

**Aus dem Experimental and Clinical Research Center
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin**

DISSERTATION

**Freisetzung von HIV-1-Gag und die Rolle der ESCRT-Proteine
- Studien mit Hefe und humanen Zellen**

**zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)**

**vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin**

von

Birgit Meußner

aus Berlin

Datum der Promotion: 26.06.2022

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:

Birgit Meusser, Bettina Purfuerst, and Friedrich C. Luft. HIV-1 Gag release from yeast reveals ESCRT interaction with the Gag N-terminal protein region. *J Biol Chem.* 2020; 295(52):17950-17972.

Innerhalb der Dissertation sind die Inhalte der oben genannten Publikation nicht zusätzlich als Zitate gekennzeichnet.

This research was originally published in the *Journal of Biological Chemistry*. Birgit Meusser, Bettina Purfuerst, and Friedrich C. Luft. HIV-1 Gag release from yeast reveals ESCRT interaction with the Gag N-terminal protein region. *J Biol Chem.* 2020; 295(52):17950-17972. © the American Society for Biochemistry and Molecular Biology or © the Authors.

Inhaltsverzeichnis

1. Abbildungsverzeichnis	5
2. Tabellenverzeichnis	6
3. Abkürzungsverzeichnis	7
4. Zusammenfassung / Abstract	9
5. Einleitung	11
5.1. Gag und die Freisetzung von HIV-1-Virionen aus der Wirtszelle	11
5.2. Die ESCRT-Proteine	13
5.3. Die Funktion der ESCRT-Proteine bei der HIV-1-Freisetzung	15
5.4. Ist ein Hefemodell für die Analyse von Mechanismen der HIV-1-Freisetzung nützlich?	16
6. Material und Methodik	18
6.1. Hefe - Standardtechniken	18
6.1.1. Anzucht	18
6.1.2. Ernte	18
6.1.3. Transformation	18
6.1.4. Präparation von genomischer DNA	19
6.2. <i>E. coli</i> - Standardtechniken	19
6.2.1. Anzucht	19
6.2.2. Ernte	19
6.2.3. Transformation	19
6.3. HEK293-Zellen - Standardtechniken	20
6.3.1. Anzucht	20
6.3.2. Transfektion	20
6.3.3. Ernte	20
6.4. Plasmide und Plasmidkonstruktion	20
6.4.1. Konstruktion der kodierenden Sequenzen für Gagmutanten und Gagfragmente	20
6.4.2. Plasmide für die Proteinexpression in Hefe	26
6.4.3. Plasmide für die Proteinexpression in <i>E. coli</i>	26
6.4.4. Plasmide für die Proteinexpression in HEK293-Zellen	26
6.5. Hefestämme und Konstruktion von Hefestämmen	27
6.5.1. Deletionsmutanten	27
6.5.2. Genomisch kodierte epitopmarkierte ESCRT-Proteine	27
6.6. PCR und Klonierungen	29
6.7. Immunoblot	30
6.8. Experimente mit Hefe	31
6.8.1. Präparation von Totallysaten	31
6.8.2. Präparation von Membran- und Zytosolfractionen	31
6.8.3. Differenzielle Zentrifugation	31
6.8.4. Koimmunpräzipitation	32
6.8.5. Gag-GFP-Freisetzungssassay	32
6.8.6. Gag-GFP-Membranbindung nach Gag-GFP-Expressionsinduktion	32
6.8.7. Fluoreszenzmikroskopie	32
6.8.8. Elektronenmikroskopie	33
6.9. Experimente mit HEK293-Zellen	33
6.9.1. Koimmunpräzipitation	33
6.9.2. Gag-GFP-Freisetzungssassay	33
6.10. GST-Pull-down	34

6.11. Ergänzende Tabelle: PCR-Primer	34
7. Ergebnisse	37
7.1. Die Expression von Gag-GFP in Hefe	37
7.2. Die Gag-GFP-Freisetzung aus Hefesphäroplasten	39
7.3. Die Gag-GFP-Freisetzung aus Hefesphäroplasten ist ESCRT-abhängig	41
7.4. Gag bindet an ESCRT-Proteine der Hefe.....	43
7.5. ESCRT-Proteine aus Hefe und humanen Zellen binden an die aminoternale Proteinregion von Gag.	46
7.6. Die Bindung von ESCRT-Proteinen der Hefe an MA wird durch Mutation eines hydrophoben Bereichs auf der MA-Oberfläche reduziert.	48
7.7. Mutationen in der aminoternalen Proteinregion von Gag reduzieren die Bindung an ESCRT-Proteine der Hefe.	52
7.8. Mutationen in MA, die die Gag-ESCRT-Interaktion reduzieren, steigern die Plasmamembranbindung von Gag-GFP und die Gag-GFP-Freisetzung aus Hefe.....	54
7.9. Die MA3*-bedingte Steigerung der Gag-GFP-Freisetzung ist ESCRT-abhängig.....	57
7.10. Ergänzende Abbildungen	62
8. Diskussion.....	84
9. Literaturverzeichnis	91
10. Eidesstattliche Versicherung / Anteilserklärung.....	98
11. Lebenslauf	100
12. Publikationsliste.....	100
13. Danksagung.....	101

1. Abbildungsverzeichnis

1	Gag ist der Polyproteinvorläufer für die Strukturproteine von HIV-1 und spielt die zentrale Rolle bei der Assemblierung und Freisetzung neuer Virionen. (schematische Darstellung)	12
2	Das carboxyterminale p6-Peptid von Gag rekrutiert zwei ESCRT-Proteine. Im MVB-Weg induzieren ESCRT-Proteine die Bildung intraluminaler endosomaler Vesikel. (schematische Darstellung)	14
3	Strategien zur Konstruktion der kodierenden Sequenzen für Gag-GFP-Versionen (schematische Darstellung)	21
4	Strategien zur Manipulation von Genen der Hefe (schematische Darstellung)	28
5	Expression von Gag-GFP in Hefe	38
6	Hefesphäroplasten setzen Gag-GFP in einer sedimentierbaren Form frei, die 0,45 µm große Poren passieren kann. Die Freisetzung ist spezifisch für Gag-GFP und abhängig von dessen Myristylmodifikation.	41
7	Die Gag-GFP-Freisetzung aus Hefesphäroplasten ist ESCRT-abhängig.	42
8	Schematische Darstellung der verwendeten Bindungsassays	44
9	ALIX und TSG101 binden an MA. Die relative Affinität für MA verglichen mit p6 ist für ALIX höher.	45
10	ESCRT-Proteine der Hefe binden an die aminoternale Proteinregion von Gag.	47
11	Die Mutation eines hydrophoben Bereichs auf der MA-Oberfläche, der aus Leu-31, Val-35 und Trp-36 besteht, reduziert die Bindung von Bro1 und Vps23 an MA. Bro1 bindet über NCA an CA.	50
12	Die MA3*-Mutation reduziert die Koimmunopräzipitation von Bro1 und Vps23 mit MA. Schematische Darstellung von Erklärungsmöglichkeiten	51
13	Mutationen in der aminoternalen Proteinregion von Gag reduzieren die Interaktion von Gag mit Bro1 und Vps23.	53
14	Schematische Darstellung der Ergebnisse aus den Bindungsassays	54
15	Mutationen in einem hydrophoben Bereich auf der MA-Oberfläche steigern die Bindung von Gag-GFP an die Plasmamembran und die Gag-GFP-Freisetzung aus Hefe.	55
16	MA3* steigert die Bindung von MA-GFP an die Plasmamembran. ESCRT-Deletionsmutanten zeigen diesen Effekt nicht.	57
17	Die MA3*-Mutation reduziert die Bindung von MA an Vps23 und Bro1 und steigert die Bindung an die Plasmamembran. Schematische Darstellung von Erklärungsmöglichkeiten	58
18	Die gesteigerte Freisetzung von Gag(MA3*)-GFP aus Hefe ist ESCRT-abhängig. MA3* steigert die Gag-GFP-Freisetzung aus HEK293-Zellen, abhängig von der ALIX-Bindungsstelle in p6 und den Aminosäuren 126 bis 277 (in ΔNCA deletiert).	60
19	Die MA3*-Mutation reduziert die Bindung von MA an Vps23 und Bro1, erhöht die Plasmamembranbindung von Gag-GFP und steigert ESCRT-abhängig die Gag-GFP-Freisetzung. Schematische Darstellung eines Modells zur Erklärung dieser Beobachtungen	61
20	Erklärungsmodell für die Ergebnisse zur Gag-ALIX-Interaktion (schematische Darstellung)	88
Ergänzende Abbildungen:		
E1	Bro1-3HA, Bro1-9Myc und Vps23-9Myc sind im CPS-Transport-Assay funktionell.	62
E2	Fluoreszenzmikroskopie von Gag-GFP in Hefe	63
E3	Fluoreszenzmikroskopie von Gag-GFP in Hefe	64
E4	Fluoreszenzmikroskopie von Gag(G2A)-GFP in Hefe	65
E5	Elektronenmikroskopie, Kunstharzschnitte, Gag-GFP in Hefe und Negativkontrolle	66
E6	Elektronenmikroskopie, Kunstharzschnitte, Gag-GFP in Hefe und Negativkontrolle	67
E7	Elektronenmikroskopie, Kryoschnitte, Immunogoldfärbung von Gag-GFP in Hefe, YWO1	68
E8	Elektronenmikroskopie, Kryoschnitte, Immunogoldfärbung, Hefe mit leerem Vektor (Negativkontrolle)	69
E9	Gag-GFP-Freisetzungsassays mit Hefe, Gag-GFP versus Gag(G2A)-GFP, MET3-Promotor, 2µ-Vektor; Gag-GFP, MET3-Promotor, 2µ-Vektor versus ARS/CEN-Vektor	69
E10	Gag-GFP-Freisetzungsassays mit ESCRT-Deletionsmutanten der Hefe, Gag-GFP-Expression vom PGK- oder MET3-Promotor; Gag-GFP-Membranbindung nach Gag-GFP-Expressionsinduktion	70
E11	Vergleich der Proteinsequenzen von ALIX und Bro1	71
E12	Vergleich der Proteinsequenzen von TSG101 und Vps23	72
E13	Vergleich von ESCRT-Proteinen mit verschiedenen Epitopmarkierungen in Bindungsassays	73
E14	Koimmunopräzipitationsexperimente, mit Gagfragmenten und ESCRT-Proteinen der Hefe; mit Gagversionen mit mutiertem p6 und humanen ESCRT-Proteinen, 400 mM NaCl	74
E15	Fluoreszenzmikroskopie von Gag(Δ8-87)-GFP in Hefe	75
E16	Beispiele der Koimmunopräzipitationsexperimente, die zur Charakterisierung der MA-Bro1-Interaktion durchgeführt wurden	76
E17	Koimmunopräzipitationsexperimente mit MA oder Gag und Bro1 oder Vps23 bei Deletion von VPS23 oder BRO1	77

E18	Charakterisierung von Gag-GFP mit Aminosäureaustauschen in einem hydrophoben Bereich auf der MA-Oberfläche und Deletion der Aminosäuren 126-277 (Δ NCA), Präparation von membranhaltigen Sedimenten, Gag-GFP-Freisetzungsassays, Koimmunpräzipitation	78
E19	Fluoreszenzmikroskopie von Gag(MA3*)-GFP in Hefe	79
E20	Fluoreszenzmikroskopie von Gag(Δ NCA)-GFP in Hefe	80
E21	Fluoreszenzmikroskopie von MA3*-GFP in Hefe	81
E22	Freisetzung von Gag-GFP versus Gag(MA3*)-GFP oder versus Gag(Δ NCA)-GFP aus ESCRT-Deletionsmutanten der Hefe; Freisetzung von Gag-GFP-Versionen mit MA3*-, Δ NCA- und p6A*-Mutation aus HEK293-Zellen	82

2. Tabellenverzeichnis

1	Plasmide	22
2	Hefestämme	29
3	Vergleich der Ergebnisse aus Bindungs- und Freisetzungsassays mit Hefe und HEK293-Zellen	61
Ergänzende Tabelle:		
E1	PCR-Primer	34

3. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung / Abbildungen
ALIX	ALG2-interacting protein X
ARS/CEN	autonomously replicating sequence / centromeric sequence
BD	Becton Dickinson
BRO	BCK-like resistance to osmotic shock
BSA	bovine serum albumin
CA	Capsid
CCA	carboxyterminale Domäne von CA
CD	cluster of differentiation
CMV	Cytomegalovirus
COP	coat protein complex
CPS	Carboxypeptidase S
CRISPR/CAS	clustered regularly interspaced short palindromic repeats / CRISPR-associated
CYC	cytochrome C
Δ	Deletion
Da	Dalton
DIC	differential interference contrast
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DNA	deoxyribonucleic acid
ΔNCA	Deletion der Aminosäuren 126 bis 277 von Gag
dNTPs	Desoxynukleotidtriphosphate
DOA	Degradation of alpha
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	enhanced green fluorescent protein
EIAV	equine infectious anemia virus
EM	Elektronenmikroskopie
EMP	endomembrane protein
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESCRT	endosomal sorting complex required for transport
g	Erdbeschleunigung 9,81 m/s ²
Gag	group-specific antigen
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	green fluorescent protein
GST	Glutathion-S-Transferase
HA	Hämagglutinin
HEK	human embryonic kidney
HeLa	Henrietta Lacks
HIS	histidine
HIV	human immunodeficiency virus
HPLC	high performance liquid chromatography
HRS	hepatocyte growth factor-regulated tyrosine substrate
HSE	Has symptoms of class E mutants
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactosid
LB	Lysogeny Broth
LEU	leucine biosynthesis
MA	Matrix
MA3*	MA(L31R, V35E, W36A)
MET	methionine requiring
MVB	multi-vesicular body
NC	Nucleocapsid
NCA	aminoternale Domäne von CA
NEB	New England Biolabs

NMR	nuclear magnetic resonance
Myc	myelocytomatosis
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
ORF	open reading frame
p6A	ALIX-Bindungsstelle in p6
p6A*	mutierte ALIX-Bindungsstelle in p6, L489A
p6T	TSG101-Bindungsstelle in p6
p6T*	mutierte TSG101-Bindungsstelle in p6, P455L, P458L
PAR	o-phenanthroline resistant
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PDB	protein database
PGK	3-Phosphoglyceratkinase
pH	pondus Hydrogenii
PI(4,5)P ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PRR	proline rich region
RNA	ribonucleic acid
<i>S. castelli</i>	<i>Saccharomyces castelli</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SD	synthetic dextrose
SDS	sodium dodecyl sulfate
SOC	super optimal broth with catabolite repression
siRNA	small interfering RNA
SNF	Sucrose nonfermenting
TBT	Tris buffered Tween
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRP	Tryptophan
TSG	tumor susceptibility gene
UBD	ubiquitin-binding domain
UEV	ubiquitin E2 variant
VLP	virus-like particle
VMD	visual molecular dynamics
VPS	vacuolar protein sorting
WT	Wildtyp
X-GAL	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid
YPD	yeast extract peptone dextrose

Der Ein- und Drei-Buchstaben-Code für Aminosäuren, internationale Einheiten physikalischer Größen, Elementsymbole und die chemischen Formeln gängiger anorganischer Laborchemikalien werden als bekannt vorausgesetzt.

4. Zusammenfassung / Abstract

Gag, der Polyproteinvorläufer der HIV-1-Strukturproteine, assembliert an der Plasmamembran der Wirtszelle neue Virionen, die mithilfe zellulärer ESCRT-Proteine freigesetzt werden. Zwei ESCRT-Proteine, TSG101 und ALIX, binden an das carboxyterminale p6-Peptid von Gag. Die Bindung von TSG101 ist für eine effiziente Virusfreisetzung wichtig. Der Mechanismus, über den ESCRT-Proteine die Virusfreisetzung unterstützen, ist aber wenig verstanden. Die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* hat als zellbiologischer Modellorganismus wesentlich zur Charakterisierung der zellulären ESCRT-Funktion beigetragen. Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, ob ein Hefemodell zur Analyse von Mechanismen der Virusfreisetzung nützlich sein kann. Die Freisetzung von Gag in Form virusähnlicher Partikel aus Hefesphäroplasten war beschrieben. Die Gagfreisetzung nach dem publizierten Protokoll war aber ESCRT-unabhängig. Im Hefemodell dieser Arbeit war die Gag-GFP-Freisetzung aus Sphäroplasten von ESCRT-Deletionsmutanten stark reduziert. Mit Koimmunpräzipitations- und GST-Pull-down-Experimenten wurde die Bindung von Gag an zwei ESCRT-Proteine der Hefe, Vps23 und Bro1, den Homologen zu TSG101 und ALIX, untersucht. Dabei wurde eine bis dahin unbekannte Interaktion zwischen ESCRT-Proteinen und der aminoterminalen Proteinregion von Gag entdeckt. Davon ausgehend wurden Mutationen in der plasmamembranbindenden Matrix-Domäne von Gag gesucht, die diese Interaktion reduzieren. Mit Fluoreszenzmikroskopie und der Präparation membranhaltiger Zentrifugationssedimente wurde die Plasmamembranassoziation von Gag-GFP mit entsprechenden Mutationen analysiert. Die Mutation der Matrix-Domäne verstärkte die Membranbindung und ESCRT-abhängig die Freisetzung von Gag-GFP. In Übereinstimmung damit steigerte die Mutation die Gag-GFP-Freisetzung aus humanen HEK293-Zellen. In GST-Pull-down-Experimenten präzipitierten auch ALIX und TSG101 mit Matrix. Die Bindung an Matrix im Verhältnis zum p6-Peptid war für ALIX stärker als für TSG101. Passend zu diesem Ergebnis war die gesteigerte Gag-GFP-Freisetzung aus HEK293-Zellen bei Mutation der Matrix-Domäne teilweise von der ALIX-Bindungsstelle in p6 abhängig, obwohl die Mutation der ALIX-Bindungsstelle keinen Einfluss auf die Freisetzung von Gag-GFP zeigte.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind durch ein Modell erklärbar, in dem eine transiente Matrix-ESCRT-Interaktion bei Bindung von Gag an die Plasmamembran gelöst wird. Dieser Schritt könnte die in der Interaktion mit Matrix inaktiven ESCRT-Proteine in einen aktiven Zustand überführen und dazu beitragen, die ESCRT-Funktion mit der Gagassemblierung zu koordinieren.

The HIV-1 structural polyprotein Gag assembles at the host cell plasma membrane and drives virion budding, assisted by the cellular ESCRT proteins. Two ESCRT proteins, TSG101 and ALIX, bind to the Gag C-terminal p6 peptide. TSG101 binding is important for efficient HIV-1 release, but how ESCRTs contribute to the budding process is poorly understood. The baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*, a model organism in cell biology, has been used to characterize the cellular ESCRT function. This work analyzes whether a yeast model can be useful to study the mechanisms of HIV-1 release. Previous work reported Gag budding from yeast spheroplasts, but Gag release was ESCRT independent. In this work, spheroplasts of yeast ESCRT knockout mutants strongly diminished Gag-GFP release. I used GST-pulldown and coimmunoprecipitation experiments to characterize the interaction of Gag with Vps23 and Bro1, the yeast homologs of TSG101 and ALIX. I identified a previously unknown interaction between ESCRT proteins and the Gag N-terminal protein region. Subsequently, I searched for mutants in the Gag-plasma membrane-binding matrix domain that reduced this interaction. By using fluorescence microscopy and preparing membrane-containing centrifugation sediments, I analyzed the plasma membrane binding of corresponding Gag-GFP mutants. Matrix mutation increased Gag-GFP release in an ESCRT-depend-

ent manner and Gag-GFP-plasma membrane binding. Similarly, matrix mutation enhanced Gag-GFP release from human HEK293 cells. In GST-pulldown experiments, ALIX and TSG101 also precipitated with matrix. The relative affinity for matrix compared with p6 was higher for ALIX than for TSG101. Accordingly, enhancement of Gag-GFP release by matrix mutation partly depended on ALIX binding to p6, although ALIX-binding site mutation did not impair release of Gag-GFP.

The results fit with a model in which a transient matrix-ESCRT interaction is replaced when Gag binds to the plasma membrane. This step may activate ESCRT proteins the activity of which was blocked by binding to matrix. Thereby, this mechanism may coordinate ESCRT function with virion assembly.

5. Einleitung

5.1. Gag und die Freisetzung von HIV-1-Virionen aus der Wirtszelle

Viren sind für ihre Vermehrung auf Wirtszellen angewiesen. Die Charakterisierung der Interaktion von Virus und Wirtszelle kann neben der Entdeckung interessanter biochemischer Mechanismen auch zur Grundlage der Entwicklung antiviraler Therapien dienen. Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, wie das humane Immundefizienzvirus HIV-1 die zelluläre „Infrastruktur“ zur Freisetzung neuer Virionen aus der Wirtszelle benutzt.

Das HIV-1-Virion besitzt eine Membranhülle, die drei Strukturproteine, MA (Matrix), CA (Capsid) und NC (Nucleocapsid), das RNA-Genom und Enzyme umschließt (Übersicht zum Aufbau des HIV-1-Virions in Briggs und Kräusslich, 2011) (Abb. 1B). MA bildet eine äußere Schale unterhalb der Virus-hülle. Das Kapsid besteht aus einem CA-Multimer und enthält das mit NC assoziierte Genom. Bei der Infektion interagieren die Hüllproteine mit zwei Oberflächenproteinen der Wirtszelle, CD4 und einem Chemokinrezeptor (Übersicht zum HIV-1-Eintritt in die Wirtszelle in Chen, 2019). In der Folge fusioniert die Virushülle mit der zellulären Plasmamembran und die anderen Virusbestandteile werden in die Wirtszelle aufgenommen. Nach der reversen Transkription des viralen RNA-Genoms im Zytosol und der Integration der resultierenden DNA-Kopie in das Wirtszellgenom werden Proteine und RNA-Genome für neue Virionen synthetisiert (Übersicht zur reversen Transkription in Hughes, 2015; Übersicht zur Integration in Lusic und Siliciano, 2017). Diese Komponenten assemblieren an der Plasmamembran und werden dort von einer Hülle umschlossen, die aus Bestandteilen der Plasmamembran und den viralen Hüllproteinen besteht (Übersicht zur HIV-1-Assemblierung, -Freisetzung und -Reifung in Freed, 2015).

Die zentrale Rolle bei der Virusassemblierung und -freisetzung spielt Gag, der Polyproteinvorläufer für die HIV-1-Strukturproteine (Abb. 1A). Gag exprimierende Zellen setzen VLPs (virus-like particles) frei, die morphologisch unreifen Virionen (siehe unten) entsprechen (Gheysen et al., 1989). Im Zytosol beginnt Gag zu oligomerisieren (Kutluay und Bieniasz, 2010). Multimere assemblieren an der Plasmamembran (Abb. 1C). Dort streckt sich das zuvor kompakt gefaltete Protein (Datta et al., 2007 und 2011). Der Aminoterminus bindet an die Plasmamembran. Der Carboxyterminus ist in die entgegengesetzte Richtung, zum späteren Zentrum des unreifen Virions hin, orientiert (Wilk et al., 2001). Bestimmte Lipide und Membranproteine reichern sich im Bereich der assemblierten Gagmoleküle in der Plasmamembran an, die Membran wird knospenförmig deformiert und das unreife Virion spaltet sich von der Plasmamembran ab (Sengupta et al., 2019). Die Bildung des reifen Virions wird von der viralen Protease eingeleitet. Die Protease ist Bestandteil des Enzympolyproteinvorläufermoleküls Pol, das aufgrund einer translationalen Leserahmenverschiebung an den carboxyterminalen Bereich von etwa 5% der Gagmoleküle fusioniert ist. Die Protease spaltet Gag in die einzelnen Komponenten, MA, CA und NC, die dann das reife Virion formen (Bendjennat und Saffarian, 2016; Mervis et al., 1988). In Gag bilden diese Komponenten separate Domänen, deren Struktur und intermolekulare Kontakte sich teilweise von denen im reifen Virion unterscheiden (Briggs et al., 2009; Pornillos et al., 2009; Schur et al., 2015). Die aminoterminalen MA-Domäne besteht aus einem globulär gefalteten „Kopf“ und einem carboxyterminalen „Stiel“ (Hill et al., 1996). Es wird vermutet, dass ein Cluster aus basischen Aminosäuren im MA-„Kopf“ durch Bindung an das plasmamembranspezifische Lipid PI(4,5)P₂ (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat) den Kontakt zur Plasmamembran herstellt (Chukkapalli et al., 2008; Ono et al., 2004; Shkriabai et al., 2006). Ein Myristylanker verstärkt die Membranbindung (Bryant und Ratner, 1990; Göttlinger et al., 1989; Mervis et al., 1988). Nach der Entfernung des aminoterminalen Methionins durch eine zelluläre Methioninaminopeptidase katalysiert die zelluläre N-Myristyltransferase die Bindung einer Myristylkette an Gly-2

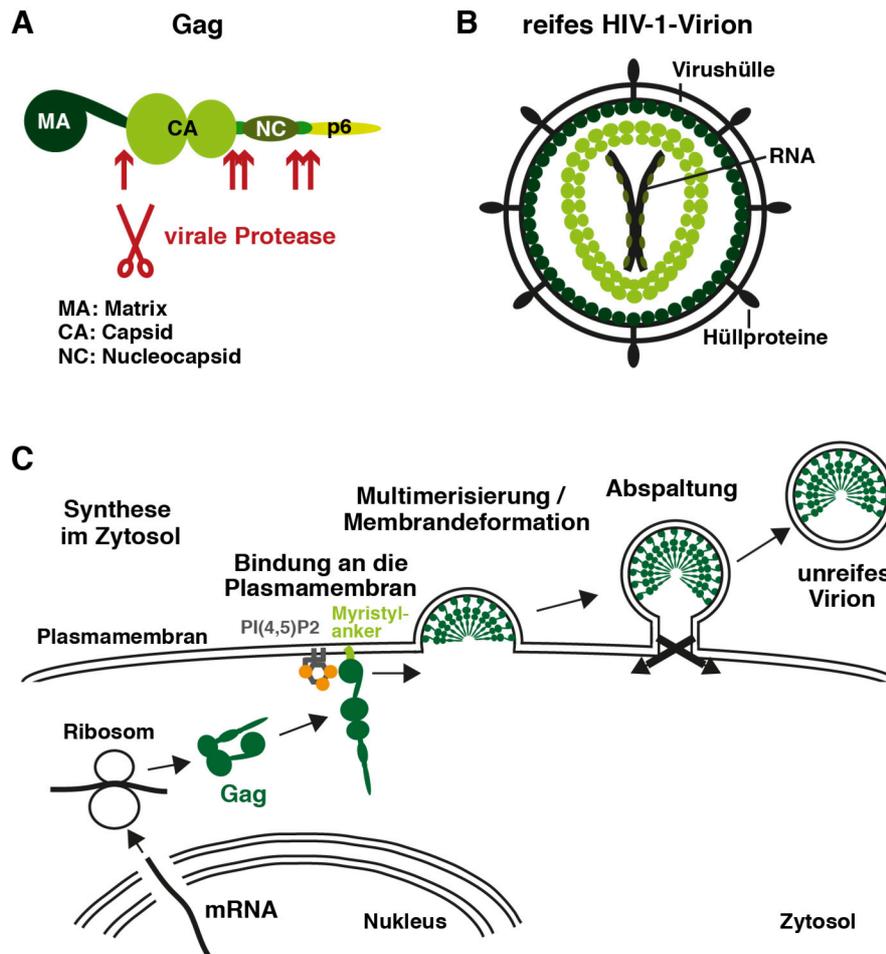


Abbildung 1. Gag ist der Polyproteinvorläufer für die Strukturproteine von HIV-1 und spielt die zentrale Rolle bei der Assemblierung und Freisetzung neuer Virionen. A, schematische Darstellung von Gag. Gag ist der Polyproteinvorläufer für die Strukturproteine von HIV-1, MA, CA und NC, die in Gag separate Domänen bilden. Das carboxyterminale p6-Peptid hat keine strukturelle Funktion. Nach der Assemblierung der unreifen Virionen spaltet die virale Protease Gag in die einzelnen Komponenten. B, schematische Darstellung der Strukturproteine im reifen HIV-1-Virion. MA bildet eine äußere Schale unterhalb der Membranhülle. CA bildet das Capsid, das das mit NC assoziierte RNA-Genom enthält. C, schematische Darstellung der gagvermittelten Assemblierung und Freisetzung von HIV-1-Virionen. Das im Zytosol synthetisierte Gag interagiert über die aminoterminale MA-Domäne mit PI(4,5)P₂ in der Plasmamembran. Eine Myristylierung am Aminoterminus von Gag verstärkt die Plasmamembranbindung. An der Plasmamembran nimmt Gag eine ausgestreckte Konformation an und assembliert das Gerüst des unreifen Virions. Die Plasmamembran wird knospenförmig deformiert und das unreife Virion spaltet sich von der Plasmamembran ab. Die bereits im Zytosol beginnende Oligomerisierung von Gag ist nicht dargestellt. A-C basieren auf der im Text zitierten Literatur.

(Seaton und Smith, 2008; Takamune et al., 2008; Übersicht zu Methioninaminopeptidasen in Bradshaw et al., 1998; Übersicht zur Myristylierung in Boutin, 1997). Im monomeren MA ist die Myristylkette innerhalb des MA-, „Kopfs“ verborgen und wird bei Trimerisierung von MA oder bei Kontakt mit Lipiden exponiert (Saad et al., 2006; Tang et al., 2004; Vlach und Saad, 2013). Interaktionen über die CA- und NC-Domäne sind wichtig für die Oligomerisierung und Multimerisierung von Gag (Bharat et al., 2014; Hendrix et al., 2015). Neben der spezifischen Rekrutierung des viralen RNA-Genoms bindet NC zusätzlich über basische Aminosäuren unspezifisch an RNA, die als Gerüst für die Konzentrierung von Gagmolekülen dient (Cimarelli et al., 2000; Hendrix et al., 2015; Übersicht zur RNA-Beladung des HIV-Virions in Rein, 2019). CA besteht aus zwei Domänen (Schur et al., 2015). Die carboxyterminale Domäne ist für die Assemblierung des unreifen Virionengerüsts notwendig, das aus einem hexameren Gitter besteht (Bharat et al., 2014). Defekte im Gitter ermöglichen die Bildung einer kugelförmigen Struktur (Briggs et al., 2009). Das p6-Peptid am Carboxyterminus von Gag rekrutiert ESCRT(endosomal sorting complex required for transport)-Proteine (Garrus et al., 2001; Martin-Serrano et al., 2001; Strack et al., 2003; VerPlank et al., 2001; von Schwedler et al., 2003b).

5.2. Die ESCRT-Proteine

ESCRT-Proteine sind an verschiedenen membranmodellierenden Prozessen beteiligt (Übersicht zu Funktionen der ESCRT-Proteine in Vietri et al., 2020). Entdeckt wurden sie in genetischen Screenings mit der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* (Robinson et al., 1988; Rothman und Stevens, 1986; Rothman et al., 1989). In diesen Screenings wurde der Proteintransport zur Vakuole, die dem Lysosom in humanen Zellen entspricht, analysiert. In einem Prozess, der MVB(multi-vesicular body)-Weg genannt wird, binden die zytosolischen ESCRT-Proteine an die endosomale Membran und induzieren die Bildung von Vesikeln, die Membranproteine in das Lumen des Endosoms transportieren (Katzmann et al., 2001; Odorizzi et al., 1998) (Abb. 2A). Durch die Fusion von Endosom und Vakuole gelangen die Membranproteine in die Vakuole. Bei der MVB-Vesikel-Bildung wird, wie bei der Freisetzung von HIV-1-Virionen, ein Membranbereich knospenförmig deformiert und anschließend von der Ausgangsmembran abgespalten. Beide Prozesse sind topologisch vergleichbar. Entstehende MVB-Vesikel und HIV-1-Virionen schließen auf der zytosolischen Seite der Membran befindliche Komponenten ein und bilden sich vom Zytosol weg, das heißt, sie werden in das Endosom beziehungsweise in den Extrazellulärraum abgegeben. Das steht im Gegensatz zu vielen intrazellulären Vesikelbildungsprozessen, bei denen Vesikel in das Zytosol abgegeben werden (Übersicht zu COPI-, COPII- und clathrinbeschichteten Vesikeln in Faini et al., 2013). Da beide Vesikelarten mithilfe zytosolischer Proteine entstehen, sind für die Bildung von MVB-Vesikeln und HIV-1-Virionen andere Mechanismen erforderlich als für die Bildung der ins Zytosol abgegebenen Vesikel. Basierend auf Untersuchungen zur Funktion und Struktur der ESCRT-Proteine existieren verschiedene Modelle für ihre Funktionsweise (Übersicht zu Modellen für die Mechanismen der ESCRT-Funktion in Pavlin und Hurley, 2020 und Schöneberg et al., 2017).

Der ESCRT-Apparat der Hefe umfasst vier heterooligomere Kernkomplexe [ESCRT-0 (Vps27 und Hse1), ESCRT-I (Vps23, Vps28, Vps37 und Mvb12), ESCRT-II (Vps22, Vps25 und Vps36) und ESCRT-III (Snf7, Vps2, Vps20 und Vps24)], verschiedene ESCRT-III-ähnliche und -assoziierte Proteine, Bro1, die Ubiquitinhydrolase Doa4 und die AAA-ATPase Vps4, die ESCRT-Komplexe disassembliert (Babst et al., 1998, 2002a und 2002b; Bilodeau et al., 2002; Chu et al., 2006; Dupré und Haguenaer-Tsapis, 2001; Katzmann et al., 2001; Nikko et al., 2003; Odorizzi et al., 2003; Pfitzner et al., 2020) (Abb. 2B). Humane Zellen exprimieren homologe Proteine mit zum Teil mehreren Isoformen (Martin-Serrano et al., 2003; von Schwedler et al., 2003b). ESCRT-III-Proteine polymerisieren zu spiral- und tubusförmigen Strukturen und bewirken wahrscheinlich die Vesikelbildung (Hanson et al., 2008; Henne et al., 2012; Lata et al., 2008). Es wird vermutet, dass membrangebundene Spiralen die Membran deformieren, indem sie ihren Durchmesser oder Torsionswinkel verändern (Banjade et al., 2019; Chiaruttini et al., 2015; Henne et al., 2012; Moser von Filsek et al., 2020). Tubuläre Strukturen könnten ein Innengerüst bilden, das die Formung des Vesikelhalses und die anschließende Vesikelabspaltung erleichtert (Fabrikant et al., 2009). Alternativ könnten ESCRT-III-Filamente durch die Nutzung verschiedener Membranbindungsoberflächen ein Drehmoment generieren, das diese Prozesse ermöglicht (Moser von Filsek et al., 2020). Ob und wie Vps4 zur Membrandeformation beiträgt oder ob es die ESCRT-Komplexe nach der Vesikelbildung nur recycelt, wird kontrovers diskutiert (Adell et al., 2014; Cashikar et al., 2014; Pfitzner et al., 2020; Saksena et al., 2009; Schöneberg et al., 2018; Wollert et al., 2009). Zwei sogenannte „früh agierende“ Faktoren, der ESCRT-I/II-Superkomplex und Bro1, initiieren die Assemblierung von ESCRT-III, initiieren oder stabilisieren eventuell die Krümmung der Membran und erkennen und sammeln die MVB-Substrate durch Bindung an deren Ubiquitinmodifikation (Alam et al., 2004 und 2006; Fisher et al., 2003; Hirano et al., 2006; Im et al., 2009; Kim et al., 2005; Liese et al., 2020; Pashkova et al., 2013; Ren und Hurley, 2010; Shields et al., 2009; Swanson et al., 2003; Tang et al., 2016; Teis et al., 2010; Teo et al., 2004; Wollert und Hurley, 2010). Ubiquitin ist ein kleines Protein, das substrat(klassen)spezifische Ligasen kovalent an Lysine der zu markierenden Proteine binden (Übersicht zum Ubiquitinsystem in

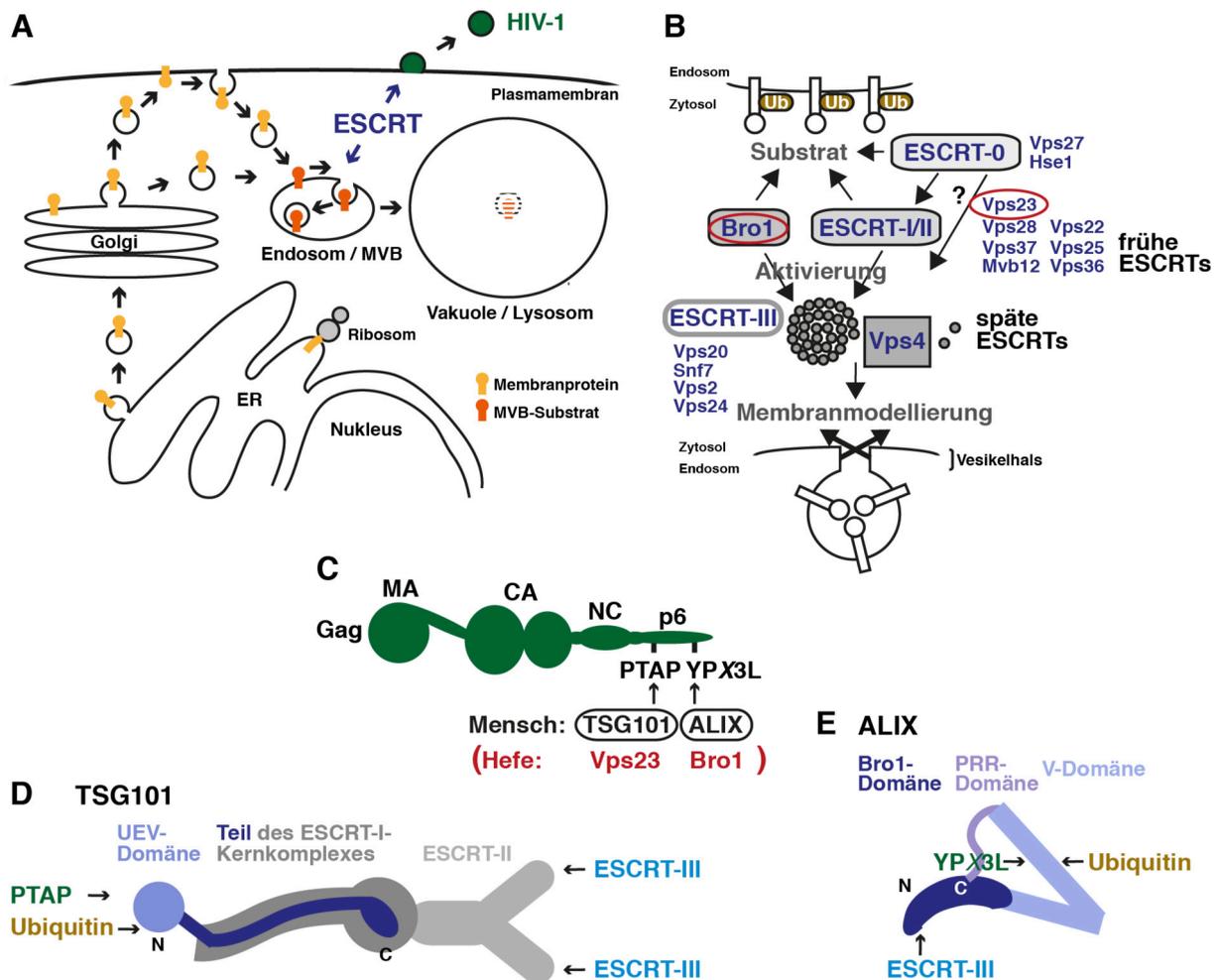


Abbildung 2. Das carboxyterminale p6-Peptid von Gag rekrutiert zwei ESCRT-Proteine. Im MVB-Weg induzieren ESCRT-Proteine die Bildung intraluminärer endosomaler Vesikel. **A**, schematische Darstellung des MVB-Wegs. Membranproteine werden entlang des MVB-Wegs ins Innere der Vakuole (Hefe) beziehungsweise des Lysosoms (humane Zellen) transportiert. Die Membranproteine gelangen vom Golgi-Apparat oder von der Plasmamembran über vesikulären Transport in die äußere Membran des Endosoms. Von der endosomalen Membran spalten sich Vesikel ins Innere des Endosoms ab, die die zu transportierenden Membranproteine enthalten. Ein Endosom, das diese Vesikel enthält, wird als multi-vesicular body (MVB) bezeichnet. Nach Fusion von MVB und Vakuole/Lysosom werden die Vesikel von vakuolären/lysosomalen Enzymen hydrolysiert. Die zytosolischen ESCRT-Proteine binden an die endosomale Membran und induzieren die Bildung der MVB-Vesikel. ESCRT-Proteine sind auch an der Freisetzung von HIV-1-Virionen beteiligt. Die Bildung von MVB-Vesikeln und HIV-1-Virionen ist im Gegensatz zu vielen anderen Vesikelbildungsprozessen vom Zytosol weg gerichtet. **B**, schematische Darstellung des ESCRT-Apparats und seiner Funktionen im MVB-Weg. ESCRT-Proteine erkennen die Transportsubstrate, oft ubiquitinierte Membranproteine, und induzieren die knospenförmige Deformation der endosomalen Membran zur Bildung substrathaltiger Vesikel und deren Abspaltung von der endosomalen Membran. ESCRT-III-Polymere deformieren die Membran. Bro1 und der ESCRT-I/II-Komplex initiieren die ESCRT-III-Polymerisierung. Bro1, ESCRT-I/II und der an ESCRT-I bindende ESCRT-0-Komplex erkennen die Substrate. Das biochemische Korrelat für eine zusätzliche ESCRT-I-unabhängige ESCRT-0-Funktion ist nicht bekannt. **C**, schematische Darstellung der ESCRT-Bindungsmotive in Gag. Das carboxyterminale p6-Peptid rekrutiert die „früh agierenden“ ESCRT-Proteine TSG101 und ALIX, die humanen Homologen von Vps23 und Bro1. Ein PTAP-Motiv bindet an TSG101. Ein YPX₃L-Motiv bindet an ALIX. **A-C** basieren auf der im Text zitierten Literatur. **D**, schematische Darstellung von TSG101. Das PTAP-Motiv und Ubiquitin interagieren unabhängig voneinander mit der aminoterminalen UEV-Domäne. Die carboxyterminale Region von TSG101 bildet zusammen mit den anderen Komponenten des ESCRT-I-Komplexes den ESCRT-I-„Kernkomplex“. Basierend auf Flower et al., 2020; Gill et al., 2007; Im und Hurley, 2008; Im et al., 2009; Kostelansky et al., 2007; Pornillos et al., 2002a; Sundquist et al., 2004. **E**, schematische Darstellung von ALIX. ALIX besteht aus einer aminoterminalen Bro1-Domäne, der zentralen V-Domäne und einer carboxyterminalen prolinreichen Region (PRR). Die Bro1-Domäne bindet an ESCRT-III. Die V-Domäne bindet Ubiquitin und das YPX₃L-Motiv. Basierend auf Dowlatshahi et al., 2012; Fisher et al., 2007; Keren-Kaplan et al., 2013; Lee et al., 2007; McCullough et al., 2008; Zhai et al., 2008 und 2011.

Pickart und Eddins, 2004). Sechs ESCRT-Proteine der Hefe haben UBDs (ubiquitinbindende Domänen) unterschiedlicher Struktur (Alam et al., 2004; Fisher et al., 2003; Pashkova et al., 2013; Ren und Hurley, 2010; Shields et al., 2009; Swanson et al., 2003; Teo et al., 2004). Alle erkennen als zentrales Merkmal einen hydrophoben Bereich auf der Ubiquitinoberfläche. Der ESCRT-0-Komplex trägt über mehrere UBDs zur Erkennung ubiquitinmodifizierter Transportsubstrate bei und rekrutiert den ESCRT-I-Komplex über eine Vps27-Vps23-Interaktion an die endosomale Membran (Bilodeau et al., 2002 und 2003;

Katzmann et al., 2003; Shih et al., 2002; Tang et al., 2016). Außerdem hat ESCRT-0 eine zusätzliche ESCRT-I-unabhängige Funktion im MVB-Weg (Tang et al., 2016).

5.3. Die Funktion der ESCRT-Proteine bei der HIV-1-Freisetzung

Viele Viren benutzen ESCRT-Proteine für ihre Freisetzung (Übersicht in Votteler und Sundquist, 2013). Die verschiedenen viralen Strukturproteine rekrutieren ESCRT-Proteine über ähnliche Peptid-motive. Ein PTAP- und ein YPX₃L-Motiv im carboxyterminalen p6-Peptid von HIV-1-Gag binden an die „früh agierenden“ ESCRT-Proteine TSG101 und ALIX, die humanen Homologen von Vps23 und Bro1 (Garrus et al., 2001; Martin-Serrano et al., 2001; Strack et al., 2003; VerPlank et al., 2001) (Abb. 2C) (siehe auch 7.4.). TSG101 bindet über seine aminoternale ubiquitinbindende UEV(ubiquitin E2 variant)-Domäne an p6, ALIX über seine zentrale ubiquitinbindende V-Domäne (Dowlatshahi et al., 2012; Fisher et al., 2007; Garrus et al., 2001; Keren-Kaplan et al., 2013; Lee et al., 2007; Pornillos et al., 2002a; Sundquist et al., 2004) (Abb. 2, D und E). Da p6 ins Innere des unreifen Virions orientiert ist (siehe 5.1.), ergibt sich die Frage, wie die an p6 gebundenen ESCRT-Proteine Kontakt zur Plasmamembran aufnehmen, um sie zu manipulieren. Es wurde vorgeschlagen, dass auch die NC-Domäne von Gag mit ALIX interagieren kann und ALIX über einen NC-Plasmamembran-Kontakt zur Membran bringt (Sette et al., 2016). Dafür müsste Gag die radspeichenartige Anordnung verlassen.

Experimente mit verschiedenen Methoden, wie der Expression dominant negativer ESCRT-Mutanten, Knockdown mit siRNA, Knockout mit CRISPR/CAS9, Kollokalisierungen mit Fluoreszenzmikroskopie und einem ESCRT-Rekrutierungsassay, legen nahe, dass ESCRT-I, -II und -III, ALIX und VPS4 an der HIV-1-Freisetzung beteiligt sind, obwohl sich die Ergebnisse für manche Komponenten widersprechen (Baumgärtel et al., 2011; Bleck et al., 2014; Carlson und Hurley, 2012; Garrus et al., 2001; Jouvenet et al., 2011; Ku et al., 2014; Langelier et al., 2006; Meng et al., 2015 und 2020; Morita et al., 2011; Pincetic et al., 2008; Strack et al., 2003; Van Engelenburg et al., 2014; von Schwedler et al., 2003b). Während der TSG101-Bindungsstelle in p6 eine wichtige Bedeutung für die HIV-1-Freisetzung zugeordnet wird, ist die Rolle der ALIX-p6-Interaktion rätselhaft. Mutationen der TSG101-Bindungsstelle reduzieren die HIV-1-Freisetzung aus Zellen gängiger Kulturzelllinien stark und ein erhöhter Anteil der noch freigesetzten Virionen hat eine abnorme Morphologie (Fujii et al., 2009; Garrus et al., 2001; Göttlinger et al., 1991). Im Virusfreisetzungsexperiment mit T-Zell-Linien führt die Mutation der TSG101-Bindungsstelle zu einem geringeren oder gar keinem Effekt (Demirov et al., 2002; Dussupt et al., 2011; Fujii et al., 2009). Virusreplikationskinetiken sind aber verzögert. Mutation oder Deletion der ALIX-Bindungsstelle in p6 reduziert die HIV-1-Freisetzung aus verschiedenen Zelllinien nur wenig oder nicht (Bendjennat und Saffarian, 2016; Demirov et al., 2002; Fisher et al., 2007; Fujii et al., 2009; Huang et al., 1995; Zhai et al., 2008). Allerdings ist die Freisetzung von Virionen mit einer Gagversion, der ein großer Teil des MA-„Kopfs“ und die aminoternale Domäne von CA fehlt, stark von der ALIX-Bindungsstelle abhängig (Strack et al., 2003). Ein erhöhter Anteil der Virionen mit mutierter ALIX-Bindungsstelle hat eine abnorme Morphologie und die Mutation führt zu verzögerten Replikationskinetiken in T-Zell-Linien (Fujii et al., 2009). In einer kinetischen Untersuchung verlangsamten Mutationen der TSG101- und ALIX-Bindungsstelle in p6 die Gag-VLP-Freisetzung (Bendjennat und Saffarian, 2016). Die ESCRT-Proteine sind also entweder nicht absolut notwendig für den Freisetzungsprozess oder sie können zusätzlich auf andere Weise rekrutiert werden.

Die HIV-1-Freisetzung und die Bildung von MVB-Vesikeln unterscheiden sich dadurch, dass die assemblierenden Gagmoleküle ein gebogenes Gitter bilden und damit die Energie für die Membrandeformation liefern könnten (Munro et al., 2014). Ob die ESCRT-Proteine an der knospenförmigen Membrandeformation bei der Virionenbildung beteiligt sind oder nur die Abspaltung der viralen Membran von der

Plasmamembran am Ende der Partikelbildung vermitteln, wird kontrovers diskutiert. Die elektronenmikroskopische Beobachtung, dass bei gestörter Gag-ESCRT-Interaktion vollständig assemblierte Virionen akkumulieren, die über ein Membranband mit der Plasmamembran assoziiert sind, spricht für eine Rolle der ESCRT-Proteine erst bei der Virionenabspaltung (Garrus et al., 2001). Übereinstimmend damit war die Partikelkrümmung in einer fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung bei Deletion des ESCRT-rekrutierenden p6-Peptids nicht beeinträchtigt (Johnson et al., 2018). Andererseits hatten in einer elektronenmikroskopischen Studie Virionen, die bei gestörter Gag-ESCRT-Interaktion an der Plasmamembran akkumulierten, eine komplette Gagschale, während das Gag-Gitter die Virionensphäre in freigesetzten Wildtyp-Virionen nur zu zwei Dritteln ausfüllte (Carlson et al., 2008). Darüber hinaus wurden elektronenmikroskopisch Gagansammlungen beobachtet, die von kreisförmigen ESCRT-III-Filamenten mit einem Durchmesser von Partikelsphären umgeben waren (Cashikar et al., 2014). In mehreren fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen zur Assemblierung von HIV-1 oder HIV-1-Gag-VLPs an der Plasmamembran wurde eine transiente Rekrutierung von „spät agierenden“ ESCRT-Proteinen am Ende des Assemblierungsprozesses beobachtet (Baumgärtel et al., 2011; Bleck et al., 2014; Johnson et al., 2018; Jouvenet et al., 2011). Voneinander abweichende Schlussfolgerungen wurden darüber gezogen, ob „früh agierende“ ESCRT-Proteine mit einer anderen Kinetik rekrutiert werden, ob ESCRT-Proteine nur im Bereich des Partikelhalses lokalisiert sind oder auch im sphärischen Teil des Partikels und ob sich verschiedene ESCRT-Proteine an unterschiedlichen Stellen im Partikel befinden (Bleck et al., 2014; Jouvenet et al., 2011; Ku et al., 2014; Prescher et al., 2015; Van Engelenburg et al., 2014). Basierend auf den zum Teil widersprüchlichen Ergebnissen existieren mehrere Modelle zur ESCRT-vermittelten HIV-1-Freisetzung (Übersicht in Hurley und Cada, 2018; Lippincott-Schwartz et al., 2017; Schöneberg et al., 2017). Diskutiert werden eine Polymerisierung von ESCRT-Proteinen innerhalb der Partikelsphäre, die sich in den Partikelhals fortsetzt, oder einer Polymerisierung erst innerhalb des Partikelhalses. Die Polymere könnten den Partikelhals oder zusätzlich Teile der Virionensphäre aus dem Inneren des Partikels heraus zusammenziehen. Alternativ könnten ESCRT-Filamente die assemblierten Gagmoleküle kreisförmig umgeben und durch Bildung einer Spirale die benachbarten Plasmamembranregionen einander annähern (Cashikar et al., 2014). Unabhängig davon, ob die ESCRT-Proteine an der Ausbildung der Virionensphäre beteiligt sind oder erst am Ende des Partikelbildungsprozesses die Virionenabspaltung ermöglichen, ist zu vermuten, dass es einen Mechanismus gibt, der die Gagassemblierung und die ESCRT-Funktion miteinander koordiniert, damit korrekt zusammengesetzte Virionen gebildet werden.

5.4. Ist ein Hefemodell für die Analyse von Mechanismen der HIV-1-Freisetzung nützlich?

Neben der noch wenig verstandenen Funktionsweise der ESCRT-Proteine bei der HIV-1-Freisetzung stellt sich die Frage nach weiteren bisher unbekanntem Virus-Wirt-Interaktionen im Freisetzungsprozess. Experimente, die den HIV-1-Freisetzungsprozess *in vivo* analysieren, werden in der Regel mit immortalisierten Zellen durchgeführt, die mit einem proviralen Vektor transfiziert sind. Alternativ wird die Freisetzung von Gag-VLPs untersucht. Zur Charakterisierung der Interaktion von HIV-1 mit zellulären Proteinen und deren Bedeutung für die Freisetzung müssen diese Proteine deletiert und manipuliert werden. Werden Proteine von einem Vektor oder an nicht natürlicher Position im Genom durch einen Fremdpromotor überexprimiert, können sie durch Beeinflussung des Gleichgewichts zellulärer Interaktionsnetzwerke indirekt negativ auf die untersuchten Prozesse wirken. So reduzieren zum Beispiel die Überexpression von TSG101 und ALIX die HIV-1-Freisetzung (Dussupt et al., 2009; Goila-Gaur et al., 2003). Daher ist es sinnvoll, manipulierte Proteine in natürlicher Stärke vom endogenen Promotor zu exprimieren. Trotz neuer experimenteller Strategien bleibt es aufwendig, das Genom humaner Zellen entsprechend zu verändern (Hoffmann et al., 2019). Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, ob ein Hefemodell nütz-

lich sein kann, um die bestehenden Ansätze zur Charakterisierung von Mechanismen der HIV-1-Freisetzung zu ergänzen. Die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* ist ein in zellbiologischen Studien viel verwendeter eukaryontischer Modellorganismus. Ein großer Vorteil besteht darin, dass haploide Hefezellen lebensfähig sind. Deshalb kann man das Hefegenom einfach und gezielt durch homologe Rekombination manipulieren. Die Produkte manipulierter Gene können unter Kontrolle ihres natürlichen Promotors exprimiert werden. Knockouts nicht essentieller Gene sind einfach herstellbar. Darüber hinaus haben genetische Screenings mit der Bäckerhefe wesentlich zum Verständnis intrazellulärer Prozesse, wie zum Beispiel des Proteintransports und der Autophagozytose, beigetragen (Bankaitis et al., 1986; Harding et al., 1995; Novick et al., 1980; Rothman und Stevens, 1986; Thumm et al., 1994; Tsukada und Ohsumi, 1993). Aus solchen Screenings, in denen mit ungerichteter Mutagenese oder durch Selektion spontaner Mutanten Gene identifiziert werden, die an den zu untersuchenden Prozessen beteiligt sind, gibt es temperatursensitive Mutanten, mit denen man auch einige essentielle Gene ausschalten kann. Ein Hefemodell für den Prozess der HIV-1-Freisetzung könnte außerdem deshalb geeignet sein, weil für die Charakterisierung der ESCRT-Funktion im MVB-Weg der Hefe methodisch vielfältige Ansätze existieren (siehe Literatur in 5.2.). Darüber hinaus wird die Analyse ESCRT-abhängiger Prozesse in der Hefe dadurch erleichtert, dass der ESCRT-Apparat der Hefe im Gegensatz zu humanen Zellen aus singulären Proteinversionen besteht (Martin-Serrano et al., 2003; von Schwedler et al., 2003b). Da die ESCRT-Gene der Hefe nicht essentiell sind, sind Experimente mit Knockoutmutanten möglich (Babst et al., 2002a und 2002b; Bilodeau et al., 2002 und 2003; Chu et al., 2006; Dupré und Haguenaer-Tsapis, 2001; Hierro et al., 2004; Katzmann et al., 2001 und 2003; Nikko et al., 2003).

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob eine Gag-GFP exprimierende Bäckerhefe als Modell zur Analyse von Mechanismen der HIV-1-Freisetzung geeignet ist. Bei Expression von Gag-GFP in humanen Zellen werden Gag-GFP-VLPs freigesetzt. Die Größe der Gag-GFP-VLPs entspricht der von unreifen HIV-1-Virionen und die Freisetzung ist abhängig von der TSG101-Bindungsstelle in p6 (Garrus et al., 2001; Pornillos et al., 2003). Die Markierung mit dem grün fluoreszierenden Protein GFP (Chalfie et al., 1994; Tsien, 1998) dient dazu, die intrazelluläre Lokalisation von Gag fluoreszenzmikroskopisch zu analysieren und Gag über eine Immunogoldmarkierung mit Anti-GFP-Antikörpern elektronenmikroskopisch zu detektieren. Die Interaktion von Gag mit zellulären Proteinen kann durch Immunpräzipitation von Gag-GFP mit Anti-GFP-Antikörpern untersucht werden. Im Gegensatz zur Verwendung gagspezifischer Antikörper besteht dabei nicht die Gefahr, dass die Antikörper mit der Gag-Gag-Interaktion oder der Interaktion von Gag mit zellulären Faktoren interferieren. Anders als humane Zellen sind Hefezellen von einer Zellwand umgeben, die eine mechanische Barriere für die Freisetzung möglicher Gag-GFP-VLPs darstellt. Mit Sphäroplasten, Hefezellen denen die Zellwand enzymatisch entfernt wurde, sollte die Gag-GFP-VLP-Freisetzung analysiert werden. Das Kriterium für die Eignung des Hefemodells sollte die Abhängigkeit der Gag-GFP-Freisetzung von ESCRT-Proteinen der Hefe sein. Die Freisetzung von Gag-VLPs aus Hefesphäroplasten war beschrieben (Sakuragi et al., 2002). Allerdings wurde mit dem publizierten Assay eine ESCRT-unabhängige Freisetzung beobachtet (Norgan et al., 2012).

6. Material und Methodik

Spezielle Geräte, Utensilien und Chemikalien sind im Text beschrieben. Zusätzlich wurden Geräte und Utensilien verwendet, die zu einer allgemeinen Laborausstattung gehören. Gängige Chemikalien hatten den für die Molekularbiologie gebotenen Reinheitsgrad. Mit „Wasser“ ist deionisiertes Wasser gemeint.

6.1. Hefe - Standardtechniken

6.1.1. Anzucht

Hefezellen wurden bei 30 °C entweder in Vollmedium [YPD: 1% Bacto-Hefeextrakt (BD), 2% Bacto-Pepton (BD), 2% Glukose] angezogen oder in synthetischem Minimalmedium [SD: 0,67% Hefe-Stickstoff-Basis (BD), 2% Glukose] mit Zusatz von Aminosäuren und Basen [20 mg/l Adeninsulfat, Uracil, L-Tryptophan, L-Histidin und 30 mg/l L-Leucin, L-Lysin (alle Sigma-Aldrich)], die für den verwendeten Wildtypstamm essentiell waren. Zur Selektion auf Plasmide oder ins Genom integrierte Genkassetten mit Auxotrophiemarker wurde Minimalmedium ohne die entsprechende Substanz verwendet. Festes Medium enthielt zusätzlich 2% Agar (BD).

Zur Repression des *MET3*-Promotors wurden dem Minimalmedium 20 mg/l Methionin zugesetzt. Zur Induktion des Promotors wurden die Kulturen mit Wasser gewaschen und anschließend in Medium ohne Methionin inkubiert. Wenn in den Abbildungslegenden keine Induktionsdauer angegeben ist, war der Promotor während der Anzucht der Kulturen dauerhaft induziert, das heißt, es wurde Medium ohne Methionin verwendet.

6.1.2. Ernte

Zur Bestimmung der Zelldichte wurde die optische Dichte bei 600 nm (OD_{600}) mit einem Ultraspec 3000 Photometer (Pharmacia Biotech) gemessen. Für die Experimente wurden Über-Nacht-Kulturen morgens verdünnt, mehrere Stunden inkubiert und anschließend aus der exponentiellen Wachstumsphase heraus so verdünnt, dass alle parallel analysierten Kulturen nach erneuter Inkubation über Nacht am nächsten Tag bei etwa gleicher OD_{600} in der exponentiellen Wachstumsphase (OD_{600} = 0,15 bis 0,4) geerntet werden konnten. Die Kulturen wurden durch dreiminütige Zentrifugation bei 1700g in einem Ausschwingrotor sedimentiert.

6.1.3. Transformation

Hefezellen wurden mit der Lithiumacetat-Methode transformiert. Zur Transformation mit einem Plasmid wurden etwa 3 OD_{600} Hefezellen in der exponentiellen Wachstumsphase mit Wasser gewaschen und in 200 μ l 0,1 M Lithiumacetat in TE [1 mM EDTA, 10 mM Tris (pH 7,4)] resuspendiert. 0,1 μ g Plasmid-DNA wurde mit 8 μ l Heringssperm-DNA (10 mg/ml, Sigma-Aldrich) vermischt, die zuvor durch Erhitzen bei 95 °C denaturiert worden war. Das DNA-Gemisch wurde zu der Hefesuspension gegeben und die Suspension wurde anschließend mit 1 ml 40% Polyethylenglykol 3000, 0,1 M Lithiumacetat in TE versetzt. Dieser Ansatz wurde zunächst 30 min bei 30 °C inkubiert, danach 12 min bei 42 °C. Nach Zentrifugation (1310g, 2 min) wurde das Hefesediment in SD aufgenommen und auf festes Selektionsmedium transferiert.

Zur Herstellung genomisch manipulierter Hefestämme wurden acht PCR-Ansätze (siehe 6.6.) vereinigt und zweimal mit 500 μ l Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert. Anschließend wurde die DNA aus der wässrigen Phase mit dem dreifachen Volumen Ethanol und 1/10 3M Natriumacetat bei -20 °C (30 min) gefällt. Nach Zentrifugation (25000g, 30 min) wurde das Präzipitat luftgetrocknet, in 30 μ l Wasser aufgenommen und gegen Wasser dialysiert. 10 μ l der dialysierten Probe wurden mit 10 μ l

Heringssperm-DNA versetzt (siehe oben) und mit etwa 7 OD₆₀₀ Hefezellen gemischt, die wie oben präpariert wurden. Anschließend wurde wie oben verfahren.

6.1.4. Präparation genomischer DNA

Das Sediment von 10 ml einer Hefekultur in der stationären Wachstumsphase wurde zum Aufschluss der Zellen in 200 µl Puffer [2% Triton, 1% SDS, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM Tris (pH 8,0)] resuspendiert, mit 200 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt und 4 min mit Glaskugeln (Durchmesser 0,5 mm, Roth) auf einem Vibrationsschüttler (VXR basic Vibrax) bei voller Umdrehungszahl geschüttelt. Der Suspension wurden 300 µl TE [1 mM EDTA, 10 mM Tris (pH 8,0)] zugesetzt. Die Probe wurde zentrifugiert (16000g, 5 min) und die DNA aus der wässrigen Phase durch Invertieren mit 1 ml Ethanol gefällt. Nach Zentrifugation (16000g, 2 min) wurde das Sediment in 400 µl TE durch Schütteln bei 37 °C gelöst und 5 min mit 75 µg/ml RNase A (Roth) bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Probe mit 10 µl 4 M Ammoniumacetat und 1 ml Ethanol invertiert. Die gefällte DNA wurde durch Zentrifugation (16000g, 2 min) sedimentiert und das luftgetrocknete Sediment wurde in 50 µl TE gelöst. 1 µl dieser Probe wurde als Template in einem PCR-Ansatz (siehe 6.6.) zur Kontrolle von genetisch manipulierten Hefestämmen eingesetzt.

6.2. *E. coli* - Standardtechniken

6.2.1. Anzucht

E. coli-Kulturen wurden bei 37 °C in LB-Medium [1% Bacto-Trypton (BD), 0,5% Bacto-Hefeextrakt (BD), 171 mM NaCl] angezogen. Zur Selektion auf resistenzvermittelnde Plasmide wurde dem Medium Antibiotikum (Ampicillin: 50 mg/l, Kanamycin: 25 mg/l) zugesetzt. Festes Medium enthielt zusätzlich 1,5% Agar (BD).

6.2.2. Ernte

Große Kulturvolumina zur Präparation heterolog exprimierter Proteine oder zur Plasmidmaxipräparation wurden durch zehnmünütige Zentrifugation bei 3000g geerntet, kleine Volumina zur Plasmidmini-präparation durch einmünütige Zentrifugation bei 16000g. Zur Bestimmung der Zelldichte wurde die OD₆₀₀ gemessen (siehe 6.1.2.).

6.2.3. Transformation

Die Transformation mit Ligationsansätzen (siehe 6.6.) erfolgte entweder per Elektroporation oder per Hitzeschock. XL1-blue Zellen (NEB) in der exponentiellen Wachstumsphase wurden mit eiskaltem Wasser gewaschen, in 10% Glycerol resuspendiert und mit einem Gene Pulser (BIO-RAD) mit dem zuvor gegen Wasser dialysierten Ligationsansatz transformiert. Käuflich erworbene chemisch kompetente DH5α-Zellen (NEB) oder XL10-Gold-Zellen (Agilent Technologies) wurden zusammen mit dem Ligationsansatz nach Herstellerangaben kurzzeitig bei 42 °C inkubiert. Die transformierten Zellen wurden 30 bis 60 min bei 37 °C in SOC-Medium [2% Bacto-Trypton (BD), 0,5% Bacto-Hefeextrakt (BD), 20 mM Glukose, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 10 mM NaCl; oder von NEB] inkubiert und anschließend auf antibiotikumhaltiges festes LB-Medium transferiert. Bei Transformation mit pGEM-T oder pGEM-5Zf enthielt das Medium zur Blau-Weiß-Selektion auf Vektoren mit Insert zusätzlich IPTG (0,5 mM) und X-GAL (80 mg/l).

Für die heterologe Expression von GST-Fusionspeptiden und -proteinen wurden BL21-Zellen per Elektroporation transformiert. Abweichend vom oben beschriebenen Procedere wurden die transformierten Zellen nach der Inkubation in SOC-Medium direkt in flüssiges antibiotikumhaltiges Medium überführt.

6.3. HEK293-Zellen - Standardtechniken

6.3.1. Anzucht

HEK(human embryonic kidney)293-Tet-On-Zellen (Clontech) wurden in DMEM mit 4,5 g/l Glukose und L-Glutamin (PAA) und 10% fötalem Kälberserum (PAA) in einem CO₂-Inkubator (Binder) bei 37 °C unter 5% CO₂ kultiviert.

6.3.2. Transfektion

Die Zellen wurden in Sechs-Loch-Platten ausgesät und am folgenden Tag unter Verwendung von Lipofectamine LTX (Invitrogen) oder Lipofectamine 2000 (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers mit Plasmid-DNA transfiziert.

6.3.3. Ernte

Zwei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen von den Kulturschalen unter Kühlung mit Eis in PBS (PAA) mit Proteaseinhibitoren [1 mM PMSF, 10 µg/ml Aprotinin und Leupeptin, 5 µg/ml Chymostatin und Pepstatin A (alle Sigma-Aldrich)] mit einem Plastikschaber abgelöst und durch Zentrifugation bei 4°C in einem Ausschwingrotor (700g, 5 min) gesammelt.

6.4. Plasmide und Plasmidkonstruktion

In Tabelle 1 sind die in den abgebildeten Experimenten verwendeten Plasmide, deren Ausgangsvektoren und Plasmide für Zwischenklonierungen aufgeführt. Da eine detaillierte Darstellung der Konstruktion jedes einzelnen Plasmids zu umfangreich wäre, sind im Folgenden nur die Prinzipien der Klonierungsstrategien erklärt und exemplarisch an Graphiken in Abb. 3 veranschaulicht. Eine Liste der PCR-Primer befindet sich unter 6.11..

6.4.1. Konstruktion der kodierenden Sequenzen für Gagmutanten und Gagfragmente

Plasmide für die Expression von Gag, Gagmutanten oder Gagfragmenten wurden durch Amplifikation der kodierenden Sequenzen per PCR und anschließende Subklonierung in einen Expressionsvektor hergestellt. Das initiale Template war pGag-EGFP (Hermida-Matsumoto und Resh, 2000) beziehungsweise pGagLTAL-EGFP. Dieser Vektor ermöglicht durch stille Mutationen eine vom viralen Protein Rev unabhängige Gagexpression (Schwartz et al., 1992). Das in dieser Arbeit als „GFP“ bezeichnete Protein entspricht dem EGFP (enhanced GFP), für das pGag-EGFP kodiert. Die von den initialen Templates ausgehenden Vektoren wurden als Templates in Folgeklonierungen eingesetzt. Über die Vorwärts- und Rückwärtsprimer der PCR wurden Restriktionsorte zur Subklonierung in Expressionsvektoren und Mutationen eingeführt. Lagen die einzuführenden Mutationen so weit von den Enden der zu amplifizierenden Sequenz entfernt, dass sie nicht über die Vorwärts- und Rückwärtsprimer eingeführt werden konnten, oder sollten im Inneren der Sequenz gelegene Teile deletiert werden, wurden drei PCRs durchgeführt. In der ersten PCR wurde das vordere und in der zweiten PCR das hintere Teilstück der zu klonierenden Sequenz amplifiziert. Der Rückwärtsprimer zur Amplifikation des vorderen Teilstücks und der Vorwärtsprimer zur Amplifikation des hinteren Teilstücks trugen in ihren 5'-Bereichen zueinander komplementäre Sequenzen. Wurden über diese Methode Punktmutationen eingeführt, bestanden die komplementären Sequenzen aus der einzuführenden Mutation und angrenzenden Bereichen (Abb. 3B). Wurde ein Teil der Gag-GFP-kodierenden Sequenz mit dieser Methode deletiert, trug einer der beiden Primer am 5'-Ende einen Überhang, der komplementär zum 5'-Ende des anderen Primers war (Abb. 3A). Demzufolge hatten das hintere Ende des ersten PCR-Produkts und das vordere Ende des zweiten PCR-Produkts identische Sequenzen. In der dritten PCR wurden die Produkte der ersten und der zweiten PCR gemeinsam als Template eingesetzt. Die identischen Sequenzen ermöglichten dabei die „Fusion“ beider Teilstücke. In

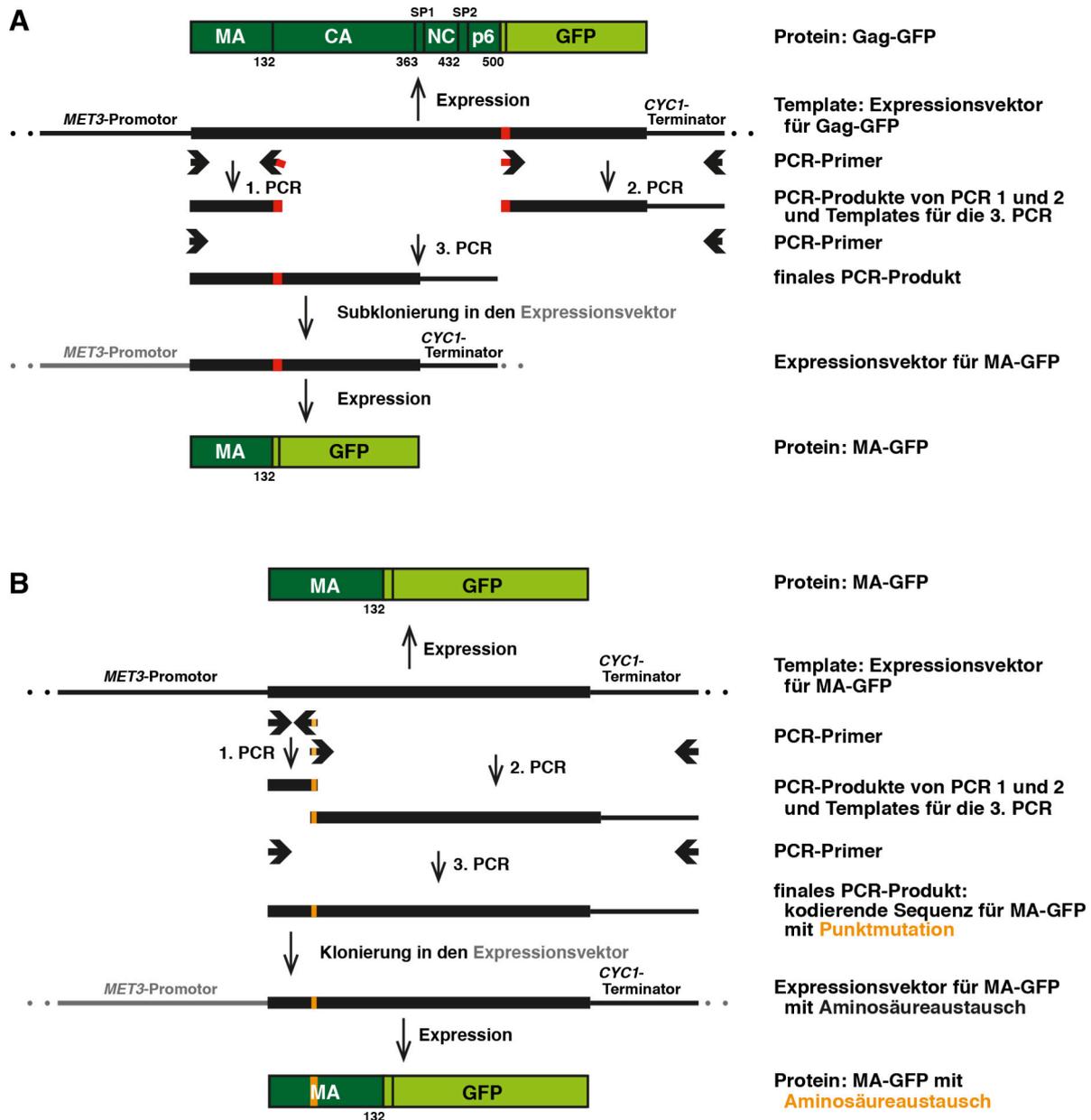


Abbildung 3. Strategien zur Konstruktion der kodierenden Sequenzen für Gag-GFP-Versionen. A, schematische Darstellung der Einführung von Deletionen in die kodierende Sequenz für Gag-GFP beziehungsweise der Konstruktion von kodierenden Sequenzen für GFP-markierte Gagfragmente am Beispiel von MA-GFP. Es werden drei PCRs durchgeführt. In der dritten PCR werden die Produkte der ersten und der zweiten PCR miteinander „fusioniert“. Das Template für die erste und zweite PCR ist ein Expressionsvektor mit der kodierenden Sequenz für Gag-GFP, der einen *CYC1*-Terminator trägt. In der ersten PCR wird der für MA kodierende Sequenzabschnitt amplifiziert, in der zweiten PCR die kodierende Sequenz für GFP und eine 5' davon gelegene kurze Verbindungssequenz zusammen mit dem *CYC1*-Terminator. Damit die PCR-Produkte in der dritten PCR „fusioniert“ werden können, trägt der Rückwärtsprimer der ersten PCR am 5'-Ende einen Überhang (rot), der komplementär zum 5'-Ende des Vorwärtsprimers der zweiten PCR (rot) ist. Das hintere Ende des ersten PCR-Produkts und das vordere Ende des zweiten PCR-Produkts haben also identische Sequenzen (rot). In der dritten PCR werden die Produkte der beiden ersten PCRs gemeinsam als Template eingesetzt. Der Vorwärtsprimer entspricht dem Vorwärtsprimer der ersten PCR. Der Rückwärtsprimer entspricht dem Rückwärtsprimer der zweiten PCR. Das PCR-Produkt, eine „Fusion“ aus den Produkten der ersten und der zweiten PCR, wird nach einem Zwischenklonierungsschritt und Sequenzierung in einen Zielvektor (grau) ligiert. B, schematische Darstellung der Einführung von internen Punktmutationen in die kodierende Sequenz für MA-GFP. Es werden drei PCRs durchgeführt. In der dritten PCR werden die PCR-Produkte aus erster und zweiter PCR miteinander „fusioniert“. Das Template für die beiden ersten PCRs ist ein Expressionsvektor mit der kodierenden Sequenz für MA-GFP. In der ersten PCR wird der vordere Teil der für MA kodierenden Sequenz amplifiziert. In der zweiten PCR wird die kodierende Sequenz für den carboxyterminalen Teil von MA und für GFP zusammen mit dem *CYC1*-Terminator amplifiziert. Das 5'-Ende des Rückwärtsprimers der ersten PCR und das 5'-Ende des Vorwärtsprimers der zweiten PCR haben zueinander komplementäre Sequenzen, die die Mutation (orange) enthalten. Das hintere Ende des ersten PCR-Produkts und das vordere Ende des zweiten PCR-Produkts tragen also identische Sequenzen mit der Mutation. In der dritten PCR werden die Produkte der beiden ersten PCRs gemeinsam als Template eingesetzt. Der Vorwärtsprimer entspricht dem Vorwärtsprimer der ersten PCR. Der Rückwärtsprimer entspricht dem Rückwärtsprimer der zweiten PCR. Das PCR-Produkt, eine „Fusion“ aus den Produkten der beiden ersten PCRs, wird nach einem Zwischenklonierungsschritt und Sequenzierung in einen Zielvektor (grau) ligiert.

der dritten PCR wurden der Vorwärtsprimer aus der ersten PCR und der Rückwärtsprimer aus der zweiten PCR verwendet.

Zur Herstellung der kodierenden Sequenzen für MA-GFP, CA-GFP, GagAp6-GFP und GFP-markierte aminoterminal oder interne Fragmente von MA oder CA wurde mit der ersten PCR die kodierende Sequenz für das jeweilige Gagfragment amplifiziert, mit der zweiten PCR die kodierende Sequenz für GFP und das aminoterminal davon liegende Verbindungspeptid (Abb. 3A). Der Rückwärtsprimer der ersten PCR hatte am 5'-Ende einen Überhang, der komplementär zum 5'-Ende des Vorwärtsprimers für die Amplifikation der GFP-kodierenden Sequenz war.

Die kodierende Sequenz für GFP-markierte carboxyterminale MA- oder CA-Fragmente wurde an Expressionsvektoren für MA-GFP oder CA-GFP amplifiziert.

Bei der Herstellung der kodierenden Sequenzen für GFP-markierte Gagfragmente, denen am Carboxyterminus das p6-Peptid fehlte (CA-SP1-NC-SP2-GFP, SP1-NC-SP2-GFP), diente die für GagAp6-GFP kodierende Sequenz als Template.

Zur Einführung interner Deletionen in die kodierenden Sequenzen für Gag und MA [Gag(Δ NCA), MA(Δ 20-29), MA(Δ 20-43)] wurde in der ersten PCR das von der einzuführenden Deletion 5' liegende Sequenzteilstück und in der zweiten PCR das 3' davon liegende Teilstück amplifiziert. Im Fall der Δ NCA-Deletion hatte der Vorwärtsprimer für die Amplifikation des hinteren Teilstücks einen 5'-Überhang, dessen Sequenz komplementär zur Sequenz des Rückwärtsprimers für die Amplifikation des vorderen Teilstücks war. Zur Herstellung der Δ 20-29- und der Δ 20-43-Deletion hatte der Rückwärtsprimer zur Amplifikation des vorderen Teilstücks einen 5'-Überhang, dessen Sequenz komplementär zur Sequenz des Vorwärtsprimers für die Amplifikation des hinteren Teilstücks war.

Für die Deletion der globulären MA-Domäne [Gag(Δ 8-87)] wurde ein Vorwärtsprimer gewählt, der 3' der zu deletierenden Sequenz ansetzte und am 5'-Ende einen Überhang mit der für die sieben aminoterminalen Aminosäuren von Gag kodierenden Sequenz trug.

Zur Kombination von Mutationen wurden zwei Strategien verfolgt:

- Vektoren, die einen Teil der angestrebten Mutationen bereits trugen, wurden als Template für die PCR eingesetzt. Weitere Mutationen wurden über die genannten Methoden eingeführt.
- Zur Kombination von Punktmutationen in MA mit Mutationen im davon carboxyterminal gelegenen Teil von Gag wurden PCR-Produkte mit Mutationen in der für MA kodierenden Sequenz per PCR mit PCR-Produkten mit Mutationen in der für den carboxyterminalen Teil von Gag kodierenden Sequenz „fusioniert“. Als Templates für die beiden ersten PCRs wurden Vektoren mit den jeweiligen Mutationen verwendet.

Tabelle 1: Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Herkunft / Referenz
GFP-CPS416	Vektor für die Expression von GFP-CPS in <i>S. cerevisiae</i> , ARS/CEN, <i>URA3</i>	Reggiori und Pelham, 2001
pEGFP-N1	Vektor für die Expression von carboxyterminal EGFP-markierten Proteinen in humanen Zellen, mit CMV-Promotor	Clontech
EX-V1319-M08	Vektor für die Expression von ALIX-3HA6HIS in humanen Zellen, mit CMV-Promotor, pReceiver	GeneCopoeia
EX-V1319-M14	Vektor für die Expression von ALIX-3Flag in humanen Zellen, mit CMV-Promotor, pReceiver	GeneCopoeia
EX-K4135-M06	Vektor für die Expression von 3HA-TSG101 in humanen Zellen, mit CMV-Promotor, pReceiver	GeneCopoeia
EX-K4135-M12	Vektor für die Expression von 3Flag-TSG101 in humanen Zellen, mit CMV-Promotor, pReceiver	GeneCopoeia
pGag-EGFP	Vektor für die Expression von Gag-EGFP in humanen Zellen, mit CMV-Promotor	Hermida-Matsumoto und Resh, 2000

pGagLTAL-EGFP	Vektor für die Expression von GagLTAL(Gag(P455L,P458L))-EGFP in humanen Zellen, mit CMV-Promotor	M. Resh
pGEM-5Zf	Vektor für die Subklonierung von PCR-Produkten	Promega
pGEM-T	Vektor für die Subklonierung von PCR-Produkten mit 3' Desoxyadenosinüberhängen	Promega
pRS415	<i>E. coli/S. cerevisiae</i> -Shuttle-Vektor, ARS/CEN, <i>LEU2</i>	Stratagene; Sikorski und Hieter, 1989
pRS416	<i>E. coli/S. cerevisiae</i> -Shuttle-Vektor, ARS/CEN, <i>URA3</i>	Stratagene; Sikorski und Hieter, 1989
pRS423	<i>E. coli/S. cerevisiae</i> -Shuttle-Vektor, 2 μ , <i>HIS3</i>	Stratagene; Christianson et al., 1992
pRS425	<i>E. coli/S. cerevisiae</i> -Shuttle-Vektor, 2 μ , <i>LEU2</i>	Stratagene; Christianson et al., 1992
pYPGE2	Vektor für die Expression von Proteinen in <i>S. cerevisiae</i> -, <i>PGK</i> -Promotor, <i>CYC1</i> -Terminator, 2 μ , <i>TRP1</i>	Brunelli und Pall, 1993
pGEX-6P-1	Vektor für die Expression von Proteinen mit aminoterminaler GST-Fusion in <i>E. coli</i>	GE Healthcare
pBM197	Derivat von pEGFP-N1, das zwischen EcoRI(629)- und Sall(639)-Schnittstelle eine Sequenz aus dem 5' nicht kodierenden Bereich von pGag-EGFP (629-678 mit Basenaustausch (C zu G) an Position 641) enthält	diese Arbeit
pBM199	Gag-kodierende Sequenz in pBM197	diese Arbeit
pBM201	Gag(G2A)-kodierende Sequenz in pBM197	diese Arbeit
pBM203	Gag(P455L,P458L)-kodierende Sequenz in pBM197	diese Arbeit
pBM205	Gag(L489A)-kodierende Sequenz in pBM197	diese Arbeit
pBM207	Gag(P455L,P458L,L489A)-kodierende Sequenz in pBM197	diese Arbeit
pBM209	MA(1-132)-kodierende Sequenz in pBM197	diese Arbeit
pBM231	Gag(Δ p6(Δ 449-500))-kodierende Sequenz in pBM197	diese Arbeit
pBM239	p6(448-500)-kodierende Sequenz in pGEX-6P-1	diese Arbeit
pBM241	p6(P455L,P458L)-kodierende Sequenz in pGEX-6P-1	diese Arbeit
pBM243	p6(L489A)-kodierende Sequenz in pGEX-6P-1	diese Arbeit
pBM245	p6(P455L,P458L,L489A)-kodierende Sequenz in pGEX-6P-1	diese Arbeit
pBM255	MA(1-132)-kodierende Sequenz in pGEX-6P-1	diese Arbeit
pBM257	CA(133-363)-kodierende Sequenz in pGEX-6P-1	diese Arbeit
pBM267	Gag-EGFP-kodierende Sequenz in pYPGE2	diese Arbeit
pBM269	Gag(P455L,P458L)-EGFP-kodierende Sequenz in pYPGE2	diese Arbeit
pBM271	<i>MET3</i> -Promotor (-178 bis -1) in pRS423	diese Arbeit
pBM273	Gag-EGFP-kodierende Sequenz mit <i>MET3</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator in pRS425	diese Arbeit
pBM276	Gag(P455L,P458L)-EGFP-kodierende Sequenz mit <i>MET3</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator in pRS425	diese Arbeit
pBM279	Gag(L489A)-EGFP-kodierende Sequenz mit <i>MET3</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator in pRS425	diese Arbeit
pBM282	Gag(P455L,P458L,L489A)-EGFP-kodierende Sequenz mit <i>MET3</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator in pRS425	diese Arbeit
pBM285	Gag(Δ p6(Δ 448-500))-EGFP-kodierende Sequenz mit <i>MET3</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator in pRS425	diese Arbeit
pBM288	Gag(G2A)-EGFP-kodierende Sequenz mit <i>MET3</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator in pRS425	diese Arbeit
pBM291	MA(1-132)-EGFP-kodierende Sequenz mit <i>MET3</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator in pRS425	diese Arbeit
pBM294	CA(133-363)-EGFP-kodierende Sequenz mit <i>MET3</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator in pRS425	diese Arbeit
pBM297	p6(448-500)-EGFP-kodierende Sequenz mit <i>MET3</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator in pRS425	diese Arbeit
pBM300	SP1-NC-SP2-p6(364-500)-EGFP-kodierende Sequenz mit <i>MET3</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator in pRS425	diese Arbeit
pBM303	CA-SP1-NC-SP2(133-447)-EGFP-kodierende Sequenz mit <i>MET3</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator in pRS425	diese Arbeit

pBM309	SP1-NC-SP2(364-447)-EGFP-kodierende Sequenz mit <i>MET3</i> -Promotor und <i>CYCI</i> -Terminator in pRS425	diese Arbeit
pBM318	MA1-61-EGFP-kodierende Sequenz mit <i>MET3</i> -Promotor und <i>CYCI</i> -Terminator in pRS425	diese Arbeit
pBM321	MA35-102-EGFP-kodierende Sequenz mit <i>MET3</i> -Promotor und <i>CYCI</i> -Terminator in pRS425	diese Arbeit
pBM324	MA62-132-EGFP-kodierende Sequenz mit <i>MET3</i> -Promotor und <i>CYCI</i> -Terminator in pRS425	diese Arbeit
pBM327	MA1-20-EGFP-kodierende Sequenz mit <i>MET3</i> -Promotor und <i>CYCI</i> -Terminator in pRS425	diese Arbeit
pBM330	MA1-41-EGFP-kodierende Sequenz mit <i>MET3</i> -Promotor und <i>CYCI</i> -Terminator in pRS425	diese Arbeit
pBM333	MA81-132-EGFP-kodierende Sequenz mit <i>MET3</i> -Promotor und <i>CYCI</i> -Terminator in pRS425	diese Arbeit
pBM336	MA97-132-EGFP-kodierende Sequenz mit <i>MET3</i> -Promotor und <i>CYCI</i> -Terminator in pRS425	diese Arbeit
pBM339	NCA(133-278)-EGFP-kodierende Sequenz mit <i>MET3</i> -Promotor und <i>CYCI</i> -Terminator in pRS425	diese Arbeit
pBM342	CCA(279-363)-EGFP-kodierende Sequenz mit <i>MET3</i> -Promotor und <i>CYCI</i> -Terminator in pRS425	diese Arbeit
pBM353	EGFP-kodierende Sequenz mit <i>MET3</i> -Promotor und <i>CYCI</i> -Terminator in pRS425	diese Arbeit
pBM354	Gag(G2A)-EGFP-kodierende Sequenz in pYPGE2	diese Arbeit
pBM355	Gag-EGFP-kodierende Sequenz mit <i>MET3</i> -Promotor und <i>CYCI</i> -Terminator in pRS415	diese Arbeit
pBM362	MA(Δ 20-29)-EGFP-kodierende Sequenz mit <i>MET3</i> -Promotor und <i>CYCI</i> -Terminator in pRS425	diese Arbeit
pBM365	MA(Δ 20-43)-EGFP-kodierende Sequenz mit <i>MET3</i> -Promotor und <i>CYCI</i> -Terminator in pRS425	diese Arbeit
pBM377	MA(RLR20,21,22AAA)-EGFP-kodierende Sequenz mit <i>MET3</i> -Promotor und <i>CYCI</i> -Terminator in pRS425	diese Arbeit
pBM383	MA(PGG23,24,25AAA)-EGFP-kodierende Sequenz mit <i>MET3</i> -Promotor und <i>CYCI</i> -Terminator in pRS425	diese Arbeit
pBM386	MA(KKK26,27,28AAA)-EGFP-kodierende Sequenz mit <i>MET3</i> -Promotor und <i>CYCI</i> -Terminator in pRS425	diese Arbeit
pBM389	MA(YKL29,30,31AAA)-EGFP-kodierende Sequenz mit <i>MET3</i> -Promotor und <i>CYCI</i> -Terminator in pRS425	diese Arbeit
pBM392	MA(KHI32,33,34AAA)-EGFP-kodierende Sequenz mit <i>MET3</i> -Promotor und <i>CYCI</i> -Terminator in pRS425	diese Arbeit
pBM398	MA(VWA35,36,37AAA)-EGFP-kodierende Sequenz mit <i>MET3</i> -Promotor und <i>CYCI</i> -Terminator in pRS425	diese Arbeit
pBM401	MA(SRE38,39,40AAA)-EGFP-kodierende Sequenz mit <i>MET3</i> -Promotor und <i>CYCI</i> -Terminator in pRS425	diese Arbeit
pBM404	MA(LER41,42,43AAA)-EGFP-kodierende Sequenz mit <i>MET3</i> -Promotor und <i>CYCI</i> -Terminator in pRS425	diese Arbeit
pBM437	MA(L31R)-EGFP-kodierende Sequenz mit <i>MET3</i> -Promotor und <i>CYCI</i> -Terminator in pRS425	diese Arbeit
pBM440	MA(V35E)-EGFP-kodierende Sequenz mit <i>MET3</i> -Promotor und <i>CYCI</i> -Terminator in pRS425	diese Arbeit
pBM449	MA(W36E)-EGFP-kodierende Sequenz mit <i>MET3</i> -Promotor und <i>CYCI</i> -Terminator in pRS425	diese Arbeit
pBM494	MA(L31R,V35R)-EGFP-kodierende Sequenz mit <i>MET3</i> -Promotor und <i>CYCI</i> -Terminator in pRS425	diese Arbeit
pBM497	MA(L31E,V35E)-EGFP-kodierende Sequenz mit <i>MET3</i> -Promotor und <i>CYCI</i> -Terminator in pRS425	diese Arbeit
pBM506	MA(L31R,V35E,W36A)-EGFP-kodierende Sequenz mit <i>MET3</i> -Promotor und <i>CYCI</i> -Terminator in pRS425	diese Arbeit
pBM527	MA(L31E,V35R)-EGFP-kodierende Sequenz mit <i>MET3</i> -Promotor und <i>CYCI</i> -Terminator in pRS425	diese Arbeit
pBM530	MA(L31R,V35E)-EGFP-kodierende Sequenz mit <i>MET3</i> -Promotor und <i>CYCI</i> -Terminator in pRS425	diese Arbeit

pBM548	Gag(L31R)-EGFP-kodierende Sequenz mit <i>MET3</i> -Promotor und <i>CYCI</i> -Terminator in pRS425	diese Arbeit
pBM551	Gag(W36E)-EGFP-kodierende Sequenz mit <i>MET3</i> -Promotor und <i>CYCI</i> -Terminator in pRS425	diese Arbeit
pBM556	Gag(L31R)-EGFP-kodierende Sequenz in pYGE2	diese Arbeit
pBM557	Gag(W36E)-EGFP-kodierende Sequenz in pYGE2	diese Arbeit
pBM582	Gag(L31E)-EGFP-kodierende Sequenz mit <i>MET3</i> -Promotor und <i>CYCI</i> -Terminator in pRS425	diese Arbeit
pBM583	Gag(L31R,V35E)-EGFP-kodierende Sequenz mit <i>MET3</i> -Promotor und <i>CYCI</i> -Terminator in pRS425	diese Arbeit
pBM584	Gag(L31R,V35E,W36A/ Δ NCA(Δ 126-277))-EGFP-kodierende Sequenz mit <i>MET3</i> -Promotor und <i>CYCI</i> -Terminator in pRS425	diese Arbeit
pBM585	Gag(L31R,V35E,W36A/ Δ p6(Δ 449-500))-EGFP-kodierende Sequenz mit <i>MET3</i> -Promotor und <i>CYCI</i> -Terminator in pRS425	diese Arbeit
pBM587	Gag(L31R,V35E,W36A/ Δ NCA(Δ 126-277)/ Δ p6(Δ 449-500))-EGFP-kodierende Sequenz mit <i>MET3</i> -Promotor und <i>CYCI</i> -Terminator in pRS425	diese Arbeit
pBM591	Gag(L31E)-EGFP-kodierende Sequenz in pYGE2	diese Arbeit
pBM592	Gag(L31R,V35E)-EGFP-kodierende Sequenz in pYGE2	diese Arbeit
pBM593	Gag(L31R,V35E,W36A/ Δ NCA(Δ 126-277))-EGFP-kodierende Sequenz in pYGE2	diese Arbeit
pBM596	Gag(L31R,V35E,W36A/ Δ NCA(Δ 126-277)/ Δ p6(Δ 449-500))-EGFP-kodierende Sequenz in pYGE2	diese Arbeit
pBM610	Gag(V35E)-EGFP-kodierende Sequenz mit <i>MET3</i> -Promotor und <i>CYCI</i> -Terminator in pRS425	diese Arbeit
pBM611	Gag(L31R,V35E,W36A)-EGFP-kodierende Sequenz mit <i>MET3</i> -Promotor und <i>CYCI</i> -Terminator in pRS425	diese Arbeit
pBM615	Gag(V35E)-EGFP-kodierende Sequenz in pYGE2	diese Arbeit
pBM616	Gag(L31R,V35E,W36A)-EGFP-kodierende Sequenz in pYGE2	diese Arbeit
pBM622	Gag(Δ 8-87)-kodierende Sequenz in pBM197	diese Arbeit
pBM632	Gag(Δ NCA(Δ 126-277))-kodierende Sequenz in pBM197	diese Arbeit
pBM634	Gag(Δ NCA(Δ 126-277)/P455L,P458L)-kodierende Sequenz in pBM197	diese Arbeit
pBM636	Gag(Δ NCA(Δ 126-277)/L489A)-kodierende Sequenz in pBM197	diese Arbeit
pBM638	Gag(Δ NCA(Δ 126-277)/P455L,P458L,L489A)-kodierende Sequenz in pBM197	diese Arbeit
pBM640	Gag(Δ NCA(Δ 126-277)/ Δ p6(Δ 449-500))-kodierende Sequenz in pBM197	diese Arbeit
pBM642	Gag(Δ 8-87/ Δ NCA(Δ 126-277))-kodierende Sequenz in pBM197	diese Arbeit
pBM662	Gag(L31R,V35E,W36A)-kodierende Sequenz in pBM197	diese Arbeit
pBM668	Gag(L31R,V35E,W36A/ Δ NCA(Δ 126-277))-kodierende Sequenz in pBM197	diese Arbeit
pBM670	Gag(L31R,V35E,W36/L489A)-kodierende Sequenz in pBM197	diese Arbeit
pBM672	Gag(L31R,V35E,W36/ Δ NCA(Δ 126-277)/L489A)-kodierende Sequenz in pBM197	diese Arbeit
pBM674	Gag(L31R,V35E,W36/P455L,P458L)-kodierende Sequenz in pBM197	diese Arbeit
pBM676	Gag(L31R,V35E,W36/P455L,P458L,L489A)-kodierende Sequenz in pBM197	diese Arbeit
pBM694	Gag(Δ NCA(Δ 126-277))-EGFP-kodierende Sequenz mit <i>MET3</i> -Promotor und <i>CYCI</i> -Terminator in pRS425	diese Arbeit
pBM706	Gag(Δ NCA(Δ 126-277)/ Δ p6(Δ 449-500))-EGFP-kodierende Sequenz mit <i>MET3</i> -Promotor und <i>CYCI</i> -Terminator in pRS425	diese Arbeit
pBM779	Gag(Δ p6(Δ 448-500))-EGFP-kodierende Sequenz in pYGE2	diese Arbeit
pBM780	Gag(L489A)-EGFP-kodierende Sequenz in pYGE2	diese Arbeit
pBM782	Gag(Δ NCA(Δ 126-277))-EGFP-kodierende Sequenz in pYGE2	diese Arbeit
pBM786	Gag(Δ 8-87)-EGFP-kodierende Sequenz in pYGE2	diese Arbeit
pBM787	Gag(Δ 8-87/ Δ NCA(Δ 126-277))-EGFP-kodierende Sequenz in pYGE2	diese Arbeit
pBM833	Gag(V35E/ Δ NCA(Δ 126-277))-EGFP-kodierende Sequenz mit <i>MET3</i> -Promotor und <i>CYCI</i> -Terminator in pRS425	diese Arbeit
pBM878	Gag(V35E/ Δ NCA(Δ 126-277)/ Δ p6(Δ 449-500))-EGFP-kodierende Sequenz mit <i>MET3</i> -Promotor und <i>CYCI</i> -Terminator in pRS425	diese Arbeit

6.4.2. Plasmide für die Proteinexpression in Hefe

Zur Proteinexpression in Hefe wurden die Vektoren pYPGE2, pRS425 und pRS415 verwendet (Brunelli und Pall, 1993; Christianson et al., 1992; Sikorski und Hieter, 1989; Übersicht zu Expressionsvektoren für *S. cerevisiae* in Gnügge und Rudolf, 2017). Die Vektoren pYPGE2 und pRS425 haben ein 2 μ -Replikationselement, das eine erhöhte Kopienzahl pro Zelle ermöglicht. Für pRS425 wurde eine Kopienzahl von 10 bis 30 pro haploidem Genom bestimmt (Christianson et al., 1992). Der Vektor pRS415 hat ein ARS/CEN-Replikationselement. ARS/CEN-Vektoren liegen in durchschnittlich einer Kopie pro haploidem Genom vor (Clarke und Carbon, 1980; Tschumper und Carbon, 1983). pYGE2 trägt einen *PGK*-Promotor und die Terminatorsequenz des *CYCI*-Gens. Die kodierenden Sequenzen für Gagversionen wurden mit EcoRI und XhoI in pYGE2 subkloniert. Zur Expression von pRS425 oder pRS415 wurden der Promotor des *MET3*-Gens und die Terminatorsequenz des *CYCI*-Gens verwendet. Die *MET3*-Promotorsequenz wurde analog zu Meusser und Sommer, 2004 über die Restriktionsorte von SacI und BamHI in pRS423 ligiert (pBM271). pBM271 diente zur Zwischenklonierung aller Sequenzen, die mit dem *MET3*-Promotor von pRS415 oder pRS425 exprimiert werden sollten. Der *CYCI*-Terminator wurde zusammen mit der zu klonierenden kodierenden Sequenz amplifiziert (Abb. 3). Als Templates für diese PCRs wurden Vektoren verwendet, die die jeweils benötigte kodierende Sequenz zusammen mit einem *CYCI*-Terminator aus vorhergehenden Klonierungen trugen. Ursprünglich stammt der *CYCI*-Terminator aus pYPGE2 (entspricht 5682 bis 4 aus pYADE4, Brunelli und Pall, 1993). Für die Subklonierung in pBM271 wurden EcoRI und SalI verwendet. Nach dem Zwischenklonierungsschritt in pBM271 wurden die kodierenden Sequenzen zusammen mit dem *MET3*-Promotor und dem *CYCI*-Terminator mit SacI und SalI in pRS415 oder pRS425 subkloniert.

6.4.3. Plasmide für die Proteinexpression in *E. coli*

Zur Herstellung von Plasmiden für die Expression von GST-Fusionspeptiden oder -proteinen in *E. coli* wurden DNA-Fragmente über die EcoRI- und XhoI-Restriktionsstelle in den Vektor pGEX-6P-1 (GE Healthcare) ligiert. pGEX-6P-1 trägt die kodierende Sequenz für GST und ermöglicht über eine *Multiple cloning site* die Subklonierung von Sequenzen, die dann mit einer aminoterminalen GST-Fusion exprimiert werden. Die Proteinexpression von pGEX-6P-1 erfolgt unter Kontrolle des Tac-Promotors, der durch IPTG im Kulturmedium induziert wird.

6.4.4. Plasmide für die Proteinexpression in HEK293-Zellen

Für die Expression von Gagversionen in HEK293-Zellen wurde eine modifizierte Form des Vektors pEGFP-N1 (Clontech) verwendet. Die Genexpression von pEGFP-N1 erfolgt mit einem CMV(Cytomegalovirus)-Promotor. In pGag-EGFP (siehe 6.4.1.), einem auf pEGFP-N1 basierenden Vektor, unterscheiden sich die 38 Basenpaare 5' des Startkodons von der *Multiple cloning site* in pEGFP-N1. Ein zunächst konstruierter Expressionsvektor, bei dem die für Gag-GFP kodierende Sequenz unter Mitnahme der sechs Basenpaare 5' des Startkodons aus pGag-EGFP in das pEGFP-N1-Rückgrat ligiert wurde, führte zu einer geringeren Gagexpression als pGag-EGFP. Um Gagversionen in gleicher Stärke wie von pGag-EGFP exprimieren zu können, wurde ein analoger Expressionsvektor konstruiert (pBM197). Zur Herstellung von pBM197 wurde an pGag-EGFP die Sequenz zwischen der EcoRI-Schnittstelle (Position 629 in pGag-EGFP und pEGFP-N1) und der dem Startkodon am nächsten gelegenen SalI-Schnittstelle (Position 678), die in pEGFP-N1 nicht vorhanden ist, per PCR amplifiziert. Dabei wurde die zwischen beiden Schnittstellen gelegene zusätzliche SalI-Schnittstelle (Position 639 in pGagEGFP und pEGFP-N1) durch einen über den Vorwärtsprimer eingeführten Basenaustausch (Position 641 in pGagEGFP und pEGFP-N1, Austausch von C zu G) entfernt. Das PCR-Produkt wurde mit EcoRI und SalI in pEGFP-N1 subkloniert (pBM197). Die kodierenden Sequenzen für GFP-markierte Proteine wurden über die SalI-Schnittstelle und über den 3' vom Stopkodon gelegenen NotI-Restriktionsort in pBM197 ligiert. Bei dieser Subklonierung wurde die aus pEGFP-N1 stammende GFP-kodierende Sequenz entfernt. Die im Vergleich zu pGag-

EGFP in pBM197 5' vom Startkodon noch fehlenden sechs Basenpaare wurden über die subklonierten Sequenzen eingefügt. Die entsprechenden sechs Basen waren in den Vorwärtsprimern für die Amplifikation der kodierenden Sequenzen enthalten.

Plasmide zur Expression von epitopmarkierten humanen ESCRT-Proteinen unter Kontrolle des CMV-Promotors wurden käuflich erworben (siehe Tabelle 1).

6.5. Hefestämme und Konstruktion von Hefestämmen

In Tabelle 2 sind die verwendeten Hefestämme aufgeführt. Der Ausgangsstamm für alle in dieser Arbeit hergestellten Hefestämme war der Wildtyp YWO1, ein haploider Abkömmling des diploiden Wildtypstamms DF5 (Seufert et al., 1990). Mit Ausnahme von Abb. 5G (E7A) und Abb. E8 wurde YWO1 als Wildtyp in den Experimenten eingesetzt. Der in Abb. 5G (E7A) und Abb. E8 verwendete Wildtypstamm SUB62 ist ebenfalls ein haploider Abkömmling von DF5 (Finley et al., 1987).

Eine Liste der PCR-Primer, die zur Herstellung und Überprüfung der Hefestämme verwendet wurden, befindet sich unter 6.11..

6.5.1. Deletionsmutanten

ESCRT-Gene wurden mit der Methode von Longtine durch homologe Rekombination deletiert (Longtine et al., 1998) (Abb. 4A). Dazu wurde ein PCR-Produkt hergestellt, das aus der Expressionskassette für einen Selektionsmarker bestand, flankiert von Sequenzen aus dem nicht kodierenden Bereich 5' und 3' des zu deletierenden ORFs (open reading frame). Als Template für die PCR diente ein Plasmid mit der Expressionskassette für den jeweiligen Selektionsmarker (Longtine et al., 1998). Die PCR-Primer entsprachen den Randbereichen der Expressionskassette und hatten an den 5'-Enden Überhänge von 45 bis 48 Basen mit Sequenzen aus dem nicht kodierenden Bereich 5' beziehungsweise 3' des zu deletierenden ORFs. Mit Hilfe der Überhänge wurde das PCR-Produkt nach Transfer in Hefe über homologe Rekombination in das Hefegenom integriert. Dabei wurde der zu deletierende ORF durch die Selektionsmarkerkassette ersetzt. Bei Verwendung eines Auxotrophiemarkers wurden die Hefetransformanten direkt auf Selektionsmedium angezogen. Bei Einführung des *KanMX6*-Markers wurden die Hefetransformanten zunächst auf Vollmedium angezogen und durch anschließendes Replikaplattieren auf geneticinhaltiges (200 mg/l) Vollmedium selektiert. Der Erfolg der Gendeletion wurde per PCR an genomischer DNA überprüft. Dafür wurden Primer gewählt, die 5' und 3' der Deletion ansetzten. Das PCR-Produkt unterschied sich in der Größe von einem mit den gleichen Primern an Wildtyp-DNA generierten PCR-Produkt. Falls der deletierte Genomabschnitt und die inserierte Markerkassette keinen deutlich detektierbaren Größenunterschied hatten, wurde eine zusätzliche Kontroll-PCR durchgeführt. In dieser PCR setzte ein Primer im an die Deletion angrenzenden Bereich an. Als zweiter Primer wurde einer der Primer verwendet, die zur Amplifikation der Markerkassette eingesetzt worden waren. Diese PCR führte nur bei Insertion der Markerkassette in den angestrebten Bereich des Genoms zu einem PCR-Produkt.

6.5.2. Genomisch kodierte epitopmarkierte ESCRT-Proteine

Hefestämme, die carboxyterminal epitopmarkierte ESCRT-Proteine exprimierten, wurden durch homologe Rekombination nach der Methode von Longtine oder Knop hergestellt (Longtine et al., 1998; Knop et al., 1999) (Abb. 4B). Dazu wurde ein PCR-Produkt erzeugt, das aus einer Genkassette bestand, die für das Epitop und 3' davon für einen Selektionsmarker kodierte, flankiert von Sequenzen aus den Bereichen, die 5' und 3' an das Stopkodon des zu modifizierenden Gens angrenzten. Als Template für die PCR diente ein Plasmid mit der Genkassette (Longtine et al., 1998; Knop et al., 1999). Die PCR-Primer entsprachen den Randbereichen der Genkassette und hatten an den 5'-Enden 44 oder 45 Basen lange Überhänge mit Sequenzen aus dem 5' beziehungsweise 3' des Stopkodons gelegenen Bereich. Mit Hilfe

der Überhänge wurde das PCR-Produkt über homologe Rekombination in das Hefegenom integriert. Die Hefetransformanten wurden wie unter 6.5.1. selektiert. Der Erfolg der homologen Rekombination wurde per PCR an genomischer DNA überprüft. Dafür wurde ein Vorwärtsprimer gewählt, der im hinteren Teil der kodierenden Sequenz des modifizierten Gens ansetzte. Der Rückwärtsprimer hybridisierte in der nicht

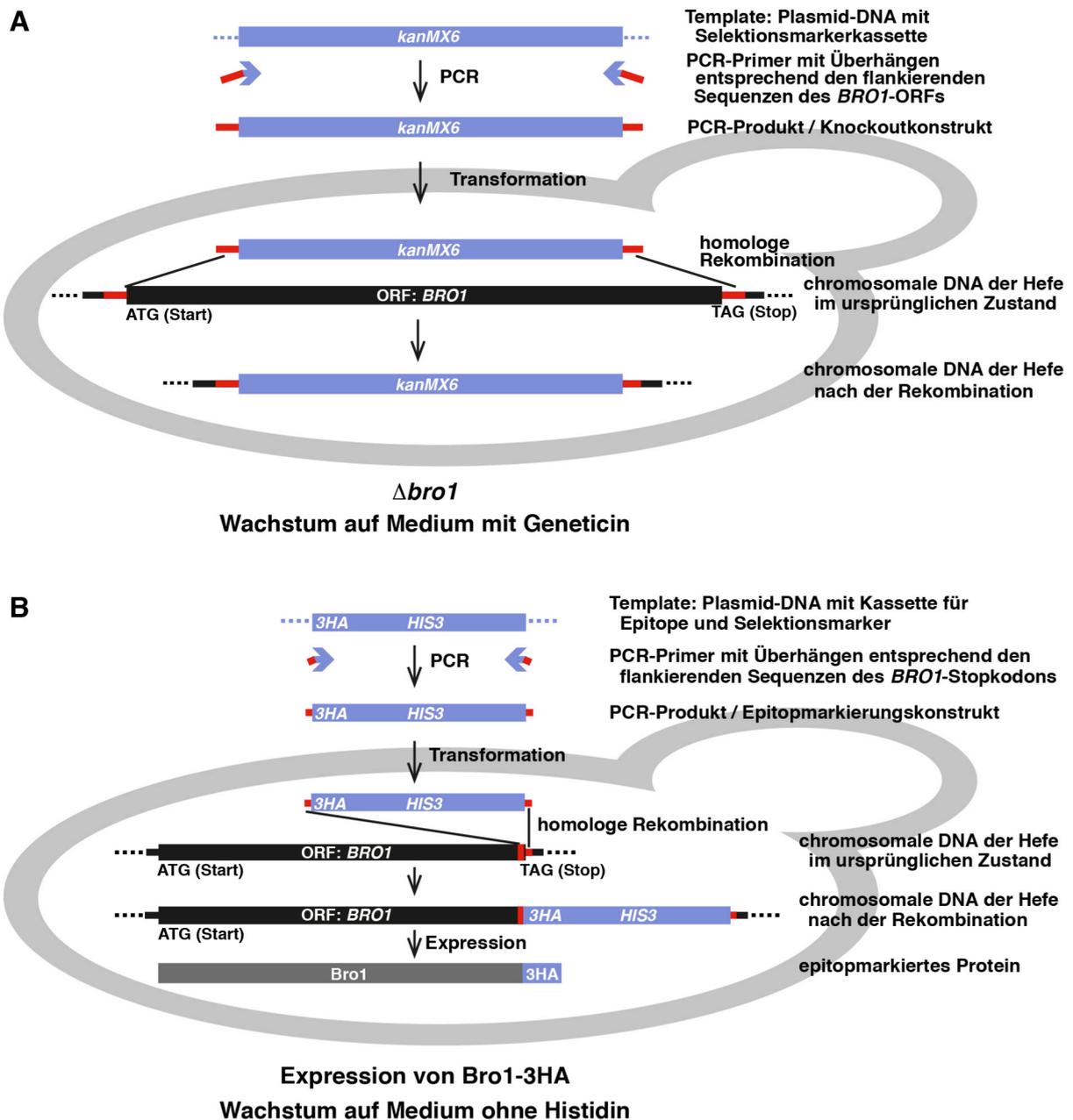


Abbildung 4. Strategien zur Manipulation von Genen der Hefe. A, schematische Darstellung der Konstruktion einer Deletionsmutante mit der Methode von Longtine (Longtine et al., 1998) am Beispiel von *Abro1*. Mittels PCR wird ein Knockoutkonstrukt hergestellt, das eine Selektionsmarkerkassette (*kanMX6*, blau) trägt. Über Sequenzen, die den ORF (open reading frame) des *BRO1*-Gens am 5'- und 3'-Ende flankieren, (rot) findet nach Transfer des Knockoutkonstrukts in Hefe eine homologe Rekombination mit dem Hefegenom statt. Das Hefegenom trägt dann statt der kodierenden Sequenz des *BRO1*-Gens die Markerkassette. Die Markerkassette vermittelt eine Geneticinresistenz und ermöglicht die Selektion der *Abro1*-Mutanten auf geneticinhaltigem Medium. B, schematische Darstellung der Konstruktion eines Hefestamms mit einem genomisch kodierten epitopmarkierten Protein nach der Methode von Longtine (Longtine et al., 1998) am Beispiel von Bro1-3HA. Mittels PCR wird ein Konstrukt zur Epitopmarkierung hergestellt, das eine Kassette (blau) mit der kodierenden Sequenz für die Epitope (3HA) und mit einem Selektionsmarker (*HIS3*) enthält. Über Sequenzen, die 5' und 3' des Stopkodons von *BRO1* liegen, (rot) findet nach Transfer des Konstrukts in Hefe eine homologe Rekombination mit dem Hefegenom statt. Im Hefegenom ist dann das Stopkodon von *BRO1* gegen die kodierende Sequenz für die Epitope (mit eigenem Stopkodon) und den Selektionsmarker ausgetauscht. Der Selektionsmarker ermöglicht den Transformanten Wachstum auf Medium, das kein Histidin enthält.

kodierenden Sequenz 3' des offenen Leserahmens. Bei erfolgreicher Insertion der Genkassette war das PCR-Produkt gegenüber der Amplifikation an Wildtyp-DNA um die Länge der Genkassette vergrößert.

Zusätzlich wurde die Expression der epitopmarkierten Proteine im Immunoblot getestet. Die Funktionalität der epitopmarkierten ESCRT-Proteine wurde überprüft, indem der Transport des MVB-Substrats GFP-CPS ins Innere des Endosoms analysiert wurde (Abb. E1).

Tabelle 2: Hefestämme

Stamm	Genotyp	Herkunft / Referenz
YWO1	<i>MATα, trp-1(am), his3-Δ200, ura3-52, lys2-801, leu2-3, -112</i>	Seufert et al., 1990
YBM87	<i>MATα, vps23::HIS3, trp-1(am), his3-Δ200, ura3-52, lys2-801, leu2-3, -112</i>	diese Arbeit
YBM88	<i>MATα, bro1::kanMX6, trp-1(am), his3-Δ200, ura3-52, lys2-801, leu2-3, -112</i>	diese Arbeit
YBM89	<i>MATα, vps23::HIS3, bro1::kanMX6, trp-1(am), his3-Δ200, ura3-52, lys2-801, leu2-3, -112</i>	diese Arbeit
YBM90	<i>MATα, vps4::HIS3, trp-1(am), his3-Δ200, ura3-52, lys2-801, leu2-3, -112</i>	diese Arbeit
YBM91	<i>MATα, vps20::HIS3, trp-1(am), his3-Δ200, ura3-52, lys2-801, leu2-3, -112</i>	diese Arbeit
YBM92	<i>MATα, vps27::HIS3, trp-1(am), his3-Δ200, ura3-52, lys2-801, leu2-3, -112</i>	diese Arbeit
YBM93	<i>MATα, vps28::HIS3, trp-1(am), his3-Δ200, ura3-52, lys2-801, leu2-3, -112</i>	diese Arbeit
YBM94	<i>MATα, BRO1-3HA:HIS3, trp-1(am), his3-Δ200, ura3-52, lys2-801, leu2-3, -112</i>	diese Arbeit
YBM95	<i>MATα, BRO1-9MYC:TRP1, trp-1(am), his3-Δ200, ura3-52, lys2-801, leu2-3, -112</i>	diese Arbeit
YBM96	<i>MATα, VPS23-9MYC:TRP1, trp-1(am), his3-Δ200, ura3-52, lys2-801, leu2-3, -112</i>	diese Arbeit
YBM97	<i>MATα, BRO1-9MYC:TRP1, vps23::kanMX6, trp-1(am), his3-Δ200, ura3-52, lys2-801, leu2-3, -112</i>	diese Arbeit
YBM98	<i>MATα, VPS23-9MYC:TRP1, bro1::kanMX6, trp-1(am), his3-Δ200, ura3-52, lys2-801, leu2-3, -112</i>	diese Arbeit
YBM99	<i>MATα, VPS23-9MYC:TRP1, vps27::kanMX6, trp-1(am), his3-Δ200, ura3-52, lys2-801, leu2-3, -112</i>	diese Arbeit
SUB62	<i>MATα, trp1-1(am), his3-Δ200, ura3-52, lys2-801, leu2-3, -112</i>	Finley et al., 1987

6.6. PCR und Klonierungen

Für analytische PCRs zur Überprüfung von genomisch manipulierten Hefestämmen wurde Taq DNA Polymerase (Invitrogen) oder MyTaq HS DNA Polymerase (BIOLINE) verwendet. Für Klonierungen oder zur Herstellung von Hefestämmen wurden Polymerasen mit geringerer Fehlerrate, Expand High Fidelity PCR System (Roche) oder Pfu Ultra High Fidelity DNA Polymerase (QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit, Agilent Technologies), eingesetzt. Die PCR-Primer wurden von der Firma BioTeZ synthetisiert und per HPLC gereinigt. PCR-Ansätze hatten ein Volumen von 50 μ l. PCR-Primer wurden in einer Konzentration von 0,4 μ M verwendet, dNTPs in einer Konzentration von 200 μ M, wenn die dNTPs nicht Bestandteil des Polymerase-Kits waren. Als Template dienten entweder 0,1 μ g Plasmid-DNA oder zur „Fusion“ von PCR-Produkten (siehe 6.4.1.) zwei aufgereinigte (siehe unten) PCR-Produkte. Im letzteren Fall wurden nach visueller Abschätzung im Agarosegel äquimolare Mengen der beiden PCR-Produkte eingesetzt, ohne die Mengen zu quantifizieren. Zeiten, Temperaturen und Zyklenanzahl in den PCR-Programmen wurden in Abhängigkeit von der verwendeten Polymerase, der Länge der zu amplifizierenden Sequenz, der Art des Templates und der Länge und Zusammensetzung der hybridisierenden Sequenz der Primer gewählt. Die PCR-Programme waren daher sehr variabel: initiale Denaturierung 1 bis 10 min bei 94 oder 95 °C; 18 bis 40 Zyklen: Denaturierung 45 oder 50 s bei 94 oder 95 °C, Hybridisierung 45 oder 50 s bei 52 bis 62 °C, Synthese 1 bis 4 min bei 68 oder 72 °C; terminale Synthese 7 oder 10 min bei 68 oder 72 °C. Zur Wahl der Hybridisierungstemperatur wurde die Schmelztemperatur der Primer abgeschätzt, indem für alle hybridisierenden Adenine und Thyminen jeweils 2 °C und für Guanine und Cytosine jeweils 4 °C angenommen wurden. Meist wurde eine Hybridisierungstemperatur gewählt,

die 2 bis 6 °C unterhalb der berechneten Schmelztemperatur des Primers mit der niedrigeren Schmelztemperatur lag.

Alle PCR-Produkte wurden vor der Subklonierung in den Zielvektor in pGEM-T (Promega) oder den mit EcoRV geschnittenen pGEM-5Zf (Promega) zwischenkloniert und sequenziert. Die Sequenzierungen wurden von den Firmen Invitex und LGC Genomics übernommen.

Restriktionen wurden mit Enzymen von NEB nach Angaben des Herstellers durchgeführt. PCR-Produkte oder DNA-Fragmente aus Restriktionsansätzen wurden über ein Agarosegel aufgereinigt und mit Hilfe eines DNA-Extraktionskits (Biozym) nach Herstellerangaben präpariert. Zur Ligation von Restriktionsfragmenten mit einem Vektor wurden nach visueller Abschätzung der präparierten DNA-Mengen im Agarosegel etwa äquimolare Mengen an Insert und Vektor eingesetzt. Zur Subklonierung von PCR-Produkten in pGEM-T oder den mit EcoRV geschnittenen pGEM-5Zf wurde ein möglichst hoher Überschuss an Insert im Verhältnis zum Vektor gewählt. Die Ligationsansätze wurden unter den vom Hersteller angegebenen Pufferbedingungen mit T4 DNA Ligase (NEB) über Nacht bei 16 °C inkubiert. Alternativ wurde T4 DNA Ligase aus dem T4 DNA Ligase Kit von Thermo Fisher 20 min bis eine Stunde bei 22 °C und anschließend bei 16 °C über Nacht eingesetzt.

Plasmidminipräparationen und Plasmidmaxipräparationen wurden mit Kits (Jetstar, Genomed oder QIAprep Spin Miniprep, Qiagen) nach Herstellerangaben durchgeführt.

6.7. Immunoblot

Zur Auftrennung proteinhaltiger Proben wurden entweder diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgele [Sammelgel: 3% Acrylamid, 0,15% Bisacrylamid mit 0,1% SDS, 125 mM Tris (pH 6,8); Trenngel: 18% Acrylamid, 0,09% Bisacrylamid oder 12% Acrylamid, 0,08% Bisacrylamid mit 0,1% SDS, 750 mM Tris (pH 8,8)] hergestellt und mit Laemmli-Laufpuffer (0,1% SDS, 50 mM Tris, 384 mM Glycin) benutzt oder käufliche Gele (Mini-Protean TGX 10%, 12% oder 4-20%, BIO-RAD) mit TGS-Puffer (BIO-RAD) verwendet.

Vor Durchführung der Polyacrylamidgelelektrophorese wurden die Proben in Probenpuffer [4% SDS, 20% Glycerin, 135 mM Tris (pH 6,8), 0,1% Bromphenolblau, 10% β -Mercaptoethanol] 10 min bei 90 °C erhitzt.

Als Molekulargewichtsmarker wurde der Prestained Broad Range Protein Marker (NEB) oder der Precision Plus Dual Color Protein Standard (BIO-RAD) verwendet.

Die Proteine wurden in einer Nassblotkammer (Mighty Small Transfer Tank TE22, Hoefer) in 147 mM Glycin, 19,8 mM Tris, 25% Methanol und 0,01% SDS bei 80 V zwei Stunden auf Polyvinylidenfluoridmembranen (Immobilon-P, Porengröße, 0,45 μ m, Roth) transferiert. Anschließend wurden die Blotmembranen 30 min mit 10% Magermilchpulver in TBT [150 mM NaCl, 50 mM Tris (pH 7,5) und 0,1% Tween] bei Raumtemperatur und danach mit den primären Antikörpern in TBT mit 5% Magermilchpulver über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Antikörperverdünnung wurde je nach Antikörper und geblotteter Proteinmenge gewählt. Die Blotmembranen wurden mit 0,2% Brij58 in PBS (137 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 1,47 mM KH_2PO_4 , 6,46 mM Na_2HPO_4 , pH 7,2) bei Raumtemperatur gewaschen. Die Inkubation mit Horseradish-Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörpern erfolgte in TBT mit 5% Magermilchpulver für eine Stunde bei Raumtemperatur. Die Immunoblots wurden mit Western Lightning Plus ECL (Perkin Elmer) und Autoradiografiefilmen (X-OMAT AR, Kodak) unter Benutzung einer automatischen Entwicklermaschine (Fuji) entwickelt. Die Autoradiografiefilme wurden gescannt (Scanmaker 9800XL TMA1600, Microtek). Mit Adobe Photoshop CS5.1 wurden Bildausschnitte hergestellt und mit Adobe Illustrator CS5.1 zu Abbildungen zusammengesetzt.

Die primären Antikörper gegen Sec61 (analog zu Panzner et al., 1995) und das HA-Epitop [aus Hybridomazellen (12CH5)] wurden von Angelika Wittstruck präpariert. Polyklonale Anti-Emp47-Antikörper stammten von H.D. Schmitt. Die anderen primären Antikörper [Anti-PGK (A-6457, Molecular Probes), Anti-GST (600-101-200, Rockland), Anti-GFP (JL-8, Clontech), Anti-Myc (M5546, Sigma-Aldrich), Anti-Flag (M2, F3165, Sigma-Aldrich), Anti-GAPDH (MAB374, Sigma-Aldrich)] und die sekundären Antikörper (Sigma-Aldrich) wurden käuflich erworben.

6.8. Experimente mit Hefe

Ausgangsmaterial für die Präparation von Proteinextrakten waren 10 bis 15 OD₆₀₀ Hefezellen. Die geernteten Zellen wurden mit eiskaltem Natriumazid (10 mM) gewaschen und die Proben bei allen folgenden Schritten auf Eis gehalten, sofern es nicht anders beschrieben ist. Zentrifugationen wurden bei 4 °C durchgeführt. Für Zentrifugationen bei 232000g wurde der TLA100.3 Rotor (Beckman Coulter) verwendet. Als Proteaseinhibitoren wurden entweder 1 mM PMSF und 10 µg/ml Aprotinin, Leupeptin, 5 µg/ml Chymostatin, Pepstatin A (alle Sigma-Aldrich) oder 1 mM PMSF und Complete Mini EDTA-freier Proteasehemmer-Cocktail (Roche) eingesetzt.

6.8.1. Präparation von Totallysaten

Die Hefezellen wurden in 50 mM Tris (pH 7,5) und 1% SDS mit Proteaseinhibitoren resuspendiert und durch 90-sekündiges Schütteln mit Glaskugeln aufgeschlossen (siehe 6.1.4.). Das Lysat wurde auf 50 mM Tris (pH 7,5), 0,1% SDS, 1% Triton X-100, 150 mM NaCl und 5 mM EDTA eingestellt und von den Glaskugeln abgenommen. Für die Kontrolle auf Funktionalität genomisch kodierter epitopmarkierter ESCRT-Proteine wurde das Lysat alternativ mit dem Aufschlusspuffer von den Glaskugeln abgenommen (Abb. E1). Unlösliches Material wurde durch Zentrifugation entfernt (10 min, 16000g). Um die Proteine zu fällen, wurde der Überstand auf eine Trichloressigsäurekonzentration von 10 bis 20% eingestellt. Die Probe wurde 10 min inkubiert, zentrifugiert (10 min, 16000g) und das Präzipitat zweimal mit Aceton gewaschen. Das luftgetrocknete Präzipitat wurde in Probenpuffer gelöst.

6.8.2. Präparation von Membran- und Zytosolfractionen

Die Hefezellen wurden in 50 mM Tris (pH 7,5) und 10 mM EDTA mit Proteaseinhibitoren resuspendiert und mit Glaskugeln lysiert (siehe 6.8.1.). Das Zelllysate wurde mit Puffer von den Glaskugeln abgenommen und Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (400g, 10 min) entfernt. Ein Aliquot des Lysats wurde mit demselben Volumen Probenpuffer versetzt (Total). Um Membranen zu sedimentieren, wurde das Lysat zentrifugiert (25000g, 30 min für Gag exprimierende Zellen oder 232000g, 30 min für MA exprimierende Zellen). Der zytosolhaltige Überstand wurde mit dem gleichen Volumen Probenpuffer versetzt. Das Sediment wurde in Probenpuffer durch Schütteln bei 90 °C gelöst. Wenn es in der Abbildungslegende nicht anders beschrieben ist, war das Volumen des Probenpuffers doppelt so groß wie das Volumen des für die Zentrifugation eingesetzten Lysats.

6.8.3. Differenzielle Zentrifugation

Die Hefezellen wurden in 50 mM Tris (pH 7,5) und 10 mM EDTA mit Proteaseinhibitoren resuspendiert und mit Glaskugeln lysiert (siehe 6.8.1.). Das Zelllysate wurde mit Puffer von den Glaskugeln abgenommen. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation entfernt (400g, 10 min). Ein Aliquot des Lysats wurde mit demselben Volumen Probenpuffer versetzt (Total). Mit dem Lysat wurde eine differenzielle Zentrifugation durchgeführt. Zuerst wurde die Probe 30 min bei 25000g zentrifugiert, der Überstand dieser Zentrifugation anschließend 30 min bei 232000g. Die Sedimente beider Zentrifugationen wurden durch Schütteln in Probenpuffer bei 90 °C gelöst. Der Überstand der letzten Zentrifugation wurde mit

demselben Volumen Probenpuffer versetzt. Die gelösten Sedimente waren im Verhältnis zum Total und zum Überstand konzentriert (25000g, 4x; 232000g, 3,3x).

6.8.4. Koimmunpräzipitation

Die Hefezellen wurden in 150 oder 400 mM NaCl, 50 mM Tris (pH 7,5) und 10% Glycerol mit Proteaseinhibitoren resuspendiert und mit Glaskugeln lysiert (siehe 6.8.1.). Proteinextrakte wurden durch Rotation in 150 oder 400 mM NaCl, 50 mM Tris (pH 7,5), 1% Triton X-100 und 10% Glycerol mit Proteaseinhibitoren bei 4 °C für 30 min präpariert. Unlösliches Material wurde durch Zentrifugation entfernt (400g, 10 min und zweimal 13000g, 10 min). Ein Aliquot des Extrakts wurde mit Probenpuffer versetzt (Input). GFP-markierte Proteine wurden aus dem Extrakt mit Anti-GFP-Antikörpern (A6455, Molecular Probes) und Protein A Sepharose (GE Healthcare) unter Rotation bei 4 °C über Nacht immunpräzipitiert. Die Sepharose wurde dreimal mit Extraktionspuffer gewaschen und anschließend mit Probenpuffer bei 90 °C eluiert.

6.8.5. Gag-GFP-Freisetzungssassay

Sphäroplasten wurden aus 5 OD₆₀₀ Hefezellen präpariert. Die Zellen wurden in Wasser gewaschen und mit 1 ml 10 mM DTT und 50 mM Hepes (pH 7,5) 10 min bei 30 °C inkubiert. DTT wurde durch zweimaliges Waschen der Zellen in 1 ml 1 M Sorbitol entfernt. Anschließend wurden die Zellen 30 min mit Zymolyase 20T (0,3 mg/ml, MP Biomedicals) in 1 ml SD mit Aminosäuren und Basen (siehe 6.1.1.), 50 mM Hepes (pH 7,5) und 1 M Sorbitol bei 30 °C inkubiert. Um den Erfolg der Zellwandentfernung zu überprüfen, wurden Aliquots in Wasser resuspendiert und das Platzen der Sphäroplasten durch Messung der OD₆₀₀ verfolgt. Zymolyase wurde durch zweimaliges Waschen der Sphäroplasten mit 1 ml SD mit Aminosäuren und Basen und 1 M Sorbitol entfernt. Die Sphäroplasten wurden anschließend in 1 ml SD mit Aminosäuren und Basen und 1 M Sorbitol bei 30 °C inkubiert. Freigesetztes Gag-GFP wurden zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet. Dazu wurden die Sphäroplasten vorsichtig durch Benutzung des *momentary buttons* der Tischzentrifuge (Eppendorf 5415C) sedimentiert. 800 µl Medium wurden abgenommen, filtriert (0,45 µm Porengröße, Zelluloseacetat, Whatman) und freigesetztes Gag-GFP wurde durch Zentrifugation (232000g, 30 min) gewonnen. Das Sediment wurde durch 20-minütiges Schütteln in Probenpuffer bei 90 °C gelöst. Am letzten Zeitpunkt der Kinetik wurden die Sphäroplasten durch 20-minütiges Schütteln in Probenpuffer lysiert. Unlösliches Material wurde durch Zentrifugation (1310g, 4 min) entfernt.

6.8.6. Gag-GFP-Membranbindung nach Gag-GFP-Expressionsinduktion

Hefezellen wurden in SD mit Aminosäuren und Basen (siehe 6.1.1.) angezogen, das zur Repression der Gag-GFP-Expression vom *MET3*-Promotor zusätzlich 20 mg/l Methionin enthielt. Nach der Ernte wurden die Zellen in Wasser gewaschen und anschließend auf 4 OD₆₀₀/ml SD mit Aminosäuren und Basen ohne Methionin konzentriert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden 1-ml-Aliquots abgenommen und daraus Membranen, Zytosol und ein Total präpariert (siehe 6.8.2.).

6.8.7. Fluoreszenzmikroskopie

Hefezellen, die GFP-markierte Proteine exprimierten, wurden *in vivo* mit einem Axioplan II Mikroskop (Zeiss) mit 63x Ölimmersionsobjektiv, Axiocam Digitalkamera und Axiovision 4 Software analysiert. Gegebenenfalls wurde die Helligkeit der Bilder mit Adobe Photoshop CS5.1 verändert. Für die DIC(differential interference contrast)-Aufnahmen wurde eine Graustufendarstellung gewählt. Mit Adobe Photoshop CS5.1 wurden Bildausschnitte hergestellt und mit Adobe Illustrator CS5.1 zu Abbildungen zusammengesetzt.

6.8.8. Elektronenmikroskopie

Diese Experimente wurden von Bettina Purfürst, Frank Vogel und Margit Vogel durchgeführt. Die Beschreibung der Methoden wurde von Bettina Purfürst für Meusser et al., 2020 in englischer Sprache verfasst. Hier befindet sich eine deutsche Übersetzung dieser Beschreibung.

„Die Fixierung und Immunogoldmarkierung wurden wie bei Kärgerl et al., 1996 durchgeführt. Die Hefezellen wurden mit 4% frisch präpariertem Formaldehyd/0,5% Glutaraldehyd (EM-Grade) in 0,1 M Natriumzitatpuffer (pH 5,0) eine Stunde bei Raumtemperatur fixiert. Nach dem Waschen wurden die Proben eine Stunde mit 1% Natriummetaperiodat behandelt, anschließend mit 1,6 M Saccharose/25% Polyvinylpyrrolidon K15 infiltriert und eingefroren. Ultradünne Kryoschnitte nach Tokuyasu, 1989 wurden mit Anti-GFP-Antikörpern (abcam, ab6556, 1:100) und sekundären Goldkolloid(12 nm)-konjugierten Antikörpern (Dianova, 111-205-144, 1:30) markiert. Die Schnitte wurden mit einer Mischung aus 3% Wolframatokieselsäurehydrat und 2,5% Polyvinylalkohol kontrastiert und stabilisiert.

Für die Kunstharzeinbettung wurden die Hefezellen mit 1% Glutaraldehyd in 0,1 M Natriumzitatpuffer eine Stunde bei 30 °C und anschließend über Nacht bei 4 °C fixiert. Nach dem Waschen wurden die Proben eine Stunde mit 1% Natriummetaperiodat inkubiert und dann in 10% Gelatine und 0,1 M Natriumkakodylatpuffer eingebettet. Die Proben wurden zwei Stunden mit 1% Osmiumtetroxid nachfixiert, mit einer aufsteigenden Ethanolreihe und Propylenoxid entwässert und in Poly/Bed^R 812 (Polysciences, Inc., Eppelheim) eingebettet. Ultradünne Schnitte wurden mit Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert.

Die Schnitte wurden mit einem Morgagni-Elektronenmikroskop (Thermo Fisher) und einer Morada CCD (Charge Coupled Device)-Kamera analysiert. Bilder wurden mit der iTEM Software (EMSIS GmbH, Münster) erstellt.“

Die in den Abb. 5G (E7A) und Abb. E8 gezeigten Bilder wurden von Frank Vogel als Papierabzug zur Verfügung gestellt und gescannt (siehe 6.7.). Alle anderen elektronenmikroskopischen Bilder wurden von Bettina Purfürst als TIFF-Files übergeben. Mit Adobe Photoshop CS5.1 wurden Bildausschnitte hergestellt und mit Adobe Illustrator CS5.1 zu Abbildungen zusammengesetzt.

6.9. Experimente mit HEK293-Zellen

Wenn es nicht anders beschrieben ist, wurden die Experimente unter Kühlung mit Eis durchgeführt. Die Zentrifugationen erfolgten bei 4 °C. Für Zentrifugationen bei 232000g wurde der TLA100.3 Rotor (Beckman Coulter) verwendet. Als Proteaseinhibitoren wurden 1 mM PMSF, 10 µg/ml Aprotinin, Leupeptin und 5 µg/ml Chymostatin, Pepstatin A (alle Sigma-Aldrich) eingesetzt.

6.9.1. Koimmunopräzipitation

Für eine Immunpräzipitation wurde das Lysat von Zellen aus einem Loch einer Sechs-Loch-Kulturplatte eingesetzt. Die Zellen wurden durch Rotation in 150 oder 400 mM NaCl, 50 mM Tris (pH 7,5), 1% Triton und 10% Glycerol mit Proteaseinhibitoren 30 min bei 4 °C lysiert. Unlösliches Material wurde durch Zentrifugation (1000g, 10 min und zweimal 13000g, 10 min) entfernt. Ein Aliquot wurde mit Probenpuffer versetzt (Input). GFP-markierte Proteine wurden aus dem Extrakt mit Anti-GFP-Antikörpern (A-6455, Molecular Probes) und Protein A Sepharose (GE Healthcare) durch Rotation bei 4 °C über Nacht immunpräzipitiert. Die Sepharose wurde dreimal mit Extraktionspuffer gewaschen und anschließend mit Probenpuffer bei 90 °C eluiert.

6.9.2. Gag-GFP-Freisetzungssassay

Zwei Tage nach der Transfektion wurde freigesetztes Gag-GFP aus dem Medium eines Lochs einer Sechs-Loch-Kulturplatte geerntet. Zur Entfernung von Zellen und Zelltrümmern wurde das Medium filtriert (0,45 µm Porengröße, Zelluloseacetat, Whatman) und freigesetztes Gag-GFP wurde durch Zentrifu-

gation (232000g, 30 min) sedimentiert. Das Sediment wurde durch Schütteln bei 90 °C in Probenpuffer resuspendiert. Zur Präparation von Zelllysaten wurden die Zellen mit 50 mM Tris (pH 7,5), 1% Triton, 0,1% SDS, 150 mM NaCl und 5 mM EDTA mit Proteaseinhibitoren 15 min auf Eis inkubiert. Unlösliches Material wurde durch Zentrifugation (16000g, 10 min) entfernt. Die Proteine wurden mit Trichloroessigsäure präzipitiert (siehe 6.8.1.).

6.10. GST-Pull-down

Zur Expression von GST-Fusionsproteinen oder -peptiden wurden *E. coli*(BL21)-Zellen mit entsprechenden pGEX-6P-1-Vektoren transformiert (siehe 6.2.3.) und bei 37 °C in LB-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 angezogen. Anschließend wurde zur Promotorinduktion 1 mM IPTG zugefügt und die Kulturen wurden über Nacht bei 16 °C in Gegenwart von 2% Ethanol inkubiert. Nach der Ernte wurden die Zellen in PBS (PAA) mit 5 mM EDTA und Proteaseinhibitoren [1 mM PMSF und Complete Mini EDTA-freier Proteasehemmer-Cocktail (Roche)] resuspendiert und mit einem Ultraschallstab aufgeschlossen. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (zweimal 16000g, 13 min) entfernt. Die Lysate wurden nach Zugabe von 1 mg/ml BSA mit Glutathionsepharose (GE Healthcare) eine Stunde bei 4 °C rotiert. 20 µl Glutathionsepharose wurden mit dem Extrakt von 120 OD₆₀₀ *E. coli*-Zellen beladen. Anschließend wurde die Sepharose dreimal in PBS mit Zusatz von 1% Triton X-100, 200 mM NaCl, 1 mg/ml BSA und Proteaseinhibitoren gewaschen. Danach wurde die Sepharose entweder mit Hefe- oder HEK293-Zellextrakt über Nacht bei 4 °C rotiert. Die Sepharose wurde dreimal in Inkubationspuffer gewaschen und mit Probenpuffer bei 90 °C eluiert. Hefe- und HEK293-Zellextrakte wurden wie für die Koimmunpräzipitationsexperimente (siehe 6.8.4. und 6.9.1.) präpariert. Vor der Inkubation mit Sepharose wurden 1 mg/ml BSA zugesetzt. Die Sepharose wurde mit dem Extrakt aus 3,4 OD₆₀₀ Hefezellen oder mit dem Extrakt von HEK293-Zellen aus einem Loch einer Sechs-Loch-Kulturplatte beladen.

6.11. Ergänzende Tabelle: PCR-Primer

Tabelle E1: PCR-Primer

Name	Sequenz (von 5' nach 3')
Klonierungen	
Expressionsvektoren für Hefe	
Gag-GFP-Versionen und -Fragmente	
00046-31	GGCCGGGAATTCATGGCTGCGAGAGCGTCAG
02051-41	GTGGATCCCCGTTTCTGTTGCTATACATCCTCACGATCTTG
02052-32	GAATTCATGCCTACCAGCATTCTGGACATAAG
03030-57	GGCCGGGAATTCATGGGTGCGAGAGCGTCAGTAGTGACACCAGCGGATCGAGATCAAG
03031-47	GCAGCTGACACAGGACACAGCAGCCCTACCAGCATTCTGGACATAAG
03032-23	GCTGTGTCCTGTGTCAGCTGCTG
07241-25	GAATTCATGGGTGCGAGAGCGTCAG
07242-28	CTCGAGTTACTTGTACAGCTCGTCCATG
07667-36	GGCCGGTTCGACAAGCTTTGCAAATTAAGCCTTCG
18334-27	GAATTCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG
18534-36	GAATTCATGGCTTTTCTTCAGAGCAGACCAGAGCCA
18535-32	GAATTCATGCCTATAGTGAGAATCCAGGG
18536-33	GAATTCATGGCTGAAGCAATGAGCCAAGTAACA
20965-21	AACAGAAAACGGGGATCCACCG
20966-42	GTGGATCCCCGTTTCTGTTATTCCTGGCCTTCCCTGTAGG
23532-41	GTGGATCCCCGTTTCTGTTGTAATTTGGCTGACCTGATTG
23533-41	GTGGATCCCCGTTTCTGTTCAAACTCTTGCCTTATGGCCG
23543-32	TATCCTTTAACTTCCGCCAGATCACTCTTTGG
24546-31	GGCCGGGAATTCATGGGTGCGAGAGCGTCAG
24547-34	GGCCGGTTCGAGTTACTTGTACAGCTCGTCCATG
24671-22	CTTGCTAAAGCTTCTTGGTG
24672-22	CACCAAGGAAGCTTTAGACA
25018-35	CCAAAGAGTGATCTGGCGGAAGTTAAAGGATACAG

23539-21 CGACAAGAACCATTTACGAGC
23540-20 CGAGAAGGCGCTGGTGTTTC
Herstellung und Kontrolle von *Avps4*
27893-65 AAAAAATAAAGCAGCATAGAGTGCCTATAGTAGATGGGGTACAACGGATCCCCGGGTTAATTAA
27894-65 TTTTCATGTACACAAGAAATCTACATTAGCACGTTAATCAATTGAGAATTCGAGCTCGTTAAAC
27895-20 GCCTATAGTAGATGGGGTAC
27896-23 AAATCTACATTAGCACGTTAATC
Herstellung und Kontrolle von *Avps20*
01985-66 TACAGACTGCTGAATTAACCTCCACTTGGTGCTTTTGTATATATCGACGGATCCCCGGGTTAATTAA
01986-65 ATTTACATTCCCTTTATTTTAATTTTGAAGCTACATACAGACATGAATTCGAGCTCGTTAAAC
02401-26 AAAAGAACAAAACATAGATAGTTTGG
02402-25 CAAATTCTATCAACGAAAAACCTGG
Herstellung und Kontrolle von *Avps27*
18952-20 GAGTAAAGAACTAAGAACAG
18953-27 TTTCTTTTACAAATACATAGAAAAGG
18256-65 TTTTGCTAAGGTGAATGAGTAGTGAGTAAAGAACTAAGAACAGTCGGATCCCCGGGTTAATTAA
18257-66 TAAGCGCTAGGTTTCTTTTACAAATACATAGAAAAGGCTACAATAGAATTCGAGCTCGTTAAAC
Herstellung und Kontrolle von *Avps28*
27751-68 TTAAAATAAGGGCACTTTCATAAAGTCACTTATCACTCAAAAAGCACCCCGGATCCCCGGGTTAATTAA
27752-68 ACGCTTGTGTACTTATATATGTTATCATAATTTCTATTTGTTTATTTTTCGAATTCGAGCTCGTTAAAC
28249-25 AAGTTATGGTTTAAACAATACAACGG
28250-28 GAATAAAAAACAAGAATATTCTAAAGTG

7. Ergebnisse

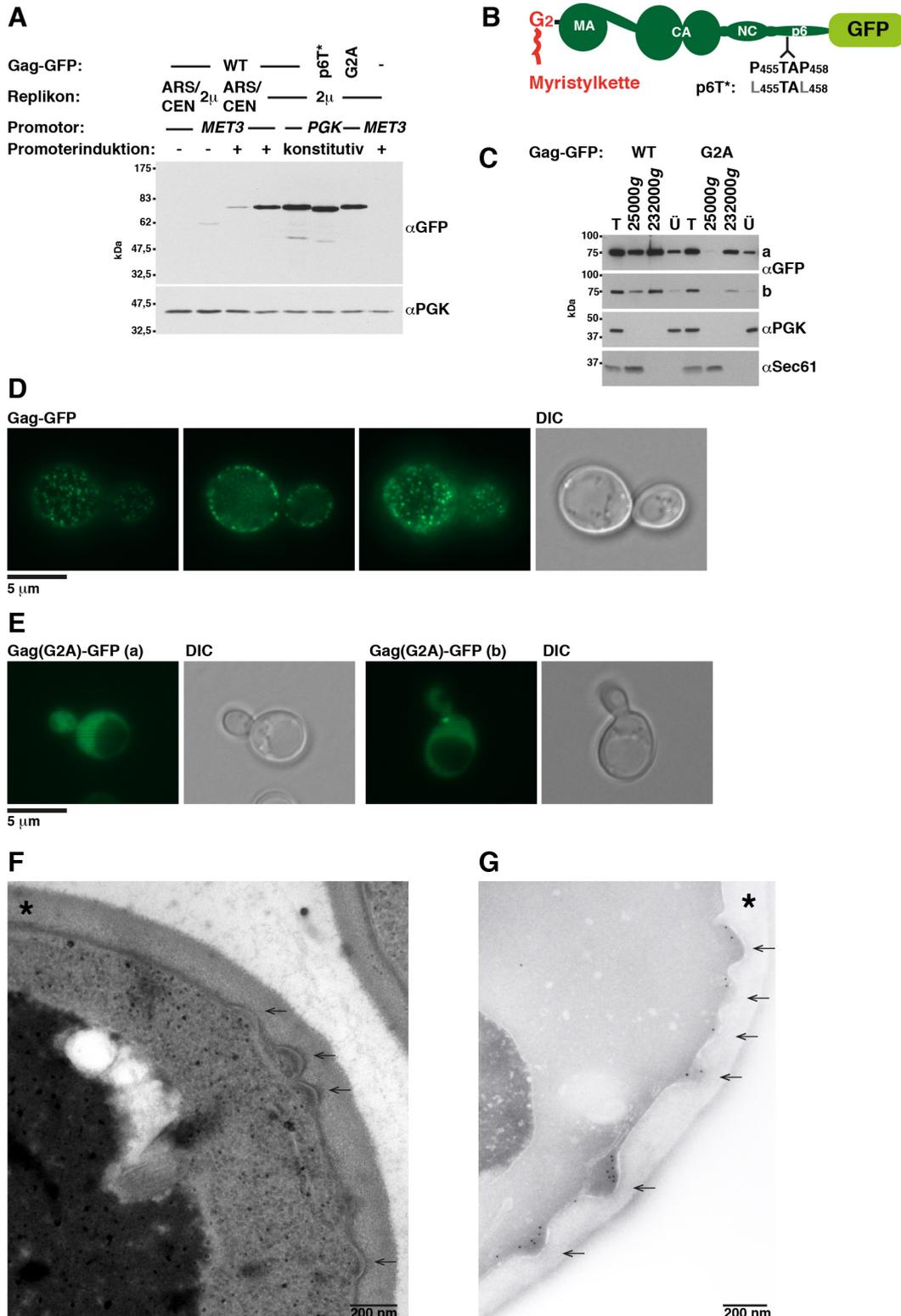
Diese Arbeit enthält keine statistischen Auswertungen. Die verwendeten Methoden sind für eine Quantifizierung von Ergebnissen nicht geeignet. Ziel war die qualitative Charakterisierung des Hefemodells anhand visuell detektierbarer Effekte. Um mikroskopische Bilder in einer Größe zu zeigen, die die Ergebnisse gut darstellen, sind repräsentative Bilder einzelner Zellen aus fluoreszenzmikroskopischen Experimenten und Ausschnitte einzelner Zellen aus elektronenmikroskopischen Experimenten abgebildet. In Kapitel 7.10. befinden sich größere Bildausschnitte der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen für die unterschiedlichen Gagversionen. Außerdem sind in Kapitel 7.10. Ausschnitte weiterer Zellen und Negativkontrollen aus den elektronenmikroskopischen Experimenten gezeigt. Viele Ergebnisse sind in mehrere Experimente eingebettet, weil beschriebene Effekte mit mehreren Methoden untersucht und/oder die jeweiligen Mutanten und Versionen zum Vergleich in verschiedenen Experimenten analysiert wurden. Um die Reproduzierbarkeit von weiteren Ergebnissen zu zeigen, insbesondere wenn Unterschiede von Signalstärken für die Interpretation wichtig sind, enthält Kapitel 7.10. Abbildungen zusätzlicher Experimente. Außerdem befinden sich in Kapitel 7.10. ergänzend Abbildungen von Experimenten, die aus Gründen der Übersichtlichkeit in den Kapiteln 7.1. bis 7.9. nur erwähnt sind. Auf die Abbildungen in Kapitel 7.10. wird im Text der Kapitel 7.1. bis 7.9. verwiesen.

7.1. Die Expression von Gag-GFP in Hefe

Um die Expressionsstärke für Gag-GFP zu finden, die zur Bildung von VLPs mit Hefe geeignet ist, wurden verschiedene Vektoren hergestellt. Die Expressionsstärke wurde über das Replikon des Vektors, das die Kopienzahl pro Zelle bestimmt, und den Promotor gesteuert (Übersicht zu Expressionsvektoren für *S. cerevisiae* in Gnügge und Rudolf, 2017). Getestet wurden ein Vektor mit konstitutiv aktivem *PGK*-Promotor, der wegen seines 2μ -Replikons in hoher Kopienzahl vorliegt, und Vektoren mit induzierbarem *MET3*-Promotor (Brunelli und Pall, 1993; Cherest et al., 1985). Die Expression vom *MET3*-Promotor wird durch Methionin im Kulturmedium gehemmt (Mao et al., 2002). Die Vektoren mit *MET3*-Promotor hatten entweder ein 2μ -Replikon oder ein ARS/CEN-Replikon, das zu einer geringen Kopienzahl führt. Zum Vergleich der Gag-GFP-Expressionsstärke wurden Lysate von Hefezellen, die mit den genannten Vektoren transformiert waren, im Immunoblot mit Anti-GFP-Antikörpern analysiert (Abb. 5A). Der Vektor mit dem *PGK*-Promotor führte zur stärksten Gag-GFP-Expression.

Die Lokalisation von Gag-GFP in der Hefezelle wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Bei starker Gag-GFP-Expression, vom 2μ -Vektor mit dem *PGK*-Promotor oder dem induzierten *MET3*-Promotor, waren punktförmige Strukturen an der Plasmamembran und eine zytosolische Fluoreszenz zu beobachten (Abb. 5D und Abb. E2 und E3, exemplarisch für die Expression vom *PGK*-Promotor). In Hefezellen exprimiertes Gag wird wie in humanen Zellen am aminoterminalen Glycin mit einer Myristylkette modifiziert (Bathurst et al., 1989). Diese Modifikation ist für die Lokalisation von Gag an der Plasmamembran notwendig (Jacobs et al., 1989). In Übereinstimmung damit zeigte sich für Gag(G2A)-GFP, eine Gagversion, bei der das myristylierbare Glycin ausgetauscht ist, die zytosolische Fluoreszenz (Abb. 5E und Abb. E4). Punktförmige Strukturen an der Plasmamembran waren nicht detektierbar. Das Bild war vergleichbar, wenn Gag-GFP mit geringer Stärke, vom ARS/CEN-Vektor mit induziertem *MET3*-Promotor, exprimiert wurde. Die Bildung der punktförmigen Strukturen an der Plasmamembran war also von der intrazellulären Gag-GFP-Konzentration und der Modifikation mit der Myristylkette abhängig.

Als weitere Methode zur Charakterisierung der Membranbindung wurde Extrakt von Gag-GFP exprimierenden Zellen durch Zentrifugation in ein membranhaltiges Sediment und einen zytosolhaltigen Überstand getrennt. Die dafür geeigneten Zentrifugationsbedingungen wurden durch differenzielle Zentrifugation bestimmt (Abb. 5C). Die Unterscheidung zwischen dem membranassoziierten Gag-GFP und Gag(G2A)-GFP war mit einem bei 25000g gewonnenen Sediment möglich. In einem aus dem Überstand



dieser ersten Zentrifugation bei 232000g gebildeten Sediment befand sich ein Anteil beider Gagversionen. Das Substrat dieses Sediments könnten zytosolische Oligomere sein und/oder Protein, das in einer undefinierten intrazellulären Struktur der Gag(G2A)-GFP exprimierenden Zellen sichtbar war (Abb. 5E und Abb. E4). Zur Analyse der Plasmamembranbindung von Gag-GFP war für Folgeexperimente demnach eine Zentrifugation bei 25000g geeignet.

Um die von Gag-GFP gebildeten punktförmigen Strukturen an der Plasmamembran bei höherer Auflösung zu charakterisieren, wurden von Bettina Purfürst und Frank Vogel elektronenmikroskopische Experimente durchgeführt. In Kunstharzschnitten hatten Gag-GFP exprimierende Zellen knospenförmige Ausstülpungen der Plasmamembran, die nicht sichtbar waren, wenn die Zellen mit dem leeren Vektor transformiert waren (Abb. 5F und Abb. E5 und E6). Um zu klären, ob diese Ausstülpungen das an der Plasmamembran akkumulierende Gag-GFP enthielten, wurden Kryoschnitte präpariert und Gag-GFP wurde über eine Immunogoldmarkierung mit Anti-GFP-Antikörpern detektiert (Abb. 5G und Abb. E7 und E8). Dabei zeigte sich eine Akkumulation von Gag-GFP in den Plasmamembranausstülpungen. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass Gag-GFP an der Plasmamembran der Hefe assembliert und die Membran wie bei der Bildung von Virionen deformiert. Die im Gegensatz zu humanen Zellen bei der Hefe vorhandene Zellwand (Abb. 5, F und G, Sterne) verhindert vermutlich die Freisetzung von VLPs und führt zur Akkumulation von assembliertem Gag-GFP an der Plasmamembran unterhalb der Zellwand.

7.2. Die Gag-GFP-Freisetzung aus Hefesphäroplasten

Im Folgenden wurde getestet, ob die Hefezellen Gag-GFP nach Entfernung der Zellwand freisetzen können. Hefezellen ohne Zellwand, Sphäroplasten, werden in verschiedenen experimentellen Ansätzen verwendet. Daher existieren für die Sphäroplastierung viele Protokollvarianten. Das gemeinsame Prinzip besteht darin, Disulfidbrücken in der Zellwand durch Inkubation mit DTT zu lösen und Glucanbindungen enzymatisch zu spalten (Übersicht zum Aufbau der Zellwand von *S. cerevisiae* in Orlean, 2012). Zur osmotischen Stabilisierung der Sphäroplasten wird dem Inkubationsmedium Sorbitol zugesetzt. Im Sphäroplastierungsprotokoll dieser Arbeit wurden die Inkubationszeit mit DTT und die DTT-Konzentration möglichst gering gehalten, um Stress durch eine Beeinflussung der Disulfidbrückenbildung im endoplasmatischen Retikulum (Travers et al., 2000) zu reduzieren. Für die enzymatische Glucanspaltung wurde Zymolyase, eine Präparation aus *Arthrobacter luteus* mit β -1,3-Glucanaseaktivität, (Kitamura und Yamamoto, 1972) ebenfalls in einer möglichst niedrigen Konzentration eingesetzt. Der Erfolg der Sphäroplastierung wurde überprüft, indem ein Aliquot des Sphäroplastierungsansatzes in deionisiertem Wasser re-

Abbildung 5. Expression von Gag-GFP in Hefe. **A**, die Gag-GFP-Expressionsstärke verschiedener Vektoren wurde im Immunoblot von Hefezell-extrakten mit Anti-GFP-Antikörpern analysiert. Gag-GFP, eine Version mit mutierter TSG101-Bindungsstelle in p6 (p6T*) oder eine Version mit mutierter Myristylierungsstelle (G2A) wurde in Wildtyp-Hefezellen von einem Vektor mit konstitutiv aktivem *PGK*-Promotor und 2 μ -Replikon oder von einem Vektor mit *MET3*-Promotor und 2 μ - oder ARS/CEN-Replikon exprimiert (pBM267, pBM269, pBM273, pBM354, pBM355). Zur Induktion des Promotors wurden die Zellen vier Stunden in Medium ohne Methionin inkubiert. *PGK* diente als Ladekontrolle. **B**, schematische Darstellung von Gag-GFP. **C**, die Membranbindung von Gag-GFP wurde mit differenzieller Zentrifugation analysiert. Mit einem 25000g-Sediment kann zwischen membrangebundenem und zytosolisch lokalisiertem Gag unterschieden werden. Ein 25000g-Sediment, ein 232000g-Sediment und ein Überstand (Ü) wurden aus Extrakten (T) von Wildtyp-Hefezellen präpariert, die GFP-markiertes Gag oder Gag(G2A) von einem Vektor mit *PGK*-Promotor und 2 μ -Replikon exprimierten (pBM267, pBM354). Die Proben wurden im Immunoblot mit den angegebenen Antikörpern analysiert. Die Sedimente waren gegenüber den Überständen und Extrakten konzentriert (25000g, 4x; 232000g, 3,3x). Das zytosolische Protein *PGK* und das ER-Membranprotein *Sec61* dienten als Referenz. Eine lange (a) und eine kurze (b) Exposition sind gezeigt. **D** und **E**, die intrazelluläre Lokalisation von GFP-markiertem Gag oder Gag(G2A), exprimiert wie in **C**, wurde mit Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Gag-GFP akkumuliert abhängig von der aminoterminalen Myristylylmodifikation in punktförmigen Strukturen an der Plasmamembran. Drei Ebenen einer Gag-GFP exprimierenden Hefezelle sind abgebildet. DIC, differential interference contrast. **F** und **G**, mit Elektronenmikroskopie sind durch Gag-GFP induzierte knospenförmige Deformationen der Plasmamembran (Pfeile) sichtbar. Stern, Zellwand. **F**, Wildtyp-Hefezellen, die Gag-GFP von einem 2 μ -Vektor mit *MET3*-Promotor (pBM273) exprimierten, wurden nach sechsständiger Induktion des Promotors in Kunstharz eingebettet. **G**, Kryoschnitte von Wildtyp-Hefezellen (SUB62), die Gag-GFP von einem 2 μ -Vektor mit *PGK*-Promotor (pBM267) exprimierten, wurden präpariert und Gag-GFP wurde über Immunogoldmarkierung mit Anti-GFP-Antikörpern detektiert. Die Elektronenmikroskopie und die Präparation der Proben wurden von Bettina Purfürst (F) und Frank Vogel (G) durchgeführt. **A** und **C**, WT, Wildtyp.

suspendiert und die optische Dichte bei 600 nm, ein Maß für die Zelldichte einer Suspension, bestimmt wurde. Aufgrund osmotisch bedingter Zellschwellung platzen sphäroplastierte Hefezellen in deionisiertem Wasser. Die Abnahme der optischen Dichte bei 600 nm zeigt den Erfolg der Sphäroplastierung an. Für die Ernte der potentiell aus den Hefesphäroplasten in das Inkubationsmedium freigesetzten Gag-GFP-VLPs wurde von der Annahme ausgegangen, dass die VLPs eine ähnliche Größe wie unreife HIV-1-Virionen haben [Durchmesser circa 130 nm (Carlson et al., 2008; Pornillos et al., 2003; Wilk et al., 2001)] und durch Hochgeschwindigkeitszentrifugation (232000g) aus dem Medium sedimentierbar sind (Abb. 6A). Um die Gag-GFP-VLPs zu ernten, wurden die Sphäroplasten zunächst vorsichtig aus dem Inkubationsmedium abzentrifugiert. Potentiell im Medium verbliebene Zellen und Zelltrümmer wurden, wie in manchen Experimenten zur Freisetzung von HIV-1 aus humanen Zellen (Wang und Barklis, 1993), mittels Filtration durch 0,45 µm große Poren entfernt. Anschließend wurde das Medium bei hoher Geschwindigkeit zentrifugiert. Das im Sediment enthaltene Gag-GFP wurde im Immunoblot mit Anti-GFP-Antikörpern detektiert.

Um zu testen, ob das verwendete Verfahren, das heißt die Filtration des Mediums und die anschließende Zentrifugation bei 232000g, für die Ernte von Gag-GFP-VLPs geeignet ist, wurde ein vergleichbares Experiment mit humanen HEK293-Zellen durchgeführt (Abb. 9A). HEK293-Zellen wurden mit Expressionsvektoren für Gag-GFP und Gag-GFP-Mutanten transfiziert. Zwei Tage später wurde das Medium, wie für die Hefesphäroplasten beschrieben, filtriert und zentrifugiert. Die Menge des auf diese Weise geernteten Gag-GFP war bei Deletion des carboxyterminalen p6-Peptids, das die ESCRT-Bindungsstellen enthält, stark reduziert. Da dieses Ergebnis mit Beobachtungen zur HIV-1-Freisetzung aus humanen Zellen übereinstimmt (Göttlinger et al., 1991), ist die verwendete Methode offenbar geeignet, um Gag-GFP-VLPs zu ernten.

Im Experiment, das in Abb. 6B dargestellt ist, exprimierten die Hefesphäroplasten Gag-GFP vom 2µ-Vektor mit *PGK*-Promotor. Freigesetztes Gag-GFP wurde alle zwei Stunden über einen Zeitraum von acht Stunden geerntet. Nach jeder Ernte wurde das Inkubationsmedium vollständig entfernt und die Sphäroplasten wurden anschließend in frischem Medium inkubiert. Vom ersten bis zum dritten Zeitpunkt nahm die Gag-GFP-Freisetzung deutlich zu. Um zu kontrollieren, ob Gag-GFP spezifisch aus den Zellen freigesetzt wird, wurden die aus dem Inkubationsmedium gewonnenen Zentrifugationssedimente zusätzlich auf drei zelluläre Proteine getestet. Weder das zytosolische Protein PGK (3-Phosphoglyceratkinase) (Jackson und Stevens, 1997), noch zwei Membranproteine, das ER-Protein Sec61 (Panzner et al., 1995) und das im Golgi-Apparat und in COPII-Transportvesikeln lokalisierte Protein Emp47 (Margulis et al., 2016; Schröder et al., 1995), waren im Sediment nachweisbar. Zusätzlich wurde eine Kontrolle mit der nicht myristylierbaren Gagversion, Gag(G2A)-GFP, durchgeführt. Gag(G2A)-GFP war in den Zentrifugationssedimenten nicht detektierbar. Die Plasmamembranbindung war demzufolge eine Voraussetzung für die Freisetzung von Gag-GFP. Bei Expression von Gag-GFP und Gag(G2A)-GFP vom 2µ-Vektor mit *MET3*-Promotor und Induktion des Promotors zu Beginn der Sphäroplastenpräparation wurden vergleichbare Ergebnisse erhalten (Abb. E9A). Bei geringer Gag-GFP-Expression, vom ARS/CEN-Vektor mit induziertem *MET3*-Promotor, war Gag-GFP im Zentrifugationssediment nicht nachweisbar (Abb. E9B). Dieses Ergebnis stimmt mit der Beobachtung überein, dass Gag-GFP bei geringer Expressionsstärke keine punktförmigen Strukturen an der Plasmamembran bildet.

Zusammengefasst zeigen die beschriebenen Experimente, dass die Hefesphäroplasten Gag-GFP in einer sedimentierbaren Form ins Inkubationsmedium freisetzen, die 0,45 µm große Poren passieren kann. Die Freisetzung ist spezifisch für Gag-GFP und erfordert dessen Plasmamembranbindung.

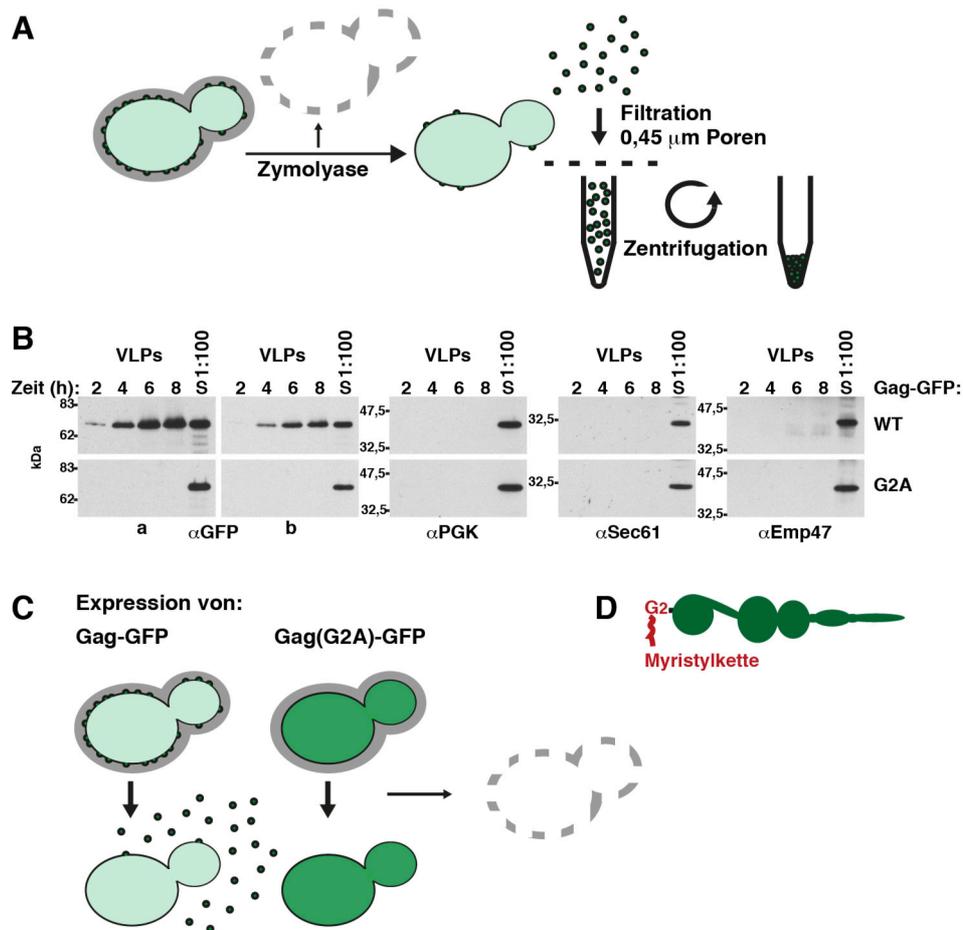


Abbildung 6. Hefesphäroplasten setzen Gag-GFP in einer sedimentierbaren Form frei, die 0,45 µm große Poren passieren kann. Die Freisetzung ist spezifisch für Gag-GFP und abhängig von dessen Myristylmodifikation. **A**, schematische Darstellung des Gag-GFP-Freisetzungsexperiments. Hefesphäroplasten werden durch enzymatische Entfernung der Zellwand mittels Zymolyase hergestellt. Die von den Sphäroplasten freigesetzten Gag-GFP-VLPs werden aus dem Inkubationsmedium geerntet, indem Zelltrümmern durch Filtration entfernt und die Gag-GFP-VLPs durch Zentrifugation gewonnen werden. **B**, die Freisetzung von Gag-GFP (WT, Wildtyp) oder Gag(G2A)-GFP, einer Version mit mutierter Myristylierungsstelle, aus Wildtyp-Hefesphäroplasten wurde mit einem Anti-GFP-Immunoblot von Zentrifugations sedimenten des Inkubationsmediums analysiert (VLPs). Die freigesetzten Proteine wurden nach der Sphäroplastenpräparation über einen Zeitraum von acht Stunden alle zwei Stunden geerntet. Nach jeder Ernte wurden die Sphäroplasten in frischem Medium inkubiert. Die Freisetzung nahm vom ersten bis zum dritten Zeitpunkt zu. Immunoblots mit Antikörpern gegen drei zelluläre Proteine, PGK (zytosolisches Protein), Sec61 (ER-Membranprotein) und Emp47 (Golgi- und COPII-Vesikel-Membranprotein), dienen als Kontrolle für die spezifische Freisetzung von Gag-GFP. Die Sphäroplasten exprimierten Gag-GFP oder Gag(G2A)-GFP von einem 2µ-Vektor mit *PGK*-Promotor (pBM267, pBM354). Eine lange (a) und eine kurze (b) Exposition sind abgebildet. Die in einer Spalte gezeigten Kinetiken sind Ausschnitte aus demselben Autoradiografiebild. S, Sphäroplastenlysate, das am letzten Zeitpunkt der Kinetik präpariert wurde. **C**, schematische Darstellung der Interpretation des in **B** abgebildeten Experiments, unter Berücksichtigung von Abb. 5, D und E. **D**, schematische Darstellung von Gag.

7.3. Die Gag-GFP-Freisetzung aus Hefesphäroplasten ist ESCRT-abhängig.

Um zu testen, ob die Gag-GFP-Freisetzung aus Hefesphäroplasten von ESCRT-Proteinen abhängig ist, wurde das Gag-GFP-Freisetzungsexperiment mit Deletionsmutanten von *VPS27* (ESCRT-0), *VPS23* und *VPS28* (beide ESCRT-I), *VPS20* (ESCRT-III), *BRO1* und *VPS4* durchgeführt [Abb. 7 (A-C) und Abb. E10 (A-D)]. Innerhalb der ersten drei Stunden nach der Sphäroplastenpräparation setzten die ESCRT-Mutanten eine gegenüber dem Wildtyp etwa vergleichbare Menge an Gag-GFP frei. Während der folgenden vier Stunden war die Gag-GFP-Freisetzung aus den ESCRT-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp deutlich reduziert. Die schwache Gag-GFP-Freisetzung in der ersten Inkubationsperiode nach der Sphäroplastenpräparation war also weitgehend ESCRT-unabhängig, während die folgende stärkere Freisetzung ESCRT-abhängig war. Um zu testen, ob die reduzierte Gag-GFP-Freisetzung aus ESCRT-

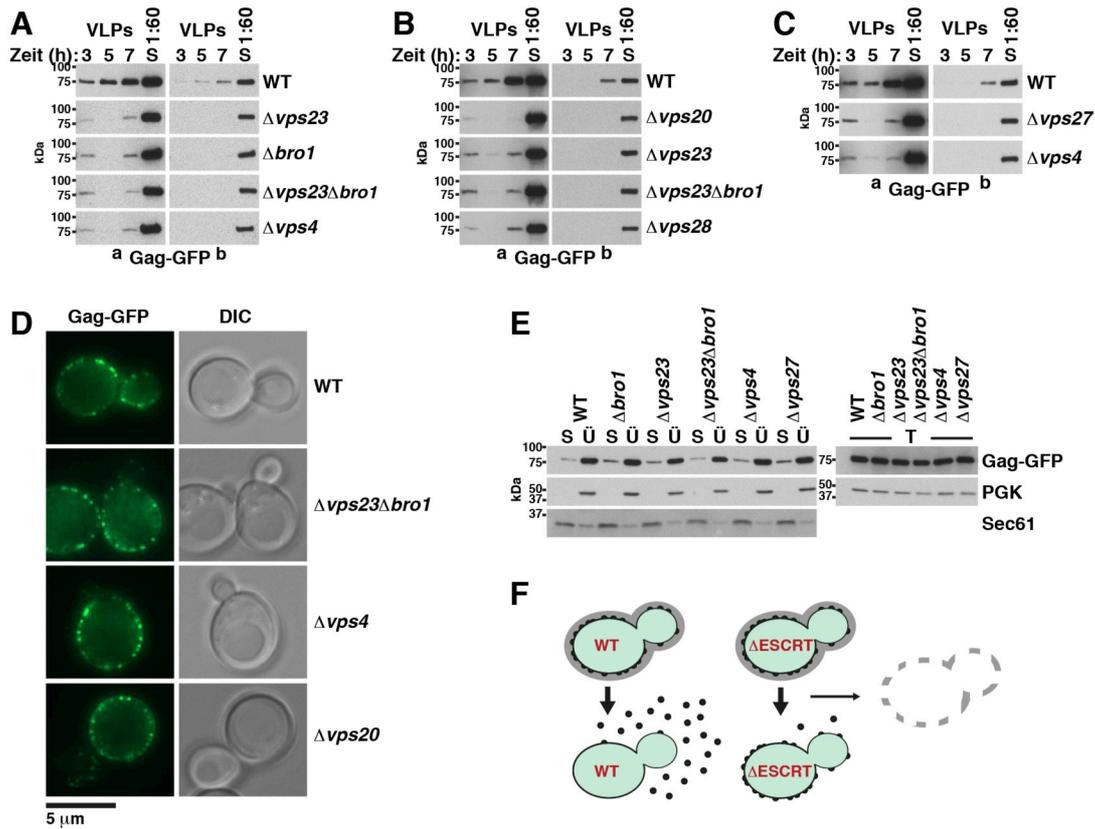


Abbildung 7. Die Gag-GFP-Freisetzung aus Hefesphäroplasten ist ESCRT-abhängig. A-C, die Freisetzung von Gag-GFP aus Hefesphäroplasten des Wildtypstamms oder der angegebenen ESCRT-Mutanten wurde mit Anti-GFP-Immunoblots von Zentrifugationsedimenten des Inkubationsmediums analysiert (VLPs). Die Gag-GFP-Freisetzung ist ESCRT-abhängig. Lange (a) und kurze (b) Expositionen sind abgebildet. Die in einer Spalte gezeigten Kinetiken sind Ausschnitte aus demselben Autoradiografiefilm. S, Sphäroplastenlysat, das am letzten Zeitpunkt der Kinetik präpariert wurde. **D** und **E**, die Deletion von ESCRT-Proteinen beeinträchtigt die Akkumulation von Gag-GFP an der Plasmamembran nicht. **D**, die Akkumulation von Gag-GFP in punktförmigen Strukturen an der Plasmamembran wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. DIC, differential interference contrast. **E**, die Membranbindung von Gag-GFP wurde mit einem Anti-GFP-Immunoblot membranhaltiger Zentrifugationsedimente (25000g) (S) und zytosolhaltiger Überstände (Ü), die aus Zellextrakt (T) gewonnen wurden, analysiert. Immunoblots für das ER-Membranprotein Sec61 und das zytosolische Protein PGK dienen als Referenz. **A-E**, die Zellen exprimierten Gag-GFP von einem 2 μ -Vektor mit *PGK*-Promotor (pBM267). **F**, schematische Darstellung zur Interpretation der abgebildeten Ergebnisse. **A-F**, WT, Wildtyp.

Mutanten durch eine gestörte Gag-GFP-Assemblierung an der Plasmamembran verursacht war, wurde die Membranbindung von Gag-GFP durch Präparation membranhaltiger Zentrifugationsedimente untersucht (Abb. 7E). Zusätzlich wurde die Bildung der punktförmigen Gag-GFP-Strukturen an der Plasmamembran mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert (Abb. 7D). Die Gag-GFP-Menge in Membransedimenten von ESCRT-Mutanten war gegenüber dem Wildtyp nicht reduziert. Außerdem wurde das gleiche Muster punktförmiger Strukturen an der Plasmamembran von ESCRT-Mutanten und Wildtypzellen beobachtet. Auch die Kinetik der Membranassoziation von Gag-GFP nach Induktion der Gag-GFP-Expression vom *MET3*-Promotor entsprach in ESCRT-Mutanten der des Wildtyps (Abb. E10E). Innerhalb der ersten drei Stunden nach der Promotorinduktion befanden sich vergleichbare Mengen an Gag-GFP im Membransediment. Aus diesen Experimenten ergibt sich also kein Hinweis darauf, dass die ESCRT-Abhängigkeit der Gag-GFP-Freisetzung aus Hefesphäroplasten durch einen Defekt der Gag-GFP-Assemblierung an der Plasmamembran bedingt sein könnte. Übereinstimmend damit wurde die Akkumulation assemblierter HIV-1-Virionen an der Plasmamembran humaner Zellen mit gestörter ESCRT-Funktion beobachtet (Garrus et al., 2001; von Schwedler et al., 2003b). Darüber hinaus war die Gagassemblierung an der Plasmamembran in fluoreszenzmikroskopischen Experimenten nicht verzögert, wenn die ESCRT-Bindungsstellen im p6-Peptid mutiert waren (Ivanchenko et al., 2009; Jouvenet et al., 2011).

Zusammengefasst zeigen die beschriebenen Experimente, dass die Freisetzung von Gag-GFP aus Hefesphäroplasten durch die Deletion von ESCRT-Proteinen stark reduziert wird.

7.4. Gag bindet an ESCRT-Proteine der Hefe.

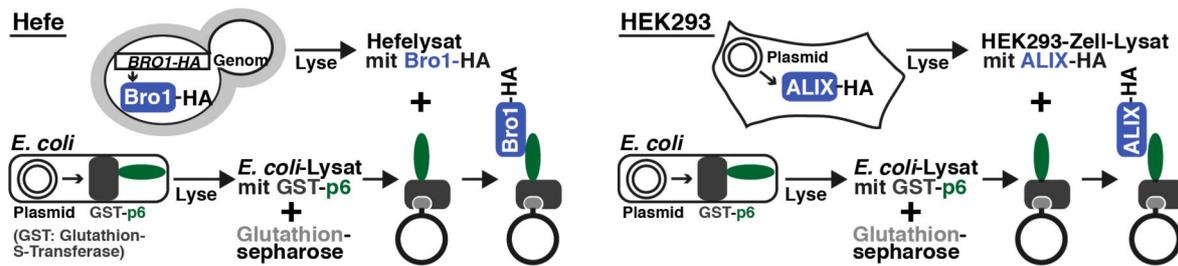
Im Folgenden sollte die Frage beantwortet werden, ob Gag an die ESCRT-Proteine der Hefe binden kann. Die humanen ESCRT-Proteine ALIX und TSG101 binden an das carboxyterminale p6-Peptid von Gag (Garrus et al., 2001; Martin-Serrano et al., 2001; Strack et al., 2003; VerPlank et al., 2001). Die ESCRT-Bindungsmotive in p6 ahmen die Sequenzen zellulärer ESCRT-Interaktionspartner oder die Sequenzen von MVB-Substraten nach (Bache et al., 2003; Dores et al., 2012 und 2016; Lu et al., 2003; Pornillos et al., 2003; von Schwedler et al., 2003b). Die Hefehomologen von ALIX und TSG101, Bro1 und Vps23, erkennen ähnliche, aber nicht identische Motive in Hefeproteinen (Bilodeau et al., 2003; Katzmann et al., 2003; Kimura et al., 2014; Richter et al., 2007).

Eine hydrophobe Tasche in der zentralen V-Domäne von ALIX bindet an die YPX_nL-Motive des p6-Peptids von HIV-1-Gag [n=3, YPL(T/A)SL] und des p9-Peptids von EIAV(equine infectious anemia virus)-Gag (n=1, YPDL) (Fisher et al., 2007; Lee et al., 2007; Zhai et al., 2008). Dabei sind die als X bezeichneten Aminosäuren so angeordnet, dass die drei anderen Aminosäuren der YPX_nL-Motive mit den gleichen Positionen in ALIX interagieren können (Zhai et al., 2008). Außerdem beeinflussen die flankierenden Bereiche des YPX_nL-Motivs die Bindungsstärke (Zhai et al., 2008). Zwei zelluläre MVB-Substrate, die Rezeptoren PAR1 und P2Y1, interagieren über YPX₃L-Motive (YPMQSL beziehungsweise YPLKSL) mit ALIX (Dores et al., 2012 und 2016). Die V-Domänen von Bro1 und ALIX haben sehr ähnliche dreidimensionale Strukturen [Pashkova et al., 2013, Struktur der V-Domäne von Bro1 aus *S. castelli* (die Proteinsequenz ist zu 56% identisch mit der V-Domäne von Bro1 aus *S. cerevisiae*)]. Die Proteinsequenzen sind aber nur zu 11 bis 15% identisch (Kimura et al., 2015; Lee et al., 2007; Pashkova et al., 2013) (Abb. E11). Bro1 bindet abhängig von einem YPX₁L(YPEL)-Motiv mit seiner V-Domäne an den zellulären Interaktionspartner Rfu1 (Kimura et al., 2014). Ein YPX₁L-Motiv (YPFL) in Doa4 ist für die funktionelle Interaktion von Bro1 und Doa4 notwendig (Richter et al., 2007). An dieser Interaktion ist allerdings die carboxyterminale Region von Bro1 beteiligt.

Eine Rille auf der Oberfläche der aminoterminalen UEV-Domäne von TSG101 bindet das PTAP-Motiv in HIV-1-p6 (Pornillos et al., 2002a). Ein PSAP-Motiv in HRS, einer Komponente des ESCRT-0-Komplexes, ist an der Interaktion zwischen TSG101 und HRS beteiligt (Bache et al., 2003; Lu et al., 2003; Pornillos et al., 2003). Das HRS-Homologe aus Hefe, Vps27, hat zwei PSDP-Motive und ein PTVP-Motiv, deren Mitwirkung an der Vps27-Vps23-Interaktion beschrieben ist (Bilodeau et al., 2003; Katzmann et al., 2003). Ein Vergleich der dreidimensionalen Struktur der TSG101- und der Vps23-UEV-Domäne ergab eine „große Sequenzdivergenz“ (Übersetzung durch die Autorin) zwischen der Region in TSG101, die das PTAP-Motiv bindet, und der entsprechenden Region in Vps23 (Teo et al., 2004) (Abb. E12). Dieser Unterschied „könnte die Bindung an ähnliche, aber abweichende PXXP-Motive erklären“ (Übersetzung durch die Autorin) (Teo et al., 2004). In einem Kokristall interagierte eine Region der UEV-Domäne von Vps23 mit einem PSDP-Motiv, die nicht der Bindungsstelle für das PTAP-Motiv in TSG101 entsprach (Ren und Hurley, 2011).

Den zitierten Ergebnissen zufolge war es also unklar, ob Gag an ESCRT-Proteine der Hefe binden würde. Für die Bindungsstudien wurden Hefestämme hergestellt, die genomisch kodierte epitopmarkierte ESCRT-Proteine exprimierten. Um zu kontrollieren, ob die Epitopmarkierung die Funktion der ESCRT-Proteine beeinflusst, wurde der ESCRT-abhängige Transport von Carboxypeptidase S in die Vakuole analysiert (Odorizzi et al., 1998; Reggiori und Pelham, 2001) (Abb. E1). Die für die Bindungsstudien verwendeten Epitopmarkierungen beeinträchtigten den Transport von Carboxypeptidase S nicht. Zusätz-

A GST-Pull-down



B Koimmunpräzipitation

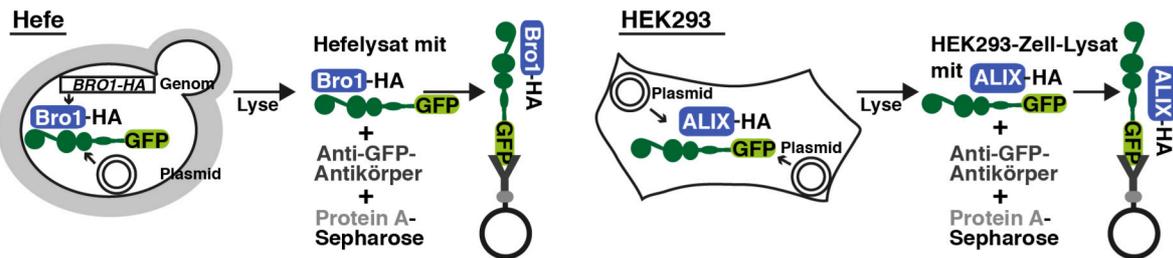


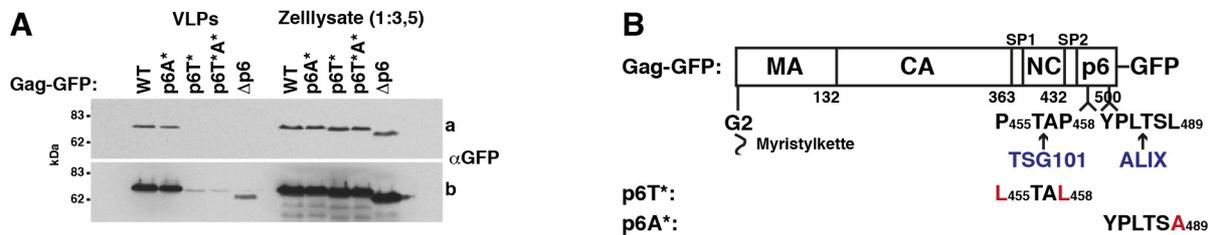
Abbildung 8. Schematische Darstellung der verwendeten Bindungsassays. A, GST-Pull-down-Experimente. Gagfragmente (exemplarisch für p6 dargestellt) wurden mit aminoterminaler GST-Fusion in *E. coli* exprimiert und nach Lyse der Bakterien an Glutathionsepharose gebunden. Die Sepharose wurde anschließend entweder mit Lysat aus Hefezellen oder HEK293-Zellen inkubiert, die die epitopmarkierte Version eines ESCRT-Proteins (exemplarisch für Bro1-HA und ALIX-HA dargestellt) exprimierten. An die Sepharose gebundenes ESCRT-Protein wurde anschließend im Immunoblot detektiert. In Hefe wurden die epitopmarkierten ESCRT-Proteine vom ursprünglichen Genlokus unter Kontrolle des natürlichen Promotors exprimiert, in HEK293-Zellen von einem Plasmid mit CMV-Promotor. B, Koimmunpräzipitationsexperimente. Gag-GFP und epitopmarkierte ESCRT-Proteine wurden in Hefe oder HEK293-Zellen exprimiert. Nach Zellyse wurde Gag-GFP mit Anti-GFP-Antikörpern und Protein-A-Sepharose immunpräzipitiert und das an Gag-GFP gebundene epitopmarkierte ESCRT-Protein wurde anschließend im Immunoblot detektiert. Die epitopmarkierten ESCRT-Proteine wurden wie in A exprimiert, Gag-GFP von einem Plasmid.

lich wurden verschiedene Epitopmarkierungen in Bindungsexperimenten verglichen (Abb. E13). Zur Charakterisierung der Gag-ESCRT-Interaktion wurden zwei Arten von Bindungsassays durchgeführt (Abb. 8). In GST-Pull-down-Assays wurden an GST (Glutathion-S-Transferase) fusionierte Gagdomänen in *E. coli* exprimiert und an Glutathionsepharose gebunden. Die Sepharose wurde anschließend mit Lysat aus Hefezellen inkubiert, die ein epitopmarkiertes ESCRT-Protein exprimierten. Die Bindung des ESCRT-Proteins an das GST-Fusionsprotein wurde im Immunoblot mit Antikörpern gegen das Epitop analysiert. In Koimmunpräzipitationsexperimenten wurde Gag-GFP in Hefezellen mit einem genomisch kodierten epitopmarkierten ESCRT-Protein exprimiert. Gag-GFP wurde mit Anti-GFP-Antikörpern immunpräzipitiert und gebundenes ESCRT-Protein wurde im Immunoblot detektiert.

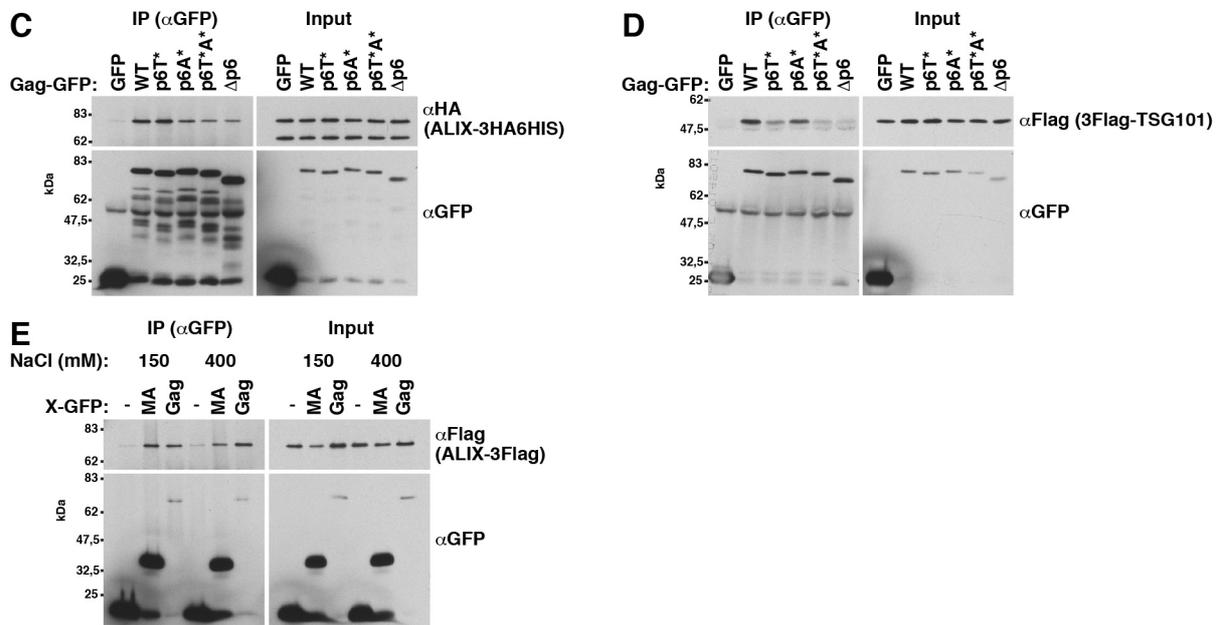
Parallel wurden Experimente mit humanen ESCRT-Proteinen durchgeführt, um zu testen, ob die verwendeten Gagkonstrukte und Inkubationsbedingungen für die Detektion der Gag-ESCRT-Interaktion geeignet waren. Die Versuchsansätze entsprachen den Bindungsassays für Hefepoteine, mit der Ausnahme, dass die epitopmarkierten humanen ESCRT-Proteine von Vektoren mit CMV-Promotor in HEK293-Zellen exprimiert wurden (Abb. 8). Mutationen in p6, die die Interaktion von p6 mit TSG101 und ALIX stark reduzieren, waren aus Bindungsassays mit dem p6-Peptid und ESCRT-Protein-Fragmenten bekannt (Garrus et al., 2001; Strack et al., 2003). Die Mutation der Bindungsstellen in p6 (TSG101: p6T*, P455L, P458L, Martin-Serrano et al., 2001; ALIX: p6A*, L489A, Strack et al., 2003) reduzierte die Bindung von TSG101 und ALIX an Gag-GFP (Abb. 9, C und D). TSG101 und ALIX können demzufolge ihr Bindungsmotiv im p6-Peptid von Gag-GFP erkennen. In Übereinstimmung mit publizierten Ergebnissen zur HIV-1-Freisetzung (siehe 5.3.) reduzierte die Mutation der TSG101-Bindungsstelle die Gag-GFP-Freisetzung aus HEK293-Zellen stark, während die Mutation der ALIX-Bindungsstelle keinen deutlichen Einfluss auf die Gag-GFP-Freisetzung hatte (Abb. 9A).

In Pull-down-Experimenten präzipitierte Bro1 mit GST-p6, aber nicht mit GST-p6A* (Abb. 10I). Bro1 kann mit dem p6-Peptid also über dieselbe Bindungsstelle interagieren wie ALIX. Außerdem koimmunpräzipitierte Bro1 mit Gag-GFP (Abb. 10C). Unerwarteterweise war diese Interaktion aber unabhän-

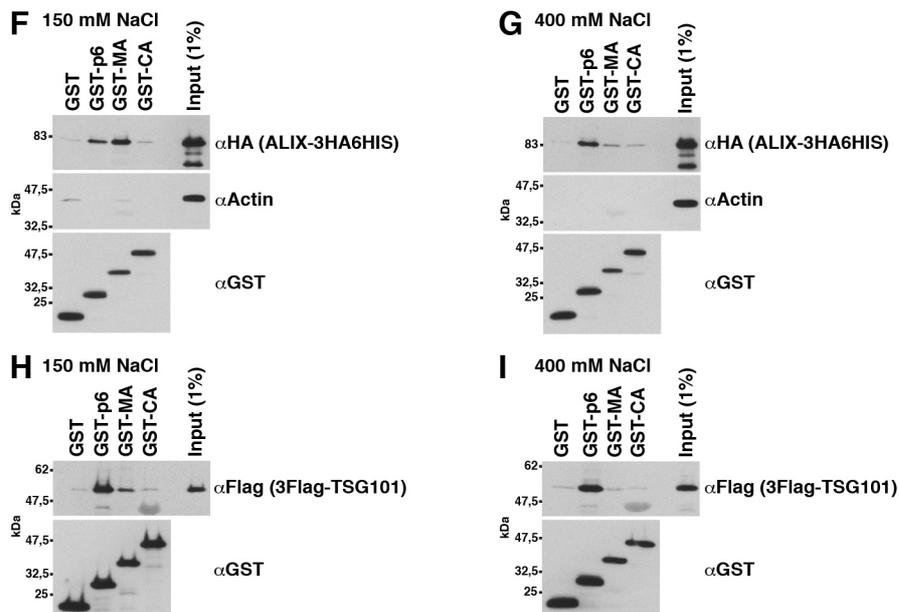
HEK293: Gag-GFP-Freisetzungssassay



HEK293: Koimmunpräzipitationen



HEK293: GST-Pull-downs



gig von p6. Vergleichbar dazu koimmunpräzipitierte die gleiche Menge an Vps23 mit Gag-GFP und Gag(Δ p6)-GFP (Abb. 10E). Im Gegensatz zu Bro1 konnte Vps23 nicht mit GST-p6 präzipitiert werden (Abb. 10, K versus H). Im Pull-down-Experiment für die humanen ESCRT-Proteine war eine Bindung von ALIX und TSG101 an GST-p6 detektierbar (Abb. 9, G und I). Während Bro1 nur bei erhöhter Salzkonzentration im Inkubationspuffer (400 mM NaCl) deutlich mit GST-p6 interagiert (Abb. 10, H versus G), präzipitierten ALIX und TSG101 auch in Gegenwart von 150 mM NaCl (Abb. 9, F-I). Die Ergebnisse der Bindungsassays deuteten darauf hin, dass die ESCRT-Proteine der Hefe stärker an eine andere Proteinregion von Gag binden als an das p6-Peptid. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen war die Freisetzung von Gag-GFP aus Hefesphäroplasten trotz der ESCRT-Abhängigkeit unabhängig von p6 (Abb. 10A).

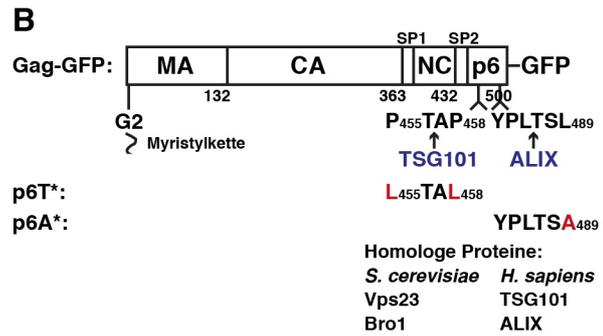
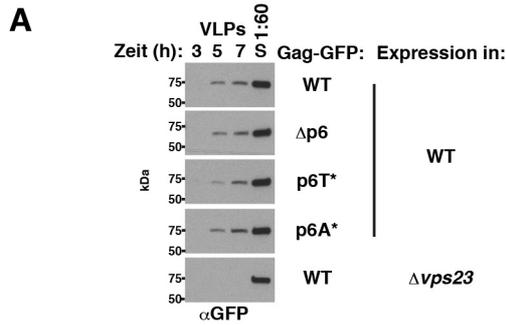
7.5. ESCRT-Proteine aus Hefe und humanen Zellen binden an die aminotermine Proteinregion von Gag.

Um die Gagdomäne zu identifizieren, die mit den ESCRT-Proteinen der Hefe interagiert, wurden Koimmunpräzipitationsexperimente durchgeführt [Abb. 10 (D und F) und Abb. E14A]. Bro1 und Vps23 koimmunpräzipitierten mit GFP-markierten Gagfragmenten, die entweder MA oder CA enthielten. Darüber hinaus präzipitierten Bro1 und Vps23 mit GST-MA (Abb. 10, G und J). Es ist prinzipiell denkbar, dass die ESCRT-Proteine mit ihren UBDs an eine potentielle Ubiquitinmodifikation der in Hefe exprimierten Gagfragmente binden. Da *E. coli* aber kein Ubiquitin exprimiert (Pickart und Eddins, 2004) und die ESCRT-Proteine mit GST-MA präzipitierten, ist eine ESCRT-MA-Interaktion unabhängig von einer Ubiquitinmodifikation möglich. Eine Bindung von Bro1 oder Vps23 an GST-CA war nicht detektierbar (Abb. 10, G, H, J und K). Möglicherweise wird die ESCRT-CA-Interaktion im Koimmunpräzipitationsexperiment über eine posttranslationale Modifikation von CA vermittelt, die bei Expression in *E. coli* nicht auftritt. Strukturelle Unterschiede zwischen GST-CA und CA-GFP könnten ebenfalls eine Erklärung sein.

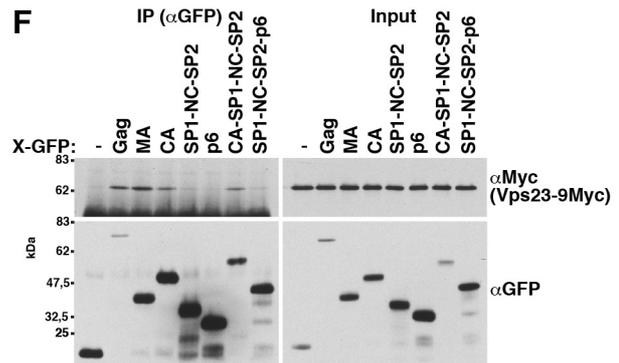
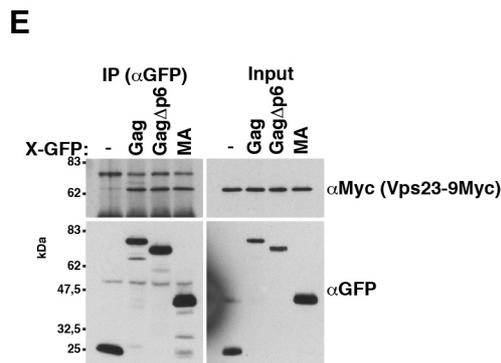
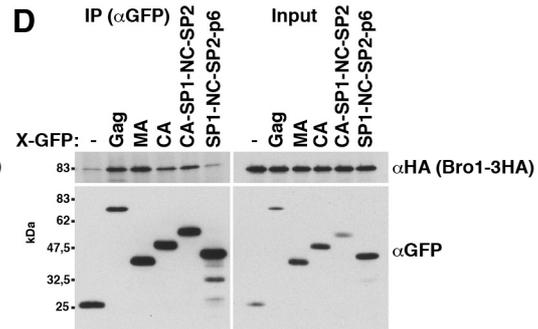
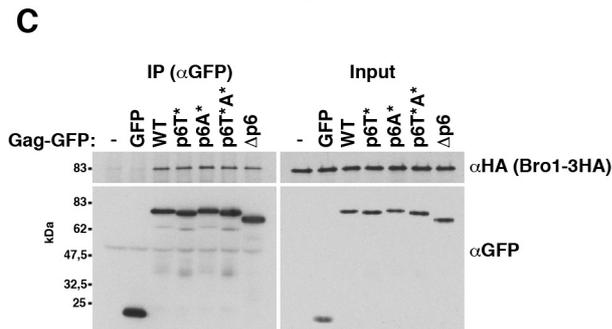
Eine Bindung von humanen ESCRT-Proteinen an die aminotermine Region von HIV-1 Gag war in der Literatur nicht beschrieben. Die humanen ESCRT-Proteine, ALIX und TSG101, interagierten wie die Hefehomologen im Pull-down-Experiment mit GST-MA [Abb. 9 (F und H) und Abb. E13 (G-J)]. Die Bindung an GST-MA im Verhältnis zu GST-p6 war für ALIX stärker als für TSG101. Die Interaktion zwischen ALIX und MA wurde darüber hinaus mit einem Koimmunpräzipitationsexperiment bestätigt (Abb. 9E). Die Mutation der ALIX-Bindungsstelle in p6 und die Deletion von p6 reduzierten die Koimmunpräzipitation von ALIX mit Gag-GFP vergleichbar stark (Abb. 9C und Abb. E14C). Dass ALIX trotz Deletion von p6 noch mit Gag-GFP koimmunpräzipitierte, ist in Übereinstimmung mit der Annahme, dass ALIX auch an eine andere Region von Gag binden kann als an p6.

Abbildung 9. ALIX und TSG101 binden an MA. Die relative Affinität für MA verglichen mit p6 ist für ALIX höher. **A**, Gag-GFP-Freisetzungssassay mit HEK293-Zellen. Die Gag-GFP-Freisetzung ist übereinstimmend mit publizierten Ergebnissen zur HIV-1-Freisetzung (Göttlinger et al., 1991) abhängig von p6. Zwei Tage nach der Transfektion mit Vektoren für die Expression der angegebenen Gagversionen vom CMV-Promotor (pBM199, pBM203, pBM205, pBM207, pBM231) wurden VLPs aus dem Kulturmedium geerntet und Zellysate präpariert. Gag-GFP wurde im Anti-GFP-Immunoblot detektiert. Eine kurze (a) und eine lange (b) Exposition sind abgebildet. **B**, schematische Darstellung von Gag-GFP. **C-E**, Koimmunpräzipitationen von epitopmarkiertem ALIX oder TSG101 mit GFP-markierten Gagversionen oder MA-GFP. Die Bindung von ALIX an Gag wird durch Deletion von p6 reduziert, aber nicht verhindert. Die Bindung von TSG101 an Gag ist stärker von p6 abhängig. ALIX bindet an MA. Die Proteine wurden in HEK293-Zellen von Vektoren mit CMV-Promotor exprimiert (pBM197, pBM199, pBM203, pBM205, pBM207, pBM209, pBM231, EX-V1319-M08, EX-V1319-M14, EX-V4135-M12). Die GFP-markierten Proteine wurden in Gegenwart von 150 mM NaCl (C und D) oder wie angegeben (E) mit Anti-GFP-Antikörpern immunpräzipitiert und koimmunpräzipitiertes ALIX oder TSG101 wurde mit Antikörpern gegen die Epitopmarkierung im Immunoblot detektiert. IP, Immunpräzipitation. **F-I**, Pull-down-Experimente, die zeigen, dass ALIX und TSG101 an in *E. coli* exprimiertes GST-MA binden. Die relative Affinität für MA verglichen mit p6 ist für ALIX höher. An GST fusionierte Gagfragmente wurden in *E. coli* exprimiert (pBM239, pBM255, pBM257), an Glutathionsepharose gebunden und mit Extrakt aus HEK293-Zellen inkubiert, die epitopmarkiertes ALIX oder TSG101 von einem Vektor mit CMV-Promotor exprimierten (EX-V1319-M08, EX-V4135-M12). An die Sepharose gebundene Proteine wurden im Immunoblot mit den angegebenen Antikörper detektiert. α Actin diente als Kontrolle für die spezifische Bindung der ESCRT-Proteine. **A, C, D**, WT, Wildtyp.

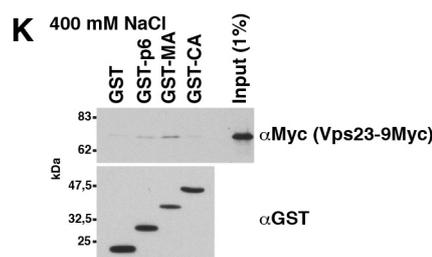
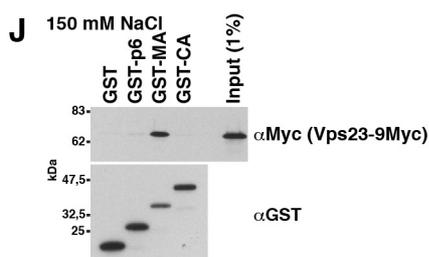
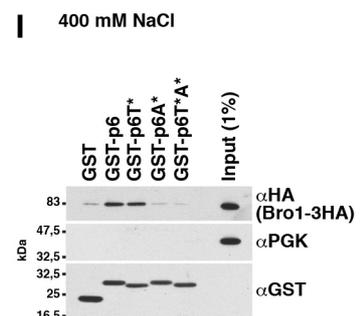
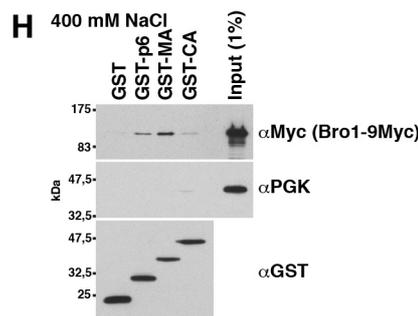
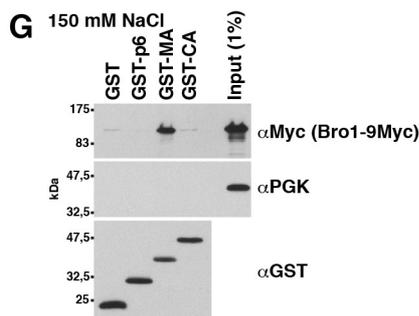
Hefe: Gag-GFP-Freisetzungssassay



Hefe: Koimmunpräzipitationen



Hefe: GST-Pull-downs



Die Bindung von Bro1, Vps23 und den humanen Homologen an GST-MA war in Gegenwart von 400 mM NaCl gegenüber 150 mM NaCl deutlich reduziert [Abb. 10 (G, H, J und K) und Abb. 9 (F-I)]. Im Gegensatz dazu präzipitierte Bro1 nur in Gegenwart von 400 mM NaCl mit GST-p6 (siehe 7.4.). Da die ESCRT-Proteine der Hefe bei 400 mM NaCl mit MA-GFP koimmunpräzipitierten [Abb. 10 (D-F) und Abb. E13 (E und F)] und eine potentielle Bindung der ESCRT-Proteine an Gag-GFP über p6 nicht verhindert werden sollte, wurden die folgenden Koimmunpräzipitationsexperimente in Inkubationspuffer mit 400 mM NaCl durchgeführt. Die Ergebnisse der Koimmunpräzipitationsexperimente für ALIX und TSG101 mit Gag-GFP und Versionen mit mutiertem p6 waren in Gegenwart von 150 mM und 400 mM NaCl vergleichbar (Abb. 9C versus Abb. E14C und Abb. 9D versus Abb. E14D).

Eine RNA-vermittelte Bindung von ALIX an die NC-Domäne von Gag ist beschrieben (Sette et al., 2012). In den Koimmunpräzipitationsexperimenten dieser Arbeit wurde keine NC-spezifische Bindung von Bro1 an GFP-markierte Gagfragmente beobachtet (Abb. 10D und Abb. E14A). Die Salzkonzentration von 400 mM NaCl im Inkubationspuffer könnte eine potentielle RNA-abhängige Bindung reduzieren. In einem Koimmunpräzipitationsexperiment, das parallel in Gegenwart von 150 mM und 400 mM NaCl durchgeführt wurde, koimmunpräzipitierte Vps23 in Gegenwart von 150 mM NaCl auch NC-spezifisch mit GFP-markierten Gagfragmenten (Abb. E14B versus Abb. 10F). Es ist möglich, dass in Gegenwart von 150 mM NaCl auch Bro1 an NC bindet.

Die Ergebnisse der Bindungsassays deuten darauf hin, dass Bro1, Vps23 und ihre humanen Homologen, ALIX und TSG101, an die aminoterminalen Proteinregion von Gag binden können. In Koimmunpräzipitationsexperimenten interagierten Bro1 und Vps23 mit MA und CA. Die Bindung an MA wurde mit einem GST-Pull-down-Experiment bestätigt. ALIX und TSG101 präzipitierten mit GST-MA, ALIX zusätzlich mit MA-GFP. Die Bindung an GST-MA im Verhältnis zu GST-p6 war für ALIX stärker als für TSG101.

7.6. Die Bindung von ESCRT-Proteinen der Hefe an MA wird durch Mutation eines hydrophoben Bereichs auf der MA-Oberfläche reduziert.

Da sowohl die ESCRT-Proteine der Hefe als auch die humanen Homologen in Bindungsassays mit MA interagierten, wurde im Folgenden versucht, die Funktion dieser Interaktion zu charakterisieren. Dazu wurden MA-Mutanten gesucht, die die Bindung von MA an ESCRT-Proteine reduzieren.

Eine Gagmutante, Gag(Δ 8-87), der der überwiegende Teil des MA-„Kopfs“ fehlt, beeinträchtigt die HIV-1-Freisetzung aus HeLa-Zellen nicht (Reil et al., 1998). Im Gegensatz dazu wurde Gag(Δ 8-87)-GFP aus Hefesphäroplasten nicht freigesetzt und die Gag(Δ 8-87)-GFP-Freisetzung aus HEK293-Zellen war

Abbildung 10. ESCRT-Proteine der Hefe binden an die aminoterminalen Proteinregion von Gag. A, die Freisetzung von Gag-GFP oder der angegebenen Gag-GFP-Mutanten aus Hefesphäroplasten des Wildtypstamms oder einer *Δvps23*-Mutante wurde mit einem Anti-GFP-Immunoblot von Zentrifugationsedimenten des Inkubationsmediums (VLPs) analysiert. P6 ist für die Gag-GFP-Freisetzung aus Hefe nicht notwendig. Die Gag-GFP-Versionen wurden von einem 2 μ -Vektor mit *PGK*-Promotor exprimiert (pBM267, pBM269, pBM779, pBM780). Die Kinetiken sind Ausschnitte aus demselben Autoradiografiebild. S, Sphäroplastenlysat, das am letzten Zeitpunkt der Kinetik präpariert wurde. B, schematische Darstellung von Gag-GFP. C-F, Koimmunpräzipitationsexperimente mit GFP-markierten Gagversionen oder Gagfragmenten, die von einem 2 μ -Vektor mit induziertem *MET3*-Promotor (pBM273, pBM276, pBM279, pBM282, pBM285, pBM291, pBM294, pBM297, pBM300, pBM303, pBM309, pBM353) in Hefezellen mit genomisch kodiertem epitopmarkiertem Bro1 oder Vps23 exprimiert wurden. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass Bro1 und Vps23 über MA und CA an Gag binden. Die Gagversionen oder Gagfragmente wurden in Gegenwart von 400 mM NaCl mit Anti-GFP-Antikörpern immunpräzipitiert und koimmunpräzipitiertes Bro1 oder Vps23 wurde mit Anti-HA- oder Anti-Myc-Immunoblots detektiert. IP, Immunpräzipitation. C, Bro1 bindet unabhängig von p6 an Gag. D, Bro1 bindet an Gagfragmente, die MA oder CA enthalten. E, Vps23 bindet an MA und unabhängig von p6 an Gag. F, Vps23 bindet an Gagfragmente, die MA oder CA enthalten. G-K, Pull-down-Experimente, die zeigen, dass genomisch kodiertes epitopmarkiertes Bro1 und Vps23 an in *E. coli* exprimiertes GST-MA binden. Bro1 bindet zusätzlich an GST-p6. Diese Bindung ist abhängig vom ALIX-Bindungsmotiv. An GST fusionierte Gagfragmente wurden in *E. coli* exprimiert (pBM239, pBM241, pBM243, pBM245, pBM255, pBM257), an Glutathionsepharose gebunden und mit Hefeextrakt inkubiert. An die Sepharose gebundene Proteine wurden im Immunoblot mit den angegebenen Antikörpern detektiert. PGK diente als Kontrolle für die spezifische Bindung der ESCRT-Proteine. G und J, der Bindungspuffer enthielt 150 mM NaCl. H, I und K, der Bindungspuffer enthielt 400 mM NaCl. G, H, J und K und Abb. 10, F-I stammen aus demselben Experiment. A und C, WT, Wildtyp.

stark reduziert (Abb. 15A und Abb. 18G). Auch in fluoreszenzmikroskopischen Experimenten ergaben sich Unterschiede im Vergleich zu Gag-GFP. Gag(Δ 8-87)-GFP bildete in Hefe weniger plasmamembran-assoziierte Strukturen als Gag-GFP und diese Strukturen hatten einen größeren Durchmesser (Abb. 15C und Abb. E15). In HEK293-Zellen waren viele kleine Gag(Δ 8-87)-GFP-Akkumulate vorhanden, während Gag-GFP eine homogene zytoplasmatische Färbung zeigte (nicht abgebildet). Möglicherweise wird der hier beobachtete Freisetzungsdefekt bei Expression des Virus, wie in dem zitierten Experiment, kompensiert. Alternativ könnte der Assemblierungsdefekt von Gag(Δ 8-87)-GFP im Zusammenhang mit einer zusätzlichen Bande unklarer Zusammensetzung im Immunoblot stehen (Abb. 15A und Abb. 18G). Da die Deletion von ESCRT-Proteinen zwar die Freisetzung von Gag-GFP aus Hefesphäroplasten reduzierte, aber zu keinem fluoreszenzmikroskopisch detektierbaren Assemblierungsdefekt führte (siehe 7.3.), war der Assemblierungsdefekt von Gag(Δ 8-87)-GFP vermutlich nicht durch eine reduzierte ESCRT-Bindung verursacht. Diese Gagmutante schien aufgrund ihres Assemblierungsdefekts für weitere Experimente zur Charakterisierung der MA-ESCRT-Interaktion ungeeignet zu sein. In der Folge wurden Mutanten gesucht, die MA weniger stark verändern.

Um Punktmutationen zu finden, die die Interaktion von MA mit Bro1 reduzieren, wurde zunächst versucht, eine Region in MA einzugrenzen, die an der Interaktion beteiligt sein könnte. Dazu wurden Koimmunpräzipitationsexperimente mit Fragmenten und internen Deletionsmutanten von MA-GFP durchgeführt (Abb. E16, A-C). Die Ergebnisse deuteten auf eine Bindungsbeteiligung der Region von Helix-2 und dem *Strand-Loop* zwischen Helix-1 und Helix-2 im MA-„Kopf“ hin (Abb. 11A). Vermutlich generiert die Expression von Fragmenten des globulär gefalteten MA-„Kopfs“ Oberflächen, die vom intakten Protein nicht exponiert werden. Außerdem können Oberflächen zerstört werden, die aus in der Proteinsequenz entfernt voneinander liegenden Aminosäuren aufgebaut sind. Die Ergebnisse dieser Koimmunpräzipitationsexperimente konnten also nur als Hinweis gewertet werden. In dem identifizierten Bereich wurde anschließend nach Punktmutationen gesucht, die die Interaktion von Bro1 und MA reduzieren. Dazu wurde für die Aminosäuren 20 bis 43 eine AAA-Mutagenese durchgeführt. Jeweils drei aufeinanderfolgende Aminosäuren wurden gegen Alanine ausgetauscht und die Mutanten für Koimmunpräzipitationsexperimente mit Bro1 verwendet (Abb. E16, D-F). Die Expressionsstärke der AAA-Mutanten mit Austausch der Aminosäuren 23 bis 43 entsprach der von MA-GFP. Somit konnten diese Mutanten zur Analyse verwendet werden. Zwei Mutanten, YKL29,30,31AAA und VWA35,36,37AAA, reduzierten die Koimmunpräzipitation von Bro1. In der Folge wurden Einzelaustausche der Aminosäuren 29 bis 31 und 35 bis 37 hergestellt. Um die Eigenschaften an diesen Positionen stärker zu verändern, wurde nicht nur gegen Alanin, sondern auch gegen Arginin, Glutamat oder Tryptophan ausgetauscht. Austausch von Leu-31, Val-35 oder Trp-36 reduzierten die Bindung von Bro1 an MA (Abb. 11B). Der Vergleich der HIV-1-Gag-Sequenzen von 194 Virusisolaten, die im Kompendium der HIV-Sequenzdatenbank (<https://www.hiv.lanl.gov>, 2017) hinterlegt sind, zeigte, dass hydrophobe Aminosäureseitenketten in Position 31, 35 und 36 konserviert sind (Position 31: 135/194 Leucin, 49/194 Methionin, 10/194 Isoleucin; Position 35: 187/194 Valin, 5/194 Isoleucin, 1/194 Leucin, 1/194 Methionin; Position 36: 194/194 Tryptophan). In der Röntgen- und NMR-Struktur sind diese drei Aminosäuren auf der MA-Oberfläche exponiert (Abb. 11, D und E) (Hill et al., 1996; Saad et al., 2006). Sie könnten also an einer Protein-Protein-Interaktion beteiligt sein. Die Aminosäuren sind nicht Teil der MA-MA-Kontaktflächen in MA-Trimer (Abb. 11E) (Hill et al., 1996). Nach den Ergebnissen der erwähnten Strukturanalysen und von zusätzlichen Studien zur MA-Lipid-Interaktion (Mercredi et al., 2016; Murphy et al., 2019; Shkriabai et al., 2006) befinden sich die identifizierten Aminosäuren auf der Seite des MA-„Kopfs“, die zur Plasmamembran orientiert ist. Um die Interaktion von MA und Bro1 noch stärker zu reduzieren, wurden Mutationen kombiniert. Für die folgenden funktionellen Experimente wurde MA3*(L31R,V35E,W36A) gewählt (Abb. 11B). Die drei Aminosäuren mit ungeladenen Seitenketten in Position 31, 35 und 36 wurden gegen eine Aminosäure mit

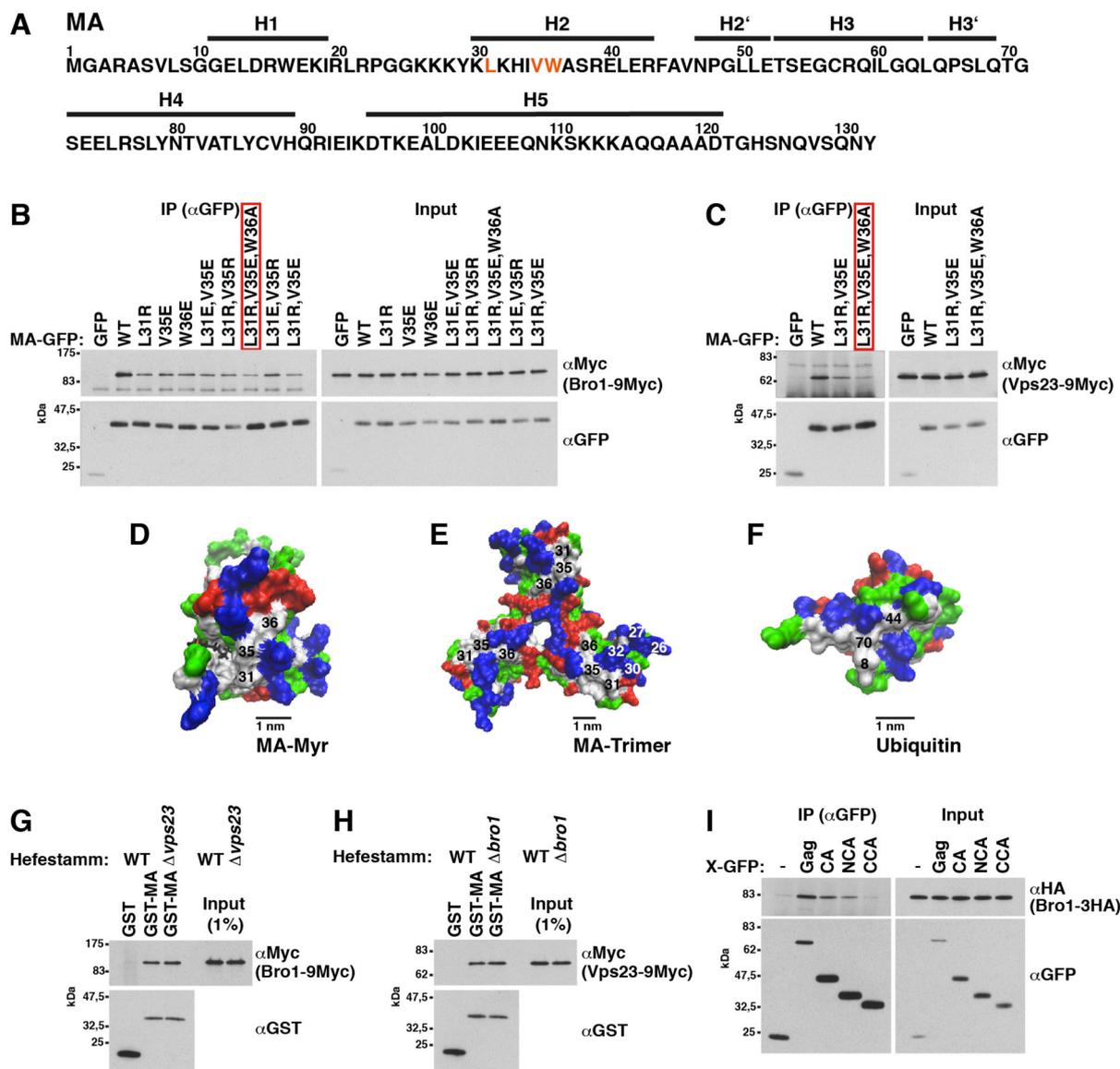


Abbildung 11. Die Mutation eines hydrophoben Bereichs auf der MA-Oberfläche, der aus Leu-31, Val-35 und Trp-36 besteht, reduziert die Bindung von Bro1 und Vps23 an MA. Bro1 bindet über NCA an CA. A, Proteinsequenz von MA, abgeleitet von pGag-EGFP (Hermida-Matsumoto und Resh, 2000), dem Template in dieser Arbeit. Leu-31, Val-35 und Trp-36, deren Austausch die Bindung an Bro1 reduziert, sind orange markiert. Die Zuordnung der Helices (H) ist aus der Röntgenstruktur von MA (Hill et al., 1996) übernommen. B und C, GFP-markierte MA-Versionen wurden in Hefezellen mit genomisch kodiertem 9Myc-markiertem Bro1 oder Vps23 von einem 2μ -Vektor mit induziertem *MET3*-Promotor exprimiert (pBM291, pBM353, pBM437, pBM440, pBM449, pBM494, pBM497, pBM506, pBM527, pBM530). MA-GFP wurde in Gegenwart von 400 mM NaCl mit Anti-GFP-Antikörpern immunpräzipitiert und koimmunpräzipitiertes Bro1 oder Vps23 wurde im Anti-Myc-Immunoblot detektiert. Die roten Kästchen kennzeichnen die MA3*-Mutation, die in den folgenden Experimenten zur Reduktion der ESCRT-MA-Bindung ausgewählt wurde. B, der Austausch von Leu-31, Val-35 oder Trp-36 reduziert die Interaktion von Bro1 mit MA. C, MA-Mutanten, die die Bindung an Bro1 reduzieren, vermindern auch die Koimmunpräzipitation von Vps23. D-F, molekulare Oberflächenstrukturen, dargestellt mit der VMD-Software (Humphrey et al., 1996). Weiß, nicht polare Aminosäureseitenketten; blau, basische Aminosäureseitenketten; rot, saure Aminosäureseitenketten; grün, polare Aminosäureseitenketten; schwarz, Myristylkette. D, MA-NMR-Struktur (PDB-Eintrag 2H31) (Saad et al., 2006). Leu-31, Val-35 und Trp-36 bilden einen hydrophoben Bereich auf der MA-Oberfläche. E, Röntgenstruktur des MA-Trimers (PDB-Eintrag 1HIW) (Hill et al., 1996). Leu-31, Val-35 und Trp-36 sind auf der zur Plasmamembran orientierten Seite von MA lokalisiert und nicht Teil der MA-MA-Kontaktstellen im Trimer. Für die Aminosäuren in Position 26, 27, 30 und 32 mit basischen Seitenketten wurde eine Beteiligung an der MA-Phospholipid-Interaktion vorgeschlagen (Mercredi et al., 2016; Murphy et al., 2019; Shkriabai et al., 2006). F, Röntgenstruktur von humanem Ubiquitin (PDB-Eintrag 1UBQ) (Vijay-Kumar et al., 1987). Der hydrophobe Bereich auf der MA-Oberfläche, der aus Leu-31, Val-35 und Trp-36 gebildet wird, ist einem hydrophoben Bereich aus Leu-8, Ile-44 und Val-70 auf der Ubiquitinoberfläche ähnlich, der an der Interaktion von Ubiquitin mit Vps23, Bro1, TSG101 und ALIX beteiligt ist (Pashkova et al., 2013; Sundquist et al., 2004; Teo et al., 2004). G und H, Pull-down-Experimente, die zeigen, dass genomisch kodiertes 9Myc-markiertes Bro1 oder Vps23 an in *E. coli* exprimiertes GST-MA (pBM255) bindet, während *VPS23* oder *BRO1* deletiert ist. GST-MA wurde an Glutathionsepharose gebunden und mit Hefeextrakt in Gegenwart von 150 mM NaCl inkubiert. An die Sepharose gebundene Proteine wurden im Immunoblot mit den angegebenen Antikörpern detektiert. I, Koimmunpräzipitation von Bro1 mit GFP-markierten CA-Versionen. Bro1 bindet an die aminoterminale Domäne von CA (NCA). Wie B, mit der Ausnahme, dass GFP-markiertes Gag, CA, NCA oder CCA (pBM273, pBM294, pBM339, pBM342, pBM353) in einem Hefestamm mit genomisch kodiertem 3HA-markiertem Bro1 exprimiert und koimmunpräzipitiertes Bro1 im Anti-HA-Immunoblot detektiert wurde. B, C, G und H, WT, Wildtyp. B, C und I, IP, Immunpräzipitation.

**Die MA3*-Mutation reduziert die Bindung von MA an Bro1 und Vps23.
Erklärungsmöglichkeiten:**

A Vps23 oder Bro1 bindet direkt an MA und rekrutiert das jeweils andere ESCRT-Protein.

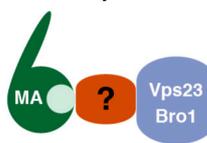


aber: $\Delta bro1$ reduziert die Bindung von Vps23 an GST-MA nicht.
 $\Delta vps23$ reduziert die Bindung von Bro1 an GST-MA nicht.

↓
Diese Möglichkeit ist unwahrscheinlich.



B Ein anderer Faktor bindet direkt an MA und rekrutiert Bro1 und Vps23.



C Vps23 und Bro1 binden an die gleiche Stelle in MA.



mögliche Erklärung:



D Vps23 und Bro1 binden direkt oder indirekt an eine Region außerhalb des in MA3* mutierten Bereichs.
Die MA3*-Mutation steigert die Affinität für einen Faktor, der Vps23 und Bro1 sterisch verdrängt.



Abbildung 12. Die MA3*-Mutation reduziert die Koimmunpräzipitation von Bro1 und Vps23 mit MA. Schematische Darstellung von Erklärungsmöglichkeiten. A-C, ein hydrophober Bereich auf der Oberfläche von MA, der in MA3* mutiert ist, ist direkt oder indirekt an der MA-ESCRT-Interaktion beteiligt. A, Bro1 oder Vps23 bindet direkt an MA und rekrutiert das jeweils andere Protein. Da die Deletion des einen ESCRT-Proteins die Bindung des anderen ESCRT-Proteins an MA im GST-Pull-down nicht reduzierte und umgekehrt, ist diese Möglichkeit unwahrscheinlich. B, MA rekrutiert beide ESCRT-Proteine über einen anderen Faktor (rot). C, Bro1 und Vps23 binden direkt an die gleiche Stelle in MA. Der hydrophobe Bereich auf der MA-Oberfläche ist einem hydrophoben Bereich auf der Ubiquitinoberfläche ähnlich, der an die UBDs (ubiquitinbindende Domänen) von Bro1 und Vps23 bindet. MA könnte diese Struktur auf der Ubiquitinoberfläche nachahmen und darüber die ESCRT-Proteine rekrutieren. D, der hydrophobe Bereich auf der MA-Oberfläche ist an der Interaktion mit den ESCRT-Proteinen nicht beteiligt. Die ESCRT-Proteine binden direkt oder indirekt an eine andere Region von MA. Die Mutation des hydrophoben Bereichs erhöht die Affinität von MA für einen Faktor (orange), bei dessen Bindung die ESCRT-Proteine sterisch verdrängt werden.

basischer, eine mit saurer und eine mit neutraler Seitenkette ausgetauscht, um die Veränderung der Oberflächenladung von MA möglichst gering zu halten. Da die Koimmunpräzipitationsexperimente mit MA-Fragmenten, wie oben beschrieben, nur bedingt aussagekräftig sind und basierend auf diesen Ergebnissen der Bereich des MA-Moleküls für die AAA-Mutagenese abgeschätzt wurde, ist nicht auszuschließen, dass andere Bereiche von MA zur Interaktion mit Bro1 beitragen.

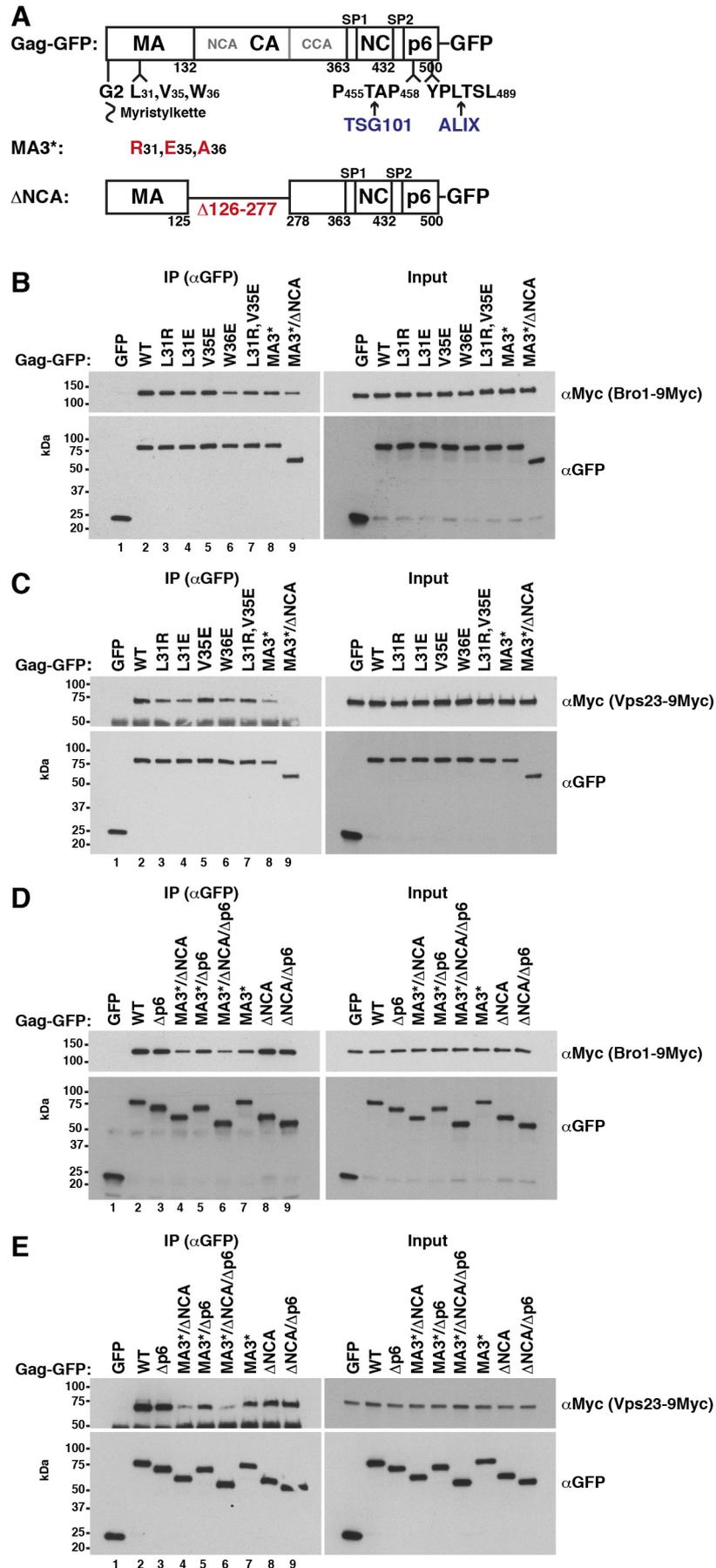
Die MA3*-Mutation reduzierte auch die Koimmunpräzipitation von Vps23 mit MA-GFP (Abb. 11C). Dieses Ergebnis lässt verschiedene Interpretationen zu (Abb. 12). Da die ESCRT-Proteine in den Bindungsstudien aus Zellextrakt präzipitiert wurden, besteht die Möglichkeit, dass MA nicht direkt an die ESCRT-Proteine bindet, sondern dass Bro1 und Vps23 durch einen anderen Faktor rekrutiert werden. Geht man davon aus, dass die in MA3* ausgetauschten Aminosäuren an der direkten oder indirekten MA-ESCRT-Interaktion beteiligt sind, ergeben sich folgende Möglichkeiten: 1) Bro1 oder Vps23 bindet direkt an MA und rekrutiert das jeweils andere Protein. 2) MA rekrutiert beide ESCRT-Proteine über einen anderen Faktor. 3) Bro1 und Vps23 binden direkt an die gleiche Stelle in MA. Alternativ könnten die ESCRT-Proteine direkt oder indirekt unabhängig von dem identifizierten hydrophoben Bereich an eine andere Region in MA binden. In diesem Fall könnte die Mutation des hydrophoben Bereichs die Bindung von MA an einen zusätzlichen Faktor verstärken, der die ESCRT-Proteine sterisch verdrängt. Um zu testen, ob Vps23 über Bro1 an MA bindet oder umgekehrt, wurden Pull-down-Experimente mit GST-MA und Extrakt aus $\Delta bro1$ - oder $\Delta vps23$ -Zellen durchgeführt (Abb. 11, G und H). Die Interaktion zwischen

Vps23 und MA war unabhängig von Bro1 und umgekehrt. Koimmunpräzipitationsexperimente mit Gag-GFP und MA-GFP führten zu vergleichbaren Ergebnissen (Abb. E17). Aus diesen Experimenten kann man schlussfolgern, dass entweder beide Proteine direkt an MA binden oder über einen anderen Faktor rekrutiert werden. Eine mögliche Erklärung für eine direkte Bindung beider ESCRT-Proteine an die gleiche Bindungsstelle in MA ist die Beobachtung, dass der hydrophobe Bereich auf der MA-Oberfläche, der aus den drei identifizierten Aminosäuren gebildet wird, einem hydrophoben Bereich auf der Oberfläche von Ubiquitin ähnlich ist (Abb. 11, D und F). Über den hydrophoben Bereich auf der Ubiquitinoberfläche, der aus den Aminosäuren Leu-8, Ile-44 und Val-70 besteht, interagieren die UBDs von ubiquitinbindenden ESCRT-Proteinen, darunter Bro1, Vps23, TSG101 und ALIX, mit Ubiquitin (Pashkova et al., 2013; Sundquist et al., 2004; Teo et al., 2004). Angrenzende Aminosäuren mit basischer Seitenkette befinden sich in MA und Ubiquitin in ähnlicher Position. Es ist denkbar, dass MA durch Nachahmung einer Struktur im Ubiquitinmolekül an die UBDs von ESCRT-Proteinen bindet. Die direkte Bindung von TSG101 und ALIX an die gleiche Stelle eines anderen Proteins, des zellulären Interaktionspartners CEP55, ist beschrieben (Lee et al., 2008; Morita et al., 2007). An dieser Bindung sind unstrukturierte prolinreiche Regionen in der carboxyterminalen Domäne von ALIX und in dem carboxyterminal der UEV-Domäne gelegenen Bereich von TSG101 beteiligt. Die entsprechenden Regionen in Bro1 und Vps23 enthalten ebenfalls prolinreiche Sequenzen (Abb. E11 und E12).

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass die Mutation eines hydrophoben Bereichs auf der MA-Oberfläche die Interaktion zwischen MA und den ESCRT-Proteinen Bro1 und Vps23 reduziert. Die Bindung von Bro1 an MA ist unabhängig von Vps23 und umgekehrt. Publizierten Ergebnissen zufolge liegt der identifizierte hydrophobe Bereich auf der zur Plasmamembran orientierten Seite von MA.

7.7. Mutationen in der aminoterminalen Proteinregion von Gag reduzieren die Bindung an ESCRT-Proteine der Hefe.

Der Austausch von Leu-31, Val-35 oder Trp-36 in MA reduzierte die Menge an koimmunpräzipitiertem Bro1 und Vps23 (siehe 7.6.). Um den Einfluss von Austausch dieser Aminosäuren auf die Bindung der ESCRT-Proteine an Gag zu untersuchen, wurden Koimmunpräzipitationsexperimente mit GFP-markierten Gagversionen durchgeführt. Mit Ausnahme von V35E reduzierten die Aminosäureaustausche die Bindung von Bro1 und Vps23 an Gag-GFP leicht [Abb. 13 (B und C) und Abb. E18J]. Da die Bindungsstudien mit Gagfragmenten gezeigt hatten, dass die ESCRT-Proteine der Hefe an MA, CA und p6 binden können (siehe 7.5.), wurde außerdem getestet, ob die Bindung der ESCRT-Proteine an Gag-GFP stärker reduziert ist, wenn zusätzlich zur MA3*-Mutation die Interaktion mit CA und p6 verhindert wird. CA besteht aus zwei Domänen (Schur et al., 2015). Die carboxyterminale Domäne (CCA) ist für die Gagassemblierung notwendig (Bharat et al., 2014). Deletion der Aminosäuren 126 bis 277 von Gag (Δ NCA), die die aminoternale Domäne von CA (NCA) und die sieben carboxyterminalen Aminosäuren des MA-„Stiels“ umfassen, beeinträchtigt die HIV-1-Freisetzung nicht (Borsetti et al., 1998). Die Freisetzung von Gag(Δ NCA)-GFP aus HEK293-Zellen führte zum gleichen Ergebnis (Abb. 18, F und G). Diese Experimente deuten darauf hin, dass die Deletion die Gagassemblierung nicht wesentlich stört. Mit einem Koimmunpräzipitationsexperiment wurde getestet, ob Bro1 an die aminoternale oder carboxyterminale Domäne von CA bindet (Abb. 11I). Bro1 koimmunpräzipitierte mit der aminoternalen Domäne (NCA-GFP), aber nicht mit der carboxyterminalen (CCA-GFP). Um zu verhindern, dass die ESCRT-Proteine über CA an Gag-GFP binden, wurden aufgrund dieser Ergebnisse die Aminosäuren 126 bis 277 deletiert. Δ NCA reduzierte die ESCRT-Bindung an Gag(MA3*)-GFP [Abb. 13, B und C (Spur 8 versus Spur 9) und D und E (Spur 7 versus Spur 4)] und die Kombination aus MA3* und Δ NCA [Gag(MA3*/ Δ NCA)-GFP] verminderte die Koimmunpräzipitation der ESCRT-Proteine im Vergleich zu Gag-GFP deutlich



[Abb. 13, B (Spur 9 versus Spur 2) und D und E (Spur 4 versus Spur 2)]. Die zusätzliche Deletion des p6-Peptids reduzierte die Bindung von Bro1 noch etwas mehr (Abb. E18J, Spur 8 versus Spur 9). Obwohl keine Reduktion der Bindung von Bro1 an Gag-GFP durch die V35E-Mutation zu beobachten war (siehe oben), koimmunpräzipitierte weniger Bro1 mit Gag(V35E/ Δ NCA/ Δ p6)-GFP als mit Gag(Δ NCA/ Δ p6) (Abb. E18J, Spur 6 versus Spur 3). Dieses Ergebnis legt die Vermutung nahe, dass die V35E-Mutation einen Effekt hat, wenn die Interaktion von Gag und Bro1 in einem anderen Bereich von Gag bereits gestört ist.

Die Koimmunpräzipitationsexperimente für ESCRT-Proteine und Gagmutanten mit kombinierter Mutation von MA, CA und p6 bestätigen die Ergebnisse der Bindungsstudien mit Gagfragmenten. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass Vps23 an MA und CA und dass Bro1 an MA, CA und p6 binden kann (Abb. 14).

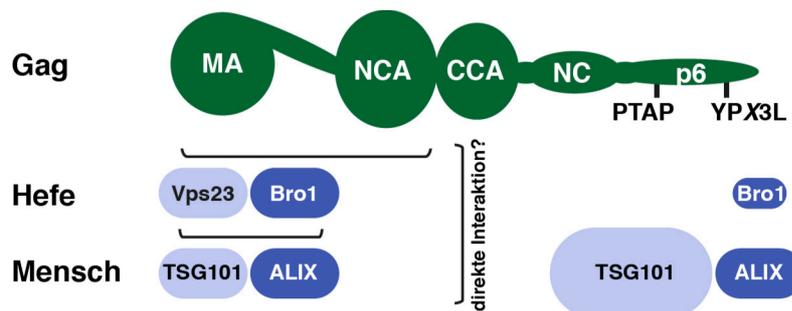


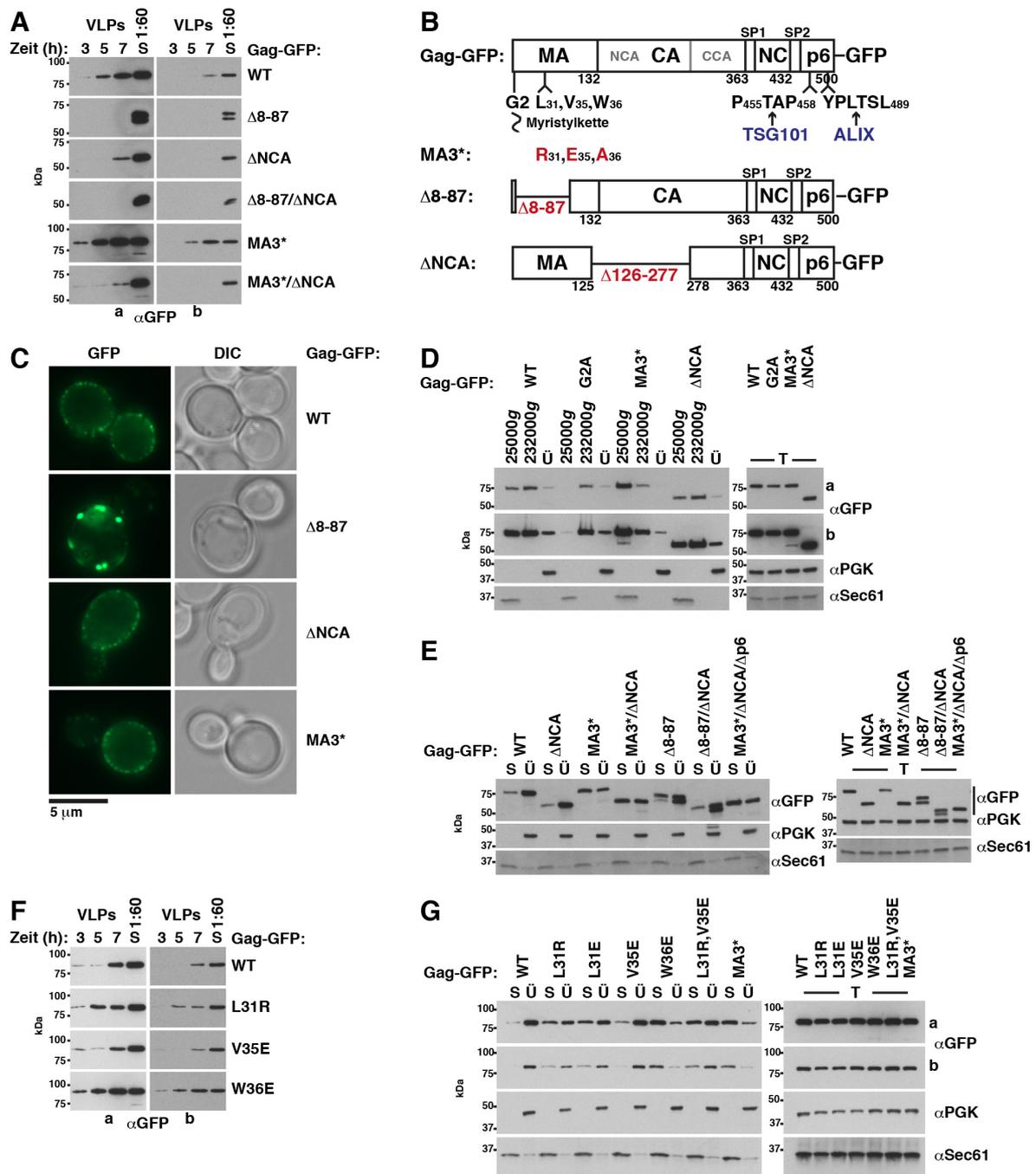
Abbildung 14. Schematische Darstellung der Ergebnisse aus den Bindungsassays. In Bindungsassays interagierten Bro1, Vps23 und die humanen Homologen, ALIX und TSG101, mit der aminoterminalen Proteinregion von Gag. Bro1 und Vps23 koimmunpräzipitierten mit MA-GFP und CA-GFP. Bro1 koimmunpräzipitierte zusätzlich mit NCA-GFP, aber nicht mit CCA-GFP. In Koimmunpräzipitationsexperimenten mit Gag-GFP reduzierte eine Kombination von Punktmutationen in MA mit einer Deletion von NCA und den sieben carboxyterminalen Aminosäuren des MA-„Stiels“ die Bindung von Bro1 und Vps23 an Gag. Die Interaktion von Bro1 und Vps23 mit MA wurde mit einem GST-Pull-down-Experiment bestätigt. Abhängig von der publizierten ALIX-Bindungsstelle (siehe 7.4.) interagierte Bro1 zusätzlich mit GST-p6. Die Bindung von Bro1 an Gag-GFP war bei Deletion von p6 aber nicht reduziert. Die Koimmunpräzipitation von ALIX und TSG101 mit Gag-GFP war bei Mutation der publizierten Bindungsstellen in p6 (siehe 7.4.) reduziert. ALIX und TSG101 präzipitierten mit GST-MA und GST-p6. Die Bindung an GST-MA im Verhältnis zu GST-p6 war für ALIX stärker als für TSG101. Die ALIX-MA-Interaktion wurde mit einem Koimmunpräzipitationsexperiment bestätigt. Da die Bindungsstudien dieser Arbeit mit Zellextrakten durchgeführt wurden, könnte die Bindung der ESCRT-Proteine an die aminoterminalen Proteinregion von Gag über zusätzliche Faktoren vermittelt sein. Mit den verwendeten Bindungsassays können die Affinitäten der verschiedenen ESCRT-Proteine zu Gag nicht miteinander verglichen werden. Die Größe der Symbole ist nicht als Ausdruck einer Interpretation in diese Richtung zu verstehen.

7.8. Mutationen in MA, die die Gag-ESCRT-Interaktion reduzieren, steigern die Plasmamembranbindung von Gag-GFP und die Gag-GFP-Freisetzung aus Hefe.

Die Ergebnisse legten die Vermutung nahe, dass MA und NCA zur Gag-ESCRT-Interaktion beitragen. Im Folgenden wurde der Einfluss der Δ NCA-Mutation und der beschriebenen Aminosäureaustausche in MA auf die Gag-GFP-Freisetzung untersucht. Unerwarteterweise hatten die MA3*- und die Δ NCA-Mutation gegensätzliche Effekte (Abb. 15A). Die Gag(MA3*)-GFP-Freisetzung war gegenüber Gag-GFP gesteigert. Die Gag(Δ NCA)-GFP-Freisetzung war reduziert. Die Δ NCA-Mutation war dominant gegenüber der MA3*-Mutation. Die p6-Deletion hatte keinen zusätzlichen Einfluss auf die Freisetzung.

Abbildung 13. Mutationen in der aminoterminalen Proteinregion von Gag reduzieren die Interaktion von Gag mit Bro1 und Vps23. A, schematische Darstellung von Gag-GFP. B-E, Koimmunpräzipitationsexperimente mit Gag-GFP-Versionen, die von einem 2 μ -Vektor mit induziertem *MET3*-Promotor (pBM273, pBM285, pBM353, pBM548, pBM551, pBM582, pBM583, pBM584, pBM585, pBM587, pBM610, pBM611, pBM694, pBM706) in Hefezellen mit genomisch kodiertem 9Myc-markiertem Bro1 oder Vps23 exprimiert wurden. Austausche von Leu-31 und Trp-36 in Gag reduzieren die Gag-ESCRT-Bindung leicht. Die Deletion der Aminosäuren 126-277 (Δ NCA) verstärkt den Effekt von Aminosäureaustauschen in MA [Gag(MA3*)-GFP versus Gag(MA3*/ Δ NCA)-GFP]. V35E reduziert die Koimmunpräzipitation der ESCRT-Proteine mit Gag-GFP nicht. Gag-GFP wurde mit Anti-GFP-Antikörpern in Gegenwart von 400 mM NaCl immunpräzipitiert und koimmunpräzipitiertes Bro1 oder Vps23 wurde im Immunoblot mit Anti-Myc-Antikörpern detektiert. IP, Immunopräzipitation. WT, Wildtyp.

zung von Gag(MA3*/ Δ NCA)-GFP (Abb. E18I). Um zu testen, ob die intrazelluläre Lokalisation, Assemblierung oder Membranbindung von Gag(MA3*)-GFP und Gag(Δ NCA)-GFP gegenüber Gag-GFP verändert und damit eine mögliche Ursache für die Freisetzungseffekte ist, wurden die Mutanten mit Fluoreszenzmikroskopie analysiert und membranhaltige Zentrifugationsedimente wurden präpariert. Gag(MA3*)-GFP und Gag(Δ NCA)-GFP bildeten zu Gag-GFP vergleichbare punktförmige Strukturen an der Plasmamembran (Abb. 15C und Abb. E19 und E20). Zytosolische Aggregatbildungen, als Hinweis auf eine mögliche Fehlfaltung, waren nicht sichtbar. Die Menge des mit Membranen bei 25000g sedimentierenden Gag(Δ NCA)-GFP war vergleichbar zu Gag-GFP (Abb. 15E und Abb. E18B). Das Verteilungsmuster von Gag(Δ NCA)-GFP in der differenziellen Zentrifugation stimmte ebenfalls mit dem von Gag-GFP überein (Abb. 15D). Aus diesen Experimenten ergab sich also kein Hinweis auf eine gestörte Mem-



branbindung, Lokalisation oder Assemblierung von Gag(Δ NCA)-GFP. Das Sedimentationsverhalten von Gag(MA3*)-GFP und Gag-GFP war hingegen unterschiedlich [Abb. 15. (D, E und G) und Abb. E18 (A-C)]. Die Verteilung von Gag(MA3*)-GFP zwischen zytosolhaltigem Überstand und membranhaltigem 25000g-Sediment war gegenüber Gag-GFP deutlich zur sedimentierbaren Form verschoben. Die erhöhte Membranbindung könnte die gesteigerte Gag(MA3*)-GFP-Freisetzung erklären. Allerdings war die Freisetzung von Gag(MA3*/ Δ NCA)-GFP gegenüber Gag-GFP reduziert, obwohl eine größere Menge an Gag(MA3*/ Δ NCA)-GFP bei 25000g sedimentierte [Abb. 15 (A und E) und Abb. E18 (B und I)]. Eine erhöhte Plasmamembranbindung ist also nicht ausreichend, um die Gag-GFP-Freisetzung zu steigern, wenn die Aminosäuren 126 bis 277 deletiert sind.

Um zu untersuchen, ob die erhöhte Plasmamembranbindung von Gag(MA3*)-GFP, die gesteigerte Freisetzung und die reduzierte Bindung an ESCRT-Proteine miteinander verknüpft sein könnten, wurden die Membranbindung und die Freisetzung von weiteren Gag-GFP-Versionen mit Austausch der Aminosäuren Leu-31, Val-35 und Trp-36 getestet. Alle Mutanten bildeten fluoreszierende punktförmige Strukturen an der Plasmamembran wie Gag-GFP. Zytosolische Aggregate waren nicht sichtbar. Mit Ausnahme von Gag(V35E)-GFP sedimentierten die Mutanten stärker mit Membranen als Gag-GFP [Abb. 15G und Abb. 18A (A-C)]. Darüber hinaus steigerten die Austausche von Leu-31 und Trp-36, anders als die V35E-Mutation, die Gag-GFP-Freisetzung aus Sphäroplasten [Abb. 15F und Abb. E18 (D-H)]. Im Gegensatz zu den anderen Mutationen reduzierte V35E die Gag-ESCRT-Interaktion in den Koimmunpräzipitationsexperimenten nicht (siehe 7.7.). Die Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass die Reduktion der Gag-ESCRT-Interaktion über die MA-Domäne, die gesteigerte Bindung an die Plasmamembran und die erhöhte Freisetzung gemeinsam auftreten.

Der umgekehrte Zusammenhang zwischen der Bindung von Gag an die Plasmamembran und der Interaktion von MA mit ESCRT-Proteinen lässt zwei Interpretationsmöglichkeiten zu: 1) Die Bindung von MA an die Plasmamembran wird durch die Interaktion mit ESCRT-Proteinen oder mit einem die ESCRT-Proteine rekrutierenden Faktor verhindert. 2) Die Bindung von MA an die Plasmamembran führt zur Ablösung der an MA gebundenen ESCRT-Proteine oder eines die ESCRT-Proteine rekrutierenden Faktors. Der mit Membranen sedimentierende Anteil an Gag-GFP war in ESCRT-Deletionsmutanten (*Δ bro1*, *Δ vps23*, *Δ bro1 Δ vps23*, *Δ vps4* und *Δ vps27*) gegenüber dem Wildtypstamm nicht verändert (siehe 7.3., Abb. 7E). Demnach ist die Möglichkeit, dass eine direkte Bindung der entsprechenden ESCRT-Proteine an MA die Bindung von Gag an die Plasmamembran verhindert, unwahrscheinlich. Zur Bestätigung dieser Ergebnisse wurde die Plasmamembranassoziation von MA-GFP in ESCRT-Deletionsmutanten untersucht. Für MA-GFP war eine zytosolische Fluoreszenz zu beobachten (Abb. 16A). Für MA3*-

Abbildung 15. Mutationen in einem hydrophoben Bereich auf der MA-Oberfläche steigern die Bindung von Gag-GFP an die Plasmamembran und die Gag-GFP-Freisetzung aus Hefe. **A**, die Freisetzung von Gag-GFP-Versionen aus Hefesphäroplasten wurde mit einem Anti-GFP-Immunoblot von Zentrifugationssedimenten des Inkubationsmediums analysiert. Die MA3*-Mutation steigert die Gag-GFP-Freisetzung. Die Δ NCA-Mutation reduziert die Freisetzung und ist dominant über MA3*. Die Deletion des globulären MA-„Kopfs“ (Δ 8-87) verhindert die Freisetzung. Eine lange (a) und eine kurze (b) Exposition sind abgebildet. Die in einer Spalte gezeigten Kinetiken sind Ausschnitte aus demselben Autoradiografiefilm. S, Sphäroplastenlysat, das am letzten Zeitpunkt der Kinetik präpariert wurde. **B**, schematische Darstellung von Gag-GFP. **C**, die Akkumulation von Gag-GFP-Versionen an der Plasmamembran wurde mit Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Gag(MA3*)-GFP und Gag(Δ NCA)-GFP bilden punktförmige Strukturen an der Plasmamembran, vergleichbar zu Gag-GFP, während plasmamembranassoziierte Gag(Δ 8-87)-GFP-Aggregate einen größeren Durchmesser haben. DIC, differential interference contrast. **D**, die Membranbindung von Gag-GFP-Versionen wurde mit differenzieller Zentrifugation analysiert. Der Anteil an Gag(MA3*)-GFP im 25000g-Membransediment ist gegenüber Gag-GFP erhöht. Gag(Δ NCA)-GFP sedimentiert vergleichbar zu Gag-GFP. Ein 25000g-Sediment, ein 232000g-Sediment und ein Überstand (Ü) wurden aus Zellextrakten (T) präpariert und im Immunoblot mit den angegebenen Antikörpern analysiert. Die Proben der Sedimente waren gegenüber den Proben der Überstände und Extrakte konzentriert (25000g, 4x; 232000g, 3,3x). Das zytosolische Protein PGK und das ER-Membranprotein Sec61 dienen als Referenz. Eine kurze (a) und eine lange (b) Exposition sind abgebildet. **E**, membranhaltige 25000g Sedimente (S) und zytosolhaltige Überstände (Ü) wurden aus Zellextrakten (T) präpariert und wie in D analysiert. Der Anteil von Gag-GFP-Versionen mit MA3*-Mutation im Membransediment ist im Vergleich zu Gag-GFP erhöht. Im Gegensatz dazu beeinflusst die Δ NCA-Mutation die Membranassoziation nicht. **G**, wie E, mit der Ausnahme, dass die Zellen die angegebenen Gag-GFP-Versionen exprimierten. Austausche von Leu-31 und Trp-36 steigern die Bindung von Gag-GFP an die Membran. Eine lange (a) und eine kurze (b) Exposition sind gezeigt. **F**, wie A, mit der Ausnahme, dass die Hefesphäroplasten die angegebenen Gag-GFP-Versionen exprimierten. Austausch von Leu-31 und Trp-36 steigern die Gag-GFP-Freisetzung. **A** und **C-F**. Gag-GFP-Versionen wurden von 2 μ -Vektoren mit *PGK*-Promotor (pBM267, pBM354, pBM556, pBM557, pBM591, pBM592, pBM593, pBM596, pBM615, pBM616, pBM782, pBM786, pBM787) im Wildtyp-Hefestamm exprimiert. WT, Wildtyp.

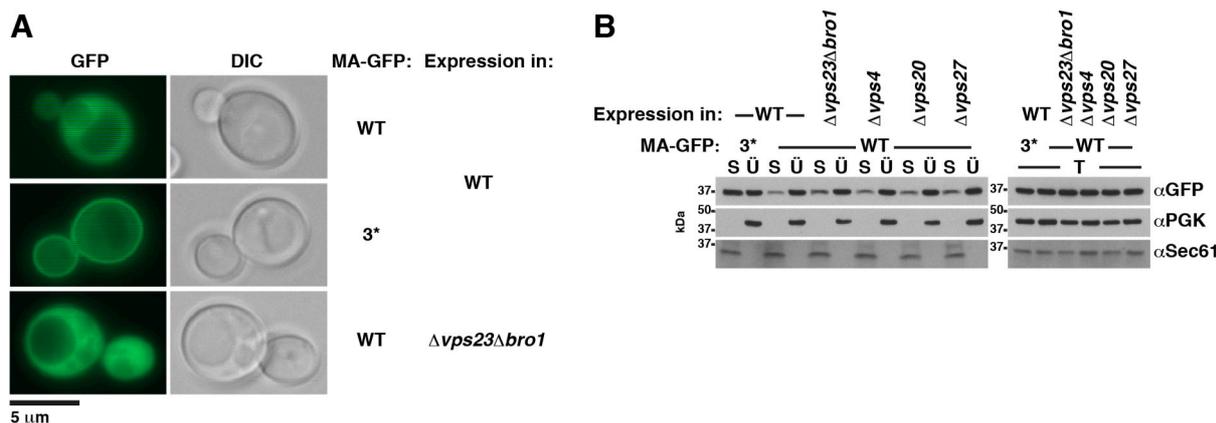


Abbildung 16. MA3* steigert die Bindung von MA-GFP an die Plasmamembran. ESCRT-Deletionsmutanten zeigen diesen Effekt nicht. **A** und **B**, Wildtyp-Hefezellen oder die angegebenen ESCRT-Mutanten exprimierten MA-GFP oder MA3*-GFP von einem 2 μ -Vektor mit induziertem *MET3*-Promotor (pBM291, pBM506). WT, Wildtyp. **A**, die Bindung von MA-GFP an die Plasmamembran wurde mit Fluoreszenzmikroskopie analysiert. MA3*-GFP zeigt eine gleichmäßige Färbung der Plasmamembran. DIC, differential interference contrast. **B**, membranhaltige 232000g-Sedimente (S) und zytosolhaltige Überstände (Ü) wurden aus Zellextrakten (T) präpariert und im Anti-GFP-Immunoblot analysiert. Der Anteil an MA3*-GFP im Sediment ist gegenüber MA-GFP erhöht. Die aus Extrakten von Wildtyp-Hefezellen und ESCRT-Mutanten sedimentierten Mengen an MA-GFP sind vergleichbar. Die Proben der Sedimente waren gegenüber den Proben der Überstände und Extrakte 5x konzentriert. Das zytosolische Protein PGK und das ER-Membranprotein Sec61 dienen als Referenz.

GFP zeigte sich zusätzlich eine gleichmäßige Markierung der Plasmamembran (Abb. 16A und Abb. E21). MA3*-GFP interagiert also, vergleichbar zu Gag(MA3*)-GFP, stärker mit der Plasmamembran als das Wildtypprotein. In der $\Delta vps23\Delta bro1$ -Mutante war für MA-GFP nur die zytosolische Fluoreszenz detektierbar (Abb. 16A). Übereinstimmend mit den Ergebnissen der Fluoreszenzmikroskopie sedimentierte ein größerer Anteil von MA3*-GFP mit Membranen als von MA-GFP (Abb. 16B). Die aus dem Extrakt von ESCRT-Deletionsmutanten ($\Delta vps23\Delta bro1$, $\Delta vps4$, $\Delta vps20$, $\Delta vps27$) sedimentierten Mengen an MA-GFP waren vergleichbar zum Wildtypstamm. Die Experimente mit MA-GFP bestätigen die Vermutung, dass die Bindung von MA an die Plasmamembran nicht durch eine direkte Bindung der in den Experimenten deletierten ESCRT-Proteine an MA verhindert wird (Abb. 17). Falls die ESCRT-Proteine über ihre UBDs direkt an den hydrophoben Bereich auf der MA-Oberfläche binden (siehe 7.6.) und dabei die Plasmamembranbindung von MA verhindern sollten, wäre es jedoch möglich, dass eine verstärkte Membranbindung von MA und Gag nur mit einem Hefestamm zu beobachten wäre, in dem mehrere oder alle der sechs UBD-tragenden ESCRT-Proteine (siehe 5.2.) deletiert sind.

Zusammengefasst zeigen die Experimente, dass MA3*, eine Mutation, die die Bindung von ESCRT-Proteinen an MA reduziert, die Plasmamembranbindung und Freisetzung von Gag-GFP verstärkt. Δ NCA, eine Mutation, die die NCA-Domäne von Gag deletiert und die Gag-ESCRT-Interaktion beeinträchtigt, reduziert die Gag-GFP-Freisetzung, beeinflusst die Plasmamembranassoziation aber nicht.

7.9. Die MA3*-bedingte Steigerung der Gag-GFP-Freisetzung ist ESCRT-abhängig.

Die Ergebnisse legten die Vermutung nahe, dass die für die MA3*-Mutation beobachteten Effekte, die reduzierte MA-ESCRT-Interaktion, die erhöhte Plasmamembranbindung und die gesteigerte Freisetzung von Gag-GFP, gemeinsam auftreten. Im Folgenden wurde die Frage untersucht, ob die Steigerung der Gag-GFP-Freisetzung durch die MA3*-Mutation ein ESCRT-abhängiger Effekt ist, das heißt, durch die reduzierte Bindung der ESCRT-Proteine an MA bedingt sein kann. Dazu wurden die Freisetzung von Gag-GFP und Gag(MA3*)-GFP aus $\Delta vps4$ -Sphäroplasten verglichen [Abb. 18A und Abb. E22 (K und L)]. Eine Deletion der AAA-ATPase Vps4, die die letzten Schritte im ESCRT-Prozess katalysiert und/oder für das Recycling von ESCRT-Proteinen notwendig ist, blockiert die ESCRT-Funktion vollständig (Saksena et al., 2009; Wollert et al., 2009). Die nach fünf und sieben Stunden Inkubationszeit, also im

Die MA3*-Mutation reduziert die Bindung von MA an Vps23 und Bro1 und steigert die Bindung von MA an die Plasmamembran.

Erklärungsmöglichkeiten:

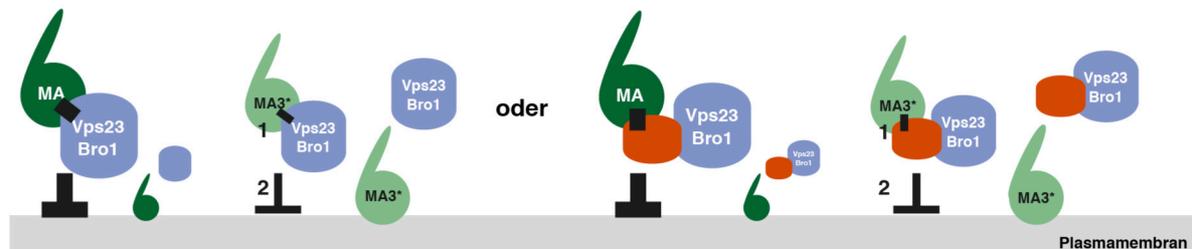
A

Ein an MA bindender Faktor verhindert die Bindung von MA an die Plasmamembran.

Die MA3*-Mutation reduziert die Affinität zum MA-bindenden Faktor und steigert damit die Bindung von MA an die Plasmamembran.

an MA bindender Faktor: **ESCRT-Protein**

an MA bindender Faktor: **ESCRT-rekrutierender Faktor**



aber: $\Delta vps23\Delta bro1$ steigert die Bindung von MA an die Plasmamembran nicht.

↓
Diese Möglichkeit ist unwahrscheinlich.



B

Bei der Interaktion von MA mit der Plasmamembran werden die direkt oder indirekt an MA gebundenen ESCRT-Proteine von MA abgelöst.

Die MA3*-Mutation erhöht die Affinität zur Plasmamembran und verstärkt damit die Dissoziation der ESCRT-Proteine von MA.

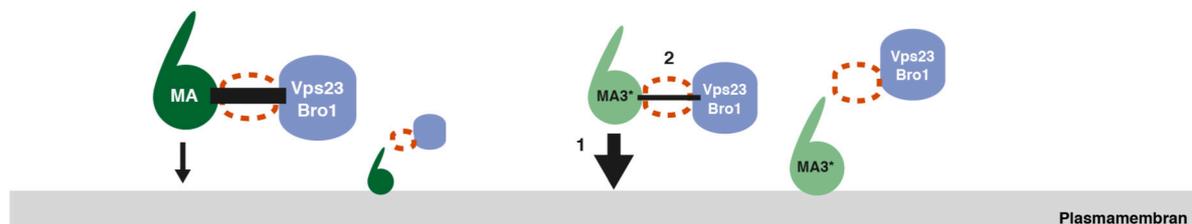


Abbildung 17. Die MA3*-Mutation reduziert die Bindung von MA an Vps23 und Bro1 und steigert die Bindung an die Plasmamembran. Schematische Darstellung von Erklärungsmöglichkeiten. **A**, die Bindung von MA an die Plasmamembran wird durch die Interaktion mit ESCRT-Proteinen oder mit einem die ESCRT-Proteine rekrutierenden Faktor (rot) verhindert. In dem Fall würde die MA3*-Mutation durch eine Reduktion der Bindungsstärke zwischen MA und den ESCRT-Proteinen oder einem die ESCRT-Proteine rekrutierenden Faktor (1) die Bindung von MA an die Plasmamembran steigern (2). Da der Anteil an membrangebundenem MA und Gag in der $\Delta vps23\Delta bro1$ -Mutante vergleichbar zum Wildtyp-Hefestamm war, ist es unwahrscheinlich, dass die Membranbindung von MA durch direkt gebundenes Vps23 und/oder Bro1 verhindert wird. (Sollten die ESCRT-Proteine über ihre UBDs an MA binden, dann könnte eine gesteigerte Membranbindung von Gag und MA bei Deletion weiterer UBD-tragender ESCRT-Proteine detektierbar sein.) **B**, die Bindung von MA an die Plasmamembran führt zu einer Ablösung der an MA gebundenen ESCRT-Proteine oder eines die ESCRT-Proteine rekrutierenden Faktors. Die MA3*-Mutation verstärkt die Affinität von MA zur Plasmamembran (1) und steigert damit die Dissoziation der direkt oder indirekt an MA gebundenen ESCRT-Proteine (2).

ESCRT-abhängigen Teil der Freisetzungskinetik (siehe 7.3.), aus einer $\Delta vps4$ -Mutante noch freigesetzte Menge an Gag-GFP wurde durch die MA3*-Mutation nicht gesteigert. Die am ersten Zeitpunkt, also im ESCRT-unabhängigen Teil der Kinetik, erhöhte Freisetzung von Gag(MA3*)-GFP (Abb. 18A) ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass das zuvor vermehrt unter der Zellwand akkumulierte plasmamembrangebundene Gag(MA3*)-GFP die ESCRT-unabhängige Freisetzung verstärkt. Zusätzlich wurden Freisetzungsexperimente mit Deletionsmutanten für die „früh agierenden“ ESCRT-Proteine Bro1 und Vps23 durchgeführt (Abb. E22, A-J), die den ESCRT-III-Komplex unabhängig voneinander aktivieren können (Tang et al., 2016). Im ESCRT-abhängigen Teil der Kinetik, nach fünf und sieben Stunden, war nahezu keine Steigerung der Gag-GFP-Freisetzung aus der $\Delta vps23\Delta bro1$ -Mutante durch die MA3*-

Mutation zu beobachten. Die Freisetzung von Gag(MA3*)-GFP aus den Einzelmutanten war im Vergleich dazu erhöht. Dieser Effekt war für die *Δvps23*-Mutante ausgeprägter. Die Ergebnisse sind im Einklang mit der Vorstellung, dass die Verstärkung der Gag-GFP-Freisetzung durch die MA3*-Mutation ein ESCRT-abhängiger Effekt ist.

Die Gag(Δ NCA)-GFP-Freisetzung war gegenüber Gag-GFP reduziert und die Koimmunpräzipitation von ESCRT-Proteinen mit Gag-GFP war bei Kombination von MA3* mit Δ NCA vermindert (siehe 7.7. und 7.8.). Um zu testen, ob die Reduktion der Gag(Δ NCA)-GFP-Freisetzung eine Folge der gestörten Interaktion mit ESCRT-Proteinen ist, wurden die Freisetzung von Gag-GFP und Gag(Δ NCA)-GFP aus *Δvps4*-Sphäroplasten verglichen (Abb. 18B und Abb. E22M). Die Deletion von *VPS4* reduzierte die Gag-GFP-Freisetzung stärker als die Δ NCA-Mutation. Diese Beobachtung ließe sich damit erklären, dass NCA nicht die einzige an ESCRT-Proteine bindende Region in Gag ist. Die Δ NCA-Mutation reduzierte die Freisetzung von Gag-GFP aus *Δvps4*-Sphäroplasten jedoch noch etwas mehr. Dieses Ergebnis lässt nicht den Schluss zu, dass die Δ NCA-bedingte Reduktion der Gag-GFP-Freisetzung ausschließlich durch eine gestörte Interaktion mit ESCRT-Proteinen verursacht ist. Die Δ NCA-Mutation reduziert die Gag-GFP-Freisetzung vermutlich durch einen zusätzlichen oder einen anderen Mechanismus.

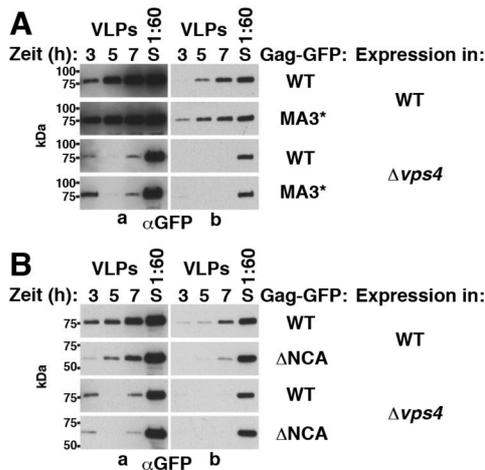
Im Folgenden wurden die Effekte der MA3*- und der Δ NCA-Mutation auf die Freisetzung von Gag-GFP aus HEK293-Zellen untersucht [Abb. 18 (D-G) und Tabelle 3]. Vergleichbar zu Hefe steigerte die MA3*-Mutation die Gag-GFP-Freisetzung aus HEK293-Zellen [Abb. 18 (D und E) und Abb. E22N]. Wie die Gag-GFP-Freisetzung wurde auch die Gag(MA3*)-GFP-Freisetzung durch die p6T*-Mutation stark reduziert, das heißt, sie war abhängig von der TSG101-Bindungsstelle in p6 (Abb. 18E). Die isolierte p6A*- oder Δ NCA-Mutation beeinträchtigte die Gag-GFP-Freisetzung nicht [Abb. 18 (D, F und G) und Abb. E22N]. Die Bedeutung der ALIX-Bindungsstelle in p6 (p6A) und der durch die Δ NCA-Mutation deletierten Proteinregion für die Gag-GFP-Freisetzung wurde bei Experimenten mit Gag(MA3*)-GFP deutlich. Eine Kombination der Δ NCA- und p6A*-Mutation verhinderte die durch die MA3*-Mutation verursachte Steigerung der Gag-GFP-Freisetzung [Abb. 18D (Spur 5 versus Spur 2 und Spur1) und Abb. E22N]. Die Bedeutung von p6A zeigt die ESCRT-Abhängigkeit des MA3*-Effekts in HEK293-Zellen. Diese Beobachtung ist also eine Analogie zu den Ergebnissen aus Hefe. Da Bro1, das Hefehomologe von ALIX, und NCA in Koimmunpräzipitationsexperimenten interagierten (siehe 7.7.), kann man spekulieren, dass ALIX auch an NCA binden könnte. Evidenz für diese Annahme aus Bindungsassays ist aber nicht vorhanden.

Im Gegensatz zu humanen Zellen war die Gag-GFP-Freisetzung aus Hefe nicht von p6 abhängig (siehe 7.4.). Dieses Ergebnis passt zu der nur schwachen Bindung von Bro1 an p6 im Vergleich zur aminoterminalen Proteinregion von Gag und keiner nachweisbaren Bindung von Vps23 an p6 (siehe 7.4. und 7.5.). Da die Δ NCA-Mutation die Gag-GFP-Freisetzung aus Hefe im Gegensatz zu HEK293-Zellen reduziert, besteht die Möglichkeit, dass die Bindung der ESCRT-Proteine aus Hefe an NCA die p6-Funktion übernimmt.

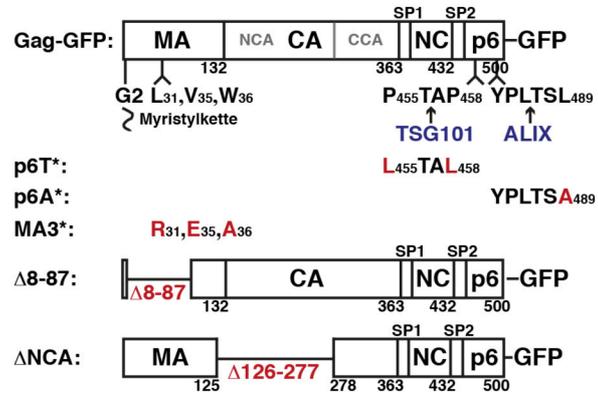
Das folgende spekulative Modell kann die Ergebnisse dieser Arbeit erklären (Abb. 19). ESCRT-Proteine können über MA, NCA und p6 an Gag binden. Bei der Bindung von Gag an die Plasmamembran wird eine direkte oder indirekte transiente ESCRT-MA-Interaktion gelöst. Dabei werden die ESCRT-Proteine von einem inaktiven in einen aktiven Zustand überführt, in dessen Folge die ESCRT-vermittelte Virionbildung/-absplattung steht.

Die publizierte Interaktion von ALIX mit der NC-Domäne (Popov et al., 2008; Sette et al., 2012) wurde in dieser Arbeit nicht berücksichtigt. Wegen der RNA-Abhängigkeit dieser Bindung (Sette et al., 2012) ist eine mögliche Bro1-NC-Interaktion eventuell nur bei Salzkonzentrationen zu beobachten, die geringer sind als die in den Bindungsassays dieser Arbeit.

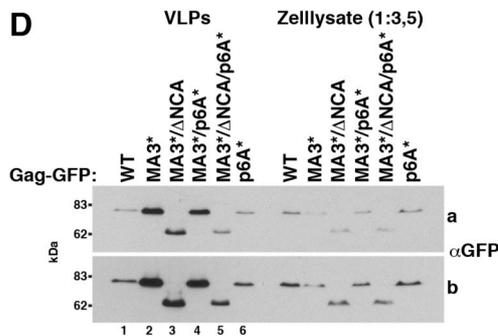
Hefe



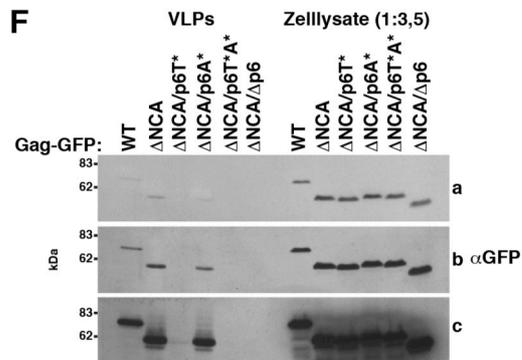
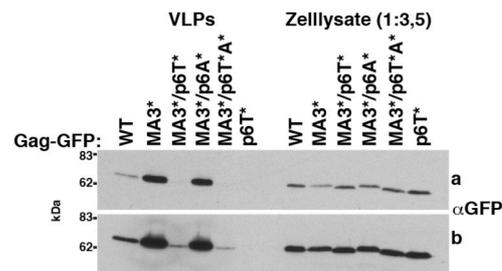
C



HEK293



E



G

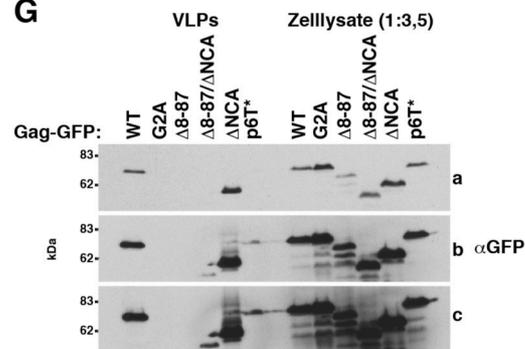


Abbildung 18. Die gesteigerte Freisetzung von Gag(MA3*)-GFP aus Hefe ist ESCRT-abhängig. MA3* steigert die Gag-GFP-Freisetzung aus HEK293-Zellen, abhängig von der ALIX-Bindungsstelle in p6 und den Aminosäuren 126 bis 277 (in Δ NCA deletiert). **A** und **B**, die Freisetzung von Gag-GFP aus Hefesphäroplasten wurde mit Anti-GFP-Immunoblots von Zentrifugationssedimenten des Inkubationsmediums (VLPs) analysiert. Gag-GFP-Versionen wurden von einem 2 μ -Vektor mit *PGK*-Promotor exprimiert (pBM267, pBM616, pBM782). Lange (a) und kurze (b) Expositionen sind abgebildet. Die in einer Spalte gezeigten Kinetiken sind Ausschnitte aus demselben Autoradiografiefilm. S, Sphäroplastenlysat, das am letzten Zeitpunkt der Kinetik präpariert wurde. **A**, im ESCRT-abhängigen Teil der Kinetik, nach fünf und sieben Stunden, verhindert die Deletion von *VPS4* den freisetzungsteigernden Effekt der MA3*-Mutation. **B**, die Gag(Δ NCA)-GFP-Freisetzung aus $\Delta vps4$ -Sphäroplasten ist im Vergleich zu Gag-GFP leicht reduziert. **D-G**, Gag-GFP-Freisetzung aus HEK293-Zellen zwei Tage nach der Transfektion mit Vektoren für die Expression der angegebenen Gagversionen vom CMV-Promotor (pBM199, pBM201, pBM203, pBM205, pBM622, pBM632, pBM634, pBM636, pBM638, pBM640, pBM642, pBM662, pBM668, pBM670, pBM672, pBM674, pBM676). VLPs wurden aus dem Kulturmedium geerntet und Zelllysate wurden präpariert. Gag-GFP wurde mit Anti-GFP-Immunoblots detektiert. Mehrere Expositionen (a-c) sind gezeigt. **D**, die MA3*-Mutation steigert die Gag-GFP-Freisetzung. Eine Kombination aus Δ NCA und p6A* verhindert diese Steigerung, während eine isolierte p6A*-Mutation die Gag-GFP-Freisetzung nicht beeinträchtigt. **E**, vergleichbar zu Gag-GFP reduziert p6T* die Freisetzung von Gag(MA3*)-GFP stark. **F** und **G**, Gag(Δ NCA)-GFP wird effizient freigesetzt. **F**, vergleichbar zu Gag-GFP reduziert p6T* die Freisetzung von Gag(Δ NCA)-GFP stark. **G**, die Deletion des globulären MA-„Kopfs“ (Δ 8-87) beeinträchtigt die Freisetzung stark. **A**, **B**, **D-G**, WT, Wildtyp. **C**, schematische Darstellung von Gag-GFP.

Tabelle 3: Vergleich der Ergebnisse aus Bindungs- und Freisetzungssays mit Hefe und HEK293-Zellen

	Hefe		HEK293		
Gag-GFP-Freisetzung:					
MA3*	gesteigert		gesteigert		
Δ p6	effizient		reduziert		
p6T*	effizient		reduziert		
p6A*	effizient		effizient		(Die Δ NCA/p6A*-Kombination verhindert den MA3*-Effekt.)
Δ NCA	reduziert		effizient		
	Bro1	Vps23	ALIX	TSG101	
Bindung an:					
GST-MA	ja	ja	ja	ja	(Die Bindung an GST-MA im Verhältnis zu GST-p6 ist für ALIX stärker als für TSG101.)
MA-GFP	ja	ja	ja		
CA-GFP	ja	ja			
Gag(MA3*/ Δ NCA)-GFP im Vergleich mit Gag-GFP	reduziert	reduziert			
GST-p6	ja	nein	ja	ja	
Gag Δ p6-GFP im Vergleich mit Gag-GFP	nicht reduziert	nicht reduziert	reduziert	reduziert	

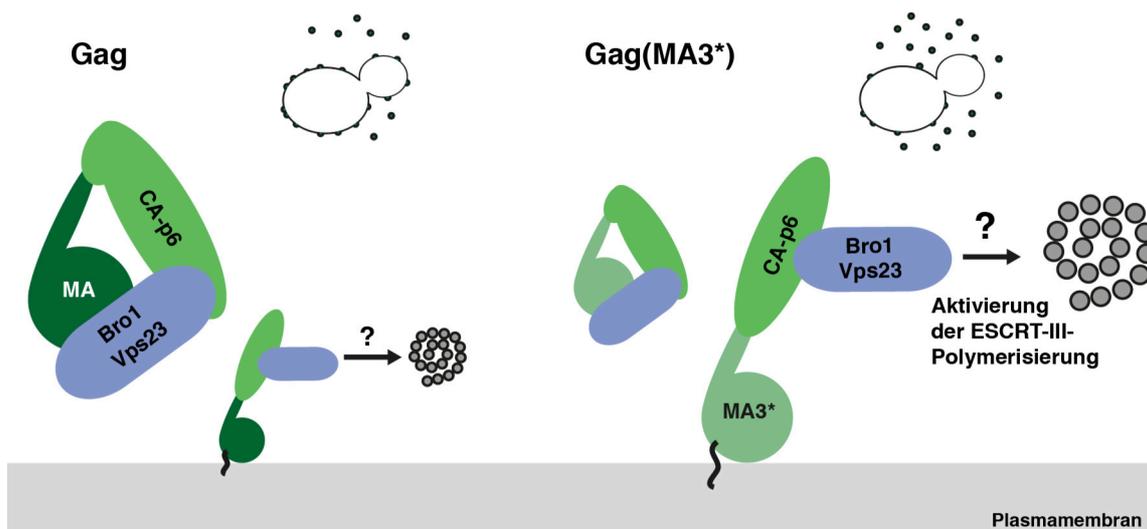


Abbildung 19. Die MA3*-Mutation reduziert die Bindung von MA an Vps23 und Bro1, erhöht die Plasmamembranbindung von Gag-GFP und steigert ESCRT-abhängig die Gag-GFP-Freisetzung. Schematische Darstellung eines Modells zur Erklärung dieser Beobachtungen. Bei Bindung von Gag an die Plasmamembran wird eine direkte oder indirekte transiente Bindung zwischen MA und ESCRT-Proteinen gelöst. Dabei werden die ESCRT-Proteine von einem inaktiven in einen aktiven Zustand überführt. Andere Regionen in Gag sind für die Rekrutierung der ESCRT-Proteine erforderlich und/oder binden die ESCRT-Proteine während ihrer Aktivität im Freisetzungsprozess.

7.10. Ergänzende Abbildungen

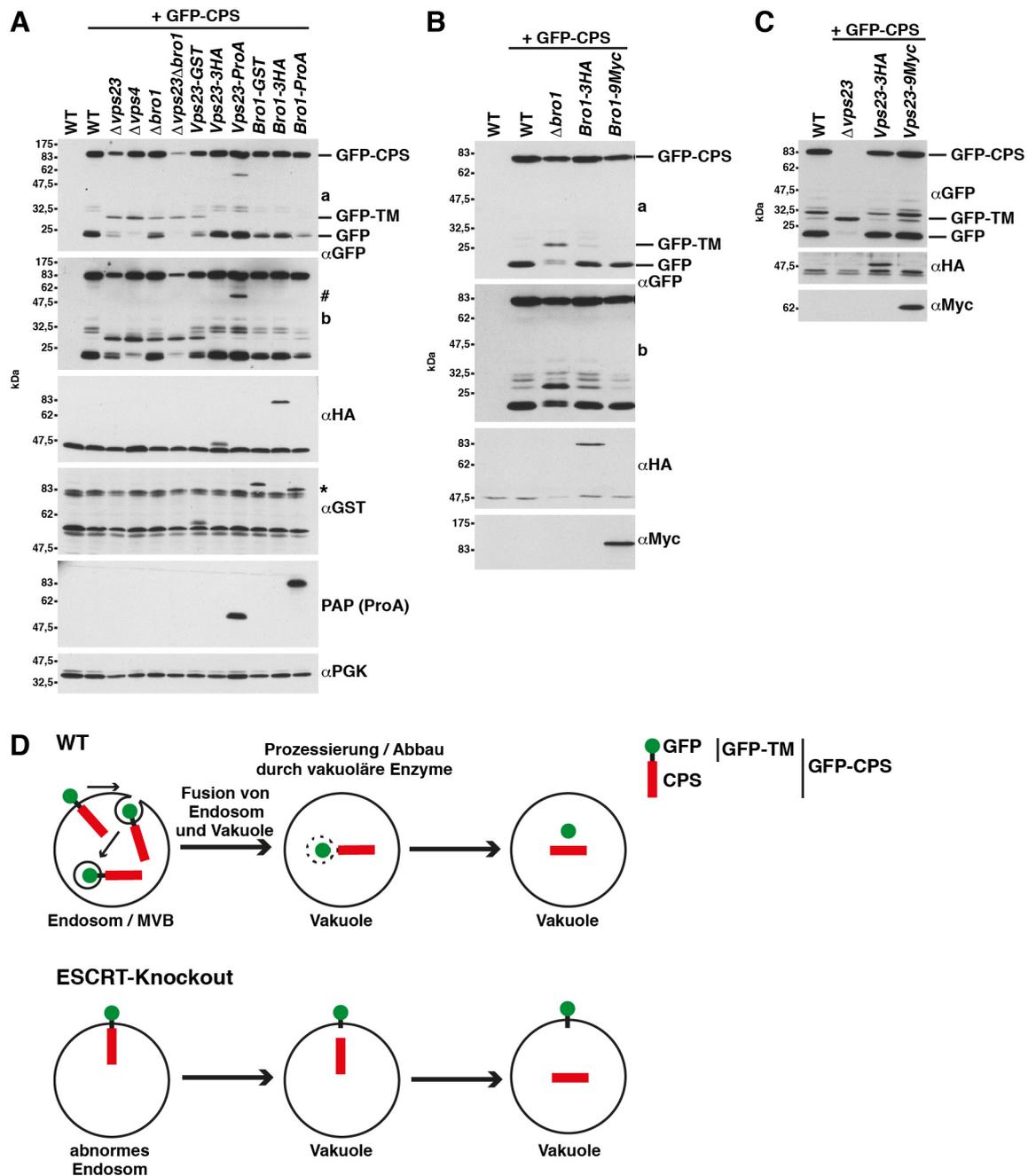
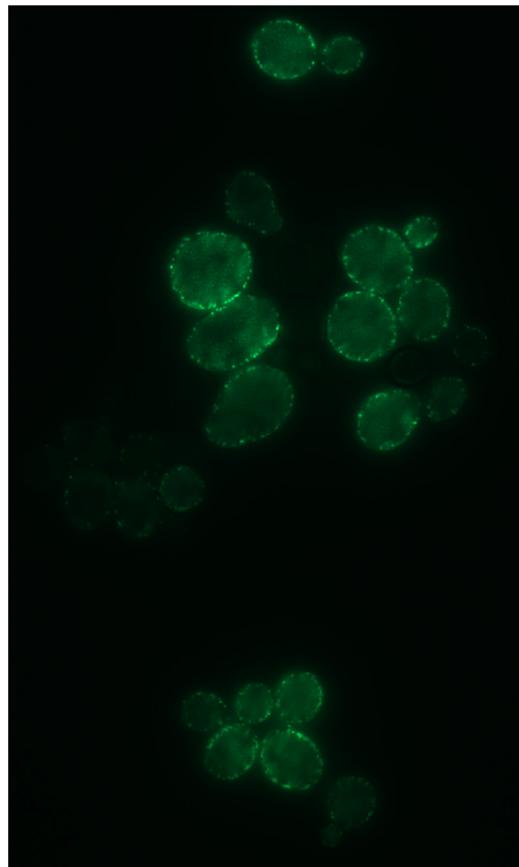
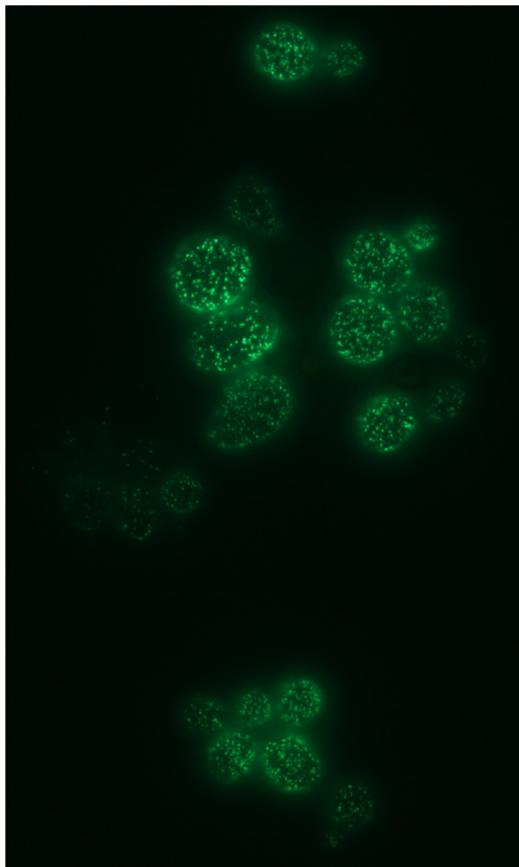
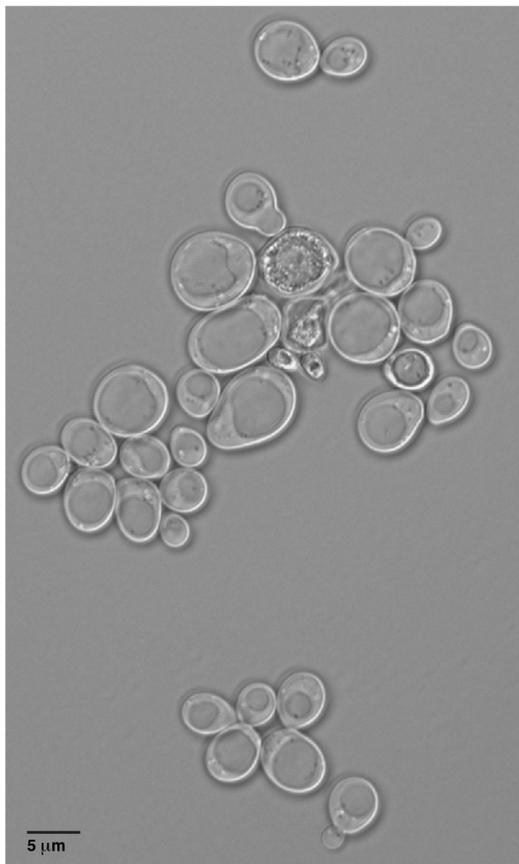


Abbildung E1. Bro1-3HA, Bro1-9Myc und Vps23-9Myc sind im CPS-Transport-Assay funktionell. A-C, die vakuoläre Prozessierung von aminoterminal GFP-markierter Carboxypeptidase S (GFP-CPS) (Odorizzi et al., 1998; Reggiori und Pelham, 2001) wurde in Hefestämmen mit genomisch kodierten epitopmarkierten ESCRT-Proteinen analysiert. D, CPS ist ein lösliches vakuoläres Enzym, das als Typ-II-Transmembranprotein (Aminoterminus im Zytosol) synthetisiert und mit dem MVB-Weg ins Innere der Vakuole transportiert wird. In der Vakuole wird der Transmembrananker durch vakuoläre Hydrolasen vom Rest des Proteins abgespalten. Während des GFP-CPS-Transports ist GFP zunächst auf der zytosolischen Seite der endosomalen Membran lokalisiert. GFP-CPS wird in MVB-Vesikel sortiert und ins Innere des Endosoms transportiert. Nach der Fusion von Endosom und Vakuole bauen vakuoläre Enzyme die Vesikel ab und setzen GFP und CPS frei. In ESCRT-Deletionsmutanten ist die MVB-Vesikelbildung gestört und GFP-CPS akkumuliert in der Membran von Endosom und Vakuole. Nach proteolytischer Prozessierung durch vakuoläre Enzyme bleibt GFP in diesem Fall mit der Transmembrandomäne und der kurzen zytosolischen Domäne von CPS verbunden (GFP-TM). A-C, Lysate von Wildtyp-Hefezellen (WT), ESCRT-Deletionsmutanten oder Hefestämmen mit genomisch kodierten epitopmarkierten Versionen von Bro1 oder Vps23, die mit einem Plasmid für die Expression von GFP-CPS (pGFP-CPS416) transformiert waren, wurden in Immunoblots mit den angegebenen Antikörpern analysiert. PGK diente als Ladekontrolle. Kurze (a) und lange (b) Expositionen sind gezeigt. #, *, Signal einer Reaktion von Protein A (ProA) mit Antikörpern, die für die Detektion von Epitopmarkierungen verwendet wurden. PAP, Peroxidase-anti-Peroxidase Komplex. C, wurde mit technischer Assistenz von Corinna Volkwein durchgeführt.



Gag-GFP



DIC

Abbildung E2. Die Lokalisation von Gag-GFP in Wildtyp-Hefezellen, exprimiert von einem 2 μ -Vektor mit *PGK*-Promotor (pBM267), wurde mit Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Gag-GFP akkumuliert in punktförmigen Strukturen an der Plasmamembran. Zwei Ebenen der Hefezellen sind abgebildet. DIC, differential interference contrast.

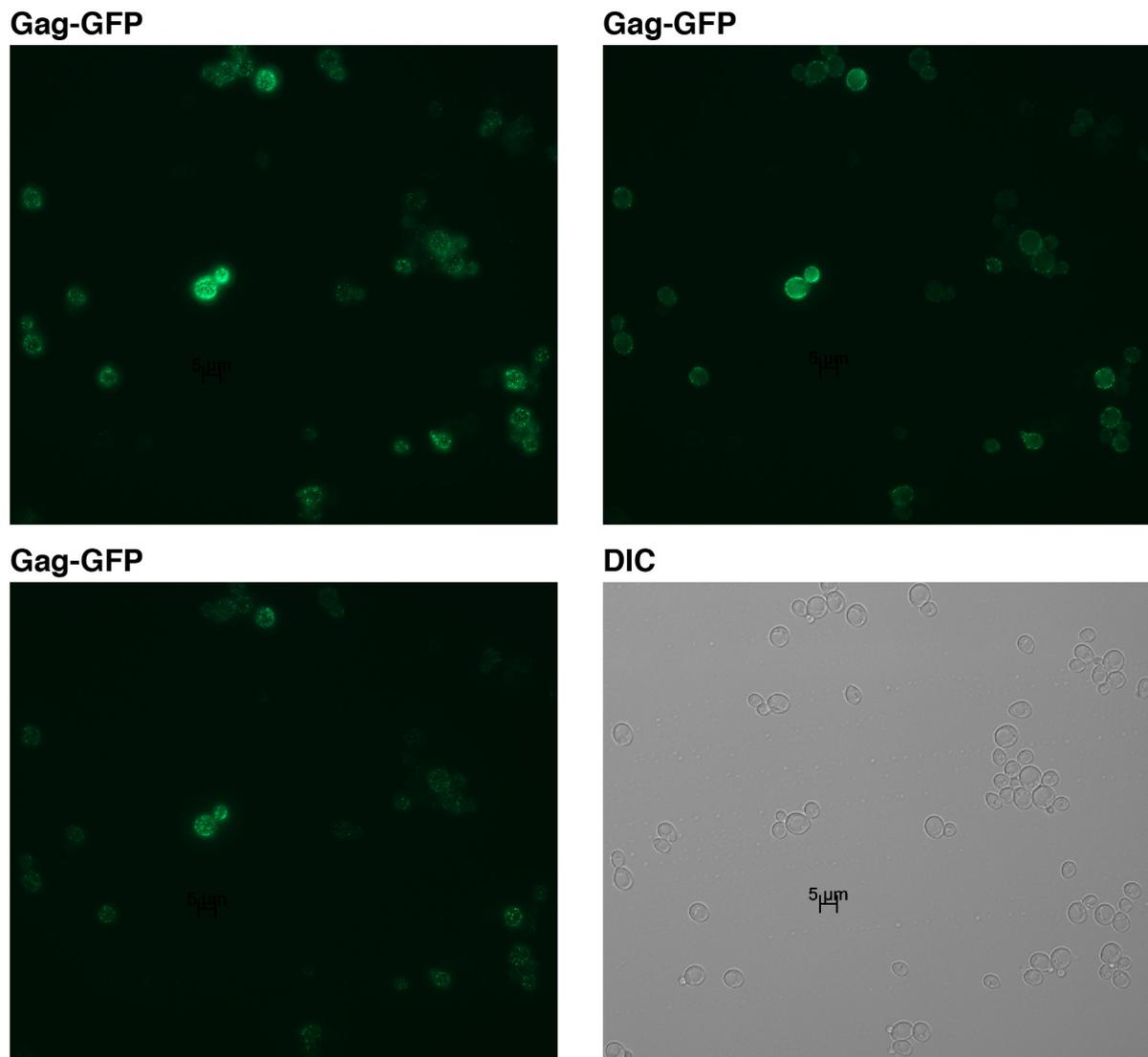


Abbildung E3. Die Lokalisation von Gag-GFP in Wildtyp-Hefezellen, exprimiert von einem 2 μ -Vektor mit *PGK*-Promotor (pBM267), wurde mit Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Gag-GFP akkumuliert in punktförmigen Strukturen an der Plasmamembran. Drei Ebenen der Hefezellen sind abgebildet. DIC, differential interference contrast.

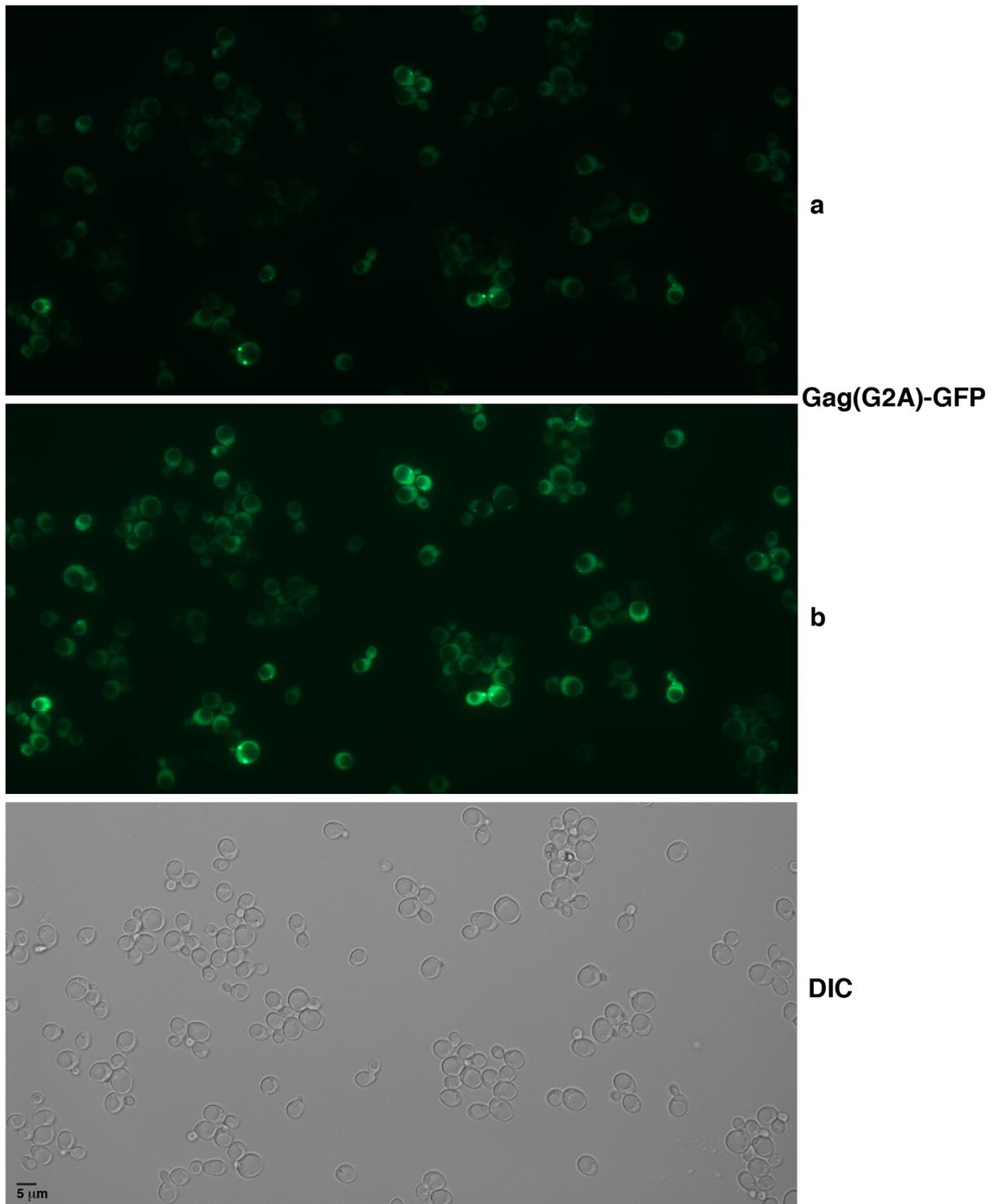


Abbildung E4. Die Lokalisation von Gag(G2A)-GFP in Wildtyp-Hefezellen, exprimiert von einem 2 μ -Vektor mit *PGK*-Promotor (pBM354), wurde mit Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Gag(G2A)-GFP ist zytosolisch lokalisiert. Zusätzlich waren Gag(G2A)-GFP-Akkumulationen in undefinierten intrazellulären Strukturen in circa einem Drittel der Zellen (127 von 337 ausgezählten Zellen) sichtbar. b, erhöhte Helligkeit. DIC, differential interference contrast.

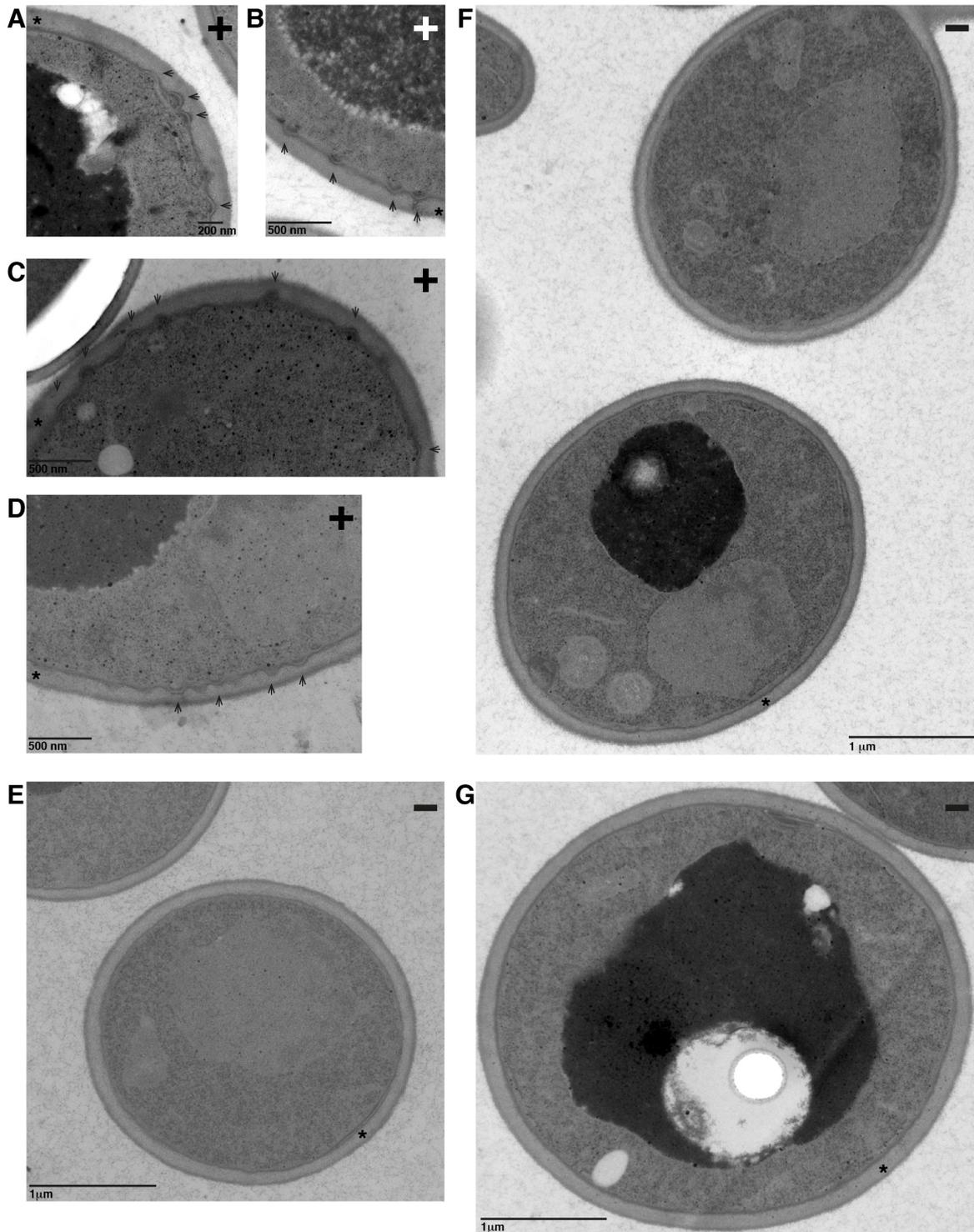


Abbildung E5. Wildtyp-Hefezellen, die entweder Gag-GFP von einem 2μ -Vektor mit *MET3*-Promotor (pBM273) (+, A-D) exprimierten oder den leeren Vektor trugen (-, E-G), wurden in Kunstharz eingebettet. Schnitte wurden mit Elektronenmikroskopie analysiert. Die Gag-GFP exprimierenden Zellen zeigten knospenförmige Deformationen der Plasmamembran (Pfeile). Die Zellen wurden zur Promotorinduktion sechs Stunden in Medium ohne Methionin inkubiert. Die Schnitte aus A, B, C, F und G stammen aus demselben Experiment. A ist auch in Abb. 5F gezeigt und hier zum Vergleich ein zweites Mal abgebildet. Die Schnitte aus D und E stammen aus einem zweiten unabhängigen Experiment. Stern, Zellwand. Die Präparation der Kunstharzschnitte und die Elektronenmikroskopie wurden von Bettina Purfürst durchgeführt.

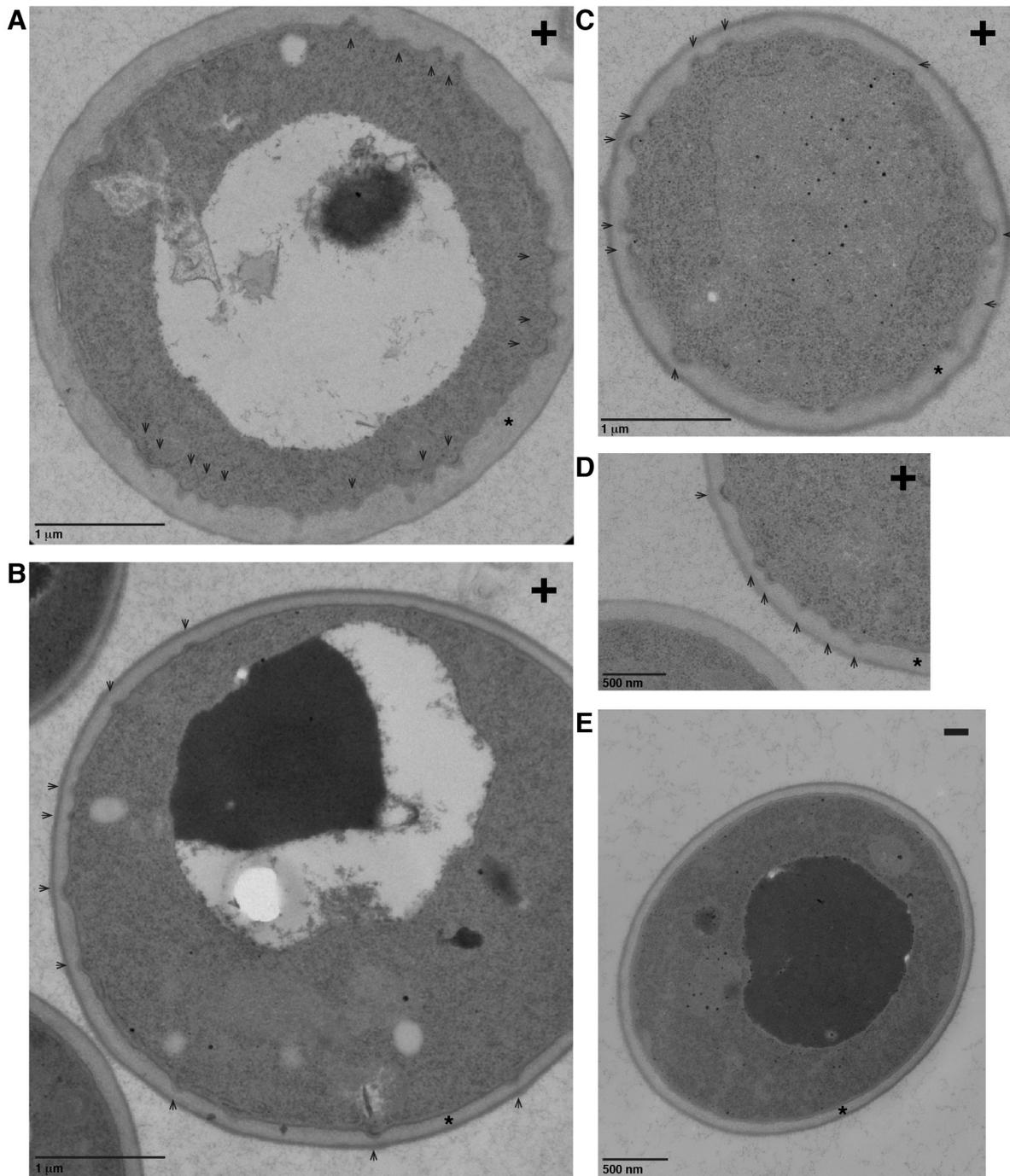


Abbildung E6. Wildtyp-Hefezellen, die entweder Gag-GFP von einem 2 μ -Vektor mit *MET3*-Promotor (pBM273) (+, **A-D**) exprimierten oder den leeren Vektor trugen (-, **E**), wurden in Kunstharz eingebettet. Schnitte wurden mit Elektronenmikroskopie analysiert. Die Gag-GFP exprimierenden Zellen zeigten knospenförmige Deformationen der Plasmamembran (Pfeile). Die Zellen wurden zur Promotorinduktion sechs Stunden in Medium ohne Methionin inkubiert. Die Schnitte stammen aus einem Experiment, das unabhängig von den in Abb. E5 gezeigten Experimenten ist. Stern, Zellwand. Die Präparation der Kunstharzschnitte und die Elektronenmikroskopie wurden von Bettina Purfürst durchgeführt.

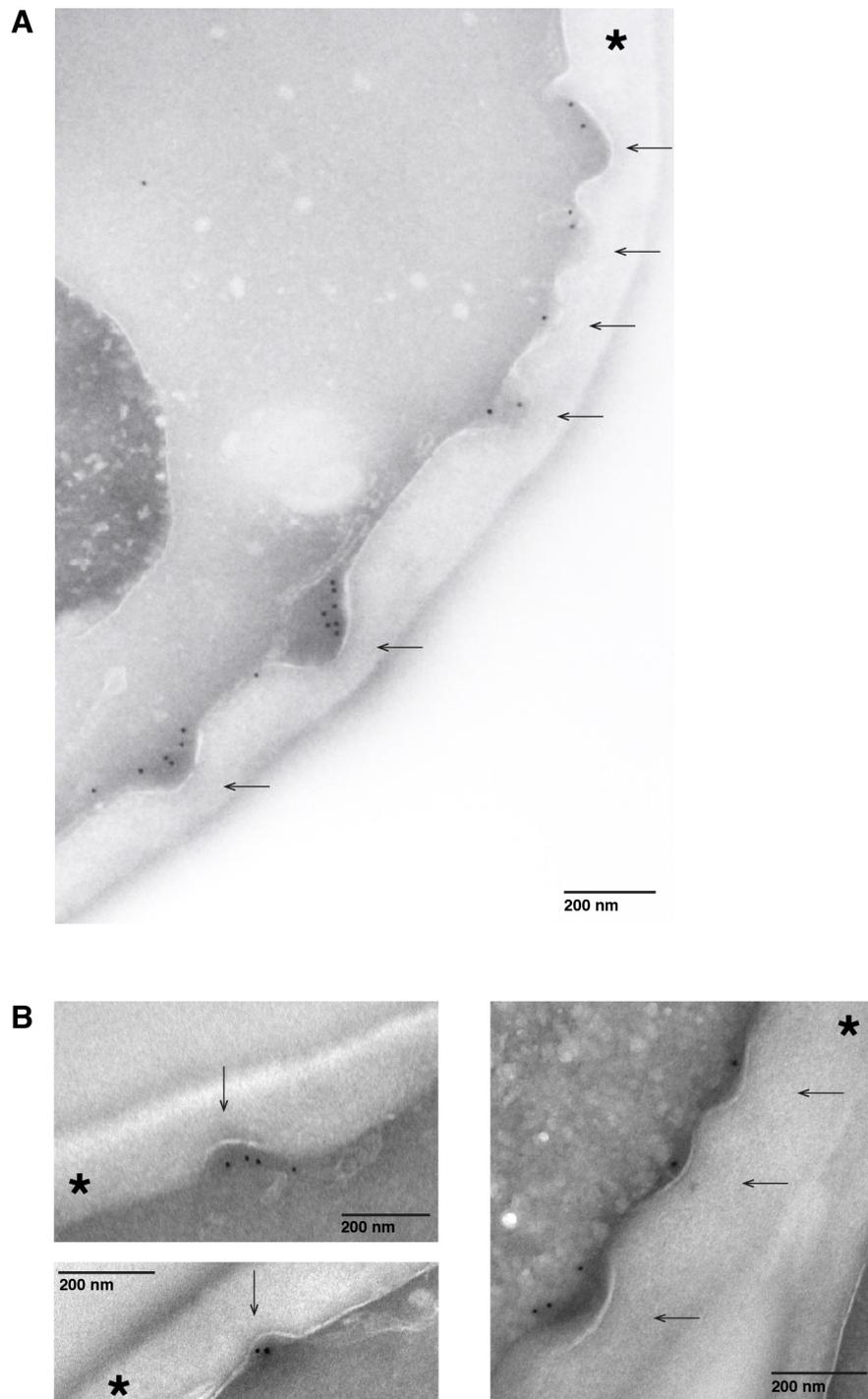


Abbildung E7. Durch Gag-GFP induzierte Plasmamembrandeformationen (Pfeile) wurden mit Elektronenmikroskopie analysiert. Kryoschnitte von Wildtyp-Hefezellen (SUB62), die Gag-GFP von einem 2μ -Vektor mit *PGK*-Promotor (pBM267) exprimierten, (**A**) oder von Wildtyp-Hefezellen (YWO1) mit Gag-GFP-Expression von einem 2μ -Vektor mit *MET3*-Promotor (pBM273), der sechs Stunden induziert war, (**B**) wurden präpariert. Gag-GFP wurde über Immunogoldmarkierung mit Anti-GFP-Antikörpern detektiert. Stern, Zellwand. A ist auch in Abb. 5G gezeigt und hier zum Vergleich ein zweites Mal abgebildet. Die Präparation der Kryoschnitte, die Immunogoldmarkierung und die Elektronenmikroskopie wurden von Frank Vogel (A) und Bettina Purfürst (B) durchgeführt.

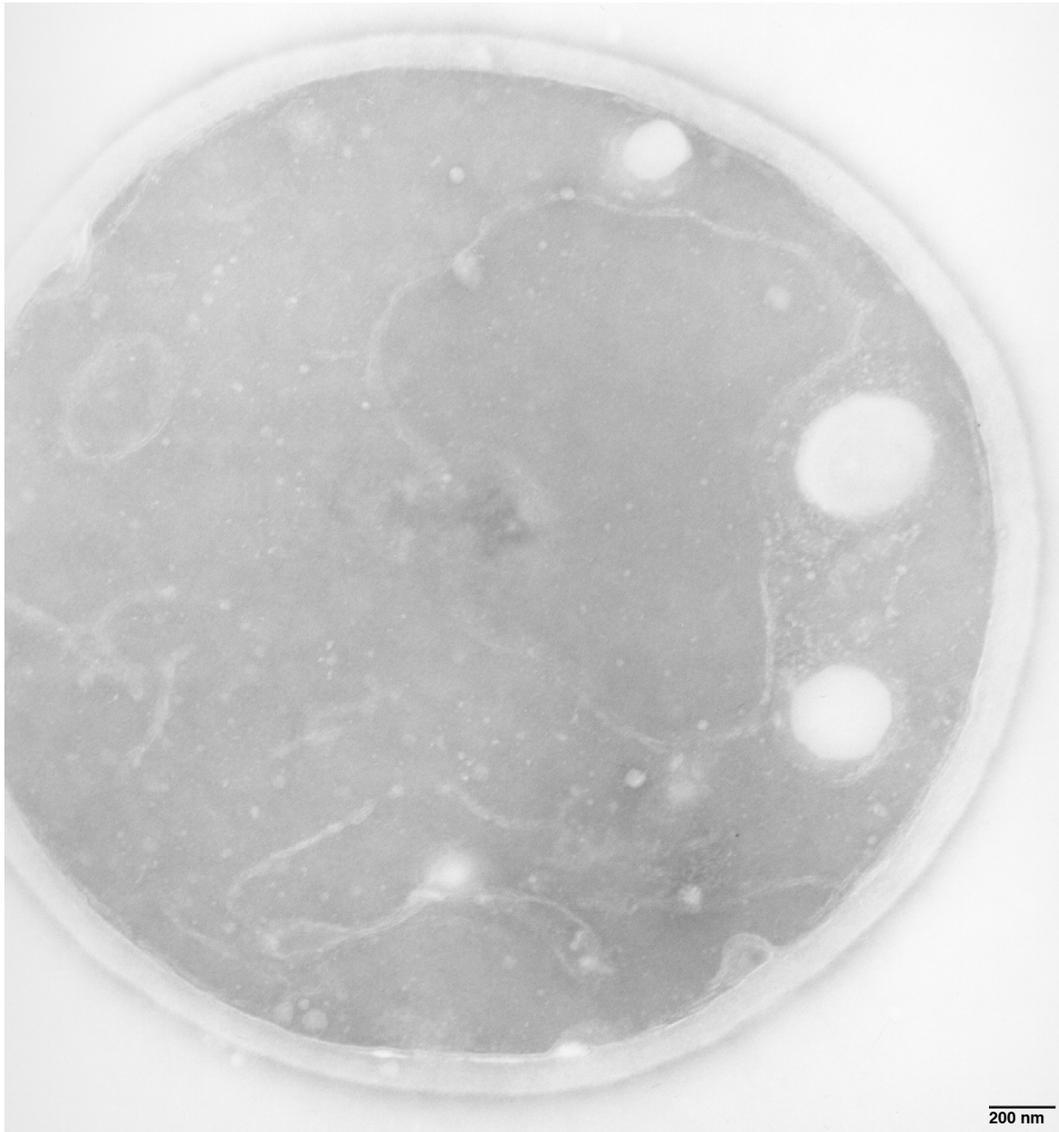


Abbildung E8. Der Kryoschnitt einer Wildtyp-Hefezelle (SUB62), die den leeren 2 μ -Vektor mit *PGK*-Promotor trug, wurde wie in Abb. 5G und Abb. E7 mit Immunogold markiert. Kryoschnitte von Hefezellen ohne Gag-GFP-Expression zeigen keine knospenförmigen Deformationen der Plasmamembran wie bei Expression von Gag-GFP (siehe Abb. 5G und Abb. E7). Die Präparation des Kryoschnitts, die Immunogoldmarkierung und die Elektronenmikroskopie wurden von Frank Vogel durchgeführt.

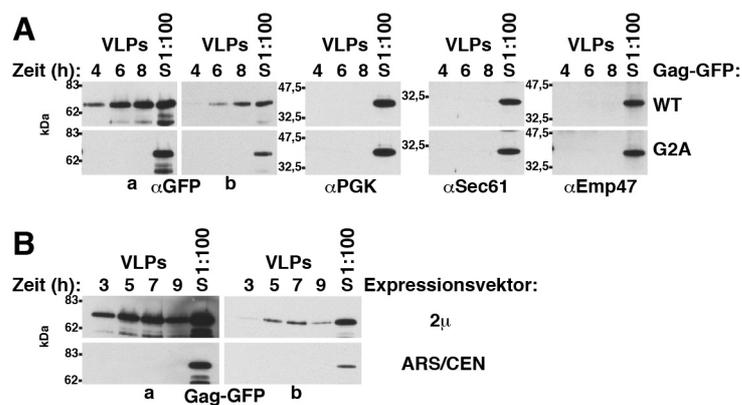
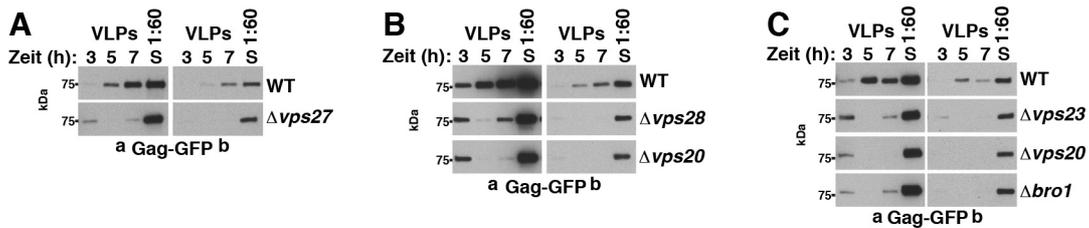


Abbildung E9. A, die Gag-GFP-Freisetzung aus Hefesphäroplasten wurde mit einem Anti-GFP-Immunoblot von Zentrifugationsedimenten des Inkubationsmediums (VLPs) analysiert. GFP-markiertes Gag (WT, Wildtyp) oder Gag(G2A) wurde von einem 2μ -Vektor mit *MET3*-Promotor (pBM273, pBM288) im Wildtyp-Hefestamm exprimiert. Der Promotor wurde zu Beginn der Sphäroplastenpräparation induziert. Die Gag-GFP-Freisetzung ist abhängig von der Myristylylmodifikation. Immunoblots mit Antikörpern gegen PGK (zytosolisches Protein), Sec61 (ER-Membranprotein) oder Emp47 (Golgi- und COPII-Vesikel-Membranprotein) dienen als Kontrolle für die spezifische Freisetzung von Gag-GFP. Das Sediment des ersten Zeitpunkts, nach zwei Stunden Inkubation, ist nicht abgebildet. Eine lange (a) und eine kurze (b) Exposition sind gezeigt. Die in einer Spalte abgebildeten Kinetiken sind Ausschnitte aus demselben Autoradiografiefilm. S, Sphäroplastenlysat, das am letzten Zeitpunkt der Kinetik präpariert wurde. **B**, wie A, mit der Ausnahme, dass Gag-GFP vom 2μ -Vektor oder ARS/CEN-Vektor mit *MET3*-Promotor (pBM273, pBM355) exprimiert wurde und der Promotor schon bei der Anzucht der Hefekultur induziert war. Wenn die Sphäroplasten Gag-GFP vom ARS/CEN-Vektor exprimieren, kann kein freigesetztes Gag-GFP detektiert werden.

Gag-GFP-Expression vom konstitutiv aktiven *PGK*-Promotor



Gag-GFP-Expression vom induzierbaren *MET3*-Promotor

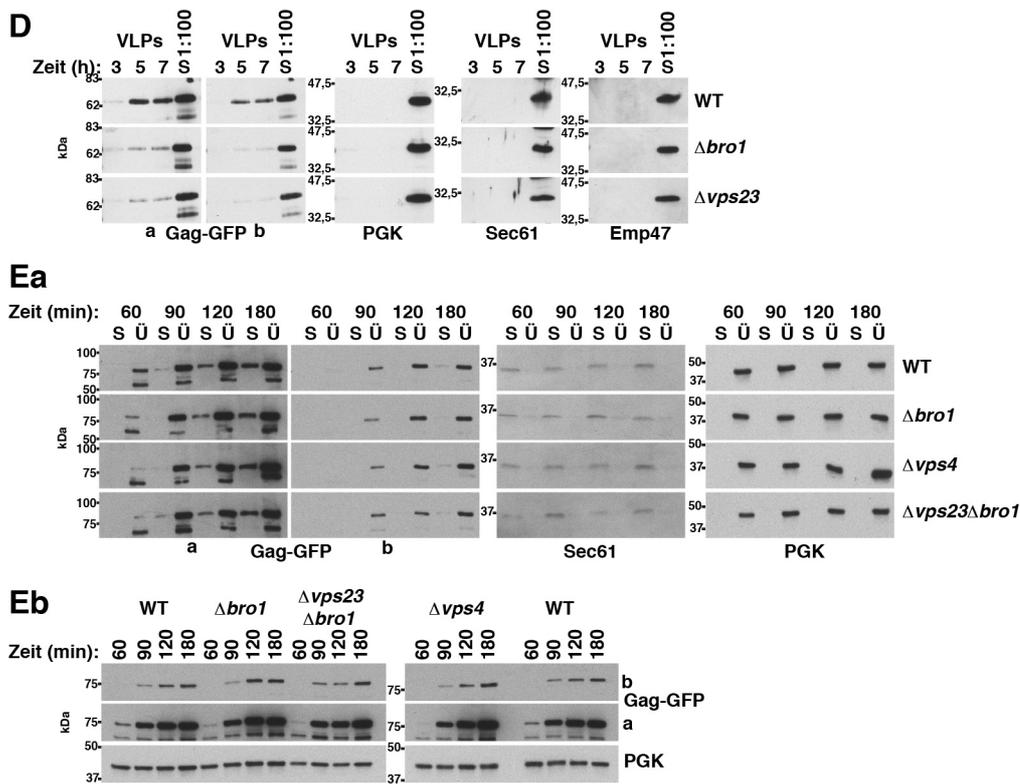
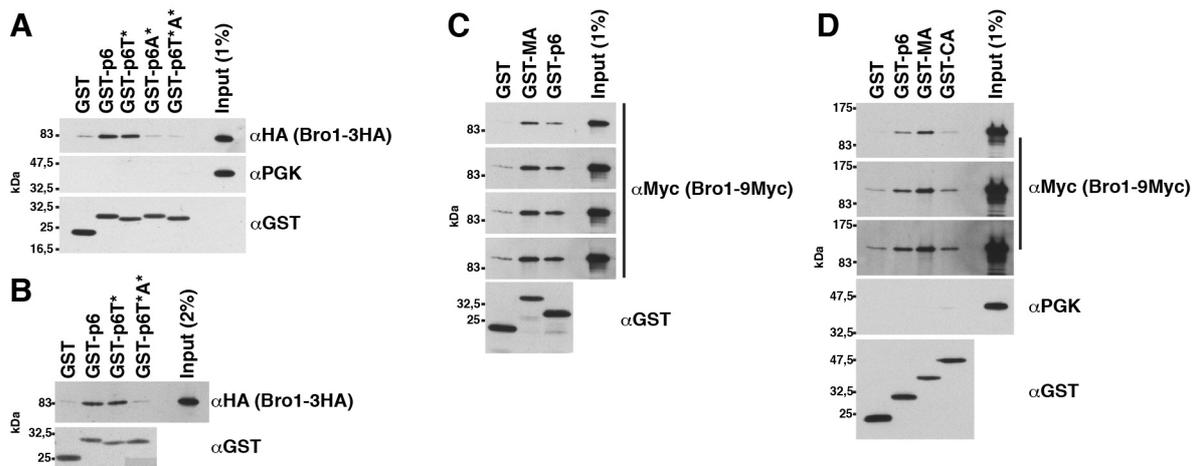


Abbildung E10. A-C, die Gag-GFP-Freisetzung aus Hefesphäroplasten des Wildtypstamms oder der angegebenen ESCRT-Mutanten wurde mit Anti-GFP-Immunoblots von Zentrifugationsedimenten des Inkubationsmediums (VLPs) analysiert. Die Gag-GFP-Freisetzung ist ESCRT-abhängig. Gag-GFP wurde von einem 2μ -Vektor mit *PGK*-Promotor (pBM267) exprimiert. S, Sphäroplastenlysat, das am letzten Zeitpunkt der Kinetik präpariert wurde. **D**, wie oben, mit der Ausnahme, dass Gag-GFP vom 2μ -Vektor mit *MET3*-Promotor (pBM273) exprimiert wurde. Der Promotor wurde zu Beginn der Sphäroplastenpräparation induziert. Immunoblots mit Antikörpern gegen PGK (zytosolisches Protein), Sec61 (ER-Membranprotein) und Emp47 (Golgi- und COPII-Vesikel-Membranprotein) dienen als Kontrolle für die spezifische Freisetzung von Gag-GFP. **E**, die Membranbindung von Gag-GFP nach Induktion des *MET3*-Promotors wurde analysiert. Die Deletion von ESCRT-Proteinen beeinträchtigt die Membranbindung von Gag-GFP nicht. Zellextrakte (**Eb**) von Wildtyp-Hefezellen oder den genannten ESCRT-Mutanten, die mit einem 2μ -Vektor für die Gag-GFP-Expression vom *MET3*-Promotor (pBM267) transformiert waren, wurden 60, 90, 120 und 360 min nach Promotorinduktion präpariert und durch Zentrifugation bei 25000g in ein membranhaltiges Sediment (S) und einen zytosolhaltigen Überstand (Ü) getrennt (**Ea**). Die Proben wurden im Anti-GFP-Immunoblot analysiert. Immunoblots mit Antikörpern gegen Sec61 und PGK dienen als Referenz. **A-E**, lange (a) und kurze (b) Expositionen sind gezeigt. Die in einer Spalte abgebildeten Kinetiken sind Ausschnitte aus demselben Autoradiografiefilm. **A-E**, WT, Wildtyp.

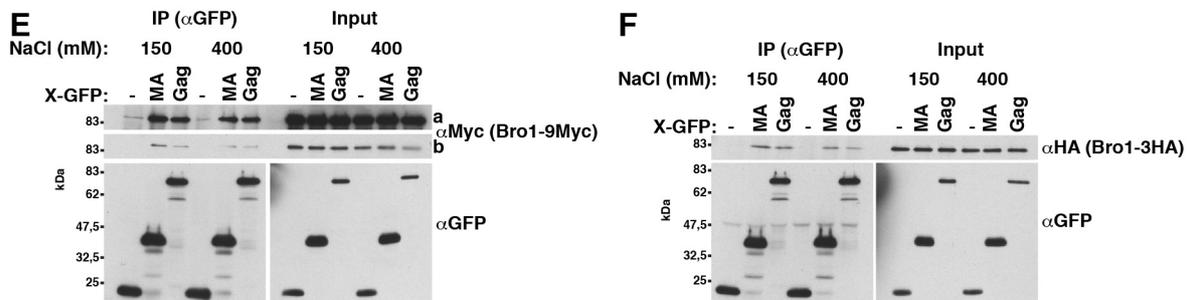
		BRO1-Domäne	
PDC6I_HUMAN	-MATFISVQLKKTSEVDLAKPLVKFIQQTYPSSGEEQAQYCRAAEELS KLRRAAVGRPLD		59
BRO1_YEAST	MKPYLFDLKLKDKTEKLDWKKGLSSYLKKS YGSSQWRTFYDEKATSELDHLRNNANGELAP		60
		:::***.*::** * * .:::*** * . . ::::***.* * *	
PDC6I_HUMAN	KHEGALETLLRYDQICSI EPKFPFSENQICLFTFWKDAFDKGS LFGGSVKLALASLGYE		119
BRO1_YEAST	--SSLSEQNLKYYSFLEHLYFRLGSKGSLKMDFTWYDAEYSSA--QKGLKYTQHTLAFE		116
		.. * ****. : : : : . : : : *** ** .. : . : * : * : *	
PDC6I_HUMAN	KSCVLFNCAALASQIAAEQNLDNDEGLKIA----AKHYQFASGAFLHIKETVLSALSRE		174
BRO1_YEAST	KSCTLFNIAVIFTQIARENIN-EDYKNS IANLTKAFSCFEYLSN-----FLNS		164
		***.** * . : : *** * : : * . ** . : : * : : : *	
PDC6I_HUMAN	PTVDISPDTVGTLSLIMLAQAQEVFFLKATRDKMKDA---IIAKLANQAADYFGDAFKQC		231
BRO1_YEAST	PSVDLQSENTRFLANICHAEAQLFVLLKLLNDQISSKQYTLISKLSRATCNL----FQKC		220
		*::: . : . . * : * *:::***.* ** . *::: . . ::::***. : : : *:::*	
PDC6I_HUMAN	QYK-DTLPKE-----VFPVLAAKHCIMQANA EYHQSI LAKQKQKFGEEIARLQHAA		281
BRO1_YEAST	HDFMKEIDDDVAIYGEPKWKT TVTCKLH--FYKLSAYYHGLHLEENRVGEAIAFLDFSM		279
		: . : . : : * . * : : : *::: . : : : : ** * * : : *	
PDC6I_HUMAN	ELIK---TVASRYDEYVNVKDFSDKINRALAAAKKDNDFIYHDRV PDLKDLDP IGTKATLV		338
BRO1_YEAST	QQLISSLFPKTVLVEFIDFDGFKETLEKKQKELIKDNDFIYHESVPAVVQVDSIKALDAI		339
		: : . : *:::***.*:::*** * : : : * * : : * * : : *	
PDC6I_HUMAN	KSTPV-----NVPISQKFTDLFEKMPVSVQQSLAAYNQRKADLVNRS IAQMREATTL	V-Domäne	391
BRO1_YEAST	KSPTWEKILEPYMQDVANKCDSL YRGI I PLDVYEKESIYSEKATLLRKQVEETETANLE		399
		** : : * . * . : : * : * . : : * . : : * * : : : . *	
PDC6I_HUMAN	ANGVLASLNLPA AIEDVSGDTPVQSI LTKSR--SVIEQGGIQTVDQLIK-----EL		440
BRO1_YEAST	YSSFIEFTNLPRLSDLEKQFSDGNIFSN TDTQGGQLMRDQIQTWCKFIQTNEFRDIEEQM		459
		. . . : *** : * . : : . *::: . : : . *** : * : : : *	
PDC6I_HUMAN	PELLQRNREILDESLRLLDEEEATDN DLRAKFKERWQRTPSNELYKPLRAEGTNFRTVLD		500
BRO1_YEAST	NKIVFKRKQILEILSALP-----NDQ-----KENVTKLKSLSLV		492
		: : : : : * * * : : * * : : * : : : * : : : *	
PDC6I_HUMAN	KAVQADGQVKECYQSHRDTIVLLCKPE-----PELNA AIP SAN---PAKTMQGSEVVNV		551
BRO1_YEAST	AASNSDEKLFACVKPHIVEINLLNDNGKIWKK FDEFNRNTPPQPSLLDIDDTKNDKILEL		552
		* : * : : * : * * * . * : * * . : . : : : *	
PDC6I_HUMAN	LKSLLSNLD---EVKKEREGLENDLK-SVNFDMTSKFLTAL AQDGVINEEALSVTELDLV		607
BRO1_YEAST	LKQVKGHAEDLRTLKEERSRNLSELRDEINDDITKLLI INKGKSDVELKDLFEVEL-EK		611
		** . : . : : : *::: . . : * : * * : * * . . : : : * . * * .	
PDC6I_HUMAN	YGGLTTKVQESLKKQEGLLKNIQVSHQEF SKMKQSNNEAN-----LREEVLKLNLATAY		660
BRO1_YEAST	FEPLSTRIEATIKQSSMIDDIKAKLDEIFHLSNFKDKSSGEEKFLEDRKNFFDKLQEA V		671
		: *:::*** : : * * . : : : * . : : : : : : . * : : : : * *	
PDC6I_HUMAN	DNFVELVANLKEGTFYNELTEILVR FQNKCSDIVFARKTERDELLKDLQOSIAREPSAP	PRR	720
BRO1_YEAST	KSFSIFASDL PKGIEFYDSL FNMSRDLAER-----VRVAKQTEDSTA-----		713
		..* : . : * : * * : * : : : : : : . : * : : * * *	
PDC6I_HUMAN	SIPTPAYQSSPAGGHAPTPT PAPRTMPPTKQP PARPPPVLPANRAPSATA-PSPVGA		779
BRO1_YEAST	-----NSPAPPLP-----PLDSKASVVG GPPLLQKSAAFQSLSRQGLNL		753
		: *:::*** * . : . *:::*** : * : : . : .	
PDC6I_HUMAN	GTAAPAPSQTPGSAPPPQAQGPYPTYPGYPGY CQMPMPMGYNPYAYGQYNMPYPVYHQ		839
BRO1_YEAST	GDQFQNLKISAGSD-LPQGGIPRPTYEASP-----YAAT-PTMAAPPVPPK		798
		* . : * * * . * * * * . * * * . * * * * : *	
PDC6I_HUMAN	SPGQAPYPGPQQ-----PSYFPQPQQSYYPQQ----- 868		
BRO1_YEAST	QSQEDMYDLRRRKAVENEERELQEN-PTS FYNRPSVFDENMYSKYSS 844		
		. : * : : . : : * : * :	

Abbildung E11. Vergleich der Proteinsequenzen von ALIX (PDC6I_Human, Q8WUM4) und Bro1 (*S. cerevisiae*, P48582), durchgeführt vom EMBL European Bioinformatics Institute mit dem Programm Clustal Omega. Die Zuordnung zu Proteindomänen wurde aus Fisher et al., 2007 übernommen. PRR, proline rich region.

Hefe: GST-Pull-downs



Hefe: Koimmunopräzipitationen



HEK293: GST-Pull-downs

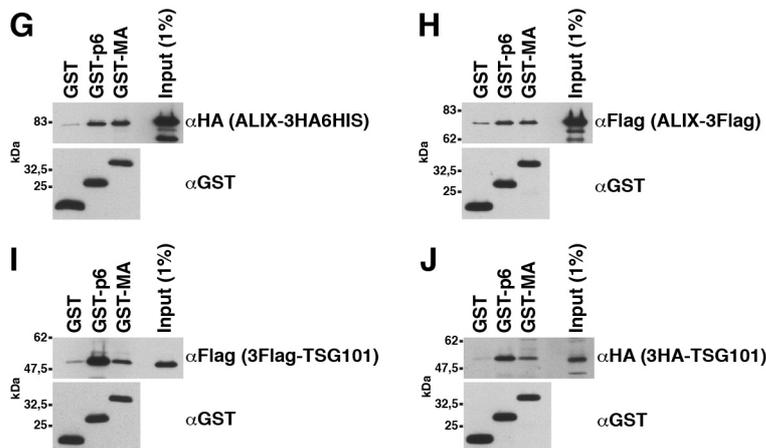
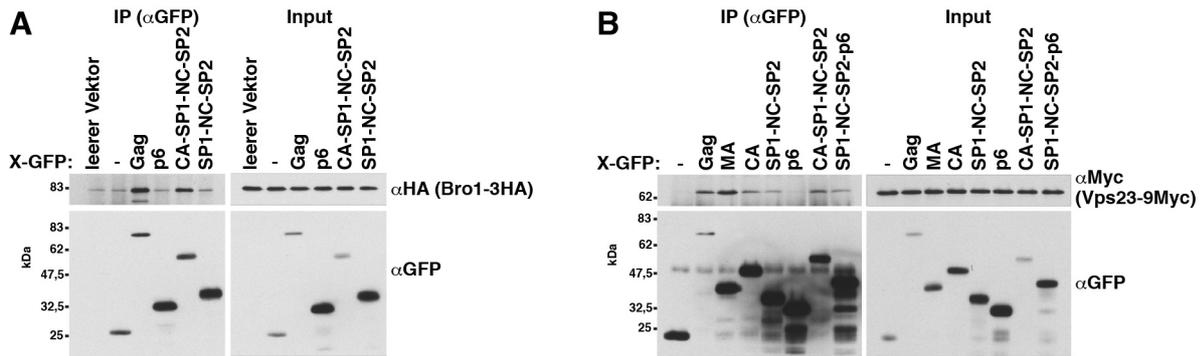


Abbildung E13. Vergleich von ESCRT-Proteinen mit verschiedenen Epitopmarkierungen in Bindungsassays. **A-D**, an GST fusionierte Gagfragmente wurden in *E. coli* exprimiert (pBM239, pBM241, pBM243, pBM245, pBM255, pBM257), an Glutathionsepharose gebunden und mit Extrakt von Hefezellen inkubiert, die gemischt kodierte epitopmarkiertes Bro1 exprimierten. Der Bindungspuffer enthielt 400 mM NaCl. An die Sepharose gebundene Proteine wurden im Immunoblot mit den angegebenen Antikörpern detektiert. PGK diente als Kontrolle für die spezifische Bindung von Bro1. P6T*, mutierte TSG101-Bindungsstelle; p6A*, mutierte ALIX-Bindungsstelle. **A**, Abb. 10I zum Vergleich gezeigt. **C**, mehrere Expositionen des Anti-Myc-Immunoblots sind abgebildet. **D**, Abb. 10H mit zusätzlichen Expositionen des Anti-Myc-Immunoblots zum Vergleich. **E-F**, Gag-GFP oder MA-GFP wurde von einem 2 μ -Vektor mit induziertem *MET3*-Promotor (pBM273, pBM291, pBM353) in einem Hefestamm mit gemischt kodierte epitopmarkiertes Bro1 exprimiert. GFP-markierte Proteine wurden mit Anti-GFP-Antikörpern immunopräzipitiert und koimmunopräzipitiertes Bro1 wurde im Immunoblot mit Anti-HA- oder Anti-Myc-Antikörpern detektiert. Eine lange (a) und eine kurze (b) Exposition sind gezeigt. **G-J**, an GST fusioniertes MA oder p6 wurde in *E. coli* exprimiert (pBM239, pBM255), an Glutathionsepharose gebunden und mit Extrakt aus HEK293-Zellen, die epitopmarkiertes ALIX oder TSG101 von Vektoren mit CMV-Promotor exprimierten (EX-V1319-M08, EX-V1319-M14, EX-V4135-M06, EX-V4135-M12), in Gegenwart von 150 mM NaCl inkubiert. An die Sepharose gebundene Proteine wurden im Immunoblot mit den angegebenen Antikörpern detektiert.

Hefe:



HEK293:

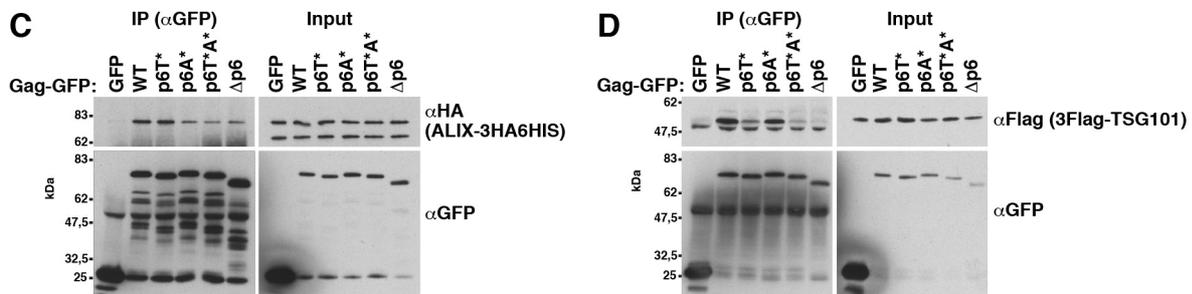


Abbildung E14. **A** und **B**, Koimmunpräzipitationsexperimente mit Gag-GFP und GFP-markierten Gagfragmenten, die von 2μ -Vektoren mit induziertem *MET3*-Promotor (pBM273, pBM291, pBM294, pBM297, pBM300, pBM303, pBM309, pBM353) in Hefezellen mit genomisch kodiertem epitopmarkiertem Bro1 oder Vps23 exprimiert wurden. Gag und Gagfragmente wurden mit Anti-GFP-Antikörpern immunpräzipitiert und koimmunpräzipitiertes Bro1 oder Vps23 wurde im Immunoblot mit Antikörpern gegen die Epitopmarkierung detektiert. **A**, Bro1 bindet an CA. In Gegenwart von 400 mM NaCl. **B**, in Gegenwart von 150 mM NaCl. Vps23 präzipitiert unter diesen Bedingungen mit NC-haltigen Fragmenten. **C** und **D**, Koimmunpräzipitationen von epitopmarkiertem ALIX oder TSG101 mit GFP-markierten Gagversionen, die in HEK293-Zellen von Vektoren mit CMV-Promotor exprimiert wurden (pBM197, pBM199, pBM203, pBM205, pBM207, pBM231, EX-V1319-M08, EX-V4135-M12), in Gegenwart von 400 mM NaCl. Die Bindung von ALIX an Gag-GFP wird durch Deletion von p6 reduziert, aber nicht verhindert. Die Bindung von TSG101 an Gag-GFP ist stärker von p6 abhängig. Die Ergebnisse sind vergleichbar zur Inkubation mit 150 mM NaCl (siehe Abb. 9, C und D). GFP-markierte Proteine wurden mit Anti-GFP-Antikörpern immunpräzipitiert und koimmunpräzipitiertes ALIX oder TSG101 wurde im Immunoblot mit Antikörpern gegen die Epitopmarkierung detektiert. WT, Wildtyp.

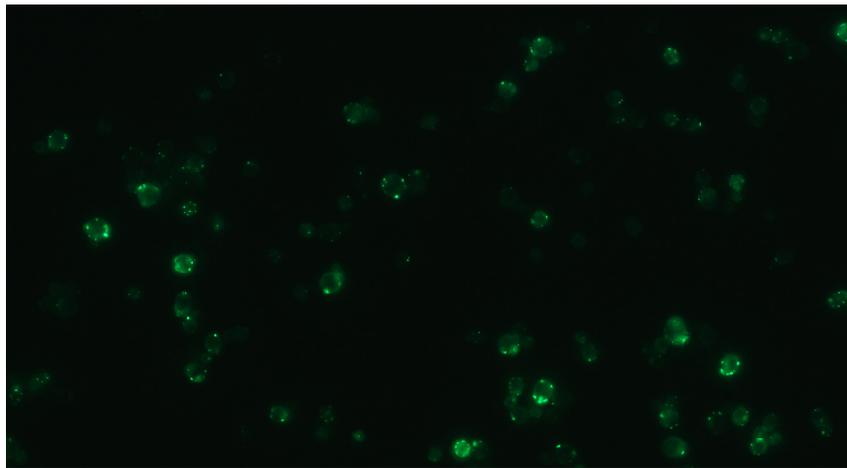
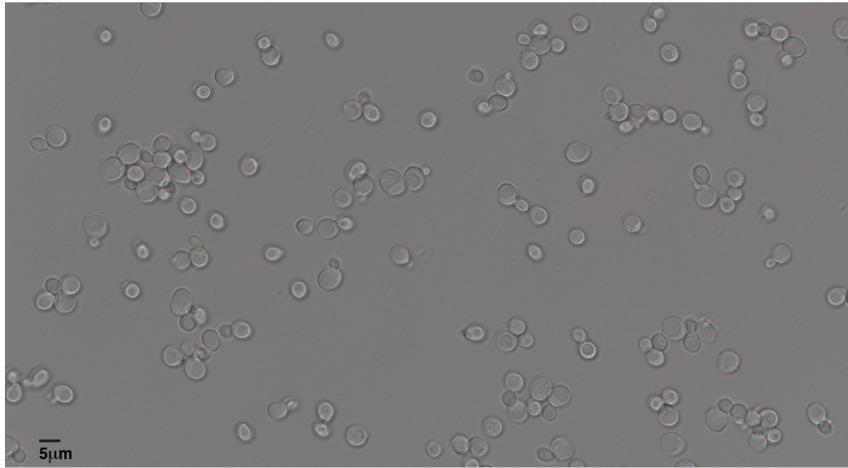
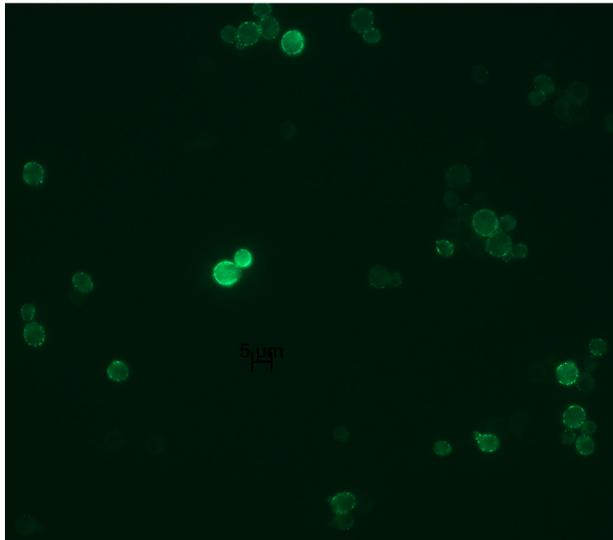
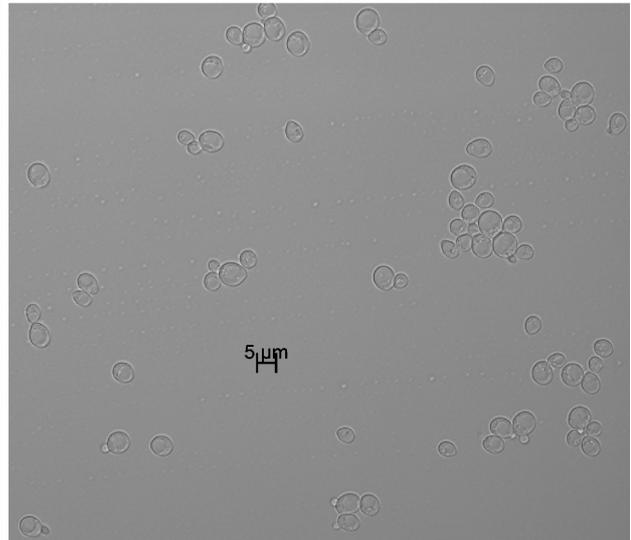
**Gag(Δ 8-87)-GFP****DIC****Gag-GFP****DIC**

Abbildung E15. Gag(Δ 8-87)-GFP oder Gag-GFP wurde von einem 2 μ -Vektor mit *PGK*-Promotor (pBM267, pBM786) in Wildtyp-Hefezellen exprimiert und mit Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Im Vergleich zu Gag-GFP bildet Gag(Δ 8-87)-GFP weniger Strukturen an der Plasmamembran. Diese Strukturen haben einen größeren Durchmesser. DIC, differential interference contrast. Das Bild der Gag-GFP exprimierenden Zellen ist auch in Abb. E3 gezeigt.

Abbildung E16. Beispiele der Koimmunpräzipitationsexperimente, die zur Charakterisierung der MA-Bro1-Interaktion durchgeführt wurden. Gag-GFP und GFP-markierte MA(1-132)-Versionen wurden von 2 μ -Vektoren mit induziertem *MET3*-Promotor (pBM273, pBM291, pBM318, pBM321, pBM324, pBM327, pBM330, pBM333, pBM336, pBM353, pBM362, pBM365, pBM377, pBM383, pBM386, pBM389, pBM392, pBM398, pBM401, pBM404) in Hefezellen mit genomisch kodiertem 3HA-markierten Bro1 exprimiert. GFP-markierte Proteine und Peptide wurden mit Anti-GFP-Antikörpern in Gegenwart von 400 mM NaCl immunpräzipitiert und koimmunpräzipitiertes Bro1 wurde im Anti-HA-Immunoblot detektiert. **A-C**, mit Fragmenten oder internen Deletionsmutanten von MA. Helix-2 (30-43) und der *Strand loop* zwischen Helix-1 und -2 (20-29) könnten an der MA-Bro1-Interaktion beteiligt sein. Die Zuordnung von Sekundärstrukturelementen wurde aus der MA-Röntgenstruktur übernommen (Hill et al., 1996). **D-F**, AAA-Mutagenese im Bereich der Aminosäuren 20 bis 43 von MA. YKL29,30,31AAA und VWA35,36,37AAA reduzieren die MA-Bro1-Interaktion. **C**, **D-F**, WT, Wildtyp.

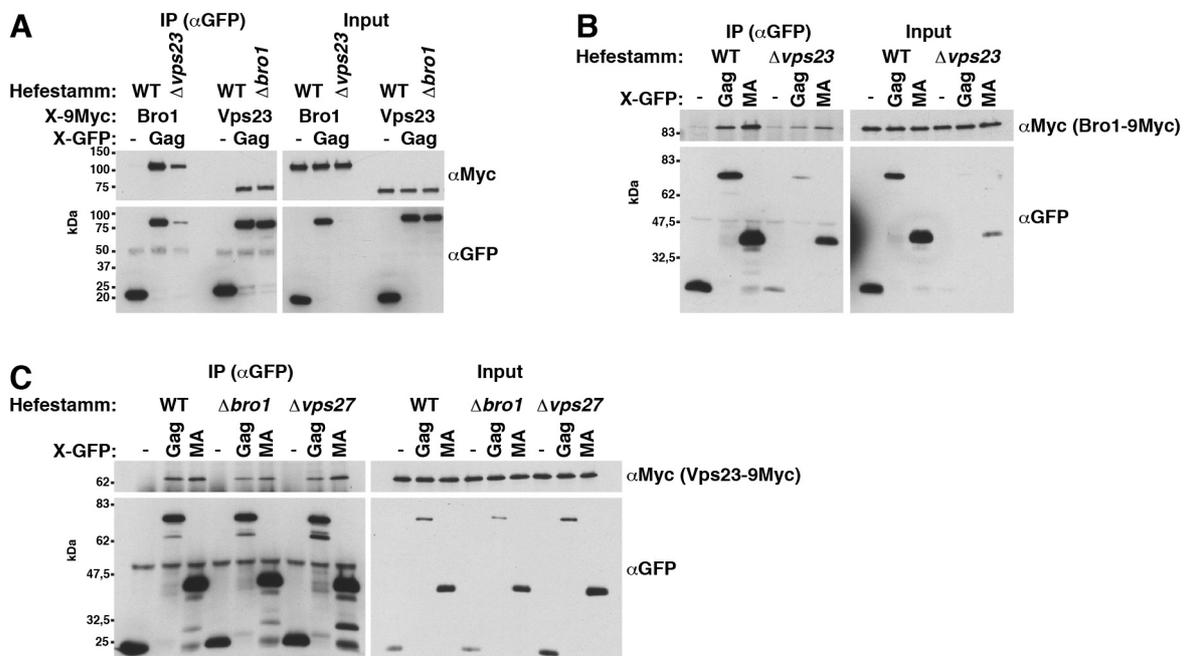


Abbildung E17. A-C, Koimmunpräzipitationsexperimente mit GFP-markiertem Gag oder MA, das von einem 2 μ -Vektor mit induziertem *MET3*-Promotor (pBM273, pBM291, pBM353) in Hefezellen mit genomisch kodiertem 9Myc-markierten Vps23 oder Bro1 exprimiert wurde. Gag oder MA wurde mit Anti-GFP-Antikörpern in Gegenwart von 400 mM NaCl immunpräzipitiert und koimmunpräzipitiertes Vps23 oder Bro1 wurde im Anti-Myc-Immunoblot detektiert. **A**, mit Wildtyp-Hefezellen oder den angegebenen Mutanten. Vps23 koimmunpräzipitiert mit Gag unabhängig von Bro1. Bro1 koimmunpräzipitiert mit Gag, das in einer $\Delta vps23$ -Mutante exprimiert wird. Da die Gagexpression in diesem Hefestamm reduziert war, kann die Menge des koimmunpräzipitierten Bro1 nicht direkt mit der aus dem Wildtypstamm verglichen werden. **B**, mit Wildtyp-Hefezellen oder einer $\Delta vps23$ -Mutante. Bro1 koimmunpräzipitiert mit MA in Abwesenheit von Vps23. Hier ergab sich das gleiche Problem wie in A. **C**, mit Wildtyp-Hefezellen oder den angegebenen Mutanten. Vps23 interagiert mit Gag und MA in Abwesenheit von Bro1 oder Vps27, einem anderen ubiquitinbindenden ESCRT-Protein. **A-C**, WT, Wildtyp.

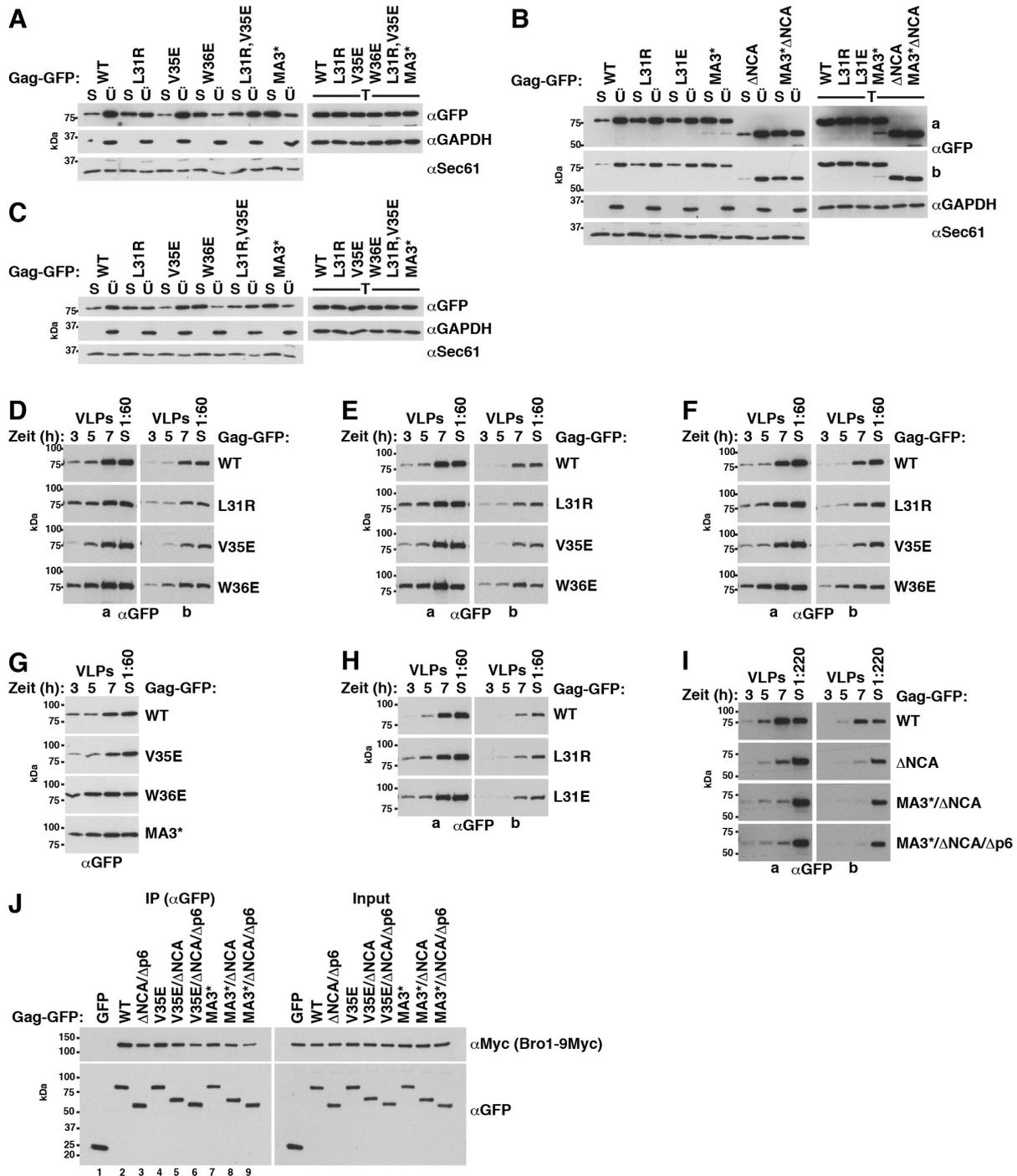


Abbildung E18. A-C, membranhaltige 25000g-Zentrifugationsedimente (S) und zytosolhaltige Überstände (Ü) aus Extrakten (T) von Zellen, die die angegebenen Gag-GFP-Versionen exprimierten, wurden im Immunoblot mit den angegebenen Antikörpern analysiert. Austausch von L31 oder W36 steigern die Bindung von Gag-GFP an die Membran. Die ΔNCA-Mutation reduziert die Membranassoziation nicht. Das zytosolische Protein GAPDH (Delgado et al., 2001) und das ER-Membranprotein Sec61 dienen als Referenz. D-I, die Freisetzung von Gag-GFP-Versionen aus Wildtyp-Hefesphäroplastraten wurde mit Anti-GFP-Immunoblots von Zentrifugationsedimenten des Inkubationsmediums (VLPs) analysiert. S, Sphäroplastratenlysat, das am Ende der Kinetik präpariert wurde. D-H, Austausch von Leu-31 oder Trp-36 steigern die Gag-GFP-Freisetzung. I, ΔNCA reduziert die Gag-GFP-Freisetzung und ist dominant über MA3*. Die Deletion von p6 reduziert die Gag(MA3*/ANCA)-GFP-Freisetzung nicht weiter. A-I, Gag-GFP-Versionen wurden von 2μ-Vektoren mit *PGK*-Promotor (pBM267, pBM556, pBM557, pBM591, pBM592, pBM593, pBM596, pBM615, pBM616, pBM782) in Wildtyp-Hefezellen exprimiert. Lange (a) und kurze (b) Expositionen sind abgebildet. Die in D-I in einer Spalte gezeigten Kinetiken sind Ausschnitte aus demselben Autoradiografiebild. J, Koimmunpräzitationsexperiment mit Gag-GFP-Versionen, die von 2μ-Vektoren mit induziertem *MET3*-Promotor (pBM273, pBM353, pBM584, pBM587, pBM610, pBM611, pBM706, pBM833, pBM878) in Hefezellen mit genomisch kodiertem 9Myc-markiertem Bro1 exprimiert wurden. Obwohl die V35E-Mutation die Koimmunpräzitation von Bro1 mit Gag-GFP nicht reduziert, ist die Menge an Bro1, die mit Gag(V35E/ANCA/Δp6)-GFP koimmunpräzitiert gegenüber der mit Gag(ΔNCA/Δp6)-GFP präzitierten Menge reduziert. Die Gag-GFP-Versionen wurden mit Anti-GFP-Antikörpern in Gegenwart von 400 mM NaCl immunpräzitiert und koimmunpräzitiertes Bro1 wurde im Anti-Myc-Immunoblot detektiert. A-J, WT, W.

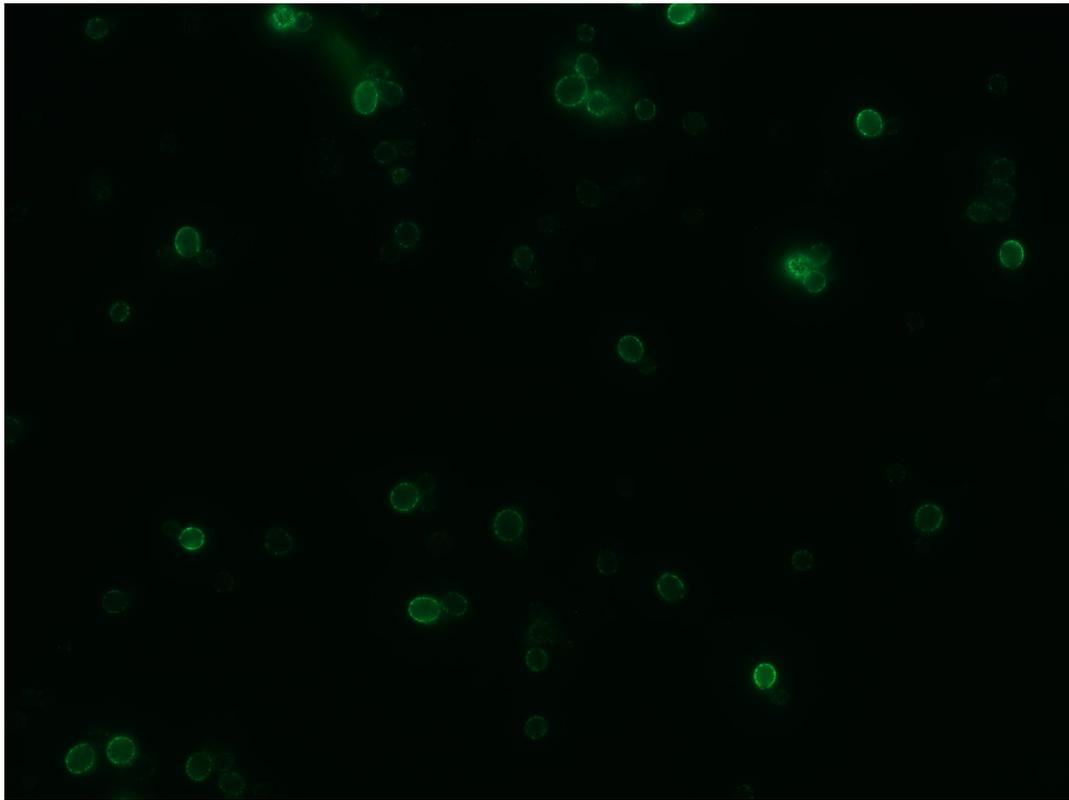
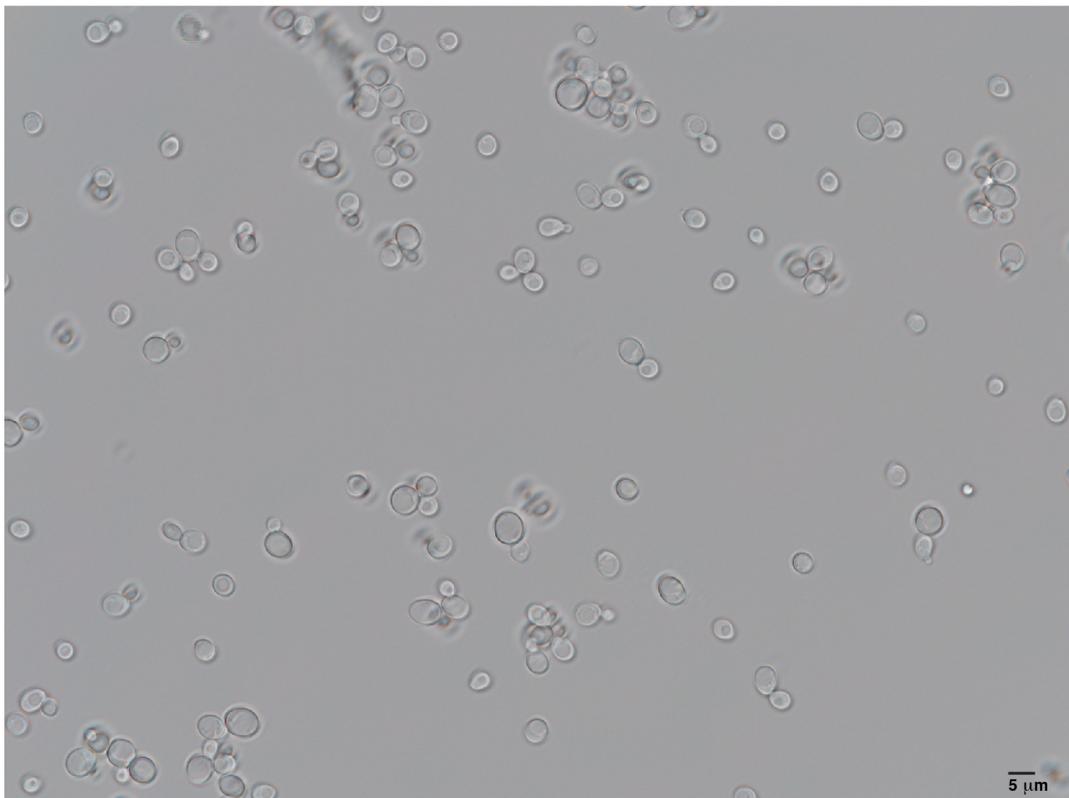
Gag(MA3*)-GFP**DIC**

Abbildung E19. Gag(MA3*)-GFP wurde von einem 2 μ -Vektor mit *PGK*-Promotor (pBM616) in Wildtyp-Hefezellen exprimiert und mit Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Gag(MA3*)-GFP bildet punktförmige Strukturen an der Plasmamembran, vergleichbar zu Gag-GFP (siehe Abb. E2 und E3). Zytoplasmatische Aggregate sind nicht sichtbar. DIC, differential interference contrast.

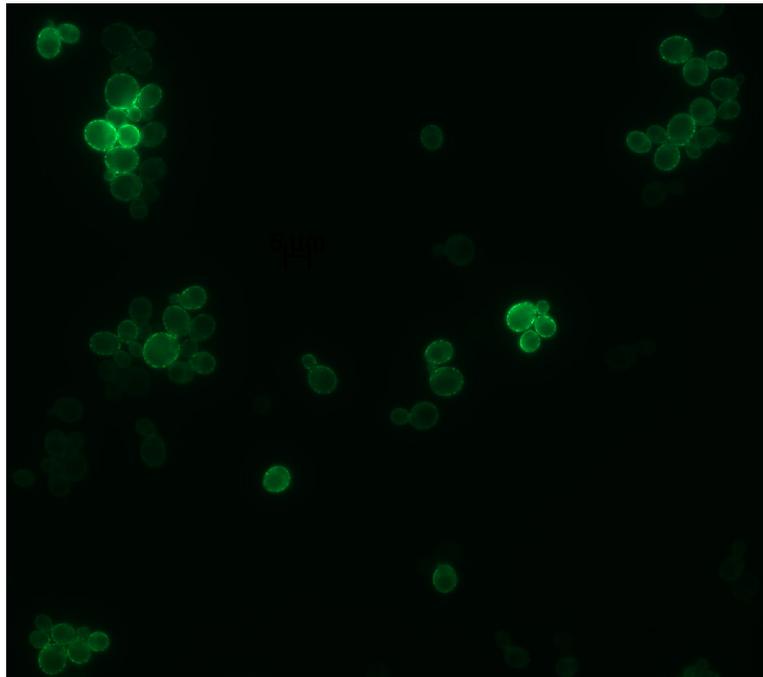
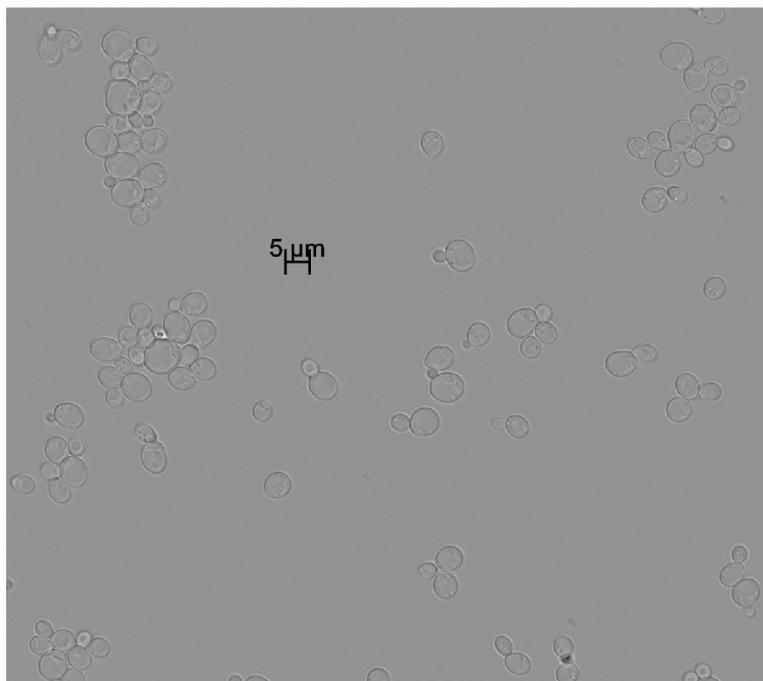
Gag(Δ NCA)-GFP**DIC**

Abbildung E20. Gag(Δ NCA)-GFP wurde von einem 2 μ -Vektor mit *PGK*-Promotor (pBM782) in Wildtyp-Hefezellen exprimiert und mit Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Gag(Δ NCA)-GFP bildet punktförmige Strukturen an der Plasmamembran vergleichbar zu Gag-GFP (siehe Abb. E2 und E3). Aggregate sind nicht sichtbar. DIC, differential interference contrast.

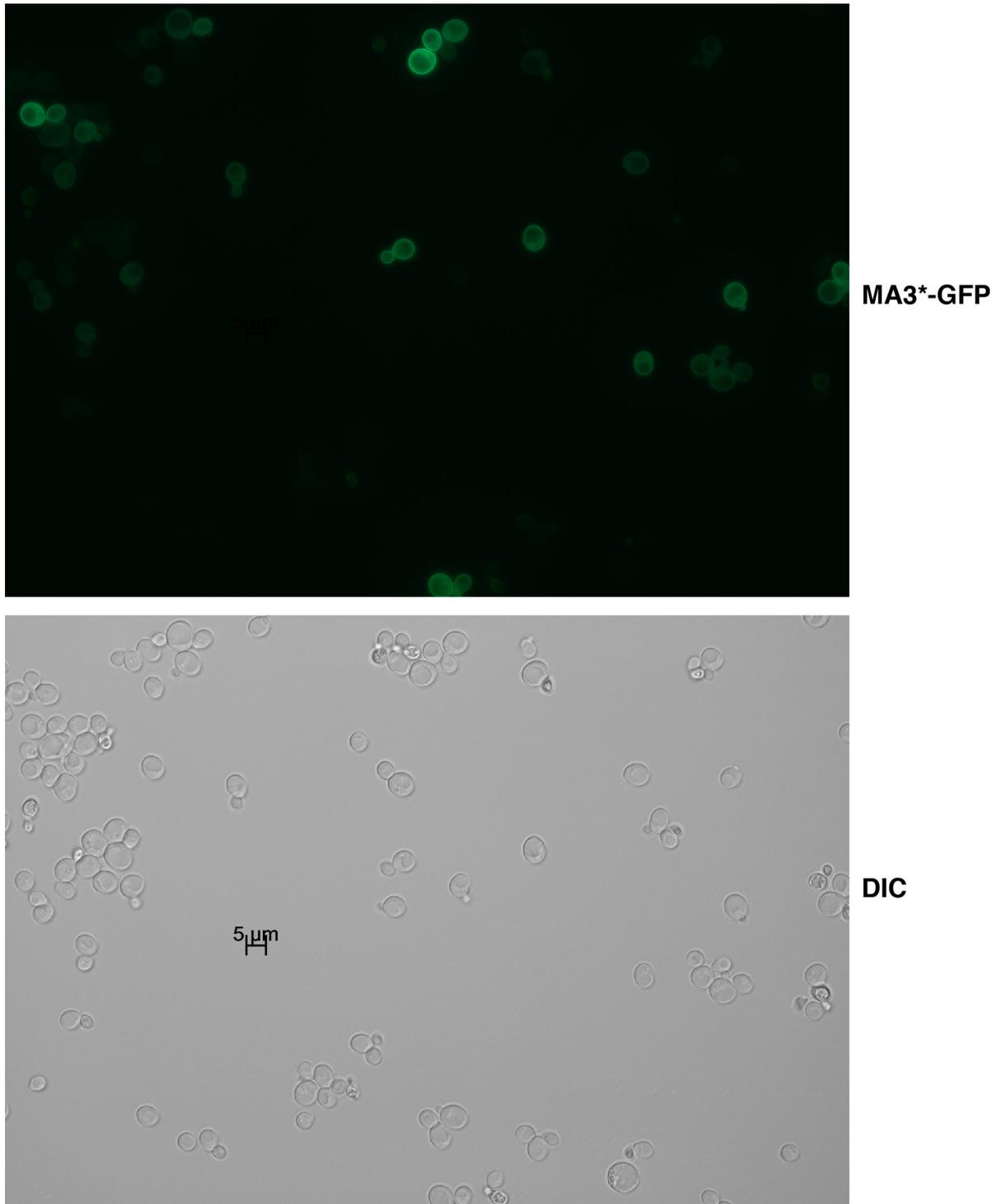


Abbildung E21. MA3*-GFP wurde von einem 2 μ -Vektor mit induziertem *MET3*-Promotor (pBM506) in Wildtyp-Hefezellen exprimiert und mit Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Zusätzlich zur zytosolischen Fluoreszenz zeigt MA3*-GFP eine gleichmäßige Färbung der Plasmamembran. DIC, differential interference contrast.

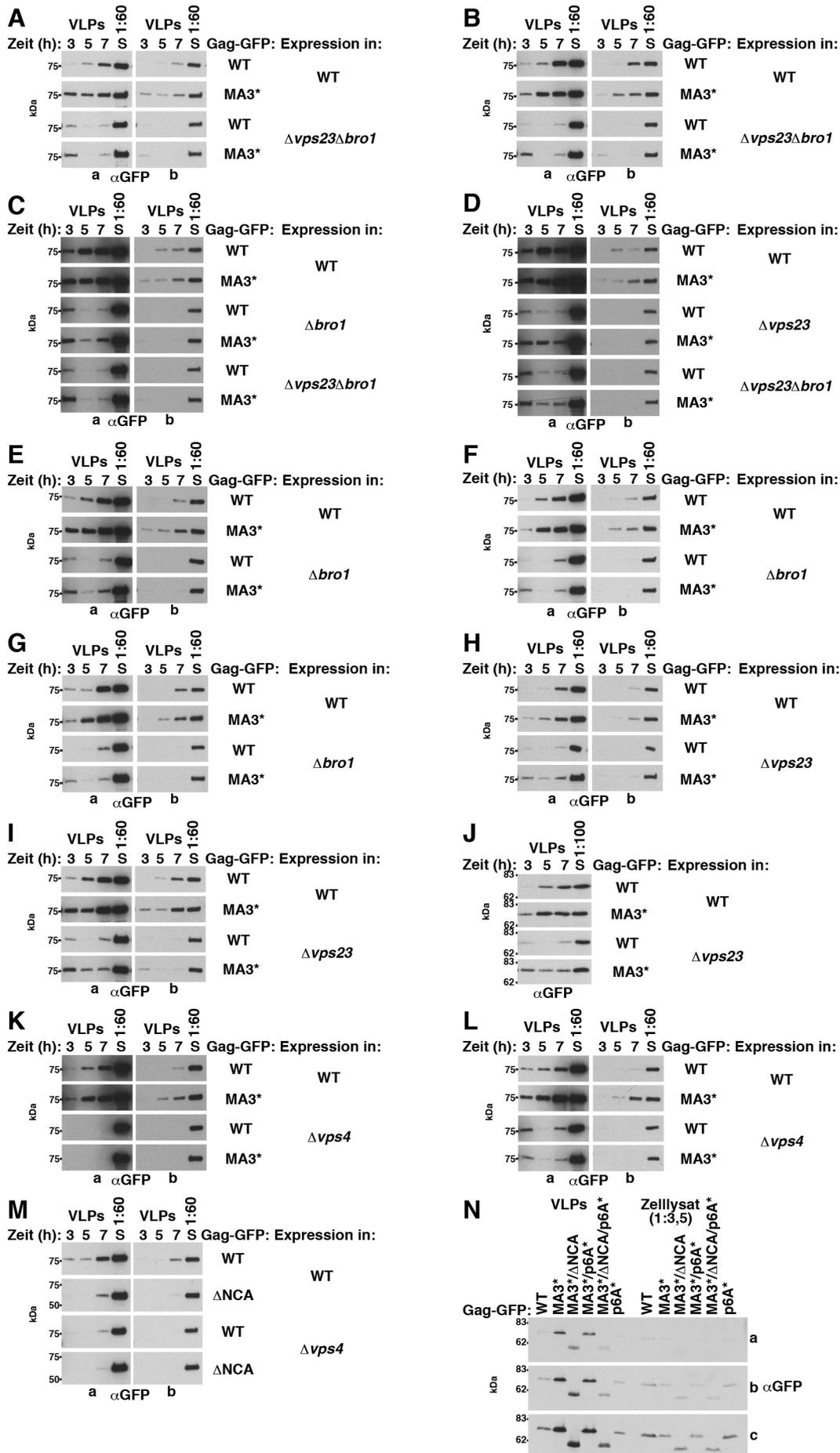


Abbildung E22. A-M, die Gag-GFP-Freisetzung aus Hefezellen wurde mit Anti-GFP-Immunoblots von Zentrifugationsedimenten des Inkubationsmediums (VLPs) analysiert. Gag-GFP-Versionen wurden von 2 μ -Vektoren mit *PGK*-Promotor (pBM267, pBM616, pBM782) in Wildtyp-Hefezellen oder den angegebenen Mutanten exprimiert. Lange (a) und kurze (b) Expositionen sind abgebildet. Die in einer Spalte gezeigten Kinetiken sind Ausschnitte aus demselben Autoradiografiefilm. S, Sphäroplastenlysat, das am Ende der Kinetik präpariert wurde. **A-D**, mit der *Avps23Abro1*-Mutante ist der MA3*-Effekt nach fünf und sieben Stunden Inkubation fast nicht detektierbar. **C** und **E-G**, die Gag(MA3*)-GFP-Freisetzung aus *Abro1*-Sphäroplasten war gegenüber Gag-GFP in zwei Experimenten erhöht (**C** und **E**) und in zwei anderen Experimenten war der MA3*-Effekt nach fünf und sieben Stunden Inkubation nicht nachweisbar (**F** und **G**). **D** und **H-J**, die Gag(MA3*)-GFP-Freisetzung aus *Avps23*-Sphäroplasten ist gegenüber Gag-GFP gesteigert. **K** und **L**, die Deletion von *VPS4* verhindert den MA3*-Effekt. **M**, die Gag(Δ NCA)-GFP-Freisetzung aus *Avps4*-Sphäroplasten ist gegenüber Gag-GFP leicht reduziert. **N**, die Gag-GFP-Freisetzung aus HEK293-Zellen wurde zwei Tage nach Transfektion mit Vektoren für die Expression der angegebenen Gagversionen vom CMV-Promotor (pBM199, pBM205, pBM662, pBM668, pBM670, pBM672) analysiert. VLPs wurden aus dem Kulturmedium geerntet und Zelllysate wurden präpariert. Die Gag-GFP-Versionen wurden im Anti-GFP-Immunoblot detektiert. Mehrere Expositionen (a-c) sind gezeigt. Die MA3*-Mutation steigert die Gag-GFP-Freisetzung. Eine Kombination aus Δ NCA und p6A* verhindert diese Steigerung, während eine isolierte p6A*-Mutation die Gag-GFP-Freisetzung nicht beeinträchtigt. **A-N**, WT, Wildtyp.

8. Diskussion

Das virale Protein Gag und die zellulären ESCRT-Proteine kooperieren bei der Freisetzung von HIV-1-Virionen an der Plasmamembran. Zwei „früh agierende“ ESCRT-Proteine, TSG101 und ALIX, binden an das carboxyterminale p6-Peptid von Gag (Garrus et al., 2001; Martin-Serrano et al., 2001; Strack et al., 2003; VerPlank et al., 2001). Bei Mutation der TSG101-Bindungsstelle ist die HIV-1-Freisetzung aus Zellen gängiger Kulturzelllinien stark beeinträchtigt, während die Mutation der ALIX-Bindungsstelle einen vergleichsweise geringen Einfluss auf die Freisetzungstärke hat (Fisher et al., 2007; Garrus et al., 2001 und siehe 5.3.). Welche Schritte auf die Rekrutierung der „früh agierenden“ ESCRT-Proteine folgen, ist wenig verstanden. Seit der Entdeckung der ESCRT-Proteine ist die Hefe *S. cerevisiae* ein geeigneter Modellorganismus für die Charakterisierung der ESCRT-Funktion. Ein Hefemodell könnte daher dazu beitragen, die Mechanismen des viralen Freisetzungsprozesses zu verstehen.

Die Freisetzung von HIV-1-Gag-VLPs aus Hefesphäroplasten war publiziert (Sakuragi et al., 2002). Die Freisetzung mit dem publizierten Assay wurde jedoch als ESCRT-unabhängig beschrieben (Norgan et al., 2012). In dieser Arbeit wurde ein anderes Protokoll entwickelt. Die Analyse mit ESCRT-Deletionsmutanten ergab eine ESCRT-abhängige Gag-GFP-Freisetzung aus Hefesphäroplasten. In Bindungsassays interagierte Gag darüber hinaus mit Bro1 und Vps23, den Hefehomologen von ALIX und TSG101. Im Freisetzungsassay dieser Arbeit wurde die Gag-GFP-Freisetzung sieben Stunden im Anschluss an die Sphäroplastenpräparation verfolgt. Norgan et al. beschrieben eine ESCRT-unabhängige Freisetzung nach zweistündiger Inkubation. Die kurze Inkubationszeit könnte erklären, warum die Autoren keine ESCRT-abhängige Freisetzung beobachteten. Im Freisetzungsassay dieser Arbeit war die Gag-GFP-Freisetzung zum ersten Zeitpunkt der Kinetik, nach drei Stunden, ähnlich wie bei Norgan et al., weitgehend ESCRT-unabhängig. Im Verlauf nahm die Gag-GFP-Freisetzung zu und war deutlich abhängig von ESCRT-Proteinen. Gag-GFP, das während der ersten Inkubationsperiode freigesetzt wurde, könnte hauptsächlich von VLPs stammen, die sich bereits unter der intakten Zellwand, vor der Sphäroplastenpräparation, assembliert hatten. Bendjennat und Saffarian zeigten mit kinetischen Experimenten zur HIV-1-Gag-VLP-Freisetzung aus humanen Zellen, dass die ESCRT-p6-Interaktion nicht notwendig für die Freisetzung ist, aber die Freisetzung beschleunigt (Bendjennat und Saffarian, 2016). Käme es in ESCRT-Deletionsmutanten der Hefe zu einer verzögerten Gag-GFP-Partikelbildung unterhalb der intakten Zellwand, ist denkbar, dass diese Verzögerung im Freisetzungsassay, also während der ersten Inkubationsperiode nach Entfernung der Zellwand, nicht mehr sichtbar ist. Sakuragi et al. analysierten in einem Experiment die Gagfreisetzung über einen längeren Zeitraum als zwei Stunden. In diesem Experiment nahm die Gagfreisetzung im Verlauf ab. Das unterscheidet sich von der mit der Zeit zunehmenden und dabei ESCRT-abhängigen Freisetzung in dieser Arbeit. Die Unterschiede zwischen dem Protokoll dieser Arbeit und den publizierten Experimenten sind vielfältig und betreffen den Vektor für die Gagexpression, den Wildtyp-Hefestamm, die Präparation und Inkubation der Sphäroplasten und die Ernte des freigesetzten Gags. Welche dieser Unterschiede das Ergebnis eventuell beeinflusst haben, wäre nur bei Austausch einzelner Komponenten im Experiment zu ermitteln. Hier können nur denkbare Möglichkeiten genannt werden. Die Expressionsstärke von Gag könnte in den verschiedenen Arbeiten unterschiedlich sein. Sakuragi et al. benutzten einen 2 μ -Vektor, Norgan et al. einen ARS/CEN-Vektor, mit jeweils eigenem und von dieser Arbeit abweichenden Promotor. In dieser Arbeit wurde im Unterschied zu den anderen eine kodonadaptierte gagkodierende Sequenz verwendet, die in humanen Zellen eine vom viralen Protein Rev unabhängige Expression ermöglicht (Schwartz et al., 1992). Norgan et al. verwendeten, wie in dieser Arbeit, carboxyterminal GFP-markiertes Gag. In der oben erwähnten Freisetzungskinetik von Sakuragi et al. wurde Gag ohne carboxyterminale Verlängerung eingesetzt. In humanen Zellen steigert die Größe der carboxyterminalen Verlänge-

rung die Abhängigkeit der VLP-Freisetzung vom ESCRT-bindenden p6-Peptid (Bendjennat und Saffarian, 2016). Eventuell gibt es hefestammspezifische Unterschiede, die zum Beispiel die gaginduzierte Deformation der Plasmamembran begünstigen könnten. In dieser Arbeit induzierte die Expression von Gag-GFP elektronenmikroskopisch detektierbare knospenförmige Ausstülpungen der Plasmamembran unterhalb der Zellwand. Gaginduzierte Ausstülpungen der Plasmamembran unterhalb der Zellwand wurden auch in einer anderen Arbeit beschrieben (Biemans et al., 1992). Sakuragi et al. beobachteten direkt nach der Entfernung der Zellwand elektronendichte Bereiche an der Plasmamembran, während Ausstülpungen erst in Aufnahmen sichtbar waren, die nach zweistündiger Inkubation der Sphäroplasten gemacht wurden. Eine Aufnahme von Zellen mit intakter Zellwand ist nicht gezeigt. Unterschiede bei der Sphäroplastenpräparation und -inkubation könnten sich durch Beeinflussung der Zellhomöostase ausgewirkt haben. Falls die zur Bestimmung der Zelldichte gemessene optische Dichte bei 600 nm in den verschiedenen Arbeiten miteinander vergleichbar ist, wurden die Hefesphäroplasten in dieser Arbeit in einer früheren Wachstumsphase präpariert, die Inkubationszeit mit DTT und die DTT-Konzentration waren in dieser Arbeit geringer, während und nach der Präparation wurden die Sphäroplasten in sorbitolhaltigem Minimalmedium inkubiert, im Vergleich zu sorbitolhaltigem Puffer während und sorbitolhaltigem Vollmedium nach der Präparation in den anderen Arbeiten. Nach jeder Ernte von freigesetztem Gag-GFP wurden die Sphäroplasten in der folgenden Inkubationsperiode in frischem Medium resuspendiert. Ein Austausch des Mediums ist für die Freisetzungskinetik bei Sakuragi et al. nicht beschrieben. Die Sphäroplastendichte im Inkubationsmedium ist in den publizierten Arbeiten nicht genannt und kann daher nicht verglichen werden. Zur Ernte des freigesetzten Gag-GFP wurden in dieser Arbeit Zelltrümmer durch Filtration mit 0,45 µm großen Poren aus dem Inkubationsmedium entfernt und Gag-GFP wurde anschließend durch Zentrifugation sedimentiert. Eine Verunreinigung durch zelluläre Proteine war im Immunoblot nicht detektierbar. In den publizierten Assays wurde das Inkubationsmedium nicht filtriert. Die Zentrifugation erfolgte durch ein Saccharosekissen.

Im Zentrifugationssediment, das bei der Ernte von freigesetztem Gag-GFP gewonnen wurde, waren fluoreszenzmikroskopisch punktförmige Strukturen detektierbar, die den von Gag-GFP an der Plasmamembran gebildeten Strukturen entsprachen (nicht abgebildet). Eine elektronenmikroskopische Charakterisierung der Partikel wurde nicht durchgeführt. Jedoch gab es neben der Bildung der von Gag-GFP induzierten Gag-GFP-haltigen knospenförmigen Ausstülpungen der Plasmamembran mehrere Hinweise darauf, dass Gag-GFP in Form von VLPs freigesetzt wurde. Voraussetzung für die Gag-GFP-Freisetzung war dessen Bindung an die Plasmamembran. Gag-GFP wurde in einer sedimentierbaren Form freigesetzt, die 0,45 µm große Poren passieren konnte. Die Freisetzung war spezifisch für Gag-GFP. Drei getestete zelluläre Proteine waren im Gag-GFP-Sediment nicht detektierbar. Außerdem war die Freisetzung von Gag(ΔNCA)-GFP, einer Mutante, deren Akkumulation an der Plasmamembran nicht beeinträchtigt war, gegenüber Gag-GFP reduziert. Dieses Ergebnis stützt die Annahme, dass die Gag-GFP-Freisetzung ein von Gag-GFP angetriebener Prozess ist und nicht einfach mit der Menge an membrangebundenem Gag-GFP korreliert.

Das Hefesystem wurde verwendet, um die Interaktion von Gag mit ESCRT-Proteinen zu analysieren und mit Gagmutanten den Zusammenhang zwischen reduzierter ESCRT-Bindung, Bindung an die Plasmamembran und Freisetzung zu charakterisieren. Dabei wurde eine bis dahin unbekannte Interaktion von ESCRT-Proteinen mit der aminoterminalen Proteinregion von Gag entdeckt. In Bindungsassays interagierten die ESCRT-Proteine Bro1 und Vps23 mit den Gagdomänen MA und NCA. Die Interaktion mit MA wurde für die humanen Homologen, ALIX und TSG101, bestätigt. Funktionelle Daten deuteten an, dass ALIX eventuell auch mit NCA interagiert (siehe unten). Gagproteine verschiedener anderer Retroviren tragen in ihrer aminoterminalen Hälfte ESCRT-Bindungsmotive, die den Bindungsmotiven im carboxyterminalen p6-Peptid von HIV-1-Gag entsprechen (Übersicht in Morita und Sundquist, 2004; Vot-

teler und Sundquist, 2013). Für das feline Immundefizienzvirus wurde darüber hinaus eine vom carboxy-terminalen Peptid unabhängige Interaktion zwischen ALIX und Gag vermutet, deren Determinante in Gag noch nicht beschrieben ist (Del Vecchio et al., 2020). Es ist also denkbar, dass es für den Freisetzungsprozess unwichtig ist, an welcher Position in Gag die Interaktion mit den ESCRT-Proteinen stattfindet. Alternativ könnte die Bindung von ESCRT-Proteinen an die aminoterminalen Proteinregion, die sich in der Nähe der Plasmamembran befindet, eine mechanistische Bedeutung haben.

Aminosäureaustausche in einem hydrophoben Bereich auf der Oberfläche des MA-„Kopfs“, bestehend aus Leu-31, Val-35 und Trp-36, reduzierten die Koimmunpräzipitation von Bro1 und Vps23 mit MA-GFP. Da die Bindungsassays mit Zellextrakt durchgeführt wurden, könnten andere zelluläre Faktoren an der Interaktion beteiligt sein. Mit Hilfe von Deletionsmutanten wurde die Möglichkeit ausgeschlossen, dass MA Bro1 oder Vps23 über das jeweils andere Protein rekrutiert. Der hydrophobe Bereich auf der MA-Oberfläche ist einem hydrophoben Bereich auf der Ubiquitinoberfläche ähnlich (Saad et al., 2006; Vijay-Kumar et al., 1987). Der hydrophobe Bereich auf der Ubiquitinoberfläche ist zentral an der Bindung zwischen Ubiquitin und den UBDs der „früh agierenden“ ESCRT-Proteine, wie Bro1, Vps23 und deren humanen Homologen, beteiligt (Pashkova et al., 2013; Sundquist et al., 2004; Teo et al., 2004). Diese Beobachtung könnte eine direkte Bindung beider ESCRT-Proteine an MA erklären. In dem Fall würde der hydrophobe Bereich auf der MA-Oberfläche eine Struktur von Ubiquitin nachahmen, um an ESCRT-Proteine zu binden. Eine Bindung von TSG101 und ALIX an die gleiche Stelle eines anderen Proteins, CEP55, ist beschrieben (Lee et al., 2008; Morita et al., 2007). An dieser Interaktion sind aber nicht die UBDs, sondern prolinreiche Regionen beider ESCRT-Proteine beteiligt. Aminosäureaustausche in dem hydrophoben Bereich auf der MA-Oberfläche, die die Gag-ESCRT-Interaktion reduzierten, steigerten die Bindung von Gag-GFP an die Plasmamembran. Diese Beobachtung passt zu der Tatsache, dass sich der hydrophobe Bereich auf der Seite von MA befindet, die der Plasmamembran zugewandt ist (Hill et al., 1996; Mercredi et al., 2016; Murphy et al., 2019; Shkriabai et al., 2006). Die Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass die ESCRT-MA-Interaktion transient ist und gelöst wird, wenn Gag an die Plasmamembran bindet. Es ist also auch denkbar, dass die identifizierten Aminosäuren nicht an der MA-ESCRT-Interaktion beteiligt sind, sondern dass die Mutationen direkt die Affinität von MA zur Plasmamembran erhöhen. Bei der Interaktion von MA mit der Plasmamembran könnten ESCRT-Proteine, die direkt oder indirekt an eine andere Stelle von MA binden, sterisch verdrängt werden. Ursachen für eine gesteigerte Affinität zur Plasmamembran könnten eine verstärkte Exposition der aminoterminalen Myristylkette oder eine verstärkte Interaktion von MA mit Lipiden oder Proteinen der Plasmamembran sein. Austausch von Leu-31 und Trp-36 erhöhten den plasmamembrangebundenen Anteil von Gag-GFP. Der MA-Röntgenstruktur zufolge sind Leu-31 und Trp-36 nicht Bestandteil der MA-MA-Kontakte im MA-Trimer (Hill et al., 1996). Daraus ergibt sich somit kein Hinweis auf eine verstärkte Trimerisierung der Mutanten mit konsekutiv gesteigerter Myristylkettenexposition (Tang et al., 2004). In zwei NMR-Studien, die die Myristylkettenexposition untersuchten, wurde kein Kontakt von Leu-31 oder Trp-36 zu der in MA verborgenen Myristylkette beschrieben (Fledderman et al., 2010; Tang et al., 2004). Eine veränderte Interaktion der Mutanten mit der Myristylkette kann davon also nicht abgeleitet werden. In räumlicher Nähe zum identifizierten hydrophoben Bereich auf der MA-Oberfläche befindet sich ein Cluster aus basischen Aminosäuren, das mit Phospholipiden interagiert (Mercredi et al., 2016; Murphy et al., 2019; Shkriabai et al., 2006). Da sowohl die L31R- als auch die L31E-Mutation die Bindung von Gag-GFP an die Plasmamembran verstärkten, ist eine erhöhte Affinität dieser Mutanten für negativ geladene Phospholipide wahrscheinlich nicht der Grund für die gesteigerte Plasmamembranbindung. Eine verstärkte Freisetzung von HIV-1 mit der Gag(W36A)-Mutation ist beschrieben (Paillart und Göttlinger, 1999). Ob Trp-36 mit einer aus der Membran ausgeklappten Lipidacylkette interagiert, wie in einer NMR-Studie vorgeschlagen wurde, ist umstritten (Mercredi et al., 2016; Saad et al., 2006). Darüber

hinaus ist unklar, wie die in dieser Arbeit verwendeten Trp-36-Austausche die Membranbindung von Gag-GFP durch einen Einfluss auf diesen potentiellen Effekt erhöhen könnten. Weitere Experimente mit zusätzlichen Techniken sind erforderlich, um die Frage zu klären, ob die MA-Mutanten direkt die Affinität von MA zur Plasmamembran steigern. Alternativ könnte die reduzierte Bindung von MA an ESCRT-Proteine oder einen die ESCRT-Proteine rekrutierenden Faktor die Affinität der MA-Mutanten zur Plasmamembran erhöhen. Die Bindung von Gag-GFP und MA-GFP an die Plasmamembran war in mehreren ESCRT-Deletionsmutanten gegenüber dem Wildtyp nicht gesteigert. Daher ist zu vermuten, dass die Bindung von Gag an die Plasmamembran durch die entsprechenden ESCRT-Proteine nicht blockiert wird. Nicht auszuschließen ist die Möglichkeit, dass ein der Membranbindung vorausgehender Schritt auf dem Weg von Gag zur Plasmamembran durch die Mutationen erleichtert wird.

Da das carboxyterminale p6-Peptid von Gag humane ESCRT-Proteine rekrutieren kann, stellt sich die Frage, warum eine transiente Interaktion zwischen MA und ESCRT-Proteinen für die Virusfreisetzung nützlich sein könnte. Aminosäureaustausche in MA, die die Bindung von Gag an ESCRT-Proteine reduzierten, steigerten die Gag-GFP-Freisetzung. Das steht im Gegensatz zur reduzierten Gag(Δ p6)-GFP-Freisetzung aus humanen HEK293-Zellen. Zwei Experimente deuteten darauf hin, dass der freisetzungsteigernde Effekt der MA-Mutationen an ESCRT-Proteine gekoppelt ist. Die Deletion von *VPS4* verhinderte die MA3*-induzierte Steigerung der Gag-GFP-Freisetzung aus Hefe. Eine Kombination aus Δ NCA und einer mutierten ALIX-Bindungsstelle in p6 (p6A*) hatte den gleichen Effekt auf die Gag(MA3*)-GFP-Freisetzung aus HEK293-Zellen. Die letztere Beobachtung war besonders bemerkenswert, weil Gag(p6A*)-GFP und Gag(Δ NCA)-GFP effizient freigesetzt wurden. Die Ergebnisse aus Hefe und humanen Zellen legen die Vermutung nahe, dass die ESCRT-MA-Interaktion die ESCRT-Proteine in einem inaktiven Zustand hält, bis die Interaktion bei Bindung von Gag an die Plasmamembran gelöst wird. Diese Vermutung zusammen mit den Ergebnissen der GST-Pull-down-Experimente könnte dazu beitragen, die Rolle der ALIX-Bindungsstelle in p6 zu verstehen. In GST-Pull-down-Experimenten war die Bindung an MA verglichen mit p6 für ALIX stärker als für TSG101. Wenn man annimmt, dass ESCRT-Proteine an p6 binden, während sie die HIV-1-Freisetzung vorantreiben, dann würde eine reduzierte Interaktion der ESCRT-Proteine mit mutiertem MA (MA3*) besonders die p6-abhängige ALIX-Funktion beeinflussen (Abb. 20). Da die Kombination aus Δ NCA und p6A* den MA3*-Effekt verhinderte, kann man spekulieren, dass ALIX auch über eine Bindung an NCA agiert. Allerdings fehlen entsprechende Hinweise aus Bindungsassays mit humanen ESCRT-Proteinen. Übereinstimmend mit diesen Annahmen beeinträchtigten p6A-Mutationen stark die Freisetzung von HIV-1 mit einem minimalen Gagkonstrukt, Gag(Δ 8-87/ Δ 126-277), dem der größte Teil des MA-„Kopfs“ und NCA fehlten (Strack et al., 2003). Die Überlegungen führen zu einem Modell, in dem ALIX mit mehreren Stellen von Gag interagieren kann und seine Aktivität durch die Gagassemblierung reguliert wird. Eine zusätzliche Bindung von ALIX an die NC-Domäne, die abhängig von RNA- oder Membranpräsenz ist, wurde beschrieben (Sette et al., 2016). Zur Hypothese der regulierten Aktivität passen Modelle, nach denen die ALIX-Funktion durch den Wechsel zwischen einer offenen und einer geschlossenen Konformation und durch Dimerisierung gesteuert werden kann (Pires et al., 2009; Zhai et al., 2011; Zhou et al., 2009). Zusätzlich ist für das Homologe aus Hefe, Bro1, und für dessen Bindungspartner Doa4 eine regulatorische Funktion bei der MVB-Vesikel-Bildung vorgeschlagen worden (Johnson et al., 2017; Wemmer et al., 2011).

Die Konformationsänderung während der Gagassemblierung, von einer kompakten Faltung zu einer ausgestreckten Struktur (Datta et al., 2007 und 2011), könnte zu einer dynamischen Veränderung der Gag-ESCRT-Interaktion beitragen. Die transiente MA-ESCRT-Interaktion könnte helfen, die ESCRT-III-Polymerisierung erst zu einem Zeitpunkt zu aktivieren, der zulässt, dass Gag ausreichend assembliert, um ein vollständiges Virion zu bilden. Dieses Modell passt zu den Ergebnissen von zeitaufgelösten fluoreszenzmikroskopischen Experimenten zur Freisetzung von HIV-1- und EIAV-Gag-VLPs (Bleck et al.,

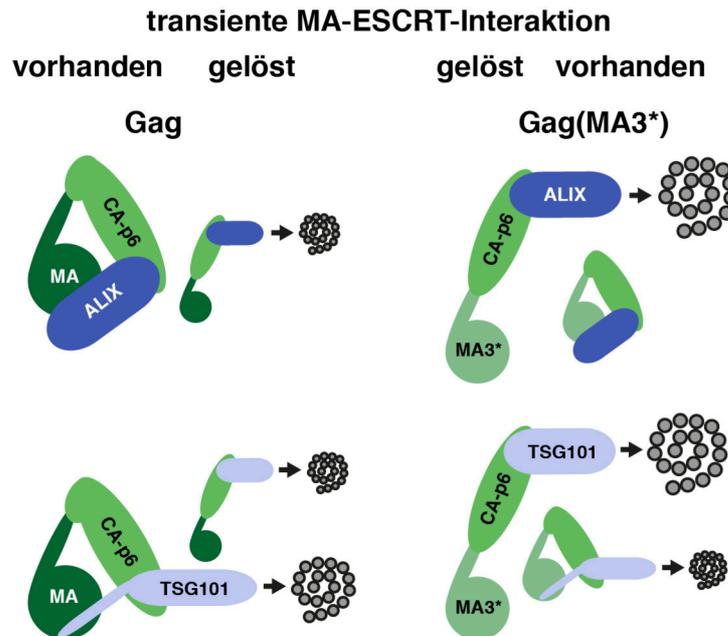


Abbildung 20. Erklärungsmodell für die Ergebnisse zur Gag-ALIX-Interaktion. Modell zur Erklärung der folgenden Beobachtungen: Die Mutation der TSG101-Bindungsstelle in p6 reduziert die Freisetzung von Gag-GFP aus HEK293-Zellen stark. Gag-GFP mit einer Mutation der ALIX-Bindungsstelle in p6 (p6A*) oder mit der Δ NCA-Mutation (Deletion der aminoterminalen Domäne von CA (NCA) und der sieben carboxyterminalen Aminosäuren des „MA-Stiels“) wird effizient freigesetzt. Die verstärkte Freisetzung von Gag(MA3*)-GFP wird durch eine Kombination aus Δ NCA und p6A* verhindert. Im GST-Pull-down ist die Bindung an MA im Vergleich zu p6 für ALIX stärker als für TSG101. MA3*- und die Δ NCA-Mutation reduzieren die Bindung von Bro1 und Vps23, den Hefehomologen von ALIX und TSG101, an Gag. MA3* steigert die Gag-GFP-Freisetzung aus Hefesphäroplasten, Δ NCA reduziert die Freisetzung. Modell: Eine transiente MA-ESCRT-Interaktion hält die ESCRT-Proteine in einem inaktiven Zustand. Bei Lösung der MA-ESCRT-Interaktion werden die ESCRT-Proteine aktiviert. Die ESCRT-Proteine binden an p6, während sie die VLP-Freisetzung ermöglichen. Da die Affinität für MA im Vergleich zur Affinität für p6 für TSG101 kleiner ist als für ALIX, wird ein kleinerer Anteil von TSG101 als von ALIX durch die Bindung an MA in einem inaktiven Zustand gehalten. Die MA3*-Mutation erhöht den Anteil an Gagmolekülen mit gelöster MA-ESCRT-Interaktion und steigert deshalb besonders die Aktivität von ALIX. Möglicherweise trägt NCA auch zur Bindung der aktiven ESCRT-Proteine bei. Die Größe des ESCRT-III-Polymers (graue Spirale) symbolisiert die Aktivität des ESCRT-Proteins.

2014; Jouvenet et al., 2011). Diese Experimente zeigen, dass die „spät agierenden“ ESCRT-III-Proteine und VPS4 rekrutiert werden, wenn die Gagassemblierung abgeschlossen ist, während die „früh agierenden“ ESCRT-Proteine ALIX und TSG101 zusammen mit Gag akkumulieren.

Eine Störung der ESCRT-vermittelten Virionfreisetzung führt zur Überpolymerisierung von Gag (siehe 5.3., Carlson et al., 2008). Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass die ESCRT-vermittelte Freisetzung in kinetischer Konkurrenz zur Polymerisierung von Gag steht und damit die Zusammensetzung der Virionen beeinflusst. Die Koordination von Gagassemblierung und ESCRT-Aktivierung hat demnach vermutlich eine Bedeutung für die Bildung infektiöser Virionen. Eine verfrühte Abschnürung könnte inkomplette Partikel produzieren. Zum Beispiel ist eine bestimmte Anzahl an Gagmolekülen für die Bildung des Kapsids erforderlich, MA inkorporiert die viralen Hüllproteine, und zelluläre Plasmamembranproteine, die das Virus vor der angeborenen Immunantwort schützen, werden in die virale Membran sortiert (Briggs et al., 2003; Saifuddin et al., 1997; Yu et al., 1992). Darüber hinaus kommt es bei verzögerter Abspaltung der Virionen durch eine gestörte Interaktion zwischen ESCRT-Proteinen und p6 zu Enzymverlust durch den offenen Vesikelhals (Bendjennat und Saffarian, 2016).

Im Gegensatz zur Gag-GFP-Freisetzung aus HEK293-Zellen war die Gag-GFP-Freisetzung aus Hefe unabhängig von p6. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen war nur eine schwache Bindung von Bro1 an p6 zu beobachten und keine Vps23-p6-Interaktion. Bro1 interagiert über eine dem ALIX-Bindungsmotiv in p6 ähnliche Sequenz mit zellulären Proteinen. Eine der Interaktionen involviert analog zur Bindung von ALIX an p6 die V-Domäne von Bro1 (Kimura et al., 2014). Eine andere Interaktion ist vom carboxyterminalen Bro1 abhängig (Richter et al., 2007). Daher besteht die Möglichkeit, dass Bro1 über eine andere Proteinregion mit dem ALIX-Bindungsmotiv in p6 interagiert als ALIX. Im Gegensatz

zu HEK293-Zellen reduzierte die Δ NCA-Mutation die Gag-GFP-Freisetzung aus Hefe. Daher ist denkbar, dass die NCA-ESCRT-Interaktion in Hefe die p6-Funktion übernimmt. Da ESCRT-Proteine der Hefe mit CA-GFP koimmunpräzipitierten, aber nicht mit in *E. coli* exprimiertem GST-CA interagierten, könnte eine posttranslationale Modifikation, wie eine Ubiquitinierung, notwendig für die Bindung sein. Ubiquitinmodifikationen sind bei Expression in humanen Zellen über das gesamte Gagmolekül verteilt und haben eine Bedeutung für die HIV-1-Freisetzung (Gottwein und Kräusslich, 2005; Gottwein et al., 2006; Sette et al., 2013). Die Δ NCA-Mutation könnte die Gag-GFP-Freisetzung aber auch über einen anderen möglichen Effekt reduzieren. Einer Computersimulation zufolge trägt NCA zur Partikelkrümmung bei und bestimmte Punktmutationen in NCA beeinträchtigen die Membrandeformation und die Virusfreisetzung (Hogue et al., 2011; Pak et al., 2017; von Schwedler et al., 2003a). Allerdings könnte mutiertes NCA die Gagassemblierung beeinflussen, obwohl dessen Abwesenheit die Assemblierung nicht stört. Die carboxyterminale Domäne von CA kann *in vitro* unabhängig von NCA ein Gitter assemblieren, das dem des unreifen Virions entspricht, und HIV-1 mit der Δ NCA-Mutation wird effizient aus HeLa-Zellen freigesetzt (Bharat et al., 2014; Borsetti et al., 1998), analog zu Gag(Δ NCA)-GFP aus HEK293-Zellen in dieser Arbeit. Die prozessierten HIV-1(Δ NCA)-Virionen hatten einen heterogeneren Durchmesser als Wildtyp-Virionen (Borsetti et al., 1998). Die Größenheterogenität könnte auf eine gestörte Gagassemblierung zurückzuführen sein, aber auch Ausdruck einer gestörten Kontrolle der ESCRT-Funktion im Freisetzungsprozess. So hatte ein erhöhter Anteil von Virionen mit mutierter ALIX-Bindungsstelle in p6, die aus HeLa-Zellen freigesetzt wurden, eine abnorme Morphologie (Fujii et al., 2009). Die fluoreszenzmikroskopischen Experimente in dieser Arbeit ergaben keine Hinweise auf eine gestörte Gag(Δ NCA)-GFP-Assemblierung in Hefe. Die punktförmigen Strukturen an der Plasmamembran waren vergleichbar zu Gag-GFP. Ob eine Veränderung der Strukturen bei einem potentiellen Krümmungsdefekt mit dieser Technik detektierbar wäre, ist aber unklar. Eine elektronenmikroskopische Analyse der Gag(Δ NCA)-GFP exprimierenden Zellen wurden nicht durchgeführt. Ein solches Experiment wäre vermutlich nur bei einem sehr ausgeprägten Krümmungsdefekt wegweisend, weil die verschiedenen Schnittebenen ohnehin eine gewisse Heterogenität verursachen.

Die Beobachtung, dass die Deletion der ESCRT-0-Untereinheit Vps27 die Gag-GFP-Freisetzung reduziert, war unerwartet, weil Vps27 an Phosphatidylinositol-3-Phosphat in der endosomalen Membran bindet (Katzmann et al., 2003; Misra und Hurley, 1999). Somit ergibt sich die Frage, ob Gag den ESCRT-0-Komplex in Konkurrenz zur endosomalen Membran an die Plasmamembran rekrutieren kann. ESCRT-0 enthält mehrere UBDs (Bilodeau et al., 2002; Mizuno et al., 2003; Shih et al., 2002), die mit potentiellen Ubiquitinmodifikationen von Gag oder mit dem identifizierten hydrophoben Bereich auf der MA-Oberfläche interagieren könnten. Ergebnisse aus humanen Zellen, die zeigen, dass das Vps27-Homologe HRS zusammen mit dem viralen Protein Vpu die antivirale Aktivität des zellulären Proteins Tetherin unterdrückt (Janvier et al., 2011), könnten so interpretiert werden, dass HRS zusätzlich eine davon unabhängige Funktion bei der HIV-1-Freisetzung hat.

Mit dem in dieser Arbeit etablierten Hefesystem wurde eine vorher unbekannte Gag-ESCRT-Interaktion in der aminoterminalen Proteinregion von Gag entdeckt. Diese vermutlich zum Teil transiente Interaktion wurde gefunden, weil die ESCRT-p6-Interaktion im Hefesystem weniger prominent ist als in humanen Zellen. In diesem Fall war es also nützlich, dass das Hefemodell nicht komplett mit dem humanen System übereinstimmt. Experimente mit zusätzlichen Methoden sind erforderlich, um die molekularen Determinanten dieser Gag-ESCRT-Interaktion zu charakterisieren. Darauf basierend können dann gezielt Gagmutanten hergestellt werden, die helfen, die Funktion der neu entdeckten Interaktion im viralen Freisetzungsprozess besser zu verstehen und den Mechanismus der ESCRT-abhängigen Gagfreisetzung aus Hefe zu untersuchen, auch um damit mögliche indirekte Effekte der ESCRT-Deletionsmutanten auszuschließen. Das Hefemodell könnte dann ein ergänzendes Werkzeug bei der Charakterisierung des ba-

salen Freisetzungsmechanismus sein. Der Vergleich von Unterschieden und Gemeinsamkeiten mit dem Prozess in humanen Zellen könnte dazu beitragen, die genaue Bedeutung individueller Interaktionen und Schritte bei der Virusfreisetzung zu verstehen. Der Vergleich von Interaktionen der ESCRT-Proteine aus der Hefe und humanen Zellen mit dem gleichen Substrat, Gag, könnte zusätzlich helfen, mehr über den Mechanismus des ESCRT-Apparats an sich zu lernen.

9. Literaturverzeichnis

- Adell, M.A.Y., G.F. Vogel, M. Pakdel, M. Müller, H. Lindner, M.W. Hess, and D. Teis. 2014. Coordinated binding of Vps4 to ESCRT-III drives membrane neck constriction during MVB vesicle formation. *J Cell Biol.* 205:33-49.
- Alam, S.L., C. Langelier, F.G. Whitby, S. Koirala, H. Robinson, C.P. Hill, and W.I. Sundquist. 2006. Structural basis for ubiquitin recognition by the human ESCRT-II EAP45 GLUE domain. *Nat Struct Mol Biol.* 13:1029-1030.
- Alam, S.L., J. Sun, M. Payne, B.D. Welch, B.K. Blake, D.R. Davis, H.H. Meyer, S.D. Emr, and W.I. Sundquist. 2004. Ubiquitin interactions of NZF zinc fingers. *EMBO J.* 23:1411-1421.
- Babst, M., D.J. Katzmann, E.J. Estepa-Sabal, T. Meerloo, and S.D. Emr. 2002a. ESCRT-III: An Endosome-Associated Heterooligomeric Protein Complex Required for MVB Sorting. *Dev Cell.* 3:271-282.
- Babst, M., D.J. Katzmann, W.B. Snyder, B. Wendland, and S.D. Emr. 2002b. Endosome-Associated Complex, ESCRT-II, Recruits Transport Machinery for Protein Sorting at the Multivesicular Body. *Dev Cell.* 3:283-289.
- Babst, M., B. Wendland, E.J. Estepa, and S.D. Emr. 1998. The Vps4p AAA ATPase regulates membrane association of a Vps protein complex required for normal endosome function. *EMBO J.* 17:2982-2993.
- Bache, K.G., A. Brech, A. Mehlum, and H. Stenmark. 2003. Hrs regulates multivesicular body formation via ESCRT recruitment to endosomes. *J Cell Biol.* 162:435-442.
- Banjade, S., S. Tang, Y.H. Shah, and S.D. Emr. 2019. Electrostatic lateral interactions drive ESCRT-III heteropolymer assembly. *Elife.* 8:e46207.
- Bankaitis, V.A., L.M. Johnson, and S.D. Emr. 1986. Isolation of yeast mutants defective in protein targeting to the vacuole. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83:9075-9079.
- Bathurst, I.C., N. Chester, H.L. Gibson, A.F. Dennis, K.S. Steimer, and P.J. Barr. 1989. N Myristylation of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 gag Polyprotein Precursor in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Virol.* 63:3176-3179.
- Baumgärtel, V., S. Ivanchenko, A. Dupont, M. Sergeev, P.W. Wiseman, H.-G. Kräusslich, C. Bräuchle, B. Müller, and D.C. Lamb. 2011. Live-cell visualization of dynamics of HIV budding site interactions with an ESCRT component. *Nat Cell Biol.* 13:469-474.
- Bendjennat, M. and S. Saffarian. 2016. The Race against Protease Activation Defines the Role of ESCRTs in HIV Budding. *PLoS Pathog.* 12:e1005657.
- Bharat, T.A.M., L.R. Castillo Menendez, W.J.H. Hagen, V. Lux, S. Igonet, M. Schorb, F.K.M. Schur, H.-G. Kräusslich, and J.A.G. Briggs. 2014. Cryo-electron microscopy of tubular arrays of HIV-1 Gag resolves structures essential for immature virus assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 111:8233-8238.
- Biemans, R., D. Thines, D. Gheysen, T. Rutgers, and T. Cabezón. 1992. Subcellular localization of recombinant truncated Gag precursor proteins of HIV expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *AIDS.* 6:541-546.
- Bilodeau, P.S., J.L. Urbanowski, S.C. Winistorfer, and R.C. Piper. 2002. The Vps27p Hse1p complex binds ubiquitin and mediates endosomal protein sorting. *Nat Cell Biol.* 4:534-539.
- Bilodeau, P.S., S.C. Winistorfer, W.R. Kearney, A.D. Robertson, and R.C. Piper. 2003. Vps27-Hse1 and ESCRT-I complexes cooperate to increase efficiency of sorting ubiquitinated proteins at the endosome. *J Cell Biol.* 163:237-243.
- Bleck, M., M.S. Itano, D.S. Johnson, V.K. Thomas, A.J. North, P.D. Bieniasz, and S.M. Simon. 2014. Temporal and spatial organization of ESCRT protein recruitment during HIV-1 budding. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 111:12211-12216.
- Borsetti, A., A. Öhagen, and H.G. Göttlinger. 1998. The C-terminal Half of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gag Precursor Is Sufficient for Efficient Particle Assembly. *J Virol.* 72:9313-9317.
- Boutin, J.A.. 1997. Myristoylation. *Cell Signal.* 9:15-35.
- Bradshaw, R.A., W.W. Brickley, and K.W. Walker. 1998. N-Terminal processing: the methionine aminopeptidase and N-acetyl transferase families. *Trends Biochem Sci.* 23:263-267.
- Briggs, J.A. and H.-G. Kräusslich. 2011. The Molecular Architecture of HIV. *J Mol Biol.* 410:491-500.
- Briggs, J.A.G., J.D. Riches, B. Glass, V. Bartonova, G. Zanetti, and H.-G. Kräusslich. 2009. Structure and assembly of immature HIV. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:11090-11095.
- Briggs, J.A.G., T. Wilk, R. Welker, H.-G. Kräusslich, and S.D. Fuller. 2003. Structural organization of authentic, mature HIV-1 virions and cores. *EMBO J.* 22:1707-1715.
- Brunelli, J.P. and M.L. Pall. 1993. A Series of Yeast Shuttle Vectors for Expression of cDNAs and Other DNA Sequences. *Yeast.* 9:1299-1308.
- Bryant, M. and L. Ratner. 1990. Myristoylation-dependent replication and assembly of human immunodeficiency virus 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87:523-527.
- Carlson, L.-A., J.A.G. Briggs, B. Glass, J.D. Riches, M.N. Simon, M.C. Johnson, B. Müller, K. Grünwald, and H.-G. Kräusslich. 2008. Three-Dimensional Analysis of Budding Sites and Released Virus Suggests a Revised Model for HIV-1 Morphogenesis. *Cell Host Microbe.* 4:592-599.
- Carlson, L.-A. and J.H. Hurley. 2012. In vitro reconstitution of the ordered assembly of the endosomal sorting complex required for transport at membrane-bound HIV-1 Gag clusters. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109:16928-16933.
- Cashikar, A.G., S. Shim, R. Roth, M.R. Maldazys, J.E. Heuser, and P.I. Hanson. 2014. Structure of cellular ESCRT-III spirals and their relationship to HIV budding. *Elife.* 3:e02184.
- Chalfie, M., Y. Tu, G. Euskirchen, W.W. Ward, and D.C. Prasher. 1994. Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression. *Science.* 263:802-805.
- Chen, B.. 2019. Molecular Mechanism of HIV-1 Entry. *Trends Microbiol.* 27:878-891.
- Cherest, H., N.N. Thao, and Y. Surdin-Kerjan. 1985. Transcriptional regulation of the *MET3* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene.* 34:269-281.
- Chiaruttini, N., L. Redondo-Morata, A. Colom, F. Humbert, M. Lenz, S. Scheuring, and A. Roux. 2015. Relaxation of Loaded ESCRT-III Spiral Springs Drives Membrane Deformation. *Cell.* 163:866-879.
- Christianson, T.W., R.S. Sikorski, M. Dante, J.H. Shero, and P. Hieter. 1992. Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. *Gene.* 110:119-122.

- Chu, T., J. Sun, S. Saksena, and S.D. Emr. 2006. New component of ESCRT-I regulates endosomal sorting complex assembly. *J Cell Biol.* 175:815-823.
- Chukkapalli, V., I.B. Hogue, V. Boyko, W.-S. Hu, and A. Ono. 2008. Interaction between the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gag Matrix Domain and Phosphatidylinositol-(4,5)-Bisphosphate Is Essential for Efficient Gag Membrane Binding. *J Virol.* 82:2405-2417.
- Cimarelli, A., S. Sandin, S. Höglund, and J. Luban. 2000. Basic Residues in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Nucleocapsid Promote Virion Assembly via Interaction with RNA. *J Virol.* 74:3046-3057.
- Clarke, L. and J. Carbon. 1980. Isolation of a yeast centromere and construction of functional small circular chromosomes. *Nature.* 287:504-509.
- Datta, S.A.K., J.E. Curtis, W. Ratcliff, P.K. Clark, R.M. Crist, J. Lebowitz, S. Krueger, and A. Rein. 2007. Conformation of the HIV-1 Gag Protein in Solution. *J Mol Biol.* 365:812-824.
- Datta, S.A.K., F. Heinrich, S. Raghunandan, S. Krueger, J.E. Curtis, A. Rein, and H. Nanda. 2011. HIV-1 Gag Extension: Conformational Changes Require Simultaneous Interaction with Membrane and Nucleic Acid. *J Mol Biol.* 406:205-214.
- Delgado, M.L., J.E. O'Connor, I. Azorin, J. Renau-Piqueras, M.L. Gil, and D. Gozalbo. 2001. The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase polypeptides encoded by the *Saccharomyces cerevisiae* THD1, THD2 and THD3 genes are also cell wall proteins. *Microbiology.* 147:411-417.
- Del Vecchio, C., M. Celestino, M. Celegato, G. Palù, C. Parolin, F. Bouamr, and A. Calistri. 2020. Alix-Mediated Rescue of Feline Immunodeficiency Virus Budding Differs from That Observed with Human Immunodeficiency Virus. *J Virol.* 94:e02019-19.
- Demirov, D.G., J.M. Orenstein, and E.O. Freed. 2002. The Late Domain of Human Immunodeficiency Virus Type 1 p6 Promotes Virus Release in a Cell Type-Dependent Manner. *J Virol.* 76:105-117.
- Dores, M.R., B. Chen, H. Lin, U.J. Soh, M.M. Paing, W.A. Montagne, T. Meerloo, and J. Trejo. 2012. ALIX binds a YPX₃L motif of the GPCR PAR1 and mediates ubiquitin-independent ESCRT-III/MVB sorting. *J Cell Biol.* 197:407-419.
- Dores, M.R., N.J. Grimsey, F. Mendez, and J. Trejo. 2016. ALIX Regulates the Ubiquitin-Independent Lysosomal Sorting of the P2Y1 Purinergic Receptor via a YPX₃L Motif. *PLoS One.* 11:e0157587.
- Dowlatshahi, D.P., V. Sandrin, S. Vivona, T.A. Shaler, S.E. Kaiser, F. Melandri, W.I. Sundquist, and R.R. Kopito. 2012. ALIX is a Lys63-Specific Polyubiquitin Binding Protein that Functions in Retrovirus Budding. *Dev Cell.* 23:1247-1254.
- Dupré, S. and R. Haguenaer-Tsapis. 2001. Deubiquitination Step in the Endocytic Pathway of Yeast Plasma Membrane Proteins: Crucial Role of Doa4p Ubiquitin Isopeptidase. *Mol Cell Biol.* 21:4482-4494.
- Dussupt, V., M.P. Javid, G. Abou-Jaoudé, J.A. Jadwin, J. de La Cruz, K. Nagashima, and F. Bouamr. 2009. The Nucleocapsid Region of HIV-1 Gag Cooperates with the PTAP and LYPX_nL Late Domains to Recruit the Cellular Machinery Necessary for Viral Budding. *PLoS Pathog.* 5:e1000339.
- Dussupt, V., P. Sette, N.F. Bello, M.P. Javid, K. Nagashima, and F. Bouamr. 2011. Basic Residues in the Nucleocapsid Domain of Gag Are Critical for Late Events of HIV-1 Budding. *J Virol.* 85:2304-2315.
- Fabrikant, G., S. Lata, J.D. Riches, J.A.G. Briggs, W. Weissenhorn, and M.M. Kozlov. 2009. Computational Model of Membrane Fission Catalyzed by ESCRT-III. *PLoS Comput Biol.* 5:e1000575.
- Faini, M., R. Beck, F.T. Wieland, and J.A. Briggs. 2013. Vesicle coats: structure, function, and general principles of assembly. *Trends Cell Biol.* 23:279-288.
- Finley, D., E. Özkaynak, and A. Varshavsky. 1987. The Yeast Polyubiquitin Gene Is Essential for Resistance to High Temperatures, Starvation, and Other Stresses. *Cell.* 48:1035-1046.
- Fisher, R.D., H.-Y. Chung, Q. Zhai, H. Robinson, W.I. Sundquist, and C.P. Hill. 2007. Structural and Biochemical Studies of ALIX/AIP1 and Its Role in Retrovirus Budding. *Cell.* 128:841-852.
- Fisher, R.D., B. Wang, S.L. Alam, D.S. Higginson, H. Robinson, W.I. Sundquist, and C.P. Hill. 2003. Structure and Ubiquitin Binding of the Ubiquitin-interacting Motif. *J Biol Chem.* 278:28976-28984.
- Fledderman, E.L., K. Fujii, R.H. Ghanam, K. Waki, P.E. Prevelige, E.O. Freed, and J.S. Saad. 2010. Myristate Exposure in the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Matrix Protein Is Modulated by pH. *Biochemistry.* 49:9551-9562.
- Flower, T.G., Y. Takahashi, A. Hudait, K. Rose, N. Tjahjono, A.J. Pak, A.L. Yokom, X. Liang, H.-G. Wang, F. Bouamr, G.A. Voth, and J.H. Hurley. 2020. A helical assembly of human ESCRT-I scaffolds reverse-topology membrane scission. *Nat Struct Mol Biol.* 27:570-580.
- Freed, E.O.. 2015. HIV-1 assembly, release and maturation. *Nat Rev Microbiol.* 13:484-496.
- Fujii, K., U.M. Munshi, S.D. Ablan, D.G. Demirov, F. Soheilian, K. Nagashima, A.G. Stephen, R.J. Fisher, and E.O. Freed. 2009. Functional role of Alix in HIV-1 replication. *Virology.* 391:284-292.
- Garrus, J.E., U.K. von Schwedler, O.W. Pornillos, S.G. Morham, K.H. Zavitz, H.E. Wang, D.A. Wettstein, K.M. Stray, M. Côté, R.L. Rich, D.G. Myszka, and W.I. Sundquist. 2001. Tsg101 and the Vacuolar Protein Sorting Pathway Are Essential for HIV-1 Budding. *Cell.* 107:55-65.
- Gheysen, D., E. Jacobs, F. de Foresta, C. Thiriart, M. Francotte, D. Thines, and M. De Wilde. 1989. Assembly and Release of HIV-1 Precursor Pr55^{gag} Virus-like Particles from Recombinant Baculovirus-Infected Insect Cells. *Cell.* 59:103-112.
- Gill, D.J., H. Teo, J. Sun, O. Perisic, D.B. Veprintsev, S.D. Emr, and R.L. Williams. 2007. Structural insight into the ESCRT-I/II link and its role in MVB trafficking. *EMBO J.* 26:600-612.
- Gnügge, R. and F. Rudolf. 2017. *Saccharomyces cerevisiae* Shuttle vectors. *Yeast.* 34:205-221.
- Göttlinger, H.G., T. Dorfman, J.G. Sodroski, and W.A. Haseltine. 1991. Effect of mutations affecting the p6 gag protein on human immunodeficiency virus particle release. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88:3195-3199.
- Göttlinger, H.G., J.G. Sodroski, and W.A. Haseltine. 1989. Role of capsid precursor processing and myristoylation in morphogenesis and infectivity of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86:5781-5785.
- Goila-Gaur, R., D.G. Demirov, J.M. Orenstein, A. Ono, and E.O. Freed. 2003. Defects in Human Immunodeficiency Virus Budding and Endosomal Sorting Induced by TSG101 Overexpression. *J Virol.* 77:6507-6519.
- Gottwein, E., S. Jäger, A. Habermann, and H.-G. Kräusslich. 2006. Cumulative Mutations of Ubiquitin Acceptor Sites in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gag Cause a Late Budding Defect. *J Virol.* 80:6267-6275.
- Gottwein, E. and H.-G. Kräusslich. 2005. Analysis of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gag Ubiquitination. *J Virol.* 79:9134-9144.

- Hanson, P.I., R. Roth, Y. Lin, and J.E. Heuser. 2008. Plasma membrane deformation by circular arrays of ESCRT-III protein filaments. *J Cell Biol.* 180:389-402.
- Harding, T.M., K.A. Morano, S.V. Scott, and D.J. Klionsky. 1995. Isolation and Characterization of Yeast Mutants in the Cytoplasm to Vacuole Protein Targeting Pathway. *J Cell Biol.* 131:591-602.
- Hendrix, J., V. Baumgärtel, W. Schimpf, S. Ivanchenko, M.A. Digman, E. Gratton, H.-G. Kräusslich, B. Müller, and D.C. Lamb. 2015. Live-cell observation of cytosolic HIV-1 assembly onset reveals RNA-interacting Gag oligomers. *J Cell Biol.* 210:629-646.
- Henne, W.M., N.J. Buchkovich, Y. Zhao, and S.D. Emr. 2012. The Endosomal Sorting Complex ESCRT-II Mediates the Assembly and Architecture of ESCRT-III Helices. *Cell.* 151:356-371.
- Hermida-Matsumoto, L. and M.D. Resh. 2000. Localization of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gag and Env at the Plasma Membrane by Confocal Imaging. *J Virol.* 74: 8670-8679.
- Hierro, A., J. Sun, A.S. Rusnak, J. Kim, G. Prag, S.D. Emr, and J.H. Hurley. 2004. Structure of the ESCRT-II endosomal trafficking complex. *Nature.* 431:221-225.
- Hill, C.P., D. Worthylake, D.P. Bancroft, A.M. Christensen, and W.I. Sundquist. 1996. Crystal structures of the trimeric human immunodeficiency virus type 1 matrix protein: Implications for membrane association and assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:3099-3104.
- Hirano, S., N. Suzuki, T. Slagsvold, M. Kawasaki, D. Trambaiolo, R. Kato, H. Stenmark, and S. Wakatsuki. 2006. Structural basis of ubiquitin recognition by mammalian Eap45 GLUE domain. *Nat Struct Mol Biol.* 13:1031-1032.
- Hoffman, H.K., M.V. Fernandez, N.S. Groves, E.O. Freed, and S.B. van Engelenburg. 2019. Genomic tagging of endogenous human ESCRT-I complex preserves ESCRT-mediated membrane-remodeling functions. *J Biol Chem.* 294:16266-16281.
- Hogue, I.B., J.R. Grover, F. Soheilian, K. Nagashima, and A. Ono. 2011. Gag Induces the Coalescence of Clustered Lipid Rafts and Tetraspanin-Enriched Microdomains at HIV-1 Assembly Sites on the Plasma Membrane. *J Virol.* 85:9749-9766.
- Huang, M., J.M. Orenstein, M.A. Martin, and E.O. Freed. 1995. p6^{Gag} Is Required for Particle Production from Full-Length Human Immunodeficiency Virus Type 1 Molecular Clones Expressing Protease. *J Virol.* 69:6810-6818.
- Hughes, S.H.. 2015. Reverse Transcription of Retroviruses and LTR Retrotransposons. *Microbiol Spectr.* 3:MDNA3-0027-2014.
- Humphrey, W., Dalke, A., and Schulten, K. 1996. VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph.* 14:33-38.
- Hurley, J.H. and A.K. Cada. 2018. Inside job: how the ESCRTs release HIV-1 from infected cells. *Biochem Soc Trans.* 46:1029-1036.
- Im, Y.J. and J.H. Hurley. 2008. Integrated Structural Model and Membrane Targeting Mechanism of the Human ESCRT-II Complex. *Dev Cell.* 14:902-913.
- Im, Y.J., T. Wollert, E. Boura, and J.H. Hurley. 2009. Structure and Function of the ESCRT-II-III Interface in Multivesicular Body Biogenesis. *Dev Cell.* 17:234-243.
- Ivanchenko, S., W.J. Godínez, M. Lampe, H.-G. Kräusslich, R. Eils, K. Rohr, C. Bräuchle, B. Müller, and D.C. Lamb. 2009. Dynamics of HIV-1 Assembly and Release. *PLoS Pathog.* 5:e1000652.
- Jackson, D.D. and T.H. Stevens. 1997. *VMA12* Encodes a Yeast Endoplasmic Reticulum Protein Required for Vacuolar H⁺-ATPase Assembly. *J Biol Chem.* 272:25928-25934.
- Jacobs, E., D. Gheysen, D. Thines, M. Francotte, and M. deWilde. 1989. The HIV-1 Gag precursor Pr55^{Gag} synthesized in yeast is myristoylated and targeted to the plasma membrane. *Gene.* 79:71-81.
- Janvier, K., A. Pelchen-Matthews, J.-B. Renaud, M. Caillet, M. Marsh, and C. Berlioz-Torrent. 2011. The ESCRT-0 Component HRS is Required for HIV-1 Vpu-Mediated BST-2/Tetherin Down-regulation. *PLoS Pathog.* 7:e1001265.
- Johnson, D.S., M. Bleck, and S.M. Simon. 2018. Timing of ESCRT-III protein recruitment and membrane scission during HIV-1 assembly. *Elife.* 7:e36221.
- Johnson, N., M. West, and G. Odorizzi. 2017. Regulation of yeast ESCRT-III membrane scission activity by the Doa4 ubiquitin hydrolase. *Mol Biol Cell.* 28:661-672.
- Jouvenet, N., M. Zhadina, P.D. Bieniasz, and S.M. Simon. 2011. Dynamics of ESCRT protein recruitment during retroviral assembly. *Nat Cell Biol.* 13:394-401.
- Kärgel, E., R. Menzel, H. Honeck, F. Vogel, A. Böhmer, and W.-H. Schunck. 1996. *Candida maltosa* NADPH-cytochrome P450 Reductase: Cloning of a Full-length cDNA, Heterologous Expression in *Saccharomyces cerevisiae* and Function of the N-terminal Region for Membrane Anchoring and Proliferation of the Endoplasmic Reticulum. *Yeast.* 12:333-348.
- Katzmann, D.J., M. Babst, and S.D. Emr. 2001. Ubiquitin-Dependent Sorting into the Multivesicular Body Pathway Requires the Function of a Conserved Endosomal Protein Sorting Complex, ESCRT-I. *Cell.* 106:145-155.
- Katzmann, D.J., C.J. Stefan, M. Babst, and S.D. Emr. 2003. Vps27 recruits ESCRT machinery to endosomes during MVB sorting. *J Cell Biol.* 160:413-423.
- Keren-Kaplan, T., I. Attali, M. Estrin, L.S. Kuo, E. Farkash, M. Jerabek-Willemsen, N. Blutraich, S. Artzi, A. Peri, E.O. Freed, H.J. Wolfson, and G. Prag. 2013. Structure-based *in silico* identification of ubiquitin-binding domains provides insights into the ALIX-V:ubiquitin complex and retrovirus budding. *EMBO J.* 32:538-551.
- Kim, J., S. Sitaraman, A. Hierro, B.M. Beach, G. Odorizzi, and J.H. Hurley. 2005. Structural Basis for Endosomal Targeting by the Bro1 Domain. *Dev Cell.* 8:937-947.
- Kimura, Y., J. Kawawaki, Y. Kakiyama, A. Shimoda, and K. Tanaka. 2014. The ESCRT-III Adaptor Protein Bro1 Controls Functions of Regulator for Free Ubiquitin Chains 1 (Rfu1) in Ubiquitin Homeostasis. *J Biol Chem.* 289:21760-21769.
- Kimura, Y., M. Tanigawa, J. Kawawaki, K. Takagi, T. Mizushima, T. Maeda, and K. Tanaka. 2015. Conserved Mode of Interaction between Yeast Bro1 Family V Domains and YP(X)_nL Motif-Containing Target Proteins. *Eukaryot Cell.* 14:976-982.
- Kitamura, K and Y. Yamamoto. 1972. Purification and Properties of an Enzyme, Zymolyase, which Lyses Viable Yeast Cells. *Arch Biochem Biophys.* 153: 403-6.
- Knop, M., K. Siegers, G. Pereira, W. Zachariae, B. Winsor, K. Nasmyth, and E. Schiebel. 1999. Epitope Tagging of Yeast Genes using a PCR-based Strategy: More Tags and Improved Practical Routines. *Yeast.* 15:963-972.
- Kostelansky, M.S., C. Schluter, Y.Y.C. Tam, S. Lee, R. Ghirlando, B. Beach, E. Conibear, and J.H. Hurley. 2007. Molecular Architecture and Functional Model of the Complete Yeast ESCRT-I Heterotetramer. *Cell.* 129:485-498.

- Ku, P.-I., M. Bendjennat, J. Ballew, M.B. Landesman, and S. Saffarian. 2014. ALIX Is Recruited Temporarily into HIV-1 Budding Sites at the End of Gag Assembly. *PLoS One*. 9:e96950.
- Kutluay, S.B. and P.D. Bieniasz. 2010. Analysis of the Initiating Events in HIV-1 Particle Assembly and Genome Packaging. *PLoS Pathog*. 6:e1001200.
- Langelier, C., U.K. von Schwedler, R.D. Fisher, I. De Domenico, P.L. White, C.P. Hill, J. Kaplan, D. Ward, and W.I. Sundquist. 2006. Human ESCRT-II Complex and Its Role in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Release. *J Virol*. 80:9465-9480.
- Lata, S., G. Schoehn, A. Jain, R. Pires, J. Piehler, H.G. Göttlinger, and W. Weissenhorn. 2008. Helical Structures of ESCRT-III Are Disassembled by VPS4. *Science*. 321:1354-1357.
- Lee, H.H., N. Elia, R. Ghirlando, J. Lippincott-Schwartz, and J.H. Hurley. 2008. Midbody Targeting of the ESCRT Machinery by a Noncanonical Coiled coil in CEP55. *Science*. 322:576-580.
- Lee, S., A. Joshi, K. Nagashima, E.O. Freed, and J.H. Hurley. 2007. Structural basis for viral late-domain binding to Alix. *Nat Struct Mol Biol*. 14:194-199.
- Liese, S., E.M. Wenzel, I. Kjos, R. Rojas Molina, S.W. Schultz, A. Brech, H. Stenmark, C. Raiborg, and A. Carlson. 2020. Protein crowding mediates membrane remodeling in upstream ESCRT-induced formation of intraluminal vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 117:28614-28624.
- Lippincott-Schwartz, J., E.O. Freed, and S.B. van Engelenburg. 2017. A Consensus View of ESCRT-Mediated Human Immunodeficiency Virus Type 1 Abscission. *Ann Rev Virol*. 4:309-325.
- Longtine, M.S., A. McKenzie III, D.J. Demarini, N.G. Shah, A. Wach, A. Brachat, P. Philippsen, and J.R. Pringle. 1998. Additional Modules for Versatile and Economical PCR-based Gene Deletion and Modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 14:953-961.
- Lu, Q., L.W. Hope, M. Brasch, C. Reinhard, and S.N. Cohen. 2003. TSG101 interaction with HRS mediates endosomal trafficking and receptor down-regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:7626-7631.
- Lusic, M. and R.F. Siliciano. 2017. Nuclear landscape of HIV-1 infection and integration. *Nat Rev Microbiol*. 15:69-82.
- Mao, X., Y. Hu, C. Liang, and C. Lu. 2002. MET3 Promoter: A Tightly Regulated Promoter and Its Application in Construction of Conditional Lethal Strain. *Curr Microbiol*. 45:37-40.
- Margulis, N.G., J.D. Wilson, C.M. Bentivoglio, N. Dhungel, A.D. Gitler, and C. Barlowe. 2016. Analysis of COPII vesicles indicates a role for the Emp47-Ssp120 complex in transport of cell surface glycoproteins. *Traffic*. 17:191-210.
- Martin-Serrano, J., A. Yarovoy, D. Perez-Caballero, and P.D. Bieniasz. 2003. Divergent retroviral late-budding domains recruit vacuolar protein sorting factors by using alternative adaptor proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:12414-12419.
- Martin-Serrano, J., T. Zang, and P.D. Bieniasz. 2001. HIV-1 and Ebola virus encode small peptide motifs that recruit Tsg101 to sites of particle assembly to facilitate egress. *Nat Med*. 7:1313-1319.
- McCullough, J., R.D. Fisher, F.G. Whitby, W.I. Sundquist, and C.P. Hill. 2008. ALIX-CHMP4 interactions in the human ESCRT pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105:7687-7691.
- Meng, B., N.C.Y. Ip, T.E.M. Abbink, J.C. Kenyon, and A.M.L. Lever. 2020. ESCRT-II functions by linking to ESCRT-I in human immunodeficiency virus-1 budding. *Cell Microbiol*. e13161.
- Meng, B., N.C.Y. Ip, L.J. Prestwood, T.E.M. Abbink, and A.M. Lever. 2015. Evidence that the endosomal sorting complex required for transport-II (ESCRT-II) is required for efficient human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) production. *Retrovirology*. 12:72.
- Mercredi, P.Y., N. Bucca, B. Loeliger, C.R. Gaines, M. Mehta, P. Bhargava, P.R. Tedbury, L. Charlier, N. Floquet, D. Muriaux, C. Favard, C.R. Sanders, E.O. Freed, J. Marchant, and M.F. Summers. 2016. Structural and Molecular Determinants of Membrane Binding by the HIV-1 Matrix Protein. *J Mol Biol*. 428:1637-1655.
- Mervis, R.J., N. Ahmad, E.P. Lillehoj, M.G. Raum, F.H.R. Salazar, H.W. Chan, and S. Venkatesan. 1988. The gag Gene Products of Human Immunodeficiency Virus Type 1: Alignment within the gag Open Reading Frame, Identification of Posttranslational Modifications, and Evidence for Alternative gag Precursors. *J Virol*. 62:3993-4002.
- Meusser, B., B. Purfuerst, and F.C. Luft. 2020. HIV-1 Gag release from yeast reveals ESCRT interaction with the Gag N-terminal protein region. *J Biol Chem*. 295:17950-17972.
- Meusser, B. and T. Sommer. 2004. Vpu-Mediated Degradation of CD4 Reconstituted in Yeast Reveals Mechanistic Differences to Cellular ER-Associated Protein Degradation. *Mol Cell*. 14:247-258.
- Misra, S. and J.H. Hurley. 1999. Crystal Structure of a Phosphatidylinositol 3-Phosphate-Specific Membrane-Targeting Motif, the FYVE Domain of Vps27p. *Cell*. 97:657-666.
- Mizuno, E., K. Kawahata, M. Kato, N. Kitamura, and M. Komada. 2003. STAM Proteins Bind Ubiquitinated Proteins on the Early Endosome via the VHS Domain and Ubiquitin-interacting Motif. *Mol Biol Cell*. 14:3675-3689.
- Morita, E., V. Sandrin, H.-Y. Chung, S.G. Morham, S.P. Gygi, C.K. Rodesch, and W.I. Sundquist. 2007. Human ESCRT and ALIX proteins interact with proteins of the midbody and function in cytokinesis. *EMBO J*. 26:4215-4227.
- Morita, E., V. Sandrin, J. McCullough, A. Katsuyama, I. Baci Hamilton, and W.I. Sundquist. 2011. ESCRT-III Protein Requirements for HIV-1 Budding. *Cell Host Microbe*. 9:235-242.
- Morita, E. and W.I. Sundquist. 2004. Retrovirus budding. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 20:395-425.
- Moser von Filseck, J., L. Barberi, N. Talledge, I.E. Johnson, A. Frost, M. Lenz, and A. Roux. 2020. Anisotropic ESCRT-III architecture governs helical membrane tube formation. *Nat Commun*. 11:1516.
- Munro, J.B., A. Nath, M. Farber, S.A. Datta, A. Rein, E. Rhoades, and W. Mothes. 2014. A Conformational Transition Observed in Single HIV-1 Gag Molecules during *In Vitro* Assembly of Virus-Like Particles. *J Virol*. 88:3577-3585.
- Murphy, R.E., A.B. Samal, J. Vlach, V. Mas, P.E. Prevelige, and J.S. Saad. 2019. Structural and biophysical characterizations of HIV-1 matrix trimer binding to lipid nanodiscs shed light on virus assembly. *J Biol Chem*. 294:18600-18612.
- Nikko, E., A.-M. Marini, and B. André. 2003. Permease Recycling and Ubiquitination Status Reveal a Particular Role for Bro1 in the Multivesicular Body Pathway. *J Biol Chem*. 278:50732-50743.
- Norgan, A.P., J.R. Lee, A.J. Oestreich, J.A. Payne, E.W. Krueger, and D.J. Katzmman. 2012. ESCRT-Independent Budding of HIV-1 Gag Virus-Like Particles from *Saccharomyces cerevisiae* Spheroplasts. *PLoS One*. 7:e52603.
- Novick, P., C. Field, and R. Schekman. 1980. Identification of 23 Complementation Groups Required for Post-translational Events in the Yeast Secretory Pathway. *Cell*. 21:205-215.

- Odorizzi, G., M. Babst, and S.D. Emr. 1998. Fab1p PtdIns(3)P 5-Kinase Function Essential for Protein Sorting in the Multivesicular Body. *Cell*. 95:847-858.
- Odorizzi, G., D.J. Katzmann, M. Babst, A. Audhya, and S.D. Emr. 2003. Bro1 is an endosome-associated protein that functions in the MVB pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci*. 116:1893-1903.
- Ono, A., S.D. Ablan, S.J. Lockett, K. Nagashima, and E.O. Freed. 2004. Phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate regulates HIV-1 Gag targeting to the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101:14889-14894.
- Orlean, P. 2012. Architecture and Biosynthesis of the *Saccharomyces cerevisiae* Cell Wall. *Genetics*. 192:775-818.
- Paillart, J.-C. and H.G. Göttlinger. 1999. Opposing Effects of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Matrix Mutations Support a Myristyl Switch Model of Gag Membrane Targeting. *J Virol*. 73:2604-2612.
- Pak, A.J., J.M.A. Grime, P. Sengupta, A.K. Chen, A.E.P. Durumeric, A. Srivastava, M. Yeager, J.A.G. Briggs, J. Lippincott-Schwartz, and G.A. Voth. 2017. Immature HIV-1 lattice assembly dynamics are regulated by scaffolding from nucleic acid and the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 114:E10056-E10065.
- Panzner, S., L. Dreier, E. Hartmann, S. Kostka, and T.A. Rapoport. 1995. Posttranslational Protein Transport in Yeast Reconstituted with a Purified Complex of Sec Proteins and Kar2p. *Cell*. 81:561-570.
- Pashkova, N., L. Gakhar, S.C. Winistorfer, A.B. Sunshine, M. Rich, M.J. Dunham, L. Yu, and R.C. Piper. 2013. The Yeast Alix Homolog Bro1 Functions as a Ubiquitin Receptor for Protein Sorting into Multivesicular Endosomes. *Dev Cell*. 25:520-533.
- Pavlin, M.R. and J.H. Hurley. 2020. The ESCRTs – converging on mechanism. *J Cell Sci*. 133:jcs240333.
- Pfützner, A.-K., V. Mercier, X. Jiang, J. Moser von Filseck, B. Baum, A. Šarić, and A. Roux. 2020. An ESCRT-III Polymerization Sequence Drives Membrane Deformation and Fission. *Cell*. 182:1140-1155.e1118.
- Pickart, C.M. and M.J. Eddins. 2004. Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochim Biophys Acta*. 1695:55-72.
- Pincetic, A., G. Medina, C. Carter, and J. Leis. 2008. Avian Sarcoma Virus and Human Immunodeficiency Virus, Type 1 Use Different Subsets of ESCRT Proteins to Facilitate the Budding Process. *J Biol Chem*. 283:29822-29830.
- Pires, R., B. Hartlieb, L. Signor, G. Schoehn, S. Lata, M. Roessle, C. Moriscot, S. Popov, A. Hinz, M. Jamin, V. Boyer, R. Sadoul, E. Forest, D.I. Svergun, H.G. Göttlinger, and W. Weissenhorn. 2009. A Crescent-Shaped ALIX Dimer Targets ESCRT-III CHMP4 Filaments. *Structure*. 17:843-856.
- Popov, S., E. Popova, M. Inoue, and H.G. Göttlinger. 2008. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gag Engages the Bro1 Domain of ALIX/AIP1 through the Nucleocapsid. *J Virol*. 82:1389-1398.
- Pornillos, O., S.L. Alam, D.R. Davis, and W.I. Sundquist. 2002a. Structure of the Tsg101 UEV domain in complex with the PTAP motif of the HIV-1 p6 protein. *Nat Struct Biol*. 9:812-817.
- Pornillos, O., S.L. Alam, R.L. Rich, D.G. Myszk, D.R. Davis, and W.I. Sundquist. 2002b. Structural and functional interactions of the Tsg101 UEV domain. *EMBO J*. 21:2397-2406.
- Pornillos, O., B.K. Ganser-Pornillos, B.N. Kelly, Y. Hua, F.G. Whitby, C.D. Stout, W.I. Sundquist, C.P. Hill, and M. Yeager. 2009. X-Ray Structures of the Hexameric Building Block of the HIV Capsid. *Cell*. 137:1282-1292.
- Pornillos, O., D.S. Higginson, K.M. Stray, R.D. Fisher, J.E. Garrus, M. Payne, G.P. He, H.E. Wang, S.G. Morham, and W.I. Sundquist. 2003. HIV Gag mimics the Tsg101-recruiting activity of the human Hrs protein. *J Cell Biol*. 162:425-434.
- Prescher, J., V. Baumgärtel, S. Ivanchenko, A.A. Torrano, C. Bräuchle, B. Müller, and D.C. Lamb. 2015. Super-Resolution Imaging of ESCRT-Proteins at HIV-1 Assembly Sites. *PLoS Pathog*. 10:e1004677.
- Reggiori, F. and H.R.B. Pelham. 2001. Sorting of proteins into multivesicular bodies: ubiquitin-dependent and -independent targeting. *EMBO J*. 20: 5176-5186.
- Reil, H., A.A. Bukovsky, H.R. Gelderblom, and H.G. Göttlinger. 1998. Efficient HIV-1 replication can occur in the absence of the viral matrix protein. *EMBO J*. 17:2699-2708.
- Rein, A. 2019. RNA Packaging in HIV. *Trends Microbiol*. 27:715-723.
- Ren, X. and J.H. Hurley. 2010. VHS domains of ESCRT-0 cooperate in high-avidity binding to polyubiquitinated cargo. *EMBO J*. 29:1045-1054.
- Ren, X. and J.H. Hurley. 2011. Structural basis for endosomal recruitment of ESCRT-I by ESCRT-0 in yeast. *EMBO J*. 30:2130-2139.
- Richter, C., M. West, and G. Odorizzi. 2007. Dual mechanisms specify Doa4-mediated deubiquitination at multivesicular bodies. *EMBO J*. 26:2454-2464.
- Robinson, J.S., D.J. Klionsky, L.M. Banta, and S.D. Emr. 1988. Protein Sorting in *Saccharomyces cerevisiae*: Isolation of Mutants Defective in the Delivery and Processing of Multiple Vacuolar Hydrolases. *Mol Cell Biol*. 8:4936-4948.
- Rothman, J.H., I. Howald, and T.H. Stevens. 1989. Characterization of genes required for protein sorting and vacuolar function in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*. 8: 2057-2065.
- Rothman, J.H. and T.H. Stevens. 1986. Protein Sorting in Yeast: Mutants Defective in Vacuole Biogenesis Mislocalize Vacuolar Proteins into the Late Secretory Pathway. *Cell*. 47:1041-1051.
- Saad, J.S., J. Miller, J. Tai, A. Kim, R.H. Ghanam, and M.F. Summers. 2006. Structural basis for targeting HIV-1 Gag proteins to the plasma membrane for virus assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103:11364-11369.
- Saifuddin, M., T. Hedayati, J.P. Atkinson, M.H. Holguin, C.J. Parker, and G.T. Spear. 1997. Human immunodeficiency virus type 1 incorporates both glycosyl phosphatidylinositol-anchored CD55 and CD59 and integral membrane CD46 at levels that protect from complement-mediated destruction. *J Gen Virol*. 78:1907-1911.
- Saksena, S., J. Wahlman, D. Teis, A.E. Johnson, and S.D. Emr. 2009. Functional Reconstitution of ESCRT-III Assembly and Disassembly. *Cell*. 136:97-109.
- Sakuragi, S., T. Goto, K. Sano, and Y. Morikawa. 2002. HIV type 1 Gag virus-like particle budding from spheroplasts of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:7956-7961.
- Schöneberg, J., I.-H. Lee, J.H. Iwasa, and J.H. Hurley. 2017. Reverse-topology membrane scission by the ESCRT proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 18:5-17.
- Schöneberg, J., M.R. Pavlin, S. Yan, M. Righini, I.-H. Lee, L.-A. Carlson, A.H. Bahrami, D.H. Goldman, X. Ren, G. Hummer, C. Bustamante, and J.H. Hurley. 2018. ATP-dependent force generation and membrane scission by ESCRT-III and Vps4. *Science*. 362:1423-1428.
- Schröder, S., F. Schimmöller, B. Singer-Krüger, and H. Riezman. 1995. The Golg-localization of Yeast Emp47p Depends on Its Di-lysine Motif But Is Not Affected by the *ret1-1* Mutation in α -COP. *J Cell Biol*. 131:895-912.

- Schur, F.K.M., W.J.H. Hagen, M. Rumlova, T. Ruml, B. Müller, H.-G. Kräusslich, and J.A.G. Briggs. 2015. Structure of the immature HIV-1 capsid in intact virus particles at 8.8 Å resolution. *Nature*. 517:505-508.
- Schwartz, S., M. Campbell, G. Nasioulas, J. Harrison, B.K. Felber, and G.N. Pavlakis. 1992. Mutational Inactivation of an Inhibitory Sequence in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Results in Rev-Independent gag Expression. *J Virol*. 66:7176-7182.
- Seaton, K.E. and C.D. Smith. 2008. N-Myristoyltransferase isozymes exhibit differential specificity for human immunodeficiency virus type 1 Gag and Nef. *J Gen Virol*. 89:288-296.
- Sengupta, P., A.Y. Seo, H.A. Pasolli, Y.E. Song, M.C. Johnson, and J. Lippincott-Schwartz. 2019. A lipid-based partitioning mechanism for selective incorporation of proteins into membranes of HIV particles. *Nat Cell Biol*. 21:452-461.
- Sette, P., V. Dussupt, and F. Bouamr. 2012. Identification of the HIV-1 NC Binding Interface in Alix Bro1 Reveals a Role for RNA. *J Virol*. 86:11608-11615.
- Sette, P., K. Nagashima, R.C. Piper, and F. Bouamr. 2013. Ubiquitin conjugation to Gag is essential for ESCRT-mediated HIV-1 budding. *Retrovirology*. 10:79.
- Sette, P., S.K. O'Connor, V.S. Yerramilli, V. Dussupt, K. Nagashima, K. Chutiraka, J. Lingappa, S. Scarlata, and F. Bouamr. 2016. HIV-1 Nucleocapsid Mimics the Membrane Adaptor Syntenin PDZ to Gain Access to ESCRTs and Promote Virus Budding. *Cell Host Microbe*. 19:336-348.
- Seufert, W., J.P. McGrath, and S. Jentsch. 1990. UBC1 encodes a novel member of an essential subfamily of yeast ubiquitin-conjugating enzymes involved in protein degradation. *EMBO J*. 9:4535-4541.
- Shields, S.B., A.J. Oestreich, S. Winistorfer, D. Nguyen, J.A. Payne, D.J. Katzmann, and R. Piper. 2009. ESCRT ubiquitin-binding domains function cooperatively during MVB cargo sorting. *J Cell Biol*. 185:213-224.
- Shih, S.C., D.J. Katzmann, J.D. Schnell, M. Sutanto, S.D. Emr, and L. Hicke. 2002. Epsins and Vps27p/Hrs contain ubiquitin-binding domains that function in receptor endocytosis. *Nat Cell Biol*. 4:389-393.
- Shkriabai, N., S.A.K. Datta, Z. Zhao, S. Hess, A. Rein, and M. Kvaratskhelia. 2006. Interactions of HIV-1 Gag with Assembly Cofactors. *Biochemistry*. 45:4077-4083.
- Sikorski, R.S. and P. Hieter. 1989. A System of Shuttle Vectors and Yeast Host Strains Designed for Efficient Manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 122:19-27.
- Strack, B., A. Calistri, S. Craig, E. Popova, and H.G. Göttinger. 2003. AIP1/ALIX Is a Binding Partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 Functioning in Virus Budding. *Cell*. 114:689-699.
- Sundquist, W.I., H.L. Schubert, B.N. Kelly, G.C. Hill, J.M. Holton, and C.P. Hill. 2004. Ubiquitin Recognition by the Human TSG101 Protein. *Mol Cell*. 13:783-789.
- Swanson, K.A., R.S. Kang, S.D. Stamenova, L. Hicke, and I. Radhakrishnan. 2003. Solution structure of Vps27 UIM-ubiquitin complex important for endosomal sorting and receptor downregulation. *EMBO J*. 18:4597-4606.
- Takamune, N., K. Gota, S. Misumi, K. Tanaka, S. Okinaka, and S. Shoji. 2008. HIV-1 production is specifically associated with human NMT1 long form in human NMT isozymes. *Microbes Infect*. 10:143-150.
- Tang, C., E. Loeliger, P. Luncsford, I. Kinde, D. Beckett, and M.F. Summers. 2004. Entropic switch regulates myristate exposure in the HIV-1 matrix protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101:517-522.
- Tang, S., N.J. Buchkovich, W.M. Henne, S. Banjade, Y.J. Kim, and S.D. Emr. 2016. ESCRT-III activation by parallel action of ESCRT-I/II and ESCRT-0/Bro1 during MVB biogenesis. *Elife*. 5:e15507.
- Teis, D., S. Saksena, B.L. Judson, and S.D. Emr. 2010. ESCRT-II coordinates the assembly of ESCRT-III filaments for cargo sorting and multivesicular body vesicle formation. *EMBO J*. 29:871-883.
- Teo, H., D.B. Veprintsev, and R.L. Williams. 2004. Structural Insights into Endosomal Sorting Complex Required for Transport (ESCRT-I) Recognition of Ubiquitinated Proteins. *J Biol Chem*. 279:28689-28696.
- Thumm, M., R. Egner, B. Koch, M. Schlumberger, M. Straub, M. Veenhuis, and D.H. Wolf. 1994. Isolation of autophagy mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*. 349:275-280.
- Tokuyasu, K.T.. 1989. Use of poly(vinylpyrrolidone) and poly(vinyl alcohol) for cryoultramicrotomy. *Histochem J*. 21:163-171.
- Travers, K.J., C.K. Patil, L. Wodicka, D.J. Lockhart, J.S. Weissman, and P. Walter. 2000. Functional and Genomic Analyses Reveal an Essential Coordination between the Unfolded Protein Response and ER-Associated Degradation. *Cell*. 101:249-258.
- Tschumper, G. and J. Carbon. 1983. Copy number by a yeast centromere. *Gene*. 1983:221-232.
- Tsien, R.Y.. 1998. The Green Fluorescent Protein. *Annu Rev Biochem*. 67:509-544.
- Tsukada, M. and Y. Ohsumi. 1993. Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*. 333:169-174.
- Van Engelenburg, S.B., G. Shtengel, P. Sengupta, K. Waki, M. Jarnik, S.D. Ablan, E.O. Freed, H.F. Hess, and J. Lippincott-Schwartz. 2014. Distribution of ESCRT Machinery at HIV Assembly Sites Reveals Virus Scaffolding of ESCRT Subunits. *Science*. 343:653-656.
- VerPlank, L., F. Bouamr, T.J. LaGrassa, B. Agresta, A. Kikonyogo, J. Leis, and C.A. Carter. 2001. Tsg101, a homologue of ubiquitin-conjugating (E2) enzymes, binds the L domain in HIV type 1 Pr55(Gag). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:7724-7729.
- Vietri, M., M. Radulovic, and H. Stenmark. 2020. The many functions of ESCRTs. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 21:25-42.
- Vijay-Kumar, S., C.E. Bugg, K.D. Wilkinson, R.D. Vierstra, P.M. Hatfield, and W.J. Cook. 1987. Comparison of the Three-dimensional Structures of Human, Yeast, and Oat Ubiquitin. *J Biol Chem*. 262:6396-6399.
- Vlach, J. and J.S. Saad. 2013. Trio engagement via plasma membrane phospholipids and the myristoyl moiety governs HIV-1 matrix binding to bilayers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110:3525-3530.
- von Schwedler, U.K., K.M. Stray, J.E. Garrus, and W.I. Sundquist. 2003a. Functional Surfaces of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Capsid Protein. *J Virol*. 77:5439-5450.
- von Schwedler, U.K., M. Stuchell, B. Müller, D.M. Ward, H.Y. Chung, E. Morita, H.E. Wang, T. Davis, G.P. He, D.M. Cimbara, A. Scott, H.-G. Kräusslich, J. Kaplan, S.G. Morham, and W.I. Sundquist. 2003b. The Protein Network of HIV Budding. *Cell*. 114:701-713.
- Votteler, J. and W.I. Sundquist. 2013. Virus Budding and the ESCRT Pathway. *Cell Host Microbe*. 14:232-241.
- Wang, C.T. and E. Barklis. 1993. Assembly, Processing, and Infectivity of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gag Mutants. *J Virol*. 67:4264-4273.

- Wemmer, M., I. Azmi, M. West, B. Davies, D. Katzmann, and G. Odorizzi. 2011. Bro1 binding to Snf7 regulates ESCRT-III membrane scission activity in yeast. *J Cell Biol.* 192:295-306.
- Wilk, T., I. Gross, B.E. Gowen, T. Rutten, F. de Haas, R. Welker, H.-G. Kräusslich, P. Boulanger, and S.D. Fuller. 2001. Organization of Immature Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J Virol.* 75:759-771.
- Wollert, T. and J.H. Hurley. 2010. Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes. *Nature.* 464:864-869.
- Wollert, T., C. Wunder, J. Lippincott-Schwartz, and J.H. Hurley. 2009. Membrane scission by the ESCRT-III complex. *Nature.* 458:172-177.
- Yu, X., X. Yuan, Z. Matsuda, T.-H. Lee, and M. Essex. 1992. The Matrix Protein of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Is Required for Incorporation of Viral Envelope Protein into Mature Virions. *J Virol.* 66:4966-4971.
- Zhai, Q., R.D. Fisher, H.-Y. Chung, D.G. Myszka, W.I. Sundquist, and C.P. Hill. 2008. Structural and functional studies of ALIX interactions with YPX_nL late domains of HIV-1 and EIAV. *Nat Struct Mol Biol.* 15:43-49.
- Zhai, Q., M.B. Landesman, H.-Y. Chung, A. Dierkers, C.M. Jeffries, J. Trewhella, C.P. Hill, and W.I. Sundquist. 2011. Activation of the Retroviral Budding Factor ALIX. *J Virol.* 85:9222-9226.
- Zhou, X., S. Pan, L. Sun, J. Corvera, Y.-C. Lee, S.-H. Lin, and J. Kuang. 2009. The CHMP4b- and Src-docking sites in the Bro1 domain are autoinhibited in the native state of Alix. *Biochem J.* 418:277-284.

10. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Birgit Meußner, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Freisetzung von HIV-1-Gag und die Rolle der ESCRT-Proteine - Studien mit Hefe und humanen Zellen / HIV-1-Gag release and the function of ESCRT proteins - experiments with yeast and human cells“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Erstbetreuer angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an Publikationen

Birgit Meußer hatte folgenden Anteil an der Publikation:

Birgit Meusser, Bettina Purfuerst, and Friedrich C. Luft, HIV-1 Gag release from yeast reveals ESCRT interaction with the Gag N-terminal protein region, Journal of Biological Chemistry, 2020

Design des Projekts, Planung, Durchführung und Auswertung der Experimente, Erstellung der Abbildungen, Schreiben des Manuskripts und der Antwort auf die Gutachterkommentare.

Folgende Beiträge wurden von weiteren Personen geleistet:

Elektronenmikroskopie: Diese Experimente wurden von Bettina Purfürst und Frank Vogel mit technischer Assistenz von Margit Vogel geplant, durchgeführt und ausgewertet. Aus diesen Experimenten sind Fig. 1 (F und G) und Fig. S4, S5 und S6 hervorgegangen. Bettina Purfürst hat im Manuskript den Methodenteil zur Elektronenmikroskopie geschrieben. Der Anteil von Birgit Meußer an diesen Experimenten war die Transformation und Anzucht der Hefezellen und die Erstellung der Abbildungen aus Files und Papierabzügen der elektronenmikroskopischen Aufnahmen, die von Bettina Purfürst und Frank Vogel zur Verfügung gestellt wurden.

Technische Assistenz: Angelika Wittstruck hat die Anti-Sec61- und Anti-HA-Antikörper präpariert. Corinna Volkwein hat die praktischen Arbeiten zur Klonierung von pBM267 und zur Umklonierung der Inserts von pBM437, 440, 449, 494, 497, 506, 527, 530, 548, 551, 556, 557, 582-585, 587, 591-593, 596, 610, 611, 615, 616 in ihre Zielvektoren und zur Kontrolle von YBM96, inklusive der Funktionalität (Fig. S19C) durchgeführt. Marina Sitte und Andreas Schmidt haben große Mengen an Geschirr gespült und sterilisiert und Kulturmedien, Wasser und Laborplastik autoklaviert.

Betreuung: Thomas Sommer hat das Projekt in der Anfangsphase mit Gedanken begleitet, finanziell unterstützt und Arbeitsplatz zur Verfügung gestellt. Anschließend hat Friedrich C. Luft Arbeitsplatz zur Verfügung gestellt und das Projekt finanziert. Friedrich C. Luft hat den Publikationsprozess supervidiert und das Manuskript und die Antwort auf die Gutachterkommentare sprachlich verbessert.

Unterschrift, Datum und Stempel des erstbetreuenden Hochschullehrers

Unterschrift der Doktorandin

11. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

12. Publikationsliste

Meusser, B., B. Purfuerst, and F.C. Luft. 2020. HIV-1 Gag release from yeast reveals ESCRT interaction with the Gag N-terminal protein region. *J Biol Chem.* 295:17950-17972.

Meusser, B., C. Hirsch, E. Jarosch, and T. Sommer. 2005. ERAD: the long road to destruction. *Nat Cell Biol.* 7:766-772.

Meusser, B. and T. Sommer. 2004. Vpu-Mediated Degradation of CD4 Reconstituted in Yeast Reveals Mechanistic Differences to Cellular ER-Associated Protein Degradation. *Mol Cell.* 14:247-258.

Jarosch, E., R. Geiss-Friedlander, B. Meusser, J. Walter, and T. Sommer. 2002. Protein Dislocation from the Endoplasmic Reticulum - Pulling Out the Suspect. *Traffic.* 3:530-536.

Stade, K., F. Vogel, I. Schwienhorst, B. Meusser, C. Volkwein, B. Nentwig, R.J. Dohmen, and T. Sommer. 2002. A Lack of SUMO Conjugation Affects cNLS-dependent Nuclear Protein Import in Yeast. *J Biol Chem.* 277:49554-49561.

13. Danksagung

Ich bedanke mich bei Bettina Purfürst, Frank und Margit Vogel für den elektronenmikroskopischen Blick in die gagexprimierenden Hefezellen, bei Angelika Wittstruck für die Präparation von Antikörpern, bei Corinna Volkwein für einen Teil der Klonierungen und die Kontrolle eines Hefestamms, bei Thomas Sommer für Interesse und finanzielle Unterstützung in der Anfangsphase des Projekts und bei Marion Bimmler für die Beratung beim Erstellen eines Fördermittelantrags. Ich danke allen, die mir geholfen haben, das Projekt trotz eines Laborwechsels unter den für die Experimente nicht gut geeigneten Bedingungen wenigstens bis zu einer Publikation zu bringen. Dafür danke ich den Mitgliedern der AG Luft, den hilfsbereiten Nachbarn, der AG Schmidt-Ott, ganz besonders Tatjana Luganskaja, Emilia Vigolo und Gabriel Kirchgraber, der AG Izsvák und AG Willnow, und netten Menschen, die mir wichtige Laborutensilien geliehen haben, Hendrik Fuchs, Bernhard Gilließen und Jeanette Mothes, AG Filitz und AG Müller für die Lagerung von Gefrierproben und Lajos Marko für die Hilfe am Fluoreszenzmikroskop. Besonders wichtig waren Marina Sitte und Andreas Schmidt, die nicht nur riesige Geschirrmengen gewaschen und sterilisiert und große Volumina an Kulturmedium und Wasser autoklaviert haben, sondern durch ihre vorausschauende Organisation mit dem Ziel bestmöglicher Unterstützung und ihre weit darüber hinausgehende Hilfsbereitschaft mehr als nur die Arbeit erleichtert haben. Bei Susanne, Carsten und Theodor Brockmann bedanke ich mich für die Möglichkeit, diese Arbeit auszudrucken, und bei Marie-Luise Meußner und Susanne Brockmann für die Rechtschreibkorrektur. Bei Friedrich Luft bedanke ich mich dafür, dass er die Betreuung eines Projekts übernommen hat, das außerhalb seines eigentlichen Interessenbereichs liegt, seine finanziellen Mittel dafür geopfert und trotz der widrigen Begleitumstände bis zum Ende durchgehalten und den Publikationsprozess supervidiert hat.