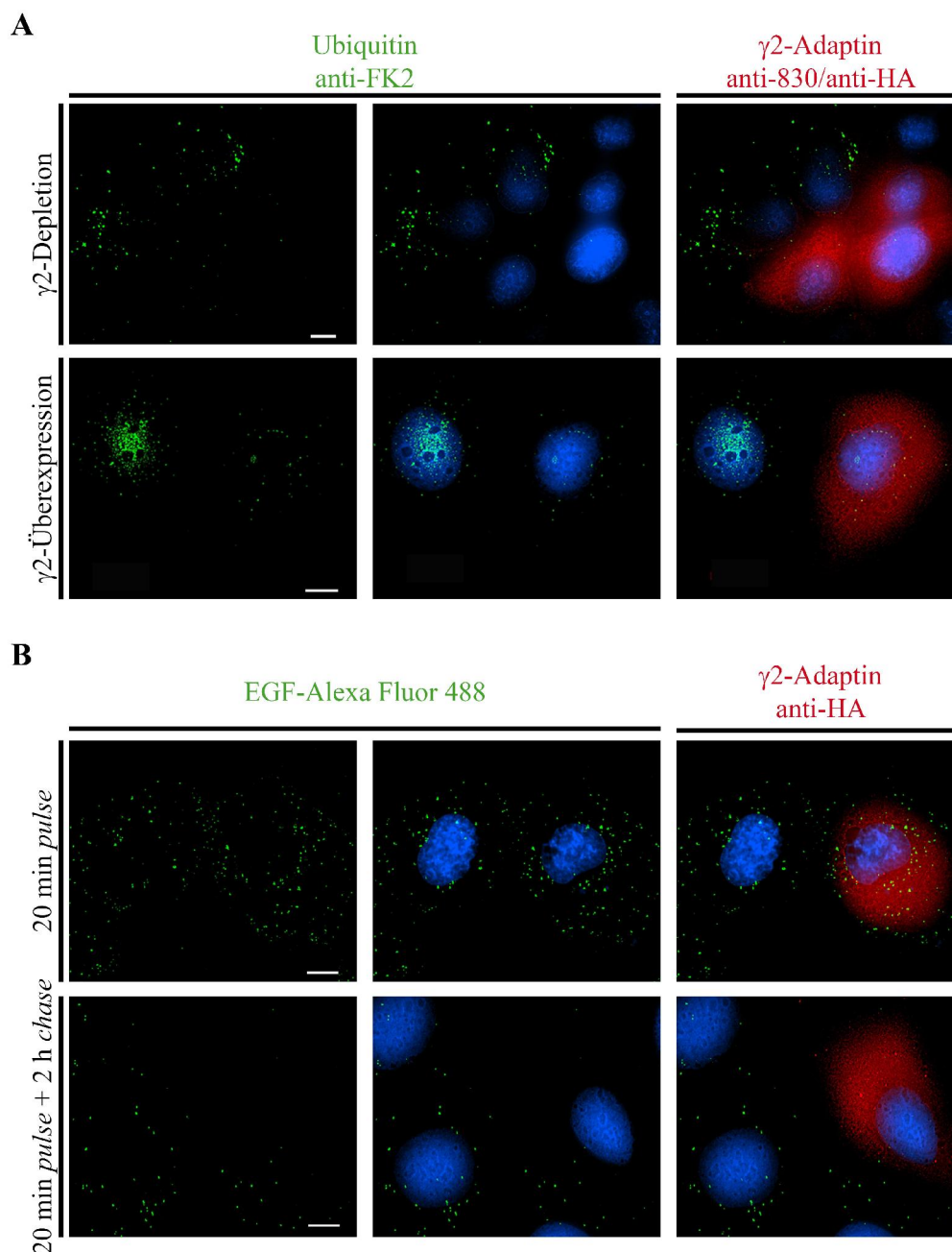
$\gamma$ 2-Adaptin (Rost et al. 2008), sollte nun die Auswirkung von überexprimiertem  $\gamma$ 2-Adaptin auf EGF untersucht werden.

Für die Analyse zum Abbau ubiquitiniertes Proteine wurden die Zellen mit  $\gamma$ 2-siRNA bzw. mit  $\gamma$ 2-HA (HA-markiertes  $\gamma$ 2-Adaptin) DNA transfiziert. Nach dreitägiger Depletion bzw. Expression wurden die Zellen fixiert, für Immunfluoreszenzstudien gefärbt (ubiquitinierte Proteine: anti-FK2; endogenes  $\gamma$ 2-Adaptin: anti-830;  $\gamma$ 2-HA: anti-HA) und anschließend im Mikroskop analysiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 9 A gezeigt.  $\gamma$ 2-Adaptin ist in Rot dargestellt und zeigt eine zytoplasmatische, perinukleare Lokalisation. Die in Grün dargestellten ubiquitinierten Proteine zeigen eine punktuelle Aggregation im Zytoplasma. Diese tritt bei  $\gamma$ 2-depletierten im Vergleich zu nicht-depletierten Zellen verstärkt auf. Bei  $\gamma$ 2-Überexpression sind weniger Ubiquitin-Aggregate zu beobachten als in nicht-transfizierten Zellen.

Für die Analyse zum Abbau von EGF wurden die mit  $\gamma$ 2-HA transfizierten Zellen vor der Fixierung und der Immunfluoreszenzfärbung ( $\gamma$ 2-HA: anti-HA) nach dem EGF-Assay-Protokoll (3.3.6) behandelt. Die Zellen wurden für 20 Minuten mit Alexa-Fluor 488 markiertem EGF inkubiert und entweder direkt im Anschluss fixiert oder vor der Fixierung für eine *chase*-Periode von zwei Stunden in Serum-freien Medium inkubiert. Die immunfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen sind in Abbildung 9 B dargestellt.  $\gamma$ 2-Adaptin (rot) zeigt seine typische zytoplasmatische Lokalisation und EGF (grün) ist an vesikulären Strukturen im Zytoplasma lokalisiert. Nach der zweistündigen *chase*-Periode nimmt das EGF-Signal ab, wobei es bei  $\gamma$ 2-Überexpression im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen stärker herabgesetzt ist.

Diese Versuche zeigen, dass  $\gamma$ 2-Adaptin eine Rolle im endo-lysosomalen Abbauweg spielt, da die Depletion von  $\gamma$ 2-Adaptin eine Akkumulation von ubiquitinierten Proteinen im Vergleich zu nicht depletierten Zellen zeigt, und die Überexpression von  $\gamma$ 2-HA zu einem verstärkten Abbau ubiquitiniertes Proteine führt (Abbildung 9 A). Die quantitative Auswertung der Ubiquitin-Färbung zeigt eine Steigerung der relativen Fluoreszenzeinheiten um 80 % bei  $\gamma$ 2-Depletion und eine Reduktion auf 40 % bei  $\gamma$ 2-Überexpression (Döring et al. 2010). Diese und die vorausgegangenen Ergebnisse der Depletions-Versuche zum Abbau von EGF konnten bestätigt werden, da die Überexpression von  $\gamma$ 2-HA den Abbau von EGF verstärkt (Abbildung 9 B). Die quantitative Auswertung der relativen Fluoreszenzeinheiten des EGF-Signals liegt bei  $\gamma$ 2-Überexpression im Vergleich zur Kontrolle bei unter 20 % (Döring et al. 2010). Der inhibitorische Effekt der  $\gamma$ 2-Depletion auf den lysosomalen Abbau

und der verstärkende Effekt der  $\gamma 2$ -Überexpression deuten auf eine regulatorische Rolle von  $\gamma 2$ -Adaptin im endo-lysosomalen Abbauweg hin.



**Abbildung 9: Untersuchung zur Rolle von  $\gamma 2$ -Adaptin im endo-lysosomalen Abbauweg**

Als Marker für den endo-lysosomalen Abbauweg wurden Ubiquitin und EGF verwendet. Balken  $\cong 10 \mu\text{m}$  (A) In  $\gamma 2$ -depletierten und  $\gamma 2$ -HA transfizierten Zellen wurden ubiquitinierte Proteine mittels anti-FK2 angefärbt (grün), während die Depletion von  $\gamma 2$ -Adaptin mit dem gegen endogenes  $\gamma 2$ -Adaptin gerichteten anti-830 und die Überexpression mit anti-HA nachgewiesen wurde (rot). (B)  $\gamma 2$ -transfizierte Zellen wurden für 20 Minuten mit Alexa-Fluor 488 markiertem EGF (grün) inkubiert und entweder direkt oder nach einer chase-Periode von zwei Stunden mit anti-HA (rot) für die Immunfluoreszenz gefärbt.

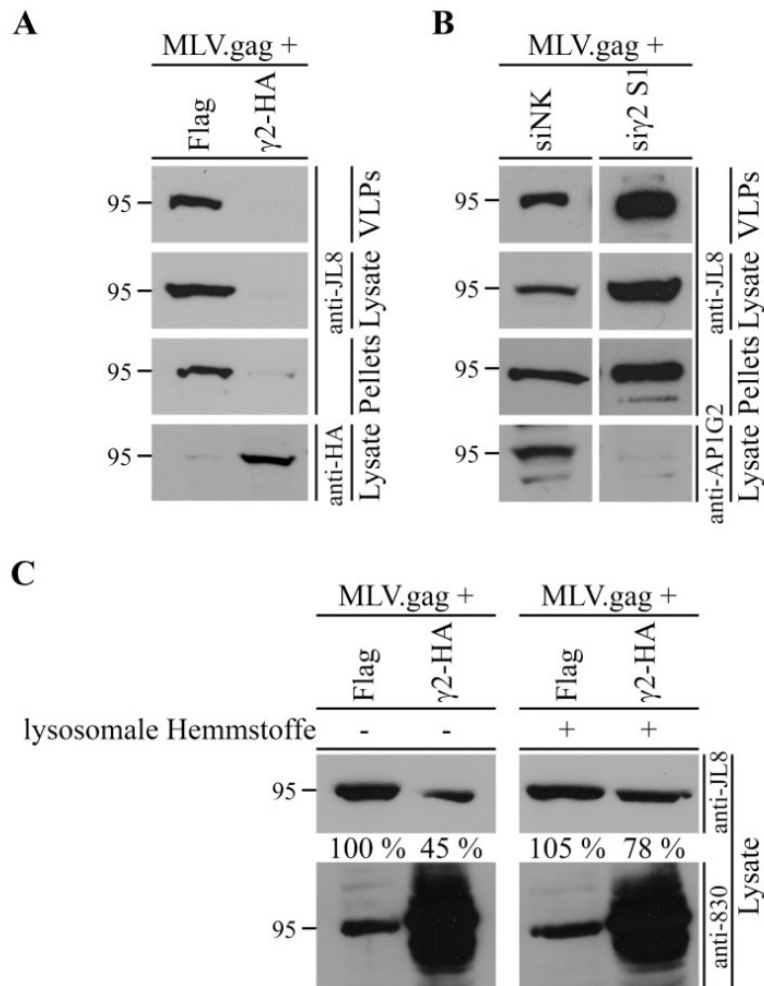
## 4.2 Untersuchungen zur Rolle von $\gamma$ 2-Adaptin während der MLV.gag-Morphogenese

Das retrovirale Polyprotein MLV.gag wurde als Modell verwendet, um die MVB-abhängige Freisetzung von VLPs im Wechselspiel mit  $\gamma$ 2-Adaptin zu untersuchen. Hierzu konnte bereits gezeigt werden, dass die Überexpression von  $\gamma$ 2-HA in transfizierten Säugerzellkulturen die Konzentration von MLV.gag im Lysat und der VLPs im Überstand reduziert (Lambert et al. 2007).

Der Effekt von überexprimierten  $\gamma$ 2-HA auf die intra- und extrazelluläre Menge von MLV.gag wurde überprüft und ist in Abbildung 10 A dargestellt. Es wurde HA-markiertes  $\gamma$ 2-Adaptin mit einem Molekulargewicht von ca. 95 kDa und GFP-markiertes MLV.gag (ca. 95 kDa) verwendet. Der Einfluss von überschüssigem  $\gamma$ 2-Adaptin ist abhängig von dessen Konzentration (Lambert et al. 2007), weshalb  $\gamma$ 2-HA, soweit nicht anders erwähnt, im Überschuss (DNA-Verhältnis von 4:1) transfiziert wurde. Zusätzlich wurde die Wirkung der  $\gamma$ 2-Depletion auf MLV.gag untersucht. Hierzu wurden Zellen zunächst mit siRNA gegen  $\gamma$ 2-Adaptin transfiziert und nach 48-stündiger Depletion mit der MLV.gag DNA transfiziert. Nach 24 Stunden Expression wurden die Zellen in Triton-Lysepuffer lysiert und die bei der Klärung des Lysats entstandenen Pellets in SDS-Probenpuffer aufgenommen. Vor der Lyse wurde der Zellkulturüberstand abgenommen, filtriert und die VLPs durch Ultrazentrifugation aufgereinigt. Die Analyse der Proben erfolgte anschließend über SDS-PAGE und Western Blot und ist in Abbildung 10 B dargestellt. Die Überexpression von  $\gamma$ 2-HA führt zu einer Reduktion von MLV.gag in der Zelle und zu einer Reduktion der VLPs im Zellkulturüberstand, während die  $\gamma$ 2-Depletion die Ausschleusung der VLPs verstärkt und gleichzeitig mehr MLV.gag in den Lysaten und den bei der Zentrifugation der Lysate entstandenen Pellets detektiert werden kann (Abbildung 10 A und B).

Versuche mit lysosomalen Hemmstoffen wurden durchgeführt, um zu überprüfen, ob es sich bei der Reduktion von MLV.gag bei Überexpression von  $\gamma$ 2-HA um dessen lysosomalen Abbau handelt. Hierzu wurden Zellen mit MLV.gag und  $\gamma$ 2-HA bzw. einem Flag-Kontrollvektor ko-transfiziert und nach dreitägiger Expression mit den lysosomalen Hemmstoffen Chloroquin und  $\text{NH}_4\text{Cl}$  und einem Inhibitor der Proteinbiosynthese inkubiert (3.3.5). Nach der Inkubation wurden die Zellen in SDS-Probenpuffer aufgenommen und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

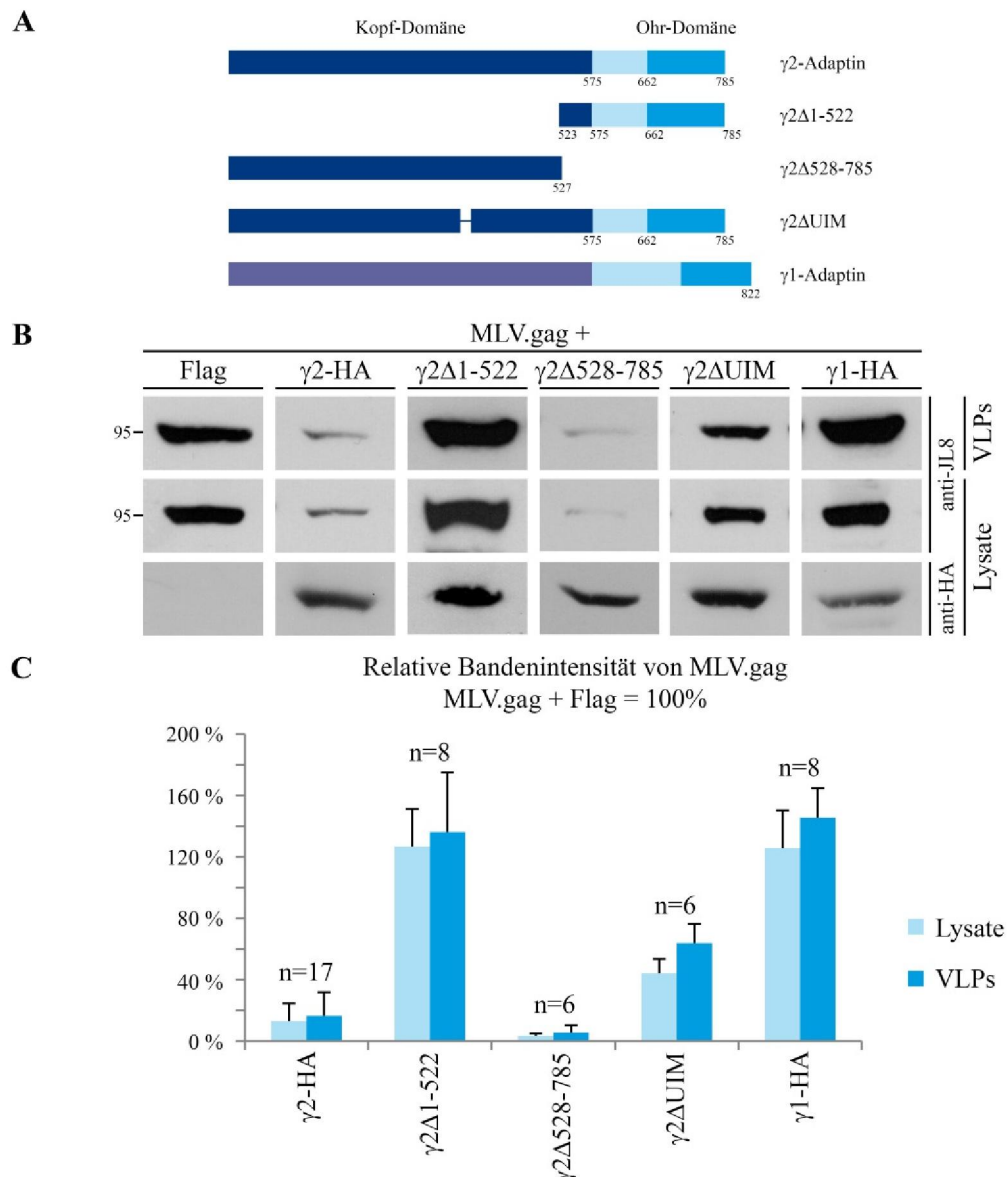
Es konnte eine abgeschwächte Reduktion bei Zugabe von lysosomalen Hemmstoffen für intrazelluläres MLV.gag bei  $\gamma 2$ -Überexpression beobachtet werden (Abbildung 10 C), was darauf schließen lässt, dass MLV.gag bei Überexpression von  $\gamma 2$ -HA verstärkt lysosomal abgebaut wird.



**Abbildung 10: Effekt von  $\gamma 2$ -Adaptin auf das retrovirale Polyprotein MLV.gag**  
**(A)** HuH-7 Zellen wurden mit MLV.gag und  $\gamma 2$ -HA bzw. einem Flag-Vektor als Kontrolle kotransfiziert und nach dreitägiger Expression analysiert. **(B)** HuH-7 Zellen wurden mit Kontroll-siRNA bzw.  $\gamma 2$ -siRNA transfiziert und nach zweitägiger Depletion mit MLV.gag und  $\gamma 2$ -HA bzw. einem Flag-Vektor als Kontrolle kotransfiziert und nach 24-stündiger Expression lysiert. **(A+B)** Die Lyse erfolgte in Triton-Lysepuffer und die dabei entstandenen Pellets wurden in SDS-Probenpuffer aufgenommen. Die Zellkulturüberstände wurden filtriert und die VLPs mittels Ultrazentrifugation aufgereinigt. Die Analyse der Proben erfolgte durch SDS-PAGE und Western Blot, wobei MLV.gag über anti-JL8 und  $\gamma 2$ -Adaptin über anti-HA bzw. anti-AP1G2 nachgewiesen wurden. **(C)** HuH-7 Zellen wurden mit MLV.gag und  $\gamma 2$ -HA bzw. Flag als Kontrolle kotransfiziert, nach dreitägiger Expression mit lysosomalen Hemmstoffen behandelt und anschließend in SDS-Probenpuffer lysiert. Die Analyse der Proben erfolgte wie in A und B, wobei endogenes  $\gamma 2$ -Adaptin mittels anti-830 nachgewiesen wurde. Die Prozent-Angaben stellen die relative Bandenintensität für MLV.gag dar und sind auf den Wert für MLV.gag ohne  $\gamma 2$ -HA und ohne lysosomale Hemmung bezogen.

### 4.2.1 Kartierung wichtiger Domänen von $\gamma 2$ -Adaptin

Für die Identifizierung funktionell wichtiger Domänen von  $\gamma 2$ -Adaptin wurde weiterhin MLV.gag als Modell-System verwendet. Es wurden verschiedene  $\gamma 2$ -Konstrukte zusammen mit MLV.gag in HuH-7 Zellen kotransfiziert und nach dreitägiger Expression wurden die VLPs aus den Zellkulturüberständen aufgereinigt und die Zellen lysiert. Die Analyse der Proben erfolgte mittels SDS-PAGE und Western Blot.



**Abbildung 11:**

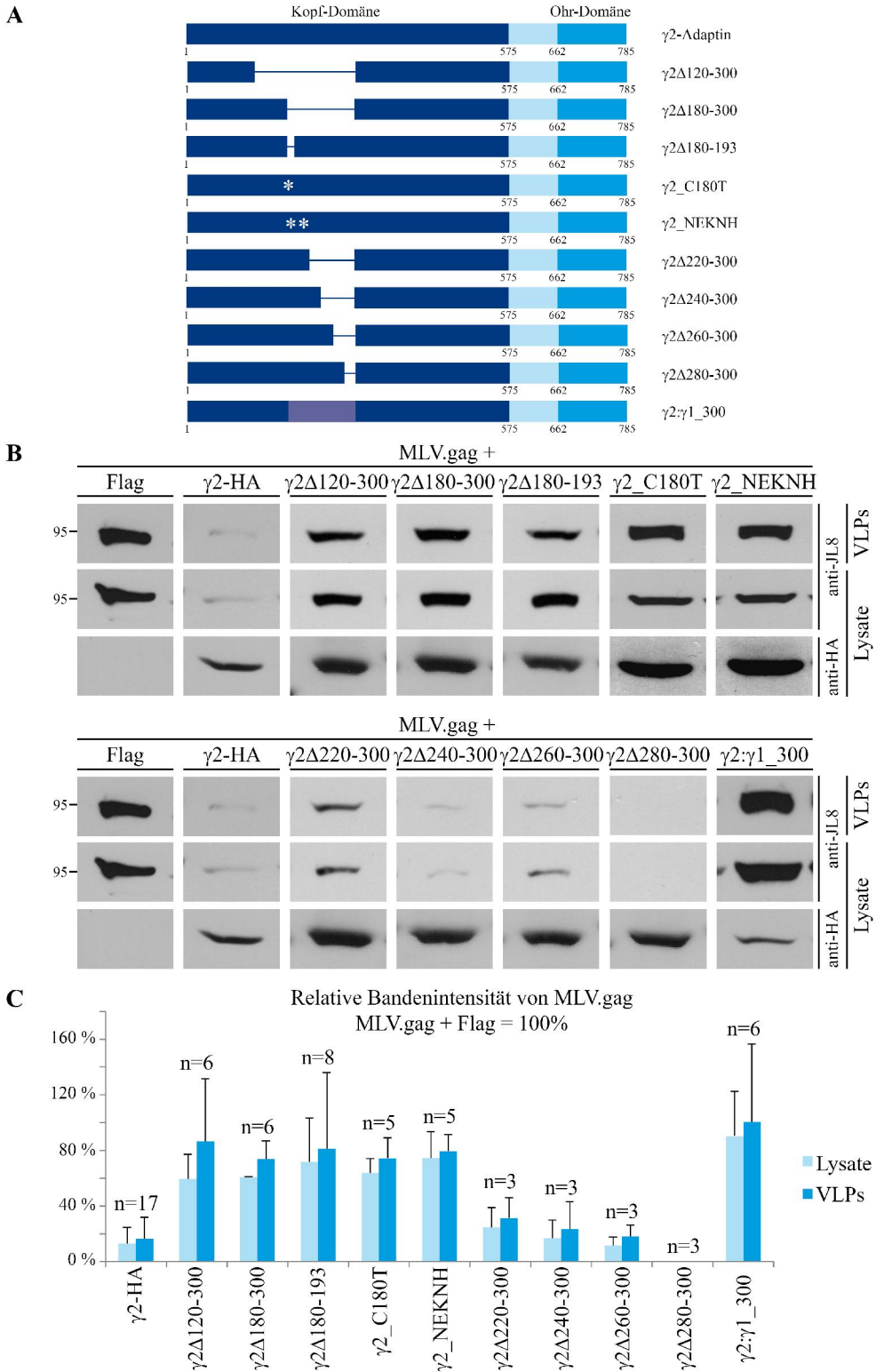
#### Wirkung von $\gamma 2\Delta 1$ -522, $\gamma 2\Delta 528$ -785, $\gamma 2\Delta$ UIM und $\gamma 1$ -HA auf die MLV.gag-Morphogenese

HuH-7 Zellen wurden mit MLV.gag und verschiedenen  $\gamma 2$ -Konstrukten,  $\gamma 1$ -HA bzw. einem leeren Flag-Vektor als Kontrolle kotransfiziert und nach drei Tagen Expression in Triton-Lysepuffer lysiert. Die VLPs wurden aus dem Zellkulturüberstand mittels Ultrazentrifugation aufgereinigt. Die Proben wurden durch SDS-PAGE und Western Blot analysiert. MLV.gag wurde über anti-JL8 nachgewiesen und die  $\gamma 2$ -Konstrukte bzw.  $\gamma 1$ -HA über anti-HA. (A) zeigt die verwendeten Konstrukte in schematischer Darstellung, (B) die Ergebnisse aus dem Western Blot und (C) die quantitative Auswertung der MLV.gag-Banden im Western-Blot im Vergleich zur Negativkontrolle. „n“ gibt die Anzahl der Experimente an.

Zunächst wurde der Einfluss von  $\gamma 2\Delta 1-522$ ,  $\gamma 2\Delta 528-785$ ,  $\gamma 2\Delta \text{UIM}$  und  $\gamma 1\text{-HA}$  (HA-markiertes  $\gamma 1$ -Adaptin, ca. 98 kDa) auf MLV.gag untersucht. Als Positivkontrolle dienten dabei Zellen, die mit  $\gamma 2\text{-HA}$  und MLV.gag kotransfiziert wurden, und als Negativkontrolle Zellen, die anstelle von  $\gamma 2\text{-HA}$  mit einem leeren Flag-Vektor transfiziert wurden. Die eingesetzten Konstrukte sind in Abbildung 11 A schematisch dargestellt.

Abbildung 11 B zeigt den Effekt der verschiedenen  $\gamma 2$ - und  $\gamma 1$ -Konstrukte auf die intra- und extrazelluläre Konzentration von MLV.gag. Dieser ist in Abbildung 11 C quantifiziert und im Vergleich zur Negativkontrolle dargestellt ( $n \geq 6$ ). Die Mutante  $\gamma 2\Delta 1-522$  beeinflusst die Menge an MLV.gag nicht, während  $\gamma 2\Delta 528-785$  funktionell ist und sich wie  $\gamma 2\text{-HA}$  verhält. Die Mutante  $\gamma 2\Delta \text{UIM}$ , der das UIM fehlt, zeigt im Vergleich zur Negativkontrolle zwar eine Reduktion von MLV.gag in den Lysaten und im Zellkulturüberstand von 40-50 %, jedoch fällt diese im Vergleich zur Positivkontrolle, bei der die Reduktion bei etwa 80 % liegt, geringer aus.  $\gamma 1\text{-HA}$  zeigt keine Reduktion von MLV.gag, wodurch gezeigt wird, dass die Reduktion von MLV.gag ein spezifischer Effekt von exogenem  $\gamma 2$ -Adaptin ist. Der weniger stark ausgeprägte Effekt von  $\gamma 2\Delta \text{UIM}$  deutet darauf hin, dass das UIM zwar für die Reduktion von MLV.gag notwendig, jedoch nicht ausreichend ist. Es scheint weitere für die Funktion von  $\gamma 2$ -Adaptin wichtige Domänen in seiner Kopf-Region (AS 1-527) zu geben. Die Gelenk-Region und die Ohr-Domäne von  $\gamma 2$ -Adaptin scheinen für den reduzierenden Effekt entbehrlich zu sein.

Um die funktionell wichtigen Domänen in der Kopf-Domäne von  $\gamma 2$ -Adaptin weiterführend zu charakterisieren, wurde eine Serie neuer Mutanten hergestellt. In vorausgegangenen Arbeiten wurde bereits die Mutante  $\gamma 2\Delta 193-785$  untersucht (Rost et al. 2006), die funktionell inaktiv ist. Folglich sollte der funktionell wichtige Bereich in der Aminosäure-Region 193-528 von  $\gamma 2$ -Adaptin lokalisiert sein. Durch bioinformatische Untersuchungen dieses Bereichs konnte eine potentielle PH-Domäne (*pleckstrin homology domain*) in der Aminosäure-Region 120-300 identifiziert werden. Die durch Klonierung und/oder PCR generierten Mutanten sind in Abbildung 12 A schematisch dargestellt. Den Deletionsmutanten fehlen die angegebenen Aminosäurebereiche, während die Punktmutationen C180T und NEKNH in Annäherung an die Sequenz von  $\gamma 1$ -Adaptin eingefügt wurden und bei der Mutante  $\gamma 2:\gamma 1_{-300}$  die Aminosäuren 120-300 von  $\gamma 2$ -Adaptin gegen die entsprechende Region aus  $\gamma 1$ -Adaptin ausgetauscht wurde.



**Abbildung 12: Wirkung von Kopf-Domänen-Mutanten von  $\gamma$ 2-Adaptin auf die MLV.gag-Morphogenese**  
 HuH-7 Zellen wurden mit MLV.gag und verschiedenen  $\gamma$ 2-Konstrukten bzw. einem leeren Flag-Vektor als Kontrolle kotransfiziert und nach drei Tagen Expression in Triton-Lysepuffer lysiert. Die VLPs wurden aus dem Zellkulturüberstand durch Ultrazentrifugation aufgereinigt. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. MLV.gag wurde über anti-JL8 nachgewiesen und die  $\gamma$ 2-Konstrukte bzw.  $\gamma$ 1-HA über anti-HA. (A) zeigt die verwendeten Konstrukte in schematischer Darstellung, (B) die Ergebnisse aus dem Western Blot und (C) die quantitative Auswertung der MLV.gag-Banden im Western-Blot im Vergleich zur Negativkontrolle. „n“ gibt die Anzahl der Experimente an.



Mit Hilfe der oben beschriebenen Ko-Transfektions-Studien wurde die Wirkung der Mutanten auf die Morphogenese von MLV.gag untersucht.

Wie in Abbildung 12 B und C dargestellt, zeigen die Mutanten  $\gamma 2\Delta 120-300$ ,  $\gamma 2\Delta 180-300$ ,  $\gamma 2\Delta 180-193$ ,  $\gamma 2\_C180T$  und  $\gamma 2\_NEKNH$  eine Reduktion von MLV.gag in den Lysaten und eine Reduktion der VLPs im Zellkulturüberstand auf 60-80 %. Ihr reduzierender Effekt ist somit im Vergleich zum Wildtyp von  $\gamma 2$ -Adaptin stark abgeschwächt. Im Gegensatz dazu zeigen sich die Mutanten  $\gamma 2\Delta 220-300$ ,  $\gamma 2\Delta 240-300$ ,  $\gamma 2\Delta 260-300$  und  $\gamma 2\Delta 280-300$  noch funktionell. Die Mutante  $\gamma 2:\gamma 1\_300$  zeigt weder eine Auswirkung auf MLV.gag im Lysat noch auf die VLPs im Überstand.

In der Aminosäuren-Region 180-220 scheint eine wichtige Domäne zu liegen, da die Mutanten  $\gamma 2\Delta 120-300$ ,  $\gamma 2\Delta 180-300$  und  $\gamma 2\Delta 180-193$  funktionell stark eingeschränkt sind, während sich die Mutanten  $\gamma 2\Delta 220-300$ ,  $\gamma 2\Delta 240-300$ ,  $\gamma 2\Delta 260-300$  und  $\gamma 2\Delta 280-300$  wie der Wildtyp von  $\gamma 2$ -Adaptin verhalten. Auch der Funktionsverlust von  $\gamma 2:\gamma 1\_300$  deutet darauf hin und führte zu einem näheren Vergleich der korrespondierenden Regionen in  $\gamma 1$ - und  $\gamma 2$ -Adaptin.  $\gamma 2\_C180T$  und  $\gamma 2\_NEKNH$ , bei denen die Sequenz von  $\gamma 2$ -Adaptin durch Austausch einzelner Aminosäuren an die von  $\gamma 1$ -Adaptin angeglichen wurde, sind funktionell ähnlich stark eingeschränkt wie  $\gamma 2\Delta 120-300$ ,  $\gamma 2\Delta 180-300$  und  $\gamma 2\Delta 180-193$ . Sequenzanalysen deuten auf eine potentielle PH-Domäne (*pleckstrin homology domain*) in dieser Region hin (Abbildung 13).

PH-Domänen kommen ausschließlich in Eukaryoten vor und bestehen aus 100-120 Aminosäuren (Wang et al. 2000). Sie besitzen mit Ausnahme einiger weniger Aminosäuren im N-terminalen und einer stark konservierten Aminosäure (**W/F/Y**) im C-terminalen Bereich eine geringe Sequenzhomologie, zeichnen sich jedoch durch eine hoch konservierte Tertiärstruktur aus: ihre N-terminale Sequenz (ca. 85 AS) bildet sieben antiparallele  $\beta$ -Faltblätter aus und die C-terminale Sequenz (ca. 15 AS) eine  $\alpha$ -Helix (Lemmon 2004). Dabei verschließt die  $\alpha$ -Helix die Fass-artige  $\beta$ -Faltblatt-Struktur und stabilisiert so die Domänenstruktur. (Shaw 1996) PH-Domänen können mit Phosphatidylinositol interagieren, jedoch binden nur etwa 10 % der PH-Domänen dieses spezifisch und mit hoher Affinität. PH-Domänen spielen nicht nur bei der Membran-Assoziation von Proteinen eine wichtige Rolle, sondern auch bei Protein-Protein-Interaktionen (Lemmon 2004). PH-Domänen sind multifunktionelle Protein-Module und kommen u.a. in zellulären Signalproteinen, Serin/Threonin-Kinasen, Tyrosin-Kinasen, GEFs, endozytotischen GTPasen, Adaptern, mit dem Zytoskelett assoziierten Proteinen und Enzymen des Phosphoinositid-Metabolismus vor

(Rebecchi und Scarlata 1998). PH-Domänen dienen dabei nicht nur der Regulation der Interaktionspartner, sondern auch der Regulation der Proteine selbst (Wang et al. 2000). Die Multifunktionalität der PH-Domänen zeigt sich auch darin, dass sie Ubiquitin-bindende Eigenschaften besitzen und zu den UBDs zählen (Randles und Walters 2012).

**A**

Konsensussequenz PH-Domäne	<b>G</b>	(1)	M I V <b>L</b>	(21)	<b>K</b> E R D H	(4)	M I V <b>L</b>	(9)	M I V <b>L</b>	(3)	<b>K</b> E R D H
$\gamma$ 2-Adaptin AS 189-291	G	(1)	L	(22)	K	(4)	L	(9)	M	(4)	E

**B**

$\gamma$ 2-Adaptin:

```

1  mvvpslklqd lieeirgakt qaqereviqk ecahirasfr dgdpvhrhrq lakllyvhml
61  gypahfgqme clkliassrf tdkrvgyлга mlllderhda hllitnsikn dlsqgiqpqv
121 glalctlstm gsaemcrdla peveklilqp spyvrkkail tavhmirkvp elssvflppc
181 aqllherhhg illgtitlit elcerspaal rhfrkvvpql vhilrtlvm gystehsisg
241 vsdpflqvqi lrlrlilgrn heesetmnd llaqvntnd tsrnagnavl fetvltimdi
301 rsaaglrvla vnigrflln sdrniryval tsllrlvqsd hsavqrhrpt vveclretda
361 slsrralels lalvnssnvr ammqelqaf1 escppdlrad casgillaae rfaptkrwhi
421 dtihvlтта gthvrddava nltqliggaq elhaysvrrl ynalaedisq qplvqvaawc
481 igeygdllla gnceeieplq vdeeevlall ekvlqshmsl patrgyalta lmk1strlcg
541 dnnrirqvvs iygsclldvel qgraveydtl frkydhmraa ilekmp1ver dgpqadeeak
601 eskeaaqlse aapvptepqa sqllldlldll dgasgdvqhp phldpspgga lvhlldlpcv
661 ppppapipdl kvferegvql nlsfirppen palllitita tnfsegdvth ficqaavpks
721 lqlqlqapsg ntvpargglp itqlfrilnp nkaplrklr ltydhfhqsv qeifevnnlp
781 veswq

```

**Abbildung 13: PH-Domäne**

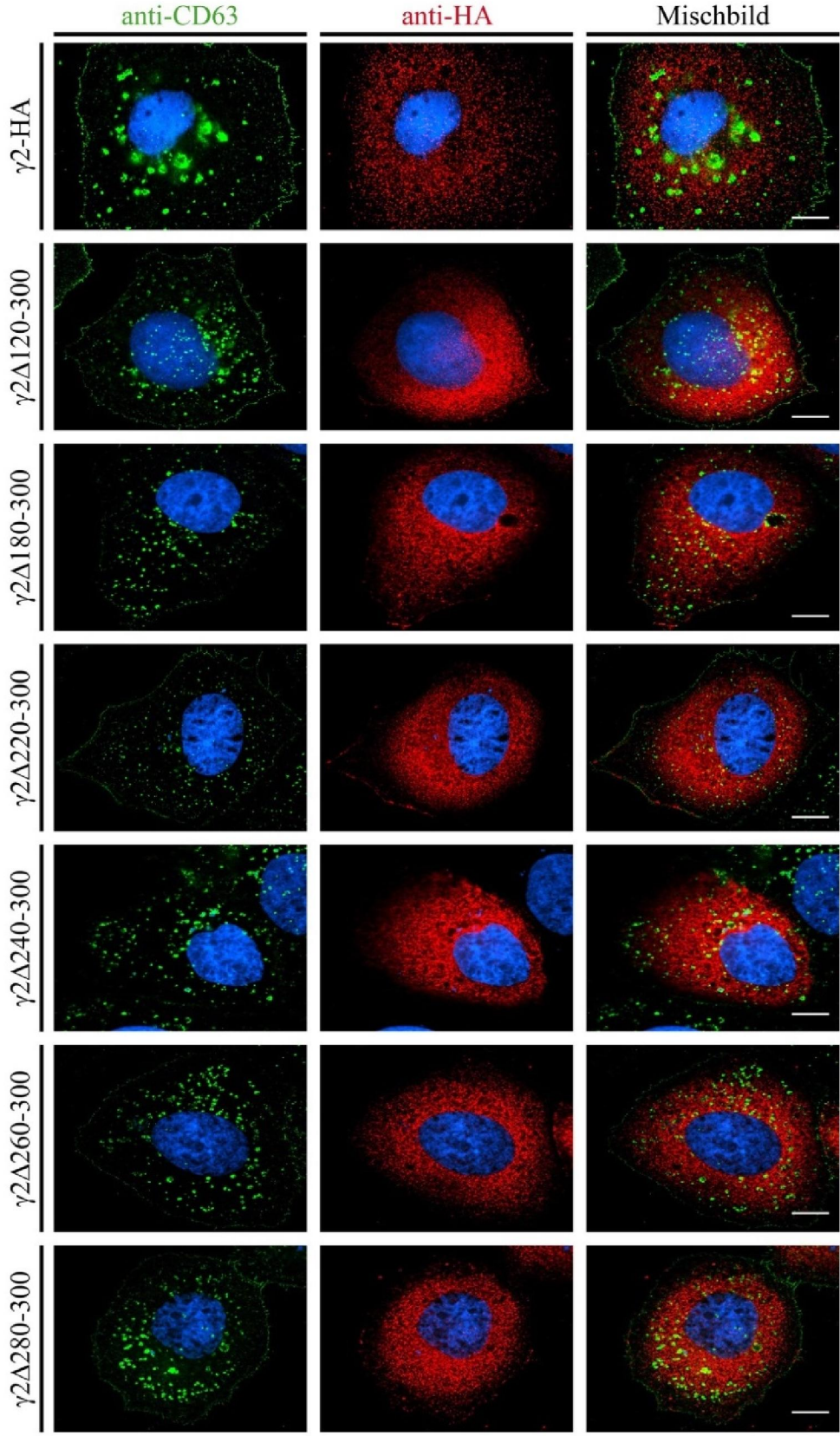
(A) Konsensussequenz der N-terminalen Sequenz von PH-Domänen (nach <http://smart.embl.de>; *family alignment for the PH domain; normal smart mode*) im Vergleich zur Aminosäuresequenz von  $\gamma$ 2-Adaptin. Übereinstimmungen sind in Blau hervor gehoben. Die am häufigsten auftretenden AS sind fett hervor gehoben. (B) Aminosäuresequenz von  $\gamma$ 2-Adaptin, wobei die Deckung mit der N-terminalen Konsensussequenz der PH-Domäne Rot hervorgehoben ist. Die hoch konservierte, aromatische Aminosäure am C-terminalen Ende der PH-Domäne ist unterstrichen.

Die Aminosäuren sind im Ein-Buchstaben-Code angegeben. Die Zahlen in Klammern stehen für die Anzahl der zwischengeschalteten, nicht konservierten Aminosäuren.

#### 4.2.2 Phänotypische Charakterisierung der $\gamma 2$ -Mutanten

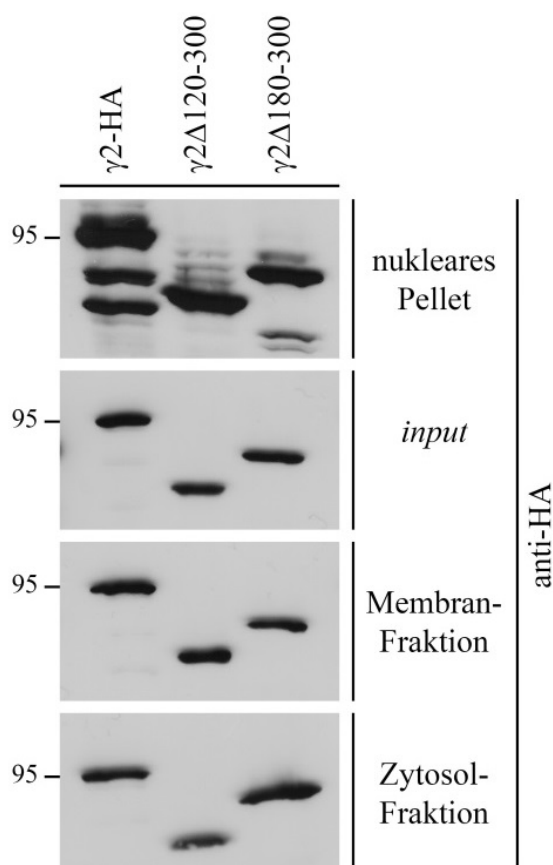
Da PH-Domänen die Bindung an Phosphatidylinositol ermöglichen und somit Einfluss auf die Membranassoziation des Proteins haben können, wurde die subzelluläre Lokalisation einiger  $\gamma 2$ -Mutanten untersucht.

Hierzu wurden HuH-7 Zellen mit  $\gamma 2$ -HA,  $\gamma 2\Delta 120-300$ ,  $\gamma 2\Delta 180-300$ ,  $\gamma 2\Delta 220-300$ ,  $\gamma 2\Delta 240-300$ ,  $\gamma 2\Delta 260-300$  bzw.  $\gamma 2\Delta 280-300$  transfiziert. Nach dreitägiger Expression wurden die Zellen fixiert und für die Immunfluoreszenz-Untersuchungen gefärbt. Die  $\gamma 2$ -Konstrukte wurden über anti-HA nachgewiesen und endogenes CD63 als endosomaler Marker über anti-CD63 angefärbt (Abbildung 14).  $\gamma 2$ -Adaptin und die untersuchten  $\gamma 2$ -Mutanten zeigen eine zytoplasmatische, perinukleare Lokalisation (rot). CD63 (grün) ist an vesikulären Strukturen im Zytoplasma und z.T. an der Plasmamembran lokalisiert. An den zytoplasmatischen Strukturen kommt es teilweise zur Ko-Lokalisation von CD63 mit den  $\gamma 2$ -Konstrukten, unabhängig von der Art der Mutation. Es konnte keine wesentliche Änderung in der Lokalisation der verschiedenen  $\gamma 2$ -Konstrukte beobachtet werden, obgleich  $\gamma 2\Delta 120-300$  und  $\gamma 2\Delta 180-300$  die potentielle PH-Domäne nicht mehr tragen. Bei allen  $\gamma 2$ -Konstrukten kommt es zur teilweisen Kolo-kalisation mit CD63, wodurch die Assoziation von  $\gamma 2$ -Adaptin mit dem endo-lysosomalen System bestätigt werden konnte. Hierbei hat die potentielle PH-Domäne in  $\gamma 2$ -Adaptin offensichtlich keinen Einfluss auf dessen intrazelluläre Lokalisation und Assoziation mit MVBs.



**Abbildung 14: Intrazelluläre Verteilung der  $\gamma 2$ -Mutanten**  
HuH-7 Zellen wurden mit  $\gamma 2$ -HA,  $\gamma 2\Delta 120$ -300,  $\gamma 2\Delta 180$ -300,  $\gamma 2\Delta 220$ -300,  $\gamma 2\Delta 240$ -300,  $\gamma 2\Delta 260$ -300 bzw.  $\gamma 2\Delta 280$ -300 transfiziert und nach dreitägiger Expression mit PFA fixiert. Die  $\gamma 2$ -Konstrukte wurden über anti-HA (rot) angefärbt und CD63 als endosomaler Marker über anti CD63 (grün). Kolokalisation ist in Gelb dargestellt. Balken  $\cong 10 \mu\text{m}$

Zusätzlich wurde die Lokalisation der Mutanten  $\gamma 2\Delta 120-300$  und  $\gamma 2\Delta 180-300$  durch subzelluläre Fraktionierung weiterführend charakterisiert, indem die HuH-7 Zellen nach der Transfektion in Membran- und Zytosolfraktion (3.3.4.1) aufgetrennt wurden. Als Kontrolle dienten hierbei  $\gamma 2$ -transfizierte Zellen. Die Zellen wurden durch hypotonischen Schock und mechanische Scherkräfte aufgebrochen und das Homogenat zunächst durch Zentrifugation von Zellkernen und großen Zelltrümmern befreit. Der dabei entstandene postnukleare Überstand wurde über die Ultrazentrifugation auf einem Sucrose-Kissen in Membran- und Zytosolfraktion aufgetrennt. Anschließend wurden die Proben über SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Der Nachweis der  $\gamma 2$ -Konstrukte erfolgte über anti-HA. Die Ergebnisse sind in Abbildung 15 dargestellt und ergänzen die Beobachtung aus der Immunfluoreszenz, dass sich  $\gamma 2\Delta 120-300$  und  $\gamma 2\Delta 180-300$  in ihrer subzellulären Verteilung nicht von  $\gamma 2$ -HA unterscheiden.



**Abbildung 15: Subzelluläre Verteilung von  $\gamma 2$ -HA,  $\gamma 2\Delta 120-300$  und  $\gamma 2\Delta 180-300$**

HuH-7 Zellen wurden mit  $\gamma 2\Delta 120-300$  und  $\gamma 2\Delta 180-300$  bzw.  $\gamma 2$ -HA als Kontrolle transfiziert und nach dreitägiger Expression in Membran- und Zytosolfraktion ausgetrennt. Hierfür wurden die Zellen zunächst über hypotonischen Schock und mechanische Scherkräfte ausgebrochen und der postnukleare Überstand auf einem Sucrose-Kissen in der Ultrazentrifuge zentrifugiert, wobei die Membranen pelletieren. Die Analyse der Proben erfolgte mittels SDS-PAGE und Western Blot, wobei die  $\gamma 2$ -Konstrukte über anti-HA nachgewiesen wurden.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die Überexpression von  $\gamma 2$ -Adaptin zu einem verstärkten Abbau von endogenen Substraten des endo-lysosomalen Transportsystems führt, während seine Depletion diese Degradation verzögert. Das retrovirale MLV.gag sprosst ESCRT-abhängig in das Lumen der MVBs und seine VLPs werden nach Fusion der MVBs mit der Plasmamembran freigesetzt. Überschüssiges  $\gamma 2$ -Adaptin führt zur Reduktion von intra- und extrazellulärem MLV.gag, während die  $\gamma 2$ -Depletion diese erhöht. Dies deutet auf eine Rolle von  $\gamma 2$ -Adaptin im endo-lysosomalen Transportsystem der Zelle hin. Der Effekt von überschüssigem  $\gamma 2$ -Adaptin auf MLV.gag ist abhängig von seiner Kopf-Domäne, in der bisher das UIM und eine potentielle PH-Domäne als funktionell wichtige Regionen identifiziert werden konnte. Hierbei hat die angenommene PH-Domäne jedoch keinen Einfluss auf die subzelluläre Verteilung von  $\gamma 2$ -Adaptin. Somit scheint diese Domäne nicht die Membran-Assoziation von  $\gamma 2$ -Adaptin zu vermitteln, sondern dient möglicherweise der Interaktion mit anderen Proteinen.

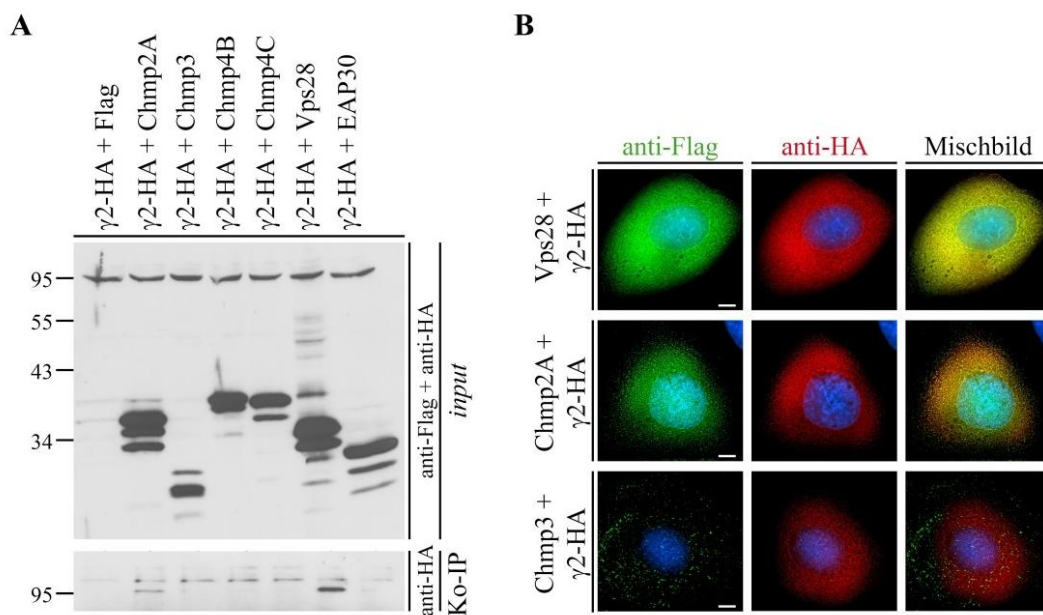
### **4.3 Identifizierung und Charakterisierung von Interaktionspartnern von $\gamma 2$ -Adaptin**

Vorausgegangene Experimente haben gezeigt, dass  $\gamma 2$ -Adaptin einen Einfluss auf die ESCRT-Kaskade und damit auf die Morphogenese von MVBs hat. Die Überexpression von  $\gamma 2$ -HA führt zur Reduktion von wildtypischen und dominant-negativen Formen von Chmp3 und Vps4 in Triton-Lysaten, wobei die wildtypischen Konstrukte in den Pellets der Lysate nachgewiesen werden können, die dominant-negativen jedoch nicht. Zudem führt die Depletion von  $\gamma 2$ -Adaptin zu erhöhten zellulären Mengen von dominant-negativem Chmp3 und Vps4 (Döring et al. 2010). Somit scheint  $\gamma 2$ -Adaptin ein wichtiger Faktor für die Homeostase der ESCRT-Kaskade zu sein.

Um zu untersuchen, wie  $\gamma 2$ -Adaptin Einfluss auf die ESCRT-Kaskade nehmen kann, wurden Ko-Immunpräzitationsstudien nach dem CHAPS-Protokoll (3.3.3.2) durchgeführt. Hierfür wurden HuH-7 Zellen mit  $\gamma 2$ -HA und verschiedenen Komponenten der ESCRT-Kaskade bzw. einem leeren Flag-Vektor als Kontrolle kotransfiziert und nach transienter Expression lysiert. Bei den untersuchten Komponenten der ESCRT-Kaskade handelt es sich um Flag-markierte Konstrukte von Chmp2A, Chmp3, Chmp4B, Chmp4C, Vps28 und EAP30. Vor der Immunpräzitation wurde jeweils eine *input*-Kontrolle für den Western Blot abgenommen. Die Immunpräzitation erfolgte mit anti-Flag beschichteten Partikeln und die

Präzipitate wurden in SDS-Probenpuffer aufgenommen und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Ko-präzipitiertes  $\gamma$ 2-HA wurden durch anti-HA im Western Blot nachgewiesen (Abbildung 16 A). Die *input*-Kontrolle zeigt die gleichmäßige Expression von  $\gamma$ 2-HA und der Flag-markierten Komponenten der ESCRT-Kaskade entsprechend ihrer spezifischen Molekulargewichte. Die Ko-IP-Analyse zeigte, dass  $\gamma$ 2-HA spezifisch mit den ESCRT-Komponenten Chmp2A und Vps28 interagiert (siehe Ko-IP), jedoch nicht mit Chmp3, Chmp4B Chmp4C und EAP30.

Um die Interaktion von  $\gamma$ 2-HA mit Chmp2A und Vps28 zu bestätigen, wurden Immunfluoreszenzfärbungen angefertigt. Hierfür wurden HuH-7 Zellen mit  $\gamma$ 2-HA und Chmp2A, Vps28 bzw. Chmp3 kotransfiziert und die Zellen nach PFA-Fixierung mit anti-HA und anti-Flag angefärbt. Die Aufnahmen sind in Abbildung 16 B dargestellt. Vps28, Chmp2A und  $\gamma$ 2-Adaptin zeigen eine zytoplasmatische Färbung, während Chmp3 in punktuellen Aggregaten im Zytoplasma lokalisiert ist. Die Immunfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigen eine Ko-Lokalisation von  $\gamma$ 2-HA mit Chmp2A bzw. Vps28, jedoch keine mit Chmp3.



**Abbildung 16:  $\gamma$ 2-HA interagiert mit Chmp2A und Vps28**

(A) HuH-7 Zellen wurden mit  $\gamma$ 2-HA und Chmp2A, Chmp3, Chmp4B, Chmp4C, Vps28, EAP30 bzw. einem leeren Flag-Vektor als Kontrolle kotransfiziert und nach dreitägiger Expression in Lysepuffer mit 2 % Chaps lysiert. Die Immunpräzipitation erfolgte mit anti-Flag-beschichteten Partikeln. Vor der Immunpräzipitation wurde jeweils eine *input* Kontrolle für den Western Blot abgenommen. Die Ko-Immunpräzipitation wurde im Western Blot über anti-HA nachgewiesen. Die Expression von  $\gamma$ 2-HA und der Flag-markierten Komponenten der ESCRT-Kaskade wurde im *input* mit anti-Flag und anti-HA überprüft. (B) HuH-7 Zellen wurden mit  $\gamma$ 2-HA und Chmp2A, Vps28 bzw. Chmp3 kotransfiziert und nach dreitägiger Expression mit PFA fixiert.  $\gamma$ 2-HA wurde über anti-HA (rot) und Chmp2A, Vps28 und Chmp3 über anti-Flag (grün) nachgewiesen. Balken  $\cong$  10  $\mu$ m

### 4.3.1 Untersuchungen zum Wechselspiel von $\gamma$ 2-Adaptin und seinen Interaktionspartnern

Anhand von MLV.gag wurde untersucht, ob die Überexpression der Interaktionspartner einen ähnlichen Effekt wie überexprimiertes  $\gamma$ 2-Adaptin zeigt, bzw. ob die Überexpression der Interaktionspartner den reduzierenden Effekt von  $\gamma$ 2-Adaptin relativieren kann.

Hierzu wurden die  $\gamma$ 2-Adaptin-spezifischen Interaktionspartner Vps28, Chmp2A, Nedd4 und Ubiquitin zusammen mit MLV.gag kotransfiziert. Zusätzlich wurden HuH-7 Zellen mit MLV.gag,  $\gamma$ 2-HA und jeweils einem der Interaktionspartner (Vps28, Chmp2A und Nedd4 sind Flag-markiert; Ubiquitin ist HA-markiert) im DNA-Verhältnis 1 + 2 + 2 kotransfiziert. Nach transienter Expression wurden die Zellen lysiert und die VLPs aufgereinigt. Die Proben wurden im Western Blot mit spezifischen Antikörpern analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 17 dargestellt, wobei A die Ergebnisse für Vps28, B für Chmp2A, C für Nedd4 und D für Ub-HA zeigt. Die quantitative Auswertung der Bandenintensität der Interaktionspartner bei Ko-Expression mit  $\gamma$ 2-HA im Vergleich zur Kontrolle ist in Abbildung 17 E aufgeführt, wobei Ub-HA aufgrund der hohen Bandenintensität quantitativ nicht ausgewertet werden konnte.

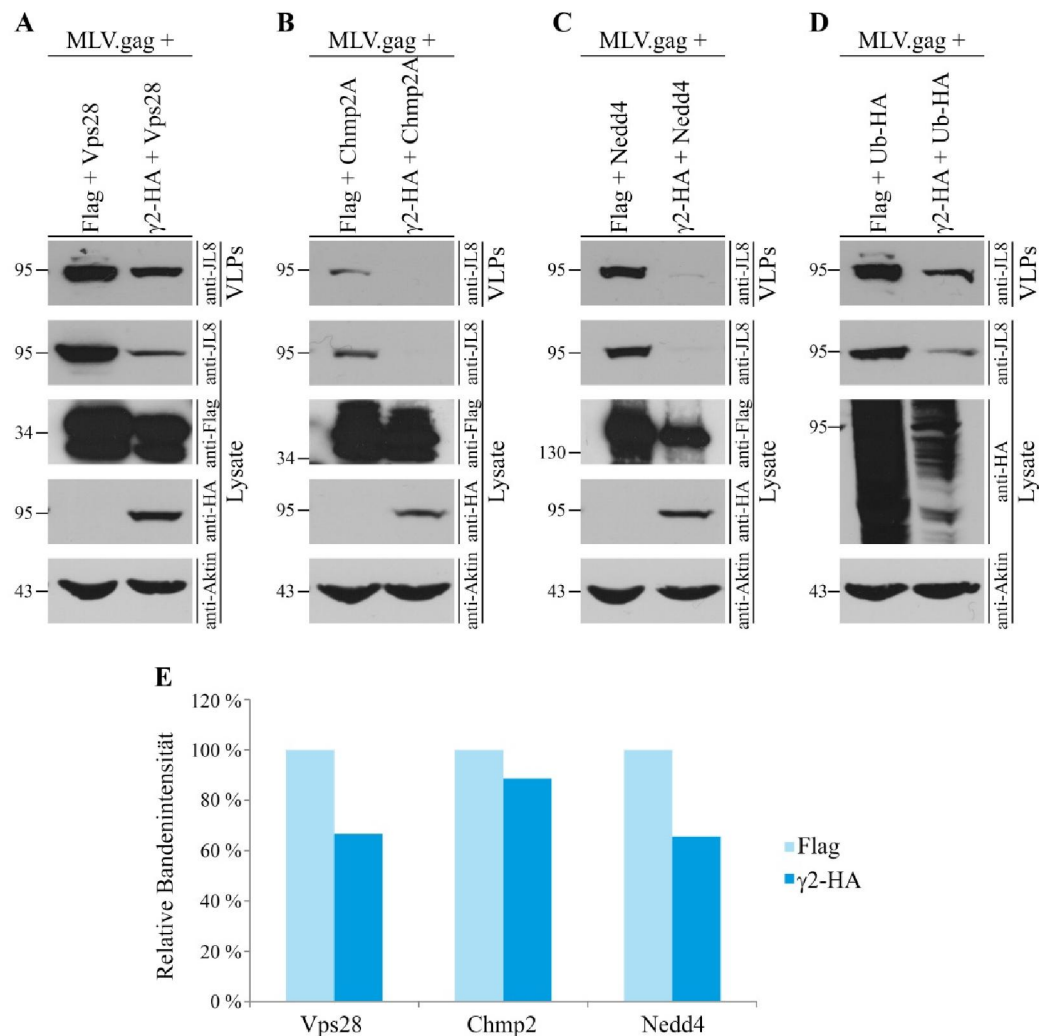
Wie Abbildung 17 A zeigt, führt überexprimiertes Vps28 nicht zu einer Reduktion von MLV.gag und hat auch keinen Einfluss auf die Reduktion von MLV.gag durch überexprimiertes  $\gamma$ 2-HA. Vielmehr konnte beobachtet werden, dass exogenes  $\gamma$ 2-HA Vps28 um 35 % reduziert. Vergleichbare Ergebnisse wurden für Nedd4 (Abbildung 17 C) und für Ub-HA (Abbildung 17 D) erzielt.

Die Überexpression von Chmp2A führt hingegen zu einer Reduktion von MLV.gag im Lysat und zu einer Reduktion der VLPs im Zellkulturüberstand, welche durch  $\gamma$ 2-HA noch zusätzlich verstärkt wird (Abbildung 17 B). Zudem hat die Überexpression von  $\gamma$ 2-HA keinen Einfluss auf Chmp2A. Der reduzierende Effekt von Chmp2A auf MLV.gag lässt sich damit erklären, dass Chmp2A neben seiner Funktion bei der Abschnürung von ILVs auch eine Rolle bei der Fusion von MVBs mit Lysosomen zugeschrieben wird (Urwin et al. 2010). Eine der ILV-Abschnürung nachgeschaltete Funktion von Chmp2A könnte auch erklären, warum es durch überschüssiges  $\gamma$ 2-Adaptin nicht reduziert wird.

Diese Daten zeigen, dass der reduzierende Effekt von exogenem  $\gamma$ 2-HA auf intra- und extrazelluläres MLV.gag nicht durch gleichzeitige Überexpression seiner Interaktionspartnern relativiert werden kann. Es besteht also keine Konkurrenz zwischen dem



reduzierenden Effekt von überexprimiertem  $\gamma$ 2-Adaptin auf MLV.gag auf der einen und der Interaktion von  $\gamma$ 2-Adaptin mit Vps28, Nedd4, Chmp2A und Ubiquitin auf der anderen Seite. Überexprimiertes Chmp2A verhält sich ähnlich wie überschüssiges  $\gamma$ 2-Adaptin, während überschüssiges Vps28, Nedd4 und Ubiquitin keinen Einfluss auf die Freisetzung der VLPs und den Abbau von MLV.gag haben. Vps28, Nedd4 und Ubiquitin werden vielmehr selbst durch überschüssiges  $\gamma$ 2-Adaptin reduziert.



**Abbildung 17:**

**Wirkung von  $\gamma$ 2-Adaptin und seinen Interaktionspartnern auf die MLV.gag-Morphogenese**  
 HuH-7 Zellen wurden mit den  $\gamma$ 2-Interaktionspartnern Vps28, Chmp2A, Nedd4 bzw. Ubiquitin und MLV.gag bzw. als Kontrolle MLV.gag und  $\gamma$ 2-HA kotransfiziert. Nach dreitägiger Expression wurden die Zellen in Triton-Lysepuffer lysiert und die VLPs aus dem Zellkulturüberstand aufgereinigt. Die Proben wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot analysiert. Zum Nachweis von MLV.gag wurde anti-JL8, von  $\gamma$ 2-HA und Ub-HA anti-HA und zum Nachweis von Vps28, Chmp2A und Nedd4 anti-Flag verwendet. (A) Zeigt die Ergebnisse für Vps28, (B) für Chmp2A, (C) für Nedd4, (D) für Ub-HA und in (E) ist die quantitative Auswertung der Flag-Banden in der Flag-Kontrolle und bei Überexpression von  $\gamma$ 2-Adaptin dargestellt.

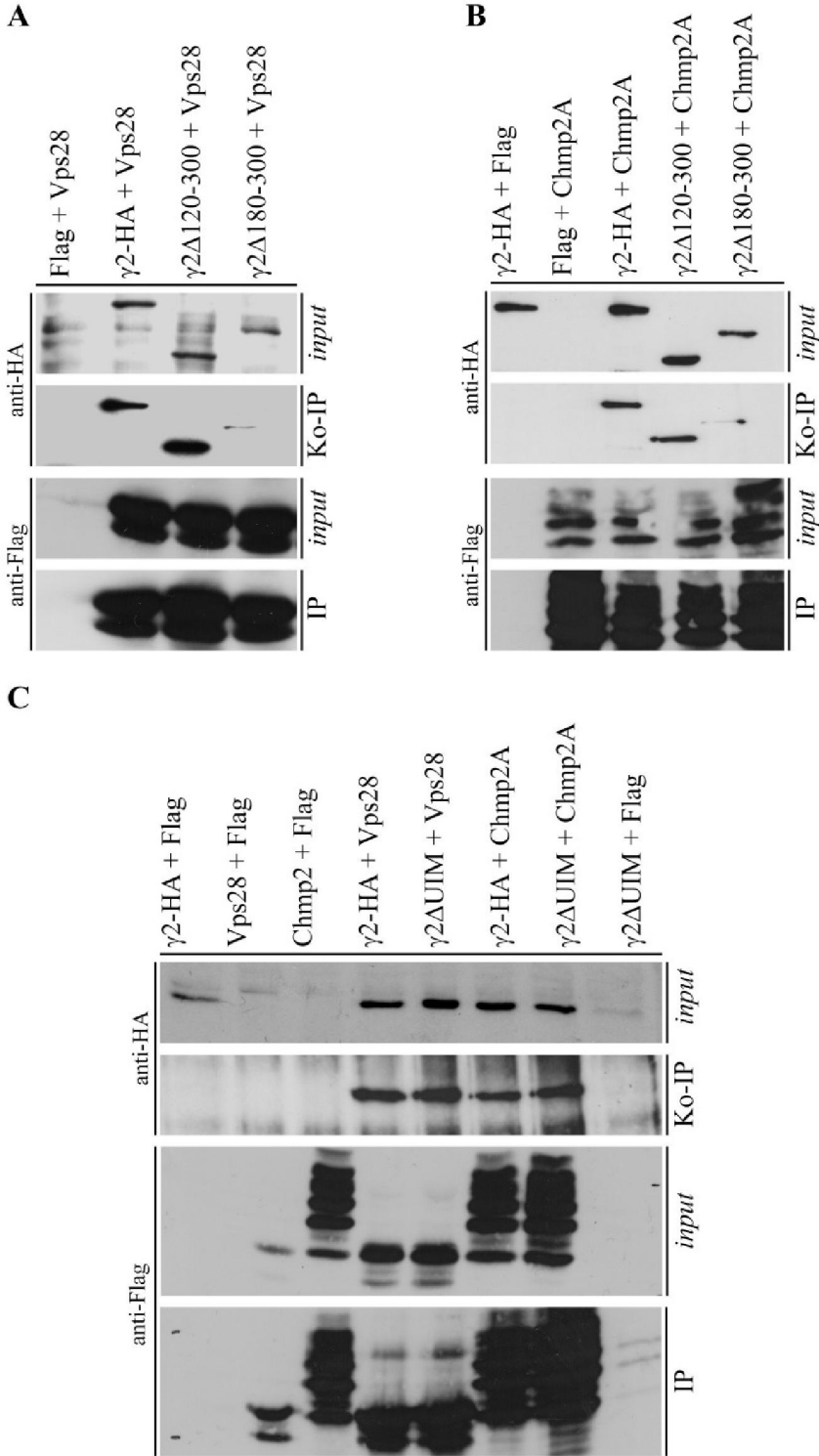
### 4.3.2 Untersuchungen zur Interaktion von Vps28 bzw. Chmp2A und $\gamma$ 2-Mutanten

Es konnte gezeigt werden, dass die mögliche PH-Domäne und das UIM eine wichtige Rolle für den reduzierenden Effekt von überschüssigem  $\gamma$ 2-HA spielen. Daher wurden Interaktionsstudien mit  $\gamma$ 2-Mutanten, ohne mutmaßliche PH-Domäne ( $\gamma$ 2 $\Delta$ 120-300 und  $\gamma$ 2 $\Delta$ 180-300) bzw. UIM ( $\gamma$ 2 $\Delta$ UIM) und den Interaktionspartnern Vps28 bzw. Chmp2A durchgeführt.

HuH-7 Zellen wurden mit  $\gamma$ 2-HA,  $\gamma$ 2 $\Delta$ 120-300,  $\gamma$ 2 $\Delta$ 180-300 bzw.  $\gamma$ 2 $\Delta$ UIM und Vps28, Chmp2A bzw. einem leeren Flag-Vektor kotransfiziert. Die Ko-Immunpräzipitation wurde nach dem Triton-Protokoll durchgeführt und erfolgte mit anti-Flag-gekoppelten Partikeln nach einer Abnahme der *input*-Kontrolle. Anschließend wurden die Präzipitate in SDS-Probenpuffer aufgenommen und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Die Immunpräzipitation wurde über anti-Flag nachgewiesen und die Präzipitate wurden mit anti-HA auf die Ko-Immunpräzipitation  $\gamma$ 2-HA bzw.  $\gamma$ 2 $\Delta$ 120-300,  $\gamma$ 2 $\Delta$ 180-300 und  $\gamma$ 2 $\Delta$ UIM überprüft.

Abbildung 18 A zeigt die Ergebnisse für Vps28 und  $\gamma$ 2 $\Delta$ 120-300 bzw.  $\gamma$ 2 $\Delta$ 180-300.  $\gamma$ 2 $\Delta$ 120-300 kann wie  $\gamma$ 2-HA im Immunpräzipitat von Vps28 nachgewiesen werden. Auch  $\gamma$ 2 $\Delta$ 180-300 zeigt im Immunpräzipitat eine Bande, auch wenn diese im Vergleich deutlich schwächer ausfällt. Jedoch zeigt  $\gamma$ 2 $\Delta$ 180-300 auch eine schwächere Expression im Vergleich zu  $\gamma$ 2-HA und  $\gamma$ 2 $\Delta$ 120-300, was diesen Unterschied erklären kann. Abbildung 18 B verdeutlicht die Ergebnisse für Chmp2A. Auch hier können sowohl  $\gamma$ 2-HA als auch  $\gamma$ 2 $\Delta$ 120-300 und  $\gamma$ 2 $\Delta$ 180-300 im Immunpräzipitat nachgewiesen werden. Abbildung 18 C zeigt die Ko-Immunpräzipitation von  $\gamma$ 2 $\Delta$ UIM mit Vps28 bzw. Chmp2A. Auch hier wurde  $\gamma$ 2 $\Delta$ UIM genau wie  $\gamma$ 2-HA im Immunpräzipitat von Vps28 und von Chmp2A nachgewiesen.

Folglich können  $\gamma$ 2 $\Delta$ 120-300,  $\gamma$ 2 $\Delta$ 180-300 und  $\gamma$ 2 $\Delta$ UIM wie  $\gamma$ 2-Adaptin noch mit Vps28 und mit Chmp2A interagieren. Somit handelt es sich weder bei der potentiellen PH-Domäne noch bei dem UIM von  $\gamma$ 2-Adaptin um das Interaktionsmodul für Vps28 bzw. Chmp2A.  $\gamma$ 2 $\Delta$ 120-300,  $\gamma$ 2 $\Delta$ 180-300 und  $\gamma$ 2 $\Delta$ UIM, die in ihrer reduzierenden Wirkung im Vergleich zu  $\gamma$ 2-Adaptin zwar stark eingeschränkt sind, besitzen also Zugang zur ESCRT-Kaskade.



**Abbildung 18:  $\gamma 2\Delta 120$ -300,  $\gamma 2\Delta 180$ -300 und  $\gamma 2\Delta UIM$  interagieren mit Vps28 und Chmp2A**  
HuH-7 Zellen wurden mit  $\gamma 2$ -HA,  $\gamma 2\Delta 120$ -300,  $\gamma 2\Delta 180$ -300 bzw.  $\gamma 2\Delta UIM$  und Vps28, Chmp2A bzw. einem leeren Flag-Vektor als Kontrolle kotransfiziert und nach dreitägiger Expression lysiert. Die Immunpräzipitation erfolgte mit anti-Flag-beschichteten Partikeln. Vor der Immunpräzipitation wurde jeweils eine *input*-Kontrolle abgenommen. Die *input*-Kontrolle dient dem Nachweis der Expression der HA-markierten  $\gamma 2$ -Konstrukte und von Vps28 und Chmp2A (beide Flag-markiert). Die Ko-Immünpräzipitation wurde im Western Blot über anti-HA nachgewiesen.  $\gamma 2\Delta 120$ -300,  $\gamma 2\Delta 180$ -300 interagieren mit Vps28 (A) und Chmp2A (B).  $\gamma 2\Delta UIM$  interagiert mit Vps28 und Chmp2A (C).

Diese Versuche zeigen, dass  $\gamma$ 2-Adaptin nicht nur mit Nedd4 (Rost et al. 2008) und Ubiquitin (Rost et al. 2006) interagiert, sondern auch mit Vps28 und Chmp2A. Somit könnte  $\gamma$ 2-Adaptin über Vps28 und Chmp2A Zugang zu ESCRT-Kaskade gewinnen. Die funktionell wichtigen Regionen in  $\gamma$ 2-Adaptin, wie das UIM und seine potentielle PH-Domäne, stellen jedoch offensichtlich keine Interaktionsmodule für Vps28 bzw. Chmp2A dar. Untersuchungen anhand des MLV.gag-Systems zeigen, dass die Interaktion von  $\gamma$ 2-Adaptin mit seinen Partner-Proteinen in keiner Konkurrenz zu seinem reduzierenden Effekt auf MLV.gag steht. Vielmehr werden Nedd4, Vps28 und Ubiquitin selbst durch überschüssiges  $\gamma$ 2-Adaptin reduziert und damit zu sog. „ $\gamma$ 2-Substraten“.

## **4.4 Untersuchungen zur Rolle von Rab7 im endo-lysosomalen System**

Rab-Proteine gehören zu der Ras-Superfamilie der monomeren GTPasen und fungieren im zellulären Vesikeltransport. Rab7A (im Folgenden nur noch Rab7 genannt) ist an frühen und späten Endosomen bzw. MVBs lokalisiert und verleiht den MVBs die Kompetenz mit Lysosomen zu fusionieren (Vanlandingham und Ceresa 2009).

### **4.4.1 Untersuchungen zur Funktion von Rab7 während der MLV.gag-Morphogenese**

Es sollte anhand von Rab7 überprüft werden, ob MLV.gag tatsächlich MVB-Strukturen nutzt, um VLPs freizusetzen, bzw. MVB-abhängig abgebaut werden kann. Eigene Vorarbeiten im Rahmen meiner Diplomarbeit zur Depletion von Rab7 und dessen Effekt auf die intra- und extrazelluläre MLV.gag-Konzentration haben gezeigt, dass die Depletion von Rab7 die Ausschleusung von VLPs steigert. Darauf aufbauend wurden Überexpressions-Experimente durchgeführt, um den Effekt von exogenem Rab7 auf MLV.gag zu prüfen. Depletions- bzw. Überexpressions-Versuche mit einer dominant-negativen (dn) Rab7-Mutante wurden durchgeführt, um die Ergebnisse der Vorversuche zu bestätigen. Dominant-negative Mutanten sind funktionell inaktiv und wirken antagonistisch zu den wildtypischen Proteinen, wodurch die endogene Proteinfunktion gestört wird.

HuH-7 Zellen wurden mit MLV.gag und dem Rab7-Wildtyp (Rab7.wt), Rab7.dn bzw. einem leeren Flag-Vektor kotransfiziert. Bei den Rab7-Konstrukten handelt es sich um GFP-Fusionsproteine mit einem Molekulargewicht von ca. 55 kDa. Nach dreitägiger Expression

wurden die Zellen in Triton-Lysepuffer lysiert und die bei der Zentrifugation zur Klärung der Lysate entstandenen Pellets in SDS-Probenpuffer aufgenommen. Die Zellkulturüberstände wurden filtriert und die darin enthaltenen VLPs aufgereinigt. Die Analyse der Proben erfolgte über SDS-PAGE und Western Blot, wobei sowohl MLV.gag als auch Rab7.wt und Rab7.dn über anti-JL8 nachgewiesen wurden.

Der Depletions-Versuch erfolgte nach dem gleichen Prinzip, wobei hier zunächst die HuH-7 Zellen mit zwei verschiedenen Rab7-siRNAs (#1, #3) bzw. Kontroll-siRNA transfiziert wurden. Nach 48-stündiger Depletion erfolgte die Transfektion mit MLV.gag und die Proben wurden nach 24 Stunden Expression aufgearbeitet. Die Effizienz der Depletion wurde mit anti-Rab7 kontrolliert.

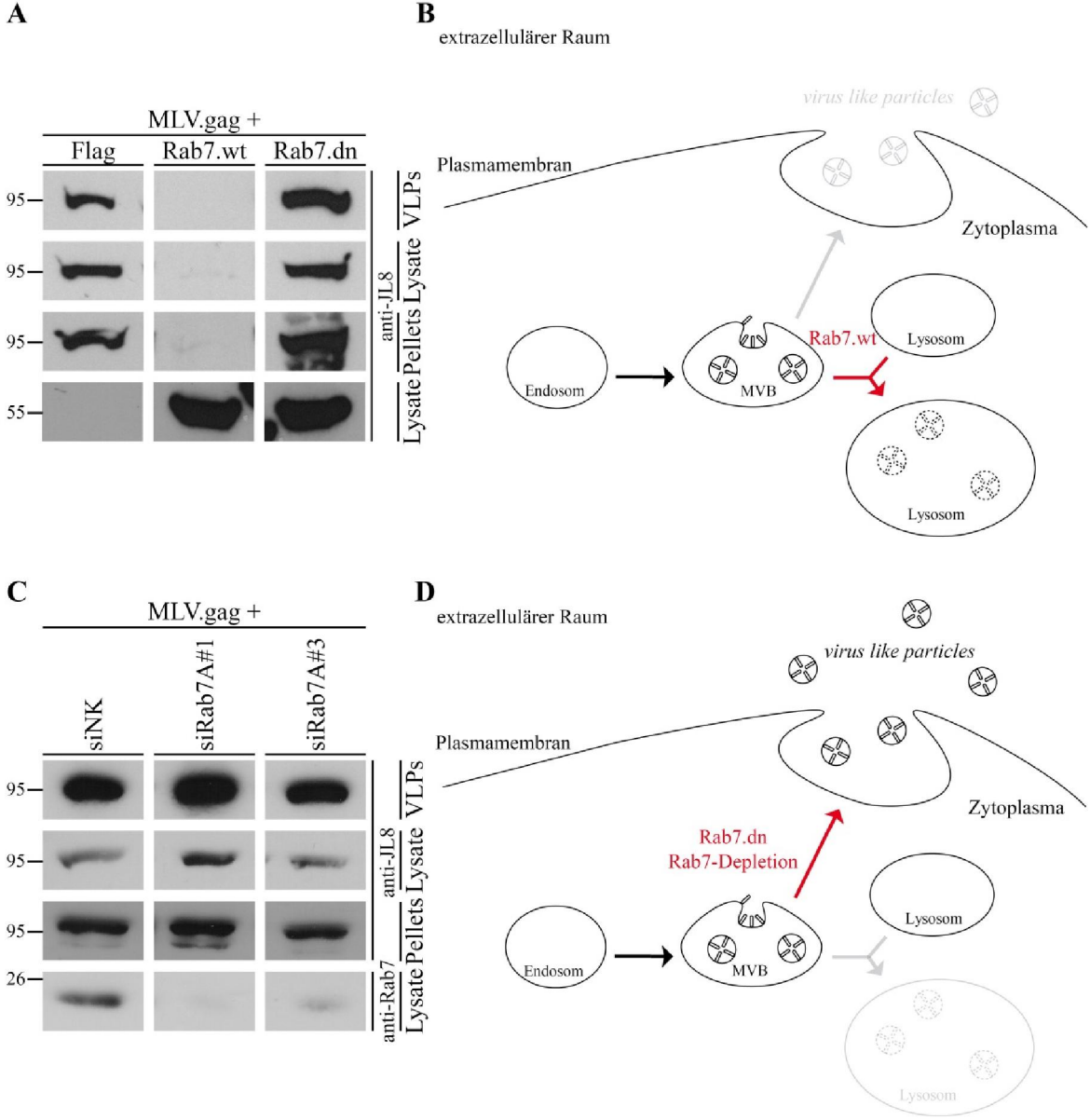
Die Ergebnisse zur Untersuchung des Effekts von exogenem Rab7.wt bzw. Rab7.dn auf MLV.gag sind in Abbildung 19 A dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von wildtypischem Rab7 intra- und extrazelluläres MLV.gag stark reduziert, während durch die dominant-negative Form die intra- und vor allem die extrazelluläre Menge von MLV.gag gesteigert wird. Die Verringerung der intrazellulären Menge von MLV.gag bei Überexpression von Rab7.wt in den Lysaten und auch in den bei der Klärung der Lysate entstandenen Pellets deutet auf dessen verstärkten lysosomalen Abbau hin.

Abbildung 19 C zeigt die Ergebnisse des Depletions-Versuchs. Die frühere Beobachtung, dass die Depletion von Rab7 die Ausschleusung der VLPs steigert, konnte bestätigt werden. Zusätzlich wurde eine leichte Steigerung von MLV.gag in der Zelle beobachtet. Dies unterstützt die Annahme, dass MLV.gag MVBs zur Ausschleusung seiner VLPs nutzt bzw. auch MVB-abhängig abgebaut werden kann.

Eine schematische Darstellung für die mögliche Rolle von überschüssigem Rab7.wt ist in Abbildung 19 B dargestellt. Überschüssiges Rab7.wt führt zu einer verstärkten Fusion der MVBs mit den Lysosomen und damit zu einem verstärkten Abbau von MLV.gag, welches die MVBs zur Ausschleusung seiner VLPs nutzt.

Die mögliche Auswirkung des Fehlens von Rab7 bzw. von überexprimiertem Rab7.dn ist in Abbildung 19 D skizziert. Die dominant-negative Form von Rab7 ist enzymatisch nicht mehr aktiv und kann damit die Fusion der MVBs mit den Lysosomen nicht mehr katalysieren. Daher kommt es bei der Expression von Rab7.dn, ähnlich wie bei der Depletion von Rab7, zu einer Blockade der Fusion von MVBs und Lysosomen, wodurch der lysosomale Abbau von Proteinen, die von den MVBs zu den Lysosomen transportiert werden, unterbunden ist. Somit kann es zu vermehrten Fusion der MVBs mit der

Plasmamembran und damit zur gesteigerten Freisetzung von VLPs in Form von Exosomen kommen.



**Abbildung 19: Die Rolle von Rab7 bei der MLV.gag-Morphogenese**  
(A) Effekt der Überexpression von Rab7.wt und Rab7.dn auf MLV.gag. HuH-7 Zellen wurden mit MLV.gag und Rab7.wt, Rab7.dn bzw. einem leeren Flag-Vektor kotransfiziert. Nach dreitägiger Expression wurden die Zellen lysiert und die dabei entstandenen Pellets in SDS-Probenpuffer aufgenommen. Die VLPs wurden aus den Zellkulturüberständen aufgereinigt. Die Analyse der Proben erfolgte mittels SDS-PAGE und Western Blot, wobei anti-JL8 zum Nachweis verwendet wurde. (B) Schematische Darstellung zum Effekt von exogenem Rab7.wt. (C) HuH-7 Zellen wurden mit zwei siRNAs gegen Rab7 (#1, #3) bzw. Kontroll siRNA transfiziert. Nach zwei Tagen Depletion wurden die Zellen mit MLV.gag transfiziert. Die Expression erfolgte für 24 Stunden. Anschließend wurden die Zellen wie in A aufgearbeitet und die Proben mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert. Der Nachweis von MLV.gag erfolgte über anti-JL8 und die Depletion wurde über anti-Rab7 kontrolliert. (D) Schematische Darstellung der Wirkung von Rab7.dn bzw. der Rab7-Depletion

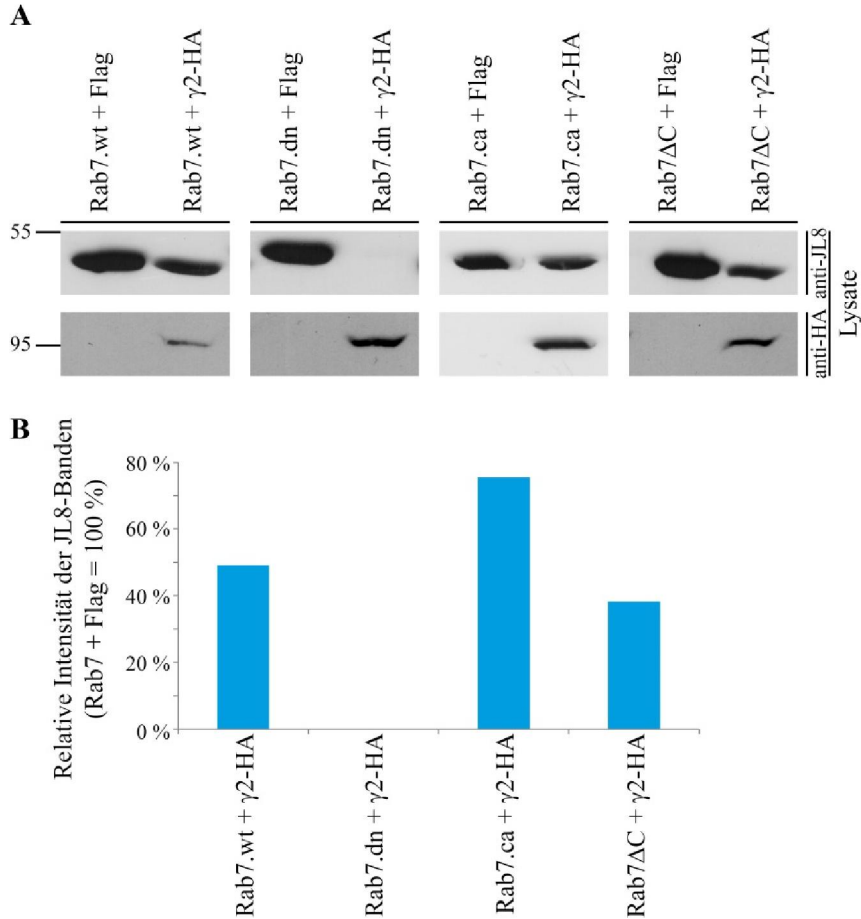
#### 4.4.2 Untersuchung zum Wechselspiel von Rab7 und $\gamma$ 2-Adaptin

Anschließend wurde überprüft, ob überschüssiges  $\gamma$ 2-Adaptin einen ähnlich reduzierenden Effekt auf Rab7 ausübt wie auf Komponenten der ESCRT-Kaskade (Vps28, Chmp2A, Nedd4, Ub) bzw. auf MLV.gag. Hierfür wurden verschiedene Formen von Rab7 verwendet: Rab7.wt, Rab7.dn, welches katalytisch inaktiv ist und nur in der GDP-gebundenen Form vorliegt, konstitutiv-aktives Rab7 (Rab7.ca), welches ausschließlich in der katalytisch aktiven, GTP-gebundenen Form vorkommt, und Rab7 $\Delta$ C, einer Mutante von Rab7, die aufgrund der C-terminalen Deletion der Isoprenylierungsstelle nicht mehr an Membranen assoziieren kann.

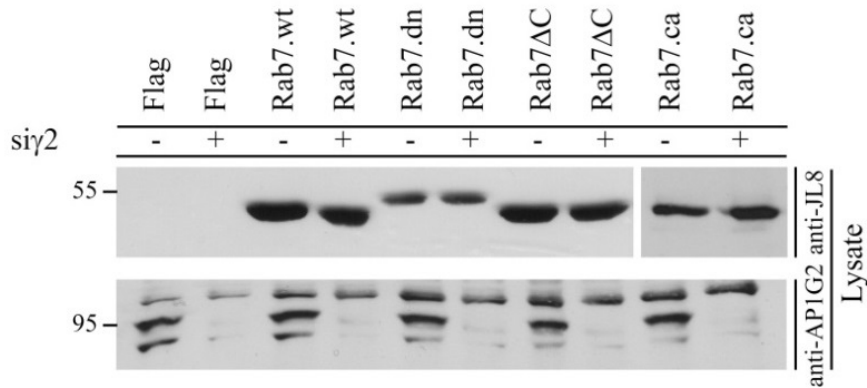
HuH-7 Zellen wurden mit Rab7.wt, Rab7.dn, Rab7.ca bzw. Rab7 $\Delta$ C und  $\gamma$ 2-HA bzw. einem leeren Flag-Vektor als Kontrolle kotransfiziert. Nach dreitägiger Expression wurden die Zellen lysiert. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert, wobei die Rab7-Konstrukte über anti-JL8 und  $\gamma$ 2-HA über anti-HA nachgewiesen wurden.

Wie Abbildung 20 zeigt, reduziert überschüssiges  $\gamma$ 2-HA alle Rab7-Konstrukte. Die quantitative Auswertung des Western Blots (Abbildung 20 B) verdeutlicht, dass der Grad der Reduktion durch überexprimiertes  $\gamma$ 2-HA abhängig von der katalytischen Eigenschaft der Rab7-Konstrukte ist. Rab7.dn, welches die funktionell inaktive Form von Rab7 darstellt, wird am stärksten reduziert, während das konstitutiv-aktive Rab7.ca nur minimal beeinflusst wird. Dies ist analog zu den Ergebnissen vorausgegangener Versuche anhand von Komponenten der ESCRT-Kaskade, da deren dominant-negative Formen von  $\gamma$ 2-HA immer stärker tangiert werden (Döring et al. 2010).

Daneben wurde auch der Effekt der  $\gamma$ 2-Depletion auf die verschiedenen Rab7-Konstrukte überprüft. Hierzu wurden HuH-7 Zellen mit siRNA gegen  $\gamma$ 2-Adaptin bzw. Kontroll siRNA transfiziert. Nach 48 Stunden Depletion erfolgte die Transfektion mit Rab7.wt, Rab7.dn, Rab7 $\Delta$ C und Rab7.ca. Die Triton-Lyse wurde nach 24 Stunden Expression durchgeführt und die Proben wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot mit anti-JL8 gegen die Rab7-Konstrukte und anti-AP1G2 gegen endogenes  $\gamma$ 2-Adaptin analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 21 dargestellt und zeigen keinen Effekt der  $\gamma$ 2-Depletion auf die Gleichgewichtskonzentration der verschiedenen Rab7-Konstrukte.



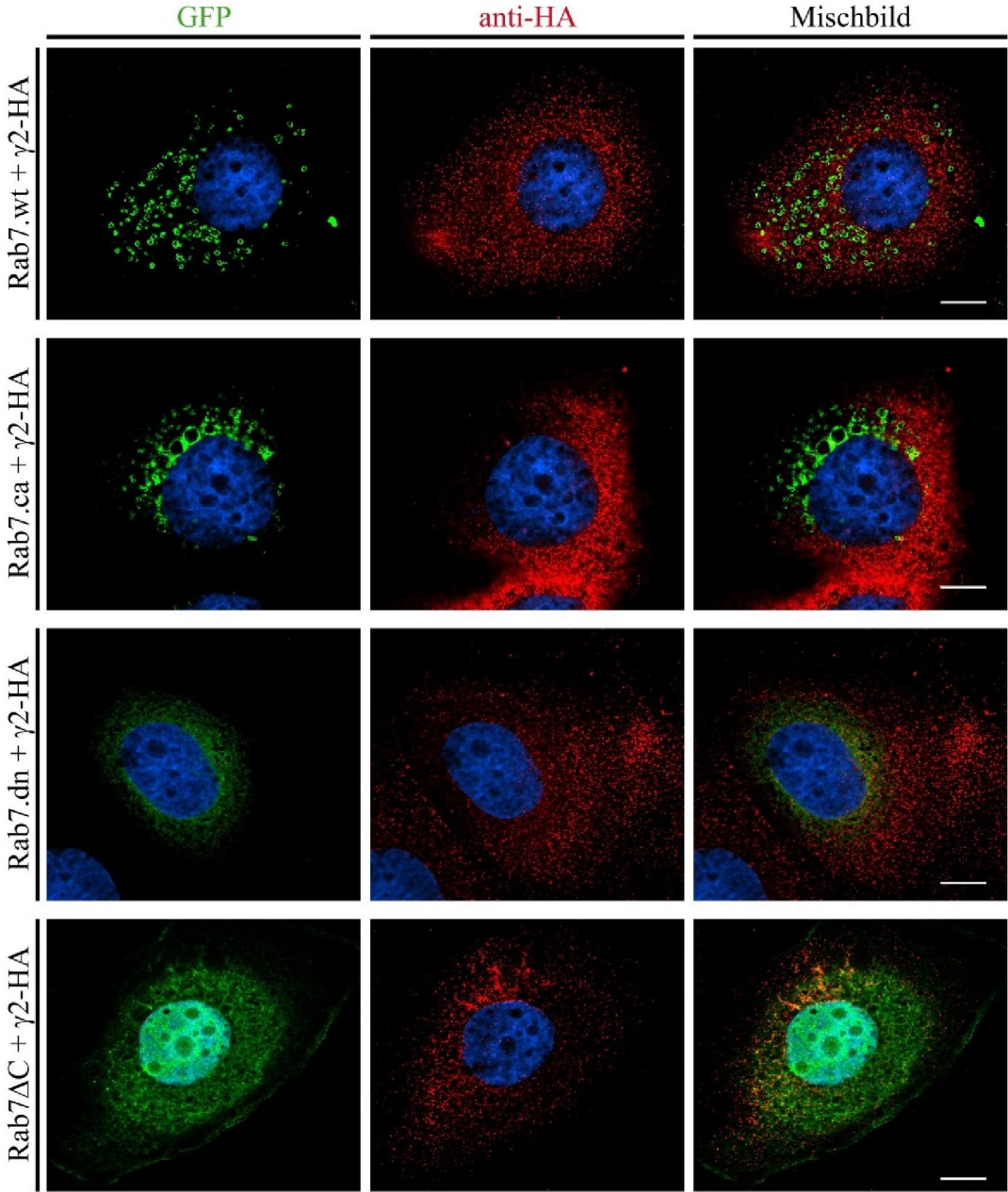
**Abbildung 20: Wirkung von überschüssigem  $\gamma$ 2-HA auf Rab7**  
 HuH-7 Zellen wurden mit Rab7.wt, Rab7.dn, Rab7.ca bzw. Rab7 $\Delta$ C und  $\gamma$ 2-HA bzw. einem leeren Flag-Vektor kotransfiziert und nach dreitägiger Expression lysiert. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Anti-JL8 wurde zum Nachweis der Rab7-Konstrukte und anti-HA zum Nachweis von  $\gamma$ 2-HA verwendet. (A) Ergebnisse aus dem Western Blot, (B) quantitative Auswertung der Rab7-Banden im Vergleich zur Kontrolle (Rab7.wt/dn/ca/ $\Delta$ C + Flag = 100 %)



**Abbildung 21: Wirkung von unterschüssigem  $\gamma$ 2-Adaptin auf Rab7**  
 HuH-7-Zellen wurden mit  $\gamma$ 2- bzw. Kontroll-siRNA transfiziert. Nach 48 Stunden Depletion wurden die Zellen mit Rab7.wt, Rab7.dn, Rab7 $\Delta$ C bzw. Rab7.ca transfiziert. Die Triton-Lyse erfolgte nach 24 Stunden Expression und die Proben wurden mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert. Die Rab7-Konstrukte wurden über anti-JL8 nachgewiesen und die  $\gamma$ 2-Depletion mit Hilfe von anti-AP1G2.



Um einen besseren Einblick über die Wirkung von überexprimierten  $\gamma$ 2-HA auf die verschiedenen Rab7-Konstrukte zu erhalten, wurden Immunfluoreszenzfärbungen angefertigt, bei denen die Zellen jeweils mit  $\gamma$ 2-HA und Rab7.wt, Rab7.ca, Rab7.dn bzw. Rab7 $\Delta$ C kotransfiziert wurden. Die Zellen wurden nach dreitägiger Expression mit PFA fixiert. Die Rab7-Konstrukte sind GFP-markiert und wurden daher nicht über Antikörper angefärbt.  $\gamma$ 2-HA wurde über anti-HA sichtbar gemacht (Abbildung 22).



**Abbildung 22: Subzelluläre Lokalisation  $\gamma$ 2-Adaptin und der Rab7-Konstrukte**  
HuH-7 Zellen wurden mit  $\gamma$ 2-HA und Rab7.wt, Rab7.ca, Rab7.dn und Rab7 $\Delta$ C kotransfiziert, auf Deckgläschen ausgesät und mit PFA fixiert. Die Rab7-Konstrukte sind mit GFP (grün) markiert und  $\gamma$ 2-HA wurde über anti-HA (rot) angefärbt. Kolokalisation ist in Gelb dargestellt. Balken  $\cong$  10  $\mu$ m

Wie Abbildung 22 verdeutlicht, weisen die Rab7-Konstrukte unterschiedliche subzelluläre Verteilungen auf. Rab7.wt und Rab7.ca sind in vesikulären Strukturen angehäuft, während Rab7.dn und Rab7 $\Delta$ C diffus in der Zelle verteilt vorliegen.  $\gamma$ 2-HA zeigt seine typische zytoplasmatische Verteilung. Auch die starke Reduktion von Rab7.dn durch überschüssiges  $\gamma$ 2-Adaptin wird in der Immunfluoreszenz bestätigt, da das GFP-Signal bei gleicher Belichtungszeit viel schwächer ist als in den anderen Präparaten. Zudem kann erstaunlicherweise für alle Rab7-Konstrukte, unabhängig von deren katalytischer Aktivität und zellulären Lokalisation, eine teilweise Kollokalisierung mit  $\gamma$ 2-HA beobachtet werden.

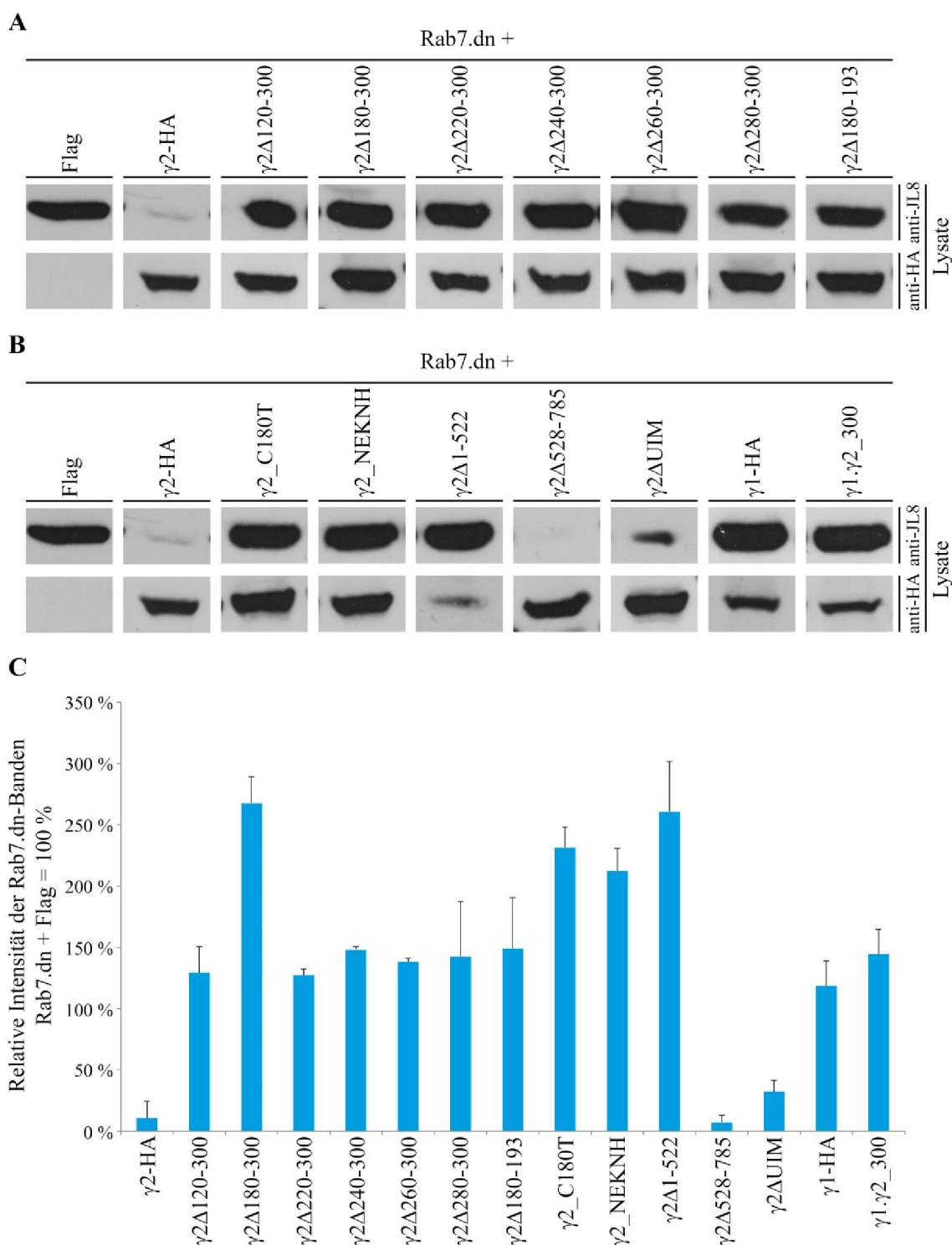
#### **4.4.3 Untersuchung zur Rolle von $\gamma$ 2-Adaptin im Wechselspiel mit Rab7: Kartierung funktionell wichtiger Domänen**

Um zu untersuchen, welche Region von  $\gamma$ 2-HA für die Reduktion von Rab7 wichtig ist, wurden verschiedene  $\gamma$ 2-Mutanten, ähnlich wie in 4.2.1, getestet. Da der Effekt von exogenem  $\gamma$ 2-HA auf Rab7.dn am stärksten ausfällt, wurde diese Mutante experimentell untersucht. Es wurden die folgenden  $\gamma$ 2- und  $\gamma$ 1-Konstrukte analysiert:  $\gamma$ 2-HA,  $\gamma$ 2 $\Delta$ 120-300,  $\gamma$ 2 $\Delta$ 180-300,  $\gamma$ 2 $\Delta$ 220-300,  $\gamma$ 2 $\Delta$ 240-300,  $\gamma$ 2 $\Delta$ 260-300,  $\gamma$ 2 $\Delta$ 280-300,  $\gamma$ 2 $\Delta$ 180-193,  $\gamma$ 2\_C180T,  $\gamma$ 2\_NEKNH,  $\gamma$ 2 $\Delta$ 1-522,  $\gamma$ 2 $\Delta$ 528-785,  $\gamma$ 2 $\Delta$ UIM,  $\gamma$ 1-HA und  $\gamma$ 2: $\gamma$ 1\_300.

HuH-7 Zellen wurden mit Rab7.dn und einem leeren Flag-Vektor als Kontrolle bzw. einem der  $\gamma$ 2- bzw.  $\gamma$ 1-Konstrukte kotransfiziert. Nach dreitägiger Expression wurden die Zellen lysiert und die Proben im Western Blot mittels anti-JL8 zum Nachweis von Rab7.dn und anti-HA zum Nachweis der  $\gamma$ 2-Konstrukte analysiert. Die Ergebnisse des Western Blots sind in Abbildung 23 A und B dargestellt. Abbildung 23 C zeigt die quantitative Auswertung der Rab7.dn-Banden im Vergleich zur Flag-Kontrolle (Rab7.dn + Flag = 100 %; n=4).

Erstaunlicherweise unterschied sich das Bild, das diese Kartierung liefert, von dem der Kartierung für den  $\gamma$ 2-Effekt auf MLV.gag (4.2.1). Rab7.dn wird ausschließlich von überexprimiertem  $\gamma$ 2-HA,  $\gamma$ 2 $\Delta$ 528-785 und abgeschwächt von  $\gamma$ 2 $\Delta$ UIM reduziert, während alle anderen  $\gamma$ 2-Konstrukte eher einen steigernden Effekt ausüben. Auch  $\gamma$ 1-HA zeigt einen steigernden Effekt auf die Rab7.dn-Konzentration, wodurch der funktionelle Unterschied zwischen  $\gamma$ 2- und  $\gamma$ 1-Adaptin erneut bestätigt werden konnte. Da die PH-Domänen-defizienten Mutanten keine Wirkung auf Rab7.dn zeigen, scheint diese Region eine wichtige Rolle für das Wechselspiel zwischen  $\gamma$ 2-Adaptin und Rab7 zu spielen. Auch wird die wichtige Rolle des UIM erneut bestätigt. Da die Deletion des UIM jedoch die Reduktion von

Rab7.dn nur abschwächt und nicht vollständig blockiert, deutet das auf eine im Vergleich zur potentiellen PH-Domäne untergeordnete Rolle im Zusammenhang mit Rab7 hin.



**Abbildung 23: Wirkung von  $\gamma$ 2-Mutanten auf Rab7.dn**

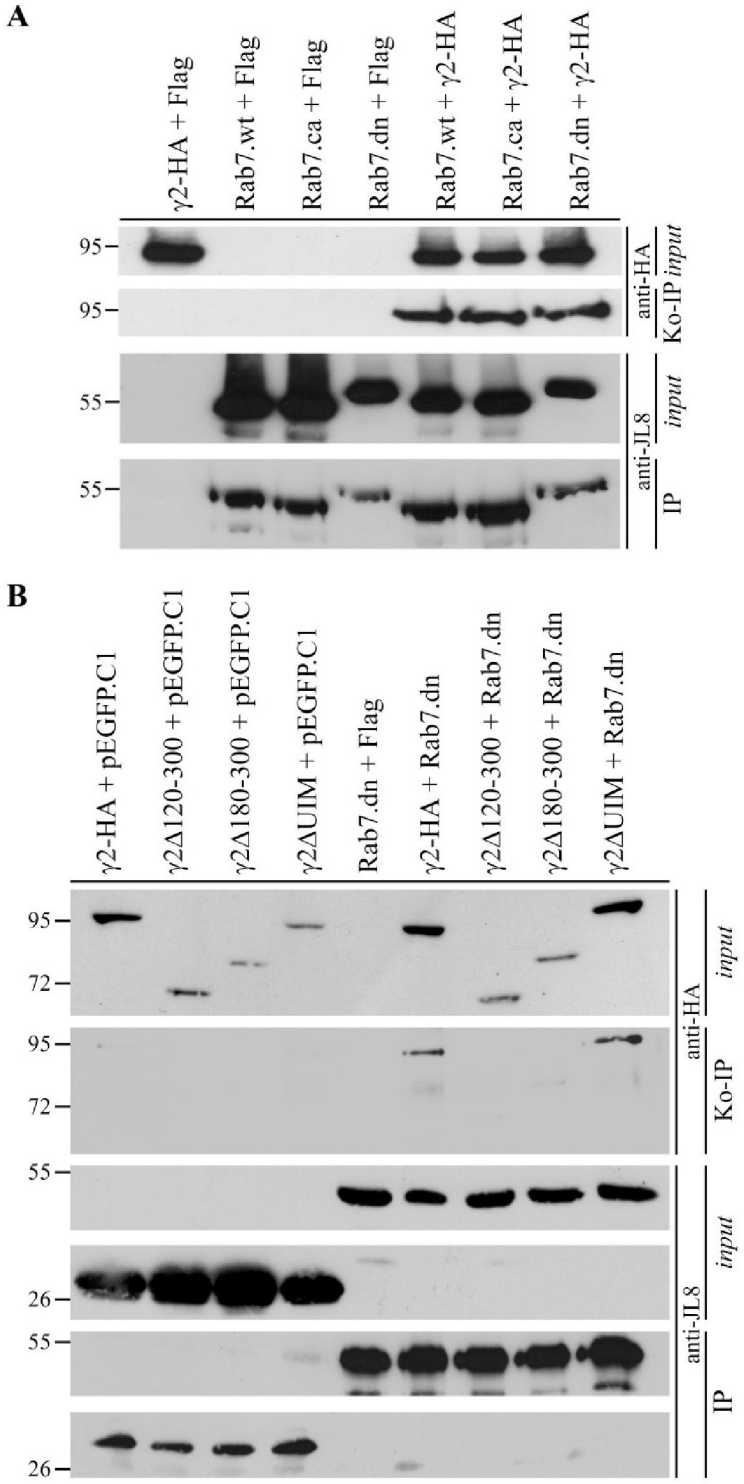
HuH-7 Zellen wurden mit Rab7.dn und einem leeren Flag-Vektor als Kontrolle bzw. einem der  $\gamma$ 2-Konstrukte kotransfiziert und nach drei Tagen Expression lysiert. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert, wobei Rab7.dn über anti-JL8 und die  $\gamma$ 2-Konstrukte über anti-HA nachgewiesen wurden. (A) + (B) Ergebnisse aus dem Western Blot, (C) quantitative Auswertung der Rab7-Banden im Vergleich zur Kontrolle (Rab7.dn + Flag = 100 %; n=4). „n“ gibt die Anzahl der Experimente an.

#### 4.4.4 Rab7 ist ein Interaktionspartner von $\gamma$ 2-Adaptin

Da in den Immunfluoreszenzstudien von  $\gamma$ 2-HA mit den Rab7-Konstrukten zum Teil Ko-Lokalisationen zu beobachten waren, wurden Ko-Immunpräzipitationen durchgeführt, um eine mögliche Interaktion von  $\gamma$ 2-Adaptin mit Rab7 zu überprüfen.

Hierzu wurden HuH-7 Zellen mit  $\gamma$ 2-HA, Rab7.wt, Rab7.ca bzw. Rab7.dn und einem leeren Flag-Vektor als Kontrolle bzw. mit  $\gamma$ 2-HA und Rab7.wt, Rab7.ca bzw. Rab7.dn kotransfiziert. Nach dreitägiger Expression wurden die Zellen nach dem Triton-Protokoll lysiert. Vor der Immunpräzipitation wurde eine *input*-Kontrolle abgenommen. Die Immunpräzipitation erfolgte mit anti-JL8-beschichteten Partikeln. Die Präzipitate wurden in SDS-Probenpuffer aufgenommen und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Die Immunpräzipitation wurde mit anti-JL8 im Western Blot überprüft und ko-präzipitiertes  $\gamma$ 2-HA über anti-HA nachgewiesen (Abbildung 24 A).  $\gamma$ 2-HA wurde sowohl mit Rab7.wt als auch mit Rab7.ca und Rab7.dn ko-präzipitiert. Somit interagiert  $\gamma$ 2-Adaptin mit Rab7 unabhängig von dessen katalytischer Aktivität, was jedoch die Frage aufwirft, warum die katalytische Aktivität von Rab7 bei der Reduktion durch überexprimiertes  $\gamma$ 2-HA eine Rolle spielt. Eine Erklärung liefert ein möglicher Defekt in der Faltung von Rab7.dn, der mit der katalytischen Inaktivierung einhergehen könnte.  $\gamma$ 2-Adaptin könnte somit eine Chaperon-Funktion ausüben und bevorzugt falsch-gefaltetes Rab7 reduzieren.

Anschließend wurden Ko-Immunpräzipitationen von  $\gamma$ 2 $\Delta$ 120-300,  $\gamma$ 2 $\Delta$ 180-300 und  $\gamma$ 2 $\Delta$ UIM mit Rab7.dn durchgeführt.  $\gamma$ 2 $\Delta$ 120-300 und  $\gamma$ 2 $\Delta$ 180-300 wurden ausgewählt, da ihre Überexpression zwar einen reduzierenden Effekt auf MLV.gag, jedoch nicht auf Rab7.dn zeigt.  $\gamma$ 2 $\Delta$ UIM reduziert bei Überexpression sowohl MLV.gag als auch Rab7.dn, wenn auch im Vergleich zu  $\gamma$ 2-HA in einer abgeschwächten Form. Das Ergebnis dieser Ko-Immunpräzipitationen ist in Abbildung 24 B dargestellt und zeigt, dass  $\gamma$ 2 $\Delta$ UIM noch mit Rab7.dn interagieren kann, während  $\gamma$ 2 $\Delta$ 120-300 und  $\gamma$ 2 $\Delta$ 180-300 nicht mit Rab7.dn ko-präzipitiert werden konnten. Dies steht im Einklang mit den Versuchen zur Kartierung der für die Reduktion von Rab7 funktionell wichtigen Domänen von  $\gamma$ 2-Adaptin und zeigt, dass eine Interaktion zwischen  $\gamma$ 2-Adaptin und Rab7 für dessen Reduktion notwendig ist.



**Abbildung 24:  $\gamma 2$ -Adaptin interagiert mit Rab7**  
Ko-Immünpräzipitation von  $\gamma 2$ -HA und Rab7.wt, Rab7.ca bzw. Rab7.dn (A) und von  $\gamma 2\Delta 120$ -300,  $\gamma 2\Delta 180$ -300 bzw.  $\gamma 2\Delta$ UIM und Rab7.dn (B). HuH-7 Zellen wurden transfiziert und nach drei Tagen Expression nach dem Triton-Protokoll lysiert. Die Immunpräzipitation erfolgte mit anti-JL8 beschichteten Partikeln. Vor der Immunpräzipitation wurde jeweils eine *input* Kontrolle für den Western Blot abgenommen. Die Präzipitate wurden in SDS-Probenpuffer aufgenommen und anschließend mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Die *input*-Kontrolle dient dem Expressionsnachweis der verschiedenen Konstrukte. Der Nachweis der Immunpräzipitation erfolgte über anti-JL8. Ko-präzipitiertes  $\gamma 2$ -HA wurde über anti-HA nachgewiesen.

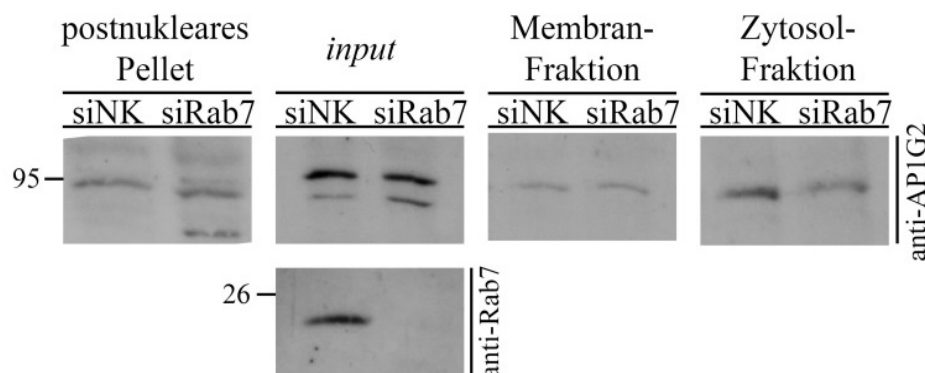
#### 4.4.5 Die Membranassoziation von $\gamma$ 2-Adaptin ist Rab7-unabhängig

Rab-Proteine rekrutieren ihre Effektor-Proteine an Membranen, ähnlich der ARF-GTPasen (Kawasaki et al. 2005), die z.B. für die Membranassoziation von  $\gamma$ 1-Adaptin verantwortlich sind (Takatsu et al. 1998; Lewin et al. 1998). Um zu überprüfen, ob Rab7 die Membranassoziation von  $\gamma$ 2-Adaptin beeinflusst, wurde das Verteilungsmuster von endogenem  $\gamma$ 2-Adaptin in Rab7-depletierten Zellen untersucht.

HuH-7 Zellen wurden mit siRNA gegen Rab7 bzw. Kontroll-siRNA transfiziert und nach dreitägiger Depletion durch hypotonischen Schock und mechanische Scherkräfte aufgebrochen. Das Homogenat wurde durch Zentrifugation gereinigt, wodurch das nukleare Pellet entstand. Der postnukleare Überstand wurde über Ultrazentrifugation in Membran- und Zytosolfraktion aufgetrennt. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Der Nachweis der Depletion erfolgte über anti-Rab7 und endogenes  $\gamma$ 2-Adaptin wurde über anti-AP1G2 nachgewiesen.

Wie

Abbildung 25 zeigt, wird die Membranassoziation von  $\gamma$ 2-Adaptin durch die Depletion von Rab7 nicht beeinflusst. Es konnte jedoch beobachtet werden, dass bei Rab7-Depletion weniger endogenes  $\gamma$ 2-Adaptin in der Zytosol-Fraktion detektiert werden konnte. Dies wirft die Frage auf, ob zytosolisches  $\gamma$ 2-Adaptin bei Verlust von Rab7 verstärkt abgebaut wird.



**Abbildung 25: Die Membranassoziation von  $\gamma$ 2-Adaptin ist Rab7-unabhängig**

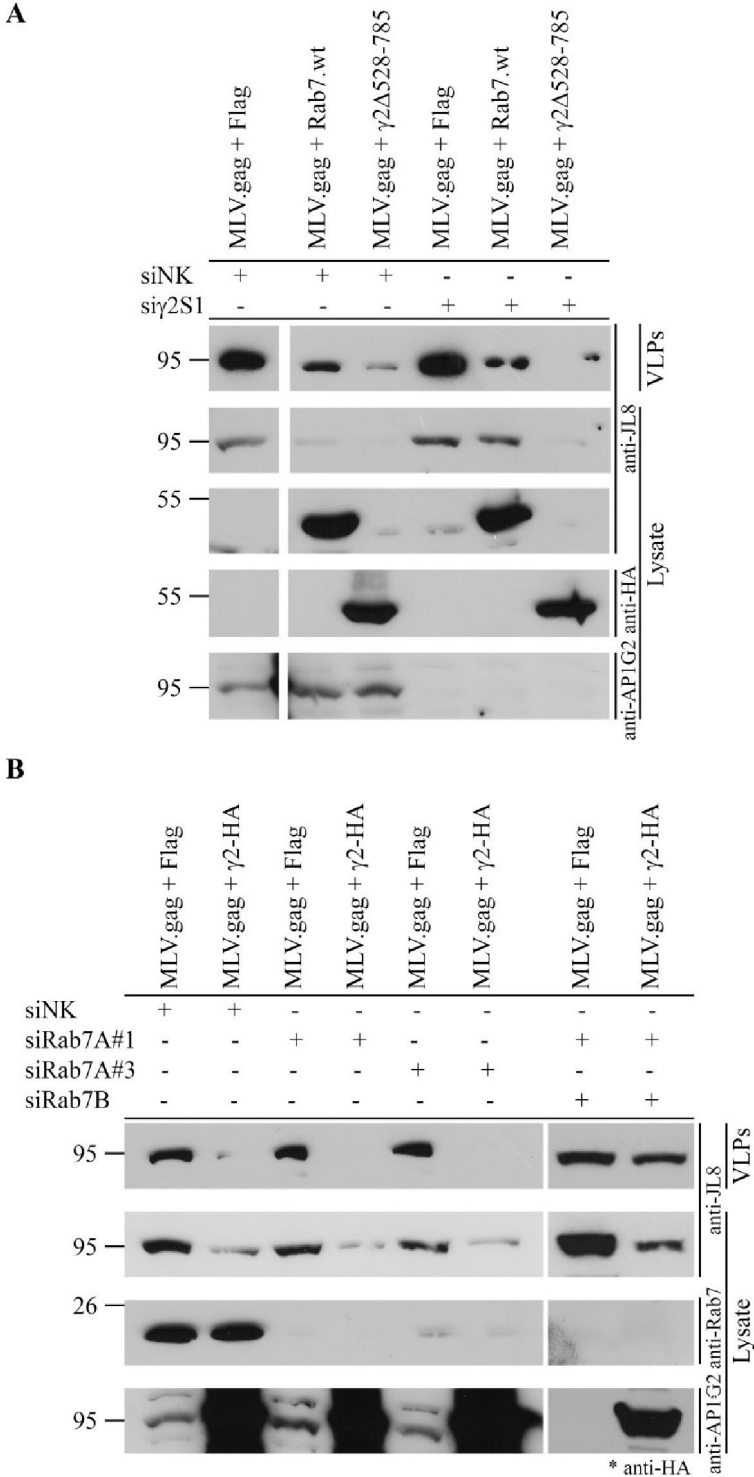
HuH-7 Zellen wurden mit siRNA gegen Rab7 bzw. Kontroll-siRNA transfiziert. Nach drei Tagen Depletion wurden die Zellen mechanisch aufgebrochen und der postnukleare Überstand durch Ultrazentrifugation in Membran- und Zytosol-Fraktion aufgetrennt. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert, wobei die Depletion mit anti-Rab7 überprüft und endogenes  $\gamma$ 2-Adaptin über anti-AP1G2 nachgewiesen wurde.

#### 4.4.6 Untersuchung zur funktionellen Wechselwirkung zwischen $\gamma$ 2-Adaptin und Rab7

Es konnte gezeigt werden, dass  $\gamma$ 2-Adaptin mit Rab7 unabhängig von dessen katalytischer Aktivität interagiert und dass überschüssiges  $\gamma$ 2-Adaptin Rab7, abhängig von dessen katalytischer Aktivität, unterschiedlich stark reduziert. MLV.gag wird sowohl durch exogenes  $\gamma$ 2-Adaptin als auch durch exogenes Rab7 in seiner intra- und extrazellulären Konzentration erniedrigt. Um das Zusammenspiel zwischen  $\gamma$ 2-Adaptin und Rab7 näher zu charakterisieren, wurden Versuche durchgeführt, bei denen eines der beiden Proteine depletiert wurde, während die Wirkung der Überexpression des anderen auf MLV.gag untersucht wurde.

HuH-7 Zellen wurden mit siRNA gegen  $\gamma$ 2-Adaptin bzw. Kontroll-siRNA transfiziert. Hierbei wurde die siRNA si $\gamma$ 2S1 verwendet. Diese depletiert  $\gamma$ 2-Adaptin, jedoch nicht  $\gamma$ 2 $\Delta$ 528-785, da dieser Mutante die Ziel-Sequenz von si $\gamma$ 2S1 fehlt. Nach zweitägiger Depletion wurden die Zellen mit MLV.gag und einem leeren Flag-Vektor als Kontrolle, Rab7.wt bzw.  $\gamma$ 2 $\Delta$ 528-785 kotransfiziert. Nach 24 Stunden Expression wurden die Zellen lysiert und die VLPs aufgereinigt. Die Proben wurden im Western-Blot analysiert, wobei anti-JL8 zum Nachweis von MLV.gag bzw. Rab7 und anti-HA zum Nachweis von  $\gamma$ 2 $\Delta$ 528-785 eingesetzt wurden. Die Depletion von  $\gamma$ 2-Adaptin wurde über anti-AP1G2 überprüft. Das Ergebnis ist in Abbildung 26 A dargestellt und zeigt, dass exogenes Rab7 die extrazelluläre Menge von MLV.gag selbst beim Fehlen von  $\gamma$ 2-Adaptin reduzieren kann. Bei  $\gamma$ 2-Depletion kann jedoch keine Reduktion der intrazellulären MLV.gag-Menge bei Überexpression von Rab7 detektiert werden. Somit schränkt die Depletion von  $\gamma$ 2-Adaptin die Wirkung von exogenem Rab7 ein. Der Effekt von exogenem Rab7 ist somit teilweise abhängig von  $\gamma$ 2-Adaptin.

Um zu überprüfen, ob der Einfluss von exogenem  $\gamma$ 2-Adaptin auf MLV.gag Rab7-abhängig ist, wurden vergleichbare Versuche durchgeführt, bei denen nun Rab7 depletiert und  $\gamma$ 2-HA überexprimiert wurde. Hierfür wurden die Rab7-siRNAs siRab7#1 und siRab7#3 gegen Rab7A alleine und eine siRNA gegen Rab7B in Kombination mit siRab7#1 eingesetzt. Die Depletion von Rab7 wurde im Western Blot über anti-Rab7 nachgewiesen, der Nachweis von MLV.gag erfolgte über anti-JL8 und der von  $\gamma$ 2-HA über anti-AP1G2 bzw. anti-HA.



**Abbildung 26: Untersuchung zum Zusammenspiel von  $\gamma 2$ -Adaptin und Rab7**  
 (A) HuH-7 Zellen wurden mit si $\gamma 2S1$  bzw. Kontroll-siRNA transfiziert. Nach 48 Stunden Depletion erfolgte die Transfektion mit MLV.gag und Rab7.wt,  $\gamma 2\Delta 528-785$  bzw. einem leeren Flag-Vektor als Kontrolle. Nach 24 Stunden Expression wurden die Zellen lysiert und die VLPs aus den Zellkulturüberständen aufgereinigt. Die Analyse der Proben erfolgte über SDS-PAGE und Western Blot (anti-JL8: MLV.gag, Rab7.wt; anti-HA:  $\gamma 2\Delta 528-785$ ; anti-APIG2: endogenes  $\gamma 2$ -Adaptin). (B) HuH-7 Zellen wurden mit verschiedenen Rab7-siRNAs (siRab7#1 und siRab7#3: gegen Rab7A; siRab7B: gegen Rab7B) und Kontroll-siRNA transfiziert. Nach 48 Stunden Depletion erfolgte die Transfektion mit MLV.gag und  $\gamma 2$ -HA bzw. einem Kontroll-Vektor. Die Aufarbeitung und Analyse der Proben erfolgte wie in A, wobei für den Nachweis der Depletion anti-Rab7 verwendet wurde.

\* Bei der Ko-Depletion von Rab7A und Rab7B wurde zum Nachweis von  $\gamma 2$ -Adaptin anti-HA eingesetzt.



Das Ergebnis der  $\gamma 2$ -Überexpression bei Depletion von Rab7 ist in Abbildung 26 B dargestellt. Für die Proben, bei denen nur Rab7A depletiert wurde (siRab7#1 und siRab7#3), kann kein Effekt der Depletion auf die Reduktion von MLV.gag durch exogenes  $\gamma 2$ -HA beobachtet werden. Werden jedoch beide Isoformen Rab7A und Rab7B depletiert, wird die Wirkung von exogenem  $\gamma 2$ -HA auf MLV.gag stark abgeschwächt. Dies deutet darauf hin, dass der reduzierende Einfluss von exogenem  $\gamma 2$ -HA abhängig von Rab7 ist, auch wenn wahrscheinlich noch mehrere Faktoren bei diesem Effekt eine Rolle spielen.

Die monomeren GTPase Rab7 ist an der Fusion der MVBs mit Lysosomen beteiligt. Der Effekt von Rab7 auf das retrovirale MLV.gag ist vergleichbar zu dem von  $\gamma 2$ -Adaptin: Überexprimiertes Rab7.wt reduziert die intra- und extrazelluläre MLV.gag-Konzentration und überschüssiges Rab7.dn bzw. die Rab7-Depletion steigert diese. Rab7 wird durch überschüssiges  $\gamma 2$ -Adaptin in seiner Gleichgewichts-konzentration reduziert, jedoch bei  $\gamma 2$ -Depletion nicht beeinflusst. Die Reduktion von Rab7 durch überexprimiertes  $\gamma 2$ -Adaptin ist abhängig von seiner katalytischen Aktivität, da Rab7.dn am stärksten reduziert wird. Einhergehend mit der katalytischen Inaktivität von Rab7.dn könnte die Mutation Defekten in der Proteinfaltung auslösen. Demnach könnte  $\gamma 2$ -Adaptin eine Chaperon-Funktion übernehmen und bevorzugt fehlgefaltetes Rab7 erkennen. Der reduzierende Effekt von überexprimiertem  $\gamma 2$ -Adaptin auf Rab7 wird wesentlich von der potentiellen PH-Domäne beeinflusst. Diese Domäne stellt das Interaktionsmodul zwischen Rab7 und  $\gamma 2$ -Adaptin dar. Jedoch wird die Membran-Assoziation von  $\gamma 2$ -Adaptin nicht durch Rab7 beeinflusst, weshalb  $\gamma 2$ -Adaptin wahrscheinlich kein klassisches Effektor-Protein von Rab7 darstellt.

## 4.5 Identifikation und Charakterisierung eines potentiellen LIR-Motivs in $\gamma 2$ -Adaptin

Im Folgenden wurde die Kopf-Domäne von  $\gamma 2$ -Adaptin bioinformatisch näher betrachtet und nach einem Sequenzmotiv gesucht, welches neben dem UIM und der mutmaßlichen PH-Domäne Aufschluss über die Funktion von  $\gamma 2$ -Adaptin geben kann. Die PH-Domäne konnte als Interaktionsmodul für Rab7 identifiziert werden, wobei die Feinkartierung der genauen AS-Sequenz noch aussteht. In der Kopf-Domäne von  $\gamma 2$ -Adaptin wurde durch *in silico*-Sequenzanalysen ein potentielles LIR-Motiv an Aminosäuren-Position 503-509 entdeckt.

LIR steht für *LC3 interaction region* und ist ein Sequenzmotiv, das die Bindung an das Protein LC3 vermittelt. Die Konsensus-Sequenz des LIR-Motivs ist in Abbildung 27 dargestellt. Sie ist sieben Aminosäuren lang und zeichnet sich N-terminal durch drei saure Aminosäuren gefolgt von einer aromatischen Aminosäure und C-terminal durch eine hydrophobe Aminosäure aus (Johansen und Lamark 2011; Alemu et al. 2012). Das potentielle LIR-Motiv von  $\gamma 2$ -Adaptin entspricht mit Ausnahme der mittleren aromatischen Aminosäure der LIR-Konsensussequenz.

<b>LIR-Motiv</b>	<b>D</b>	<b>D</b>	<b>D</b>	<b>W</b>			<b>L</b>
	<b>E</b>	<b>E</b>	<b>E</b>	<b>F</b>	<b>x</b>	<b>x</b>	<b>I</b>
				<b>Y</b>			<b>V</b>
Potentiell LIR-Motiv in $\gamma 2$ -Adaptin Aminosäuren 503-509	E	E	E	V	L	A	L
Optimiertes LIR-Motiv in $\gamma 2$ .LIR Aminosäuren 503-509	E	E	E	W	T	H	L

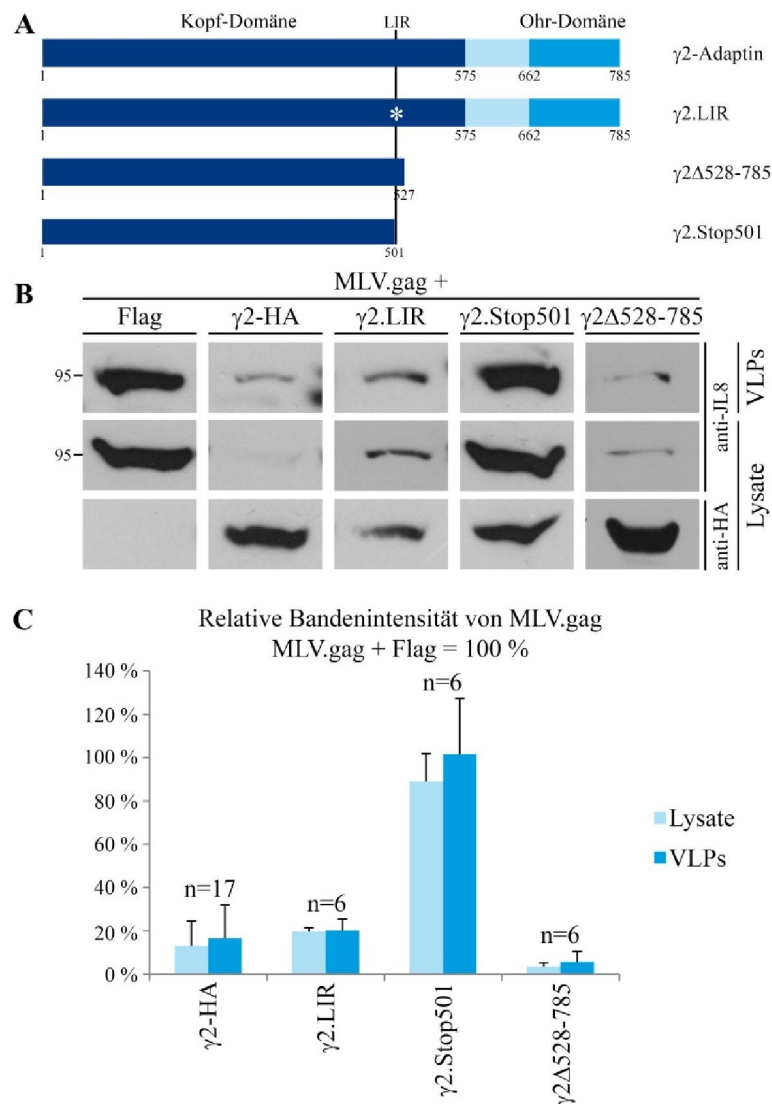
**Abbildung 27: LIR-Motiv**

Die Konsensussequenz des LIR-Motivs ist oben (fett) dargestellt. In der Mitte folgt das potentielle LIR-Motiv von  $\gamma 2$ -Adaptin. Dieses wurde durch Mutagenese an die Konsensussequenz angepasst und somit optimiert und ist unten aufgeführt. Die Aminosäuren sind nach dem Ein-Buchstaben-Code angegeben, wobei x für eine beliebige Aminosäure steht. Übereinstimmungen mit der Konsensussequenz sind in blau gezeigt, die Nicht-Übereinstimmung ist weiß hervorgehoben.

LC3 ist ein Autophagosomen-Marker und wird an Phagophore rekrutiert, wo es die Autophagosomen-Bildung vorantreibt und an der Rekrutierung spezifischer Substrate für die Autophagie beteiligt ist, indem es mit sogenannten Autophagie-Adaptoren interagiert (Johansen und Lamark 2011). Das potentielle LIR-Motiv könnte somit eine Verbindung von  $\gamma$ 2-Adaptin zur Autophagie darstellen. Zur Klärung der Frage, ob es sich dabei um ein funktionelles LIR-Motiv handelt, wurden zunächst zwei Mutanten generiert:  $\gamma$ 2.LIR und  $\gamma$ 2.Stop501.  $\gamma$ 2.LIR trägt ein optimiertes LIR-Motiv, das in allen Aminosäuren der Konsensussequenz entspricht (Abbildung 27).  $\gamma$ 2.Stop501 ist eine verkürzte  $\gamma$ 2-Mutante, die an Position 501, also vor dem potentiellen LIR-Motiv, ein Stopp-Codon trägt.

#### **4.5.1 Identifikation und Charakterisierung eines potentiellen LIR-Motivs in $\gamma$ 2-Adaptin: Untersuchungen anhand von $\gamma$ 2.LIR und $\gamma$ 2.Stop501**

Zur Charakterisierung von  $\gamma$ 2.LIR und  $\gamma$ 2.Stop501 wurde ihre Wirkung auf MLV.gag getestet. Als Positivkontrollen dienten hier sowohl  $\gamma$ 2-HA als auch  $\gamma$ 2 $\Delta$ 528-785, da sich diese Deletionsmutante von  $\gamma$ 2.Stop501 nur in 27 Aminosäuren unterscheidet, jedoch noch das potentielle LIR-Motiv trägt. Die  $\gamma$ 2-Konstrukte sind in Abbildung 28 A schematisch dargestellt. HuH-7 Zellen wurden mit MLV.gag und einem Flag-Vektor,  $\gamma$ 2-HA,  $\gamma$ 2.LIR,  $\gamma$ 2.Stop501 bzw.  $\gamma$ 2 $\Delta$ 528-785 kotransfiziert. Nach Expression für drei Tage, wurden die VLPs aus den Zellkulturüberständen aufgereinigt und die Zellen lysiert. Die Analyse der Proben erfolgte über SDS-PAGE und Western Blot. MLV.gag wurde über anti-JL8 und die  $\gamma$ 2-Konstrukte über anti-HA nachgewiesen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 28 B dargestellt. Abbildung 28 C zeigt die quantitative Auswertung der MLV.gag-Banden im Vergleich zur Kontrolle. Wie gezeigt, reduziert  $\gamma$ 2.LIR die intra- und extrazelluläre MLV.gag-Menge vergleichbar mit  $\gamma$ 2-HA und  $\gamma$ 2 $\Delta$ 528-785, während  $\gamma$ 2.Stop501 weder einen Effekt auf die VLPs noch auf die intrazelluläre MLV.gag-Menge zeigt. Diese funktionelle Inaktivierung von  $\gamma$ 2.Stop501 im Vergleich zu  $\gamma$ 2-HA lässt sich nicht als Konsequenz einer zu großen Deletion erklären, denn die ähnlich stark verkürzte Mutante  $\gamma$ 2 $\Delta$ 528-785 verhält sich wie wildtypisches  $\gamma$ 2-Adaptin. Vielmehr deutet es darauf hin, dass der Funktionsverlust von  $\gamma$ 2.Stop501 auf das Fehlen des potentiellen LIR-Motivs zurückzuführen ist.



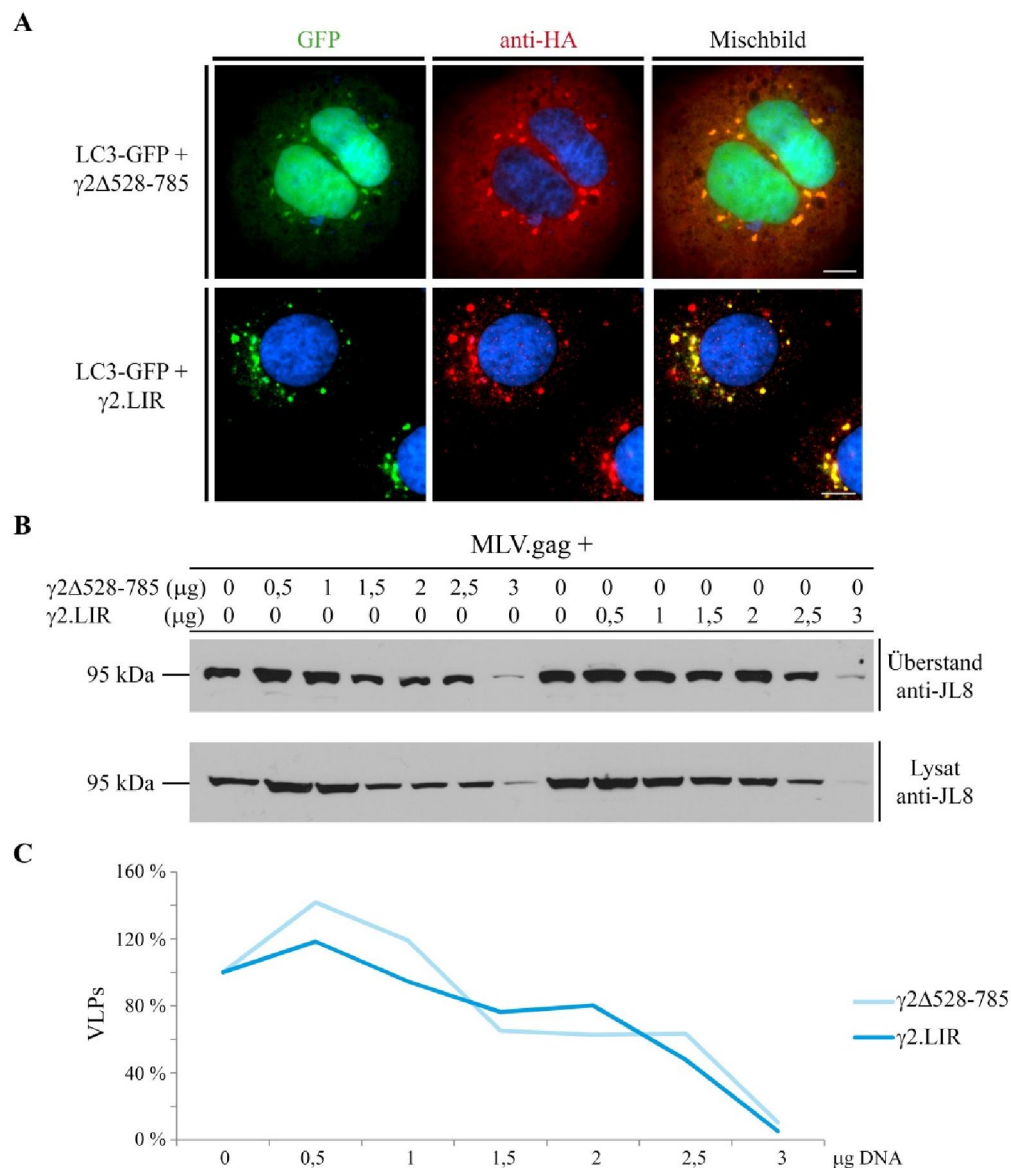
**Abbildung 28: Wirkung von  $\gamma 2$ .LIR und  $\gamma 2$ .Stop501 auf die MLV.gag-Morphogenese**

HuH-7 Zellen wurden mit MLV.gag und  $\gamma 2$ -HA,  $\gamma 2$ .LIR,  $\gamma 2$ .Stop501,  $\gamma 2\Delta 528-785$  und einem leeren Flag-Vektor als Kontrolle kotransfiziert. Nach dreitägiger Expression wurden die VLPs aufgereinigt und die Zellen in Triton-Lysepuffer lysiert. Die Analyse der Proben erfolgte über SDS-PAGE und Western Blot mit Hilfe von anti-JL8 (MLV.gag) und anti-HA ( $\gamma 2$ -Konstrukte). (A) Schematische Darstellung der  $\gamma 2$ -Konstrukte, wobei \* das optimierte LIR-Motiv symbolisiert. Die Lage des LIR-Motivs in  $\gamma 2$ -Adaptin ist durch den grauen Balken angezeigt. (B) Ergebnisse aus dem Western Blot, (C) quantitative Auswertung der MLV.gag-Banden im Vergleich zur Kontrolle (MLV.gag + Flag = 100 %). „n“ gibt die Anzahl der Experimente an.

#### 4.5.2 Untersuchungen zu $\gamma 2$ .LIR

Zur phänotypischen Charakterisierung von  $\gamma 2$ .LIR, das im Vergleich zu  $\gamma 2$ -HA ein optimiertes LIR-Motiv trägt, wurde die intrazelluläre Lokalisation von  $\gamma 2$ .LIR und  $\gamma 2\Delta 528-785$  bei Koexpression mit LC3-GFP in Immunfluoreszenzuntersuchungen betrachtet. Hierfür wurden HuH-7 Zellen mit LC3-GFP und  $\gamma 2$ .LIR bzw.  $\gamma 2\Delta 528-785$  kotransfiziert und die Zellen mit PFA fixiert. Der Nachweis der  $\gamma 2$ -Konstrukte erfolgte über anti-HA, während LC3-GFP aufgrund seiner Autofluoreszenz nicht angefärbt wurde. Die

Aufnahmen sind in Abbildung 29 A dargestellt und zeigen eine Ko-Lokalisation von LC3-GFP sowohl mit  $\gamma 2\Delta 528-785$  als auch mit  $\gamma 2.LIR$  in Aggregat-artigen Strukturen, bei denen es sich möglicherweise um Autophagosomen handelt. Auffallend hierbei ist, dass  $\gamma 2.LIR$  fast ausschließlich an diesen Strukturen lokalisiert ist, während  $\gamma 2\Delta 528-785$  zusätzlich noch die typische zytoplasmatische  $\gamma 2$ -Färbung zeigt.



**Abbildung 29: Charakterisierung von  $\gamma 2.LIR$**

(A) Immunfluoreszenzen bei Koexpression von LC3-GFP und  $\gamma 2\Delta 528-785$  bzw.  $\gamma 2.LIR$ . LC3-GFP ist in Grün dargestellt und die  $\gamma 2$ -Konstrukte, nachgewiesen über anti-HA, in Rot. Kolokalisation ist in Gelb gezeigt. Balken  $\cong 10 \mu\text{m}$ . (B) HuH-7 Zellen wurden mit MLV.gag und steigenden Mengen an  $\gamma 2\Delta 528-785$  bzw.  $\gamma 2.LIR$  kotransfiziert und nach dreitägiger Expression lysiert. VLPs wurden über Untrazentrifugation aufgereinigt. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot mit anti-JL8 und anti-HA analysiert. Die Expressionskontrolle der  $\gamma 2$ -Konstrukte ist hier nicht gezeigt. (C) Quantitative Auswertung: Die relative Bandenintensität der VLPs wurde gegen die steigenden DNA-Mengen der  $\gamma 2$ -Konstrukte aufgetragen.

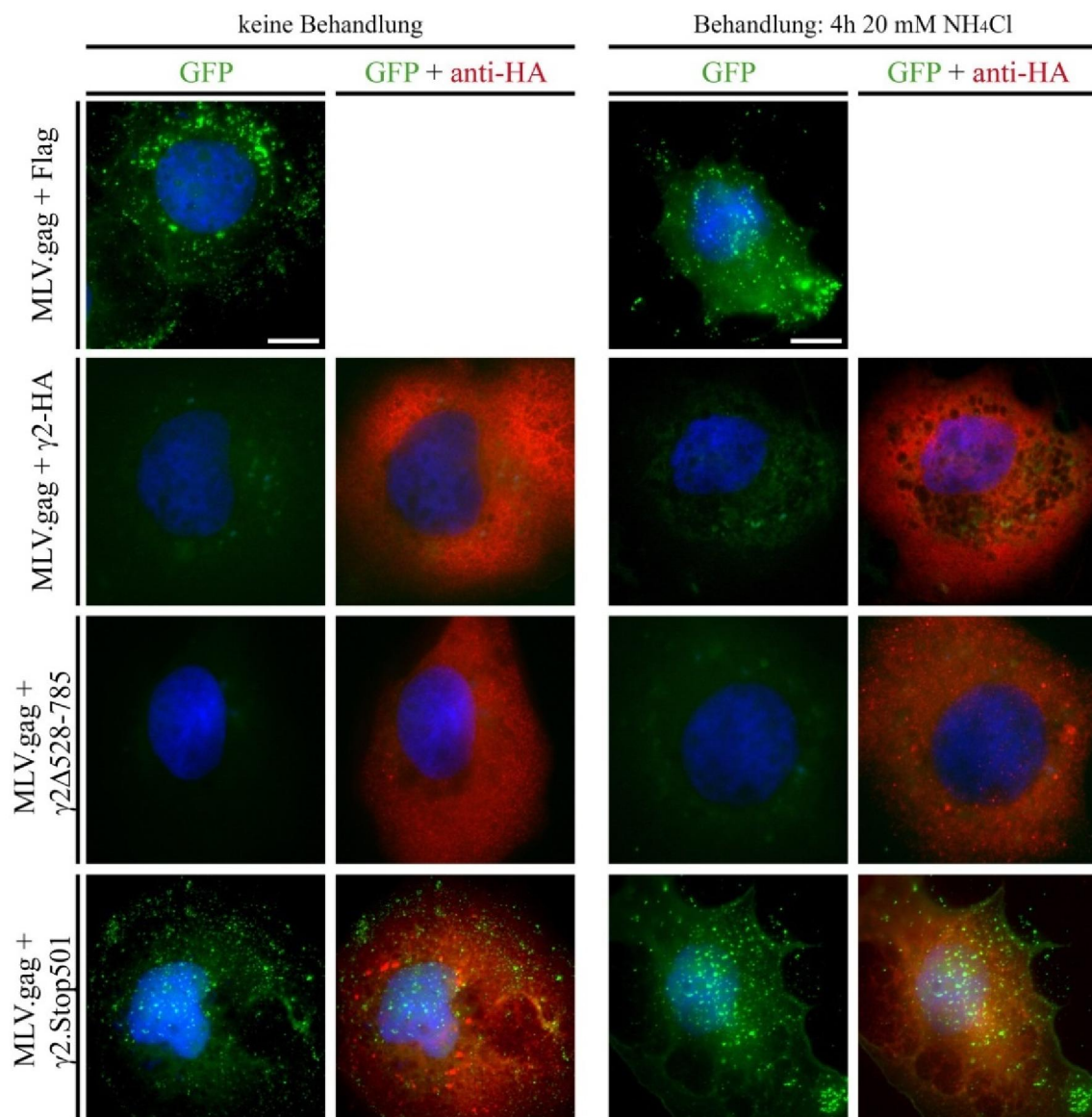
Da die Überexpression von  $\gamma 2$ .LIR einen zu  $\gamma 2$ -HA vergleichbaren Effekt auf MLV.gag zeigt, galt es zu prüfen, ob  $\gamma 2$ .LIR diesen Effekt möglicherweise schon bei geringeren Konzentrationen als  $\gamma 2$ -HA erzielt. Hierfür wurde eine Titration der bei der Transfektion eingesetzten DNA-Mengen durchgeführt. Standardmäßig werden MLV.gag und  $\gamma 2$ -HA im DNA-Verhältnis 1:4 transfiziert, was bei der Transfektion in der 6-*well*-Platte einem Verhältnis von 1  $\mu\text{g}$  + 3  $\mu\text{g}$  entspricht. HuH-7 Zellen wurden mit MLV.gag und  $\gamma 2$ .LIR bzw.  $\gamma 2\Delta 528-785$  in verschiedenen DNA-Verhältnissen transfiziert, wobei jeweils 1  $\mu\text{g}$  MLV.gag eingesetzt wurde.  $\gamma 2$ .LIR bzw.  $\gamma 2\Delta 528-785$  wurde dabei in 0,5  $\mu\text{g}$ -Schritten von 0 bis 3  $\mu\text{g}$  eingesetzt und die Gesamtmenge der DNA mit einem Kontroll-Vektor ausgeglichen. Nach dreitägiger Expression wurden die VLPs aus dem Zellkulturüberstand aufgereinigt und die Zellen lysiert. Die Proben wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und MLV.gag über anti-JL8 und die  $\gamma 2$ -Konstrukte über anti-HA im Western Blot nachgewiesen.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 29 B dargestellt und zeigen keinen Unterschied im Effekt von überexprimiertem  $\gamma 2$ .LIR bzw.  $\gamma 2\Delta 528-788$  für die jeweiligen bei der Transfektion eingesetzten DNA-Konzentrationen auf MLV.gag. Dies ist auch quantitativ in Abbildung 29 C dargestellt, wobei hier die relative Bandenintensität der VLPs gegen die bei der Transfektion eingesetzten DNA-Mengen aufgetragen ist. Die Optimierung des potentiellen LIR-Motivs führte somit zwar zu einer höheren Ko-Lokalisationsrate mit LC3 an Aggregatartigen Strukturen, aber nicht zu einer funktionellen Verbesserung. Daher wurde  $\gamma 2$ .LIR im Folgenden nicht weiter untersucht.

### 4.5.3 Untersuchungen zu $\gamma 2$ .Stop501

Zur phänotypischen Charakterisierung der offensichtlich „funktionslosen“  $\gamma 2$ .Stop501-Mutante wurden zunächst Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Hierzu wurden HuH-7 Zellen mit MLV.gag und  $\gamma 2$ -HA,  $\gamma 2\Delta 528-785$ ,  $\gamma 2$ .Stop501 bzw. einem leeren Flag-Vektor als Kontrolle kotransfiziert. Die Zellen wurden 24 Stunden nach der Transfektion auf jeweils zwei Deckgläschen pro Transfektion ausgesät. Vor der Fixierung mit PFA wurde eine Hälfte der Zellen zur Hemmung des lysosomalen Abbaus mit 20 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  für vier Stunden inkubiert, während die andere Hälfte in Zellkulturmedium ohne Zusätze kultiviert wurde. Nach der PFA-Fixierung erfolgte die Anfärbung der  $\gamma 2$ -Konstrukte über anti-HA. MLV.gag wurde mittels seiner Autofluoreszenz dargestellt. Die Aufnahmen sind in Abbildung 30 gezeigt und wurden mit gleichen Belichtungszeiten durchgeführt, um einen quantitativen Vergleich zwischen den Bildern zu ermöglichen. Es ist zu beobachten, dass die Hemmung

des lysosomalen Abbaus keinen Einfluss auf die  $\gamma 2$ -Konstrukte an sich hat. Dies deutet darauf hin, dass  $\gamma 2$ -Adaptin bzw. seine Mutanten offensichtlich stabile Proteine sind, die in dem Zeitfenster von vier Stunden nicht lysosomal abgebaut werden.



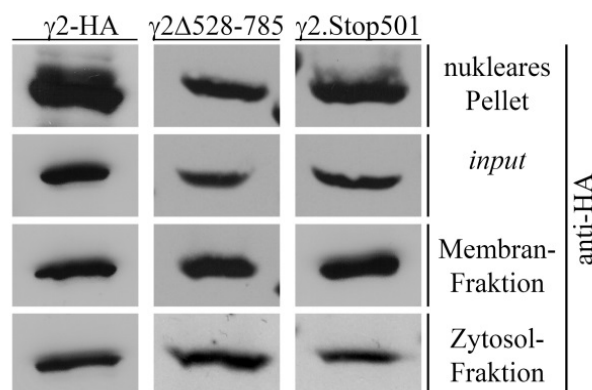
**Abbildung 30: Intrazelluläre Verteilung von MLV.gag mit  $\gamma 2$ -HA,  $\gamma 2\Delta 528-785$  bzw.  $\gamma 2$ .Stop501 in An- und Abwesenheit lysosomaler Hemmstoffe**

HuH-7 Zellen wurden mit MLV.gag und  $\gamma 2$ -HA,  $\gamma 2\Delta 528-785$ ,  $\gamma 2$ .Stop501 bzw. einem leeren Flag-Vektor als Kontrolle kotransfiziert. Vor der PFA-Fixierung wurden die Zellen nach 48-stündiger Expression für vier Stunden in An- bzw. Abwesenheit des lysosomalen Hemmstoffs NH<sub>4</sub>Cl inkubiert. Die  $\gamma 2$ -Konstrukte wurden über anti-HA angefärbt, während MLV.gag autofluoresziert. Balken  $\cong 10 \mu\text{m}$

Die Reduktion von MLV.gag durch exogenes  $\gamma 2$ -HA und  $\gamma 2\Delta 528-785$ , die bisher nur im Western Blot untersucht wurde, konnte in der Immunfluoreszenz bestätigt werden. Auch das Ausbleiben dieses Effekts bei Überexpression von  $\gamma 2$ .Stop501 ist in der Immunfluoreszenz

deutlich zu erkennen. Vergleicht man die Fluoreszenzaufnahmen in An- und Abwesenheit von  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , so kann man eine leichte Steigerung des MLV.gag-Signals bei Zugabe von  $\text{NH}_4\text{Cl}$  und Ko-Transfektion mit  $\gamma 2$ -HA und  $\gamma 2\Delta 528-785$  beobachten, während das Signal in der Kontrolle und bei Ko-Transfektion mit  $\gamma 2$ .Stop501 unbeeinflusst bleibt. Dies unterstützt die Hypothese, dass MLV.gag bei Überexpression von  $\gamma 2$ -HA lysosomal abgebaut wird.  $\text{NH}_4\text{Cl}$  hemmt den lysosomalen Proteolyse unabhängig davon, ob die Substrate für die Degradation im Lysosom aus MVBs oder Autophagosomen stammen. Daher liefert dieser Versuch noch keinen Hinweis darauf, ob der Abbau von MLV.gag durch exogenes  $\gamma 2$ -Adaptin Autophagie-abhängig erfolgt oder nicht.

In den Immunfluoreszenzstudien konnte keine wesentliche Änderung in der subzellulären Verteilung von  $\gamma 2$ .Stop501 im Vergleich zu  $\gamma 2$ -HA beobachtet werden. Dennoch wurde eine möglicherweise veränderte subzelluläre Lokalisation von  $\gamma 2$ .Stop501 im Vergleich zu  $\gamma 2$ -HA und  $\gamma 2\Delta 528-785$  durch Fraktionierungsstudien untersucht. Für die Fraktionierung in zytosolische und Membran-gebundene bzw. -assoziierte Proteine wurden HuH-7 Zellen mit  $\gamma 2$ -HA,  $\gamma 2\Delta 528-785$  und  $\gamma 2$ .Stop501 transfiziert und durch differentielle Zentrifugation aufgearbeitet. Die Proben wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot mittels anti-HA analysiert. Wie Abbildung 31 zeigt, konnte keine veränderte Membran-Assoziation von  $\gamma 2$ .Stop501 im Vergleich zu  $\gamma 2$ -HA und  $\gamma 2\Delta 528-785$  beobachtet werden. Das Fehlen der potentiellen LIR-Domäne scheint damit keinen Einfluss auf die Membran-Assoziation von  $\gamma 2$ .Stop501 zu haben.



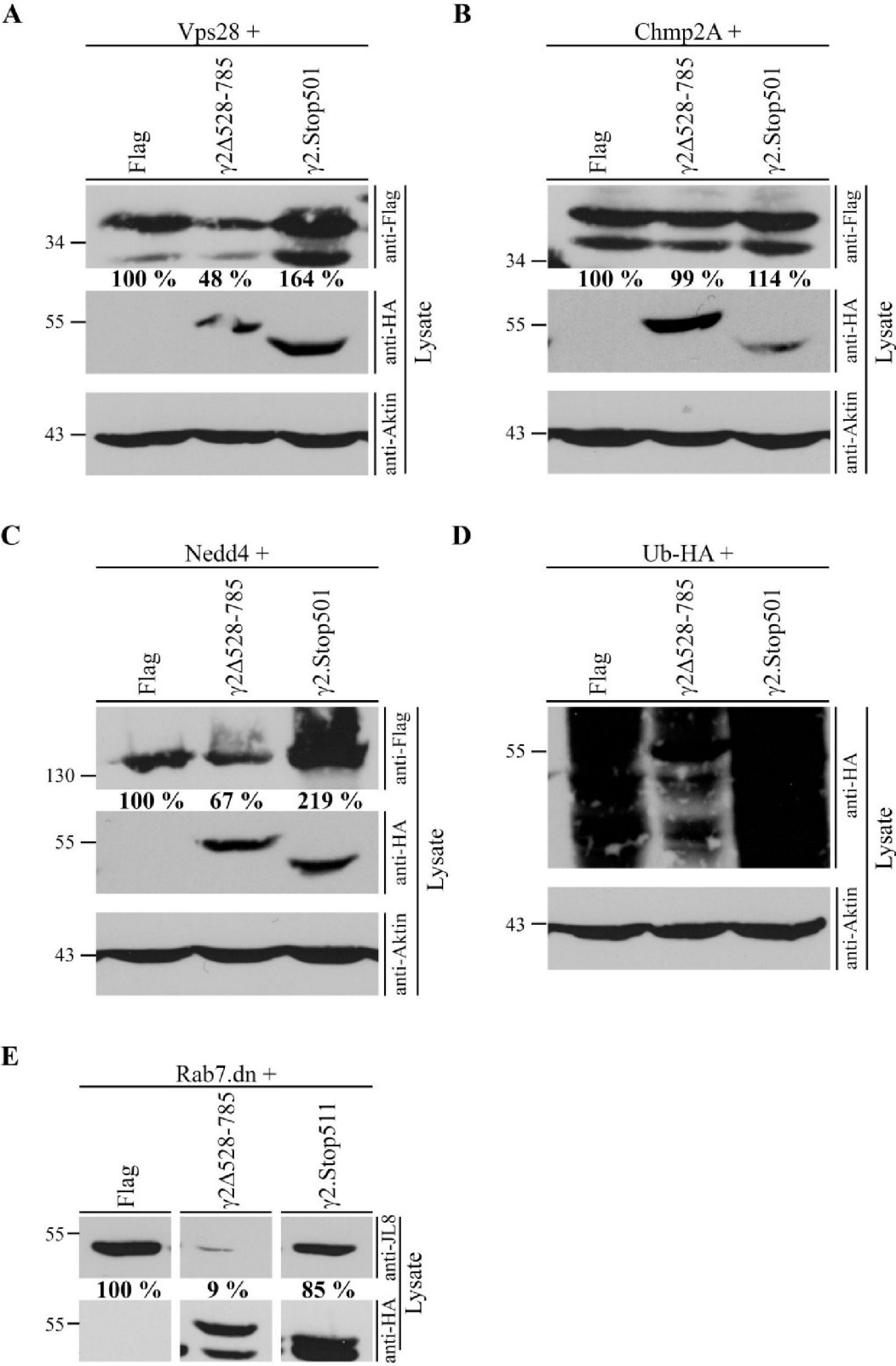
**Abbildung 31: Subzelluläre Fraktionierung von  $\gamma 2$ .Stop501**

Auftrennung in Membran- und Zytosolfraktion – HuH-7 Zellen wurden mit  $\gamma 2$ -HA,  $\gamma 2\Delta 528-785$  und  $\gamma 2$ .Stop501 transfiziert und nach dreitägiger Expression unter nativen Bedingungen aufgebrochen. Zellkerne und nicht aufgebrochene Zellen wurden pelletiert und der postnukleare Überstand in Membran- und Zytosolfraktion durch Ultrazentrifugation auf einem Sucrose-Kissen aufgetrennt. Die Analyse der Proben erfolgte über SDS-PAGE und Western Blot mittels anti-HA.



Da überexprimiertes  $\gamma 2$ .Stop501 MLV.gag nicht reduziert, wurde überprüft, ob das fehlende LIR-Motiv zu einem generellen Funktionsverlust von  $\gamma 2$ -Adaptin führt. Als „Substrate“ wurden die oben beschriebenen  $\gamma 2$ -Interaktionspartner Vps28, Chmp2A, Nedd4, Ubiquitin und Rab7.dn verwendet. Es wurden HuH-7 Zellen mit diesen Konstrukten und  $\gamma 2\Delta 528-785$  als Positivkontrolle,  $\gamma 2$ .Stop501 bzw. einem leeren Flag-Vektor als Negativkontrolle bei gleichen DNA-Mengen kotransfiziert. Nach dreitägiger Expression erfolgte die Lyse. Die Proben wurden im Western Blot mittels anti-HA gegen die  $\gamma 2$ -Konstrukte bzw. Ub-HA, anti-Flag gegen Vps28, Chmp2A und Nedd4 und anti-JL8 gegen Rab7.dn analysiert.

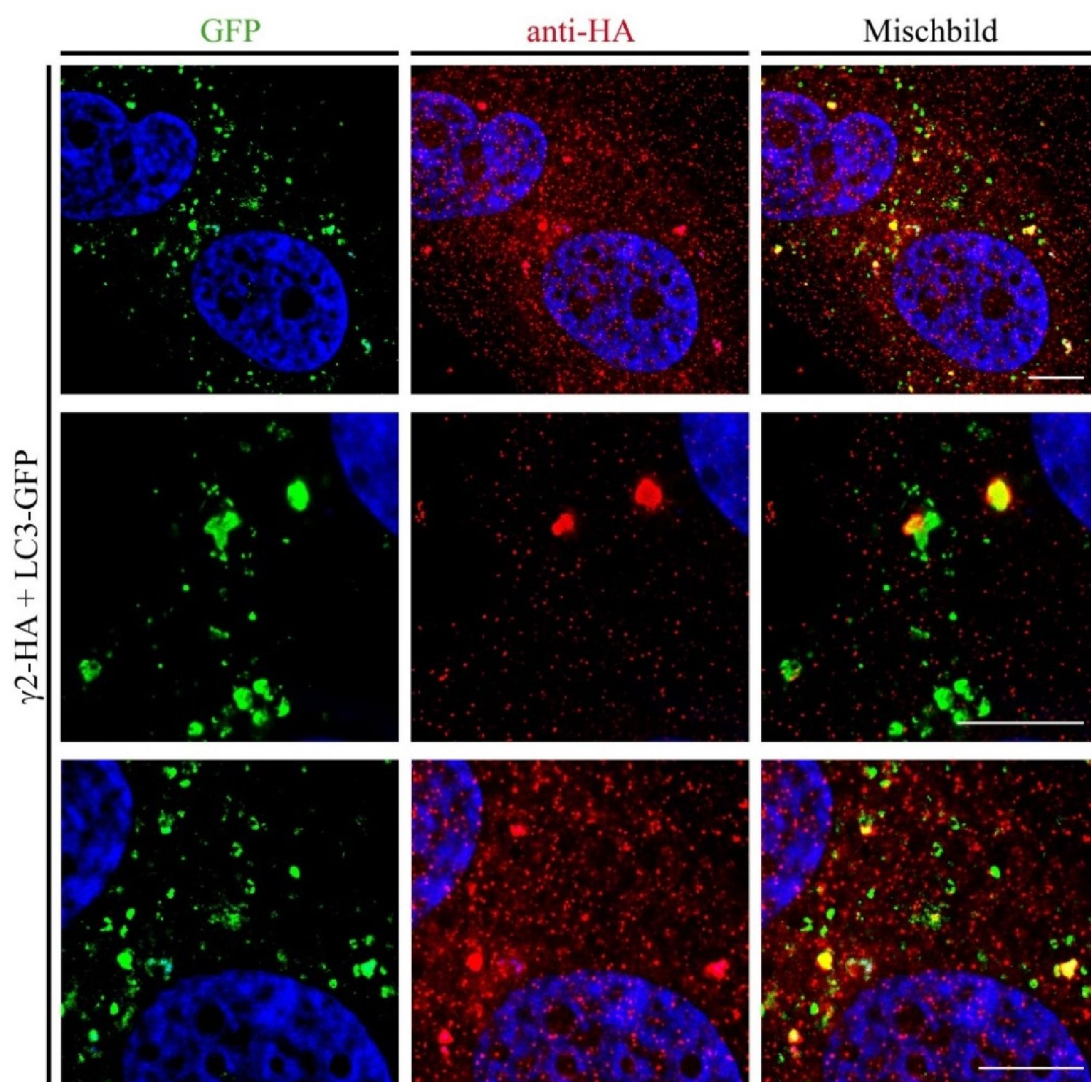
Die Ergebnisse werden in Abbildung 32 gezeigt. Abbildung 32 A zeigt den Effekt auf Vps28. Während  $\gamma 2\Delta 528-785$  die zelluläre Menge von Vps28 auf 48 % reduziert, kommt es im Gegensatz dazu bei Ko-Expression mit  $\gamma 2$ .Stop501 zu einer Steigerung im Vergleich zur Negativkontrolle. Hingegen bleibt Chmp2A sowohl bei Ko-Expression mit  $\gamma 2\Delta 528-785$  als auch mit  $\gamma 2$ .Stop501 unbeeinflusst (Abbildung 32 B). Nedd4 wird von  $\gamma 2\Delta 528-785$  auf 68 % reduziert, während  $\gamma 2$ .Stop501 auch hier zu einer Erhöhung der Nedd4-Menge im Vergleich zur Kontrolle führt (Abbildung 32 C). Ähnlich verhält es sich mit Ub-HA (Abbildung 32 D), auch wenn hier keine quantitative Auswertung möglich war. Rab7.dn wird, wie bereits mehrfach beobachtet, am stärksten durch exogenes  $\gamma 2\Delta 528-785$  reduziert und zeigt bei Überexpression von  $\gamma 2$ .Stop501 keine Reduktion (Abbildung 32 E). Somit zeichnet sich ab, dass das Fehlen des potentiellen LIR-Motivs eine generelle Funktionseinschränkung von  $\gamma 2$ -Adaptin verursacht.



**Abbildung 32: Vergleichende Charakterisierung von  $\gamma 2$ .Stop501 und  $\gamma 2\Delta 528-785$**   
HuH-7 Zellen wurden mit Vps28, Chmp2A, Nedd4, Ub-HA, Rab7.dn und  $\gamma 2\Delta 528-785$  als Positivkontrolle,  $\gamma 2$ .Stop501 bzw. einem Flag-Vektor als Negativkontrolle kotransfiziert. Nach dreitägiger Expression wurden die Zellen lysiert und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert (anti-HA:  $\gamma 2\Delta 528-785$ ,  $\gamma 2$ .Stop501, Ub-HA; anti-Flag: Vps28, Chmp2A, Nedd4; anti-JL8: Rab7.dn; anti-Aktin: Ladekontrolle). (A) Ergebnis für Vps28, (B) Chmp2A, (C) Nedd4, (D) Ub-HA und (E) Rab7.dn. Die prozentualen Angaben beziehen sich auf die relative Intensität der Vps28-, Chmp2A-, Nedd4-, Ub-HA- und Rab7.dn-Banden im Vergleich zur Negativkontrolle.

## 4.6 Untersuchungen zum Wechselspiel von $\gamma$ 2-Adaptin und LC3

Das LIR-Motiv läßt eine mögliche Verbindung zwischen  $\gamma$ 2-Adaptin und LC3 vermuten. Daher wurden Immunfluoreszenzstudien durchgeführt, bei denen  $\gamma$ 2-HA zusammen mit LC3-GFP exprimiert wurde. Hierbei konnte in der Tat eine Ko-Lokalisation von  $\gamma$ 2-HA mit LC3-GFP in Aggregat-artigen Strukturen beobachtet werden (Abbildung 33). Somit scheint das potentielle LIR-Motiv in  $\gamma$ 2-Adaptin funktionell zu sein.



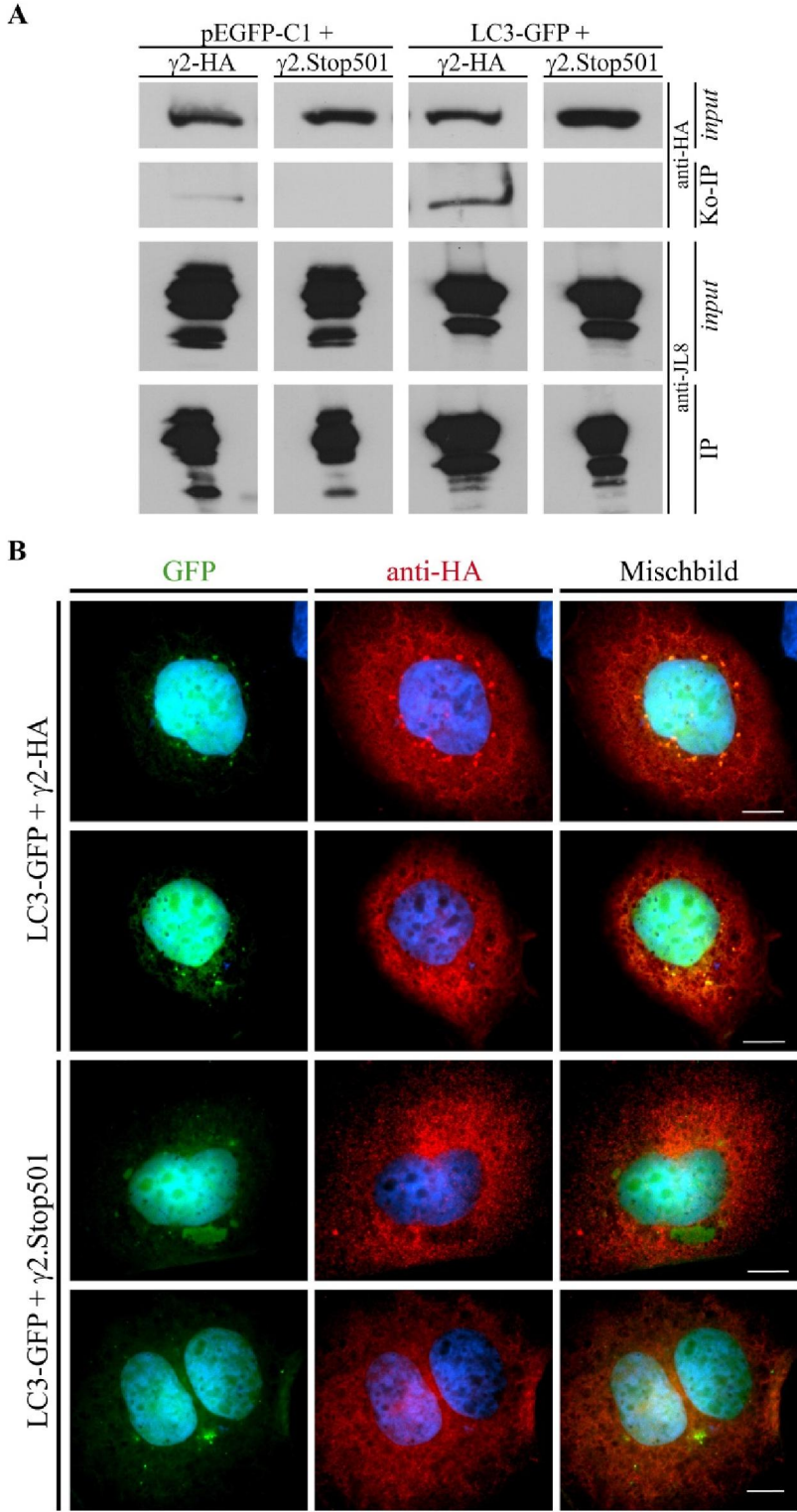
**Abbildung 33: Ko-Lokalisation von  $\gamma$ 2-HA und LC3-GFP**

HuH-7 Zellen wurden mit  $\gamma$ 2-HA und LC3-GFP transfiziert und nach dreitägiger Expression mit PFA fixiert.  $\gamma$ 2-HA wurde über anti-HA angefärbt (rot) und LC3-GFP über seine Autofluoreszenz (grün) nachgewiesen. Kolokalisation ist in Gelb dargestellt. Balken  $\hat{=}$  10  $\mu$ m

Um die LIR-Funktionalität weiterführend zu prüfen, wurden Interaktionsstudien zwischen  $\gamma$ 2-HA bzw.  $\gamma$ 2.Stop501 und LC3-GFP durchgeführt. Hierfür wurden HuH-7 Zellen mit  $\gamma$ 2-HA bzw.  $\gamma$ 2.Stop501 und LC3-GFP bzw. pEGFP-C1 als Kontrolle kotransfiziert und nach dreitägiger Expression nach dem Triton-Protokoll lysiert. Vor der Immunpräzipitation mit anti-JL8-beschichteten Partikeln wurde eine *input*-Kontrolle abgenommen. Die Präzipitate wurden anschließend in SDS-Probenpuffer aufgenommen, wobei für die Proben mit  $\gamma$ 2.Stop501 SDS-Probenpuffer ohne  $\beta$ -Mercaptoethanol verwendet wurde, da  $\gamma$ 2.Stop501 im Proteingel sonst auf der Höhe der schweren Antikörperketten läuft und die Antikörper unter nicht-reduzierenden Bedingungen nicht dissoziieren. Die Analyse der Proben erfolgte über SDS-PAGE und Western Blot, wobei die Immunpräzipitation über anti-JL8 und ko-präzipitiertes  $\gamma$ 2-HA über anti-HA nachgewiesen wurde. Die Expression der Konstrukte wurde in der *input*-Kontrolle überprüft.

Als Negativkontrolle diente die Ko-Expression mit pEGFP-C1, bei der weder  $\gamma$ 2-HA noch  $\gamma$ 2.Stop501 in den Präzipitaten nachgewiesen werden kann. Bei Ko-Expression mit LC3-GFP wird  $\gamma$ 2-HA ko-präzipitiert, während  $\gamma$ 2.Stop501 im Präzipitat nicht detektierbar ist. (Abbildung 34 A)  $\gamma$ 2-Adaptin kann folglich in LIR-abhängiger Reaktion mit LC3 interagieren.

Um diesen Befund in Immunfluoreszenzuntersuchungen zu erhärten, wurden Färbungen bei Ko-Expression von  $\gamma$ 2-HA bzw.  $\gamma$ 2.Stop501 und LC3-GFP angefertigt. Die Aufnahmen in Abbildung 34 B zeigen eine Kollokalisierung von  $\gamma$ 2-HA mit LC3-GFP in Aggregat-artigen Strukturen, während es bei Ko-Expression von  $\gamma$ 2.Stop501 und LC3-GFP zu einer verminderten Ausbildung von solchen LC3-GFP-positiven Strukturen kommt und keine Ko-Lokalisation von  $\gamma$ 2.Stop501 und LC3-GFP beobachtet werden kann. Dies bekräftigt die Ergebnisse der Ko-Immunpräzipitation und spricht für ein funktionelles LIR-Motiv in  $\gamma$ 2-Adaptin.



**Abbildung 34:  $\gamma 2$ -Adaptin interagiert mit LC3**

(A) Ko-Immünpräzipitation von  $\gamma 2$ -HA bzw.  $\gamma 2$ .Stop501 und LC3-GFP. HuH-7 Zellen wurden mit  $\gamma 2$ -HA bzw.  $\gamma 2$ .Stop501 und LC3-GFP bzw. pEGFP-C1 als Kontrolle kotransfiziert. Nach dreitägiger Expression wurden die Zellen lysiert. Die Immünpräzipitation erfolgte nach Abnahme einer *input*-Kontrolle mit anti-JL8-beschichteten Partikeln. Die Präzipitate wurden in SDS-Probenpuffer aufgenommen und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Hierfür wurden anti-JL8 für LC3-GFP und GFP und anti-HA für die  $\gamma 2$ -Konstrukte verwendet. (B) Immünfluoreszenzen bei zweitägiger Ko-Expression von  $\gamma 2$ -HA bzw.  $\gamma 2$ .Stop501 (rot) mit LC3-GFP (grün) und anschließender PFA-Fixierung. Die  $\gamma 2$ -Konstrukte wurden über anti-HA angefärbt; Kolokalisation ist in Gelb dargestellt. Balken  $\cong 10 \mu\text{m}$

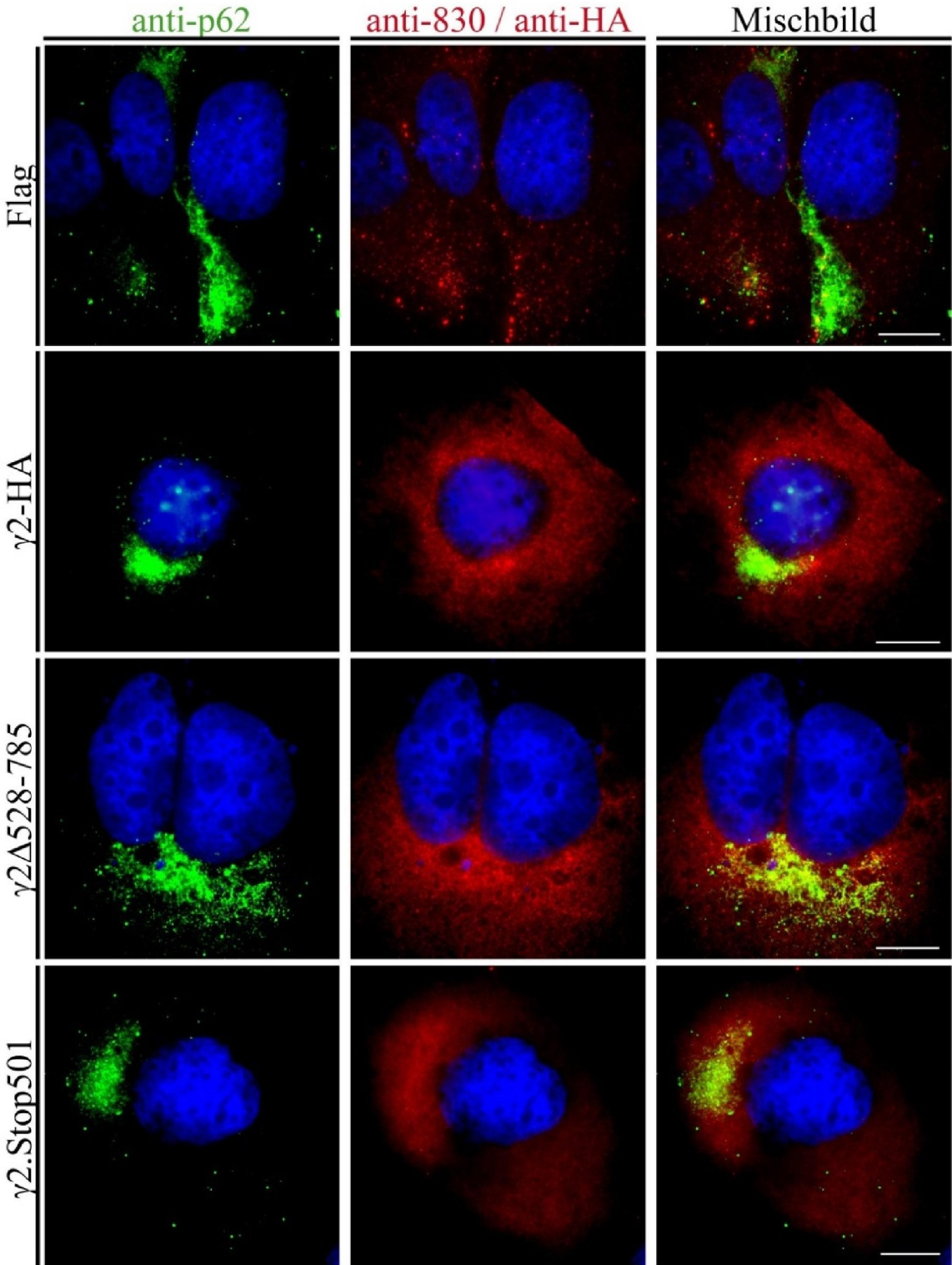
## 4.7 Untersuchungen zur Rolle von $\gamma$ 2-Adaptin in der Autophagie

Da eine Interaktion zwischen  $\gamma$ 2-Adaptin und LC3, einem funktionellen Protein im Autophagie-Weg, nachgewiesen werden konnte, wurde die mögliche Rolle von  $\gamma$ 2-Adaptin in der Autophagie untersucht.

### 4.7.1 Untersuchungen zu $\gamma$ 2-Adaptin und p62

LC3 rekrutiert u.a. Autophagie-Adapter an die Phagophore und ermöglicht so den Abbau dieser Adapter und ihrer Substrate durch Autophagie (Kabeya et al. 2000; Johansen und Lamark 2011). p62 ist der am besten untersuchte Autophagie-Adapter und an vielen selektiven Autophagie-Prozessen, oft auch in Kombination mit anderen Autophagie-Adaptoren, beteiligt (Pankiv et al. 2007; Johansen und Lamark 2011). Daher sollte untersucht werden, ob  $\gamma$ 2-Adaptin möglicherweise auch in Kombination mit p62 wirkt. Hierzu wurden Immunfluoreszenz-Färbungen angefertigt, bei denen überexprimiertes bzw. endogenes  $\gamma$ 2-Adaptin gemeinsam mit endogenem p62 angefärbt wurde. HuH-7 Zellen wurden mit  $\gamma$ 2-HA,  $\gamma$ 2 $\Delta$ 528-785,  $\gamma$ 2.Stop501 bzw. einem Flag-Vektor transfiziert und nach dreitägiger Expression mit PFA fixiert. Endogenes p62 wurde in allen Präparaten über anti-p62 angefärbt und endogenes  $\gamma$ 2-Adaptin in dem Kontroll-Präparat über anti-830. Die exogenen  $\gamma$ 2-Konstrukte wurden über anti-HA nachgewiesen.

Wie in Abbildung 35 dargestellt, zeigen  $\gamma$ 2-HA,  $\gamma$ 2 $\Delta$ 528-785 und  $\gamma$ 2.Stop501 (rot) die typische zytoplasmatische Färbung. Endogenes  $\gamma$ 2-Adaptin (rot) ist ebenfalls zytoplasmatisch lokalisiert, wobei vermehrt punktuelle Strukturen auftreten. Diese Strukturen lassen sich vermutlich mit der transienten Lokalisation von  $\gamma$ 2-Adaptin an MVBs bzw. möglicherweise auch an Autophagosomen erklären. p62 (grün) ist im Zytoplasma an Aggregat-artigen Strukturen zentriert lokalisiert. Es kommt sowohl für endogenes  $\gamma$ 2-Adaptin als auch für  $\gamma$ 2-HA,  $\gamma$ 2 $\Delta$ 528-785 und  $\gamma$ 2.Stop501 zur teilweisen Ko-Lokalisation mit p62. Dies ist überraschend, da die Ko-Lokalisation somit nicht im Zusammenhang mit der Funktionalität von  $\gamma$ 2-Adaptin zu stehen scheint. Daher wurde p62 im Zusammenhang mit  $\gamma$ 2-Adaptin zunächst auch nicht weiter verfolgt.



**Abbildung 35: Subzelluläre Lokalisation von  $\gamma$ 2-Adaptin und p62**  
HuH-7 Zellen wurden mit  $\gamma$ 2-HA,  $\gamma$ 2 $\Delta$ 528-785,  $\gamma$ 2.Stop501 und einem Flag-Vektor transfiziert und nach dreitägiger Expression mit PFA fixiert. Alle Präparate wurden mit anti-p62 angefärbt (grün). Endogenes  $\gamma$ 2-Adaptin (rot) wurde im Flag-transfizierten Präparat über anti-830 und die  $\gamma$ 2-Konstrukte (rot) in den übrigen Präparaten über anti-HA nachgewiesen. Kolokalisation ist in Gelb dargestellt. Balken  $\cong$  10  $\mu$ m

#### 4.7.2 LC3 als Marker für das Maß der Autophagie

LC3 kommt als zytoplasmatisches LC3-I und als Membran-assoziiertes LC3-II vor. LC3-II ist am Phagophor lokalisiert und an der Innen- und Außenseite der Autophagosomen. Damit kann es nur zum Teil als LC3-I in das Zytoplasma zurück gewonnen werden, während LC3-II an der Innenseite der Autophagosomen durch Autophagie abgebaut wird. Das LC3-II / LC3-I Verhältnis gibt somit Aufschluss über das Maß der Autophagie, wenn es im Vergleich von Zellen in An- und Abwesenheit lysosomaler Hemmstoffe betrachtet wird. (Mizushima und Yoshimori 2007; Kabeya et al. 2000)

Zunächst wurde die Wirkweise von LC3 als Marker der Autophagie überprüft, indem untransfizierte Zellen unter Autophagie-stimulierenden und –inhibierenden Bedingungen in An- und Abwesenheit von  $\text{NH}_4\text{Cl}$  analysiert wurden. Zur Induktion der Autophagie wurden EBSS, ein Aminosäure-freies Medium, und Rapamycin verwendet. Die Autophagie wurde durch 3-MA inhibiert. Die Inkubation erfolgte jeweils in An- und Abwesenheit von  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Anschließend wurden die Zellen in SDS-Probenpuffer lysiert. Die Proben wurden direkt über SDS-PAGE aufgetrennt und mit anti-LC3 im Western Blot analysiert. Abbildung 36 A zeigt schematisch das zu erwartende LC3-Bandenmuster unter normalen Bedingungen, bei Induktion oder Inhibition der Autophagie, jeweils mit und ohne lysosomale Hemmung. Bei Autophagie-Induktion kommt es zu einer Steigerung von LC3-II im Vergleich zur Kontrolle, welche durch lysosomale Hemmstoffe weiter verstärkt wird. Die Hemmung der Autophagie führt hingegen zu keiner Änderung im LC3-Bandenmuster im Vergleich zur Kontrolle, auch nicht bei Zugabe von  $\text{NH}_4\text{Cl}$ .

Die Wirkweise der zur Inhibition (rot) bzw. Induktion (grün) der Autophagie eingesetzten Substanzen ist in Abbildung 36 B schematisch dargestellt. Nährstoffmangel und Rapamycin induzieren die Autophagie, indem sie den mTOR-Komplex inhibieren. Der mTOR-Komplex wirkt als negativer Regulator der Autophagie. Ein weiterer die Autophagie regulierender Komplex ist der Phagophor-induzierende PI3-Kinase-Komplex, der durch 3-MA inhibiert wird.  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ist ein lysosomaler Hemmstoff, der die Ansäuerung der Lysosomen inhibiert.

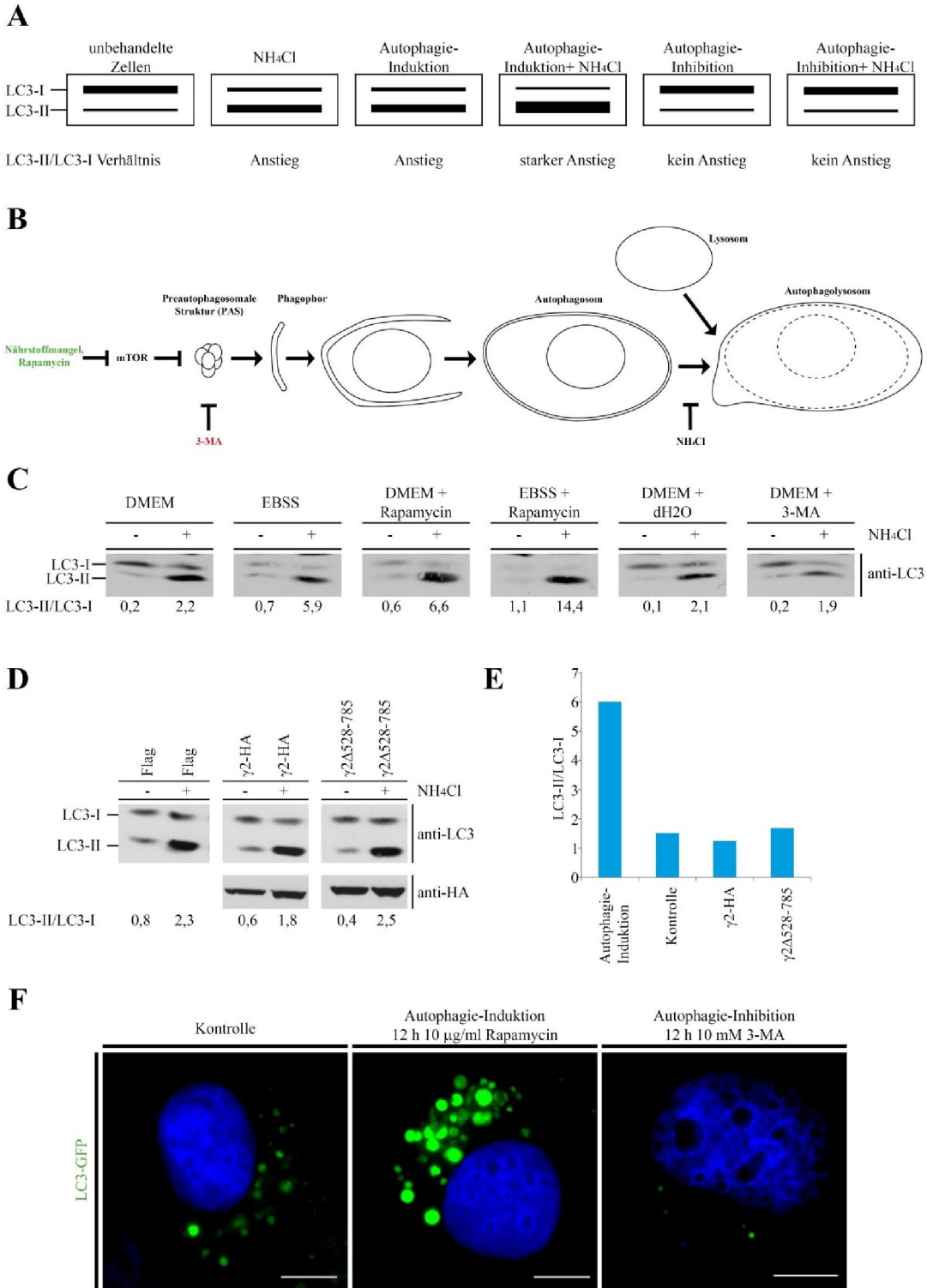
Abbildung 36 C zeigt die Ergebnisse des LC3-Western Blots bei Autophagie-Induktion bzw. -Inhibition untransfizierter HuH-7 Zellen in An- und Abwesenheit von  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Sie entsprechen dem in Abbildung 36 A dargestellten Schema, so dass sichergestellt ist, dass sich der LC3-Western Blot im verwendeten Zellkultur-System als Marker für das Maß der Autophagie eignet.

Daraufhin wurde überprüft, ob  $\gamma 2$ -Adaptin den Mechanismus der Autophagie induzieren kann. Hierfür wurden HuH-7 Zellen mit  $\gamma 2$ -HA,  $\gamma 2\Delta 528-785$  und einem Flag-Vektor als



Kontrolle transfiziert und nach dreitägiger Expression für vier Stunden mit  $\text{NH}_4\text{Cl}$  inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in SDS-Probenpuffer lysiert und die Proben mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Anti-HA diente hierbei dem Nachweis der  $\gamma 2$ -Konstrukte und anti-LC3 dem Nachweis von LC3-I und LC3-II. Wie Abbildung 36 D zeigt, ändert sich das LC3-Bandenmuster bei Überexpression von  $\gamma 2$ -HA und  $\gamma 2\Delta 528-785$  in An- und Abwesenheit von  $\text{NH}_4\text{Cl}$  genauso wie in der Kontrolle. Somit kann  $\gamma 2$ -Adaptin die Autophagie nicht induzieren. Dies wird noch deutlicher, wenn man die LC3-I- und LC3-II-Banden quantifiziert und den Anstieg des LC3-II / LC3-I Verhältnis bei lysosomaler Hemmung mit dem bei Autophagie-Induktion durch Rapamycin vergleicht (Abbildung 36 E). Der Wert für  $\gamma 2$ -HA,  $\gamma 2\Delta 528-785$  und Flag als Kontrolle sind in etwa gleich hoch, während der für Rapamycin um mehr als das vierfache höher liegt.

Da sich die LC3-Banden bei Zugabe von 3-MA nicht von denen der Kontrolle unterscheiden, wurde die Wirkung von 3-MA in der Fluoreszenz visuell überprüft. HuH-7 Zellen wurden mit LC3-GFP transfiziert und nach zweitägiger Expression über Nacht mit Rapamycin, 3-MA bzw. Zellkulturmedium ohne weitere Zusätze als Kontrolle inkubiert. Die Zellen wurden in PFA fixiert und im Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Abbildung 36 F zeigt die entsprechenden Aufnahmen. Die Wirkung von Rapamycin und 3-MA konnte bestätigt werden. Bei Inkubation mit Rapamycin steigt die Anzahl der Aggregat-artigen Strukturen im Vergleich zur Kontrolle an, während sie bei 3-MA Behandlung stark absinkt. Mit 3-MA behandelte Zellen zeigen hingegen eine viel stärkere diffuse Hintergrundfärbung als die Kontrolle und Rapamycin behandelte Zellen (nicht gezeigt). Damit ist die Wirkung von Rapamycin und 3-MA auch in der Fluoreszenz bestätigt und die Grundlage für weitere Versuche mit diesen Substanzen geschaffen.

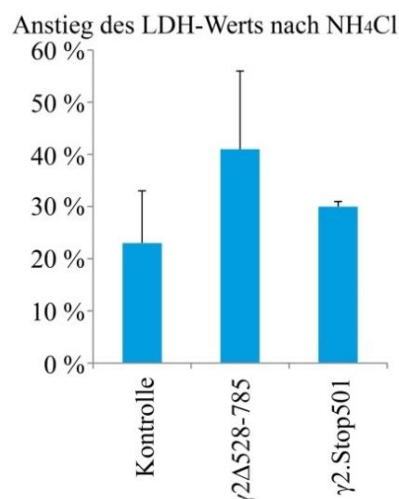


**Abbildung 36: LC3 als Marker für das Maß der Autophagie**  
 (A) Schematische Darstellung des LC3-Bandenmusters bei Induktion und Inhibition der Autophagie in An- und Abwesenheit lysosomaler Hemmstoffe. (B) Wirkweise der zur Induktion (grün) und Inhibition (rot) der Autophagie eingesetzten Substanzen. (C) LC3-Western Blot (anti-LC3) untransfizierter Zellen bei vierstündiger Autophagie-Induktion bzw. -Inhibition in An- und Abwesenheit von NH<sub>4</sub>Cl und anschließender Lyse in SDS-Probenpuffer. (D) LC3-Western Blot (anti-LC3) nach dreitägiger Überexpression von γ2-HA bzw. γ2Δ528-785 (anti-HA), vierstündiger Inkubation mit und ohne NH<sub>4</sub>Cl und anschließender Lyse in SDS-Probenpuffer. (E) Anstieg des LC3-II / LC3-I Verhältnis bei lysosomaler Hemmung für Rapamycin im Vergleich zu Flag-, γ2-HA- und γ2Δ528-785-transfizierten Zellen. (F) LC3-transfizierte Zellen wurden über Nacht mit Rapamycin bzw. 3-MA inkubiert und anschließend mit PFA-fixiert. LC3-GFP ist grün dargestellt. Balken ≅ 10 µm

### 4.7.3 LDH als Marker für das Maß der Autophagie

Der LC3-Western Blot hat gezeigt, dass  $\gamma 2$ -Adaptin die Autophagie nicht induzieren kann. Dies sollte anhand eines weiteren Autophagie-Markers bestätigt werden. Hierzu wurde LDH (Laktatdehydrogenase) gewählt, welches ausschließlich über Autophagie abgebaut wird (Kopitz et al. 1990). Da die Gesamtmenge an LDH in der Zelle aber konstant gehalten wird, wurden keine Vollzelllysate untersucht, sondern aus Lysaten präparierte Mikrosomen, die u.a. Autophagosomen und Lysosomen beinhalten.

HuH-7 Zellen wurden mit  $\gamma 2\Delta 528-785$ ,  $\gamma 2$ .Stop501 und einem Flag-Vektor als Kontrolle transfiziert und die Mikrosomen nach zweitägiger Expression und vierstündiger Behandlung mit bzw. ohne  $\text{NH}_4\text{Cl}$  präpariert. Die Zellen wurden durch hypotonischen Schock und mechanische Scherkräfte aufgebrochen und anschließend die Zellkerne, nicht aufgebrochenen Zellen und große Zelltrümmer pelletiert. Der postnukleare Überstand wurde auf einem Sucrose-Kissen bei 40 000 rpm und  $4^\circ\text{C}$  für eine Stunde zentrifugiert. Das dabei entstandene Mikrosomen-Pellet wurde in TBS gelöst und das enthaltene LDH mit Hilfe eines LDH-Assays quantifiziert. Der LDH-Wert der Proben ohne  $\text{NH}_4\text{Cl}$  wurde zu dem Wert bei lysosomaler Hemmung ins Verhältnis gesetzt. Der beobachtete Anstieg des LDH-Werts bei Zugabe von  $\text{NH}_4\text{Cl}$  im Vergleich zu unbehandelten Zellen ist in Abbildung 37 dargestellt. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen  $\gamma 2\Delta 528-785$ - und den Kontroll- bzw.  $\gamma 2$ .Stop501-transfizierten Zellen beobachtet werden. Damit ist bestätigt, dass  $\gamma 2$ -Adaptin *per se* die Autophagie nicht induzieren kann.



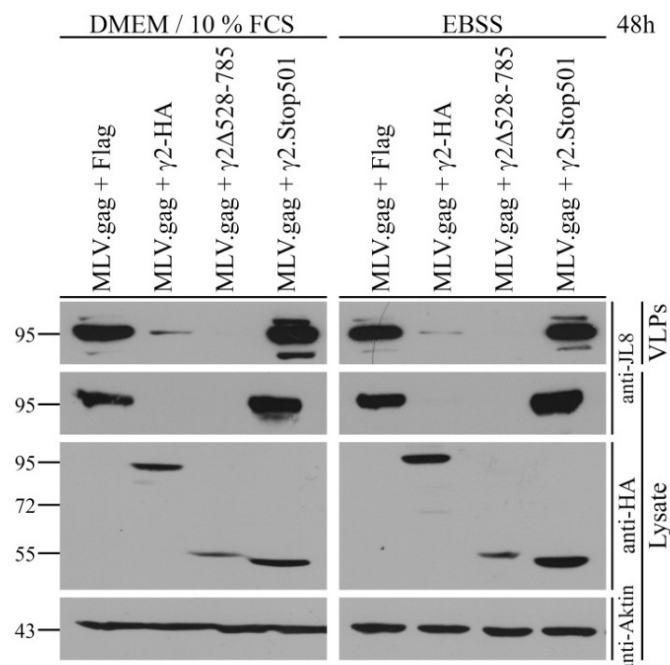
**Abbildung 37: LDH als Marker für das Maß der Autophagie**

HuH-7 Zellen wurden mit  $\gamma 2\Delta 528-785$ ,  $\gamma 2$ .Stop501 bzw. einem Flag-Vektor als Kontrolle transfiziert und nach zweitägiger Expression für vier Stunden mit bzw. ohne  $\text{NH}_4\text{Cl}$  inkubiert. Die Mikrosomenpräparation erfolgte nach nativem Zellaufschluss durch Ultrazentrifugation auf einem Sucrose-Kissen. Das Mikrosomenpellet wurde in TBS gelöst und dem LDH-Assay unterzogen. Das Balkendiagramm zeigt den Anstieg des LDH-Werts bei lysosomaler Hemmung im Vergleich zu unbehandelten Zellen.

#### 4.7.4 Autophagie-Induktion und MLV.gag

Ogleich  $\gamma 2$ -Adaptin die Autophagie nicht induziert, scheint MLV.gag bei  $\gamma 2$ -Überexpression vermutlich Autophagie-abhängig abgebaut zu werden. Daher galt es die Frage zu beantworten, ob die Induktion der Autophagie die intra- und extrazelluläre MLV.gag-Konzentration beeinflussen kann.

Hierfür wurden HuH-7 Zellen mit MLV.gag und  $\gamma 2$ -HA,  $\gamma 2\Delta 528-785$ ,  $\gamma 2$ .Stop501 bzw. einem leeren Flag-Vektor kotransfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurde das Medium gegen DMEM / 10 % FCS bzw. EBSS, zur Induktion der Autophagie, ausgetauscht. Nach weiteren 48 Stunden wurden die VLPs aufgereinigt und die Zellen lysiert. Die Proben wurden im Western Blot mit anti-JL8 gegen MLV.gag und anti-HA gegen die  $\gamma 2$ -Konstrukte analysiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 38 aufgeführt und zeigt, dass der Effekt von überexprimiertem  $\gamma 2$ -Adaptin auf MLV.gag durch die Induktion der Autophagie nicht beeinträchtigt ist und die Induktion der Autophagie keinen Einfluss auf intra- und extrazelluläres MLV.gag hat. Dies deutet auf eine Rolle von  $\gamma 2$ -Adaptin in der selektiven Autophagie hin, die bei Autophagie-Induktion von den nicht-selektiven Autophagie-Prozessen „überstrahlt“ wird.



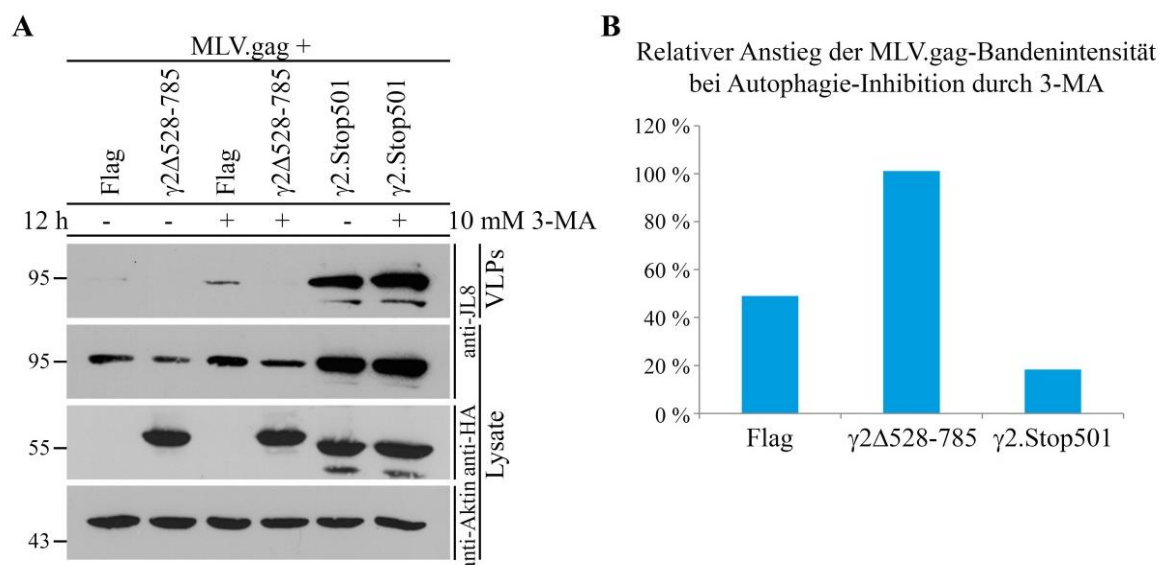
**Abbildung 38: Wirkung der Autophagie-Induktion auf die MLV.gag-Morphogenese**

HuH-7 Zellen wurden mit MLV.gag und  $\gamma 2$ -HA,  $\gamma 2\Delta 528-785$ ,  $\gamma 2$ .Stop501 und einem Flag-Vektor als Kontrolle kotransfiziert. 24 Stunden nach Transfektion wurde das Zellkulturmedium erneuert bzw. gegen EBSS ausgetauscht. Nach weiteren 48 Stunden wurden die VLPs aus dem Zellkulturüberstand aufgereinigt und die Zellen lysiert. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. MLV.gag wurde über anti-JL8 und die  $\gamma 2$ -Konstrukte über anti-HA nachgewiesen. Anti-Aktin diente als Ladekontrolle.

#### 4.7.5 Autophagie-Inhibition und MLV.gag

Daraufhin wurde untersucht, ob die Inhibition der Autophagie den Effekt von exogenem  $\gamma 2$ -Adaptin auf MLV.gag relativieren kann.

HuH-7 Zellen wurden mit  $\gamma 2\Delta 528-785$ ,  $\gamma 2$ .Stop501 bzw. einem leeren Flag-Vektor als Kontrolle kotransfiziert. Nach 48-stündiger Expression wurden die Zellen für weitere 12 Stunden in An- und Abwesenheit von 10 mM 3-MA inkubiert. Die VLPs wurden aus dem Zellkulturüberstand aufgereinigt und die Zellen lysiert. Die Proben wurden im Western Blot analysiert, wobei MLV.gag über anti-JL8 und die  $\gamma 2$ -Konstrukte über anti-HA nachgewiesen wurden. Abbildung 39 A zeigt das Ergebnis aus dem Western Blot, wobei das Signal der VLPs in den Kontrollen äußerst schwach ausfällt. Dennoch ist eine Tendenz der VLP-Steigerung bei Autophagie-Inhibition zu erkennen. Betrachtet man die MLV.gag-Banden in den Lysaten, so wird deutlich, dass die intrazelluläre Menge bei Zugabe von 3-MA ansteigt (Abbildung 39 B). Bei Überexpression von  $\gamma 2\Delta 528-785$  fällt dieser Anstieg am Stärksten aus und liegt bei fast 100 %. Dadurch wird deutlich, dass die Inhibition der Autophagie den Effekt von exogenem  $\gamma 2$ -Adaptin auf MLV.gag relativieren kann.



**Abbildung 39: Wirkung der Autophagie-Inhibition auf die MLV.gag-Morphogenese**

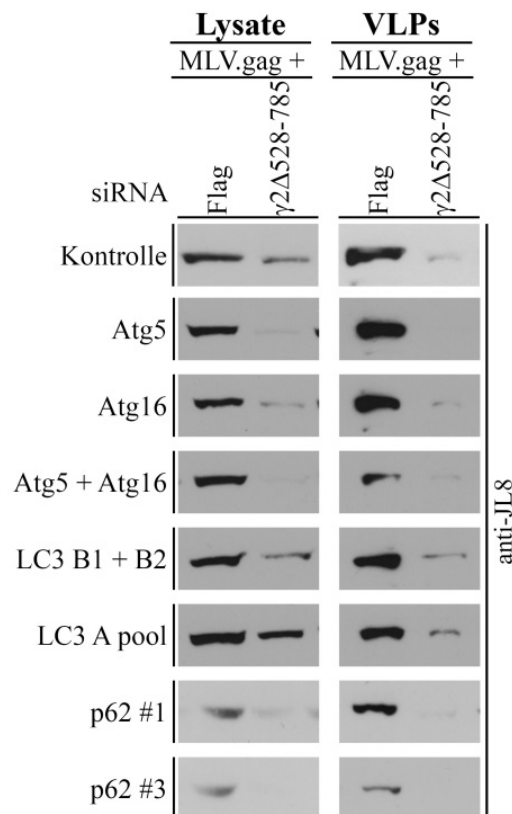
HuH-7 Zellen wurden mit MLV.gag und  $\gamma 2\Delta 528-785$ ,  $\gamma 2$ .Stop501 und einem Flag-Vektor als Kontrolle kotransfiziert. Nach 48 Stunden Expression wurde für 12 Stunden 10 mM 3-MA bzw. dH<sub>2</sub>O als Kontrolle zum Medium gegeben. Die Zellen wurden in Triton-Lysepuffer lysiert und die VLPs aufgereinigt. Die Analyse der Proben erfolgte mittels SDS-PAGE und Western Blot über anti-JL8 (MLV.gag) bzw. anti-HA ( $\gamma 2$ -Konstrukte). Anti-Aktin diente als Ladekontrolle. (A) Ergebnisse aus dem Western Blot. (B) Relativer Anstieg der Intensität der MLV.gag-Banden nach Autophagie-Inhibition durch 3-MA.

#### 4.7.6 Autophagie-Inhibition durch Depletion von Autophagie-Katalysatoren

Die Autophagie kann auch durch eine Depletion für sie wichtiger Proteine gehemmt werden. Daher wurde untersucht, welche Wirkung die Depletion solcher Proteine auf den Effekt von exogenem  $\gamma 2$ -Adaptin auf MLV.gag zeigt. Hierfür wurde die Depletion von Atg5, Atg16, LC3 und p62 untersucht.

HuH-7 Zellen wurden mit siRNA gegen Atg5, Atg16, Atg5 plus Atg16, LC3B, LC3A und p62 und Kontroll-siRNA transfiziert. Nach 48-stündiger Depletion erfolgte die Transfektion mit MLV.gag und  $\gamma 2\Delta 528-785$  bzw. einem leeren Flag-Vektor als Kontrolle. Nach 24 Stunden Expression wurden die VLPs aus dem Zellkulturüberstand aufgereinigt und die Zellen lysiert. Anschließend erfolgte die Analyse der Proben über SDS-PAGE und Western Blot mit Hilfe von anti-JL8 gegen MLV.gag und anti-HA gegen  $\gamma 2\Delta 528-785$ .

Die Ergebnisse sind in Abbildung 40 dargestellt, wobei A das Ergebnis aus dem Western Blot zeigt. Erstaunlicherweise zeigt die Depletion von Atg5 und Atg16 alleine bzw. in Kombination keinen Einfluss auf den reduzierenden Effekt von exogenem  $\gamma 2\Delta 528-785$  auf MLV.gag. Jedoch ist extrazelluläres MLV.gag an sich gerade bei Ko-Depletion von Atg5 und Atg16 schon stark reduziert. Die Depletion von LC3 zeigt hingegen eine Abschwächung der Reduktion von MLV.gag durch  $\gamma 2\Delta 528-785$ , sowohl bei den VLPs als auch besonders in den Lysaten. Dies bestätigt die bereits vermutete LC3-Abhängigkeit dieses Effekts. MLV.gag wird durch die Depletion von p62 sowohl intra- als auch extrazellulär sehr stark reduziert. Dennoch führt die Expression von  $\gamma 2\Delta 528-785$  zu einer noch stärkeren Reduktion.  $\gamma 2$ -Adaptin kann MLV.gag somit auch ohne p62 reduzieren. Die Tatsache, dass die Depletion von p62 einen ähnlichen Effekt wie die Überexpression von  $\gamma 2\Delta 528-785$  zeigt, lässt vermuten, dass p62 und  $\gamma 2$ -Adaptin nicht gemeinsam wirken, sondern vielleicht als Gegenspieler fungieren.



**Abbildung 40: Wirkung der Depletion von Autophagie-Katalysatoren auf die MLV.gag-Morphogenese**  
Die Depletion mit siRNAs gegen Atg5, Atg16, LC3 und p62 erfolgte für 48 Stunden. Danach wurden die Zellen mit MLV.gag und  $\gamma 2\Delta 528-785$  bzw. einem Flag-Vektor kotransfiziert. Nach 24 Stunden wurden die VLPs aufgereinigt und die Zellen lysiert. Die Analyse der Proben erfolgte mittels SDS-PAGE und Western Blot über anti-JL8 gegen MLV.gag und anti-HA gegen  $\gamma 2\Delta 528-785$ .

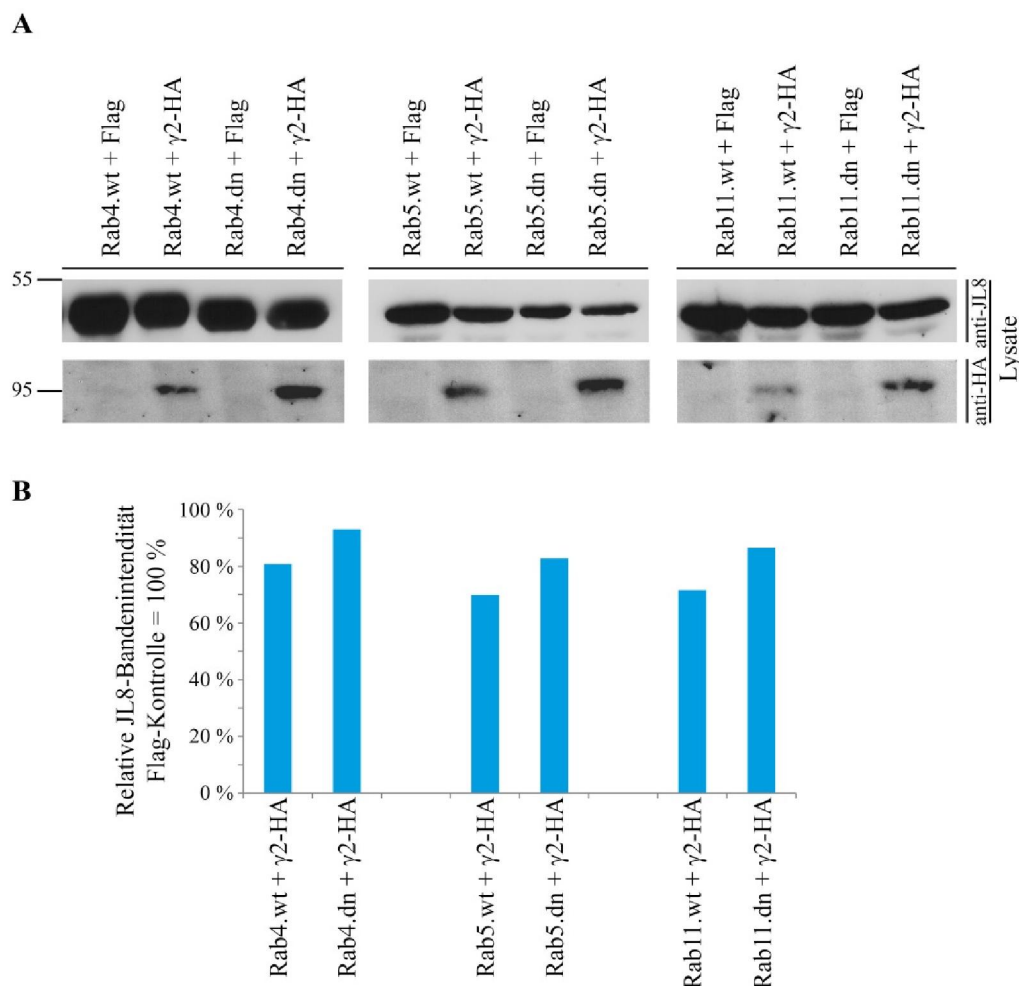
In  $\gamma 2$ -Adaptin wurde ein LIR-Motiv an AS-Position 503-509 identifiziert. Das Fehlen dieses Motivs in  $\gamma 2$ .Stop501 führt zur generellen Funktionseinschränkung von  $\gamma 2$ -Adaptin. Die subzelluläre Verteilung von  $\gamma 2$ -Adaptin wird durch den Verlust des LIR-Motivs jedoch nicht beeinflusst. Ein LIR-Motiv kann die Interaktion mit dem Autophagie-spezifischen Protein LC3 vermitteln. Es konnte gezeigt werden, dass  $\gamma 2$ -Adaptin, nicht aber  $\gamma 2$ .Stop501, mit LC3 interagiert und in der Zelle an Aggregat-artigen Strukturen ko-lokalisiert. Damit besitzt  $\gamma 2$ -Adaptin Eigenschaften eines Autophagie-Adapters. Autophagie-Adapter vermitteln die selektive Autophagie, indem sie ihre spezifischen Substrate über ihre Interaktion mit LC3 an Phagophore heran führen. Für eine Rolle von  $\gamma 2$ -Adaptin in der selektiven Autophagie spricht auch, dass MLV.gag bei  $\gamma 2$ -Überexpression Autophagie-abhängig abgebaut wird, jedoch überschüssiges  $\gamma 2$ -Adaptin die Autophagie *per se* nicht induzieren kann.  $\gamma 2$ -Adaptin könnte über sein UIM ubiquitinierte Proteine oder über seine Interaktion mit Proteinen an späten endosomalen Strukturen diese als Substrate der selektiven Autophagie zuführen.

## 4.8 Identifizierung möglicher $\gamma$ 2-Substrate

$\gamma$ 2-Adaptin scheint eine Rolle im selektiven Abbau durch Autophagie zu spielen. Um diese Rolle näher beschreiben zu können, wurde nach weiteren Substraten gesucht, die durch Überexpression von  $\gamma$ 2-Adaptin selektiv abgebaut werden.

### 4.8.1 $\gamma$ 2-Adaptin und Proteine der Rab-Familie

Rab7 ist ein Interaktionspartner von  $\gamma$ 2-Adaptin und wird entsprechend seiner katalytischen Aktivität unterschiedlich stark von exogenem  $\gamma$ 2-Adaptin reduziert. Um zu überprüfen, ob dieser Effekt charakteristisch für Rab7 ist oder für alle Proteine der Rab-Familie gilt, wurden exemplarisch Versuche mit Rab4, Rab5 und Rab11 durchgeführt.



**Abbildung 41:  $\gamma$ 2-Adaptin und Rab5, Rab5 bzw. Rab11**

HuH-7 Zellen wurden mit  $\gamma$ 2-HA bzw. einem Flag-Vektor und Rab4.wt, Rab4.dn, Rab5.wt, Rab5.dn, Rab11.wt bzw. Rab11.dn kotransfiziert und nach dreitägiger Expression in Triton-Lysepuffer lysiert. Die Analyse der Proben erfolgte über SDS-PAGE und Western Blot mit anti-JL8 gegen die Rab-Proteine und anti-HA gegen  $\gamma$ 2-HA. (A) Ergebnisse aus dem Western Blot, (B) quantitative Auswertung der Rab-Banden im Vergleich zur Kontrolle.



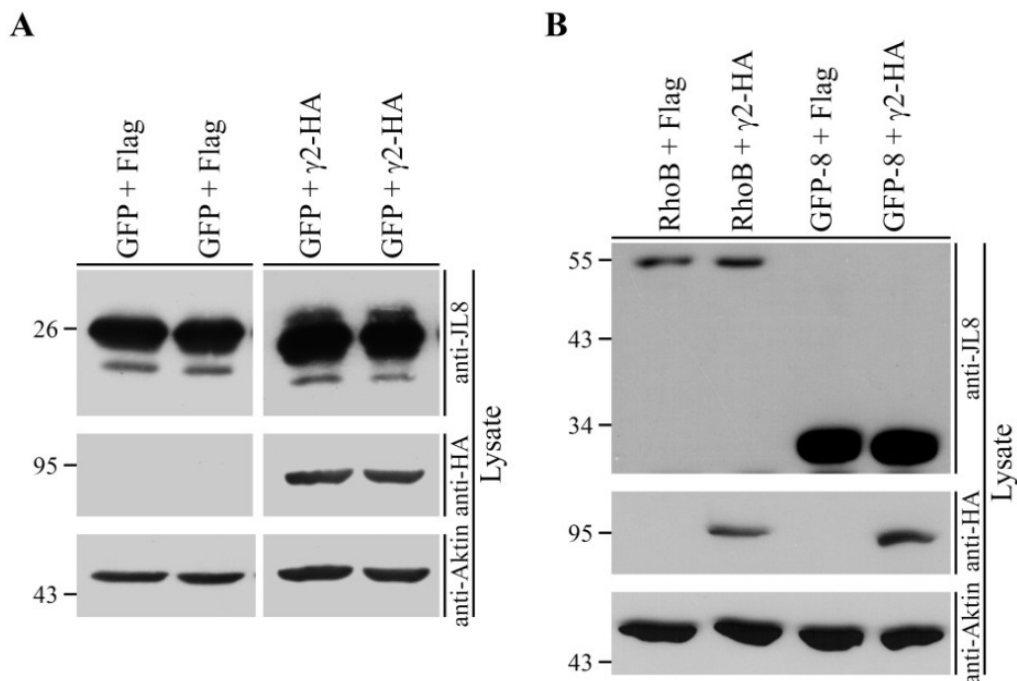
Rab4 und Rab5 sind an frühen Endosomen lokalisiert und Rab4 ist für *recycling*-Prozesse verantwortlich (van der Sluijs et al. 1992), während Rab5 die Fusion von frühen Endosomen und endozytierten Vesikeln katalysiert (Gorvel et al. 1991; Bucci et al. 1992). Rab11 ist an der Exozytose von endosomalen *recycling*-Vesikeln beteiligt (Casanova et al. 1999; Ren et al. 1998).

HuH-7 Zellen wurden mit GFP-markiertem Rab4, Rab5 bzw. Rab11, jeweils in wildtypischer und dominant-negativer Form, und  $\gamma$ 2-HA bzw. einem Flag-Vektor als Kontrolle kotransfiziert. Nach dreitägiger Expression wurden die Zellen lysiert und die Lysate im Western Blot analysiert. Die Rab-Proteine wurden dabei über anti-JL8 nachgewiesen und  $\gamma$ 2-HA über anti-HA. Abbildung 41 A zeigt die Ergebnisse aus dem Western Blot und B die quantitative Auswertung der Rab-Banden in Vergleich zur jeweiligen Kontrolle. Für Rab4, Rab5 und Rab11 konnte unabhängig von deren katalytischer Aktivität keine signifikante Reduktion durch überschüssiges  $\gamma$ 2-HA beobachtet werden. Somit scheint der reduzierende Effekt von überexprimiertem  $\gamma$ 2-Adaptin auf Rab7 spezifisch zu sein.

#### 4.8.2 $\gamma$ 2-Adaptin und GFP, RhoB bzw. GFP-8

Als weitere mögliche Substrate von  $\gamma$ 2-Adaptin wurden GFP, RhoB und GFP-8 getestet. GFP ist ubiquitär in der Zelle verteilt und ein Fremdkörper für diese. RhoB ist eine monomere GTPase, die am endozytotischen Vesikel-Transport beteiligt ist und gemeinsam mit den Signal-Kinasen und Wachstumsfaktorenrezeptoren, deren Transport sie katalysiert, lysosomal abgebaut wird (Pérez-Sala et al. 2009). GFP-8 ist ein künstliches Konstrukt aus GFP und der endo-lysosomalen Lokalisationssequenz aus RhoB.

HuH-7 Zellen wurden mit GFP, RhoB bzw. GFP-8 und  $\gamma$ 2-HA bzw. einem Flag-Vektor als Kontrolle kotransfiziert und nach dreitägiger Expression lysiert. Die Proben wurden im Western Blot mit anti-HA gegen  $\gamma$ 2-HA und anti-JL8 gegen GFP, RhoB und GFP-8 analysiert. Als Ladekontrolle wurde Aktin über anti-Aktin nachgewiesen. Das Ergebnis ist in Abbildung 42 dargestellt und zeigt weder für GFP (A) noch für RhoB und GFP-8 (B) eine Reduktion durch exogenes  $\gamma$ 2-HA. GFP, RhoB und GFP-8 sind somit keine Substrate von  $\gamma$ 2-Adaptin und bestätigen somit dessen Selektivität.



**Abbildung 42:  $\gamma$ 2-Adaptin und GFP, RhoB bzw. GFP-8**

HuH-7 Zellen wurden mit  $\gamma$ 2-HA bzw. Flag und GFP (A), RhoB bzw. GFP-8 (B) kotransfiziert und die Zellen nach dreitägiger Expression in Triton-Lysepuffer lysiert. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Anti-HA diente dem Nachweis von  $\gamma$ 2-HA und anti-JL8 dem Nachweis von GFP, RhoB und GFP-8. Als Ladekontrolle wurde Aktin über anti-Aktin nachgewiesen.

### 4.8.3 $\gamma$ 2-Adaptin und weitere potentielle Substrate

Um die Charakteristika der selektiven  $\gamma$ 2-Substrate näher einzugrenzen, wurde ein *screen* mit verschiedenen potentiellen Substraten durchgeführt. Hierfür wurden Proteine ausgewählt, die an verschiedenen Stellen in der Zelle lokalisiert sind und unterschiedliche Funktionen ausüben. Zudem wurden Proteine mit und ohne Verbindung zu Ubiquitin bzw. Ubiquitin-Ligasen untersucht sowie virale Proteine als Fremdkörper innerhalb der Zelle. Ein weiteres Kriterium war auch die Untersuchung von Proteinen in ihrer wildtypischen und dominant-negativen Form.

Ihre Ko-Expression gemeinsam mit  $\gamma$ 2 $\Delta$ 528-785,  $\gamma$ 2.Stop501 bzw. einem Flag-Vektor als Kontrolle erfolgte in HuH-7 Zellen. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Proben im Western Blot analysiert.  $\gamma$ 2-HA wurde über anti-HA nachgewiesen. Als Ladekontrolle diente Aktin. Die untersuchten Proteine sind mit ihrer Lokalisation, ihrer Verbindung zu Ubiquitin und dem zum Nachweis verwendeten Antikörper in Tabelle 16 aufgeführt. Die Ergebnisse des *screens* sind in Abbildung 43 gezeigt. Erneut konnte eine Selektivität der von exogenem  $\gamma$ 2-Adaptin beeinflussten Proteine gezeigt werden. Alle Proteine, die von

überexprimiertem  $\gamma 2\Delta 528-785$  reduziert werden, werden von  $\gamma 2$ .Stop501 nicht beeinflusst, was dessen Funktionsverlust durch das fehlende potentielle LIR-Motiv erneut bestätigt.

**Tabelle 16: Untersuchte potentielle  $\gamma 2$ -Substrate**

	Lokalisation	Verbindung zu Ub / Ub-Ligasen	Antikörper
<b>YFP-ER</b>	ER	-	anti-JL8
<b>YFP-Golgi</b>	Golgi	-	anti-JL8
<b>Eps15D3<math>\Delta</math>2</b>	Zytoplasma	+	anti-JL8
<b>Eps15D3</b>	Zytoplasma	+	anti-JL8
<b>Hsc70.wt</b>	Zytoplasma	+	anti-JL8
<b>Hsc70.dn</b>	Zytoplasma	+	anti-JL8
<b>Rab33.wt</b>	Zytoplasma	-	anti-JL8
<b>Rab33.dn</b>	Zytoplasma	-	anti-JL8
<b>HPV16 L1</b>	Zellkern *	+	anti-312F
<b>HPV16 L2</b>	Zellkern *	+	anti-L2-1
<b>Alix</b>	Zytoplasma	+	anti-HA
<b>Alix<math>\Delta</math>Bro</b>	Zytoplasma	+	anti-HA
<b>Alix<math>\Delta</math>V</b>	Zytoplasma	-	anti-HA
<b>GFP-NLS</b>	Zellkern	-	anti-JL8

\* bei starker Überexpression auch im Zytoplasma lokalisiert

Das YFP-ER-Fusionsprotein ist ein lösliches ER-Marker-Protein, welches in das Lumen des ER transloziert wird und im ER-Lumen verbleibt. YFP-Golgi ist ein in der Golgi-Membran verankertes Fusions-Protein. (Mades et al. 2012) Beide Proteine besitzen keine Verbindung zum Ubiquitin-Apparat. Sie werden durch  $\gamma 2\Delta 528-785$  nicht reduziert (Abbildung 43 A). Eps15D3 $\Delta$ 2 ist eine katalytisch aktive Mutante von Eps15, während Eps15D3 inaktiv ist (Spoden et al. 2008). Beide Proteine werden von  $\gamma 2\Delta 528-785$  reduziert, wobei die katalytisch inaktive Form Eps15D3 am stärksten reduziert wird (Abbildung 43 B). Eps15 ist ein Adapter-Protein, welches an der Endozytose, u.a. von EGF und Transferrin, beteiligt ist (Carbone et al. 1997). Eps15 trägt zwei UIMs und kann über eines der beiden ubiquitinierte Proteine binden (Regan-Klapisz et al. 2005).

Hsc70 spielt u.a. eine wichtige Rolle im degradativen System. Zusammen mit seinem Ko-Chaperon CHIP (*C-terminus of Hsc70-interacting protein*), einer Ubiquitin-Ligase, markiert es Proteine für den Ubiquitin-abhängigen Abbau im Proteasom. Gemeinsam mit Lamp2A vermittelt Hsc70 die Chaperon-abhängige Autophagie am Lysosom (Liu et al. 2012). Zudem wird Hsc70 auch eine Rolle bei der Mikroautophagie an späten Endosomen zugeschrieben. Hierbei werden zytoplasmatische Proteine durch Hsc70 an MVBs heran geführt und bei der ILV-Abschnürung ESCRT-abhängig in ILVs verpackt (Sahu et al. 2011).

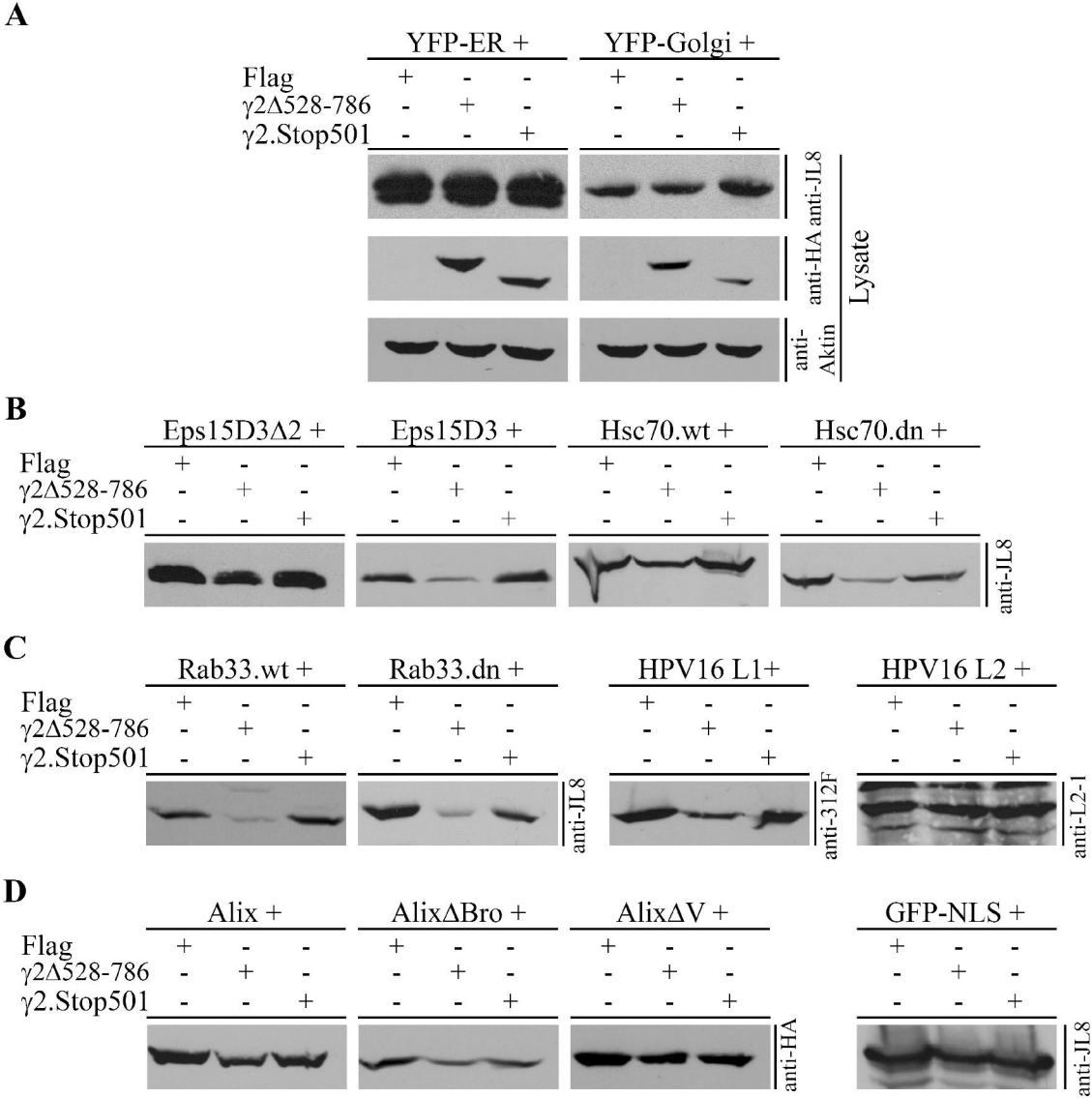
Hsc70.wt und Hsc70.dn wurden bei Ko-Expression von  $\gamma\Delta 528-785$  bzw.  $\gamma 2$ .Stop501 untersucht, wobei beide Proteine durch  $\gamma\Delta 528-785$  reduziert werden, nicht aber durch  $\gamma 2$ .Stop501. Die Reduktion von Hsc70.dn durch überexprimiertes  $\gamma\Delta 528-785$  fällt im Vergleich zu der von Hsc70.wt deutlich stärker aus (Abbildung 43 B).

Abbildung 43 C zeigt die Ergebnisse für Rab33.wt, Rab33.dn, HPV16 L1 und HPV16 L2. Rab33 wird in beiden Formen stark von  $\gamma\Delta 528-785$  reduziert. Rab33 gehört zur Familie der Rab-Proteine. Es ist an Golgi-Membranen lokalisiert und vermittelt den retrograden Transport zwischen Golgi und ER (Sandoval und Simmen 2012). Zudem interagiert Rab33 mit Atg16 und ist dadurch am Membrantransport für das Phagophor-Wachstum beteiligt (Itoh et al. 2008).

HPV16 L1 und L2 sind virale Hüllproteine mit einer nuklearen Lokalisations-Sequenz. Sie sind im Zellkern an PML-*bodies* lokalisiert und liegen nur bei starker Überexpression im Zytoplasma vor. (Florin et al. 2002) An PML-*bodies* werden eine Vielzahl von Proteinen modifiziert, z.B. durch Sumoylierung, Ubiquitinierung, Phosphorylierung oder Acetylierung (Lallemand-Breitenbach und Thé 2010). HPV16 L1 wird durch  $\gamma\Delta 528-785$  reduziert, HPV16 L2 hingegen nicht. Dies lässt sich damit erklären, dass die HPV16 L1 Expression sehr stark ist und damit vermutlich keine ausschließlich nukleare Lokalisation vorliegt, während HPV16 L2 nur äußerst schwach exprimiert ist (Abbildung 43 C zeigt sehr kurze Exposition für L1 und eine lange Belichtung für L2).

Alix ist ein zytoplasmatisches Adapter-Protein mit multiplen Funktionen, z.B. in der Biologie von Membranen, der Zytokinese und der ESCRT-abhängigen Freisetzung einiger umhüllter Viren. Alix stellt ein akzessorisches Protein der ESCRT-Kaskade dar und kann mit der ESCRT-I-Untereinheit Tsg101 und der ESCRT-III-Untereinheit Chmp4 interagieren. Die Bro1-Domäne in Alix vermittelt die Interaktion mit Chmp4. (Odorizzi 2006) Zudem besitzt Alix eine Ubiquitin-bindende V-Domäne. Die Alix-Mutante Alix $\Delta$ Bro besitzt diese V-Domäne noch, während sie Alix $\Delta$ V fehlt. Alix und Alix $\Delta$ Bro werden durch  $\gamma\Delta 528-785$  reduziert, während Alix $\Delta$ V unbeeinflusst bleibt. GFP-NLS ist im Zellkern lokalisiert, besitzt keine Verbindung zu Ubiquitin und wird durch Überexpression von  $\gamma\Delta 528-785$  nicht reduziert (Abbildung 43 D).

Die Ergebnisse aus dem *screen* und allen vorausgegangenen Versuchen deuten darauf hin, dass die selektiven  $\gamma 2$ -Substrate als charakteristische Merkmale eine zytoplasmatische Lokalisation und eine Verbindung zu Ubiquitin besitzen.



**Abbildung 43: Screen zu möglichen selektiven Substraten von  $\gamma 2$ -Adaptin**  
 HuH-7 Zellen wurden mit  $\gamma 2\Delta 528-785$ ,  $\gamma 2.Stop501$  bzw. einem Flag-Vektor als Kontrolle und YFP-ER, YFP-Golgi (A); Eps15D3 $\Delta 2$ , Eps15D3, Hsc70.wt, Hsc70.dn (B); Rab33.wt, Rab33.dn, HPV16 L1, HPV16 L2 (C); Alix, AlixBro, Alix $\Delta V$  bzw. GFP-NLS (D) kotransfiziert. Die Lyse erfolgte nach dreitägiger Expression in Triton-Lysepuffer. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot (anti-JL8, anti-HA, anti-312F, anti-L2-1 und anti-Aktin) analysiert.

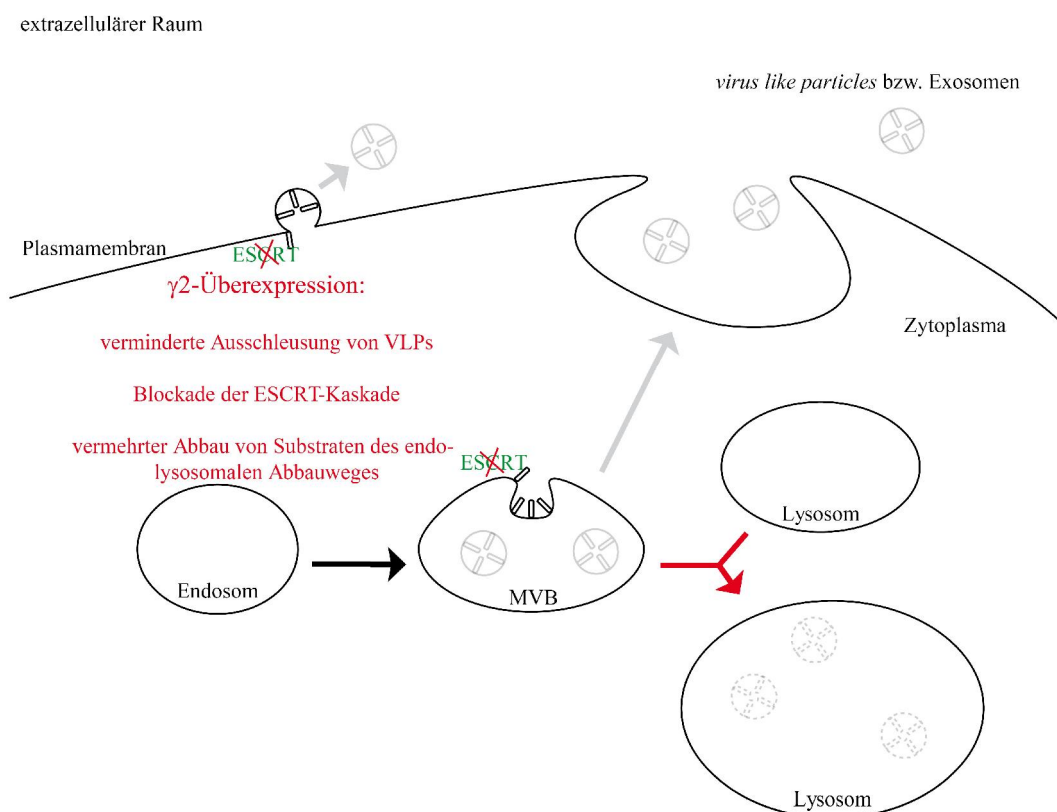
Tabelle 17: Zusammenfassung aller untersuchten „Substrate“ von  $\gamma$ 2-Adaptin

Zielprotein	Lokalisation							Verbindung zu Ubiquitin/ Ub-Ligasen	Art		$\gamma$ 2-Adaptin  Reduktion	
	Zytoplasma	Zellkern	Membran-assoziiert	Membran-ständig	ER	Golgi	Endosom/Lysosom		humane Proteine	Fremdkörper		
Alix	+							+	+	-	+	
Alix $\Delta$ Bro	+							+	+	-	+	
Alix $\Delta$ V	+							-	+	-	-	
Chmp2	+	+							+	-	-	
EGF							+		+	-	-	
EIAV.gag	+	+							-	+	++	
Eps15D3 (dn)	+							+	+	-	++	
Eps15D3 $\Delta$ 2	+							+	+	-	+	
GFP			ubiquitär						-	-	+	-
GFP-8	+	+					+	-	-	+	-	
GFP-NLS		+						-	-	+	-	
HIV.gag	+	+					+		-	+	++	
HPV16 L1	+	+							-	+	+	
HPV16 L2	+	+							-	+	-	
Hsc70.dn	+							+	+	-	++	
Hsc70.wt	+							+	+	-	+	
MLV.gag	+	+							-	+	++	
Nedd4	+	+						+	+	-	+	
Rab11.dn	+	+							+	-	-	
Rab11.wt	+	+							+	-	-	
Rab33.dn	+	+							+	-	+	
Rab33.wt	+	+							+	-	+	
Rab4.dn	+	+							+	-	-	
Rab4.wt	+	+							+	-	-	
Rab5.dn	+	+							+	-	-	
Rab5.wt	+	+							+	-	-	
Rab7.ca	+	+							+	-	-	
Rab7 $\Delta$ C	+								+	-	+	
Rab7.dn	+	+							+	-	++	
Rab7.wt	+	+							+	-	+	
RhoB	+						+	-	+	-	-	
Ub-HA			ubiquitär						+			++
Vps28	+	+							+	-	+	
YFP-ER						+		-		+	-	
YFP-Golgi				+		+		-		+	-	

## 5 Diskussion

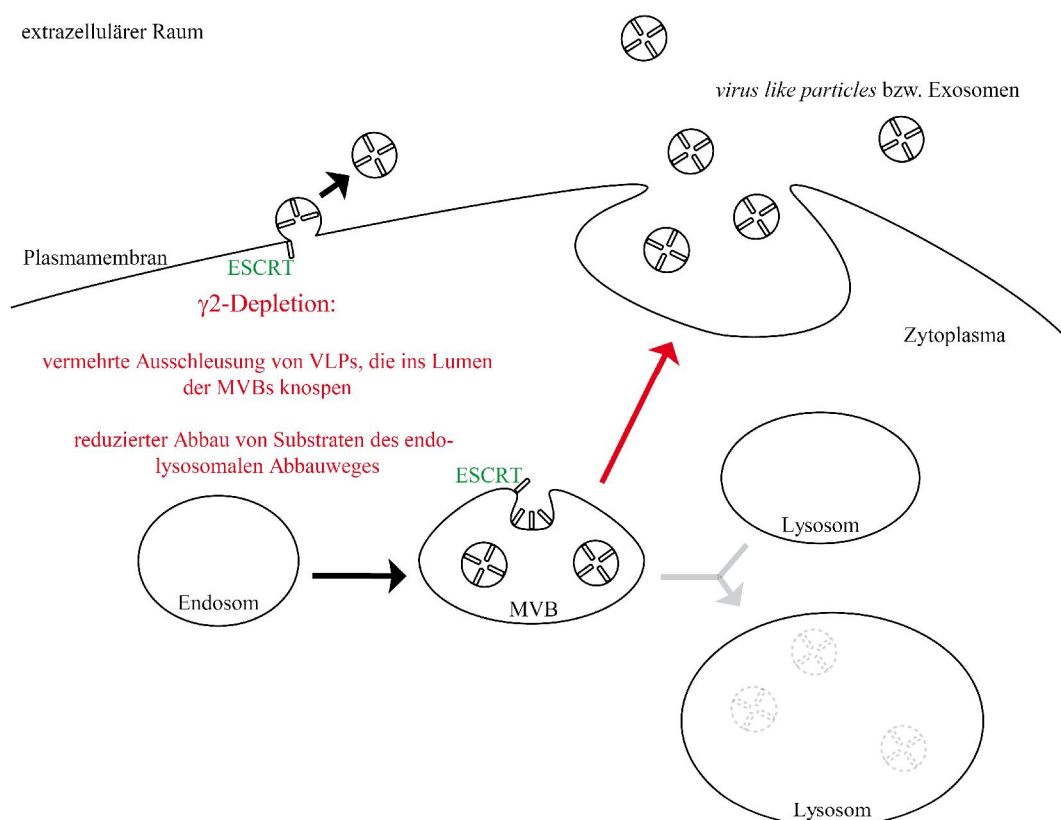
Ziel der Arbeit war es die, physiologische Funktion von  $\gamma 2$ -Adaptin zu charakterisieren. Die Ergebnisse dieser und vorausgegangener Arbeiten deuten auf eine Rolle von  $\gamma 2$ -Adaptin im degradativen Transportsystem der Zelle hin.

$\gamma 2$ -Adaptin ist an späten Endosomen bzw. MVBs lokalisiert (Rost et al. 2006; Hartmann-Stühler und Prange 2001). Änderungen in der zellulären  $\gamma 2$ -Konzentration führen zu Umgestaltungen der MVB-Morphologie (Lambert et al. 2007; Rost et al. 2008). Diese veränderten MVBs sind ähnlich zu den Kompartimenten der Klasse E, die bei der Inhibition der ESCRT-Kaskade, die die Abschnürung von ILVs in das Lumen der MVBs hinein katalysiert, entstehen (Bishop und Woodman 2000). Gemeinsam mit dem Befund, dass Änderungen in der Konzentration von  $\gamma 2$ -Adaptin eine Auswirkung auf endogene und exogene Substrate des endo-lysosomalen Proteintransports haben, lässt dies eine regulatorische Rolle von  $\gamma 2$ -Adaptin in diesem zellulären Transportsystem vermuten.



**Abbildung 44: Schematische Darstellung des Effekts von überschüssigem  $\gamma 2$ -Adaptin in der Zelle**  
Die Überexpression von  $\gamma 2$ -Adaptin führt zur verminderten Freisetzung von VLPs, was sich mit der Blockade der ESCRT-Kaskade durch exogenes  $\gamma 2$ -Adaptin erklären lässt. Gleichzeitig führt die  $\gamma 2$ -Überexpression zum vermehrten Abbau von endogenen und exogenen Substraten des endo-lysosomalen Transportsystems.

Endogene Substrate wie z.B. EGF und ubiquitinierte Proteine werden bei  $\gamma 2$ -Überexpression vermehrt und bei  $\gamma 2$ -Depletion weniger stark lysosomal abgebaut (Rost et al. 2008). Exogene Substrate des endo-lysosomalen Proteintransports sind u.a. HBV und einige retrovirale Gag-Polyproteine, die in ihrer Freisetzung durch überschüssiges  $\gamma 2$ -Adaptin blockiert werden (Lambert et al. 2007; Döring et al. 2010) und deren intrazelluläre Konzentration durch ihren vermehrten lysosomalen Abbau reduziert wird. Der verstärkte lysosomale Abbau von Gag-Polyproteinen bei  $\gamma 2$ -Überexpression erfolgt nur, wenn diese fähig sind in das Lumen der MVBs hinein zu knospen (z.B. HIV und MLV in HuH-7 Zellen), um dann durch Fusion der MVBs mit der Plasmamembran freigesetzt zu werden. EIAV.gag knospt in HuH-7 Zellen an der Plasmamembran und wird durch überschüssiges  $\gamma 2$ -Adaptin auch in seiner Freisetzung blockiert. Die intrazellulären EIAV.Gag-Proteine werden hier jedoch in Detegenz-unlösliche Strukturen sequestriert und nicht abgebaut. (Döring et al. 2010) Bei  $\gamma 2$ -Depletion kommt es zur vermehrten Ausschleusung von retroviralen VLPs. Die Wirkung der Depletion und Überexpression von  $\gamma 2$ -Adaptin ist in Abbildung 44 Abbildung 45 schematisch dargestellt.



**Abbildung 45: Schematische Darstellung des Effekts von depletiertem  $\gamma 2$ -Adaptin in der Zelle**  
Die Depletion von  $\gamma 2$ -Adaptin hat keine Auswirkungen auf die ESCRT-Kaskade und beeinflusst daher auch nicht die ESCRT-abhängige Knospung von VLPs an der Plasmamembran. Es kommt vielmehr zu einem verminderten Abbau von endogenen und exogenen Substraten des endo-lysosomalen Transportsystems, womit eine vermehrte Freisetzung von VLPs, die in das Lumen der MVBs hinein knospen, und wahrscheinlich von Exosomen ermöglicht ist.



Die ESCRT-Kaskade katalysiert die ILV-Abschnürung an MVBs. Retroviren können an der Plasmamembran oder in das Lumen der MVBs hinein knospen. Dafür rekrutieren sie die ESCRT-Kaskade über sog. *late*-Domänen. Dabei katalysiert die ESCRT-Kaskade die Abschnürung weg vom Zytoplasma. Das retrovirale EIAV.gag knospt ESCRT-abhängig an der Plasmamembran. Bei Überexpression von  $\gamma$ 2-Adaptin ist diese VLP-Abschnürung blockiert (Döring et al. 2010). Dies deutet darauf hin, dass  $\gamma$ 2-Adaptin an der Plasmamembran, und wahrscheinlich auch an den MVBs, als negativer Regulator der ESCRT-Kaskade wirkt. Zugang erhält  $\gamma$ 2-Adaptin hierbei über seine Interaktionspartner Nedd4 (Rost et al. 2008), ein ESCRT-akzessorisches Protein, und Vps28 bzw. Chmp2A, zwei Komponenten der ESCRT-Kaskade (Döring et al. 2010).

Die genauen Interaktionsmodule für Vps28 und Chmp2A sind in  $\gamma$ 2-Adaptin noch nicht identifiziert. Jedoch können das UIM und die PH-Domäne ausgeschlossen werden. Ihre Mutation führt zwar zu funktionellen Einschränkungen von  $\gamma$ 2-Adaptin, jedoch findet eine Interaktion dieser Mutanten mit Vps28 und Chmp2A noch statt. Der genaue Regulationsmechanismus der ESCRT-Kaskade durch  $\gamma$ 2-Adaptin bleibt jedoch noch unklar. Naheliegend ist, dass überschüssiges  $\gamma$ 2-Adaptin seine ESCRT-assoziierten Interaktionspartner bindet und diese dadurch „inaktiviert“. Jedoch konnte eine solche Konkurrenz bisher nicht gezeigt werden, da die Ko-Expression der einzelnen Interaktionspartner mit  $\gamma$ 2-Adaptin dessen reduzierende Wirkung auf MLV.gag nicht relativieren kann.

Defekte in der ESCRT-Kaskade und ihre Dysregulation sind mit verschiedenen Krebsarten und neurodegenerativen Krankheiten assoziiert. Die Entstehung von Krebs ist dabei auf eine Störung in der Regulation von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, wie z.B. EGFR, zurückzuführen, welche u.a. die Proliferation und Differenzierung von Zellen steuern (Saksena und Emr 2009). In neurodegenerativen Krankheiten, wie z.B. der Alzheimerschen oder Parkinsonschen Erkrankung, führt die Störung der ESCRT-Kaskade zu einem verminderten Protein-Abbau, wodurch die Bildung von Aggregaten begünstigt wird (Saksena und Emr 2009). Hierbei wird davon ausgegangen, dass eine defekte ESCRT-Kaskade zusätzlich auch den Abbau der Protein-Aggregate durch Autophagie blockiert (Manil-Segalén et al. 2012). Die genaue Regulation der ESCRT-Kaskade ist daher von großer Bedeutung und erfolgt auf mehreren Ebenen. Eine wichtige Rolle spielt dabei die Ubiquitinierung und De-Ubiquitinierung von Substrat-Molekülen, aber auch von einigen Komponenten der ESCRT-Kaskade (Wright et al. 2011; Eden et al. 2012). Die Regulation der ESCRT-Kaskade erfolgt über akzessorische Proteine der ESCRT-Kaskade. Neben Ubiquitin-Ligasen und de-ubiquitinierenden Enzymen (DUBs) handelt es sich hierbei um Proteine, die die

Assoziation und Dissoziation der ESCRT-Kaskade steuern, z.B. über die Regulation der Vps4-Aktivität, (Roxrud et al. 2010). Ein negativer Regulator der ESCRT-Kaskade ist z.B. SCAMP3 (*secretory carrier membrane protein 3*), welches mit den Substraten der ESCRT-Kaskade um die Bindung an ESCRT-0 und -I konkurriert (Aoh et al. 2009; Roxrud et al. 2010). Eine vergleichbare Wirkung könnte  $\gamma$ 2-Adaptin als negativer Regulator der ESCRT-Kaskade ausüben.

Die Wirkung von überschüssigem  $\gamma$ 2-Adaptin ist spezifisch für den endo-lysosomalen Proteintransport, da z.B. Transferrin in seiner Aufnahme und seinem Transport von  $\gamma$ 2-Adaptin nicht beeinflusst wird (Döring et al. 2010). EGFR und TR (Transferrin-Rezeptor) werden beide nach der Bindung ihrer Liganden von der Plasmamembran internalisiert und zu frühen Endosomen transportiert. An den Endosomen trennen sich die Transportrouten der beiden transmembranen Rezeptoren: während EGFR in ILVs verpackt und später im Lysosom abgebaut wird (Huotari und Helenius 2011), wird TR inaktiviert und an die Plasmamembran zurückgeführt (Mayle et al. 2012). Als Transportsignal für den lysosomalen Abbau von EGFR dient dessen Modifikation mit Ubiquitin. Eine artifizielle Ubiquitinierung vom TR verhindert seine Rückführung an die Plasmamembran und führt zu seinem lysosomalen Abbau (Raiborg et al. 2002).

Als Ubiquitin-Adapter für EGFR ist u.a. Hrs, eine Untereinheit von ESCRT-0, beschrieben. Die Depletion von Hrs inhibiert den EGFR-Abbau (Bache et al. 2003b) und führt zu einer stark verminderten Anzahl an MVBs, einer verminderten Membran-Assoziation von ESCRT-I und vergrößerten endosomalen Strukturen (Bache et al. 2003a). Die Expression dominant-negativer Hrs-Mutanten führt zur Inhibition der ILV-Abschnürung und des EGFR-Abbaus (Lloyd et al. 2002). Neben der Sortierung ubiquitiniertes Transmembran-Proteine für den lysosomalen Abbau, bindet Hrs auch K63-ubiquitinierte, zytosolische Proteine und dient somit gemeinsam mit STAM auch der Sortierung löslicher Proteine, die für den Abbau im Lysosom und nicht im Proteasom bestimmt sind (Nathan et al. 2013).

Auch  $\gamma$ 2-Adaptin besitzt charakteristische Merkmale eines Ubiquitin-Adapters: es kann Ubiquitin über sein UIM binden (Rost et al. 2006) und interagiert mit der Ubiquitin-Ligase Nedd4, durch die es selbst ubiquitiniert werden kann (Rost et al. 2008). Diese gekoppelte Modifikation mit Ubiquitin ist typisch für Ubiquitin-Adapter (Hoeller et al. 2006).  $\gamma$ 2-Adaptin könnte somit auch eine Adapter-Funktion für ubiquitinierte Fracht-Moleküle im endo-lysosomalen System zugeschrieben werden. Die Bedeutung der Bindung von Ubiquitin

an  $\gamma 2$ -Adaptin für seine Funktion ist jedenfalls nicht von der Hand zu weisen. Die UIM-Deletionsmutante von  $\gamma 2$ -Adaptin ist funktionell eingeschränkt, wenn man ihre Wirkung auf MLV.gag und Rab7.dn im Vergleich zum Wildtyp betrachtet. Die Bindung von Ubiquitin scheint damit für die Funktion von  $\gamma 2$ -Adaptin notwendig zu sein. Dabei ist nicht auszuschließen, dass  $\gamma 2$ -Adaptin neben seinem UIM noch andere UBDs besitzen könnte. PH-Domänen besitzen u.a. Ubiquitin-bindende Eigenschaften, wie z.B. die GLUE-Domäne in EAP45 (Slagsvold et al. 2005). Möglicherweise führt die Deletion des UIM nur zu einer funktionellen Einschränkung und zu keinem vollständigen Funktionsverlust, da  $\gamma 2$ -Adaptin über seine PH-Domäne und mögliche andere Sequenzmotive noch Ubiquitin binden kann. Die Bedeutung von Ubiquitin für die Funktionsweise von  $\gamma 2$ -Adaptin wird auch dadurch hervorgehoben, dass bisher alle identifizierten potentiellen  $\gamma 2$ -Substrate eine Verbindung zum Ubiquitin-Apparat aufweisen. Für  $\gamma 2$ -Adaptin ist eine Rolle als Ubiquitin-Adapter im endo-lysosomalen Transportsystem vergleichbar zu der von Hrs denkbar, wobei  $\gamma 2$ -Adaptin zusätzlich regulatorische Funktionen zu besitzen scheint.

Ein weiterer bekannter Ubiquitin-Adapter im endo-lysosomalen System ist GGA3 (*golgi-associated,  $\gamma$ -Adaptin homologue, Arf-binding*). GGAs sind monomere Ubiquitin- und Clathrin-bindende Adapter, die den Transport transmembraner, monoubiquitiniertes Proteine vom TGN zum Endosom (GGA1, GGA2) bzw. in das Lumen der MVBs hinein (GGA3) vermitteln (Babst 2004; Pelham 2004).

Für GGA3 wird eine mit Hrs vergleichbare Funktion vermutet, da es ebenfalls mit Tsg101 interagiert (Puertollano und Bonifacino 2004). Sowohl die Depletion als auch die Überexpression von GGA3 führt, ähnlich wie die von  $\gamma 2$ -Adaptin, zu vergrößerten endosomalen Strukturen. Jedoch entsprechen diese bei Überexpression von GGA3 nicht den Kompartimenten der Klasse E. Die Depletion von GGA3 führt, ähnlich wie die von  $\gamma 2$ -Adaptin, zu einer Akkumulation von EGF. Sie hat jedoch weitreichendere Folgen auf den endosomalen Proteintransport als die Depletion von  $\gamma 2$ -Adaptin, da bei GGA3-Depletion auch der Transferrin-Transport beeinträchtigt ist. (Puertollano und Bonifacino 2004) Auch die Überexpression von GGA3 zeigt einen zu  $\gamma 2$ -Adaptin vergleichbaren inhibitorischen Effekt auf die retrovirale VLP-Freisetzung. Jedoch ist dieser im Gegensatz zu dem von  $\gamma 2$ -Adaptin durch die Überexpression von Ubiquitin relativierbar und beruht auf einer Störung der Arf-Funktion und damit auf einer falschen Lokalisation der retroviralen Gag-Polyproteine. (Joshi et al. 2009)

$\gamma$ 2-Adaptin kann sowohl zytosolisch, als auch Membran-gebunden vorliegen, jedoch ist der Mechanismus der Membranrekrutierung noch unverstanden. Im Gegensatz zu  $\gamma$ 1-Adaptin und GGA3 erfolgt die Membranbindung jedoch unabhängig von Arf1 (Takatsu et al. 1998). Neue Hinweise auf den Mechanismus der Membranassoziation von  $\gamma$ 2-Adaptin konnten in dieser Arbeit nicht gefunden werden, da die subzelluläre Verteilung von  $\gamma$ 2-Adaptin unabhängig von seiner PH-Domäne und seinem LIR-Motiv ist.

Überschüssiges  $\gamma$ 2-Adaptin führt zum vermehrten Abbau von endogenen und exogenen Substraten des endo-lysosomalen Proteintransports. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen könnte eine Rolle von  $\gamma$ 2-Adaptin bei der Fusion der MVBs mit den Lysosomen liefern. Rab7 ist an diesem Fusionsprozess beteiligt (Vonderheit und Helenius 2005) und zeigt bei Überexpression bzw. Depletion eine, mit der von  $\gamma$ 2-Adaptin vergleichbare Wirkung auf die intra- und extrazelluläre MLV.gag-Konzentration.

Für die Fusion der MVBs mit den Lysosomen sind die ESCRT-, HOPS- (*homotypic fusion and vacuole protein sorting*) und SNARE-Komplexe (*synaptosome-associated protein receptor*) essentiell (Luzio et al. 2010). Neben der ILV-Abschnürung sind einige ESCRT-Komponenten (z.B. Chmp2B, Chmp3 und Chmp5) auch an der MVB-Lysosom-Fusion beteiligt (Metcalf und Isaacs 2010). Dies wurde in Drosophila- und Säugerzellen, nicht jedoch in der Hefe, beobachtet.  $\gamma$ 2-Adaptin, welches in der Hefe nicht vorkommt, interagiert mit Vps28 und Chmp2A, zwei Komponenten der ESCRT-Kaskade, und erhält so Zugang zu dieser. Auch auf den HOPS- und SNARE- Komplex könnte  $\gamma$ 2-Adaptin indirekt Einfluss nehmen, da es mit Rab7 interagiert.

Der HOPS-Komplex ist ein Rab7-Effektor (Price et al. 2000), der gleichzeitig auch als Rab7-GEF fungiert (Wurmser et al. 2000). Als GEF verstärkt HOPS das Rab7-Signal, während es als Rab7-Effektor die Membranfusion über die Interaktion mit t-SNAREs (*target-SNARE*) katalysiert (Price et al. 2000).

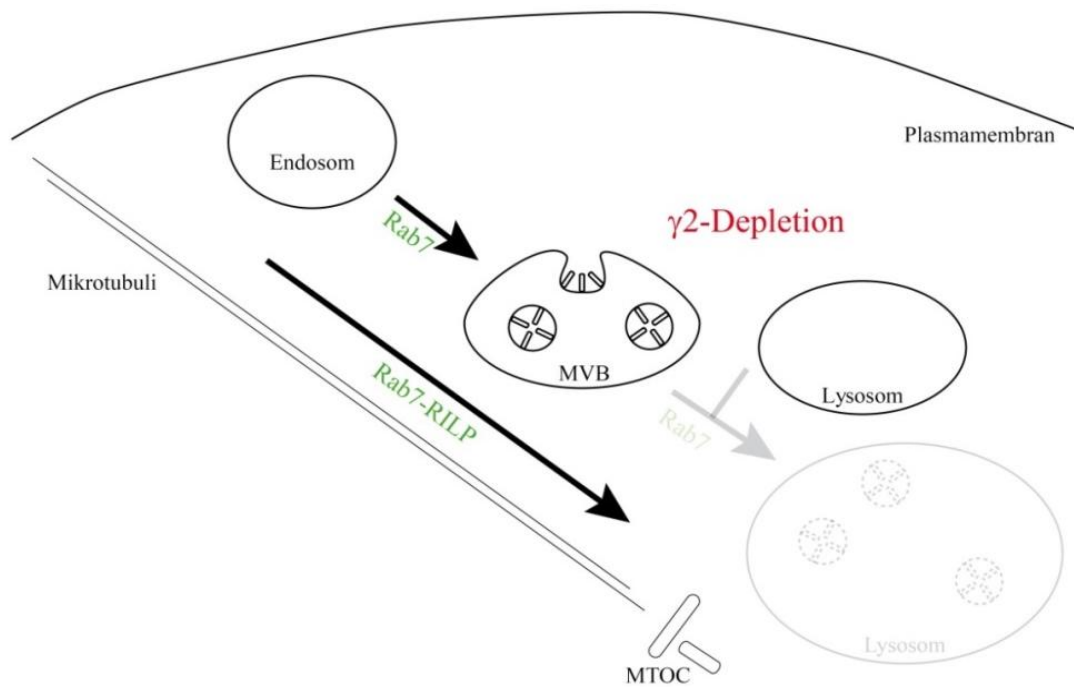
Die MVB-Lysosom-Fusion wird auf Seiten von Rab7 durch Rubicon reguliert. Rubicon ist ein negativer Regulator von Rab7 und hemmt die Reifung der Endosomen. Rubicon sequestriert UVRAG (*UV radiation resistance-associated gene*), einen Aktivator von HOPS. Aktives Rab7 konkurriert mit UVRAG um die Bindung an Rubicon und führt so zur Freisetzung von UVRAG und damit indirekt zu seiner eigenen Aktivierung. (Sun et al. 2010). In diesem Zusammenhang wäre eine Rolle von  $\gamma$ 2-Adaptin als Gegenspieler von Rubicon, also als positiver Regulator von Rab7 denkbar. Dem widerspricht jedoch die

Beobachtung, dass  $\gamma$ 2-Adaptin mit Rab7 unabhängig von dessen katalytischer Aktivität interagiert und damit kein „klassischer“ Spieler im Rab7-Zyklus zu sein scheint. Dennoch ist eine regulatorische Funktion von  $\gamma$ 2-Adaptin nicht auszuschließen, da der reduzierende Effekt von überschüssigem  $\gamma$ 2-Adaptin auf Rab7 abhängig von dessen GTP/GDP-Status ist. Dies lässt sich damit erklären, dass  $\gamma$ 2-Adaptin im Falle von Rab7.dn nicht mit Rab7-Effektoren um die Interaktion mit Rab7 konkurrieren muss und diese Konkurrenz bei Rab7.ca im Vergleich zu Rab7.wt noch verstärkt ist, da Effektoren nur mit GTP-gebundenem Rab7 interagieren können (Stenmark und Olkkonen 2001). Diese Erklärung beruht auf der Annahme, dass die Mutation in Rab7.dn nur zu einer katalytischen Inaktivierung und zu keiner falschen Faltung des Proteins führt (Vonderheit und Helenius 2005). Bei einem Faltungsdefekt könnte  $\gamma$ 2-Adaptin auch eine Chaperonfunktion übernehmen und darüber den lysosomalen Abbau steuern. Eine mögliche Chaperonfunktion von  $\gamma$ 2-Adaptin könnte auch erklären, warum dominant-negative Mutanten von überexprimiertem  $\gamma$ 2-Adaptin stets am stärksten reduziert werden. Hier bleibt aber die Spezifität der Substrat-Erkennung von  $\gamma$ 2-Adaptin noch unklar.

Die Annahme, dass  $\gamma$ 2-Adaptin die Funktion von Rab7 positiv regulieren könnte, wird auch dadurch gestützt, dass  $\gamma$ 2-Adaptin über seine PH-Domäne mit Rab7 interagiert.

PH-Domänen dienen häufig als Interaktionsmodule für monomere GTPasen (z.B. der Rho- und Rac-Proteinfamilie) und die entsprechenden Proteine erfüllen dabei in der Regel regulatorische Funktionen (z.B. GEF-Funktion) (Rebecchi und Scarlata 1998).

Als positiver Regulator von Rab7 müsste  $\gamma$ 2-Adaptin diesem funktionell nachgeschaltet sein. Bei Depletion von  $\gamma$ 2-Adaptin reduziert exogenes Rab7 die Freisetzung der VLPs, kann jedoch die Steigerung der intrazellulären MLV.gag-Menge durch depletiertes  $\gamma$ 2-Adaptin nicht relativieren. Exogenes Rab7 kann somit die Fusion der MVBs mit der Plasmamembran verhindern, aber gleichzeitig verhindert die Depletion von  $\gamma$ 2-Adaptin einen vermehrten lysosomalen Abbau. Die Inhibition der Fusion der MVBs mit der Plasmamembran lässt sich über RILP, einen Rab7-Effektor, erklären, welcher mit dem Dynein-Dynaktin-Komplex interagiert und den Transport von späten Endosomen von der Zellperipherie hin zur perinuklearen Region vermittelt (Jordens et al. 2001). Die Inhibition des lysosomalen Abbaus bei Verlust von  $\gamma$ 2-Adaptin trotz exogenem Rab7 deutet darauf hin, dass  $\gamma$ 2-Adaptin Rab7 tatsächlich funktionell übergeordnet ist und sein Fehlen die HOPS-abhängige Fusion der MVBs mit den Lysosomen verhindert, während der zum MTOC gerichtete Transport über RILP noch stattfinden kann.



**Abbildung 46:  $\gamma$ 2-Adaptin ist Rab7 funktionell nachgeschaltet**

Bei  $\gamma$ 2-Depletion katalysiert Rab7 den Transport später Endosomen entlang der Mikrotubuli über RILP, kann jedoch die Fusion mit den Lysosomen nicht mehr steuern.

Neben der Fusion der vollständigen Zellorganellen, könnte der vermehrte Abbau bei  $\gamma$ 2-Überexpression auch auf einem gesteigerten vesikulären Transport zwischen den MVBs und den Lysosomen beruhen. Ein solcher Transport wäre vergleichbar mit der durch AP-Komplexe vermittelten Vesikelabschnürung und der anschließenden Fusion mit dem jeweiligen Zielorganell (Ohno 2006).

$\gamma$ 2-Adaptin gilt als Mitglied der Clathrin-Adapter-Proteinfamilie, weshalb eine zu den AP-Komplexen vergleichbare Funktion nicht ausgeschlossen werden kann. Bei den Substraten der AP-Komplexe handelt es sich ausschließlich um Transmembran-Proteine, während zu den angenommenen  $\gamma$ 2-Substraten auch zytoplasmatische Proteine zählen.

Eine vesikuläre Transportroute zwischen späten Endosomen und Lysosom ist in der Literatur für den AP3-Komplex beschrieben (Odorizzi et al. 1998). Jedoch scheint AP-3 auch an der Ubiquitin-unabhängigen und Alix-abhängigen Verpackung von Substraten in ILVs beteiligt zu sein (Dores et al. 2012). Eine zu AP-3 vergleichbare, jedoch Ubiquitin-abhängige Funktion von  $\gamma$ 2-Adaptin im vesikulären Transport zwischen MVB und Lysosom kann nicht ausgeschlossen werden, wurde jedoch nicht weiter untersucht. Eine solche vesikuläre Transportroute von für den Abbau bestimmten Substraten zwischen MVBs und Lysosomen wird in der Literatur jedoch auch als unwahrscheinlich diskutiert (Luzio et al. 2000).

Alternativ könnte  $\gamma 2$ -Adaptin auch eine Schalter-Funktion zwischen der Fusion der MVBs mit der Plasmamembran zur Freisetzung von Exosomen und der Fusion mit den Lysosomen wahrnehmen. Hinweise für eine Rolle von  $\gamma 2$ -Adaptin als Schalter zwischen MVBs und Lysosomen liefert eine 2009 von Rüder *et al.* beschriebene Interaktion mit EBAG9 (*estrogen receptor-binding fragment-associated antigen 9*). Der Ansatz zur Untersuchung einer möglichen Schalter-Funktion von  $\gamma 2$ -Adaptin zwischen lysosomalen Abbau und Exosomen-Freisetzung lieferte bisher keine eindeutigen Erkenntnisse.

Das Protein EBAG9 wird ubiquitär, aber bevorzugt in Östrogen-abhängigen Tumoren, exprimiert und katalysiert die Freisetzung sog. lytischer Granula durch Fusion Lysosomen-verwandter Kompartimente mit der Plasmamembran. Diese Freisetzung tritt in EBAG9-*knockout*-Mäusen verstärkt auf, weshalb EBAG9 als negativer Modulator der Morphogenese bzw. der Fusion dieser Lysosomen-verwandten Kompartimente mit der Plasmamembran bezeichnet wird.  $\gamma 2$ -Adaptin und EBAG9 wurden als Gegenspieler klassifiziert, wobei  $\gamma 2$ -Adaptin die Freisetzung der lytischen Granula begünstigen sollte. (Rüder et al. 2009) Die Ergebnisse dieser und vorausgegangener Arbeiten deuten jedoch vielmehr darauf hin, dass  $\gamma 2$ -Adaptin die Fusion der MVBs mit den Lysosomen begünstigen würde.

Der  $\gamma 2$ -abhängigen Abbau von Rab7 und Vps28 widerspricht einer Rolle von  $\gamma 2$ -Adaptin bei der Fusion der MVBs mit den Lysosomen bzw. im vesikulären Transport von den MVBs zu den Lysosomen. Rab7 und Vps28 sind an der Außenseite der MVBs lokalisiert und können bei MVB-Lysosomen-Fusion nicht in das Lumen der Lysosomen gelangen, um dort abgebaut zu werden. Zudem liefert die MVB-Lysosomen-Fusion nur dann eine plausible Erklärung für den vermehrten lysosomalen Abbau bei  $\gamma 2$ -Überexpression, wenn die ILV-Abschnürung dabei nicht beeinträchtigt ist. EIAV.gag schnürt seine VLPs ESCRT-abhängig an der Plasmamembran ab. Diese Freisetzung wird durch überschüssiges  $\gamma 2$ -Adaptin blockiert und EIAV.gag in Detergenz-unlöslichen Aggregaten sequestriert. Die Depletion von  $\gamma 2$ -Adaptin hat hingegen keinen Einfluss auf die EIAV.gag-Morphogenese. (Döring et al. 2010)

An der Plasmamembran wird die ESCRT-abhängige VLP-Abschnürung somit durch überschüssiges  $\gamma 2$ -Adaptin gehemmt. Ob überexprimiertes  $\gamma 2$ -Adaptin auch an den MVBs als negativer Regulator der ESCRT-Kaskade wirkt, ist noch nicht abschließend geklärt. Jedoch führen Änderungen in der  $\gamma 2$ -Konzentration zu veränderten endosomalen Strukturen, die den Kompartimenten der Klasse E entsprechen (Lambert et al. 2007; Rost et al. 2008).

Kompartimente der Klasse E wurden ursprünglich 1992 in der Hefe als prä-Vakuolen-ähnliche Zellorganellen beschrieben (Raymond et al. 1992). Sie entstehen durch Defekte in der MVB-Morphogenese. In Säugerzellen führt z.B. die Depletion von Tsg101 zu vergrößerten endosomalen Strukturen, die sich über eine mehrfache Zisternenbildung auszeichnen (Doyotte et al. 2005). Diese Zisternen entstehen durch Invagination an der MVB-Membran ohne ILV-Abschnürung. Hierdurch kommt es zu multiplen Sortierungsdefekten und damit zu einer verlängerten Signalwirkung und Halbwertszeit von EGFR. Die für den lysosomalen Abbau bestimmten Substrate akkumulieren an den Kompartimenten der Klasse E und werden nicht abgebaut (Emily M. Coonrod and Tom H. Stevens, 2010). Die Entstehung der Kompartimente der Klasse E beruht auf der Inhibition der ESCRT-Kaskade und kann durch artifizielle Aktivierung von ESCRT relativiert werden (Russell et al. 2012). Zusätzlich beruht der Mechanismus der Klasse E-Morphogenese auf Defekten in der Rab5/Rab7-Konversion, die die Reifung endosomaler Strukturen steuert (Russell et al. 2012). Rab5 und sein Effektor CORVET (*class C core vacuole/endosome tethering*), die die Fusion früher endosomaler Strukturen steuern (Solinger und Spang 2013), akkumulieren an Kompartimenten der Klasse E. Auch kommt es zur Akkumulation von Rab7, jedoch nicht von seinem für die Fusion mit den Lysosomen notwendigen Effektor HOPS. Die Blockade der Rab5/Rab7-Konversion an endosomalen Strukturen führt zu ähnlichen Kompartimenten wie denen der Klasse E, jedoch kommt es an diesen zur Abschnürung von ILVs, allerdings nicht zur Fusion mit den Lysosomen (Russell et al. 2012). Über den Abbau von Kompartimenten der Klasse E, die keine Kompetenz für die Fusion mit den Lysosomen besitzen, sind in der Literatur bislang keine Hinweise zu finden.

Die Überexpression von  $\gamma$ 2-Adaptin führt zu vergrößerten späten endosomalen Strukturen, die den Kompartimenten der Klasse E entsprechen (Lambert et al. 2007; Rost et al. 2008). Die Versuche mit EIAV.gag an der Plasmamembran lassen vermuten, dass es auch an den endosomalen Strukturen zur Blockade der ILV-Abschnürung durch überexprimiertes  $\gamma$ 2-Adaptin kommt, was es jedoch noch zu überprüfen gilt. Überschüssiges  $\gamma$ 2-Adaptin induziert gleichzeitig den vermehrten Abbau von Substraten des endo-lysosomalen Systems. Dieser Befund scheint dem charakteristischen Bild von Kompartimenten der Klasse E zu widersprechen, da es an ihnen zur Akkumulation von Substraten kommt (Emily M. Coonrod and Tom H. Stevens 2010). Bei Blockade der Abschnürung der ILVs verbleiben die Substrate an der Oberfläche der MVBs und könnten selbst bei Fusion mit den Lysosomen nicht in deren Lumen gelangen. Dieses topologische Problem und die Fusions-Inkompetenz der Kompartimente der Klasse E mit Lysosomen führt zu der Frage, wie die Substrate, die



bei Blockade der ILV-Abschnürung durch überschüssiges  $\gamma 2$ -Adaptin vermutlich auf der Oberfläche verbleiben, dennoch in das Lumen der Lysosomen gelangen und dort abgebaut werden können. Eine mögliche Erklärung liefert der Abbau der defekten MVBs durch Autophagie, wobei  $\gamma 2$ -Adaptin als Autophagie-Adapter wirken könnte.

Autophagie ist ein zellulärer Prozess, bei dem zytoplasmatische Komponenten lysosomal abgebaut werden. Hierbei werden Teile des Zytoplasmas, u.a. Proteinaggregate und Zellorganellen, von einer Membran, dem Phagophor, umschlossen. Die dadurch entstehenden, von einer doppelten Membran umhüllten Vesikel bezeichnet man als Autophagosomen. Sie fusionieren mit Lysosomen und setzen ihren Inhalt so dem hydrolytischen Abbau aus. Die Degradation von Zellorganellen durch Autophagie ist für Mitochondrien, Peroxisomen und Teile des ER beschrieben. Für den Abbau endosomaler Strukturen ist in der Literatur bisher keine Information zu finden. Der Abbau von Zellorganellen erfolgt streng reguliert, so dass nur defekte Organellen durch Autophagie abgebaut werden. (Johansen und Lamark 2011)

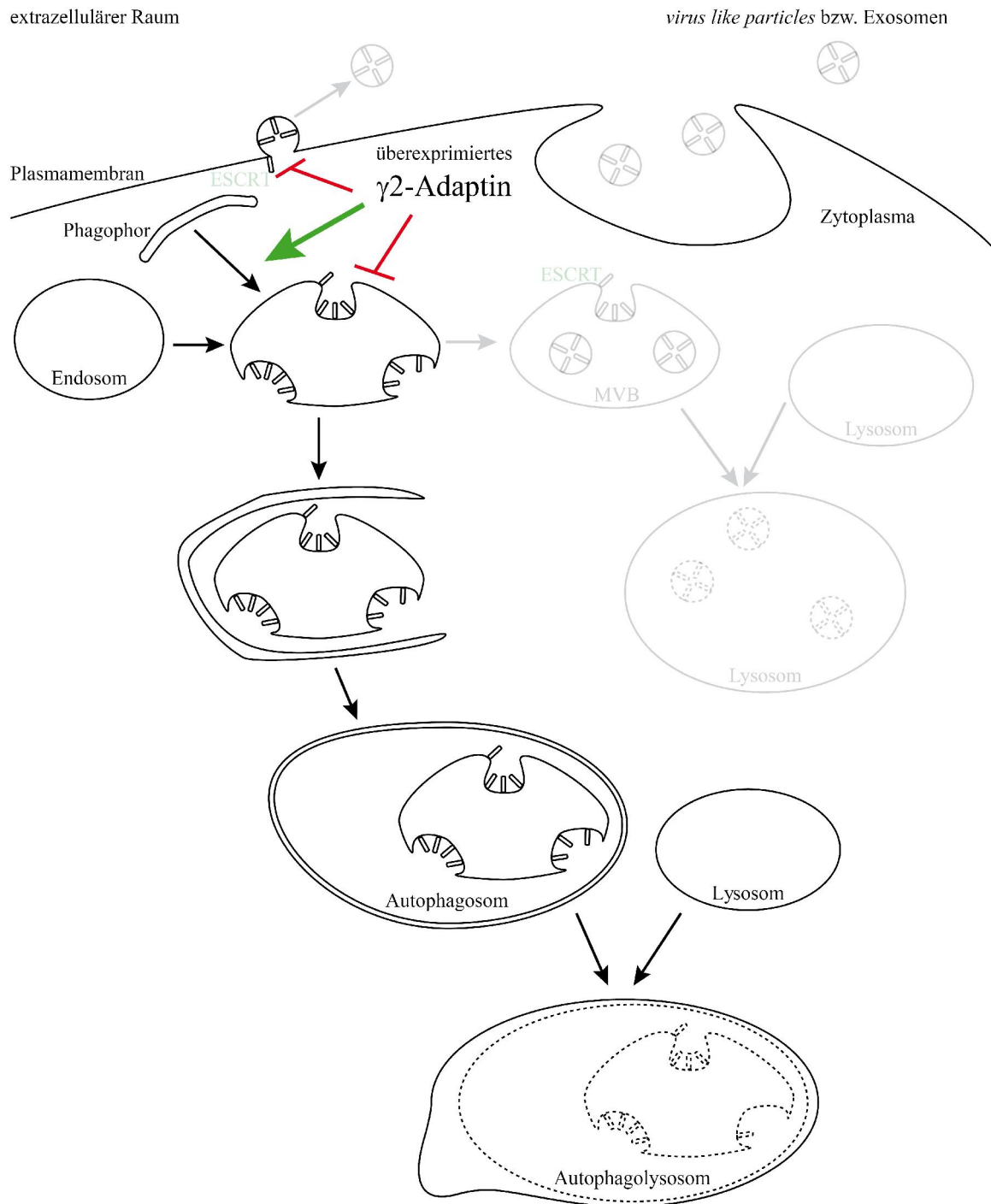
Die Autophagie ist kein, wie ursprünglich vermutet, rein nicht-selektiver Abbauprozess. Unter normalen Wachstumsbedingungen erfolgt die Autophagie selektiv zur Aufrechterhaltung der zellulären Homeostase. Die Selektivität wird hierbei über Autophagie-Adapter vermittelt. Diese zeichnen sich durch folgende charakteristische Merkmale aus:

- ❖ Autophagie-Adapter binden ubiquitinierte Substrate.
- ❖ Sie interagieren mit dem Autophagie-spezifischen Protein LC3.
- ❖ Autophagie-Adapter werden selbst durch Autophagie abgebaut.
- ❖ Sie besitzen die Fähigkeit zu polymerisieren oder Aggregate zu bilden.

Autophagie-Adapter führen somit Autophagie-Substrate, die in der Regel durch Ubiquitin markiert sind, an den LC3-positiven Phagophor heran. Sie werden gemeinsam mit ihren Substraten in Autophagosomen verpackt und nach deren Fusion mit den Lysosomen abgebaut. (Kirkin et al. 2009b; Shaid et al. 2013)

$\gamma 2$ -Adaptin erfüllt mindestens zwei der vier charakteristischen Merkmale für Autophagie-Adapter:  $\gamma 2$ -Adaptin bindet ubiquitinierte Substrate, die lysosomal abgebaut werden, und interagiert mit LC3. Ein weiteres Merkmal ist der Autophagie-abhängige Abbau der Adapter. Der Abbau von  $\gamma 2$ -Adaptin wurde nicht explizit untersucht, jedoch konnte bei Versuchen mit lysosomalen Hemmstoffen kein signifikanter Abbau von  $\gamma 2$ -Adaptin beobachtet werden. Dennoch treten in SDS-Lysepuffer immer wieder Abbaubanden von  $\gamma 2$ -Adaptin auf.  $\gamma 2$ -Adaptin wird abgebaut, aber ob der Abbau Autophagie-abhängig erfolgt,

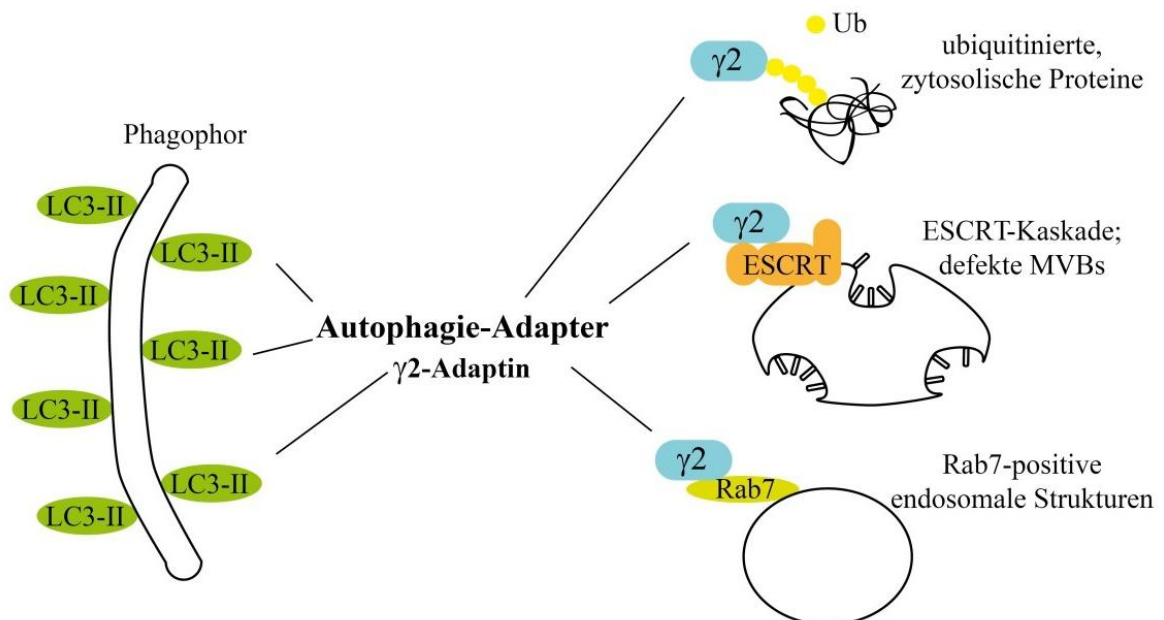
ist noch unklar. Die Fähigkeit zu oligomerisieren bzw. Aggregate zu bilden wurde für  $\gamma 2$ -Adaptin nicht näher untersucht. Da  $\gamma 2$ -Adaptin aber ein Autophagie-Adapter für defekte endosomale Strukturen zu sein scheint, ist dieses Merkmal auch zu vernachlässigen, da dem Abbau von Zellorganellen durch Autophagie keine Aggregat-Bildung vorausgehen muss (Shaid et al. 2013). Dennoch tritt bei  $\gamma 2$ -Überexpression immer wieder die Sequestrierung von einigen Substraten in Detegenz-unlösliche Aggregate auf (z.B. bei EIAV.gag), wenn diese nicht durch überschüssiges  $\gamma 2$ -Adaptin reduziert werden. Daher kann auch eine mögliche Aggregat-bildende Eigenschaft von  $\gamma 2$ -Adaptin nicht ausgeschlossen werden.



**Abbildung 47: Modell des Abbaus defekter MVBs durch Autophagie**

Die Überexpression von  $\gamma 2$ -Adaptin blockiert die ESCRT-Kaskade und vermittelt gleichzeitig den vermehrten Abbau seiner Substrate. Eine mögliche Erklärung dafür liefert der Abbau der durch die Blockade der ESCRT-Kaskade entstehenden defekten MVBs durch Autophagie.  $\gamma 2$ -Adaptin könnte dabei die Autophagie-Maschinerie zu diesen Kompartimenten der Klasse E rekrutieren.

$\gamma$ 2-Adaptin könnte folgende Funktion im Zusammenhang mit der Autophagie übernehmen: Der vermehrte Abbau seiner Substrate bei Überexpression erfolgt nicht durch Induktion der Autophagie. Vielmehr führt  $\gamma$ 2-Adaptin seine Substrate selektiv an die Phagophore heran, wodurch diese von Autophagosomen umschlossen werden. Dies ermöglicht ihren Abbau im Lysosom nach der Fusion der Autophagosomen mit diesem. Bei den Substraten von  $\gamma$ 2-Adaptin handelt es sich wahrscheinlich um ubiquitinierte Proteine und endosomale Strukturen. Die Verbindung zu den endosomalen Strukturen stellt  $\gamma$ 2-Adaptin dabei wahrscheinlich über seine Interaktionspartner Vps28, Chmp2, Nedd4 und / oder Rab7 her. Ob die Rolle von  $\gamma$ 2-Adaptin als möglicher negativer Regulator der ESCRT-Kaskade möglicherweise auf seiner Funktion als Autophagie-Adapter beruht, bleibt aber noch unklar.



**Abbildung 48:  $\gamma$ 2-Adaptin als potentieller Autophagie-Adapter**

$\gamma$ 2-Adaptin besitzt Eigenschaften eines Autophagie-Adapters. Über seinen potentiellen LIR-Motiv kann es mit LC3 interagieren und so seine Substrate an Phagophore heran führen.  $\gamma$ 2-Adaptin kann über sein UIM ubiquitinierte Substrate binden. Weitere Interaktionspartner von  $\gamma$ 2-Adaptin sind Komponenten der ESCRT-Kaskade und Rab7. Über diese kann  $\gamma$ 2-Adaptin auch endosomale Strukturen an die Phagophore rekrutieren.

Bei neurodegenerativen Krankheiten führen Defekte in der ESCRT-Kaskade zur Bildung von Protein-Aggregaten, die durch Autophagie nicht mehr abgebaut werden können (Rusten und Simonsen 2008). Daher wird angenommen, dass die Autophagie eine funktionsfähige MVB-Maschinerie benötigt (Saksena und Emr 2009).

Die Auswirkungen von ESCRT-Defekten auf die Autophagie-Maschinerie ist jedoch Spezies- und Zelltyp-abhängig (Manil-Segalén et al. 2012). Autophagosomen können mit MVBs zu Amphisomen oder direkt mit Lysosomen zu Autophagosomen verschmelzen. Die Amphisomen-Bildung ist bei gestörter MVB-Morphogenese nicht möglich, während die Fusion mit den Lysosomen, wie z.B. in *C.elegans*, noch stattfinden kann (Manil-Segalén et al. 2012). In Säugerzellen scheint der Abbau der Autophagosomen jedoch bei ESCRT-Depletion gestört zu sein, da es dabei zur Akkumulation von Autophagosomen kommt (Rusten und Stenmark 2009b). Es wird zwar diskutiert, ob eine Störung der MVB-Morphogenese die Autophagie induziert und dadurch eine Akkumulation von Autophagosomen hervorruft (Rusten und Stenmark 2009b), jedoch widerspricht dies dem Bild bei neurodegenerativen Erkrankungen. Zur Klärung dieser Frage wurde der Autophagie-*Flux* unter diesen Bedingungen auch noch nicht näher untersucht (Manil-Segalén et al. 2012).

In der Literatur ist kein Hinweis auf dem Abbau endosomaler Strukturen durch Autophagie zu finden und für Säugerzellen wird angenommen, dass die Autophagie eine funktionsfähige ESCRT-Kaskade benötigt. Somit scheint eine Rolle von  $\gamma$ 2-Adaptin als Autophagie-Adapter defekter MVBs zunächst verwunderlich. Jedoch ist  $\gamma$ 2-Adaptin in diesem Zusammenhang bisher auch einzigartig, da es in erhöhter Konzentration nicht nur als Autophagie-Adapter zu wirken scheint, sondern gleichzeitig die Störung der MVB-Morphogenese bedingt. Daher ist anzunehmen, dass  $\gamma$ 2-Adaptin nicht *per se* defekte endosomale Strukturen beseitigen kann, sondern möglicherweise regulatorische Funktionen übernimmt. In diesem Falle wäre eine Erhöhung der intrazellulären  $\gamma$ 2-Konzentration bei Aus- bzw. Überlastung der ESCRT-Kaskade zu erwarten. Dies wurde jedoch bisher noch nicht untersucht.

## 5.1 Modell der physiologischen Funktion von $\gamma$ 2-Adaptin

$\gamma$ 2-Adaptin ist ein zytosolisches Protein, das mit den Membranen später Endosomen assoziiert vorliegen kann (Lambert et al. 2007). Der Mechanismus der Membran-Rekrutierung ist dabei noch nicht bekannt.  $\gamma$ 2-Adaptin ist ein potentielles Adapter-Protein, das über sein UIM ubiquitinierte Proteine binden (Rost et al. 2006) und über sein LIR-Motiv mit LC3 interagieren kann. Neben Ubiquitin und LC3 sind Nedd4 (Rost et al. 2008), Vps28 und Chmp2A (Döring et al. 2010) und Rab7 als Interaktionspartner von  $\gamma$ 2-Adaptin identifiziert. Diese Interaktionen ermöglichen  $\gamma$ 2-Adaptin einen Zugang zur ESCRT-Kaskade und späten endosomalen Strukturen. Überschüssiges  $\gamma$ 2-Adaptin wirkt dabei als Inhibitor der ESCRT-Kaskade. Ob  $\gamma$ 2-Adaptin unter physiologischen Bedingungen ubiquitinierte Substrate für die Verpackung in ILVs an die ESCRT-Kaskade heran führt, ist bisher noch unklar. Überschreitet  $\gamma$ 2-Adaptin eine kritische Konzentration in der Zelle, inhibiert es die ESCRT-Kaskade und führt höchstwahrscheinlich zum Abbau der dadurch entstehenden defekten MVBs durch Autophagie. Hierbei wirkt es als Autophagie-Adapter zwischen den defekten MVBs und den LC3-positiven Phagophoren. Die Inhibition der ESCRT-Kaskade scheint dabei z.T. unabhängig von der Funktion von  $\gamma$ 2-Adaptin als Autophagie-Adapter zu sein, da überschüssiges  $\gamma$ 2-Adaptin auch die ESCRT-abhängige Knospung von Retroviren an der Plasmamembran inhibiert (Döring et al. 2010). Um dies weiterführend zu überprüfen, sollten Versuche mit Retroviren, die an der Plasmamembran knospen, z.B. EIAV.gag, und  $\gamma$ 2.Stop501 durchgeführt werden. Sie könnten eine Antwort auf die Frage liefern, ob  $\gamma$ 2-Adaptin die ESCRT-Kaskade durch Rekrutierung von LC3 und der Autophagie-Maschinerie vollständig inhibiert, oder ob die inhibitorische Wirkung von  $\gamma$ 2-Adaptin auf die ESCRT-Kaskade teilweise unabhängig von seiner Interaktion mit LC3 erfolgt.

Als Autophagie-Adapter führt  $\gamma$ 2-Adaptin nicht nur späte endosomale Strukturen dem Abbau durch Autophagie zu, sondern auch verschiedene zytosolische Proteine. Ein erster *screen* zur Identifikation von charakteristischen Merkmalen solcher  $\gamma$ 2-Substrate deutet darauf hin, dass diese Proteine in einer Verbindung zum Ubiquitin-System der Zelle stehen. Dies bekräftigt die postulierte Funktion von  $\gamma$ 2-Adaptin als Ubiquitin-Adapter. Neben einer direkten Verbindung dieser Substrate zu  $\gamma$ 2-Adaptin ist auch eine indirekte Wirkung von  $\gamma$ 2-Adaptin auf diese denkbar. Da überexprimiertes  $\gamma$ 2-Adaptin den Abbau später endosomaler Strukturen durch Autophagie zu vermitteln scheint, ist auch der indirekte Abbau von mit

diesen Strukturen assoziierten Proteinen denkbar. Dieser indirekte Abbau durch überschüssiges  $\gamma$ 2-Adaptin tritt vermutlich auch bei endogenen Substraten des endo-lysosomalen Systems, wie z.B. EGF, auf. Neben den transmembranen Substraten, die ESCRT-abhängig in ILVs verpackt werden, werden bei diesem Schritt auch zum Teil zytosolische Proteine mit verpackt. Dieser Prozess wird als Mikroautophagie an MVBs bezeichnet und erfolgt abhängig von Hsc70 (Sahu et al. 2011). Überexprimiertes  $\gamma$ 2-Adaptin vermittelt den Abbau von Hsc70 und damit wahrscheinlich auch von Hsc70-Substraten und -Ko-Chaperonen. Daher ist es schwierig zu unterscheiden, welches direkte Substrate von  $\gamma$ 2-Adaptin sind und welche indirekt durch den Abbau von defekten MVBs und mit ihnen assoziierter Proteine abgebaut werden. Unabhängig davon, ob es sich um direkte oder indirekte  $\gamma$ 2-Substrate handelt, zeichnen sie sich alle über eine zytoplasmatische Lokalisation und eine Verbindung zu Ubiquitin aus.

Da  $\gamma$ 2-Adaptin die ESCRT-Kaskade inhibieren und als Autophagie-Adapter fungieren kann, könnte es eine regulatorische Funktion im lysosomalen System übernehmen. Hierbei könnte  $\gamma$ 2-Adaptin als Schalter zwischen dem endo-lysosomalen Abbauweg und dem Abbau durch Autophagie wirken. Denkbar ist eine ähnliche Schalter-Funktion wie die der Hsc70-Ko-Chaperone Bag1 und Bag3 (*BCL-associated athanogene*). Die Expression von Bag3 steigt mit der Alterung der Zelle an, während die von Bag1 absinkt. Bag1 vermittelt den proteasomalen Abbau und Bag3 begünstigt in alternden Zellen, in denen die Anzahl falsch gefalteter Proteine ansteigt, den p62-abhängigen Abbau durch Autophagie. (Shaid et al. 2013)

Die Depletion von  $\gamma$ 2-Adaptin zeigt keinen regulatorischen Effekt auf die ESCRT-Kaskade, da die ESCRT-abhängige VLP-Knospung an der Plasmamembran unbeeinflusst bleibt. Dennoch werden ubiquitinierte Proteine und EGF bei  $\gamma$ 2-Depletion weniger stark abgebaut. Da  $\gamma$ 2-Adaptin jedoch nicht bei der Fusion von MVBs mit den Lysosomen beteiligt zu sein scheint, deutet dies darauf hin, dass der Autophagie-abhängige Abbau später endosomaler Strukturen, welcher von  $\gamma$ 2-Adaptin vermittelt wird, auch unter physiologischen Bedingungen auftritt. Dies würde bedeuten, dass die Funktion von  $\gamma$ 2-Adaptin als Autophagie-Adapter unabhängig von der Konzentrations-abhängigen Inhibition der ESCRT-Kaskade erfolgt. Eine alternative Erklärung liefert eine doppelte Adapter-Funktion von  $\gamma$ 2-Adaptin an MVBs: als Adapter für Substrate der ESCRT-Kaskade und als Autophagie-Adapter. Bei diesem Erklärungsmodell ist davon auszugehen, dass sich die Inhibition der ESCRT-Kaskade und die Funktion als Autophagie-Adapter gegenseitig bedingen.

## 6 Zusammenfassung

Ziel der Arbeit war es, die physiologische Funktion von  $\gamma$ 2-Adaptin zu charakterisieren.  $\gamma$ 2-Adaptin wurde 1998 erstmals von Takatsu *et al.* und Lewin *et al.* als mögliches Mitglied der Clathrin-Adapter-Proteinfamilie beschrieben. Seine genaue physiologische Funktion ist aber bis heute noch unklar. Bisherige Ergebnisse deuten darauf hin, dass  $\gamma$ 2-Adaptin unabhängig von den AP-Komplexen wirkt.

In der HBV-Morphogenese ist eine spezielle Funktion von  $\gamma$ 2-Adaptin bekannt, da es dort nach seiner Ubiquitinierung durch Nedd4 als Adapter zwischen dem HBV L- und Core-Protein fungiert und Änderungen in der  $\gamma$ 2-Konzentration die HBV-Freisetzung blockieren.

$\gamma$ 2-Adaptin besitzt neben den für die Clathrin-Adapter Proteine typischen Clathrin-bindenden Eigenschaften auch die Fähigkeit, Ubiquitin über sein UIM zu binden. Darüberhinaus wird  $\gamma$ 2-Adaptin durch seine Interaktion mit der Ubiquitin-Ligase Nedd4 selbst ubiquitiniert. Damit besitzt  $\gamma$ 2-Adaptin typische Eigenschaften eines Ubiquitin-Adapters.  $\gamma$ 2-Adaptin ist an MVBs lokalisiert und Abweichungen in der  $\gamma$ 2-Konzentration verändern die MVB-Morphologie. Zudem führt die Überexpression von  $\gamma$ 2-Adaptin zur Blockade der Freisetzung retroviraler VLPs und die  $\gamma$ 2-Depletion blockiert den lysosomalen Abbau von EGF, einem Substrat des endo-lysosomalen Proteintransports. Dies alles deutet auf eine mögliche Funktion von  $\gamma$ 2-Adaptin in diesem Transportsystem hin, welche in dieser Arbeit näher untersucht wurde.

Es konnte gezeigt werden, dass die Depletion von  $\gamma$ 2-Adaptin den Abbau von endogenen (z.B. EGF, ubiquitinierte Proteine) und exogenen (z.B. das retrovirale MLV.gag-Polyprotein) Substraten des endo-lysosomalen Weges inhibiert, während sie bei  $\gamma$ 2-Überexpression verstärkt abgebaut werden. Alle bisher identifizierten „Substrate“ von  $\gamma$ 2-Adaptin, also Proteine, die durch überschüssiges  $\gamma$ 2-Adaptin abgebaut werden, besitzen eine Verbindung zum endo-lysosomalen System und / oder zur Ubiquitin-Maschinerie der Zelle. Weitere Hinweise auf eine Rolle von  $\gamma$ 2-Adaptin im MVB-Weg lieferte die Identifikation von Vps28 und Chmp2A als spezifische Interaktionspartner von  $\gamma$ 2-Adaptin. Über Vps28 erhält  $\gamma$ 2-Adaptin direkten Zugang zum ESCRT-I- und über Chmp2A zum ESCRT-III-Komplex.

Zudem konnte neben dem UIM eine PH-Domäne in  $\gamma$ 2-Adaptin als wichtige funktionelle Domäne identifiziert werden. Sie stellt das Modul für die Interaktion mit Rab7 dar, welche



erstmals gezeigt werden konnte. Auch die Interaktion mit Rab7 deutet auf eine Rolle von  $\gamma$ 2-Adaptin im endo-lysosomalen Transportsystem hin, da Rab7 an späten Endosomen lokalisiert ist und u.a. die Fusion der MVBs mit den Lysosomen vermittelt. Da die Auswirkungen der Rab7-Überexpression und -Depletion auf MLV.gag denen der  $\gamma$ 2-Überexpression bzw. -Depletion entsprechen, liegt die Vermutung nahe, dass  $\gamma$ 2-Adaptin an einem ähnlich späten Schritt im endo-lysosomalen Transportsystem wirkt wie Rab7. Jedoch blockiert überschüssiges  $\gamma$ 2-Adaptin die ESCRT-abhängige VLP-Ausschleusung an der Plasmamembran und fungiert daher möglicherweise als negativer Regulator der ESCRT-Kaskade. Da die Überexpression von  $\gamma$ 2-Adaptin aber gleichzeitig zum vermehrten lysosomalen Abbau führt, ist eine Funktion von  $\gamma$ 2-Adaptin bei der MVB-Lysosomen-Fusion wenig wahrscheinlich. Einer solchen Funktion widerspricht auch, dass die intrazelluläre Konzentration von Rab7 und Vps28 durch überschüssiges  $\gamma$ 2-Adaptin reduziert werden.

Als dritte funktionell wichtige Domäne in  $\gamma$ 2-Adaptin konnte ein LIR-Motiv identifiziert werden, über welches  $\gamma$ 2-Adaptin mit dem Autophagie-Markerprotein LC3 interagieren kann. Die Interaktion mit LC3, und damit die Verbindung zur Autophagie-Maschinerie, liefert eine mögliche Erklärung für den vermehrten Abbau bei  $\gamma$ 2-Überexpression und den Abbau von Proteinen auf der MVB-Oberfläche. Dabei induziert  $\gamma$ 2-Adaptin nicht die Autophagie *per se*, sondern scheint als Autophagie-Adapter zu wirken, der seine Substrate, z.B. MVBs, selektiv dem Abbau durch Autophagie zuführt.

Eine mögliche Rolle von  $\gamma$ 2-Adaptin im zum Lysosom hin gerichteten zellulären Transport konnte bestätigt werden, wobei  $\gamma$ 2-Adaptin dabei verschiedene Funktionen übernimmt:

- ❖ als Ubiquitin-Adapter im endo-lysosomalen System,
- ❖ als negativer Regulator der ESCRT-Kaskade
- ❖ und / oder als Autophagie-Adapter.

## 7 Summary

The aim of this thesis was to characterize the physiological function of  $\gamma 2$ -Adaptin. In 1998,  $\gamma 2$ -Adaptin was characterized by Takatsu *et al.* and Lewin *et al.* as a putative member of the clathrin adaptor protein family. Its exact physiological function is not identified yet, but previous studies indicate that it functions independently of the adaptor protein complexes.

During HBV-morphogenesis,  $\gamma 2$ -Adaptin adapts a specific role. After its ubiquitination by Nedd4, it functions as an adaptor between HBV L- and Core-proteins. Changes in its concentration result in a blockage of HBV-release.

As a putative member of the clathrin adaptor protein family,  $\gamma 2$ -Adaptin possesses clathrin-binding ability. In addition, it can bind ubiquitin via its UIM and can interact with the ubiquitin-ligase Nedd4. During this interaction,  $\gamma 2$ -Adaptin itself is ubiquitinated. Therefore, it holds characteristic features of an ubiquitin adaptor.  $\gamma 2$ -Adaptin is localized at MVBs and changes in its concentration cause defects in MVB-morphology. Overexpressed  $\gamma 2$ -Adaptin results in the inhibition of retroviral particle release and its depletion blocks lysosomal degradation of EGF, an endogenous substrate of the endo-lysosomal pathway. These results indicate a possible role of  $\gamma 2$ -Adaptin in the MVB-pathway. Such a function in the endo-lysosomal system was further analyzed in this thesis.

It could be shown that the depletion of  $\gamma 2$ -Adaptin results in an inhibition of the lysosomal degradation of endogenous and exogenous substrates of the endo-lysosomal pathway, while it was increased during  $\gamma 2$ -overexpression. All identified “ $\gamma 2$ -substrates” exhibit a connection to the endo-lysosomal system and / or the ubiquitin-machinery of the cell. Further indication of a  $\gamma 2$ -function in the MVB-pathway came from the identification of Vps28 and Chmp2A as specific  $\gamma 2$ -interaction partners. Via these interactions  $\gamma 2$ -Adaptin gets access to the ESCRT-machinery, as Vps28 is a subunit of the ESCRT-I- and Chmp2A of the ESCRT-III-complex. In addition to its UIM, a PH-domain was identified as functional important in  $\gamma 2$ -Adaptin. The PH-domain is the interaction module for the interaction between  $\gamma 2$ -Adaptin and Rab7, which could be shown for the first time. Rab7 is localized to late endosomes and functions in MVB-lysosome-fusion. This enhances the idea of a functional role of  $\gamma 2$ -Adaptin in the MVB-pathway. The effect of Rab7-overexpression and depletion on the MLV.gag-morphogenesis resembles the effect of  $\gamma 2$ -Adaptin. This indicates a function of  $\gamma 2$ -Adaptin during late steps of the endo-lysosomal pathway, similar to Rab7.

However, overexpressed  $\gamma 2$ -Adaptin inhibits ESCRT-dependent retroviral particle release from the plasma membrane and therefore might possibly work as a negative regulator of the ESCRT-machinery. As overexpressed  $\gamma 2$ -Adaptin results in an enhanced lysosomal degradation, a role in MVB-lysosome-fusion is not very likely.

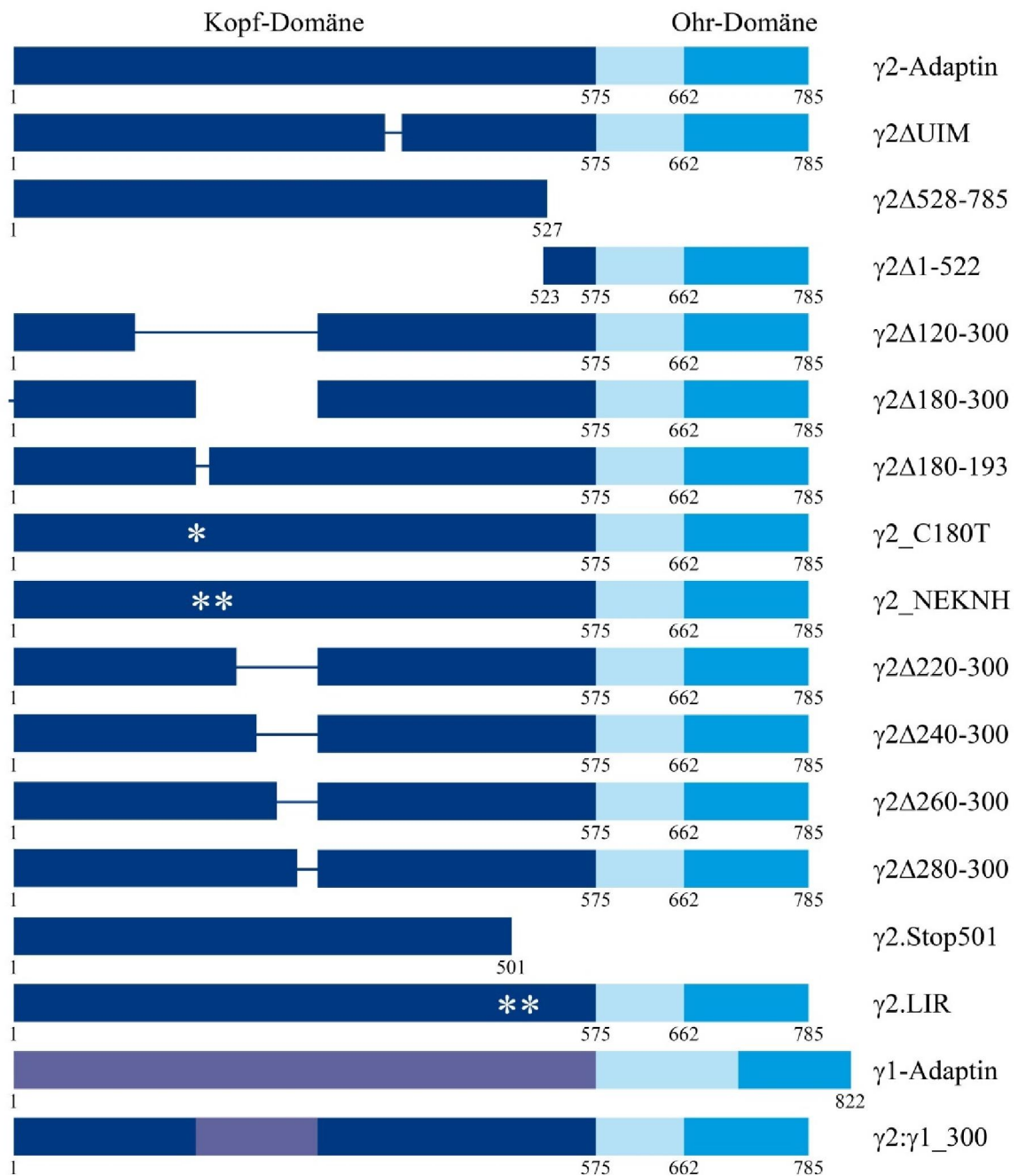
Another newly identified domain in  $\gamma 2$ -Adaptin is the LIR-motif. It enables  $\gamma 2$ -Adaptin to interact with the autophagy marker protein LC3. The interaction between  $\gamma 2$ -Adaptin and LC3 – and therefore a connection to the autophagy machinery - provide a possible explanation for the increased lysosomal degradation during  $\gamma 2$ -overexpression and the degradation of proteins on the MVB outer membrane. Thereby,  $\gamma 2$ -Adaptin does not induce autophagy in principle, but seems to function as an autophagy adaptor, which delivers its substrates, for instance MVBs, to autophagosomal degradation.

A putative role for  $\gamma 2$ -Adaptin in cellular transport directed to the lysosome was confirmed and  $\gamma 2$ -Adaptin functions at different steps during this process:

- ❖ as an ubiquitin adaptor
- ❖ as a negative regulator of the ESCRT-machinery
- ❖ and / or as an autophagy adaptor.

# 8 Anhang

## 8.1 Übersichtsdarstellung der $\gamma 2$ - bzw. $\gamma 1$ -Konstrukte



**Abbildung 49: Übersicht der verwendeten  $\gamma 2$ - und  $\gamma 1$ -Konstrukte**

Die einzelnen Konstrukte sind schematisch dargestellt, wobei sich die Darstellung an der Organisation in N-terminale Kopf- und C-terminale Ohr-Domäne von  $\gamma 1$ -Adaptin orientiert. Deletionen innerhalb der Sequenz sind über die Striche angedeutet und Punktmutationen, die zu einem oder mehreren AS-Austauschen führen, mit \* markiert.

## 8.2 Abkürzungsverzeichnis

3-MA	3-Methyladenin
ADP	Adenosindiphosphat
AP	Adapter-Protein
ARF	ADP ribosylation factor
AS	Aminosäure
Atg	autophagy-related
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
Bag	BCL-associated athanogene
BSA	bovine serum albumin
bzw.	beziehungsweise
ca	constitutive active
ca.	circa
CHAPS	3-[(3-Chloraminopropyl)dimethylammonio]-1-propan sulfonat
CHIP	<i>C-terminus of Hsc70-interacting protein</i>
Chmp	chromatin modifying protein
CIP	calf intestinal phosphatase
cm	Zentimeter
CMA	chaperone-mediated autophagy
CORVET	<i>class C core vacuole/endosome tethering</i>
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
dH <sub>2</sub> O	deionisiertes Wasser
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMP	2,4,6-Tris-(dimethylaminomethyl)-phenol
DMSO	Dimethylsulfoxid
dn	dominant negative
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> ; Desoxyribonukleinsäure
DOC	Natriumdesoxycholol
DUB	<i>de-ubiquitinating enzyme</i>
Eap	ELL-associated protein
EBAG9	estrogen receptor-binding fragment-associated antigen 9
EBSS	Earle's Balanced Salt Solution

E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epidermal growth factor
EGFR	epidermal growth factor receptor
EIAV	equine infectious anemia virus
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESCRT	endosomal sorting complex required for transport
FCS	fetal calv serum
FIP200	focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kD
FYCO1	FYVE and coiled-coil domain-containing protein 1
GABARAP	$\gamma$ -aminobutryate receptor associated protein
Gag	group specific antigen
GAP	GTPase-activating protein
GDF	GDI displacement factor
GDI	GDP dissociation inhibitor
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	GDP / GTP exchange factor
GFP	green fluorescent protein
GGA	<i>golgi-associated, <math>\gamma</math>-Adaptin homologue, Arf-binding</i>
GLUE	<i>GRAM-Like Ubiquitin-binding in EAP45</i>
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	Guanosintriphosphatase
HA	Hemagglutinin (HA-Tag: YPYDVPDYA)
HBV	Hepatitis B Virus
HDAC6	histone deacetylase 6
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
HIV	human immunodeficiency virus
HOPS	homotypic fusion and vacuole protein sorting
HPV	human papilloma virus
Hrs	hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate
Hsc70	heat shock cognate 7
HuH-7	humane Hepatomzellen
IgG	Immunglobulin G
ILV	intraluminale Vesikel

IP	Immunpräzipitation
kDa	Kilodalton
Ko-IP	Ko-Immunpräzipitation
Lamp2A	lysosome-associated membrane protein type-2A
LB	Luria Bertani
LC3	microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3
LDH	Laktatdehydrogenase
LIR	LC3 interaction region
M	Mol
mg	Milligramm
ml	Milliliter
MLV	murine leukemia virus
mM	millimolar
MTOC	microtubuli organizing center
MVB	multivesicular bodies
NBR1	neighbour of breast cancer 1
NLS	nuclear lokalisation signal
nm	Nanometer
NP-40	nonyl phenoxyethoxyethanol 40
PB1-Domäne	Phox/Bem1p domain
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PFA	Paraformaldehyd
PE	Phosphatidylethanolamin
pH	<i>potentia Hydrogenii</i> (negativer dekadischer Logarithmus der Aktivität der Oxoniumionen)
PH-Domäne	pleckstrin homology domain
PI(3)P	Phosphatidylinisitol-3-phosphat
Pleckstrin	<u>platelet and leukocyte C kinase substrate protein</u>
POX	Peroxidase
Rab	Ras-related in brain
Ran	Ras-related nuclear protein
Ras	rat sarcoma
REP	Rab escort protein

RGGTase	Rab Geranyl-Geranyl-Transferase
Rho	Ras homology
RILP	Rab-interactin lysosomal protein
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SCAMP3	<i>secretory carrier membrane protein 3</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
siRNA	small interfering RNA
SNARE	soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor
s.o.	siehe oben
sog.	sogenannt
STAM	signal transducing adaptor protein
TBS	tris buffered saline
TGN	Transgolginetzwerk
TCA	Trichloressigsäure
TR	Transferrin-Rezeptor
Tsg101	tumor susceptibility gene 101
t-SNAREs	target synaptosome-associated protein receptor
u.a.	unter anderem
Ub	Ubiquitin
UBA	<i>ubiquitin-associated</i>
UBL	Ubiquitin-like
UEV	ubiquitin E2 variant
UIM	Ubiquitininteraktionsmotiv
UVRAG	UV radiation resistance-associated gene
v	Volumen
VHS	Vps-27, Hrs, STAM
VLP	virus like particles
Vps	vacuolar protein sorting
w	weight
wt	wild type
YFG	yellow fluorescent protein



z.B.	zum Beispiel
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer

### 8.3 Ein- und Dreibuchstabencodes der Aminosäuren

Tabelle 18: Ein- und Dreibuchstabencode der Aminosäuren

Einbuchstabencode	Dreibuchstabencode	Aminosäure
A	Ade	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin
X	---	beliebige AS

## 9 Literaturverzeichnis

**Alemu, Endalkachew Ashenafi; Lamark, Trond; Torgersen, Knut Martin; Birgisdottir, Aasa Birna; Larsen, Kenneth Bowitz; Jain, Ashish et al. (2012):** ATG8 family proteins act as scaffolds for assembly of the ULK complex: sequence requirements for LC3-interacting region (LIR) motifs. In: *J. Biol. Chem.* 287 (47), S. 39275–39290.

**Ali, B. R.; Seabra, M. C. (2005):** Targeting of Rab GTPases to cellular membranes. In: *Biochem. Soc. Trans.* 33 (Pt 4), S. 652–656.

**Anant, J. S.; Desnoyers, L.; Machius, M.; Demeler, B.; Hansen, J. C.; Westover, K. D. et al. (1998):** Mechanism of Rab geranylgeranylation: formation of the catalytic ternary complex. In: *Biochemistry* 37 (36), S. 12559–12568.

**Aniento, Fernando; Gruenberg, Jean (2003):** Subcellular fractionation of tissue culture cells. In: *Curr Protoc Immunol* 8, S. Unit 8.1C.

**Aoh, Quyen L.; Castle, Anna M.; Hubbard, Charles H.; Katsumata, Osamu; Castle, J. David (2009):** SCAMP3 negatively regulates epidermal growth factor receptor degradation and promotes receptor recycling. In: *Mol. Biol. Cell* 20 (6), S. 1816–1832.

**Ausubel, Frederick M. (Hg.):** Current protocols in molecular biology. New York: Wiley.

**Babst, Markus (2004):** GGAing ubiquitin to the endosome. In: *Nat. Cell Biol.* 6 (3), S. 175–177.

**Babst, Markus; Katzmann, David J.; Estepa-Sabal, Eden J.; Meerloo, Timo; Emr, Scott D. (2002a):** Escrt-III: an endosome-associated heterooligomeric protein complex required for mvb sorting. In: *Dev. Cell* 3 (2), S. 271–282.

**Babst, Markus; Katzmann, David J.; Snyder, William B.; Wendland, Beverly; Emr, Scott D. (2002b):** Endosome-associated complex, ESCRT-II, recruits transport machinery for protein sorting at the multivesicular body. In: *Dev. Cell* 3 (2), S. 283–289.

**Bache, Kristi G.; Brech, Andreas; Mehlum, Anja; Stenmark, Harald (2003a):** Hrs regulates multivesicular body formation via ESCRT recruitment to endosomes. In: *J. Cell Biol.* 162 (3), S. 435–442.

**Bache, Kristi G.; Raiborg, Camilla; Mehlum, Anja; Stenmark, Harald (2003b):** STAM and Hrs are subunits of a multivalent ubiquitin-binding complex on early endosomes. In: *J. Biol. Chem.* 278 (14), S. 12513–12521.

**Bardens, Andreas; Döring, Tatjana; Stieler, Jens; Prange, Reinhild (2011):** Alix regulates egress of hepatitis B virus naked capsid particles in an ESCRT-independent manner. In: *Cell. Microbiol.* 13 (4), S. 602–619.

**Bieniasz, Paul D. (2006):** Late budding domains and host proteins in enveloped virus release. In: *Virology* 344 (1), S. 55–63.

**Bishop, N.; Woodman, P. (2000):** ATPase-defective mammalian VPS4 localizes to aberrant endosomes and impairs cholesterol trafficking. In: *Mol. Biol. Cell* 11 (1), S. 227–239.

**Bucci, C.; Parton, R. G.; Mather, I. H.; Stunnenberg, H.; Simons, K.; Hoflack, B.; Zerial, M. (1992):** The small GTPase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway. In: *Cell* 70 (5), S. 715–728.

- Bucci, C.; Thomsen, P.; Nicoziani, P.; McCarthy, J.; van Deurs, B. (2000):** Rab7: a key to lysosome biogenesis. In: *Mol. Biol. Cell* 11 (2), S. 467–480.
- Bucci, Cecilia; Bakke, Oddmund; Progida, Cinzia (2010):** Rab7b and receptors trafficking. In: *Commun Integr Biol* 3 (5), S. 401–404.
- Calistri, A.; Salata, C.; Parolin, C.; Palù, G. (2009):** Role of multivesicular bodies and their components in the egress of enveloped RNA viruses. In: *Rev. Med. Virol.* 19 (1), S. 31–45.
- Cantalupo, G.; Alifano, P.; Roberti, V.; Bruni, C. B.; Bucci, C. (2001):** Rab-interacting lysosomal protein (RILP): the Rab7 effector required for transport to lysosomes. In: *EMBO J.* 20 (4), S. 683–693.
- Carbone, R.; Fré, S.; Iannolo, G.; Belleudi, F.; Mancini, P.; Pelicci, P. G. et al. (1997):** eps15 and eps15R are essential components of the endocytic pathway. In: *Cancer Res.* 57 (24), S. 5498–5504.
- Carlton, Jeremy (2010):** The ESCRT machinery: a cellular apparatus for sorting and scission. In: *Biochem. Soc. Trans.* 38 (6), S. 1397–1412.
- Carter, R. E.; Sorkin, A. (1998):** Endocytosis of functional epidermal growth factor receptor-green fluorescent protein chimera. In: *J. Biol. Chem.* 273 (52), S. 35000–35007.
- Casanova, J. E.; Wang, X.; Kumar, R.; Bhartur, S. G.; Navarre, J.; Woodrum, J. E. et al. (1999):** Association of Rab25 and Rab11a with the apical recycling system of polarized Madin-Darby canine kidney cells. In: *Mol. Biol. Cell* 10 (1), S. 47–61.
- Ceresa, Brian P.; Bahr, Steven J. (2006):** rab7 activity affects epidermal growth factor:epidermal growth factor receptor degradation by regulating endocytic trafficking from the late endosome. In: *J. Biol. Chem.* 281 (2), S. 1099–1106.
- Del Conte-Zerial, Perla; Bruschi, Lutz; Rink, Jochen C.; Collinet, Claudio; Kalaidzidis, Yannis; Zerial, Marino; Deutsch, Andreas (2008):** Membrane identity and GTPase cascades regulated by toggle and cut-out switches. In: *Mol. Syst. Biol.* 4, S. 206.
- Dores, Michael R.; Paing, May M.; Lin, Huilan; Montagne, William A.; Marchese, Adriano; Trejo, JoAnn (2012):** AP-3 regulates PAR1 ubiquitin-independent MVB/lysosomal sorting via an ALIX-mediated pathway. In: *Mol. Biol. Cell* 23 (18), S. 3612–3623.
- Döring, Tatjana; Gotthardt, Katherina; Stieler, Jens; Prange, Reinhild (2010):**  $\gamma$ 2-Adaptin is functioning in the late endosomal sorting pathway and interacts with ESCRT-I and -III subunits. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1803 (11), S. 1252–1264.
- Doyotte, Aurelie; Russell, Matthew R. G.; Hopkins, Colin R.; Woodman, Philip G. (2005):** Depletion of TSG101 forms a mammalian "Class E" compartment: a multicisternal early endosome with multiple sorting defects. In: *J. Cell. Sci.* 118 (Pt 14), S. 3003–3017.
- Duve, C. de; Wattiaux, R. (1966):** Functions of lysosomes. In: *Annu. Rev. Physiol.* 28, S. 435–492.
- Eden, Emily R.; Huang, Fangtian; Sorkin, Alexander; Futter, Clare E. (2012):** The role of EGF receptor ubiquitination in regulating its intracellular traffic. In: *Traffic* 13 (2), S. 329–337.
- Emily M. Coonrod and Tom H. Stevens:** The Yeast vps Class E Mutants: The Beginning of the Molecular Genetic Analysis of Multivesicular Body Biogenesis: The American Society for Cell Biology.

- Fader, C. M.; Colombo, M. I. (2009):** Autophagy and multivesicular bodies: two closely related partners. In: *Cell Death Differ.* 16 (1), S. 70–78.
- Fang, Yi; Wu, Ning; Gan, Xin; Yan, Wanhua; Morrell, James C.; Gould, Stephen J. (2007):** Higher-order oligomerization targets plasma membrane proteins and HIV gag to exosomes. In: *PLoS Biol.* 5 (6), S. e158.
- Farnsworth, C. C.; Kawata, M.; Yoshida, Y.; Takai, Y.; Gelb, M. H.; Glomset, J. A. (1991):** C terminus of the small GTP-binding protein smg p25A contains two geranylgeranylated cysteine residues and a methyl ester. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88 (14), S. 6196–6200.
- Felder, S.; Miller, K.; Moehren, G.; Ullrich, A.; Schlessinger, J.; Hopkins, C. R. (1990):** Kinase activity controls the sorting of the epidermal growth factor receptor within the multivesicular body. In: *Cell* 61 (4), S. 623–634.
- Feng, Y.; Press, B.; Wandinger-Ness, A. (1995):** Rab 7: an important regulator of late endocytic membrane traffic. In: *J. Cell Biol.* 131 (6 Pt 1), S. 1435–1452.
- Fire, A.; Xu, S.; Montgomery, M. K.; Kostas, S. A.; Driver, S. E.; Mello, C. C. (1998):** Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. In: *Nature* 391 (6669), S. 806–811.
- Florin, Luise; Becker, Katrin A.; Sapp, Cornelia; Lambert, Carsten; Sirma, Hüseyin; Müller, Martin et al. (2004):** Nuclear translocation of papillomavirus minor capsid protein L2 requires Hsc70. In: *J. Virol.* 78 (11), S. 5546–5553.
- Florin, Luise; Sapp, Cornelia; Streeck, Rolf E.; Sapp, Martin (2002):** Assembly and translocation of papillomavirus capsid proteins. In: *J. Virol.* 76 (19), S. 10009–10014.
- Futter, C. E.; Pearse, A.; Hewlett, L. J.; Hopkins, C. R. (1996):** Multivesicular endosomes containing internalized EGF-EGF receptor complexes mature and then fuse directly with lysosomes. In: *J. Cell Biol.* 132 (6), S. 1011–1023.
- Giroglou, T.; Florin, L.; Schäfer, F.; Streeck, R. E.; Sapp, M. (2001):** Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. In: *J. Virol.* 75 (3), S. 1565–1570.
- Gorvel, J. P.; Chavrier, P.; Zerial, M.; Gruenberg, J. (1991):** rab5 controls early endosome fusion in vitro. In: *Cell* 64 (5), S. 915–925.
- Grosshans, Bianka L.; Ortiz, Darinel; Novick, Peter (2006):** Rabs and their effectors: achieving specificity in membrane traffic. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103 (32), S. 11821–11827.
- Gruenberg, J.; Maxfield, F. R. (1995):** Membrane transport in the endocytic pathway. In: *Curr. Opin. Cell Biol.* 7 (4), S. 552–563.
- Guo, Yajuan; Chang, Chunmei; Huang, Rui; Liu, Bo; Bao, Lan; Liu, Wei (2012):** AP1 is essential for generation of autophagosomes from the trans-Golgi network. In: *J. Cell. Sci.* 125 (Pt 7), S. 1706–1715.
- Haglund, Kaisa; Stenmark, Harald (2006):** Working out coupled monoubiquitination. In: *Nat. Cell Biol.* 8 (11), S. 1218–1219.
- Hamasaki, Maho; Yoshimori, Tamotsu (2010):** Where do they come from? Insights into autophagosome formation. In: *FEBS Lett.* 584 (7), S. 1296–1301.

- Hartmann-Stühler, C.; Prange, R. (2001):** Hepatitis B virus large envelope protein interacts with gamma2-adaptin, a clathrin adaptor-related protein. In: *J. Virol.* 75 (11), S. 5343–5351.
- Hawley-Nelson, P.; Ciccarone, V. (2001):** Transfection of cultured eukaryotic cells using cationic lipid reagents. In: *Curr Protoc Neurosci* 1, S. Appendix 1F.
- Henne, William M.; Buchkovich, Nicholas J.; Emr, Scott D. (2011):** The ESCRT pathway. In: *Dev. Cell* 21 (1), S. 77–91.
- Hirst, Jennifer; Irving, Carol; Borner, Georg H. H. (2013):** Adaptor protein complexes AP-4 and AP-5: new players in endosomal trafficking and progressive spastic paraplegia. In: *Traffic* 14 (2), S. 153–164.
- Hoeller, Daniela; Crosetto, Nicola; Blagoev, Blagoy; Raiborg, Camilla; Tikkanen, Ritva; Wagner, Sebastian et al. (2006):** Regulation of ubiquitin-binding proteins by monoubiquitination. In: *Nat. Cell Biol.* 8 (2), S. 163–169.
- Huotari, Jatta; Helenius, Ari (2011):** Endosome maturation. In: *EMBO J.* 30 (17), S. 3481–3500.
- Hurley, James H. (2008):** ESCRT complexes and the biogenesis of multivesicular bodies. In: *Curr. Opin. Cell Biol.* 20 (1), S. 4–11.
- Hyttinen, Juha M. T.; Niittykoski, Minna; Salminen, Antero; Kaarniranta, Kai (2013):** Maturation of autophagosomes and endosomes: a key role for Rab7. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1833 (3), S. 503–510.
- Ingham, Robert J.; Gish, Gerald; Pawson, Tony (2004):** The Nedd4 family of E3 ubiquitin ligases: functional diversity within a common modular architecture. In: *Oncogene* 23 (11), S. 1972–1984.
- Inoue, H.; Nojima, H.; Okayama, H. (1990):** High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. In: *Gene* 96 (1), S. 23–28.
- Itoh, Takashi; Fujita, Naonobu; Kanno, Eiko; Yamamoto, Akitsugu; Yoshimori, Tamotsu; Fukuda, Mitsunori (2008):** Golgi-resident small GTPase Rab33B interacts with Atg16L and modulates autophagosome formation. In: *Mol. Biol. Cell* 19 (7), S. 2916–2925.
- Johansen, Terje; Lamark, Trond (2011):** Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. In: *Autophagy* 7 (3), S. 279–296.
- Jordens, I.; Fernandez-Borja, M.; Marsman, M.; Dusseljee, S.; Janssen, L.; Calafat, J. et al. (2001):** The Rab7 effector protein RILP controls lysosomal transport by inducing the recruitment of dynein-dynactin motors. In: *Curr. Biol.* 11 (21), S. 1680–1685.
- Joshi, Anjali; Nagashima, Kunio; Freed, Eric O. (2009):** Defects in cellular sorting and retroviral assembly induced by GGA overexpression. In: *BMC Cell Biol.* 10, S. 72.
- Kabaya, Y.; Mizushima, N.; Ueno, T.; Yamamoto, A.; Kirisako, T.; Noda, T. et al. (2000):** LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. In: *EMBO J.* 19 (21), S. 5720–5728.
- Katzmann, D. J.; Babst, M.; Emr, S. D. (2001):** Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. In: *Cell* 106 (2), S. 145–155.
- Kawasaki, Masato; Nakayama, Kazuhisa; Wakatsuki, Soichi (2005):** Membrane recruitment of effector proteins by Arf and Rab GTPases. In: *Curr. Opin. Struct. Biol.* 15 (6), S. 681–689.

- Kim, Hee Jin; Lee, Stacy; Jung, Jae U. (2010):** When autophagy meets viruses: a double-edged sword with functions in defense and offense. In: *Semin Immunopathol* 32 (4), S. 323–341.
- Kirkin, Vladimir; Lamark, Trond; Sou, Yu-Shin; Bjørkøy, Geir; Nunn, Jennifer L.; Bruun, Jack-Ansgar et al. (2009a):** A role for NBR1 in autophagosomal degradation of ubiquitinated substrates. In: *Mol. Cell* 33 (4), S. 505–516.
- Kirkin, Vladimir; McEwan, David G.; Novak, Ivana; Dikic, Ivan (2009b):** A role for ubiquitin in selective autophagy. In: *Mol. Cell* 34 (3), S. 259–269.
- Kopitz, J.; Kisen, G. O.; Gordon, P. B.; Bohley, P.; Seglen, P. O. (1990):** Nonselective autophagy of cytosolic enzymes by isolated rat hepatocytes. In: *J. Cell Biol.* 111 (3), S. 941–953.
- Lallemand-Breitenbach, Valérie; Thé, Hugues de (2010):** PML nuclear bodies. In: *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2 (5), S. a000661.
- Lambert, Carsten; Döring, Tatjana; Prange, Reinhild (2007):** Hepatitis B virus maturation is sensitive to functional inhibition of ESCRT-III, Vps4, and gamma 2-adaptin. In: *J. Virol.* 81 (17), S. 9050–9060.
- Leder, C.; Kleinschmidt, J. A.; Wiethe, C.; Müller, M. (2001):** Enhancement of capsid gene expression: preparing the human papillomavirus type 16 major structural gene L1 for DNA vaccination purposes. In: *J. Virol.* 75 (19), S. 9201–9209.
- Lemmon, M. A. (2004):** Pleckstrin homology domains: not just for phosphoinositides. In: *Biochem. Soc. Trans.* 32 (Pt 5), S. 707–711.
- Lewin, D. A.; Sheff, D.; Ooi, C. E.; Whitney, J. A.; Yamamoto, E.; Chicione, L. M. et al. (1998):** Cloning, expression, and localization of a novel gamma-adaptin-like molecule. In: *FEBS Lett.* 435 (2-3), S. 263–268.
- Lippé, R.; Miaczynska, M.; Rybin, V.; Runge, A.; Zerial, M. (2001):** Functional synergy between Rab5 effector Rabaptin-5 and exchange factor Rabex-5 when physically associated in a complex. In: *Mol. Biol. Cell* 12 (7), S. 2219–2228.
- Liu, Tuoen; Daniels, Christopher K.; Cao, Shousong (2012):** Comprehensive review on the HSC70 functions, interactions with related molecules and involvement in clinical diseases and therapeutic potential. In: *Pharmacol. Ther.* 136 (3), S. 354–374.
- Lloyd, Thomas E.; Atkinson, Richard; Wu, Mark N.; Zhou, Yi; Pennetta, Giuseppa; Bellen, Hugo J. (2002):** Hrs regulates endosome membrane invagination and tyrosine kinase receptor signaling in *Drosophila*. In: *Cell* 108 (2), S. 261–269.
- Lombardi, D.; Soldati, T.; Riederer, M. A.; Goda, Y.; Zerial, M.; Pfeffer, S. R. (1993):** Rab9 functions in transport between late endosomes and the trans Golgi network. In: *EMBO J.* 12 (2), S. 677–682.
- Luzio, J. P.; Rous, B. A.; Bright, N. A.; Pryor, P. R.; Mullock, B. M.; Piper, R. C. (2000):** Lysosome-endosome fusion and lysosome biogenesis. In: *J. Cell. Sci.* 113 (Pt 9), S. 1515–1524.
- Luzio, J. Paul; Gray, Sally R.; Bright, Nicholas A. (2010):** Endosome-lysosome fusion. In: *Biochem. Soc. Trans.* 38 (6), S. 1413–1416.
- Mades, Andreas; Gotthardt, Katherina; Awe, Karin; Stieler, Jens; Döring, Tatjana; Füsler, Sabine; Prange, Reinhild (2012):** Role of human sec63 in modulating the steady-state levels of multi-spanning membrane proteins. In: *PLoS ONE* 7 (11), S. e49243.

- Manil-Segalén, Marion; Lefebvre, Christophe; Culetto, Emmanuel; Legouis, Renaud (2012):** Need an ESCRT for autophagosomal maturation? In: *Commun Integr Biol* 5 (6), S. 566–571.
- Mariño, G.; López-Otín, C. (2004):** Autophagy: molecular mechanisms, physiological functions and relevance in human pathology. In: *Cell. Mol. Life Sci.* 61 (12), S. 1439–1454.
- Mattera, Rafael; Arighi, Cecilia N.; Lodge, Robert; Zerial, Marino; Bonifacino, Juan S. (2003):** Divalent interaction of the GGAs with the Rabaptin-5-Rabex-5 complex. In: *EMBO J.* 22 (1), S. 78–88.
- Mattera, Rafael; Boehm, Markus; Chaudhuri, Rittik; Prabhu, Yogikala; Bonifacino, Juan S. (2011):** Conservation and diversification of dileucine signal recognition by adaptor protein (AP) complex variants. In: *J. Biol. Chem.* 286 (3), S. 2022–2030.
- Mayle, Kristine M.; Le, Alexander M.; Kamei, Daniel T. (2012):** The intracellular trafficking pathway of transferrin. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1820 (3), S. 264–281.
- Metcalf, Daniel; Isaacs, Adrian M. (2010):** The role of ESCRT proteins in fusion events involving lysosomes, endosomes and autophagosomes. In: *Biochem. Soc. Trans.* 38 (6), S. 1469–1473.
- Mizushima, Noboru (2007):** Autophagy: process and function. In: *Genes Dev.* 21 (22), S. 2861–2873.
- Mizushima, Noboru; Yoshimori, Tamotsu (2007):** How to interpret LC3 immunoblotting. In: *Autophagy* 3 (6), S. 542–545.
- Nathan, James A.; Kim, Hyoung Tae; Ting, Lily; Gygi, Steven P.; Goldberg, Alfred L. (2013):** Why do cellular proteins linked to K63-polyubiquitin chains not associate with proteasomes? In: *EMBO J.* 32 (4), S. 552–565.
- Nickerson, Daniel P.; Russell, Matthew R. G.; Odorizzi, Greg (2007):** A concentric circle model of multivesicular body cargo sorting. In: *EMBO Rep.* 8 (7), S. 644–650.
- Odorizzi, G.; Cowles, C. R.; Emr, S. D. (1998):** The AP-3 complex: a coat of many colours. In: *Trends Cell Biol.* 8 (7), S. 282–288.
- Odorizzi, Greg (2006):** The multiple personalities of Alix. In: *J. Cell. Sci.* 119 (Pt 15), S. 3025–3032.
- Ohno, Hiroshi (2006):** Physiological roles of clathrin adaptor AP complexes: lessons from mutant animals. In: *J. Biochem.* 139 (6), S. 943–948.
- Pankiv, Serhiy; Clausen, Terje Høyvarde; Lamark, Trond; Brech, Andreas; Bruun, Jack-Ansgar; Outzen, Heidi et al. (2007):** p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. In: *J. Biol. Chem.* 282 (33), S. 24131–24145.
- Pelchen-Matthews, Annegret; Raposo, Graça; Marsh, Mark (2004):** Endosomes, exosomes and Trojan viruses. In: *Trends Microbiol.* 12 (7), S. 310–316.
- Pelham, Hugh R. B. (2004):** Membrane traffic: GGAs sort ubiquitin. In: *Curr. Biol.* 14 (9), S. R357-9.
- Pérez-Sala, Dolores; Boya, Patricia; Ramos, Irene; Herrera, Mónica; Stamatakis, Konstantinos (2009):** The C-terminal sequence of RhoB directs protein degradation through an endo-lysosomal pathway. In: *PLoS ONE* 4 (12), S. e8117.

- Piper, Robert C.; Katzmann, David J. (2007):** Biogenesis and function of multivesicular bodies. In: *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 23, S. 519–547.
- Prange, Reinhild (2012):** Host factors involved in hepatitis B virus maturation, assembly, and egress. In: *Med. Microbiol. Immunol.* 201 (4), S. 449–461.
- Price, A.; Seals, D.; Wickner, W.; Ungermann, C. (2000):** The docking stage of yeast vacuole fusion requires the transfer of proteins from a cis-SNARE complex to a Rab/Ypt protein. In: *J. Cell Biol.* 148 (6), S. 1231–1238.
- Progida, Cinzia; Cogli, Laura; Piro, Francesco; Luca, Azzurra de; Bakke, Oddmund; Bucci, Cecilia (2010):** Rab7b controls trafficking from endosomes to the TGN. In: *J. Cell. Sci.* 123 (Pt 9), S. 1480–1491.
- Progida, Cinzia; Spinosa, Maria Rita; Luca, Azzurra de; Bucci, Cecilia (2006):** RILP interacts with the VPS22 component of the ESCRT-II complex. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 347 (4), S. 1074–1079.
- Puertollano, Rosa; Bonifacino, Juan S. (2004):** Interactions of GGA3 with the ubiquitin sorting machinery. In: *Nat. Cell Biol.* 6 (3), S. 244–251.
- Raiborg, C.; Bache, K. G.; Mehlum, A.; Stang, E.; Stenmark, H. (2001a):** Hrs recruits clathrin to early endosomes. In: *EMBO J.* 20 (17), S. 5008–5021.
- Raiborg, C.; Bremnes, B.; Mehlum, A.; Gillooly, D. J.; D'Arrigo, A.; Stang, E.; Stenmark, H. (2001b):** FYVE and coiled-coil domains determine the specific localisation of Hrs to early endosomes. In: *J. Cell. Sci.* 114 (Pt 12), S. 2255–2263.
- Raiborg, Camilla; Bache, Kristi G.; Gillooly, David J.; Madshus, Inger Helene; Stang, Espen; Stenmark, Harald (2002):** Hrs sorts ubiquitinated proteins into clathrin-coated microdomains of early endosomes. In: *Nat. Cell Biol.* 4 (5), S. 394–398.
- Raiborg, Camilla; Stenmark, Harald (2009):** The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. In: *Nature* 458 (7237), S. 445–452.
- Randles, Leah; Walters, Kylie J. (2012):** Ubiquitin and its binding domains. In: *Front. Biosci.* 17, S. 2140–2157.
- Raymond, C. K.; Howald-Stevenson, I.; Vater, C. A.; Stevens, T. H. (1992):** Morphological classification of the yeast vacuolar protein sorting mutants: evidence for a prevacuolar compartment in class E vps mutants. In: *Mol. Biol. Cell* 3 (12), S. 1389–1402.
- Rebecchi, M. J.; Scarlata, S. (1998):** Pleckstrin homology domains: a common fold with diverse functions. In: *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 27, S. 503–528.
- Regan-Klapisz, Elsa; Sorokina, Irina; Voortman, Jarno; Keizer, Peter de; Roovers, Rob C.; Verheesen, Peter et al. (2005):** Ubiquilin recruits Eps15 into ubiquitin-rich cytoplasmic aggregates via a UIM-UBL interaction. In: *J. Cell. Sci.* 118 (Pt 19), S. 4437–4450.
- Ren, M.; Xu, G.; Zeng, J.; Lemos-Chiarandini, C. de; Adesnik, M.; Sabatini, D. D. (1998):** Hydrolysis of GTP on rab11 is required for the direct delivery of transferrin from the pericentriolar recycling compartment to the cell surface but not from sorting endosomes. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95 (11), S. 6187–6192.
- Rost, Martina; Döring, Tatjana; Prange, Reinhild (2008):** gamma2-Adaptin, a ubiquitin-interacting adaptor, is a substrate to coupled ubiquitination by the ubiquitin ligase Nedd4 and functions in the endosomal pathway. In: *J. Biol. Chem.* 283 (46), S. 32119–32130.



- Rost, Martina; Mann, Sylvia; Lambert, Carsten; Döring, Tatjana; Thomé, Nicole; Prange, Reinhild (2006):** Gamma-adaptin, a novel ubiquitin-interacting adaptor, and Nedd4 ubiquitin ligase control hepatitis B virus maturation. In: *J. Biol. Chem.* 281 (39), S. 29297–29308.
- Roxrud, Ingrid; Stenmark, Harald; Malerød, Lene (2010):** ESCRT & Co. In: *Biol. Cell* 102 (5), S. 293–318.
- Rüder, Constantin; Höpken, Uta E.; Wolf, Jana; Mittrücker, Hans-Willi; Engels, Boris; Erdmann, Bettina et al. (2009):** The tumor-associated antigen EBAG9 negatively regulates the cytolytic capacity of mouse CD8+ T cells. In: *J. Clin. Invest.* 119 (8), S. 2184–2203.
- Russell, Matthew R. G.; Shideler, Tess; Nickerson, Daniel P.; West, Matt; Odorizzi, Greg (2012):** Class E compartments form in response to ESCRT dysfunction in yeast due to hyperactivity of the Vps21 Rab GTPase. In: *J. Cell. Sci.* 125 (Pt 21), S. 5208–5220.
- Rusten, Tor Erik; Simonsen, Anne (2008):** ESCRT functions in autophagy and associated disease. In: *Cell Cycle* 7 (9), S. 1166–1172.
- Rusten, Tor Erik; Stenmark, Harald (2009a):** How do ESCRT proteins control autophagy? In: *J. Cell. Sci.* 122 (Pt 13), S. 2179–2183.
- Rzomp, Kimberly A.; Scholtes, Luella D.; Briggs, Benjamin J.; Whittaker, Gary R.; Scidmore, Marci A. (2003):** Rab GTPases are recruited to chlamydial inclusions in both a species-dependent and species-independent manner. In: *Infect. Immun.* 71 (10), S. 5855–5870.
- Sahu, Ranjit; Kaushik, Susmita; Clement, Cristina C.; Cannizzo, Elvira S.; Scharf, Brian; Follenzi, Antonia et al. (2011):** Microautophagy of cytosolic proteins by late endosomes. In: *Dev. Cell* 20 (1), S. 131–139.
- Sakaguchi, Takemasa; Kato, Atsushi; Sugahara, Fumihiko; Shimazu, Yukie; Inoue, Makoto; Kiyotani, Katsuhiko et al. (2005):** AIP1/Alix is a binding partner of Sendai virus C protein and facilitates virus budding. In: *J. Virol.* 79 (14), S. 8933–8941.
- Saksena, Suraj; Emr, Scott D. (2009):** ESCRTs and human disease. In: *Biochem. Soc. Trans.* 37 (Pt 1), S. 167–172.
- Sambrook, Joseph; Fritsch, Edward F.; Maniatis, Thomas P.; Russell, David W.; Green, Michael R. (NY : Cold Spring Harbor Laboratory Press):** Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sandoval, Carolina Ortiz; Simmen, Thomas (2012):** Rab proteins of the endoplasmic reticulum: functions and interactors. In: *Biochem. Soc. Trans.* 40 (6), S. 1426–1432.
- Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A. R. (1977):** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74 (12), S. 5463–5467.
- Scheffner, Martin; Staub, Olivier (2007):** HECT E3s and human disease. In: *BMC Biochem.* 8 Suppl 1, S. S6.
- Shaid, S.; Brandts, C. H.; Serve, H.; Dikic, I. (2013):** Ubiquitination and selective autophagy. In: *Cell Death Differ.* 20 (1), S. 21–30.
- Shaw, G. (1996):** The pleckstrin homology domain: an intriguing multifunctional protein module. In: *Bioessays* 18 (1), S. 35–46.

- Sheff, D. R.; Daro, E. A.; Hull, M.; Mellman, I. (1999):** The receptor recycling pathway contains two distinct populations of early endosomes with different sorting functions. In: *J. Cell Biol.* 145 (1), S. 123–139.
- Slagsvold, Thomas; Aasland, Rein; Hirano, Satoshi; Bache, Kristi G.; Raiborg, Camilla; Trambaiolo, Daniel et al. (2005):** Eap45 in mammalian ESCRT-II binds ubiquitin via a phosphoinositide-interacting GLUE domain. In: *J. Biol. Chem.* 280 (20), S. 19600–19606.
- Slagsvold, Thomas; Pattni, Krupa; Malerød, Lene; Stenmark, Harald (2006):** Endosomal and non-endosomal functions of ESCRT proteins. In: *Trends Cell Biol.* 16 (6), S. 317–326.
- Solinger, Jachen A.; Spang, Anne (2013):** Tethering complexes in the endocytic pathway: CORVET and HOPS. In: *FEBS J.*
- Sönnichsen, B.; Renzis, S. de; Nielsen, E.; Rietdorf, J.; Zerial, M. (2000):** Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of Rab4, Rab5, and Rab11. In: *J. Cell Biol.* 149 (4), S. 901–914.
- Spoden, Gilles; Freitag, Kirsten; Husmann, Matthias; Boller, Klaus; Sapp, Martin; Lambert, Carsten; Florin, Luise (2008):** Clathrin- and caveolin-independent entry of human papillomavirus type 16--involvement of tetraspanin-enriched microdomains (TEMs). In: *PLoS ONE* 3 (10), S. e3313.
- Stenmark, H.; Olkkonen, V. M. (2001):** The Rab GTPase family. In: *Genome Biol.* 2 (5), S. REVIEWS3007.
- Stoynova, Ludmila; Solórzano, Ramona; Collins, Elaine D. (2004):** Generation of large deletion mutants from plasmid DNA. In: *BioTechniques* 36 (3), S. 402-4, 406.
- Strack, Bettina; Calistri, Arianna; Craig, Stewart; Popova, Elena; Göttlinger, Heinrich G. (2003):** AIP1/ALIX is a binding partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 functioning in virus budding. In: *Cell* 114 (6), S. 689–699.
- Sun, Jim; Deghmane, Ala-Eddine; Soualhine, Hafid; Hong, Thomas; Bucci, Cecilia; Solodkin, Anna; Hmama, Zakaria (2007):** Mycobacterium bovis BCG disrupts the interaction of Rab7 with RILP contributing to inhibition of phagosome maturation. In: *J. Leukoc. Biol.* 82 (6), S. 1437–1445.
- Sun, Qiming; Westphal, Wiebke; Wong, Kwun Ngok; Tan, Irena; Zhong, Qing (2010):** Rubicon controls endosome maturation as a Rab7 effector. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107 (45), S. 19338–19343.
- Takatsu, H.; Sakurai, M.; Shin, H. W.; Murakami, K.; Nakayama, K. (1998):** Identification and characterization of novel clathrin adaptor-related proteins. In: *J. Biol. Chem.* 273 (38), S. 24693–24700.
- Touchot, N.; Chardin, P.; Tavitian, A. (1987):** Four additional members of the ras gene superfamily isolated by an oligonucleotide strategy: molecular cloning of YPT-related cDNAs from a rat brain library. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84 (23), S. 8210–8214.
- Treier, M.; Staszewski, L. M.; Bohmann, D. (1994):** Ubiquitin-dependent c-Jun degradation in vivo is mediated by the delta domain. In: *Cell* 78 (5), S. 787–798.
- Urwin, Hazel; Authier, Astrid; Nielsen, Jorgen E.; Metcalf, Daniel; Powell, Caroline; Froud, Kristina et al. (2010):** Disruption of endocytic trafficking in frontotemporal dementia with CHMP2B mutations. In: *Hum. Mol. Genet.* 19 (11), S. 2228–2238.

- van der Sluijs, P.; Hull, M.; Webster, P.; Mâle, P.; Goud, B.; Mellman, I. (1992):** The small GTP-binding protein rab4 controls an early sorting event on the endocytic pathway. In: *Cell* 70 (5), S. 729–740.
- van Niel, Guillaume; Porto-Carreiro, Isabel; Simoes, Sabrina; Raposo, Graça (2006):** Exosomes: a common pathway for a specialized function. In: *J. Biochem.* 140 (1), S. 13–21.
- Vanlandingham, Phillip A.; Ceresa, Brian P. (2009a):** Rab7 regulates late endocytic trafficking downstream of multivesicular body biogenesis and cargo sequestration. In: *J. Biol. Chem.* 284 (18), S. 12110–12124.
- Volpers, C.; Sapp, M.; Snijders, P. J.; Walboomers, J. M.; Streeck, R. E. (1995):** Conformational and linear epitopes on virus-like particles of human papillomavirus type 33 identified by monoclonal antibodies to the minor capsid protein L2. In: *J. Gen. Virol.* 76 (Pt 11), S. 2661–2667.
- Vonderheit, Andreas; Helenius, Ari (2005):** Rab7 associates with early endosomes to mediate sorting and transport of Semliki forest virus to late endosomes. In: *PLoS Biol.* 3 (7), S. e233.
- Wang, T.; Dowal, L.; El-Maghrabi, M. R.; Rebecchi, M.; Scarlata, S. (2000):** The pleckstrin homology domain of phospholipase C-beta(2) links the binding of gbetagamma to activation of the catalytic core. In: *J. Biol. Chem.* 275 (11), S. 7466–7469.
- Wang, Tuanlao; Hong, Wanjin (2006):** RILP interacts with VPS22 and VPS36 of ESCRT-II and regulates their membrane recruitment. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 350 (2), S. 413–423.
- White, Ian J.; Bailey, Lorna M.; Aghakhani, Minoo Razi; Moss, Stephen E.; Futter, Clare E. (2006):** EGF stimulates annexin 1-dependent inward vesiculation in a multivesicular endosome subpopulation. In: *EMBO J.* 25 (1), S. 1–12.
- Wollert, Thomas; Hurley, James H. (2010):** Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes. In: *Nature* 464 (7290), S. 864–869.
- Wright, Michelle H.; Berlin, Ilana; Nash, Piers D. (2011):** Regulation of endocytic sorting by ESCRT-DUB-mediated deubiquitination. In: *Cell Biochem. Biophys.* 60 (1-2), S. 39–46.
- Wurmser, A. E.; Sato, T. K.; Emr, S. D. (2000):** New component of the vacuolar class C-Vps complex couples nucleotide exchange on the Ypt7 GTPase to SNARE-dependent docking and fusion. In: *J. Cell Biol.* 151 (3), S. 551–562.
- Zizioli, D.; Meyer, C.; Guhde, G.; Saftig, P.; Figura, K. von; Schu, P. (1999):** Early embryonic death of mice deficient in gamma-adaptin. In: *J. Biol. Chem.* 274 (9), S. 5385–5390.

# Publikationen und Kongressbeiträge

## Publikationen

### **Role of human sec63 in modulating the steady-state levels of multi-spanning membrane proteins**

Mades A, Gotthardt K, Awe K, Steiler J, Döring T, Fuser S, Prange R  
PLoS One 2012;7(11) e49243

### **Revisiting the wax plants (*Hoya*, Marsdenieae, Apocynaceae): Phylogenetic tree using the *matK* gene and *psbA-trnH* intergenic spacer**

Wanntorp, Livia; Gotthardt, Katherina; Müllner, Alexandra N.  
Taxon 2011; Vol. 60 Nr.1 4-14 (11)

### **$\gamma$ 2-Adaptin is functioning in the late endosomal sorting pathway and interacts with ESCRT-I and -III subunits**

Döring T, Gotthardt K, Stieler J, Prange R  
Biochim Biophys Acta 2010 Nov;1803(11):1252-64

## Kongressbeiträge

Posterpräsentation 21<sup>st</sup> Annual Meeting of the GfV (German Society for Virology) and the DVV, Freiburg, 23.-26.03. 2011  
**Alix regulates egress of hepatitis B virus naked capsid particles in an ESCRT-independent manner**

Vortrag 8<sup>th</sup> Workshop, Cell Biology of Viral Infections, German Society of Virology, Deidesheim, 29.09.-01.10.2010  
 **$\gamma$ 2-Adaptin is functioning in the late endosomal sorting pathway and interacts with ESCRT-I and -III subunits**

Vortrag 1<sup>st</sup> international symposium: protein trafficking in health and disease, Hamburg, 26-28.03.2010  
 **$\gamma$ 2-Adaptin is functioning in the late endosomal sorting pathway and interacts with ESCRT-I and -III subunit**

# Lebenslauf

# Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, Katherina Kirsten Gotthardt, gemäß Paragraph 11 Absatz 3d der Promotionsordnung vom 22.12.2003, dass ich die jetzt als Dissertation vorgelegte Arbeit selbst angefertigt und alle benutzten Hilfsmittel in der Arbeit angegeben habe.

Mainz, den \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Katherina Kirsten Gotthardt

# Danksagung