

Charakterisierung der Neddylisierung von Cofilin1

Einfluss auf die neuronale Entwicklung

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von
Ulf Einsfelder
aus
Frechen

Bonn 2022

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Gutachter: Prof. Dr. Valentin Stein

Gutachter: Prof. Dr. Walter Witke

Tag der Promotion: 10.11.2022

Erscheinungsjahr: 2022

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	9
2	Einleitung	11
2.1	Nedd8	11
2.2	Aktin	13
2.3	Biotin-Streptavidin-Pulldown	15
3	Zielsetzung	19
4	Material und Methoden	21
4.1	Material	21
4.2	Methoden	26
4.2.1	F/G Aktin Separation	26
4.2.2	Zellkultur	26
4.2.3	Auftauen von HEK-Zellen	27
4.2.4	Einfrieren von HEK-Zellen	27
4.2.5	SDS-PAGE	27
4.2.6	Western Blot	27
4.2.7	Immunpräzipitation	28
4.2.8	Pulldown	28
4.2.9	Herstellung elektrokompenter Bakterien	28
4.2.10	Transformation elektrokompenter Bakterien	29
4.2.11	DNS-Präparation	29
4.2.12	Restriktionsverdau	30
4.2.13	PCR	30
4.2.14	Agarose-Gelelektrophorese	30
4.2.15	Gelextraktion	31
4.2.16	Ligation	31
4.2.17	Einführen von Punktmutationen	31

4.2.18	PCIA-Extraktion	31
4.2.19	Erzeugung eines targeting-Vektors mittels Mini- λ	32
4.2.20	Erzeugung einer transgenen Maus mittels eines targeting-Vektors	36
5	Ergebnisse	39
5.1	Neddylierung synaptischer Proteine	39
5.1.1	Immunpräzipitation von GluA-Rezeptor 1	39
5.1.2	Biotin-Streptavidin-Pulldown von neddylierten Proteinen	43
5.2	Einfluss von Neddylierung auf das Aktin-Zytoskelett	56
5.2.1	F/G-Aktin-Verhältnis	56
5.3	Neddylierung von Aktinregulatoren	59
5.3.1	Profilin	59
5.3.2	Cofilin	59
5.3.3	Identifizierung neddylierte Lysine in Cofilin	63
5.3.4	Neddylierungsdefizientes Cofilin in der Entwicklung von Neuronen	67
5.3.5	Lebendzellmikroskopie nach Cofilin1 Austausch	72
5.4	Vergleich zu anderen Arbeiten zu Neddylierung von Cofilin1	73
5.4.1	Cofilin1-Bindestelle für UBC12	74
5.4.2	PSD-95-Bindestelle für UBC12	76
6	Diskussion	79
6.1	Neddylierung synaptischer Proteine	79
6.2	Einfluss von Neddylierung auf das Aktin-Zytoskelett	81
6.3	Neddylierung von Aktinregulatoren	81
6.4	Cofilin1-Bindestelle für UBC12	85
6.5	Avi-Nedd8-Mauslinie	89
7	Evaluation und Ausblick	91
	Abkürzungsverzeichnis	95
	Einheiten	95
	Abkürzungen	96
	Abbildungsverzeichnis	99
	Tabellenverzeichnis	101

Literaturverzeichnis	103
Danksagung	109

1 Zusammenfassung

Nachdem lange davon ausgegangen wurde, dass die posttranslationale Modifikation durch Nedd8 nur bestimmte Culline und den Zellzyklus reguliert, sind in den vergangenen Jahren weitere neddylierte Proteine gefunden worden, die nicht im Zusammenhang mit dem Zellzyklus stehen, sondern andere Funktionen in der Zelle wahrnehmen. Anknüpfend daran habe ich in dieser Arbeit einen Pulldown entwickelt und eine Mauslinie mit getagtem Nedd8 generiert, um gewebespezifisch die Neddylome der Maus zu bestimmen.

Mir ist es gelungen einen Pulldown zu entwickeln, der es sowohl ermöglicht in heterologen Systemen exprimierte Proteine, sowie davon abgeleitete Mutanten auf Neddylierung zu untersuchen, als auch bei endogen exprimierten Proteinen in einem unvoreingenommenen Experiment zu bestimmen, ob sie neddyliert werden. Hierbei werden stringente und denaturierende Waschbedingungen benutzt. Die Neddylierung in der Maus findet *in vivo* und unter endogenen Expressionsleveln statt. Die Verifizierung, dass die Neddylierung über die Neddylierungsmaschinerie erfolgt, wird durch Verwendung des NAE1-Inhibitors MLN-4924 in der Zellkultur oder in der Maus über das Einkreuzen von einer Mauslinie mit gefloxtem NAE1 erreicht.

Weitergehend habe ich auf der Suche nach dem neddylierten Protein, das für das filopodienartige Aussehen von den Spines in der Zellkultur nach der Neddylierungsinhibition durch MLN-4924 verantwortlich ist, Cofilin1 als ein neddyliertes Protein identifiziert. Ich habe die neddylierten Lysine von Cofilin1 bestimmt. Darauf folgend habe ich eine neddylierungsdefiziente Cofilin1-Mutante erzeugt und den Einfluss auf die neuronale Entwicklung in der Maus untersucht. Vermutlich wird das Neuritenwachstum durch die Neddylierung von Cofilin1 initiiert.

Zuletzt postuliere ich anhand von *in silico* Modellierungsdaten eine potentielle Bindestelle für UBC12 auf den neddylierten Proteinen. Diese Bindestelle ist keine lineare Sequenz, die sich an der Primärstruktur erkennen lässt, sondern vielmehr eine dreidimensionale Erkennungsoberfläche, die durch die Tertiärstruktur des Proteins ausgebildet wird.

2 Einleitung

2.1 Nedd8

Eine Neddylierung ist eine posttranslationale Modifikation in Form eines kleinen, 9 KiloDalton (kDa) großen, Proteins, neural-precursor-cell-expressed developmentally down-regulated 8 (Nedd8). Nedd8 ist ein Ubiquitin-ähnliches Protein (UBL) und ist mit 80 % Homologie zu Ubiquitin das zu Ubiquitin ähnlichste Protein dieser Familie.

Nedd8 wurde mittels einer Subtraktionsklonierung gefunden, bei der neuronale Entwicklungsfaktoren gesucht wurden, indem Boten-Ribonukleinsäuren (mRNS) aus Neuronen adulter Tiere von einer embryonalen, neuronalen komplementären Desoxyribonucleinsäure (DNS)-Bibliothek abgezogen wurde. Daher stammt auch der Name neural-precursor-cell-expressed developmentally down-regulated (Nedd), zu deutsch: exprimiert in neuronalen Vorläuferzellen, in der Entwicklung herab reguliert. Herab reguliert bedeutet in diesem Fall reduziert, aber nicht ausgeschaltet. Nedd8 ist neben Nedd7 das im adulten Tier noch am stärksten exprimierte Protein der untersuchten Nedd [Kumar et al., 1992].

Eine weitere Charakterisierung von Nedd8 aus Gewebe erwachsener Mäuse zeigte eine Expression in allen untersuchten Geweben. Diese bestanden aus Gewebe von Herz, Gehirn, Milz, Lunge, Leber, Muskel, Niere, Hoden sowie einem Dutzend verschiedener Zellkulturlinien. Ebenso zeigte es eine für Southernblot ausreichende Homologie in allen untersuchten Spezies: Mensch, Affe, Ratte, Maus, Hund, Rind, Kaninchen, Huhn und Hefe [Kumar et al., 1993].

Nedd8 ist von so genereller Bedeutung für Lebewesen, dass ein Knockout davon lethal ist und es auch in Pflanzen konserviert auftritt. In Ackerschmalwand ist Nedd8 zu 83% identisch mit humanen Nedd8 [Mergner and Schwechheimer, 2014].

Nedd8 wird äquivalent zu Ubiquitin von einem E1-Enzym aktiviert. Dieses E1-Enzym besteht bei Nedd8 aus einer regulatorischen Untereinheit NEDD8-activating enzyme E1 regulatory subunit (NAE1) und einer katalytischen Untereinheit Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 3 (UBA3) [Liakopoulos et al., 1998]. Ebenfalls korrespondierend zu

2 Einleitung

Ubiquitin wird ein konjugierendes E2-Enzym benötigt. Dies ist im Falle von Nedd8 NEDD8-conjugating enzyme Ubc12 (UBC12) [Liakopoulos et al., 1998].

Nedd8 wird als Nedd8-Vorstufe exprimiert. Der C-Terminus von humanen Nedd8 bestehend aus Gly-Gly-Leu-Arg-Glu, distal zum konservierten di-Glycin an Positionen 75 und 76, muss vor einer Nedd8-Konjugation enzymatisch abgetrennt werden [Kamitani et al., 1997].

Diese Prozessierung von Nedd8-Vorstufe zu reifem Nedd8 wird durch Enzyme durchgeführt, die auch neddylierte Proteine deneddylieren können. Diese sind Sentrin-specific protease 8 (SEN8) und Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L3 (UCH-L3) [Wada et al., 1998]. Zwischen den beiden Deneddylasen gibt es Unterschiede in der Spezifität. UCH-L3 kann sowohl Ubiquitin als auch Nedd8 schneiden. SEN8 ist spezifisch für Nedd8 [Gan-Erdene et al., 2003].

2009 gelang es Soucy mit Pevonedistat (MLN-4924) ein Adenosintriphosphat (ATP)-Analogon zu entwickeln, mit dem sich gezielt NAE1 inhibieren ließ [Soucy et al., 2009]. Dies ermöglicht es nun neue Neddylierung zu unterbinden und somit den Einfluss von Neddylierung auf Proteine und Signal- oder Stoffwechselwege zu untersuchen.

Die Effekte von Neddylierung sind divers. So kann die Neddylierung wie eine Ubiquitinierung die Stabilität eines Proteins reduzieren. Der Epidermal Growth Factor Receptor wird nach seiner Aktivierung neddyliert. Dies erhöht nachfolgende Ubiquitinierung und mustert den Rezeptor für Abbau aus [Oved et al., 2006]. Eine Neddylierung kann auch die Stabilität eines Proteins erhöhen. So wird Mouse Double Minute 2 (MDM2) durch Neddylierung stabilisiert. Eine Deneddylierung von MDM2 durch SEN8 führt zu einem verringerten MDM2-Level [Watson et al., 2010]. Die Neddylierung kann auch stabilitätsunabhängig die Aktivität eines Proteins verändern oder erhöhen. Das Protein von Hippel-Lindau (VHL) kann in einem E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex am Abbau des Hypoxia-inducible factor beteiligt sein, oder den Aufbau der Fibronectin Extrazellulärmatrix fördern. Die Neddylierung von VHL ist wie das Umlegen eines molekularen Schalters und verhindert die Einbindung in den E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex und fördert somit die Interaktion mit Fibronectin [Russell and Ohh, 2008]. Ein weiteres Beispiel für den Effekt von einer Neddylierung, das unabhängig vom Ubiquitinsystem ist, ist die cyclic GMP-AMP Synthetase (cGAS), die eine wichtige Rolle in der antiviralen Immunantwort hat. Die cGAS wird mittels rnf111 als E3-Ligase neddyliert. Eine Poly-neddylierung von cGAS führt zu einer verstärkten Dimerisierung und zu einer Bindung an cytosolischer doppelsträngiger DNS. Nach der Bindung an die DNS aktiviert cGAS den Stimulator of Interferon Genes und löst somit eine Immunantwort aus. Die Ned-

dylierung von cGAS kann durch einen Knockout von UBC12, dem E2 konjugierendem Enzym, oder rnf111, der E3-Ligase, unterbunden werden. Diese Knockout-Mäuse sind in der Folge anfälliger für eine Infektion mit HSV-1, einem DNS-Virus [Li et al., 2021].

Es gibt Hinweise darauf, dass das Zytoskelett ein Ziel für die Neddylierung ist. Dies wurde an der „klassischen“ Aufgabe von Nedd8, der Zellproliferation, untersucht. So werden die Mikrotubuli des Spindelapparates während der Zellteilung in *Caenorhabditis elegans* durch Nedd8 reguliert [Kurz et al., 2002].

2008 stellte Rabut eine Reihe von Kriterien vor, um eine Neddylierung nachzuweisen [Rabut and Peter, 2008]. Diese Kriterien sind in zwei Kategorien unterteilt. Die erste sind die sogenannten Minimalbedingungen:

- Kovalente Bindung zwischen Nedd8 und Substrat *in vivo*.
- Eine Neddylierung erfolgt unter endogenen Bedingungen *in vivo*.
- Eine Neddylierung hängt *in vivo* von Komponenten ab, die spezifisch für die Neddylierungsmaschinerie sind.

Zusätzlich führt Rabut noch folgende Kriterien auf, um ein Nedd8-Substrat weiter zu charakterisieren:

- Neddylierte Lysine bestimmen.
- Den Phänotyp einer nicht neddylierbaren Mutante charakterisieren.
- *In vivo* die spezifische Nedd8-Ligase identifizieren.
- Die Neddylierungsreaktion *in vitro* nachahmen.
- Die Deneddylase *in vivo* bestimmen.

2.2 Aktin

Das Aktin ist evolutionär gesehen ein sehr altes Protein, das an einer Vielzahl zellulärer Funktionen beteiligt ist. Aktin war bereits in dem gemeinsamen Vorläufer von allem derzeit existierendem Leben auf der Erde vorhanden, da sowohl Prokaryonten, Archaeobakterien als auch Eukaryonten Aktin besitzen, dass sich strukturell und funktional ähnelt. In Eukaryonten ist es eine der am stärksten konservierten Genfamilien und unterscheidet sich nur in einzelnen Aminosäuren zwischen unterschiedlichen Spezies. Der

2 Einleitung

Grund hierfür ist die Interaktion mit sich selbst, um Filamente zu bilden, wie auch die große Zahl an regulatorischen Proteinen, die mit dem Aktin interagieren müssen. Aktin ist am intrazellulären Transport, an der Zellmorphologie und -bewegung, an der Muskelkontraktion und an der Zellteilung beteiligt.

Aktin ist nicht symmetrisch, es gibt ein pointed end und ein barbed end. Die Namensgebung stammt von Elektronenmikroskopaufnahmen von Aktinfilamenten, die mit Myosin dekoriert waren, sodass die Filamente aussahen, als hätten sie Pfeilspitzen mit Widerhaken. Aktin bindet ATP, was die Anlagerung an Filamente erhöht. Aktin hydrolysiert das ATP zu Adenosindiphosphat (ADP) und anorganisches Phosphat (P_i). ATP-Aktin hat die gleichen Eigenschaften wie ADP+ P_i -Aktin. P_i dissoziiert im Verlauf von Minuten von Aktin. Aktin mit gebundenem ADP hat eine etwas geringere Affinität zu Filamenten und sorgt für eine etwas höher frequente Abspaltung vom Filament zum Monomer. Die Dissoziation von P_i ist eine Art molekularer Timer, der die durchschnittliche Lebenszeit der Aktinfilamente begrenzt.

Aktin polymerisiert oberhalb seiner kritischen Konzentration spontan zu Aktinfilamenten, die eine doppelsträngige Helix ausbilden. Die spontane Polymerisation wird in der Zelle jedoch von Bindepartnern unterbunden, sodass stets ein Pool an Aktinmonomeren vorhanden ist. So bindet zum Beispiel Profilin alle freien ATP-Aktinmonomere in der Zelle. Profilin bindet an das barbed end Aktins und verhindert sterisch eine Anlagerung an das pointed end anderer Aktine und die Keimbildung von Aktinfilamenten. Das pointed end des gebundenen Aktinmonomers verbleibt frei und kann an das barbed end von Aktinfilamenten binden. Die Affinität von Profilin für Aktin in Filamenten ist deutlich geringer als das für Aktinmonomere, sodass Profilin nun vom Aktin dissoziiert und das barbed end für weitere Anlagerungen freigegeben wird. Profilin ist ferner ein Nukleotidaustauschfaktor von Aktin und beschleunigt den Austausch von ADP zu ATP in Aktinmonomeren. Dadurch steht es für weitere Anlagerungen an Aktinfilamente als ATP-Aktin zur Verfügung, wodurch Profilin den Aufbau von Aktinfilamenten begünstigt [Goldschmidt-Clermont et al., 1992, Gieselmann et al., 1995].

Auf der Seite des Aktin Abbaus gibt es die Cofilin/Aktin depolymerisierender Faktor (ADF)-Familie. Vertreter dieser Familie können Aktinfilamente an den Enden depolymerisieren oder Aktinfilamente schneiden. Sie binden dabei bevorzugt an ADP-Aktin, also Aktin das bereits länger in die Filamente eingebaut ist [Cooper et al., 1986, Carlier et al., 1997]. Cofilin1, auch nicht-muskuläres Cofilin genannt, ist existentiell, ein Knock-out ist bereits im Embryonalstadium lethal in Mäusen. Cofilin2, auch muskuläres Cofilin genannt, wird bevorzugt in Muskeln exprimiert. Es ist nicht wichtig für die Muskelent-

wicklung, jedoch für deren Erhalt. Ein Knockout ist eine Woche nach Geburt lethal. Ein Knockout von ADF hingegen kann von den Cofilinen größtenteils kompensiert werden. Er führt lediglich zu Blindheit aufgrund von einer Verdickung der Cornea [Gurniak et al., 2005, Agrawal et al., 2012, Smith et al., 1996, Ikeda et al., 2003].

Es gibt verschiedene Regulationsmechanismen für Cofilin. Diese verändern entweder die Aktivität oder die subzelluläre Lokalisation Cofilins. Die wichtigste posttranslationale Modifikation ist die Phosphorylierung von Serin an Position 3. Diese Phosphorylierung verhindert ein Binden Cofilins an Aktin und damit sowohl das Schneiden wie auch die Depolymerisation von Aktinfilamenten [Moriyama et al., 1996]. Darüber hinaus findet eine weitere Regulation durch Phospholipide in Form von Phosphatidylinositol, Phosphatidylinositol4-monophosphate und Phosphatidylinositol4,5-bisphosphate statt [Yonezawa et al., 1990]. Oder andere posttranslationale Modifikationen sind S-Glutathionylisierung oder eine Glycolysierung [Kruger et al., 2019, Huang et al., 2013].

Diese vielseitige Regulation von Aktin und aktinregulierenden Proteinen ist wichtig, da das Aktin obengenannte vielseitige Aufgaben erfüllt, intrazellulären Transport, Zellmorphologie und -bewegung, Muskelkontraktion und Zellteilung. Interessant für meine Fragestellung ist, dass Filopodia und Wachstumskegel in Neuronen mit Aktin gefüllt sind [Kuczmarski and Rosenbaum, 1979]. Die Richtung des Wachstums von Axonen wird durch suchende Filopodia gesteuert [Letourneau, 1975]. Die Polymerisation von Aktin kann je einzeltem Filament eine Kraft um die 1 pN ausüben, die durch Bündelung von mehreren Filamenten verstärkt werden kann und die Zellmembran ausstülpen kann [Kovar and Pollard, 2004].

2.3 Biotin-Streptavidin-Pulldown

Der Pulldown ist eine Art von Chromatographie. Bei einer Chromatographie trennt man ein Gemisch an Substanzen in Lösung je nach seinen Eigenschaften auf. Es gibt eine feste Phase und die Substanzen in Lösung interagieren mehr oder weniger mit dieser festen Phase und werden so zurückgehalten. Dadurch wird das Gemisch in Abhängigkeit seiner Interaktion mit der festen Phase aufgetrennt. Ein Beispiel hierfür sind die Ionen-Austausch-Chromatographien. Bei der Anionen-Austausch-Chromatographie nutzt man eine positiv geladene Säule als feste Phase. Negativ geladene Proteine, also Proteine deren isoelektrischer Punkt niedriger als der pH der Lösung ist, binden als Anionen über elektrostatische Anziehung an die Säule. Die Elution erfolgt über einen pH-Wechsel der die Proteine umlädt, oder über Erhöhung der Ionenkonzentration, was

2 Einleitung

die elektrostatische Anziehung abschwächt. Umgekehrt binden bei Kationen-Austausch-Chromatographie positiv geladene Proteine, also Proteine deren isoelektrischer Punkt höher als der pH der Lösung ist, als Kationen an eine negativ geladene Säule. Diese Möglichkeit der Proteinchromatographie wurde bereits vor über 60 Jahren beschrieben [Sober and Peterson, 1958].

Für gezielte Proteinfällung kann man sich spezifische Interaktionen zunutze machen. So hat Shimazaki das Gift der Joro-Spinne, das an AMPA-selektive Glutamat (GluA)-Rezeptoren bindet und diese inhibiert, genutzt um GluA-Rezeptoren aufzureinigen [Shimazaki et al., 1992]. Wenn kein natürlicher starker Interaktionspartner vorhanden ist, kann man Antikörper gegen das zu fällende Protein einsetzen, wenn es Antikörper gibt, die spezifisch an das Protein binden.

Durch gentechnische Manipulation kann man ein Protein mit einem Tag in der Primärstruktur versehen, anhand dessen man das Protein aufreinigen kann. Hier findet die Interaktion mit der festen Phase zwischen dem Tag und der Säule statt und ist unabhängig vom nativen Protein. Ein Beispiel hierfür ist der His-Tag. Ein oder mehrere Hexahistidine, eine Folge von 6 Histidinen, wird an das Protein kloniert. Diese Hexahistidine haben eine metallchelatierende Wirkung und können an bestimmte Metallionen in der festen Phase binden. Als feste Phase nutzt man üblicherweise Nickel-Nitrilotriessigsäure-Agarose. Zur Elution verwendet man Imidazol, der Seitengruppe von Histidin, wodurch man das Hexahistidin von den Nickelionen verdrängt und das Protein somit eluiert [Hochuli et al., 1987].

Bei einem Pulldown wird ein Zielmolekül oder bait an der festen Phase verankert. Dessen Interaktionspartner, prey genannt, binden aus einem Gemisch von Proteinen heraus daran und verbleiben ebenfalls an der festen Phase. Diese Interaktionspartner können im Anschluss eluiert und identifiziert oder quantifiziert werden.

Im Falle von Nedd8 ist es kein klassischer Pulldown, da der prey Nedd8 kovalent an die Interaktionspartner gebunden wird. Nedd8 und Interaktionspartner sind also bereits vor dem Pulldown miteinander verbunden und binden nicht erst an der Säule aneinander. Nedd8 und Interaktionspartner sind durch eine kovalente Bindung miteinander verbunden, die äußerst stabil ist. Die Härte des Waschens hängt in diesem Fall nicht von der Interaktion zwischen bait und prey ab, sondern davon wie stabil der prey Nedd8 an die Säule gebunden ist. Benötigt wird also eine sehr starke Interaktion um Nedd8 an der festen Phase zu fixieren. Die Bindung zwischen Biotin und Streptavidin ist eine der stärksten bekannten nicht-kovalenten Bindungen. Die Dissoziationsrate ist so niedrig, dass sie nur indirekt über die Assoziations- und Austauschrate abgeschätzt werden

kann [Green, 1990]. Darüber hinaus ist die Bindung so stabil, dass selbst Bedingungen, die die meisten Proteine denaturiert hätten, wie hohe Temperaturen, 6 M Guanidiniumhydrochlorid oder 8 M Harnstoff, die Bindung nicht auflösen können [González et al., 1999].

Ein Ansatz, um ein Zielprotein zu biotinylieren, verwendet die Biotin-Ligase BirA aus *E.coli*. Diese biotinyliert ihr natürliches Substrat, das Biotin Carboxyl Carrier Protein, das als 75 Aminosäuren-Protein an das Zielprotein fusioniert werden kann [Cronan, 1990]. Mittels Phage-Display konnte eine minimale Biotinylierungssequenz für BirA gefunden werden. Diese ist mit 14 Aminosäuren deutlich kleiner als das ursprünglich verwendete Biotin Carboxyl Carrier Protein, wird aber im gleichen Maße biotinyliert [Beckett et al., 1999]. Diese Sequenz wird im folgenden Avi-Tag genannt.

3 Zielsetzung

Das erste Ziel dieser Arbeit ist es, eine Methode zu entwickeln alle neddylierten Proteine einer untersuchten Probe zu identifizieren. Hierbei sollen insbesondere Proteine der prä-synaptischen Maschinerie gefunden werden, die neddyliert werden. Die Identifizierung soll gewebespezifisch ablaufen, sodass man das Neddylom unterschiedlicher Zellen, zum Beispiel von Neuronen und der sie umgebender Oligodendrozyten, getrennt voneinander betrachten kann. Dadurch kann zum einen potentiell unterschiedliche Regulierung durch Neddylierung in unterschiedlichen Zelltypen aufgezeigt werden, während solche Feinheiten der Regulation in nicht gewebespezifischen Untersuchungen unentdeckt bleiben. Zum anderen kann so die relative Proteinmenge eines bestimmten Zelltyps in der Analyse erhöht werden. Hierdurch können Proteine, die spezifisch für einen Zelltyp sind und nicht global abundant sind, angereichert werden und haben somit eine verbesserte Chance in unvoreingenommenen Analysemethoden wie Massenspektrometrie entdeckt zu werden. Darüber hinaus sollte diese Methode auch die von Rabut aufgestellten Kriterien für eine Neddylierung erfüllen [Rabut and Peter, 2008].

Das zweite Ziel dieser Arbeit ist es, das neddylierte Protein zu finden, das für das filopodienartige Aussehen der Spines nach MLN-4924-Behandlung in Zellkultur verantwortlich ist, wie sie in der Arbeit von Annette Vogl beschrieben sind [Vogl et al., 2015]. Filopodiaartige Spines werden als unreife Spines angesehen, die sich zu reifen Spines weiterentwickeln. Nedd8 scheint in der Reifung der Spines eine wichtige Rolle zu spielen. Um den Einfluss der Neddylierung auf die Reifung zu bestimmen, muss das neddylierte Protein identifiziert werden, das die Reifung beeinflusst. Nach Identifikation des Proteins ist der Einfluss der Neddylierung auf das Protein und die Zelle zu charakterisieren. Auch hier sollten nach Möglichkeit die von Rabut aufgestellten Kriterien für eine Neddylierung erfüllt sein.

4 Material und Methoden

4.1 Material

Tabelle 1: Geräte

Gerät	Hersteller / Lieferant
Horizontalschüttler	GFL 3005
Vortexer	Scientific Industries Vortex Genie 2
Mini-Zentrifuge	Biozym
Glasplatten, short und +spacer	Bio-Rad
Gelelektrophorese Strom-/Spannungs-quelle	Bio-Rad, PowerPac basic
Thermocycler	Biometra, Professional Trio
Magnetrührer	IKA, RCT basic
Thermomixer	eppendorf, Thermomixer compact
Pipetten	Gilson, Pipetman
Magnetständer	Invitrogen, dynal
Ultraschall	Bandelin, Sonopuls
Zellkulturpumpe	Integra, Vacusafe

Tabelle 2: Proteinstrukturen

Protein	PDB-ID	Publikation
Cofilin1	4bex	[Klejnot et al., 2013]
UBC12 und Nedd8	4P5O	[Scott et al., 2014]
PSD-95	6spv	[Rodzli et al., 2020]

Tabelle 3: Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Chemikalie	Hersteller / Lieferant
2-Mercaptoethanol	Sigma
Glycerol (86-89%)	Sigma-Aldrich
Ethanol	Merck
Methanol	Appllichem
2-Propanol	VWR
Deoxycholic Acid Sodium Salt	Calbiochem
Ponceau S	Sigma-Aldrich
1,10-Phenanthroline, anhydrous	Alfa Aesar
Triton X-100	Sigma
Tween20	Sigma
Urea	VWR
Sodium dodecyl sulfate	Merck
Titriplex II (EDTA)	Merck
Tris Base	Promega
Ammonium Persulfate	Sigma
Bromophenol Blue	Sigma-Aldrich
Tricin	Roth
Bicin	Roth
Chloramphenicol	Roth
Guanidine Hydrochloride	Amresco
N-Ethylmaleimide	Merck
HEPES	Sigma
Iodoacetamide	Amresco
Silbernitrat	Roth
Natriumthiosulfat	Roth
MES	Roth
Kaliumchlorid	Roth
Sodium azide	Sigma-Aldrich
Sodium orthovanadate	Sigma
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck
Natriumdihydrogenphosphat	Merck
Sodium acetate	Sigma
Natriumchlorid	Merck

Tabelle 4: Chemikalien und Verbrauchsmaterial 2

Chemikalie	Hersteller / Lieferant
Natriumhydroxid	Applichem
Salzsäure	VWR
Agarose Standard	Roth
Milchpulver	babylove Kindergetränk
Roti-Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Roth
Roti-Phenol	Roth
30% Acrylamide/Bis solution 19:1	Bio-Rad
TEMED	Sigma
Pierce Streptavidin Magnetic Beads	Thermo Scientific
D-Biotin	BioChemica
Carbenicillin	Roth
Kanamycin sulfate	USB Corp
Ethidium bromid	Sigma
TransIT-293	Mirus
Albumin, Bovine	Sigma
Bisacrylamide 2K	Applichem
Glutaraldehyde, 25%	Polysciences
Trypan Blue Solution (0.4%)	Sigma
Immobilon-P, Immobilon-FL	Merck
Cell Strainer, 40 µm	Corning
Amicon Ultracel - 30K	Merck
Nucleospin Gel and PCR clean-up	Macherey-Nagel
Nucleospin Plasmid	Macherey-Nagel
Nucleobond Xtra Midi	Macherey-Nagel
Nucleobond Xtra Midi EF	Macherey-Nagel
Nucleobond Xtra Maxi	Macherey-Nagel
Phase Lock Gel Light 2 mL	eppendorf
0,5 mL Reagiergefäß	Sarstedt
1,5 mL Reagiergefäß	Sarstedt
15 mL Reagiergefäß	greiner bio-one
50 mL Reagiergefäß	Sarstedt
Serologische Pipetten	Sarstedt

Tabelle 5: Puffer

HEK-Medium	500 mL Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco), 50 mL fetal calf serum (Gibco), 5 mL Penicillin/Streptomycin (Gibco)
PBS	130 mM Natriumchlorid, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , pH 7,4
Trypsin	45 mL PBS, 5 mL 0.25% Trypsin-EDTA (Gibco)
TEV-Puffer	50 mM Tris Base, 100 mM Natriumchlorid, pH 8,0
RIPA	50 mM Na ₂ HPO ₄ , 130 mM Natriumchlorid, 0,1% (w/v) SDS, 1% (v/v), Triton X-100, 0,5% (w/v) Natriumdeoxycholat, pH 7,0
Waschpuffer2	8 M Harnstoff, 10 mM Tris HCl pH 8,0, 100 mM Na ₂ HPO ₄ pH 8,0, 10 mM Mercaptoethanol, 0,1% (v/v) Triton X-100
Waschpuffer3	8 M Harnstoff, 2,5 mM Tris HCl pH 6,8, 100 mM Na ₂ HPO ₄ pH 6,2, 10 mM Mercaptoethanol, 0,1% (v/v) Triton X-100
Ladepuffer	13% (v/v) Glycerol, 37,5 mM Tris HCl pH 6,8, 2,9% (w/v) SDS 3,3% (v/v) Mercaptoethanol, 40 mM Biotin
PAGE-Laufpuffer	25 mM Tris Base, 192 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS, pH 8-9
Transferpuffer	25 mM Tris Base, 192 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol, pH 8-9
TBS	10 mM Tris Base, 150 mM Natriumchlorid, pH 7,6

Tabelle 6: Antikörper

Rabbit anti-GFP	1:500	Abcam
Mouse anti-Aktin	1:1.000	Sigma
Rabbit anti-pCofilin (S3) (77G2)	1:1.000	Cell Signaling Technologies
Mouse anti-PSD-95 (K28/43)	1:1.000	Neuromab
Mouse anti-GFP (N86/8)	1:1.000	Neuromab
Streptavidin, HRP	1:5.000	Thermo Scientific
Streptavidin, IRDye 680RD	1:5.000	Li-Cor
Goat anti-Mouse, IRDye 680RD	1:2.000 - 1:10.000	Li-Cor
Goat anti-Mouse, IRDye 800CW	1:2.000 - 1:10.000	Li-Cor
Goat anti-Rabbit, IRDye 680RD	1:2.000 - 1:10.000	Li-Cor
Goat anti-Rabbit, IRDye 800CW	1:2.000 - 1:10.000	Li-Cor

Tabelle 7: Zusammensetzung Polyacrylamidgele

	5 mL	10 mL	15 mL	20 mL	25 mL	30 mL	40 mL	50 mL
6%								
H ₂ O	2.6	5.3	7.9	10.6	13.2	15.9	21.2	26.5
30% acrylamide mix	1	2	3	4	5	6	8	10
1.5 M Tris (pH 8.8)	1.3	2.5	3.8	5	6.3	7.5	10	12.5
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10% APS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.004	0.008	0.012	0.016	0.02	0.024	0.032	0.04
8%								
H ₂ O	2.3	4.6	6.9	9.3	11.5	13.9	18.5	23.2
30% acrylamide mix	1.3	2.7	4	5.3	6.7	8	10.7	13.3
1.5 M Tris (pH 8.8)	1.3	2.5	3.8	5	6.3	7.5	10	12.5
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10% APS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.003	0.006	0.009	0.012	0.015	0.018	0.024	0.03
10%								
H ₂ O	1.9	4	5.9	7.9	9.9	11.9	15.9	19.8
30% acrylamide mix	1.7	3.3	5	6.7	8.3	10	13.3	16.7
1.5 M Tris (pH 8.8)	1.3	2.5	3.8	5	6.3	7.5	10	12.5
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10% APS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02
12%								
H ₂ O	1.6	3.3	4.9	6.6	8.2	9.9	13.2	16.5
30% acrylamide mix	2	4	6	8	10	12	16	20
1.5 M Tris (pH 8.8)	1.3	2.5	3.8	5	6.3	7.5	10	12.5
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10% APS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02
15%								
H ₂ O	1.1	2.3	3.4	4.6	5.7	6.9	9.2	11.5
30% acrylamide mix	2.5	5	7.5	10	12.5	15	20	25
1.5 M Tris (pH 8.8)	1.3	2.5	3.8	5	6.3	7.5	10	12.5
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10% APS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02

4.2 Methoden

4.2.1 F/G Aktin Separation

HEK-Zellen werden in 6-well Schalen ausgesät und entsprechend dem Experiment behandelt.

Zur Ernte wird das Medium von den Zellen abgesaugt. Die Zellen werden mit 4 mL PBS gewaschen. Dann mit 500 μ L Trypsin abgelöst und in 1,5 mL Reagiergefäß überführt. Dort wird das Trypsin mit 1 mL Medium inaktiviert. Die Zellen werden bei 1000 g für 3' pelletiert. Der Überstand wird abgesaugt und das Pellet in 1 mL PBS resuspendiert und gewaschen. Im Anschluss werden die Zellen wie zuvor pelletiert. Der Überstand wird erneut abgesaugt und 100 μ L PBS zu den Zellen gegeben, diese aber nicht resuspendiert. Die gleiche Menge von eiskaltem 2x PHEM (600 mM PIPES, 200 mM HEPES, 100 mM EGTA, 20 mM $MgCl_2$) mit 2% Triton wird zugeben und die Zellyse mittels eines Dounce Homogenisators unterstützt. Danach werden die Proben für 15' auf Eis ruhen gelassen und anschließend für 10' mit Höchstgeschwindigkeit zentrifugiert. 80%, also 160 μ L des Überstandes, welcher das G-Aktin enthält, wird abgenommen und nach Zugabe von 40 μ L 5x Ladepuffer für 10' aufgekocht. Der restliche Überstand wird abgenommen, ohne das Pellet zu berühren. Das Pellet, welches das F-Aktin enthält, wird in 250 μ L 1x Ladepuffer, der aus 5x Ladepuffer + PHEMT besteht, resuspendiert und für 10' aufgekocht. Die gleichen Volumina von F- und G-Aktin werden auf ein 10% Acrylamid-Gel geladen und ein Western Blot durchgeführt, um die Verteilung von F- und G-Aktin zu quantifizieren.

4.2.2 Zellkultur

Proteinexpression wird standardmäßig in Human Embryo Kidney (HEK)-Zellen durchgeführt. Die Zellen werden dreimal wöchentlich 1:10 gesplittet. Hierfür werden sie mit phosphatbuffered saline (PBS) gewaschen, mit Trypsin bei Raumtemperatur abgelöst und vereinzelt. Die Trypsinreaktion wird mit frischem Medium abgestoppt, die Zellen mechanisch vereinzelt, durchmischt und auf neue Schalen verteilt.

Zur Transfektion wird in 6 cm-Schalen zu einer etwa 70%igen Konfluenz ausgesät. Nach 2-3 Stunden wird ein Transfektionsansatz vorbereitet, dazu wird in 500 μ L Medium ohne Zusätze 7 μ g DNS und 20 μ L TransIT gegeben und für 20' bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wird, falls nötig, Biotin zu den Zellen gegeben und danach der Transfektionsansatz auf die Zellen verteilt.

Üblicherweise exprimieren die Zellen für 2 Tage. Falls benötigt, wird MLN-4924 und Dimethylsulfoxid (DMSO) 1 Tag nach Transfektion zugegeben.

4.2.3 Auftauen von HEK-Zellen

HEK-Zellen werden im Cryotube im Wasserbad bei 37 Grad Celsius (°C) schwenkend erwärmt. Sobald sie aufgetaut sind werden sie in 10 mL warmen Medium überführt und gemischt. Dann für 5' bei 1000 Umdrehungen pro Minute (upm) pelletiert. Der Überstand wird abgenommen und das Zellpellet in 10 mL warmen Medium resuspendiert und auf eine 10 cm-Schale ausplattiert.

4.2.4 Einfrieren von HEK-Zellen

Je eine 10 cm-Schale konfluent gewachsener HEK-Zellen wird mit PBS gewaschen. Mit 1 mL Trypsin inkubiert. Wenn die Zellen abgelöst sind, wird 1 mL Frierschutzmedium zugegeben. Je 1 mL wird in ein Cryotube gegeben und die Zellen in einem isopropanol-gepuffertem Einfrierständer mit einer Rate von $-1^{\circ}\text{C} / \text{Minute}$ im -80°C -Gefrierschrank eingefroren. Am folgenden Tag werden die Zellen zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff oder in einen -150°C -Gefrierschrank überführt.

4.2.5 SDS-PAGE

Sodium Dodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese nach Lämmli wird zum Trennen von Proteinen nach ihrer apparenten molekularen Masse verwendet [Laemmli, 1970]. Proben werden mit modifiziertem Lämmli-Ladepuffer für 10 bis 15' aufgekocht und auf Polyacrylamidgele aufgetragen. Die Rezeptur für verschiedene Dichten und Volumina von Polyacrylamidgelen ist in 7 aufgeführt.

Die Trennung wird bei konstanter Spannung durchgeführt. Eine niedrigere Spannung von 70 V wird für das Durchlaufen des Sammelgels verwendet, die auf 100 V erhöht wird, sobald die Proben das Trenngel erreicht haben.

4.2.6 Western Blot

Die Proteine aus dem Polyacrylamidgel werden im Tankblot auf PVDF-Membranen übertragen. Dies erfolgt entweder bei 100 V für 1 - 1 $\frac{1}{2}$ Stunden, oder bei 30 V über Nacht. Die Membran wird für eine $\frac{3}{4}$ Stunde getrocknet, um die Proteine zu fixieren. Danach wird die Membran für 2 Stunden in 5% Milchpulver oder BSA in TBS geblockt.

Darauf wird die Membran über Nacht bei 4°C rotierend mit dem Primärantikörper inkubiert. Am folgenden Tag wird die Membran dreimal für 10' mit TBS/T gewaschen, für eine Stunde bei Raumtemperatur rotierend mit dem Sekundärantikörper inkubiert und anschließend erneut dreimal für 10' mit TBS/T gewaschen. Die Digitalisierung erfolgt entweder über eine Kameraaufnahme der Chemilumineszenz bei HRP-gekoppelten Antikörpern, oder der Fluoreszenz bei Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern.

4.2.7 Immunpräzipitation

HEK-Zellen werden mit kaltem PBS gewaschen. Dann die Zellen auf Eis mit Radioimmunoprecipitation assay (RIPA)-Puffer mit Proteaseinhiboren lysiert, 1 mL für eine 6 cm-Schale, 0,5 mL für eine 3,5 cm-Schale. Durch Schwenken und mithilfe eines Zellschaber werden die Zellen abgelöst. Anschließend in ein 1,5 mL-Eppi überführt. Dann auf Eis ultraschallbehandelt, bis die Probe homogen ist. 50 µL der Probe wird abgenommen, dies ist das „Lysat“. Zum Rest wird 1 µL α -GFP-Antikörper gegeben und über Nacht bei 4°C rotiert. Die Antikörper-Protein-Komplexe werden mittels 30 µL Dynabeads Protein G gefällt. Dies geschieht rotierend bei 4°C für 4 Stunden. Der Überstand wird abgenommen und die Beads zum Waschen in 200 µL PBS mit 1% Triton X-100 resuspendiert und für 30' bei 4°C rotiert. Dies wird dreimal wiederholt. Die Proteine werden eluiert, indem man sie 5' in 50 µL Lämmli-Puffer bei 98°C aufkocht.

4.2.8 Pulldown

Die ersten Schritte bis einschließlich Abnahme einer Probe als „Lysat“ sind identisch zur Immunpräzipitation. Im Anschluss wird nun 25 µL Streptavidin-Beads hinzugefügt und über Nacht bei 4°C rotiert. Am folgenden Tag werden die Beads erst zweimal mit 1 mL RIPA-Puffer mit Proteaseinhiboren für 5' gewaschen. Dann einmal 1 mL Waschpuffer2 für 15'. Schließlich noch dreimal 1 mL Waschpuffer3 für 15'. Danach werden die Beads ein viertes Mal in Waschpuffer3 resuspendiert und in ein neues Eppi überführt. Dort werden die Beads ein letztes mal angelagert, der Waschpuffer verworfen und anschließend in modifiziertem Ladepuffer für 10' bei 98°C eluiert.

4.2.9 Herstellung elektrokompenter Bakterien

Bakterien auf einer Platte ohne Antibiotika ausstreichen und über Nacht bei 37°C inkubieren. Am nächsten Tag einen einzelnen Klon picken und über Nacht in 50 mL Super

Optimal Broth (SOB)-Medium ohne Antibiotika bei 37°C als Vorkultur inkubieren. Am folgenden Tag zwei Kolben mit 750 mL SOB-Medium ohne Antibiotika mit je 7,5 mL Vorkultur animpfen. Diese bei 37°C inkubieren und bis zu einer optischen Dichte von 0,60 bei 600 nm wachsen lassen. Die Kolben für 15' auf gesalzenem Eis schwenken. Die Bakteriensuspension bei 4°C, 2000 g, 15' in vier Zentrifugenbechern zentrifugieren und Überstand abgießen. Bakterien in je 250 mL eiskaltem 10%-Glycerol durch schwenken auf Eis resuspendieren. Erneut bei gleichen Bedingungen zentrifugieren und Überstand abgießen. Bakterien in je 50 mL eiskaltem 10%-Glycerol durch schwenken auf Eis resuspendieren und je einen Becher in ein 50 mL-Falcon überführen. Die Bakteriensuspension bei 4°C, 2000 g, 15' in vier 50 mL-Falcons zentrifugieren und Überstand abgießen. Bakterien in je 25 mL eiskaltem 10%-Glycerol durch schwenken auf Eis resuspendieren und je zwei 50 mL-Falcon in ein 50 mL-Falcon überführen. Die Bakteriensuspension bei 4°C, 1750 g, 15' in zwei 50 mL-Falcons zentrifugieren und Überstand abgießen. Bakterien in 2 mL eiskaltem 10%-Glycerol durch schwenken auf Eis resuspendieren und vereinigen. Mit eiskaltem 10%-Glycerol verdünnen, sodass eine 1:100 Verdünnung in Glycerol eine optischen Dichte von 1,00 bei 600 nm hat. In 50 µL aliquotieren, in flüssigem Stickstoff schockfrieren und bei -80°C lagern. Bakterien testen, indem 10 pg pUC-19-Vektor elektroporiert wird, Bedingungen siehe unten, und die sich bildenden Kolonien gezählt werden. Es werden etwa 10⁹ Kolonien/µg DNS erwartet.

4.2.10 Transformation elektrokompenter Bakterien

50 µL elektrokompente Bakterien werden auf Eis aufgetaut und mit 1 µL DNS gemischt, entweder aus einer Ligation oder 1:1000 verdünnt im Falle einer Retransformation. Das Gemisch wird in eine gekühlte Küvette überführt und mit den Einstellungen 2,5 kV, 400 Ω, 25 µF elektroporiert. Danach werden die Bakterien in 1 mL Super Optimal broth with Catabolite repression (SOC) mit 37°C überführt und bei der gleichen Temperatur für 30' inkubiert. Danach werden 100 µL Bakterien mit einer Inokulationsöse auf ein Agar-Platte mit dem Plasmid entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen.

4.2.11 DNS-Präparation

Erfolgt nach Herstellerangaben des Kits. In Kurz: Bakterien wachsen über Nacht in Medium mit entsprechendem Antibiotikum, schüttelnd bei 37°C. Bakterien werden abzentrifugiert und in Resuspensionspuffer resuspendiert. Mit Lysepuffer für 5' lysiert. Danach mit Neutralisationspuffer neutralisiert. Zelltrümmer und ausgefallene Chemi-

kalien werden entweder abfiltriert und abzentrifugiert. Die gelöste DNS wird an eine Säule gebunden, gewaschen und anschließend eluiert. Für Präparationen die größer als eine Mini-Präparation sind, erfolgt noch eine Isopropanol-Fällung, gefolgt von einem Ethanolwaschschritt und schließlich lösen in Tris/EDTA-Puffer.

4.2.12 Restriktionsverdau

Etwa 1 µg DNS wird mit Wasser, Puffer und entsprechendem Restriktionsenzym, Fast-Digest von Thermo Fisher, in einem 20 µL-Ansatz gemischt. Die Dauer und Temperatur entsprechen den Herstellerangaben zu dem jeweiligem Enzym. Für Mehrfachverdau werden beide Enzyme zusammen in den Ansatz gemischt. Für Plasmidklonierungen wird 10' vor Ende des Verdaus alkalische Phosphatase zum Plasmidrückgrat gegeben. Dies dient dazu die Phosphatgruppen an den Enden der DNS zu entfernen. Da diese für die Ligation unerlässlich sind, reduziert man so die Anzahl der falsch positiven Klone durch Religation.

4.2.13 PCR

Für einen 50 µL-Polymerase Kettenreaktion (PCR)-Ansatz wird 1 µL Plasmid-DNS oder eine vergleichbare Menge genomischer DNS oder PCR-Produkt mit 10 µL 5x-Puffer, 1 µL dNTPs (je 10 mM), je 1 µL forward und reverse Primer (10 mM), 0,5 µL Phusion-DNA-polymerase (2 u/µL), Rest Wasser.

Standardmäßig sieht ein PCR-Protokoll wie folgt aus. Schmelzen der DNS bei 98°C für 3'. 30 Wiederholungen von Schmelzen bei 98°C für 30 Sekunden ("), Primeranlagerung um die 60°C für 15", gefolgt von 72°C für 15"-30" pro Kilobase für die Verlängerung des DNS-Strangs. Abschließend 5' bei 72°C, um alle Verlängerungen abzuschließen.

Die Temperatur für die Primeranlagerung ist abhängig von der Schmelztemperatur der Primer und wird für jedes Paar entsprechend bestimmt.

4.2.14 Agarose-Gelelektrophorese

Agarose-Gele werden aus erhitzter und verflüssigten Agarose in Tris Acetat EDTA (TAE)-Puffer in Konzentrationen von 0,7-2%, abhängig von der Größe der DNS-Fragmente, aber üblicherweise 1%, mit 0,1 µg mL⁻¹ Ethidiumbromid gegossen.

Die Proben werden mit DNS-Ladepuffer versehen und neben einem Marker auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung im Gel erfolgt in TAE-Puffer bei einem Spannungs-

gradienten von etwa 8 V cm^{-1} .

4.2.15 Gelextraktion

Die Bande gewünschter Größe wird auf einem Blaulicht-Tisch mithilfe eines Skalpells ausgeschnitten. Das Gel wird bei 55°C im Bindepuffer aufgelöst. Die DNS wird an eine Säule gebunden. Dort gebunden wird die DNS gewaschen, getrocknet und schließlich eluiert.

4.2.16 Ligation

Plasmidrückgrat und Einsatz werden im molaren Verhältnis 3 zu 1 – abzuschätzen aus der Bandenintensität im Agarosegel – gemischt, sodass es $15,75 \mu\text{L}$ ergibt. Hierzu kommt $4 \mu\text{L}$ 5x Puffer und $0,25 \mu\text{L}$ Ligase ($5 \text{ u}/\mu\text{L}$). Dieser Ansatz wird bei 16°C über Nacht inkubiert.

4.2.17 Einführen von Punktmutationen

Bei der Einführung von Punktmutationen mittels ortsspezifischer Mutagenese nutzt man zwei komplementäre Primer, die die Punktmutation in ihrer Mitte tragen. Das Primerpaar liegt in einer weiteren „Gesamt-PCR“, welche sich als insert in einen Zielvektor klonieren lässt.

Der Mutationsprimer in Vorwärtsrichtung und der rückwärtsgerichtete Primer der „Gesamt-PCR“ geben die erste Teil-PCR, und die beiden anderen Primer ergeben die zweite Teil-PCR. Nach Aufreinigung werden die PCR-Produkte gemischt und dienen als Vorlage in der „Gesamt-PCR“. Dadurch dass die Mutationsprimer komplementär sind, können sie sich aneinander anlagern und dienen als Primer für den Rest des DNS-Stranges. Somit erhält man einen kompletten Strang, der die Mutation in der Mitte trägt.

4.2.18 PCIA-Extraktion

DNS wird mit gleicher Menge Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (PCIA) in einem Phaselock-Eppi kräftig gemischt. Nach Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit, etwa $21,000 \text{ g}$, für $5'$ wird die DNS-haltige wässrige Phase, üblicherweise oberhalb des Gels, abgenommen. 3 M Natriumacetat wird in Höhe von 10% des Volumens hinzugegeben. Dann wird das $2^{1/2}$ -fache des Volumens an Ethanol hinzugefügt. Die DNS wird dann

bei -20°C über Nacht gefällt. Die DNS wird dann für 30' bei maximaler Geschwindigkeit pelletiert. Das Pellet wird solange mit Ethanol gewaschen, samt erneuter Zentrifugation für 5', bis das Phenol entfernt ist. Anschließend wird der Ethanol verdunstet und die DNS im gewünschtem Puffer gelöst.

4.2.19 Erzeugung eines targeting-Vektors mittels Mini- λ

Erzeugung eines pDTA mit 2 Homologiebereichen

Mittels PCR werden zwei etwa 500 Basenpaare lange Homologiebereiche vom Anfang und Ende des mehrere Kilobasenpaare langen Homologiebereichs für embryonale Stammzell-Rekombination amplifiziert. Beide werden mittels Restriktionsverdau und Ligation in den pDTA-Vektor kloniert, sodass sie direkt neben dem Gen für Diphtherietoxin A liegen. Die Sequenz wird mittels Testverdau und anschließender Sequenzierung bestätigt.

Erzeugung eines pFRT mit 2 Homologiebereichen

Mittels PCR werden zwei etwa 1000 bis 1500 Basenpaare lange Homologiebereiche, die benachbart auf dem durch den Knockin zu modifizierenden Genabschnitt liegen. Dementsprechend wird einer der Homologiebereiche durch das zu verändernde Gen modifiziert. Hier sollte auch eine neue Restriktions-Schnittstelle eingeführt werden, um rekombinierte Klone mittels Southern Blot leichter identifizieren zu können. In der Mitte der beiden Homologiebereiche liegt eine geflippte Neomycin-Transferase, die zur Selektion der embryonalen Stammzellen auf Antibiotikum dient. Die Sequenz wird mittels Testverdau und anschließender Sequenzierung bestätigt.

Mini- λ -Plasmid

Cryostock von Mini-Lambda-Bakterien wird auf einer Platte mit Tetracyclin ausgestrichen und über Nacht bei 32°C wachsen gelassen. Am nächsten Morgen impft man 5 mL LB-Medium mit Tetracyclin mit einer Kolonie als Vorkultur an und lässt diese über den Tag bei 32°C wachsen. Abends impft man mit der Vorkultur 200 mL LB-Medium mit Tetracyclin an und lässt diese über Nacht bei 32°C wachsen. Am nächsten Morgen inkubiert man die Bakterien im Wasserbad bei 42°C schüttelnd für 20'. Danach für 15' auf Eis schüttelnd kühlen. Dann folgt eine Midipräp des Plasmids, nach Herstellerangaben für very-low-copy-Plasmide.

Elektrokompetente DH10B mit BAC-Vektor

Einzelnen Klon aus der entsprechenden BAC-Bibliothek in 3 mL SOB-Medium mit Chloramphenicol animpfen und über Nacht bei 37°C und 220 upm als Vorkultur wachsen lassen. Mit Vorkultur 200 mL SOB-Medium inokulieren und bei 37°C bis zu einer optischen Dichte von 0,35 bei 600 nm wachsen lassen. Bakterien zum Abkühlen für 5' in Eiswasser schütteln. Weitere 10' auf Eis stehen lassen und gelegentlich schütteln. Bakterien bei 4°C, 1700 g, 15' in vier 50 mL-Falcons zentrifugieren. Überstand abschütten und Pellets in je 10 mL eiskaltem autoklavierten Wasser resuspendieren. Je 2 Ansätze vereinigen und weitere 20 mL Wasser zugeben und durchmischen. Erneut unter den gleichen Bedingungen zentrifugieren. Überstand abschütten. Je ein Pellet in 1 mL eiskaltem autoklavierten Wasser resuspendieren und in 1,5 mL-Eppi überführen. Diesmal bei 4°C, 6800g für 20" zentrifugieren. Überstand abnehmen, noch zweimal mit 1 mL Wasser waschen und unter den vorherigen Bedingungen zentrifugieren. Schließlich Pellet in 100 µL Wasser resuspendieren und je 50 µL in frische gekühlte Eppis überführen und nach Möglichkeit direkt verwenden.

Transformation Mini-λ in elektrokompetente DH10B mit BAC-Vektor

100 ng Mini-λ-Plasmid wird mit 50 µL elektrokompetenten DH10B mit BAC-Vektor gemischt und in eisgekühlten Küvetten elektroporiert. Die Bedingungen hierfür sind 25 µF, 200 Ω und 1,75 kV. Nach Elektroporation zügig das SOC-Medium zugeben und dann 1 Stunde bei 32°C, 300 upm schüttelnd inkubieren. Zellen zentrifugieren, Überstand abnehmen und Pellet in 100 µL Medium resuspendieren und auf Platten mit Chloramphenicol und Tetracyclin ausstreichen. Über Nacht bei 32°C wachsen lassen, es kann 20 Stunden dauern bis Kolonien erscheinen.

Zum Testen der Temperatursensitivität werden 10 Kolonien je auf zwei Platten, beide mit Chloramphenicol und Tetracyclin, ausgestrichen. Die zuerst ausgestrichene Platte wird bei 42°C, die andere bei 32°C inkubiert. Klone, die auf der 42°C Platte sterben, exprimieren Mini-λ-Gene und können von der 32°C-Platte verwendet werden.

Induzierte und elektrokompetente DH10B mit BAC-Vektor mit Mini-λ

Einen einzelnen Klon in 3 mL LB-Medium mit Chloramphenicol und Tetracyclin animpfen und über Nacht bei 32°C und 220 upm als Vorkultur wachsen lassen. Mit Vorkultur 200 mL LB-Medium mit Chloramphenicol und Tetracyclin inokulieren und bei 32°C bis zu einer optischen Dichte von 0,30 bei 600 nm wachsen lassen. Optional: 1/3 der Bakte-

rien verbleibt als nicht induzierte Kontrolle bei 32°C, der Rest wird im Wärmebad bei 42°C, für 15-20' geschüttelt. Bakterien zum Abkühlen für 5' in Eiswasser schütteln. Im Anschluss weitere 10' auf Eis stehen lassen und gelegentlich schütteln. Bakterien bei 4°C, 1700 g, 15' in sechs 50 mL-Falcons zentrifugieren. Überstand abschütten und Pellets in je 10 mL eiskaltem autoklavierten Wasser resuspendieren. Je 2 Ansätze vereinigen und weitere 20 mL Wasser zugeben und durchmischen. Erneut bei gleichen Bedingungen zentrifugieren. Überstand abschütten. Je ein Pellet in 1 mL eiskaltem autoklavierten Wasser resuspendieren und in 1,5 mL-Eppi überführen. Erneut bei 4°C, 6800 g für 20" zentrifugieren. Überstand abnehmen und noch zweimal mit 1 mL Wasser waschen, bei gleichen Zentrifugationsbedingungen. Pellet in 100 µL Wasser resuspendieren und je 50 µL in frische gekühlte Eppis überführen und direkt verwenden.

Transformation pDTA mit 2 Homologiebereichen in induzierte und elektrokompetente DH10B mit BAC-Vektor mit Mini-λ

1 µg pDTA mit 2 Homologiebereichen, siehe Seite 32, linearisieren und über Gelextraktion reinigen. 100 ng DNS mit 50 µL induzierten und elektrokompetenten DH10B mit BAC-Vektor und Mini-λ mischen und elektroporieren. Die Bedingungen hierfür sind 25 µF, 200 Ω und 1,75 kV. Zügig das SOC-Medium zugeben und ins Eppi überführen, dann 1 Stunde bei 32°C und 220 upm schüttelnd inkubieren. Zellen zentrifugieren, Überstand abnehmen und Pellet in 100 µL Medium resuspendieren und auf Platten mit Tetracyclin und Carbenicillin austreichen. Über Nacht bei 32°C wachsen lassen. Es kann 20 Stunden dauern bis Kolonien erscheinen. 20-24 Minipreps von Kolonien machen. Positive Klone durch Testverdau und folgender Sequenzierung bestimmen.

Dies ergibt rekombiniertes pDTA.

Elektrokompetente Bakterien mit Mini-λ

Einen einzelnen Klon in 3 mL LB-Medium mit Tetracyclin animpfen und über Nacht bei 32°C und 220 upm als Vorkultur wachsen lassen. Mit Vorkultur 100 mL LB-Medium mit Chloramphenicol und Tetracyclin inokulieren und bei 32°C bis zu einer optischen Dichte von 0,35 bei 600 nm wachsen lassen. Bakterien zum Abkühlen für 5' in Eiswasser schütteln. Im Anschluss weitere 10' auf Eis stehen lassen und gelegentlich schütteln. Bakterien bei 4°C, 1700 g, 15' in zwei 50 mL-Falcons zentrifugieren. Überstand abschütten und Pellets in je 10 mL eiskaltem autoklavierten Wasser resuspendieren. Beide Ansätze vereinigen und weitere 20 mL Wasser zugeben und durchmischen. Erneut bei gleichen

Bedingungen zentrifugieren. Überstand abschütten. Das Pellet in 1 mL eiskaltem autoklavierten Wasser resuspendieren und in 1,5 mL-Eppi überführen. Erneut bei 4°C, 6800 g für 20“ zentrifugieren. Überstand abnehmen und noch zweimal mit 1 mL Wasser waschen, bei gleichen Zentrifugationsbedingungen. Pellet in 100 µL Wasser resuspendieren und je 50 µL in frische gekühlte Eppis überführen und direkt verwenden.

Transformation von rekombiniertem pDTA in elektrokompetente Bakterien mit Mini-λ

1 µL rekombiniertes pDTA, siehe Seite 34, 1:100 bis 1:1000 verdünnt verwenden. DNS mit 50 µL elektrokompetenten Bakterien mit Mini-λ mischen und elektroporieren. Die Bedingungen hierfür sind 25 µF, 200 Ω und 1,75 kV. Zügig das SOC-Medium zugeben und ins Eppi überführen, dann 1 Stunde bei 32°C und 300 upm schüttelnd inkubieren. Zellen zentrifugieren, Überstand abnehmen und Pellet in 100 µL Medium resuspendieren und auf Platten mit Tetracyclin und Carbenicillin ausstreichen. Über Nacht bei 32°C wachsen lassen. Es kann 20 Stunden dauern bis Kolonien erscheinen. 3-4 Minipreps von Kolonien machen. Positive Klone durch Testverdau bestätigen.

Temperatursensitivität der Klone testen, siehe Seite 33.

Induzierte und elektrokompetente Bakterien mit Mini-λ und pDTA

Einen einzelnen Klon in 3 mL LB-Medium mit Tetracyclin und Carbenicillin animpfen und über Nacht bei 32°C und 220 upm als Vorkultur wachsen lassen. Mit Vorkultur 200 mL LB-Medium mit Tetracyclin und Carbenicillin inokulieren und bei 32°C bis zu einer optischen Dichte von 0,30 bei 600 nm wachsen lassen. Die Bakterien werden ins Wärmebad bei 42°C gestellt, wo sie für 15-20' geschüttelt werden. Bakterien zum Abkühlen für 5' in Eiswasser schütteln. Im Anschluss weitere 10' auf Eis stehen lassen und gelegentlich schütteln. Bakterien bei 4°C, 1700 g, 15' in vier 50 mL-Falcons zentrifugieren. Überstand abschütten und Pellets in je 10 mL eiskaltem autoklavierten Wasser resuspendieren. Je 2 Ansätze vereinigen und weitere 20 mL Wasser zugeben und durchmischen. Erneut bei gleichen Bedingungen zentrifugieren. Überstand abschütten. Je ein Pellet in 1 mL eiskaltem autoklavierten Wasser resuspendieren und in 1,5 mL-Eppi überführen. Erneut bei 4°C, 6800 g für 20“ zentrifugieren. Überstand abnehmen und noch zweimal mit 1 mL Wasser waschen, bei gleichen Zentrifugationsbedingungen. Pellet in 100 µL Wasser resuspendieren und je 50 µL in frische gekühlte Eppis überführen und direkt verwenden.

Transformation von pFRT mit 2 Homologiebereichen in induzierte und elektrokompetente Bakterien mit Mini- λ und pDTA

1 μg pFRT mit 2 Homologiebereichen, siehe Seite 32, linearisieren und über Gelextraktion reinigen. 100 ng DNS mit 50 μL induzierten und elektrokompetenten Bakterien mit Mini- λ und pDTA mischen und elektroporieren. Die Bedingungen hierfür sind 25 μF , 200 Ω und 1,75 kV. Zügig das SOC-Medium zugeben und ins Eppi überführen, dann 1 Stunde bei 32°C und 300 upm schüttelnd inkubieren. Zellen zentrifugieren, Überstand abnehmen und Pellet in 100 μL Medium resuspendieren und auf Platten mit Carbenicillin und Kanamycin austreichen. Über Nacht bei 32°C wachsen lassen. Es kann 20 Stunden dauern bis Kolonien erscheinen. 24 Minipreps von Kolonien machen. Positive Klone durch Testverdau und folgender Sequenzierung bestimmen.

Dies ergibt rekombiniertes pFRT. Für eine Elektroporation werden 200 μg endotoxinfreie DNS benötigt. Dafür positives Plasmid in Standard E.coli retransformieren und endotoxinfreie Maxipräparation durchführen.

4.2.20 Erzeugung einer transgenen Maus mittels eines targeting-Vektors

Erzeugung rekombinierter Stammzellen

Dies wurde größtenteils von der AG Schweitzer oder der Transgene Maus Facility der Universität Hamburg durchgeführt. Die durchgeführten Schritte kurz zusammengefasst:

200 μg targeting-Vektor wird linearisiert und über eine Säule aufgereinigt. Embryonale Stammzellen werden mit dem targeting-Vektor elektroporiert und auf Feeder Zellen wachsen gelassen. Einzelklone werden mit Geneticin selektiert und vermehrt. Genomische DNA der Klone wird extrahiert. Durch PCR wird kontrolliert, ob der Knockin vorhanden ist, oder durch DNS-Reparaturmechanismen durch den Wildtyp ersetzt wurde. PCR-positive Klone werden mittels Southern Blot untersucht, um zu bestimmen ob eine homologe Rekombination oder eine zufälliger Insertion stattgefunden hat. Southern Blot-positive Klone werden sequenziert, um Mutationen im Transgen auszuschließen. Falls man mehrere nutzbare Klone erhält, kann man den oder die aussichtsreichsten Kandidaten durch Karyotypisierung bestimmen.

Erzeugung einer gentechnisch veränderten Maus

Dies wurde größtenteils von dem Haus für experimentelle Therapie der Universität Bonn oder der Transgene Maus Facility der Universität Hamburg durchgeführt. Die durchgeführten Schritte kurz zusammengefasst:

Aus schwangeren Mäusen werden Embryonen im Morula-Stadium entnommen. Die rekombinierten embryonalen Stammzellen werden in die Morula injiziert und die Chimäre in eine scheinchwangere Maus eingepflanzt. Von dieser Leihmutter werden sie austragen und geboren. Die Mauslinie der embryonalen Stammzellen und die Mauslinie der Morula-spendenden Tiere haben unterschiedliche Fellfarbe. Somit kann man anhand der Fellfarbe der geborenen Chimären den transgenen Anteil der Tiere abschätzen. Aus den Chimären kann man heterozygote Tiere durch nachfolgende Verpaarungen gewinnen, sofern die transgenen Zellen auch in der Keimbahn vorhanden sind.

Durch Verpaarung mit Deleter-FLPe-Mäusen kann die geflippte Neomycinresistenzkassette entfernt werden. Dadurch bleibt fast ausschließlich der Knockin im Genom der transgenen Maus zurück.

5 Ergebnisse

5.1 Neddylierung synaptischer Proteine

In einer vorangegangenen Arbeit [Brockmann et al., 2019] haben wir gezeigt, dass unter Einfluss von MLN-4924 das Input-Output-Verhältnis hippocampaler CA1-Synapsen verringert ist. Dies gilt sowohl für Ströme, die durch GluA-, als auch N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren vermittelt werden. Im folgenden soll nun untersucht werden, ob GluA-Rezeptoren neddyliert werden, was eine Grundvoraussetzung für eine direkte Kontrolle von Nedd8 auf die Rezeptorströme ist.

5.1.1 Immunpräzipitation von GluA-Rezeptor 1

Zur besseren Lesbarkeit kürze ich im folgenden homotetrameren Glutamaterezeptor bestehend aus GluA1-Untereinheiten mit GluA-Rezeptor ab.

Ich habe mit einem GluA-Rezeptor-grün fluoreszierendes Protein (GFP)-Fusionsprotein, bzw. mit GFP transfizierte Zellen geerntet und das Lysat im Western Blot untersucht (s. Abb. 5.1). GFP alleine zeigt eine starke Bande bei den erwarteten 30 kDa. Die GluA-Rezeptoren jedoch haben keine Bande bei den erwarteten 130 kDa für das Fusionsprotein, stattdessen ein hochmolekulareres verschwommenes Signal. Dies deutet darauf hin, dass die Rezeptoren aggregieren und nicht ordnungsgemäß ins Trenngel einlaufen (siehe * in Abbildung 5.1). Dies tritt regelmäßig bei Transmembranproteinen, wie den GluA-Rezeptoren auf, wenn diese erhitzt werden.

Im Folgenden habe ich deswegen verschiedene Dauern des Aufkochens im Ladepuffer untersucht. 0', also kein Aufkochen, 5' und 20' bei 98 °C (s. Abb. 5.2). Während der fehlenden Zeit auf 20' werden die Proben auf 30 °C gehalten. Werden die Proben nur bei 30 °C inkubiert, kann man, im Gegensatz zu den aufgekochten Proben, Banden bei 130 kDa sehen. Diese sind relativ breit und unscharf, was daran liegt, dass die Proteine durch das mangelnde Aufkochen nicht vollständig entfaltet sind. Somit haben sie keine einheitliche Struktur und Laufverhalten, was in aufgeweiteten Banden resultiert.

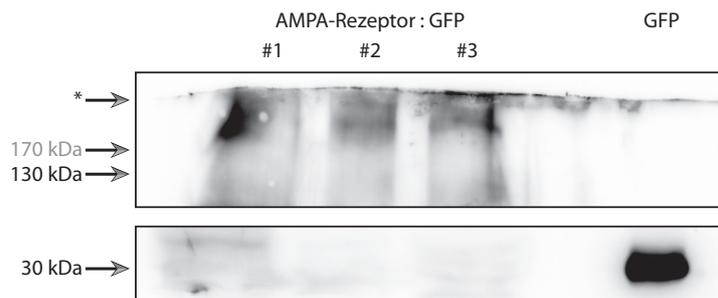


Abbildung 5.1: **GluA-Rezeptor läuft nicht in Trenngel ein.** Western Blot, Detektion mit GFP-Primärantikörper. Es wurden Lysate von mit GluA-Rezeptor-GFP-Fusionsprotein oder mit GFP transfizierter HEK-Zellen aufgetragen. Die erwarteten Molekulargewichte betragen 130 kDa respektive 30 kDa. Mit einem * ist die obere Kante des Trenngels markiert.

Um dieses Problem zu lösen, teste ich verschiedene Bedingungen (s. Abb. 5.3). Zum einen wird die Temperatur mit 30 °C, 60 °C und 98 °C variiert, als auch die Menge an Sodium Dodecylsulfat (SDS) im Ladepuffer, die entweder die üblicherweise verwendeten 1% oder erhöhte 4% beträgt.

Die Erhöhung der SDS-Konzentration auf 4% erlaubt es, die Proben aufzukochen, da das Detergens die hydrophoben Bereiche maskiert. Das SDS hält mit der negativ geladenen Sulfatgruppe Proteine in Lösung. Auch hält die negative Ladung Proteine von anderen Proteinen fern und eine Aggregation der Proteine wird somit verhindert.

Im nächsten Experiment wird GluA-Rezeptor-GFP und Flag-Nedd8 überexprimiert. Die Immunpräzipitation ist gegen GFP gerichtet. Im Western Blot verwende ich Antikörper gegen GluA-Rezeptor (siehe Abbildung 5.4A) als Kontrolle der Immunpräzipitation und Antikörper gegen Flag (siehe Abbildung 5.4B) zur Ermittlung der Kopräzipitation von Nedd8. Als Negativkontrolle gegenüber dem nativen GluA-Rezeptor wird die Vierfach-Mutante GluA-Rezeptor(K831, 837, 840, 886R) verwendet, die kein intrazelluläres Lysin besitzt. Da nur intrazelluläre Lysine neddyliert werden können, ist dies eine neddylierungsdefiziente Mutante. Diese Mutante sollte im GluA-Rezeptor-Blot vergleichbare Banden zum Wildtyp liefern, da beides Fusionsproteine mit GFP sind, die jeweils präzipitiert werden. Im Flag-Blot sollte die Bande jedoch nicht vorhanden sein, da die Mutante nicht neddyliert werden kann. Des weiteren habe ich in einem Ansatz Stargazin koexprimiert, welches in Neuronen nötig ist, um GluA-Rezeptoren in die Zellmembran zu transportieren.

In Abbildung 5.4 kann man erkennen, dass die Koexpression von Stargazin keinen Ein-

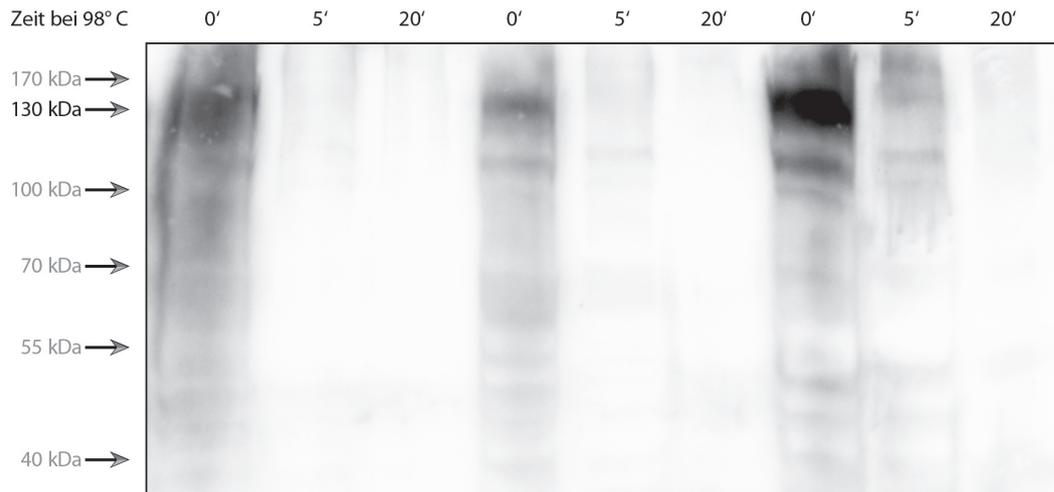


Abbildung 5.2: **Dauer des Aufkochens bestimmt wie gut GluA-Rezeptoren ins Trenngel einlaufen.** Western Blot, Detektion mit GFP-Primärantikörper. Es wurden mehrere Lysate von mit GluA-Rezeptor-GFP-Fusionsprotein transfizierter HEK-Zellen für die angegebene Dauer bei 98 °C inkubiert und aufgetragen. Das erwartete Molekulargewicht beträgt 130 kDa.

fluss auf die Expression und Neddylierung von GluA-Rezeptoren hat. Entweder fehlen in HEK-Zellen noch weitere Kofaktoren, oder es spielt für die Expression oder Neddylierung, im Gegensatz zur physiologischen Funktion, keine Rolle, ob sich der GluA-Rezeptor im Golgi, Transportvesikel oder in der Plasmamembran befindet. Des weiteren kann man sehen, dass die Immunpräzipitation im Allgemeinen funktioniert hat. Die Eluat-Banden sind stärker als die Lysat-Banden. Die GluA-Rezeptoren werden somit angereichert. Jedoch gibt es keinen Unterschied im Flag-Blot, man sieht also keine spezifische Anreicherung von neddylierten GluA-Rezeptoren.

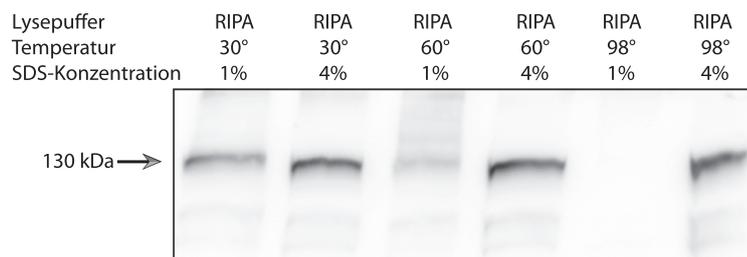


Abbildung 5.3: **Erhöhte SDS-Konzentration im Ladepuffer verbessert das Einlaufen von GluA-Rezeptor ins Trenngel.** Western Blot, Detektion mit GFP-Primärantikörper. Es wurden Lysate von mit GluA-Rezeptor-GFP-Fusionsprotein transfizierter HEK-Zellen bei der angegebenen Temperatur in Ladepuffer mit 1% bzw. 4% SDS inkubiert und aufgetragen. Das erwartete Molekulargewicht beträgt 130 kDa. Bei erhöhter SDS-Konzentration sind deutlich stärkere Banden zu sehen, insbesondere bei höheren Temperaturen.

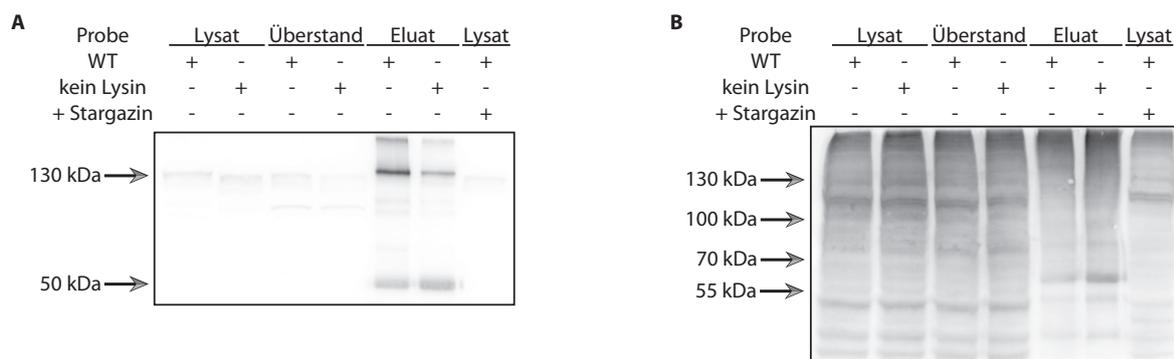


Abbildung 5.4: **Kopräzipitation von GluA-Rezeptor und Flag-Nedd8.** A) Western Blot, Detektion mit GluA-Rezeptor-Primärantikörper oder B) Flag-Primärantikörper. Aufgetragen wurden Proben von Lysat, Überstand und Eluat der Immunpräzipitation, einerseits von Wildtyp GluA-Rezeptor (WT), andererseits von einer Mutante, die intrazellulär kein Lysin besitzt. A) Die Banden im Überstand sind nur leicht schwächer als im Lysat, es erfolgt somit keine quantitative Präzipitation. Die Banden im Eluat sind deutlich stärker, es kommt zu einer effektiven Anreicherung. In der letzten Probe wurde zusätzlich das GluA-Rezeptor moderierende Protein Stargazin koexprimiert, es verstärkt die Menge an GluA-Rezeptor jedoch nicht. B) Im Eluat sind keine Banden bei 140 kDa zu sehen, die auf neddylierten GluA-Rezeptor hindeuten.

5.1.2 Biotin-Streptavidin-Pulldown von neddylierten Proteinen

Da der Hintergrund im Flag-Blot relativ stark ist und dies schwache potentielle Banden neddylierter Proteine maskieren könnte, möchte ich stringenter waschen, um den Hintergrund zu reduzieren. Hierfür habe ich zum Biotin-Streptavidin-Pulldown gewechselt, da zwischen diesen beiden Proteinen die stärkste natürlich vorkommende nicht-kovalente Bindung herrscht. Dies ermöglicht es mir die Proben mit Puffern zu waschen, die für die meisten Proteine denaturierend sind und trotzdem das biotinylierte Zielprotein gebunden halten.

Des Weiteren soll standardmäßig ein Protein biotinyliert und somit im Pulldown gebunden werden und das andere GFP-getaggt und im Western Blot detektiert werden. Ich habe mich dafür entschieden Nedd8 mit einem selbst-biotinylierendem Tag auszustatten, da dieser zum einen mit 10 kDa deutlich kleiner als GFP mit 30 kDa ist und man somit verhindert, dass Nedd8 mit seinen 9 kDa auf über die vierfache Größe anwächst. Ferner ist der zeitgleich neddylierte Anteil der Proteine im Verhältnis zum Gesamtprotein gering und lässt sich durch den Pulldown gezielt erhöhen. Darüber hinaus ist es möglich mittels eines Streptavidin-Pulldowns alle neddylierten Proteine anzureichern, auch bis dahin unbekannte Proteine. Diese können im Anschluss, zum Beispiel mittels Massenspektrometrie, identifiziert werden.

Zur Etablierung habe ich neben den GluA-Rezeptoren auch postsynaptic density protein 95 (PSD-95) als Neddylierungs-Ziel ausgesucht, da von diesem bereits bekannt ist, dass es neddyliert wird.

MLN-4924-Dosis-Wirkungskurve

Nedd8 und Ubiquitin sind von der Sequenz und der Struktur sehr ähnlich, siehe 2.1 Nedd8. Bei Überexpression von Nedd8 kann Nedd8 auch fälschlicherweise über das Ubiquitin-System an Proteine angehängt werden, was in der Literatur auch nicht-kanonische Neddylierung genannt wird [Lobato-Gil et al., 2021]. Um „echte“ Neddylierung über das Nedd8-System von nicht-kanonische Neddylierung abgrenzen zu können, muss die Neddylierung über den NAE1-Inhibitor MLN-4924 unterdrückt werden können. Durch die oben genannte strukturelle Ähnlichkeit von Nedd8 und Ubiquitin, kann auch MLN-4924 bei höheren Konzentrationen das Ubiquitin-aktivierende Enzym blockieren. Deshalb habe ich eine MLN-4924-Dosis-Wirkungskurve erstellt, um die minimale Konzentration zu bestimmen, mit der ich die Neddylierung inhibieren kann, um die Neddylierung zu blockieren, ohne das Ubiquitinsystem zu beeinflussen. Dafür habe ich selbst-biotinylierendes

Nedd8 (Bio-Nedd8) in HEK-Zellen exprimiert, mit unterschiedlichen Konzentrationen von MLN-4924 behandelt und im Western Blot analysiert. Aus den Daten habe ich eine Dosis-Wirkungs-Beziehung erhalten (s. Abb. 5.5). Hier kann man bei etwa 100 kDa eine Bande sehen, die wahrscheinlich den Cullinen entspricht. Von diesen ist bekannt, dass sie neddyliert werden und diese Größe besitzen. Man sieht, wie die Bande mit zunehmender MLN-Konzentration abnimmt und bei 1 μ M MLN-4924 fast vollständig verschwunden ist.

Soucy und Kollegen, die MLN-4924 in einem Hochdurchsatz-Screening gefunden und nachfolgend charakterisiert haben, zeigten für MLN-4924 einen IC_{50} von 4,7 nM für NAE1 und von 1,5 μ M für das Ubiquitin aktivierende Enzym Ubiquitin conjugating enzyme 10 (UBC10) [Soucy et al., 2009]. Da die von mir gefundene Konzentration in Höhe von 1 μ M sehr nah am von Soucy gefundenen IC_{50} für UBC10 liegt, kontrolliere ich, ob die Verwendung von 1 μ M MLN-4924 die Ubiquitinierung reduziert. Ich behandle HEK-Zellen mit dem Vehikel DMSO, 1 μ M MLN-4924 und 10 μ M MLN-4924. Die Zellen werden geerntet und im Western Blot gegen UBC12, dem Nedd8-E2 und gegen Ubiquitin-conjugating enzyme E2 C (UBE2C), dem Ubiquitin-E2 gefärbt. Wie in Abbildung 5.6 zu sehen ist, verändert sich die Menge an unbeladenem E2-Enzym nach MLN-4924-Behandlung nicht, weder für Nedd8 noch für Ubiquitin. Zugabe von 1 μ M oder 10 μ M MLN-4924 reduziert die Bandenintensität von beladenem UBC12 unter die Detektionsgrenze, während die Bande von beladenem UBE2C unverändert stark bleibt.

Die Abweichung von Soucy, die NAE1 mit 0,01 - 0,1 μ M MLN-4924 und UBC10 mit 1 - 10 μ M MLN-4924 inhibieren konnte, könnte sich dadurch erklären lassen, dass ich HEK-Zellen verwendet habe und Soucy HCT-116-Zellen verwendet hat oder dass ich mit 0,01% DMSO nur ein Zehntel von Soucys verwendeten 0,1% DMSO eingesetzt habe.

Optimierung der Biotinylierung

Man sieht in Abbildung 5.5 weitere deutliche Banden bei 90 und 130 kDa, die sich nicht durch MLN-4924 blockieren lassen. Diese Banden treten auch dann auf, wenn kein Bio-Nedd8 exprimiert wird. Deswegen gehören diese Banden zu Proteinen, die in HEK-Zellen nativ biotinyliert werden, wie Carboxylasen. Diese stören Experimente, indem sie Streptavidinbindestellen besetzen und somit weniger Bio-Nedd8 gebunden werden kann. Deshalb versuche ich, ob man über Kinetik oder Affinität bevorzugt Bio-Nedd8 biotinylieren kann. Biotin wird 1, 2 oder 4 Stunden vor der Ernte zugegeben. Dies erfolgt in den Konzentrationen 0,04, 0,4 und 4 μ M (s. Abb. 5.7). Bei den meisten getesteten Bedingungen ist kein Unterschied zu sehen. Nur bei der niedrigsten Biotin-Konzentration für 1

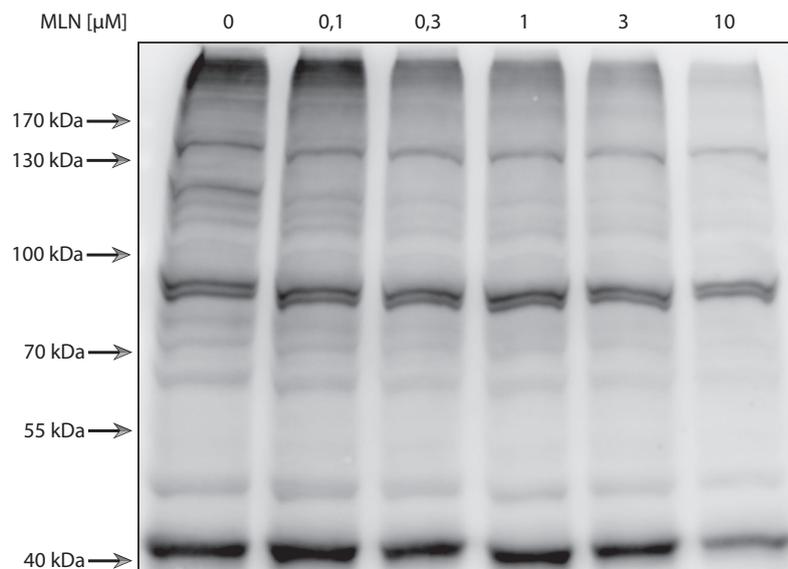


Abbildung 5.5: **MLN-4924 Dosis-Wirkungskurve.** Zellen die Bio-Nedd8 exprimieren werden mit steigenden Konzentrationen von MLN-4924 behandelt. Den MLN-4924-Effekt erkennt man an der Dreifachbande zwischen 110 und 120 kDa. Die Banden bei 40, 90 und 130 kDa sind MLN-4924-resistent und gehören zu endogen biotinylierten Proteinen, wie Carboxylasen.

oder 2 Stunden sind die Banden etwas schwächer. Dies gilt jedoch für beides, Bio-Nedd8 und nativ biotinylierte Proteine, in Abbildung 5.7 mit Sternen gekennzeichnet. Somit lässt sich Bio-Nedd8 weder über die Biotinkonzentration noch die Inkubationszeit mit Biotin bevorzugt gegenüber nativ biotinylierten Proteinen modifizieren. Deshalb habe ich im Folgenden Biotin in einer Konzentration von 4 µM für 48 Stunden zugegeben, um sicherzustellen, dass jedes verfügbare Bio-Nedd8 biotinyliert wird.

Optimierung der Solubilisierung

Wie in Abbildung 5.3 zu sehen ist, benötigt man erhöhte Konzentrationen von SDS im Ladepuffer, um GluA-Rezeptoren in Lösung zu halten. Entsprechend teste ich, ob mehr SDS im Lysepuffer einen positiven Effekt auf die Solubilisierung von GluA-Rezeptoren hat (s. Abb. 5.8). Die Zellen werden entweder direkt in Ladepuffer aufgeköcht, oder erst für 15' in RIPA-Puffer mit 0,1% beziehungsweise 1% SDS bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss werden die Proben zentrifugiert und der Überstand in Ladepuffer aufgeköcht. In Abbildung 5.8 sieht man, dass die Zusammensetzung des RIPA-Puffers mit 0,1% SDS, wie er in der Literatur beschrieben wird, nicht ausreichend ist, um alle GluA-Rezeptoren aus der Membran zu lösen. Nur bei 1% SDS erhält man eine gleich starke Bande, wie bei

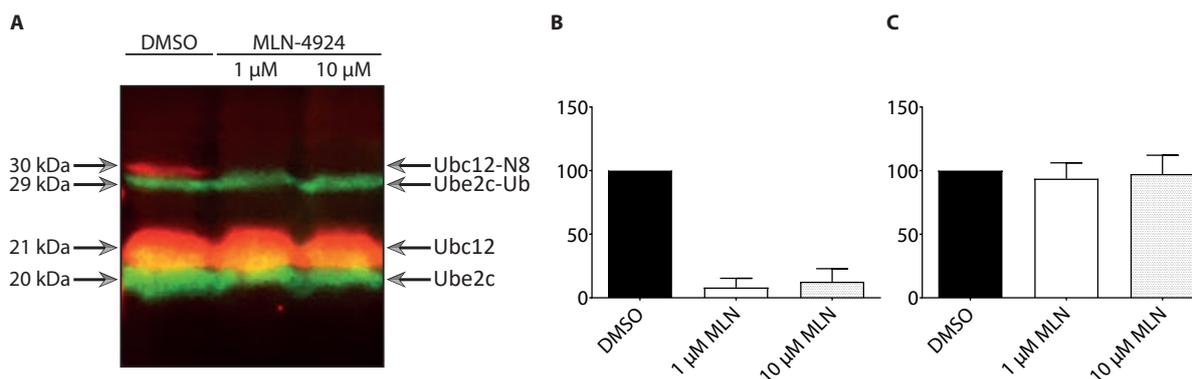


Abbildung 5.6: **MLN-4924 Spezifität.** **A)** 2 Kanal Western Blot Aufnahme gefärbt gegen UBC12 in rot und UBE2C in grün. Wenn das Vehikel DMSO zugegeben wird, wird UBC12 mit Nedd8 und UBE2C mit Ubiquitin in HEK-Zellen beladen. Bei Zugabe von MLN-4924 in den Konzentrationen 1 µM und 10 µM für 60' zur HEK-Zellkultur, kommt es zu einer starken Reduktion der Beladung von UBC12 mit Nedd8. Die Beladung von UBE2C mit Ubiquitin bleibt unverändert. **B)** Quantifizierung für UBC12-Nedd8 (T-Test gegen DMSO. DMSO: 100; 1 µM MLN-4924: 8,1 ± 7,2; P = 0,0002; N = 5; 10 µM MLN-4924: 12,6 ± 10,3; P = 0,001; N = 5) **C)** Quantifizierung für UBE2C-Ubiquitin (T-Test gegen DMSO. DMSO: 100; 1 µM MLN-4924: 93,7 ± 12,4; P = 0,63; N = 5; 10 µM MLN-4924: 97,3 ± 14,8; P = 0,86; N = 5).

aus direkt mit Ladepuffer aufgekochten Zellen. Im Folgenden verwende ich eine Konzentration von 1% SDS im RIPA-Puffer, um auch Transmembranproteine zu solubilisieren. Da ich nun Streptavidin-Pulldowns durchführe, die Biotin binden und keine Immunpräzipitation mit Antikörpern, müssen Epitope nicht erhalten bleiben und eine mögliche Denaturierung von Proteinen durch die hohe SDS-Konzentration ist irrelevant.

Direktvergleich von GFP-Immunpräzipitation und Streptavidin-Pulldown

Im Folgenden habe ich untersucht, ob Streptavidin-beads generell für Pulldowns von biotinyliertem Nedd8 geeignet sind. Streptavidin-Pulldown und GFP-Immunpräzipitation werden parallel durchgeführt und verglichen. Hierfür wird GluA-GFP und Bio-Nedd8 koexprimiert. Die Immunpräzipitation wird ohne Veränderung durchgeführt. Für den Pulldown wird die Zugabe von GFP-Antikörper und Protein-G-beads durch die Zugabe von Streptavidin-beads ersetzt, der Rest wird gleich behandelt. Für die Immunpräzipitation (s. Abb. 5.9 links) ist der Blot gefärbt über GluA-Rezeptor-Antikörper die Präzipitationskontrolle. Der Blot mit Streptavidin zeigt, ob ein neddyliertes Protein kopräzipitiert ist. Im Pulldown (s. Abb. 5.9 rechts) ist Streptavidin die Präzipitationskontrolle. Der Blot gefärbt gegen GluA-Rezeptoren zeigt, ob am im Pulldown gefällten

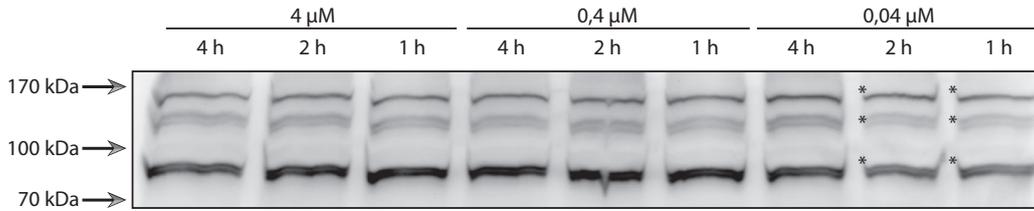


Abbildung 5.7: **Biotinylierung in Abhängigkeit von Konzentration und Inkubationsdauer mit Biotin.** In das Medium der mit Bio-Nedd8 transfizierten HEK-Zellen wird 1, 2, bzw. 4 Stunden vor Ernte Biotin in den Konzentrationen 0,04 μM , 0,4 μM und 4 μM gegeben. Der anschließende Western Blot wird mit Streptavidin gefärbt. Mit einem Stern sind schwächer gewordene Banden markiert.



Abbildung 5.8: **Test von Lysebedingungen.** HEK-Zellen die GluA-Rezeptor-GFP exprimieren werden entweder direkt mit Ladepuffer aufgeköcht, oder vorher in RIPA-Puffer geerntet und dann mit Ladepuffer aufgeköcht. Der RIPA-Puffer besitzt entweder 0,1% SDS oder 1% SDS.

Bio-Nedd8 der GluA-Rezeptor gebunden ist. Bei der Immunpräzipitation (s. Abb. 5.9 links) sieht man wie gehabt eine Anreicherung der GluA-Rezeptoren von Lysat zu Eluat. Im Streptavidin-Blot ist weiterhin keine Bande im Eluat zu erkennen. Beim Streptavidin-Pulldown (s. Abb. 5.9 rechts) sieht man eine Anreicherung der biotinylierten Proteine. Da sich die Bandenintensität mit MLN-4924 reduzieren lässt, befinden sich neddylierte Proteine darunter. Im gegen GluA-Rezeptor gefärbten Blot sieht man schwache Banden von GluA-Rezeptoren, in Abbildung 5.9 rechts unten mit Sternen markiert. GluA-Rezeptoren könnten also neddyliert sein. Man sieht ebenfalls eine schwache Bande von GluA-Rezeptoren im Eluat nach Zugabe von MLN-4924. MLN-4924 blockiert die Neddylierung, sodass keine Kopräzipitation von GluA-Rezeptoren mit Bio-Nedd8 möglich sein sollte und somit auch keine Bande vorhanden sein sollte, sodass dies weiter untersucht werden muss.

5 Ergebnisse

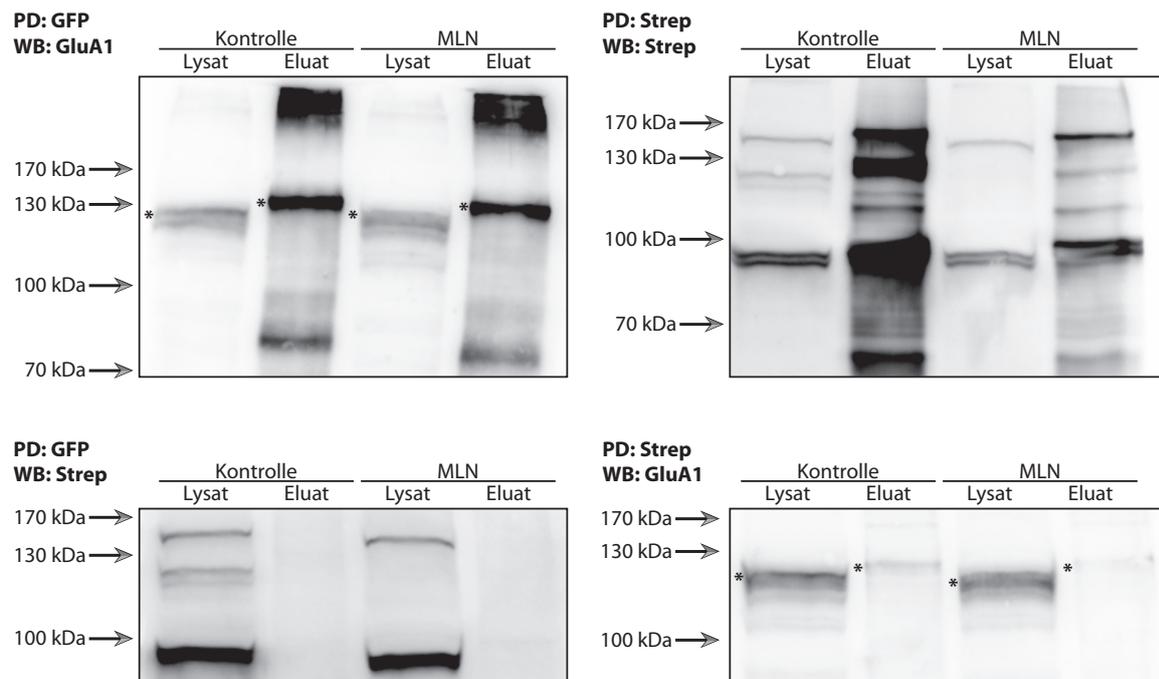


Abbildung 5.9: **Vergleich von GFP-Immunpräzipitation und Streptavidin-Pulldown.** Auf der linken Seite sind die GFP-Immunpräzipitationen dargestellt und auf der rechten die Streptavidin-Pulldowns. Im oberen Blot befinden sich die Kontrollen für die jeweilige Präzipitation, im unteren wird die Kopräzipitation untersucht. GluA-Rezeptor-Banden sind mit einem Stern markiert.

Verwendung des Avi-Tags und Linkeroptimierung

Nach Pulldown sind, im Gegensatz zur Immunpräzipitation, Banden zu sehen. Diese sind aber schwach und nahe der Detektionsgrenze, sodass ich zuerst das Protokoll optimiere, um stärkere Banden zu erhalten. Zuerst tausche ich den selbstbiotinylierenden Tag am Nedd8 gegen einen Avi-Tag aus, der von BirA biotinyliert wird. Der Vorteil des Avi-Tags ist, dass er deutlich kleiner ist, siehe 2.3 Biotin-Streptavidin-Pulldown.

Bei der Klonierung des Avi-Tags an das Nedd8 entsteht durch den verbleibenden Polylinker mit den verschiedenen Restriktionsschnittstellen auch im Protein ein Linker aus willkürlich vorgegebenen Aminosäuren zwischen Nedd8 und dem Avi-Tag. Meine Absicht war es, den Polylinker so weit wie möglich zu verkürzen, damit der Linker zwischen Protein und Tag aus möglichst wenigen Aminosäuren besteht. Dies dient dazu, die Größenänderung des Nedd8 zwischen Wildtyp und getagtem Protein klein zu halten. In den ersten Versuchen führt dies jedoch zu einem sehr schwachen Signal im Streptavidin Blot. Dies macht es zu einem ineffektiven Kandidaten für Pulldowns, da Expression,

5.1 Neddylierung synaptischer Proteine

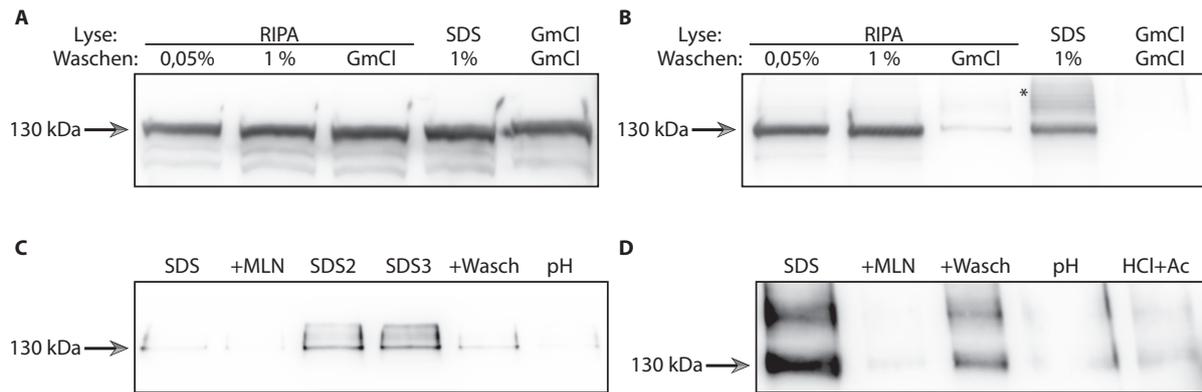


Abbildung 5.10: **Lyse- und Waschbedingungen A/B)** Proben wurden in RIPA (RIPA), RIPA mit 1% SDS (SDS) oder 6 M Guanidiniumhydrochlorid (GmCl) lysiert und in diesem Puffer an die Beads gebunden. Darauf folgend wurde mit 0,05%, 1% SDS oder Guanidiniumhydrochlorid (GmCl) gewaschen. **A)** zeigt die Lysate vor Pulldown. **B)** die Eluate nach dem Pulldown. Unmodifiziertes PSD-95-GFP wird bei 130 kDa erwartet. Neddyliertes PSD-95-GFP wird darüber erwartet, in **B)** mit einem Stern markiert. **C)** Eluate nach Pulldown. Alle wurden in RIPA mit 1% SDS geerntet. Waschschrte für SDS: 1x Waschpuffer1 (WP1), 1x WP2, 3x WP3. SDS2: 1x WP2, 3x WP3. SDS3: 3x WP3. +Wasch: 1x WP1, 1x WP2, 5x WP3. pH: 1x WP1, 1x WP2, 3 x WP3, 1x WP3 bei pH 2.0. MLN hatte Zugabe von MLN-4924 24 Stunden vor Ernte, es wurde wie SDS geerntet und gewaschen. **D)** Eluate nach Pulldown. Alle wurden in RIPA mit 1% SDS geerntet. Waschschrte für SDS: 2x RIPA ohne zusätzliches SDS, 1x WP2, 3x WP3. +Wasch: 2x RIPA ohne zusätzliches SDS, 1x WP2, 5x WP3. pH: 2x RIPA ohne zusätzliches SDS, 1x WP2, 3x WP3, 1x WP3 bei pH 2.0. HCl+Ac: 2x RIPA ohne zusätzliches SDS, 1x WP2, 3x WP3, 1x Aceton + HCl bei -20 °C. MLN hatte Zugabe von MLN-4924 24 Stunden vor Ernte, es wurde wie SDS geerntet und gewaschen.

Anbindung und Biotinylierung von Nedd8 sowohl nötig sind, um ein starkes Signal im Streptavidinblot zu erhalten, als auch um Nedd8 in Verbindung mit von diesem modifizierten Proteinen im Pulldown zu fällen. Somit zeigt das Signal im Streptavidinblot, wie gut die getestete Nedd8-Variante für Fällungen geeignet ist. Ich teste die Signalstärke im Streptavidinblot von Nedd8 ohne Linker, mit Linker und mit einer Tobacco etch virus (TEV)-Schnittstelle als nützlichem Linker, jeweils nach Koexpression mit BirA (siehe Abbildung 5.11A). Hier kann man sehen, dass nur das Nedd8 mit Linker zu deutlichen Banden führt. Die Variante ohne Linker zeigt nur ein leicht stärkeres Signal, als HEK-Zellen ohne Nedd8 mit Avi-Tag. Expression von Nedd8 mit einer TEV-Schnittstelle als Linker zeigt keine Veränderung gegenüber Expression von BirA ohne Nedd8 mit Avi-Tag und ist somit für Pulldowns nicht geeignet.

Somit lässt sich von den getesteten Nedd8-Varianten nur die mit Linker für Streptavidin-

Pulldowns verwenden. Da die TEV-Schnittstelle jedoch die Möglichkeit eröffnet nach einem Pulldown spezifisch von den Magnetbeads durch einen Verdau zu eluieren, habe ich beides kombiniert, den Linker und die TEV-Schnittstelle zwischen Nedd8 und dem Avi-Tag. Wie man in Abbildung 5.11B sehen kann, gab es keine Verbesserung durch die Kombination von Linker und TEV-Schnittstelle gegenüber TEV-Schnittstelle ohne Linker.

Da der Linker einen deutlichen Einfluss auf die Verwendbarkeit des Avi-Tag-Nedd8 für Pulldowns hat, habe ich zur Optimierung noch weitere Linker getestet. Zum einen teste ich einen rigiden, Alphahelix-formenden Linker, zum anderen einen flexiblen, Glycin-reicher Linker. Bei beiden wird in die Mitte des Linkers eine TEV-Schnittstelle kloniert, für den rigiden jedoch auch eine Variante ohne TEV. In Abbildung 5.11C kann man sehen, dass alle drei ein deutlich stärkeres Signal zeigen als der vorher verwendete Linker, bestehend aus den vom Polylinker vorgegebenen Aminosäuren. Avi-tag:rigid-Linker:TEV-Schnittstelle:rigid-Linker:Nedd8 (Avi-Nedd8) zeigt sogar ein stärkeres Signal als das in Abschnitt 5.1.2 verwendete Bio-Nedd8. Avi-Nedd8 wird als beste der getesteten Nedd8-Tag-Varianten für alle folgenden Experimente verwendet.

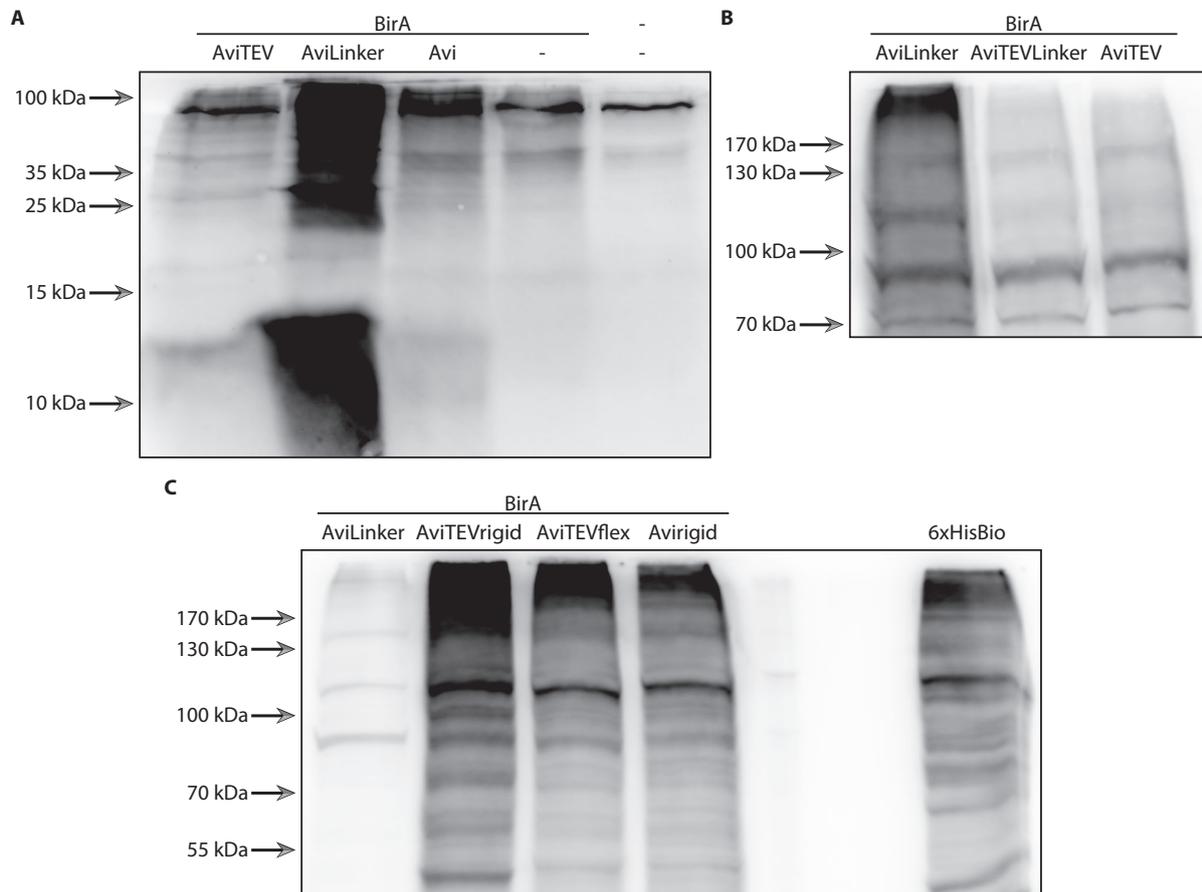


Abbildung 5.11: **Nedd8-Linker-Optimierung**. Streptavidin-Blots von HEK-Zelllysaten, bei denen verschiedene Linker zwischen Avi-Tag und Nedd8 getestet wurden. Avi = Avi-Tag. TEV = TEV-Protease-Erkennungssequenz. Linker = Polylinker des verwendeten Plasmids. rigid = Alphahelix-formender rigider Linker. flex = glycinreicher flexibler Linker. 6xHisBio = zuvor verwendeter selbstbiotinylierender Tag.

Optimierung des Pulldowns durch Ultrafiltration

Ein weiterer Ansatz, um die Pulldowneffizienz zu verbessern ist die Ultrafiltration mittels Zentrifugation und einem Filter mit einer Größengrenze von 30 kDa. Ungebundenes Biotin und freies Avi-Nedd8 werden so abgetrennt. Neddylierte Zielproteine, die durch die GFP-Fusion mindestens 30 kDa groß sind, verbleiben. Hierdurch sollen die Bindestellen an den Streptavidinbeads besser genutzt werden, da ungebundenes Biotin und freies Avi-Nedd8 zwar Bindestellen besetzen können, aber zu keinem Informationsgewinn was Bindepartner angeht führen. Das Problem, an diesem Ansatz ist, dass die Detergenzien aus dem RIPA-Puffer Mizellen bilden, die größer als die Größengrenze des Filters sind. Somit reichert sich das Detergenz an, fällt aus und die Probe wandelt sich in ein Gel um. Dadurch wird ein Binden an Magnetbeads und Waschen unmöglich. Eine Möglichkeit dies zu verhindern wäre die Menge an Detergenz zu verringern. Wenn die Detergenzkonzentration unter die kritische Mizellbildungskonzentration fällt, erhält man Detergenzmonomere und diese passen durch den Filter. Dies ist hier jedoch nicht möglich, da die Mizellen erwünscht sind, um darin Membranproteine zu solubilisieren. Eine weitere Möglichkeit wäre einen Filter mit einer höheren Größengrenze zu verwenden, was jedoch die Gefahr birgt auch Zielproteine zu verlieren. Aus diesen Gründen wird auf eine Ultrafiltration zur Abtrennung von Nedd8 und Biotin verzichtet.

Elution durch TEV-Proteaseverdau

Das Biotin-Streptavidin-System hat den Vorteil der starken Bindung, die stringentes Waschen erlaubt. Ein Nachteil ist, dass es auch endogen biotinylierte Proteine, wie zum Beispiel die Carboxylasen gibt. Auch diese werden an die Streptavidinmagnetbeads gebunden und lassen sich bei der Bindung nicht von den biotinylierten neddylierten Proteinen unterscheiden (s. Abb. 5.7). Um dieses Problem zu lösen, sollen die neddylierten Proteine durch TEV-Protease verdaut und eluiert werden. Endogen biotinylierte Proteine besitzen keine TEV-Protease-Schnittstelle und bleiben an den Streptavidinmagnetbeads gebunden, sodass gezielt Proteine eluiert werden, die beides besitzen, eine Biotinylierung und eine TEV-Protease-Schnittstelle.

Als Proben dienen HEK-Zellen, transfiziert mit Cofilin1-GFP und Avi-Nedd8. Eine davon zusätzlich mit BirA, die zweite nicht. Die Proben werden wie zuvor lysiert, an Beads gebunden und gewaschen. Zur Elution werden die Beads für eine Stunde bei 34 °C mit TEV-Protease inkubiert. Danach werden die Beads angelagert und das Eluat abgenommen. Anschließend werden beide Proben erneut für eine Stunde mit TEV-Protease

inkubiert, diesmal bei 37 °C. Danach werden die Beads erneut angelagert und das Eluat abgenommen. Schließlich wird der Rest der gebundenen Proteine im gleichen Volumen Ladepuffer bei 98 °C eluiert. Gleiches Volumen der Proben wird aufgetragen und im Western Blot mit einem Nedd8-Antikörper untersucht.

In Abbildung 5.12A kann man erkennen, dass bei 34 °C ein Bruchteil der Proteine eluiert wird. Bei 37 °C ist es etwas mehr, jedoch verbleibt der Großteil der Proteine an den Beads und wird erst im Ladepuffer bei 98 °C eluiert. Des weiteren kann man hier die Spezifität des Pulldowns erkennen. Ohne BirA wird kein eluierbares Nedd8 an die Beads gebunden.

Für das nächste Experiment habe ich zwei längere Inkubationszeiten mit TEV-Protease getestet. Zum einen 20 Stunden bei 4 °C, zum anderen drei Stunden bei 34 °C. Zur Analyse wird im Western Blot nicht Nedd8 untersucht, sondern Cofilin1-GFP, welches kovalent an Nedd8 gebunden sein sollte (siehe Abbildung 5.12B). Hier sieht man eine schwache Bande bei der 34 °C-Inkubation. Aber auch bei diesem Experiment wird der Großteil der Proteine erst bei Inkubation in Ladepuffer bei 98 °C eluiert.

Als nächstes habe ich die bisher verwendete, kommerziell erworbene TEV-Protease mit einer im Haus hergestellten, von PD Dr. Eckhardt, verglichen. In Abbildung 5.12C kann man erkennen, dass die selbst hergestellte deutlich besser abschneidet als die kommerziell erhältliche, aber auch diese kann von den Beads nur einen Teil der Proteine eluieren. Die meisten gebundenen Proteine werden erst im Ladepuffer bei 98 °C eluiert. Auch in diesem Versuch kann man erkennen, dass die Elution mit TEV-Protease äußerst spezifisch ist und kein biotinyliertes Protein im TEV-Eluat nachgewiesen werden kann (siehe Abbildung 5.12D).

Da mit dem TEV-Protease-Verdau nicht quantitativ von den Beads eluiert werden kann, wird im Folgenden mit Ladepuffer eluiert und die Kontamination mit endogen biotinylierten Proteinen in Kauf genommen.

5 Ergebnisse

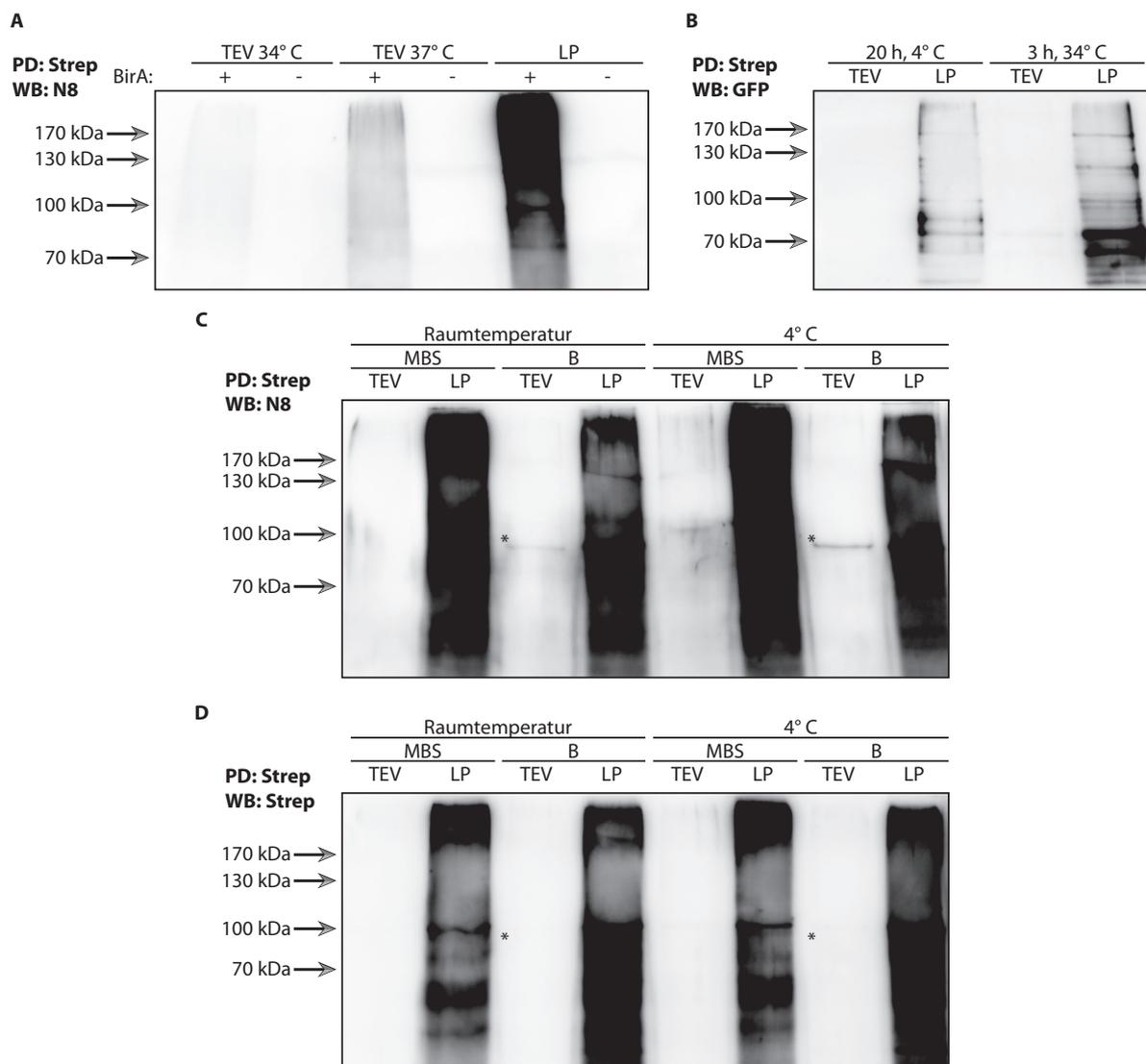


Abbildung 5.12: **Elution durch TEV-Proteaseverdau.** TEV = Elution mittels TEV-Proteaseverdau. LP = Elution durch Aufkochen in Ladepuffer. MBS = kommerziell erhältliche TEV-Protease. B = Präparation B der vom im Haus hergestellten TEV-Protease, zur Verfügung gestellt von PD Dr. Eckhardt. **A)** Zwei Proben von Avi-Nedd8 exprimierenden Zellen entweder mit (+) oder ohne (-) Expression von BirA wurden nach dem Pulldown konsekutiv mit TEV-Protease bei 34 °C, mit TEV-Protease bei 37 °C und mit Ladepuffer eluiert. **B)** Die Proben stammen aus HEK-Zellen, die Avi-Nedd8, BirA und Cofilin1-GFP exprimieren. Der Pulldown wurde entweder über 20 Stunden bei 4 °C eluiert oder über 3 Stunden bei 34 °C. Beide Proben wurden im Anschluss jeweils nochmals in Ladepuffer eluiert. **C/D)** Avi-Nedd8 und BirA wurde in HEK-Zellen exprimiert. Die Pulldowns wurden über Nacht entweder bei 4 °C oder Raumtemperatur mit je einer der beiden TEV-Proteasen eluiert. Alle Proben wurden erneut in Ladepuffer aufgekocht, um alle restlichen gebundenen Proteine zu eluieren. C) ist im Western Blot gegen Nedd8 gefärbt und D) mit Streptavidin gegen Biotin. Mit einem Stern sind die vermuteten Cullin-Banden markiert.

Streptavidin-Pulldown von GluA-Rezeptoren

Nachdem das neue Pulldown-Protokoll etabliert ist, teste ich erneut die GluA-Rezeptoren mit dem optimierten Pulldown-Protokoll auf eine Neddylierung. HEK-Zellen werden entweder mit Wildtyp-GluA-Rezeptor, einer Mutante bei der alle vier intrazelluläre Lysine zu Argininen mutiert sind oder einer trunkierten Variante transfiziert. Der trunkierten Variante fehlt der intrazelluläre C-Terminus, in dem sich die vier Lysine befinden. Zusätzlich wird noch jeweils biotinyliertes Nedd8 koexprimiert. In Abbildung 5.13 kann man erkennen, dass weder die Mutante bei der die vier Lysine ersetzt sind, noch die Mutante bei der alle intrazellulären Lysine trunkiert sind, zu einer schwächeren GluA-Rezeptor-Bande in den Eluat-Proben führt. Die Bande, die auch im Wildtyp zu sehen ist, ist zumindest größtenteils auf eine Nedd8-unabhängige Verschleppung zurückzuführen. Somit scheinen GluA-Rezeptoren nicht, oder nur in nicht nachweisbaren Mengen in HEK-Zellen neddyliert zu werden.

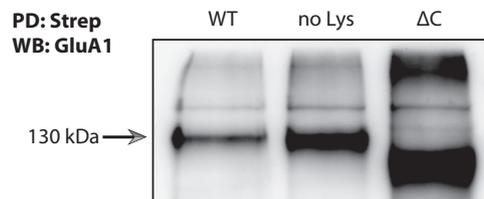


Abbildung 5.13: **Untersuchung der Neddylierung von GluA-Rezeptoren.** GluA-Rezeptor als Wildtyp, als Mutante ohne intrazelluläres Lysin oder als Mutante ohne intrazelluläre C-terminale Domäne wurde mit biotinyliertem Nedd8 in HEK-Zellen exprimiert. Es wurde das optimierte Streptavidin-Pulldown-Protokoll verwendet und im Western Blot ein Antikörper gegen GluA-Rezeptor verwendet. 130 kDa ist die Größe des GluA-Rezeptor1-GFP Fusionsproteins. Neddyliertes Protein sollte darüber zu sehen sein. Es ist im Wildtyp keine Bande zu erkennen, die bei den nicht neddylierbaren Mutanten fehlt.

5.2 Einfluss von Neddylierung auf das Aktin-Zytoskelett

In einer vorherigen Arbeit von Annette Vogl und anderen [Vogl et al., 2015] wurde gezeigt, dass die Inhibierung von Neddylierung durch MLN-4924 zur Zeit der Spineentwicklung vermehrt zu unreifen filopodienartigen Spines führt. Da diese sich morphologisch stark von reifen Spines unterscheiden, liegt die Vermutung nahe, dass das Zytoskelett von Neddylierung beeinflusst wird. Das Aktin-Zytoskelett besteht aus Aktin-Polymeren sogenanntem filamentösem Aktin, auch F-Aktin genannt. Die einzelnen Aktin-Monomere werden globuläres oder G-Aktin genannt. Unterschiede im Verhältnis von F-Aktin zu G-Aktin deuten auf Veränderungen im Auf- oder Abbau des Aktin-Zytoskeletts hin. Der Aufbau von F-Aktin wird unter anderem von Proteinen der Profilin-Familie vermittelt, während Vertreter der ADF/Cofilin-Familie Aktinfilamente schneiden und im Allgemeinen zu einem Abbau von F-Aktin führen.

5.2.1 F/G-Aktin-Verhältnis

Wie zuvor beschrieben, deuten Veränderungen im Verhältnis von F-Aktin zu G-Aktin auf Veränderungen im Auf- oder Abbau des Aktin-Zytoskeletts hin. Um das Verhältnis zu bestimmen, möchte ich F- und G-Aktin trennen und es mittels Western Blottings quantifizieren. Um die Proteinmenge im Western Blot über die Lichtintensität quantitativ auszuwerten, muss diese in einem linearen Bereich liegen. Zu diesem Zweck habe ich eine Aktin-Verdünnungsreihe mit dem Faktor $\sqrt{10}$ auf ein SDS-Gel aufgetragen und im Western Blot ausgewertet.

Man sieht in Abbildung 5.14A die quantifizierten Werte der in Abbildung 5.14B gezeigten Aufnahmen des Blots bei verschiedenen Belichtungszeiten. In rot sind überbelichtete Pixel markiert. Werte von überbelichteten oder unterbelichteten Banden sind im Graphen transparent dargestellt. Hier sieht man, dass der größte lineare Bereich bei 30-sekündiger Belichtung (in Abbildung 5.14A rote Quadrate) kurz vor der Sättigung liegt. In diesem Bereich besteht ein linearer Zusammenhang zwischen Proteinmenge und Bandenintensität über etwa 2 Größenordnungen. In den folgenden Experimenten verdünne ich die Proben so, dass die daraus resultierenden Aktin-Bandenintensitäten in diesem Bereich liegen.

Zur Bestimmung des F/G-Aktin-Verhältnisses habe ich je eine 3,5 cm-Schale HEK-Zellen mit DMSO oder MLN-4924 behandelt. F- und G-Aktin werden voneinander getrennt und im Western Blot quantifiziert.

In Abbildung 5.14C sieht man die Quantifizierung und in Abbildung 5.14D einen dazu-

gehörigen Beispiel-Blot. In beiden Abbildungen erkennt man nach MLN-4924-Behandlung deutlich die Verschiebung des F/G-Verhältnis zu F-Aktin. Die Blockierung der Neddylierung begünstigt also entweder den Aufbau von filamentösem Aktin, oder behindert den Abbau desselben.

Zur Verifikation der Methode habe ich je DMSO- oder MLN-4924-behandelte Proben noch zusätzlich mit Latrunculin A oder dem dazugehörigen Lösungsmittel Ethanol behandelt.

Latrunculin A behindert den Aufbau von filamentösem Aktin. Es wird somit eine Reduzierung des F/G-Aktin Verhältnisses erwartet, wie sie auch in Abbildung 5.14E/F zu sehen ist. Unabhängig davon, ob die Neddylierung blockiert und das F/G-Aktin Verhältnis erhöht wird oder nicht, reduziert die Zugabe von Latrunculin A wie erwartet das F/G-Aktin Verhältnis.

Da die ursprüngliche Vermutung war, dass Veränderungen im Aktinzytoskelett die Ursache für die hohe Anzahl von filopodienartigen Spines an Neuronen nach MLN-4924-Behandlung sind, habe ich auch das F/G-Aktin Verhältnis in primären Neuronen untersucht.

In Abbildung 5.14G/H sieht man, dass auch in primären Neuronen nach MLN-4924-Behandlung das Verhältnis hin zu filamentösem Aktin verschoben ist.

5 Ergebnisse

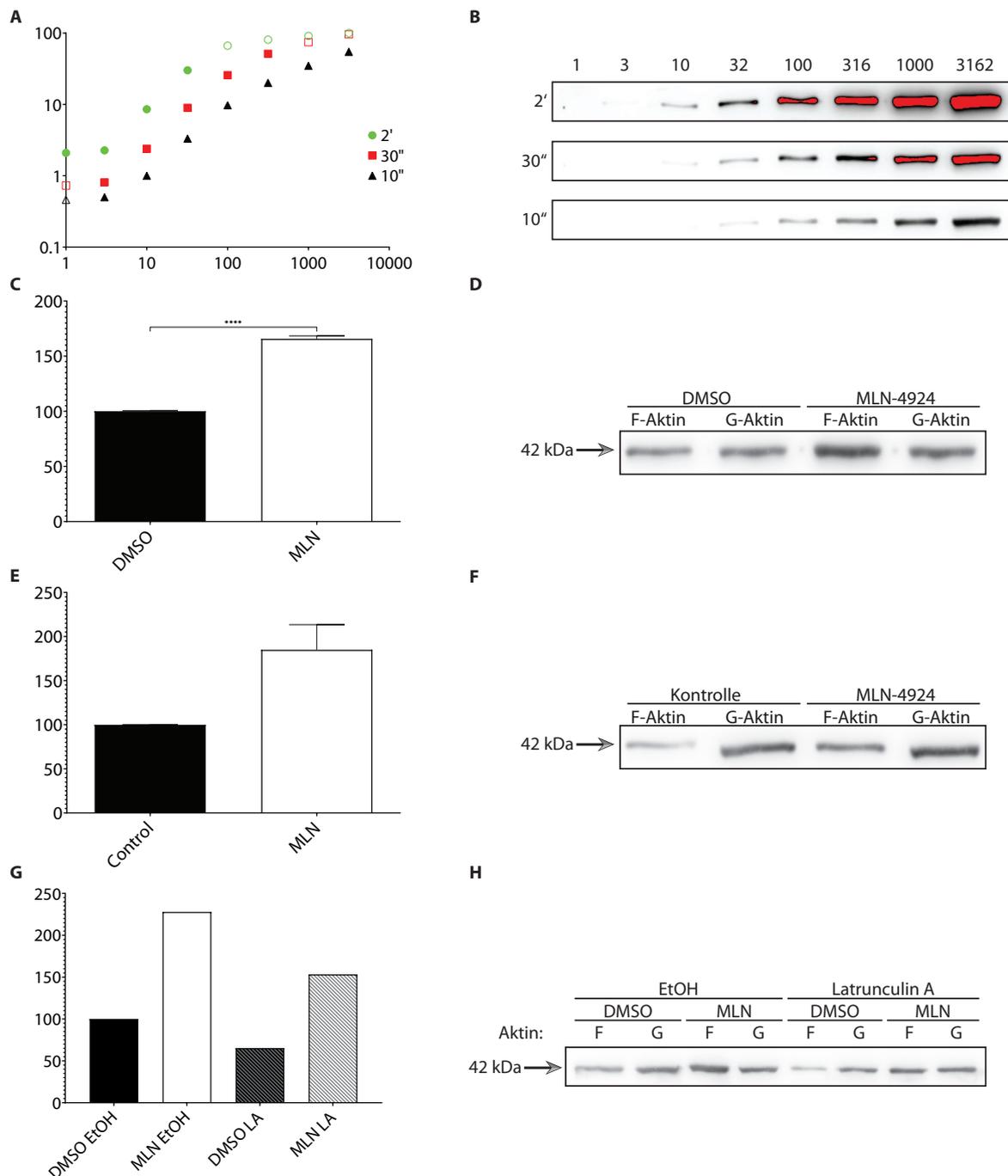


Abbildung 5.14: **Verändertes Aktin-Zytoskelett nach MLN-4924-Behandlung.** A/B) Bestimmung des linearen Bereichs im Western Blot mit einer Aktin-Verdünnungsreihe. Über-/Unterbelichtete Werte haben nicht gefüllte Symbole, überbelichtete Pixel sind rot markiert. C/D) HEK-Zellen wurden mit DMSO oder MLN-4924 behandelt, F/G-Aktin getrennt und quantifiziert. MLN-4924 erhöht das F/G-Verhältnis signifikant (DMSO: $100 \pm 0,7$; MLN-4924: $165,7 \pm 2,7$; $P < 0,0001$; $N = 3$) E/F) In kortikalen Neuronen ist F/G-Verhältnis nach MLN-4924-Behandlung erhöht (Kontrolle: $100 \pm 0,1$; MLN-4924: $156,3 \pm 28,6$; $N = 2$) G/H) Zugabe von Latrunculin A in Ethanol verringert das F/G-Verhältnis unabhängig von MLN-4924-Behandlung (DMSO EtOH: 100 ; MLN-4924 EtOH: $227,7$; DMSO LA: $65,3$; MLN-4924 LA: $153,2$; $N = 1$).

5.3 Neddylierung von Aktinregulatoren

Nachdem ich gezeigt habe, dass sich das Aktin-Zytoskelett verändert, wenn Neddylierung blockiert wird, müssen der oder die Aktinregulatoren gefunden werden, die neddyliert werden. Aussichtsreiche Kandidaten, die direkt mit Aktin interagieren, stammen aus der Profilin-Familie, die den Aktinfilamentaufbau begünstigen, oder aus der ADF/Cofilin-Familie, die Aktinfilamente schneiden.

5.3.1 Profilin

Beginnend mit Profilin, exprimiere ich Profilin1 respektive Profilin2 je mit Avi-Nedd8 und BirA in HEK-Zellen. Diese werden nach dem in 5.1.2 optimiertem Protokoll auf Interaktion untersucht. Wie in Abbildung 5.15A/B zu sehen ist, gibt es zwar einen Unterschied in der Bandenintensität zwischen Profilin1 und 2, jedoch keinen Unterschied jeweils zwischen DMSO und MLN-4924. Dies bedeutet, Profileine wurden in HEK-Zellen zumindest nicht kanonisch neddyliert, vergleiche Lobato-Gil [Lobato-Gil et al., 2021].

5.3.2 Cofilin

Als nächstes untersuche ich die ADF/Cofilin-Familie. Hier werden Cofilin1, Cofilin2 oder ADF je mit Avi-Nedd8 und BirA in HEK-Zellen exprimiert.

In Abbildung 5.15C/D kann man erkennen, dass Cofilin1 mit DMSO zu deutlichen Banden im Western Blot nach Pulldown führt, die sich durch Zugabe von MLN-4924 signifikant reduzieren lassen. Cofilin2 wird nur im geringen Maße präzipitiert, sodass sich die Banden an der Nachweisgrenze befinden und sich von MLN-4924 nicht beeinflussen lassen. ADF hat zu Cofilin1 vergleichbare Banden, die sich durch MLN-4924-Zugabe ebenfalls reduzieren lassen. Jedoch ist die Streuung der quantifizierten Intensitäten so hoch, dass der Unterschied statistisch nicht signifikant ist. Im folgenden habe ich mich auf Cofilin1 und 2 fokussiert, da die hohe Varianz der Messwerte von ADF reproduzierbare Ergebnisse und eine zuverlässige Analyse verhindert. Zusätzlich haben Cofilin1 und Cofilin2 gegenüber ADF den Vorteil, dass sie an Aktinfilamente binden und sich dies lichtmikroskopisch nachweisen lässt (siehe Abbildung 5.15E). Wenn Aktinfilamente durch das GFP der Cofiline gefärbt werden, muss die Aktinbindestelle der Cofiline intakt sein. Da die Cofiline nur aus einer Domäne bestehen, liegt es in diesem Fall nahe, dass das gesamte Protein korrekt gefaltet ist.

Als weiterer Nachweis, dass es sich bei dem im Pulldown präzipitiertem Protein um

Cofilin1 handelt, führe ich einen Pulldown und nachfolgend SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE) durch. Bei der entsprechenden Höhe schneide ich die Bande aus dem Gel aus und die enthaltenen Proteine werden mittels Massenspektrometrie identifiziert. In Abbildung 5.15F sieht man, dass Cofilin1 in der Probe massenspektrometrisch identifiziert wird.

Nicht nur ein verstärkter Aufbau, sondern auch ein reduzierter Abbau von F-Aktin kann zu einem höheren F/G-Aktin-Verhältnis führen. Die Aktivität von Cofilin lässt sich über den Phosphorylierungsstatus zeigen. Phosphorylierung an Serin-3 führt zu einem inaktivem Cofilin.

In Abbildung 5.16A/B sieht man nun, dass nach MLN-4924-Behandlung die Phosphorylierung von Cofilin1 an Serin-3 stark erhöht ist. Der erhöhte Anteil von inaktivem Cofilin1 könnte reduziertes Schneiden von F-Aktin bedeuten und somit das erhöhte F/G-Aktin-Verhältnis erklären.

Um herauszufinden, ob eine direkte Abhängigkeit der Neddylierung vom Phosphorylierungsstatus Cofilins besteht, exprimiere ich Cofilin1 als Positivkontrolle, Cofilin2 als Negativkontrolle, die phosphorylierungsdefiziente Cofilin1-Mutante S3A, sowie die phosphorylierungsimitierende Cofilin1-Mutante S3D je mit Avi-Nedd8 und BirA in HEK-Zellen.

Das Ergebnis nach Pulldown und Western Blot (siehe Abbildung 5.16C) zeigt, dass weder die phosphorylierungsdefiziente, noch die phosphorylierungsimitierende Cofilin1-Mutante in HEK-Zellen neddyliert werden.

5.3 Neddylierung von Aktinregulatoren

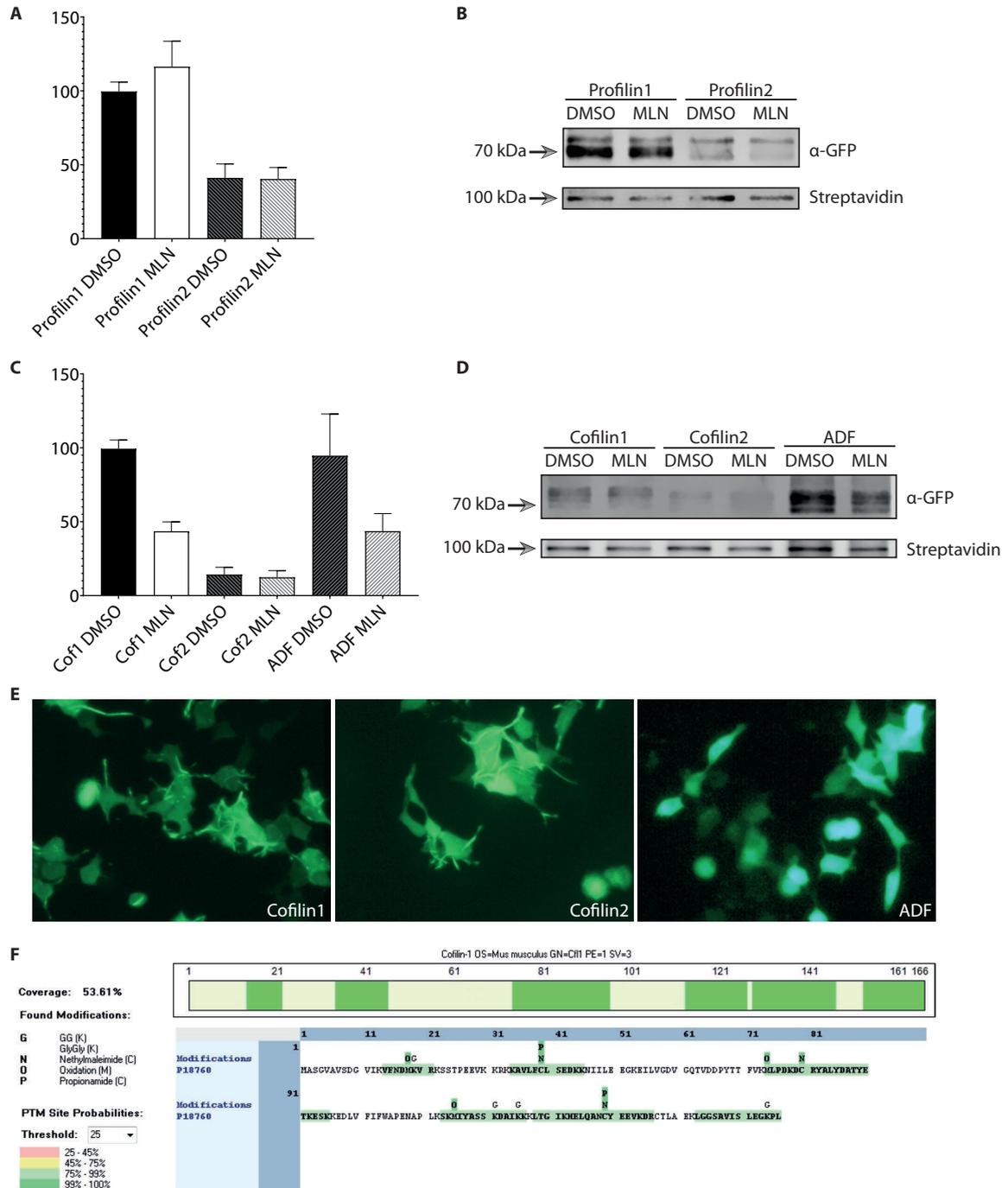


Abbildung 5.15: Neddylierung Aktin-modifizierender Proteine. **A/B**) Für Profilin wurden keine Unterschiede zwischen DMSO und MLN-4924-Behandlung festgestellt (Profilin1 DMSO: $100 \pm 6, 3$; Profilin1 MLN-4924: $116, 3 \pm 9, 5$; $P = 0,38$; $N = 6$. Profilin2 DMSO: $41, 1 \pm 9, 5$; Profilin2 MLN-4924: $40, 4 \pm 7, 8$; $P = 0,95$; $N = 6$) **C/D**) Es gibt einen statistisch signifikanten Unterschied für Cofilin1, aber nicht für Cofilin2 oder ADF (Cofilin1 DMSO: $100 \pm 5, 9$; Cofilin1 MLN-4924: $43, 5 \pm 6, 4$; $P < 0,0001$; $N = 6$. Cofilin2 DMSO: $14, 2 \pm 4, 9$; Cofilin2 MLN-4924: $12, 4 \pm 4, 5$; $P = 0,79$; $N = 6$. ADF DMSO: $94, 6 \pm 28, 2$; ADF MLN-4924: $43, 6 \pm 11, 9$; $P = 0,13$; $N = 6$) **E**) HEK-Zellen transfiziert mit Cofilin-GFP bzw. ADF-GFP-Konstrukt **F**) Sequenzabdeckung des in der Massenpektrometrie gefundenen Cofilin1.

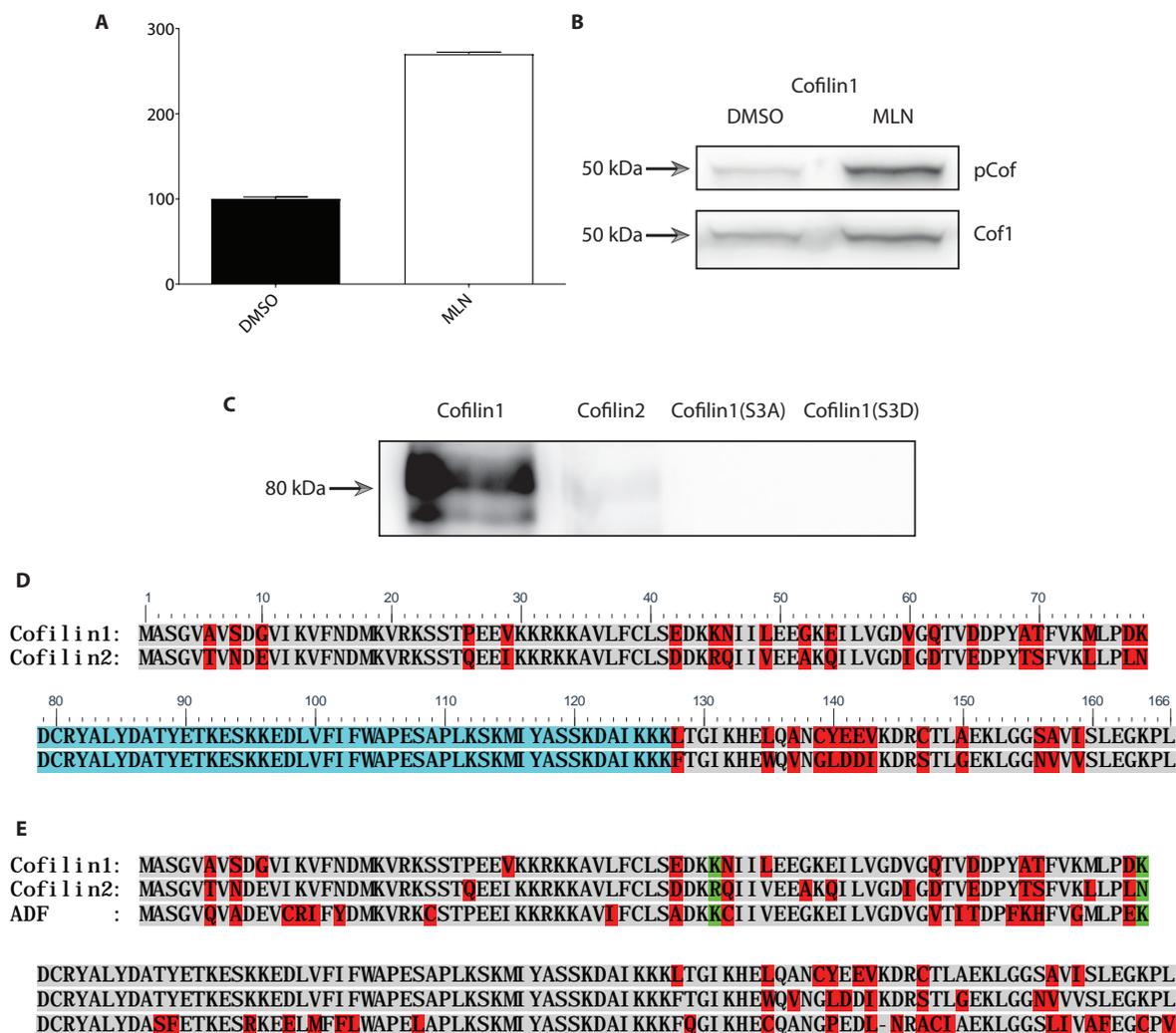


Abbildung 5.16: **Interaktion zwischen Neddylierung und Phosphorylierung von Cofilin1.**

A/B) Cofilin1 wird nach MLN-4924-Behandlung signifikant stärker phosphoryliert (DMSO: $100 \pm 2, 3$; MLN-4924: $270 \pm 2, 3$; $P > 0, 0001$; $N = 3$) **C)** Weder die phospho-blockierende S3A- noch die phospho-imitierende S3D-Mutante werden in HEK-Zellen neddyliert **D/E)** Sequenzvergleiche von humanem Cofilin1/2 sowie ADF. Abweichende Aminosäuren sind rot markiert. Der Homologiebereich zwischen Cofilin1 und 2 ist hellblau markiert. Die beiden Lysine die nur in Cofilin1 vorkommen, aber nicht in Cofilin2 sind grün hinterlegt.

5.3.3 Identifizierung neddylierte Lysine in Cofilin

Eine Möglichkeit um herauszufinden, wie die Neddylierung ein Protein beeinflusst, ist es das neddylierte Lysin zu einem Arginin zu mutieren und damit eine neddylierungsdefiziente Mutante zu erzeugen und diese im Vergleich zum Wildtyp zu untersuchen. Das Problem beim Identifizieren des neddylierten Lysins ist, dass selbst ein kleines Protein mit 19 kDa wie Cofilin1 25 Lysine besitzt.

Um die Anzahl der Lysine einzuschränken mache ich mir zunutze, dass Cofilin1 und Cofilin2 sehr ähnlich sind und Cofilin1 neddyliert wird, Cofilin2 hingegen nicht. Wenn man die Aminosäuresequenzen der beiden Proteine vergleicht, fällt der ausgedehnte Homologiebereich in der Mitte der Sequenzen, von Aminosäure 79 bis 127, auf, in Abbildung 5.16D hellblau dargestellt. Dies ausnutzend habe ich Chimären kloniert und untersucht, die entweder im vorderen Bereich, Aminosäure 1-78, aus Cofilin1 und im hinteren Bereich, Aminosäure 128-166, aus Cofilin2 bestanden, beziehungsweise umgekehrt.

In HEK-Zellen führt die Expression der Cofilin-Chimären, erkennbar an der GFP-Koexpression, zur Apoptose der Zellen, was eine Analyse der Neddylierung unmöglich macht.

Ein weiterer Blick auf die Sequenzen von Cofilin1 und Cofilin2 zeigt, dass es nur 2 Lysine gibt, die in Cofilin1 vorhanden sind, aber nicht in Cofilin2. Wie in Abbildung 5.16E grün dargestellt ist, handelt es sich um die Lysine an Position 45 und 78 in Cofilin1.

Diese Lysine mutiere ich zu dem ebenfalls positiv geladenem Arginin, entweder einzeln oder zusammen. Die Mutanten, sowie Cofilin1 als Positivkontrolle und Cofilin2 als Negativkontrolle werden je mit Avi-Nedd8 und BirA in HEK-Zellen exprimiert und daraufhin mittels Pulldown und Western Blot untersucht.

Wie in Abbildung 5.17A/B zu erkennen ist, kommt es zu einer Reduktion der Neddylierung von Cofilin1, wenn diese Lysine zu Arginin mutiert werden. Die Reduzierung ist deutlich für die Einzelmutanten, aber auch additiv, sodass die Reduzierung für die Doppelmutante Cofilin1(K45,78R) stärker ausfällt.

Ein Problem, das auftreten kann, wenn man einzelne Aminosäuren oder ganze Domänen mutiert ist, dass das Protein oder einzelne Domänen davon nicht korrekt falten oder das gesamte Protein als instabil abgebaut wird. Auch dies führt zu fehlendem Protein nach Pulldown und könnte sich fälschlicherweise als Entfernung des neddylierten Lysins interpretieren lassen. Das Vorhandensein des Proteins lässt sich relativ leicht durch einen C-terminalen GFP-Tag nachweisen. Korrekte Faltung ist schwieriger nachzuweisen. Sie lässt sich zum Beispiel über Interaktion mit anderen Proteinen zeigen. Im Fall von Co-

filin nutze ich die Interaktion mit Aktin. Cofilin bindet Aktin, unter anderem auch in dicken Aktinbündeln, die sich mikroskopisch erkennen lassen. In Abbildung 5.17C sieht man, dass bei Cofilin1 und 2 sowie allen Mutanten die Aktinbündel mit GFP dekoriert sind. Dies zeigt, dass die Aktin-Bindestelle der Cofiline trotz Mutation ordnungsgemäß gefaltet ist. Da Cofilin ein kleines Protein ist und nur aus einer Domäne besteht, liegt es nahe, dass damit auch das gesamte Protein korrekt gefaltet ist.

Es bleibt die Frage, warum zwei Lysine für die Neddylierung von Cofilin verantwortlich sind und warum diese 33 Aminosäuren entfernt voneinander liegen. Die erste Frage diskutiere ich an späterer Stelle, aber auf die zweite Frage gibt es eine einfache Antwort. Wenn man die Struktur von Cofilin1 betrachtet, siehe Abbildung 5.17D, bei der die angesprochenen Lysine rot eingefärbt sind, sieht man, dass die beiden Lysine zwar in der Primärstruktur weit voneinander entfernt liegen, in der Tertiärstruktur jedoch mit 2,8 nm nahe beieinander sind. Eventuell ist der Neddylierungskomplex promiskuitiv und wenn das primäre Neddylierungsziel entfernt wird, könnte es zu einer Neddylierung eines benachbarten Lysins kommen.

Nicht nur der Verlust der Neddylierbarkeit weist auf ein neddyliertes Lysin hin, sondern auch der Hinzugewinn von Neddylierbarkeit einer eigentlich nicht neddylierten Isoform kann ein neddyliertes Lysin zeigen. Hierfür mutiere ich Cofilin2, sodass es die ihm gegenüber Cofilin1 fehlenden zwei Lysine erhält. Der Western Blot nach Pulldown der Cofilin2 R45K, der N78K Einzelmutanten, sowie der R45K, N78K Doppelmutante ist in Abbildung 5.18 zu sehen. Hier kann man sehen, dass das Einfügen eines Lysins an Position 78 an Stelle des Asparagins zu Neddylierung von Cofilin2 führt, die fast dem Neddylierungslevel von Wildtyp Cofilin1 entspricht. Unerwarteterweise führt das Hinzufügen des Lysins an Position 45 nicht nur dazu, dass Cofilin2 nicht neddyliert wird, sondern verhindert sogar die Neddylierung die durch die Mutation zu Lysin an Position 78 gewonnen wird.

Wie ich bereits beschrieben habe, gibt es keinen Unterschied in der Neddylierung von Cofilin1 in Abhängigkeit des Phosphorylierungsstatus (siehe Abbildung 5.16C). Als nächstes untersuche ich, ob es in Cofilin1 andersherum eine Abhängigkeit des Phosphorylierungsstatus von der Neddylierung gibt. Ich habe dafür GFP-getaggtetes Wildtyp Cofilin1 in HEK-Zellen exprimiert, mit als auch ohne MLN-4924, sowie die neddylierungsdefiziente K45, 78R Doppelmutante. In Abbildung 5.19 sieht man, dass MLN-4924 wie gehabt den Anteil an phosphoryliertem Cofilin erhöht, die neddylierungsdefiziente Mutante aber kein erhöhtes Level an Phosphorylierung aufweist. Die Neddylierung und die Phosphorylierung von Cofilin1 sind anscheinend unabhängig voneinander.

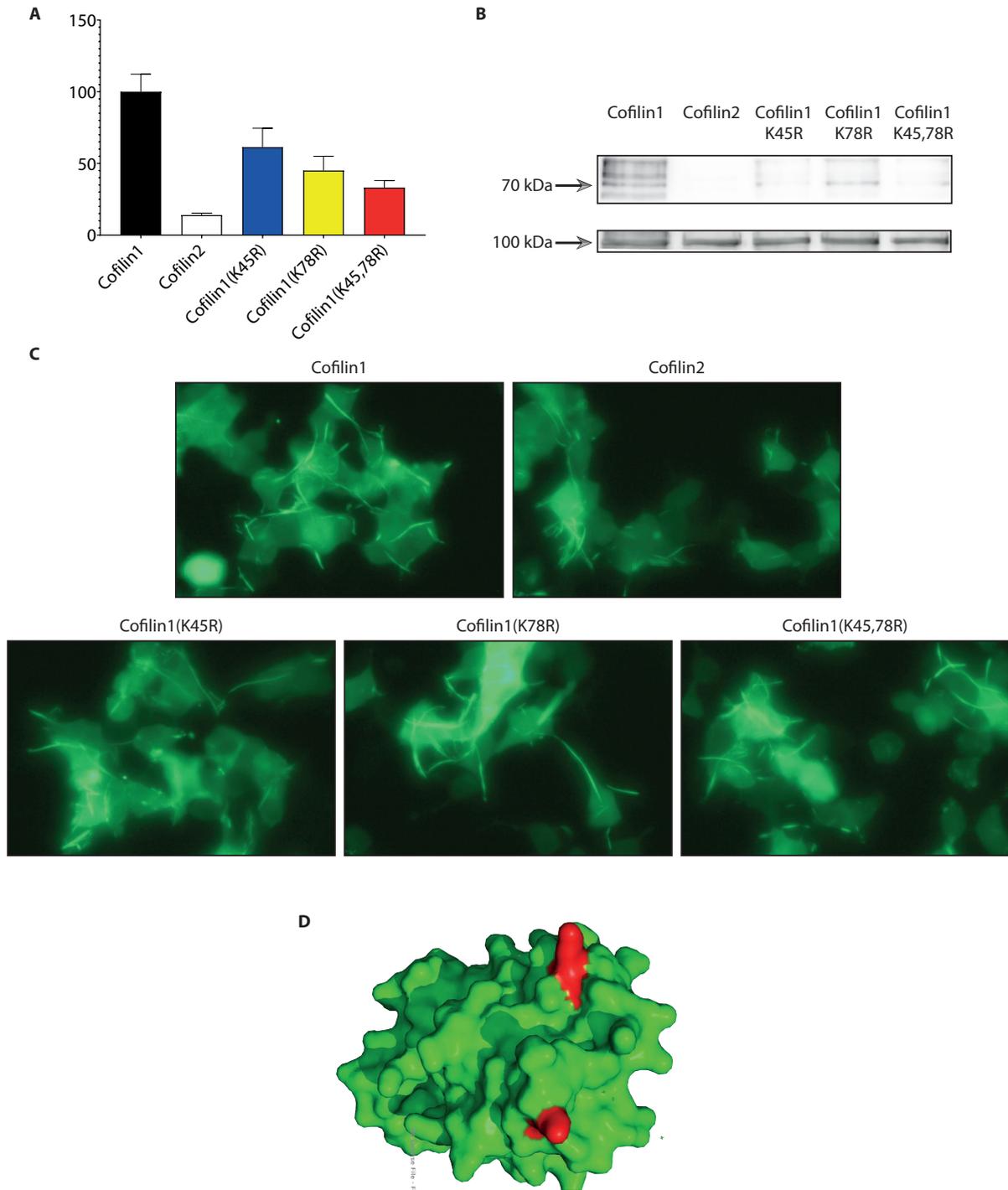


Abbildung 5.17: **Neddylierte Lysine in Cofilin1.** **A/B)** Das Ersetzen der Lysine 45 und 78 führt zu einer kumulativen reduzierten Neddylierung von Cofilin1. (T-Test gegen Wildtyp. WT: $100 \pm 12,3$; K45R: $61,3 \pm 13,2$; $P = 0,076$; K78R: $45,1 \pm 10,0$; $P = 0,013$; K45,78R: $33,2 \pm 4,9$; $P = 0,0024$; $N = 4$) **C)** Zellkulturaufnahmen in HEK-Zellen zeigt, dass die Cofilin1-Mutanten an Aktin binden. **D)** 3D-Struktur von Cofilin1, in der die beiden Lysine an Positionen 45 und 78 rot eingefärbt sind. (Struktur modifiziert nach PDB: 4bex).

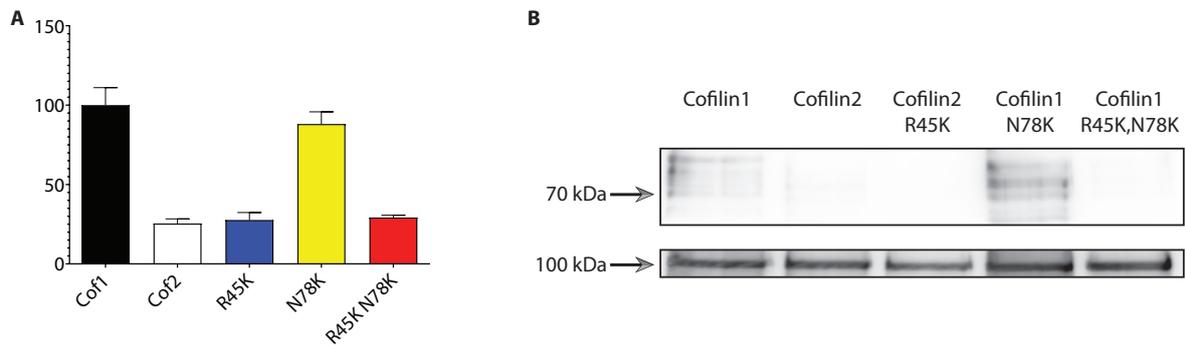


Abbildung 5.18: **Neddylierung von Cofilin2 durch Mutation zu Lysinen.** Das Ersetzen von Asparagin 78 durch Lysin ermöglicht die Neddylierung von Cofilin2. Mutation von Arginin 45 zu Lysin ermöglicht keine Neddylierung von Cofilin2. Es verhindert auch den Neddylierungsgewinn durch N78K (T-Test gegen Wildtyp Cofilin2. WT: $25,4 \pm 2,9$; R45K: $27,7 \pm 4,7$; $P = 0,703$; N78K: $88,1 \pm 7,7$; $P = 0,0003$; R45K,N78K: $29,2 \pm 1,4$; $P = 0,289$; $N = 4$).

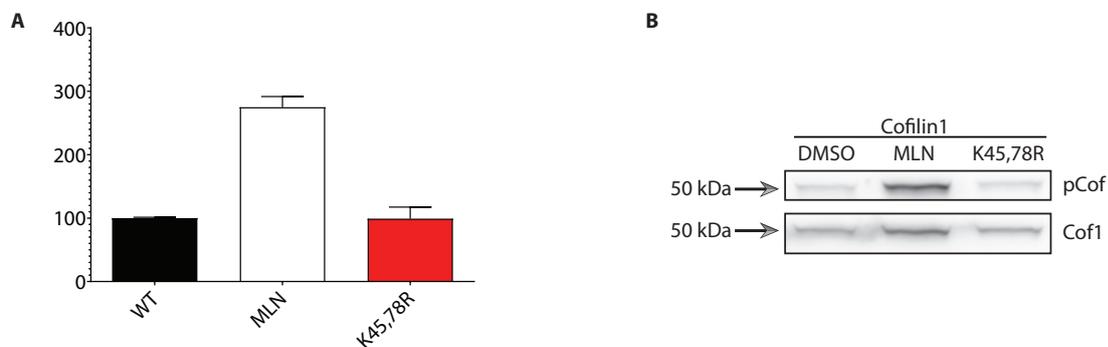


Abbildung 5.19: **Phosphorylierung von Cofilin1 in Abhängigkeit der Neddylierung.** Die neddylierungsdefiziente Cofilin1 Mutante K45,78R, hat einen unveränderten Phosphorylierungsstatus (DMSO: $100 \pm 1,3$; MLN-4924: $274,8 \pm 16,9$; K45,78R: $99,1 \pm 18,3$; $N = 2$).

5.3.4 Neddylierungsdefizientes Cofilin in der Entwicklung von Neuronen

Die in diesem Abschnitt beschriebenen Maus-Operationen und Vorbereitungen wurden gemeinsam mit und die Bildaufnahme sowie Bildanalyse alleinig von Dr. Michael Döngi durchgeführt.

Wir wollten die biologische Relevanz der Neddylierung von Cofilin1 im lebendem Organismus zu ermitteln. Dazu haben wir adulte Mäuse mit einem konstitutivem ADF-Knockout und gefloxtem Cofilin1, im Folgenden ADF-Mäuse genannt, im Gyrus dentatus viral transduziert. Diese Mauslinie wurde uns freundlicherweise von Dr. Christine Gurniak-Witke zur Verfügung gestellt. Durch Nutzung eines Moloney Maus-Leukämie-Virus (MoMLV), der nur sich teilende Zellen infiziert, kann eine spärliche Transduktion erreicht werden. Der Virus sorgt für die Expression einer Cre-Rekombinase, die zu einem Knockout von endogenem Cofilin1 in den betroffenen Zellen führt, von GFP das die Morphologie der transduzierten Zellen sichtbar macht, sowie einem dritten Protein. Dieses dritte Protein ist entweder ein zweites GFP, wodurch Cofilin1-Knockout Zellen entstehen (kurz KO), oder Cofilin1 zur Wiederherstellung eines möglichst nativen Zustands (kurz WT), oder die Cofilin1-K45,78R-Mutante, die nicht neddyliert werden kann (kurz Mutante). Eine graphische Übersicht über die verwendeten MoMLV-Viruskonstrukte befindet sich in Abbildung 5.21D. Als zweite Mauslinie verwenden wir C57BL/6J, im Folgenden B6-Mäuse genannt. Diese werden mit den gleichen Viren transduziert. Daraus ergeben sich die folgenden sechs Kombinationen:

B6 + KO (schwarz): Die transduzierten Zellen sind am ähnlichsten zu den Zellen aus unbehandelten Mäusen und haben nur eine Belastung durch virale Transduktion und Expression der Cre-Rekombinase und GFP. Diese Belastung ist auch in allen folgenden Kombinationen gegeben. Die Aktin-Zytoskelett kontrollierenden Proteine sind hier unbeeinflusst.

B6 + Mutante (blau): Die Zellen dieser Mäuse exprimieren immer noch die gesamte endogene Cofilin-Familie, aber es können sich dominante Effekte durch die Überexpression von nicht neddylierbarem Cofilin1 ergeben.

B6 + WT (orange): In dieser Kombination besitzen die Zellen immer noch die gesamte endogene Cofilin-Familie. Die Überexpression von Cofilin1 kann das Aktin-Zytoskelett beeinflussen.

ADF + KO (grün): Cofilin1 und ADF fehlen in diesen Zellen komplett. Lediglich Cofilin2 kann noch exprimiert werden.

ADF + Mutante (rot): Endogenes Cofilin1 und ADF fehlen in den transduzierten Zellen. Cofilin1 wird jedoch durch ein nicht neddylierbares Cofilin1 ersetzt. Im Vergleich zum Knockout und der Expression von Cofilin1 Wildtyp sollte der Effekt der fehlenden Regulation durch Neddylierung auf Cofilin1 sichtbar werden.

ADF + WT (violett): In dieser Kombination fehlt ADF, der Knockout des endogenen Cofilin1 sollte durch Überexpression von Cofilin1 zumindest teilweise ausgeglichen werden.

Der Virus wird stereotaktisch injiziert. 28 Tage nach viraler Transduktion werden die Mäuse in 4% Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Der dorsale Hippocampus wird in 70 µm dicke Coronalanschnitte geschnitten. Die Schnitte untersuchen wir auf GFP-Fluoreszenz. Positive Schnitte werden durch GFP-Antikörper und Alexa-488-gekoppeltem Sekundärantikörper nachgefärbt und dreidimensional konfokal mikroskopiert.

In Abbildung 5.20 sieht man beispielhafte Bilder und Rekonstruktionen in Form von Maximumprojektionen. Alle Kombinationen zeigen eine Mischung sowohl aus kurzen, wie auch längeren Dendriten. ADF + Mutante, sowie ADF + WT zeigten tendenziell kürzere Dendriten. Auffällig bei ADF + Mutante, die Variante bei der Cofilin1 nicht mehr durch Neddylierung reguliert werden kann, ist Bläschenbildung sowohl entlang des Dendriten, als auch in den Wachstumskegeln, in Abbildung 5.20 mit roten Sternen markiert. Dies tritt bei etwa einem Fünftel der Zellen auf.

Die Analysen, gezeigt in Abbildung 5.21, zeigen keinen statistisch signifikanten Unterschied im Somadurchmesser, der Länge der Dendriten und der Anzahl der durchschnittlichen Verzweigungen für die untersuchten Bedingungen. Auch die Sholl-Analyse, mit der man die Komplexität des Dendritenbaums auswertet, zeigt für die neddylierungsdefiziente Mutante keine statistisch signifikante Änderung. Es besteht einzig ein Unterschied zwischen B6 + WT und ADF + WT (siehe Abbildung 5.21B rechts unten). Der Grund hierfür liegt vermutlich in der erhöhten Cofilin1 Expression in B6 + WT, die sowohl endogenes, sowie transduziertes Cofilin1 exprimiert.

Die Ursache für den hier mangelnden Unterschied liegt in der Art der Bildauswertung. Das Gehirn wird für die mikroskopischen Aufnahmen in Scheiben geschnitten. Hier kann es passieren, dass der Dendritenbaum nicht parallel in der Schnittebene liegt und von seinem Zellkörper getrennt wird. Um diese Präparationsartefakte zu vermeiden, werden alle Zellen ausgeschlossen, deren Dendrit kürzer als 200 µm ist. Der Anteil der hierdurch ausgeschlossenen Zellen ist in Abbildung 5.21C dargestellt. Bei B6 + KO, bei denen Aktin-Zytoskelett kontrollierende Proteine unbeeinflusst sind, werden etwa 2% der Zellen ausgeschlossen. Anders bei ADF + Mutante, bei der endogenes Cofilin1 durch nicht

neddylierbares Cofilin1 ersetzt wird. Hier werden über 50% der Zellen von der Analyse ausgeschlossen. Der große Unterschied von 2% zu 50% deutet darauf hin, dass es sich nicht um ein Präparationsartefakt handelt, sondern die Dendritenentwicklung in über der Hälfte der Zellen massiv gestört ist und in die Analyse nur die vergleichsweise gesunden Zellen mit milden Phänotyp einfließen.

Hinzu kommt, dass bei B6 + KO 3 Tiere ausreichend sind, um 31 transduzierte Zellen zu finden, wohingegen bei ADF + Mutante 7 Tiere für 32 Zellen benötigt werden. Auch wenn Virustiter und Genauigkeit der Virusinjektion ebenfalls einen Einfluss auf die Anzahl der transduzierten Zellen pro Tier haben, deutete eine Reduktion auf weniger als die Hälfte der Zellen pro Tier darauf hin, dass das Ersetzen von Cofilin1 durch nicht neddylierbares Cofilin1 zur Apoptose führen könnte. Dies könnte erklären warum 28 Tage nach Virusinjektion, zum Zeitpunkt der Fixierung, weniger transduzierte Neurone vorhanden sind.

Deswegen soll im folgenden Experiment unter anderem die Apoptoserate ermittelt werden.

5 Ergebnisse

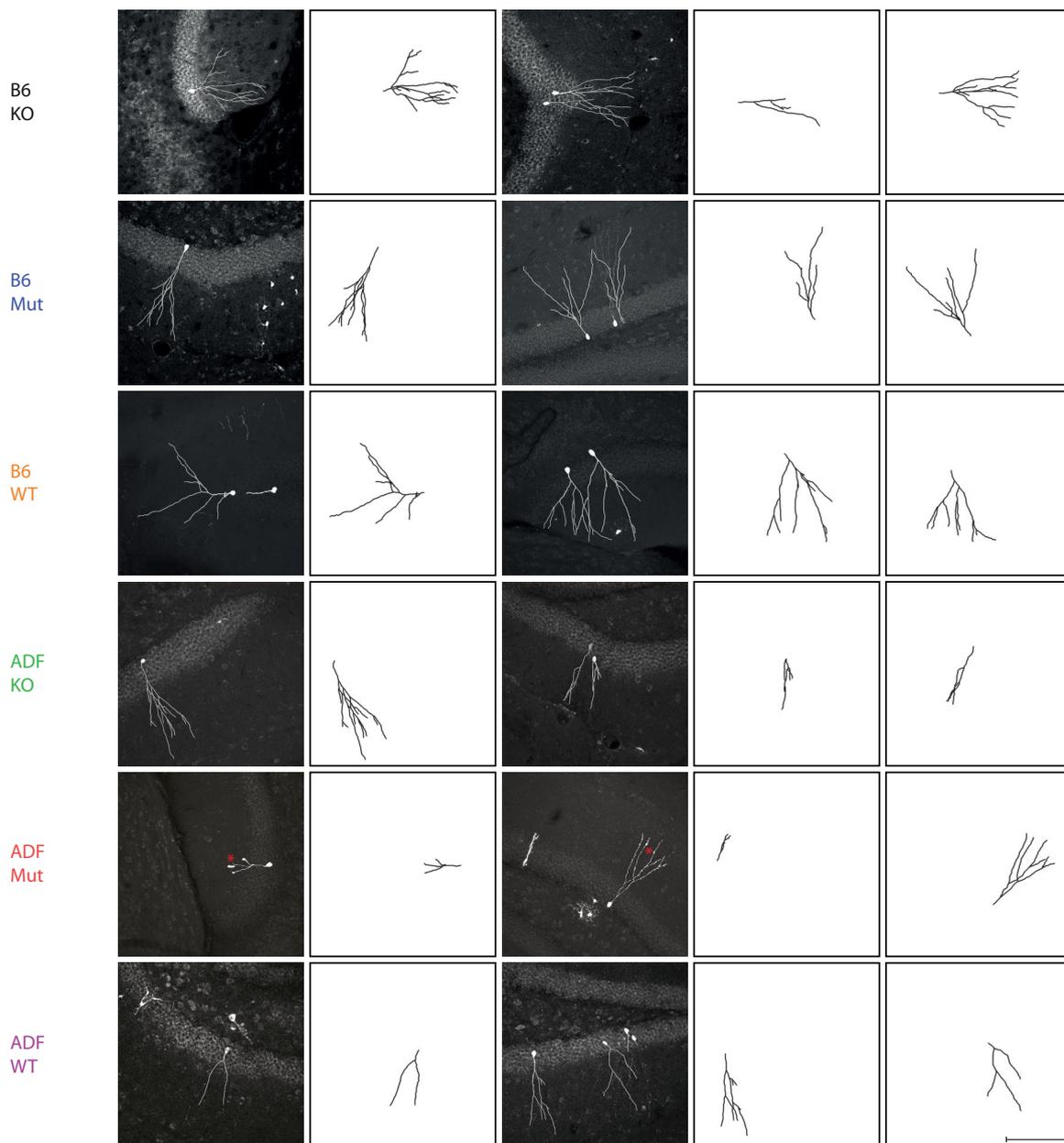


Abbildung 5.20: **Cofilin1-Austausch in vivo**. Originalaufnahmen und daraus rekonstruierte Dendriten als Overlay und als Einzelabbildung. **Schwarz:** C57BL/6J-Tiere transduziert mit Cre:P2A:GFP:P2A:GFP MoMLV. **Blau:** C57BL/6J-Tiere transduziert mit Cre:P2A:Cofilin1(K45,78R):P2A:GFP MoMLV. **Orange:** C57BL/6J-Tiere transduziert mit Cre:P2A:Cofilin1:P2A:GFP MoMLV. **Grün:** ADF-Tiere (konstitutiver ADF-Knockout und gefloxtes Cofilin1) transduziert mit Cre:P2A:GFP:P2A:GFP MoMLV. **Rot:** ADF-Tiere transduziert mit Cre:P2A:Cofilin1(K45,78R):P2A:GFP MoMLV. **Violett:** ADF-Tiere transduziert mit Cre:P2A:Cofilin1:P2A:GFP MoMLV. Die Maßstabsskala entspricht 100 μm .

Mit freundlicher Genehmigung von Dr. Michael Döngi.

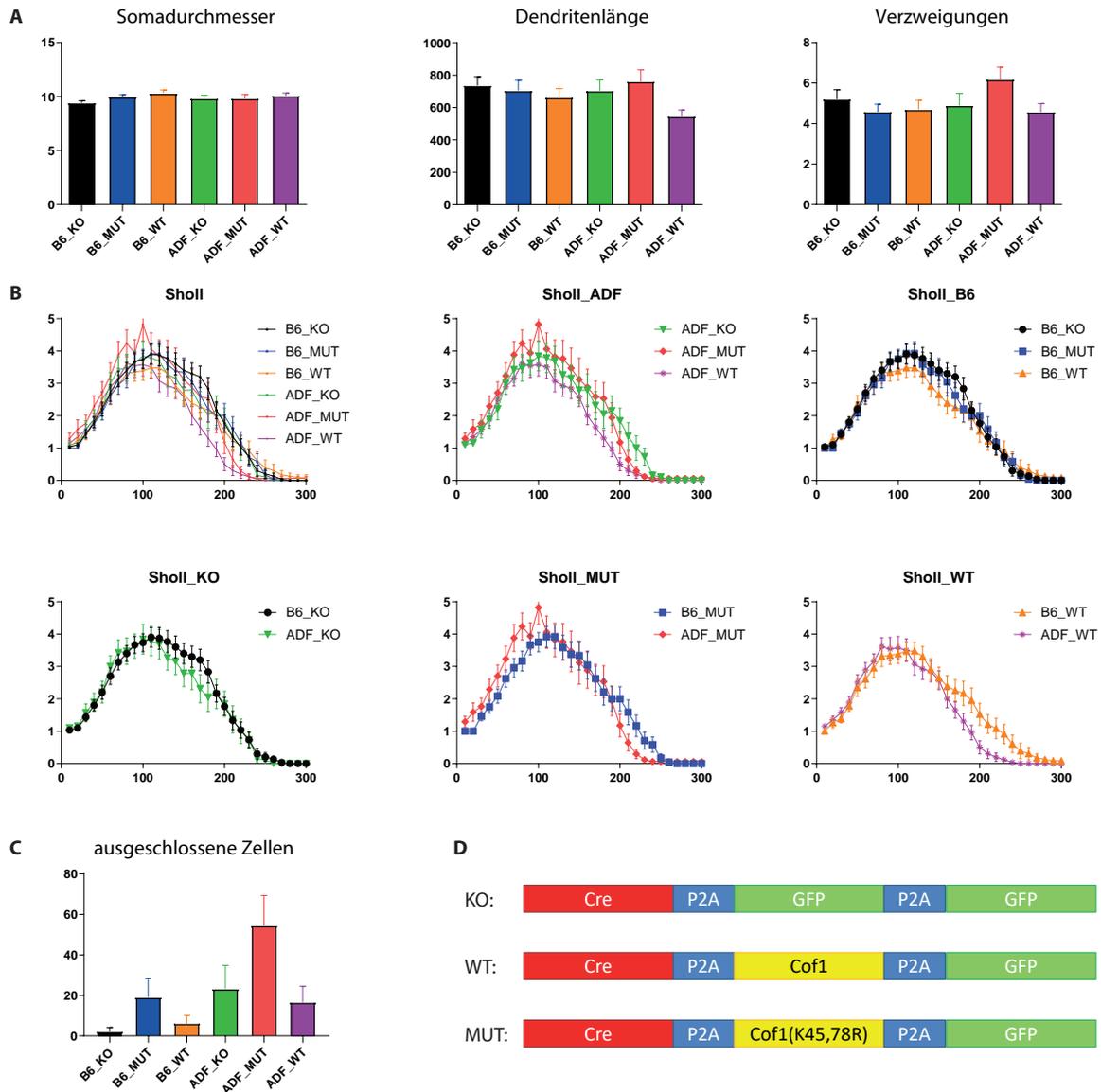


Abbildung 5.21: **Auswertung der in Abbildung 5.20 beispielhaft gezeigten in vivo Aufnahmen.** **A)** Die Parameter Somadurchmesser, Länge des Dendriten und Anzahl der Verzweigungen zeigen keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den untersuchten Bedingungen. **B)** Die Sholl-Analyse, aufgeteilt nach Genotyp der Maus oder verwendetem Virus, zeigt nur einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen B6 + WT (orange) und ADF + WT (violett). **C)** Prozentzahl der von der Analyse ausgeschlossenen Zellen, da deren Dendrit kürzer als 200 μm war. **D)** Übersicht der verwendeten MoMLV-Viruskonstrukte.

A-C) B6_KO: $n = 31$, $N = 3$, B6_MUT: $n = 31$, $N = 5$, B6_WT: $n = 25$, $N = 5$, ADF_KO: $n = 26$, $N = 7$, ADF_MUT: $n = 32$, $N = 7$, ADF_WT: $n = 31$, $N = 4$
A/B) mit freundlicher Genehmigung von Dr. Michael Döngi.

5.3.5 Lebendzellmikroskopie nach Cofilin1 Austausch

Um die Ereignisse zu untersuchen, die zwischen Transduktion der Zellen und Fixierung nach 28 Tagen liegen, soll eine primäre Neuronenkultur aus ADF-Tieren erzeugt und viral transduziert werden. Die Aussaat der Zellen erfolgt auf Zellkulturschalen mit Glasboden, wodurch die Neurone in ihrer Kulturschale regelmäßig mikroskopiert werden können. Hierdurch lässt sich sowohl die Entwicklung der Neurone beobachten als auch die Apoptoserate der transduzierten Zellen bestimmen.

Ein Problem, das hier auftreten kann ist, dass die Zellen im Gegensatz zu den fixierten Zellen in 5.3.4 nicht mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern nachgefärbt werden können, um das GFP-Signal zu verstärken. Um ein starkes Fluoreszenzsignal zu erhalten, benötigt man eine starke GFP-Expression. Dies lässt sich erreichen, indem man viele Kopien des GFP-Gens in die Zelle einbringt, was man durch einen hohen Virustiter erzielen kann. Allerdings möchte ich nur einzelne Zellen transduzieren, damit man die Dendriten noch eindeutig den jeweiligen Zellkörpern zuordnen kann, was sich durch einen niedrigen Virustiter erzielen lässt. Um dieses Problem zu umgehen, sollen zwei virale Vektoren eingesetzt werden. Der erste besitzt eine Stop-Kassette, die die Transkription unterbricht und die von LoxP-Sequenzen umgeben ist, gefolgt von einem GFP-Gen. Dieser Vektor soll in hoher Konzentration eingesetzt werden, sodass in den Neuronen eine hohe Kopienanzahl von GFP gegeben ist, das aber nicht exprimiert wird, da die Transkription davor durch die Stop-Kassette unterbrochen wird. Der zweite virale Vektor besitzt eine Cre-Rekombinase, die LoxP-Sequenzen rekombinieren kann. Hierdurch wird die Stop-Kassette vor dem GFP entfernt, wodurch dieses transkribiert und in großer Menge exprimiert werden kann. Der virale Vektor mit Cre soll in geringer Konzentration eingesetzt werden, um nur einzelne Zellen zu transduzieren. Durch diese Kombination lässt sich beides erreichen, nur vereinzelte Zellen sind fluoreszent und diese haben eine starke GFP-Expression.

Durch Probleme in der Erzeugung von primärer Neuronenkultur, deren Zellen mehrere Wochen überleben, ließ sich dieses Experiment nicht im Zeitrahmen dieser Doktorarbeit durchführen.

5.4 Vergleich zu anderen Arbeiten zu Neddylisierung von Cofilin1

In einer vergleichbaren Arbeit von Annette Vogl und anderen [Vogl et al., 2020] wurden ähnliche Ergebnisse gefunden, jedoch abweichend mit K112 als neddyliertem Lysin von Cofilin1. Ich habe alle drei Lysine weiter untersucht. In Abbildung 5.22A/B ist zu sehen, dass die Entfernung von Lysin 112 die gleiche Reduzierung der Neddylisierung zeigt, wie die Entfernung der Lysine 45 und 78. Eine Dreifachmutante, bei der alle drei Lysine zu Arginin mutiert werden, zeigt keine weitere Reduzierung der Neddylisierung.

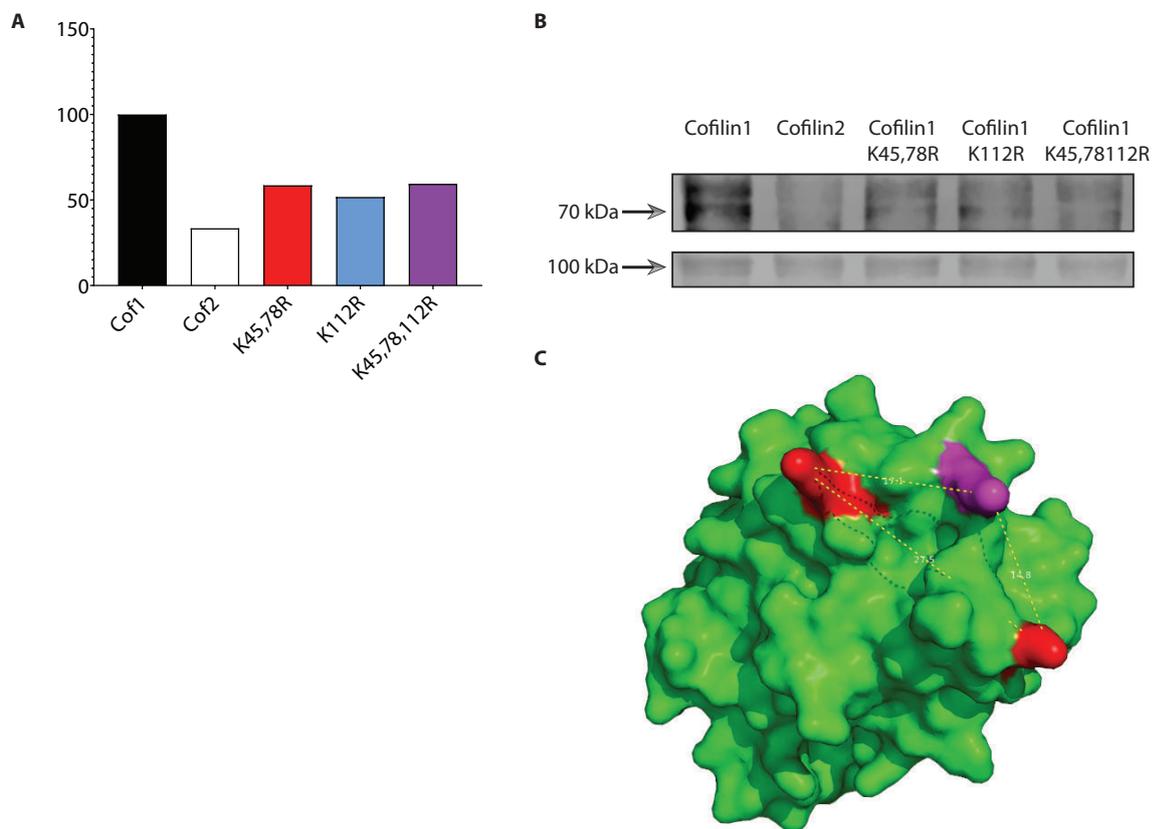


Abbildung 5.22: **Vergleich der Cofilin1 K45,78R und der K112R Mutante A/B)** Sowohl die K45,78R als auch die K112R Mutante führen zu einer reduzierten Neddylisierung von Cofilin1. Ein Ersetzen aller drei Lysine führt zu keiner weiteren Reduktion (N = 1) **C)** Der Abstand zwischen Lysin 45 und 78 in rot beträgt 2,8 nm. Die Abstände zu dem in violett dargestelltem Lysin 112 betragen 1,5 nm bzw. 1,7 nm (Struktur modifiziert nach PDB: 4bex).

5.4.1 Cofilin1-Bindestelle für UBC12

Auch das dritte Lysin an Position 112 liegt mit 1,5 nm respektive 1,7 nm in räumlicher Nähe der beiden anderen, siehe Abbildung 5.22C. Eine Möglichkeit zu erklären warum entweder die Entfernung von Lysin 112 oder der Lysine 45 und 78 zu einer starken Reduktion der Neddylierung führt, wäre dass ein bis zwei der Lysine direkt neddyliert werden, die anderen jedoch für die Bindung von UBC12 benötigt werden.

Um dies genauer zu untersuchen, mutiere ich Aminosäuren, die innerhalb der vermuteten Bindestelle liegen. Diese potentielle Bindestelle vermute ich in Form des von den Lysinen 45, 78 und 112 aufgespannten Dreiecks, vgl. Abbildung 5.23D. Wie in Abbildung 5.23A/B zu sehen ist, führt die Mutation der Glutaminsäure an Position 42 zur kleineren Aminosäure Asparaginsäure zu keiner nennenswerten Änderung der Neddylierung. Der Austausch zum größeren Tyrosin führt zu einer Reduktion der Neddylierung. Eine Reduktion im stärkerem Ausmaß folgte dem Austausch der Asparaginsäure an Position 79 zur größeren Glutaminsäure. Die Mutation von Isoleucin an Position 116 zu Tryptophan, zieht ebenfalls eine Reduktion der Neddylierung nach sich. Letzteres liegt aber wahrscheinlich daran, dass Cofilin1 mit der größten proteinogenen Aminosäure Tryptophan nicht mehr ordnungsgemäß falten kann, da auch die Bindung zu Aktin gestört ist, wie in Abbildung 5.23C zu erkennen ist.

Da die Mutation zu größeren Aminosäuren in der potentiellen Bindestelle die Neddylierung tendenziell reduziert und die Mutation zu kleineren nicht, bestärkt dies meine Theorie einer Bindestelle für UBC12, die durch die entsprechenden Mutationen sterisch blockiert wird. Hinzu kommt, dass die Lysine in Cofilin1 unverändert sind und es trotzdem zu einer Reduktion der Neddylierung kommt.

5.4 Vergleich zu anderen Arbeiten zu Neddylierung von Cofilin1

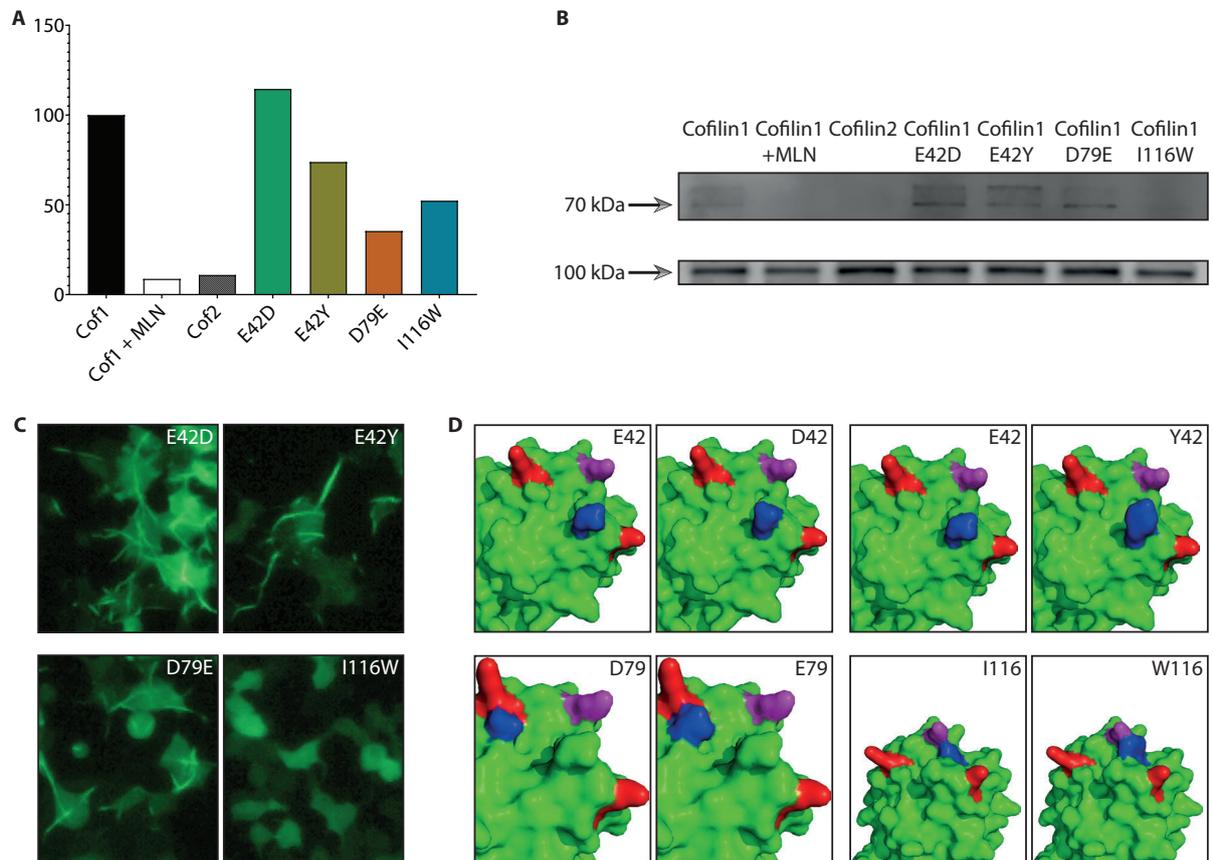


Abbildung 5.23: Mutationen die in der vermuteten UBC12-Bindestelle von Cofilin1 liegen.

A/B) Die Mutation von E42D scheint keinen Einfluss auf die Neddylierung zu haben, wohingegen E42Y zu einer leicht reduzierten Neddylierung führt und D79E und I116W eine deutliche Reduktion nach sich ziehen (N = 1) **C)** Zellkulturaufnahmen in HEK-Zellen zeigt, dass die Cofilin1-Mutanten E42D, E42Y und D79E an Aktin binden. Die Mutante I116W zeigt ein gleichmäßiges Fluoreszenzsignal im Zytosol und scheint Aktin nicht mehr binden zu können. **D)** In-silico-Mutation der untersuchten Cofilin1-Mutanten. In rot und violett sind die für die Neddylierung wichtigen Lysine zur Orientierung dargestellt. In blau ist die mutierte Aminosäure dargestellt, im jeweiligen Bildpaar links die native Aminosäure und rechts die mutierte (Struktur modifiziert nach PDB: 4bex).

5.4.2 PSD-95-Bindestelle für UBC12

Da es sich um eine potentielle Bindestelle für UBC12 handelt, dem einzigen bekannten E2 Enzym der Neddylierungskaskade, vermute ich, dass diese Bindestelle auf den neddylierten Proteinen konserviert ist. Im Gegensatz dazu gibt es mehrere Nedd8-E3-Proteine, von denen die meisten vermutlich noch unbekannt sind. Durch die höhere Anzahl an Nedd8-E3-Proteinen können die E3-Bindestellen an neddylierten Proteinen somit diverser und spezifischer sein.

Mit Hilfe von Pymol untersuche ich die Oberfläche von PSD-95. Ich prüfe, ob das Lysin 202, das neddyliert wird, ebenfalls ein Teil eines Dreiecks von positiver Ladung ist. Wie in Abbildung 5.24A zu sehen ist, finde ich ein potentielles Triplet aus Lysin 202 mit 168 und 193. Dieses Dreieck hat eine Kantenlänge von 1,1 nm bis 1,6 nm, also in einer vergleichbaren Größenordnung wie das Lysin-Dreieck in Cofilin1. Interessanterweise wurde von Annette Vogl gezeigt, dass Lysin 202 das bevorzugte Neddylierungsziel ist, aber teilweise auch Lysin 193 neddyliert wurde [Vogl et al., 2015].

Wenn also die positiv geladenen Lysine ein Dreieck bilden, sollten in der Nähe des aktiven Zentrums von UBC12 negative Ladungen vorhanden sein, die diese positiven Ladungen anziehen und in räumlicher Nähe des aktivierten Nedd8 halten können.

In Abbildung 5.24B/C sieht man, dass es mir möglich ist, zu jedem der drei Lysine in Cofilin1 eine negativ geladene Aminosäure in UBC12 zu finden. Der Abstand zwischen ϵ -N von Lysin 45 zum C_γ von Aspartat 89 beträgt 0,3 nm, zwischen ϵ -N von Lysin 78 zum C_γ von Aspartat 143 beträgt er 0,2 nm und der Abstand zwischen ϵ -N von Lysin 112 zum C_δ von Glutamat 117 ist 0,4 nm in diesem Modell ohne dass es zu einer Kollision zwischen den beiden Proteinen kommt.

Wenn man nun Nedd8 mit einblendet (siehe Abbildung 5.24D) sieht man, dass Glutamat 117 und Aspartat 143 beide einen offenen Bogen über dem aktiven Zentrum bilden. Sie eignen sich damit dafür mit ihrer negativen Ladung ein positiv geladenes Lysin direkt über dem aktiviertem Nedd8 zu halten. Das Dreieck das von Aspartat 89, Glutamat 117 und Aspartat 143 aufgezogen wird hat eine Kantenlänge von 0,9 nm bis 2,2 nm und liegt in einer vergleichbaren Größenordnung wie die Lysin-Dreiecke in Cofilin1 und PSD-95.

In Abbildung 5.24E wird nun zusätzlich Cofilin1 eingeblendet. Wie durch ihre Nähe zu Glutamat 117 und Aspartat 143 in UBC12 zu erwarten ist, sind die Lysine 78 und 112 von Cofilin1 sehr nah am aktivierten di-Glycin von Nedd8. Lysin 45 hingegen ist auf der abgewandten Seite, deutlich weiter entfernt und vermutlich von Nedd8 nicht zu erreichen.

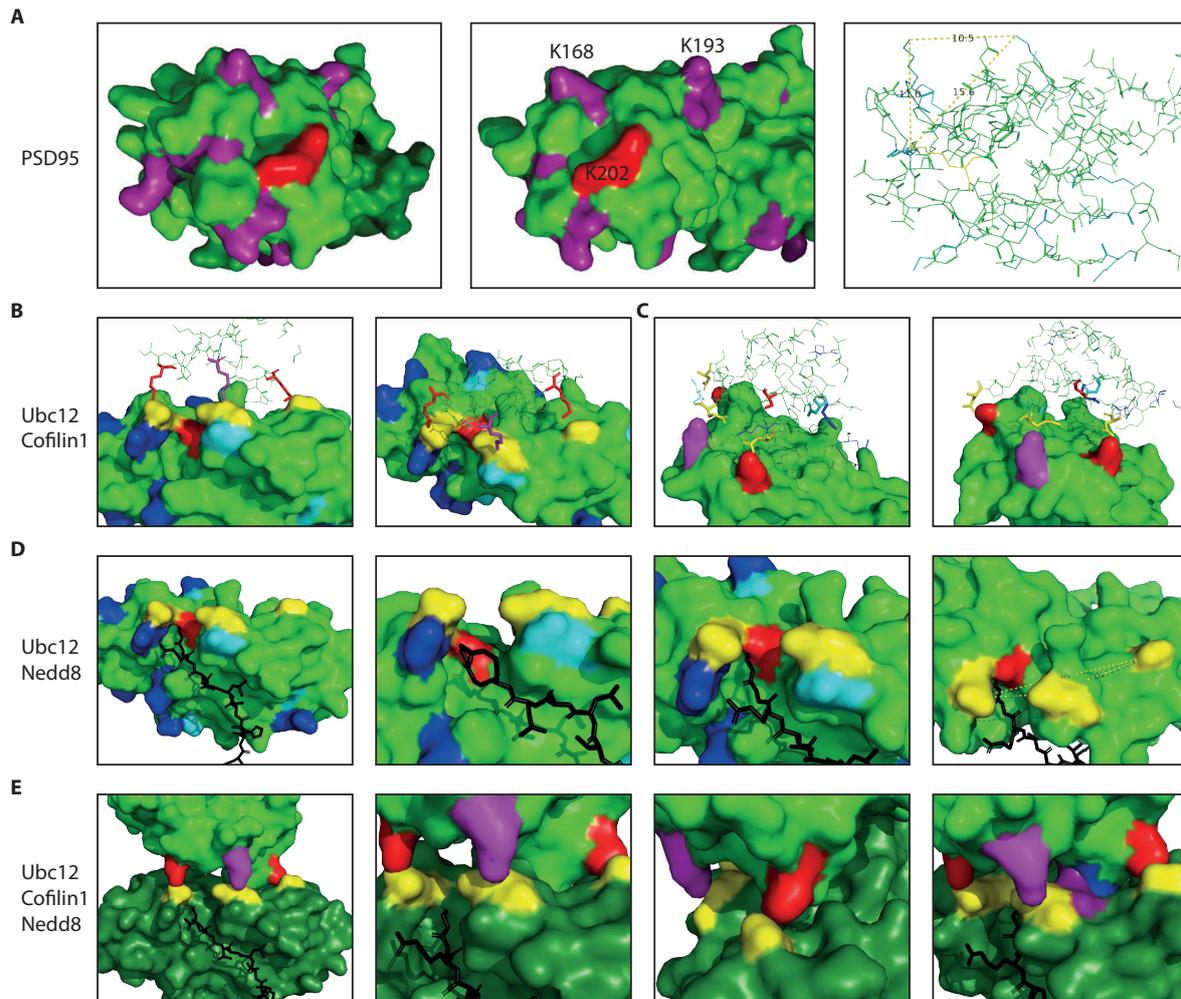


Abbildung 5.24: **Modellierung einer Bindestelle für Ubc12.** **A)** 3D-Struktur von UBC12. Das bekannte neddylierte Lysin 202 wurde rot gefärbt, alle weiteren Lysine pink. Kandidaten für ein Lysin-Dreieck mit Lysin 202 wären die Lysine 168 und 193. Das durch diese Lysine gebildete Dreieck hat eine Kantenlänge von 1,1 nm bis 1,6 nm. **B)** UBC12 in der Oberflächendarstellung. Das aktive Zentrum an Position 111 ist rot dargestellt (hier Serin, im Wildtyp Cystein). Negativ geladene Aminosäuren, die mit den positiv geladenen Lysinen in Cofilin interagieren könnten, gelb gefärbt. Alle weiteren Glutamate dunkelblau und Aspartate hellblau gefärbt. Zur Unterscheidung und Transparenz wurde Cofilin1 in Linienrepräsentation dargestellt und auf die Aminosäuren reduziert, die in die Nähe von UBC12 kommen könnten. Lysine 45 und 78 wurden rot dargestellt, Lysin 112 pink. **C)** Wie B) aber Cofilin1 als Oberfläche und UBC12 als Linien dargestellt. **D)** UBC12 wie in B) dargestellt mit den ersten zehn Aminosäuren von Nedd8 als schwarze Linien kovalent an das aktive Zentrum von UBC12 gebunden. Das Dreieck, das von den negativ geladenen Aminosäuren der potentiellen Bindestelle gebildet wird, beträgt 0,9 nm bis 2,2 nm. **E)** UBC12 als Oberfläche dunkelgrün dargestellt mit den potentiell interagierenden negativ geladenen Aminosäuren gelb gefärbt. Daran gebunden in schwarzen Linien Nedd8. Cofilin1 in hellgrün mit Lysinen 45 und 78 in rot und Lysin 112 in pink. Zusätzlich ganz rechts: weiteres Ionenpaar im Inneren der potentiellen Bindestelle. (Strukturen modifiziert nach PDB, PSD-95: 6spv, Cofilin1: 4bex, UBC12 und Nedd8: 4P5O).

6 Diskussion

6.1 Neddylierung synaptischer Proteine

Mir ist es gelungen, ein universelles Protokoll zu entwickeln, mit dem man eine Vielzahl an Proteinen auf Neddylierung untersuchen kann. Dieses ist nicht nur auf synaptische Proteine beschränkt, sondern lässt sich für jedes Protein nutzen, dass mit biotinyliertem Nedd8 koexprimiert werden kann. Eine herausragende Eigenschaft dieses Protokolls ist, dass es ermöglicht nicht nur cytosolische Proteine wie Cofilin1, membrangebundene Proteine wie PSD-95, sondern auch Transmembranproteine wie die GluA-Rezeptoren zu untersuchen. Vor allem die letzte Gruppe der Transmembranproteine entzieht sich häufig einer Analyse, da sie durch ihre hydrophoben Bereiche (GluA-Rezeptoren zum Beispiel besitzen 4 Membrandomänen) im Lösungsmittel Wasser aggregieren, dadurch ausfallen und in der Folge nicht für eine Analyse zur Verfügung stehen.

Ein weiterer Vorteil ist es, dass man vom zu untersuchenden Protein nur ein GFP-Fusionsprotein benötigt, um das Protokoll durchführen zu können.

Die Größe der erfolgreich untersuchten Proteine reicht von 15 kDa von Profilin1 bis hin zu 160 kDa von Rho-associated protein kinase 1 (ROCK1). Da es jeweils GFP-Fusionsproteine sind, steigert sich das Molekulargewicht um 30 kDa. Noch größere Proteine können die Trenn- und Übertragungskapazitäten des Western Blot Verfahrens strapazieren. Die Banden könnten unscharf werden und das relative Unterschied im Molekulargewicht zwischen unneddylierter Form zu neddylierter Form wird gering. Dadurch könnte es schwierig werden die Bandenverschiebung durch das Anhängen von Nedd8 aufzulösen. Für solche Proteine könnte man alternativ nach dem Pulldown einen Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) oder Dot Blot durchführen. Deren Nachteil, dass falsch positive Signale durch fehlenden Größentrennung nicht ausgeschlossen werden können, fällt durch die hohe Spezifität (kommerziell) erhältlicher GFP-Antikörper kaum in das Gewicht. Es wird hier sogar zum Vorteil, da somit auch Proteine untersucht werden können, die zu groß für das Western Blot Verfahren sind.

Mein Fokus auf ein universell einsetzbares Protokoll erforderte es, gewisse Optionen

auszuschließen, da sie mit den Voraussetzungen für eine universelle Nutzung inkompatibel sind. Ich möchte jedoch noch zwei Varianten aufführen, die man unter bestimmten Umständen nutzen kann. Wenn man bereit ist auf die Analyse von Membranproteinen zu verzichten und nur cytosolische Proteine zu untersuchen, kann man auf die Zugabe von Detergenzien verzichten und die Zellen stattdessen mechanisch aufschließen. Durch den Verzicht auf Detergenzien kann man zum Waschen im Pulldown auch Guanidiniumhydrochlorid verwenden, dass ein stark chaotropes Salz ist, damit stark denaturierend wirkt und eventuell zu einem stringenteren Waschen führt, als die Verwendung von Harnstoff allein [Hofmeister, 1888]. Die zweite Möglichkeit, die sich dann eröffnet, ist die Ultrafiltration, bei der kleine Moleküle wie Biotin oder freies Avi-Nedd8 abfiltriert werden können. Beide können an die Streptavidinbindestellen der Magnetbeads binden. Wenn Biotin und freies Avi-Nedd8 vor dem Pulldown entfernt werden, bleiben diese Bindestellen frei und können stattdessen mehr mit Avi-Nedd8 neddylierte Proteine binden, sodass die Magnetbeads effektiver genutzt werden können. Des Weiteren kann bei der Ultrafiltration das Volumen der Probe reduziert werden, sodass mehr Zelllysate eingesetzt werden kann, um die oben beschriebenen frei bleibenden Bindestellen abzusättigen, ohne dass sich das weitere Protokoll ändert.

Bei der Auswertung der Pulldowns sollte man beachten, dass man sich die inhärente Neddylierungsmaschinerie der spezifischen Zellkulturlinie zunutze macht, welche man zur Expression benutzt. Nach dem derzeitigen Stand der Forschung gibt es keine andere Möglichkeit, da die meisten E3-Enzyme der verschiedenen Neddylierungskaskaden noch unbekannt sind. Dies führt zu folgenden Einschränkungen. Zum einen kann man dadurch die Nedd8-E3-Ligasen nicht überexprimieren. Zum anderen kann es sein, dass das benötigte E3-Protein in der verwendeten Zellkulturlinie nicht exprimiert wird, oder wenn es exprimiert wird, dass es anders reguliert wird. Während dies für ubiquitinär exprimierte Proteine wie Cofilin und Profilin keine Rolle spielt, kann es bei zelltypspezifischen Proteine wie den GluA-Rezeptoren eine Rolle spielen, wenn sie in Nieren-Zellen exprimiert werden, statt in exzitatorischen Neuronen des zentralen Nervensystems. Aus diesem Grund konnte ich im Abschnitt 5.1.2 lediglich die Aussage treffen, dass GluA-Rezeptoren in HEK-Zellen nicht neddyliert werden. Dies heißt jedoch nicht unbedingt, dass GluA-Rezeptoren in Neuronen und/oder unter bestimmten Bedingungen ebenfalls nicht neddyliert werden. Für zuverlässige Ergebnisse sollten zu untersuchende Proteine endogen exprimiert werden [Rabut and Peter, 2008]. Deshalb haben wir eine Avi-Nedd8-Maus erzeugt, die dies in Zukunft gewebespezifisch und unter endogenem Promotor ermöglichen soll. Mehr dazu wird in 6.5 Avi-Nedd8-Mauslinie beschrieben.

6.2 Einfluss von Neddylierung auf das Aktin-Zytoskelett

Die Behandlung von Zellen mit MLN-4924 sorgt für eine robuste Erhöhung des F/G-Aktin-Verhältnisses um mehr als 50%. Dies gilt sowohl für HEK-Zellen, als auch primäre Neurone. Für die Zuverlässigkeit des Experimentes spricht die Reproduzierbarkeit, die sich in niedrigen Schwankungen und kleinen Fehlerbalken widerspiegelt. Die Behandlung mit Latrunculin A zeigt nicht nur, dass die Trennung und Quantifizierung von F/G-Aktin funktioniert. Sie zeigt auch, dass sowohl bei mit DMSO, als auch bei mit MLN-4924 behandelten Zellen mit erhöhtem F/G-Aktin-Verhältnis das Verhältnis relativ gesehen gleich abnimmt, im Beispiel von Abbildung 5.14 um jeweils ein Drittel. Dies deutet auf einen unterschiedlichen Wirkmechanismus von Latrunculin A und MLN-4924 hin. Da Latrunculin A den Aufbau von filamentösem Aktin behindert, könnte dieser unterschiedliche Wirkmechanismus darauf hindeuten, dass MLN-4924 den Abbau von F-Aktin zu G-Aktin beeinflusst.

6.3 Neddylierung von Aktinregulatoren

Profiline werden in HEK-Zellen nicht neddyliert, da es keinen Unterschied in der Bandenintensität nach DMSO- und MLN-4924-Behandlung gibt. Einen Unterschied gibt es jedoch zwischen Profilin1 und Profilin2. In Abbildung 5.14A sieht man, dass der Pull-down von Profilin1 zu zweieinhalbfach so starken Bandenintensitäten führt wie Profilin2. Unterschiedliche Expressionslevel der Profiline entfallen hier als Ursache, da die GFP-Fluoreszenz in HEK-Zellen sowie GFP-Bandenintensität vom Lysat im Western Blot vergleichbar sind. Gegen die mögliche Erklärung, dass Profilin1 Biotin-Streptavidin-unabhängig besser an die Magnetbeads bindet, spricht, dass Profilin1 und 2 eine zu 61% identische und 76% homologe Proteinsequenz besitzen (EMBOSS Needle, Pairwise Sequence Alignment). Bei der höheren Neddylierung von Profilin1 könnte es sich somit um eine nicht-kanonische Neddylierung handeln [Lobato-Gil et al., 2021], bei der es zu einer Neddylierung ohne Zuhilfenahme von Nedd8-E1, Nedd8-E2 oder Nedd8-E3 kommt. Diese ist somit auch nicht MLN-4924-sensitiv. Meine Vermutung ist, dass die HEK-Zellen durch die Überexpression heterologer Proteine zellulärem Stress ausgesetzt sind. Hierdurch kommt es zu einem Ungleichgewicht des Ubiquitin-Nedd8-Verhältnisses, sodass die Profiline durch Nedd8-Spillover in das Ubiquitin-System neddyliert werden [Leidecker et al., 2012]. Da in diesem Fall die Neddylierung über das Ubiquitin-System verläuft, lässt diese sich nicht mittels MLN-4924 inhibieren, da MLN-4924 in den verwen-

deten Konzentrationen nur das Nedd8-System inhibiert (s. Abb. 5.6). Dieser zelluläre Stress wäre in diesem Fall durch die Überexpression von Profilin1 größer als durch die Überexpression von Profilin2.

Cofilin1 hingegen wird in HEK-Zellen neddyliert, während Cofilin2 nicht neddyliert wird. Von großem Vorteil für meine weitere Analyse ist es, dass Cofilin1 und Cofilin2 mit 81% identischer und 90% homologer Primärsequenz (EMBOSS Needle, Pairwise Sequence Alignment) sehr ähnlich zueinander sind. Dies ermöglicht es mir Cofilin2, ein Protein mit sehr ähnlichen Eigenschaften wie Cofilin1, als Negativ-Referenz zu nutzen. Cofilin2, auch muskuläres Cofilin genannt, wird hauptsächlich in Muskelzellen exprimiert. Es ist nicht auszuschließen, dass Cofilin2 in Muskelzellen unabhängig von Cofilin1 neddyliert und reguliert wird. Cofilin1, auch nicht-muskuläres Cofilin genannt, wird in allen anderen Zellen exprimiert, also auch in Neuronen, die mich auf Grund der Fragestellung meiner Doktorarbeit bevorzugt interessieren. So weit die Regulierung von Cofilin1 und Cofilin2 betroffen ist, gehe ich davon aus, dass Neurone und HEK-Zellen sich beide als nicht-muskuläre Zellen vergleichbar verhalten. Ergebnisse zur Neddylierung von Cofilin1 in HEK-Zellen sollten somit auch auf Neurone übertragbar sein.

Zur Einordnung der in Abbildung 5.17 gezeigten Ergebnisse möchte ich auf publizierte Ergebnisse im Ubiquitin-Feld verweisen. Lin zeigt in ihrer Arbeit eine Ubiquitinierung des GluA-Rezeptors. Die Mutation von Lysin 886 im GluA-Rezeptor zu Arginin führt zu einer Reduktion des Signals für Ubiquitinierung von 30% auf 70% des Wildtypsignals. Mutationen der anderen Lysine führten zu keiner Reduktion des Ubiquitinsignals. Die 30%ige Reduktion, die statistisch signifikant ist, ist ausreichend, um Lysin 886 als Haupt-Ubiquitinierungsziel zu identifizieren [Lin et al., 2011].

Die von mir gezeigte Bandenstärkenreduktion der Cofilinmutanten um zwei Drittel auf 33% ist deutlich stärker ausgeprägt. Auch wenn sich die Bandenstärke nicht auf 0% reduzieren lässt, ist dies ein starkes Indiz dafür, dass es sich bei den beiden Lysinen um ein Neddylierungsziel handelt. Die kumulative Reduktion der K45R-, K78R- und K45,78R-Mutante deutet auf eine gewisse Promiskuität der Neddylierungsmaschinerie für die neddylierten Lysine hin. Das heißt, wenn ein neddyliertes Lysin entfernt wird, könnte ein anderes in der Nähe befindliches Lysin stattdessen neddyliert werden.

Ein weiterer Hinweis, der zumindest für die Neddylierung von Lysin 78 spricht, ist die Mutation von Cofilin2. Hier kann das zuvor nicht neddylierte Cofilin2 neddyliert werden, wenn Asparagin an Position 78 zu Lysin mutiert wird. Dieser hinzugewinn an Neddylierung ist ein vielversprechenderer Hinweis auf eine Neddylierung, denn der Verlust von Neddylierung, wie er in den Mutationen von Cofilin1 zu sehen ist, kann auch durch eine

fehlerhafte Faltung des Proteins oder durch sterische Behinderung von Nedd8 oder der Nedd8-Ligase durch die mutierte Aminosäure entstehen. Die Mutation von Arginin 45 zu Lysin in Cofilin2 führt zu keiner Neddylierung. Vielmehr verhindert sie sogar den gerade beschriebenen Neddylierungsgewinn durch eine Mutation von Asparagin an Position 78 zu Lysin. Ich vermute, dass der Austausch des größeren positiv geladenen Arginins zum kleineren positiv geladenen Lysin die Faltung oder Protein-Protein-Interaktionen von Cofilin2 teilweise und lokal beeinflusst und somit eine Neddylierung verhindert, auch wenn die Bindung des mutierten Cofilin2 an Aktin unverändert ist.

Ich habe den physiologischen Effekt der Neddylierungsdefizienz von Cofilin1 untersucht, indem ich in einer Mauslinie ohne ADF und mit gefloxtem Cofilin1 das Wildtyp Cofilin1 gegen neddylierungsdefizientes Cofilin1 in neuronalen Stammzellen des Gyrus dentatus viral ausgetauscht habe. Transduzierte Zellen zeigen in den untersuchten Parametern Somadurchmesser, Dendritenlänge, Anzahl der Verzweigungen sowie der Shollanalyse keinen Unterschied gegenüber Zellen mit neddylierbarem Cofilin1. Auffallend ist jedoch, dass über die Hälfte der Zellen mit der neddylierungsdefizienten Cofilin1-Mutante keinen Dendritenbaum ausbildet und somit nicht in die Auswertung und Statistik einfließen, während dies in den B6-Kontrolltieren nur bei 2% der Zellen der Fall ist. Anscheinend gibt es bei der Expression von neddylierungsdefizientem Cofilin1 einen scharfen Übergang zwischen Zellen, die einen pathologischen Phänotyp ohne Dendritenbaum aufweisen und Zellen, die phänotypisch gesund aussehen. Es gibt keinen signifikanten Anteil an Zellen, die einen Übergang dazwischen in Form eines deutlich reduzierten Dendritenbaumes bilden. Eine Erklärung hierfür könnte die Expression von Cofilin2 sein. Auch wenn Cofilin2 hauptsächlich im Muskelzellen vertreten ist, wird es auch in Neuronen exprimiert und kann zu einer Kompensation führen. Eventuell hängt es vom Verhältnis der Proteinmenge zwischen Cofilin2 und neddylierungsdefizientem Cofilin1 ab, ob der Phänotyp der untersuchten Neurone pathologisch oder gesund ist. Das Expressionslevel von exogenem Cofilin1 hängt von der Anzahl der Integrationen und vom Ort der Integrationen im Genom ab. Unterschiede können auftreten, wenn es in stark oder weniger stark abgelesenen Genombereichen integriert wird. Dies könnte ebenfalls erklären, warum es bei den Cofilin1/ADF-Knockout Zellen einen höheren Anteil an Zellen mit gesundem Phänotyp gibt als bei der Expression von nicht-neddylierbarem Cofilin1. Was dadurch nicht erklärt werden kann, ist, warum es keinen kontinuierlichen Übergang zwischen pathologisch und gesund erscheinenden Zellen gibt.

Eine andere Erklärung könnte sein, dass die Neddylierung von Cofilin1 für das initiale Wachstum des Dendritenbaums wichtig ist, aber im späteren Verlauf keine Rol-

le mehr spielt. In Maus embryonale Fibroblasten (MEF)-Zellen mit gefloxtem Cofilin1 und induzierbarer Cre-Rekombinase dauert es drei Tage nach Induktion bis das endogene Cofilin1 abgebaut ist. In der von mir verwendeten Mauslinie kommt noch Zeit für die virale Transduktion und Integration hinzu. Es könnte also sein, dass neuronale Stammzellen, die direkt nach der Transduktion zu Neuronen differenzieren, mit dem noch verbliebenem endogenem Wildtyp-Cofilin1 die Initiation des Dendritenbaumwachstums durchführen können. Neuronale Stammzellen, die erst später nach der Transduktion zu Neuronen differenzieren, hätten hingegen kein endogenes Cofilin1 mehr und wären somit an der Initiation des Dendritenbaumwachstums gehindert. Damit würde sich die diskrete Trennung zwischen nicht vorhandenem Dendritenbaum und gesund erscheinendem Dendritenbaum ohne kontinuierliche Übergänge erklären lassen. Neddylierungsdefizientes Cofilin1 würde nach dieser Hypothese mit residualem endogenem, neddylierbarem Cofilin konkurrieren und könnte den erhöhten Anteil an dendritenbaumlosen Neuronen erklären, wenn man den Cofilin1-Knockout mit der Ersetzung von Cofilin1 durch neddylierungsdefizientes Cofilin1 betrachtet. Dies gilt ebenso für die Expression von neddylierungsdefizientem Cofilin1 im B6-Hintergrund, bei dem es zu keinem Knockout von endogenem Cofilin1 kommt, es aber trotzdem zu einer erhöhten Anzahl an dendritenbaumlosen Neuronen kommt.

Eine Untersuchung im Maushintergrund mit konstitutiven Cofilin1 und ADF Knockout, um residuales endogenes Cofilin1 zu verhindern, ist nicht möglich, da der konstitutive Knockout von Cofilin1 letal ist [Gurniak et al., 2005]. Eine Möglichkeit die letztgenannte Theorie zu überprüfen, wäre die Transfektion einer neuronalen Zellkultur. Neurone die früh differenzieren oder früh ihren Dendritenbaum wiederaufbauen, sollten vermehrt gesund aussehen. Neurone die spät differenzieren oder spät ihren Dendritenbaum wiederaufbauen, sollten vermehrt ohne Dendritenbaum erscheinen. Leider war es im Zeitrahmen dieser Doktorarbeit nicht möglich eine neuronale Zellkultur zu etablieren, die vital genug war, um dieses Experiment durchzuführen.

Eine mögliche Kompensation durch Cofilin2 könnte mit einem Knockout durch Verwendung einer weiteren Mauslinie untersucht werden. Die Linie mit konstitutivem ADF Knockout und gefloxtem Cofilin1 und gefloxtem Cofilin2 böte sich hierfür an. Hierdurch wäre die gesamte ADF/Cofilin-Familie ausgeknockt. Die transduzierten Zellen wären in Folge vollkommen von dem viral eingebrachten Cofilin1 abhängig, das entweder unverändert oder neddylierungsdefizient sein kann. Auch hier steht zu erwarten, dass durch den konditionellen Knockout mittels des Cre-LoX-Systems die endogenen Cofiline noch mehrere Tage im System verbleiben und die Analyse komplexer machen könnten.

Für die Theorie, dass neddyliertes Cofilin1 für das initiale Wachstum des Dendritenbaums wichtig ist, spricht, dass ein konditioneller Knockout von Cofilin1 in einem Hintergrund mit konstitutivem ADF-Knockout dazu führt, dass Neurone keine Neuriten ausbilden können [Flynn et al., 2012]. Diese Eigenschaft von Cofilin1, das Ausbilden von Neuriten, scheint somit über Neddylierung aktiviert oder reguliert zu werden.

6.4 Cofilin1-Bindestelle für UBC12

Annette Vogl hat in Cofilin1 mit Lysin 112 ein anderes neddyliertes Lysin gefunden, als ich es gefunden habe [Vogl et al., 2020]. Auch die Cofilin1 K112R Mutante war neddylierungsdefizient, ebenso wie die Cofilin K45,78R Mutante. Es kommt zu keiner weiteren Reduzierung der Cofilinbande nach Avi-Nedd8-Pulldown, wenn eine K45,78,112R Dreifachmutante getestet wurde. Dies ist für mich überraschend, da es gegen die vorher vermutete Promiskuität der Neddylierung spricht. Unter dieser Annahme hätte es mehrere vergleichbar stark neddylierte Lysine geben können, jedoch hätten die Effekte aus der Mutation von Lysin zu Arginin kumulativ sein müssen.

Eine Hypothese, die ich daraus entwickelt habe, ist, dass die drei Lysine nicht nur neddyliert werden können, sondern auch zu einer Bindestelle für UBC12 gehören. Während die noch unbekannten E3-Nedd8-Ligasen für die Spezifität sorgen, ist eine UBC12-Bindestelle vermutlich generischer, da es für Nedd8 verschiedene E3-Ligasen gibt, aber nur UBC12 als E2-konjugierendes-Enzym. Ich war in der Lage, der Theorie entsprechend in PSD-95 eine vergleichbare Lysin-Triade um das bevorzugt neddylierte Lysin finden.

Aus dieser Theorie heraus habe ich das nächste Experiment entwickelt und Aminosäuren, die keine Lysine sind, innerhalb dieser vermuteten UBC12-Bindestelle mutiert. Auffallend ist, dass die Mutation zu sterisch anspruchsvolleren Aminosäuren die Menge an neddyliertem Cofilin1 verringert. Entsprechend meiner Theorie bedeutet dies, dass größere Aminosäuren in der Bindestelle die Bindung von UBC12 an Cofilin1 behindern. Durch die größeren Aminosäuren wird UBC12 vermutlich auf Abstand gehalten und somit die Neddylierung verringert, obwohl das neddylierte Lysin in dieser Mutante unverändert ist.

In diesem Zusammenhang sollte man auch berücksichtigen, dass die Mutation von Lysin zu Arginin nicht nur eine potentielle ϵ -Peptidbindung am Lysin verhindert, sondern auch, dass die Guanidinium-Gruppe von Arginin größer ist als die Aminogruppe von Lysin. Sie könnte also auch sterisch die Bindestelle behindern, auch wenn das ursprüngliche Lysin selbst nicht neddyliert wird.

Es ist noch offen, welches der drei Lysine in Cofilin1 neddyliert wird, Lysin 45, 78 oder 112. Meine Daten sprechen gegen eine Neddylierung von Lysin 45. Eine Mutation in Cofilin2 von Arginin 45 zu Lysin führt zu keinem Gewinn an Neddylierung. Im Gegenteil, diese Mutation kann sogar den Neddylierungsgewinn durch die Asparagin 78 zu Lysin Mutante zunichte machen. Grund hierfür ist vermutlich, dass die Seitenkette von Lysin kürzer ist als von Arginin. Deshalb kann wahrscheinlich die negative Ladung in UBC12 diese positive Ladung auf Cofilin2 nicht mehr erreichen. UBC12 kann nicht mehr ordnungsgemäß binden und Cofilin2 wird nicht mehr neddyliert. Nach der Modellierung, die in Abbildung 5.24E gezeigt ist, bindet Lysin 45 an UBC12 auf der von Nedd8 entfernten Seite und stünde demnach für eine Neddylierung nicht zur Verfügung. Auch wenn es vermutlich nicht direkt neddyliert wird, sprechen meine Daten doch für die Relevanz der positiven Ladung an dieser räumlichen Position.

Für eine Neddylierung von Lysin 78 spricht, dass es in der Cofilin1 Mutante zu einem Neddylierungsverlust kommt und wenn man Asparagin 78 in Cofilin2 zu Lysin mutiert nahezu ein Neddylierungslevel von Wildtyp Cofilin1 erreicht wird. Leider konnte in meinen Proben keine di-Glycin Modifikation an Lysin 78 in Cofilin1 mittels Massenspektrometrie entdeckt werden. Grund hierfür könnte sein, dass durch eine Isopeptidbindung am Lysin das Schneiden durch Trypsin verhindert wird. Dadurch wird das Peptidstück größer und vermutlich schwerer in der Masse zu detektieren. Abhilfe könnten größere Peptidmengen schaffen, indem man beispielsweise eine di-Glycin-Anreicherung nach dem Trypsinverdau durchführt. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass auch endogenes Ubiquitin zu einer di-Glycin-Modifikation von Lysinen nach Trypsinverdau führt. Dies ist besonders für Proteine problematisch, die sowohl mit Nedd8 als auch mit Ubiquitin modifiziert werden. Diese werden durch Avi-Nedd8 im Pulldown gefällt, aber nach dem Trypsinverdau auf Peptidebene kann nicht mehr unterschieden werden, von welcher der beiden Modifikationen der di-Glycin-Rest stammt. Es gibt zwar ein sogenanntes Masse-Nedd8, mit einer Arginin zu Lysin Mutation an Position 74, mit dem man Nedd8 und Ubiquitin unterscheiden kann, jedoch beeinflusst eine Modifikation direkt am di-Glycin von Nedd8 dessen Bindung an Zielproteinen. Zumindest deuten die Ergebnisse meiner Untersuchungen im Western Blot darauf hin, dass die Neddylierung mit Masse-Nedd8 im Vergleich zu nativem Nedd8 reduziert ist. Ein Ausweg wäre Nedd8 mit einem Avi-Tag zu versehen und Ubiquitin mit einem mutierten Ubiquitin zu ersetzen, dass mittels Massenspektrometrie unterscheidbar ist. Dies wäre der beste Ansatz, ist jedoch als doppelter Knockin sehr zeit- und ressourcenaufwendig.

Für eine Neddylierung von Lysin 112 spricht, dass mit Massenspektrometrie gezeigt

wird, dass es eine Nedd8-abhängige di-Glycin Modifikation trägt [Vogl et al., 2020]. Auch wenn dies mit in unmittelbarer Nähe der Bindungsstelle mutiertem Nedd8 R74K durchgeführt wird, liegt es nahe, dass es auch von Wildtyp-Nedd8 an dieser Position neddyliert wird. Eine Untersuchung eines Neddylierungsgewinns in Cofilin2 ist nicht möglich, da an Position 112 auch in Cofilin2 bereits ein Lysin vorhanden ist und Cofilin2 trotzdem nicht neddyliert wird.

Zusammengefasst, sprechen für Lysin 78 als Hauptneddylierungsziel die Ergebnisse Cofilin2 Mutationen. Meine Daten und die Daten von Annette Vogl aus der Massenspektrometrie lassen keine Aussage zu Lysin 78 zu. Für Lysin 112 sprechen klar die Massedaten von Vogl [Vogl et al., 2020]. Ebenso für Lysin 112 spricht, dass hier eine Einzelmutation für Neddylierungsdefizienz ausreichend ist, während bei Lysin 78 eine Doppelmutation in Verbindung mit Lysin 45 benötigt wird, um eine Neddylierungsdefizienz zu bewirken. Meine Cofilin2 Daten hingegen sprechen gegen eine Neddylierung von Lysin 112.

Offen bleibt somit, ob

- 1) Lysine 78 und 112 promiskuitiv neddyliert werden, oder
- 2) nur Lysin 112 neddyliert wird, während Lysin 78 nur für die Bindung von UBC12 wichtig ist, oder
- 3) andersherum nur Lysin 78 neddyliert wird, während Lysin 112 nur für die Bindung von UBC12 wichtig ist und eventuell der mittels Massenspektrometrie gefundene di-Glycin-Rest nur ein Artefakt der Nedd8 R74K-Mutante ist.

Außer Frage steht jedoch, dass alle drei beschriebenen Lysine wichtig für die Neddylierung von Cofilin1 sind und eine Neddylierungsdefizienz von Cofilin1 starke Auswirkungen auf die Entwicklung von Neuronen hat.

Zuletzt möchte ich auf die in 5.4.1 Cofilin1-Bindestelle für UBC12 und 5.4.2 PSD-95-Bindestelle für UBC12 beschriebenen Modellierungsdaten eingehen. Um die von mir in PyMol gemessenen Abstände einordnen zu können, möchte ich sie mit der Größe der beteiligten Atome vergleichen. Der van-der-Waals-Radius von Kohlenstoff beträgt 0,17 nm, von Stickstoff 0,16 nm, von Sauerstoff 0,15 nm und von Wasserstoff 0,11 nm [Bondi, 1964, Rowland and Taylor, 1996]. Benutzt man die van-der-Waals-Radii für die von mir gemessenen Abstände als Referenz, bedeutet dies für meine Werte von 0,2 nm einen direkten Kontakt bis hin zu 0,4 nm, also nur eine Atomlänge entfernt. Darüber hinaus muss man bedenken, dass die Seitenketten der Aminosäuren nicht starr sind, sondern sich bewegen können. Im Lysin beträgt der Abstand vom C_α zum ϵ -NH₃ 0,6 nm. In der Asparaginsäure beträgt der Abstand vom C_α zur Carboxylgruppe der Seitenkette

0,25 nm. In der Glutaminsäure beträgt der Abstand vom C_α zur Carboxylgruppe der Seitenkette 0,4 nm.

Es besteht also genug Bewegungsfreiraum, dass sich die Aminosäuren durch induzierte Passform direkt aneinanderlegen. Andererseits ergibt sich dadurch auch das Problem, dass die Seitenketten so ausgerichtet sind, wie sie im Protein im Kristall mit sich selbst liegen. Dies entspricht nicht unbedingt der Lage, die sie für eine Bindung an ein anderes Protein, wie z.B. UBC12 einnehmen. Das erschwert die Analyse, da es nicht einen festen gültigen Abstand zwischen den Lysinen gibt, sondern einen flexiblen Bereich an in Frage kommenden Konstellationen gibt.

Aus der daraus resultierenden Ungenauigkeit, kann man nicht eindeutig das neddylierte Lysin bestimmen. Deshalb lässt sich auch durch diese Modellierung die Frage nicht klären, ob Lysin 78 oder Lysin 112 in Cofilin1 neddyliert werden. Nach meiner Modellierung liegt Lysin 45 auf der von Nedd8 abgewandten Seite und ist ein weiteres Indiz dafür, dass Lysin 45 von Cofilin1 nur zur Bindung von UBC12 wichtig ist und nicht selbst neddyliert wird.

Deshalb könnte die Untersuchung der Ladungsverteilung in der dreidimensionalen Proteinstruktur ein wertvolles Instrument für die Eingrenzung von Lysinen als Neddylierungsziel sein. Wenn man genügend neddylierte Lysine kennt und deren Umgebung analysiert und die Flexibilität der Lysin-Abstände und der mittig liegenden negativen Ladung genauer eingrenzt, könnte man mithilfe von Strukturdaten auch bei anderen Proteinen ohne Vorwissen Lysine als aussichtsreiche Kandidaten für eine Neddylierung finden.

Am Beispiel von Cofilin1 erklärt, würde dies folgendes bedeuten. Cofilin1 besitzt 25 Lysine. Ich habe 2 Lysine ausgeschlossen, weil diese nicht nach außen zeigen und vermutlich nicht für eine Neddylierung zur Verfügung stehen. Unter den verbleibenden 23 Lysinen bilden sich nur 2 Triplets mit einer negativen Ladung in der Mitte aus. Es verbleiben somit nur noch 6 Lysine von 25 als Neddylierungsziele, dies spricht einer Reduktion von 76%. Wenn die Daten eindeutig genug sind, kann man eventuell aus jedem Triplett noch ein Lysin ausschließen, vergleichbar zu Lysin 45. Dann wären es nur noch 4 Lysine von 25 als Neddylierungsziele, dies spricht einer Reduktion der noch zu untersuchenden Lysine von 84%. Dies ohne eine Mutation und einen Pulldown durchzuführen. Somit könnte dies die Identifizierung von neddylierten Lysinen deutlich vereinfachen und beschleunigen, sofern eine ausreichend genaue 3D-Struktur des zu untersuchenden Proteins gegeben ist.

6.5 **Avi-Nedd8-Mauslinie**

Zweck der Avi-Nedd8-Mauslinie ist es, die Neddylome zelltypspezifisch und *in vivo* unter endogenen Bedingungen zu bestimmen. Hierfür habe ich eine Mauslinie erzeugt, in der das Exon 1 von endogenem Nedd8 gegen den entsprechenden Bereich von Avi-Nedd8 ausgetauscht wurde. Dies ermöglicht es, Avi-Nedd8 auf endogenem Level zu exprimieren. Die Expression von Nedd8 auf endogenem Niveau ist wichtig, da es bei Überexpression von Nedd8 zu einem sogenannten Spillover ins Ubiquitin-System kommen kann [Leidecker et al., 2012]. Kommt es zu diesem, wird Nedd8 nicht nur von der Neddylierungsmaschinerie, sondern auch über die Ubiquitinierungsmaschinerie an Zielproteine gebunden. In Folge dessen erhält man falsch positive Neddylierungsziele, die eigentlich ubiquitiniert werden sollten. Durch den Austausch des Nedd8 Exon 1 wird Avi-Nedd8 durch den endogenen Nedd8-Promotor reguliert und auf endogenem Level exprimiert, sodass dieses Problem nicht auftritt.

Um die Zelltypspezifität zu erreichen, habe ich die $Gt(ROSA)26Sor^{tm1(CAG-birA,-EGFP)Joz}$ (stp-flx BirA)-Mauslinie [Wood et al., 2016] mit meiner Avi-Nedd8-Maus gekreuzt. In der stp-flx BirA-Mauslinie ist die BirA inaktiv, außer sie wird durch eine Cre-Rekombinase aktiviert. Durch das Einkreuzen einer Cre-Mauslinie mit einem entsprechendem Promotor, kann der Zelltyp gewählt werden, in der die BirA der stp-flx BirA-Linie aktiviert wird. Avi-Nedd8 wird in allen Zellen exprimiert, jedoch wird der Avi-Tag nicht selbst von Streptavidin-beads erkannt, sondern erst das daran gebundene Biotin. Diese Biotinylierung erfolgt durch BirA und somit nur in Zellen, die BirA exprimieren. Diese Expression wird durch die Cre-Rekombinase aktiviert und das Expressionsmuster der Cre-Rekombinase durch den gewählten Promotor vorgegeben.

Durch die Kombination dieser drei Mauslinien erhält man Expression von Avi-Nedd8 auf endogenem Level und kann die Biotinylierung von Avi-Nedd8 durch die Wahl des Cre-Rekombinase-Promotors zelltypspezifisch regulieren.

Ein Problem das mit diesem System auftreten kann, ist die Durchlässigkeit der Stop-flox-Kassette. Dies führt zu einer basalen Expression von BirA und somit auch zu einer geringen Menge an Biotinylierung auch in Zellen, in denen die Biotinylierung eigentlich inaktiv sein sollte. Dadurch kommt es zu falsch positiver Biotinylierung. Dieser Fehler lässt sich durch die Wahl einer entsprechenden Kontrolle kompensieren. Hierfür benutzt man eine Mauslinie, die BirA nur basal exprimiert. Also eine Linie mit Avi-Nedd8 und stp-flx BirA ohne Expression von Cre-Rekombinase.

Ein weiteres Problem kann dadurch auftreten, dass der Avi-Tag zwar die Konsensus-

6 Diskussion

sequenz für die BirA darstellt, jedoch auch nicht-identische aber ähnliche Sequenzen in geringem Maße ebenfalls biotinyliert werden. Dies lässt sich durch eine Kontrolle kompensieren, bei der BirA ohne Avi-Nedd8 exprimiert wird. Also eine Mauslinie in der die *stp-flx* BirA-Linie mit der gleichen Cre-Rekombinase-Linie, die auch im Experiment benutzt wurde, gekreuzt wird.

7 Evaluation und Ausblick

Das **erste Ziel**, eine Methode zu entwickeln um alle neddylierten Proteine einer untersuchten Probe zu identifizieren wurde größtenteils erfüllt. Lediglich das Experiment, gewebespezifisch die Neddylome der Maus zu bestimmen, konnte im Zeitrahmen dieser Doktorarbeit nicht durchgeführt werden, da die Generationszeit der Mäuse mit drei Monaten zu lang war um Mäuse mit passendem Genotyp zu züchten.

Es ist mir gelungen eine Methode zu entwickeln, die es sowohl ermöglicht in heterologen Systemen exprimierte Proteine, sowie davon abgeleitete Mutanten auf Neddylierung zu untersuchen, als auch bei endogen exprimierten Proteinen in einem unvoreingenommenen Experiment zu bestimmen, ob sie neddyliert werden. Durch die Verwendung des Avi-Tags ist es mir möglich Biotin und Streptavidin für den Pulldown zu benutzen. Durch die starke Bindung zwischen Biotin und Streptavidin konnte ich im Pulldown stringente, denaturierende Waschbedingungen mit 8 M Harnstoff und Mercaptoethanol nutzen. Dadurch wird das erste Kriterium für ein echtes Nedd8-Substrat [Rabut and Peter, 2008] erfüllt, dass Nedd8 kovalent an das Zielprotein gebunden sein muss, denn nicht kovalent gebundene Proteine verlieren unter diesen denaturierenden Bedingungen den Kontakt.

Durch Erzeugung einer Avi-Nedd8-Maus wird das zweite Kriterium erfüllt, dass die Neddylierung unter endogenen Bedingungen erfolgt. Durch den Knockin wird das Avi-Nedd8 anstelle des endogenen Nedd8 exprimiert. Deshalb unterliegt das getaggte Avi-Nedd8 derselben Regulierung wie das endogene Nedd8 und sollte mit dem gleichen Expressionslevel an Stelle des endogenen Nedd8 exprimiert werden.

Das letzte Kriterium für ein echtes Nedd8-Substrat, Abhängigkeit der Neddylierung von spezifischen Komponenten der Neddylierungsmaschinerie, kann in Zellkultur durch Zugabe von MLN-4924 getestet werden, da MLN-4924 NAE1 blockiert, den ersten Schritt der Neddylierungskaskade. In der Maus kann man dieses Ziel durch Einkreuzen der Mauslinie mit geflochten NAE1 erreichen. Die Cre-Rekombinase, die die Expression von BirA aktiviert und somit die Biotinylierung ermöglicht, verhindert gleichzeitig durch den Knockout von NAE1 die Neddylierung von Proteinen.

Dem **zweiten Ziel**, das neddylierte Protein zu finden, das für das filopodienartige Aussehen von Spines in Zellkultur nach Neddylierungsinhibition durch MLN-4924 verantwortlich ist, konnte ich mich durch eine Reihe von Experimenten nähern. Ich konnte Cofilin1 als neddyliertes Protein identifizieren. Da ich hierfür ebenfalls den denaturierenden Pulldown mit Avi-Tag, Biotin und Streptavidin benutzt habe, war auch hier das erste Kriterium für ein echtes Nedd8-Substrat, die kovalente Bindung, erfüllt.

Das zweite Kriterium, Expression unter endogenen Bedingungen, ist mittels transien-ter Expression nicht erfüllbar, hierfür wäre die Avi-Nedd8-Mauslinie erforderlich. Durch Titration der bei der Transfektion eingesetzten Avi-Nedd8-DNS, konnte ich jedoch Bedingungen finden, bei der die Neddylierung von Cofilin1 durch MLN-4924 unterbunden werden konnte. Dies bedeutet, dass die Neddylierung von Cofilin1 über die Neddylierungsmaschinerie stattgefunden hat, nicht über die Ubiquitinierungsmaschinerie. Der Spillover in das Ubiquitinsystem, ist der Hauptgrund für das Kriterium der endogenen Expressionslevel und wurde somit näherungsweise erfüllt.

Das dritte Kriterium, eine Abhängigkeit der Neddylierung von spezifischen Komponenten der Neddylierungsmaschinerie, wurde ebenfalls durch Zugabe von MLN-4924 gezeigt, die obenstehend beschrieben wurde.

Neben den Minimalkriterien konnte ich weitere Kriterien der Charakterisierung eines Nedd8-Substrats erfüllen [Rabut and Peter, 2008]. Die neddylierten Lysine konnten mit den Lysinen an Position 45 und 78 bestimmt werden. Ich habe eine neddylierungsdefiziente Mutante erzeugt. Ich habe den Phänotyp der neddylierungsdefizienten Mutante in-vivo untersucht. Dabei habe ich herausgefunden, dass die Neddylierung von Cofilin1 für die Ausbildung von Neuriten notwendig ist.

Über die ursprünglichen Ziele hinaus habe ich mit der potentiellen Bindestelle für UBC12 an Cofilin1 eine Theorie entwickelt, die erklärt, warum unterschiedliche Lysine für die Neddylierung von Cofilin1 entscheidend sind. Diese potentielle Bindestelle besteht aus drei positiven Ladungen, einschließlich des zu neddylierenden Lysins, im Dreieck um eine negative Ladung. Da ich auch eine vergleichbare potentielle Bindestelle um das neddylierte Lysin von PSD-95 gefunden habe, könnte dies eine notwendige Eigenschaft für Proteine sein, die von UBC12 neddyliert werden.

Die **weiterführenden Experimente** sind nun, wenn die entsprechenden Mauslinien mit Avi-Nedd8, BirA und gewebespezifischer Cre-Rekombinase gekreuzt sind, Organe zu entnehmen und nach Pulldown und massenspektrometrischer Analyse die gewebespezifischen Neddylome zu bestimmen.

So gefundene neddylierte Proteine können analog zu meiner Arbeit an Cofilin1 unter-

sucht werden. Durch Mutation von Lysinen können neddylierungsdefiziente Mutanten erzeugt werden. Zur Identifizierung von aussichtsreichen Kandidaten für die Neddylierung, können die Proteine auf die potentielle UBC12-Bindestelle untersucht werden, sofern ihre Struktur aufgeklärt ist. Dadurch reduziert sich die Anzahl der zu untersuchenden Lysine auf ein Bruchteil der Gesamtylsine. Das/die neddylierten Lysine können so deutlich schneller gefunden werden, selbst wenn kein nahes verwandtes Protein vorhanden ist das nicht neddyliert wird. Ebenso kann man so Lysine finden, die sich in Proteinteilen befinden, die durch ihre physikalischen Eigenschaften in der Massenspektrometrie nicht analysiert werden können. Somit können schneller neddylierungsdefiziente Mutanten erzeugt werden, mit denen man den Einfluss der Neddylierung auf das Protein untersuchen kann.

Zur Untersuchung der Neddylierungsdefizienz bietet sich das von mir entwickelte Pulldown-Protokoll mit anschließendem Western Blot an. Neddylierungsdefiziente Mutanten können im Vergleich zum Wildtyp-Protein untersucht werden, um die Bedeutung der Neddylierung für diese Proteine zu bestimmen. Sofern es eine konstitutive oder konditionelle Knockout-Linie gibt, können diese Effekte *in vivo* durch einen Austausch der Proteine untersucht werden. Wenn es keine Knockout-Linie gibt, könnte man eventuell vorhandene dominant negative Effekte untersuchen, oder alternativ einen Knockdown durch small hairpin RNA und RNA-Interferenz induzieren.

Durch das Finden weiterer neddylierter Lysine, kann die potentielle UBC12-Bindestelle besser charakterisiert werden und mit genug Daten eine Konsensus-3D-Struktur für die Bindung von UBC12 entwickelt werden.

Abkürzungsverzeichnis

Einheiten

°C Grad Celsius

kDa Kilodalton

' Minuten

upm Umdrehungen pro Minute

“ Sekunden

Abkürzungen

Abb	Abbildung
ADF	Aktin depolymerisierender Faktor
ADP	Adenosindiphosphat
GluA	AMPA-selektive Glutamat
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Avi-Nedd8	Avi-tag:rigid-Linker:TEV-Schnittstelle:rigid-Linker:Nedd8
stp-flx BirA	Gt(ROSA)26Sor ^{tm1(CAG-birA,-EGFP)} Joez
cGAS	cyclic GMP-AMP Synthetase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonucleinsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
GFP	grün fluoreszierendes Protein
Bio-Nedd8	selbst-biotinylierendes Nedd8
HEK	Human Embryo Kidney
LIMK	LIM domain kinase
MDM2	Mouse Double Minute 2
MEF	Maus embryonale Fibroblasten
MLN-4924	Pevonedistat
MoMLV	Moloney Maus-Leukämie-Virus
mRNS	Boten-Ribonukleinsäuren
NAE1	NEDD8-activating enzyme E1 regulatory subunit

Nedd7	neural-precursor-cell-expressed developmentally down-regulated 7
Nedd8	neural-precursor-cell-expressed developmentally down-regulated 8
Nedd	neural-precursor-cell-expressed developmentally down-regulated
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	phosphatbuffered saline
PCIA	Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
P_i	anorganisches Phosphat
PSD-95	postsynaptic density protein 95
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay
ROCK1	Rho-associated protein kinase 1
SDS	Sodium Dodecylsulfat
SENp8	Sentrin-specific protease 8
SOB	Super Optimal Broth
SOC	Super Optimal broth with Catabolite repression
SSH	Protein phosphatase Slingshot homolog
TAE	Tris Acetat EDTA
TESK	Dual specificity testis-specific protein kinase
TEV	Tobacco etch virus
TEMED	Tetramethylethylendiamin
UBA3	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 3

Abkürzungsverzeichnis

UBC10	Ubiquitin conjugating enzyme 10
UBC12	NEDD8-conjugating enzyme Ubc12
UBE2C	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 C
UBL	Ubiquitin-ähnliches Protein
UCH-L3	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L3
VHL	von Hippel-Lindau

Abbildungsverzeichnis

5.1	GluA-Rezeptor läuft nicht in Trenngel ein.	40
5.2	Dauer des Aufkochens bestimmt wie gut GluA-Rezeptoren ins Trenngel einlaufen.	41
5.3	Erhöhte SDS-Konzentration im Ladepuffer verbessert das Einlaufen von GluA-Rezeptor ins Trenngel.	42
5.4	Kopräzipitation von GluA-Rezeptor und Flag-Nedd8.	42
5.5	MLN-4924 Dosis-Wirkungskurve.	45
5.6	MLN-4924 Spezifität.	46
5.7	Biotinylierung in Abhängigkeit von Konzentration und Inkubationsdauer mit Biotin.	47
5.8	Test von Lysebedingungen.	47
5.9	Vergleich von GFP-Immunpräzipitation und Streptavidin-Pulldown.	48
5.10	Lyse- und Waschbedingungen	49
5.11	Nedd8-Linker-Optimierung.	51
5.12	Elution durch TEV-Proteaseverdau.	54
5.13	Untersuchung der Neddylierung von GluA-Rezeptoren.	55
5.14	Verändertes Aktin-Zytoskelett nach MLN-4924-Behandlung.	58
5.15	Neddylierung Aktin-modifizierender Proteine.	61
5.16	Interaktion zwischen Neddylierung und Phosphorylierung von Cofilin1.	62
5.17	Neddylierte Lysine in Cofilin1.	65
5.18	Neddylierung von Cofilin2 durch Mutation zu Lysinen.	66
5.19	Phosphorylierung von Cofilin1 in Abhängigkeit der Neddylierung.	66
5.20	Cofilin1-Austausch in vivo.	70
5.21	Auswertung der in Abbildung 5.20 beispielhaft gezeigten in vivo Aufnahmen.	71
5.22	Vergleich der Cofilin1 K45,78R und der K112R Mutante	73
5.23	Mutationen die in der vermuteten UBC12-Bindestelle von Cofilin1 liegen.	75
5.24	Modellierung einer Bindestelle für Ubc12.	77

Tabellenverzeichnis

1	Geräte	21
2	Proteinstrukturen	21
3	Chemikalien und Verbrauchsmaterial	22
4	Chemikalien und Verbrauchsmaterial 2	23
5	Puffer	24
6	Antikörper	24
7	Zusammensetzung Polyacrylamidgele	25

Literaturverzeichnis

- P. B. Agrawal, M. Joshi, T. Savic, Z. Chen, and A. H. Beggs. Normal myofibrillar development followed by progressive sarcomeric disruption with actin accumulations in a mouse *cfl2* knockout demonstrates requirement of cofilin-2 for muscle maintenance. *Hum Mol Genet*, 21(10):2341–56, 2012.
- D. Beckett, E. Kovaleva, and P. J. Schatz. A minimal peptide substrate in biotin holoenzyme synthetase-catalyzed biotinylation. *Protein Sci*, 8(4):921–9, 1999.
- A. Bondi. van der waals volumes and radii. *The Journal of Physical Chemistry*, 68(3):441–451, 1964.
- M. M. Brockmann, M. Döngi, U. Einsfelder, N. Körber, D. Refojo, and V. Stein. Neddylation regulates excitatory synaptic transmission and plasticity. *Sci Rep*, 9(1):17935, 2019.
- M. F. Carrier, V. Laurent, J. Santolini, R. Melki, D. Didry, G. X. Xia, Y. Hong, N. H. Chua, and D. Pantaloni. Actin depolymerizing factor (adf/cofilin) enhances the rate of filament turnover: implication in actin-based motility. *J Cell Biol*, 136(6):1307–22, 1997.
- J. A. Cooper, J. D. Blum, Jr. Williams, R. C., and T. D. Pollard. Purification and characterization of actophorin, a new 15,000-dalton actin-binding protein from *acanthamoeba castellanii*. *J Biol Chem*, 261(1):477–85, 1986.
- Jr. Cronan, J. E. Biotination of proteins in vivo. a post-translational modification to label, purify, and study proteins. *J Biol Chem*, 265(18):10327–33, 1990.
- K. C. Flynn, F. Hellal, D. Neukirchen, S. Jacob, S. Tahirovic, S. Dupraz, S. Stern, B. K. Garvalov, C. Gurniak, A. E. Shaw, L. Meyn, R. Wedlich-Söldner, J. R. Bamberg, J. V. Small, W. Witke, and F. Bradke. Adf/cofilin-mediated actin retrograde flow directs neurite formation in the developing brain. *Neuron*, 76(6):1091–107, 2012.

- T. Gan-Erdene, K. Nagamalleswari, L. Yin, K. Wu, Z. Q. Pan, and K. D. Wilkinson. Identification and characterization of den1, a deneddylase of the ulp family. *J Biol Chem*, 278(31):28892–900, 2003.
- R. Gieselmann, D. J. Kwiatkowski, P. A. Janmey, and W. Witke. Distinct biochemical characteristics of the two human profilin isoforms. *Eur J Biochem*, 229(3):621–8, 1995.
- P. J. Goldschmidt-Clermont, M. I. Furman, D. Wachsstock, D. Safer, V. T. Nachmias, and T. D. Pollard. The control of actin nucleotide exchange by thymosin beta 4 and profilin. a potential regulatory mechanism for actin polymerization in cells. *Mol Biol Cell*, 3(9):1015–24, 1992.
- M. González, C. E. Argaraña, and G. D. Fidelio. Extremely high thermal stability of streptavidin and avidin upon biotin binding. *Biomol Eng*, 16(1-4):67–72, 1999.
- N. M. Green. Avidin and streptavidin. *Methods Enzymol*, 184:51–67, 1990.
- C. B. Gurniak, E. Perlas, and W. Witke. The actin depolymerizing factor n-cofilin is essential for neural tube morphogenesis and neural crest cell migration. *Dev Biol*, 278(1):231–41, 2005.
- E. Hochuli, H. Döbeli, and A. Schacher. New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. *J Chromatogr*, 411:177–84, 1987.
- Franz Hofmeister. Zur lehre von der wirkung der salze. *Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie*, 24(4):247–260, 1888.
- X. Huang, Q. Pan, D. Sun, W. Chen, A. Shen, M. Huang, J. Ding, and M. Geng. O-glcacylation of cofilin promotes breast cancer cell invasion. *J Biol Chem*, 288(51):36418–25, 2013.
- S. Ikeda, L. A. Cunningham, D. Boggess, N. Hawes, C. D. Hobson, J. P. Sundberg, J. K. Naggert, R. S. Smith, and P. M. Nishina. Aberrant actin cytoskeleton leads to accelerated proliferation of corneal epithelial cells in mice deficient for destrin (actin depolymerizing factor). *Hum Mol Genet*, 12(9):1029–37, 2003.
- T. Kamitani, K. Kito, H. P. Nguyen, and E. T. Yeh. Characterization of nedd8, a developmentally down-regulated ubiquitin-like protein. *J Biol Chem*, 272(45):28557–62, 1997.

- M. Klejnot, M. Gabrielsen, J. Cameron, A. Mleczak, S. K. Talapatra, F. Kozielski, A. Pannifer, and M. F. Olson. Analysis of the human cofilin 1 structure reveals conformational changes required for actin binding. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 69(Pt 9):1780–8, 2013.
- D. R. Kovar and T. D. Pollard. Insertional assembly of actin filament barbed ends in association with formins produces piconewton forces. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(41):14725–30, 2004.
- A. Kruyer, L. E. Ball, D. M. Townsend, P. W. Kalivas, and J. D. Uys. Post-translational s-glutathionylation of cofilin increases actin cycling during cocaine seeking. *PLoS One*, 14(9):e0223037, 2019.
- E. R. Kuczmarski and J. L. Rosenbaum. Studies on the organization and localization of actin and myosin in neurons. *J Cell Biol*, 80(2):356–71, 1979.
- S. Kumar, Y. Tomooka, and M. Noda. Identification of a set of genes with developmentally down-regulated expression in the mouse brain. *Biochem Biophys Res Commun*, 185(3):1155–61, 1992.
- S. Kumar, Y. Yoshida, and M. Noda. Cloning of a cDNA which encodes a novel ubiquitin-like protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 195(1):393–9, 1993.
- T. Kurz, L. Pintard, J. H. Willis, D. R. Hamill, P. Gonczy, M. Peter, and B. Bowerman. Cytoskeletal regulation by the nedd8 ubiquitin-like protein modification pathway. *Science*, 295(5558):1294–8, 2002.
- U. K. Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *Nature*, 227(5259):680–5, 1970.
- O. Leidecker, I. Matic, B. Mahata, E. Pion, and D. P. Xirodimas. The ubiquitin E1 enzyme ube1 mediates nedd8 activation under diverse stress conditions. *Cell Cycle*, 11(6):1142–50, 2012.
- P. C. Letourneau. Cell-to-substratum adhesion and guidance of axonal elongation. *Dev Biol*, 44(1):92–101, 1975.
- C. Li, L. Zhang, D. Qian, M. Cheng, H. Hu, Z. Hong, Y. Cui, H. Yu, Q. Wang, J. Zhu, W. Meng, J. F. Xu, Y. Sun, P. Zhang, and C. Wang. Rnf111-facilitated neddylation

- potentiates cgas-mediated antiviral innate immune response. *PLoS Pathog*, 17(3): e1009401, 2021.
- D. Liakopoulos, G. Doenges, K. Matuschewski, and S. Jentsch. A novel protein modification pathway related to the ubiquitin system. *Embo j*, 17(8):2208–14, 1998.
- A. Lin, Q. Hou, L. Jarzylo, S. Amato, J. Gilbert, F. Shang, and H. Y. Man. Nedd4-mediated ampa receptor ubiquitination regulates receptor turnover and trafficking. *J Neurochem*, 119(1):27–39, 2011.
- S. Lobato-Gil, J. B. Heidelberger, C. Maghames, A. Bailly, L. Brunello, M. S. Rodriguez, P. Beli, and D. P. Xirodimas. Proteome-wide identification of nedd8 modification sites reveals distinct proteomes for canonical and atypical neddylation. *Cell Rep*, 34(3): 108635, 2021.
- J. Mergner and C. Schwechheimer. The nedd8 modification pathway in plants. *Front Plant Sci*, 5:103, 2014.
- K. Moriyama, K. Iida, and I. Yahara. Phosphorylation of ser-3 of cofilin regulates its essential function on actin. *Genes Cells*, 1(1):73–86, 1996.
- S. Oved, Y. Mosesson, Y. Zwang, E. Santonico, K. Shtiegman, M. D. Marmor, B. S. Kochupurakkal, M. Katz, S. Lavi, G. Cesareni, and Y. Yarden. Conjugation to nedd8 instigates ubiquitylation and down-regulation of activated receptor tyrosine kinases. *J Biol Chem*, 281(31):21640–21651, 2006.
- G. Rabut and M. Peter. Function and regulation of protein neddylation. 'protein modifications: beyond the usual suspects' review series. *EMBO Rep*, 9(10):969–76, 2008.
- N. A. Rodzli, M. P. Lockhart-Cairns, C. W. Levy, J. Chipperfield, L. Bird, C. Baldock, and S. M. Prince. The dual pdz domain from postsynaptic density protein 95 forms a scaffold with peptide ligand. *Biophys J*, 119(3):667–689, 2020.
- R. Scott Rowland and Robin Taylor. Intermolecular nonbonded contact distances in organic crystal structures: Comparison with distances expected from van der waals radii. *The Journal of Physical Chemistry*, 100(18):7384–7391, 1996.
- R. C. Russell and M. Ohh. Nedd8 acts as a 'molecular switch' defining the functional selectivity of vhl. *EMBO Rep*, 9(5):486–91, 2008.

- D. C. Scott, V. O. Sviderskiy, J. K. Monda, J. R. Lydeard, S. E. Cho, J. W. Harper, and B. A. Schulman. Structure of a ring e3 trapped in action reveals ligation mechanism for the ubiquitin-like protein nedd8. *Cell*, 157(7):1671–84, 2014.
- K. Shimazaki, H. P. Robinson, T. Nakajima, N. Kawai, and T. Takenawa. Purification of ampa type glutamate receptor by a spider toxin. *Brain Res Mol Brain Res*, 13(4):331–7, 1992.
- R. S. Smith, N. L. Hawes, S. D. Kuhlmann, J. R. Heckenlively, B. Chang, T. H. Roderick, and J. P. Sundberg. Corn1: a mouse model for corneal surface disease and neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 37(2):397–404, 1996.
- H. A. Sober and E. A. Peterson. Protein chromatography on ion exchange cellulose. *Fed Proc*, 17(4):1116–26, 1958.
- T. A. Soucy, P. G. Smith, M. A. Milhollen, A. J. Berger, J. M. Gavin, S. Adhikari, J. E. Brownell, K. E. Burke, D. P. Cardin, S. Critchley, C. A. Cullis, A. Doucette, J. J. Garnsey, J. L. Gaulin, R. E. Gershman, A. R. Lublinsky, A. McDonald, H. Mizutani, U. Narayanan, E. J. Olhava, S. Peluso, M. Rezaei, M. D. Sintchak, T. Talreja, M. P. Thomas, T. Traore, S. Vyskocil, G. S. Weatherhead, J. Yu, J. Zhang, L. R. Dick, C. F. Claiborne, M. Rolfe, J. B. Bolen, and S. P. Langston. An inhibitor of nedd8-activating enzyme as a new approach to treat cancer. *Nature*, 458(7239):732–6, 2009.
- A. M. Vogl, M. M. Brockmann, S. A. Giusti, G. Maccarrone, C. A. Vercelli, C. A. Bauder, J. S. Richter, F. Roselli, A. S. Hafner, N. Dedic, C. T. Wotjak, D. M. Vogt-Weisenhorn, D. Choquet, C. W. Turck, V. Stein, J. M. Deussing, and D. Refojo. Neddylation inhibition impairs spine development, destabilizes synapses and deteriorates cognition. *Nat Neurosci*, 18(2):239–51, 2015.
- A. M. Vogl, L. Phu, R. Becerra, S. A. Giusti, E. Verschueren, T. B. Hinkle, M. D. Bordenave, M. Adrian, A. Heidersbach, P. Yankilevich, F. D. Stefani, W. Wurst, C. C. Hoogenraad, D. S. Kirkpatrick, D. Refojo, and M. Sheng. Global site-specific neddylation profiling reveals that neddylated cofilin regulates actin dynamics. *Nat Struct Mol Biol*, 27(2):210–220, 2020.
- H. Wada, K. Kito, L. S. Caskey, E. T. Yeh, and T. Kamitani. Cleavage of the c-terminus of nedd8 by uch-l3. *Biochem Biophys Res Commun*, 251(3):688–92, 1998.

- I. R. Watson, B. K. Li, O. Roche, A. Blanch, M. Ohh, and M. S. Irwin. Chemotherapy induces nedp1-mediated destabilization of mdm2. *Oncogene*, 29(2):297–304, 2010.
- K. H. Wood, B. S. Johnson, S. A. Welsh, J. Y. Lee, Y. Cui, E. Krizman, E. S. Brodtkin, J. A. Blendy, M. B. Robinson, M. S. Bartolomei, and Z. Zhou. Tagging methyl-cpg-binding domain proteins reveals different spatiotemporal expression and supports distinct functions. *Epigenomics*, 8(4):455–73, 2016.
- N. Yonezawa, E. Nishida, K. Iida, I. Yahara, and H. Sakai. Inhibition of the interactions of cofilin, destrin, and deoxyribonuclease i with actin by phosphoinositides. *J Biol Chem*, 265(15):8382–6, 1990.

Danksagung

Diese Arbeit wäre ohne Unterstützung nicht möglich gewesen.

Ganz besonders danke ich Prof. Valentin Stein, sowohl für die Chance diese Arbeit in seiner Gruppe durchzuführen, als auch dafür, dass er jederzeit eine offene Tür und ein offenes Ohr für mich hatte. Die Diskussionen der Ergebnisse und die Planungen weiterer Experimente mit ihm, machten meine Arbeit in diesem Umfang und dieser Qualität erst möglich. Ich bin dankbar dafür, dass er meine Ideen, Vorschläge und Hypothesen offen aufgenommen und unterstützt hat.

Ich bedanke mich bei Prof. Walter Witke, dass er das Zweitgutachten übernommen hat und mit mir die Ergebnisse meiner Aktin- und Cofilin-Experimente diskutiert hat. Mein Dank gilt auch Dr. Christine Gurniak-Witke und Dr. Pietro Pilo Boyle die mir Hintergrundwissen, Protokolle, Antikörper, Zelllinien und Mauslinien zur Verfügung stellten, ohne die viele meiner Experimente nicht möglich gewesen wären.

Für die Unterstützung bei der Durchführung meiner Experimente und der Versorgung Maus- und Zelllinien bin ich Dorit, Michael, Frau Bock und Isa dankbar. Generell möchte ich mich bei allen Kollegen am Institut für die schöne Zeit und die angenehme Zusammenarbeit bedanken.

Für die Hilfe bei der Generierung der Avi-Nedd8-Mauslinie bedanke ich mich bei Prof. Ulrich Schweizer, Noelia und Uschi.

Bei Philip und meiner Frau bedanke ich mich für Korrekturen und Anmerkungen zu meiner Arbeit und bei meiner Mutter für die Hilfe beim Druck selbiger.

Zum Abschluss danke ich meiner Familie für ihre Unterstützung.