

Analyse der Clathrin vermittelten Endocytose mittels RNA Interferenz

Von der naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.
genehmigte Dissertation
von

Dipl.-Biochem. Lars Hinrichsen
geboren am 15. September 1975 in Kiel

August 2005

Referent: Prof. Dr. Walter Müller

Korreferent: Prof. Dr. Ernst J. Ungewickell

Tag der Promotion: 09. August 200

Zusammenfassung

Die Clathrin vermittelte Endocytose ist in Zellen höherer Eukaryoten der wichtigste Weg zur Rezeptor vermittelten Aufnahme von Hormonen und Nahrungsmittelmolekülen. In dieser Arbeit wurde RNA Interferenz dazu benutzt, die Expression der Proteine Clathrin, AP-2, CALM und GAK zu unterdrücken, um ihre Funktion bei der Endocytose aufzuklären.

Die Ausschaltung von Clathrin führte zu einem beinahe vollständigen Verschwinden von Clathrin bedeckten Strukturen. Elektronen- und Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass AP-2 unabhängig von der Anwesenheit des Strukturproteins Membrandomänen organisiert, welche der Größe von Clathrin bedeckten Strukturen entsprechen. Da diese vollständig flach waren, wurde geschlossen, dass Clathrin direkt die Einstülpung der Membran vorantreibt. Dies geschieht vermutlich, indem das Protein entweder selbst die mechanische Energie bereitstellt oder einen bisher unbekanntem Cofaktor rekrutiert. Zellen, in denen Clathrin ausgeschaltet worden war, zeigten eine generell schwächere Gesamtendocytoseleistung und eine sehr stark herabgesetzte Transferrin-Aufnahme. Der Effekt auf die EGF-Aufnahme bei höheren Konzentrationen des Hormons (10 ng/mL) war weniger ausgeprägt, welches zu der Annahme führte, dass es alternative Aufnahmewege gibt. Die Ausschaltung von AP-2 reduzierte die Bindung von Clathrin, Eps15 und CALM an die Plasmamembran stark, hatte aber keinen Einfluss auf die Bindung von Epsin. Die Transferrin-Aufnahme war stark inhibiert, die EGF-Endocytose dagegen nicht. Da die Inhibition der EGF-Aufnahme noch geringer ausfiel als nach der Suppression der Clathrin Expression, konnte gefolgert werden, dass in Abhängigkeit von der Fracht auch alternative Adaptoren Clathrin an die Plasmamembran rekrutieren können.

Die Ergebnisse der Ausschaltung von CALM schlossen aus, dass dieses Molekül einer dieser alternativen Adaptoren ist. Vielmehr konnte durch elektronenmikroskopische Untersuchungen gezeigt werden, dass CALM die Größe der Einstülpungen an der Plasmamembran moduliert.

Die Ausschaltung des Proteins GAK, welches dafür benötigt wird, die Clathrin-Hülle von den Vesikeln abzustreifen, führte zu einer Anhäufung von Clathrin bedeckten Strukturen an der Plasmamembran. Dieses wurde auf einen Defekt bei der Vesikelknospung zurückgeführt. Es wurde daraus geschlossen, dass GAK schon in frühen Schritten der Endocytose benötigt wird. Da es nach Depletierung des Proteins überraschenderweise nur zu einer Verlangsamung und keinem kompletten Stillstand der Endocytose kam, kann es möglicherweise durch ein bisher unbekanntes Protein ersetzt werden.

Schlagwörter: Clathrin, Adaptoren, CALM, GAK, *Uncoating*, Endocytose, RNAi

Summary

Clathrin mediated endocytosis is the most important pathway in cells of higher eukaryotes for receptor dependent uptake of growth factors and nutrients. In this study RNA Interference (RNAi) was used to knock down the endocytic proteins clathrin, AP-2, CALM and GAK in HeLa cells in order to assess their functions during coated vesicle budding.

Depletion of clathrin resulted in an almost complete disappearance of clathrin coated structures. Electron microscopy revealed flat AP-2 positive structures at the plasma membrane, which would normally be hidden beneath the clathrin lattices. As this coat did not show any signs of invagination it was concluded that clathrin is needed for this process either by providing a mechanical force or by recruiting a yet unknown cofactor. In functional studies *knockdown* cells displayed a major decrease in general endocytosis as well as in transferrin uptake. The effect on the EGF internalisation at higher concentrations of the hormone (10 ng/mL) was less profound, leading to the assumption that there are alternative pathways for its endocytosis.

Studies of AP-2 *knockdown* cells revealed its importance for the stable membrane association of eps15, CALM and clathrin but not epsin. Functional assays also showed a significant decrease in Transferrin uptake, but no effects on EGF-endocytosis. With the AP-2 *knockdown* having an even smaller effect on EGF internalisation as the depletion of clathrin, it was concluded that alternative adaptors possibly sequester the latter molecule to the plasma membrane in a cargo specific way.

The *knockdown* of CALM by RNA Interference excluded the possibility mentioned in the literature that CALM might be one of these adaptors. Intense electron microscopical studies gave rise to the assumption that CALM instead is necessary for controlling the vesicle size at the plasma membrane.

Depletion of GAK, a factor which was shown to be needed to *uncoat* clathrin coated vesicles, led to the accumulation of flat coated structures and pits at the plasma membrane, indicating defects in vesicle budding. It was therefore concluded that GAK might already be involved in early stages of vesicle formation, presumably during the rearrangement of the clathrin lattice. Surprisingly, no major inhibition of clathrin mediated endocytosis was observed. This led to the assumption that GAK might be substituted by a second protein.

Keywords: clathrin, adaptors, CALM, GAK, *uncoating*, endocytosis, RNAi

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG.....	1
SUMMARY.....	2
INHALTSVERZEICHNIS	3
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	5
1. EINLEITUNG	7
1.1 INTRAZELLULÄRE TRANSPORTVORGÄNGE	7
1.2 ENDOCYTOSE.....	8
1.2.1 <i>Transferrin-Rezeptor</i>	10
1.2.2 <i>EGF-Rezeptor</i>	11
1.3 MECHANISMUS DER CLATHRIN VERMITTELTEN ENDOCYTOSE	12
1.3.1 <i>Clathrin</i>	12
1.3.2 <i>Adaptorproteine</i>	13
1.3.3 <i>CALM/AP180</i>	15
1.3.4 <i>Molekulare Mechanismen der Clathrin vermittelten Endocytose</i>	16
1.3.5 <i>Bildung von Clathrin bedeckten Vesikeln am TGN</i>	20
1.3.6 <i>Sortierung von Proteinen aus dem Endosom in Multivesikuläre Körperchen</i>	21
1.4 RNA-INTERFERENZ.....	21
1.5 AUFGABENSTELLUNG.....	25
2. MATERIAL UND METHODEN.....	26
2.1 MATERIALIEN	26
2.1.1 <i>Chemikalien</i>	26
2.1.2 <i>Puffer und Lösungen</i>	29
2.1.3 <i>siRNAs</i>	32
2.1.4 <i>DNA – Konstrukte</i>	33
2.1.5 <i>Antikörper</i>	33
2.1.6 <i>Zelllinien</i>	35
2.1.7 <i>Geräte</i>	35
2.1.8 <i>Verbrauchsmaterialien</i>	36
2.1.9 <i>verwendete Software</i>	37
2.2 METHODEN.....	38
2.2.1 <i>Zellkultur</i>	38
2.2.2 <i>Transfektion</i>	38
2.2.3 <i>Fluoreszenzmikroskopie</i>	42
2.2.4 <i>Funktionelle Untersuchungsmethoden</i>	44
2.2.5 <i>Zellfraktionierung</i>	48
2.2.6 <i>Elektronenmikroskopie</i>	49

2.2.7 Apoptosetests	55
2.2.8 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western-Blot.....	56
3. ERGEBNISSE	59
EINLEITUNG	59
3.1 TEIL I.....	59
3.1.1 Vergleiche unterschiedlicher Methoden zur Ausschaltung von Proteinen mittels RNAi.....	59
3.1.2 Präparation von Plasmamembranfragmenten für die Elektronenmikroskopie.....	62
3.2 TEIL II	68
3.2.1 Ausschaltung der schweren Kette von Clathrin mittels RNAi.....	68
3.2.2 Ausschaltung der leichten Ketten Clathrins mittels RNAi.....	80
3.2.3 Ausschaltung des AP-2 Komplexes mittels RNAi.....	81
3.2.4 Funktionelle Untersuchungen an Clathrin und AP-2 RNAi Zellen.....	84
3.2.5 Ausschaltung des Proteins CALM mittels RNAi	90
3.2.6 Ausschaltung des Proteins GAK mittels RNAi	95
4. DISKUSSION	101
CLATHRIN RNAI	101
AP-2 RNAI	103
FUNKTIONELLE UNTERSUCHUNGEN AN CLATHRIN UND AP-2 RNAI ZELLEN.....	104
CALM RNAI	106
GAK RNAI	108
SCHLUSSBETRACHTUNG.....	109
5. LITERATUR	110
6. DANKSAGUNG:.....	114
7. ANHANG	115
WISSENSCHAFTLICHER WERDEGANG.....	115
PUBLIKATIONEN	115
ABBILDUNG: INTERAKTIONEN VON PROTEINEN DER CLATHRIN VERMITTELTEN ENDOCYTOSE	116

Abkürzungsverzeichnis

4xPP	vierfach-Probenpuffer
ABTS	2,2'-Azino-bis(3-Ethylbenzthiazolin-6-Sulfonsäure)
ANTH-Domäne	AP180 N-terminale Homologiedomäne
AP	Adaptorproteinkomplex
AP180	<i>assembly</i> protein mit einer apparenten Molekülmasse von 180 kDa
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BSA	Bovines Rinderserumalbumin
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorabditis elegans</i> , eine Nematodenart
CALM	<i>Clathrin Assembly Lymphoid Myeloid Leukemia Protein</i>
C-terminal	carboxyterminal
DDSA	Dodecenylnbernsteinsäureanhydrid
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagle's Medium
dsRNA	doppelsträngige RNA
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
ECL	<i>Enhanced Chemoluminescence Reagent</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i> , Epidermis-Wachstumsfaktor
EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i> , eine Variante des GFP mit verstärkter Fluoreszenzintensität
EGFR	EGF-Rezeptor
EGTA	Ethylenbis(oxyethylenitrilo)-tetraacetat
EH-Domäne	Eps15-Homologiedomäne
ENTH-Domäne	Epsin N-terminale Homologiedomäne
Eps15	EGF-Rezeptorproteinsubstrat 15
Epsin	Eps15-interagierendes Protein
ER	endoplasmatisches Reticulum
EYFP	<i>Enhanced Yellow Fluorescent Protein</i> , eine Variante des GFP mit verändertem Fluoreszenzspektrum und verstärkter Fluoreszenzintensität
g	-fachem der Erdbeschleunigung
GAK	Cyklin-G assoziierte Kinase
GFP	grün fluoreszierendes Protein, isoliert aus der Qualle <i>Aequorea victoria</i>
GTP	Guanosin-5'-Triphosphat
HC	schwere Kette von Clathrin (<i>heavy chain</i>)
HEPES	[4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-ethansulfonsäure
Hsc70	konstitutiv expremiertes Hitzeschockprotein mit einer Größe von 70 kDa
kD	Kilodalton

LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i> , Lipoprotein geringer Dichte, ein Transportpartikel für Cholesterin
LC	leichte Kette von Clathrin (<i>light chain</i>)
MW	Molekulargewichtsmarker
N-terminal	aminoterminal
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered Saline</i> , Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
RISC	<i>RNA induced silencing complex</i>
RNAi	RNA Interferenz
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
shRNA	<i>small hairpin RNA</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
TBS	<i>tris buffered saline</i> , Tris gepufferte Kochsalzlösung
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGN	Transgolginetzwerk
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton	t-Octylphenoxypoly-etoxyethanol
TUNEL	<i>terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated Fluorescein-dUTP nick end labelling</i> , ein Apoptosetest
Tween	Polyoxyethylensorbitenmonolaurat

Aminosäuren wurden entsprechend dem Einbuchstabencode abgekürzt. Das Symbol Φ wurde für große, hydrophobe Aminosäurereste verwendet, X kennzeichnet eine beliebige Aminosäure.

Enzym- und Proteinnamen wurden bei der ersten Nennung *kursiv* geschrieben.

Alle Grafiken und Zeichnungen wurden, soweit nicht anders gekennzeichnet, vom Autor mit Adobe Illustrator 8.0 erstellt.

1. Einleitung

1.1 Intrazelluläre Transportvorgänge

Eukaryotische Zellen sind Orte reger Betriebsamkeit, in denen permanent Proteine und Lipide zwischen membranumhüllten Zellorganellen hin und her transportiert werden. Die Fracht wird dabei meist in kleinen Membranvesikeln von 0,05 – 0,1 µm Durchmesser verpackt. Diese bilden sich, indem sich die Membran der Ausgangsorganelle lokal immer tiefer einstülpt, bis schließlich das fertige Vesikel abgeschnürt wird, welches darauf mit seinem Zielkompartiment verschmilzt. Die Sortierung der Fracht und die Bildung der Vesikel ist ein streng kontrollierter Prozess, der in Abhängigkeit vom Ort der Entstehung und von der Zielorganelle durch eine Vielzahl unterschiedlicher Hüllproteine vermittelt wird.

Eines der am Besten charakterisierten dieser Makromoleküle ist *Clathrin*. Es bildet eine sehr charakteristische, auch Stachelsaum genannte Hülle um die Vesikel, welche deshalb leicht unter dem Elektronenmikroskop zu identifizieren sind. Clathrin umhüllte Vesikel sind an verschiedenen zellulären Transportprozessen beteiligt:

Zum einen vermitteln sie die Ausschleusung von Proteinen aus dem Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) ins späte Endosom und wahrscheinlich auch wieder zurück. Zum anderen sind sie entscheidend an der Rezeptor vermittelten Aufnahme von Molekülen aus dem Extrazellularraum beteiligt. Dieser Prozess ist unter dem Namen *Clathrin vermittelte Endocytose* bekannt. Clathrin spielt auch bei der Sortierung von Proteinen aus dem späten Endosom in die so genannten Multivesikulären Körperchen eine Rolle. Es bildet hier jedoch keine Vesikel, sondern nur flache Strukturen.

Clathrin bedeckte Vesikel sind jedoch keineswegs einzigartig in ihrer Fähigkeit Frachtmoleküle zu sortieren und zu transportieren. So wird der Transport von Proteinen aus dem Endoplasmatischen Reticulum (ER) in den Golgi Apparat durch so genannte *COPI* bedeckte Vesikel vermittelt. Der Rücktransport von Makromolekülen aus dem TGN in das ER verläuft über *COPII* umhüllte Strukturen. Die Hüllproteine für Vesikel aus dem Endosom, welche Frachtmoleküle exocytieren, sind dagegen noch nicht bekannt.

Während man bis vor einigen Jahren die spezifische Aufnahme von Proteinen aus dem Extrazellularraum mit Clathrin vermittelter Endocytose gleichsetzte, so ist auch hier klar geworden, dass eine Vielzahl von verschiedenen Prozessen existiert. Da sich ein Großteil dieser Arbeit mit Proteinen der Clathrin vermittelten Endocytose beschäftigt, ist es wichtig, diese von alternativen Aufnahmewegen abzugrenzen.

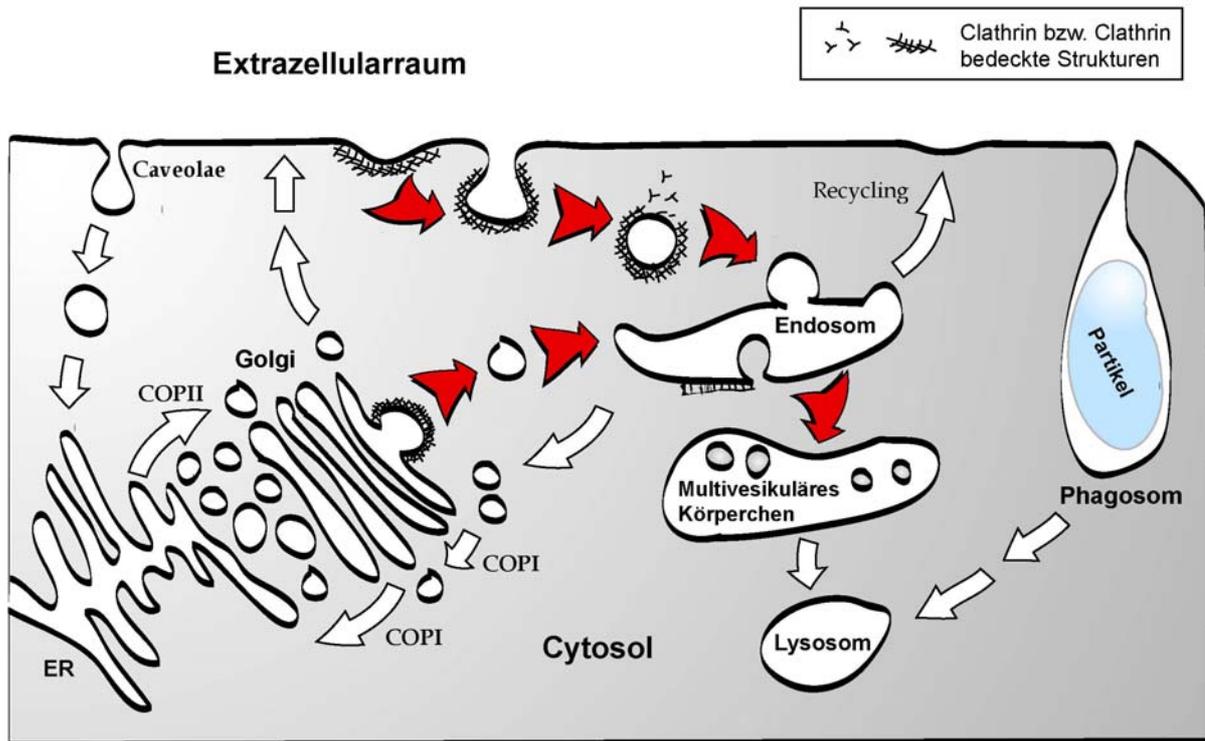


Abbildung 1-1 Beispiele von intrazellulären Transportprozessen. Clathrin vermittelte Transportvorgänge sind mit einem roten Pfeil markiert, andere mit einem weißen Pfeil. Es sind mittlerweile auch Clathrin unabhängige Rezeptor vermittelte Endocytoseprozesse bekannt, durch welche die Fracht ins Endosom transportiert wird.

1.2 Endocytose

Die Aufnahme von Molekülen aus dem Extrazellularraum wird allgemein als Endocytose bezeichnet. Es werden hierbei verschiedene Formen unterschieden (Überblick bei Conner und Schmid 2002 (1)). Während die **Phagocytose**, bei der Bakterien und andere größere Partikel von der Zelle umflossen und aufgenommen werden, nur von wenigen spezialisierten Zellen durchgeführt werden kann, nehmen fast alle Zellen permanent über **Pinocytose** genannte Vorgänge Moleküle aus der Umgebung auf. Während die Makropinocytose, ein Actin abhängiger Prozess, mit der eher unspezifischen Aufnahme von Molekülen aus der extrazellulären Flüssigkeit in Verbindung gebracht wird, so bietet die so genannte *Rezeptor vermittelte Endocytose* der Zelle die Möglichkeit, gezielt Moleküle aufzunehmen, welche an einen Rezeptor an der Zelloberfläche gebunden haben. Gut charakterisiert ist hierbei die Aufnahme von Molekülen über Einstülpungen, die mit dem Cholesterin bindenden Protein *Caveolin* ausgekleidet sind, so genannte *Caveolae*. Die Bildung dieser Einstülpungen ist abhängig von der Existenz von cholesterinreichen Membransubdomänen, auch *Rafts* genannt. In letzter Zeit wurde eine Reihe weiterer Endocytoseprozesse beschrieben, die sowohl

Caveolin- als auch Clathrin unabhängig sind. Sie sind zum Teil bisher nur über ihre Abhängigkeit von *Rafts* definiert, weshalb sie auch unter dem Begriff *Raft*-abhängige Endocytose zusammengefasst werden.

Die bei weitem Wichtigste Form der Rezeptor vermittelten Endocytose verläuft jedoch über Clathrin bedeckte Einstülpungen (*Clathrin coated pits*) und Clathrin bedeckte Vesikel. Sie ist von essentieller Bedeutung beim Recycling von synaptischen Vesikeln aus dem synaptischen Spalt, sorgt für die Aufnahme des lebenswichtigen Eisentransportproteins *Transferrin*, von *LDL* und *Insulin*. Auch ist von verschiedenen Viren bekannt, dass sie die Clathrin vermittelte Endocytose als Eingangspforte in Zellen nutzen.

Die Art und Weise, wie ein Frachtmolekül endocytiert und innerhalb der Zelle behandelt wird, ist abhängig von der Natur ihres Rezeptors, der Art des Moleküls und vom Zustand der Zelle: Während einige Rezeptoren so gut wie immer recycelt werden, werden andere in der Regel ins Lysosom transportiert und dort abgebaut. Diese verschiedenen Schicksale sollen anhand der Beispiele des Transferrin- und des *EGF*-(*Epidermal Growth Factor*, Epidermis Wachstumsfaktor) Rezeptors erläutert werden:

1.2.1 Transferrin-Rezeptor

Das Glykoprotein Transferrin stellt das wichtigste Transportprotein von Eisen im Blut dar. Die eisenfreie Form, die Apotransferrin genannt wird, kann zwei Fe^{3+} -Ionen binden, wodurch Ferrotransferrin gebildet wird. Dieses wird nach Bindung an den Transferrin-Rezeptor Clathrin vermittelt aufgenommen und ins späte Endosom transportiert. Im hier herrschenden sauren Milieu dissoziieren die Eisenionen vom Transportmolekül ab. Während das Eisen in der Zelle verbleibt, wird das Apotransferrin, welches bei einem pH-Wert von weniger als 6 an seinen Rezeptor gebunden bleibt, wieder aus der Zelle ausgeschleust. Der im Extrazellularraum herrschende neutrale pH-Wert reduziert die Affinität des Frachtmoleküls zu seinem Rezeptor drastisch, es dissoziiert ab und steht für einen weiteren Beladungs- und Transportzyklus zur Verfügung (siehe Abbildung 1-2). Der gesamte hier beschriebene Aufnahme- und Recyclingprozess dauert etwa 15 Minuten.

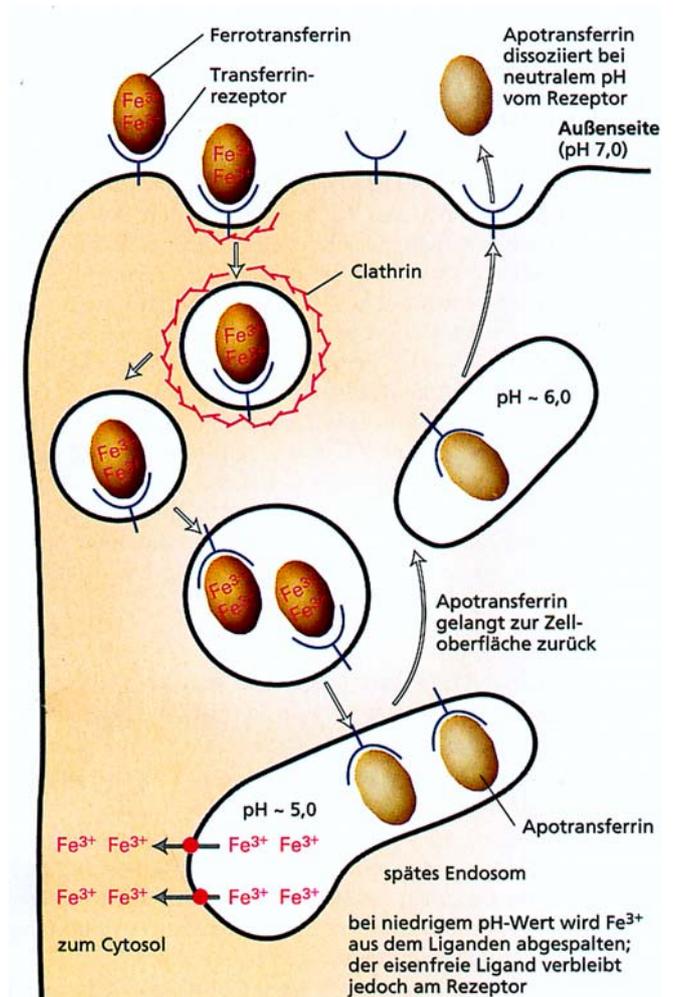


Abbildung 1-2 Schematische Darstellung von Transferrin Endocytose und Recycling: Nach seiner Aufnahme durch Clathrin vermittelte Endocytose gelang der Transferrin-Rezeptor Komplex in die Endosomen. Bei dem hier herrschenden sauren pH Wert dissoziiert das Eisen vom Transferrin ab und wird ins Cytosol geschleust. Der Fracht-Rezeptor-Komplex bleibt so lange erhalten, bis er wieder an die Zelloberfläche gebracht wird. Hier dissoziiert das Apotransferrin ab und kann neues Eisen aufnehmen. Grafik aus (2) nach (3)

1.2.2 EGF-Rezeptor

Während Transferrin ein Molekül ist, welches der Grundversorgung der Zellen mit Nährstoffen dient, vermittelt der EGF (Epidermiswachstumsfaktor) der Zelle ein Signal, welches fehlgeleitet fatale Folgen für den Organismus haben kann. Nach der Bindung des Wachstumshormons aktiviert der Rezeptor eine Reihe von Signaltransduktionswegen und regt die Zellen zur Proliferation an. Ein permanent aktiver EGF-Rezeptor ist daher ein klassisches Onkogen, da er Zellen zur Hyperproliferation anregt. Ein Großteil aller Hautkrebskrankungen ist auf eine solche Veränderung des EGF-Rezeptors (EGFR) zurückzuführen. Vor diesem Hintergrund spielt die Endocytose des Rezeptors eine wichtige Rolle in der Regulation der Signalisierungsdauer. So zeigten Wells et al. 1990 (5), dass eine nicht endocytierbare Mutante dieses Rezeptors zu verstärktem Zellwachstum führte. Des Weiteren

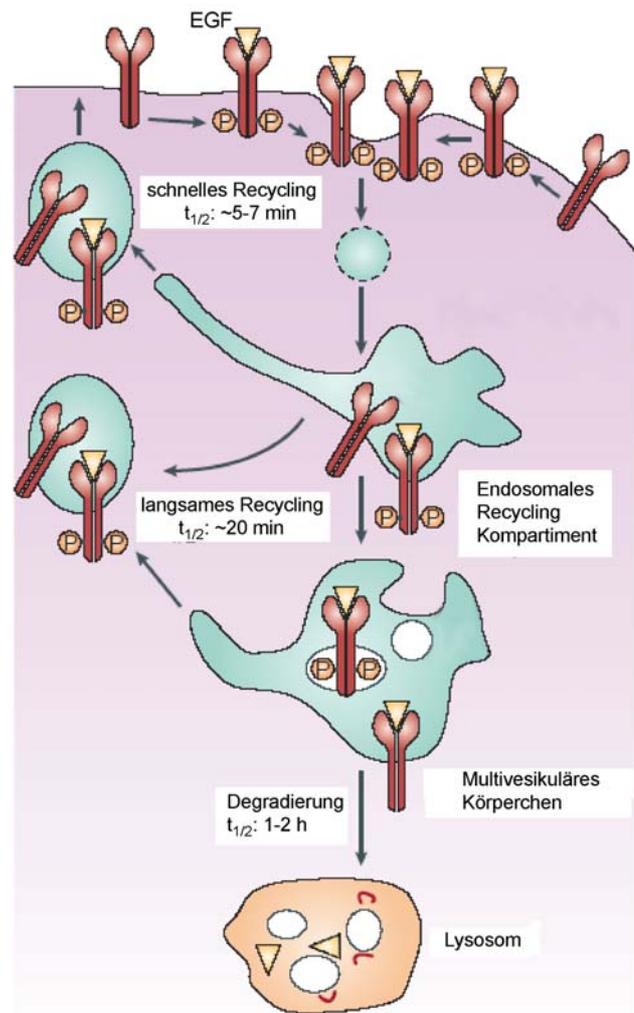


Abbildung 1-3 Schematische Darstellung von EGF Endocytose und Recycling: Der EGF-Rezeptor wird durch die Bindung von EGF aktiviert und schließlich endocytiert. Innerhalb von zehn Minuten kann dieser dann im Endosom detektiert werden. Während Rezeptoren ohne Ligand fast ausschließlich an die Plasmamembran zurück recycelt werden, ist die Wahrscheinlichkeit im Lysosom degradiert zu werden für besetzte Rezeptoren höher. Nichtsdestotrotz gelangt ein signifikanter Anteil von ihnen auf zwei alternativen Recyclingwegen an die Plasmamembran zurück. Zeichnung aus (4).

wird der Rezeptor durch die Endocytose von der Oberfläche entfernt, die Reaktionsfähigkeit der Zelle auf ein weiteres Signal somit herabgesetzt. Neuere Forschungen haben gezeigt, dass auch der aufgenommene Rezeptor noch signalisieren kann. Tatsächlich wird vermutet, dass die Endocytose auch dazu dient, bestimmte Signaltransduktionswege anzuschalten. So hat man beobachtet, dass unter Bedingungen, in denen die EGFR-Aufnahme inhibiert ist, die Aktivierung der *ERK1/2* Kinase signifikant reduziert war (6). Die Endocytose des EGF-Rezeptors dient folglich ganz anderen Zwecken als die Aufnahme von Transferrin. Vor diesem Hintergrund ist es nicht verwunderlich, dass der Rezeptor-Ligandenkomplex in der

Zelle in der Regel ein ganz anderes Schicksal hat als das des Transferrin Rezeptors: Ein Großteil des EGF wird mitsamt seinem Rezeptor ins Lysosom transportiert und dort degradiert, nur ein geringerer Prozentsatz wird recycelt.

1.3 Mechanismus der Clathrin vermittelten Endocytose

Es dürfte ersichtlich sein, dass derart komplexe Abläufe wie Clathrin vermittelte Transportvorgänge einer stringenten Kontrolle bedürfen, die durch eine Vielzahl von Proteinen vermittelt wird. Tatsächlich spielen neben Clathrin auch noch die so genannte *Adaptoren*, welche die Bindung von Clathrin an die Membran vermitteln und eine ständig wachsende Schar von *akzessorischen Proteinen*, deren Funktion meist noch unbekannt ist, eine Rolle. Einen Überblick über die beteiligten Proteine gibt Abbildung 7-1 im Anhang.

Im folgenden Abschnitt soll zunächst auf einzelne Proteine, die für diese Arbeit wichtig waren, besonders eingegangen werden, bevor versucht wird, die molekularen Mechanismen der Clathrin vermittelten Endocytose im Menschen dem Leser näher zu bringen. Auf weitere Transportprozesse, an denen Clathrin beteiligt ist wird nur am Rande eingegangen, da sie für diese Arbeit eine nur untergeordnete Rolle spielen.

1.3.1 Clathrin

Treibende Kraft hinter der Clathrin vermittelten Endocytose ist die Fähigkeit des Proteins Clathrin, sich zu polyedrischen Käfigen aus Fünf- und Sechsecken zusammenzulagern. Die Reaktion ist energetisch begünstigt und findet unter geeigneten Pufferbedingungen auch spontan im Reagenzglas statt. Es wurde vermutet, dass die bei der Käfigbildung freiwerdende Energie ausreicht, um ein Vesikel von der Plasmamembran abzuschneiden (7). Clathrin besitzt eine dreibeinige Struktur (*Triskelion*) (8,9). Es besteht bei Säugern aus drei identischen schweren Ketten (HC) mit einer Masse von 192 kD (10) und einer Länge von 1675 Aminosäureresten, an die sich in der Achsen- oder Nabenregion der Triskelions jeweils eine leichte Kette (LC) anlagert. Die schwere Kette lässt sich grob in drei Teile unterteilen: die proximale, distale und die terminale Domäne (siehe Abbildung 1-3).

In Wirbeltieren finden sich zwei Formen dieser Ketten: LCa und LCb, während bei Hefen, Wirbellosen und Insekten nur eine bekannt ist. LCa und LCb haben Spleißvarianten von 25 – 29 kD (11). Obwohl für LCb eine höhere Affinität zu schweren Ketten *in vitro* nachgewiesen

wurde (12), stellte man eine rein zufällige Verteilung der leichten Ketten fest (11). Die Bedeutung dieser Makromoleküle war lange Zeit unbekannt, bis man feststellte, dass sich die schweren Ketten bei physiologischem pH-Wert spontan zu Käfigen zusammenlagerten, was in Gegenwart der leichten Kette unterbunden wurde (13). Sie scheinen also die Zusammenlagerung von Clathrin HC zu Käfigen zu modulieren. Der Einfluss der leichten Ketten kann *in vitro* durch einen pH-Wert von weniger als 6,5 unterbunden werden.

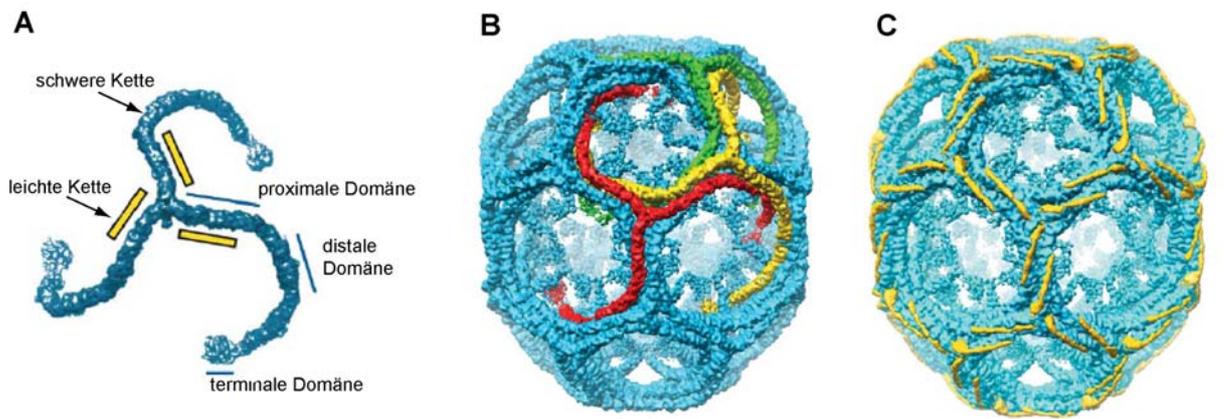


Abbildung 1-4: Clathrin: A) elektronenmikroskopische Rekonstruktion, der Durchmesser eines Triskelions beträgt ca. 50 nm; B) Clathrin Käfig ohne leichte Ketten. Die Position dreier schwerer Ketten ist durch unterschiedliche Färbung hervorgehoben. Die terminalen Domänen ragen in den Käfig hinein; C) Käfig mit leichten Ketten (gelb); alle Abbildungen aus (14); der abgebildete Käfig wurde *in vitro* hergestellt und ist zu klein, um *in vivo* ein Vesikel einschließen zu können.

Die Organisationsstruktur des Clathrin Käfigs wurde bis zu einer Auflösung von 7,9 bis 11 Å aufgeklärt: Die schweren Ketten sind miteinander verschlungen, jede Ecke eines Käfigs vereint dabei Segmente von vier verschiedenen Triskelien (Abbildung 1-3 B).

Da Clathrin selbst nicht an Membranen binden kann, benötigt es hierfür die Hilfe von Adapterproteinen. Die terminale Domäne, welche die Bindung an diese Proteine vermittelt, ragt zu diesem Zweck weit in das Zentrum eines Käfigs hinein (Abbildung 1-3 B).

Die leichten Ketten liegen dagegen an der Außenseite (Abbildung 1-3 C) eines Käfigs, was sie für regulatorische Proteine gut zugänglich macht.

1.3.2 Adaptorproteine

Die neben Clathrin häufigsten Proteine in Clathrin bedeckten Vesikeln sind die „Adaptoren“ AP-1 und AP-2. Sie vermitteln nach gängiger Ansicht die Bindung von Clathrin an Membranen. Sie können durch verschiedene weitere Bindungsdomänen aber auch mit einer Vielzahl von akzessorischen und regulatorischen Proteinen interagieren (Überblick bei (15)).

Die Adaptoren bilden eine eigene Gruppe von heterotetrameren Proteinen, wobei die Adapterproteinkomplexe 1 und 2 (AP-1 und AP-2) am besten erforscht sind. Während AP-1 bei der Bildung von Clathrin bedeckten Vesikeln am TGN eine Rolle spielt, so ist AP-2 ausschließlich an der Plasmamembran lokalisiert. Es sind im Menschen mit AP-3 und AP-4 noch zwei weitere Adaptorproteinkomplexe bekannt. Für AP-3 ist eine direkte Clathrin Bindung nachgewiesen. Eine Funktion in Sortiervorgängen vom TGN zum Lysosom wird vermutet (16,17). AP-4 scheint dagegen nur bei Clathrin unabhängigen Vesikelbildungen am TGN eine Rolle zu spielen (18). Neuerdings gibt es allerdings auch Studien, die AP-4 als ein Teil eines Clathrin vermittelten Transportvorganges sehen (19).

Alle Adaptoren haben eine sehr charakteristische Struktur, die unter dem Elektronenmikroskop an einen Kopf mit langen Ohren erinnert (20) (siehe Abbildung 1-5).

Die einzelnen Untereinheiten werden Adaptine genannt. AP-1 besteht dabei aus den Untereinheiten γ -, $\beta 1$ -, $\mu 1$ - und $\sigma 1$ -Adaptin, während sich AP-2 aus α -, $\beta 2$ -, $\mu 2$ - und $\sigma 2$ zusammensetzt. α , γ , $\beta 1$ und $\beta 2$ haben ein Gewicht von ca. 100 kD, die μ Untereinheiten sind mit 50 kD wesentlich leichter. Die σ -Untereinheiten sind mit ca. 20 kD am kleinsten. Alle β -Untereinheiten der Adaptoren haben sehr ähnliche Aminosäuresequenzen, α und γ unterscheiden sich dagegen stärker. Insgesamt weisen jedoch alle großen Untereinheiten der Adaptorproteinkomplexe eine ähnliche Tertiärstruktur auf.

Sie bestehen aus einem Rumpfteil, der mit den anderen Untereinheiten des Komplexes interagiert, und den so genannten Appendix- (*Appendage*-) Domänen. Beide Teile sind durch eine flexible Scharnier- (*Linker*-) Region verbunden. Die Appendix-Domäne lässt sich in die *Sandwich*- und die *Plattform*-Domäne unterteilen.

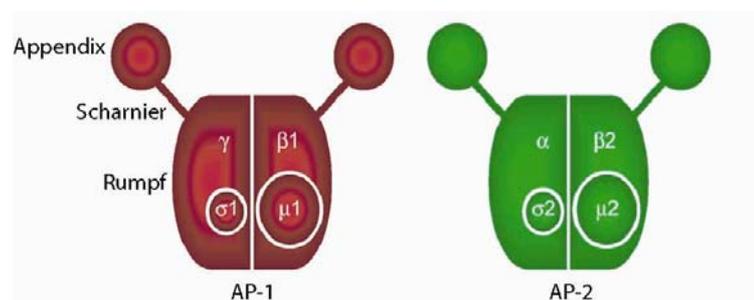


Abbildung 1-5: Schematische Darstellung von AP-1 und AP-2 (nach Robinson M. und Bonifacino J. (21)): Die Moleküle bestehen aus jeweils zwei großen Untereinheiten (α und γ bzw. $\beta 1/2$ von ca. 100kD), sowie μ (50 kD) und σ (20kD).

Die α -Adaptin Ohrdomäne weist neben einer Bindungsstelle für die terminale Domäne von Clathrin auch zahlreiche Interaktionsstellen für verschiedene akzessorische Proteine auf.

Die β -Untereinheit von AP-2 kann über die Scharnier- und Ohrregion ebenfalls Clathrin binden.

Zur hochaffinen Bindung von AP-2 an die Membran tragen Protein-Protein sowie Protein-Lipid Wechselwirkungen bei. Sowohl α - als auch μ 2-Adaptin binden an das seltene Membranlipid *Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat*. Die Bindung von AP-2 an die Plasmamembran wird eventuell zusätzlich durch eine Interaktion mit dem Protein Synaptotagmin vermittelt (22).

Über μ 2-Adaptin kann AP-2 an das Tetrapeptidmotiv $YXX\Phi^*$, welches im cytosolischen Teil vieler Rezeptoren vorkommt, binden. Eine Phosphorylierung dieser Untereinheit durch die Kinase *AAK1* (23) erhöht die Bindungsfähigkeit des Adaptors an diese Aminosäuresequenzen (24) und ist notwendig für die Rekrutierung des Transferrin-Rezeptors in Clathrin bedeckte Strukturen.

Mit ihren vielen Bindungs- und Interaktionstellen sind die Adaptoren die Organisationszentren der Clathrin vermittelten Endocytose: Sie verbinden das Gerüstmolekül Clathrin mit den Membranen, binden bestimmte Frachtmoleküle und rekrutieren einen Schwarm von Helfermolekülen an die Orte der Vesikelbildung. Tatsächlich interagiert fast jedes der so genannten akzessorischen Proteine mit einem der Adaptorproteinkomplexe. Die Bindung an AP-1 und AP-2 wird dabei zumeist über Sequenzmotive aus 3 bis 5 Aminosäuren vermittelt.

In jüngster Zeit mehren sich allerdings auch die Berichte darüber, dass es neben den klassischen hier vorgestellten Adaptoren auch noch alternative Adaptoren geben könnte, welche unabhängig von den hier vorgestellten Proteinkomplexen die Bindung Clathrins an die Plasmamembran vermitteln.

1.3.3 CALM/AP180

CALM und sein nervenzellspezifisches Homolog AP180 zählen zu den ANTH-(*AP180 N-Terminale Homologiedomäne*) Domänen Proteinen. Sie kommen in Clathrin bedeckten Vesikeln in hoher Konzentration vor und zählen zu den häufigsten akzessorischen Proteinen.

CALM und AP180 zeichnen sich durch eine am N-Terminus befindliche globuläre Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat bindende Domäne aus. Der Rest des jeweiligen Proteins

* Die Aminosäuren wurden nach dem Einbuchstabencode abgekürzt. X steht für eine beliebige, Φ für eine große, hydrophobe Aminosäure.

weist dagegen keine geordnete Struktur auf (25), ist jedoch ausgesprochen reich an Bindungsmotiven.

CALM hat seine größte Ähnlichkeit mit seinem neuronalen Gegenstück in der ANTH-Domäne. Das C-terminale Ende ist kürzer als bei AP180. Es bindet Clathrin (26) und über zwei DXF Sequenzmotive an die Plattform Domäne von α -Adaptin. Zusätzlich finden sich hier noch zwei NPF Bindungsmotive, über die eine Bindung an das akzessorische Protein *Eps15* vermittelt wird (27).

Es ist seit langem bekannt, dass man durch Zugabe von AP180 bei Käfigbildungsexperimenten *in vitro* besonders kleine und einheitliche Clathrinkäfige erhält (28). Des Weiteren konnte im Fadenwurm *Caenorabditis elegans* beobachtet werden, dass sich nach Ausschaltung von *UNC-11*, dem AP180 orthologen Protein, vergrößerte Clathrin umhüllte Vesikel an den Synapsen anhäufte (29). Die Autoren folgerten aus diesen Daten, dass AP180 unter anderem die Größe der knospenden Clathrin bedeckten Vesikel moduliert. Arbeiten von Ford et al. (2001)(30) zeigten, dass Clathrin an künstlichen Membranen, bei Zugabe von AP180, flache Gitter formte. Gab man zusätzlich noch AP-2 hinzu, so bildeten sich Clathrin bedeckte Einstülpungen. Aus diesen Ergebnissen wurde der Schluss gezogen, dass AP180 und sein Homolog CALM vielleicht als alternative Adaptoren für Clathrin dienen könnten.

1.3.4 Molekulare Mechanismen der Clathrin vermittelten Endocytose

Die Clathrin vermittelte Endocytose ist nicht zuletzt aufgrund des frühen Zeitpunktes ihrer Entdeckung relativ gut erforscht. Die Grundprinzipien, welche die Einstülpung der Membran und die daraus resultierende Vesikelbildung beeinflussen, sind mittlerweile verstanden: Die Clathrin vermittelte Endocytose lässt sich grob in vier Schritte einteilen: Die *Keimbildung*, die voranschreitende Einstülpung der Membran (*Knospung*), die *Abschnürung* des Vesikels und schließlich die so genannte *Uncoating* Reaktion, in der die Proteinhülle des Vesikels wieder abgestreift wird (siehe Abbildung 1-6).

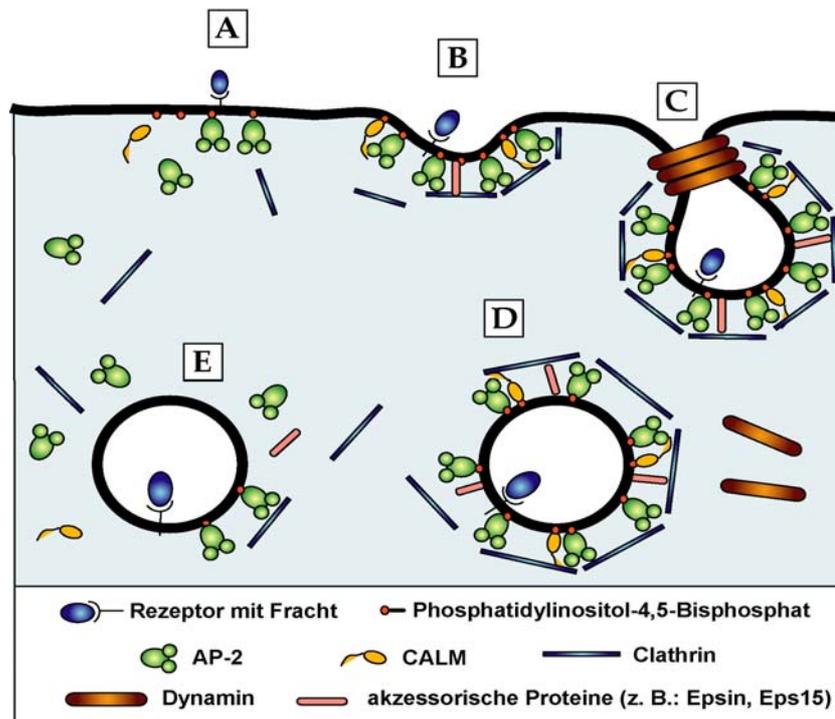


Abbildung 1-6: Schematische Darstellung der Clathrin vermittelten Endocytose

- A) Keimbildung: AP-2 wird über ARF6 an die Plasmamembran rekrutiert, es bindet an Membranlipide und/oder Synaptotagmin; einige akessorische Proteine und/oder Frachtmoleküle binden. (In neuronalem Gewebe findet man statt CALM AP180.)
- B) Knospung: Weitere akessorische Proteine binden, Clathrin wird aus dem Cytosol rekrutiert, die Membran stülpt sich ein.
- C) Abschnürung: Das Vesikel wird unter Einwirkung von Dynamin abgeschnürt.
- D) *Uncoating*: Anschließend wird es unter Einwirkung von GAK (in neuronalem Gewebe Auxilin) und Hsc70 von seiner Clathrin Hülle befreit.
- E) *Uncoating*: Das Vesikel verliert auch die Hülle aus Adapter- und akessorischen Proteinen und kann nun mit seiner Zielorganelle, dem Endosom, verschmelzen.

1.3.4.1 Keimbildung

Die Clathrin vermittelte Endocytose wird möglicherweise durch die Aktivierung des kleinen GTP bindenden Enzyms *ARF6* (*ADP-Ribosylierungsfaktor 6*) über das *GTPase-aktivierende Protein (GAP) SMAP1*, welches direkt Clathrin bindet (31), eingeleitet. Vermutlich reguliert *ARF6* dann in seiner GTP-Form die Bindung von AP-2 an die Plasmamembran (32). Dies geschieht auf der einen Seite durch direkte Interaktion, auf der anderen Seite durch Beeinflussung der Synthese von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP2) (33).

Die negativen Ladungen dieses Lipides und die Phosphorylierung der $\mu 2$ -Untereinheit durch die *AAK1 Kinase* induzieren nun nach gängigem Modell eine Konformationsänderung im membrangebundenen AP-2 Komplex. Die vorher durch Teile der $\beta 2$ -Untereinheit versteckte Bindungstasche für die YXX Φ -Motive einiger Rezeptoren wird freigelegt und der Adaptorproteinkomplex kann nun Frachtmoleküle in die Zonen rekrutieren, in denen später

ein Clathrin bedecktes Vesikel entsteht (15). Vermutlich zu diesem Zeitpunkt binden auch einige der akzessorischen Proteine.

1.3.4.2 Knospung

Die Reaktionen, welche nun die weitere Entstehung von Clathrin bedeckten Vesikeln vorantreiben, sind bisher nahezu vollständig unverstanden. So sind neben einigen regulatorischen Kinasen auch eine Vielzahl von „Helferproteinen“ charakterisiert worden. Bei den wenigsten ist ihre Funktion bekannt. Es ist ebenso unklar, ob eine Hierarchie zwischen den akzessorischen Molekülen existiert, ob das eine das andere verdrängen kann, oder zu welchem Zeitpunkt sie genau in den Prozess der Vesikelknospung eingreifen. Die bisher vorhandenen Informationen lassen sich nicht zu einem plausiblen Gesamtmodell zusammenfügen. Insgesamt vermitteln die akzessorischen Proteine wohl jedoch eine Vielzahl von zum Teil völlig unterschiedlichen Aufgaben: Während Proteine wie *ARH* oder die β -*Arrestine* nur dazu da sind, ganz bestimmte Frachtmoleküle mit der Endocytosemaschinerie in Verbindung zu bringen (15), koppeln andere zum Beispiel Clathrin direkt (*Hip1R*) (34) oder indirekt (*Intersectin*) (35) mit dem Actin Cytoskelett.

Relativ gut charakterisiert sind die akzessorischen Proteine CALM, Eps15 und Epsin. Eps15 wurde zunächst als Substrat des EGF-Rezeptors beschrieben, bindet fest an AP-2 (36,37) und wurde mit der Anordnung von Clathrin Molekülen während des Einstülpungsprozesses in Verbindung gebracht (38). Epsin kann wie AP-2 Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat binden (39) und weist gewisse strukturelle Ähnlichkeit mit dem bereits beschriebenen CALM (25) auf. Es bindet direkt an Clathrin, AP-2 und Eps15 (40,41). Eine Funktion von Epsin könnte es sein, die Einstülpung der Plasmamembran voranzutreiben (42). In einer neueren Publikation wurde allerdings gezeigt, dass es zusammen mit *Eps15* und *Eps15R* für die Clathrin unabhängige Endocytose von monoubiquitinylierten Frachtmolekülen wie dem EGF-Rezeptor benötigt wird (43).

Da die Vielzahl von unterschiedlichen Bindungen zwischen verschiedenen an der Clathrin vermittelten Endocytose beteiligten Moleküle sehr komplex ist, sind diese in einer Grafik im Anhang schematisch dargestellt (siehe Anhang, Abbildung 7-1). Die Bindung der Moleküle untereinander wird dabei durch eine begrenzte Zahl von charakteristischen Bindungsmotiven vermittelt.

Die weitere Bildung eines Clathrin bedeckten Vesikels verläuft vermutlich wie folgt: Der C-terminale Teil der β -Untereinheit von AP-2, welche eines der „Ohren“ darstellt, besitzt zwei Clathrinbindungsdomänen und rekrutiert Clathrin Triskelia aus dem Cytosol. Es bildet sich

ein größeres hexagonisches Netzwerk an der Plasmamembran ((44,45), eigene Beobachtungen)). Für die Bildung eines vollständig bedeckten Vesikels werden jedoch, sofern man geometrische Voraussetzungen zugrunde legt, auch mindestens zwölf Pentagone benötigt. Es muss also die Möglichkeit geben, diese Netze umzuordnen. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass sowohl Clathrin als auch AP-2 an der Plasmamembran einem permanenten, schnellen ATP-abhängigen Austausch unterliegen (46). Da die einzelnen Clathrin Triskelia miteinander verflochten sind, war zunächst vermutet worden, dass das Gitter nur an den Rändern umgeordnet werden kann. Neuere Untersuchungen der Energetik des Einstülpungsprozesses haben jedoch auch die Möglichkeit einer lokalen Änderung innerhalb der Fläche aufgezeigt (7). Die Proteine, die diesen Vorgang katalysieren und kontrollieren, konnten jedoch noch nicht identifiziert werden. Es wird jedoch vermutet, dass das Protein Auxilin hier eine wichtige Rolle spielen könnte (47).

Die treibende Kraft bei der weiteren Einstülpung der Membran ist wohl das Molekül Clathrin selbst. Ab einem bestimmten Grad der Membraninvagination wird die Krümmung von der BAR-Domäne des Proteins Amphiphysin „erkannt“ (48). Es bindet und rekrutiert die GTPase Dynamin, die schließlich die Abschnürung des Vesikels vermittelt.

1.3.4.3 Abschnürung

Dynamin legt sich in mehreren Schichten ringförmig um den „Hals“ von knospenden Vesikeln. Zur Zeit existieren mehrere Modelle über den Reaktionsmechanismus der Abschnürung (11): Eines besagt, dass Dynamin wie eine klassische GTPase als ein regulatorisches Protein fungiert, welches andere Enzyme rekrutiert oder aktiviert, die dann die Abschnürung des Vesikels katalysieren. Alternativ wurde vorgeschlagen, dass die schichtweise Anlagerung von Dynamin die mechanische Energie bereitstellt, die für die Abschnürung des Vesikels benötigt wird. Dies könnte beispielsweise dadurch erreicht werden, dass sich der Dynaminring einer Schlinge gleich immer weiter zusammenzieht, bis die Verbindung zwischen Vesikel und Plasmamembran abreißt. Experimentelle Untersuchungen haben bisher Daten geliefert, welche beide Thesen unterstützen.

1.3.4.4 Uncoating

Das frisch abgeschnürte Vesikel kann nicht direkt mit seinem Zielkompartiment verschmelzen, sondern muss zunächst in einer *Uncoating* genannten Reaktion seine Hülle aus Clathrin, Adaptoren und akzessorischen Proteinen abstreifen. Die Dissoziation von Clathrin und den Adaptormolekülen sind dabei zwei voneinander unabhängigen Prozesse (49). Die

Abstreifung der Clathrinhülle ist ein energetisch ungünstiger Prozess und erfordert die Spaltung von ATP. Das Hitzeschockprotein *Hsc70*, welches in allen Säugetierzellen hoch expremiert wird, katalysiert diese Reaktion (50). Zusätzlich wird als Cofaktor das Protein *Auxilin* bzw. GAK (*Cyclin G assoziierte Kinase*) oder *Auxilin2* benötigt (51-53). Während *Auxilin* nur in Nervenzellen vorkommt, wird GAK ubiquitär expremiert. Beide Enzyme sind vermutlich schon in den Clathrin bedeckten Vesikeln vorhanden und bringen das *Hsc70* in eine für die Katalyse günstige Position. Des Weiteren induziert *Auxilin* im Bereich der terminalen Domäne Clathrins eine Konformationsänderung, was den Käfig an dieser Stelle destabilisiert (54) und somit das *Uncoating* erleichtert.

Während für die Dissoziation des Clathringerüsts pro schwere Kette ein Molekül *Hsc70* gebraucht wird, reichen von *Auxilin* bzw. GAK katalytische Konzentrationen aus.

GAK und *Auxilin* sind homologe Proteine, beide zeichnen sich durch eine N-terminal gelegene PTEN Domäne, Clathrin Bindungsdomänen und die J-Domäne aus. Das nahe dem C-Terminus gelegene HPDK Motiv der J-Domäne ist die zentrale Bindungsstelle für *Hsc70* (53). Im Gegensatz zu *Auxilin* enthält GAK zusätzlich noch eine Kinasedomäne, welche die μ -Untereinheiten von AP-1 und AP-2 phosphorylieren kann (51).

Obwohl GAK und *Auxilin* in hohen Konzentrationen *in vitro* die Zusammenlagerung von Clathrin bedeckten Vesikeln induzieren können (53), ist ihre hauptsächliche Funktion *in vivo* vermutlich die Co-Chaperon Aktivität während der *Uncoating*-Reaktion (51-53).

Eine Ausschaltung von *Auxilin* in *C. elegans* mittels RNAi führte zu reduzierter Endocytose und einer generellen intrazellulären Immobilisierung von Clathrin (47), hervorgerufen durch eine Anhäufung von Clathrin bedeckten Vesikeln im Cytosol.

1.3.5 Bildung von Clathrin bedeckten Vesikeln am TGN

Zusätzlich zu seiner Funktion bei der Endocytose spielt Clathrin vor allem noch bei der Bildung von Vesikeln am TGN eine Rolle. Als universeller Adaptor kommt hier statt AP-2 AP-1 zum Zuge. Die hier gebildeten Vesikel ähneln den Clathrin bedeckten der Endocytose in vielerlei Hinsicht. Auch die Prinzipien der Vesikelbildung sollten ähnlich sein, es sind jedoch andere Proteine beteiligt. Interessanterweise kann AP-1 nicht allein an die Plasmamembran binden, sondern benötigt hierfür Cofaktoren (55). Auch ist die Bildung von AP-1-haltigen Vesikeln am TGN von der kleinen GTPase ARF1 abhängig (56). Bekanntestes Frachtmolekül ist der Mannose-6-Phosphat-Rezeptor, über den lysosomale Enzyme aus dem TGN in Richtung ihres Zielkompartiments geschleust werden. Während für die Clathrin vermittelte

Endocytose schon eine Vielzahl von beteiligten Proteinen beschrieben worden ist, sind es für die Vesikelbildung am TGN weit weniger. Im Rahmen der zu beobachtenden Umorientierung der Forschung auf dieses Gebiet ist allerdings zu vermuten, dass die Zahl der bekannten, an diesem Prozess beteiligten Proteine, in den nächsten Jahren stark steigen wird.

1.3.6 Sortierung von Proteinen aus dem Endosom in Multivesikuläre Körperchen

In jüngster Zeit wurde eine ungewöhnliche Clathrin bedeckte Struktur beschrieben, die bei der Sortierung von Proteinen aus dem Endosom in die Multivesikulären Körperchen (kurz: MVBs) eine Rolle spielt. Hier bildet Clathrin keine Vesikel, sondern lediglich eine flache Doppelschicht (57). Möglicherweise besteht die Rolle dieser Clathrin Hülle darin, das Adaptorprotein *Hrs* mitsamt dessen Fracht zu konzentrieren. *Hrs* ist für die Sortierung von ubiquitinylierten Frachtmolekülen in Multivesikuläre Körperchen verantwortlich (58). Es bindet an den *ESCRT-I Komplex* (*Endosomal Sorting Complex Required for Transport*), welcher wiederum an die übrigen *ESCRT* genannten Komplexe bindet. Von diesen vermutet man, dass sie an der Entstehung von multivesikulären Körperchen beteiligt sind. Man nimmt an, dass *Hrs* die Fracht an den *ESCRT-I Komplex* „übergibt“, von wo aus diese dann zwecks Zerstörung in das Lysosom transportiert werden kann (15).

1.4 RNA-Interferenz

Die genaue Funktion der meisten akzessorischen, endocytotischen Proteine bei der Bildung von Transportvesikeln ist unbekannt. Häufig lässt sich jedoch die Aufgabe eines Makromoleküles innerhalb eines komplizierten zellulären Prozesses ableiten, wenn dieses defekt ist oder gar fehlt. War die Herstellung dieser so genannten „*Knockouts*“ bis vor kurzem eine schwierige und langwierige Aufgabe, die nur in wenigen spezialisierten Labors beherrscht wurde, so lassen sich heute mittels RNA Interferenz (RNAi) Mangelphänotypen leicht und schnell erzeugen. Diese Methode hat daher in den letzten Jahren die zellbiologische Forschung verändert wie kaum eine andere zuvor. Da die Ausschaltung von endocytotischen Proteinen mittels RNAi das zentrale Thema dieser Dissertation ist, soll die Methode im folgenden Abschnitt genauer erläutert werden:

Bei RNAi macht sich der Forscher ein uraltes und hochkonserviertes System der Zellen zur Verteidigung gegen Viren und zur post-transkriptionellen Regulierung von zelleigenen Genen zu Nutze. RNAi wurde bisher in fast sämtlichen untersuchten eukaryotischen Spezies vom Pilz bis zum Menschen nachgewiesen und muss sich schon vor der Trennung von Tier- und Pflanzenwelt entwickelt haben (59).

Die ersten Beobachtungen von RNA Interferenz wurden bereits vor mehr als einem Jahrzehnt bei Pflanzen und Pilzen beschrieben (60).

Ende der Neunziger Jahre des letzten Jahrhunderts wurde beobachtet, dass die Injektion von doppelsträngiger RNA (*dsRNA*) in den Nematoden *C. elegans* sehr spezifisch zur Vernichtung komplementärer mRNA führte (61). Einer der verblüffendsten Eigenschaften dieses Prozesses war dabei seine Effizienz: Nur wenige Moleküle doppelsträngiger RNA reichten aus, um für Zellgenerationen die Translation der Ziel-mRNA zu unterbinden. RNAi ist heute am besten in *C. elegans* erforscht. Der Mechanismus läuft nach derzeit gültigem Modell dort wie folgt ab (62)(Abbildung 1-7):

Doppelsträngige RNA unterschiedlicher Länge, auch *Trigger* - RNA genannt, sei es von einem sich vermehrenden Virus oder zelleigenen regulatorischen RNAs, werden von der Endonuclease *Dicer* in kleine Stücke von 21 bis 25 Nukleotiden Länge geschnitten. Das Enzym, welches der RNase III analog ist, arbeitet in einer ATP-abhängigen Reaktion.

Die Produkte *Dicers* werden *siRNAs* (*small interfering RNAs*) genannt. Sie weisen charakteristische Überhänge aus zwei Nukleotiden jeweils am 3`-Ende eines jeden Stranges auf.

Die Fragmente werden in einen *RISC* (*RNA induced silencing complex*) genannten Komplex inkorporiert. In einer ATP-abhängigen Reaktion wird die RNA entwunden und somit der RISC-Komplex aktiviert. Dieser kann jetzt mRNAs mit komplementären Sequenzen erkennen und zerschneiden, wodurch das Protein, für das diese mRNA codiert hat, nicht mehr hergestellt werden kann. Der RISC siRNA Komplex wird recycelt und kann somit viele Ziel-RNAs zerstören. Eine so induzierte Ausschaltung eines Proteins wird auch als „*Knockdown*“ bezeichnet.

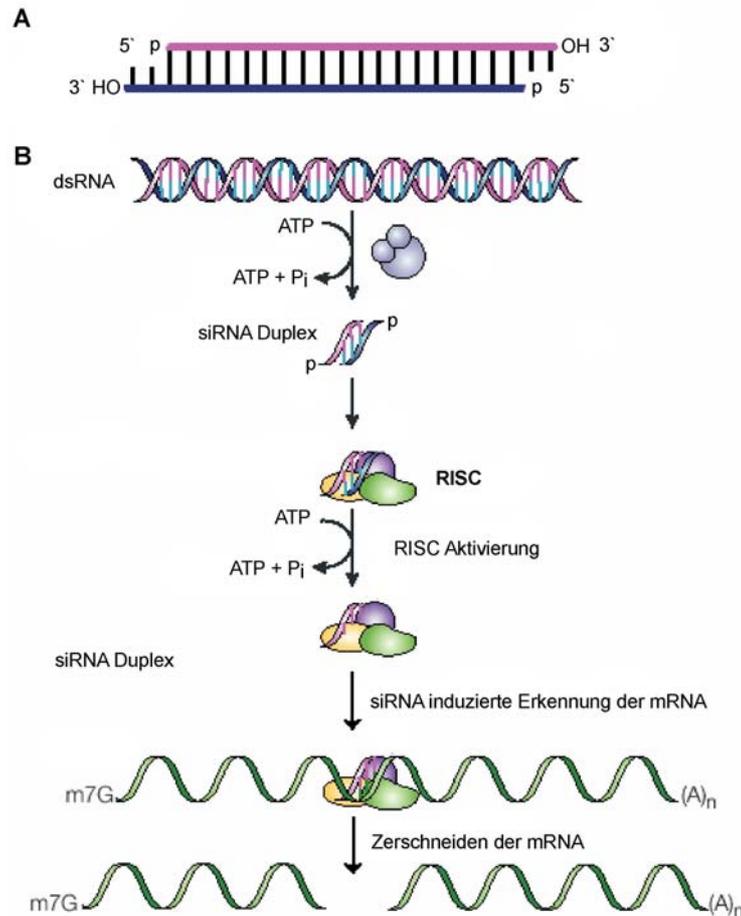


Abbildung 1-7

- A) Schema einer siRNA mit ihren charakteristischen 3' Überhängen
 B) Schema RNAi: RNAi wird durch doppelsträngige RNAs ausgelöst. Die Endonuklease DICER zerschneidet diese in 19-21 Basenpaare lange siRNAs. Diese werden in den RISC Komplex inkorporiert, der nach seiner ATP-abhängigen Aktivierung die Zerstörung erkannter mRNA vermittelt. Zeichnung modifiziert nach (62).

Obwohl sich RNAi in *C. elegans* schnell zum Mittel der Wahl für die Herstellung von Knock-out Phänotypen entwickelt hat und auch in *Drosophila* breit angewendet wurde, war es längere Zeit nicht möglich, RNAi in Säugetierzellen festzustellen oder anzuwenden. Die damals übliche Injektion von doppelsträngiger RNA mit mehr als 30 Nukleotiden Länge löste sequenzunspezifisch die so genannte *Interferon* Antwort aus (63), eine antivirale Schutzmaßnahme der Zellen. Interferon löst die Zerstörung sämtlicher mRNA über die Aktivierung der 2' 5' *Oligoadenylat Synthase* aus, welche wiederum *RNase L* aktiviert. Die gesamte Proteinproduktion der Zelle kommt zum Erliegen, die Zelle stirbt schließlich.

Der Durchbruch gelang 2002, als gezeigt werden konnte, dass RNAi in Säugetierzellen aktiv ist. Durch Transfektion von synthetischen RNA Oligomeren von 19 bis 21 Basenpaaren Länge, welche den von Dicer produzierten Fragmenten entsprechen, ließ sich die Menge der ausgewählten Proteine innerhalb der Zellen um bis zu 95% reduzieren (63). Die siRNAs

wirkten dabei schon in nanomolaren Konzentrationen – ganz im Gegensatz zu Ansätzen mit Antisense RNA, wo wesentlich höhere Konzentrationen benötigt werden (64). Der Effekt hält über mehrere Zellteilungen und bis zu zehn Tage an (65). Im Gegensatz zu Pilzen (66), Pflanzen (67) und Nematoden (68), die siRNAs vervielfältigen können, gibt es bisher keine Hinweise darauf, dass dies in Säugerzellen möglich ist. Die Herunterregulierung von Proteinen mittels Transfektion von siRNAs kann in diesem System daher immer nur temporär sein. Um diese Nachteile zu überwinden, und um möglicherweise *stabile* „Knockdown“-Zelllinien zu erhalten, wurden eine Reihe von Vektor basierten Ansätzen entwickelt (z. B. Brummelkamp et al. 2001(69)), durch die haarnadelförmige dsRNAs expremiert werden. Diese werden wiederum durch Dicer in siRNAs überführt (70).

In den knapp vier Jahren seit ihrer Entdeckung und Nutzbarmachung in Säugetieren hat sich RNAi in eine breit angewandte Technik verwandelt und andere Methoden zur Ausschaltung von mRNAs wie Anti-sense RNA oder Ribozym Technologien ins Abseits gedrängt. Dazu beigetragen hat neben der leichten Anwendbarkeit und Zuverlässigkeit auch die geringe Anzahl von unspezifischen Nebeneffekten. Zwar gab es Reporte über solche Nebenwirkungen (71), doch zeigten auf der anderen Seite Untersuchungen mit Proteinarrays, dass RNAi in der Regel äußerst spezifisch wirkt. Nichtsdestotrotz ist bei jeder Untersuchung mit dieser Methode eine Reihe von Kontrollen notwendig, um unspezifische Effekte auszuschließen (64,72).

Hierzu zählen die Anwendung von Kontroll-siRNAs, welche keine Effekte zeigen sollten und Untersuchungen ob die Art der Einschleusung der RNA in die Zellen Nebenwirkungen hat. Auch sollte man verschiedene RNAs, die unterschiedliche Sequenzen innerhalb einer mRNA erkennen, benutzen, um gemachte Beobachtungen zu verifizieren. Die beste aller Kontrollen ist mit Sicherheit die „Rettung des Normalzustandes“ einer Zelle durch Einbringen des durch RNAi ausgeschalteten Proteins. Die könnte theoretisch durch eine mRNA, welche die angegriffene Sequenz nicht aufweist oder durch Mikroinjektion des funktionellen Moleküls erfolgen. In der Praxis lässt sich diese Kontrolle im Gegensatz zu den vorher genannten allerdings nur in den seltensten Fällen realisieren, da der *Mangelphänotyp* bei falscher Dosierung der Reagenzien nur allzu leicht in einen *Überexpressionsphänotyp* umschlägt.

Die Möglichkeit, mit RNAi jedes beliebige Protein ausschalten zu können, hat obendrein die Hoffnung geweckt, nun ein Mittel gegen Virusinfektion oder andere Krankheiten in der Hand zu haben. Erste Versuche haben in der Zellkultur gezeigt, dass RNAi gegen Humanpathogene eingesetzt werden kann (73,74). Die größte Herausforderung besteht jetzt unter anderem darin, die siRNAs in die Zielzellen zu bringen. Bisher ist die Bioverfügbarkeit dieser

Moleküle noch bei Weitem zu gering. Die Kopplung dieser Moleküle an Cholesterin (75) verbesserte die Verfügbarkeit zwar drastisch, sie kann allerdings auch noch nicht als Durchbruch angesehen werden.

Die Zukunft wird zeigen, ob RNAi sich wirklich auf therapeutischem Gebiet behaupten kann, oder ob diese Methode das Schicksal so vieler potentieller Allheilmittel teilen wird.

1.5 Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit war es, die Funktion der Proteine *Clathrin*, *AP-2* und später auch *CALM* und *GAK* mittels RNA Interferenz in HeLaSS6 Zellen auszuschalten und die Auswirkungen auf die Clathrin vermittelte Endocytose zu untersuchen. Dabei sollte ein breites Methodenspektrum von verschiedenen Arten der Mikroskopie bis hin zu funktionellen Analysen zum Tragen kommen. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf die Etablierung einer Methode zur Präparation der Plasmamembran für die Elektronenmikroskopie gelegt.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Alle verwendeten Säuren und Salze, welche in der folgenden Tabelle nicht angegeben wurden, wurden von Riedel-de Haën bezogen. Bei dem verwendeten Wasser handelte es sich, sofern nicht gesondert angegeben, um mit der Filteranlage Milli-Q der Firma Millipore gereinigtes, vollentsalztes Wasser.

Chemikalie	Hersteller
2,2'-Azino-bis(3-Ethylbenzthiazolin-6-Sulfonsäure) (ABTS)	
2,4,6 Tris(dimethyl-aminomethyl)phenol	Serva
2-Dodecenylnsuccinsäureanhydrid	Serva
Aceton für Kritisch Punkt Trocknung, 99,8%	Riedel-de Haën
Aceton, 99,5%	J.T. Baker
Acrylamid	BioRad
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	BioRad
BCA Proteinkonzentrationsbestimmungssystem	Pierce
Bisacrylamid	BioRad
Bleicitrat	Serva
Bleinitrat	Merck
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma
Bromphenolblau	Sigma
Carbanhydrase	Sigma
Dimethylarsinsäure Natriumsalz Trihydrat	Merck
Dinatriumtetraborat	Merck
DMEM (<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>) (Medium)	Invitrogen
ECL (<i>Enhanced Chemoluminescence Reagent</i>)	Amersham
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)	Sigma
EGF (Epidermis-Wachstumsfaktor), (Tetramethylrhodamin markiert)	Molecular Probes
EGF, I-125 markiert	Perkin Elmer
Eialbumin	Sigma

Chemikalie	Hersteller
Entellan	Merck
Entwickler D19	Kodak
Entwickler Roentoroll 25	Tetenal
Ethanol	Merck
Farbstoff <i>Coomassie Brilliant Blue R250</i>	Serva
Fixierer <i>Copex</i>	Agfa
Fixierer <i>Superfix 25</i>	Tetenal
Flusssäure	Merck
Formvar	Plano
fötale Kälberserum <i>FKS Gold</i>	PAA
Glutaraldehyd	Sigma
Glycerin	Sigma
Glycid Ether <i>100</i>	Serva
Hepes (N-[2-Hydroxyethyl]piperazino-N`-[2-ethansulfonsäure])	Sigma
Hoechst 33342	Hoechst
Kohlestifte	Plano
Leibovitz`s L15 Zellkulturmedium	Invitrogen
Lipofectamine2000	Invitrogen
Meerrettichperoxidase	Sigma
Methylnadicanhydrid	Serva
Milchpulver	Uelzena
Molekularsieb 2,5 Å	Roth
Natriumazid	Merck
Natriumcitrat	Sigma
Natriumpyruvat-Lösung (100mM)	Sigma
NEN (<i>Renaissance Western-Blot Chemoluminescence Reagent Plus</i>)	NEN
NeutrAvidin® (zur Detektion von Biotin) gekoppelt mit Meerrettichperoxidase)	Molecular Probes
Oligofectamine	Invitrogen
OptiMEM (reduziertes Medium mit wenig Serum)	Invitrogen
Osmiumtetroxid	Polyscience
Ovalbumin	Sigma

Chemikalie	Hersteller
Paraformaldehyd	Fluka
Pen/Strep (Penicillin/Streptomycin-Mischung)	Invitrogen
Phalloidin (Rhodamin markiert)	Molecular Probes
Phosphorylase B	Sigma
Poly-L-Lysin, #1274	Sigma
Ponceau S	Chroma Gesellschaft
<i>Prolong Antifade Kit</i>	Molecular Probes
Propylenoxid	Fluka
Proteaseinhibitorcocktail <i>Complete MINI</i>	Roche Diagnostics
Protein-A-Gold (10 nm Partikeldurchmesser)	Universität Utrecht; Posthuma Slot
SDS (Natrium-Dodecyl-Sulfat)	BioRad
Sojabohnen Trypsininhibitor	Sigma
TEMED (Tetramethylethylendiamin)	BioRad
Toluidinblau	Merck
Transfektionsreagenz Lipofectamine2000	Invitrogen
Transfektionsreagenz Oligofectamine	Invitrogen
Transferrin (Biotin markiert)	Molecular Probes
Transferrin (Texas-Rot markiert)	Molecular Probes
Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminoethan)	Sigma
Triton X-100 (t-Octylphenoxypoly-etoxyethanol)	Sigma
Trypanblau	Sigma
Trypsin-EDTA Mischung (<i>Trypsin-EDTA</i>)	Invitrogen
TUNEL – Apoptosetestsystem (<i>TUNEL in situ cell death detection kit</i>)	Boehringer Mannheim
Tween (Polyoxyethylensorbitenmonolaurat)	Sigma
Uranylacetat - Dihydrat	Merck
β -Galaktosidase	Sigma
β -Mercaptoethanol	Merck

2.1.2 Puffer und Lösungen

Lösung	Zusammensetzung
Stripping - Puffer	62,5 mM Tris-HCL 100 mM β -Mercaptoethanol 2% (w/v) SDS pH 6,7
Bleicitratlösung nach Reynolds	30 ml Wasser 1,33 g Bleinitrat 1,76 g Natriumcitrat * 2 H ₂ O in einen 50 ml Kolben geben und einige Minuten rühren lassen. 8 ml 1 M NaOH hinzufügen und ad 50 ml mit Wasser auffüllen. Neu ansetzen, sobald ein weißer Niederschlag entsteht.
Blockierlösung	Blockierlösung: 8 % Milchpulver 0,1 % Tween in PBS gelöst
Cacodylat – Puffer	Dimethylarsinsäure 0,1M ph 7,3
Coomassie Brilliant Blue Färbelösung	2g Coomassie Brilliant Blue 500 mL 95 % Ethanol, 5 Minuten rühren, 100 mL Eisessig hinzugeben auf 1 L mit Wasser auffüllen, 2 h rühren, durch Faltenfilter filtrieren
Elektroporationslösung I	2 g ATP Dinatriumsalz 1,2 mg MgCl ₂ *6 H ₂ O 10 mL Wasser (durch Filtern sterilisieren, in 80 μ L Aliquots aufbewahren)
Elektroporationslösung II	6 g KH ₂ PO ₄ 0,6 g NaHCO ₃ 0,2 g Glucose 300 mL Wasser (auf pH 7,4 mit NaOH bringen, Endvolumen 500 mL, durch Filtern sterilisieren, in 4 mL Aliquots aufbewahren)
Epoxidharz	291,9 g Glycidether 126,6 g DDSA 165,8 g MNA mischen, zum Aushärten die 0,015fache Menge 2,4,6 Tris(dimethylaminomethyl)phenol hinzugeben
Golgebindingspuffer (Puffer G)	25 mM HEPES 125 mM Kaliumacetat 5 mM Magnesiumacetat pH 7,1
Laufpuffer	0,1 % SDS 370 mM Glycin 50 mM Tris

Lösung	Zusammensetzung
Molekulargewichtsstandard	β-Galaktosidase (116 kDa) Phosphorylase b (97 kDa) BSA (66 kDa) Ovalbumin (45 kDa) Carbanhydrase (29 kDa) je 5 mg/mL in Vierfach Probenpuffer
PBS (<i>phosphate buffered saline</i>)	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 1,9 mM KH ₂ PO ₄ 8,2 mM NaHPO ₄ pH 7,3
Ponceau S-Färbelösung	0,041 % Ponceau 6,7 % Methanol 2 % Essigsäure
Puffer W (Lysispuffer für Zellfraktionierung)	100 mM Natriumphosphatpuffer 50 mM NaCl 1 mM MgCl ₂ 1 mM EGTA Complete MINI Protease Inhibitor Cocktail pH 7,4
Sammelgel	1 g Glycerin 7,5 ml 0,5M Tris 5 ml Acrylamidlösung (30 % Acrylamid und 8 % Bisacrylamid in H ₂ O) 0,3 ml 10 % SDS 50 µl Bromphenolblau mit H ₂ O auf 30 ml auffüllen 30 µl TEMED 300 µl 10 % APS pH 6,8
SDS-Lysispuffer	100 µL 10% SDS in Wasser, 250 µL Vierfach-Probenpuffer, 650 µL Wasser
SDS-PAGE-Laufpuffer	0,1 % SDS 370 mM Glycin 50 mM Tris
Substratlösung Meerrettichperoxidaseaufnahme Test	für 1mg/mL ABTS in 0,1 M Zitratpuffer pH 5,0 (Zitronensäure, pH mit NaOH einstellen) + 0,025% H ₂ O ₂ (30%ige Lösung 1 :2000 verdünnt)
TBS (<i>tris buffered saline</i>)	20 mM Tris (2,42 g) 140 mM NaCl (8,18 g) auf 1 L auffüllen pH 7,6
Transferpuffer (halbtrockenes Verfahren)	50 mM Tris 39 mM Glycin 0,037 % (m/V) SDS 20 % (V/V) Methanol

Lösung	Zusammensetzung
Transferpuffer (nasses Verfahren)	48 mM Tris 380 mM Glycin 0,1% (m/V) SDS 10% (V/V) Methanol
Trenngel: 19%ige Acrylamidlösung	4 g Glycerin 7,5 ml 1,5M Tris 19 ml Acrylamidlösung (30 % Acrylamid und 6 % Bisacrylamid in H ₂ O) 0,3 ml 10 % SDS 17 µl TEMED 113 µl 10 % APS pH 8,8
Trenngel: 9%ige Acrylamidlösung	2 g Glycerin 7,5 ml 1,5M Tris 9 ml Acrylamidlösung (30 % Acrylamid und 3 % Bisacrylamid in H ₂ O) 0,3 ml 10 % SDS mit H ₂ O auf 30 ml auffüllen 17 µl TEMED 113 µl 10% APS pH 8,8
Vierfach-Probenpuffer (4 x PP)	2 mM EDTA 10 % Mercaptoethanol 10 % SDS 50 % Glycerin 100 mM Tris angefärbt mit Bromphenolblau; pH 8,0
Zellkulturmedium	0,5 L DMEM (im folgenden auch nur als „Medium bezeichnet“) 10% fötales Kälberserum 1% Penicillin/Streptomycin-Mix 1mM Natriumpyruvat

2.1.3 siRNAs

Die doppelsträngige RNA wurde von Dharmacon als 20 μ M Lösung bezogen. Alle Sequenzen wurden so ausgewählt, dass sich keine aktiven Überschneidungen mit denen anderer humaner mRNAs ergaben. Die Auswahl erfolgte von J. Harborth nach den Kriterien aus dem siRNA User Guide (65).

Zielprotein	Sequenz	Interne Bezeichnung	Referenz
Clathrin (HC)	AACCUGCGGUCUGGAGUCAAC	Clathrin Oligo I	Hinrichsen et al. (2003) (76)
Clathrin (HC)	AAUGGAUCUCUUUGAAUACGG	Clathrin Oligo II	Hinrichsen et al. (2003) (76)
α -Adaptin	AAGCAUGUGCACGCUGGCCAG	α -Adaptin Oligo I	Hinrichsen et al. (2003); (76)
α -Adaptin	AAGGUGUGGUACCGAGUCA	α -Adaptin Oligo II	Hinrichsen et al. (2003); (76)
CALM	AAUGGGGUAAUAAAUGCUGCC	CALM Oligo I	
CALM	AAGAAUUGGAACCAUAAGAA	CALM Oligo III	Huang et al. (2004); (77)
LCa	AAGUAAUGGUCCAACAGACAG	LCa	
LCb	AAGGUGGCCAGCUAUGUGAC	LCb	
GAK	AAAGGGCAGCUGGUGAAUUU	GAK I	
GAK	AAGGUUGAGAACUUGUUGCUU	GAK II oder GAK PNAS	Zhang L. et al. (2004) ; (78)
γ -Adaptin	AAGCCCAGACAUGCUUGCGCA	γ -Adaptin	
GFP	GGTACGTCCAGGAGCGCACC	GFP	Novina C. D. (2002); (79)
Luciferase	AACGTTACCGCGGAATACTTCGA	Luciferase	Elbashir et al. (2002); (63)

Die RNAs wurden so synthetisiert, dass beide Stränge aus 19 Basen bestanden und der fertige Duplex einen dTdT Überhang am 3` Ende von Sinn- und Gegensinnstrang aufwies. Das AA am Anfang der angegebenen Sequenz wird im Sinnstrang nicht synthetisiert. Es handelt sich hierbei um eine „traditionelle“ Nomenklatur der Forscher aus dem siRNA Feld. Der dTdT Überhang am 3`-Ende der Oligomere wird von der Firma Dharmacon und den meisten anderen Herstellern standardmäßig synthetisiert, da vermutet wird, dass dieser die RNAs nukleaseresistenter macht (64).

Ist die Sequenz also als AAGGUUGAGAACUUGUUGCUU angegeben, so sah der fertige siRNA Duplex wie folgt aus:

```

GGUUGAGAACUUGUUGCUUdTdT
dTdTCCAACUCUUGAACAACGAA

```

Der Vektor *pSuper*, welcher das oben angegebene γ -Adaptin Oligomer als haarnadelförmige RNA expremierte (80), wurde von A. Ungewickell zur Verfügung gestellt.

Die siRNA Experimente gegen γ -Adaptin wurden im Rahmen dieser Arbeit nur durchgeführt, um vektorbasierte Ansätze und die Transfektion synthetischer siRNA miteinander zu vergleichen.

2.1.4 DNA – Konstrukte

Es wurden folgende DNA – Konstrukte verwendet:

pEYFP- β 2-Adaptin (81) wurde freundlicherweise von A. Sorkin zur Verfügung gestellt.

pEGFP-LCa (46) wurde von L. Greene bezogen.

2.1.5 Antikörper

2.1.5.1 Primärantikörper

Antikörper	Antigen	Quelle
1C2 (Maus)	GAK	Medical & Biological Laboratories; Katalognummer : M057-3
20D6 (Maus)	γ -Adaptin	E. Ungewickell; (82)
Anti AP-2 (Maus)	α -Adaptin	Santa Cruz Biotechnology; Katalognummer: sc-17771
Anti AP50 (Maus)	μ 2-Adaptin	Transduction Laboratories; Katalognummer: 611350
Anti-M6P (Kaninchen)	Kationen unabhängiger Mannose-6-Phosphat Rezeptor	B. Hoflack; (83)
Anti-CALM (Kaninchen)	H ₂ N-CRPPNPFPGVPGAAQIQ FM-COOH	E. Ungewickell; (76)
Anti-CALM (Ziege)	CALM	Santa Cruz Biotechnology; Katalognummer: sc-6433
Anti-Dynamin II (Maus)	Dynamin II	Transduction Laboratories; Katalognummer: 610264
Anti-EEA1 (Maus)	EEA1	BD-Biosciences; Katalognummer: 610456
Anti-EEA1 (Kaninchen)	EEA1	Z. Zerial; (84)
Anti-Eps15 (Kaninchen)	H ₂ N-CQEDLELAIALSKSEISEA-COOH	E. Ungewickell; (85)
Anti-Eps15 (Maus)	Eps15	Transduction Laboratories; Katalognummer: 610806
Anti-Epsin (Kaninchen)	H ₂ N-CEERIRRGDDLRLQMA-COOH	E. Ungewickell; (25)
Anti-Epsin (Kaninchen)	Rattenepsin 1 Reste 229-575 konjugiert mit GST	L. M. Traub; (41)
Anti-Hrs (Kaninchen)	Hrs	H. Stenmark; (86)

Antikörper	Antigen	Quelle
Anti- β -Adaptin(100/1) (Maus)	β 1/2-Adaptin	E. Ungewickell; (82)
AP.6 (Maus)	AP2 (α -Adaptin)	F. M. Brodsky; (87)
M30 Cytodeath (Maus)	Caspase Produkt von Cytokeratin 18	Roche Diagnostics; (88); Katalognummer: 2156857
R442-6 (Kaninchen)	Actin	E. Ungewickell; (76)
R460 (Kaninchen)	Clathrin leichte Kette	E. Ungewickell; (76)
R461 (Kaninchen)	Clathrin leichte Kette	Ungewickell E.; (82)
X22 (Maus)	Clathrin schwere Kette	F. M. Brodsky; (87)
Anti-CHC (Maus)	Clathrin schwere Kette	Transduction Laboratories; Katalognummer: A59420

Alle Primärantikörper wurden für Immunfluoreszenz und Western-Blot in einer Lösung aus 3% BSA in PBS, welche mit mit 0,02% Natriumazid konserviert worden war, verdünnt.

2.1.5.2 Sekundärantikörper

Antikörper	Antigen	Quelle
FITC konjugiertes Ziegen IgG	Maus IgG	Dianova
FITC konjugiertes Ziegen IgG	Kaninchen IgG	Dianova
Gold konjugiertes Ziegen IgG	Maus IgG	Biocell
Meerrettichperoxidase konjugiertes Ziegen IgG	Maus IgG	MP Biomedicals
Meerrettichperoxidase konjugiertes Ziegen IgG	Kaninchen IgG	MP Biomedicals
Meerrettichperoxidase konjugiertes Kaninchen IgG	Ziege IgG	MP Biomedicals
Rhodamin konjugiertes Ziegen IgG	Kaninchen IgG	Dianova
Rhodamin konjugiertes Ziegen IgG	Maus IgG	Dianova

Die Sekundärantikörper wurden für die Immunfluoreszenz wie die Primärantikörper verdünnt, für Western-Blots in Blockierlösung.

2.1.6 Zelllinien

Die HeLaSS6 Zellen, ein Subklon der Linie HeLaS3 , waren eine freundliche Gabe von C. Weber, Göttingen. Es handelt sich bei dieser Zelllinie um ein humanes Adenokarzinom *Cervix uteri*. Die Zellen weisen daher teilweise epitheliale Eigenschaften auf.

NIH/3T3 Zellen wurden von J. Wehland, Braunschweig zur Verfügung gestellt. Es handelt sich hierbei um eine Fibroblastenzelllinie aus Mäuseembryonen. Sie wurde zuerst 1963 von Todaro und Green beschrieben (89).

2.1.7 Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Autoklav	Varioklav	H+P Labortechnik
Bedampfungsanlage BA 360 M	BA 360 M	Baltec
Blotapparatur (halbtrocken)		Forschungswerkstätten, MH-Hannover
Blotapparatur (nass)	TE 22	Hoefer
Brutschrank	Hera Cell	Heraeus
CCD Kamera	MicroMax	Princeton Instruments; Roper Scientific
Elektronenmikroskop	EM - 10 C	Carl Zeiss
Elektronenmikroskop	EM 301	Philips
Elektronenmikroskop	EM 902	Carl Zeiss
Entwicklermaschine	Optimax TR	MS Laborgeräte
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200	Axiovert 200	Zeiss
Fluoreszenzmikroskop Eclipse E800	Eclipse E800	Nikon
Fotokassetten	Suprema	Dr. Goos
Fotometer	DU 640	Beckman
Gefrierbruchanlage	BAF 400c	Baltec
Gelkammern für SDS-PAGE	Mighty Small II	Hoefer
Heizblock	Dri-Block DB-2A	Techne
Inkubationskammer für die Beobachtung von lebenden Zellen	POC Mini	Carl Zeiss
Konfokales Laserscanmikroskop	LSM-5 Meta	Carl Zeiss
Kreislaufkühlgerät	F12	Julabo
Kritische Punkt Trocknungsanlage	CPD 30	Balzers
Kühlzentrifuge	5410	Eppendorf

Gerät	Modell	Hersteller
Lichtmikroskop	Labovert	Leitz
Mikrotiterplattenlesegerät	Odyssey	Li-Cor Biosciences
Netzgerät	PowerPac 300 oder 1000	BioRad
Nucleofector		Amaxa
pH-Meter	MultiCal	WTW
Reinstwasseranlage	MilliQ	Millipore
Saugapparatur	Vacu Safe	Integra Bioscience
Standzentrifuge	Variofuge 3.0 R	Heraeus
Tischzentrifuge	5417 R	Eppendorf
Trockenschrank	T 6200 oder B 5050	Heraeus
Ultramikrotom	Ultratom III	LKB
Ultraschallgerät	Sonifier 250, Typ T2.OA	Branson, Heinemann
Ultrazentrifuge	Optima TL100	Beckman
Vakuumpumpe	Laboport	KNF Neuberger
Vorblitz	Sensitize	Amersham Pharmacia (GE Biotech)
Wasserbad	WB 29	Memmert
Wippinkubator	Duomax 1030	Heidolph
Zählkammer	Thoma	Brandt
γ – Strahlungszähler	BF 2111	Berthold

2.1.8 Verbrauchsmaterialien

Material	Modell	Hersteller
Blot-Papier	3 mm Chr	Whatman
Blot-Membran	Protran	Schleicher & Schuell
Deckgläser	12 mm, 30 mm Durchmesser	Menzel – Gläser
ECL – Filme	Hyperfilm - ECL	Amersham Pharmacia
Filme für die Elektronenmikroskopie	4489	Kodak
Filterpapier	695	Schleicher & Schuell
Kupfernetze für Elektronenmikroskopie	3,05 mm 200 Maschen	SCI
Kupferschlitznetz für Elektronenmikroskopie	3,05 mm 1 x 2 mm Schlitz	SCI
Objektträger		Menzel – Gläser
Parafilm		National Can
Pasteurpipetten		Brandt
Petrischalen	Nunclon Surface	Nalge Nunc

Material	Modell	Hersteller
Pipettenspitzen	Plastibrand	Brandt
Reaktionsgefäße 1,5 mL		Sarstedt
Reaktionsgefäße 1,5 mL	Safelock	Eppendorf
Reaktionsgefäße 15 / 50 mL	Cellstar	Greiner Bio – One
sterile Pipetten 5 / 10 / 25 mL	Cellstar	Greiner Bio – One
Ultrazentrifugenröhrchen 1,5 mL	Microfuge Polyallomer	Beckman
Zellkulturplatten	Nunclon Surface	Nalge Nunc

2.1.9 verwendete Software

Programm	Hersteller
Excel 2002	Microsoft
IP-Lab 3.2	Scanalytics
Word 2002	Microsoft
Photoshop 7.0	Adobe
Illustrator 8.0	Adobe
LSM 510-Meta Software 3.2	Carl Zeiss
Axiovision 4.2	Carl Zeiss
NIH-Image 6.2	National Institutes of Health

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Die humane Adenokarzinomzelllinie HeLaSS6 wurde in *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM), dem 10% fötales Kälberserum, 1% Natriumpyruvat und 1% einer Mischung aus Penicillin und Streptomycin (*Pen/Strep*: 10000 Units Penicillin Natriumsalz; 10 mg/mL Streptomycinsulfat) zugesetzt worden waren, (Vollmedium) bei 37°C und 5% CO₂ gezüchtet. Um permanent ein exponentielles Wachstum der Zellen zu gewährleisten, wurden diese alle zwei bis drei Tage bei einer Konfluenz von etwa 80% passagiert. Die Zelldichte wurde dabei auf ein Viertel reduziert. Dazu wurden die Zellen zunächst von altem Medium befreit und mit sterilem PBS gewaschen. Durch eine dreiminütige Inkubation mit *Trypsin-EDTA* wurden die Zellen vom Boden des Kulturgefäßes gelöst und anschließend mit warmem Vollmedium resuspendiert. Ein Teil wurde dann in einer Kulturschale mit gleicher Nährlösung ausgesät.

Die NIH/3T3 Zellen wurden auf die gleiche Weise kultiviert und passagiert.

2.2.2 Transfektion

2.2.2.1 Allgemeines

Das experimentelle Einbringen von fremdem Erbgut in kultivierte Zellen wird als Transfektion bezeichnet. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode zumeist dazu benutzt, siRNA in Zellen zu übertragen und damit gezielt bestimmte Proteine herunterzuregulieren. Transfektionen wurden auch benutzt, um Vektoren, welche kleine haarnadelförmige RNAs (pSuper) oder GFP-Fusionsproteine exprimieren, in die Zielzellen zu bringen. Testweise wurde auch eine Elektroporationsmethode (Nucleofector) für die Transfektion von RNAs verwendet.

Die Transfektion von siRNAs für RNAi Experimente erfolgte standardmäßig mit den Reagenzien Oligofectamine oder später Lipofectamine2000, welche aus einer Mischung von kationischen Lipiden bestehen. Die positiv geladenen Gruppen dieser Moleküle interagieren dabei spontan mit dem negativ geladenen Rückgrad der RNA oder DNA, so dass sich eine hydrophobe Hülle um die Nukleinsäuren bildet. Diese Vesikel können leicht mit der Zellmembran verschmelzen, wonach die Fracht ins Cytosol abgegeben oder endocytiert wird (90). Der genaue Ablauf dieses Prozesses ist jedoch unklar.

Bei jeder Transfektion wurde neben dem eigentlichen RNAi-Ansatz auch jeweils ein Kontrollansatz pipettiert. Als Kontrollreagenzien wurden zunächst Kontroll-RNAs wie die Anti-GFP-siRNA oder die Anti-Luciferase-siRNA benutzt. Ebenso wurden als Kontrollen Ansätze pipettiert, welche nur Transfektionsreagenz enthielten.

2.2.2.2 Transfektionen mit kationischen Lipidreagenzien

HeLaSS6 oder NIH3T3 Zellen, die in einer zehn Milliliter Petrischale bis zu einer Konfluenz von 70 – 80% gewachsen waren, wurden 24 Stunden vor der Transfektion mit PBS gewaschen und anschließend durch eine 2 – 3minütige Inkubation bei 37 °C mit 1 mL Trypsin-EDTA vom Schalenboden abgelöst. Anschließend wurde gründlich mit einer Pipette resuspendiert. Die Zellen wurden gezählt und in einer Dichte von 0,18 bis $0,5 \cdot 10^5$ pro 500 μL Medium in einer 24-Brunnen Zellkulturplatte ausgesät. Sollte der Ansatz später durch Immunfluoreszenz untersucht werden, so waren diese vorher mit sterilen Deckgläschen versehen worden.

Für Transfektionen in größeren Ansätzen wurden Zellzahl und Mediumvolumen entsprechend der größeren Kulturfläche angepasst. Bei Benutzung von 6-Brunnen Platten wurde somit zum Beispiel bei 5-fach größerer Kulturfläche die 5-fache Menge an Zellen und Medium pro Brunnen pipettiert.

Die Zellen wurden nach Aussaat und gründlichem Mischen für 24 Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Transfektion von siRNAs mit Oligofectamine

Für jeden Ansatz in einer 24-Brunnen Platte wurden zunächst 3 μL 20 μM (0,84 μg ; 60 pmol) dsRNA mit 50 μL OptiMEM, einem serumfreiem Medium gemischt (*Premix I*). Die Kontrollzellen wurden anstatt mit zum Zielprotein komplementärer dsRNA entweder mit Luciferase dsRNA, GFP dsRNA, Lipofectamine2000 oder nur OptiMEM transfiziert. In einem zweiten Gefäß mischte man anschließend 1 μL Transfektionsreagenz mit 50 μL OptiMEM (*Premix II*). Dieser Ansatz wurde 5 Minuten bei Raumtemperatur (RT) inkubiert, anschließend mit der ersten Mischung vereinigt und gründlich mit einer Pipette vermischt. Vortexen war nicht empfehlenswert. Das Gemisch wurde nun 15 Minuten bei RT inkubiert. Während dieser Zeit wurden HeLaSS6 Zellen mit DMEM + 10% FKS gewaschen und mit 532 μL derselben Lösung versetzt. Für die Transfektion von NIH/3T3 Fibroblasten wurden

die Zellen mit identischen Volumina von DMEM, dem ein Gemisch von nicht essentiellen Aminosäuren der Firma Invitrogen zugegeben worden war, gewaschen und inkubiert.

Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden pro Ansatz je 68 μL Transfektionsgemisch auf die Zellen gegeben, so dass sich ein Gesamtvolumen von 600 μL pro Brunnen ergab. Durch ruckartiges Hin- und Herbewegen der Zellkulturplatte für ca. 30 s wurde gründlich gemischt.

Die Zellen wurden für mindestens 4 Stunden im Brutschrank inkubiert. Nach dieser Zeit war die Transfektion abgeschlossen, das Medium konnte daher bei Bedarf ohne Bedenken gewechselt werden.

Für Transfektionen in größeren Kulturgefäßen wurden die Ansätze entsprechend der gestiegenen Kulturfläche vergrößert.

Die Auswertung der Transfektionen erfolgte nach den jeweils angegebenen Inkubationszeiten. Dies waren in der Regel 48 oder 72 Stunden.

Da Oligofectamine zum Teil drastischen Qualitätsschwankungen unterlag, die zum Teil dazu führten, dass keinerlei Transfektion erfolgte, wurde später zumeist Lipofectamine2000 verwendet. Dieses Reagenz erwies sich langfristig als zuverlässiger und auch preisgünstiger. Unterschiede in Zellgesundheit und Reaktion auf RNAi Experimente wurden zwischen beiden Reagenzien nicht beobachtet.

Transfektion von siRNAs oder DNA mit Lipofectamine2000

Die Transfektion mit Lipofectamine2000 verlief für RNAi Experimente und Experimente mit DNA Vektoren identisch. Mit diesem Reagenz wurden während dieser Arbeit nur HeLaSS6 Zellen transfiziert.

Für jeden Ansatz in einer 24-Brunnen Platte wurden zunächst 3 μL 20 μM (0,84 μg ; 60 pmol) dsRNA oder 0,5 μg DNA Vektor mit 50 μL OptiMEM, einem serumfreiem Medium gemischt („Premix I“). Die Kontrollzellen wurden anstatt mit zum Zielprotein komplementärer dsRNA entweder mit Luciferase dsRNA, GFP dsRNA, Oligofectamine oder nur OptiMEM transfiziert. In einem zweiten Gefäß mischte man anschließend 1 μL Transfektionsreagenz mit 50 μL OptiMEM („Premix II“). Dieser Ansatz wurde 5 Minuten bei Raumtemperatur (RT) inkubiert, anschließend mit der ersten Mischung vereinigt und gründlich mit einer Pipette vermischt. Vortexen war nicht empfehlenswert. Das Gemisch wurde nun 20 Minuten bei RT inkubiert. Während dieser Zeit wurden HeLaSS6 Zellen mit DMEM + 10% FKS gewaschen und mit 500 μL desselben Mediums versetzt. (Bei Transfektionen von DNA war zunächst statt Medium mit FKS Medium mit einem Zusatz aus einem Gemisch von

nichtessentiellen Aminosäuren (Invitrogen) verwendet worden. Die Verwendung von Serum bei der Transfektion verbesserte jedoch die Zellgesundheit und schadete der Transfektionseffizienz in HeLa Zellen nicht.)

Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden pro Ansatz je 100 µL Transfektionsgemisch auf die Zellen gegeben, so dass sich ein Gesamtvolumen von 600 µL pro Brunnen ergab. Durch ruckartiges Hin- und Herbewegen der Zellkulturplatte für ca. 30 s wurde gründlich gemischt. Die Zellen wurden für mindestens 4 Stunden im Brutschrank inkubiert. Nach dieser Zeit war die Transfektion abgeschlossen, das Medium konnte daher bei Bedarf ohne Bedenken gewechselt werden.

Für Transfektionen in größeren Kulturgefäßen wurden die Ansätze entsprechend der gestiegenen Kulturfläche vergrößert.

Die Auswertung der Transfektionen erfolgte nach den jeweils angegebenen Inkubationszeiten. Dies waren in der Regel 48 oder 72 Stunden.

2.2.2.3 Transfektion durch Elektroporation

Zunächst wurden die Lösungen vorbereitet, in der die Zellen elektroporiert werden sollten. Hierzu mischte man 80 µL Elektroporationslösung I und 4 mL Elektroporationslösung II. Man pipettierte nun 5 µg der zu transfizierenden Nukleinsäuren in ein steriles Eppendorfreaktionsgefäß. Anschließend trypsinisierte man $2 \cdot 10^6$ HeLa Zellen und zentrifugierte sie bei 800 g für 5 min. Alles über dem Zellpellet stehende Medium wurde sorgfältig abgenommen und die Zellen in 100 µl des Gemisches aus Lösung I und II aufgenommen. Sofort überführte man nun die Zellen in das Reaktionsgefäß mit den Nukleinsäuren, mischte und transferierte die Mischung in die Elektroporationsküvette. Die Zellen wurden unter Verwendung von Programm A-023 im Nucleofector von Amaxa elektroporiert. Die Zellen wurden nun so schnell wie möglich aus der Küvette entfernt und ausplattiert, da die Anzahl von toten Zellen direkt mit der Verweildauer in der Elektroporationslösung anstieg. Für mikroskopische Untersuchungen erwies sich ein Volumen von 120 µL der Zellsuspension pro Brunnen einer 24-Brunnen Platte als optimal.

2.2.3 Fluoreszenzmikroskopie

2.2.3.1 Standard-Immunfluoreszenz

Auf Deckgläschen in 24-Brunnen Zellkulturplatten gewachsene Zellen wurden zunächst dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden diese für 10 Minuten mit einer Lösung von 4% Formaldehyd in PBS bei RT fixiert. Danach wurde dreimal mit PBS gewaschen. Es folgte eine Inkubation mit TBS für 5 Minuten bei RT, um das restliche Formaldehyd zu neutralisieren. Die Zellen wurden nun durch eine 5minütige Inkubation mit einer Lösung aus 0,1% Triton X-100 in TBS permeabilisiert. Anschließend wurde gründlich mit PBS gewaschen (drei- bis vierfach). Es folgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper. Dazu wurde ein 20 µL Tropfen der gewünschten Antikörperverdünnung in PBS mit 3% BSA auf eine mit Parafilm ausgelegte Schale aufgebracht. (Die Antikörperkonzentrationen waren vor den eigentlichen Experimenten so ausstitriert worden, dass mit einer Reduktion des zu detektierenden Proteins eine annähernd lineare Abnahme der Fluoreszenzintensität beobachtet wurde.) Die mit Filterpapier vorsichtig getrockneten Deckgläschen wurden mit der Zellseite nach unten auf den Tropfen gelegt. Die Inkubation erfolgte in der Regel für eine Stunde bei 37 °C.

Anschließend wurden die Deckgläser durch vorsichtiges Eintauchen in drei mit PBS gefüllte 50 mL Bechergläser gewaschen. Die Erstantikörper wurden durch Fluoreszenzfarbstoff-markierte Zweitantikörper sichtbar gemacht. Die Inkubation erfolgte hier wie bereits für den ersten Antikörper beschrieben. Nach Ablauf der Zeit wurden die Deckgläschen erneut gewaschen und die Zellkerne durch eine 10minütige Inkubation auf Eis mit dem Chromatin färbenden Interkalationsfarbstoff Hoechst 33341 gefärbt. Die Deckgläser wurden erneut gewaschen und nun auf einem Objektträger mit einem Tropfen des Eindeckmittels Prolong-Antifade fixiert. Nach der Trocknung konnten die Präparate unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden.

Da die Transfektionseffizienz bei RNAi Experimenten häufig bei über 90% lag, erwies es sich oft als schwierig, Aufnahmen zu machen, bei denen transfizierte und nicht transfizierte Zellen direkt nebeneinander lagen. Des Weiteren war der Zellrasen bei einer Aufarbeitung drei Tage nach der Transfektion in der Regel schon so dicht gewachsen, dass die einzelnen Zellen sich wenig ausbreiten konnten und somit für Aufnahmen „wenig fotogen“ waren. Um zu Demonstrationszwecken möglichst gute Fotos machen zu können, benötigte man die Zellen daher in kleinen Gruppen mit Kontrollen und „*Knockdown*“-Zellen dicht nebeneinander.

Daher wurden die Zellen am Tage vor der Aufarbeitung, sofern die Effekte einer siRNA Transfektion hinreichend bekannt waren, trypsinisiert und RNAi- und Kontrollansatz gemischt. Anschließend wurden die Zellen auf ein Viertel der ursprünglichen Dichte verdünnt und erneut auf Deckgläsern ausgesät.

Die Präparate wurden entweder in einem Standard Immunfluoreszenzmikroskop (Zeiss Axiovert 200 oder Nikon Eclipse 800) oder im konfokalen Laserscanmikroskop Zeiss LSM-510 Meta betrachtet, wobei bei letzterem der Modus „*single track*“ gewählt wurde, um ein Durchstrahlen der Fluoreszenz in einen anderen Kanal zu vermeiden.

2.2.3.2 FRAP (*Fluorescence Recovery after Photobleaching*) Fluoreszenzerholung nach Fotobleichen

FRAP ist eine Technik bei der Fluorophore in lebenden Zellen mittels eines Lasers ausgebleicht werden und die Wiederkehr der Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Zeit gemessen wird. Die Geschwindigkeit ist dabei ein Maß dafür, inwieweit das ausgebleichte Molekül in der Zelle einem Austausch unterliegt. Clathrin und AP-2 unterliegen in Clathrin bedeckten Strukturen einem schnellen und regelmäßigen Austausch (46), so dass in der Regel eine „Erholung“ der Fluoreszenz innerhalb von 10 bis 20 s beobachtet wird. Um Clathrin oder AP-2 fluoreszierend zu markieren, müssen die Zellen mit GFP-LCa oder YFP- β 2-Adaptin exprimierenden Vektoren transfiziert werden. Diese Moleküle werden von der Zelle während Clathrin vermittelter Transportvorgänge wie ihre natürlichen Gegenstücke verwendet. Die YFP bzw. GFP Färbung entspricht daher an der Plasmamembran weitgehend dem in der Standardimmunfluoreszenz zu beobachtenden Muster.

Für solche Experimente wurden 90000 HeLaSS6 Zellen in 2 mL Petrischalen mit 2,5 cm Deckgläsern ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden diese wie im Abschnitt „Transfektionen mit Lipofectamine2000“ mit siRNAs transfiziert. Zwei Tage nach der Transfektion wurden alle Ansätze zusätzlich mit Vektoren transfiziert, die entweder die Informationen für GFP-LCa oder YFP- β 2-Adaptin enthielten. Die Transfektion erfolgte dabei ebenfalls wie im Abschnitt „Transfektionen mit Lipofectamine2000“ beschrieben. Am folgenden Tag wurden die Deckgläser aus der Petrischale gehoben, zweimal mit warmem PBS (37 °C) gewaschen und in die

Beobachtungskammer für lebende Zellen (POC-Mini) eingespannt. Die Zellen wurden mit 500 µL 37 °C warmem Leibowitz's Medium (ohne Indikator) mit 0,1% BSA überdeckt und konnten nun unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet werden. Fluoreszierende Zellen wurden hier zunächst in der Epifluoreszenz ausgesucht und anschließend mit dem Laserscanaufsatz des Mikroskops untersucht. Das Bleichen von ausgewählten Fluoreszenzpunkten erfolgte mit 20 Pulsen („Iterationen“) des auf 20 % seiner maximalen Leistungsstufe eingestellten 488 nm Argon-Lasers. Der Bildausschnitt wurde so gewählt, dass die Scanzeit pro Bild maximal 800 ms betrug. In jedem Experiment wurde jeweils eine identische Bild- und Bleichfenstergröße benutzt. Die Rückkehr der Fluoreszenz wurde in Abhängigkeit von der Zeit gemessen. Die hier erhaltenen Werte wurden auf einen nicht gebleichten Hintergrund innerhalb der Zelle bezogen. Die Auswertung erfolgte nach Export der Daten mit Microsoft Excel.

2.2.4 Funktionelle Untersuchungsmethoden

2.2.4.1 EGF – Aufnahme für Immunfluoreszenz

Auf Deckgläschen gewachsene Zellen wurden aus ihren Kulturschalen in eine neue Schale mit frischem DMEM mit 0,1% BSA überführt und für eine halbe Stunde im Brutschrank inkubiert. Das BSA im Medium sollte den Zellen dabei die gewohnte Proteinumgebung simulieren. Die Deckgläschen legte man nun mit der Zellseite nach unten auf einen 20 µL Tropfen einer Lösung aus Medium mit 0,1% BSA und EGF (10 - 40 ng/mL Texas Rot markiertes EGF), welcher in einer mit Parafilm ausgelegten Schale aufgebracht worden war. Die Proben wurden für 60 Minuten auf Eis gestellt. In dieser Zeit sollte der Wachstumsfaktor an seine Rezeptoren binden. Da die Zellmembran bei diesen Temperaturen erstarrt, konnte aber gleichzeitig keine Endocytose stattfinden.

Nach Abschluss der Inkubation wurden die Zellen durch Spülen mit 37 °C warmem reinem DMEM aufgewärmt, in eine Schale mit 37 °C warmem Medium mit 0,1% BSA überführt und im Brutschrank für 0 bis 15 Minuten inkubiert. Die gebundenen EGF-Moleküle können während dieser Zeit aufgenommen werden. Die Reaktion wurde durch Waschen mit PBS gestoppt.

Das weitere Vorgehen ist bei Verwendung von Texas Rot markiertem EGF im Abschnitt Standard Immunfluoreszenz beschrieben.

2.2.4.2 EGF – Aufnahme für biochemische Untersuchungen

In einer 24-Brunnen Platte gewachsene HeLa Zellen wurden mit frischem DMEM mit 0,1% BSA für eine halbe Stunde im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden sie mit eiskaltem Medium mit 0,1% BSA gewaschen und für eine Stunde auf Eis in 120 μ L DMEM mit 0,1% BSA und 1 bis 50 ng/mL I-125 markiertem EGF inkubiert. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die Zellen mit 37 °C warmem Medium gewaschen und für die angegebenen Zeiten in 500 μ L 37 ° warmen Medium mit 0,1% BSA im Brutschrank inkubiert.

Anschließend wurden die Zellen mit eiskaltem PBS auf Eis dreimal gewaschen, für 2,5 Minuten mit eiskaltem 0,1 M Natriumacetat Puffer pH 4,5 inkubiert und nochmals mit eiskaltem PBS gewaschen. Dieser Schritt sollte nicht internalisierten EGF entfernen. Nun wurden die Zellen in 0,1 M Tris pH 8 mit 1 % SDS oder in SDS Lysispuffer lysiert, in Plastikmessröhrchen überführt und im γ -Zähler (Berthold) gemessen. Die Proben konnten bei Bedarf auch noch mit Hilfe von SDS-Page und Western-Blot untersucht werden.

Eine alternative, vielleicht physiologischere Methode (77), um die EGF-Aufnahme zu untersuchen, war die folgende:

HelaSS6 Zellen wurden mit 37 °C warmem Medium ohne FKS, aber mit 0,1% BSA (w/v) gewaschen und für eine halbe Stunde im Brutschrank mit derselben Lösung inkubiert. Nun wurden die Zellen mit 1 bis 50 ng/mL I-125 markiertem EGF in 37 °C warmem Medium mit 0,1% BSA für die jeweils angegebenen Zeiten (0 bis 15 Minuten) inkubiert. Danach wurden die Zellen mit kaltem PBS und Acetatpuffer wie oben bereits beschrieben gewaschen. Anschließend wurden sie lysiert und analysiert.

Die gemessene Strahlung wurde immer auf die Proteinkonzentration der Probe normiert. Hierzu verwendete man bei Lyse mit 1% SDS in Tris-HCl pH 8 das kommerziell erhältliche BCA-Proteinbestimmungssystem der Firma Pierce nach Angaben des Herstellers. Bei Lyse mit SDS-Lysepuffer wurde die Proteinkonzentration mittels SDS-PAGE und Coomassie Brilliant Blue Färbung, welche densitometrisch ausgewertet wurde, bestimmt. Da das Glycerin im SDS-Lysepuffer die Proteinbestimmung mit dem BCA Kit störte, konnte dieser bei Lyse der Zellen mit selbigem Puffer nicht verwendet werden.

2.2.4.3 Transferrin – Aufnahme für Immunfluoreszenz

Die Transferrin-Aufnahme ist als Standardtest zur Überprüfung der Clathrin vermittelten Endocytose etabliert. Auf Deckgläschen gewachsene Zellen wurden aus ihren Kulturschalen in eine neue Schale mit frischem DMEM mit 0,1% BSA überführt und für eine halbe Stunde im Brutschrank inkubiert.

Im Kälberserum vorhandenes unmarkiertes Transferrin sollte während dieser Zeit von den Zellen vollständig ins Medium abgegeben werden, da das Transportmolekül für Eisen in der Zelle einen Kreislauf durchläuft: Mit Eisen beladenes Transferrin wird von der Zelle aufgenommen. Während das Eisen in der Zelle verbleibt, wird unbeladenes Transferrin wieder ausgeschleust. Der gesamte Vorgang nimmt etwa 15 Minuten in Anspruch.

Anschließend legte man die Deckgläschen mit der Zelleseite nach unten auf einen 20 µL Tropfen einer Lösung aus 5 µg/mL mit Texas Rot markiertem Transferrin in Medium mit 0,1% BSA, welcher in einer mit Parafilm ausgelegten Schale aufgebracht worden war. Es erfolgte eine Inkubation von 0 – 15 Minuten im Brutschrank. Die Transferrinaufnahme wurde anschließend durch dreimaliges Waschen mit PBS gestoppt. Die Zellen wurden nun wie im Absatz Standard Immunfluoreszenz beschrieben fixiert und weiter behandelt.

2.2.4.4 Transferrin – Aufnahme für biochemische Untersuchungen

In einer 24-Brunnen Platte gewachsene HeLa Zellen wurden mit frischem DMEM mit 0,1% BSA für eine halbe Stunde im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden sie mit eiskaltem Medium mit 0,1% BSA gewaschen und für eine Stunde auf Eis mit 120 µL DMEM mit 0,1% BSA und 250 ng/mL Biotin-markiertem Transferrin inkubiert. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die Zellen mit 37 °C warmem Medium gewaschen und für die angegebenen Zeiten in 500 µL Medium mit 0,1% BSA im Brutschrank inkubiert.

Nun wurden die Zellen mit eiskaltem PBS auf Eis dreimal gewaschen. Anschließend wurden sie für 2,5 Minuten mit eiskaltem 0,1 M Natriumacetat Puffer pH 4,5 inkubiert und nochmals mit eiskaltem PBS gewaschen. Dieser Schritt sollte nicht internalisiertes Transferrin entfernen.

Nun wurden die Zellen in SDS-Lysispuffer lysiert und aufgeköcht. Sie konnten anschließend mit Hilfe von SDS-PAGE und Western-Blot untersucht werden.

Das Biotin markierte Transferrin wurde auf der Nitrozellulosemembran mit Hilfe von NeutrAvidin®, welches mit Meerrettichperoxidase gekoppelt war, sichtbar gemacht. Die Bandenintensität wurde densitometrisch bestimmt, die Intensität auf das Actin Signal auf gleicher Nitrocellulosemembran normiert.

Für den Transferrin-Aufnahmetest nach Behandlung der Zellen mit GAK siRNAs wurde I-125 markiertes Transferrin verwendet. Die Konzentration betrug hierbei in Anlehnung an Huang et al. 1 µg / mL: HeLaSS6 Zellen wurden mit 37 °C warmem Medium ohne FKS, aber mit 0,1% BSA (w/v), gewaschen und für eine halbe Stunde im Brutschrank mit derselben Lösung inkubiert. Nun wurden die Zellen mit 1µg / mL I-125 markiertem Transferrin in 37 °C warmem Medium mit 0,1% BSA für die jeweils angegebenen Zeiten (0 bis 10 Minuten) inkubiert. Danach wurden die Zellen mit kaltem PBS zweimal gewaschen und mit 0,2 M Essigsäure, versetzt mit 0,5 M NaCl pH 2,8, für 5 Minuten inkubiert (500µL / Reaktionsvertiefung einer Zellkulturplatte mit 24 Reaktionsvertiefungen). Anschließend wurde kurz mit selbiger Lösung gewaschen (500µL), danach mit PBS (300µL). Alle Waschlösungen seit dem ersten Säurewaschschritt wurden dabei in einem Messröhrchen vereinigt. Die Zellen wurden anschließend in 0,1 M Tris mit 1 % SDS lysiert, die Lysate in ein separates Messröhrchen überführt. Es wurden jeweils beide Messröhrchen ausgemessen und die Summe des aufgenommenen Transferrins in % der gemessenen Gesamtmenge bestimmt.

2.2.4.5 Meerrettichperoxidase-Aufnahme

Die Meerrettichperoxidase-Aufnahme gilt als Maß für die gesamte Endocytoseleistung einer Zelle, da dieses Molekül unspezifisch mit dem umgebenden Medium aufgenommen wird. Die Menge des aufgenommenen Enzyms kann in einer Farbreaktion nachgewiesen werden:

HeLaSS6 Zellen in einer Reaktionsvertiefung einer 24-Brunnen Platte wurden mit 2 mL Medium, welches 0,1% BSA enthielt, gewaschen und in diesem Medium für 60 min im Brutschrank hungern gelassen. Anschließend wurden 1,6 mL des Mediums entfernt, 100 µL 5 mg / mL Meerrettichperoxidase hinzugegeben und mit einer Pipette sorgfältig gemischt. Anschließend wurde für die jeweils angegebene Zeit im Brutschrank inkubiert. Die Proben wurden auf Eis gestellt und dreifach mit eiskaltem PBS gewaschen. Es folgte ein zweifaches Waschen mit PBS mit 0,5% BSA für je 5 min und ein weiteres dreimaliges Waschen mit einfachem PBS. Alle verwendeten Lösungen waren eiskalt. Die Flüssigkeit in den

Reaktionsvertiefungen wurde nun vollständig entfernt und die Zellen durch Inkubation mit 150 μL 0,2% Triton X-100 in PBS für 30 bis 50 Minuten auf Eis lysiert.

In der Zwischenzeit wurde eine Mikrotiterplatte mit 50 μL Wasser pro Reaktionsvertiefung vorbereitet. Die Zelllysate wurden nach Ablauf der Inkubationszeit mit einer Pipette gründlich resuspendiert und je 25 μL des Lysates wurden in einen vorbereiteten Brunnen der 96-Brunnen Platte pipettiert. Nun wurden 75 μL der Substratlösung (1 mg / mL ABTS in 0,1 M Zitratpuffer (pH 5) mit 0,025% H_2O_2) hinzugegeben, gemischt und auf Eis inkubiert, bis sich eine grüne Färbung einstellte. Die Absorption wurde im Mikrotiterplattenlesegerät bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen. Die so ermittelten Werte übertrug man in eine Excel Tabelle und wertete sie aus. Die gemessene Meerrettichperoxidase-Aufnahme wurde auf die Proteinkonzentration des Lysates normiert. Hierzu verwendete man wiederum das BCA-System der Firma Pierce.

2.2.5 Zellfraktionierung

Diese Experimente dienten der Ermittlung der Menge eines Proteins, welche im Cytosol bzw. an der Plasmamembran gebunden vorliegt.

Transfizierte oder nicht-transfizierte HeLaSS6 Zellen wurden mit 37 °C warmem PBS zweimal gewaschen, anschließend mit warmem Puffer W und eiskaltem Puffer W gewaschen. Die Zellen wurden schnell auf Eis gestellt, sorgfältig von Puffer befreit und mit 250 μL eiskaltem Puffer W mit Proteaseinhibitorcocktail versetzt. Die Zellkulturschalen wurden nun auf einen Trockeneisblock gedrückt und innerhalb von zwei Minuten eingefroren. Die Zellen wurden auf Eis wieder aufgetaut (Dauer: ca. 15 Minuten) und erneut eingefroren und wieder aufgetaut. Eine Untersuchung unter Verwendung von Trypan-Blau zeigte, dass durch diese Methode sämtliche Zellen aufgebrochen wurden. Auf eine Verwendung von Detergenzien wurde bewusst verzichtet, da viele Proteine der Clathrin vermittelten Endocytose an Membranlipide binden. Durch eine Verwendung von Detergentien, so vermutete man, würde diese Bindung unterbunden und ein Teil dieser Proteine fälschlicherweise in die Cytosolfraction überführt werden.

Die lysierten Zellen wurden mit einem Zellschaber von der Schalenoberfläche abgeschabt und in ein 1,5 mL Ultrazentrifugenröhrchen überführt. Es wurde nun für 30 min bei 90000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 80 μL vierfach konzentriertem Probenpuffer (4xPP) versetzt, das Pellet in 320 μL einfach konzentriertem Probenpuffer gelöst. Durch 50faches

Auf- und Abpipettieren durch eine Kanüle auf einer 1mL Spritze wurde die Lösung homogenisiert. Überstand und Pellet wurden nebeneinander auf einem Gel aufgetragen, die Proteine durch Elektrophorese aufgetrennt. Die Übertragung der Eiweiße auf die Nitrocellulosemembran erfolgte im nassen Verfahren, da hiermit ein gleichmäßigerer Transfer erzielt wurde.

Die Stärke der mit Antikörpern sichtbar gemachten Proteinbanden wurde densitometrisch auf vorgeblitzten Filmen bestimmt.

2.2.6 Elektronenmikroskopie

2.2.6.1 *Preembedding*

Preembedding ist eine Methode, um Proteine in der Zelle unter dem Elektronenmikroskop sichtbar zu machen. Das zu Grunde liegende Prinzip ist hierbei das gleiche wie bei der Immunfluoreszenz. Die Erstantikörper werden in diesem Fall jedoch über mit Goldpartikeln markierte Zweitantikörper sichtbar gemacht. Gold weist eine wesentlich höhere Elektronendichte auf als die hauptsächlich aus organischen Molekülen bestehenden Zellen und ist als tiefschwarzer Fleck auf dem Leuchtschirm zu erkennen.

Transfizierte Zellen in Brunnen ohne Deckgläschen einer 24-Brunnen Zellkulturplatte wurden dreimal mit Golgibindungspuffer (Puffer G) gespült und anschließend für 10 Minuten bei RT mit einer Lösung aus 4% Formaldehyd in PBS fixiert. Die Zellen wurden mehrfach mit Puffer G gespült, mit circa 1 mL Puffer G bedeckt und anschließend durch Einfrieren auf einem Trockeneisblock für 5 bis 10 Minuten permeabilisiert. Danach taute man die Zellen zügig im 37 °C warmen Wasserbad wieder auf und spülte mit Puffer G. Nun gab man 100 µL der Erstantikörperlösung hinzu, verschloss die Zellkulturplatte mit Parafilm und inkubierte für zwei Stunden bei 37 °C. Die Zellen wurden anschließend mit PBS gespült. War der verwendete Erstantikörper ein Kaninchen Immunglobulin, so konnte sofort Protein-A-Gold (150 µL) hinzugegeben werden. Bei Verwendung eines Erstantikörpers aus Maus musste zunächst mit einem Anti-Maus Zweitantikörper aus Kaninchen für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert werden. Dieser wurde anschließend durch mehrfaches Spülen mit PBS entfernt. Es folgte eine Inkubation mit Protein-A-Gold in 3% BSA in PBS. Das Protein-A-Gold wurde über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit PBS gründlich gespült und anschließend mit einer Lösung aus 2,5% Glutaraldehyd in Cacodylatpuffer für 30

Minuten bei RT abschließend fixiert. Es wurde nun für 10 Minuten mit Cacodylatpuffer gespült, danach für 1 Stunde mit 1% Osmiumtetroxidlösung in Wasser. In den folgenden Schritten wurden die Zellen entwässert. Dazu wurden sie jeweils zweimal für fünf Minuten mit Ethanollösungen von 25%, 50%, 75% und schließlich 90% behandelt. Es folgte eine Inkubation und schließlich mit 100% Ethanol für sechsmal fünf Minuten.

Die überstehende Flüssigkeit wurde nun abgenommen und Propylenoxid auf die Zellen pipettiert. Dieses stark flüchtige Lösungsmittel greift den Kunststoff der Schale an, wodurch sich die Zellen als gut sichtbares schwarzbraunes Band vom Boden ablösen. Diese wurden zügig, bevor das Propylenoxid verdunstet war, in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt und durch eine zehnminütige Zentrifugation bei höchster Drehzahl in der Tischzentrifuge pelletiert. Der Bodensatz wurde mit Propylenoxid resuspendiert und wiederum zentrifugiert. Anschließend wird das Pellet zweimal in einer 1:1 Mischung aus Propylenoxid und Epoxidharz aufgenommen und für 30 Minuten bei 40 °C im Trockenschrank inkubiert. Es wurde danach erneut zentrifugiert, das Pellet anschließend in einer 1:3 Mischung aus Propylenoxid und Epoxidharz resuspendiert. Dieses Gemisch wurde für 90 Minuten bei 40 °C inkubiert. Die Zellen wurden nun wieder herunterzentrifugiert und in reinem Epoxidharz resuspendiert. Nach 45 Minuten bei 40 °C wurde das Harz nach einer Zentrifugation gewechselt und nochmals inkubiert.

Es folgte anschließend die Endeinbettung in Epoxidharz, in Silicon-Flacheinbettungsformen, wodurch man Harzstücke erhielt, welche sich in ein Ultramikrotom einspannen ließen. Das Harz härtete für 20 Stunden bei 40 °C und anschließend für 40 Stunden bei 60 °C. Nach der Aushärtung konnten die Präparate im Ultramikrotom geschnitten und auf mit Formvar bedampfte Kupfernetze aufgebracht werden. Diese Arbeiten wurden von Frau Elke Mallon durchgeführt.

Anschließend wurden die Proben zwecks Kontrastierung in 5% Uranylacetat in Wasser inkubiert. Es folgte eine weitere Kontrastierung mit Bleicitratlösung nach Reynolds. Die Präparate konnten nach dem Trocknen unter dem Elektronenmikroskop untersucht werden.

2.2.6.2 Kritisch Punkt Trocknung von Zellmembranfragmenten

Die verwendete Vorschrift beruhte in wesentlichen Teilen auf Publikationen von J. Heuser (91) zur Herstellung und Präparation von sogenannten *unroofed cells* oder *Rip-Offs*. Die Behandlung nach der Fixierung mit Glutaraldehyd stammt aus dem Labor von G. Borisy (92,93).

HeLaSS6 Zellen wurden in einer 24-Brunnen Platte auf Deckglassplittern ausgesät. Es wurden keine ganzen Deckgläser verwendet, da der Probenhalter in der Gefrierbruchanlage nur maximal zwei ganze Deckgläser aufnehmen kann, von den Splittern aber sechs bis sieben. Auch ist die Anzahl der erhaltenen fertigen Präparate, die aus einem einzigen Glassplitter erhalten werden, bei weitem genug (durchschnittlich 14-21 Stück).

Zur Herstellung der Glassplitter zerbrach man unter der Sterilwerkbank Deckgläser mit einer Pinzette, so dass man Stücke erhielt, die etwa 1/3 bis 1/2 Deckglas groß waren. Um dabei ein vollständiges Zersplittern der Deckgläser zu vermeiden, hat es sich bewährt, wenn man das Glas an der gewünschten Bruchstelle mit der Pinzette festhielt und es mit einer Seite schräg auf den Boden drückte, bis es zerbrach. Hierbei entstanden meist nur ein bis zwei Bruchstücke. Sollten die Präparate mit Antikörpern markiert werden, so wurden die Bruchstücke in der Gefrierbruchanlage mit einer Schicht Kohle bedampft und im Hitzeschrank sterilisiert.

Für einfache Präparationen ohne Antikörpermarkierung wurden die Bruchstücke einfach in Ethanol gewaschen, abgeflammt und in eine Schale einer 24-Brunnen Platte gelegt. Anschließend konnten die Zellen ausgesät werden.

Am Tage der Aufarbeitung wurden die Zellen viermal in 37 °C warmem PBS gewaschen. In der Schale, in der die Zellen auch gewachsen waren, wurden sie anschließend für 15 s mit 0,1 mg / mL Polylysin in Puffer G behandelt. Polylysin hat sowohl eine hohe Affinität zu Glas als auch zu Proteinen und wird daher als „Klebstoff“ verwendet, um die Zellen an der Glasoberfläche zu befestigen. Eine zu lange Behandlung mit Polylysin führt allerdings zu ausgeprägten Präparationsartefakten (91).

Es folgte ein dreifaches Waschen für insgesamt ca. 30 s in 1/3 konzentriertem Puffer G. Die hypotonische Lösung sollte die Zellen ein wenig aufquellen lassen. Im nächsten Schritt wurden die Deckglassplitter aus der Kulturschale entnommen und in einem Winkel von 45 ° unter die Spitze eines Ultraschallgerätes (Branson Sonifier) gehalten, welche in ein 50 mL Becherglas mit Puffer G tauchte. Der Abstand von der Spitze betrug ca. 5 mm. Anschließend wurden die Zellen durch einen sehr kurzen (ca. 0,5 s) Ultraschallstoß bei niedrigster

Leistungsstufe des Gerätes von der Glasoberfläche „geblasen“. Im Idealfall reißt bei dieser Behandlung der obere Teil der Zelle ab, während die basolaterale Plasmamembran an der Glasoberfläche kleben bleibt (siehe Abbildungen 2-1 und 2-2).

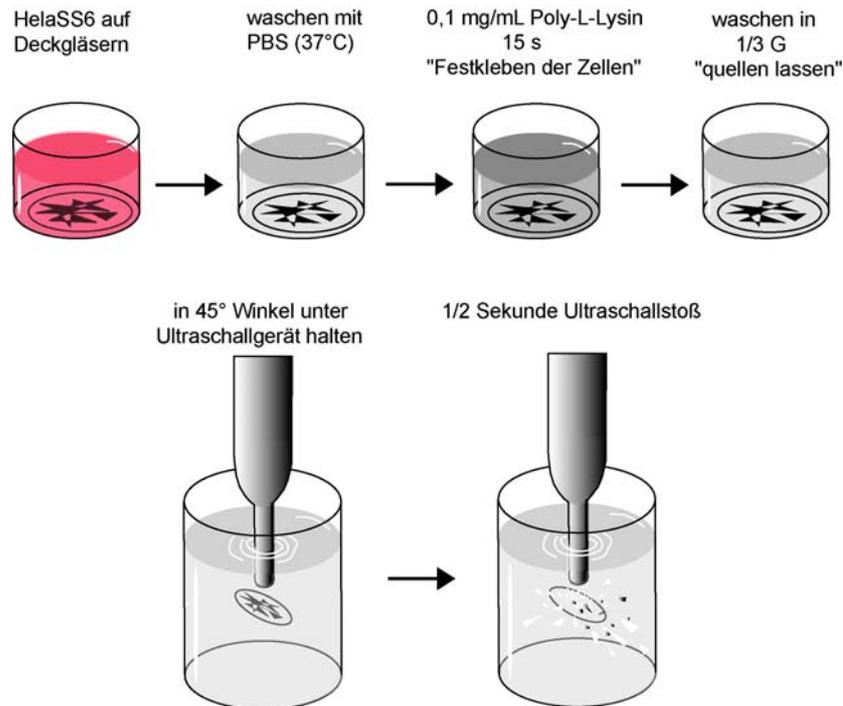


Abbildung 2-1 Schema der Herstellung von Zellmembranfragmenten

Das Abreißen der Zellen war auch mit bloßem Auge gut zu erkennen, die vorher leicht milchige Oberfläche wurde dabei klar. Bei der Ultraschallbehandlung war es wichtig, nicht zu kurz und auch nicht zu lang zu beschallen: Wurde zu kurz beschallt, blieben alle Zellen an der Oberfläche kleben und man erhielt keine brauchbaren Präparate, wurde zu lang beschallt, wurde auch die Plasmamembran abgerissen und nur die blanke Oberfläche blieb zurück. Im Idealfall blieben meistens die Randbereiche der Plasmamembran an der Glasoberfläche zurück, seltener konnte man auch mittlere Bereiche der Plasmamembran beobachten. Es schien fast so, als ob die Zellen hauptsächlich in peripheren Bereichen festgewachsen waren. Insgesamt ging auch bei erfolgreichem Beschallen weit mehr als die Hälfte der gesamten basolateralen Plasmamembran verloren.

Die folgenden Schritte der Präparation werden nun in zwei Schemata kurz dargestellt, anschließend folgt im Text eine genauere Arbeitsanleitung:

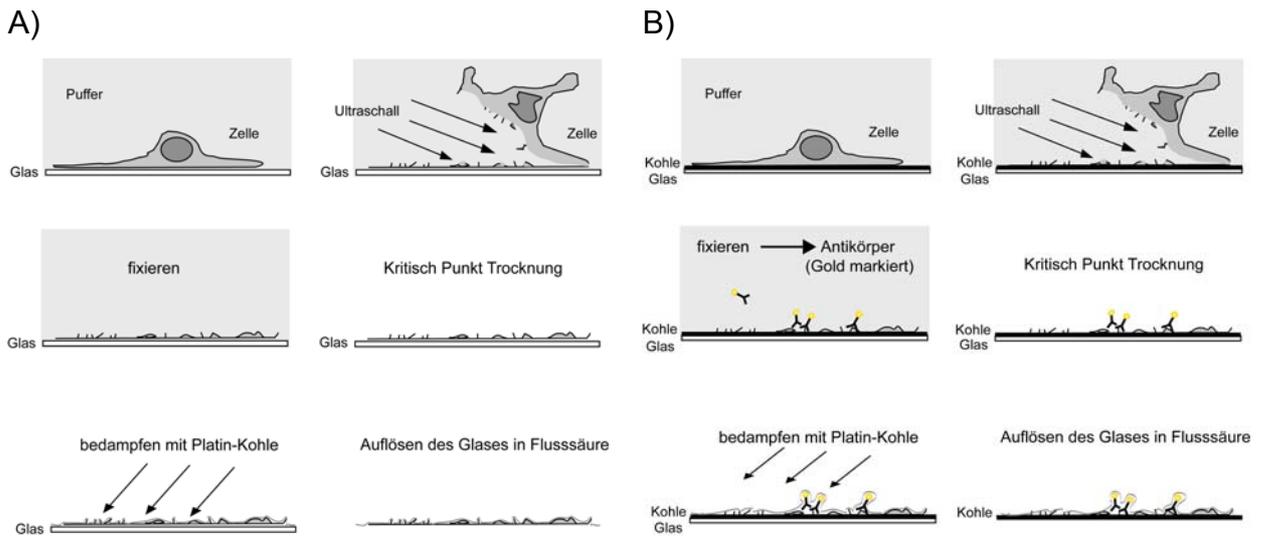


Abbildung 2-2: Präparation von Zellmembranfragmenten für die Elektronenmikroskopie

A) Präparation ohne Antikörpermarkierung:

Die Zellen werden wie oben beschrieben mit einem Ultraschallstoß von der Glassoberfläche „geblasen“. Anschließend werden sie durch Behandlung mit verschiedenen Reagenzien fixiert, und darauf entwässert. Es folgt die so genannte Kritisch Punkt Trocknung. Die Präparate werden aus dem Trocknungsapparat direkt in die Gefrierbrüchmaschine überführt und mit einer Schicht aus Platin-Kohle bedampft. Diese Schicht wird durch eine reine Kohlenschicht stabilisiert. Anschließend wird das Glas in Flusssäure aufgelöst und der hauchdünne Film aus Platin-Kohleschicht und Zellfragment auf Elektronenmikroskopienetzchen aufgebracht.

B) mit Antikörpermarkierung: Die Arbeitsabläufe sind weitgehend die gleichen. Man beachte jedoch, dass mit Kohle bedampfte Glassplitter verwendet wurden, damit die mit Gold markierten Antikörper nach dem Auflösen des Glases nicht verloren gingen, sondern im so genannten „Sandwich“ erhalten blieben.

Sofort nach dem Ultraschallstoß wird der Glassplitter kurz in Puffer G gewaschen (kurzes Eintauchen in eine 2 mL Zellkulturschale gefüllt mit Puffer G) und anschließend in 2% Glutaraldehyd in Puffer G für 30 min fixiert.

Sollten die Zellfragmente mit Antikörpern markiert werden, wurde für die gleiche Zeit mit Formaldehyd fixiert und die im nächsten Absatz beschriebene Behandlung angeschlossen. Ohne Antikörpermarkierung wurde die Behandlung wie im übernächsten Absatz beschrieben fortgesetzt.

Zur Antikörpermarkierung wurden die Zellen nun für eine halbe Stunde unter sechsfachem Lösungswechsel mit einer Lösung aus Puffer G mit 50 mM Ammoniumchlorid und 50 mM Ammoniumacetat behandelt, um das Formaldehyd zu neutralisieren. Anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen mit einer Lösung aus 0,1% (w/v) BSA in Puffer G für eine halbe Stunde abgesättigt. Es folgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper, welcher in gleicher Lösung gelöst worden war, für eine Stunde. Proben wurden nun durch mehrfaches vorsichtiges Eintauchen in 5 100 mL Bechergläser, welche mit Puffer G gefüllt waren, gewaschen und anschließend mit dem Zweitantikörper ebenfalls für eine Stunde inkubiert. Der Antikörper war dabei in der gleichen Lösung wie der Erstantikörper gelöst. Anschließend wurde wie bereits beschrieben gewaschen. Im letzten Schritt wurden die Antikörper mit 2%

Glutaraldehyd in G für ein halbe Stunde bei Raumtemperatur fixiert. Die Präparation wurde nun wie im nächsten Absatz beschrieben fortgesetzt.

Ohne zu waschen wurde nach der Fixierung mit Glutaraldehyd das Fixierungsmittel gegen 0,1 % Tannin in Wasser ausgetauscht und dieses für 20 min auf den Proben gelassen.

Die Deckgläser wurden nun dreimal mit Wasser gewaschen, wobei beim dritten Waschschrift für 5 min inkubiert wurde. Anschließend wurden die Deckgläser in 0,2% Uranylacetat in Wasser für weitere 20 min inkubiert. Die Präparate wurden nun ausgiebig mit Wasser gewaschen und in eine Petrischale mit Wasser überführt. Anschließend wurden die Proben durch eine Behandlung mit Aceton-Wasser-Gemischen aufsteigender Acetonkonzentration entwässert. Verwendet wurden dabei 30%, 50%, 70%, 90% (je 2 x 3 Minuten) und 100% (4 x 3 Minuten) Aceton. Das 100%ige Aceton war zuvor mit einem Molekularsieb über Nacht getrocknet worden.

Die Deckgläschen konnten nun mittels Kritisch Punkt Trocknung getrocknet werden.

Der Kritische Punkt ist der Punkt aus Druck und Temperatur, bei dem eine Verbindung oder ein Element, welches sich in der Gasphase befindet, durch Druckerhöhung nicht mehr verflüssigt werden kann. Es besteht hier kein Unterschied zwischen Gas und Flüssigkeit mehr. Man kann folglich jenseits des Kritischen Punktes eine Substanz in die Gasphase überführen, ohne eine Phasengrenze zu überschreiten. Die sonst bei einem Verdampfen auftretenden Oberflächenspannungen, welche häufig Präparationsartefakte verursachen, werden somit beim Trocknen vermieden. Da der Kritische Punkt von Wasser bei 374 °C und 228,5 bar liegt, ein Zustand der zur vollständigen Zerstörung der Proben führen würde, müssen die Proben in ein geeignetes Sekundärmedium überführt werden. Verwendet wurde CO₂, welches einen kritischen Punkt bei 31 °C und 73,8 bar hat. Der Ablauf der Trocknung lässt sich vereinfacht wie folgt beschreiben:

Unter Druck verflüssigtes 6 °C kaltes Kohlendioxid ersetzt in der Trocknungsanlage zunächst schrittweise das Lösungsmittel Aceton. Anschließend werden Druck und Temperatur langsam bis jenseits des kritischen Punktes erhöht. Bei Erniedrigung des Druckes auf Atmosphärendruck geht das Lösungsmittel ohne Phasenübergang in die Gasphase über. Eine trockene Probe bleibt zurück.

Anschließend wurden die Deckgläschen in der Bedampfungsanlage auf einem sich drehenden Probenhalter (langsamste Geschwindigkeit) unter einem Winkel von 27° mit Platin-Kohle bedampft. Diese Schicht wurde durch eine in einem Winkel von 80° aufgedampfte Kohleschicht stabilisiert. Die Oberfläche der Deckgläschen wurde dann mit einer Rasierklinge schachbrettartig eingeritzt, sodass die aufgedampfte Schicht beim folgenden Eintauchen in

20%ige Flusssäure in kleinen Stückchen abgeschwemmt wurde. Diese Partikel wurden mit einer Platinöse aufgefischt und in Wasser gewaschen. Mit einem sauberen Kupfernetz wurden die Replicae aufgenommen und anschließend vorsichtig mit einem Filterpapierdreieck getrocknet. Die Präparate konnten nun unter dem Elektronenmikroskop untersucht werden.

Für statistische Auswertungen wurden diese fotografiert, die Negative eingescannt und als TIFF-Datei abgespeichert. Anzahl und Form der Clathrin bedeckten Strukturen wurden am Computer mit dem Programm Axiovision ausgewertet. Die statistische Untersuchung der Messwerte erfolgte in Microsoft Excel.

Sollten 3D-Aufnahmen angefertigt werden, so wurden die Präparate im Goniometer des Zeiss EM - 10 C um jeweils + 6° oder - 6° gekippt und fotografiert. Die Negative wurden wiederum digitalisiert und in Photoshop 7.0 wie folgt bearbeitet: Die Bilder wurden in den RGB-Farbmodus umgewandelt, im Auswahlfenster „Kanäle“ rot bzw. grün eingefärbt und in einem neuen Bild übereinander gelegt. Durch Wahl der Ebenenoption „Negativ multiplizieren“ wurden beide Ebenen gleichzeitig sichtbar gemacht und anschließend gegeneinander verschoben, bis beim Blick durch die dieser Arbeit beigelegte Rot-Grün-Brille ein dreidimensionaler Bildeindruck entstand.

2.2.7 Apoptosetests

2.2.7.1 Untersuchung auf das Caspase-Produkt von Cytokeratin-18

Im Prinzip handelt es sich bei diesem Test um eine einfache Standard Immunfluoreszenz. Das Caspase-Produkt von Cytokeratin-18 wurde mit einem kommerziellen Primärantikörper, welcher 1:20 verdünnt wurde markiert. Dieser wurde mit einem fluoreszenzmarkierten Zweitantikörper sichtbar gemacht. Ein Fluoreszenzsignal zeigte dabei apoptotische Zellen sehr deutlich an. Mit diesem Test sollte es möglich sein, auch sehr frühe Stadien der Apoptose zu erkennen (88).

2.2.7.2 „TUNEL“-Test

Bei dieser Untersuchungsmethode handelt es sich um eine Methode zur in situ Markierung von DNA (Einzel-) Strang Brüchen (*nicks*), wie sie gehäuft in apoptotischen Zellen auftreten, mittels terminaler Desoxynucleotidyltransferase. Diese katalysiert die Polymerisation von Fluorescein-markiertem dUTP Nukleotiden an freie 3'-OH DNA Enden (94). Es wurde ein

kommerzielles System (*Kit*) der Firma Boehringer Mannheim verwendet. Die Durchführung entsprach dabei den Angaben des Herstellers.

2.2.8 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western-Blot

2.2.8.1 Vorbereitung der Zellen

Von Zellen in einer Zellkulturplatte mit 24 Reaktionsvertiefungen wurde das überstehende Medium abgesaugt, die Zellen mit 100 μ L Trypsin-EDTA gewaschen und anschließend durch eine 5 minütige Inkubation bei RT mit gleichem Reagenz vom Schalenboden gelöst. Die Zellen wurden mit 500 μ L Medium mit 10% FKS vom Boden gespült, resuspendiert und in ein gekühltes Eppendorfreaktionsgefäß mit 25 μ L Trypsin-Inhibitor (2 mg / mL in Wasser) überführt. Alle weiteren Schritte wurden unter Kühlung durchgeführt. Es wurde nun bei 940 g in der Kühlzentrifuge bei 4 °C für 4 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde mit 700 μ L PBS versetzt und erneut zentrifugiert. Wiederum wurde der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 30 μ L kochendem SDS-Lysispuffer aufgenommen, gevortext, suspendiert und anschließend für 5 Minuten im Heizblock gekocht. Die Proben wurden entweder direkt auf ein SDS-Gel aufgetragen oder eingefroren.

Im Verlauf dieser Arbeit wurde festgestellt, dass es effektiver und schneller war, die Zellen nach dreimaligem Waschen mit PBS sofort in der kochenden Lösung zu lysieren. Diese Methode wurde folglich anstelle der zuerst beschriebenen verwendet.

2.2.8.2 SDS-PAGE

Die unterschiedlichen Proteine des Zelllysates wurden mittels Elektrophorese in einem 0,8 mm dicken Gradientengel von 6,5 x 9 cm Größe aufgetrennt. Der Gradient des so genannten Trenngels bestand aus einem Acrylamidgradienten von 9-19 % und einem Bisacrylamidgradienten von 0,009-0,38 % und ermöglicht im oberen Gelbereich eine bessere Trennung von größeren Proteinen. Über dem Trenngel befand sich ein Sammelgel, welches die Taschen für den Probenauftrag enthält.

Die Gradienten wurden hergestellt, indem 9 und 19 %ige Acrylamidlösungen aus einem Gradientenmischer mittels einer peristaltischen Pumpe in den Gießstand gefüllt wurden. Auf

dieses Trenngel wurde ein Sammelgel mit Taschen zur Probenauftragung geschichtet. Die Taschen wurden mit 15 µL der wie oben beschrieben vorbereiteten Proben befüllt. Außerdem wurden in eine Tasche eines jeden Gels 10 µL des Molekulargewichtstandards (bei Verwendung des nassen Transferverfahrens (*Tankblot*) 25µL) aufgetragen. Der Gellauf erfolgte unter Kühlung mit Wasser (RT) in der mit Laufpuffer gefüllten Elektrophoresekammer bei einer Spannung von 70 V für 15 Minuten und 200 V für weitere 60 Minuten.

2.2.8.3 Western-Blot

Die durch Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurden im so genannten halbtrockenen Verfahren auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Es wurde dabei für 60 Minuten eine Stromstärke von 0,8 mA / cm² Gel angelegt.

Zur Quantifizierung der Zellfraktionierungsversuche wurden die Proteine im so genannten nassen Verfahren auf die Nitrocellulosemembran übertragen. Es wurde der entsprechende Transferpuffer verwendet und eine Stromstärke von 320 mA für 90 Minuten angelegt.

Die Membran wurde mit Ponceau S gefärbt und die Banden durch spülen mit Wasser sichtbar gemacht. Bei Verwendung des nassen Transferverfahrens waren die Banden für Molekulargewichtsmarker und Proteine aufgrund des hohen Salzgehaltes des Puffers nur schwer erkennbar. Daher musste die Membran vor der Färbung mit Ponceau S unbedingt mit destilliertem Wasser gespült werden. Auch eine Erhöhung der Menge an Marker pro Geltasche von 10 µL auf 25 µL hat sich bewährt.

Die Markerbanden wurden mit Bleistift markiert. Durch Inkubation mit PBS wurde die Membran entfärbt. Anschließend wurden die unspezifischen Bindungsstellen mit der proteinreichen Blockierlösung abgesättigt. Nach circa 30 Minuten wurde diese Lösung gründlichst mit PBS mit 0,1% Tween abgespült und die Membran auf dem Wippinkubator mit einer entsprechenden Menge (5 – 10 mL) der Erstantikörperverdünnung inkubiert. Nach einer Stunde wurde die Lösung abgenommen und erneut mit PBS gründlich gespült. Die Antikörperlösung konnte wiederverwendet werden.

Es folgte eine einstündige Inkubation mit dem den Erstantikörper erkennenden an Meerrettichperoxidase gekoppelten Zweitantikörper, welcher 1:2000 in Blockierlösung mit 0,1% Tween verdünnt worden war. Anschließend wurde die Membran gründlich mit PBS gespült und danach in einer Lösung aus einem Teil ECL- oder NEN-Reagenz und einem Teil Wasser für eine Minute inkubiert. Die durch die Reaktion der Peroxidase mit dem Reagenz

entstehende Lumineszenz wurde in der Dunkelkammer durch Auflegen eines Spezialfilms sichtbar gemacht. Die Belichtungszeiten betragen abhängig von der Signalstärke wenige Sekunden bis mehrere Stunden (Inkubation über Nacht).

Für Quantifizierungen der Bandenintensität mittels Densitometrie wurden vorgeblitzte Filme verwendet: Hierfür wurden die zu verwendenden Filme in der Dunkelkammer mit Tesafilm an der Wand befestigt und mit Hilfe des Blitzes *Sensitize* von Amersham Pharmacia aus einem Abstand von ca. 3 m vorgeblitzt, bis eine optische Dichte des Filmes von 0,1-0,2 OD bei einer Wellenlänge von 540 nm erreicht wurde. In der Regel war hierfür ein einzelner Blitz ausreichend. Da die Blitzintensität von der Batteriespannung des Gerätes abhängig war, empfahl es sich, vor der Belichtung ganzer Filme zunächst mit kleinen Schnittresten die optimale Entfernung des Blitzes von den Filmen zu ermitteln.

Die Filme wurden in der Entwicklermaschine automatisch entwickelt. Die Quantifizierung der Bandenstärken erfolgte nach einer Digitalisierung der Aufnahmen mit dem Programm NIH-Image.

Sollte die Membran für die Detektion von weiteren Proteinen verwendet werden, wurden die Antikörper durch eine Inkubation in *Stripping*-Puffer über 30 Minuten bei 50 °C entfernt. Nach ausgiebigem Waschen in PBS mit 0,1% Tween konnten die Membranen nach erneutem Quenchen in Blockierlösung mit Antikörpern inkubiert werden. Dieses Verfahren wurde vor allem zur Auswertung der Zellfraktionierung verwendet.

3. Ergebnisse

Einleitung

Die Ergebnisse werden wie folgt gegliedert vorgestellt:

- Der erste Teil behandelt die Optimierung der RNAi Methode für endocytotische Proteine durch den Vergleich unterschiedlicher Verfahren sowie die Etablierung einer elektronenmikroskopischen Methode zur Analyse von Clathrin Strukturen an der Plasmamembran.
- Im zweiten Teil der Arbeit werden die Auswirkungen dargestellt, welche die Ausschaltung von Clathrin und AP-2 mittels RNAi auf die Verteilung von Proteinen der Clathrin vermittelten Endocytose und auf die Morphologie an der Plasmamembran hat. Anschließend wird auf die funktionellen Auswirkungen der RNAi Experimente eingegangen. Den Abschluss bilden die Ergebnisse aus der Ausschaltung von CALM und GAK.

3.1 Teil I

3.1.1 Vergleiche unterschiedlicher Methoden zur Ausschaltung von Proteinen mittels RNAi

Zentrales Thema dieser Dissertation war es, verschiedene Proteine der Clathrin vermittelten Endocytose mit Hilfe von RNAi auszuschalten und die Auswirkungen auf die Überlebensfähigkeit, die Funktion und die Morphologie der Zelle zu untersuchen. Dieses sollte Rückschlüsse über ihre exakte Funktion ermöglichen.

Grundlage für jede weiterführende Untersuchung war daher immer eine effektive Ausschaltung des ausgewählten Proteins. Die dazu verwendete Methode sollte zuverlässig, einfach zu handhaben, von geringer Zelltoxizität und preisgünstig sein. Für biochemische Untersuchungen, in denen eine große Zellgesamtheit einzelne Messwerte liefern sollte, musste zusätzlich gewährleistet sein, dass möglichst alle Zellen in einer behandelten Petrischale getroffen wurden, das heißt am Tage der Auswertung eine möglichst niedrige Konzentration des ausgewählten Proteins aufwies. Unter diesen Vorgaben wurden daher verschiedene Methoden miteinander verglichen:

Die erste publizierte Methode zur Ausschaltung von Proteinen mittels RNA Interferenz beinhaltete das Einbringen synthetischer doppelsträngiger RNA Oligomere von 19 bis 21 Basenpaaren Länge (siRNAs) in Zellen mit Hilfe von kationischen Transfektionsreagenzien (63). Später wurde eine Methode publiziert, in der ein pSuper genannter Vektor, welcher doppelsträngige shRNA Oligomere expremiert, in die zu untersuchenden Zellen transfiziert wurde (69). Die erste Frage war also, ob man einen Vektor-basierten Ansatz oder einzelne synthetische RNAs verwenden sollte.

Vergleichende Experimente, bei denen die synthetische γ -Adaptin siRNA und der Vektor pSuper, welcher das gleiche Oligomer expremierte, verwendet wurden, zeigten, dass unabhängig von der verwendeten Methode, transfizierte Zellen eine vergleichbar starke Reduktion des ausgewählten Proteins aufwiesen. Auch die beobachteten Effekte waren identisch. Allerdings konnte bei einer Transfektion von HeLaSS6 Zellen mit dem Vektor pSuper nur eine Transfektionseffizienz von maximal 30-40% erreicht werden, wohingegen bei der Verwendung von synthetischen siRNAs Effizienzen von in der Regel 85 - 95 % erreicht wurden. Der Vektor konnte somit nur für mikroskopische Analysen der RNAi Experimente verwendet werden, während die Alternativmethode auch biochemische Untersuchungen ermöglichte.

Der Vektor basierte Ansatz bietet theoretisch den großen Vorteil, dass man stabil transfizierte Zellen herstellen kann, während die Reduktion eines Proteins mit synthetischen Oligomeren immer nur vorübergehend sein kann. Da aber erwartet wurde, dass die Zellen ohne eine funktionierende Clathrin vermittelte Endocytose langfristig sterben würden, oder dass kompensatorische Mechanismen eventuelle Effekte überspielen würden, hätte man Vektoren mit induzierbarer Expression von shRNAs verwenden müssen. Insgesamt wären solche Ansätze sehr zeitaufwendig gewesen. Die synthetische doppelsträngige RNA Oligomere erwiesen sich dagegen als erstaunlich leicht zu handhaben und zu transfizieren, es war auch keine „Klonierarbeit“ erforderlich, so dass die Transfektion von synthetischen siRNAs zur Methode der Wahl wurde.

Die Transfektion der Zellen mit siRNAs erfolgte zunächst mit dem Reagenz Oligofectamine, später, da das Präparat des Öfteren signifikanten Qualitätsschwankungen unterlag (J. Harborth, U. Greber (persönliche Kommunikation), eigene Beobachtungen), wurde auf Lipofectamine2000 umgestiegen. Die Transfektionseffizienz war mit beiden Reagenzien identisch. Lipofectamine2000 hatte gegenüber Oligofectamine jedoch zusätzlich den Vorteil, dass geringere Volumina der Substanz pro Ansatz benötigt wurden (1 μ L statt 3 μ L in 600 μ L Volumen in einer 24-Brunnen Platte), was den Preis der Transfektion erheblich senkte.

In jüngerer Zeit wurde eine Elektroporationsmethode unter Verwendung des so genannten Nucleofactors der Firma Amaxa getestet. Hierbei handelt es sich um eine Elektroporationsapparatur, bei der eine Vielzahl von verschiedenen Porationszeiten und Stromstärken, abgelegt in für den Nutzer nicht ersichtlichen Programmen, ausgewählt werden können. Laut Herstellerangaben sollten sich mit diesem Gerät Transfektionseffizienzen von über 60 % bei DNA-Vektoren und nahezu 100 % bei siRNAs erreichen lassen. Bei den durchgeführten Versuchen an HeLaZellen gelang allerdings bei ersteren gar keine Transfektion, bei letzteren lag die Effizienz ungefähr bei 70%. Die Zellen, die RNA erhalten hatten, wiesen im Vergleich zu mit Standardverfahren transfizierten Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop scheinbar eine geringere Restfluoreszenz des ausgewählten Proteins auf. Seine Reduktion in der Zelle schien also effektiver gewesen zu sein. Diese Effizienz wurde allerdings durch einen sehr hohen Verlust an Zellen „erkauft“, da ca. 40 - 60% der Zellen in Folge der Elektroporation starben. Es ist möglich, dass durch Verwendung anderer Puffer oder Anpassen des Elektroporationsprogrammes eine höhere Effizienz und Zellgesundheit erreicht werden kann. In Anbetracht der Tatsache, dass bei Benutzung von kationischen Transfektionsreagenzien in der Regel gute Ergebnisse erzielt werden konnten, erschien dieses Gerät für die Transfektion von HeLa Zellen keine bessere Alternative. Bei Verwendung von Zellen, welche sich auf traditionelle Weise nicht mit siRNAs transfizieren lassen, scheint das Gerät dagegen durchaus nützlich.

Alle in dieser Arbeit veröffentlichten Ergebnisse wurden daher durch Transfektion von Zellen mit synthetischen RNA Oligomeren erzielt.

Bei jeder Transfektion wurde neben dem eigentlichen RNAi-Ansatz auch jeweils ein Kontrollansatz pipettiert. Als Kontrollreagenzien wurden zunächst Kontroll-RNAs wie die Anti-GFP-siRNA oder die Anti-Luciferase-siRNA benutzt. Ebenso wurden als Kontrollen Ansätze pipettiert, welche nur Transfektionsreagenz enthielten. Tatsächlich schienen die kationischen Lipidreagenzien der eigentliche Auslöser für eventuellen Zellstress zu sein: Transfizierte Zellen wuchsen generell etwas langsamer und reagierten empfindlicher, beispielsweise auf die Behandlung mit Trypsin, als völlig unbehandelte Zellen. Dabei machte es keinen Unterschied, ob sie mit unspezifischer siRNA oder nur mit Transfektionsreagenzien behandelt worden waren. Die Transfektionsreagenzien hatten allerdings keinen Einfluss auf die Verteilung von Proteinen der Clathrin vermittelten Endocytose.

3.1.2 Präparation von Plasmamembranfragmenten für die Elektronenmikroskopie

Die herausragende Eigenschaft des Moleküls Clathrin ist die Fähigkeit, sich zu charakteristischen Käfigen zusammenzulagern, die leicht unter dem Elektronenmikroskop erkannt werden können. Die Bildung dieser Strukturen geschieht an den Membranen der Zelle unter Beteiligung einer Vielzahl von akzessorischen Proteinen und Adaptoren. Die Methode RNAi eröffnete dem Experimentator die Möglichkeit, auf leichte Weise Mangelphänotypen all dieser Makromoleküle zu erstellen, um dann die Auswirkungen auf die Bildung und das Erscheinungsbild von Clathrin bedeckten Strukturen beobachten zu können. Auf diese Weise konnten dann Rückschlüsse auf die Funktion des jeweiligen Proteins geschlossen werden. Während Immunfluoreszenz und biochemische Methoden mehr die globalen Auswirkungen auf die gesamte Zelle zeigen, liefert nur die Elektronenmikroskopie die Auflösung, die benötigt wird, um die Auswirkungen auf das Aussehen von Clathrin bedeckten Vesikeln zu liefern.

Die Untersuchung von Clathrin bedeckten Strukturen in Ultradünnschnitten ist allerdings sehr mühsam und uneffektiv. Clathrin bedeckte Vesikel und Einstülpungen sind zwar am typischen Stachelsaum zu erkennen, die Detailstruktur bleibt dem Beobachter jedoch verborgen. Die Membran macht des Weiteren nur einen Bruchteil des gesamten Präparates aus (siehe Abbildung 3-1).

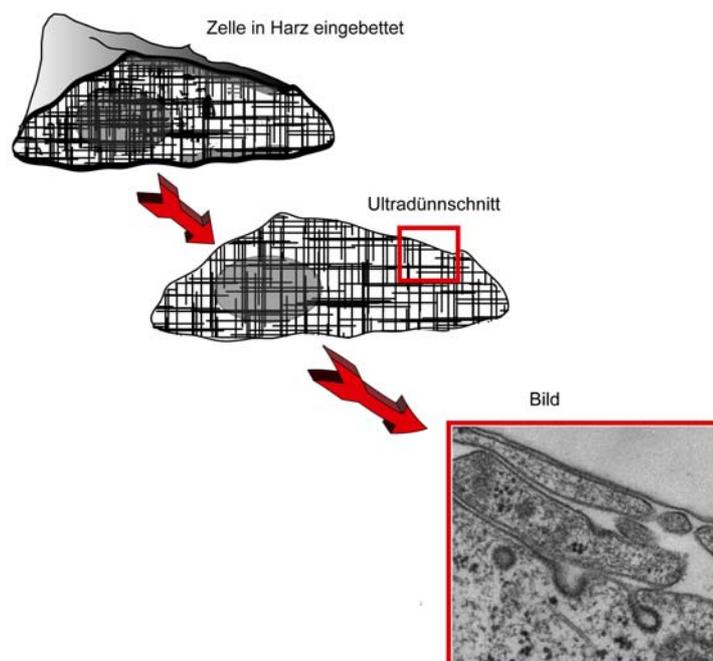


Abbildung 3-1: Schematische Darstellung der Herstellung von Ultradünnschnitten von Zellen. Die Plasmamembran macht im fertigen Präparat nur einen Bruchteil der Fläche aus. Eine quantitative Auswertung von Clathrin bedeckten Strukturen ist in diesen Präparaten daher ineffektiv und zeitaufwendig.

Auch kann eine Einstülpung, welche quer geschnitten wird, so aussehen wie ein Vesikel, obwohl tatsächlich eine Verbindung zur Plasmamembran besteht. Dies ist nur durch ein intensives Studium von Serienschnitten zu bestimmen.

Ideal für die Untersuchung von Clathrin bedeckten Vesikeln wäre dagegen eine Präparationsmethode, nach welcher der Experimentator quasi direkt aus dem Cytosol auf die Plasmamembran schauen könnte:

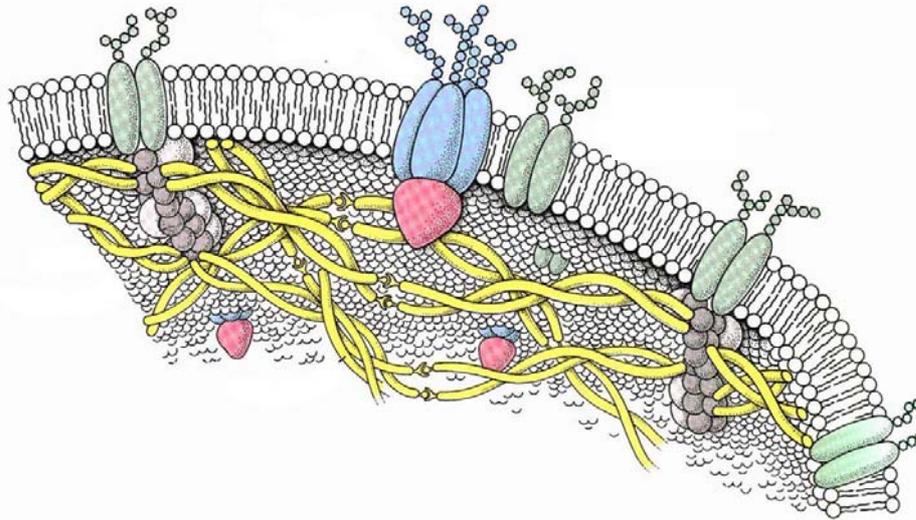


Abbildung 3-2: Ideale Beobachtungsposition für Clathrin bedeckte Strukturen an der Plasmamembran.
Abbildung aus (95).

Eine solche Methode wurde schon in den Achtziger Jahren des letzten Jahrhunderts von J. Heuser (96) und M.V. Nermut (97) entwickelt : Die so genannte „Abreiß“- oder „*Rip-Off*“ Methode. Hierzu werden auf Glas gewachsene Zellen mittels Ultraschall oder eines Pufferstrahles von der Oberfläche gerissen, wobei die Plasmamembran am Substrat kleben bleibt. Diese Zellfragmente werden fixiert, getrocknet und mit Platin bedampft. Das Glas wird im nächsten Schritt aufgelöst, der übrig bleibende, hauchdünne Film aus Zellresten und Platinschicht wird auf Elektronenmikroskopienetzchen aufgebracht. Diese so genannten Replicae können nun unter dem Elektronenmikroskop betrachtet werden.

Die Methode sollte daher in der Arbeitsgruppe etabliert werden. Zunächst einmal musste das Abreißen der Zellen optimiert werden. Hierbei erwies sich die 2000 von J. Heuser beschriebene Vorgehensweise als erfolgreich. Die artefaktfreie Trocknung der fixierten Zellmembranfragmente erwies sich allerdings als kompliziert. Hierfür wurden in der Vergangenheit verschiedene Methode verwendet: blitzartiges Einfrieren in flüssigem Helium (J. Heuser) oder Ethan und anschließendes Sublimieren des Eises in einer Gefrierbruchanlage, oder die so genannte „Kritisch Punkt Trocknung“ (M. V. Nermuth). Da die besten Ergebnisse

laut Heuser mit der Methode des schnellen Einfrierens erzielt wurden, wurde zunächst diese Methode getestet. Es erwies sich jedoch, dass hiermit keine reproduzierbaren Ergebnisse erzielt werden konnten. Zwar gelangen hin und wieder Präparate, deren Detailerhaltung von Clathrin bedeckten Vesikeln auch später kaum übertroffen werden sollte, die Gründe für Erfolg oder Misserfolg blieben jedoch ebenso vielfältig wie unkontrollierbar. Die ersten Probleme traten schon vor dem Einfrieren auf: Die Probe musste möglichst trocken sein, damit die Probe schnell und gleichmäßig einfrieren konnte. Auf der anderen Seite mussten die Präparate ständig von einem dünnen Wasserfilm bedeckt sein, da sonst Trocknungsartefakte entstanden, die zum Verlust jeglicher Details der Clathrin bedeckten Strukturen führten und die Proben völlig unbrauchbar machten.

Des Weiteren war es in der Gefrierbruchanlage nicht zu kontrollieren, wann der richtige Zeitpunkt für die Bedampfung gekommen war: Zu langes Trocknen ließ die Membran zunächst reißen und verwandelte sie schließlich in eine spinnennetzartige Struktur, welche keine Ähnlichkeit mit der Plasmamembran hatte. Wartete man zu kurz, so war noch zu viel Eis auf der Membran, so dass man entweder nur die Eisstruktur bedampfte, oder man ein Bild von Vesikeln erhielt, welche gerade aus einer Eisschicht herausragten, während flache Clathrin bedeckte Strukturen und die Plasmamembran verborgen blieben. Das ideale Zeitfenster war vermutlich nur wenige Sekunden groß und selbst auf dem gleichen Deckglas lokal unterschiedlich. Daher waren selbst bei „erfolgreichen“ Experimenten nur sehr kleine Bereiche des Deckglases brauchbar präpariert, die Gesamtausbeute folglich gering.

Als Alternative wurde die Kritisch Punkt Trocknung getestet. Hierzu wurden die Zellen zunächst nur mit Glutaraldehyd fixiert. Anschließend wurde die wässrige Phase der Proben gegen Aceton ausgetauscht und das Präparat in der entsprechenden Apparatur getrocknet. Die Methode erwies sich als zuverlässig. Die Ausbeute war sehr hoch, da nahezu der gesamte Bereich des Deckglases brauchbar präpariert wurde. Allerdings wiesen die Vesikel und Clathrin bedeckten Strukturen deutliche Trocknungsartefakte auf, der Erhaltungsgrad war wesentlich schlechter als beim schnellen Einfrieren. Mit der Qualität der so erhaltenen Präparationen wäre zwar eine quantitative Aussage über die Menge der Vesikel möglich gewesen, eine Aussage über eine veränderte Morphologie in siRNA transfizierten Zellen jedoch schwierig gewesen. Durch die Verwendung von getrocknetem Aceton und von wasserfreiem CO₂ in der Kritisch Punkt Trocknungsapparatur, sowie durch die Einführung eines verbesserten Transfers der Deckglassplitter zwischen den verschiedenen Flüssigkeiten wurden leichte Verbesserungen der Präparatqualität erzielt. Letztendlich war jedoch nicht auszuschließen, dass die Verbesserungen nur durch eine erhöhte Erfahrung des

Experimentators zustande kamen. Die Qualität der Präparate lag aber immer noch unter derjenigen von J. Heuser publizierten oder der eigenen mittels schnellem Einfrieren gewonnenen Präparate. Auch zeigte sich in den so mittels Kritisch Punkt Trocknung gewonnenen Replicaen ein seit langem bekanntes Artefakt dieser Methode (93): die Actin-Filamente schienen nahtlos miteinander verwachsen zu sein, obwohl sie es tatsächlich nicht waren (Abbildung 3-3 A).

Der Durchbruch gelang, als eine Methode für die Kritisch Punkt Trocknung, welche von Svitkina und Borisy (93) publiziert worden war, eingeführt wurde. Hierzu wurden die Proben direkt nach der Fixierung in 0,1% Tannin in Wasser inkubiert und anschließend noch mit 0,2% Uranylacetat in Wasser behandelt. Hierdurch gelang eine signifikante Erhöhung der Präparatqualität, die nun kaum von denen der eingefrorenen Proben unterscheidbar war. Auch das Artefakt der scheinbar fusionierten Actin Filamente blieb fast vollständig aus (siehe Abbildung 3-3 E).

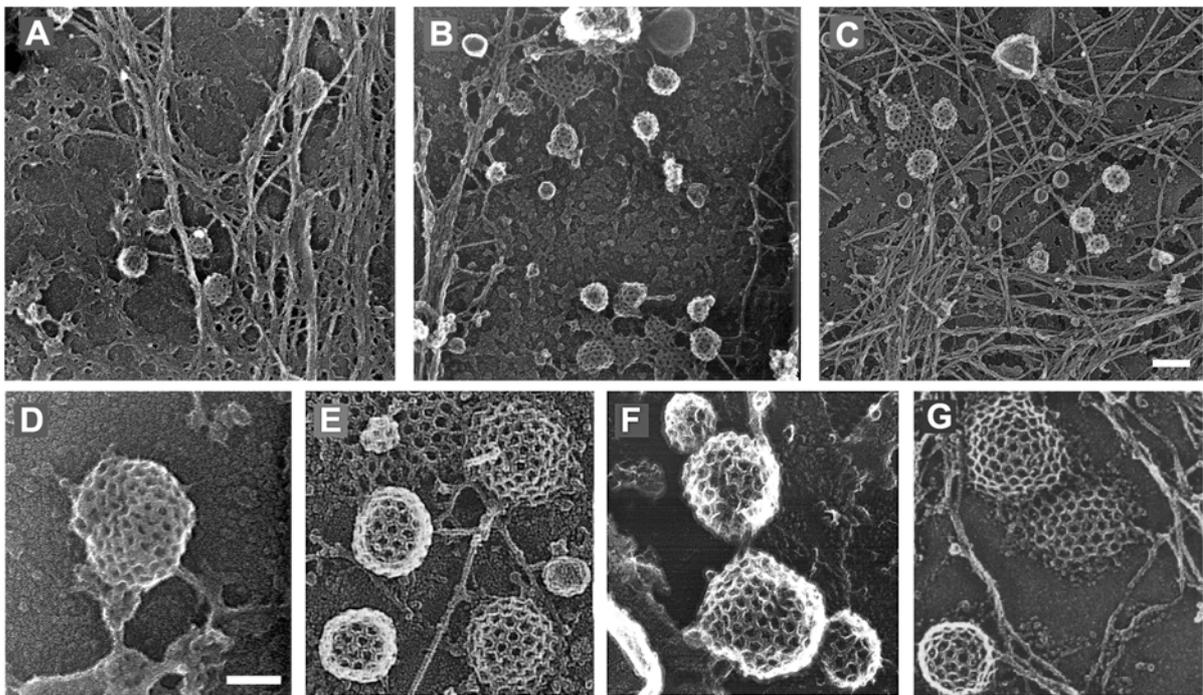


Abbildung 3-3: mit verschiedenen Verfahren präparierte Zellmembranfragmente: A-C: Überblick, D-F: Maximal erreichter Detailreichtum bei Clathrin bedeckten Einstülpungen

- A) Erste Versuche mit Kritisch Punkt Trocknung: Das Präparat zeigt Trocknungsartefakte: Die Actin Filamente sind zu wenigen dicken Fasern fusioniert, der Detailreichtum der Clathrin bedeckten Einstülpungen ist stark reduziert, flache Clathrin bedeckte Strukturen sind nicht zu erkennen
- B) Kritisch Punkt Trocknung ohne Tannin und Uranylacetat, aber mit den im Text erwähnten Verbesserungen: der Detailreichtum ist besser (nichtsdestotrotz scheinen die Clathrin bedeckten Strukturen verkleistert), das Artefakt der „fusionierten Actin Filamente ist nicht mehr ganz so stark.
- C) Kritisch Punkt Trocknung mit Tannin und Uranylacetat: Gute Erhaltung der Vesikel, einzelne Actin Filamente sind deutlich zu erkennen.

Anmerkung: Eine Übersichtsaufnahme wie in A-C war bei Präparaten, die durch schnelles Einfrieren gewonnen wurden so gut wie nicht möglich. Die erhaltenen Bereiche waren in der Regel zu klein.

- D) Kritisch Punkt Trocknung ohne Tannin und Uranylacetat: Die Einstülpung wirkt deutlich abgeplattet, die

- einzelnen „Löcher“ des Netzwerkes sind unförmig und „verkleistert“.
- E) Kritisch Punkt Trocknung mit Tannin und Uranylacetat: Bestmögliche Erhaltung nach Kritisch Punkt Trocknung, die Vesikel wirken zum teil platter als in F. Die Fünf- und Sechseckstruktur der Clathrin Netzwerke ist zu erkennen. Innerhalb der „Löcher“ sind zum Teil weitere Details erkennbar.
 - F) Schnelles Einfrieren: Die Vesikel sehen deutlich anders aus als nach der Kritisch Punkt Trocknung, sie wirken plastischer, allerdings zum Teil deformiert. Auch hier ist die Fünf- und Sechseckstruktur der Clathrin Netzwerke zu erkennen.
 - G) Aufnahme von J. Heuser 1989 (45), schnelles Einfrieren, maximal bisher erreichter Detailreichtum

Der Balken in A – C entspricht 125 nm, in C– G 100 nm.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die letztendlich verwendete Methode der „Kritisch Punkt Trocknung“ ideal für die Untersuchung von Clathrin bedeckten Strukturen an der Plasmamembran ist, da sie Präparate hoher Qualität bei einer hohen Ausbeute liefert. Die Methode des schnellen Einfrierens lieferte geringere Ausbeuten und ist insgesamt wesentlich komplizierter zu handhaben. Die eventuell bessere Detailerhaltung macht diese Nachteile bei weitem nicht wett.

Abschließend soll nochmals betont werden, wie wichtig es ist, dass die Präparate bis zur Kritisch Punkt Trocknung ständig von einem Flüssigkeitsfilm überzogen sind. Fallen die Glassplitter trocken, nützen sämtliche Vorkehrungen und Fixierungen nichts, die Präparate weisen sichtbare Trocknungsartefakte auf, die so weit gehen können, dass Clathrin bedeckte Strukturen nicht mehr als solche zu erkennen sind.

3.1.2.1 Vergleich unterschiedlicher elektronenmikroskopischer Präparate

Im folgenden Abschnitt sollen die Vorteile der mit Hilfe der „Abreiß“-Technik gewonnenen Präparate im Vergleich zu Ultradünnschnitten verdeutlicht werden.

Gleichzeitig sollen die elektronenmikroskopischen Präparate dem Leser näher gebracht werden, um ihm ein leichteres Nachvollziehen der Ergebnisse, die mit Hilfe von RNAi und der Abreißtechnik erhalten wurden, zu ermöglichen (Abbildung 3-4):

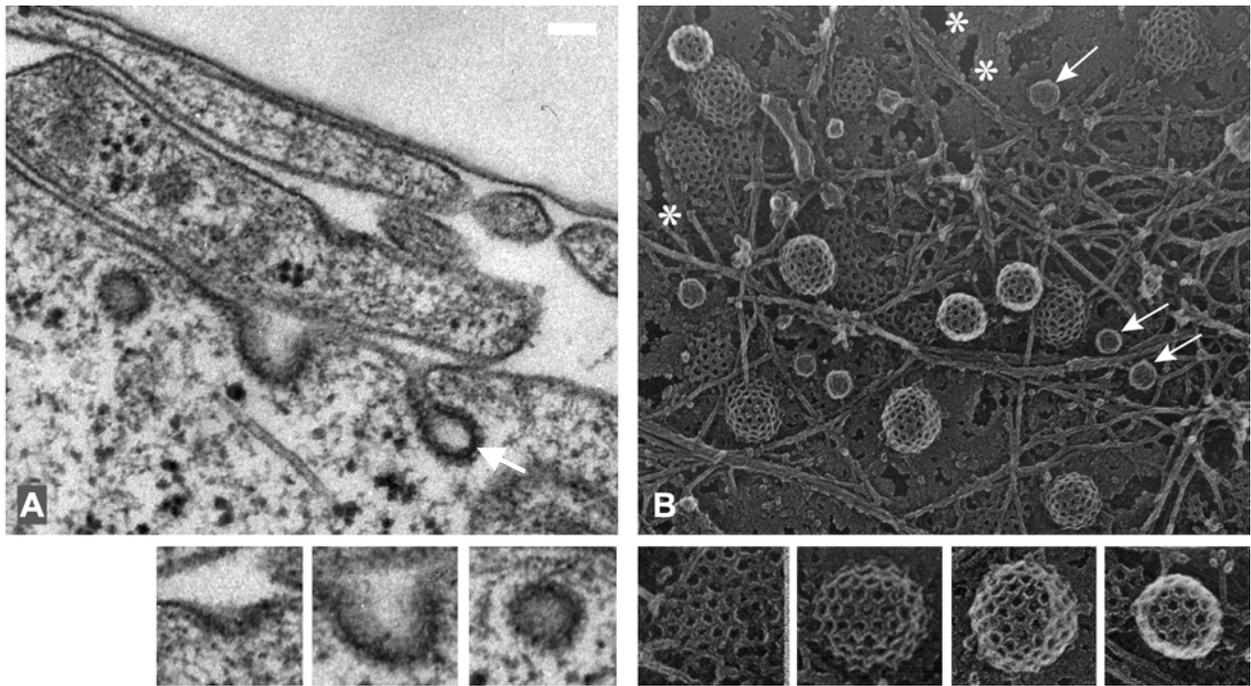


Abbildung 3-4: Vergleich von Ultradünnschnittpräparaten mit über die „Abreiß-Technik“ gewonnenen Präparaten:

- A) Ultradünnschnitt: Die Aufnahme zeigt einen Bereich an der Plasmamembran von HeLaSS6 Zellen: Es sind verschiedene Stadien der Clathrin vermittelten Endocytose sichtbar. Die kleinen Bilder zeigen Vergrößerungen dieser Stadien: von links flache Einstülpung, tiefe Einstülpung, Vesikel (Es könnte sich hierbei allerdings auch um eine tiefeingestülpte Vertiefung handeln, wie sie der Pfeil in A bezeichnet). Flache Clathrin bedeckte Strukturen, wie sie in B zu sehen sind, sind in den Ultradünnschnitten nicht zu identifizieren.
- B) Präparat, welches mit Hilfe der „Abreiß-Technik“ und Kritisch Punkt Trocknung gewonnen wurde. Der Betrachter blickt aus dem Cytosol auf die Plasmamembran. Es sind verschiedene Stadien der Clathrin vermittelten Endocytose sichtbar. Die kleinen Bilder zeigen wiederum Vergrößerungen: von links: nicht eingestülptes Clathrin Netzwerk, flache Einstülpung, tiefe Einstülpung, Vesikel oder tiefe Einstülpung. Die mit Pfeil markierten Strukturen sind Caveolae. Die Sternchen zeigen Risse in der Plasmamembran, ein durch die Präparationsmethode hervorgerufenes Artefakt. Die faserartigen Strukturen sind Reste des Actin Cytoskeletts.

Der Balken entspricht 125 nm.

3.2 Teil II

3.2.1 Ausschaltung der schweren Kette von Clathrin mittels RNAi

Clathrin ist ein zentrales Protein der Clathrin vermittelten Transportprozesse. Sein Fehlen sollte daher fatale Folgen auf diese Vorgänge haben. Zunächst wurde daher die schwere Kette in den HeLaSS6 Zellen mittels RNAi ausgeschaltet. Zu diesem Zweck wurde mit „Clathrin Oligo I“ transfiziert. Als Kontrollen wurden die Kontroll-siRNAs (Luciferase oder GFP) oder später nur das Transfektionsreagenz verwendet, da die Kontroll-RNAs keinerlei Effekte zeigten: Nach einer Transfektion mit dem Reagenz alleine konnten im Vergleich zu unbehandelten Zellen keine Unterschiede in Bezug auf Proteinverteilung sowie Zellmorphologie beobachtet werden. Lediglich die Zellwachstumsgeschwindigkeit nahm ab. Um zu ermitteln, ab wann die Reduktion stark genug war, um eine sinnvolle Auswertung der RNAi Experimente durchführen zu können, wurde in Western-Blot Experimenten die Halbwertszeit des Moleküls abgeschätzt (Abbildung 3-5 A): Ein bis vier Tage nach der Transfektion wurden Zellen in SDS-Lysispuffer aufgelöst und im Western-Blot auf ihren Clathrin Gehalt im Vergleich zur Kontrolle untersucht. Bereits am zweiten Tag nach der Transfektion war Clathrin stark reduziert, wobei die Gesamtproteinkonzentration, welche über die Intensität des Actin Signals ermittelt wurde, nur geringfügig reduziert war. Nach zwei Tagen war die Konzentration der schweren Kette im Vergleich zum Actin Signal auf 16% der Kontrolle gesunken, wobei die stärkste Reduktion auf nur 5% nach drei Tagen erreicht wurde. Nach vier Tagen war eine leichte Erholung des Clathrins zu beobachten, welche durch ein schnelleres Wachstum von nicht oder nur schwach transfizierten Zellen erklärt werden könnte. Bei einem Kontrollexperiment, in dem das Protein Eps15 ausgeschaltet worden war, war allerdings festgestellt worden, dass am vierten Tag nach der Transfektion eine Verminderung des RNAi Effektes einsetzte. Nach sechs Tagen hatte die Proteinkonzentration wieder ihre ursprüngliche Konzentration erreicht (98). Mit der schweren Kette reduziert sich in gleichem Maße auch die Menge der leichten Kette (Abbildung 3-5 B). Dies stützt die These, dass die leichten Ketten allein ohne die schwere Kette nicht stabil sind. Der Clathrin „*Knockdown*“ hatte einen Einfluss auf das Zellwachstum im Vergleich zu den Kontrollzellen. Häufig erreichte die Zelldichte 48 h nach der Transfektion nur 70% der Kontrollzelldichte.

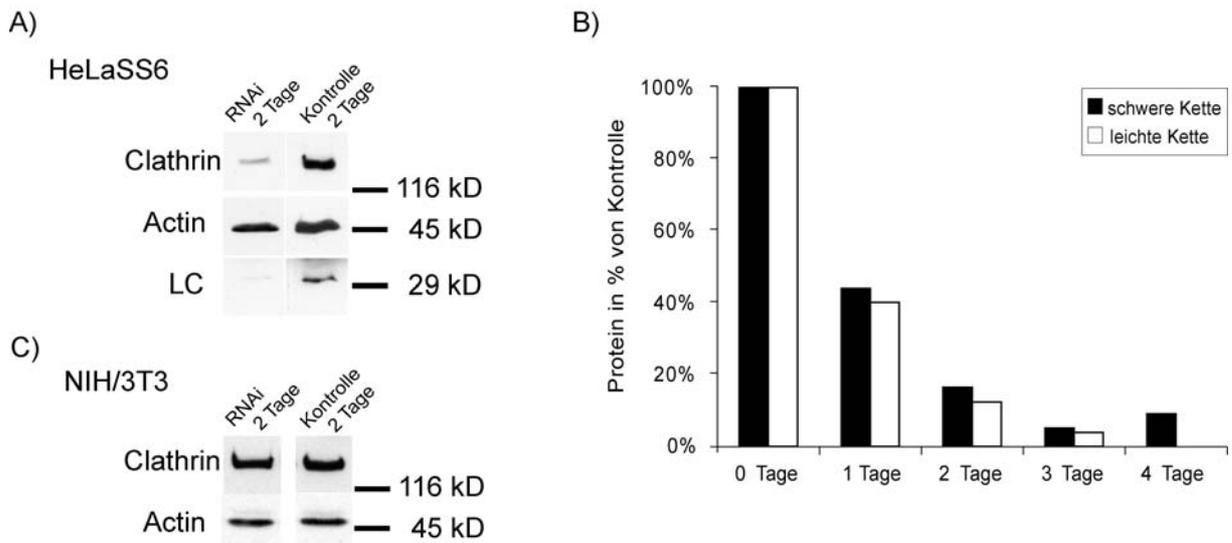


Abbildung 3-5: Western-Blot nach Behandlung mit von Zellen siRNA gegen Clathrin schwere Kette:

- A) Western-Blot Analyse von mit Clathrin siRNA transfizierten Zellen und Kontrollzellen. Die Lysate wurden 48h nach der Transfektion hergestellt, es wurde jeweils Clathrin schwere Kette, Clathrin leichte Kette oder Actin sichtbar gemacht. Daten für die schwere Kette in A und B aus (98).
- B) Zeitverlauf der Abnahme der zellulären Clathrin Konzentration, die Intensitäten für schwere und leichte Kette wurden mit Hilfe von Densitometrie ausgemessen und durch die Intensität des Actin Signals geteilt, um Unterschiede in der Gesamt-Proteinkonzentration auszugleichen. Die Kontrollen wurden jeweils gleich 100% gesetzt. Man beachte, dass das Verschwinden der leichten Kette parallel zur Reduktion der schweren Kette verläuft.
- C) Western-Blot Analyse von mit Clathrin schwere Kette siRNA transfizierten NIH 3T3 Mäuse Fibroblasten. Der humanspezifische RNA Duplex hatte keinen Effekt auf die Expression der schweren Kette.

Die mit siRNAs gegen Clathrin transfizierten Zellen gingen allerdings nicht in Apoptose, denn weder konnte das Caspase Produkt von Cytokeratin 18 (88) nachgewiesen werden, noch zeigte der sogenannte TUNEL Test einen Unterschied zu den Kontrollzellen. Bei letzterer Untersuchungsmethode wurden *in situ* DNA-(Einzel-)Strangbrüche („nicks“) mittels terminaler Desoxynucleotidyltransferase, die die Polymerisation von Fluorescein-markierten dUTP Nucleotiden an freie 3'-OH DNA Enden katalysiert, nachgewiesen (TUNEL; (94)). Die geringere Zellzahl beruhte daher höchstwahrscheinlich auf einer geringeren Proliferation der transfizierten Zellen.

Der Zeitverlauf der Reduktion der schweren Kette deutete auf eine Halbwertszeit von 18 - 20 h in den transfizierten HeLa-Zellen hin. Dieser Wert stimmte mit dem für Clathrin in DT40 Lymphocyten bestimmten überein (99). Hier war die Expression des Proteins allerdings unter Verwendung eines Tetracyclin regulierbaren Expressionssystems unterbunden worden. In einer anderen Publikation hatte man dagegen in einer B-Zelllinie eine Halbwertszeit von 50 h bestimmt. Die Ursache für diese Unterschiede ist unbekannt.

Um zu kontrollieren, ob die Suppression der schweren Kette Clathrins auch spezifisch war, wurden neben den üblichen Kontrollen (Luciferase und GFP siRNA) eine weitere durchgeführt. Es wurden auch 3T3 Fibroblasten mit Clathrin Oligo I transfiziert. In der

Literatur wird die RNAi induzierte Ausschaltung von Genen als sehr spezifisch beschrieben: Nur eine Basenfehlpaarung innerhalb der Erkennungssequenz soll eine siRNA ineffektiv machen (59). Eine solche Fehlpaarung wies auch das verwendete Oligomer im Vergleich mit der Sequenz der schweren Kette Clathrins der Maus auf. Es wurden daher Mäuse Fibroblasten der Linie NIH/3T3 mit der RNA transfiziert. Es konnte kein nennenswerter Effekt auf Clathrin beobachtet werden (Abbildung 3-5 C). Es muss hierbei gesagt werden, dass dieser Effekt keineswegs darauf beruhte, dass sich die 3T3 Zellen generell nicht transfizieren lassen oder unempfindlich gegenüber RNAi sind: Eine Transfektion dieser Zellen mit einem RNA Oligomer gegen α -Adaptin, welches keine Basenfehlpaarungen aufwies, zeigte durchaus einen Effekt (siehe Abbildung 3-11).

Eine weitere Kontrolle war die Verwendung einer zweiten siRNA (Clathrin Oligo II), welche in der Immunfluoreszenz identische Effekte zeigte (siehe Abbildung 3-6). Im Western-Blot jedoch wurde deutlich, dass diese siRNA bei weitem nicht so effektiv war (maximal 50% Reduktion von Clathrin) (keine Abbildung).

3.2.1.1 Immunfluoreszenzen Clathrin depletierter Zellen

Zur immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der Zellen, in denen die Clathrin Konzentration mittels RNAi reduziert worden war, wurden diese zwei Tage nach der Transfektion mit Formaldehyd fixiert, permeabilisiert und die Proteine mit den jeweiligen Antikörpern sichtbar gemacht. Auch mit dieser Methode ließ sich deutlich zeigen, dass mit der Reduktion der schweren Kette eine Reduktion der leichten Kette einhergeht (Abbildung 3-6). Bei den hell leuchtenden Zellen handelt es sich um Kontrollzellen, die einen Tag vor der Immunfluoreszenz mit den auf dem Foto dunkel erscheinenden, transfizierten Zellen gemischt wurden, um einen direkten Vergleich und aussagekräftigere Fotos zu ermöglichen.

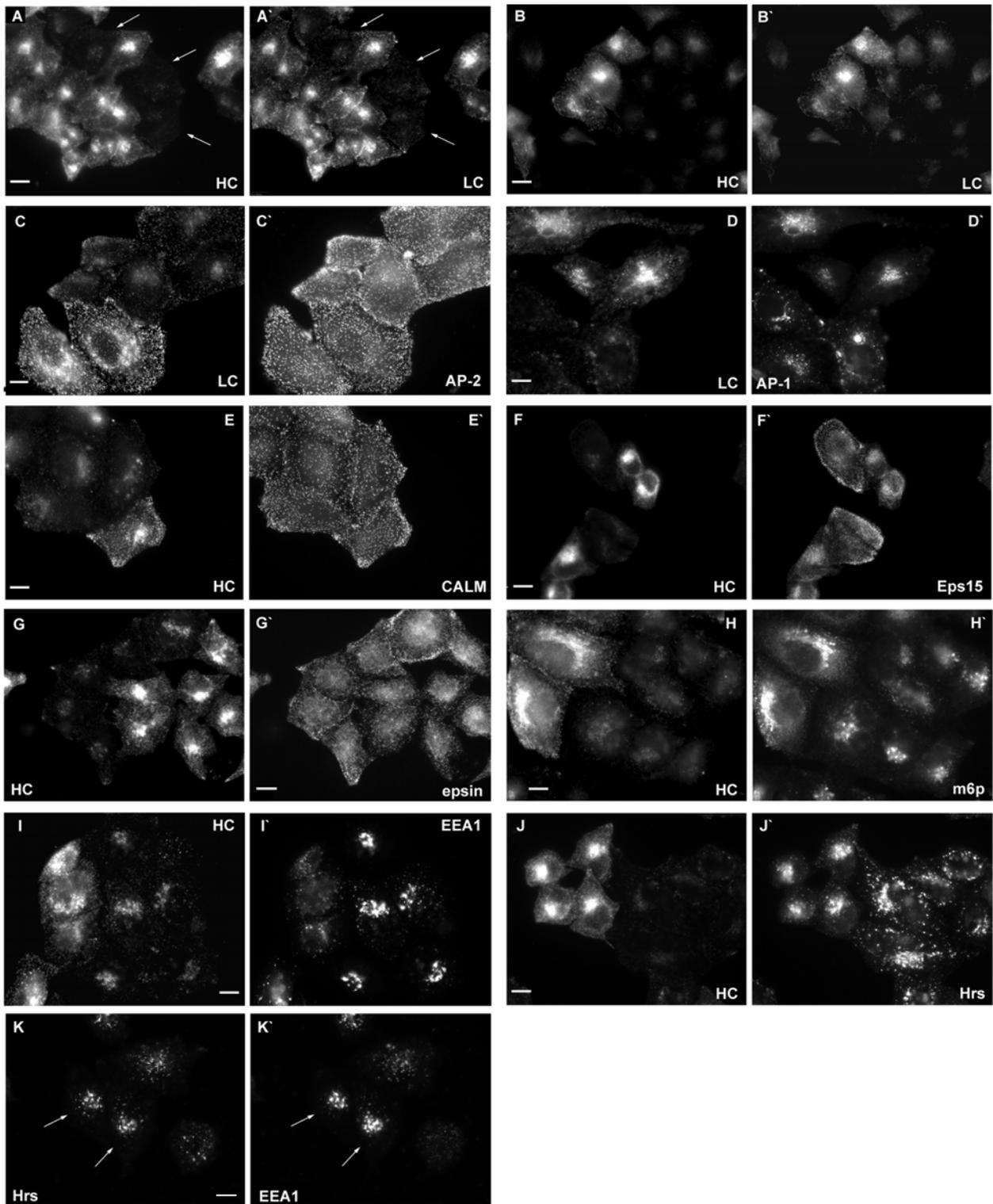


Abbildung 3-6: Effekte der Clathrin Suppression in der Immunfluoreszenz: Um Kontroll- und siRNA transfizierte Zellen gemeinsam abbilden zu können, wurden die Zellen 24 h nach der Transfektion trypsinisiert, gemischt und wieder ausplattiert.

Die Zellen wurden auf Clathrin schwere Kette (HC) mit X22 (A) und B)) oder leichte Kette (LC) mit R461 (A') und B'')) gefärbt. Die Zellen in A wurden mit Clathrin Oligo I transfiziert, die Zellen in B mit Oligo II. Die Pfeile deuten auf Zellen mit starker Clathrin Reduktion. Die Zellen in C bis K wurden mit Clathrin Oligo I behandelt. Doppelfärbungen wurden für folgende Proteine erstellt:

C) und C'): LC mit R461 gegen Clathrin leichte Kette, AP-2 mit AP.6 gegen die α -Adaptin Untereinheit des Komplexes; D) und D'): LC mit R461 und AP-1 mit 20D6, dem Antikörper gegen die γ -Adaptin Untereinheit des Komplexes; E) und E'): HC und Anti-CALM; F) und F'): HC und Anti-Eps15; G) und G'): HC und Anti-Epsin; H) und H'): HC und Mannose-6-Phosphat Rezeptor mit dem polyklonalen Antikörper; I) und I'): HC und EEA1 mit polyklonalem Antikörper; J) und J'): HC und Hrs; K) und K'): Hrs und EEA1 mit monoklonalem Antikörper. Der Balken entspricht 10 μ m.

Die Markierung der leichten Kette Clathrins mit dem affinitätsgereinigten polyclonalen Serum R461, zeigte dabei ein geringfügig stärkeres Signal als der Antikörper gegen die schwere Kette X22. Dies beruht vermutlich darauf, dass der polyklonale Antikörper insgesamt verschiedene Epitope erkennen kann oder die leichten Ketten für Antikörper leichter zugänglich sind. Nichtsdestotrotz konnten beide Antikörper als sichere Anzeiger für ein Verschwinden von Clathrin verwendet werden. Zwei Tage nach der Transfektion war in der Regel noch eine schwache Färbung von Clathrin in allen Zellen zu erkennen. Besonders auffällig war diese in der Region um den Zellkern, welche vermutlich das Trans-Golgi-Netzwerk darstellt. Dieses Resultat konnte bei Benutzung des zweiten Oligomers („Clathrin Oligo II“) wiederholt werden. Im nächsten Schritt wurde die Verteilung des Adaptorproteinkomplexes 2 untersucht. AP-2 zeigt in den Kontrollzellen an der Plasmamembran ein typisches gepunktetes Muster, welches Clathrin bedeckte Strukturen an der Plasmamembran repräsentiert. In mit Clathrin siRNA behandelten Zellen blieb dieses Muster erhalten, lediglich die Intensität der Fluoreszenz nahm geringfügig ab. Zusätzlich wurde eine diffuse Hintergrundfärbung sichtbar, welche vermutlich durch einen höheren Anteil an cytosolischem AP-2 hervorgerufen wurde. Diese Vermutung konnte später durch Zellfraktionierungsexperimente untermauert werden (siehe Abbildung 3-7).

Auch das Färbungsmuster von AP-1 in der Immunfluoreszenz bei HeLa-Zellen ist sehr charakteristisch: Das Protein ist hauptsächlich um den Bereich um den Zellkern lokalisiert, in der sich das TGN befindet. Es gibt aber auch eine schwache Färbung in peripheren Regionen (11). In den transfizierten Zellen zeigten sich die AP-1 positiven Strukturen viel stärker um den Kern hin zusammengezogen. Dies deutet auf eine Veränderung des Trans-Golgi-Netzwerkes insgesamt hin (D und D').

Neben Clathrin und den Adaptoren spielen bei Clathrin vermittelten Transportvorgängen auch noch sogenannte akzessorische Proteine eine Rolle. Hierzu zählen unter anderem CALM, Epsin und Eps15. Um zu untersuchen, ob Clathrin einen Einfluss auf die Verteilung dieser Proteine hat, wurden Immunfluoreszenzen angefertigt. Die Verteilung von CALM, welches in Kontrollzellen an der Plasmamembran perfekt mit AP-2 (26) kolokalisiert, änderte sich nicht signifikant (E und E'). Zum Teil war eine leicht schwächere Fluoreszenz zu verzeichnen. Während die Verteilung und Intensität von Epsin (G und G') in Clathrin depletierten Zellen unverändert blieb, nahm die Fluoreszenzintensität von Eps15 (F und F') zu. Letzteres Protein zeigte allerdings weiterhin das typische Verteilungsmuster, welches mit dem seines Bindungspartners AP-2 identisch ist. Die Veränderung in der Fluoreszenzintensität lag

vermutlich darin begründet, dass Eps15 ohne Clathrin in der Zelle leichter für den Antikörper erreichbar war. Eine später durchgeführte biochemische Untersuchung zeigte, dass die Menge an Membran gebundenem Eps15 in den Clathrin siRNA behandelten Zellen nicht anstieg, sondern sank (Abbildung 3-7).

Insgesamt ließ sich aus diesen Immunfluoreszenzen folgern, dass keines der untersuchten Proteine Clathrin für seine stabile Assoziation an die Plasmamembran benötigt.

Da Clathrin vermittelte Transportvorgänge auch für die Sortierung des Mannose-6-Phosphat-Rezeptors vom TGN zum Endosom verantwortlich sind und vermutlich auch für ihren Rücktransport von dort benötigt werden, wurde die Untersuchung auf Proteine des TGN ausgedehnt. Die Färbung des Mannose-6-Phosphats zeigte eine stärkere Konzentration des Moleküls am Kern (H und H'). Während das Protein in Kontrollzellen halbmondförmig um den Kern verteilt war, war in Clathrin depletierten Zellen die Färbung auf eine viel kleinere Region zusammengezogen.

Das Protein EEA1 gilt als Markerprotein für das frühe Endosom. Es ist in Kontrollzellen in der Regel gleichmäßig verteilt. In Zellen, in denen Clathrin ausgeschaltet worden war, zeigte sich dagegen eine Aggregation des Proteins, verbunden mit einem starken Anstieg der Fluoreszenzintensität (I und I'). Eine ähnliche Beobachtung wurde schon von Bennet et al. gemacht: Nach der Überexpression eines Konstruktes, welches nur aus der C-terminalen Region der Clathrin schweren Kette bestand, den so genannten Clathrin-Naben, auch „Hubs“ (100) genannt, zog sich der Golgi-Apparat scheinbar um den Kern zusammen.

Das Protein Hrs spielt eine wichtige Rolle bei der Sortierung von Proteinen aus den Endosomen in die sogenannten multivesikulären Körperchen. Es rekrutiert dabei Clathrin (86), welches bei diesem Transportprozess ein flaches Netz an der Membran dieser Strukturen bildet. Interessanterweise zeigt sich die Hrs Färbung in transfizierten Zellen viel verstreuter als in den Kontrollen (J und J'). Hrs zeigt eine teilweise Kollokalisierung mit EEA1 in Baby-Hamster-Nierenzellen (BHK1) (86). Diese kann auch in HeLa-Zellen beobachtet werden und blieb auch nach der Suppression von Clathrin erhalten (K und K').

3.2.1.2 Biochemische Analyse der Zellen nach Clathrin RNAi

Um auch biochemisch zu untersuchen, ob die Assoziation von Adaptor- oder akzessorischen Proteinen an Membranen von der Ausschaltung von Clathrin betroffen war, wurde eine Zellfraktionierung durchgeführt. Dazu wurden die Zellen zwei Tage nach der Transfektion gewaschen, und durch Einfrieren auf Trockeneis lysiert. Es wurde dabei Puffer W verwendet, in welchem Clathrin bedeckte Vesikel (aufgereinigt nach R. Lindner, 1994 (101)) stabil blieben (Abbildung 3-7 A). Im Gegensatz zum Isolationspuffer für Clathrin bedeckte Vesikel förderte er jedoch auch nicht die spontane Zusammenlagerung von Clathrin bedeckten Vesikeln (keine Abbildung). Durch Ultrazentrifugation wurden Membran- und Cytosolfraction voneinander getrennt. Beide Fraktionen wurden in SDS-Probenpuffer aufgenommen und mit SDS-PAGE und Western-Blot analysiert (3-7 B). Die Analyse zeigte, dass der Anteil von Membran gebundenem Clathrin in den siRNA behandelten Zellen im Vergleich zu den Kontrollen von 50% auf 80% anstieg. Ebenso war der Anteil an AP-1 an der Plasmamembran erhöht. Im Gegensatz dazu war der Anteil von gebundenem AP-2 und Eps15 stark reduziert. Die Prozentzahlen der Reduktion waren dabei nahezu identisch, was die enge Verbindung beider Proteine widerspiegelt (Benmerah A. et al. 1998). Auch CALM war in den RNAi Ansätzen etwas weniger plasmamembranassoziiert. Für Epsin und Dynamin (3-7 C) ließ sich keine Änderung beobachten. Insgesamt konnte bei keinem der untersuchten Proteine eine Änderung der Gesamtmenge in der Zelle festgestellt werden. In Bezug auf Dynamin konnten damit die Aussagen einer Publikation aus dem Jahre 2003 (102) nicht bestätigt werden (Abbildung 3-7 C). Hier war nach einer Clathrin Reduktion von 10%, herbeigeführt durch Antisense RNA, eine 10fache Zunahme der zellulären Dynaminkonzentration beobachtet worden.

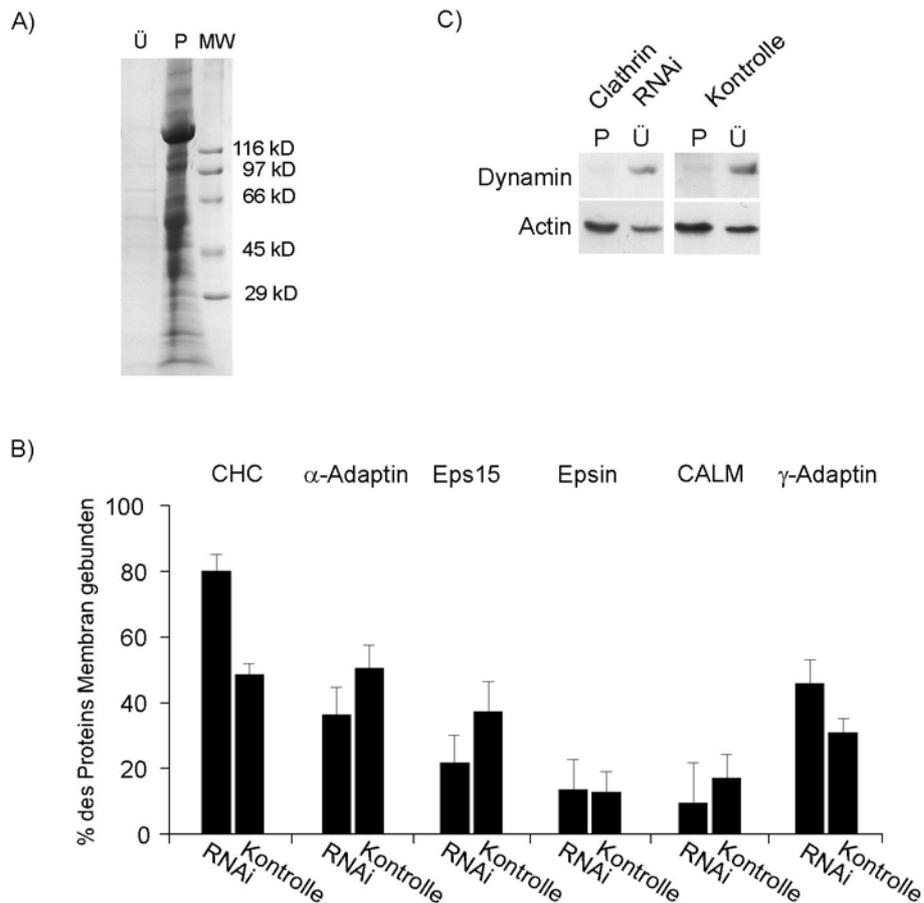


Abbildung 3-7 Effekt der Ausschaltung von Clathrin auf die Membranassoziation von Adaptoren oder akzessorischen Proteinen:

- A) Stabilität von Clathrin bedeckten Vesikeln in Puffer W: Clathrin bedeckte Vesikel wurden für 15 min auf Eis mit Puffer W inkubiert und anschließend pelletiert. Überstand (Ü) und Pellet (P) wurden mit SDS-Page analysiert. Es konnte fast kein Protein im Überstand gemessen werden, die Vesikel zerfallen im Puffer folglich nicht. MW: Molekulargewichtsmarker.
- B) Membran Assoziation von Hüll- und Akzessorischen Proteinen nach Clathrin RNAi.: HeLaSS6 Zellen wurden mittels Einfrieren und Auftauen lysiert, und mit Hilfe von Ultrazentrifugation in eine Cytosol und eine Membranfraktion aufgeteilt. Beide Fraktionen wurden mit Hilfe von SDS-Page und Western-Blot analysiert. Der Fehlerbalken zeigt die Abweichungen dreier unabhängiger Proben, die jeweils doppelt im Western-Blot analysiert wurden, untereinander an.
- C) Effekt von Clathrin RNAi auf die intrazelluläre Dynaminkonzentration

3.2.1.3 Ultrastrukturelle Analyse der Zellen nach Clathrin RNAi

Clathrin bedeckte Vesikel und Einstülpungen sind unter dem Elektronenmikroskop leicht zu erkennen und zu beobachten. Da die ersten genauen Beschreibungen der Clathrin vermittelten Endocytose aus den sechziger Jahren des letzten Jahrhunderts an Ultradünnschnitten von Zellen unter dem Elektronenmikroskop gewonnen worden waren (103), lag es nahe, die Auswirkungen eines Clathrin Knockdowns mit dieser Methode zu untersuchen.

Kontroll- und transfizierte HeLaSS6 Zellen wurden 48h nach der Transfektion fixiert und wie im Methodenteil beschrieben eingebettet, ultradünn geschnitten und kontrastiert.

Wie erwartet wurde in den Clathrin RNAi Zellen eine starke Reduktion an Clathrin bedeckten Strukturen beobachtet (mindestens 60% Reduktion). Für eine quantitative Untersuchung wurden in drei unabhängigen Experimenten jeweils zehn komplette Zellprofile ausgezählt: Hierbei konnte festgestellt werden, dass sich das Verhältnis von flachen (definiert durch eine größere Breite als Tiefe) zu tiefen Einstülpungen (definiert durch eine größere Tiefe als Breite) von 0,6 in den Kontrollzellen zu 2,3 in mit siRNAs gegen Clathrin behandelten Zellen änderte (Abbildung 3-8 A). Die Anzahl der flachen Einstülpungen nahm in letzteren im Verhältnis zu den tiefen folglich stark zu. Auffällig war auch das Auftauchen von direkt nebeneinander liegenden flachen Clathrin bedeckten Einstülpungen (Abbildung 3-8 B). Strukturen, die als Clathrin bedeckte Vesikel interpretiert werden konnten, fehlten fast vollständig.

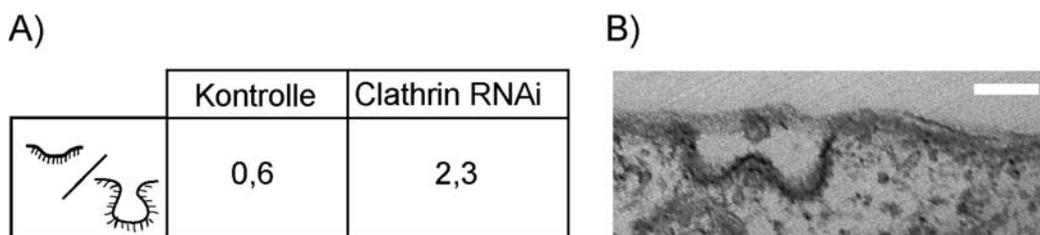


Abbildung 3-8: Auswertung der Ultradünnschnitte

- A) Das Verhältnis von flachen zu tiefen Einstülpungen stieg von 0,6 in den Kontrolle auf 2,3 in den „*Knockdown*“ Zellen.
- B) Sofern überhaupt Clathrin bedeckte Einstülpungen in den *Knockdowns* zu finden waren, so waren diese meist flach. Auffällig war dabei das Auftauchen von mehreren flachen Einstülpungen direkt nebeneinander. Der Balken entspricht 100 nm.

Insgesamt zeigen diese Daten, dass der Einstülpungsvorgang ohne Clathrin behindert wird.

Bei der statistischen Auswertung der Präparate war allerdings zu berücksichtigen, dass unter dem Elektronenmikroskop nicht zwischen transfizierten und nicht-transfizierten Zellen unterschieden werden konnte. Da die Transfektionseffizienz nie ganz 100% erreichte, musste davon ausgegangen werden, dass auch Zellen, in denen keine Reduktion von Clathrin zu verzeichnen war, ausgezählt wurden. Die tatsächlichen Effekte könnten also noch ein wenig drastischer sein, als die Zahlen beschreiben.

Eine Auswertung der Ultradünnschnittpräparate auf Veränderungen von Clathrin bedeckten Vesikeln ist zeitraubend, eine genaue Aussage über Veränderungen der Morphologie nicht möglich. Es wurde daher die bereits zu Beginn der Ergebnisse beschriebene „Abreiß“-Methode angewandt:

Zweiundsiebzig Stunden nach der Transfektion mit Clathrin siRNA wurden Platin-Replicae von Plasmamembranfragmenten hergestellt. Die Betrachtung unter dem Elektronenmikroskop zeigte wie erwartet das fast vollständige Fehlen von Clathrin bedeckten Strukturen. Selten erblickte man einzelne flache Einstülpungen, die dann jedoch von verkrüppelter Erscheinung waren (Abbildung 3-9).

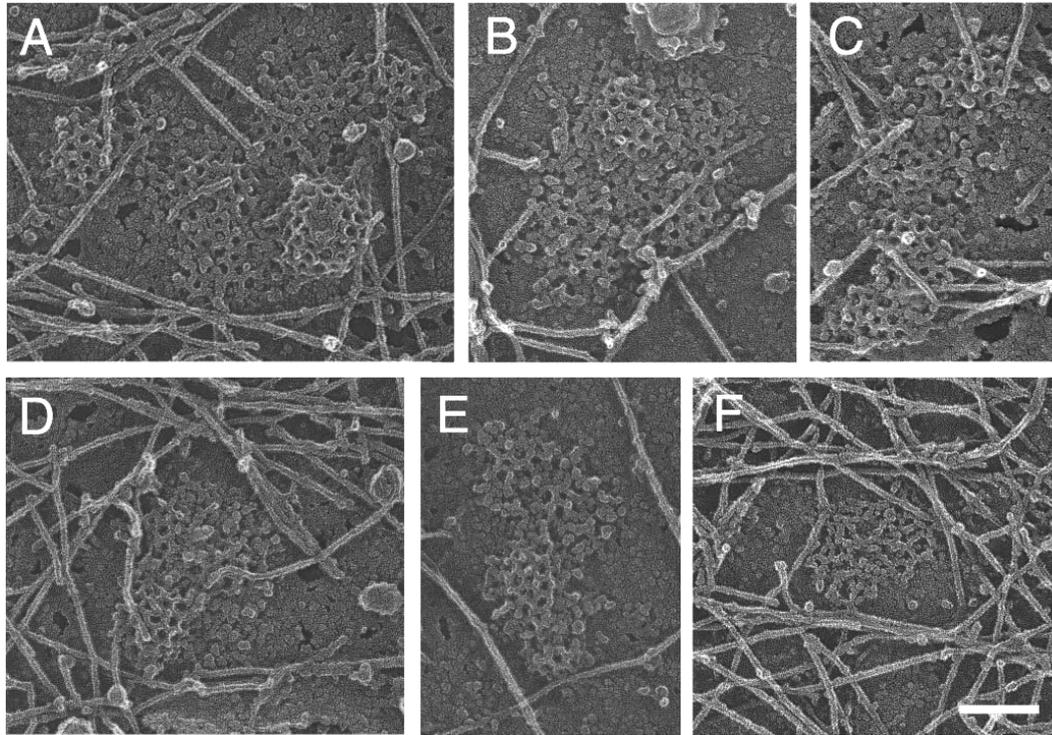


Abbildung 3-9: Morphologie von Clathrin siRNA transfizierten Zellen an der Plasmamembran: Die Bilder sind so angeordnet, dass sie von A nach F eine sinkende Konzentration von Clathrin an der Membran suggerieren sollen. Während die Strukturen in A noch gut an Clathrin bedeckte Strukturen unbehandelter Zellen erinnert (siehe Abbildung 3-4), so tun sie es in B – F immer weniger. In F ist kein Clathrin mehr zu erkennen. Stattdessen tritt immer deutlicher eine andere, flache Struktur zu Tage, die sich ebenfalls deutlich von der Plasmamembran unterscheidet. In den Kontrollen ist diese Struktur unter dem Clathrin Netzwerk verborgen. Der Balken entspricht 100 nm.

Diese Strukturen befanden sich dabei häufig auf flachen Unterstrukturen, welche sich von der übrigen Plasmamembran unterschieden. Es schien, als ob es sich dabei um eine vorgefertigte Plattform handelte, auf der in „normalen“ Zellen Clathrin gebunden hätte. Da in den siRNA transfizierten Zellen das Clathrin fehlte, um diese Strukturen zu besetzen, waren diese jetzt für den Beobachter sichtbar.

Die Strukturen, die noch von Clathrin besetzt waren, waren häufig flach eingestülpt (vergleiche Abbildung 3-9 A).

Die Tatsache, dass sich die Immunfluoreszenzfärbung von AP-2 fast nicht geändert hatte, legte die Vermutung nahe, dass es sich bei der „Unterstruktur“ um eine AP-2 bedeckte Struktur handelte. Zur Bestätigung dieser Hypothese wurden die Plasmamembranfragmente

daher mit Antikörpern gegen AP-2 markiert. Der primäre Antikörper wurde mit einem mit Gold markierten Zweitantikörper sichtbar gemacht (Abbildung 3-10):

Die in den Zellen, in denen Clathrin ausgeschaltet worden war, beobachteten flachen Strukturen waren deutlich AP-2 positiv. Durch Kippen der Proben mit dem Goniometer des Elektronenmikroskops konnten 3D-Aufnahmen erstellt werden, die zeigten, dass diese vollständig flach waren (3-10 E). Clathrin ist also essentiell für die Einstülpung der Plasmamembran.

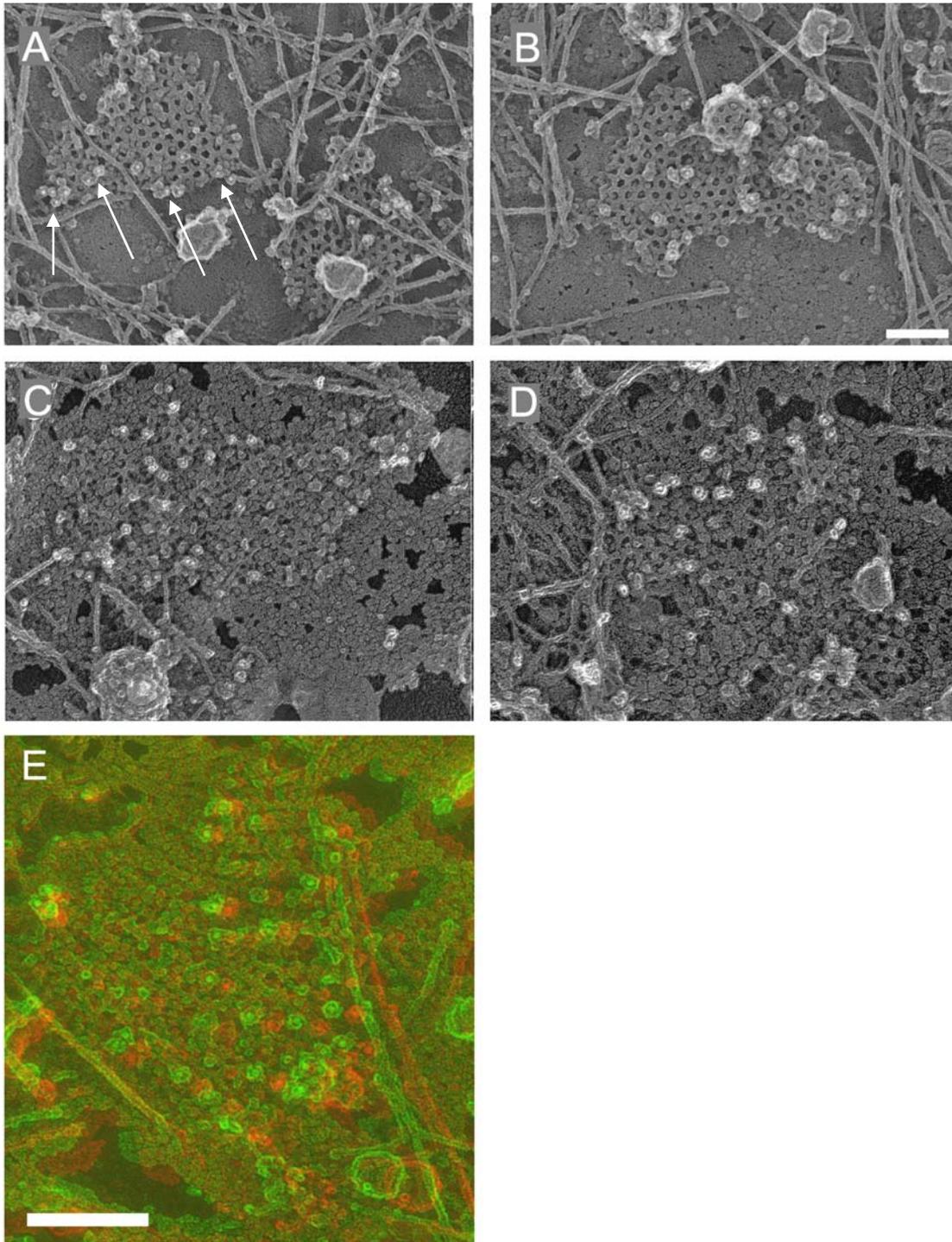


Abbildung 3-10 Markierung von AP-2 mittels des Antikörpers AP.6 und 10nm Gold-markiertem Zweitantikörper an der Plasmamembran:

A) und B): Kontrollzellen, das Clathrin Netzwerk zeigt gelegentliche Antikörpermarkierung: (weiße Punkte von grauem Rand umgeben; das sehr elektronendichte Gold erscheint im Negativ als weißer Punkt, die aufgedampfte Platinschicht zeigt sich als grauer Rand um den Antikörper herum, siehe Pfeile)

C) und D): Clathrin RNAi: Es ist fast kein Clathrin-Netzwerk mehr vorhanden. Man sieht eine flache Struktur, die sich deutlich von der Plasmamembran abhebt und von Antikörpern besetzt ist.

E): 3D Aufnahme von AP-2 positiven Flächen nach Clathrin RNAi: Die Zellen wurden 72h nach der Transfektion für die Elektronenmikroskopie präpariert und jeweils aus einem Winkel von $+6^\circ$ und -6° fotografiert. Die Aufnahmen wurden in rot beziehungsweise grün eingefärbt und in Adobe Photoshop unter Verwendung der Ebenenoption „negativ multiplizieren“ in einem Bild übereinander gelegt. Bei Betrachtung mit der beigelegten 3D-Brille erscheinen die Bilder dreidimensional. Die zu beobachtende Struktur ist flach. Dem Balken entsprechen 125 nm.

3.2.2 Ausschaltung der leichten Ketten Clathrins mittels RNAi

Die Funktion der leichten Ketten von Clathrin (LC) ist bisher weitgehend ungeklärt. Es ist bekannt, dass die leichten Ketten die Zusammenlagerung von schweren Ketten bei physiologischem pH-Wert unterbinden (Liu et al.), trotzdem weiß man bisher nicht, warum es in Säugern zwei verschiedene Sorten von leichten Ketten gibt (LCa und LCb). Obwohl für LCb eine höhere Affinität zu schweren Ketten *in vitro* nachgewiesen wurde (12), beobachtet man eine rein zufällige Anordnung der leichten Ketten auf Clathrin Triskelia. LCb lässt sich phosphorylieren, während dieses bei LCa nicht möglich ist. Versuche, LCb mit Exocytose in Verbindung zu bringen, waren bisher nicht restlos überzeugend (104). Es schien daher interessant, die leichten Ketten Clathrins ebenfalls mit RNAi auszuschalten, um eventuell die Funktion dieser Moleküle entschlüsseln zu können. Da auf der anderen Seite die Erfahrung gemacht wurde, dass die leichten Ketten alleine ohne die schweren Ketten nicht stabil waren, lag die Vermutung nahe, dass auch die Ausschaltung der leichten Ketten zu einer Reduzierung der Gesamtmenge an Clathrin führen würde. Es wurde jeweils ein Oligomer getestet: eines gegen LCa und eines gegen LCb. Die Ergebnisse im Western-Blot zeigten, dass höchstwahrscheinlich nur das gegen LCa effektiv war (Abbildung 3-11).

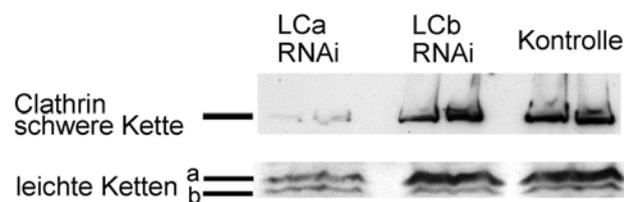


Abbildung 3-11: Western-Blot eines Clathrin leichte Ketten siRNA Experimentes: Die Zellen wurden 72 h nach der Transfektion lysiert und anschließend analysiert. Die leichte Kette wurde mit R460 nachgewiesen.

Nach der Transfektion von HeLaSS6 mit diesem Oligomer kam es zu einer starken Reduzierung der intrazellulären Clathrin Konzentration. Sowohl das Signal für die schwere Kette, als auch dasjenige für die schwerere der leichten Ketten (LCa) wurde schwächer. Nach Transfektion der Zellen mit siRNAs gegen LCb konnte keinerlei Änderung in den Bandenintensitäten festgestellt werden. Auch die Verwendung des Serums R461, welches hauptsächlich LCb erkennt, ergab kein anderes Ergebnis. Es wurde daher angenommen, dass das verwendete Oligomer ineffektiv war. Tatsächlich beschrieben Huang et al. 2004 eine ebenfalls ineffektive siRNA gegen LCb (77). Diese unterschied sich von der hier verwendeten nur um ein Basenpaar (GAAGGTGGCCCAGCTATGT statt

AAGGTGGCCCAGCTATGTT). Offensichtlich ist auch die schwere Kette allein nicht stabil, sondern nur der Gesamtkomplex hat in der Zelle Bestand. Einzelne Untereinheiten werden degradiert.

3.2.3 Ausschaltung des AP-2 Komplexes mittels RNAi

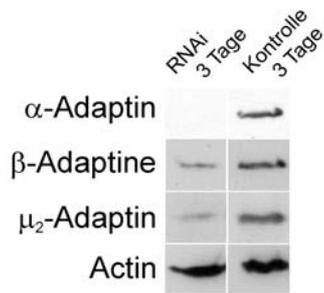
Der AP-2 Komplex gilt als der Hauptorganisator aller Clathrin bedeckten Strukturen an der Plasmamembran. Er rekrutiert Clathrin und interagiert sowohl mit Frachtmolekülen, Membranlipiden als auch akzessorischen Proteinen. In jüngster Zeit wurde die Rolle von AP-2 als alleiniger Adaptor an der Plasmamembran jedoch in Frage gestellt, als gezeigt werden konnte, dass AP180/CALM *in vitro* Clathrin zu rekrutieren vermochte. Es schien daher von Interesse, AP-2 mittels RNAi auszuschalten. Die hierzu verwendeten siRNAs hatten beide die mRNA der α -Adaptin Untereinheit des AP-2 Komplexes als Ziel. Untersuchungen im Western-Blot zeigten, dass diese schon 24h nach der Transfektion zu 95% verschwunden war (Abbildung 3-12 B). Das Molekül hat folglich nur eine sehr kurze Halbwertszeit.

Auch die anderen Untereinheiten nehmen nach der Transfektion mit der RNA gegen α -Adaptin in ihrer Konzentration ab (Abbildung 3-12 A). Nach drei Tagen betrug die der μ -Untereinheit nur noch 30% derjenigen der Kontrolle. Für die β -Adaptin Untereinheit war nur eine Reduktion um 20% zu verzeichnen. Dieser Unterschied lässt sich allerdings damit erklären, dass der verwendete Antikörper 100/1 auch die β -Adaptin Untereinheit von AP-1, welche der von AP-2 sehr ähnlich ist, erkennt (82).

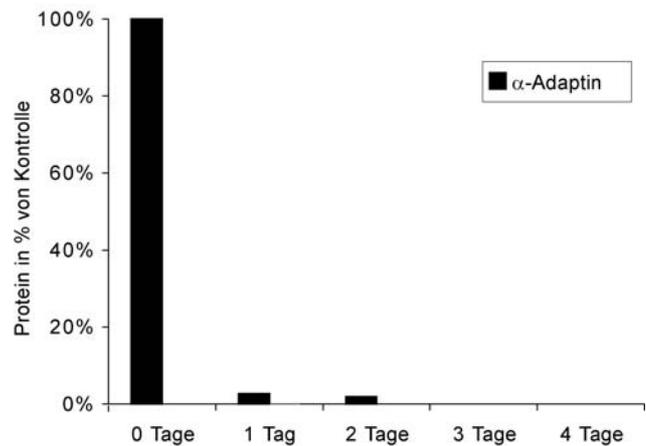
Die Ausschaltung von α -Adaptin führte also zu einer AP-2 Depletion. Wie bei Clathrin sind auch hier die einzelnen Untereinheiten alleine nicht stabil.

Eine weitere Kontrolle, die die Spezifität der Methode RNAi zeigen sollte, war die Transfektion von Mäusefibroblasten (NIH/3T3) mit α -Adaptin Oligo I. Da die Zielsequenz zwischen Maus und Mensch konserviert ist, konnte man auch bei diesen Zellen eine Reduktion von α -Adaptin verzeichnen (Abbildung 3-12 C).

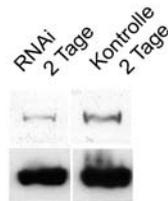
A) HeLaSS6



B)



C) NIH 3T3

**Abbildung 3-12: Western-Blot einer Transfektion von HeLaSS6 mit α -Adaptin dsRNA (Oligo I):**

- A) Western-Blot Analyse von mit α -Adaptin RNAi Zellen und Kontrollzellen. Die Lysate wurden 72h nach der Transfektion hergestellt, es wurden jeweils α -Adaptin, die β -Adaptine (sowohl β_1 - als auch β_2 -Adaptin), μ_2 -Adaptin oder Actin sichtbar gemacht. Die Transfektion mit α -Adaptin siRNA resultiert in einem allgemeinen AP-2 „Knockdown“.
- B) Zeitverlauf der α -Adaptin RNAi, die Intensitäten der Western-Blot Banden wurden densitometrisch ausgewertet und durch die Intensität des Actin Signals geteilt, um Unterschiede in der Gesamt-Proteinkonzentration auszugleichen. Die Kontrollen wurden jeweils gleich 100% gesetzt. Man beachte, dass α -Adaptin bereits nach 24h zu über 90% verschwunden ist.
- C) Western-Blot Analyse von α -Adaptin siRNA transfizierten NIH/3T3 Mäusefibroblasten. Der RNA Duplex führt auch in diesen Zellen zu einer Reduktion des Makromoleküls.

Der Einfluss der Ausschaltung von AP-2 auf das Zellwachstum war nicht so stark wie bei Clathrin, vermutlich deshalb, weil Clathrin im Gegensatz zu AP-2 auch noch an anderen Transportvorgängen innerhalb der Zelle beteiligt ist.

Die Effekte der α -Adaptin RNAi Experimente wurden ebenfalls in der Immunfluoreszenz untersucht (Abbildung 3-13):

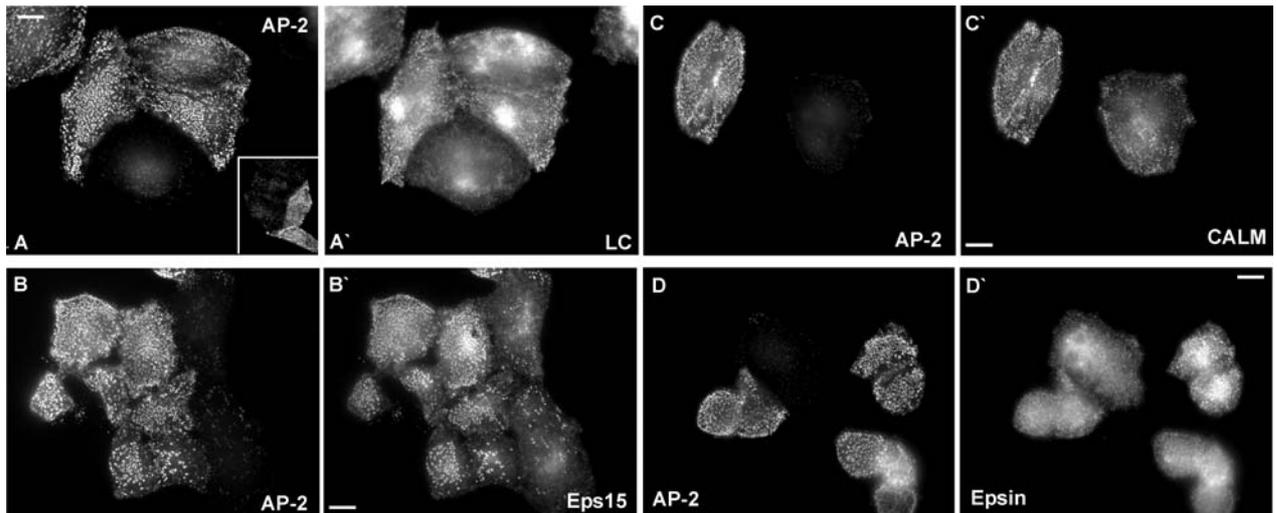


Abbildung 3-13: Effekte der Ausschaltung von α -Adaptin in der Immunfluoreszenz:

Um Kontrollen und siRNA transfizierte Zellen auf einem Foto abbilden zu können, wurden die Zellen 24 h nach der Transfektion trypsinisiert, gemischt und wieder ausplattiert.

Die Zellen wurden auf α -Adaptin mit AP.6 (A, B, C, D) und Clathrin leichte Kette (LC)(A') oder CALM (C'), Eps15 (B') oder Epsin (D') gefärbt. Der Balken entspricht 10 μ m.

Nicht verwunderlich war, dass die Färbung von Clathrin an der Plasmamembran fast vollständig verschwand (Abbildung 3-13 A), während die Färbung am Golgi weitgehend unberührt blieb: Clathrin benötigt AP-2 für die stabile Assoziation mit der Plasmamembran, während für die Assoziation an die Golgi Membran AP-1 notwendig ist. Abbildung 3-13 B zeigt den Einfluss von α -Adaptin RNAi auf die Plasmamembranassoziation von Eps15. Sie ist fast vollständig verschwunden. AP-2 wird folglich auch für die Rekrutierung dieses Moleküls benötigt. Ein ähnlicher Effekt wurde auch für CALM beobachtet (Abbildung 3-13 C). Weitgehend unbeeinflusst blieb dagegen die Färbung von Epsin.

Die Ergebnisse der Immunfluoreszenz wurden durch die Ergebnisse der Zellfraktionierung bestätigt (Abbildung 3-14). Die Assoziation von Clathrin an die Plasmamembran sank um 30%, die von Eps15 um 80% und die von CALM um 50%. Die Membranbindung von übrigem α -Adaptin stieg hingegen um 25% an. Keine Effekte wurden für Epsin beobachtet.

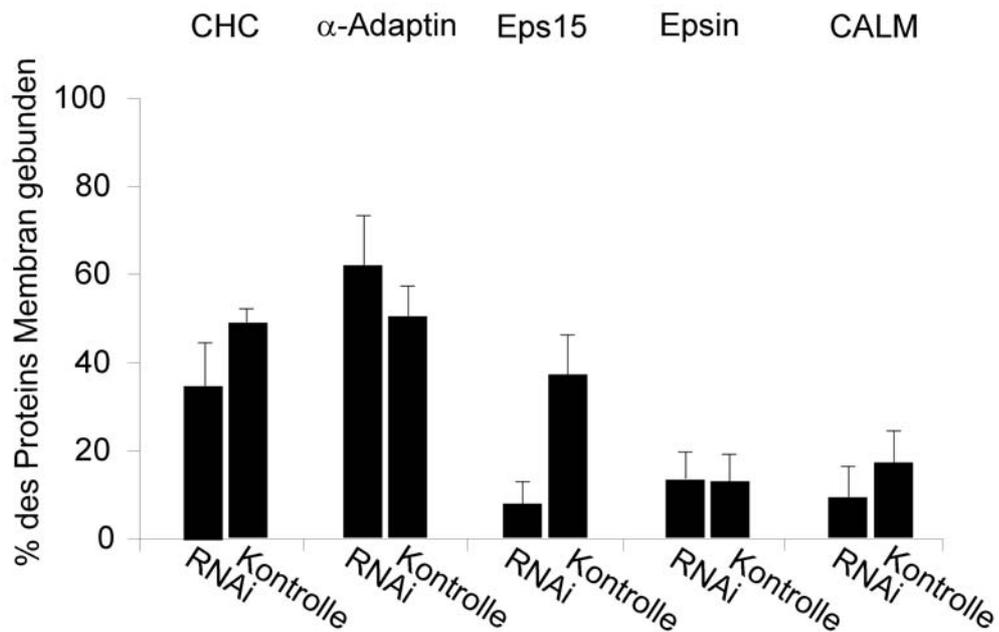


Abbildung 3-14: Effekt der Reduktion von AP-2 auf die Membranassoziation von Adaptoren oder akzessorischen Proteinen: Membranassoziation von Hüll- und Akzessorischen Proteinen nach α -Adaptin RNAi: HeLaSS6 Zellen wurden mittels Einfrieren und Auftauen lysiert, und mit Hilfe von Ultrazentrifugation in eine Cytosol- und eine Membranfraktion aufgeteilt. Beide Fraktionen wurden mit Hilfe von SDS-Page und Western-Blot analysiert. Der Fehlerbalken zeigt die Abweichungen dreier unabhängiger Proben, die jeweils doppelt im Western-Blot analysiert wurden, untereinander an.

Insgesamt kann man aus diesen Ergebnissen schließen, dass AP-2 für die Bindung von Clathrin, CALM und Eps15 an die Plasmamembran von großer Bedeutung ist. Epsin ist dagegen weitgehend unabhängig von AP-2.

Wie bei den Experimenten mit Clathrin siRNAs wurden auch elektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Die Untersuchung von Plasmamembranfragmenten unter dem Elektronenmikroskop zeigte ein nahezu vollständiges Fehlen von Clathrin bedeckten Strukturen (Reduktion auf ca. 10%). Die vorhandenen Einstülpungen zeigten ein normales Aussehen. Flache Clathrin bedeckte Strukturen waren extrem selten und, sofern vorhanden sehr viel kleiner als in den Kontrollen (Daten nicht gezeigt). Gleiche Ergebnisse erhielt man bei der Untersuchung von Ultradünnschnitten: Es wurde ein nahezu vollständiges Fehlen von Clathrin bedeckten Strukturen an der Plasmamembran festgestellt.

3.2.4 Funktionelle Untersuchungen an Clathrin und AP-2 RNAi Zellen

3.2.4.1 Auswirkungen auf die Gesamtendocytose in HeLa Zellen

Um die Auswirkungen auf die Endocytoseleistung der HeLa Zellen zu untersuchen, wurde die Aufnahme von Meerrettichperoxidase gewählt, von der man weithin annimmt, dass sie

unspezifisch mit dem umgebenden Medium von der Zelle endocytiert wird. Die Menge an Meerrettichperoxidase in der Zelle ist folglich ein Maß für sämtliche Endocytosevorgänge. Achtundvierzig Stunden nach der Transfektion mit Clathrin oder α -Adaptin siRNA wurden die Zellen in Medium mit Meerrettichperoxidase inkubiert. Die Zellen wurden anschließend auf Eis gewaschen, lysiert und die aufgenommene Meerrettichperoxidase colorimetrisch nachgewiesen. Die Graphik zeigt, dass die Gesamtendocytoseleistung der Zellen sowohl nach Clathrin- als auch AP-2 Ausschaltung zu ca. 50% reduziert ist.

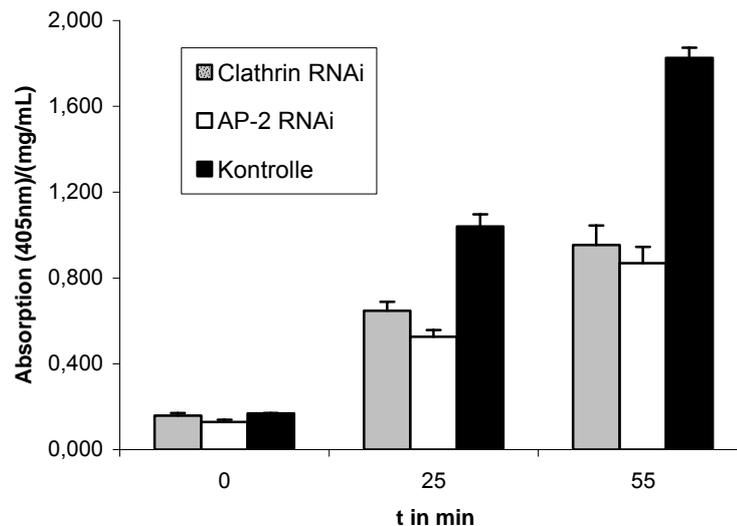


Abbildung 3-15: Aufnahme von Meerrettichperoxidase als Maß für die Gesamtendocytose der Zellen:

Beide RNAi Werte zeigen eine deutlich verringerte Endocytose. Nach diesen Ergebnissen liegt der Anteil der Clathrin-vermittelten Endocytose an der Gesamtendocytose bei 40 – 50 %. Der Fehlerbalken entspricht den Abweichungen innerhalb von drei Ansätzen.

3.2.4.2 Endocytose von Transferrin

Eisen ist für das Wachstum von Zellen von entscheidender Bedeutung. Das Molekül, welches dabei für den Eisentransport außerhalb von Zellen zuständig ist, wird Transferrin genannt. Es gilt als die klassische Sonde zur funktionellen Untersuchung von Clathrin vermittelten Endocytosevorgängen. Die Auswirkungen der Ausschaltung von AP-2 oder Clathrin auf die Transferrin-Aufnahme wurden daher untersucht:

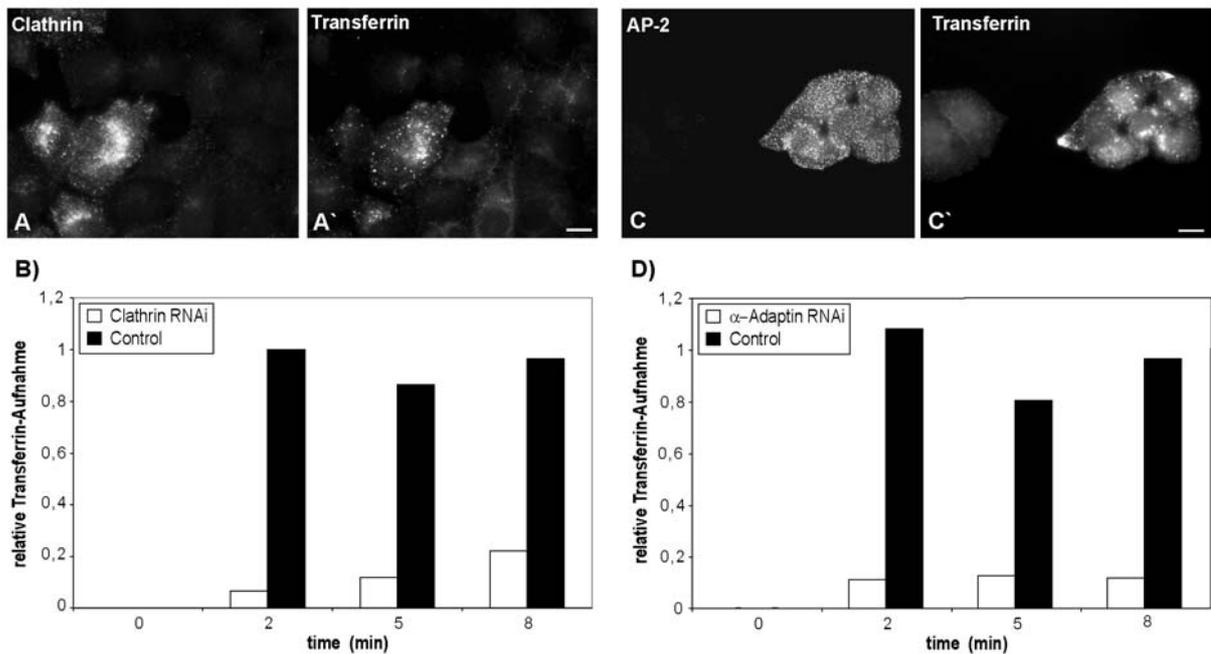


Abbildung 3-16: Effekte der Ausschaltung Clathrins mittels RNAi auf die Transferrin-Aufnahme:

A) und A'): in der Immunfluoreszenz (48h nach der Transfektion wurden HeLa SS6 zunächst für 30 min bei 37 °C mit Medium ohne Serum, dann für 1 h auf Eis mit Texas-Rot markiertem Transferrin inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und für 10 min bei 37 °C aufgewärmt. Nun wurden die Zellen gewaschen, fixiert und mit einem Antikörper gegen das ausgeschaltete Protein gefärbt.)

B): Quantifizierung im Western-Blot (Die Zellen wurden wie für die Immunfluoreszenz beschrieben behandelt, allerdings wurde Biotin-markiertes Transferrin verwendet. Nach Beendigung der Transferrin-Aufnahme bei 37 °C für die dargestellten Zeiten wurden die Zellen mit Säure gewaschen, um an der Oberfläche gebundenes Transferrin zu entfernen, lysiert und im Western-Blot untersucht. Transferrin wurde mit NeutrAvidin, an das Meerrettich-Peroxidase gebunden war, sichtbar gemacht.

Effekte der Ausschaltung alpha-Adaptins mittels RNAi auf die Transferrin-Aufnahme:

C) und C'): in der Immunfluoreszenz

D): Quantifizierung im Western-Blot

Der Balken in den Immunfluoreszenzen entspricht 10 µm.

Die Daten sowohl der Immunfluoreszenz als auch der biochemischen Analyse zeigen, dass die Transferrin-Aufnahme sowohl nach Ausschaltung von Clathrin als auch nach Ausschaltung des AP-2 Komplexes stark reduziert war (Abbildung 3-16).

3.2.4.3 Endocytose von EGF

Der Epidermis Wachstumsfaktor, kurz EGF, ist einer der besterforschten Wachstumshormone. Störungen der Regulation der durch dieses Peptidhormon ausgelösten Signalkaskade führen in vielen Fällen zu Krebs. Auch dieses Molekül sollte nach allgemeiner Auffassung Clathrin vermittelt aufgenommen werden. Die Verhältnisse waren allerdings nicht so eindeutig wie bei Transferrin.

Zunächst wurde die EGF-Aufnahme in einem sogenannten „Pulse-Chase“ Experiment überprüft. Achtundvierzig Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen dreißig Minuten

in serumfreiem Medium inkubiert. Anschließend sollte das Hormon auf Eis für eine Stunde an die Rezeptoren binden. Danach wurde mit warmem Medium gewaschen und für fünf bis fünfzehn Minuten im Brutschrank inkubiert.

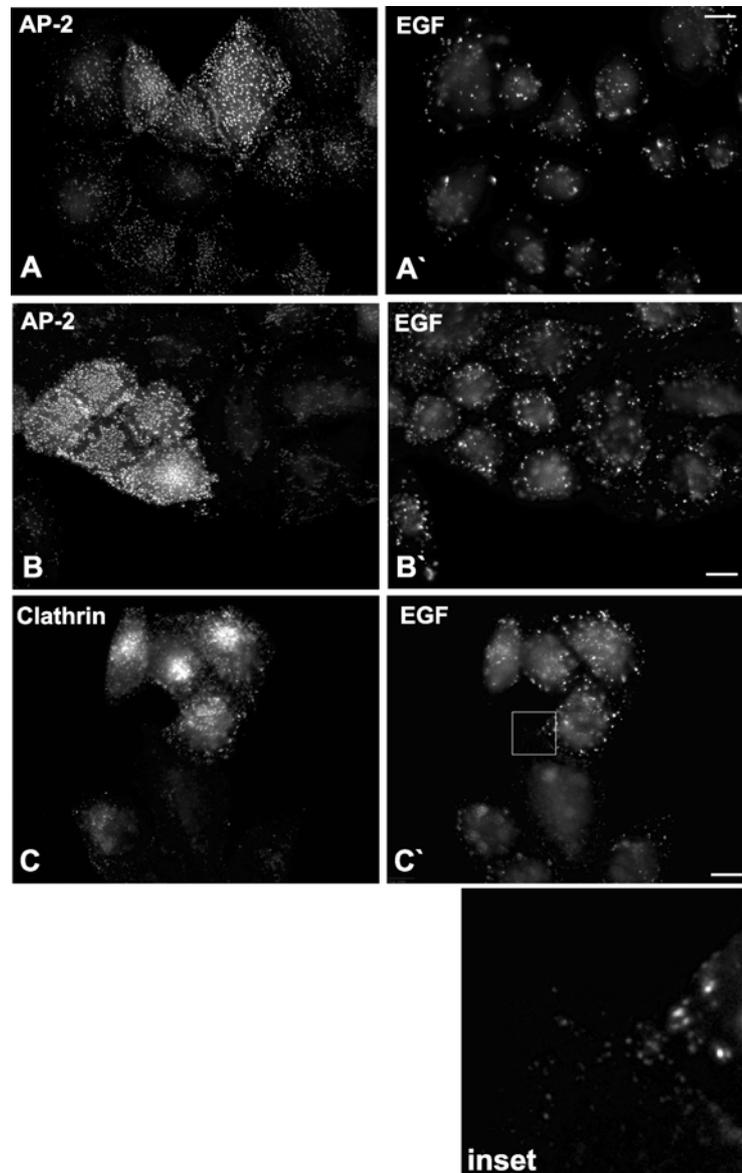


Abbildung 3-17: Effekte der α -Adaptin und Clathrin Ausschaltung auf die EGF Aufnahme:

A und A': AP-2 RNAi, 24h nach der Transfektion

B und B': AP-2 RNAi, 48h nach der Transfektion

C und C': Clathrin RNAi, 48h nach der Transfektion

Der Balken in den Immunfluoreszenzen entspricht 10 μ m. In der Immunfluoreszenz ist kein Unterschied in der EGF Aufnahme nach AP-2 RNAi zu erkennen. Nach Clathrin RNAi ist ein Unterschied deutlich sichtbar, die Fluoreszenzintensität ist geringer, das aufgenommene Clathrin aggregiert nicht wie in den Kontrollen, sondern ist viel feiner verteilt.

In Kontrollzellen aggregiert das aufgenommene Protein innerhalb von 10 Minuten in charakteristische Strukturen, welche sich mit dem endosomalen Markerprotein EEA1 färben lassen (eigene Beobachtungen; (86)).

Die Immunfluoreszenzbilder der EGF-Aufnahme zeigten nach α -Adaptin RNAi keinerlei Abweichungen von der Kontrolle. Da α -Adaptin bereits einen Tag nach der Transfektion zu über 90% reduziert ist, wurde die Aufnahme des Hormons auch am ersten Tag nach der Transfektion untersucht. Dieses sollte ausschließen, dass in den α -Adaptin siRNA transfizierten Zellen langsam ein alternativer Aufnahmeweg hochreguliert worden war. In keinem der untersuchten Ansätze ließ sich ein Unterschied zur Kontrolle erkennen (Abbildung 3-17). Sollte also ein alternativer Aufnahmeweg angeschaltet worden sein, so müsste dieses sehr schnell geschehen sein, wahrscheinlich also simultan mit dem Rückgang von AP-2. Die Ausschaltung von Clathrin zeigte einen deutlichen Effekt auf die EGF-Aufnahme: die Fluoreszenz war deutlich schwächer, der aufgenommenen EGF aggregierte nicht wie in den Kontrollzellen in EEA1 positiven Kompartimenten.

Da die EGF Aufnahmetests nach Clathrin RNAi keine eindeutigen Ergebnisse lieferten, wurde eine biochemische Untersuchung angeschlossen: Die EGF-Aufnahme wurde wiederum in einem so genannten „Pulse-Chase“ Experiment überprüft. Achtundvierzig Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen dreißig Minuten in Serum-freiem Medium inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf Eis für eine Stunde mit 10 ng / mL I-125 markiertem EGF inkubiert. Danach wurde mit warmem Medium gewaschen und den Zellen für fünf bis fünfzehn Minuten im Brutschrank die Gelegenheit gegeben, das Hormon aufzunehmen. Die Zellen wurden anschließend in der Kälte sauer gewaschen, um an der Oberfläche haftendes EGF fortzuspülen. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die aufgenommene Radioaktivität im γ -Zähler gemessen. Die erhaltenen Werte wurden auf die Proteinkonzentration normiert.

Die Ergebnisse waren zunächst verblüffend: Die Aufnahme war insgesamt nur geringfügig behindert. Der Unterschied zwischen Kontrollen und siRNA behandelten Zellen war nach 5 Minuten am stärksten (ca. 30%). Er wurde jedoch nach 10 Minuten geringer und nach 15 Minuten war sogar mehr EGF in den Zellen der RNAi Ansätze zu messen (Abbildung 3-17). Letzterer Wert könnte allerdings dadurch zustande kommen, dass in den Kontrollzellen ein Teil des EGFs mitsamt des Rezeptors recycelt wurde (vergleiche Sorkin A. et al. (1991) (105)), während dies in den Clathrin depletierten Zellen aufgrund des aus dem Gleichgewicht geratenen endosomalen Sortiersystems (siehe Immunfluoreszenz) nicht möglich war. Die gesamte Menge des aufgenommenen Hormons verblieb in der Zelle.

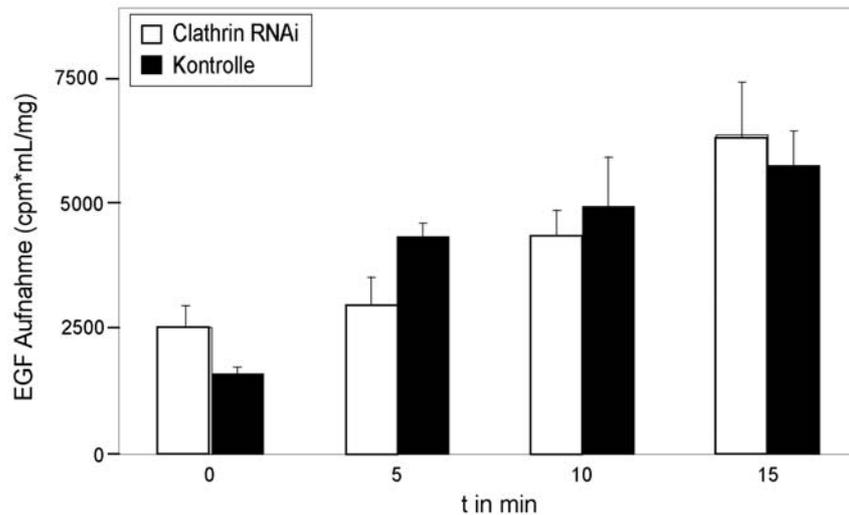


Abbildung 3-18: Aufnahme von I-125 markiertem EGF nach Clathrin RNAi in HeLaSS6 Zellen:

Die Zellen wurden vor der Aufnahme 1h auf Eis mit 10 ng/mL EGF inkubiert, mit Medium gewaschen und bei 37°C in Medium für die angegebene Zeit inkubiert. Der Fehlerbalken entspricht den Abweichungen innerhalb von drei Ansätzen.

Da die Ausschaltung von AP-2 keine Effekte auf die EGF Aufnahme hatte und der Clathrin „Knockdown“ nur einen geringen Unterschied hervorbrachte, wurde gefolgert, dass EGF in den siRNA behandelten Zellen über einen Clathrin unabhängigen Weg aufgenommen werden kann. In den Clathrin RNAi Zellen ist die Weiterleitung des EGF allerdings behindert, weshalb eine weit feinere Verteilung in der Immunfluoreszenz beobachtet wird.

Allerdings muss bei der Interpretation der Daten beachtet werden, dass zwei Tage nach der Transfektion immerhin noch 15 – 20 % des ursprünglich vorhandenen Clathrins in den transfizierten Zellen vorhanden waren. Man konnte daher vermuten, dass diese Menge vielleicht ausreichend war, genügend Clathrin aufzunehmen. Dies stünde allerdings im deutlichen Kontrast zur verringerten Transferrin-Aufnahme, die zu diesem Zeitpunkt schon zu 90% inhibiert war. Da die Effekte nach der Ausschaltung von AP-2 geringer waren als nach der Clathrins, konnte man folgern, dass möglicherweise bisher unbekannte, alternative Adaptoren die Rolle von AP-2 übernehmen könnten.

Zusammenfassend ließ sich jedoch folgern, dass AP-2 und Clathrin einen geringeren Einfluss auf die EGF Aufnahme haben als auf die Transferrin-Aufnahme.

3.2.5 Ausschaltung des Proteins CALM mittels RNAi

Als mögliche alternative Adaptoren zu AP-2 wurden immer wieder zwei Proteine genannt: zum einen Epsin, zum anderen CALM. In Kooperation mit A. Meyerholz wurde daher dieses Protein ausgeschaltet. Es wurden für die folgenden Untersuchungen zwei verschiedene siRNAs transfiziert: „Oligo I“ oder „Oligo III“. Drei Tage nach der Transfektion war die Reduktion des Proteins am effektivsten (Abbildung 3-19). Sämtliche Aufarbeitungen erfolgten daher zu diesem Zeitpunkt. Die Reduktion von CALM hatte keine Auswirkungen auf die zelluläre Konzentration von Clathrin oder AP-2 (Western-Blot Daten, nicht gezeigt).

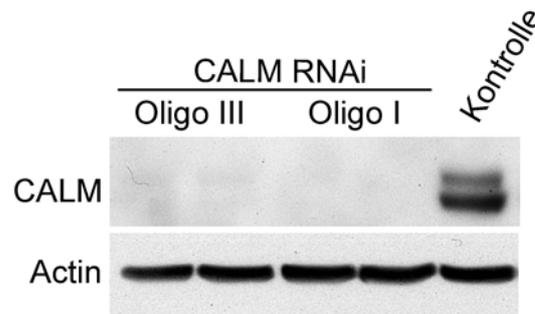


Abbildung 3-19: Western-Blot eines CALM siRNA Experimentes: Die Zellen wurden 72h nach der Transfektion lysiert. Beide RNAs führten zu einer fast vollständigen Reduktion von CALM.

Die Immunfluoreszenz zeigte ebenfalls die fast vollständige Reduktion von CALM. An der Plasmamembran beobachtete man bei der AP-2 Färbung geringfügige Änderungen: Die beobachteten Strukturen erschienen zeitweilig ein wenig größer und konzentrierten sich mehr in bestimmten Arealen.

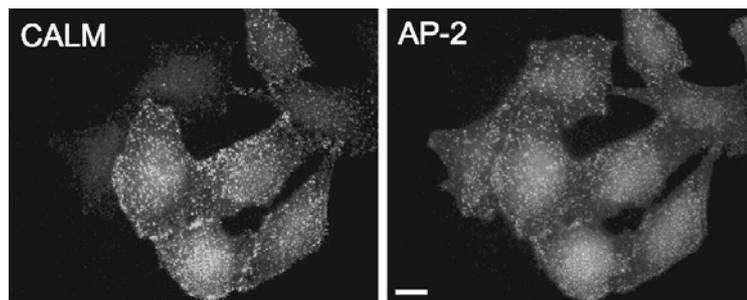


Abbildung 3-20: Immunfluoreszenzen eines CALM RNAi Experimentes: Die Zellen wurden 72h nach der Transfektion fixiert. Es wurde auf CALM und AP-2 gefärbt. AP-2 positive Strukturen an der Plasmamembran, welche mit Clathrin bedeckten Strukturen gleichgesetzt werden, erscheinen geringfügig dicker. Der Balken entspricht 10 µm. Aufnahmen von A. Meyerholz

Es erschien daher interessant, wie sich die Morphologie an der Plasmamembran ändern würde. Die Präparation von Plasmamembranfragmenten für die Elektronenmikroskopie über die „Abreißtechnik“ wurde auch für CALM RNAi Experimente angewandt. Blickte man auf die Präparate so war ein Unterschied offensichtlich: Während die Kontrollvesikel meist eine regelmäßige runde Form hatten, so zeigten die Plasmamembranen der Zellen aus den

transfizierten Ansätzen eine Vielzahl von Formen. Insgesamt waren die Vesikel meist größer und unregelmäßiger geformt (Abbildung 3-21). Häufig zeigten sie eine Wurstform und ragten weit ins Cytosol hinein (Abbildung 3-22). Andere wiesen eine gleichmäßigere XY-Ausdehnung auf, waren aber nicht so rund wie diejenigen in den Kontrollen. Ein ebenfalls häufiger beobachtetes Phänomen war das gehäufte Auftreten von so genannten „Minikäfigen“. Diese waren mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 70 nm kleiner als die Masse der Kontrollvesikel, deren Durchmesser 100 – 150 nm betrug. Die Minikäfige traten vereinzelt auch in den Kontrollen auf, eine Häufung war jedoch nur in den CALM RNAi Präparaten zu beobachten.

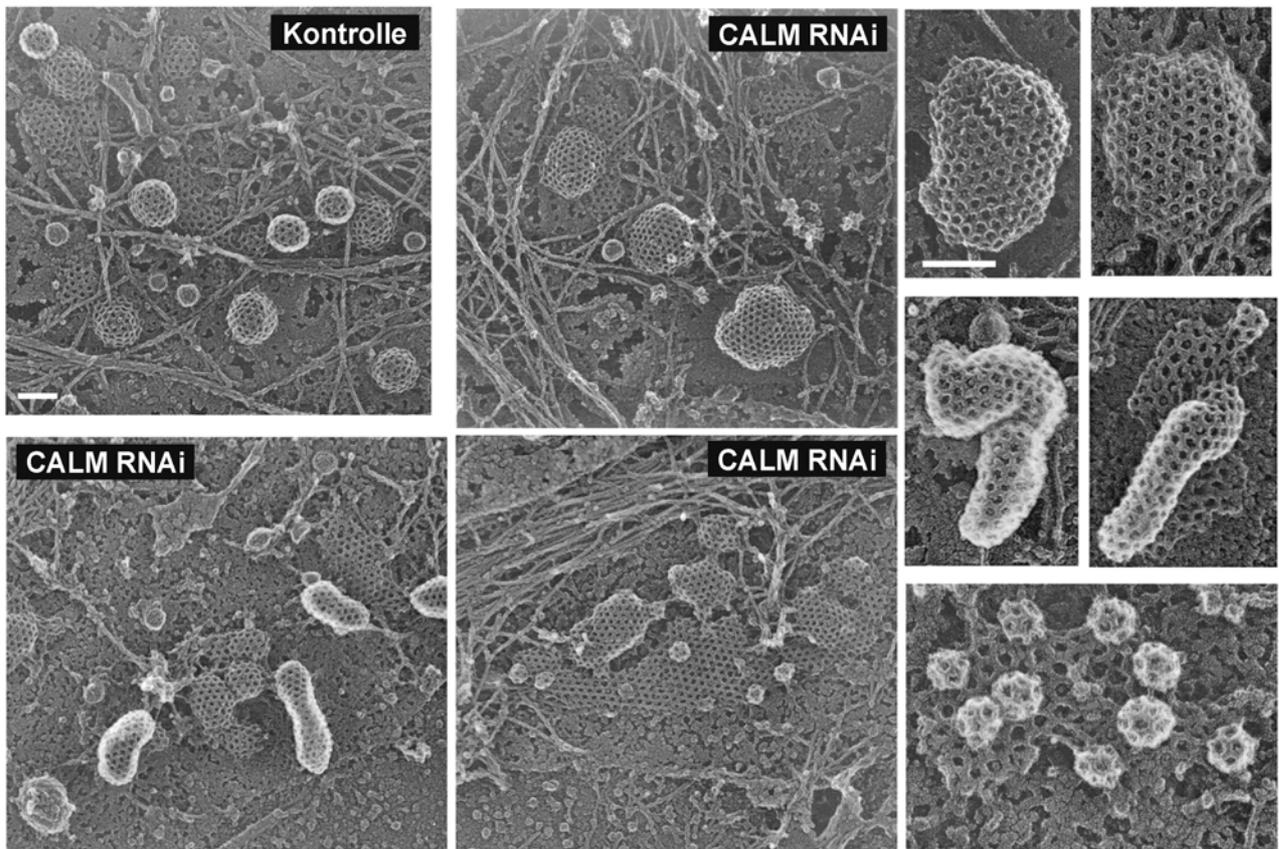


Abbildung 3-21: Rip Offs eines CALM RNAi Experimentes: Die Zellen wurden 72h nach der Transfektion für die Elektronenmikroskopie präpariert. Während die Kontrollvesikel meist eine regelmäßige runde Form haben, so zeigen die Plasmamembranen der Zellen aus den transfizierten Ansätzen eine Vielzahl von Formen. Insgesamt sind die Vesikel meist größer und unregelmäßig geformt. Ein ebenfalls häufiger beobachtetes Phänomen war das gehäufte Auftreten von so genannten Minikäfigen. Die Vergrößerungen zeigen ausschließlich Vesikel aus CALM RNAi Zellen. Der Balken entspricht 125 nm.

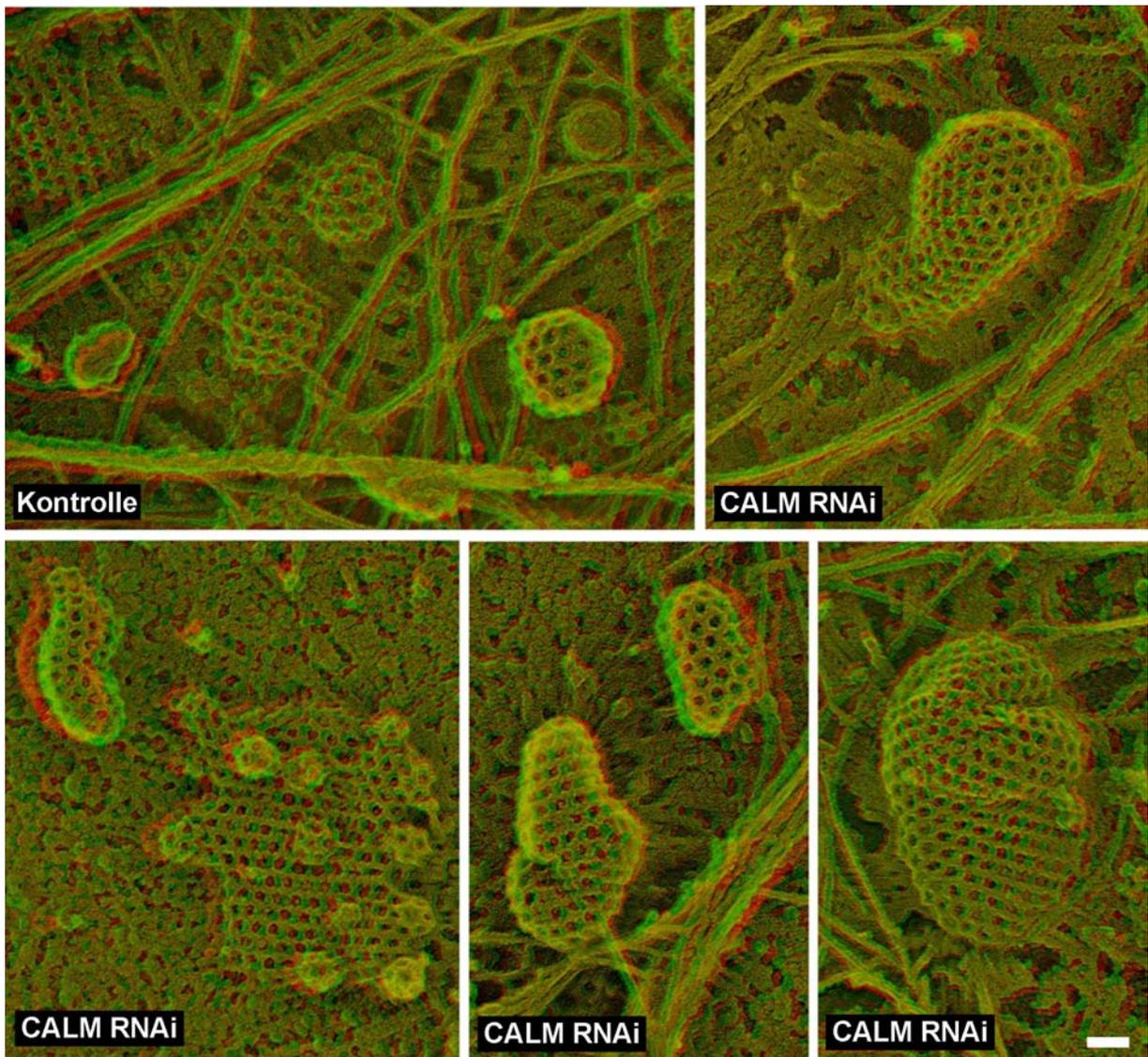


Abbildung 3-22: 3D Aufnahmen der präparierten Membranfragmente eines CALM siRNA Experimentes: Die Zellen wurden 72h nach der Transfektion für die Elektronenmikroskopie präpariert und jeweils aus einem Winkel von + 6° und -6° fotografiert. Die Aufnahmen wurden in rot beziehungsweise grün eingefärbt und in Adobe Photoshop in einem Bild übereinander gelegt. Bei Betrachtung mit der beigelegten 3D-Brille erscheinen die Bilder dreidimensional. Dem Balken entsprechen 50 nm.

Um die Beobachtungen zu verifizieren, wurden 28 Zellfetzen aus drei verschiedenen Experimenten fotografiert, die Negative digitalisiert und die Anzahl und Form der Clathrin bedeckten Strukturen am Computer mit dem Programm Axiovision ausgewertet. Es wurden für die Experimente beide siRNAs verwendet, es konnte kein Unterschied zwischen den Effekten der einzelnen RNAs festgestellt werden. Es machte ebenfalls keinen Unterschied, ob die Kontrollzellen nur mit Transfektionsreagenz oder zusätzlich mit dem GFP-RNA Kontrolloligomer transfiziert wurden. Insgesamt wurden für die Kontrollen 1123 und für die Knockdowns 1238 Clathrin bedeckte Einstülpungen ausgemessen. Diese Auswertung konnte die gemachten Beobachtungen belegen (Abbildung 3-23). Während in den Kontrollen 65%

der Vesikel einen Durchmesser von 100 bis 150 nm hatten, so waren es bei den CALM „*Knockdown*“ Präparaten nur 21%.

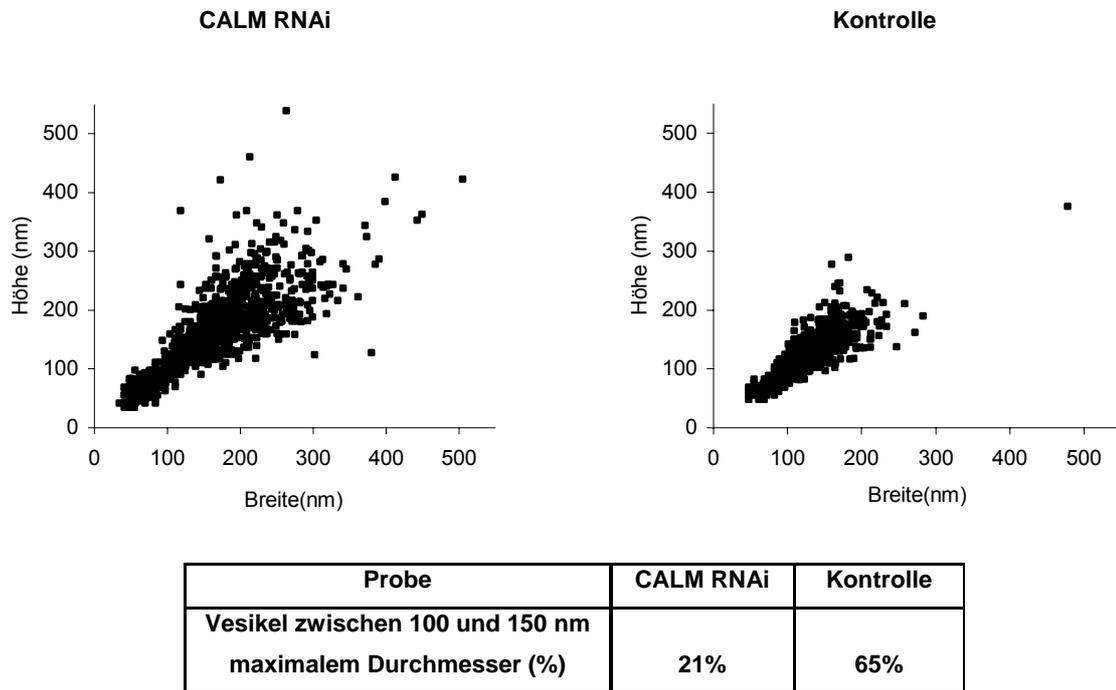


Abbildung 3-23: statistische Auswertung der Vesikelgröße bei CALM „*Knockdown*“ und Kontrolle:

Größe und kleinste Ausdehnung von Clathrin bedeckten Einstülpungen wurden gemessen und gegeneinander aufgetragen. Insgesamt wurden 1123 Strukturen in 28 Zellfragmenten für die Kontrollzellen und 1238 Strukturen in 28 Zellen für den „*Knockdown*“ gezählt. Die Größenverteilung in mit Clathrin siRNAs behandelten Ansätzen ist viel inhomogener.

Wenn man bedenkt, dass die Transfektionseffizienz maximal bei 95% liegt, und rein statistisch mindestens eine nicht transfizierte Zelle mit den „CALM RNAi Zellen“ ausgewertet wurde, so ist das Ergebnis noch eindrucksvoller.

Diese Ergebnisse wurden durch eine alternative elektronenmikroskopische Methode untermauert. Ultradünnschnitte von mit CALM RNAi transfizierten Zellen zeigten breite flache Vesikel, welche in den Kontrollen nicht zu sehen waren. Eine stichprobenartige Auswertung ergab, dass diese breiten Einstülpungen 20% der Gesamtpopulation in den behandelten Zellen ausmachten (Daten nicht gezeigt).

In Anbetracht dieser Ergebnisse liegt die Vermutung nahe, dass das Protein CALM die Größe der Clathrin bedeckten Vesikel moduliert. Da in den siRNA behandelten Zellen nicht weniger Clathrin an der Plasmamembran gemessen wurde, sondern eher mehr (Auszählung an präparierten Plasmamembranfragmenten), ist außerdem zu vermuten, dass CALM für die Rekrutierung von Clathrin an die Plasmamembran *in vivo* keine Rolle spielt.

3.2.5.1 Funktionelle Untersuchungen

Der Unterschied in der Aufnahme von Transferrin war im Vergleich zur Kontrolle gering. Diese Beobachtung wird durch eine Publikation von Huang et al. gestützt (77): Die CALM siRNA transfizierten Ansätze, es wurde dabei CALM Oligo III benutzt, nahmen noch 90 % der Transferrinmenge der Kontrollen auf.

In selbiger Publikation wurde auch gezeigt, dass eine AP-2 Ausschaltung sehr wohl einen Einfluss auf die EGF Endocytose haben kann, wenn man die Aufnahmeexperimente anders gestaltet (siehe Diskussion). Ließ man hierbei die Vorinkubation auf Eis weg und inkubierte die Zellen einfach mit warmem Medium mit EGF, so wiesen die AP-2 RNAi Ansätze eine um 40% geringere Endocytoserate auf als die Kontrolle. Der Effekt war allerdings immer noch geringer als bei Clathrin RNAi. Für die EGF Aufnahme wurden daher beide Varianten getestet. Bei Verwendung der Vorinkubation auf Eis zeigte sich nur ein geringer Effekt (Abbildung 3-24 A). Ohne diese Vorinkubation ging die Aufnahme des EGF auf ca. 60% der Menge in den Kontrollen zurück (Abbildung 3-24 B). Die Reduktion ist dabei nicht so stark wie nach Clathrin RNAi, sondern ähnelt sehr den Effekten der α -Adaptin Depletion, wo die Aufnahmefähigkeit für EGF dann ebenfalls auf 60 % reduziert ist ((77), durch eigene Experimente bestätigt). CALM galt als ein möglicher alternativer Adaptor zu AP-2. Es weist jedoch keine bekannten Interaktionsmotive zu Frachtmolekülen auf. Es kann aber die Clathrin Bindung an Lipiddoppelschichten vermitteln (30). Eine Ausschaltung beider Moleküle sollte daher vielleicht die EGF Aufnahme noch weiter senken als ein „*Knockdown*“ allein. Es wurde allerdings kein Unterschied beobachtet (Abbildung 3-24 B).

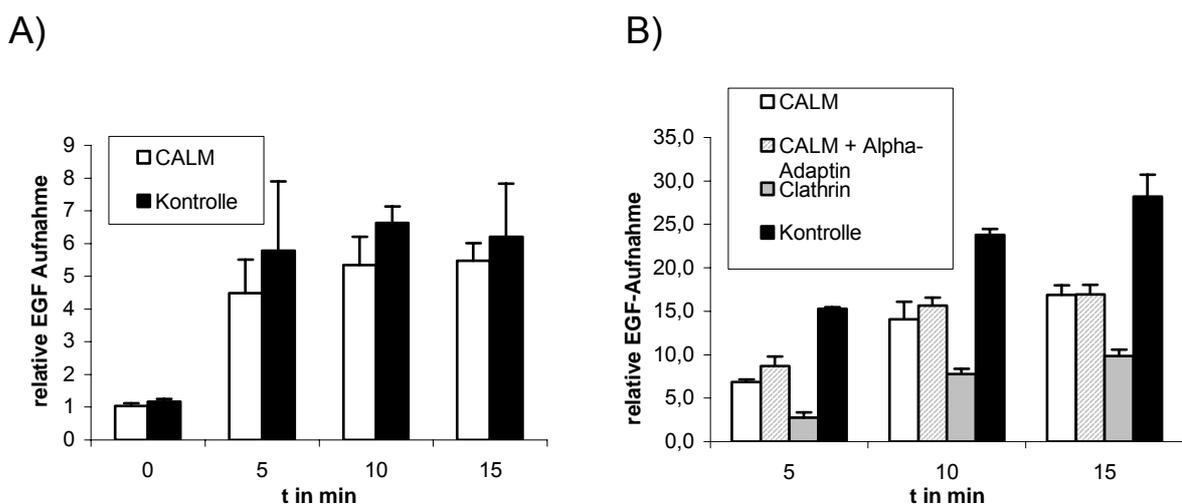


Abbildung 3-24: Auswertung der EGF-Aufnahme nach CALM RNAi:

- A) mit Vorinkubation auf Eis, der 0 Minuten Wert zeigt den nicht entfernbaren Hintergrund an. Die Aufnahme des EGF ist leicht behindert.
 B) ohne Vorinkubation auf Eis, die Aufnahme des EGF ist im Vergleich zu A) stärker reduziert. Der Fehlerbalken entspricht den Abweichungen innerhalb von drei Ansätzen.

Man kann also schließen, dass CALM als alternativer Adaptor auch in diesem Kontext nicht in Frage kommt.

3.2.6 Ausschaltung des Proteins GAK mittels RNAi

Das Protein GAK ist der ubiquitär exprimierte Cofaktor, der *in vitro* in nur katalytischer Menge ausreicht, um Clathrin bedeckte Vesikel von ihrer Hülle zu befreien. Bei einem Fehlen von GAK, sollte man daher eine Akkumulation von Clathrin bedeckten Vesikeln im Cytosol erwarten, sofern das Protein diese Rolle auch *in vivo* übernimmt. Ein ähnlicher Effekt wurde nach Ausschaltung des Orthologs in *C. elegans* beobachtet (47). In gleicher Publikation war auch eine Immobilisation von Clathrin an der Plasmamembran beobachtet worden. Man vermutete daher, dass Auxilin bereits den Austausch von Clathrin während des Einstülpungsprozesses katalysieren könnte.

Es schien folglich aufschlussreich, dieses Enzym mittels RNAi auszuschalten. Es wurden zwei verschiedene siRNAs verwendet: Zum einen ein bereits publiziertes Oligomer (GAK II, Zhang et al 2004 (78)), zum anderen ein in der Arbeitsgruppe entworfenes (GAK I).

Wie der Western-Blot zeigt (Abbildung 3-25), waren beide RNAs effektiv, 72 h nach der Transfektion wurde eine starke Reduktion des Proteins beobachtet:

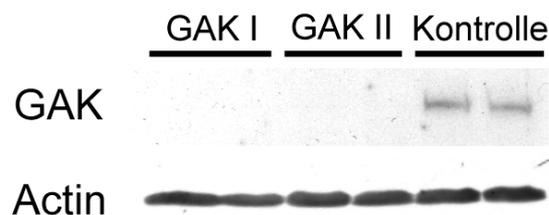


Abbildung 3-25: Western-Blot eines GAK siRNA Experimentes: Die Zellen wurden 72h nach der Transfektion lysiert. Beide RNAs führen zu einer Reduktion von GAK.

Es wurde daher eine elektronenmikroskopische Untersuchung nach der „Abreiß“-Methode angeschlossen:

Bei der Untersuchung der Präparate fiel dem Betrachter auf, dass die sonst in den Kontrollzellen relativ seltenen, flachen Einstülpungen (Pfeile in Abbildung 3-28) in den Zellenfragmenten aus mit GAK siRNAs behandelten Zellen wesentlich häufiger waren. Auch schien es mehr und ausgedehntere flache, nicht eingestülpte Clathrin Netzwerke zu geben.

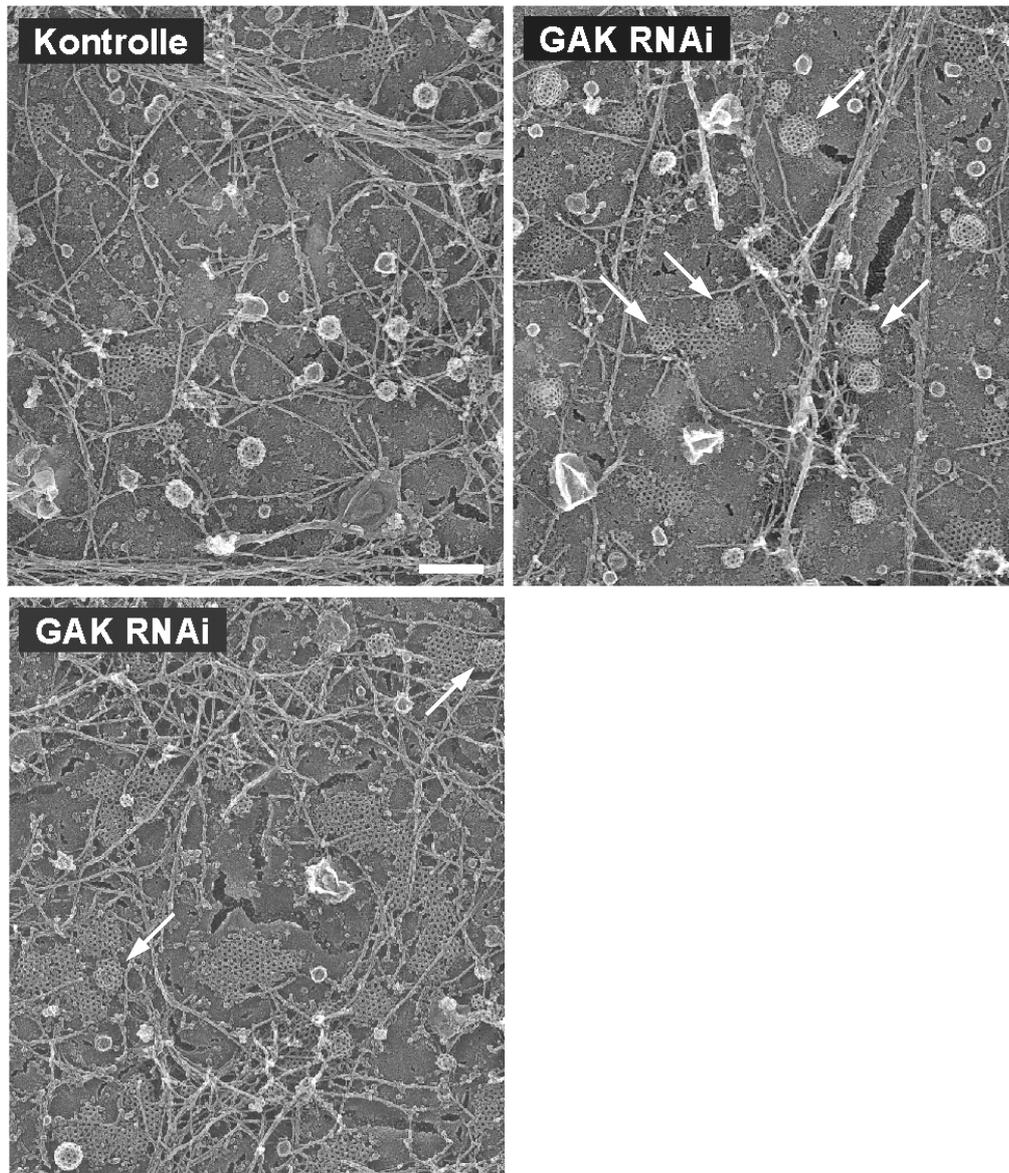
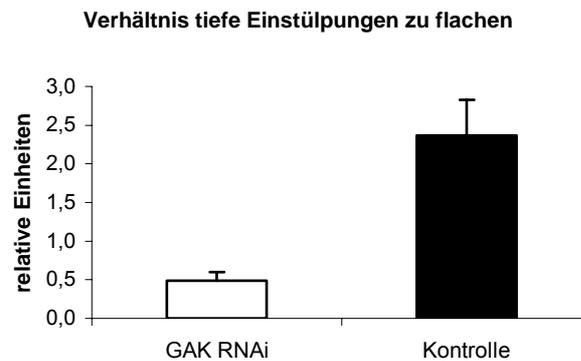


Abbildung 3-26: Rip Offs von GAK siRNA transfizierten Zellen und Kontrollen: Man beachte, dass in den GAK siRNA behandelten Zellen die flachen Clathrin bedeckten Netzwerke und flachen Einstülpungen (Pfeil) wesentlich häufiger sind als in den Kontrollen, wo mehr vesikelartige Strukturen auftauchen. Der Balken entspricht 125 nm.

Um die gemachten Beobachtungen zu überprüfen, wurde wiederum eine statistische Auswertung angeschlossen. Es wurden für die GAK RNAi Ansätze insgesamt 768 Clathrin bedeckte Strukturen aus 7 Zellfragmenten ausgewertet. Drei stammten aus Ansätzen die mit siRNA I transfiziert worden waren, vier aus welchen, die mit siRNA II transfiziert worden waren. Beide siRNAs lieferten die gleichen Ergebnisse, weshalb die Werte zusammengerechnet wurden. Bei den Kontrollen wurden ebenfalls sieben Zellfragmente ausgewertet, vier entstammten den RNAi Experimenten mit der siRNA gegen GAK, drei

weitere waren auch schon im Zusammenhang mit den CALM RNAi Experimenten ausgewertet worden. Bei den Kontrollen wurden insgesamt 412 Clathrin bedeckte Strukturen ausgewertet. Es zeigte, sich dass die Zahlenverhältnisse von tiefen zu flachen Einstülpungen in beiden Kontrollen identisch waren.

A)



B)

	flache Einstülpungen / μm^2	tiefe Einstülpungen / μm^2	flache Netzwerke / μm^2
GAK RNAi	0,5	0,3	0,7
Kontrolle	0,3	0,6	0,3

Abbildung 3-27: Auswertung von Clathrin bedeckten Strukturen nach GAK „Knockdown“ im Vergleich zur Kontrolle:

In den GAK depletierten Ansätzen häufen sich flache Einstülpungen und flache Clathrin bedeckte Netzwerke im Vergleich zu tiefen Einstülpungen an. Die Fehlerbalken in A) zeigen die Abweichungen der Verhältnisse innerhalb der jeweils sieben Zellfragmente an. Die Tabelle (B) zeigt die bestimmten Zahlenwerte.

Des Weiteren wurde die Beobachtung gemacht, dass die Fläche der Plasmamembran, die von Clathrin bedeckten Strukturen eingenommen wurde mit 8% in den GAK RNAi Zellen etwa doppelt so groß war wie in den Kontrollen (3% - 4%).

Um diese Ergebnisse zu verifizieren, wurde eine Zellfraktionierung von M. Düwel durchgeführt. Es zeigte sich, dass in den RNAi Ansätzen der Anteil von Membran gebundenem AP-2 und Clathrin stark gestiegen war. Hierzu muss allerdings gesagt werden, dass sich in der Membranfraktion auch Clathrin bedeckte Vesikel wieder finden. Das Ergebnis könnte folglich auch sich im Cytosol akkumulierende Vesikel, die nicht von ihrer Hülle befreit werden konnten, widerspiegeln.

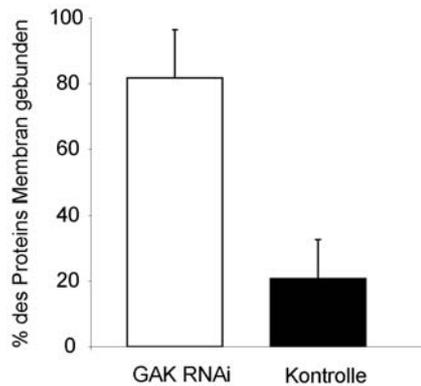


Abbildung 3-28: Zellfraktionierung eines GAK siRNA Experimentes: In den siRNA transfizierten Ansätzen ist deutlich mehr Clathrin in den Membranfraktionen zu finden.

In Greener et al. 2001 (47) wurde beschrieben, dass nach es nach einem Auxilin „Knockdown“ mittels RNAi in *C. elegans* zu einer weitgehenden Immobilisierung von Clathrin kam. Dies sollte in HeLa Zellen mittels *FRAP* (*Fluorescence Recovery after Photobleaching*) untersucht werden. Hierbei handelt es sich um eine Technik, bei der Fluorophore in lebenden Zellen unter dem Mikroskop mittels eines Lasers ausgebleicht werden und die Wiederkehr der Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Zeit gemessen wird. Die Geschwindigkeit ist dabei ein Maß dafür, inwieweit das ausgebleichte Molekül in der Zelle einem Austausch unterliegt.

HeLaSS6 Zellen wurden für die FRAP-Untersuchungen zwei Tage nach der Transfektion mit siRNAs zusätzlich mit einem Vektor, welcher entweder die Informationen für EGFP-LCa oder EYFP- β 2-Adaptin enthielt, transfiziert. Am folgenden Tag wurden die Zellen in Leibowitz-Medium mit 0,1% BSA in der Inkubationskammer eines konfokalen Laserscan-Mikroskops lebend untersucht. Grün fluoreszierende Strukturen an der Plasmamembran wurden mit dem Laser ausgebleicht und die Wiederkehr der Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Zeit aufgezeichnet. In der Auswertung (siehe Abbildung 3-29) wurden für die Bestimmung der RNAi Werte Ergebnisse aus vier Ansätzen gemittelt. Davon waren zwei mit siRNA Oligomer I und zwei mit siRNA Oligomer II transfiziert worden. Es wurden weniger Kontrollzellen als potentielle Knockdownzellen ausgemessen, da die Werte für die Fluoreszenzerholung aus Testversuchen bereits hinlänglich bekannt waren. Die Untersuchungen sollten lediglich eine ausreichende Gesundheit der Zellen sicherstellen und einen direkten Vergleich der erhaltenen Werte ermöglichen. Die Ergebnisse der Experimente sind in Abbildung 3-29 dargestellt.

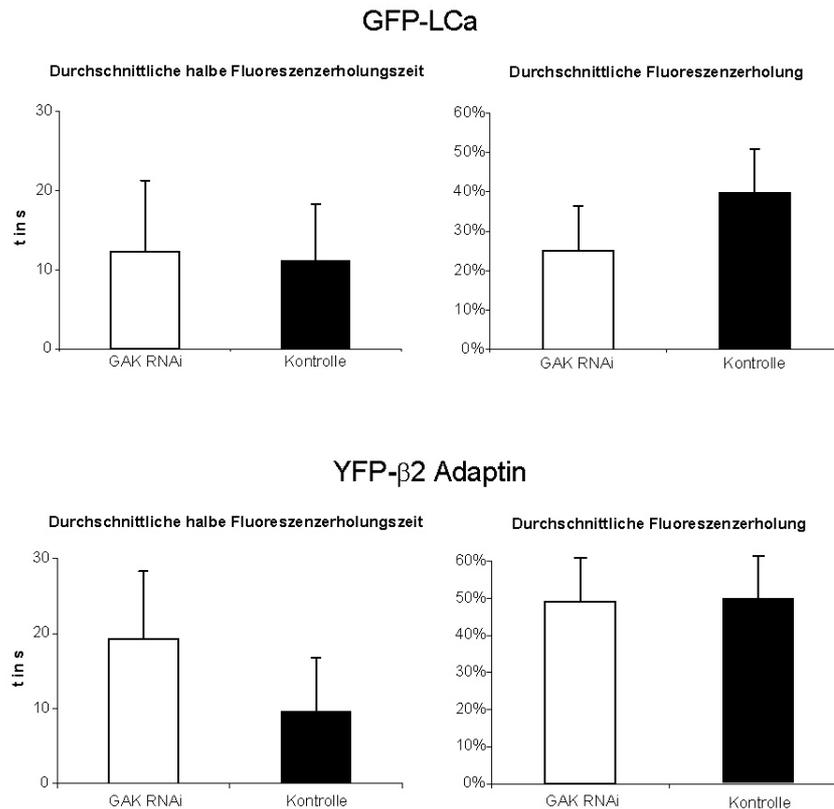


Abbildung 3-29: FRAP eines GAK RNAi Experimentes: Die Zellen wurden zwei Tage nach der Transfektion mit siRNAs zusätzlich mit einem Vektor, welcher entweder die Informationen für GFP-LCa oder YFP-β2-Adaptin enthielt, transfiziert. Am dritten Tag wurden die lebenden Zellen unter dem Laserscannmikroskop untersucht. Fluoreszierende Strukturen von GFP-LCa oder YFP-β2-Adaptin an der Plasmamembran wurden mit dem Laser ausgebleicht und die Rückkehr der Fluoreszenz im Laufe der Zeit aufgezeichnet. $n_{(YFP-\beta 2-Adaptin, Kontrolle)} = 5$; $n_{(LCa, Kontrolle)} = 10$; $n_{(YFP-\beta 2-Adaptin, RNAi)} = 26$; $n_{(LCa, RNAi)} = 25$

Die Fehlerbalken zeigen die Abweichung der jeweils bestimmten Werte voneinander an.

Die Fluoreszenzen aus den GAK RNAi Ansätzen, die mit EGFP-LCa transfiziert worden waren erholten sich genauso schnell wie die der Kontrollen. Es konnte jedoch beobachtet werden, dass die Erholung insgesamt weit geringer war als in den Kontrollzellen. Viele Punkte zeigten lediglich eine minimale Fluoreszenzerholung.

Ein wenig anders war das Bild bei den mit EYFP-β2-Adaptin transfizierten Zellen: Die Fluoreszenzerholungszeit war, wie aufgrund der Publikation von Greener et al. 2001 erwartet, nur etwa halb so schnell wie in den Kontrollen. Die Fluoreszenzerholung insgesamt war hier jedoch in beiden Fällen identisch. Die GAK Depletion führt also nicht zu einer generellen Immobilisation von Clathrin an der Plasmamembran. Die Austauschraten von AP-2 waren allerdings deutlich reduziert.

Es fragte sich, ob die beobachteten Phänotypen auch funktionelle Auswirkungen hatten. Es wurde daher ein Aufnahmeexperiment mit I-125 markiertem Transferrin angeschlossen. Die Aufnahme-prozedur entsprach derjenigen, die in Huang et al. 2004 (77) publiziert worden war.

Der beobachtete Unterschied in der Transferrin-Aufnahme war jedoch nur gering (Abbildung 3-30).

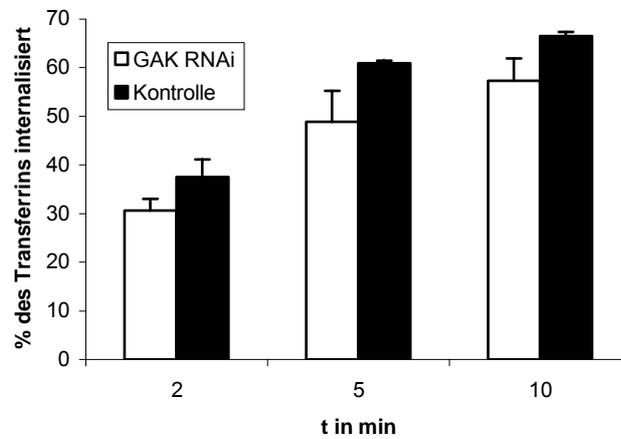


Abbildung 3-30: Transferrin-Aufnahme Experiment eines GAK siRNA Experimentes: Die Zellen wurden ohne Vorinkubation auf Eis nach (77) mit $1\mu\text{g} / \text{mL}$ I-125 markiertem Transferrin inkubiert. In den Knockdowns ist eine leicht geringere Aufnahme von Transferrin zu beobachten. Die Fehlerbalken entsprechen den Abweichungen dreier Ansätze.

Zusammen genommen zeigen diese Daten, dass GAK bereits in frühen Phasen der Einstülpung von Clathrin bedeckten Vesikeln benötigt wird. Es scheint jedoch für die Clathrin vermittelte Endocytose nicht allgemein essentiell zu sein.

4. Diskussion

Clathrin RNAi

Durch die Ausschaltung von Clathrin mittels RNAi konnten zwei Funktionen dieses Schlüsselmoleküls der Clathrin vermittelten Endocytose herausgearbeitet werden: Es ist zum einen Gerüstmolekül und zum anderen treibende Kraft bei der Vesikelbildung. Fluoreszenzmikroskopische und biochemische Analysen haben gezeigt, dass Clathrin dabei – ganz im Gegensatz zu AP-2 - keine Organisationsfunktion ausübt: Die Membranassoziation der untersuchten Adaptoren und akzessorischen Proteine blieb unbeeinflusst. Diese Daten wurden auch von anderer Seite bestätigt (106).

Der Blick durch das Elektronenmikroskop offenbarte, nicht unerwartet, ein nahezu vollständiges Fehlen aller Clathrin bedeckten Strukturen. Übrig gebliebene Clathrin Moleküle bildeten vereinzelt deformierte Ansätze der sonst so typischen Gitter. Das Fehlen des Strukturproteins legte jedoch den Blick auf eine darunter liegende, geordnete Struktur frei, welche sonst unter dem Clathrin Netzwerk verborgen war. Diese konnte durch Markierung mit Antikörpern eindeutig als AP-2-haltig identifiziert werden.

Kombiniert man die Daten der Immunfluoreszenz und der Elektronenmikroskopie, so lässt sich schließen, dass es sich bei der Struktur um eine Art Plattform für die Bindung von Clathrin an die Plasmamembran handelt. Da diese neben AP-2 bereits sämtliche der untersuchten akzessorischen Proteine enthält, kann man davon ausgehen, dass die Orte der Clathrin vermittelten Endocytose bereits vorgegeben sind, ohne dass Clathrin eine organisierende oder stabilisierende Funktion ausführen muss.

Wie die elektronenmikroskopischen Untersuchungen gezeigt haben, gibt es in dieser Struktur keinerlei Einstülpungen, so lange kein Clathrin zugegen ist. Clathrin ist also nicht nur das Hüllprotein der Clathrin bedeckten Vesikel, sondern vermutlich auch die treibende Kraft hinter der Einstülpung. Es stellt sich nun die Frage, inwiefern das Strukturprotein auch die mechanische Energie für diesen Prozess liefert. So ist es nicht auszuschließen, dass Clathrin nur einen Cofaktor rekrutiert, welcher diese bereitstellt. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass Clathrin auch der mechanische Faktor hinter dem Einstülpungsvorgang ist. Bei physiologischem pH-Wert ist die Käfigbildung durch Clathrin eine energetisch begünstigte Reaktion (107). Tatsächlich wird vermutet, dass diese Energie ausreichen könnte, ein Vesikel an der Plasmamembran einzustülpen (7).

Legt man diese Annahme zu Grunde, so stellt sich allerdings die Frage, warum man an der Plasmamembran nicht nur eingestülpte, sondern auch ausgedehnte flache, Clathrin bedeckte Strukturen finden kann ((44,45); eigene Beobachtungen, siehe Ergebnisteil).

Auch sind die Clathrin Doppelschichten an der Endosomenmembran flach. Für letztere Struktur könnte man eine unterschiedliche Zusammensetzung der Membran als Ursache anführen. Für die Vesikelbildung an TGN und Plasmamembran liegt allerdings ein anderes Modell näher: Clathrin ist nicht allein in der Lage, eine Membraninvagination zu induzieren. Es benötigt hierfür einen Cofaktor, der entweder schon vor der Bindung des Strukturmoleküls an der Plasmamembran gebunden vorliegt oder direkt durch Clathrin rekrutiert werden kann. Ein Protein, welches eine solche Rolle übernehmen könnte, ist Epsin. Ford et al. zeigten 2002, dass dieses Protein über seine ENTH-Domäne in der Lage ist, eine Einstülpung der Plasmamembran zu induzieren (42). Vorläufige elektronenmikroskopische Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe in mit siRNAs gegen Epsin behandelten Zellen (Daten nicht gezeigt) wiesen jedoch auf keine Behinderung in der Bildung von Clathrin bedeckten Vesikeln hin. Da auch die Endocytose von EGF und Transferrin nach Ausschaltung von Epsin nur geringfügig behindert wurde (43,77), so scheint dieses Protein, wenn überhaupt, nicht der alleinige Cofaktor zu sein. Eine andere plausible Erklärung ist, dass einige der an der Plasmamembran befindlichen Proteine die Einstülpung von Clathrin bedeckten Netzwerken unterbinden – erst eine Entfernung dieser Moleküle leitet die Vesikelbildung ein (siehe Abbildung 4-1).

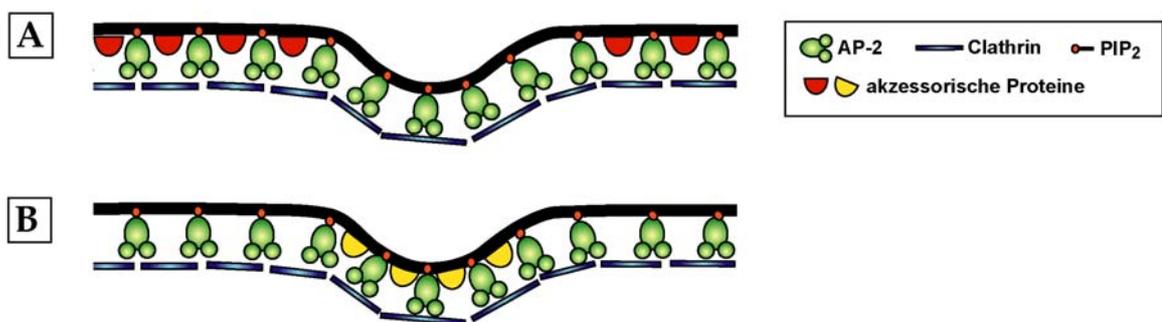


Abbildung 4-1: Modelle für eine Membraneinstülpung:

- A) Ein bisher unbekannter Faktor / unbekanntes Protein verhindert die Membraneinstülpung durch Clathrin, erst sein Fehlen ermöglicht die Vesikelknospung
- B) Clathrin benötigt einen Cofaktor, um die Membraninvagination voranzutreiben. Dieser könnte entweder durch Clathrin selbst rekrutiert werden oder bereits vor der Clathrinbindung an der Membran vorhanden sein.

Eine Aufgabe für zukünftige Experimente sollte es daher sein, herauszufinden, welche Moleküle benötigt werden, um flache Clathrin bedeckte Strukturen in Einstülpungen zu überführen. Denkbar wäre hierzu ein Ansatz, in welchem man Clathrin depletierte, mit

Ultraschall behandelte Zellen mit unterschiedlichen Substanzen wie zum Beispiel Clathrin allein, Clathrin mit zusätzlichen Proteinen oder Clathrin mit ATP oder GTP behandelt und sie dann elektronenmikroskopisch untersucht.

Eine weitere Frage ist auch, welche Faktoren die AP-2 positiven Strukturen in Zellen, in denen Clathrin ausgeschaltet worden ist, an der Plasmamembran zusammenhalten.

Eine Determinante ist hierbei sicherlich das Vorhandensein von Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat. Es gilt als essentiell für die AP-2 Bindung an die Plasmamembran (108-110). Direkt gezeigt werden konnte die Wichtigkeit von Membranlipiden am TGN: Das Ausschalten der Kinase *PI4KIIa*, die am TGN die Bildung von Phosphatidylinositol-4-phosphat katalysiert, unterbindet die Assoziation von AP-1 an die Golgi Membran vollständig (111).

Ein Einfluss von Cholesterin auf die Stabilität der AP-2 positiven Strukturen kann dagegen weitgehend verneint werden. Eine Behandlung von Zellen mit *Methyl- β -Cyclodextrin*, welches dieses Membranlipid extrahiert (112), verhindert die Bindung von AP-2 an die Plasmamembran nicht. Die in der Immunfluoreszenz beobachteten Strukturen wiesen keinerlei Veränderungen gegenüber dem „Normalzustand“ auf.

Möglicherweise wird die Struktur auch durch ihre Proteinkomponenten stabilisiert. Während AP-2 zumindest zum Teil essentiell für ihren Aufbau ist, spielen Eps15 und CALM vermutlich keinerlei Rolle. Die Bindung beider Proteine an die Plasmamembran ist AP-2 abhängig, ihre Ausschaltung mittels RNAi hatte aber nur marginale Einflüsse auf die Membranassoziation des Adaptorproteins (76,98). Auch Epsin ist wahrscheinlich nicht erforderlich. Ob ein Fehlen mehrerer dieser Proteinkomponenten zugleich einen Einfluss hat, muss dagegen noch getestet werden.

Eine Proteinkomponente, deren Einfluss wahrscheinlich wichtig ist, ist dagegen Synaptotagmin, für das gezeigt werden konnte, dass es Einfluss auf die AP-2 Bindung an die Plasmamembran hat (22). Eine Ausschaltung dieses Proteins mittels RNAi ist daher mit Sicherheit ein nahe liegendes Experiment.

AP-2 RNAi

Die Ausschaltung von AP-2 in HeLaSS6 Zellen führte ebenso wie die von Clathrin zu einer fast vollständigen Reduktion von Clathrin bedeckten Strukturen an der Plasmamembran. Die Tatsache, dass AP-2 für eine stabile Assoziation von CALM und Eps15 an die Plasmamembran benötigt wird, verdeutlicht seine Rolle als eine der wichtigsten

Organisationsplattformen der Clathrin vermittelten Endocytose. Interessanterweise spielt Epsin hier eine Sonderrolle, da das Fehlen des Adaptorproteins keinen Einfluss auf die Lokalisation und die intrazelluläre Verteilung des Proteins hatte. Auch diese Daten konnten von anderer Seite bestätigt werden (106).

Funktionelle Untersuchungen an Clathrin und AP-2 RNAi Zellen

Wohl kaum ein Teil der Ergebnisse aus den RNAi Experimenten gegen Clathrin oder AP-2 hat so für Diskussionen gesorgt wie die funktionelle Untersuchung der Transferrin- und EGF-Aufnahme. Zwar war die Aufnahme von Transferrin nach siRNA Behandlung in beiden Fällen fast vollständig inhibiert, die Aufnahme von EGF ließ sich jedoch prozentual weniger blockieren. So zeigte der AP-2 „*Knockdown*“ in Abhängigkeit vom Experimentaufbau entweder keine Auswirkungen (76,106,113), oder maximal eine Reduktion auf 50% (77) im Vergleich zur Kontrolle. Der Effekt der Ausschaltung von Clathrin war in jedem Fall stärker. Eine zulässige Folgerung war daher, dass möglicherweise neben AP-2 in Abhängigkeit von der aufzunehmenden Fracht noch alternative Adaptormoleküle existieren, welche die Clathrin Bindung an die Plasmamembran vermitteln könnten.

Verschiedene Proteine waren dafür als Kandidaten im Gespräch, es konnte jedoch bei keinem *in vivo* gezeigt werden, dass sie die Clathrin Bindung an die Plasmamembran vermitteln können. Auch zeigte die starke Reduktion von Clathrin bedeckten Strukturen an der Plasmamembran auf ca. 10 % nach einer Ausschaltung von AP-2, dass der Einfluss dieser alternativen Adaptoren insgesamt wohl gering sein muss (76,106).

Auf der anderen Seite gibt es mehr und mehr Evidenzen, dass bestimmte Frachtmoleküle spezifische Adaptoren benötigen, um Clathrin vermittelt aufgenommen werden zu können: Der Transferrin Rezeptor ist über AP-2 mit der Maschinerie der Clathrin vermittelten Endocytose verknüpft. Andere, monoubiquitinylierte Frachtmoleküle wie der EGF Rezeptor benötigen hierfür Interaktionspartner wie Epsin. Weitere Adaptoren, welche spezifisch nur eine Gruppe von Frachtmolekülen erkennen können, sind zum Beispiel die β -Arrestine 1 und 2, welche die 7-Helixdomänen von G-Protein gekoppelten Rezeptoren erkennen können und sie mit der Clathrin Endocytosemaschinerie in Verbindung bringen (114,115). Die Proteine *Dab2* oder *ARH* erkennen dagegen nur Proteine der LDL-Rezeptorfamilie (15). Ob einer dieser alternativen Adaptoren die Organisationsrolle für die Clathrin vermittelte Endocytose in Abwesenheit von AP-2 übernehmen kann, muss allerdings noch gezeigt werden. Da ein

Fehlen von AP-2 in Säugern schon im Embryonalzustand letal sein soll (15), ist dies eher unwahrscheinlich.

Während die Daten aus Motley et al. (106) und diejenigen dieser Arbeit (76) in Bezug auf die EGF-Aufnahme nach einer AP-2 Ausschaltung übereinstimmten, so unterschieden sie sich in den Ergebnissen der Aufnahme nach einem Clathrin „*Knockdown*“: In erster Arbeit wurde eine starke Beeinträchtigung der EGF Endocytose beobachtet. In der hier vorliegenden Arbeit war dagegen der beobachtete Unterschied im Vergleich zu den Kontrollen gering, was zu der Annahme führte, dass der Wachstumsfaktor über einen Clathrin unabhängigen Weg aufgenommen werden kann.

Der Unterschied in den Aufnahmeverfahren beider Arbeitsgruppen bestand hauptsächlich in der Verwendung unterschiedlich hoher Konzentrationen von EGF. So verwendeten Motley et al. (106) eine Konzentration von 1 ng / mL, während hier eine von 10 ng/mL benutzt wurden. Die Diskrepanz zwischen beiden Daten wurde daher damit erklärt, dass die bei niedrigen EGF Konzentrationen (1 ng / mL) auftretende Clathrin abhängige EGF Aufnahme bei höheren EGF Konzentration (10 ng / mL) durch eine Clathrin unabhängige Endocytose abgelöst wird (116). Diese Vermutung wurde 2005 in einer Publikation von Sigismund S. et al. (43) untermauert: Bei einer Konzentration von 1 ng /mL wurde EGF ausschließlich Clathrin vermittelt aufgenommen, während bei 10 ng /mL der Rezeptor auch in einer *Raft* abhängigen, Clathrin unabhängigen Weise endocytiert wurde. Ausschlaggebend für eine Clathrin unabhängige Aufnahme war dabei neben der Konzentration des Hormons auch die Ubiquitylierung des Rezeptors. Nicht ubiquitylierte Rezeptoren wurden dagegen Clathrin vermittelt endocytiert.

Die Beobachtungen lassen sich auch mit einer Kombination aus beiden Schlussfolgerungen interpretieren: Es existiert neben der Clathrin vermittelten Endocytose noch ein alternativer Weg für die EGF Aufnahme. Des Weiteren vermitteln neben AP-2 vermutlich noch andere Adaptoren die Endocytose des Wachstumshormons. Diese können den Adaptorkomplex zwar nicht vollständig ersetzen, sein Fehlen jedoch zum Teil kompensieren.

Ein Faktor wurde jedoch bei allen Diskussionen außer Acht gelassen: die Prozedur des Aufnahmetests. Während in dieser Arbeit und bei Motley et al. (106) mit einer Vorinkubation auf Eis gearbeitet wurde, so konnten Huang et al. 2004 zeigen, dass die Ausschaltung von AP-2 ohne diese Vorinkubation, bei direkter Zugabe des EGF zum warmen Medium, sehr wohl einen Effekt zeigt (77). Obwohl man zugeben musste, dass letztere Prozedur physiologischer war, so darf nicht vergessen werden, dass beide Verfahren *in vitro*-Tests sind, die die natürlichen Gegebenheiten lediglich annähern können. Während diese bei der

Transferrin-Aufnahme, unabhängig von Änderungen in der Prozedur, ähnliche Ergebnisse lieferten, so war dies beim EGF nicht der Fall. Im Gegensatz zur Endocytose von Transferrin ist die Aufnahme des Wachstumsfaktors eine offensichtlich wesentlich komplizierter kontrollierte Angelegenheit, die in ihren Einzelheiten noch nicht erforscht ist. Die Notwendigkeit des Organismus, beide Frachtmoleküle unterschiedlich zu behandeln, ist offensichtlich: Eine „verkehrte“ Reaktion der „verkehrten“ Zelle auf den EGF ist potentiell viel gefährlicher als beim Transferrin.

Bei allem Diskussionsstoff, den die oben genannten Experimente geliefert haben, ist dennoch eines sehr deutlich geworden: Es gibt nicht „die“ Clathrin vermittelte Endocytose, sondern verschiedene Arten in Abhängigkeit vom Frachtmolekül. Das einzige Protein, welches nach heute gängiger Auffassung immer an der Vesikelentstehung beteiligt ist, ist Clathrin. Selbst für AP-2 wird dies zum Teil in Frage gestellt. Man kann sich die Zelle modellhaft als ein Haus vorstellen, für das es viele verschiedene Eingangstore gibt, welche in Abhängigkeit von den Bedürfnissen der Zelle durch ganz unterschiedliche Schlüssel geöffnet werden können. Manchmal öffnet ein Schlüssel daher einen Zugang über eine Clathrin vermittelte Endocytose, beim anderen Mal hingegen zu einer Clathrin unabhängigen Endocytose - wie beim EGF.

Ob letzterer Aufnahmeweg nun spezifisch oder unspezifisch ist, ist eine Frage, die im Moment nicht beantwortet werden kann. Das Dogma, dass die Clathrin vermittelte Endocytose die einzige spezifische ist, gilt jedoch schon länger als widerlegt (117).

CALM RNAi

Im Rahmen dieser Arbeit wurden auch die Effekte einer Ausschaltung des Proteins CALM auf die Bildung von Clathrin bedeckten Vesikeln untersucht. Auf der Vergrößerungsebene der Immunfluoreszenz waren die beobachteten Effekte an der Plasmamembran klein. Es ließ sich lediglich eine leichte Vergrößerung der fluoreszierenden Strukturen von AP-2 und Clathrin an der Plasmamembran feststellen.

Auf der Vergrößerungsebene der Elektronenmikroskopie wurde jedoch ein deutlicher Unterschied zwischen Kontrollen und siRNA behandelten Zellen offenbar:

Während im Normalfall ein Großteil der Vesikel eine einheitlich runde Form bei einer Größe von 100 bis 150 nm aufwies, so waren jene in den transfizierten Ansätzen deutlich

unregelmäßiger geformt. Viele Vesikel waren wesentlich größer oder kleiner und wiesen teilweise eine wurstähnliche Form auf.

Aus diesen Ergebnissen wurde der Schluss gezogen, dass CALM die Größe von Clathrin bedeckten Einstülpungen moduliert. Ähnliche Beobachtungen, welche diese Aussagen stützten, wurden schon vor einiger Zeit für das Protein AP180, dem neuronalen Homolog des ausgeschalteten Makromoleküls, gemacht: So wurde gezeigt, dass nach Zugabe von AP180 zu Experimenten bei denen *in vitro* Clathrin Käfige hergestellt wurden, besonders kleine und einheitliche Strukturen gebildet wurden (28). Die Ausschaltung von UNC-11, dem Ortholog von AP180 in *C. elegans*, führte in diesem Organismus zu einer Ansammlung von übergroßen Vesikeln an den Synapsen (29). Ein Modell, wie CALM oder AP180 die Ausdehnung der Vesikel moduliert, existiert allerdings bisher nicht.

Interessanterweise zeigte der CALM „*Knockdown*“ kaum Auswirkungen auf die Aufnahme von Transferrin ((77); eigene Beobachtungen), jedoch eine um 50% geringere aufgenommene Menge an EGF. Da CALM keine Interaktionsmotive für Frachtmoleküle enthält, handelt es sich hierbei wohl eher um indirekte Effekte. Sie lassen sich bisher nicht schlüssig erklären.

Da der unter dem Elektronenmikroskop beobachtete, ausgeprägte Effekt nur mit einer geringen funktionellen Behinderung der Zelle einher ging, muss daher davon ausgegangen werden, dass noch ein zweiter Mechanismus existiert, der die Größe der Vesikel zumindest ansatzweise reguliert. Dieser könnte in der Struktur des Clathrin Moleküls selbst begründet liegen und somit energetische oder entropische Ursachen haben. Es könnte sich allerdings auch um ein weiteres modulierendes Molekül handeln, welches bis jetzt unbekannt ist.

Die Tatsache, dass AP180 *in vitro* in der Lage ist, an künstlichen Membranen Clathrin besetzte Netzwerke zu erzeugen (30), führte dazu, dass CALM als potentieller alternativer Adaptor zu AP-2 gehandelt wurde. Die Ausschaltung von AP-2 mittels RNAi zeigte jedoch, dass CALM von diesem für seine stabile Assoziation an die Plasmamembran abhängig ist. Es kann daher so gut wie ausgeschlossen werden, dass CALM als alternativer Adaptor zu AP-2 agieren kann.

Insgesamt legen die hier vorgestellten Ergebnisse die Vermutung nahe, dass CALM für eine „Feineinstellung“ der Clathrin vermittelten Endocytose benötigt wird, die diesen Vorgang insgesamt effektiver und somit „kostengünstiger“ für die Zelle macht. CALM übt aber insgesamt keine essentielle Funktion aus.

GAk RNAi

Die Ergebnisse der RNAi Experimente gegen das Enzym GAK waren zunächst überraschend: Aufgrund bisher publizierter Ergebnisse war davon ausgegangen worden, dass eine Ausschaltung des Proteins zum Kollaps der gesamten Clathrin vermittelte Endocytose führen müsste (47,51,52): Da der Katalysator für die *Uncoating* Reaktion nicht mehr vorhanden ist, kann die Proteinhülle nicht abgestreift werden, die Vesikel vermögen folglich nicht mehr mit dem Endosom zu fusionieren und sammeln sich im Cytosol an. Schließlich kommt die Endocytose zum Stillstand, da kein freies Clathrin, keine freien Adaptoren und auch keine akzessorischen Proteine mehr zur Vesikelbildung zur Verfügung stünden. Auch unterliegt Clathrin an der Plasmamembran einem schnellen und regelmäßigen ATP-abhängigen Austausch (46). Es war daher vermutet worden, dass GAK/Auxilin diesen Austausch schon an der Plasmamembran katalysiert.

Die Daten der Elektronenmikroskopie und der Zellfraktionierung schienen diese Annahmen zunächst zu bestätigen: Der „*Knockdown*“ mittels RNAi von GAK führt zur Akkumulation von flachen Clathrin bedeckten Einstülpungen und Netzwerken an der Plasmamembran. Es wird hier 8 % der Membranfläche von Clathrin bedeckten Strukturen eingenommen, während es in den Kontrollen nur halb so viel ist. Doch wider Erwarten war in den mit GAK siRNA transfizierten Ansätzen weder die Aufnahme von Transferrin signifikant behindert, noch war der Austausch von Clathrin an der Plasmamembran unterbunden. Die Geschwindigkeit des Prozesses war identisch, die Erholung der Fluoreszenz war allerdings durchschnittlich nur halb so gut wie in den Kontrollen. Diese Daten sind nicht damit zu vereinbaren, dass GAK der alleinige Katalysator des Austauschs von Clathrin an der Plasmamembran ist. Es muss noch einen weiteren Cofaktor geben. Möglich ist, dass Clathrin beispielsweise am Rande von Clathrin bedeckten Einstülpungen ohne GAK austauschen kann. In den mittleren Bereichen, wo die Clathrin Moleküle sehr stark miteinander verflochten sind, wird dagegen das Enzym benötigt: Man beobachtet folglich in Zellen, in denen die Produktion von GAK unterdrückt worden ist, nach Fotobleichen von fluoreszenzmarkierten Clathrin Strukturen eine Erholung welche genau so schnell ist, wie in den Kontrollen. Sie ist jedoch nicht vollständig, da Clathrin nur in bestimmten Bereichen ausgetauscht werden kann.

Auf der anderen Seite erholt sich die AP-2 Fluoreszenz langsamer, was auf einen gewissen Einfluss von GAK auf den Gesamtprozess schließen lässt.

Zusammengenommen legen diese Ergebnisse nahe, dass GAK *in vivo* und in höheren Eukaryoten nicht den Einfluss bei der Clathrin vermittelten Endocytose hat, den man zunächst

angenommen hat. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass das *Uncoating* durch GAK auch beim Austausch von Clathrin an der Plasmamembran eine Rolle spielt. Die geringen funktionellen Auswirkungen legen allerdings nahe, dass es entweder einen weiteren Cofaktor gibt, und/oder dass die *Uncoating* Reaktion auch ohne GAK funktionieren kann.

Es ist allerdings noch eine weitere Erklärung denkbar: GAK ist *in vitro* bereits in katalytischen Mengen wirksam. Da die Ausschaltung von Proteinen mittels RNAi nie vollständig ist, sondern ein Rest in der Zelle verbleibt, ist es denkbar, dass diese Menge ausreichend sein könnte, um ein einigermaßen funktionierendes *Uncoating* zu gewährleisten. Beispiele in der Literatur zeigen allerdings, dass die Ausschaltung von Enzymen meist unproblematisch ist (31,111), da auch hier die intrazellulären Konzentrationen genau den jeweiligen Bedürfnissen der Zelle angepasst sind.

Schlussbetrachtung

Auch diese Arbeit hat gezeigt, wie effektiv und einfach mit Hilfe von RNAi Mangelphänotypen von Proteinen erzeugt werden können, die kaum von einem vollständigen „*Knockout*“ zu unterscheiden sind. Hierdurch gelangen Einsichten in die Funktionsweisen von endocytotischen Makromolekülen, die ohne diese Methode nicht möglich gewesen wären. Es wurden keine unspezifischen Seiteneffekte beobachtet. Die Ergebnisse, die mit einer siRNA erzielt wurden, konnten stets mit einer zweiten siRNA mit einer unterschiedlichen Sequenz reproduziert werden. Dies verdeutlicht die hohe Spezifität dieser Methode.

Zusammenfassend kann man sagen, dass auch diese Arbeit verdeutlicht, welche enorme Bedeutung RNAi für die moderne zellbiologische Forschung hat. Sie hat sich daher nicht zu Unrecht in den vier Jahren seit ihrer Nutzbarmachung in Säugetieren zu einer breit angewandten Standardmethode entwickelt. Eine Charakterisierung von neuen endocytotischen Proteinen ohne Anwendung dieser Methode erscheint kaum mehr vorstellbar.

5. Literatur

1. Conner, S. D., und Schmid, S. L. (2003) *Nature* **422**, 37-44
2. Lodish H., B. A., Zipursky S.L., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J. (2001) *Molekulare Zellbiologie*, 4. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag
3. Ciechanover, A., Schwartz, A. L., und Lodish, H. F. (1983) *J Cell Biochem* **23**, 107-130
4. Sorkin, A., und Von Zastrow, M. (2002) *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 600-614
5. Wells, A., Welsh, J. B., Lazar, C. S., Wiley, H. S., Gill, G. N., und Rosenfeld, M. G. (1990) *Science* **247**, 962-964
6. Vieira, A. V., Lamaze, C., und Schmid, S. L. (1996) *Science* **274**, 2086-2089
7. Nossal, R. (2001) *Traffic* **2**, 138-147
8. Ungewickell, E., und Branton, D. (1981) *Nature* **289**, 420-422
9. Kirchhausen, T., und Harrison, S. C. (1981) *Cell* **23**, 755-761
10. Kirchhausen, T., Harrison, S. C., Chow, E. P., Mattaliano, R. J., Ramachandran, K. L., Smart, J., und Brosius, J. (1987) *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 8805-8809
11. Brodsky, F. M., Chen, C. Y., Knuehl, C., Towler, M. C., und Wakeham, D. E. (2001) *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**, 517-568
12. Hill, B. L., Drickamer, K., Brodsky, F. M., und Parham, P. (1988) *J Biol Chem* **263**, 5499-5501
13. Ungewickell, E., und Ungewickell, H. (1991) *J Biol Chem* **266**, 12710-12714
14. Fotin, A., Cheng, Y., Sliz, P., Grigorieff, N., Harrison, S. C., Kirchhausen, T., und Walz, T. (2004) *Nature* **432**, 573-579
15. Owen, D. J., Collins, B. M., und Evans, P. R. (2004) *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**, 153-191
16. Rous, B. A., Reaves, B. J., Ihrke, G., Briggs, J. A., Gray, S. R., Stephens, D. J., Banting, G., und Luzio, J. P. (2002) *Mol Biol Cell* **13**, 1071-1082
17. Peden, A. A., Rudge, R. E., Lui, W. W., und Robinson, M. S. (2002) *J Cell Biol* **156**, 327-336
18. Hirst, J., Bright, N. A., Rous, B., und Robinson, M. S. (1999) *Mol Biol Cell* **10**, 2787-2802
19. Barois, N., und Bakke, O. (2005) *Biochem J* **385**, 503-510
20. Heuser, J. E., und Keen, J. (1988) *J Cell Biol* **107**, 877-886
21. Robinson, M. S., und Bonifacino, J. S. (2001) *Curr Opin Cell Biol* **13**, 444-453
22. Ullrich, B., Li, C., Zhang, J. Z., McMahon, H., Anderson, R. G., Geppert, M., und Sudhof, T. C. (1994) *Neuron* **13**, 1281-1291
23. Conner, S. D., Schroter, T., und Schmid, S. L. (2003) *Traffic* **4**, 885-890
24. Ricotta, D., Conner, S. D., Schmid, S. L., von Figura, K., und Honing, S. (2002) *J Cell Biol* **156**, 791-795
25. Kalthoff, C., Alves, J., Urbanke, C., Knorr, R., und Ungewickell, E. J. (2002) *J Biol Chem* **277**, 8209-8216
26. Tebar, F., Bohlander, S. K., und Sorkin, A. (1999) *Mol Biol Cell* **10**, 2687-2702
27. Confalonieri, S., und Di Fiore, P. P. (2002) *FEBS Lett* **513**, 24-29
28. Ahle, S., und Ungewickell, E. (1986) *Embo J* **5**, 3143-3149
29. Nonet, M. L., Holgado, A. M., Brewer, F., Serpe, C. J., Norbeck, B. A., Holleran, J., Wei, L., Hartwig, E., Jorgensen, E. M., und Alfonso, A. (1999) *Mol Biol Cell* **10**, 2343-2360
30. Ford, M. G., Pearse, B. M., Higgins, M. K., Vallis, Y., Owen, D. J., Gibson, A., Hopkins, C. R., Evans, P. R., und McMahon, H. T. (2001) *Science* **291**, 1051-1055

31. Tanabe, K., Torii, T., Natsume, W., Braesch-Andersen, S., Watanabe, T., und Satake, M. (2005) *Mol Biol Cell* **16**, 1617-1628
32. Paleotti, O., Macia, E., Luton, F., Klein, S., Partisani, M., Chardin, P., Kirchhausen, T., und Franco, M. (2005) *J Biol Chem* **280**, 21661-21666
33. Krauss, M., Kinuta, M., Wenk, M. R., De Camilli, P., Takei, K., und Haucke, V. (2003) *J Cell Biol* **162**, 113-124
34. Engqvist-Goldstein, A. E., Warren, R. A., Kessels, M. M., Keen, J. H., Heuser, J., und Drubin, D. G. (2001) *J Cell Biol* **154**, 1209-1223
35. Schafer, D. A. (2002) *Curr Opin Cell Biol* **14**, 76-81
36. Benmerah, A., Lamaze, C., Begue, B., Schmid, S. L., Dautry-Varsat, A., und Cerf-Bensussan, N. (1998) *J Cell Biol* **140**, 1055-1062
37. Benmerah, A., Gagnon, J., Begue, B., Megarbane, B., Dautry-Varsat, A., und Cerf-Bensussan, N. (1995) *J Cell Biol* **131**, 1831-1838
38. Salcini, A. E., Chen, H., Iannolo, G., De Camilli, P., und Di Fiore, P. P. (1999) *Int J Biochem Cell Biol* **31**, 805-809
39. Itoh, T., Koshihara, S., Kigawa, T., Kikuchi, A., Yokoyama, S., und Takenawa, T. (2001) *Science* **291**, 1047-1051
40. Chen, H., Fre, S., Slepnev, V. I., Capua, M. R., Takei, K., Butler, M. H., Di Fiore, P. P., und De Camilli, P. (1998) *Nature* **394**, 793-797
41. Drake, M. T., Downs, M. A., und Traub, L. M. (2000) *J Biol Chem* **275**, 6479-6489
42. Ford, M. G., Mills, I. G., Peter, B. J., Vallis, Y., Praefcke, G. J., Evans, P. R., und McMahon, H. T. (2002) *Nature* **419**, 361-366
43. Sigismund, S., Woelk, T., Puri, C., Maspero, E., Tacchetti, C., Transidico, P., Di Fiore, P. P., und Polo, S. (2005) *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 2760-2765
44. Heuser, J. (1989) *J Cell Biol* **108**, 401-411
45. Heuser, J. E., und Anderson, R. G. (1989) *J Cell Biol* **108**, 389-400
46. Wu, X., Zhao, X., Baylor, L., Kaushal, S., Eisenberg, E., und Greene, L. E. (2001) *J Cell Biol* **155**, 291-300
47. Greener, T., Grant, B., Zhang, Y., Wu, X., Greene, L. E., Hirsh, D., und Eisenberg, E. (2001) *Nat Cell Biol* **3**, 215-219
48. Peter, B. J., Kent, H. M., Mills, I. G., Vallis, Y., Butler, P. J., Evans, P. R., und McMahon, H. T. (2004) *Science* **303**, 495-499
49. Hannan, L. A., Newmyer, S. L., und Schmid, S. L. (1998) *Mol Biol Cell* **9**, 2217-2229
50. Ungewickell, E. (1985) *Embo J* **4**, 3385-3391
51. Umeda, A., Meyerholz, A., und Ungewickell, E. (2000) *Eur J Cell Biol* **79**, 336-342
52. Greener, T., Zhao, X., Nojima, H., Eisenberg, E., und Greene, L. E. (2000) *J Biol Chem* **275**, 1365-1370
53. Ungewickell, E., Ungewickell, H., Holstein, S. E., Lindner, R., Prasad, K., Barouch, W., Martin, B., Greene, L. E., und Eisenberg, E. (1995) *Nature* **378**, 632-635
54. Fotin, A., Cheng, Y., Grigorieff, N., Walz, T., Harrison, S. C., und Kirchhausen, T. (2004) *Nature* **432**, 649-653
55. Zhu, Y., Traub, L. M., und Kornfeld, S. (1998) *Mol Biol Cell* **9**, 1323-1337
56. Traub, L. M., Ostrom, J. A., und Kornfeld, S. (1993) *J Cell Biol* **123**, 561-573
57. Sachse, M., Urbe, S., Oorschot, V., Strous, G. J., und Klumperman, J. (2002) *Mol Biol Cell* **13**, 1313-1328
58. Raiborg, C., Bache, K. G., Gillyooly, D. J., Madshus, I. H., Stang, E., und Stenmark, H. (2002) *Nat Cell Biol* **4**, 394-398
59. Sharp, P. A. (2001) *Genes Dev* **15**, 485-490
60. Jorgensen, R. (1990) *Trends Biotechnol* **8**, 340-344

61. Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., und Mello, C. C. (1998) *Nature* **391**, 806-811
62. Dykxhoorn, D. M., Novina, C. D., und Sharp, P. A. (2003) *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 457-467
63. Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., und Tuschl, T. (2001) *Nature* **411**, 494-498
64. Dharmacon, I. (2004) *RNAi Technical Reference & Application Guide*
65. Tuschl, T., Elbashir, S., Harborth, J., und Weber, K. (2004) in <http://www.rockefeller.edu/labheads/tuschl/sirna.html>
66. Cogoni, C., und Macino, G. (2000) *Curr Opin Genet Dev* **10**, 638-643
67. Dalmay, T., Hamilton, A., Rudd, S., Angell, S., und Baulcombe, D. C. (2000) *Cell* **101**, 543-553
68. Sijen, T., Fleenor, J., Simmer, F., Thijssen, K. L., Parrish, S., Timmons, L., Plasterk, R. H., und Fire, A. (2001) *Cell* **107**, 465-476
69. Brummelkamp, T. R., Bernards, R., und Agami, R. (2002) *Science* **296**, 550-553
70. Paddison, P. J., Caudy, A. A., Bernstein, E., Hannon, G. J., und Conklin, D. S. (2002) *Genes Dev* **16**, 948-958
71. Sledz, C. A., Holko, M., de Veer, M. J., Silverman, R. H., und Williams, B. R. (2003) *Nat Cell Biol* **5**, 834-839
72. (2003) *Nat Cell Biol* **5**, 489-490
73. Banerjea, A., Li, M. J., Bauer, G., Remling, L., Lee, N. S., Rossi, J., und Akkina, R. (2003) *Mol Ther* **8**, 62-71
74. Boden, D., Pusch, O., Lee, F., Tucker, L., und Ramratnam, B. (2003) *J Virol* **77**, 11531-11535
75. Soutschek, J., Akinc, A., Bramlage, B., Charisse, K., Constien, R., Donoghue, M., Elbashir, S., Geick, A., Hadwiger, P., Harborth, J., John, M., Kesavan, V., Lavine, G., Pandey, R. K., Racie, T., Rajeev, K. G., Rohl, I., Toudjarska, I., Wang, G., Wuschko, S., Bumcrot, D., Koteliensky, V., Limmer, S., Manoharan, M., und Vornlocher, H. P. (2004) *Nature* **432**, 173-178
76. Hinrichsen, L., Harborth, J., Andrees, L., Weber, K., und Ungewickell, E. J. (2003) *J Biol Chem* **278**, 45160-45170
77. Huang, F., Khvorova, A., Marshall, W., und Sorkin, A. (2004) *J Biol Chem* **279**, 16657-16661
78. Zhang, L., Gjoerup, O., und Roberts, T. M. (2004) *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 10296-10301
79. Novina, C. D., Murray, M. F., Dykxhoorn, D. M., Beresford, P. J., Riess, J., Lee, S. K., Collman, R. G., Lieberman, J., Shankar, P., und Sharp, P. A. (2002) *Nat Med* **8**, 681-686
80. Ghosh, P., Griffith, J., Geuze, H. J., und Kornfeld, S. (2003) *J Cell Biol* **163**, 755-766
81. Sorkina, T., Huang, F., Beguinot, L., und Sorkin, A. (2002) *J Biol Chem* **277**, 27433-27441
82. Ahle, S., Mann, A., Eichelsbacher, U., und Ungewickell, E. (1988) *Embo J* **7**, 919-929
83. Meresse, S., und Hoflack, B. (1993) *J Cell Biol* **120**, 67-75
84. Simonsen, A., Lippe, R., Christoforidis, S., Gaullier, J. M., Brech, A., Callaghan, J., Toh, B. H., Murphy, C., Zerial, M., und Stenmark, H. (1998) *Nature* **394**, 494-498
85. Kalthoff, C., Groos, S., Kohl, R., Mahrhold, S., und Ungewickell, E. J. (2002) *Mol Biol Cell* **13**, 4060-4073
86. Raiborg, C., Bache, K. G., Mehlum, A., Stang, E., und Stenmark, H. (2001) *Embo J* **20**, 5008-5021
87. Brodsky, F. M. (1985) *J Cell Biol* **101**, 2055-2062

88. Leers, M. P., Kolgen, W., Bjorklund, V., Bergman, T., Tribbick, G., Persson, B., Bjorklund, P., Ramaekers, F. C., Bjorklund, B., Nap, M., Jornvall, H., und Schutte, B. (1999) *J Pathol* **187**, 567-572
89. Todaro, G. J., und Green, H. (1963) *J Cell Biol* **17**, 299-313
90. Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., und Struhl, K. (1999) *Short Protocols in Molecular Biology*, 4 edition (April 19, 1999) Ed., Wiley John & Sons Inc
91. Heuser, J. (2000) *Traffic* **1**, 545-552
92. Svitkina, T. M., Verkhovsky, A. B., und Borisy, G. G. (1995) *J Struct Biol* **115**, 290-303
93. Svitkina, T. M., und Borisy, G. G. (1998) *Methods Enzymol* **298**, 570-592
94. Gavrieli, Y., Sherman, Y., und Ben-Sasson, S. A. (1992) *J Cell Biol* **119**, 493-501
95. Stryer, L. (1996) *Biochemie*, 4. Ausgabe Ed., Spektrum, Akademischer Verlag
96. Heuser, J. (1980) *J Cell Biol* **84**, 560-583
97. Nermut, M. V. (1989) *Electron Microsc Rev* **2**, 171-196
98. Hinrichsen, L. (2002) in *Diplomarbeit*, pp. 66, Hannover Medical School, Hannover
99. Wetten, F. R., Hawkins, S. F., Stewart, A., Luzio, J. P., Howard, J. C., und Jackson, A. P. (2002) *Science* **297**, 1521-1525
100. Liu, S. H., Wong, M. L., Craik, C. S., und Brodsky, F. M. (1995) *Cell* **83**, 257-267
101. Lindner, R. (1994) in *Cell Biology: A Laboratory Handbook*, pp. 525-530.
102. Iversen, T. G., Skretting, G., van Deurs, B., und Sandvig, K. (2003) *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 5175-5180
103. Roth, T. F., und Porter, K. R. (1964) *J Cell Biol* **20**, 313-332
104. Acton, S. L., und Brodsky, F. M. (1990) *J Cell Biol* **111**, 1419-1426
105. Sorkin, A., Krolenko, S., Kudrjavytceva, N., Lazebnik, J., Teslenko, L., Soderquist, A. M., und Nikolsky, N. (1991) *J Cell Biol* **112**, 55-63
106. Motley, A., Bright, N. A., Seaman, M. N., und Robinson, M. S. (2003) *J Cell Biol* **162**, 909-918
107. Keen, J. H., Willingham, M. C., und Pastan, I. H. (1979) *Cell* **16**, 303-312
108. Gaidarov, I., und Keen, J. H. (1999) *J Cell Biol* **146**, 755-764
109. Padron, D., Wang, Y. J., Yamamoto, M., Yin, H., und Roth, M. G. (2003) *J Cell Biol* **162**, 693-701
110. Page, L. J., und Robinson, M. S. (1995) *J Cell Biol* **131**, 619-630
111. Wang, Y. J., Wang, J., Sun, H. Q., Martinez, M., Sun, Y. X., Macia, E., Kirchhausen, T., Albanesi, J. P., Roth, M. G., und Yin, H. L. (2003) *Cell* **114**, 299-310
112. Rodal, S. K., Skretting, G., Garred, O., Vilhardt, F., van Deurs, B., und Sandvig, K. (1999) *Mol Biol Cell* **10**, 961-974
113. Conner, S. D., und Schmid, S. L. (2003) *J Cell Biol* **162**, 773-779
114. Goodman, O. B., Jr., Krupnick, J. G., Santini, F., Gurevich, V. V., Penn, R. B., Gagnon, A. W., Keen, J. H., und Benovic, J. L. (1996) *Nature* **383**, 447-450
115. Laporte, S. A., Oakley, R. H., Holt, J. A., Barak, L. S., und Caron, M. G. (2000) *J Biol Chem* **275**, 23120-23126
116. Sever, S. (2003) *Dev Cell* **5**, 530-532
117. Johannes, L., und Lamaze, C. (2002) *Traffic* **3**, 443-451
118. Praefcke, G. J., Ford, M. G., Schmid, E. M., Olesen, L. E., Gallop, J. L., Peak-Chew, S. Y., Vallis, Y., Babu, M. M., Mills, I. G., und McMahon, H. T. (2004) *Embo J* **23**, 4371-4383

6. Danksagung:

Diese Dissertation wurde im Institut für Zellbiologie im Zentrum Anatomie der Medizinischen Hochschule Hannover unter der Leitung von Herrn Professor Ernst Ungewickell angefertigt. Ich danke ihm für die Bereitstellung dieses interessanten und modernen Themas, sowie für die hervorragende Betreuung.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Professor Walter Müller für die Übernahme des Referats dieser Arbeit bedanken.

Ich danke Herrn Jens Harborth für die Hilfe bei der Auswahl der siRNA Sequenzen.

Frau Anika Meyerholz danke ich für die Zusammenarbeit bei dem CALM Projekt.

Dank geht auch an Frau Groos für die Daten der Ultradünnschnitte von CALM siRNA behandelten Zellen, für ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft und nicht zuletzt für die Zusammenarbeit bei der Immunmarkierung von Plasmamembranfragmenten.

Herrn Michael Düwel danke ich für die gute Zusammenarbei bei der Bearbeitung des GAK Projektes.

Des weiteren möchte ich mich ganz besonders bei Herrn Gerhard Preiß bedanken, der, obwohl er schon lange nicht mehr an einen Erfolg geglaubt hat, trotz allem unermüdlich mit mir Proben für die Elektronenmikroskopie bedampft und die Anlagen in Stand gehalten hat.

Dank geht auch an Frau Christiane Lemke für die unendlich vielen Gele, Frau Elke Mallon für Herstellung der Ultradünnschnitte und an Frau Angelika Hundt für die Digitalisierung der Negative und diverse Fotoarbeiten. Beate Großmann danke ich dafür, dass sie zum Teil die Zellen für mich ausgesät und noch viel häufiger passagiert hat.

Herrn Markus Döring und Herrn Tobias Frank danke ich für das Korrekturlesen der Arbeit.

Gesa Meyer danke ich für ebendieses und noch viel mehr.

Gedankt sei auch meinen Eltern und meiner Großmutter für die Unterstützung während des Studiums und der Dissertation.

7. Anhang

wissenschaftlicher Werdegang

- 10.1996 – 08.2002
Studium der Biochemie an der Universität Hannover, Abschluss: Diplom
Diplomarbeit: Hemmung der intrazellulären Proteinsynthese von Clathrin, Eps15 und Hip1R mittels inhibitorischer RNA
- 09.2002 – 08.2005
Promotion im Fach Biochemie an der Universität Hannover, Anfertigung der Doktorarbeit in der Abteilung Zellbiologie der MH-Hannover

Publikationen

- 09.2003
Hinrichsen L., Harborth J., Andrees L., Weber C., Ungewickell E.J.: "*Effect of clathrin heavy chain- and alpha-adaptin-specific small inhibitory RNAs on endocytic accessory proteins and receptor trafficking in HeLa cells*"
J Biol Chem. 2003 Nov 14;278(46):45160-70. Epub 2003 Sep 6. PMID: 12960147
12. 2004
Hinrichsen L.*, Meyerholz A*., Groos S., Esk C., Brandes G., Ungewickell E.J.: "*Role of the Clathrin Assembly Lymphoid Myeloid Leukemia Protein (CALM) in coated vesicle budding*"
Poster: 44th Annual Meeting of The American Society for Cell Biology, Abstract #L226, Washington, DC, USA
- 04.2005
Meyerholz A*., Hinrichsen L*., Groos S., Esk C., Brandes G., Ungewickell E.J.: "*The Role of CALM in coated vesicle budding*"
Manuskript eingereicht
- *der Beitrag beider Autoren ist gleichwertig

Abbildung: Interaktionen von Proteinen der Clathrin vermittelten Endocytose

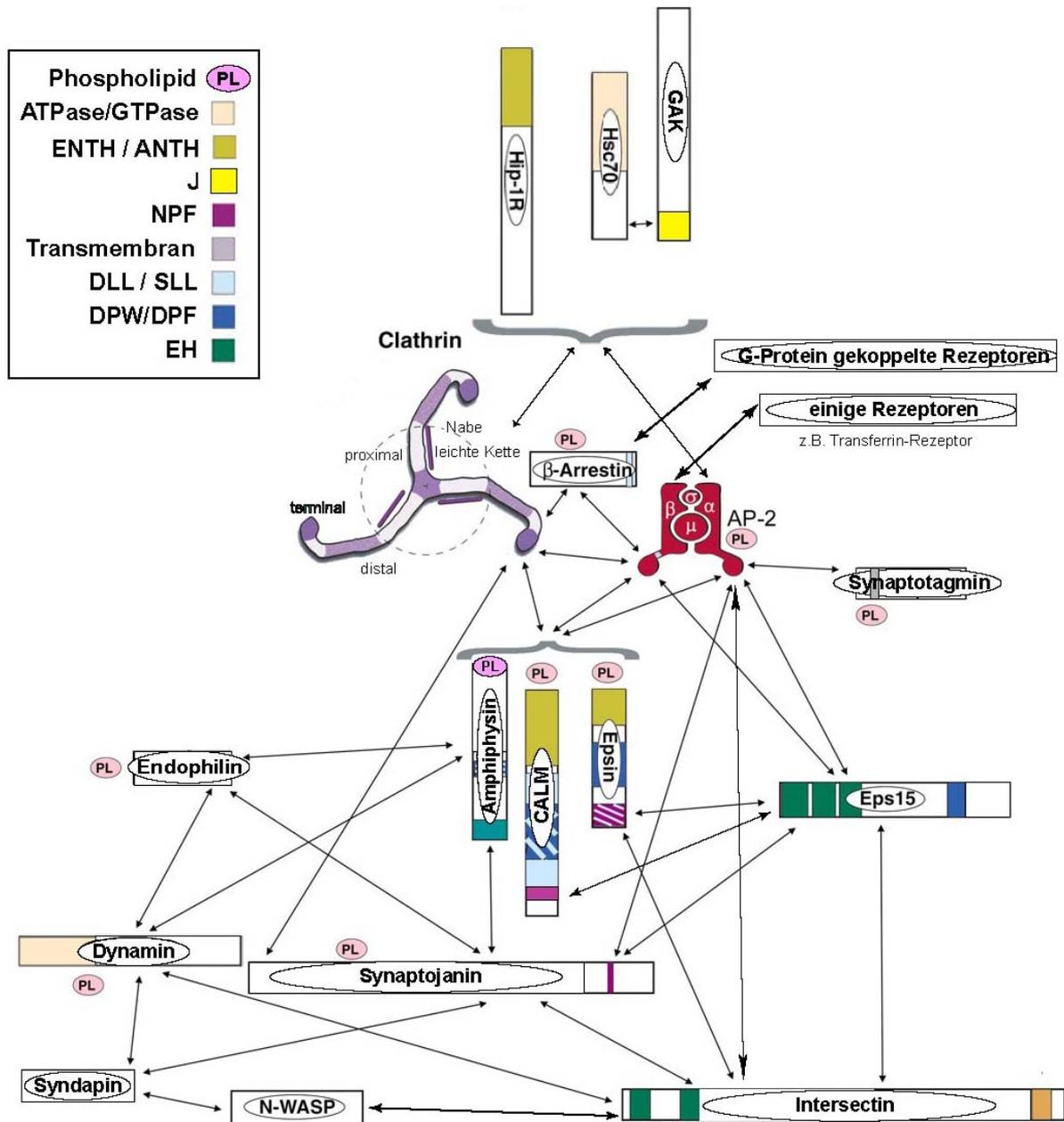


Abbildung 7-1: Interaktionen von ausgewählten Proteinen der Clathrin vermittelten Endocytose: Die Pfeile zeigen Bindungen zwischen den einzelnen dargestellten Proteinen an. Graue Klammern deuten eine Bindung aller eingeschlossenen Makromoleküle an. Alle Moleküle außer Clathrin, AP-2 und die Rezeptoren sind als Balken mit einer Länge, welche die Molekülgröße im Verhältnis zu den übrigen Proteinen repräsentiert, dargestellt. Die farbigen Flächen zeigen unterschiedliche Bindungsmotive und Domänen an. Ihre Ausdehnung entspricht ansatzweise der Ausdehnung innerhalb des jeweiligen Proteins. Man beachte, dass die Pfeile nicht grundsätzlich die bindenden Domänen anzeigen.

Beschreibung der Legende: ein rosa Kreis mit den Buchstaben **PL** zeigt die Bindung von Membranlipiden (Phosphatidylinositol-4-5-Bisphosphat) an; die **ANTH/ENTH**-Domänen sind Phosphatidylinositol-4-5-Bisphosphat bindende Domänen; **J** zeigt die J-Domäne von GAK an, sie ist hochkonserviert und bindet Hsc70; das **NPF** Bindungsmotiv bindet EH-Domänen; **DLL/SLL** sind Clathrin bindende Sequenzmotive; **DPW** vermittelt AP-2 Bindung, die Eps15-Homologie Domäne (**EH**-Domäne) bindet NPF Motive.

Die Grafik zeigt nur eine Auswahl der bekannten Clathrin und AP-2 Bindungspartner an. So sind allein für Appendixdomäne von α -Adaptin über 20 bindende Proteine beschrieben worden (118).

Grafik modernisiert und angepasst aus (11).

