

# **Funktion der Clathrin leichten Ketten in lebenden Zellen**

Von der naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften  
Dr. rer. nat.  
genehmigte Dissertation  
von

Dipl.-Biochem. Philip Dannhauser  
Geboren am 25. November 1980 in Celle  
(2011)

Referent: Prof. Dr. Ernst J. Ungewickell

Koreferent: Prof. Dr. Helmut Holtmann

Tag der Promotion: 19.1.2011

## **Erklärung zur Dissertation**

gemäß §6(1) der Promotionsordnung der Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

für die Promotion zum Dr. rer. nat.

Hierdurch erkläre ich, dass ich meine Dissertation mit dem Titel

### **Funktion der Clathrin leichten Ketten in lebenden Zellen**

selbständig verfasst und die benutzten Hilfsmittel und Quellen sowie  
gegebenenfalls die zu Hilfeleistungen herangezogenen Institutionen vollständig  
angegeben habe.

Die Dissertation wurde nicht schon als Masterarbeit, Diplomarbeit oder andere  
Prüfungsarbeit verwendet.

PG. Dhes

.....  
(Philip Dannhauser)

„Wir können nicht beobachten, ohne das zu  
beobachtende Phänomen zu stören...“

*W. Heisenberg*

# Zusammenfassung

Clathrin ist ein ubiquitär exprimierter Proteinkomplex mit großer Bedeutung für die Homöostase eukaryotischer Zellen, da es am vesikulären Transport, der Zellmigration und Mitose beteiligt ist. Clathrintriskelia bestehen aus drei schweren Ketten (CHC), die jeweils eine leichte Kette (CLC) binden. In dieser Arbeit wurde RNA Interferenz dazu benutzt, die Expression der Clathrin leichten und schweren Ketten zu unterdrücken und so die Funktion der leichten Ketten genauer zu charakterisieren. Darüber hinaus wurden GFP-CLC-Fusionsproteine, die üblicherweise zur Analyse von Clathrin in lebenden Zellen verwendet werden, im Vergleich mit fluorochromiertem Clathrin charakterisiert. Die Analyse von HeLa-Zellen im Westernblot und quantitativer PCR zeigte, dass die Unterdrückung der Expression der leichten Ketten eine Reduktion der Expression der schweren Kette auf mRNA- und Proteinniveau zur Folge hat. Das Ausmaß der Reduktion der schweren Kette war dabei abhängig von der Transfektionsstrategie. In HeLa-Zellen, die nur noch etwa 20% CLC exprimierten, aber noch etwa 75% schwere Ketten, lagerten sich letztere zu großen Plaques an der der Unterlage anhaftenden Plasmamembran zusammen. Mikroinjektion fluorochromierter schwerer Kette (Alexa488 CHC) in CLC-depletierten Zellen, führte gleichfalls zur Ausbildung vergrößerter, dynamischer Clathrinstrukturen. Diese Plaquebildung konnte durch Mikroinjektion von Alexa488 CHC, an die leichte Ketten zuvor gebunden worden waren, verhindert werden.

Die biochemische und funktionelle Charakterisierung von fluorochromierten Clathrin leichten Ketten ergab, dass diese sich wie nicht-derivatisierte leichte Ketten verhielten. Im Gegensatz dazu sind GFP-CLC Fusionsproteine unter physiologischen Bedingungen nicht in der Lage, die Polymerisation von Clathrin in Käfigstrukturen zu inhibieren. Dazu passen Daten, die zeigen, dass in HeLa-Zellen die wenig endogene leichte Ketten, dafür aber GFP-LCB überexprimieren, Clathrin-Plaques vermehrt an der adherenten Plasmamembran auftraten. Die Expression von GFP-LCB war auch nicht ausstreichend, um die Reduktion der schweren Kette in Folge der Depletion der endogenen leichten Ketten vollständig zu verhindern. Immunfluoreszenz - Untersuchungen zeigten weiterhin, dass die Morphologie des Trans-Golginetzwerks (TGN) mit der Änderung der Expression und Lokalisation der schweren Kette, korreliert. Aus den vorliegenden Ergebnissen kann geschlossen werden, dass die leichten Ketten Regulatoren der Expression der Clathrin schweren Kette sind und die Zusammenlagerung der schweren Kette in lebenden Zellen von den leichten Ketten reguliert wird. Somit hat die Manipulation der Expression der leichten Ketten in lebenden Zellen immer auch Auswirkungen auf die schwere Kette, was bei der Interpretation der Phänotypen

einer auf die leichten Ketten gezielten siRNA zu berücksichtigen ist. Da auch GFP-CLC Fusionsproteine, das Verhalten der schweren Ketten verändern, sind *in vitro* fluochromierte leichte Ketten, die sich funktionell nicht von endogenen unterscheiden, eine Alternative, um die Dynamik von Clathrin in lebenden Zellen fluoreszenzmikroskopisch zu charakterisieren.

## Abstract

Clathrin is an ubiquitously expressed protein complex with great importance for the homeostasis in eukaryotic cells as it is crucial for vesicular trafficking, cell migration and mitosis. Clathrin triskelia consist of three heavy (CHC) - and three light chains (CLC). In this thesis I investigated the role of the clathrin light chains using RNA interference. In addition GFP-CLC fusion proteins, used to visualize clathrin in living cells were compared with *in vitro* fluorochromated light chains. Westernblot analysis and quantitative PCR of HeLa cells revealed that down regulation of CLC by RNAi causes also a reduction in the mRNA- and protein levels of the clathrin heavy chain. The extend of this reduction is dependent on the RNAi-transfection protocol. In HeLa-cells with expression level of CLC reduced by 80% and still high levels of CHC (~75% left) the heavy chain coalesced into large patches at the substrate-adhering plasma membrane. Microinjection of fluorochromated heavy chain (Alexa488 CHC) into light-chain-depleted cells resulted in large and dynamic clathrin structures. This phenotype was reversed by microinjection of Alexa 488 CHC complexed with light chains. An important function of light chains is their ability to inhibit under physiological conditions the self-assembly of clathrin. In *in vitro* assembly experiments where fluorochromated- and unlabeled light chains were compared with GFP-CLC fusion proteins I observed that the latter failed to inhibit the assembly of clathrin under physiological conditions. Also, the downregulation of endogenous CLC by RNAi in cells stably expressing GFP-LCB promoted clathrin assembly on membranes. Moreover, the expression of GFP-LCB was not sufficient to completely prevent the loss of heavy chains in cells where the endogeneous light chains had been depleted by RNAi. Finally immunofluorescence and analysis showed, that the morphology of the TGN correlates with changes in heavy chain expression and localization in cells treated with CLC- or CHC-specific siRNA.

I conclude that the clathrin light chains regulate expression of the clathrin heavy chain and that light chains regulate the assembly of the heavy chain in living cells. Moreover, GFP-tagged light chains are functionally compromised and therefore microinjected

fluorochromated light chains offer an alternative for studying clathrin dynamics in living cells.

Finally, the manipulation of clathrin light chains levels in living cells can interfere with the expression level of the heavy chain which complicates the interpretation of the results of targeted knockdowns of light chains.

Schlagworte:

Clathrin, Regulation, RNA-Interferenz

Keywords:

Clathrin, regulation, RNA-Interference

# Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Ungewickell für die ausgezeichnete Betreuung, die stete Diskussionsbereitschaft und die gute Zusammenarbeit während der Dissertation bedanken.

Ein besonderes Dankeschön geht an Michael Düwel, und Annalisa Mancini die mir während meiner ersten Zeit freundlich, geduldig und kompetent zu Seite gestanden haben. Ich möchte auch Agnes Golla, Markus Hoffmann, Anna Bargsten und Inga Wittrock für die schöne Zeit und kollegiale Atmosphäre im Labor danken.

Den Mitarbeitern des Instituts für Zellbiologie, insbesondere bei Huberta Ungewickell, Beate Großmann, Heike Böning, Christiane Lemke, Angelika Hundt und Gurdrun Daenecke gilt mein Dank für ihre freundliche und kompetente Zusammenarbeit und die technische Assistenz.

Auch bei Dr. Robert Lindner und Dr. Rudolf Bauerfeind danke ich für ihre Unterstützung und Diskussionsbereitschaft.

Frau Dr. Stephanie Groos möchte ich insbesondere für die Einführung und Unterstützung bei der Durchführung elektronenmikroskopischer Verfahren bedanken.

Frau PD Dr. U. Curth möchte ich für die Durchführung und Auswertung der Fluoreszenz-Ultrazentrifugationsexperimente danken.

Ich danke Frau Dr. Volke für den Zugang zum „Imager Argus1“.

Herrn Prof. Dr. Holtmann gilt besonderer Dank für die Übernahme des Koreferats und dafür, dass er den Biochemie – Studenten immer engagiert zur Seite gestanden hat.

Zu guter letzt möchte ich mich bei meinen Eltern für die Unterstützung meiner Träume und deren Verwirklichung bedanken. Ich danke Melanie Backhausen und meiner Mutter für das Korrekturlesen dieser Arbeit.



# Inhaltsverzeichnis:

<b>Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>Abstract</b>	<b>2</b>
<b>Danksagung</b>	<b>4</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>5</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>8</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>11</b>
Endozytosemechanismen	11
Clathrinvermittelte Endozytose	13
Clathrin	16
Clathrin leichte Ketten	18
Adaptorkomplex 1/2	21
Hip 1/ 1R	23
Akzessorische Proteine	24
Darstellung der clathrinvermittelten Endozytose in der Mikroskopie	25
<b>Aufgabenstellung</b>	<b>27</b>
<b>2. Material und Methoden</b>	
Material	
Geräte	28
Chemikalien	29
Enzyme/ Liganden	31
Komplettsysteme	32
Zellen und Bakterien	32
Vektoren / DNA-Konstrukte	33
Primer/ siRNA	34
Antikörper	35
Puffer	37
Verbrauchsmaterialien	39
Software	40

## Methoden

### Zellkultur

Zellpassage und Kultur	41
Transfektion von DNA	41
Transfektion von siRNA	42

### Nachweismethoden

Messung der Extinktion von DNA und Proteinen	42
Coomassie-Färbung/ Ponceau-Färbung	43
SDS-PAGE und Western Blotting	43
Immunhistochemie	44
Aufnahme von Transferrin	45
Behandlung der Zellen mit Latrunculin B	46

### Lichtmikroskopie

Mikroskopie lebender Zellen	47
Mikroinjektion	47
FRAP – "Fluorescence Recovery After Photobleach"	48

### Elektronenmikroskopie

Präparation ventraler Zellmembran - „Ripp off“	48
Ultradünnschnitte	50

### Molekularbiologische Methoden

Kultivierung von Bakterienkulturen	51
DNA-Reinigung	51
Elektro-/ Thermotransformation	51
Agarose-Gelelektrophorese	53
Aufreinigung von DNA über ein Agarosegel	53
Aufreinigung von RNA	53
Generierung von cDNA	54
Kolonie-PCR	54
Quantitative PCR	55
Klonierungen von CLC-cDNA	56
Sequenzierung /Sequenzanalyse	58
Densiometrische Auswertung	58

Testinduktion	59
Aufreinigungen	
Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen	59
Aufreinigung von Clathrin	60
Fluorochromierung von Clathrin	60
Zellfraktionierung	61
Immunpräzipitation	61
Analytische Ultrazentrifugation	62
Zusammenlagerung (Assembly) von Clathrin	63
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>64</b>
Expression von Clathrin	65
Clathrinabhängige Morphologie des Trans-Golgi-Netzwerks (TGN)	77
Morphologie von Clathrinstrukturen an der Plasmamembran	91
Mikroinjektion von fluorochromiertem Clathrin	106
Untersuchungen zur Funktionalität von GFP-CLC	112
<b>4. Diskussion</b>	<b>123</b>
Expression von Clathrin	124
Clathrin in der Organellmorphogenese	133
Clathrin in dynamischen Prozessen	138
Fazit	146
<b>5. Literaturverzeichnis</b>	<b>147</b>
<b>6. Curriculum vitae</b>	<b>158</b>

# Abkürzungsverzeichnis

AAK1	Adaptor-assoziierte Kinase 1
ANTH	„AP180-N-terminal homology „
AP	Adaptor Protein (e.g. AP1, AP2)
AP180	“Assembly protein” mit einem apparenten Molekulargewicht von 180 kDa
Arf1 Arf6	ADP-ribosylierungsfaktor 1, ADP-ribosylierungsfaktor 6
ATP	Adenosintriphosphat
BFA	Brefeldin A
BLAST	“Basic logical alignment search tool“
BSA	Bovines Serum Albumin
CALM	“Clathrin assembly lymphoid myeloid leukemia protein“
CCP	„Clathrin-coated pit“ – Clathrin bedeckte Membraneinstülpung
CCV	„Clathrin-coated vesicle„, clathrinbedecktes Vesikel
cDNA	„complementary DNA“
CHC	„Clathrin heavy chain„, – Clathrin schwere Kette
CIP	„Calf intestinal alkaline phosphatase“- Alk. Phosphatase aus Rinderdarm
CLTC-1	Gen Clathrin schwere Kette, CHC 17 (Chromosom 17)
CLTA/ CLTB	Gen Clathrin leichte Kette, Isoform A/B
CME	“Clathrin-mediated endocytosis” – Clathrinvermittelte Endozytose
DMEM	„Dulbeccos modified Eagle’s medium“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	„Deoxyribonucleic acid“ – Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ECL	„Enhanced Chemoluminescence“
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEA1	„Early endosomal antigen 1“
EGF	Epidermal growth factor
ENTH-	Epsin N-terminal homology domain
Eps15	„EGF-receptor protein substrate 15“
Epsin	„Eps15-interacting protein“
ER	Endoplasmatisches Reticulum

FCS	Fetales Kälberserum
GAK	Cyclin G-assoziierte Kinase
GEF	Guanine nucleotide exchange factor
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein
GGA	Golgi-localizing, $\gamma$ -adaptin ear homology domain, Arf –binding
GSH	Glutathion
GST	Glutathione-S-transferase
GTP	Guanosine 5-triphosphate
H <sub>6</sub>	6 x Histidin
HEPES	Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure
Hip1	„Huntingtin interacting protein 1“
Hip1R	„Hip1-related,„
Hsc70	“Cognate heat shock-protein with a MW of 70 kDa”
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
kDa	Kilodalton
LB-Medium	Luria-Bertani medium
LCA	Clathrin leichte Kette Isoform A
LCB	Clathrin leichte Kette Isoform B
LCKD	(Clathrin) Leichte Ketten „knock down“
LDL	Low-density lipoprotein
M6PR	Mannose 6-Phosphate-Rezeptor
MHH	Medizinische Hochschule Hannover
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MW	Molekulargewicht
nt	Nucleotid
PBS	„Phosphate buffered saline“
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDB	„Protein database“
PFA	Paraformaldehyd
PIPK	Phosphatidylinositol 4-phosphat 5-Kinase
PMSF	Phenyl-methyl-sulfonyl fluorid
PiP	Phosphatidylinositol
PiP-4	Phosphatidylinositol 4-monophosphate
PiP <sub>2</sub> -4,5	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
Q-Primer	„Quantifizierungs – Primer“

RE	Recyclingendosom
RFP	Rot Fluoreszierendes Protein
RT	Reverse Transcriptase
SDS	„Sodium dodecyl sulfate“ – Natrium-Dodecylsulfat
SDS-PAGE	„ <u>S</u> DS- <u>P</u> olyAcrylamid- <u>G</u> el <u>E</u> lektrophorese“
siRNA	„Short interfering RNA“
Snx 9	Sorting nexin 9
TBE	Tris-borat-EDTA
TBS	„Tris-buffered saline“
TD	Terminale Domäne
TE	Tris-EDTA
TE	Tris-Extrakt
Tf	Transferrin
TfR	Transferrinrezeptor
TGN	<i>Trans</i> -Golgi-Netzwerk
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units
UV	Ultraviolettes Licht
Upm	Umdrehungen pro Minute
XFP	Allg. für Fluoreszierendes Protein (GFP, RFP..)

# 1. Einleitung

Die fortwährende Anpassung der eukaryotischen Plasmamembran spielt eine zentrale Rolle bei der Interaktion von Zellen mit ihrer Umgebung. Die Zusammensetzung der Membran wird durch komplexe Prozesse gesteuert, welche für den kontrollierten An- und Abtransport von Membranbestandteilen sorgen. Einer der konserviertesten Prozesse ist die Endozytose von Membranvesikeln. Teile der Membran werden hierbei einschließlich gebundener Moleküle von der Oberfläche ins Innere der Zelle transportiert. Die Sortierung von Membran und Frachtmolekülen an der Oberfläche ist streng reguliert und legt die weitere Bestimmung des sich bildenden Vesikels fest.

Allerdings finden dabei nicht nur Rezeptoren und Frachtmoleküle ihren Weg in die Zelle, sondern auch Krankheitserreger wie Viren und Bakterien (Marsh & Helenius et al 2006; Bonazzi & Cossard et al 2006).

Das Protein Clathrin ist eines der am besten charakterisierten Makromoleküle, die direkt am Prozess der Endozytose, bzw. dem intrazellulären Transport von frachtbeladenen Vesikeln zwischen verschiedenen Zellorganellen beteiligt sind. Die sogenannte Clathrinvermittelte Endozytose ist eine der effektivsten und häufigsten Formen der Endozytose in eukaryotischen Zellen (Doherty & McMahon et al 2009). Weiterhin ist Clathrin essenziell für den anterograden und den posterograden Transport zwischen dem Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) und dem späten Endosom.

In dieser Arbeit liegt der Fokus der Untersuchungen auf den Mechanismen, bei denen Clathrin involviert ist.

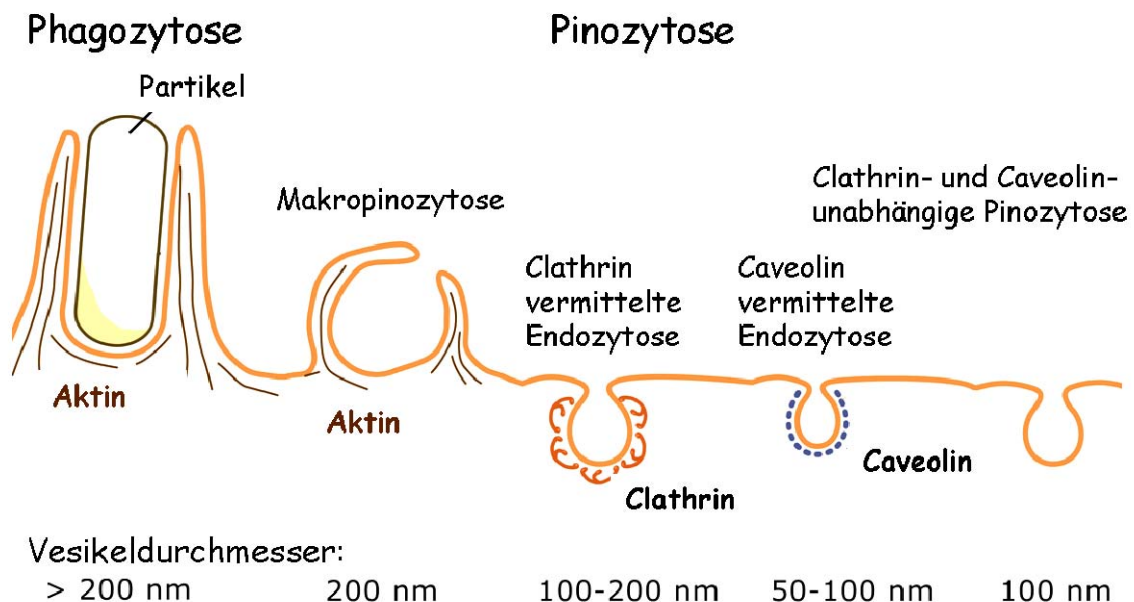
## **Endozytosemechanismen:**

Im Allgemeinen wird der Prozess der Internalisierung von Molekülen aus dem Extrazellulärraum als Endozytose beschrieben. Je nach Mechanismus und Frachtmolekülen unterscheidet man verschiedene Formen (siehe Abbildung 1.1). Es gilt zu beachten, dass viele Moleküle redundant über verschiedene Mechanismen internalisiert werden können. Ein Beispiel für die Aufnahme verhältnismäßig großer Partikel ist die Phagozytose von Bakterien. Hierbei umfließt die Zelle das bis zu einigen Mikrometern große Partikel und nimmt es so auf. Diese Form der Endozytose wird in der Regel nur von spezialisierten Zellen, wie Makrophagen, durchgeführt. Einige Bakterien sind allerdings auch in der Lage, Phagozytose

bei normaler Weise nicht phagozytierenden Zellen zu induzieren (Mengaud et al. 1996; Pauly & Drubin et al. 2007).

Fast alle Zellen hingegen nehmen mit der Pinozytose, dem sogenannten „Zelltrinken“, ständig unspezifisch Moleküle aus der Umgebung auf. Die Makropinozytose ist, wie die Phagozytose, abhängig von der Funktion des Aktin- Zytoskeletts. Alle Zellen nehmen darüber hinaus über die rezeptorvermittelte Endozytose spezifisch Moleküle von der Oberfläche auf. Hierbei werden Moleküle endozytiert. Diese sind an Rezeptoren gebunden, welche sich wiederum im Bereich des sich bildenden Vesikels anreichern und somit die Aufnahme nicht nur spezifisch sondern auch quantitativ machen können. Dieser Weg dient Zellen außerdem zur Regulation der Menge und Zusammensetzung von Rezeptoren an der Oberfläche.

**Abbildung 1.1**



Jones & Bartlett Publishers

**Abbildung 1.1:** Übersicht verschiedener Endozytosemechanismen.

Die Clathrinvermittelte Endozytose ist die wichtigste und am besten untersuchte Form der rezeptorvermittelten Endozytose. Sie kommt in nahezu allen Zellen ständig vor und ist unter anderem beim Recycling von synaptischen Vesikeln von großer Bedeutung. Neben dieser Funktion sorgt sie auch für die Aufnahme von Transferrin, Insulin, LDL und EGF. Viele zelluläre Parasiten, wie z.B. Influenza-Viren, missbrauchen diesen Weg, um in ihre Wirtszellen zu gelangen.

Abhängig von den Eigenschaften des Rezeptors, seiner Fracht und der Art der Zelle, kann die Art der Endozytose, sowie der Weitertransport zu und zwischen intrazellulären



Kompartimenten variieren. Weitere Beispiele für rezeptorvermittelte Endozytoseformen sind Caveolin- und Flotillin abhängige Prozesse. Hierbei wird die Membran im Bereich cholesterinreicher Subdomänen eingestülpt und dabei intrazellulär von dem Cholesterin bindenden Protein Caveolin umhüllt. Diese Subdomänen werden auch als „Rafts“ beschrieben. Alternativ spielt die Flotillin abhängige Endozytose bei der Raftendozytose eine Rolle. Beiden Prozessen ist gemein, dass sie unabhängig von Clathrin, aber abhängig von Dynamin sind (Doherty&McMahon et al.2009).

## **Clathrinvermittelte Endozytose**

Die Clathrinvermittelte Endozytose ist verantwortlich für die Aufnahme einer großen Bandbreite von Transmembranrezeptoren und ihrer Liganden in clathrinbedeckten Vesikeln. Für die Bildung von clathrinbedeckten Strukturen an der Plasmamembran können unterschiedliche Adaptoren verantwortlich gemacht werden, was den Prozess sehr variabel macht. Die Komplexität der beteiligten Adaptoren und akzessorischen Proteine in endozytotischer Maschinerie spiegeln die Adaptation des Mechanismus der Clathrinvermittelten Endozytose an verschiedene Frachtmoleküle wieder. In Synapsen, die Ort hoher Aktivität von Endozytose sind, werden bis zu 20 verschiedene Frachtmoleküle im selben Vesikel verpackt und aufgenommen (Schmid& McMahon et al 2007) Dieses Beispiel zeigt, dass in der Clathrinvermittelten Endozytose zwar Spezifitäten zwischen Adaptoren und Rezeptoren (und deren Liganden) bestehen, diese sich allerdings nicht unbedingt in einer räumlichen Trennung der Aufnahme äußern. Bei einigen Ausnahmen, wie Transferrin, hat sich allerdings gezeigt, dass das Adaptorprotein 2 essenziell für die Internalisation via Clathrinvermittelter Endozytose ist. Außerdem wurde für die alternativen Adaptoren Dab2 und ARH gezeigt, dass sie frachtspezifisch für die Aufnahme für das „Low-Density Lipoprotein“ LDL sind. Für den Adaptor Numb wiederum wurde eine Rolle bei der Internalisierung von Sanpodo, einem Regulator der Notch-Signalkaskade in neuronalem Gewebe, beschrieben (Hutterer et al. 2005).

Adaptoren und akzessorische Proteine koordinieren die Nukleation der Polymerisation des Clathrins an der Plasmamembran, die internalisiert werden soll. Diese Nukleation wiederum selbst sorgt dafür, dass das Clathrin in runde Gitterstrukturen polymerisiert, begleitet von einer beginnenden Einstülpung der gebundenen Membran (Abbildung 1.2 Schritt 1). Es bildet sich ein stabiles, aber dynamisches, mehrschichtiges Netzwerk.

Die Rekrutierung der Adaptoren an sich bildende endozytotische Bereiche geschieht zum einen über das Phospholipid Phosphatidylinositol-4,5-Phosphat (PiP<sub>2</sub>). Die Aktivität spezieller PiP-Kinasen sorgt für die lokale Erhöhung der PiP<sub>2</sub>-Konzentration und somit für eine vermehrte Rekrutierung von Adaptoren in diesem Bereich. Zum anderen spielen die zytosolischen Abschnitte transmembranständiger Rezeptoren, die dileuzin- und tyrosinbasierte Motive enthalten, bei der Adaptorenrekrutierung eine Rolle. Als Beispiel hierfür sei das Motiv YTRF des Transferrinrezeptors genannt, der ein sehr spezifischer Marker für die Clathrinvermittelte Endozytose ist. Durch die Interaktion ihrer zytoplasmatischen Domänen mit bestimmten Adaptoren können Transmembranrezeptoren mit ihrer Fracht in dem sich bildenden, clathrinbedeckten Vesikel konzentriert und aufgenommen werden.

Man geht davon aus, dass es gleichzeitig mit der Bildung des Clathrinmantels sukzessive zur Einstülpung der Membran kommt (siehe z.B. Modell „brownian ratchet“ Hinrichsen et al., 2006; Abbildung 1.2 Schritt 2). In der Abwesenheit von Clathrin kommt es nicht mehr zur Einstülpung AP2 - haltiger Strukturen an der Plasmamembran. (Hinrichsen et al. 2006)

Bei der Einstülpung der von clathrinummantelten Membran spielt das Bestreben des Clathrins, sich zu Buckminster-Fuller-Körpern zusammenzulagern eine entscheidende Rolle. Theoretisch ist die Polymerisation des Clathrins allein jedoch nicht in der Lage, die Krümmung der Membran zu induzieren (Nossal et al. 2001) Andererseits können Proteine wie Epsin, welches ein spezifischer Adaptor für ubiquitinylierte Rezeptoren ist (Hawryluk et al. 2006), Inositolphosphate binden und durch das Inserieren einer amphipathischen Helix in das innere Blatt der Lipiddoppelschicht die Krümmung der Membran unterstützen. In Bereichen, in denen Epsin an der Membran präsent ist, führt es zusammen mit der einsetzenden Zusammenlagerung des Clathrins zu einer Einstülpung der Membran. Das Zytoskelett spielt höchst wahrscheinlich ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Regulierung der Membranbiegung und der Abschnürung von Vesikeln. Kräfte, die durch die Polymerisation des Aktins zustande kommen, können die Einschnürung eines Membranabschnittes unterstützen (Liu et al 2009). Tatsächlich sind ebenfalls aktin gestützte Motorproteine wie Myosin VI, welches z.B. Dab2 und PiP<sub>2</sub> bindet, an der Clathrinvermittelten Endozytose beteiligt (Hasson et al. 2003).

Die Dynamik und Regulation dieses Verhaltens in vitro wurde bereits eingehend beschrieben. Ausserdem wird bei der Einstülpung auch der Einfluss akzessorischer Proteine diskutiert, die mit ihrem hydrophoben Teil in eine Lage der Plasmamembran inserieren können, um sie so zu krümmen. Als Beispiel sei hier die Bin-Familie (Bridging-Integrator) genannt. Diese Proteine

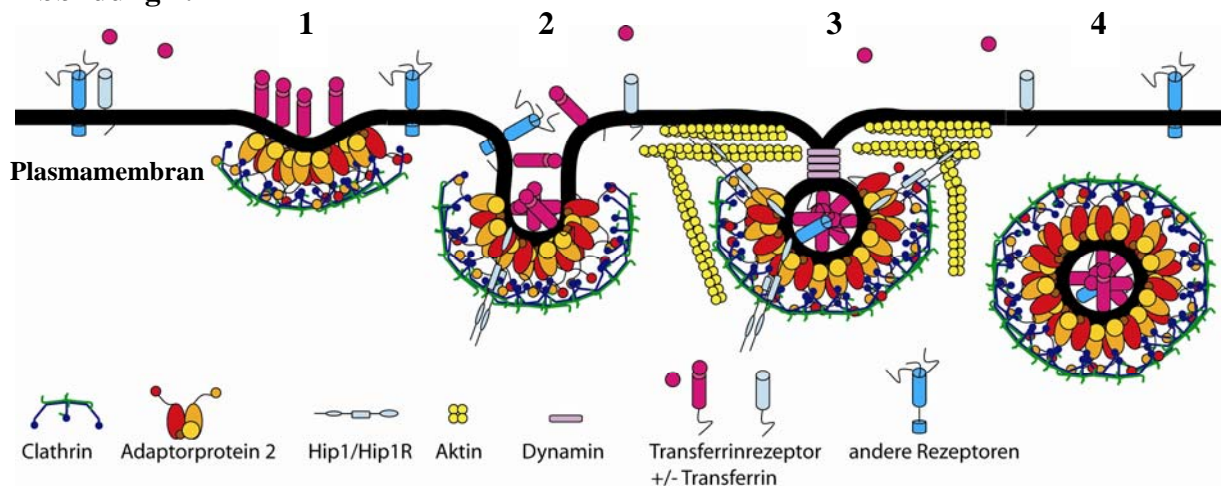
haben die spezielle Eigenschaft, Membranen sowohl zu krümmen, als auch ein erhöhtes Bindungsverhalten für bestimmte Krümmungen zu zeigen und diese somit zu „erkennen“. Sogenannte Bar-Domänenproteine (Bin–Amphiphysin–Rvs) wie das Amphiphysin können, in hoher Konzentration selbst Membrankrümmung induzieren und dadurch Membranen in Tubuli verformen. (Gallop et al. 2005). Die fortschreitende Polymerisation des Clathrins und die Assemblierung der Mantelbestandteile resultiert in der Invagination der Donormembran, und durch Abschnürung des eingestülpten Bereichs entsteht das endozytotische Vesikel. Unterstützt wird dieser Prozess, wie schon erwähnt, von dem Aktinzytoskelett, welches über Aktin und Clathrin bindende Proteine wie Hip 1 oder N-Wasp direkt mit dem clathrinbedeckten Vesikel in Verbindung treten kann. Am Abschnürungsprozess ist die GTPase Dynamin beteiligt. Dynamin formt dabei ein helikales Polymer um den Hals des sich bildenden Vesikels. Die Hydrolyse von GTP bewirkt eine Konformationsänderung des Dynamins, welche die Trennung des Vesikels von der Plasmamembran bewirkt (Wiejak et al. 2002). Das fertige Vesikel wird nach dem Abschnüren von der Plasmamembran, je nach Inhalt, zu seinem Zielorganell transportiert. (Abbildung 1.2 Schritt 3-4)

Der Zerfall („Dissassembly“) des komplexen Vesikelmantels geschieht durch Depolymerisierung des Clathringitters und den Zerfall der bestehenden Komplexe aus Adaptorproteinen und akzessorischen Proteinen auf der Oberfläche der Membranvesikel. Einen entscheidenden Einfluss auf den Zerfall des clathrinbedeckten Vesikels haben Phosphatasen wie Synaptojanin oder OCRL (Ooms et al. 2009). Sie sorgen für die Umwandlung des  $\text{PiP}_2$  in  $\text{PiP}$  (Phosphatidylinositol-4-Phosphat). Dieses reduziert die Bindungsfähigkeit der Adaptoren und einiger akzessorischer Proteine zur Membran. An der Auflösung des Proteinmantels sind das Hitzeschockprotein Hsc70 und sein Kofaktor Auxilin (Auxilin 1 in neuronalem Gewebe, Auxilin2/ Gak ubiquitär) von entscheidender Bedeutung. (Ungewickell et al. 1995) Auxilin rekrutiert dabei das HSC70 an die Clathrinhülle und verstärkt dessen ATPase-Aktivität. Auxilin allein hingegen ist in hohen Konzentrationen in der Lage, die Polymerisationsneigung von Clathrin zu verstärken.

Nach seiner „Enthüllung ist das Vesikel bereit, mit Endosom zu fusionieren.

Die geschilderten Prozesse der Bildung und Dissoziation clathrinbedeckter Vesikel sind sehr komplex und erfordern das Zusammenspiel zahlreicher Proteine. Auf einige, die für diese Arbeit von Bedeutung sind, soll genauer eingegangen werden

**Abbildung 1.2**



**Abbildung 1.2:** Vereinfachte, schematische Darstellung des Ablaufes von Bildung und Zerfall clathrinbedeckter Vesikel (nicht maßstabsgetreu). Schritt 1: Durch die Anlagerung von AP 2 an die Membran und die Rekrutierung von Clathrin kommt es zur Anreicherung von Frachtmolekülen (Liganden). Schritt 2: In der sich fortwährend weiter vertiefenden Membraneinbuchtung sammeln sich immer mehr Frachtmoleküle. Schritt 3: Im weiteren Prozess kommt es mit der fortschreitenden Clathrinpolymerisation zur Ausbildung eines Vesikels. Schritt 4: In Abhängigkeit von GTP schnürt das Mechanoenzym Dynamin das Vesikel von der Plasmamembran ab. Das fertige Vesikel ist internalisiert und wird im Folgenden durch die Aktivität von Phosphatasen wie Synaptojanin oder OCRL und Chaperonen und deren Kofaktoren (Auxilin und HSC70) von seiner Proteinhülle befreit.

## Clathrin

Elektronenmikroskopische Aufnahmen des aus Hirn gereinigten Clathrinpolymers waren ausschlaggebend für die Namensgebung des Proteins (latein. clatri = Gitter). Das polygonale Clathrinpolymer stellt neben den Adaptorproteinen den Hauptanteil der Proteinhülle der clathrinbedeckten Vesikel (Pearse et al. 1976).

Clathrin ist ein hetero hexamerer Komplex, bestehend aus drei 192 kDa schweren, trimerisierten Ketten und drei kleineren assoziierten leichten Ketten. Das Trimer, das man auch als Triskelion (Dreibeiner) bezeichnet, wird durch nicht-kovalente Wechselwirkungen zusammengehalten, benötigt aber bestimmte Cysteinreste am C-terminus (Ybe et al. 2003).

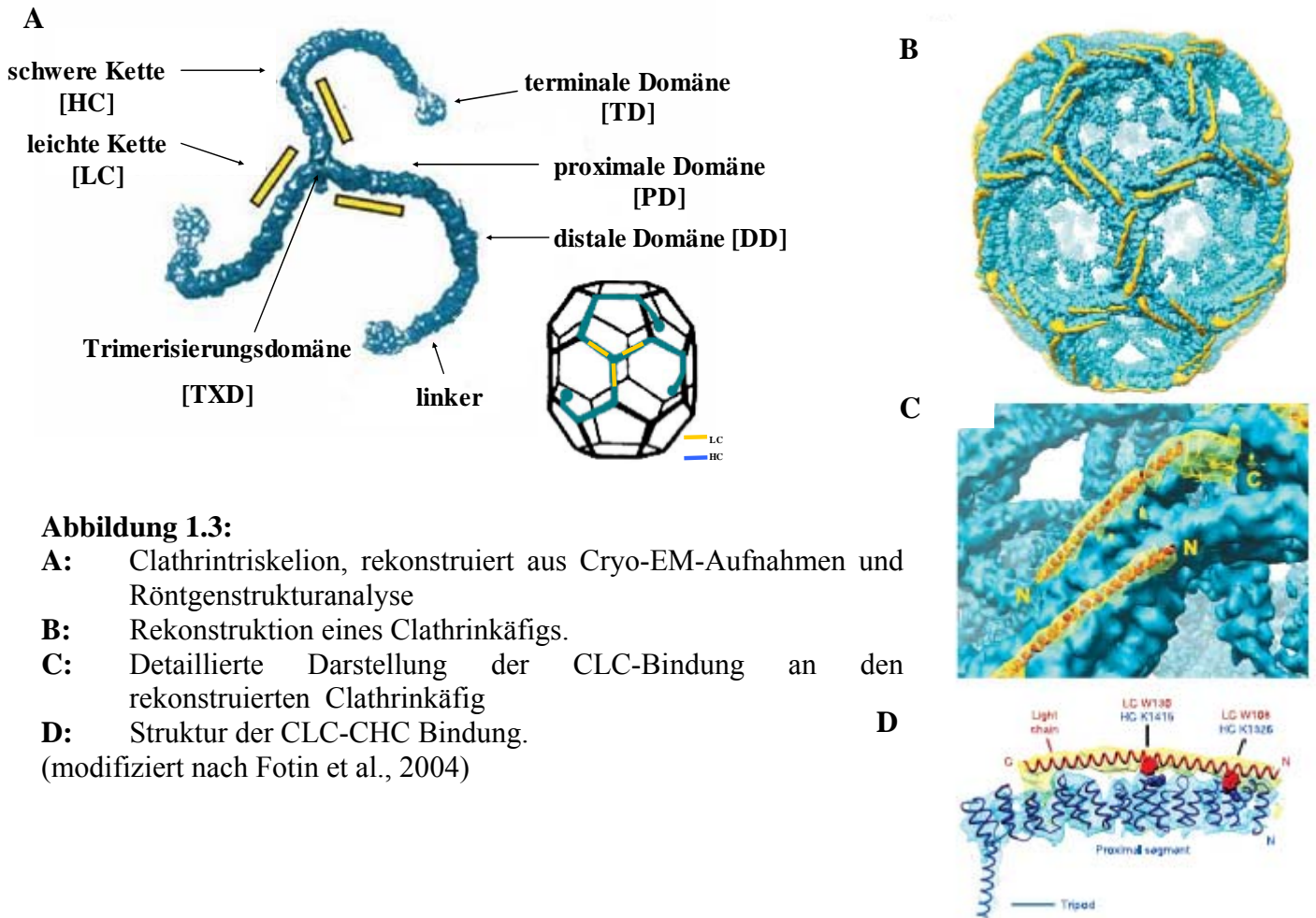
Das Triskelion Clathrin hat darüber hinaus die bemerkenswerte Fähigkeit, in zwei und dreidimensionalen Strukturen zu polymerisieren. In der Zelle liegt es zytosolisch als Triskelion oder zu einem Gitter polymerisiert an Membranen vor. Dieses Gitter ist in der Lage, seine flache Struktur sukzessive einzustülpen, dabei das sich abschnürende Membranvesikel zu umkleiden und so bei der Endozytose zu unterstützen. Das Clathringitter eines clathrinbedeckten Vesikels unterscheidet sich in seiner Gitterstruktur vom flachen Polymer. Während im flachen Zustand nahezu ausschließlich hexamere Gitterflächen vorliegen, kommen beim Wechsel zur Käfigstruktur pentamere Strukturen hinzu. Der Käfig

hat starke Ähnlichkeit mit dem Buckminster-Fuller-Dom mit variablem Durchmesser zwischen 50 und 100nm. Die Polymerisation reinen Clathrins in Käfige lässt sich in vitro einfach durch Erniedrigung des pH-Wertes und Zufügen von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen induzieren. Die Polymerisation in vitro lässt sich ebenfalls durch Zugabe von Adaptoren wie AP2 oder AP180 induzieren (Zaremba et al. 1983).

Die Clathrin schwere Kette faltet sich in eine N-terminale, globuläre Domäne, gefolgt von einem flexiblen „Linker“ Segment, einer distalen, proximalen und Trimerisierungsdomäne. Die N-terminale Domäne (TD) besteht aus einer  $\beta$ -Propellerstruktur. In den proximalen und distalen Domänen bildet die Polypeptidkette eine  $\alpha$ -helikale „zig zag“ Struktur (siehe Abbildung 1.3 A/B) (Wilbur et al. 2005).

Die Primärstruktur der schweren Ketten ist in allen Eukaryoten, wie Hefe, bis hin zu humanen Zellen stark konserviert (Wakeham et al. 2005). Der Grund dafür ist wahrscheinlich darin zu finden, dass das Clathrin einen zentralen Knotenpunkt in der Endozytose und vesikulärem Transport in der Zelle darstellt. Seine hohe Zahl an Interaktionspartnern und die besondere Weise zu polymerisieren sorgen so für eine gute evolutionäre Konservierung. Die Beine des Triskelions sind sehr flexibel und lassen im polymerisierten Zustand eine Biegung relativ zur Lage der Trimerisierungsdomäne in allen drei Raumrichtungen zu.

**Abbildung 1.3**



**Abbildung 1.3:**

- A:** Clathrintriskelion, rekonstruiert aus Cryo-EM-Aufnahmen und Röntgenstrukturanalyse
- B:** Rekonstruktion eines Clathrinkäfigs.
- C:** Detaillierte Darstellung der CLC-Bindung an den rekonstruierten Clathrinkäfig
- D:** Struktur der CLC-CHC Bindung.  
(modifiziert nach Fotin et al., 2004)

Im Polymer tragen jeweils vier Triskelia im Gitter zu einer Seite bei, an der zwei proximale und zwei distale Domänen antiparallel zueinander angeordnet sind (Abbildung 1.3 B, Abbildung 1.4 B).

Zwei Domänen interagieren antiparallel zueinander und zwei parallel. Im Clathrinkäfig, wie er als Proteinhülle eines Vesikels vorkommt, liegt die terminale Domäne, in Richtung der Membran, an die die Adaptorproteine binden. Tatsächlich finden sich auf dieser Domäne zahlreiche Bindungsmotive, unter anderem für Adaptorproteine, wie das heterotetramere AP 2.

### Clathrin leichte Ketten

In höheren Eukaryoten existieren zwei Isoformen der Clathrin leichten Kette (CLC), Typ a und b. Diese Isoformen sollen hier als LCA und LCB bezeichnet werden. Die Abkürzung „CLC“ bezieht sich auf beide Isoformen gemeinsam. Bisher wurden keine höheren Zellen gefunden, in denen nur eine Isoform exprimiert wird. Ihre Sequenzen sind zu etwa 60%

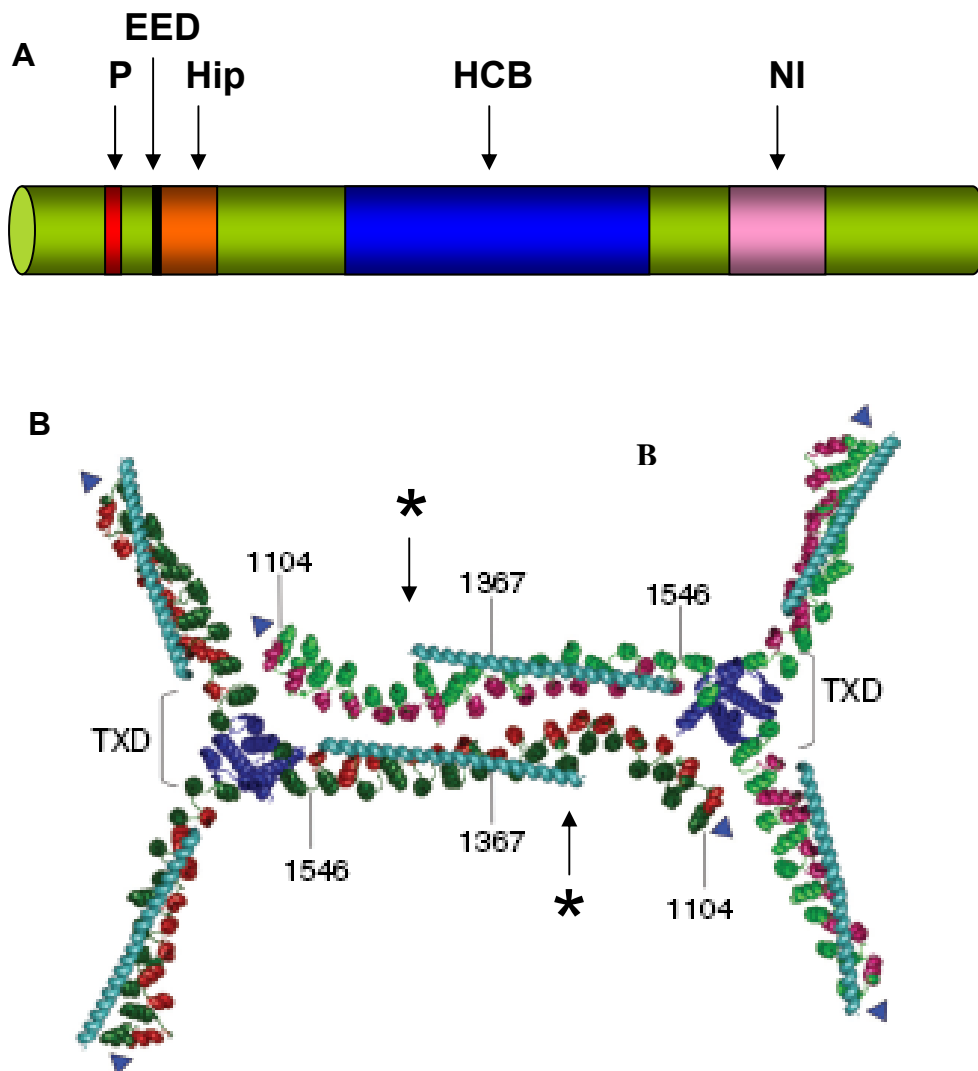
identisch und werden von unterschiedlichen Genen codiert. Das Verhältnis der Expression der Isoformen leichten Ketten ist zum Teil gewebeabhängig. Es wurde berichtet, dass in sekretorischen Zellen die b – Form dominiert. Für Neuronen ist bekannt, dass die Expression der b-Form doppelt so hoch ist wie die von a. Für die allermeisten Gewebezellen findet man ein Verhältnis von 1:1. (Brodsky et al., 1991). Eine Besonderheit ist die neuronale Form der leichten Ketten, die durch alternatives Spleißen der mRNA entsteht, wobei ein 18 und 30 Aminosäuren großes Insert am C-terminus entsteht. Das Insert bindet Calmodulin, scheint aber keinen Einfluss auf die regulativen Eigenschaften der CLC in Bezug auf das Polymerisationsverhalten des Clathrins zu haben (Wong et al. 1990).

Die Isoformen unterscheiden sich zu allererst in ihrer Größe, wobei a mit ca. 26 kDa etwas größer als b(25 kDa) ist. Die Molekulargewichte der leichten Ketten liegen zwischen 25 und 26 kDa. Die N-terminale Region beider Isoformen ist reich an Glycin- und Prolinresten sowie an negativ geladenen Aminosäuren wie Asparagin, was in einer verringerten Mobilität in der SDS - Gelelektrophorese resultiert. Tatsächlich findet man die Banden der leichten Ketten in einem 11%igen SDS-Polyacrylamidgel bei etwa 32 bis 36 kDa.

Die leichten Ketten sind intrinsisch ungeordnete Polypeptide, die aber in funktionelle Domänen gegliedert werden (Abbildung 1.4 A). Beiden Isoformen ist ein Abschnitt gemein, der für die Bindung an die schwere Kette des Clathrins verantwortlich ist (HCB). Die beiden genannten Abschnitte falten sich nach Bindung an die schwere Kette in eine 71 Reste lange  $\alpha$ -Helix, die im Cryo - Elektronenmikroskop dargestellt werden konnte (Abbildung 1.3 C). Besondere Bedeutung für die Bindung an die schwere Kette, die hoch affin ist ( $K_d \sim 10^{-9} M^{-1}$ ), haben die beiden Tryptophanreste an Position 108 und 130 in der leichten Kette, die mit den Lysinresten an Position 1326 und 1415 in der proximalen Domäne der schweren Kette interagieren (Abbildung 1.3 C) (Chen et al. 2002; Fotin et al. 2004). Der  $\alpha$ -helikale Bereich wird N- und C-terminal flankiert von 70 bis 90 Resten, die unstrukturiert sind.

Die leichten Ketten binden parallel an die schweren Ketten, wobei sich ihr N-terminaler Bereich in der Nähe des Knicks zwischen proximaler und distaler Domäne befindet. Entsprechend befindet sich das flexible C-terminale Segment der CLC im Bereich der Trimerisierungsdomäne (TXD) der schweren Ketten (Abbildung 1.4 B).

Abbildung 1.4



**Abbildung 1.4 A:** Schematische Darstellung der leichten Ketten des Clathrins. P: Phosphorylierung durch CKII, nur LCB; EED: „Assembly“-regulative Aminosäurereste; Hip: Bindungsstelle von Hip1 und Hip1/R; NI: Neuronales Insert; **B:** Lage und Orientierung der leichten Ketten auf den Triskelien in einem Clathrinpolymer, TXD: Trimerisierungsdomäne; \*-Lage des N-Terminus der CLC. (modifiziert nach Wilbur et al. 2005)

Neben den bisher genannten Domänen findet sich in beiden Isoformen ein besonders konservierter Abschnitt im Bereich des N-terminus, in dem sich auch eine Bindungsstelle für die Proteine Hip und Hip 1/R (s.u.) findet (Hip). In diesem Abschnitt liegen auch drei saure Aminosäuren, für die gezeigt werden konnte, dass sie für die Kontrolle der leichten Ketten über die Polymerisation des Clathrins notwendig sind (EED) (Ybe et al. 1998; Chen et al 2002).

Am C-terminus befinden sich die bereits erwähnten neuronalen Inserts (NI), flankiert von Cysteinen, die *in vitro* Disulfidbrücken leicht ausbilden. N-terminal zu der konservierten Region (Hip) liegen zwei Serinreste (P), für die gezeigt werden konnte, dass sie *in vitro*,



durch die Serin-/ Threoninkinase CK II phosphoryliert werden (Hill, Brodsky et al. 1988). Teile der leichten Ketten in höheren Eukaryoten sind konserviert. Insbesondere Bereiche des N- und der C- terminus sind vollständig erhalten. Bei Säugetieren sind die Unterschiede zwischen den einzelnen Spezies sehr gering. Die leichten Ketten der Vögel (z.B. Gallus gallus) sind immerhin zu 80% identisch zur humanen Form. Die leichte Kette b – Isoform der Amphibien (Xenopus) zeigt eine geringere Homologie zu der humanen (72%).

Die Funktion der Clathrin leichten Ketten wurde zuerst in vitro beschrieben. Es konnte nachgewiesen werden, dass neben der Bindung akzessorischer Proteine die Hauptfunktion der leichten Ketten darin besteht, das Zusammenlagern der Triskelia in Käfige zu regulieren (Ungewickell&Ungewickell et al. 1991), und die Stabilität der Triskelia zu gewährleisten (Ybe et al. 2007). Die inhibitorische Wirkung der CLC auf den Vorgang der Käfigbildung kann durch die Zugabe von Kalzium oder „assemblyfördernder“ Proteine wie Adaptoren aufgehoben werden. Clathrintriskelia, denen die leichten Ketten fehlen, weisen eine geringere Stabilität auf als solche, die die leichten Ketten gebunden haben.

Die Anwendung von siRNA zur Herunterregulation der Expression der Clathrin leichten Ketten hat zu weiteren Erkenntnissen über Ihre Funktion geführt. Zwar konnte kein apparenter Effekt auf den Vorgang der Clathrinvermittelten Endozytose nachgewiesen werden, jedoch zeigte sich eindeutig, dass die leichten Ketten über die Rekrutierung aktinbindender Proteine wie Hip 1 für die Vernetzung des Aktinzytoskeletts und der Clathrinstrukturen an der Plasmamembran verantwortlich gemacht werden können.

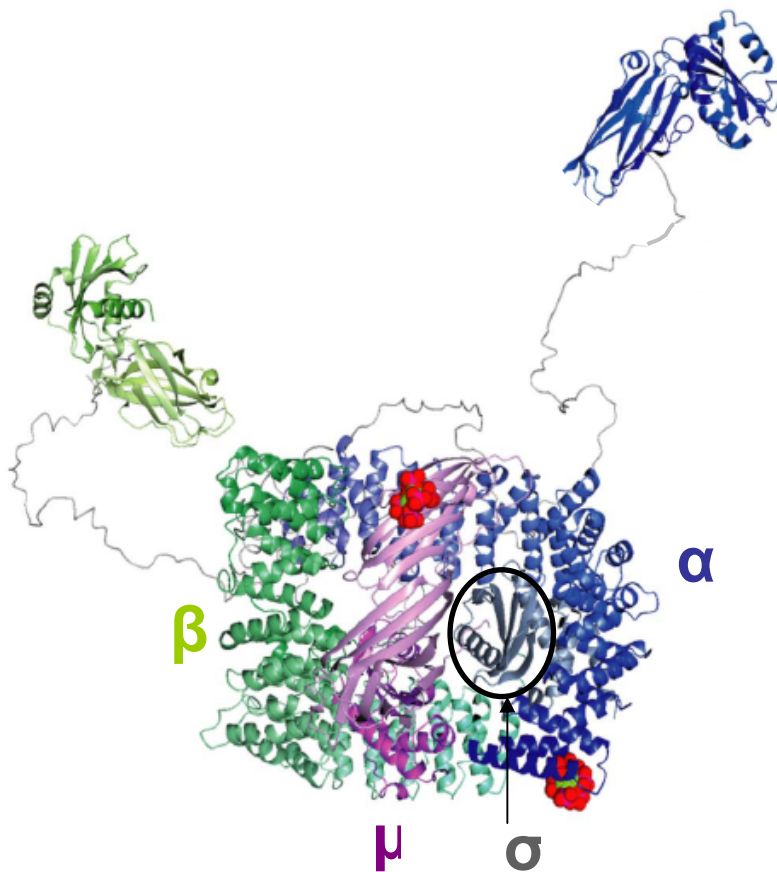
Außerdem zeigte sich, dass das Fehlen der CLC zu einer Umverteilung des Clathrinadaptors AP1 in der Golgiregion sowie einer Delokalisation des Mannose-6-Phosphatrezeptors führte (Poupon et al. 2008).

### **Adaptorkomplex 1/2**

Neben dem Clathrin stellen die Adaptorproteine AP1 und AP2 den Hauptanteil an Protein in clathrinbedeckten Vesikeln. Sie vermitteln im Wesentlichen die Bindung des Clathrins an Membranen. Weitere Adaptoren sind AP3 und AP4, deren Funktion in der Vesikelbildung und deren Transport im Bereich des TGNs und des Lysosoms vermutet werden. Außerdem gilt es, eine Klasse sogenannter alternativer Adaptoren wie Epsin, ARH und Dab2 zu nennen, die zum Teil frachtspezifisch Clathrin an die Plasmamembran rekrutieren können. Die Adaptoren AP 1 bis 4 haben eine für sie charakteristische Quartärstruktur, die von vier Untereinheiten (Adaptine) geprägt ist, wobei zwei dieser Untereinheiten jeweils eine Subdomäne besitzen. Diese steht über einen flexiblen Linker mit dem aus dem „Körper“ des

Komplexes hervor (Owen et al. 2004). Die Struktur erinnert an einen Kopf mit zwei Ohren. Exemplarisch ist die Kristallstruktur des AP2 in Abbildung 1.5 zu sehen (Motley et al. 2006). AP1 besteht aus den Untereinheiten  $\gamma$ ,  $\beta_1, \mu_1$  und  $\sigma_1$ . AP2 besteht wiederum aus den Adaptinen  $\alpha$ ,  $\beta_2, \mu_2$  und  $\sigma_2$ . Die  $\mu$ -Untereinheiten haben etwa ein Molekulargewicht von 50 kDa, die  $\sigma$ -Adaptine nur etwa 20kDa. Alle anderen Untereinheiten sind hingegen ungefähr 100kDa groß. Die größte Identität in der Aminosäuresequenz weisen die vier  $\beta$ -Untereinheiten aus,  $\alpha$ ,  $\gamma$  und  $\sigma$  hingegen weniger.

**Abbildung 1.5**



**Abbildung 1.5: Schematische Darstellung der Kristallstruktur des Adaptorproteins 2** (modifiziert nach Motley et al. 2006).  $\alpha$ ,  $\beta, \gamma$  und  $\sigma$  bezeichnen die einzelnen Adaptine, aus denen sich das Heterotetramer AP2 zusammensetzt.

Die „Ohrdomänen“ des  $\alpha$ -Adaptin und  $\beta$ -Adaptin besitzen Bindungsstellen für Clathrin.  $\alpha$ -Adaptin bindet über diese Domäne außerdem akzessorische Proteine.

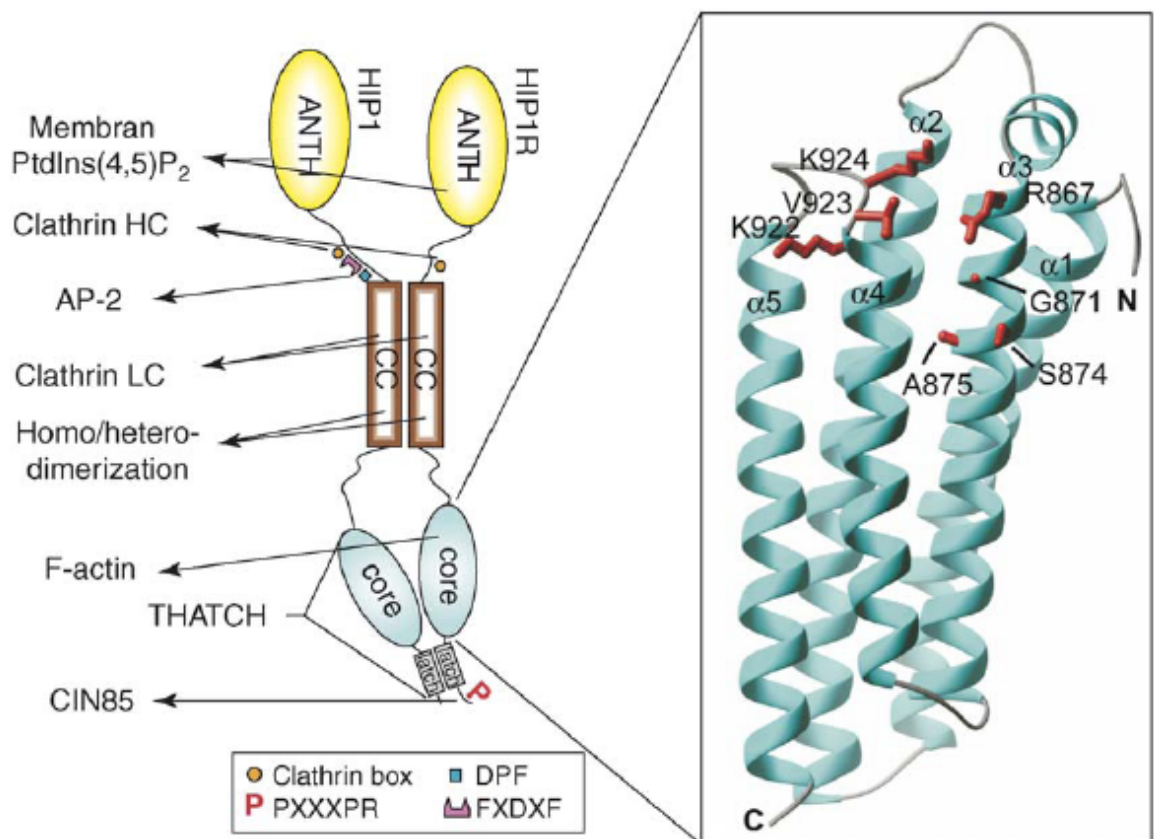
## **Hip 1/ 1R**

Vertreter „Huntingtin-interacting“ Proteinfamilie (Hip1 und Hip1R in Säugern und Sla2p in Hefe) werden mit der Huntingtonschen Krankheit in Verbindung gebracht (Kalchmann et al. 1997). Sie werden beide in kleinen Mengen in nichtneuronalem Gewebe exprimiert. In neuronalem Gewebe hingegen finden sich größere Mengen dieser Proteine. Sie verknüpfen die Clathrin vermittelte Endozytose mit dem Aktinzytoskelett. Die beiden Homodimere Hip1 sowie Hip1R binden beide Isoformen der Clathrin leichten Kette über ihre „coiled coil“ – Region (siehe Abbildung 1.6). Die Bindungsstelle auf den CLC ist sehr stark konserviert, teilweise hydrophob und enthält in Richtung des N-Terminus ein ebenfalls konserviertes Triplet aus negativ geladenen Aminosäuren (EED), die an der Regulation der Zusammenlagerung des Clathrins beteiligt sind. Wird diese Domäne in Zellen überexprimiert, führt dieses zu einer Beeinflussung der Organisation Aktinzytoskeletts (Chen et al. 2005).

Beide Vertreter der Hip-Familie verfügen überdies über ANTH-Domänen, welche eine Bindung von PiP<sub>2</sub>-haltigen Membranen ermöglichen.

Die Bindung beider Hip-Dimere an die leichte Kette des Clathrins unterscheidet sich in ihrer Affinität und ihrem Effekt der CLC Bindung auf die Hip-Aktin-Interaktion. So scheint die Bindung von Hip und Hip1R an Aktin (über die „THATCH“-Domäne, Abbildung 1.5) seine Bindung an CLC zu schwächen. Es wurde auch gezeigt, dass der Komplex aus Hip1 und Cortaktin die Polymerisation von Aktinfilamenten hemmt (LeClainche et al. 2007). Clathrin scheint also ein negativer Regulator der Hip-Aktin-Interaktion zu sein (Wilbur et al. 2008). Diese Erkenntnis führt zu dem Modell, dass Hip und Aktinfilamente nicht am wachsenden Vesikel mit Clathrin verknüpft sind, sondern dass das Aktin eher am Rand des Clathrinmantels, z.B. an der Abschnürungsstelle polymerisiert und dadurch aktiv an der Endozytose beteiligt ist.

**Abbildung 1.6**



Current Opinion in Cell Biology

**Abbildung 1.6:** Schematische Darstellung und Kristallstruktur der Proteine Hip1 und Hip1R (modifiziert nach Brett & Traub et al. 2006). Die Motive FXDXF und DPF sind Aminosäurefolgen, die eine Bindung an AP2 vermitteln, während die Prolinreiche Domäne PXXXXPR verantwortlich ist für die Bindung von SH3-Domänen. Weiterhin finden sich Motive, wie die „Clathrin box“ welche eine Bindung an die Clathrin schwere Kette ermöglicht.

### Akzessorische Proteine

Die größte funktionale Bandbreite findet sich bei den akzessorischen Proteinen der Clathrinvermittelten Endozytose. Sie können, wie bereits erwähnt, bei der Krümmung der Membran behilflich sein, weitere Proteine in den Clathrinmantel rekrutieren oder koordinierende bzw. sogenannte Plattformfunktionen ausfüllen. So können die Proteine der BAR-Familie wie z.B. Amphiphysin und SNX9 Membrankrümmung generieren und stabilisieren. Außerdem binden Amphiphysin und SNX9 Clathrin und AP2 und sind in der Lage, Dynamin in clathrinbedeckte Strukturen an der Membran zu rekrutieren. Eps15 hingegen scheint eine Plattformfunktion einzunehmen. Mit seinem langen, c-terminalen Abschnitt, der viele DPF-Motive hat, ist es in der Lage, AP2-Ohrdomänen zu vernetzen. Die Interaktion von AP2 mit Eps15 ist auch ein Beispiel für die Phosphorylierungsabhängigkeit

der Protein-Protein-Interaktionen in clathrinbedeckten Vesikeln. Eps 15 wird vom EGF-Rezeptor tyrosin-phosphoryliert und bindet nur in phosphoryliertem Zustand an AP2. (Confalonieri et al. 2000; Cousin et al. 2001). Folglich spielen Proteine der Klasse der Kinasen und der Phosphatasen eine entscheidende Rolle bei der Regulation der clathrinvermittelten Endozytose. Die Proteinkinasen CK2, AAK und GAK/Auxilin 2, sowie die Lipidphosphatasen, wie Synaptojanin, OCRL wurden als kritisch für den Ablauf der CE identifiziert. (Ref. Pelkmans, Zerial et al. 2005).

## **Darstellung der Clathrinvermittelten Endozytose in der Mikroskopie**

Die dem Zytosol zugewandte Seite der Plasmamembran ist teilweise mit Clathrinnetzen bedeckt. Diese lassen sich in der Fluoreszenzmikroskopie darstellen. Hierbei gelingt der Nachweis des Clathrins durch Expression der GFP-gekoppelten leichten Ketten oder durch Anfärben mit entsprechenden Antikörpern in der Immunhistochemie (Abbildung 1.7 A).

Die Clathrin-bedeckten Bereiche zeichnen sich durch eine sehr hohe Dynamik aus, die in FRAP-Studien quantifiziert wurde. Für diese Untersuchungen wurden lebende, GFP-CLC exprimierende Zellen gezielt mit einem Laser gebleicht und die Erholungszeit für die Fluoreszenz gemessen. Hierbei zeigte sich, dass in weniger als einer Minute ca. 90% der ursprünglichen Fluoreszenz an der gleichen Stelle wieder nachweisbar war. Dieses Ergebnis erklärt sich dadurch, dass die ausgebleichten GFP-CLC einem ständigen Austausch unterliegen. Die Erholung der Fluoreszenz kann den Austausch einzelner GFP-CLC oder GFP-CLC im Komplex mit schwerer Kette reflektieren. Offen bleibt im letzten Fall, ob einzelne Triskelia im Netzwerk ausgetauscht werden, oder ob sie sich mit einem sich bildenden Vesikel von der Plasmamembran entfernen. Hierbei würde die Erholung der Fluoreszenz nach der Photobleichung die de novo Bildung eines clathrinbedeckten „Pits“ reflektieren.

Clathrin wird in lebenden Zellen üblicherweise durch die stabile Expression einer der beiden CLC-isoformen, üblicherweise am N-terminus fusioniert mit einem XFP, dargestellt. Das exprimierte Fusionsprotein wird problemlos in die vorhandenen Clathrin Strukturen eingebaut. Weder funktionell (Ligandenaufnahme) noch lichtmikroskopisch lassen sich keine Veränderungen in der Morphologie der Strukturen erkennen. Auch elektronenmikroskopisch konnten bisher keine gravierenden Veränderungen in der Morphologie der Clathrinstrukturen nach Expression von XFP-CLC nachgewiesen werden (Hoffmann et al. 2010).

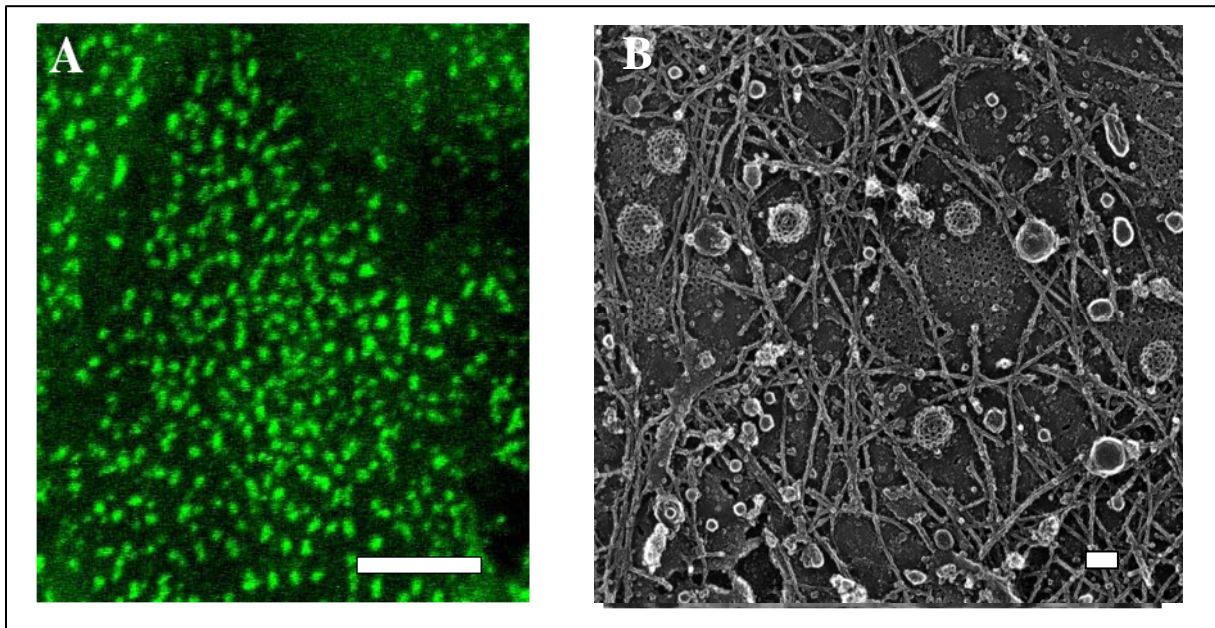
In der Elektronenmikroskopie lassen sich durch die Präparation der der adhärennten Plasmamembran durch die sogenannte „Ripp off“-Technik (Meyerholz et al. 2005)

endozytotische Strukturen im Detail darstellen. Hier kann man Membranareale ausmachen, die von einem flachen Netzwerk polymerisierten Clathrins bedeckt sind (Abbildung 1.7 B). Diese korrespondieren mit den in der Lichtmikroskopie zu sehenden Strukturen. Es ist gut zu erkennen, dass an fast jedem dieser flachen Clathrinpolymere meist lateral ein oder mehrere Vesikel im Begriff sind, sich einzustülpen. In dieser Hinsicht unterscheiden sich GFP-CLC stabil exprimierende Zellen nicht von unbehandelten Zellen.

Seit Längerem ist bekannt, dass das Protein GFP und viele seiner Derivate schwach dimerisiert. Dieses Verhalten könnte mit der Funktion der Clathrin leichten Ketten interferieren, da die hochflexiblen N-terminalen Segmente der CLC so geringere Freiheitsgrade aufweisen. Außerdem muss berücksichtigt werden, dass das GFP, welches fast so groß ist wie die CLC, möglicherweise zu sterischen Problemen führt, gerade wenn es um die Untersuchung von Eigenschaften der CLC geht, die durch den Aminoterminus definiert werden. Wie bereits beschrieben, sind wichtige Funktionen der CLC, wie die Regulation der Clathrinzusammenlagerung über Sequenzbereiche am N-terminalen Bereich reguliert. Im Weiteren ist zu bedenken, dass die Analyse GFP-CLC stabil exprimierender Zellen immer eine Mischung des Verhaltens von endogen und exogen in das System eingebrachte Proteine ist. Dieses liegt darin begründet, dass die Überexpression der CLC-Konstrukte niemals zu einer vollständigen Verdrängung der endogenen CLC führt (Dannhauser et al. 2006), sondern beide Formen der Proteine nebeneinander in der Zelle vorliegen. Besonders im Hinblick auf die Analyse mutierter, eingebrachter Proteine ist dieses zu berücksichtigen.

Eine mögliche Lösung dieses Problems ist die Reduktion der Expression der endogenen Varianten der Proteine durch Einsatz von RNAi.

**Abbildung 1.7**



**Abbildung 1.7 A:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme EGFP – LCB (wildtyp) transfizierter HeLa – Zellen (Maßstabsbalken: 10  $\mu\text{m}$ )

**B:** Elektronenmikroskopische Aufnahme von Plasmamembranfragmenten von HeLa-Zellen (Maßstabsbalken: 100 nm)

## Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit war es, die Funktion der Clathrin leichten Ketten in der lebenden Zelle zu charakterisieren. Hierzu sollte die Expression der leichten Ketten mittels RNA-Interferenz herunterreguliert, bzw. durch Überexpression verschiedener CLC – Fusionsproteine verändert werden. Die so manipulierten Zellen sollten mit verschiedenen Licht- und elektronenmikroskopischen Methoden sowie biochemischen und molekularbiologischen Verfahren analysiert werden. Bei den Untersuchungen stand besonders der direkte Einfluss der veränderten Expression der CLC auf die Clathrin schwere Kette im Vordergrund.

## 2. Material:

<b>Mikroskope</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Epifluoreszenzmikroskop	Axiovert 200 M	Carl Zeiss AG (Oberkochen)
Laser-Scanning-Mikroskop	LSM 510 Meta	Carl Zeiss AG (Oberkochen)
Total-Internal-Reflection-Mikroskop	Leica TIR-FM	Leica Microsystems (Wetzlar)
Transmissions-Elektronenmikroskop	Tecnai G <sup>2</sup> Zeiss EM 10	FEI (Eindhoven, Niederlande) Carl Zeiss AG (Oberkochen)
<b>Zentrifugen</b>	<b>Typ</b>	<b>Hersteller</b>
Kühlzentrifugen	J2-HS (Rotoren JA-10 und JA-20), Megafuge 1.0	Beckman Coulter (Krefeld) Heraeus Instruments (Osterode,)
Tischzentrifugen	Zentrifuge 5417R (Rotoren A-8-11, FA45-24-11 und FA45-30-11) Zentrifuge 5410	Eppendorf Zentrifugen GmbH (Leipzig)
Ultrazentrifugen	Optima TL100 (rotor TLA45, TLA55 und 100.4), Optima LE 80 (rotor 70Ti)	Beckman Coulter (Krefeld)
<b>Sonstige Geräte</b>	<b>Typ</b>	<b>Hersteller</b>
Agarosegel-Elektrophorese-Kammer	Sub-Cell GT Mini	BioRad (München)
Blot-Kammer		MHH-Forschungswerkstätten (Hannover)
Zellinkubator	Hera cell RS 232	Heraeus (Hanau)
Entwicklermaschine	Optimax Typ TR	Protec (Oberstenfeld)
Elektroporator	MicroPulser	BioRad (München)
Heizblock	DRI-BLOCK DB-2A	Techne (Cambridge, England)
Ion exchanger (pure water preparation)	MilliQ	Millipore (Bedford, MA, USA)
Mikropipetten	Nichipet	Nichiryo (Tokio, Japan)



Mikroskop-	POCmini	Carl Zeiss AG (Oberkochen)
Inkubationskammer		
pH-Meter	pH526	WTW (Weinheim)
Photometer	DU-640	Beckman Coulter (Krefeld)
Power Pack	PowerPac 300 / 1000	BioRad (München)
Rotierer	3025	GFL (Burgwedel)
Scanner	Duoscan	Agfa (Mortsel, Belgium)
SDS-PAGE gel chamber	Mighty Small II	Hofer (Freiburg)

## **Chemikalien**

2-Dodecenylnsuccinicacid  
2-Mercaptoethanol  
Aceton 99,5  
Acrylamid  
Agarose  
Alexa488-Maleimid  
Alexa488-NHS Ester  
Alkalische Phosphatase, Kälberdarm  
Ammoniumperoxididulfat (APS)  
Ampicillin  
Bacto-agar  
Beta-Galaktosidase  
Bisacrylamid  
Brefeldin A  
Bovines Serumalbumin (BSA)  
Brominphenol Blau  
Carbanhydrase  
CO<sub>2</sub> unabhängiges Medium  
Complete Proteaseinhibitor Cocktail  
Coomassie Brilliant Blue R250  
Dithiothreitol (DTT)  
DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium)  
DNA-Molekulargewichtsstandard (2-log)  
EDTA

## **Hersteller**

Serva (Heidelberg)  
Sigma (Taufkirchen)  
J.T. Baker (Griesheim)  
BioRad (München)  
BioRad (München)  
Invitrogen (Carlsbad, USA)  
Invitrogen (Carlsbad, USA)  
Roche (Mannheim)  
BioRad (München)  
Sigma (Taufkirchen)  
BD Biosciences (Heidelberg)  
Sigma (Taufkirchen)  
BioRad (München)  
Sigma (Taufkirchen)  
Sigma (Taufkirchen)  
Gibco Invitrogen (Karlsruhe)  
Roche (Mannheim)  
Serva (Heidelberg)  
Sigma (Taufkirchen)  
Gibco/Invitrogen (Karlsruhe)  
MBI Fermentas (St.Leon-R.)  
Sigma (Taufkirchen)

Ethanol 100%	J. T. Baker (Griesheim)
Ethidiumbromid	Sigma (Taufkirchen)
Fetales Kälberserum	Seromed (Berlin)
Flussäure	Merck (Darmstadt)
Ficoll 400	GE Healthcare (Piscataway, NJ, USA)
Glucose	Merck (Darmstadt)
Glutathion	Sigma (Taufkirchen)
Hefeextrakt	BD Biosciences (Heidelberg)
HEPES ( 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazin-ethanesulfonsäure )	Sigma (Taufkirchen)
Hiperfect	Qiagen (Hilden)
Imidazol	Merck (Darmstadt)
Immersionsöl	Carl-Zeiss (Oberkochen)
Isopropyl-beta-D-thiogalactosid (IPTG)	Sigma (Taufkirchen)
Latrunculin A	Sigma (Taufkirchen)
Latrunculin B	Sigma (Taufkirchen)
L-Cystein	Sigma (Taufkirchen)
Lipofectamine 2000	Invitrogen (Karlsruhe)
Leibowitz's L15 Zellkulturmedium	Invitrogen (Karlsruhe)
Magermilchpulver	Uelzena (Uelzen)
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Roth (Karlsruhe)
Methanol	J. T. Baker (Griesheim)
Natriumdodecyl-Sulfat (SDS)	BioRad (München)
Natriumazid	Roth (Karlsruhe)
Natriumchlorid	Merck (Darmstadt)
Natriumhydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
OptiMEM	Invitrogen (Karlsruhe)
Paraformaldehyd (PFA)	Fluka (Steinheim)
Penicillin / Streptomycinlösung	Invitrogen (Karlsruhe)
Phenyl-methyl-sulfonylfluorid (PMSF)	Sigma (Taufkirchen)
Phosphataseinhibitor-Cocktail	Sigma (Taufkirchen)
Poly-L-lysin	Sigma (Taufkirchen)
Ponceau S	Sigma (Taufkirchen)
Natriumazid	Merck (Darmstadt)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma (Taufkirchen)

Natriumpyruvat	Sigma (Taufkirchen)
Natriumpyrophosphat	Sigma (Taufkirchen)
Ovalbumin	Sigma (Taufkirchen)
Ponceau S	Sigma (Taufkirchen)
Salzsäure	J. T. Baker (Griesheim)
Sucrose	Calbiochem (Darmstadt)
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma (Taufkirchen)
Tris (Trizma Base)	Sigma (Taufkirchen)
Triton X-100	Sigma (Taufkirchen)
Trypanblu	Sigma (Taufkirchen)
Trypsin-EDTA Lösung	Invitrogen (Karlsruhe)
Trypton	BD Biosciences (Heidelberg)
Tween 20	Sigma (Taufkirchen)

<b>Enzyme/ Liganden</b>	<b>Produkt #</b>	<b>Hersteller</b>
DNA-polymerase I Klenow-fragment	1008412	Roche (Mannheim)
<i>Pfu</i> Turbo DNA Polymerase	EP0572	MBI Fermentas (St.Leon-R.)
Restrictionsendonucleasen	diverse	MBI Fermentas (St.Leon-R.)
T4-DNA-Ligase	EL0335	MBI Fermentas (St.Leon-R.)
<i>Taq</i> DNA polymerase	EP0403	MBI Fermentas (St.Leon-R.)
Transferrin	616424	Calbiochem (Darmstadt)
Transferrin (FITC- markiert)	T-2875	Molecular Probes (Leiden, Niederlande)
Phalloidin (FITC-markiert)	-	Molecular Probes

<b>Komplettsysteme</b>	<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
Agarosegelextraktion	<i>QIAquick Gel Extraction Kit</i>	Qiagen (Hilden)
Chemolumineszenz	<i>Renaissance Western blot Chemiluminescence Reagent Plus</i>	NEN (Boston, MA, USA)
Eindeckmedium	<i>ProLong Antifade Kit</i>	Molecular Probes (Leiden, Niederlande)
Plasmid-Minipräparation	<i>QIAprep Spin Miniprep Kit</i>	Qiagen (Hilden)
Präparation von endotoxin-freier DNA	<i>EndoFree Plasmid Maxi Kit</i>	Qiagen (Hilden)
RNA isolation	<i>RNeasy Micro Kit</i>	Qiagen (Hilden)
RT-PCR	<i>RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit</i>	MBI Fermentas (St.Leon-R.)
Transfektion von DNA in eukaryotische Zellen	<i>LipoFectamin 2000© Transfection Reagent</i>	Invitrogen (Karlsruhe)
Transfektion of siRNA in eukaryotische Zellen	<i>Hiperfect Transfection Reagent</i>	Qiagen (Hilden)

<b><i>Escherichia coli</i>-Stamm</b>	<b>Hersteller</b>
BL21 (DE3)	Novagen (Madison, WI, USA)
DH5α	Invitrogen (Karlsruhe)
XL1-Blue	Stratagene (Amsterdam, Netherlands)

<b>Säugetier-Zelllinien</b>	<b>Herkunft</b>	<b>Verwendetes Medium</b>
BSC 1	Grüne Meerkatze, Niere ATCC	DMEM, 10% FKS, 2% Pen/Strep, 1% Na-Pyruvat, nicht essentielle AS (1:100)
HeLa SS6	Human, Cervix ATCC	DMEM, 5 FKS, 2% Pen/Strep, 1% Na-Pyruvat, nicht essentielle AS (1:100)

IHKE	Human, Niere Forsmann, MHH	DMEM+Ham's F12 (1:1), 100nM Hydrocortison, 0,84µM Insulin, 1,6 nM EGF, 64 nM Transferrin, 2,5 mM L-Glutamin, Citprobay 200 (1:400), 15 mM NaHCO <sub>3</sub> , 29nM Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>
------	-------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

<b>Vektor</b>	<b>Expression von</b>	<b>In</b>	<b>Supplier</b>
pGEX-6P1-3	GST-Fusionprotein	<i>E.coli</i>	GE Healthcare (Piscataway, NJ, USA)
pEGFP-C1-3	GFP- Fusionprotein	eukaryotischen Zellen	Clontech (Clontech, Mountain View, CA, USA)
pCMV 2A-C	Flag-Fusionsprotein	eukaryotischen Zellen	GE Healthcare (Piscataway, NJ, USA)
PST-Blue1 (AccepTor)	Subclonierung, Sequenzierung	-	GE Healthcare (Piscataway, NJ, USA)
pTag-RFP-C	RFP-Fusionsprotein	eukaryotischen Zellen	Evrogen (Moskau, Russland)

<b>DNA-Konstrukte</b>	<b>Vektor</b>	<b>Herkunft</b>	<b>Referenz</b>
GFP-LCA	pEGFP-C3	Lois Greene	(Wu et al. 2001)
mRFP-Clathrin LCA	pEGFP-C3	Jürgen Wehland, GBF (Braunschweig)	(Benesch <i>et al.</i> , 2005)
pTagRFP-LCB	pTag-RFP-C		Selbst kloniert (s.u.)
pnGFP-nuc			GE Healthcare (Piscataway, NJ, USA)
pTagRFP-nuc			Selbst kloniert (s.u.)
Flag-LCB	pCMV-2B		Kloniert von M. Düwel
GFP-LCB	pEGFP-C2		Kloniert von H. Ungewickell
GST-LCA	pGEX6P2		Selbst kloniert (s.u.)

GST-LCB	pGEX6P2		Selbst kloniert (s.u.)
GST-GFP-LCA	pGEX6P2		Selbst kloniert (s.u.)
GST-GFP-LCB	pGEX6P2		Selbst kloniert (s.u.)
GST-LCB-GFP	pGEX6P2		Selbst kloniert (s.u.)
mRPF- $\beta$ -Aktin		K. Rottner GBF (Braunschweig)	Müller-Taubenberger et al. 2006
GFP-CHC	pEGFP-C1	SJ Royle, University of Liverpool England	Royle et al. 2005

<b>Primer</b>	<b>Sequenz 5'-&gt; 3'</b>	<b>Bemerkungen</b> ( $T_m$ = Schmelzpunkt)
LCB bovin sense	GTAAGAG GATCCATGGCTGATGACTTTGGCTTC	$T_m$ : 73,9°C
LCB bovin antisense	AGAATGAAGCTTCTAGCGGGACAGCGGTGTCTG	$T_m$ : 76,4°C
Q-LCB sense (quantitative PCR)	AGGCTTTCGTGAAGGAATCCAA	$T_m$ : 60,3°C
Q-LCB antisense (quantitative PCR)	TCTGCTTCAGGGACATGAGC	$T_m$ : 60,5°C
Q-CHC sense (quantitative PCR)	CACAACCCATTGTTTATGGTCAG	$T_m$ : 61,1°C
Q-CHC antisense (quantitative PCR)	TCACATGCTGTACCCAAAGCC	$T_m$ : 61,3°C
Q-Aktin sense (quantitative PCR)	CATTGCGGTGGACGATGGA	$T_m$ : 60,5°C
Q-Aktin antisense	TCAAGATCATTGCTCCTCCTGA	$T_m$ : 60,3°C

<b>siRNA</b>	<b>Sequenz</b>	<b>Name</b>	<b>Referenz</b>
<b>gegen:</b> GFP	GGCUACGUCCAGGAGCGCACC	GFP-Oligo	Hinrichsen et al. 2003
Clathrin schwere Kette	AACCUGCGGUCUGGAGUCAAC	CHC-Oligo	Hinrichsen et al. 2003

(CHC)

LCA                    AAGUAAUGGUCCAACAGACAG                    „LCA-                    Hoffmann et al. 2010  
Oligo“

LCB                    GAGCGAGATTGCAGGCATA                    „LCBII –                    Huang et al. 2004  
Oligo“                    (CLC-Oligo S4)

<b>Antikörper</b>	<b>Antigen</b>	<b>Quelle/ Referenz</b>
Anti-AP2 (Maus)	$\alpha$ -adaptin (AP2)	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA); Katalog # sc-17771
Anti - AP1 (Kaninchen)	$\sigma$ -Adaptin (AP1)	L.Traub (Pittsburgh)
AP.6 (Maus)	$\alpha$ -adaptin (AP2)	F.M. Brodsky; (Brodsky, 1985)
20D6 (Maus)	$\gamma$ -adaptin (AP1)	E. Ungewickell; (Ahle <i>et al.</i> , 1988)
Anti-tubulin (Maus)	$\alpha$ -Tubulin (Westernblot)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA); catalog # T-9026
Anti-M6PR (Kaninchen)	“Cation-independent mannose-6-phosphat receptor“	B. Hoflack (TU Dresden, Germany); (Meresse and Hoflack et al. 1993)
Anti-EEA1 (Maus)	EEA1	BD Biosciences (Heidelberg, Germany); catalog # 610456
R461- 10/11 (Kaninchen)	Clathrin leichte Kette (Immunfluoreszenz/ Westernblot)	E. Ungewickell; (Ahle et al. 1988)
Con.I (Maus)	Clathrin leichte Kette (Immunfluoreszenz)	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) Katalog # sc-12735
X22 (Maus)	Clathrin schwere Kette (Immunfluoreszenz)	F.M. Brodsky; (Brodsky et al. 1985)
Anti-CHC (Maus)	Clathrin schwere Kette (Westernblot)	Transduction Laboratories (Lexington, KY, USA); catalog # A59420

Anti-GST (Ziege)	GST (Westernblot)	GE Healthcare (Piscataway, NJ, USA); catalog # 27-4577-01
Anti-GFP (Maus)	GFP (Immunpräzipitatioin)	J. Wehland; Helmholtz Centre for Infection Research (Braunschweig, Germany)
X49 (Ratte)	Clathrin leichte Kette (Westernblot)	F.M. Brodsky; (Brodsky et al. 1985)
R461 X (Kaninchen)	Clathrin leichte Kette (Immunfluoreszenz)	Affinitätsgereinigt aus den polyklonalen Seren R461-3 E. Ungewickell; (Ahle et al. 1988)
Hip1R (Maus)	Hip1R (Immunfluoreszenz)	Transduction Laboratories (Lexington, KY, USA); Katalog # 612118
Hip1 (Kaninchen)	Hip1 (Immunfluoreszenz)	LM Traub, University of Pittsburgh School of Medicine, USA

### **Sek. Antikörper**

<b>Sek. Antikörper</b>	<b>Antigen</b>	<b>Quelle/ Referenz</b>
FITC-konjugierter IgG (Ziege)	Maus IgG	Dianova (Hamburg, Germany)
FITC- konjugierter IgG (Ziege)	Kaninchen IgG	Dianova (Hamburg, Germany)
HRP- konjugierter IgG (Ziege)	Maus IgG	MP Biomedicals (Solon, OH, USA)
HRP- konjugierter IgG (Ziege)	Kaninchen IgG	MP Biomedicals (Solon, OH, USA)
HRP- konjugierter IgG (rabbit)	Ziege IgG	MP Biomedicals (Solon, OH, USA)
Rhodamin- konjugierter IgG (Ziege)	Maus IgG	Dianova (Hamburg, Germany)
Rhodamin- konjugierter IgG (Ziege)	Kaninchen IgG	Dianova (Hamburg, Germany)
HRP- konjugierter IgG (Ziege)	Ratte IgG	MP Biomedicals (Solon, OH, USA)



## **Puffer/ Lösungen**

Acrylamidlösung  
9%ig, Trenngel

Acrylamidlösung  
19%ig, Trenngel

Puffer A

Blockierungslösung  
BSA-Wasch-Puffer

„Cleavage“-Puffer

Coomassielösung

Entfärbelösung

DMEM

6 X DNA-Probenpuffer

DNA-Molekularmarker (10µl/ Spur)

EDTA-Wasch-Puffer

## **Formulierung**

2 g Glycerin, 7,5 ml 1,5M Tris,  
9 ml Acrylamidlösung (30 % Acrylamid und  
3 % Bisacrylamid in H<sub>2</sub>O),  
0,3 ml 10 % SDS,  
mit H<sub>2</sub>O auf 30 ml auffüllen,  
17 µl TEMED, 113 µl 10 % APS,  
pH 8,8

4 g Glycerin, 7,5 ml 1,5M Tris,  
19 ml Acrylamidlösung (30 % Acrylamid und  
6 % Bisacrylamid in H<sub>2</sub>O).  
0,3 ml 10 % SDS,  
17 µl TEMED, 113 µl 10 % APS,  
pH 8,8

100 mM MES, 1 mM EDTA, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, und 2  
mM CaCl<sub>2</sub> (pH 6.4)

PBS mit 6 % Magermilchpulver  
0.5 M Tris-HCl, 1 % Triton X-100, 1% BSA, 0.02%  
NaN<sub>3</sub> (pH 7.0)

50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1  
mM DTT (pH 7.0)

0.2 % Coomassie Brilliant Blue R 250, 10 %  
Essigsäure, 47.5 % ethanol

10 % Eisessig, 10 % Ethanol

Dulbeccos Modified Eagle's Medium (Gibco BRL,  
Karlsruhe), 10 % Fötale Kälberserum, 1 %  
Natriumpyruvat, 2 % Penicillin / Streptomycin

0.0125 % Bromphenolblau, 0.0125 % Xylencyanol,  
1.5 % Ficoll 400, 0,1% SDS

Für 120 µl: 12µl DNA-Molekulargewichtsstandard  
(2-log), 20µl DNA-Probenpuffer, 88µl PBS

0.5 M Tris-HCl, 1 % Triton X-100, 1 mM EDTA,  
0.02% NaN<sub>3</sub> (pH 7.0)

Puffer G	25 mM HEPES, 125 mM Kaliumacetat, 5 mM Magnesiumacetat (pH 7.1)
Gelfiltrations Säulenpuffer	pH 7,2 0,5M Tris-HCl, 0,02% N <sub>3</sub>
LB (Luria Bertani) Agar	LB-medium + 1.5 % Bacto-agar
LB media	0.5 % Hefeextrakt, 1 % Trypton, 1 % NaCl (pH 7.5)
Lysispuffer (IP)	50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.02% NaN <sub>3</sub> (pH 7.4) + “Complete Proteaseinhibitor Cocktail”
Protein-Molekulargewichtsmarker	0.1 % Phosphorylase b, 0.1 % β-Galactosidase, 0.1 % Bovine Serum Albumin (BSA), 0.1 Ovalbumin, 0.1 % Carboanhydrase; jeweils 5 mg/ml in SDS - Probenpuffer
PBS	2.7 mM KCl, 1.9 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 8.2 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 137 mM NaCl (pH 7.4)
Ponceau solution	0.2 % Ponceau S, 1 % Essigsäure
Mikroinjektionspuffer	50 mM HEPES, 0,5 mM Kaliumchlorid, 0,1 mM EGTA (pH 7.5)
“Laufpuffer” (Laemmli-Elektrolytpuffer)	50 mM Tris, 370 mM Glycin, 0.1 % SDS
Sammelgel	1 g Glycerin, 7,5 ml 0,5M Tris, 5 ml Acrylamidlösung (30 % Acrylamid und 8 % Bisacrylamid in H <sub>2</sub> O), 0,3 ml 10 % SDS, 50 µl Bromphenolblau, mit H <sub>2</sub> O auf 30 ml auffüllen, 30 µl TEMED, 300 µl 10 % APS, pH 6,8
SDS-Lysispuffer (KL-„kochende Lösung“)	100 µl 10% SDS, 250 µl Bromphenolblau 0,1%, 650 µl water
SDS-Probenpuffer	25 mM Tris-HCl, 2.5 % SDS, 2.5 % β-Mercaptoethanol, 12.5 % Glycerin und Brominephenolblau (pH 8,0)
SOC -Medium	0.5 % Hefeextrakt, 2 % Trypton, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 20 mM Glucose (pH 7.0)

TB-Puffer	100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 1% Triton X-100 (pH 8.0)
TBE-Puffer	45 mM Tris-HCl, 45 mM boric acid, 1 mM EDTA (pH 8,0)
TBS-Puffer	20 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl (pH 7.6)
Transferpuffer	50 mM Tris, 39 mM glycine, 0.037 % SDS, 20 % methanol (pH 8,3)
Puffer W	100 mM Natriumphosphat, 50 mM NaCl, 1 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 mM EGTA (pH 7.4)

## Verbrauchsmaterialien

Material	Produkt	Hersteller
Affinitätsmatrix	GSH-Sepharose	GE Healthcare (Piscataway, NJ, USA)
Autoradiographiefilme	Biomax MR/MS	Eastman Kodak (New York, USA)
Blottpapier	3MM Chr	Whatman (Maidstone, England)
Zellkulturschalen	Divers Glasbodenschalen (35mm)	Nunc (Wiesbaden, Germany)
Chemilumineszenzfilm	Hyperfilm ECL	GE Healthcare (Piscataway, NJ, USA)
Deckgläschen	Ø 12 mm	Menzel-Glaser (Braunschweig, Germany)
Entsalzungssäulen	PD-10, NAP-5, NAP-10	GE Healthcare (Piscataway, NJ, USA)
Dialysekammern	Spectra/Por MWCO:6-	Spectrum (Rancho Dominguez, CA, USA)
Elektroporationsküvetten	„Gene Pulser“-Küvette 0.2 cm	BioRad (München, Germany)
Falconröhrchen	15 ml, 50 ml PP	Greiner (Frickenhausen, Germany)
Gaze		Rauscher (Pattensen, Germany)

Gelfiltrationsmatrix	Sepharose CL-4B	GE Healthcare (Piscataway, NJ, USA)
Mikroreaktionsgefäße 1	1.5 ml	Sarstedt (Nümbrecht, Germany)
Mikroreaktionsgefäße 2	0.5, 1.5 ml Safe Lock	Eppendorf (Hamburg, Germany)
Nitrocellulosemembran	Protran	Schleicher & Schuell (Dassel, Germany)
Objektträger	Mattrand	Menzel-Glaser (Braunschweig, Germany)
Pasteurpipetten		Brand (Wertheim, Germany)
Pipettenspitzen		Brand (Wertheim, Germany)
Versiegelungsfolie	Parafilm N	American National Can (Chicago, IL, USA)
Ultrazentrifugenröhrchen	divers	Beckman Coulter (Krefeld, Germany)

## **Software**

## **Hersteller**

AxioVision 4.2	Zeiss AG (Oberkochen)
C-Primer	Greg Bristol (University of California, Los Angeles, CA, USA)
DNASStar	DNASStar (Madison, WI, USA)
Excel 2003	Microsoft (Redmont, WA, USA)
Illustrator 8.0	Adobe Systems (San Jose, CA, USA)
LSM 510-Meta Software 3.2	Zeiss AG (Oberkochen)
NIH Image	National Institutes of Health Bethesda, MD, USA)
Photoshop 8.0	Adobe Systems (San Jose, CA, USA)
Word 2003	Microsoft (Redmont, WA, USA)

# Methoden:

## Zellkultur

### Zellpassage und Kultur

Es wurden die Zelllinien HeLa-SS6, BSC 1 und IHKE verwendet. HeLa-Zellen sind immortalisierte Epithelzellen aus einem humanen Adenocarcinom aus dem Cervix uteri. Die Zelllinie wurde erstmalig 1954 beschrieben (Chang et al. 1954). Bei BSC 1- Zellen handelt es sich um Nierenepithelzellen aus *Cercopithecus aethiops*, der grünen Meerkatze (Hopps et al. 1963). Zur Kultivierung der verwendeten Zelllinien HeLa SS6 und BSC 1 wurden jeweils DMEM basierte Medien verwendet, die sich nur in ihrem Gehalt an FKS (5 bzw. 10%) unterscheiden.

IHKE-Zellen sind ebenfalls Nierenepithelzellen, die durch Behandlung mit  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen immortalisiert wurden (Tveito et al. 1989). Das für diese Zellen verwendete Medium basiert auf DMEM/ Ham's F12.

Zur Passage wurden die Zellen mit PBS gewaschen und dann mit einer Trypsin/ EDTA-Lösung (Gibco) abgelöst. Der Ablösungsprozess wurde nach etwa 5 Minuten durch Resuspendieren der Zellen mit Kulturmedium im Überschuss abgestoppt. Durch Zählen der mit Trypan-Blau angefärbten Zellen in einer Neubauer-Kammer wurde die Zelldichte bestimmt. Anschließend wurde die gewünschte Zahl Zellen in ein neues Kulturgefäß (in der Regel Petrischale) gegeben.

### Transfektion von DNA:

Zur Transfektion von DNA wurde, falls nicht anders beschrieben, Lipofectamin 2000® von Invitrogen verwendet. Die Transfektionen wurden im Wesentlichen nach den Vorgaben des Herstellers durchgeführt. Für die Transfektion von 24-Loch-Schalen wurde allerdings abweichend vom Protokoll 1 µl Reagenz bei gleichbleibender DNA-Menge verwendet und für 35mm-Schalen 4µl Reagenz. Für die Transfektion wurde für alle Zellen Vollmedium mit 10% FKS, jedoch ohne Antibiotikum.

Die zu transfizierenden Zellen wurden, in individuell an das Experiment angepasster Zellzahl, 18 bis 24 Stunden vor der Transfektion ausgesät. Für eine typische Transfektion eines exprimierenden Plasmids in HeLa-Zellen wurden für 24-Loch-Platten je 80.000 Zellen pro

Loch, für 35 mm- Schalen je 400.000 Zellen pro Schale, bei 60mm-Schalen je 1.000.000 Zellen pro Schale und bei 100 mm –Schalen je 2.000.000 Zellen pro Schale ausgesät.

### **Transfektion von siRNA:**

Für die Transfektion von siRNA wurden sowohl Lipofectamin 2000®, als auch HiperFect von Qiagen verwendet. Beide Reagenzien wurden hierbei nach den Vorgaben der Hersteller eingesetzt (siehe Handbücher). Die zu transfizierenden Zellen wurden, in individuell an das Experiment angepasster Zellzahl, 18 bis 24 Stunden vor der Transfektion ausgesät. Hierbei spielte besonders die Dauer der Kultivierung der Zellen unter RNAi eine Rolle, sowie die Zellschädigung durch die Herunterregulation des bestimmten Proteins selbst. Die Transfektionseffizienz war mit beiden Reagenzien etwa gleich hoch, allerdings war beim Gebrauch von Hiperfect der Einsatz von wesentlich weniger RNA notwendig (Lipofectamin 2000: ~ 750 ng; Hiperfect: ~ 40 ng pro Napf einer 24-Loch-Platte).

Für eine typische siRNA- Transfektion in HeLa-Zellen wurden für 24-Loch-Platten je 40.000 Zellen pro Loch, für 35 mm- Schalen je 150.000 Zellen pro Schale, bei 60mm-Schalen je 500.000 Zellen pro Schale und bei 100 mm –Schalen je 1.000.000 Zellen pro Schale ausgesät. Für die Herunterregulation der Clathrin schweren Kette wurde in der Regel die ausgesäte Zellzahl um 50% erhöht, um die Sterblichkeit der Zellen im Verlauf des Experiments zu minimieren.

## **Nachweismethoden**

### **Messung der Extinktion von DNA und Proteinen**

Zur Bestimmung der Konzentrationen von reinen DNA- und Proteinlösungen wurde mit dem Photometer DU-640 (Beckman Coulter) ein Spektrum der Lösung von 250 bis 350 nm gemessen. Die Ermittlung der in der DNA-Konzentration erfolgte bei Lösungen durch Umrechnung der Extinktion bei 260 nm in  $\mu\text{g/ml}$  durch Multiplizieren mit 50 • Verdünnungsfaktor.

Für Proteinlösungen wurde die Konzentration durch Multiplizieren der Extinktion bei 280 nm mit dem jeweiligen Extinktionskoeffizienten bestimmt.

Parameter verwendeter Proteine(ProtParam, www.expasy.ch):

<b>Protein</b> (Quelle)	<b>Molekulargewicht [kDa]</b>	<b>Extinktionskoeffizient [<math>M^{-1}cm^{-1}</math>]<sub>280nm, H<sub>2</sub>O</sub></b>
<b>GFP-CLC A</b> (s.u.)	52,24	0,983
<b>CLC A</b> (human)	23,66	1,182
<b>GFP-CLC B</b> (s.u.)	57,52	0,841
<b>CLC B</b> (Rinderhirn)	25,08	1.055
<b>CHC</b> (Schweinehirn)	191,61	1,053
<b>BSA</b> (Rinderserum)	69,32	0,689

### **Coomassie-Färbung**

Mit einer Coomassie-Blue-Lösung können in der SDS-PAGE (s.u.) aufgetrennte Proteine sichtbar gemacht werden. Die Empfindlichkeit der Methode liegt bei etwa 0,2µg/Bande.

Zum Anfärben wurde das Gel etwa eine Stunde bei Raumtemperatur geschwenkt, oder für etwa 30 Sekunden in der Färbelösung in der Mikrowelle erhitzt. Durch kontrolliertes Entfärben in der Entfärberlösung wurden dann die Banden sichtbar. Gele wurden fotografiert oder auf Chromatographiepapier getrocknet.

### **Ponceau-Färbung**

Zum Anfärben von auf Nitrozellulose transferiertem Protein wurde die zu färbende Membran für 1-2 Minuten in Ponceau-Lösung geschwenkt. Anschließend erfolgte die Entfärbung bis zum gewünschten Färbungsgrad mit vorentsalztem Wasser (VE). Zur vollständigen Entfärbung wurde die Membran zweimal hintereinander 5 Minuten in frischem PBS geschwenkt.

### **SDS-PAGE und Western Blotting**

Für die SDS-Gelelektrophorese wurden, falls nicht anders angegeben, Gradientengele (9-19%) verwendet. Hierzu wurden die Proben zunächst für 2-3 Minuten in SDS-Auftragspuffer gekocht. Proben, die gereinigte Clathrin schwere Kette enthielten (z.B. „Assembly-Experimente oder Immunpräzipitationen) wurden für 10 Minuten in SDS-Auftragspuffer bei Raumtemperatur geschüttelt und anschließend für 2 Minuten aufgekocht. Dieses Verfahren stellt sicher, dass die Clathrin schwere Kette, vollständig denaturiert und mittels SDS solubilisiert wird.

Die Elektrophorese erfolgte für 20 Minuten bei einer Spannung von 80V und danach bei 200V für 55 Minuten, bis der Bromphenolblau-Marker das Gel fast verlassen hatte. Das Gel wurde dann wie folgt geschichtet:

Kathode

6 X Whatmanpapier (getränkt in Transferpuffer)

SDS-PAG

Nitrocellulose

6 X Whatmanpapier (getränkt in Transferpuffer)

Anode

Der Transfer der Proteine aus dem Gel (SDS-PAGE) auf die Nitrocellulosemembran erfolgte bei  $0,8 \text{ mA/cm}^2$  für 75 Minuten. Nach dem Transfer wurde das Protein auf der Membran mit Ponceau Rot angefärbt, um es zu fixieren und um die Markierungen des Molekulargewichtstandard zu markieren. Zum Entfernen der Färbung wurde die Membran in PBS gewaschen. Anschließend folgte die Sättigung („Blocken“) der Membran mit Protein durch Inkubation in 6% Magermilchpulver, gelöst in PBS. Der Nachweise von geblotteten Proteinen erfolgte durch Inkubation der Membran mit Protein-spezifischen Antikörpern (Primärantikörper). Der Nachweis der Bindung der spezifischen Antikörper erfolgte durch den Einsatz Peroxidase-gekoppelter Antikörper, die jeweils spezies-spezifisch die vorangehend eingesetzten Antikörper binden (Sekundärantikörper). Die Primärantikörper wurden dabei individuell verdünnt in 3% BSA in PBS eingesetzt und mehrfach verwendet. Die Sekundärantikörper wurden in 6%igem Magermilchpulver 1:2000 verdünnt und jeweils nur einmal eingesetzt. Die Nachweisreaktion erfolgte über die Aktivität der Peroxidase des Sekundärantikörpers durch Einsatz von ECL-Reagenz. Die Membran wurde jedesmal vor dem jeweiligen Wechsel des Reagenz intensiv mit PBS gewaschen. Die Chemolumineszenz-Reaktion des ECL-Reagenz mit der Peroxidase wurde durch Auflegen von ECL-Filmpapier dokumentiert.

### **Immunhistochemie**

Zur mikroskopischen Charakterisierung der Veränderung in auf Deckgläschen gewachsenen Zellen wurden die Zellen zum jeweils angegebenen Zeitpunkt für 10 Minuten in 4% PFA fixiert. Dieser und alle folgenden Schritte wurden, falls nicht anders angeführt bei Raumtemperatur durchgeführt. Das Fixierungsmittel wurde anschließend entfernt und mit TBS für 5 Minuten geblockt. Zur Permeabilisierung wurden die Zellen für 5 Minuten mit 0,1% Triton x-100 in TBS inkubiert.



Durch Spülen mit PBS wurde anschließend das Triton wieder entfernt. Dann erfolgte die Inkubation der Zellen für eine Stunde bei 37°C mit dem Protein-spezifischen Primärantikörper. Der Antikörper wurde zur Verwendung in einer individuell angepassten Verdünnung in 3%igem BSA in PBS eingesetzt. Zur Inkubation wurden feuchte Kammern, Petrischalen in denen ein feuchtes Tuch lag und die mit Parafilm ausgekleidet wurden, verwendet. Das Deckgläschen wurde mit der zellbewachsenen Seite auf etwa 20µl der vorbereiteten Antikörperlösung gelegt, so dass sich diese als Schicht gleichmäßig zwischen Deckgläschen und Parafilm verteilte.

Nach der Inkubation wurde der Überschuss des ersten Antikörpers durch mehrmaliges Eintauchen nacheinander in drei verschiedene Bechergläser, gefüllt mit PBS, entfernt. Die Inkubation des spezie-spezifischen, fluorochromierten Sekundärantikörpers erfolgte wie beim Primärantikörper. Die Verdünnung dieser Antikörper betrug in der Regel 1:1000. Zur Anfärbung der Zellkerne wurde der Antikörperlösung bei Bedarf Hoechst-Farbstoff 1:200 zugegeben.

Als letzter Schritt wurden die Deckgläschen erneut in den Bechergläsern in frischem PBS gespült. Zur mikroskopischen Untersuchung und Aufbewahrung der so gefärbten Zellen, wurden die Plättchen auf Objektträger gegeben. Hierbei wurden die Deckgläschen mit der zellbewachsenen Seite auf den einen Tropfen „Prolong-Antifade“ gegeben. Dieses Eindeckmedium sorgt für eine längere Stabilität und höhere Quantenausbeute bei den Fluoreszenzfarbstoffen.

### **Aufnahme von Transferrin**

Die Aufnahme von Transferrin durch Säugetierzellen findet exklusiv über die Clathrinvermittelte Endozytose statt. Zur Charakterisierung von Veränderungen bei der Aufnahme und Prozessierung dieses Frachtmoleküls wurde fluorochromiertes Transferrin verwendet. Falls nicht anders beschrieben, wurden die auf Deckgläschen gewachsenen Zellen etwa eine Stunde vor dem geplanten Aufnahmeexperiment in DMEM + 0,1% BSA inkubiert. Dies sollte dazu führen nicht-markiertes Transferrin, welches von den Zellen aus dem Medium aufgenommen wurde, zu entfernen.

Für die Durchführung der Aufnahme von Transferrin wurden je nach Fragestellung unterschiedliche Strategien verwendet. Die einfachste Variante war die Inkubation der Zellen für 10 Minuten bei 37°C in DMEM+0,1% BSA+ 20µg Transferrin/ml. Hierbei erreicht das Transferrin alle Zellkompartimente, die an seiner Prozessierung beteiligt sind.

Eine differenziertere Methode bestand darin, die in DMEM + 0,1% BSA vorinkubierten Zellen für mindestens 30 Minuten in CO<sub>2</sub>-unabhängigem Medium + 0,1% BSA + 4,5 g/dl Glucose + 20µg Transferrin/ml bei 4°C zu inkubieren. Hierbei bindet das Transferrin an seinen Rezeptor auf der Oberfläche der Zellen. Eine Internalisierung findet jedoch nicht statt. Dann wurden die Zellen in gleichen Medium ohne Transferrin gespült, um den Überschuss an Transferrin zu entfernen. Zur Internalisierung des nunmehr ausschließlich an den Transferrinrezeptor auf der Oberfläche der Zellen gebundenen Transferrins wurden die Zellen in vorgewärmtem Medium +0,1% BSA inkubiert. Die Temperatur und Dauer der Inkubation wurden der entsprechenden Fragestellung angepasst.

Um an der Oberfläche verbliebenes Transferrin zu entfernen wurden, falls erforderlich, die Zellen zweimal in eiskaltem PBS, 2-mal in „saurem“ Puffer bei 4°C und anschließend wieder in eiskaltem PBS gewaschen.

Abschließend wurden die Zellen für 10 Minuten in frischem 4%igem PFA fixiert und entsprechend mittels Immunfluoreszenz s.o. weiterbehandelt.

### **Behandlung der Zellen mit Latrunculin B**

Um in HeLa-Zellen das Aktinzytoskelett zu depolymerisieren wurden die Zellen mit 0,25µM Latrunculin B in DMEM+0,1% BSA für 5 – 60 bei 37°C Minuten inkubiert und anschließend mittels Immunfluoreszenz analysiert (s.o.). Das Latrunculin wurde vorangehend in DMSO in einer Konzentration von 5 mM gelöst und bei -20°C aufbewahrt. Als Kontrolle wurde Lösungsmittel (DMSO) allein in der entsprechenden Menge zu den Zellen gegeben. Das Aktinzytoskelett war bereits nach 10 Minuten quantitativ depolymerisiert, Veränderungen in der Clathrinverteilung traten nach etwa 30 Minuten auf.

## **Lichtmikroskopie**

Die Untersuchung immunhistochemischer Präparate erfolgten im Epifluoreszenzmikroskop Axiovert 200 M, bzw. dem konfokalen Mikroskop LSM 510 Meta.

### **Mikroskopie lebender Zellen**

Zur Begutachtung und Manipulation lebender Zellen wurden je nach Anforderungen durch das Mikroskop und Experiment in verschiedene Medien gebracht:

Zur Analyse und Mikroinjektion im Epifluoreszenzmikroskop Axiovert 200 M, bzw. zur Bleichung der Zellen im konfokalen Mikroskop LSM 510 Meta wurden die Zellen in CO<sub>2</sub>-unabhängigem Medium unter Zusatz von 10% FKS und 4,5g/ L Glucose inkubiert. Zur Analyse der Zellen im Olympus FV1000 wurde das für die Zellen üblicherweise verwendete CO<sub>2</sub>-abhängige Medium verwendet.

### **Mikroinjektion**

Zur Charakterisierung von fluorochromierter Clathrin schwerer Kette in Abhängigkeit zu leichter Kette wurden HeLa-Zellen zweimal innerhalb 48 mit CLC - siRNA transfiziert (siehe Abschnitt „Transfektion von siRNA“) 68 Stunden nach der ersten Transfektion wurden die Zellen mit CHC-488 (1mg/ml) allein, oder zusammen mit gereinigten Clathrin leichten Ketten mikroinjiziert. Für letzteres wurden schwere und leichte Ketten zusammen in Mikroinjektionspuffer für 10 Minuten auf Eis inkubiert. (Endkonzentration CHC: 1mg/ml, CLC: 0,2 mg/ml).

Bei der Analyse der gereinigten GFP-CLC wurden diese wie oben beschrieben mit schwerer Kette komplexiert (Endkonzentration CHC: 1mg/ml, CLC: 0,3 mg/ml) und in CLC-depletierte Zellen, sowie Kontrollzellen mikroinjiziert.

Alle Injektionen erfolgten bei einem Druck von 180 hPa für 0,4s unter lichtmikroskopischer Kontrolle. Es wurden der InjectMan NI2 © (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) und „Eppendorf Femtotips“© verwendet.

Nach einer Erholung von jeweils 4 Stunden wurden die Zellen injiziert mit fluorochromiertem Clathrin im Leica TIRF-Mikroskop analysiert. Die Überwachung längerer Erholungsphasen erfolgte im live Olympus FV1000 Lasermikroskop. FRAP-Analysen wurden mit dem Zeiss LSM 510 Meta durchgeführt.

## **FRAP – "Fluorescence Recovery After Photobleach"**

Die Charakterisierung der Dynamik von fluorchromiertem Clathrin, sowie den GFP-CLC erfolgte durch selektives Bleichen einzelner Clathrinstrukturen an der ventralen Plasmamembran. Auf Glasbodenschalen (Matek©) gewachsene HeLa-Zellen wurden wie beschrieben mit siRNA transfiziert und nach 68 Stunden mikroinjiziert. Nach einer 4-stündigen Erholungsphase wurden sie in CO<sub>2</sub>-unabhängiges Medium, versetzt mit 10% FKS und 4,5g/L Glucose gebracht und bei 37°C mit dem Zeiss LSM 510 Meta (63X/1.4 Öl DIC Objektiv) beobachtet. Die Temperatur wurde unter Verwendung einer Umluftheizstufe und einer Objektivheizung konstant gehalten.

Zum Bleichen wurden ausgewählte Bereiche in den Zellen mit einer Wellenlänge von 488nm (Argon Laser) bei 100%iger Leistung für 20 Iterationen gebleicht. Alle Experimente wurden auf einen Zeitraum von 30 Minuten beschränkt um die Vitalität der Zellen während des Bleichens zu gewährleisten. Für jeden Datensatz wurden mindestens 3 verschiedene Zellen jeweils zwei bis dreimal gebleicht und ihre Erholung für 120 Sekunden bei 25% Laserleitung aufgezeichnet. Für die Auswertung der Daten wurde die LSM 510 Software sowie Excel verwendet.

## **Elektronenmikroskopie**

Die Betrachtung der Präparate erfolgte mit dem Zeiss EM 10 bei einer Beschleunigungsspannung von 80 kV, oder mit dem FEI Tecnai G<sup>2</sup> mit einer Beschleunigungsspannung von 120 kV.

### **Präparation ventraler Zellmembran**

PT/C – Replica von dem ventralen Teil der Plasmamembran wurden wie bereits zuvor bei beschrieben (Heuser et al. 2000) dargestellt. Dabei wurden ebenfalls bereits beschriebene Modifikationen (Hinrichsen et al. 2005) vorgenommen. Falls nicht anders dargestellt wurden alle Arbeitsschritte bei Raumtemperatur durchgeführt.

Im Detail wurden die Zellen auf Glassplittern, oder 5 mm Deckgläschen kultiviert. Zum Zeitpunkt der Aufarbeitung wurden die Zellen dreimal mit 37°C warmem PBS gewaschen und anschließend für 15 Sekunden in 0,1mg/ml Poly-L-Lysin in Puffer G inkubiert. Danach wurde dreimal mit 1/3 konzentriertem Puffer G gewaschen, um die Zellen aufzuquellen. Die Präparation der Membranstücke erfolgte dann durch einen kurzen Ultraschallpuls unter Sichtkontrolle. Hierfür wurde die niedrigste Leistungsstufe des Ultraschallgerätes (Branson

Sonifier) gewählt. Die Deckgläschen wurden in einem Abstand von etwa 10 mm vom Ultraschallkopf im 45° Winkel unter die Spitze des Ultraschallkopfes platziert. Beim Erreichen des maximalen Ausschlags der Anzeige wurde das Gerät sofort ausgeschaltet. Die Länge des Pulses betrug somit etwa 0,5-1 Sekunde. Für optimale Präparationsergebnisse war eine Zelldichte von 80%iger Konfluenz oder mehr notwendig. Die Pulsgabe erfolgte zunächst einmal. Bei einem erfolgreichen „Ripp off“ klärte sich das durch den Zellbewuchs sichtbar getrübe Glas. War keine Veränderung in der Trübung zu beobachten, so wurde das Deckglas(Splitter) erneut beschallt. Nach der Beschallung wurde das Deckglas (Splitter) umgehend durch einmaliges Eintauchen in Puffer G gespült, um dann anschließend sofort in 2% Glutaraldehyd in Puffer G für 30 Minuten fixiert.

Durch die Behandlung mit Ultraschall wurde in den meisten Fällen der nicht mit dem Substrat (Glas) verwachsene Teil der Zellen abgerissen. Um den verbliebenen Teil sichtbar zu machen, wurden die Deckgläschen im Anschluss an die Fixierung für 20 Minuten mit 0,1 % (w/v) Tannin in H<sub>2</sub>O inkubiert. Der Austausch des Fixierungsmittels gegen die Tanninlösung erfolgte ohne zwischenzeitlichen Waschschrift. Anschließend wurden die Präparate dreimal mit Wasser gewaschen und dann für fünf Minuten in Wasser inkubiert. Zur weiteren Kontrastierung und Stabilisierung der Membranen folgte dann eine Inkubation in 0,2% (w/v) einer Uranylacetat (Merck). in H<sub>2</sub>O für 20 Minuten. Zur Entfernung des Uranylacetats wurde ausgiebig (mindestens viermal) mit Wasser gewaschen und dann in eine Glaspetrischale mit Wasser überführt.

Zur Entwässerung der Präparate wurde durch wiederholtes Spülen mit Aceton/Wassermischungen mit einem sukzessiv ansteigenden Acetonanteil (30%, 50%, 70%, 90%, 100% Aceton) das Wasser verdrängt. Nach der vollständigen Entfernung des Wassers konnten die Zellfragmente nun über den kritischen Punkt getrocknet werden. Hierbei wurde die in Aceton in die Trocknungsanlage eingebrachte Probe so lang mit flüssigem Kohlendioxid unter Druck bei 6°C gespült, bis das Aceton vollständig durch Kohlendioxid ersetzt war.

Danach wurde die Probenkammer ohne Druckausgleich auf etwa 43 °C aufgeheizt. Nach Überschreiten des kritischen Punktes von CO<sub>2</sub> (31°C, 73,8 bar) konnte das Lösungsmittel CO<sub>2</sub> unter Beibehaltung der Temperatur ohne Phasenübergang aus der Kammer entlassen werden. Somit war es möglich das organische Material auf den Deckgläschen zu trocknen und durch das Verdampfen von Wasser entstehende Oberflächenspannungen zu vermeiden.

Zur elektronendichten Replikation wurden die Präparate anschließend im Hochvakuum zunächst aus einem Winkel von 27° mit einer Legierung aus Platin und Kohle etwa 3 nm dick

bedampft. Anschließend wurde die Platinschicht noch durch Bedampfen mit Kohle aus einem Winkel von 90° stabilisiert.

Die so entstandenen Replica wurden im nächsten Schritt durch Inkubation in 40%iger (v/v) Flusssäure (HF in H<sub>2</sub>O) vom Glas und dem organischen Material (dem Positiv) getrennt. Hierfür wurde zunächst unter dem Binokular mit einer Rasierklinge ein Raster in die Präparate geritzt um anschließend beim Abschwemmen der Platin/Kohle-Replica handhabbare Fragmente zu erhalten. Die flotierenden Fragmente wurden unter Zuhilfenahme einer Platinöse sukzessiv mit Wasser gespült. Die Replica wurden dann mit einem sauberen Kupfernetz aufgenommen und vorsichtig mit einem Filterpapierdreieck getrocknet. Vollständig getrocknet konnten die Präparate dann im Elektronenmikroskop betrachtet werden.

### **Ultradünnschnitte**

Die Präparation von Ultradünnschnitten wurde freundlicher Weise von Dr. Stephanie Groos und Heike Böning durchgeführt.

Für die Flacheinbettung von siRNA-transfizierten Zellen in Epon wurden die in einer 35 mm-Schale kultiviert. Zum Zeitpunkt der Verarbeitung wurden die Zellen dreimal mit warmem PBS gewaschen und dann in 0.1M Na-Cacodylat-HCl-Puffer, pH 7.3 + 2,5% Glutaraldehyd fixiert. Nach dem Waschen in 0.1M Na-Cacodylat-HCl-Puffer wurden die Zellen mit 1% Tanninsäure (Mallinckrodt, St. Louis, MO) in 0.1M Na-Cacodylat-HCl-Puffer und anschließend in 1% Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Merck, Darmstadt, Germany) ebenfalls in 0.1M Na-Cacodylat-HCl-Puffer inkubiert. Anschließend erfolgte eine Kontrastierung in 1% Uranylacetat (Merck) in Wasser. Die Proben wurden im Weiteren durch Inkubation in Ethanollösungen mit ansteigendem Ethanolanteil entwässert und dann in Epoxid (Serva, Heidelberg, Germany) eingebettet.

Anschließend wurden etwa 70 nm dicke Ultradünnschnitte mit dem „Ultracut E“ (Leica, Wetzlar, Germany) Ultramikrotom angefertigt, die mit Uranylacetat und Osmiumtetroxid kontrastiert wurden (vergleiche: Simionescu&Simionescu et al. 1985).

# Molekularbiologische Methoden

## Kultivierung von Bakterienkulturen

Die Kultivierung von spezialisierten E. coli -Stämmen dient im Wesentlichen dazu, Plasmid-DNA zu vermehren und Proteine exprimieren. Bei den verwendeten Stämmen handelt es sich um Dh5 $\alpha$  und BL21. Ersterer eignet sich besonders zur Vermehrung von doppelsträngiger Plasmid-DNA, da er sich unter anderem durch eine hohe Zahl von Plasmid-Kopien pro Zelle (high copy) auszeichnet und wurde daher in der Regel zur z.B. für die Amplifikation frisch ligierter Konstrukte verwendet. Der Stamm BL21 hingegen ist speziell für die Expression von Proteinen geeignet. Er zeichnet sich durch geringe endogene Proteaseaktivität aus.

Zur Kultivierung der Bakterien wurden klassische LB-Medien verwendet. Die Kultivierung von Einzelklonen in der Regel frisch transformierter Bakterien erfolgte auf einem LB-basierten Agar in Petrischalen. Zur Selektion wurden, je nach auf dem Plasmid codierter Resistenz Ampicillin oder Kanamycin in einer Konzentration von 100 $\mu$ g/ml bzw. 30 $\mu$ g/ml eingesetzt. Für die Kultivierung von BL21-Kulturen, zur Expression von Proteinen wurde Ampicillin in einer Konzentration von 50 $\mu$ g/ml eingesetzt.

## DNA-Reinigung

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Dh5 $\alpha$  wurden je nach gewünschtem Maßstab und Reinheitsgrad der DNA, die kommerziellen Systeme der Firma Qiagen® verwendet. Für kleinere Mengen wurde das „Qiagen Miniprep-kit“, für größere Mengen das „Qiagen Midiprep-kit“ verwendet. Zur Aufreinigung von Plasmiden, die zur Transfektion in Kulturzellen (HeLa, BSC 1 usw.) verwendet werden sollten, wurde das „Qiagen Endofree-kit“ verwendet. Die Durchführung der Aufreinigung mit diesen Systemen erfolgte nach den Vorgaben der Hersteller.

## Elektro-/ Thermotransformation

Das Einbringen von Plasmid-DNA in E. coli Bakterien dient in erster Linie der Vermehrung der DNA und der Expression von auf ihr codierten Proteinen. Je nach Konzentration der zu transformierenden Plasmide wurde die Transformation durch Elektroporation, oder durch Hitzeschock gewählt. Die Elektroporation fand in Fällen Anwendung wenn aufgrund der vorangehenden experimentellen Bedingungen (z.B. Mutagenese) nur geringe Mengen an DNA (unter 5ng) in der zu transformierenden Lösung zu erwarten waren.

Für die meisten Anwendungen wie die Transformation von Ligationen und fertigen Plasmid-Präparationen war die Thermotransformation, mit ihrer geringeren Effizienz jedoch hinreichend.

### Thermotransformation

Zur Transformation wurden kompetente Bakterien der Stämme Dh5 $\alpha$  und BL21 verwendet. Zur Transformation wurden die bei -80°C gelagerten Bakterien aufgetaut und direkt nach dem Auftauen verwendet. Zur Transformation von Dh5 $\alpha$  wurden in der Regel zwischen 50 und 100 ng DNA erfolgreich eingesetzt, für BL21 wurden bis zu 200ng verwendet. Die DNA-Lösung wurde zu einem Aliquot Bakterien gegeben, wobei darauf geachtet wurde, dass alle verwendeten Reaktionsgefäße vor dem Einsatz auf Eis heruntergekühlt wurden. In der Regel wurden 75 $\mu$ l kompetente Bakterien pro Ansatz verwendet. Nach dem Einbringen der DNA in die Bakteriensuspension wurde diese gut resuspendiert und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien für 45 Sekunden bei 42°C im Wasserbad geschockt. Nach dem Hitzeschock wurden die Bakterien für exakt 2 Minuten auf Eis heruntergekühlt und anschließend in 500 $\mu$ l SOC bei Raumtemperatur aufgenommen und resuspendiert. Vor dem Ausbringen der Bakterien auf Agarplatten oder in vorbereitete Flüssigkulturen, wurden die Suspensionen zur Erholung der Bakterien für mindestens eine Stunde bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Bei ausreichender Resuspendierung der Bakterien in den vorangehenden Schritten und vorhandener Kompetenz der Bakterien wurde in der Erholungszeit nur eine geringe Sedimentation der Bakterien im Reaktionsgefäß beobachtet.

### Elektrotransformation

Zur Transformation wurden geringer Mengen von DNA (<5ng) wurde die Methode der Elektrotransformation angewandt. Hierfür fanden kompetente Bakterien der Stämme Dh5 $\alpha$  und BL21 Anwendung. Die Lagerung der Bakterien erfolgte bei -80°C.

Zur Durchführung wurde die zu transformierende Probe zunächst für mindestens eine Stunde gegen steriles Wasser dialysiert, um den Salzgehalt der Probe zu reduzieren. Anschließend wurde die DNA-Lösung zu den kurz zuvor auf Eis aufgetauten Bakterien (50 $\mu$ l) gegeben und das Gemisch gut resuspendiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension in ebenfalls auf Eis heruntergekühlte Transformationsküvetten gegeben und sofort in den Elektroporator gesteckt. Für den Elektroschock wurde die Voreinstellung „EC2“ verwendet. Sofort nach dem Schock wurde zu den Bakterien 500 $\mu$ l SOC-Medium bei Raumtemperatur gegeben und die Zellen in ein steriles Reaktionsgefäß überführt. Wiederum folgte vor dem Ausbringen der



Bakterien auf geeignete Agar-Platten eine einstündige Erholungsinkubation bei 37°C im Wasserbad.

### **Agarose-Gelelektrophorese**

Zur Analyse und Präparation von DNA-Fragmenten mit spezifischer Größe wurde die DNA mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Gele zur Elektrophorese von DNA werden in der Regel aus dem Biopolymer Agarose hergestellt. Die dabei verwendeten Konzentrationen von Agarose wurden je nach der Größe des zu analysierenden DNA-Fragments angepasst und lagen zwischen 0,8 % (m/v) für sehr große Fragmente (über 5 kb) und 2,0% (m/v) für sehr kleine Fragmente (~100-150 bp). Um die Fragmente im UV-Licht sichtbar zu machen wurde nach dem Aufkochen der Agarose im Puffer der Lösung vor dem Auspolymerisieren Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0,25µg/ ml zugesetzt. Der zur Herstellung der Gele und zur Elektrophorese eingesetzte Puffer war ein Tris-Borat-Puffer (TBE), der auch für das Anlegen höherer Spannungen geeignet ist. Die Proben wurden zur Vorbereitung mit 6 x Probenpuffer versetzt. Zur Auftrennung der DNA im Gel wurde in der Regel eine Spannung von 150 V angelegt. Die Laufzeit wurde der gewünschten Trennung angepasst. Die Betrachtung und Dokumentation der Gele erfolgte auf einem UV-Leuchttisch bei einer Wellenlänge von 254 nm. Zur Präparation von DNA – Fragmenten aus dem Gel wurde das Gel mit einer Wellenlänge 366 nm bestrahlt um die DNA nicht zu beschädigen.

Zur Extraktion eines Fragments wurde dieses unter Sichtkontrolle bei 366 nm UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten.

### **Aufreinigung von DNA über ein Agarosegel**

Für die Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen wurde das „Nucleospin Gelextraction Kit“ von Qiagen® verwendet. Die Durchführung erfolgte nach den Vorgaben der Hersteller.

### **Aufreinigung von RNA**

Für die Aufreinigung von „totaler RNA“ aus HeLa-Zellen wurde das „Total RNA Isolation Kit“ von Macherey-Nagel verwendet. Die Durchführung erfolgte nach den Vorgaben der Hersteller. Für eine Extraktion wurden je  $1 \cdot 10^6$  Zellen verwendet. Die für die RNA-Extraktion vorgesehenen Zellen wurden mit 3mM in PBS für etwa 5 Minuten bei 37°C inkubiert und dann durch Resuspendieren abgelöst, gezählt und aliquotiert. Aliquots zu  $1 \cdot 10^6$ -Zellen wurden für 3 Minuten mit 150•g bei 4°C pelletiert, der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet dann in einer Trockeneis/ Ethanol - Mischung schockgefroren.

## **Generierung von cDNA**

Zur Generierung der cDNA wurde das „RevertAid™ H-Minus single strand cDNA synthesis Kit“ © von Fermentas nach den Vorgaben der Hersteller verwendet. Es wurde jeweils 1µg RNA als Template verwendet.

## **Kolonie-PCR**

Zum Nachweis spezifischer Plasmid-Klone in einzelnen Bakterienkolonien diente die „Kolonie-PCR“. Bei dieser Form der PCR dient Zellmaterial einer Bakterienkolonie als "Template". Dabei wurde ein Teil der Kolonie von der Agarplatte entnommenen Kolonie jeweils in einen PCR-Ansatz und der Rest jeweils in eine vorbereitete LB-Flüssigkultur mit entsprechendem Selektionsantibiotikum (Kanamycin 30µg/ml oder Ampicillin 100µg/ml) überführt.

Der PCR-Ansatz zum Test einer bestimmten Zahl von Kolonien (n) erfolgte nach folgendem Schema (siehe auch Excel-Arbeitsmappe „Kolonie-PCR“ im digitalen Anhang „Material und Methoden“):

Taq-Puffer (10X)	: (n+1) µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	: (n+1) µl
Primer forw. (1:20)*	: 0,5 • (n+1) µl
Primer rev. (1:20)*	: 0,5 • (n+1) µl
dNTP (10mM)	: 0,3 • (n+1) µl
Taq-Polymerase	: 0,2 • (n+1) µl
H <sub>2</sub> O	: ad Gesamtvolumen
Gesamtvolumen	: (n+1) • 15 µl

(\* Als Primer wurden bei Klonierungen in der Regel insertspezifische Primer eingesetzt.)

Der Ansatz wurde durch mehrmaliges Hoch- und Runterpipettieren gut gemischt und dann mit je 15µl pro Ansatz auf 0,5ml-Eppendorfreaktionsgefäße verteilt. Anschließend wurden die zu testenden Kolonien mit einer weißen Pipettenspitze von der Agarplatte in den jeweiligen PCR-Einzelansatz überführt und abgestreift. Die Pipettenspitze wurde mit dem ihr anhaftendes Restmaterial an Bakterien anschließend in eine vorher vorbereitete Flüssigkultur überführt und im Schüttelinkubator bei 37°C bis zur sichtbaren Trübung inkubiert.

Die fertigen PCR-Ansätze wurden im Thermocycler „UNO-Thermoblock“ von Biometra nach folgendem Schema inkubiert:

<b>Programm:</b>	Temperatur [°C]	Zeit [s]
<b>Primäres Aufschmelzen</b>	95	120
<b>1. Aufschmelzen</b>	95	30
<b>2. Annealing<sup>1</sup></b>	55	30
<b>3. Elongation<sup>2</sup></b>	72	30
<b>Wiederholungen (1-3)</b>		25
<b>Anschließende Kühlung</b>	4	-

1 Temperatur des Annealings sollte etwa 15 °C unter dem Schmelzpunkt der Primer liegen

2 Die Elongationszeit ergibt sich aus der Prozessivität der Taq-Polymerase und der Länge des zu generierenden DNA-Fragments:  $\text{Länge Fragment[nt]} / 1000[\text{nt} \cdot \text{min}^{-1}]$  (Mindestzeit: 30 Sekunden)

Die Analyse erfolgte je nach Größe des in der PCR generierten DNA-Fragments elektrophoretisch in einem Agarosegel von 1-2% (w/v) in TBE mit (siehe Agarose-Gelelektrophorese).

### **Quantitative PCR**

Zum Quantitativen Nachweis exprimierter mRNA wurde zunächst die totale RNA aus einer definierten Zahl der zu analysierenden Zellen aufgereinigt (siehe „Aufreinigung RNA“) anschließend wurde unter Verwendung von 1 µg RNA und poly-dT-Primern aus dieser RNA unspezifisch cDNA generiert (s.o.).

Diese cDNA wurde eingesetzt, um mittels PCR die Menge darin vorhandener Clathrin schwerer Kette, Clathrin leichter Kette und Aktin-cDNA zu ermitteln, um so quantitativ auf die Expression der entsprechenden mRNAs zu schließen.

Hierzu wurden spezielle Primer generiert (Q-Primer), die spezifisch ein etwa 150 bp großes Fragment in der Nähe des 3' Endes des ORF der entsprechenden mRNA(cDNA) amplifiziert. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Primer dieselbe Schmelztemperatur und die mit der PCR zu generierenden Fragmente etwa den gleichen GC-Gehalt hatten. Um sicherzustellen, dass die PCR im exponentiellen Bereich der Vervielfältigung analysiert wurde, wurden in Vorversuchen die Parameter durch Iteration von Zyklenzahl und Template-Menge der exponentielle Bereich der Amplifikation bestimmt. Hierfür wurde die im Vorfeld klonierte cDNA der Clathrin schweren Kette Isoform 17 verwendet. Die jeweils bestimmten Bandenintensitäten für die Clathrin schwere und leichte Kette wurden in Relation zu der des Aktins gesetzt.

Die PCR-Ansätze wurden im Thermocycler „UNO-Thermoblock“ von Biometra nach folgendem Schema inkubiert:

<b>Programm:</b>	Temperatur [°C]	Zeit [s]
<b>Primäres Aufschmelzen</b>	95	120
<b>1. Aufschmelzen</b>	95	30
<b>2. Annealing</b> <sup>1</sup>	50	30
<b>3. Elongation</b> <sup>2</sup>	72	30
<b>Wiederholungen (1-3)</b>		25
<b>Anschließende Kühlung</b>	4	-

1 Temperatur des Annealings sollte etwa 15 °C unter dem Schmelzpunkt der Primer liegen

2 Die Elongationszeit ergibt sich aus der Prozessivität der Taq-Polymerase und der Länge des zu generierenden DNA-Fragments: Länge Fragment[nt] / 1000[nt • min<sup>-1</sup>] (Mindestzeit: 30 Sekunden)

Anschließend erfolgte die Analyse der PCR-Produkte durch Gelelektrophorese in einem 2%-Agarosegel (s.o.). Die Gele wurden mit dem Imager Argus1 fotografiert und mit der ImageJ-Software und Excel densitometrisch ausgewertet.

## **Klonierungen von CLC-cDNA**

LCA-GFP (pEGFP-C3-LCA) war eine freundliche Gabe von Lois Greene (JBC Vol. 155, No2, 2001 S. 291, Wu et al.).

pCMV-2B-LCB wurde freundlicher Weise von Dr. Michael Düwel kloniert.

GST-LCA wurde durch Subklonierung der LCA- DNA in den PST-Blue1-Vektor generiert. Hierfür wurde mittels PCR zunächst die LCA-DNA gewonnen. Hierfür wurden als Template 50 ng des oben erwähnten pEGFP-LCA mit folgenden Primern verwendet:

Sense: 5' ATG GCT GAG CTG GAT CCG TTC 3'

Antisense: 5' TCA GTG CAC CAG CGG GGC 3'

Für die PCR wurde die PFU-Polymerase (Fermentas) nach den Vorgaben des Herstellers verwendet.

PCR-Parameter:

<b>Programm:</b>	Temperatur [°C]	Zeit [s]
<b>Primäres Aufschmelzen</b>	95	120
<b>1. Aufschmelzen</b>	95	30
<b>2. Annealing<sup>1</sup></b>	56	30
<b>3. Elongation<sup>2</sup></b>	72	60
<b>Wiederholungen (1-3)</b>		25
<b>Anschließende Kühlung</b>	4	-

1 Temperatur des Annealings sollte etwa 15 °C unter dem Schmelzpunkt der Primer liegen

2 Die Elongationszeit ergibt sich aus der Prozessivität der Taq-Polymerase und der Länge des zu generierenden DNA-Fragments:  $\text{Länge Fragment[nt]} / 1000[\text{nt} \cdot \text{min}^{-1}]$  (Mindestzeit: 30 Sekunden)

Anschließend erfolgte eine 30-minütige Inkubation des Ansatzes bei 37°C unter Zusatz von 1U Taq-Polymerase. Die so gewonnene LCA- DNA wurde anschließend in den PSTBLUE 1 Acceptor Vector™ nach den Vorgaben des Herstellers subkloniert (Merck, Darmstadt, Germany). Das so gewonnene Konstrukt wurde dann mit EcoR I verdaut und das erhaltene Fragment in die EcoR I-Schnittstelle des pGEX-6P-2 Vectors kloniert.

GFP -LCb DNA wurde freundlicher Weise von H. Ungewickell kloniert. Dies geschah durch Ausschneiden der bovinen, neuronalen LCb DNA aus dem puc18-Vector (eine freundliche Gabe von F. Brodsky, UCSF, San Francisco, Ca) mit Hind III und EcoR I. Vor dem Verdau mit EcoR I wurden die 5'-Überhänge, entstanden durch den Hind III-Verdau, mit dem Klenow- Fragment entfernt. Der Zielvector (EGFP-C-2) wurde mit EcoR I and Sma I verdaut und die LCb DNA in den so präparierten Vektor ligiert. Die Sequenz beider Konstrukte wurde durch Sequenzierungen durch einen kommerziellen Anbieter überprüft (MWG Biotech, Ebersberg, Germany).

Die GST-GFP-LCA-DNA wurde generiert indem zuerst pEGFP-LCA Donorvector mit Age I und dann mit dem Klenow-Fragment behandelt wurde. Danach erfolgte die Excision der GFP-LCA-DNA mit Sal I. Das so gewonnene Fragment wurde in den pGEX-6P-2 Vector ligiert. Dieser wurde hierfür zuerst durch den Verdau mit EcoR I und die Reaktion Klenow und dann mit Sal I vorbereitet.

GST-GFP –LCB wurde mit der selben Strategie aus pEGFP-LCB kloniert.

Für die Generierung von GST-LCB-GFP wurde unter Nutzung von pEGFP-C2-LCB als Template (s.o) wurde die LCB-kodierende Sequenz mittels PCR und folgenden Primern amplifiziert:

Sense: 5' GTAAGAGGATCCATGGCTGATGACTTTGGCT 3'

Antisense: 5' AGAATGAAGCTTCTAGCGGGACAGCGGTGTCTG 3'.

Für die PCR wurde die PFU-Polymerase (Fermentas) nach den Vorgaben des Herstellers verwendet. (PCR-Parameter siehe Klonierung GST-LCA)

Anschließend erfolgte eine 30-minütige Inkubation des Ansatzes bei 37°C unter Zusatz von 1U Taq-Polymerase. Die so gewonnene LCB- DNA wurde anschließend in den PSTBLUE 1 Acceptor Vector™ nach den Vorgaben des Herstellers subkloniert (Merck, Darmstadt, Germany). Das so gewonnene Konstrukt wurde dann mit EcoR I verdaut und das erhaltene Fragment in die EcoR I-Schnittstelle des pGEX-6P-2 Vectors kloniert. Zuletzt wurde die GFP-DNA aus dem pEGFP-N3-Vectorin das vorher erhaltene pGEX-6P-2-LCB-Konstrukt über Sal I and Not I an den C-Terminus der LCB fusioniert.

pTagRFP-LCB wurde ausgehend von pEGFP-C2-LCB und pTagRFP-C durch den Austausch des GFP gegen TagRFP kloniert. Beide Vektoren wurden mit AgeI und Hind III verdaut. Anschließend wurde das gereinigte TagRFP-Fragment in den GFP-freien p --- C2 LCB ligiert. Zur Angleichung des Leserahmens wurde das fertige Konstrukt erneut mit Hind III verdaut und somit linearisiert. Anschließend wurden die Überhänge durch Inkubation mit dem Klenow Fragment entfernt und der linearisierte Vektor wieder religiert.

pAC-TagRFP-nuc wurde aus pAC-GFP-nuc und dem pTagRFP-C-Vektor durch Austausch des Fluorophors GFP gegen TagRFP kloniert. Hierfür wurden beide Vektoren mit AgeI und XhoI behandelt. Anschließend wurde das gereinigte TagRFP-Fragment in den pAC --- nuc-Vector ligiert.

### **Sequenzierung /Sequenzanalyse**

Zur Überprüfung und Identifizierung der Sequenzen klonierter cDNA wurde der Sequenzierservice der Firma GATC-Biotech (Koblenz, Deutschland) in Anspruch genommen. Die Analyse der erhaltenen Sequenzen erfolgte mit dem Freeware-Programm Serial-Cloner 1, dem „BLAST“-Service aus [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) und <http://align.genome.jp>.

### **Densiometrische Auswertung**

Die densiometrische Auswertung von Westernblots und Agarosegelen erfolgte mit dem Programm ImageJ. Nach der Markierung der einzelnen Laufbahnen wurde die Fläche unter den gewünschten "Peaks" berechnet.

### **Testinduktion**

Zur Expression der gewonnenen Konstrukte wurden diese in BL21-Bakterien transformiert und auf Selektivagar ausgebracht (Ampicillin 50µg/ml). Am nächsten Tag wurden einzelne Klone gepickt und in LB-Medium, versetzt mit Ampicillin (50µg/ml) bis zur sichtbaren Trübung im Schüttelinkubator inkubiert. Anschließend wurden je 500µl der Bakteriensuspension mit 0,5 mM IPTG induziert und für eine Stunde bei Raumtemperatur im Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension bei 16.000 upm in der Zentrifuge 5410 für 10 Minuten pelletiert, einmal mit PBS gewaschen und anschließend wieder pelletiert. Das Pellet wurde jeweils in PBS resuspendiert. Im Fall der GST-GFP-LC-Konstrukte wurden 10µl der Bakteriensuspension zur lichtmikroskopischen Untersuchung auf einem Objektträger ausgestrichen. Die restlichen 90 Mikroliter wurden mit 30µl 4xSDS-Probenpuffer versehen und aufgeköcht. Anschließend erfolgte die Auftrennung der Proben über SDS-PAGE und anschließend die spezifische Identifikation im Westernblot mit Antikörpern gegen GST und die CLC.

### **Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen**

GST-Fusionsproteine wurden aus lysierten Bakterien durch Affinitätschromatographie über GSH-Sepharose nach den Vorgaben des Herstellers (GE Healthcare) aufgereinigt. Zur Darstellung der GFP-CLC wurde unter ständiger Abschirmung der Probe gegen jegliches Licht gearbeitet. Das GST wurde durch den Verdau mit der „PreScission™ protease“ (GE Healthcare) verdaut. Hierfür wurden die an die GSH-Sepharose-Matrix gebundenen Proteine in den „PreScissionpuffer“ gebracht und mit 40µl PreScission Protease pro Milliliter gepackte GSH-Matrix versetzt. Der Verdau erfolgte über Nacht im Kühlraum (etwa 7°C) unter ständiger Rotation.

Danach wurden die GFP-CLC durch Gelfiltration in 0.5M Tris-HCl, 2 mM EDTA, pH 7.0 über eine Superdex 200-Säule gereinigt (GE Healthcare). Die CLC-haltige Fraktionen wurden zusammengegeben und gegen 25 mM HEPES, 125 mM Natriumacetat und 5 mM Magnesiumacetat, pH 7.1 dialysiert. Zuletzt erfolgte die Aufkonzentrierung der Probe durch

Zentrifugation über ein Centricon YM-10 (Millipore GmbH, Schwalbach, Germany) in der Kühlzentrifuge J2-HS (Rotor JA-10, 5000 UPM, 4°C) auf etwa 1 mg/ml.

### **Aufreinigung von Clathrin**

Clathrin wurde aus clathrinbedeckten Vesikeln (CCV) aus Schweinehirn extrahiert. Hierfür wurden 1.25 ml CCV-Suspension mit 250 µl 3 M Tris-HCl (pH 7.0) gemischt und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Die Suspension wurde anschließend für 20 Minuten bei 70.000 Upm (TLA110.4 Rotor - 266.000g) bei 4°C zentrifugiert. Der klare Überstand wurde abgenommen und das Pellet erneut in 0,5 M Tris-HCl (pH 7,0) resuspendiert und abzentrifugiert. Die Überstände beider Zentrifugationsschritte wurden vereinigt und durch Gelfiltration in 0,5 M Tris-HCl (pH 7,0) über eine Superose 6 – Säule aufgetrennt und fraktioniert werden. Die Proteinzusammensetzung der Fraktionen wurde mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert. Clathrinhaltige Fraktionen ohne „Assembly“- und akzessorische Proteine wurden durch Ammoniumsulfatfällung über Nacht bei 4°C in der Anwesenheit von 2 mM EDTA (pH 7,0) aufkonzentriert. Das gefällte Protein wurde mit 20.000 Upm für 20 Minuten im SW-28-Rotor pelletiert. Das Pellet wurde anschließend in 700µl 0.5 M Tris-HCl (pH 7.0) aufgenommen und danach gegen denselben Puffer dialysiert. Zur Lagerung wurde das Clathrin durch Dialyse gegen Puffer A in Käfige zusammengelagert. Die Käfige wurden bei 45000 Upm für 20 Minuten im TLA 45 – Rotor pelletiert und in 300µl Puffer A resuspendiert und auf Eis gelagert.

Die Separation von Clathrin schwerer und leichter Kette erfolgte wie bereits beschrieben (Winkler and Stanley, 1983).

### **Fluorochromierung von Clathrin**

Clathrin leichte und schwere Ketten wurden unter chaotrope Bedingungen voneinander getrennt. Hierfür wurden isolierte Triskelia in 1.3M Thiocyanat, 50 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 1mM Dithiothreitol, pH 8.2 (“Dissoziationspuffer”) gebracht. Anschließend erfolgte die chromatographische Auftrennung von schweren und leichten Ketten über eine Superdex 200 HR 10/30 Säule, die mit einem „fast liquid chromatography system“ (GE Healthcare, Freiburg, Germany) verbunden war. Vor dem Beladen der Säule mit dem dissoziierten Clathrin wurde sie in Dissoziationspuffer äquilibriert.

Für die Fluorochromierung wurden die leichten Ketten in 0.1M NaHCO<sub>3</sub>, pH 8.3 bei einer Konzentration von 0.1 mg/ml gebracht. Der Alexa- Carboxyl-Succinimidylester wurde bei einer Konzentration von 20 mg/ml in DMSO gelöst. Zu einem Milliliter der CLC-Lösung



wurden 25 µl der Alexa-488-Lösung gegeben und für eine Stunde auf Eis inkubiert. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von Tris-HCl, pH 7.0 (Endkonzentration 0,5M) gestoppt. Freier Farbstoff wurde durch die sukzessive Gelfiltration der markierten leichten Ketten über eine NAP-5 und anschließend eine NAP-10 Gelfiltrationssäule (GE Healthcare) vollständig entfernt.

Der Markierungsgrad wurde durch Messung des Absorptionsspektrums ermittelt:

$$n = \frac{A_{\max} \times MW}{[\text{Protein}] \times \epsilon_{\text{dye}}}$$

Mit  $n$  = Anzahl der Farbmoleküle pro Protein;  $A_{\max}$  = Absorptionsmaximum des Farbstoffs;  $\epsilon$  = Molarer Extinktionskoeffizient des Farbstoffs;  $[\text{Protein}]$  = Proteinkonzentration;  $MW$  = Molekulargewicht des Proteins.

Unter den gegebenen Bedingungen wurde ein Markierungsgrad von 0,7 - 0,9 Farbstoffmoleküle pro Clathrin leichte Kette erreicht.

Die Clathrin schweren Ketten wurden analog zu den leichten Ketten fluorochromiert. Hierfür wurden sie in assemblierten Zustand (Käfige) in 0.1M NaHCO<sub>3</sub>, pH 7.0 gebracht. Anschließend erfolgte die Fluorochromierungsreaktion analog zu den leichten Ketten.

### **Zellfraktionierung**

Die Fraktionierung wurde wie bereits in Hinrichsen et al. 2003 beschrieben durchgeführt.

Hierfür wurden Zellen in 60mm-Schalen kultiviert und 72 Stunden nach der ersten siRNA-Transfektion eingesetzt. Hierfür wurden die Zellen zweimal mit 100 mM NaHPO<sub>4</sub>, 50 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, pH 7,4 (Puffer W) bei 37°C gespült. Dann wurden die Zellen durch dreimaliges Einfrieren auf Trockeneis und Auftauen auf Wassereis in Puffer W + „Complete MINI protease inhibitor cocktail“ (Roche, Mannheim, Germany) aufgebrochen.

Die Trennung von löslicher (s) und unlöslicher Fraktion (p) erfolgte bei 100000 x g bei 4°C für 20 min (Optima TL100 Rotor 100.4). Die partikuläre Fraktion wurde anschließend in einem der löslichen Fraktion entsprechenden Volumen 0,5 M Tris-HCl bei pH 7,4 aufgenommen und durch kurzes Sonifizieren homogenisiert. Danach wurden beide Fraktionen durch Zusatz von SDS-Probenpuffer zuerst für 10 Minuten bei Raumtemperatur und danach für 3 Minuten bei 95°C denaturiert.

### **Immunpräzipitation**

Die Immunfällung wurde zur quantitativen Isolation von in HeLa-Zellen exprimierter Clathrin schwerer Kette angewendet. Das Präzipitat wurde nach der Reinigung im Westernblot (s.o.) untersucht.

24 Stunden vor der Transfektion der GFP-CHC wurden die Zellen in einer 10cm-Schale ausgesät, so dass sie am nächsten Tag etwa zu 80% konfluent waren ( $\sim 5 \cdot 10^6$  Zellen). 18-24 Stunden nach der Aussaat erfolgte dann die Transfektion der Zellen mit der entsprechenden Plasmid-DNA (EGFP-CHC+ pCMV-LCB bzw. EGFP-CHC + pCMV-Leervector).

Weitere 24 Stunden später erfolgte nach dreimaligem Waschen mit warmem PBS die Lyse der Zellen in 800 $\mu$ l eiskaltem TBST-Lysepuffer(+Proteaseinhibitoren). Die Zellen wurden auf Eis mit einem Schaber vollständig von der Platte gelöst und das Lysat durch mehrmaliges Hoch- und Runterpipettieren homogenisiert.

Zur vollständigen Lyse der Zellen folgte anschließend eine einstündige Inkubation der Homogenate auf Eis. Unlösliche Zellbestandteile wurden dann durch Ultrazentrifugation für 30 Minuten bei 45.000 upm und 4°C. Der Überstand wurde danach in ein frisches Ultrazentrifugenröhrchen (Eppendorf) überführt und mit 90 $\mu$ l einer 10%igen(w/v) BSA-Lösung versehen (Endkonzentration 1% BSA (w/v)). Zur ersten Reinigung („Preclear“) der Lysate wurden diese mit etwa 15 $\mu$ l gepackten Protein-A-Sepharosekügelchen versetzt und für 30 Minuten bei 7°C im Kühlraum unter ständiger Rotation inkubiert. Somit sollten unspezifisch an die Sepharose bindende Proteine abgefangen werden. Nach der Abtrennung der Kügelchen durch Zentrifugation (1200 upm, 3 Minuten und 4°C) und Überführung des Überstands in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß, wurde dem Lysat 8 $\mu$ g eines Antikörpers gegen GFP zugegeben. Nach mehrmaligem Invertieren erfolgte eine Inkubation von 1,5 Stunden auf Eis. Anschließend wurde der Komplex aus Antikörper und GFP-CHC durch Zugabe von 20 $\mu$ l gepackten und mit TBST äquilibrierten Protein-A-Sepharosekügelchen gefällt (Rotationsinkubation für 30 Minuten bei 7°C). Die Abtrennung der Kügelchen erfolgte durch Zentrifugation bei 600g für 2 Minuten und 4°C. Der Überstand wurde in ein frisches Eppendorfhütchen überführt. Um das Präzipitat zu reinigen wurden die Protein-A-Sepharosekügelchen zweimal mit „BSA-Wasch-Puffer“, einmal mit Wasser und zweimal mit „EDTA-Wasch-Puffer“ gewaschen. Anschließend wurden die Präzipitate in PBS aufgenommen und durch Zugabe von SDS-Probenpuffer bei Raumtemperatur für 10 Minuten geschüttelt. Abschließend wurden die Proben für 2 Minuten bei 95°C denaturiert.

### **Analytische Ultrazentrifugation**

Die Sedimentationsexperimente wurden freundlicher Weise von Fr. PD Dr. U. Curth (Instiut für Biophysik, MHH) durchgeführt.

Hierfür wurde eine analytische Ultrazentrifuge verwendet (Beckman Coulter Optima XL-I, Rotor An50Ti, bei 7°C und 50000 upm), die mit einem Fluoreszenzdetektionssystem bestückt ist (AU-FDS, Aviv Biomedical, NJ, USA).

Die Konzentrationsprofile wurden unter Verwendung des AU-FDS mit einer Excitationswellenlänge von 488 nm gemessen. Die Emission wurde dabei durch eine Paar dichroide Langpassfilter (>505 nm) erfasst. Die Programmierung der Zentrifuge und die Datenaufzeichnung wurde unter Verwendung der AOS – Software (Aviv Biomedical, NJ, USA) durchgeführt. Die 100µl großen Proben wurden in Zellen in speziellen Halterungen (Nanolytics, Germany) eingebracht.

Vor dem Zentrifugationslauf wurden 0,2µM Clathrin schwere Kette mit je 0,23µM Clathrin leichte Ketten, konjugiert mit Alexa 488 (s.o.) und ansteigenden Konzentrationen unmarkierter leichter Ketten in 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.9 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8.2 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.1 mM Dithiothreitol und BSA (0.1 mg/ml) über Nacht bei 7°C inkubiert.

Die während des Laufs gemessenen Konzentrationsprofile wurden unter Verwendung von SEDFIT ausgewertet. Dieses Programmpaket beinhaltet ein Modell für die differentielle Verteilung der Sedimentationskoeffizienten unter Berücksichtigung der Diffusion (c(s)-Verteilung). Die Fläche unter der c(s)-Kurve entspricht dabei der Konzentrationsverteilung der Alexa 488-markierten leichten Ketten. Die Konzentrationen von freien und gebundenen, Alexa 488-markierten leichten Ketten wurden über die Fläche unter den Maxima der c(s)-Kurven bestimmt. Dabei wurde angenommen, dass die Quantenausbeute der Alexa 488-leichten Ketten unabhängig von der Bindung an der Triskelia ist. Die gemessenen S-Werte wurden auf  $s_{20^{\circ}\text{C},\text{w}}$  bezogen. Hierfür wurde das partielle spezifische Volumen der Proteine aus der Aminosäurezusammensetzung berechnet.

### **Zusammenlagerung (Assembly) von Clathrin**

Für die Überprüfung des inhibitorischen Effekts der Clathrin leichten Ketten auf die Zusammenlagerung des Clathrins in Käfige wurden leichte Ketten ohne oder mit unmarkierten, fluorochromierten (s.o) oder GFP-leichten Ketten über Nacht gegen 0.1M MES, 1mM EGTA, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 6.6 („Assemblypuffer) dialysiert.

Die Clathrinkonzentration entsprach dabei 1,3 mg/ml in 30µl. Zusammengelagertes Clathrin wurde danach durch Ultrazentrifugation (Optima TL100, Rotor 100.4) abgetrennt. Beide Fraktionen wurden in SDS-Puffer aufgenommen und zuerst für 10 Minuten bei Raumtemperatur und danach für 3 Minuten bei 95°C denaturiert. Die Analyse erfolgte über SDS-PAGE und anschließende Färbung mit Coomassie Blue-250 (s.o)

### 3. Ergebnisse

Zur Untersuchung der Funktion der Clathrin leichten Ketten wurden bisher, Referenz nehmend zur aktuellen Literatur, verschiedene Ansätze verfolgt. Zu Beginn erfolgte die Charakterisierung von aufgereinigten CLC aus Säugerhirnen (Ungewickell et al. 1991). Neben ihrer Charakterisierung als Regulatoren der Clathrinpolymerisation fanden in diesem Kontext erste Kartierungen statt, die Orientierung und Ausdehnung der leichten Ketten eingrenzten (Ybe et al. 2003). Die Möglichkeit die CLC in verschiedenen Organismen rekombinant zu exprimieren, führte schließlich zur Identifikation von Interaktionspartnern und Hinweisen auf Funktionen (Chen et al. 2002). Zuletzt führte der Einsatz von CLC-spezifischer siRNA und die Analyse der Phänotypen zu weiteren Einblicken in die Funktion der Clathrin leichten Ketten (Huang et al. 2004, Poupon et al. 2007, Mettlen et al 2009).

Tatsächlich werfen die bisher veröffentlichten Analysen weitere grundlegende Fragen auf. So wurde bisher zwar mehrfach und schlüssig dargelegt, inwiefern eine Verbindung zwischen der CE und dem Aktinzytoskelett besteht und welchen Einfluss dieses auf die CE haben kann (Liu et al. 2010). Außerdem wurde intrazellulär für die CLC eine Rolle bei der Verteilung und Organisation verschiedener Membrankompartimente nachgewiesen (Poupon et al. 2008). Letztlich konnte aber bisher keine direkte Verbindung zwischen den regulativen Eigenschaften der CLC *in vitro* (Ungewickell et al. 1991, Ybe et al. 1998, Ybe et al. 1999) und einer möglichen äquivalenten Rolle *in vivo* nachgewiesen werden. Ein weiterer Punkt, den nahezu alle bisherigen Arbeiten zu den CLC gemein haben, ist die Tatsache, dass zur Beobachtung ihrer Dynamik in der Zelle GFP-Fusionsproteine verwendet wurden. Wie bereits behandelt, birgt dieses für die Analyse ihrer regulatorischen Eigenschaften mögliche Probleme, die im Weiteren ebenfalls behandelt werden sollen. Alle bisherigen Arbeiten lassen bei ihrer Analyse die direkte Beziehung zwischen CHC und CLC und den gegenseitigen Einfluss aufeinander *in vivo* außer Acht.

Daher sollte zur Ergründung der Rolle der CLC zunächst ihr Einfluss auf das Verhalten der CHC *in vivo* untersucht werden.

## Expression von Clathrin

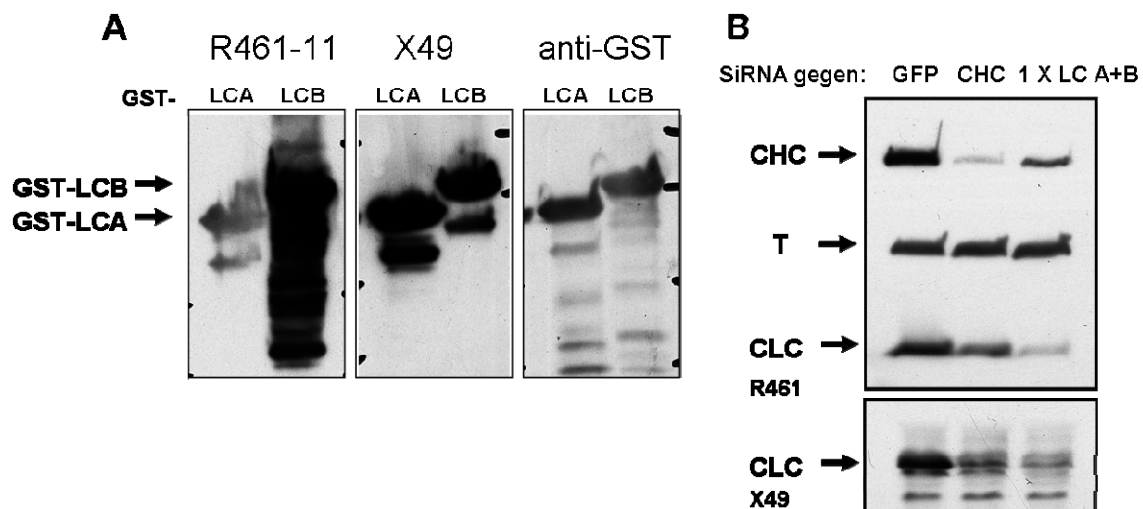
Eine mögliche Herangehensweise zur Charakterisierung der CLC besteht darin, die Expression beider Isoformen in HeLa-Zellen mittels RNAi zu unterbinden. Hierzu sollte im ersten Schritt eine verlässliche und effiziente Herunterregulation, wie sie bereits in der Literatur beschrieben wurde (Huang et al 2004), etabliert werden. Die siRNA gegen die Isoform A wurde selbst erstellt (siehe Abschnitt 2.1 „Material“) die siRNA gegen B wurde bereits publiziert (Huang et al. 2004, „LCB Oligo 4“).

Zur Charakterisierung der Antikörper gegen die Clathrin leichten Ketten wurden Lysate von Bakterien analysiert, die die Fusionsproteine GST- LCA und GST-LCB exprimieren. Es zeigt sich (Abbildung 3.1 A), dass bei etwa gleicher Beladung der Spuren LCA von R461 wesentlich schlechter erkannt wird, als LCB (linke Spuren). Im Vergleich dazu zeigt der monoklonale Antikörper X49 (mittlere Spuren), der beide Isoformen gleichermaßen erkennt, den realen, gleichen Beladungszustand, wie auch der anti-GST-Antikörper (rechte Spuren).

Somit ist klar, dass bei der Verwendung des R461-Antikörpers im Westernblot nur die Isoform B dargestellt wird. Bei einem simultanen „knock down“ beider Isoformen fungiert diese als Reporter. Im Folgenden wurde der polyklonale Antikörper R461 aufgrund seiner deutlich höheren Sensitivität und Spezifität für Nachweise im Westernblot verwendet.

Die erste Analyse des „knock downs“ erfolgte im Westernblot (Abbildung 3.1 B). Die Zellen wurden hierbei mit 3mM EDTA in PBS in Suspension gebracht, gezählt, abzentrifugiert und in Probenpuffer KL lysiert. Die Beladung der SDS-Gele erfolgte mit gleicher Zellzahl (vergleiche Tubulin (T) als Ladekontrolle). Die „Kontrolltransfektion“ unterscheidet sich von der Transfektion der CLC-siRNA durch den Einsatz eines RNA-Oligos gegen GFP, das natürlicherweise nicht in HeLa vorkommt und somit als Kontrolle für unspezifische Effekte transfizierter siRNA dient. Die Kontrolltransfektion verlief bei den Zellen immer ohne Änderung eines Phänotyps. Ebenfalls zeigte sich, wie bereits beschrieben wurde (Hinrichsen et al. 2003, 2005), dass die zwischen Transfektion der Kontroll-RNA (GFP) und der Transfektion ohne RNA (nur Transfektionsreagenz, Lipofectamin 2000© oder Hiperfect©) gleichermaßen keine offensichtlichen Unterschiede auftraten. Daher wurde später auf die Verwendung der GFP-siRNA verzichtet.

**Abbildung 3.1**



**Abbildung 3.1 Antikörper zum Nachweis der Clathrin leichten Ketten in siRNA-Experimenten**

**A:** BL21-Bakterien exprimieren GST-LCA- und GST-LCB-Fusionsproteine (jeweils Spur LCA bzw. LCB). Die lysierten Bakterien wurden im Westernblot mit drei verschiedenen Antikörpern entwickelt: Der polyklonale anti-CLC Antikörper (R461), ein monoklonaler Antikörper (x49) und ein anti-GST-Antikörper.

Es zeigt sich, dass der polyklonale Antikörper (R461) nahezu ausschließlich LCB erkennt, während X49 beide Isoformen gleichermaßen erkennt.

**B:** HeLa-Zellen wurden mit siRNA gegen GFP (Kontrolle), gegen CHC und einmal mit siRNA gegen beide CLC-Isoformen transfiziert und an Tag 3 mit EDTA abgelöst, in SDS-Puffer lysiert und via SDS-PAGE und Westernblot analysiert. Entsprechende Abschnitte der Blots wurden mit Antikörpern gegen Clathrin schwere Kette (CHC), Tubulin (T) und zwei verschiedenen Antikörpern gegen die Clathrin leichten Ketten (CLC) entwickelt (R461/ X49). Es ist zu sehen, dass bei der Herunterregulation der Clathrin schweren Kette die leichte Kette ebenfalls abnimmt. Deutlich ist auch der Verlust der schweren Kette bei Transfektion der siRNA gegen die CLC. Der Nachweis der CLC in diesen Proben gelingt auch mit dem isoformunspezifischen Antikörper X49, allerdings vor dem Hintergrund unspezifischer Banden.

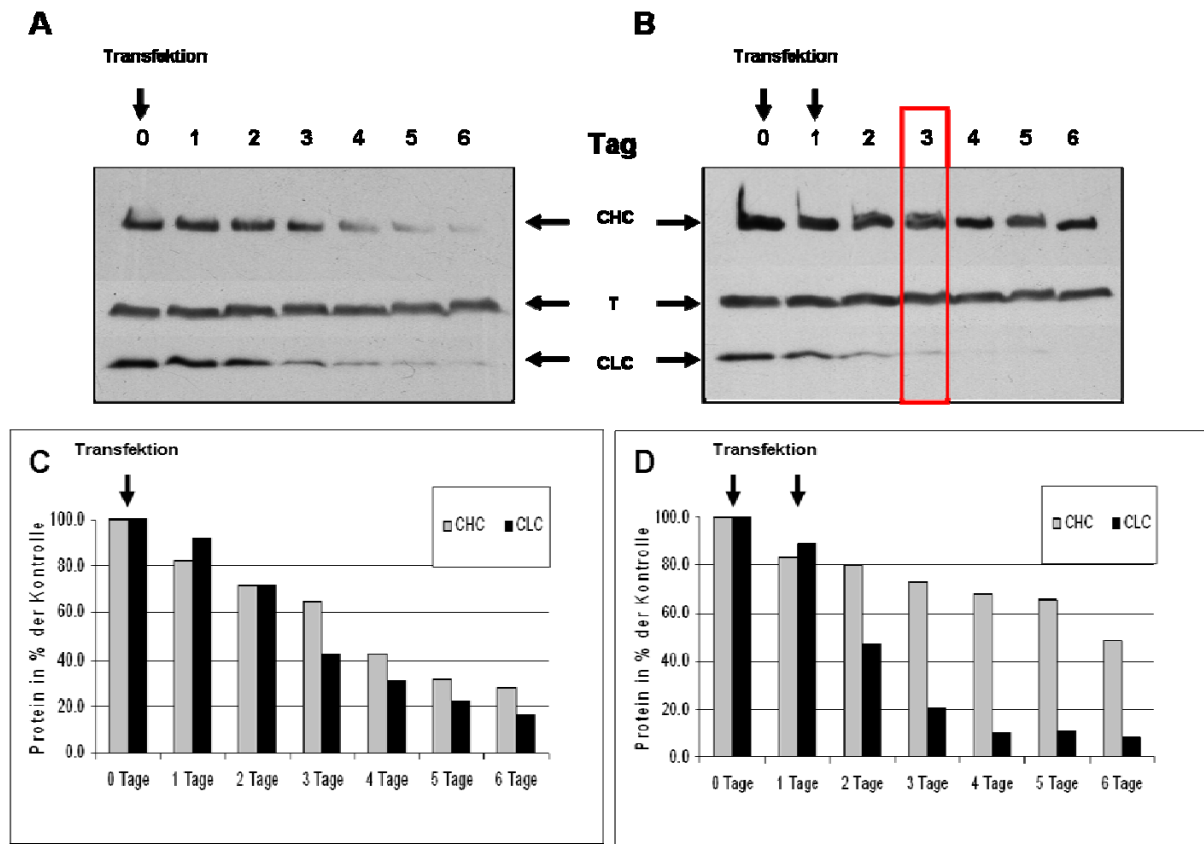
Die Depletierung der Clathrin schweren Kette durch CHC-spezifische siRNA führt ebenfalls zu einer Verringerung der Clathrin leichten Ketten (Abbildung 3.1 B „CHC“). Allerdings erscheint die zelluläre Konzentration der leichten Ketten hierbei höher als nach der einmaligen Transfektion von CLC-siRNA (1xLCA+B).

Beim weiteren Vorgehen stand zunächst die Optimierung der Reduktion der CLC im Vordergrund. Hierbei brachte die Doppeltransfektion den größten Erfolg. Dazu wurde die Transfektion 24 Stunden nach dem ersten Mal wiederholt. Ein Vergleich der beiden Zeitreihen A (einfache Transfektion) und B (doppelte Transfektion) zeigt, dass bei der Doppeltransfektion bereits nach 72 Stunden (Tag 3) eine Reduktion der leichten Ketten auf

etwa 20% gelingt (Abbildung 3.2). Dieses Niveau ist durch einfache Transfektion erst nach 4 Tagen annähernd erreicht. Eine weitere wichtige Erkenntnis ist, dass das Expressionsniveau der Clathrin schweren Kette durch die Herunterregulierung der CLC beeinflusst wird. Dies wird bei der Betrachtung der Banden der Clathrin schweren Kette in Zeitreihe A (Einfachtransfektion) sehr deutlich (Abbildung 3.2, A). Das Signal geht nahezu simultan mit dem der leichten Ketten zurück. Dieser Effekt ist ebenfalls bei doppelter Transfektion (Zeitreihe B) zu beobachten, allerdings ist er hier deutlich geringer ausgeprägt. Die Quantifizierung der Blotbanden in den Diagrammen 3.2 C und D zeigen repräsentativ den Verlauf der Proteinniveaus von CHC, Tubulin und der CLC. Der Verlauf der Expression wurde in drei unabhängigen Experimenten reproduziert. Als offensichtliche Beobachtung kann festgehalten werden, dass das Expressionsniveau der Clathrin schweren Kette eindeutig mit dem der leichten Kette sinkt. Das Ausmaß dieses Effektes ist von der Transfektionsstrategie abhängig. Die Einbringung der doppelten Menge an siRNA (doppelte Transfektion) führt zu einem geringeren Verlust der Clathrin schweren Kette im „knock down“ der Clathrin leichten Kette. Dieser beobachtete Phänotyp erwies sich als reproduzierbar und war unabhängig vom Transfektionsreagenz (es wurde Hiperfect® oder Lipofectamin 2000® verwendet).

Als Konsequenz aus der Tatsache, dass im „CLC-knock down“ ein signifikanter Teil der schweren Kette verloren geht, wurde für alle weiteren Experimente die Doppeltransfektionsstrategie gewählt und die entsprechenden Analysen, bzw. Experimente am Tag 3 nach der ersten Transfektion durchgeführt. Dies stellt im vorhandenen System den besten Kompromiss aus Effizienz der CLC - Reduktion und der Präservation der schweren Kette dar.

Abbildung 3.2



**Abbildung 3.2 Zeitabhängigkeit der Herunterregulation der Clathrin leichten Ketten: Westernblotanalyse der Herunterregulierung der Clathrin leichten Ketten in HeLa.**

Die Zellen wurden einmal (Protokoll 1 - Abbildung A, Diagramm C) oder zweimal (Protokoll 2 - Abbildung B, Diagramm D) in 48 Stunden mit siRNA gegen CLC transfiziert und am angegebenen Zeitpunkt mit SDS-Probenpuffer lysiert. Die Beladung der SDS-PAGE wurde zur Zellzahl korreliert. Entsprechende Abschnitte der Blots wurden mit Antikörpern gegen Clathrin schwere Kette (CHC), Tubulin (T) und Clathrin leichte Kette (CLC) entwickelt und durch Densitometrie quantifiziert. Zu beachten ist, dass die zelluläre Konzentration der Clathrin schweren Kette mit der Herunterregulierung der CLC abnimmt. Das Ausmaß dieses Verlustes der CHC ist bei der Transfektion nach Protokoll 2 geringer, während die CLC schneller verschwinden.

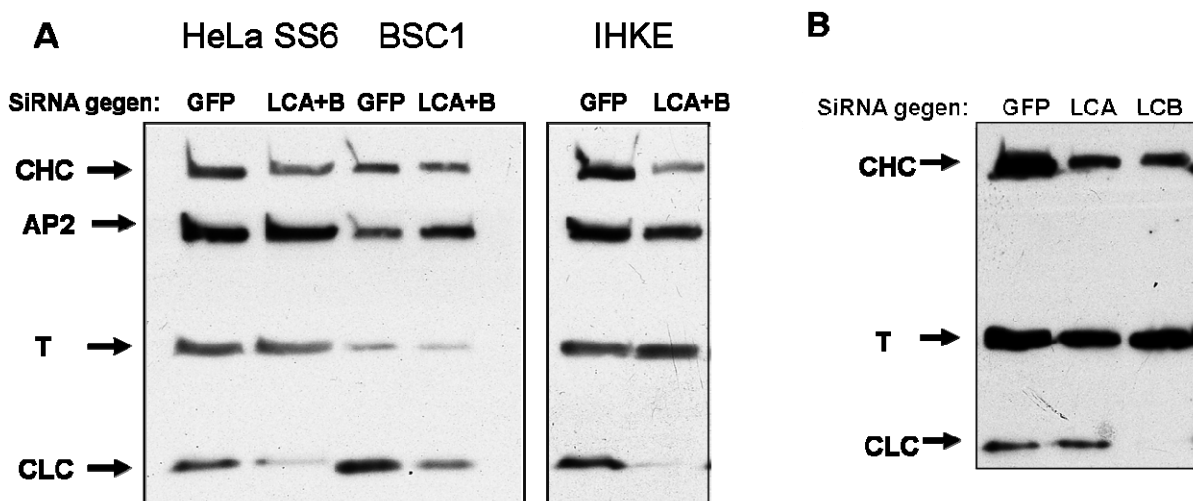
Aufgrund der starken Reduktion der CLC und der verhältnismäßig guten Erhaltung des CHC-Niveaus wurde Tag 3 nach Transfektion nach Protokoll 2 als Standard für RNAi-Experimente gegen die CLC verwendet.

Die Beobachtung, dass die Clathrin schwere Kette in Zellen ohne CLCs offensichtlich reduziert ist, lässt die Frage aufkommen, ob auch andere Proteine, die funktional in direkter Verbindung zum Clathrin stehen, wie etwa die Adaptorproteine, ebenfalls eine veränderte Expression aufweisen. Um die Möglichkeit siRNA-spezifischer Nebeneffekte auszuschließen, wurde die Herunterregulation der CLC in verschiedenen Zelltypen und die Depletion einzelner Isoformen getestet. Bei den verwendeten BSC1-Zellen handelt es sich um



Nierenepithelzellen aus der grünen Meerkatze (Hopps et al. 1963). Die IHKE-Zellen können als undifferenzierte humane Nierenzellen aus dem Bereich des proximalen Tubulus der Niere charakterisiert werden (Tveito et al. 1989). Auch in diesen Zellen sinkt das Expressionsniveau der CHC, bei Depletion der CLC. Wie in Abbildung 3.3 A zu sehen ist, verändert sich das Expressionsniveau des Adaptorproteins AP2 in allen drei getesteten Zelllinien nicht signifikant. Diese Beobachtung geht einher mit der Tatsache, dass das Expressionsniveau der Adaptine in einem „CHC-knock down“ ebenfalls nicht verändert ist (Hinrichsen et al. 2003).

**Abbildung 3.3**



**Abbildung 3.3 Zelltyp und Isoformabhängigkeit des Effekts der Herunterregulierung der Clathrin leichten Ketten.**

**A:** Die verschiedenen Zelllinien wurden gemäß Protokoll 2 mit siRNA gegen beide CLC transfiziert und an Tag 3 mit SDS-Probenpuffer lysiert. Zur Kontrolle wurden Zellen mit einer siRNA gegen GFP transfiziert. Die Beladung der SDS-PAGE wurde mit der Zellzahl korreliert. Entsprechende Abschnitte der Blots wurden mit Antikörpern gegen Clathrin schwere Kette (CHC), AP2, Tubulin (T) und Clathrin leichte Kette (CLC) entwickelt. In den drei Zelllinien zeigt die Reduktion der CLC auch einen Effekt auf das Niveau der CHC-Expression. In den beiden humanen Zelllinien HeLa und IHKE ist die Herunterregulation effektiver als in der Affenzelllinie BSC1.

**B:** HeLa-Zellen wurden mit siRNA gegen GFP (Kontrolle) und einzelne CLC-Isoformen transfiziert und an Tag 3 wie für A beschrieben behandelt. Entsprechende Abschnitte der Blots wurden mit Antikörpern gegen Clathrin schwere Kette (CHC), Tubulin (T) und Clathrin leichte Kette (CLC) entwickelt.

Die Herunterregulation der CLC einzeln führt zu starkem Verlust der CHC.

Der isoformspezifische „knock down“ von LCA bzw. LCB zeigt in beiden Fällen gleichermaßen einen drastischen Effekt auf die Expression der Clathrin schweren Kette. (Abbildung 3.3 B, Spur LCA und LCB). Allerdings zeigt sich in in der Spur „LCA“, in der die Isoform A herunterreguliert sein sollte keine, Veränderung der CLC-Bande im

Westernblot. Im Gegensatz dazu ist die Bande im „Isoform-B-knock down“ vollständig verschwunden. Dies lässt sich mit der Eigenschaft des Antikörpers R461 erklären, der wesentlich besser an LCB als an LCA bindet (Abbildung 3.1 A)

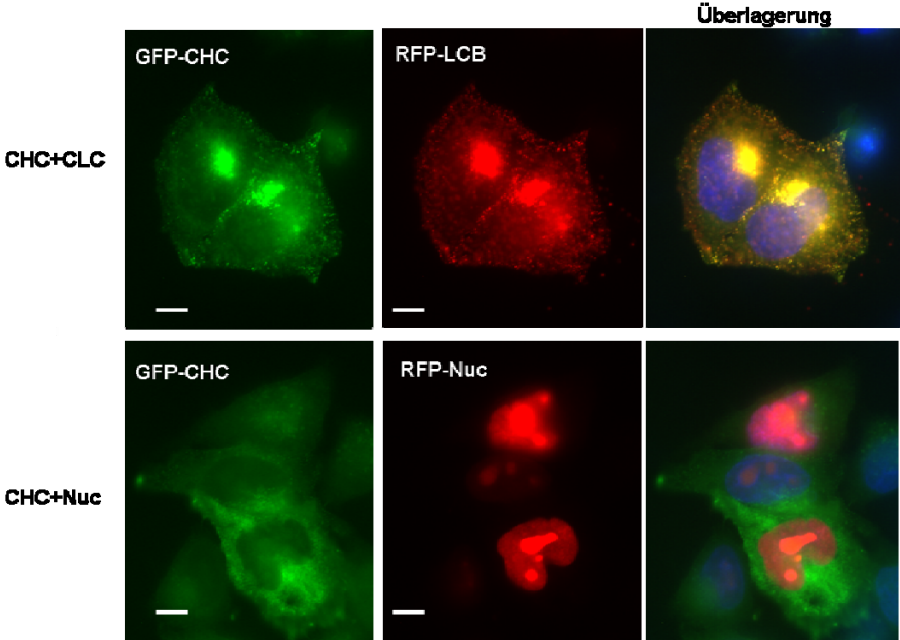
Bei der Herunterregulierung im isoformspezifischen „knock down“ zeigt sich für beide Formen der gleiche Effekt auf die schwere Kette. Damit kann als sicher gelten, dass auch die Herunterregulation der LCA, sowie der LCB erfolgreich war. Vergleicht man die Ergebnisse aus Abbildung 3.2 mit 3.3 so zeigt sich, dass die unvollständige Depletion der CLC zu einem stärkeren Verlust der CHC führt als der schnelle und vollständige. Dabei scheint es gleichgültig zu sein, ob beide Isoformen gleichzeitig nur unvollständig herunterreguliert wurden, oder eine von beiden Formen quantitativ verschwunden ist.

Die einmalige Transfektion von CLC-siRNA hat die simultane Abnahme von Clathrin leichter und schwerer Kette zur Folge (Abbildung 3.2 A+C). Die Verminderung der CLC im Clathrin schwere Ketten „knock down“ ist im Vergleich zur Kontrolle weniger ausgeprägt.

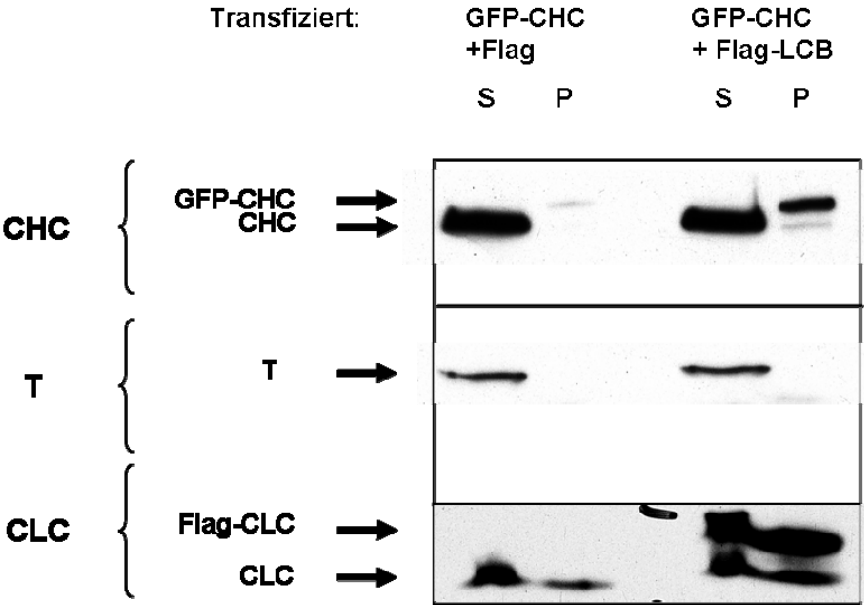
Um den Einfluss der leichten Ketten auf die Stabilität der schweren Kette unter anderen Bedingungen zu untersuchen wurde als methodischer Gegenentwurf zur Herunterregulation der Expression der Clathrin leichten Ketten deren Überexpression analysiert. GFP-LC sind als klassische Reporter für Clathrin in der lebenden Zelle etabliert. Der Einfluss der CLC auf die Stabilität der schweren Kette kann durch die Kotransfektion von Clathrin schwerer und leichter Kette in der lebenden Zelle untersucht werden. Im Folgenden (Abbildung 3.4 A) wurde ein bereits in der Literatur beschriebenes GFP-CHC-Konstrukt (Royle et al. 2005) verwendet. Die DNA der CHC wurde je äquimolar mit einem RFP-LCB-Konstrukt, oder zur Kontrolle mit einem RFP-Nuc-Konstrukt kotransfiziert. Letzteres zeichnet sich durch wiederholte Kernlokalisationssequenzen aus (Nuc), was zu einer vollständigen Lokalisation des RFPs im Zellkern führt. Der Vergleich beider Transfektionen zeigt, dass zum Einen die Expressionseffizienz der GFP-CHC in Kotransfektion mit der RFP-LCB deutlich höher lag als bei der Kontrolle, bei der keine CLC mit überexprimiert wurde. Zum Anderen scheint die schwere Kette allein in ihrer Lokalisation wesentlich diffuser als mit der leichten Kette zusammen (Abbildung 3.4 A).

Abbildung 3.4

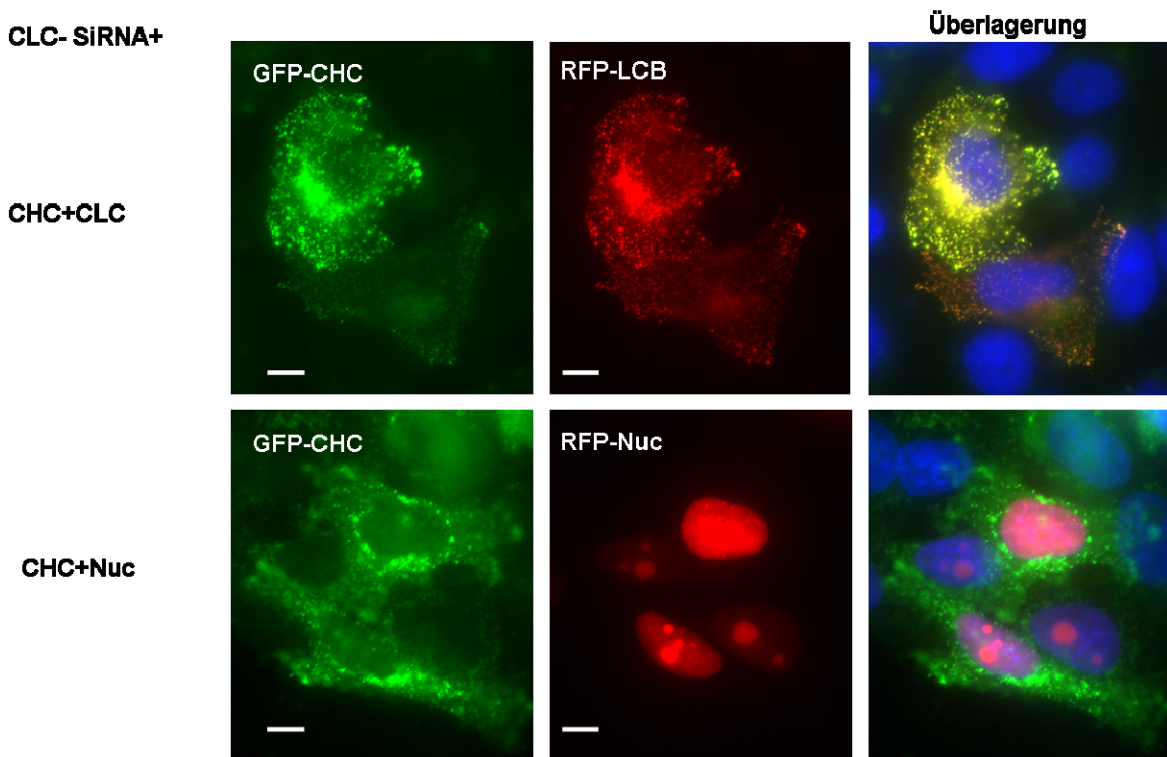
**A**



**B**



### C



**Abbildung 3.4 Analyse der Koexpression von Clathrin schwerer und leichter Kette.**

**A:** HeLa-Zellen wurden mit äquimolaren Mischungen der Plasmide kodierend für GFP-CHC/RFP-LCB und GFP-CHC/RFP-Nuc transfiziert und 24 Stunden später lichtmikroskopisch analysiert. GFP-CHC erscheint stärker exprimiert in Gegenwart der RFP-LCB.

**B:** Immunpräzipitation von überexprimiertem Clathrin: Analyse der Koexpression von Clathrin schwerer und leichter Kette. HeLa-Zellen wurden mit äquimolaren Mischungen der Plasmide kodierend für GFP-CHC/Flag-LCB und GFP-CHC/Flag transfiziert und 24 Stunden später lysiert. Anschließend wurde eine Immunpräzipitation gegen GFP durchgeführt. Jeweils neben dem Überstand (s) ist das präzipitierte Material (p) aufgetragen. Die Proben wurden im Westernblot analysiert und mit Antikörpern gegen Clathrin schwere Kette (CHC), Tubulin (T) und Clathrin leichte Kette (CLC) entwickelt. In Gegenwart von Flag-LCB wird deutlich mehr GFP-CHC präzipitiert. Es wird auch endogene CHC zusammen mit GFP-CHC präzipitiert.

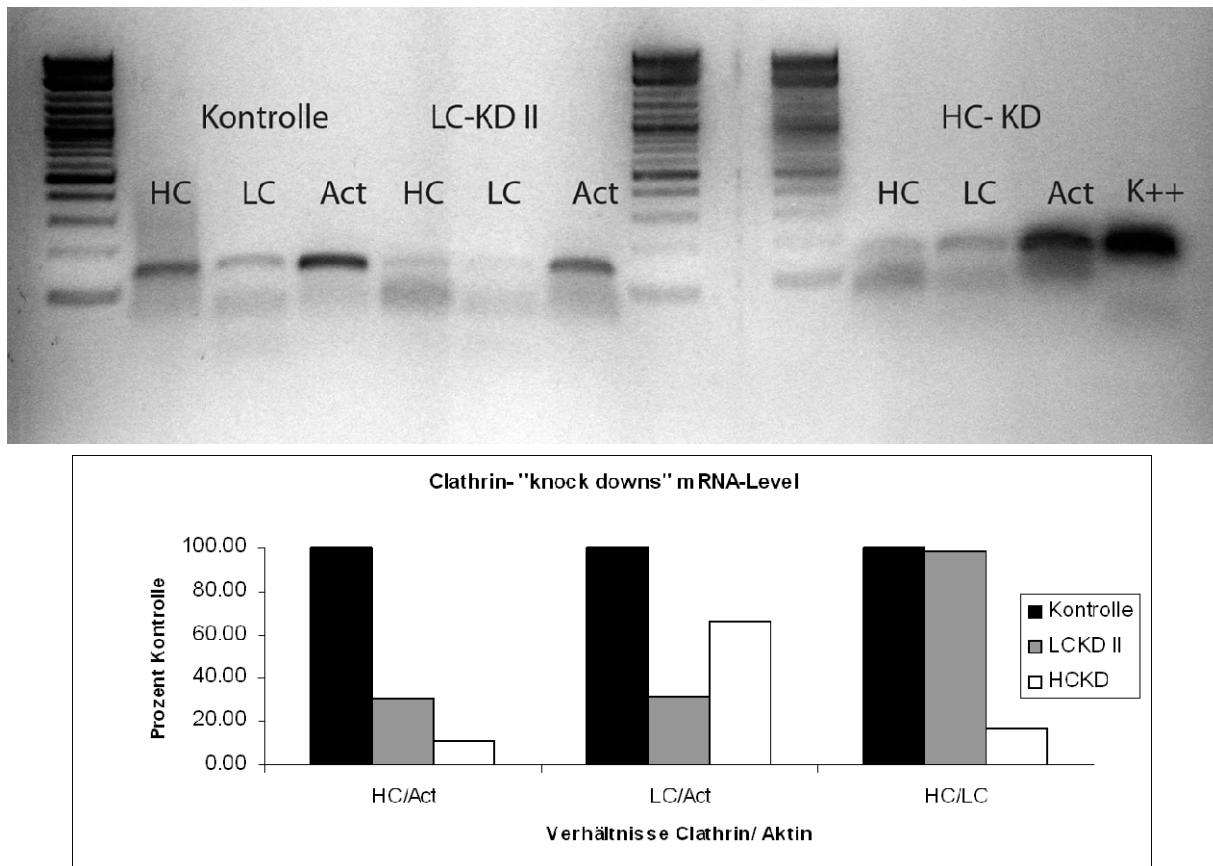
**C:** HeLa-Zellen wurden mit siRNA gegen CLC transfiziert (Protokoll 2) und an Tag 2 mit äquimolaren Mischungen der Plasmide codierend für GFP-CHC/ RFP-LCB und GFP-CHC/RFP-Nuc erneut transfiziert. Die Zellen wurden 24 Stunden später (Tag 3) lichtmikroskopisch analysiert. Das Expressionsmuster der GFP-CHC erscheint gröber in Zellen ohne endogene CLC.

Um den Einfluss der leichten Kette auf die Expression der schweren Kette in der Überexpression biochemisch zu charakterisieren, wurde das GFP-CHC-Konstrukt mit und ohne CLC koexprimiert. Die Zellen wurden lysiert und eine Immunpräzipitation gegen GFP durchgeführt. Zur Expression der Clathrin leichten Kette wurde statt des RFP-LCB-Konstrukts ein Flag-LCB-Konstrukt verwendet, da der für die Präzipitation verwendete Antikörper neben GFP auch RFP bindet. Zur Kontrolle wurde GFP-CHC mit dem Flag-Leervektor kotransfiziert. In Abbildung 3.4 B ist die Immunpräzipitation aus den beiden

Expressionsansätzen gegenübergestellt. In den jeweiligen Überständen (s) der Fällungen finden sich nicht gefällte endogene schwere Ketten (CHC), Tubulin (T) und endogene leichte Kette (CLC). Im Ansatz mit zusätzlich transfizierter Flag-LCB findet sich diese aufgrund ihrer Expression im Überschuss ebenfalls im Überstand. Aus den Bandenintensitäten der endogenen CHC und des Tubulins lässt sich ersehen, dass in etwa gleiche Mengen Zellmaterial zur Präzipitation eingesetzt wurden. Der Vergleich der beiden Präzipitate (GFP-CHC+Flag und GFP-CHC+Flag-LCB, jeweils Spur p) zeigt, dass zusammen mit der leichten Kette (mit „Flag-tag“), die ebenfalls kopräzipitiert wurde, wesentlich mehr schwere Kette isoliert wurde, als ohne kotransfizierte leichte Kette. Mit der geringen Menge an schwerer Kette, die ohne Flag-LCB präzipitiert wurde, wurden auch endogene leichte Ketten gefällt. Auf Grund der Bedingungen unter denen die Präzipitation durchgeführt wurde, kann ausgeschlossen werden, dass Clathrinaggregate mit gefällt wurden (siehe Abschnitt 2 „Immunpräzipitation“). Somit ist die im zweiten Ansatz (mit leichter Kette) ebenfalls gefällte endogene schwere Kette (CHC) zu sehen. Das lässt den Schluss zu, dass Triskelia gefällt wurden, die aus rekombinanten GFP-CHC und endogenen CHC bestehen. Der deutliche Überschuss an rekombinanter GFP-schwerer Kette lässt sich durch die erfolgreiche Überexpression erklären. In Abbildung 3.4 C wird die Überexpression der schweren Kette ohne den Hintergrund der endogenen leichten Ketten dargestellt CLC-„knock down“. Bemerkenswert ist hier die aberrante Verteilung der GFP-schweren Kette im Bereich des Golgi-Apparats in Abwesenheit jeglicher leichter Ketten. Die vorgestellten Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Expression der Clathrin schweren Kette von der der leichten Kette abhängt. Dieses gilt sowohl bei der Herunterregulation des Expressionsniveaus der CLC (Abbildung 3.1 - 3.3) als auch für die Überexpression (Abbildungen 3.4). Aus dem letzten Experiment lässt sich schließen, dass der regulatorische Einfluss der leichten Kette entweder auf Proteinebene oder auf der Ebene der mRNA (im kodierenden Bereich) vorliegen muss. Während für den Einfluss der Clathrin leichten Kette auf die Stabilität der Triskelia bereits *in vitro*-Daten vorliegen (Ybe et al. 2007), wurde der regulatorische Einfluss der CLC auf RNA-Ebene bisher noch nicht untersucht. Zur Charakterisierung der Expression von Clathrin mRNA wurden HeLa-Zellen wie in den vorangegangenen Experimenten mit siRNA gegen die Clathrin leichten Ketten transfiziert. Ausserdem wurden neben der Kontrolltransfektion ebenfalls Zellen mit siRNA gegen die Clathrin schwere Kette transfiziert (siehe Hinrichsen et al. 2003). Nach 72 Stunden wurden die Zellen geerntet, gezählt und jeweils in gleicher Zahl für die Aufarbeitung der RNA eingesetzt. Aus der totalen RNA wurde mittels reverser Transkription cDNA hergestellt, die als Template für analytische PCR verwendet wurden. Als

interne Kontrolle wurde jeweils die Menge an Aktin-mRNA bestimmt. Die Bandenintensitäten der Clathrin leichten und schweren Kette wurden mit diesem Standard verglichen. Als Kontrolle für die Effektivität der PCR wurde ein zuvor klonierter cDNA-Klon der Clathrin schweren Kette Isoform 17 verwendet, dessen Molarität photometrisch bestimmt wurde.

**Abbildung 3.5**



**Abbildung 3.5 mRNA-Expression von Clathrin:**

Elektrophoretische Analyse der mRNA-Niveaus nach Herunterregulierung der Clathrin leichten oder schweren Ketten in HeLa, zweimal (Protokoll 2) in 48 Stunden mit siRNA gegen CLC (LCKD II), bzw einmal mit siRNA gegen CHC (HCKD) transfiziert und am angegebenen Zeitpunkt aufgearbeitet. Für die Aufreinigung der RNA aus den geernteten Zellen wurde jeweils die gleiche Zellzahl geerntet. Nach reverser Transkription der mRNA wurden die Niveaus von Clathrin schwerer (HC) und leichter (LC) mRNA und als Kontrolle die mRNA von Aktin (Act) mittels PCR bestimmt. Die Werte für die Clathrin-mRNA wurden jeweils relativ zum Niveau der Kontrolle ausgedrückt. Als Kontrolle für die Effektivität der PCR wurde ein zuvor klonierter cDNA-Klon der Clathrin schweren Kette Isoform 17 verwendet (K<sup>++</sup>). Bei der Herunterregulierung der mRNA der Clathrin leichten Ketten durch siRNA (LCKD II) fällt auf, dass das Niveau der mRNA der Clathrin schweren Kette ebenfalls stark abnimmt (graue Balken). Bei der Depletion der Clathrin schweren Kette hingegen, sinkt das Niveau der CLC-mRNA im Verhältnis zur Clathrin schweren Kette nicht so weit ab (weiße Balken) Es zeigt sich, dass die Expression der Clathrin schweren Kette auf der mRNA- Ebene von der Expression der Clathrin leichten Ketten abhängt.

Wie in Abbildung 3.5 zu erkennen ist die Effektivität der Nachweis-PCR für die Clathrin leichte und schwere Kette und für Aktin unterschiedlich. Betrachtet man die ersten drei Banden von links (Kontrolle) so ist die Bande die Aktin repräsentiert am intensivsten, diejenige die die leichte Ketten mRNA repräsentiert am schwächsten. Die Auswertung der Banden erfolgte daher, nach der densitometrischen Bestimmung jeweils relativ zur Intensität der Aktinbande. Die so durch Korrelation erhaltenen Kontrollwerte für die mRNA von schwerer und leichter Kette (HC,LC) wurden als Bezugspunkt für die Änderung in den anderen Ansätzen (CLC-„knock down“ - LCKD II und CHC-„knock-down“ - HCKD) verwendet. Die Optimierung der PCR-Bedingungen erfolgte iterativ im Vergleich zur PCR-Kontrolle. Die vorliegenden Daten wurden aus drei unabhängigen PCR-Ansätzen mit jeweils neu generierter cDNA gewonnen. Um die Ergebnisse statistisch abzusichern wäre eine Quantitative PCR im „Light-Cycler“ unter Verwendung von SYBR-Green notwendig. Die vorliegenden Daten sind daher als gesichert reproduziert aber als halb-quantitativ anzusehen. Die im Balkendiagramm repräsentierten relativen Bandenintensitäten sollen das darüber im Gel dargestellte Ergebnis graphisch verdeutlichen:

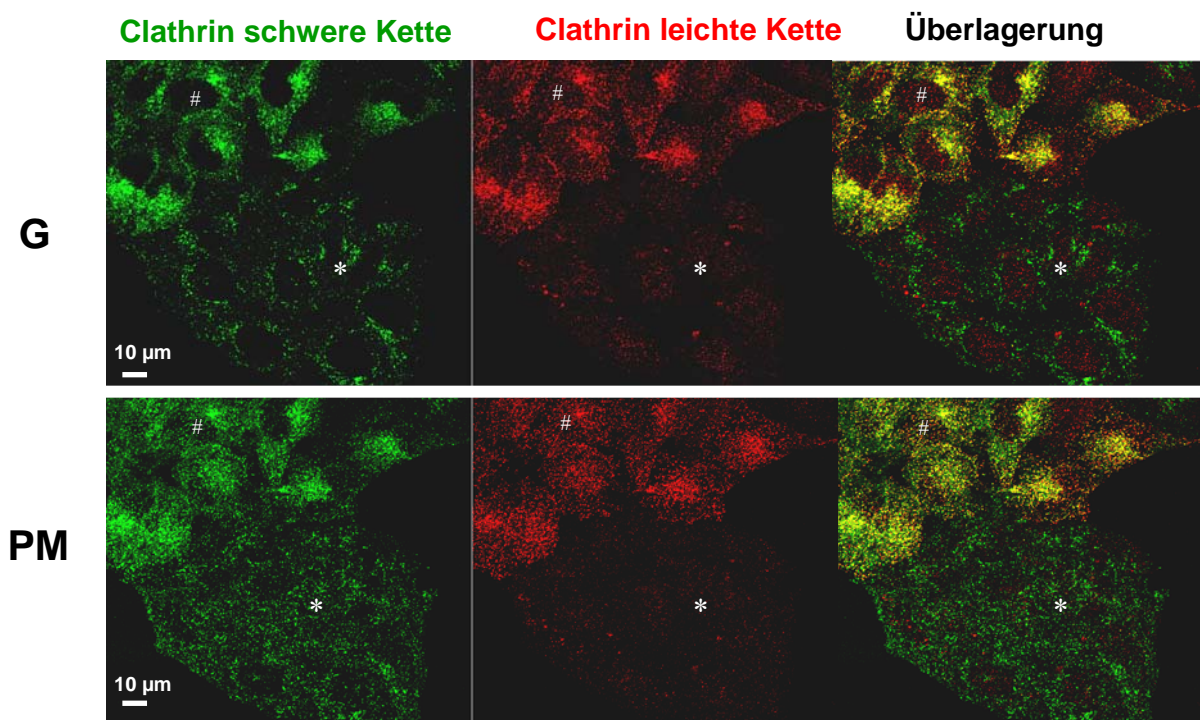
Im Vergleich zur Kontrolle nimmt die mRNA der Clathrin leichten Ketten bei Transfektion von siRNA gegen die leichten Ketten erwartungsgemäß ab (graue Balken). Gleichzeitig wird das Niveau der mRNA der Clathrin schweren Kette ebenfalls reduziert, was mit dem auf Proteinebene ebenfalls beobachteten Phänotyp (Abbildung 3.1 - 3.3) korreliert. Die Expression der Clathrin schweren Kette wird reduziert, weil das Niveau der entsprechenden mRNA sinkt.

Die Transfektion von siRNA gegen die Clathrin schwere Kette hat ebenfalls den erwarteten Effekt des Verlustes der mRNA der Clathrin schweren Kette (weiße Balken). Das Niveau der Clathrin leichte Ketten-mRNA sinkt in diesem Fall jedoch relativ wenig, verglichen mit dem Fall des leichte Ketten „knock-downs“. Betrachtet man das jeweilige Verhältnis der relativen Mengen der mRNA von schwerer und leichter Kette so fällt auf, dass im Fall der Herunterregulierung der leichten Kette das Verhältnis konstant bleibt, die schwere Kette also der leichten „folgt“. Umgekehrt wird das Verhältnis im Fall der Depletion der schweren Kette kleiner, was bedeutet, dass die Expression der leichten Kette nicht in dem Maße abnimmt wie die der schweren.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Expression der Clathrin schweren Kette von der der leichten Kette abhängt. Diese Abhängigkeit besteht sowohl auf Protein, als auch, wie eben gezeigt, auf mRNA-Ebene.

Die eindeutige Darstellung der Regulation der Expression der Clathrin schweren Kette durch die leichte Kette mit biochemischen und molekularbiologischen Nachweismethoden sollte parallel auch immunhistochemisch erfolgen. Hierzu wurden zu den auf Deckgläschen ausgesäten, transfizierten Zellen 24 Stunden nach der letzten Transfektion (Tag 2) Kontrolltransfizierte Zellen hinzugegeben. Die am Tag 2 durch Zugabe der Kontrollzellen zu denen mit „knock down“ gemischten Zellen wurden 24 Stunden später, am Tag 3, fixiert und durch Anfärbung mit Antikörpern gegen die Clathrin schwere Kette und die Clathrin leichte Kette analysiert. Die Präparate wurden mit dem konfokalen Lasermikroskop untersucht. Beim Betrachten der Zellen fiel auf, dass an der ventralen Plasmamembran, mit der die Zellen am Substrat (Deckgläschen) haften, die Menge der Clathrinstrukturen (schwere Kette, grün) nicht signifikant abgenommen hatte (Abbildung 3.6, PM).

**Abbildung 3.6**



**Abbildung 3.6 Immunfluoreszenzanalyse CLC-depletierter HeLa-Zellen:**

Die Zellen wurden nach Protokoll 2 mit siRNA gegen beide Isoformen der Clathrin leichten Ketten transfiziert(\*). Zur Kontrolle wurden Kontrollzellen (#), die mit einer Kontroll-siRNA transfiziert wurden, hinzugefügt. Am dritten Tag nach der ersten Transfektion wurden die Zellen mit PFA fixiert und mit Antikörpern gegen Clathrin schwere Kette (X22) und Clathrin leichte Kette (R46X) gefärbt. Die Aufnahmen wurden mit einem konfokalen Lasermikroskop erstellt. Es wurde auf zwei Bereiche der Zelle fokussiert: Zum einen die Plasmamembran (PM) und zum anderen die Golgiregion (G). Beim Vergleich von Kontrollzellen (#) und solchen mit herunterregulierter CLC-Expression (\*) fällt auf, dass zusammen mit den leichten Ketten auch Clathrin schwere Kette, vornehmlich im perinukleären Bereich, verloren geht.



Im Gegensatz dazu fällt bei den perinukleären Bereichen auf, dass besonders die in den Kontrollzellen gut ausgeprägte Konzentrierung von Clathrin in der Golgi-Region stark reduziert ist (G). Ein möglicher Grund für diese Änderung könnte die Veränderung der Organisation des TGN im Zusammenhang mit der Reduktion und Umverteilung der schweren Kette sein. Der direkte Vergleich von Kontrollzellen (#) und solchen mit stark reduziertem Niveau an leichten Ketten (\*, rote Färbung) zeigt, dass die schwere Kette (grüne Färbung) weniger im Bereich der Plasmamembran verloren gegangen ist, sondern vielmehr im Bereich des Golgi-Apparats.

### **Clathrinabhängige Morphologie des Trans-Golgi-Netzwerks (TGN)**

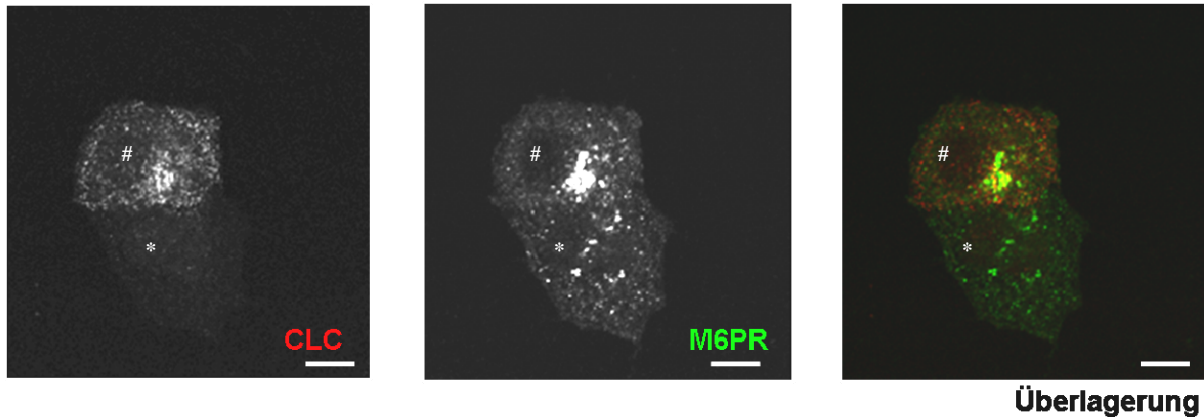
Im vorangegangenen Abschnitt konnte gezeigt werden, dass die Clathrin leichten Ketten einen regulativen Einfluss auf die Expression der Clathrin schweren Kette haben.

Im Weiteren soll nun genauer geklärt werden, wie sich die subzelluläre Verteilung des Clathrins ohne leichte Ketten verändert und welche Auswirkungen dies auf den clathrinabhängigen, vesikulären Transport hat. Wie bereits in Abbildung 3.6 zu erkennen, folgt der Depletion der CLC eine Verringerung der Expression und Umverteilung der Clathrin schweren Kette. Besonders betroffen hiervon ist die perinukleäre Region in der sich das Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) befindet. Die Bildung von Vesikeln im TGN ist clathrinabhängig, weshalb morphologische Veränderungen in diesem Bereich der Zelle zu erwarten wären, wenn die Expression und Funktionalität von Clathrin beeinträchtigt werden. Wie bei Poupon et al. 2008 beschrieben, hat die Depletion der Clathrin leichten Ketten einen Effekt auf den Golgi-Apparat und das endosomale Kompartiment, was unter anderem durch Umverteilungen des Mannose-6Phosphat-Rezeptors (M6P-Rezeptor), sowie des Adaptorproteins 1 (AP1) ersichtlich wurde. Zur weiteren Untersuchung des Effektes der Reduzierung der CLC-Expression in HeLa-Zellen wurden Zellen mit CLC-siRNA oder Kontroll-siRNA transfiziert und mittels Immunfluoreszenz analysiert. Die folgenden Ergebnisse wurden in mindestens drei unabhängigen Experimenten bestätigt.

In Abbildung 3.7 ist die Änderung der Verteilung des M6PR nach Reduzierung der CLC in der Zelle zu erkennen. In der Regel konzentriert sich der Hauptanteil des M6P-Rezeptors auf den perinukleären Bereich der Zellen. Neben dieser Verteilung befindet sich der Rezeptor auf gleichmäßig über die Zelle verteilte Strukturen. In den Zellen, die mit siRNA gegen CLC transfiziert wurden, zeigt sich ein anderes Bild: Die perinukleäre Konzentrierung des M6P-

Rezeptors ist in den meisten Zellen verschwunden, und stattdessen verteilt sich der Rezeptor in Membranstrukturen unterschiedlicher Größe.

**Abbildung 3.7**

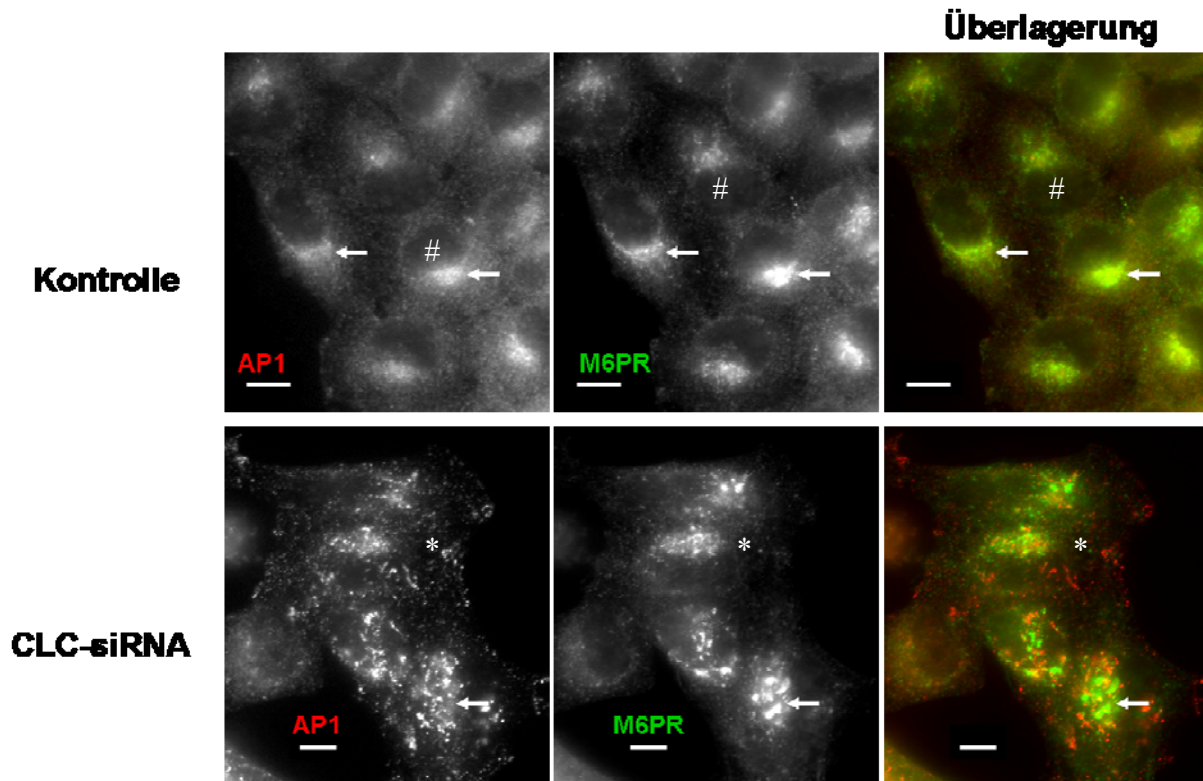


**Abbildung 3.7: Effekt der Herunterregulation der Clathrin leichten Ketten auf die Verteilung des Mannose-6-Phosphatrezeptors (M6P-Rezeptor).** Die Zellen wurden zweimal mit CLC-spezifischer siRNA transfiziert und nach 48 Stunden mit Kontrollzellen vermischt. Die Immunfluoreszenzanalyse erfolgte weitere 24 Stunden später. Es wurden ein monoklonaler Antikörper gegen die leichten Ketten und ein polyklonaler Antikörper gegen den M6P-Rezeptor verwendet. Zu beachten ist die breitere Verteilung des Rezeptors in Abwesenheit der Clathrin leichten Ketten (\*) Vergleich zum kompakten Verteilung in den Kontrollzellen(#). Maßstabsbalken: 10µm

Es ist anzumerken, dass der Phänotyp der M6P-Rezeptor -Verteilung unter den verwendeten experimentellen Bedingungen nicht einheitlich war. Tatsächlich zeigte sich, dass die inhomogene Verteilung des Mannose-6-Phosphatrezeptors nach Depletion der CLC vergrößert wurde, wenn die Zellen von ihrer Unterlage abgelöst und neu ausgesät werden. Um dieses Problem zu lösen, wurden für die im Folgenden dargestellten Ergebnisse siRNA-transfizierte Zellen nicht mit Kontrollzellen gemischt. Als nächstes wurde die Verteilung des Clathrinadaptors im CLC-„knock-down“ genauer untersucht. AP1 hat eine zentrale Rolle im Vesikelverkehr zwischen TGN und den Endosomen inne. Wie in Abbildung 3.8 zu sehen ist, verteilt sich das AP 1 (rot) in Kontrollzellen so, wie es bisher vielfach beschrieben wurde (Pfeile, Hinrichsen et al. 2003). Der Adaptor AP1 kolokalisiert deutlich mit dem M6P-Rezeptor (grün) und zeigt teils eine stark konzentrierte, teils eine eher lockere Verteilung im perinukleären Bereich. Im Vergleich hierzu zeigt sich ohne Clathrin leichte Ketten eine deutliche Änderung in der AP1-Verteilung (untere Reihe, Abbildung 3.8). Ähnlich wie im Fall des M6P-Rezeptors verteilt sich AP1 im „CLC-knock down“ über die ganze Zelle und bildet dabei größere Strukturen. Vor dem Hintergrund des in der Kontrolle sehr einheitlichen

Phänotyps ist die Verteilung des AP1 in etwa 80% der CLC depletierten Zellen deutlich zu erkennen.

**Abbildung 3.8:**



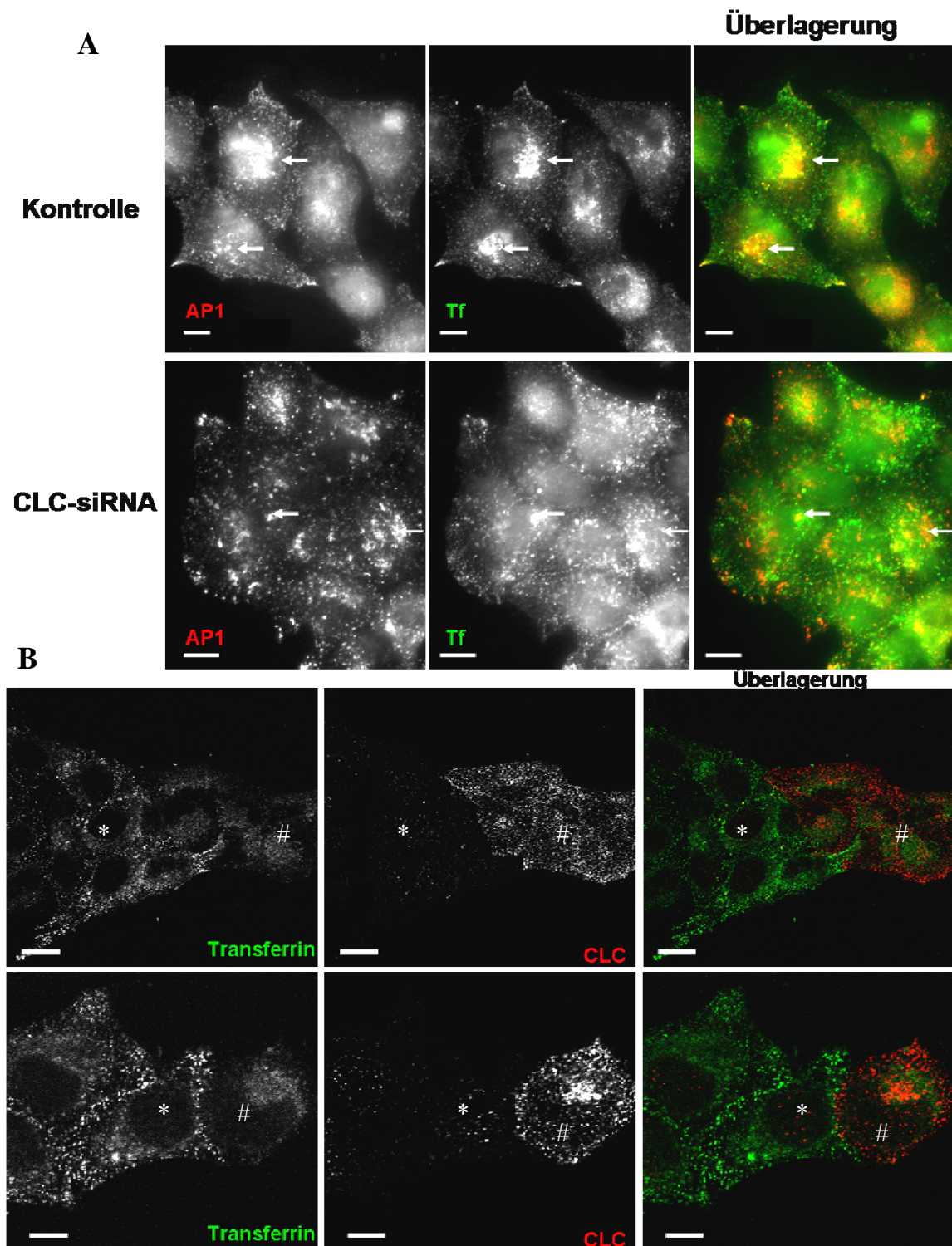
**Abbildung 3.8: Effekt der Depletierung der Clathrin leichten Ketten auf die Verteilung des Mannose-6-Phosphatrezeptors (M6P-Rezeptor) im direkten Vergleich mit AP1.**

Die Zellen wurden zweimal mit CLC-spezifischer siRNA transfiziert und nach 72 Stunden fixiert. Es wurden ein monoklonaler Antikörper gegen AP 1 (20D6) und ein polyklonaler Antikörper gegen den M6P-Rezeptor verwendet. Zu beachten ist die Umverteilung des Rezeptors und des Adaptors bei gleichzeitiger Verringerung ihrer Kolokalisation bei Abwesenheit der Clathrin leichten Ketten (\*). Im Vergleich hierzu die kompakte Kolokalisation in den Kontrollzellen(#). Maßstabsbalken: 10µm

Die Kolokalisation von AP1 und M6P-Rezeptor ist deutlich reduziert und nur noch vereinzelt klar zu erkennen (Pfeile). Zum Vergleich hierzu wurde die CLC-abhängige Verteilung des Transferrinrezeptors (Tf-Rezeptor) bestimmt. Zu diesem Zweck wurden Zellen, die mit Kontroll-siRNA bzw. CLC-siRNA transfiziert wurden, mit grün fluoreszierendem Transferrin, dem Liganden des Tf-Rezeptors, für 10 Minuten bei 37°C inkubiert und dann immunhistochemisch gegen AP1 gefärbt. Wie in Abbildung 3.9 A zu erkennen, findet sich Transferrin (grün), von dem auszugehen ist, dass es an den Rezeptor gebunden mit diesem kolokalisiert, konzentriert im perinukleären Bereich. Hier ist in den Kontrollzellen (#) die Kolokalisation zwischen AP1 und Tf-Rezeptor am stärksten ausgeprägt, jedoch nicht

vollständig (Pfeile). Im Gegensatz dazu findet sich in der Peripherie der Zellen Transferrin, welches nicht mit AP1 (rot) kolokalisiert. Nach der Herunterregulation der Clathrin leichten Ketten (\*) verändert sich, wie schon beschrieben, die Lokalisation des AP1 in die zum einen breitere Verteilung. Ebenfalls aufgelöst scheint die perinukleäre Konzentrierung des Transferrins, wobei wiederum jeweils nur ein geringer Teil der Strukturen mit AP1 überlappt.

Abbildung 3.9



**Abbildung 3.9: Effekt der Depletierung der Clathrin leichten Ketten auf die Verteilung des Transferrinrezeptors (Tf-Rezeptor) und die Endozytose von Transferrin.**

**A:** Die Zellen wurden zweimal mit CLC-spezifischer siRNA transfiziert und nach 72 Stunden für 10 Minuten mit 20µg/ml grün fluoreszierendem Transferrin bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde in der Immunfluoreszenzanalyse ein monoklonaler Antikörper gegen AP 1 verwendet. Zu beachten ist die breitere Verteilung des Rezeptors und des Adaptors bei gleichzeitiger geringer Kolo-kalisation bei Abwesenheit der Clathrin leichten Ketten (\*) Im

Gegensatz hierzu steht die kompaktere teilweise Kollokalisierung in den Kontrollzellen(#). Maßstabsbalken: 10µm

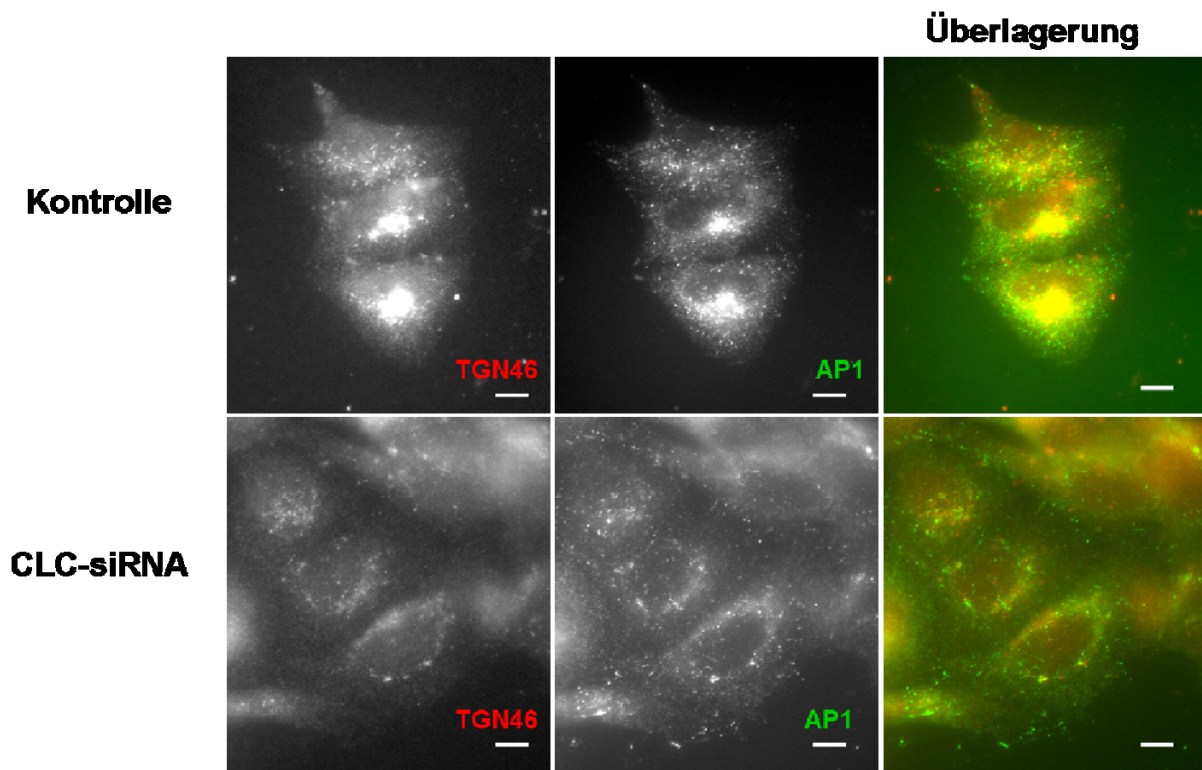
**B:** Endozytose von Transferrin unter limitierenden Bedingungen. Kontroll- und CLC-„kock-down“- Zellen wurden im Verhältnis 1:1 gemischt ausgesät. Nach 72 Stunden erfolgte die Endozytose von Transferrin bei 22°C für 60 Sekunden. Die fixierten Zellen wurden gegen die Clathrin leichte Kette gefärbt (rot). Es fällt auf, dass CLC-depletierte Zellen mehr Transferrin endozytiert haben, als Kontrollzellen. Obere Bildreihe Übersicht, Maßstabsbalken 10µm. Untere Reihe Detailansicht, Maßstabsbalken 20µm.

Die Analyse der Endozytose von Transferrin bei 37°C zeigte keine quantitative Änderung der Endozytose in Abhängigkeit zu den leichten Ketten (Daten nicht gezeigt). Dies steht im Einklang mit bisherigen Publikationen. Da die Endozytose von Transferrin in HeLa bei 37°C sehr schnell und effizient geschieht, wurden die Parameter zur Internalisierung so gewählt, dass die Endozytose limitiert abläuft. Dies ist bei 22°C und kurzen Zeiträumen (60 Sekunden) der Fall (Keen et al. 2008). Überraschender Weise endozytieren CLC-depletierte Zellen unter diesen Bedingungen mehr Transferrin als Kontrollzellen (Abbildung 3.9 B). Das Transferrinsignal ist in Zellen ohne leichte Ketten (\*) deutlich stärker, als in Kontrollzellen (#). Da die Zellen gemischt wurden und in den Aufnahmen in unmittelbarer Nachbarschaft liegen, können Färbeartefakte ausgeschlossen werden. Des Weiteren wurde bei der Analyse der Immunfluoreszenzen darauf geachtet, dass die gewerteten Zellen vergleichbar in ihrer Ausdehnung und in Zahl und Dichte der benachbarten Zellen waren. Wie auch im Fall des Mannose-6-Phosphat-Rezeptors (Abbildung 3.8) erscheinen die Transferrin-positiven Strukturen (grün) in CLC-depletierten Zellen gröber und breiter in der Zelle verteilt. Es zeigt sich, dass die anders geartete Verteilung der Rezeptoren und ihrer Fracht durch die Herunterregulation der CLC mit der des Clathrinadaptors AP1 einhergeht.

Der bisher dargestellte Einfluss der CLC-Depletion auf die Verteilung von AP1, des M6P- und des Transferrinrezeptors sind ein Hinweis darauf, dass in Abwesenheit der CLC der Vesikelverkehr im TGN signifikant beeinträchtigt ist. Daraus lässt sich der Schluss ziehen, dass die Morphologie des TGN-Kompartiments verändert ist. Um dies zu überprüfen wurde die Verteilung des TGN-Markers TGN 46 relativ zu AP1 analysiert.

Wie in Abbildung 3.10 zu erkennen ist, zeigen die Kontrollzellen eine typische Verteilung von AP1 und TGN46. Beide sind im perinukleären Bereich konzentriert und zeigen zusätzlich gleichmäßig über die Zelle verteilte vesikuläre Strukturen.

Abbildung 3.10



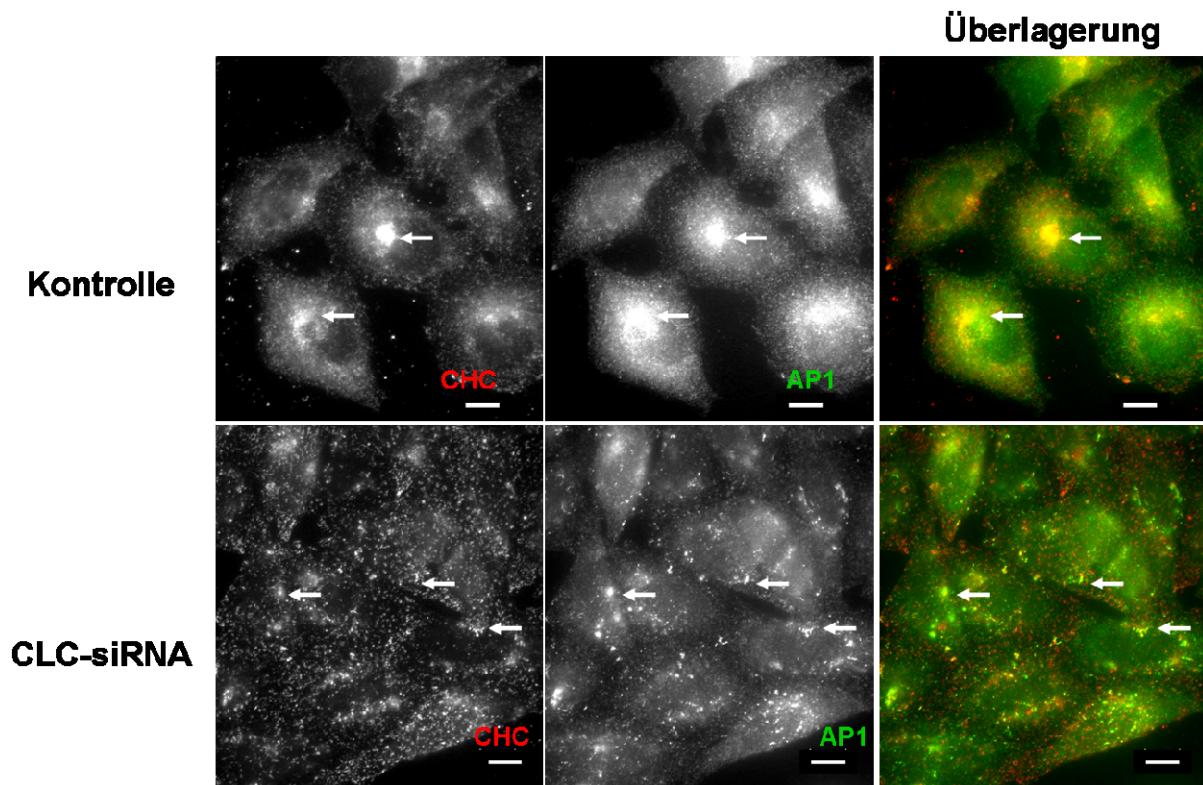
**Abbildung 3.10: Verteilung von TGN46 und AP 1 in Zellen ohne Clathrin leichte Ketten.**

Die Zellen wurden zweimal mit CLC-spezifischer siRNA transfiziert und nach 72 Stunden fixiert. Es wurden ein polyklonaler Antikörper gegen TGN46 und ein monoklonaler Antikörper gegen AP1 verwendet. Zu beachten ist die stark abweichende Lokalisation des TGN46 und des Adaptors bei Abwesenheit der Clathrin leichten Ketten. Die apparente Kolokalisation beider Proteine scheint verringert. Dies steht im Gegensatz zur kompakten Kolokalisation beider Proteine in Kontrollzellen. Maßstabsbalken: 10 $\mu$ m

Im Gegensatz zu den Kontrollzellen ist in CLC-Depletierten sowohl die Lokalisation von TGN46 als auch von AP1 stark verändert. Beide stellen sich als breit über die Zelle verteilt dar. Die in Kontrollzellen typische kompakte Kolokalisation der beiden Proteine im perinukleären Bereich ist aufgelöst. Daraus kann geschlossen werden, dass die Depletion der Clathrin leichten Ketten eine grundlegende Änderung in der Organisation des TGN bewirkt.

Wie ebenfalls bereits in Kapitel 3.1 beschrieben wurde, führt das Fehlen der Clathrin leichten Ketten zu einer Reduktion der Clathrin schweren Kette im Bereich des Golgi (Abbildung 3.6). Um die Veränderung von AP 1 und Clathrin schwerer Kette zu untersuchen, wurden Kontrollzellen und CLC-depletierte Zellen gegen beide Proteine simultan gefärbt (Abbildung 3.11). Die Doppelfärbung von AP 1 mit Clathrin schwerer Kette lässt im vorliegenden Fall, trotz des erhöhten Hintergrunds des polyklonalen Serums, Rückschlüsse auf die relative Verteilung der beiden Proteine in Abwesenheit der Clathrin leichten Ketten zu.

Abbildung 3.11



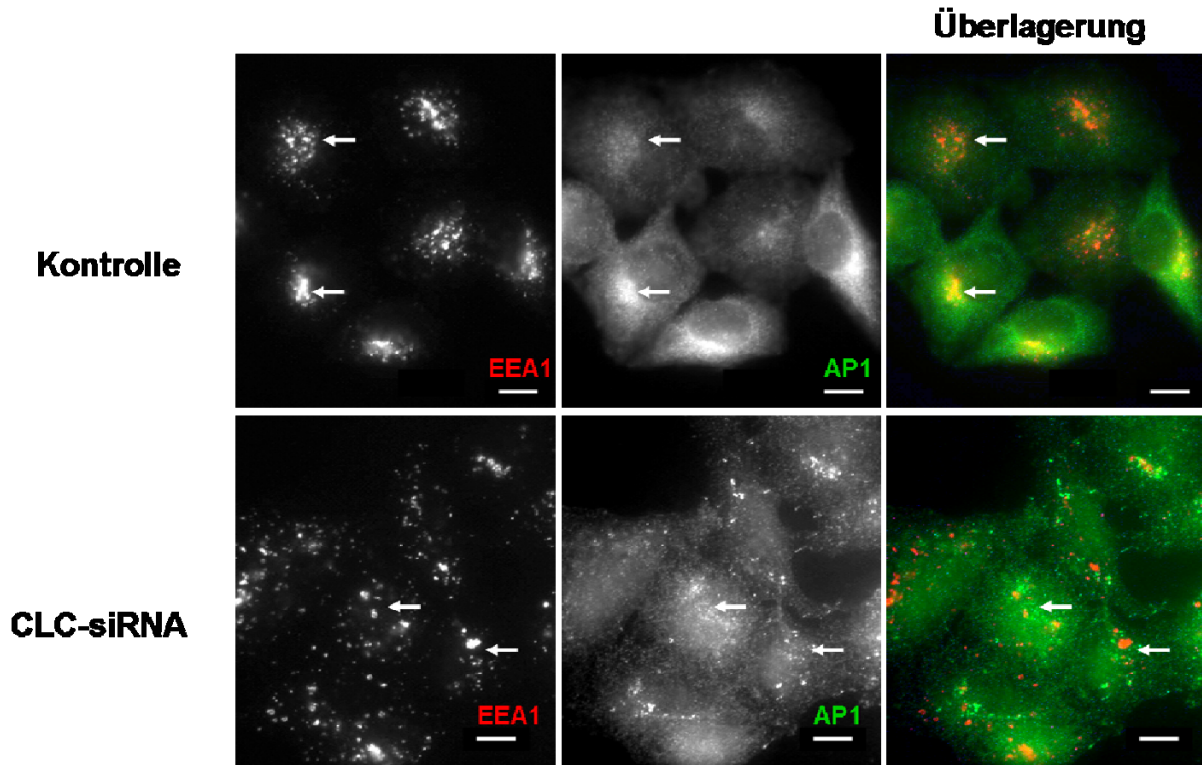
**Abbildung 3.11: Verteilung der Clathrin schweren Kette und AP 1 in Zellen ohne Clathrin leichte Ketten.** Die Zellen wurden zweimal mit CLC-spezifischer siRNA transfiziert und nach 72 Stunden fixiert. Es wurden ein polyklonaler Antikörper gegen AP1 und ein monoklonaler Antikörper gegen die Clathrin schwere Kette verwendet. Zu beachten ist die ausgedehntere Verteilung der Clathrin schweren Kette und des Adaptors bei gleichzeitiger hoher Kolo-kalisation in Zellen ohne Clathrin leichte Ketten. Im Gegensatz zur kompakten Kolo-kalisation beider Proteine in Kontrollzellen. Maßstabsbalken: 10µm

In Abbildung 3.11 ist zu erkennen, dass AP 1 (grün) und Clathrin schwere Kette (rot) besonders im Bereich des Golgi-Apparats in der Kontrolle gut miteinander kolo-kalisieren. In den mit siRNA gegen Clathrin leichte Kette behandelten Zellen lässt sich auch der bekannte Phänotyp der Umverteilung von AP 1 feststellen. Die Färbung der Clathrin schweren Kette zeigt, dass wie bereits in Abbildung 3.5 erkannt werden konnte, die Kompaktierung im perinukleären Bereich aufgelöst ist und nun vielmehr die schwere Kette wie auch AP1 in größeren Strukturen breiter über die Zelle verteilt vorliegen. Die Überlagerung zeigt, dass signifikante Anteile beider Proteine überlappen. Aus den Ergebnissen geht deutlich hervor, dass die Verteilung des AP1 die der Clathrin schweren Kette widerspiegelt. Hier stellt sich die Frage, ob das TGN eine andere Morphologie erhält, da Aktin nicht mehr den Transport im TGN unterstützt, oder ob AP1 jetzt vorwiegend an den Endosomen zu finden ist. Da Endosomen auch für den TF- und den M6P-Rezeptor wichtige Sortierungsstationen sind, lag es nahe zu prüfen, ob sich die Verteilung der Endosomen in Abwesenheit der Clathrin



lichten Ketten ändert. Hierfür wurden frühe Endosomen mit Hilfe des Organell spezifischen Markers EEA1 gefärbt.

**Abbildung 3.12**

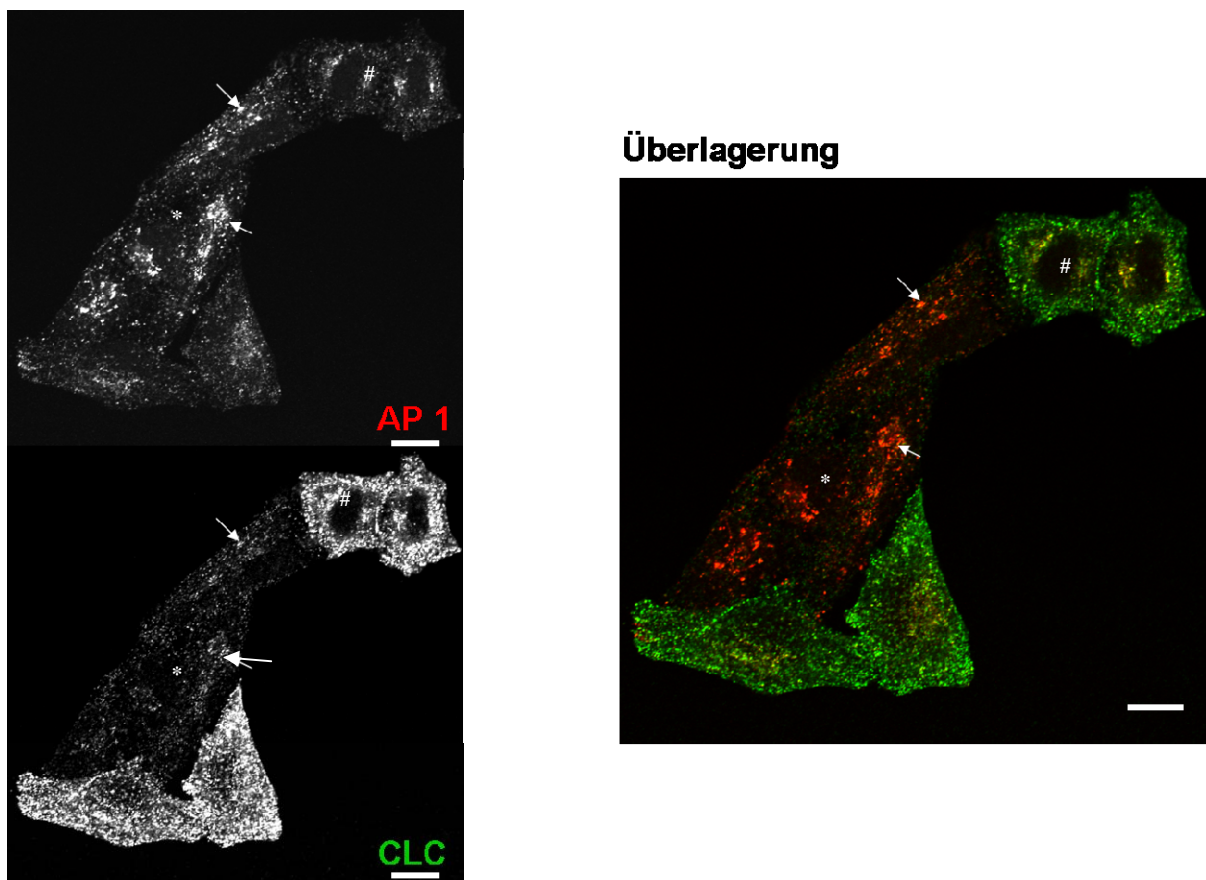


**Abbildung 3.12: Verteilung von EEA 1 und AP 1 in Zellen ohne Clathrin leichte Ketten.** Die Zellen wurden zweimal mit CLC-spezifischer siRNA transfiziert und nach 72 Stunden fixiert. Es wurden ein polyklonaler Antikörper gegen AP1 und ein monoklonaler Antikörper gegen EEA 1 verwendet. Zu beachten ist die weniger kompakte Verteilung von EEA 1 und AP 1 ohne Kolokalisation in Zellen ohne Clathrin leichte Ketten im Gegensatz zur kompakten Verteilung bei teilweiser Kolokalisation beider Proteine in Kontrollzellen. Maßstabsbalken: 10µm

Wie in den Kontrollzellen in Abbildung 3.12 zu erkennen ist, konzentriert sich der Großteil der EEA1-positiven Strukturen unterschiedlich dicht im perinukleären Bereich. So kommt es zu einer teilweisen Kolokalisation mit AP1 (Pfeile). In CLC-depletierten Zellen erscheint die EEA1-Färbung weniger kompakt und wie AP1 breiter verteilt. Allerdings findet sich in diesem Fall keine signifikante Kolokalisation der beiden Proteine. Da die Umverteilung des AP1 offensichtlich auch mit Veränderungen auf den Transport von Transferrin bzw. Mannose-6-Phosphat korreliert (Abbildungen 3.8 und 3.9, Poupon et al. 2007), sollte nun die Umverteilung von AP1 näher charakterisiert werden. Von den im perinukleären Bereich beobachteten Veränderungen in Zellen ohne Clathrin leichte Ketten erwies sich der Phänotyp der AP 1-Umverteilung (auch nach Ablösen und neu Aussäen der Zellen) als der robusteste.

In Einklang mit der „knock down“-Effizienz (siehe Abbildung 3.2) zeigten in der Regel etwa 80% der Zellen einer Population, die mit siRNA gegen Clathrin leichte Ketten transfiziert wurden, den selben Phänotyp (siehe z.B. Abbildung 3.8). Ausserdem konnte gezeigt werden, dass die im Bereich des Golgis verbliebene Clathrin schwere Kette die gleiche Verteilung zeigt wie AP1 (Abbildung 3.11). Zu diesem Zweck wurden Kontrollzellen zu Zellen mit herunterreguliertem Niveau an Clathrin leichten Ketten gegeben. Der direkte Vergleich von Kontrollzellen (#), neben „knock-down“-Zellen(\*) zeigt erneut die deutliche Veränderung der AP1-Verteilung (Abbildung 3.13).

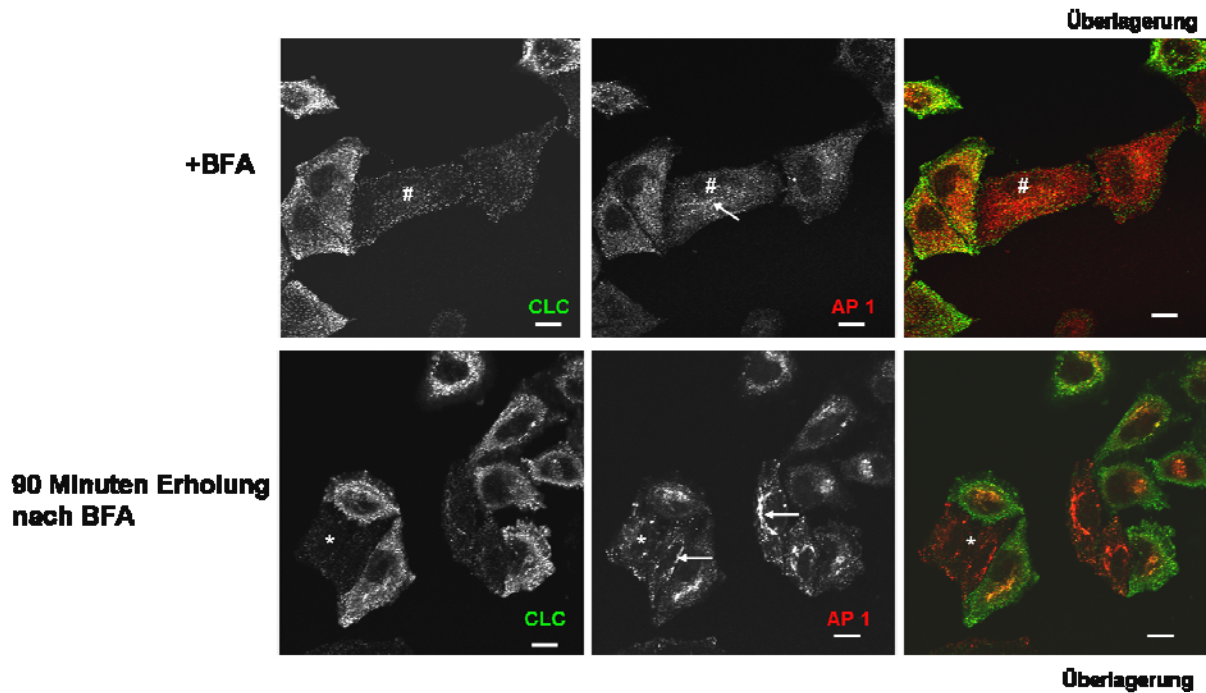
**Abbildung 3.13**



**Abbildung 3.13: Effekt der Depletion der Clathrin leichten Ketten auf die Verteilung von AP1.** Zu den Zellen wurden, wie nach doppelter Transfektion mit CLC-spezifischer siRNA einen Tag vor der Analyse Kontrollzellen gegeben. Die Immunfluoreszenzanalyse erfolgte durch Anfärben der Zellen mit einem monoklonalen AP 1-Antikörper und einem polyklonalen CLC-Antikörper (R461-11). Letzterer reagiert auch schwach mit der Clathrin schweren Kette (Pfeil). Zu beachten ist die deutliche Relokalisierung des AP1 in Abwesenheit der Clathrin leichten Ketten (\*) im Vergleich zu den Kontrollzellen (#). Die Restfärbung des polyklonalen Antikörpers kolokalisiert mit AP1 und kann mit großer Wahrscheinlichkeit der Clathrin schweren Kette zugeordnet werden. Maßstabsbalken: 20µm

Obwohl der hier für die Clathrinfärbung verwendete polyklonale Antikörper zwar schwach mit der schweren Kette kreuzreagiert, ermöglicht er dennoch problemlos die Identifizierung von CLC-depletierten Zellen. Die schwache Färbung der schweren Ketten korreliert wiederum mit denen in Rot dargestellten AP1-Strukturen. Dies kann als weitere Evidenz dafür gewertet werden, dass in Abwesenheit der Clathrin leichten Kette die Clathrin schwere Kette und AP1 gemeinsam umverteilt werden. Die AP1-Verteilung entspricht folglich der Verteilung der Clathrin schweren Kette im Bereich des Golgis auch bei fehlender leichter Kette. Zur weiteren Charakterisierung des Phänotyps der AP1-Umverteilung wurde nun das Verhalten der AP1-Strukturen unter Einfluss von Brefeldin A (BFA) untersucht. Diese Substanz verhindert durch die Inhibition der ARF1-GEFs (Guanidin-Echange-Faktoren des Adenosin-Ribosylierungsfaktors 1) selektiv die Bindung von ARF1 an TGN-Membranen. Mit diesem Experiment sollte geklärt werden, ob AP1 in den beobachteten groben Strukturen noch an PIP-4 gebunden ist und ob diese Bindung noch dynamisch, d.h. BFA-sensitiv ist. Hierfür wurden CLC-depletierte Zellen mit Kontrollzellen gemischt und 24 Stunden später 30 Minuten mit BFA inkubiert. Ein Teil der Zellen wurde anschließend mit Vollmedium ohne BFA 90 Minuten zur Erholung weiterinkubiert.

**Abbildung 3.14**

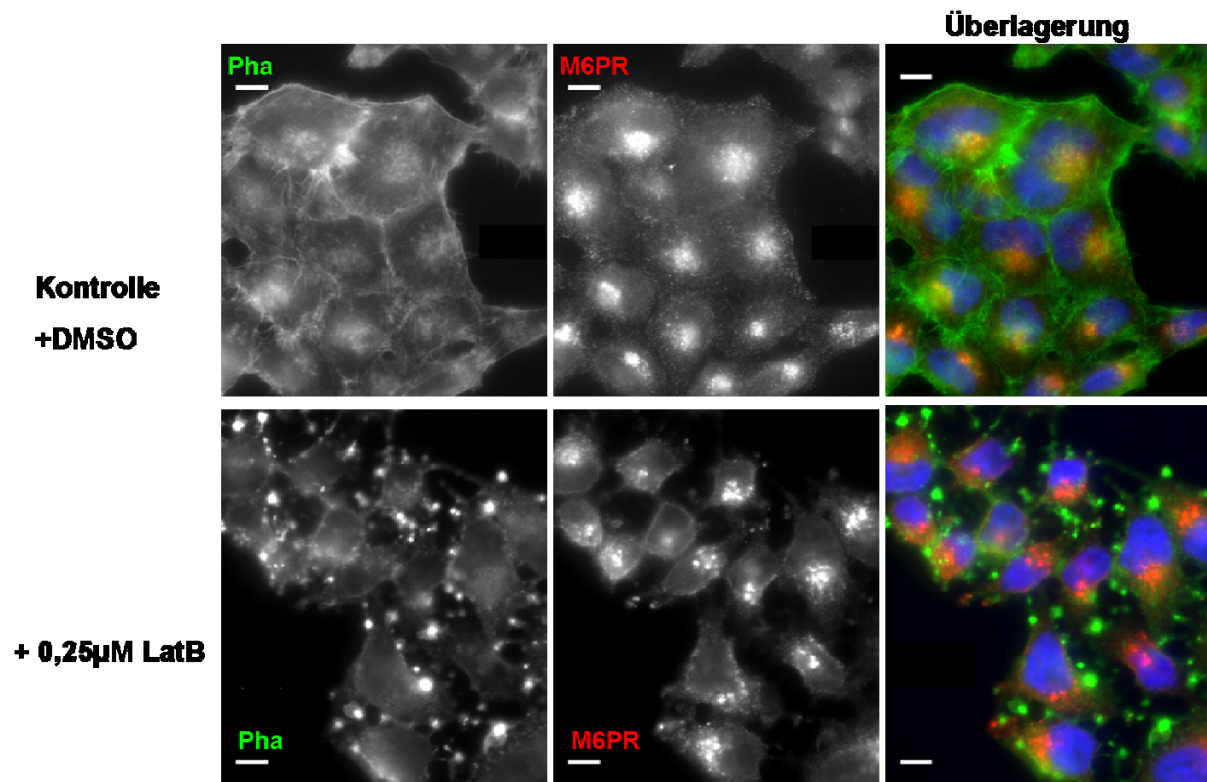


**Abbildung 3.14: Effekt von BFA auf die Verteilung von AP1 in Abwesenheit der CLC.** Die Zellen wurden nach doppelter Transfektion von CLC-spezifischer siRNA einen Tag vor der Analyse mit Kontrollzellen gemischt. 72 Stunden nach der ersten Transfektion wurden die Zellen dann für 30 Minuten BFA ausgesetzt und entweder fixiert (obere Reihe) oder für anschließend 90 Minuten in Vollmedium ohne BFA zur Erholung inkubiert. Die Immunfluoreszenzanalyse erfolgte durch Anfärben der Zellen mit einem monoklonalen AP1-Antikörper und einem polyklonalen CLC-Antikörper (R461-11). Es gilt zu beachten, dass sich auch in den „knock down“-Zellen (\*) die AP1-Strukturen zum Teil auflösen. Anders in den Kontrollzellen (#), in denen sich alle Strukturen auflösen. Maßstabsbalken: 20µm

Wie in Abb 3.12 zu sehen ist (Bild 1), verteilt sich das AP1 in Kontrollzellen (#) nahezu vollständig um. In „knock-down“-Zellen (\*) ist ebenfalls eine Umverteilung zu beobachten, allerdings sind hier teilweise Strukturen zu erkennen, die aggregiert erscheinen (Reihe „+BFA“, Pfeil). Diese Strukturen repräsentieren AP1, das an Membranen gebunden ist, die nicht dem Golgi zuzuordnen sind. Diese BFA-resistente AP1-Population ist in Kontrollzellen und in CLC-depletierten Zellen zu beobachten. Die anschließende Erholung von 90 Minuten führt zu einer Rückverteilung des AP1 in Kontrollzellen, sowie in Zellen ohne CLC. In beiden Fällen stellt sich der vorher beobachtete Phänotyp wieder ein. Über die Abhängigkeit der Rekrutierung des Aktinzytoskeletts an Clathrinstrukturen an der Plasmamembran ist bereits bekannt, dass die Bindung der Clathrin leichten Ketten an Hip1 und Hip1R von Bedeutung ist (Kaksonen et al 2006). Der Zusammenhang zwischen den Phänotypen im Bereich des Golgi-Apparats bei Depletierung der Clathrin leichten Ketten und der Rolle des Aktinzytoskeletts wurde noch nicht hinreichend untersucht. Zu diesem Zweck wurden Zellen

mit Latrunculin B, einem Gift aus Schwämmen, behandelt, welches die Polymerisation von Aktin inhibiert. Die damit verbundene Änderung der Aktinverteilung wurde durch Anfärben der Zellen mit fluorochromiertem Phalloidin überprüft. Veränderungen im Golgi wurden durch Anfärben des M6P-Rezeptors und AP 1 überprüft. (Abbildungen 3.15 und 3.16).

**Abbildung 3.15**

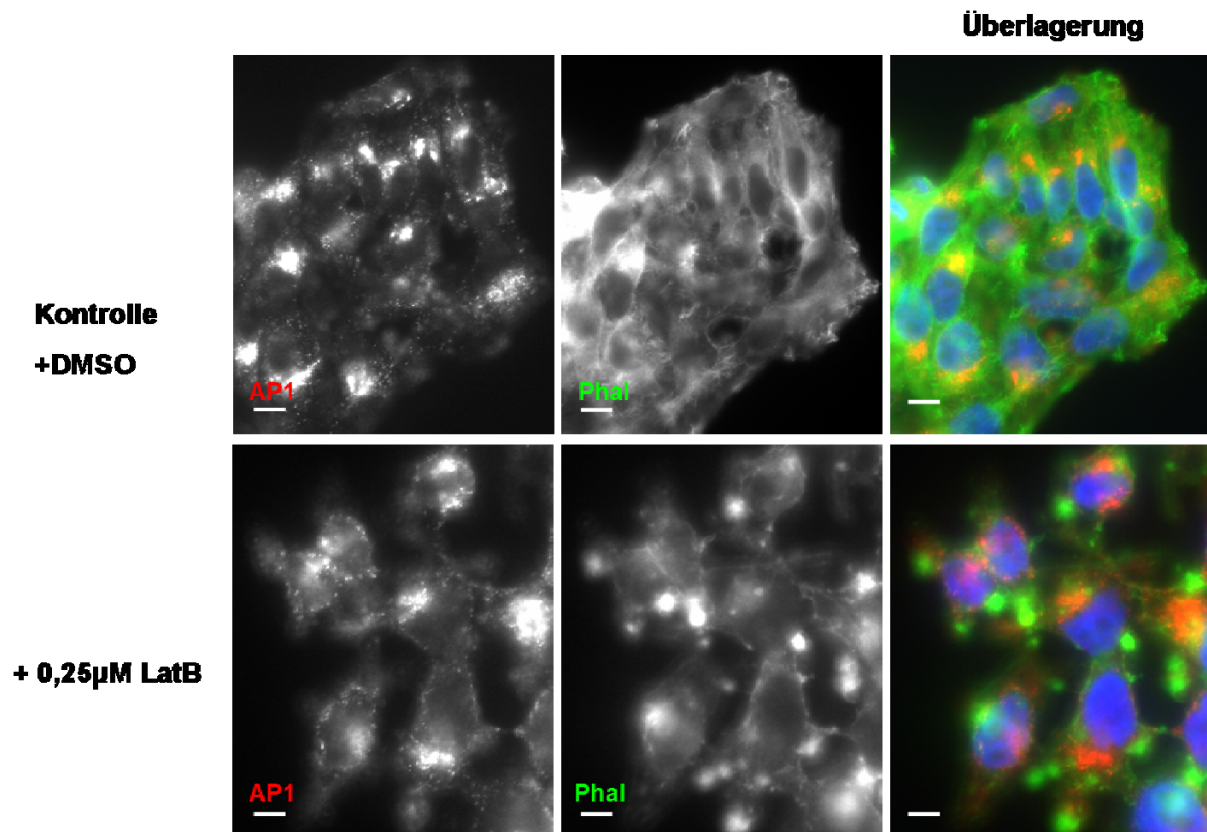


**Abbildung 3.15: Einfluss von Aktin auf den Mannose-6-Phosphat-Rezeptor.** HeLa-Zellen wurden für 30 Minuten mit 0,25  $\mu\text{M}$  Latrunculin B (LatB) in DMEM + 0,1% BSA inkubiert und anschließend fixiert. Die Immunfluoreszenzanalyse erfolgte durch Anfärben der Zellen mit einem polyklonalen Antikörper gegen den M6P-Rezeptor und grün fluorochromiertem Phalloidin. Zur Kontrolle wurden Zellen mit der gleichen Menge des Lösungsmittels (DMSO) inkubiert, in dem das Lat B vorverdünnt vorlag. Die Fokussierung der Aufnahmen wurde zur Vergleichbarkeit so durchgeführt, dass die Ausdehnung der M6P-Rezeptorfärbung möglichst gleichmäßig war. Es fällt auf, dass das Aktin nach Lat B-Behandlung der Zellen aggregiert und eine diffusere Verteilung einnimmt (grün). Die Verteilung des M6P-Rezeptors ist in den meisten Zellen einer vergleichsweise kompakt. Es ist eine Lokalisation in groben Strukturen zu beobachten. Maßstabsbalken: 20 $\mu\text{m}$

Wie in Abbildung 3.15 zu sehen, ist die Verteilung des M6P-Rezeptors abhängig vom Zustand des Aktinzytoskellets wie von der Anwesenheit der Clathrin leichten Ketten. Im Wesentlichen zeichnet sich der mit Latrunculin B gefundene Phänotyp durch die Bildung größerer Aggregate aus, die unregelmäßig über die Zelle verteilt sind. Die Veränderung des Aktinzytoskellets durch das Einwirken des Latrunculins ist signifikant und der durch die

Depletion der CLC erzeugten ähnlich. Neben der Aggregation großer Teile des Aktins verändert sich die Zellmorphologie, die durch das Aktin aufrechterhalten wird, wie in dessen Färbung ebenfalls zu erkennen. Die Zellen beginnen sich abzurunden und nur vereinzelte Ausläufer verbleiben in der ursprünglichen Ausdehnung der Zellen. In den Ausläufern finden sich die erwähnten Aggregate des Aktins.

**Abbildung 3.16**



**Abbildung 3.16: AP1-Verteilung bei Aktin-Depolymerisierung.**

HeLa-Zellen wurden für 30 Minuten mit  $0,25\mu\text{M}$  Latrunculin B (LatB) in DMEM + 0,1% BSA inkubiert und anschließend fixiert. Die Immunfluoreszenzanalyse erfolgte durch Anfärben der Zellen mit einem monoklonalen AP 1-Antikörper und grün fluorochromiertem Phalloidin. Zur Kontrolle wurden Zellen mit der gleichen Menge des Lösungsmittels (DMSO) inkubiert, in dem das Lat B vorverdünnt vorlag. Die Fokussierung der Aufnahmen wurde so zur Vergleichbarkeit so durchgeführt, dass die Ausdehnung AP 1-Färbung möglichst ähnlich war. Es fällt auf, dass das Aktin nach Lat B-Behandlung der Zellen aggregiert und eine diffusere Verteilung einnimmt (grün). Die Verteilung von AP 1 unterliegt ebenfalls einer Änderung. So ist eine ungleichmäßigere Lokalisation in groben Strukturen zu beobachten, die mal sehr kompakt und mal breit verteilt sind. Maßstabsbalken:  $20\mu\text{m}$

Die Untersuchung der Verteilung des Clathrinadaptors AP 1 (Abbildung 3.16) ergab ein ähnliches Bild: Wie im vorherigen Fall (M6P-Rezeptor) wurden zur besseren Vergleichbarkeit die Zellen bei der mikroskopischen Begutachtung so fokussiert, dass die Ausdehnung der relevanten Färbung – des Golgi-Fokus der AP 1-Färbung- möglichst

gleichmäßig war. Wie aus Abbildung 3.14 zu entnehmen war die Verteilung des AP 1 (rot) nach Latrunculin B- Behandlung nicht so uniform wie in der Kontrolle. Allerdings war die Relokalisation nicht so einheitlich zu charakterisieren wie nach der Depletion der Clathrin leichten Ketten.

Die in diesem Abschnitt präsentierten Ergebnisse verdeutlichen, dass in Zellen ohne Clathrin leichte Ketten eine Umverteilung von Mannose-6-Phosphat-Rezeptor, Transferrinrezeptor, AP1, EEA 1 und Clathrin schwerer Kette vorliegt. Die breitere, mehrheitlich aggregierte Form dieser Umverteilung entspricht nicht vollständig den zuvor beschriebenen Phänotypen (Poupon et al. 2008). Dort wurde die Verteilung des AP1 als stark kompaktiert beschrieben. Eine Beteiligung des Aktinzytoskeletts durch Herunterregulation der Clathrin leichten Ketten scheint aufgrund der vorliegenden Latrunculin B - Ergebnisse als Ursache für die beobachteten Phänotypi wahrscheinlich. Aufgrund der Lokalisation der am Golgi verbliebenen Clathrin schweren Kette und dem kolokalisierenden AP1 kann spekuliert werden, dass Umverteilung und Verlust der schweren Ketten der Hauptgrund für die beschriebenen Veränderungen im vesikulären Transport sind.

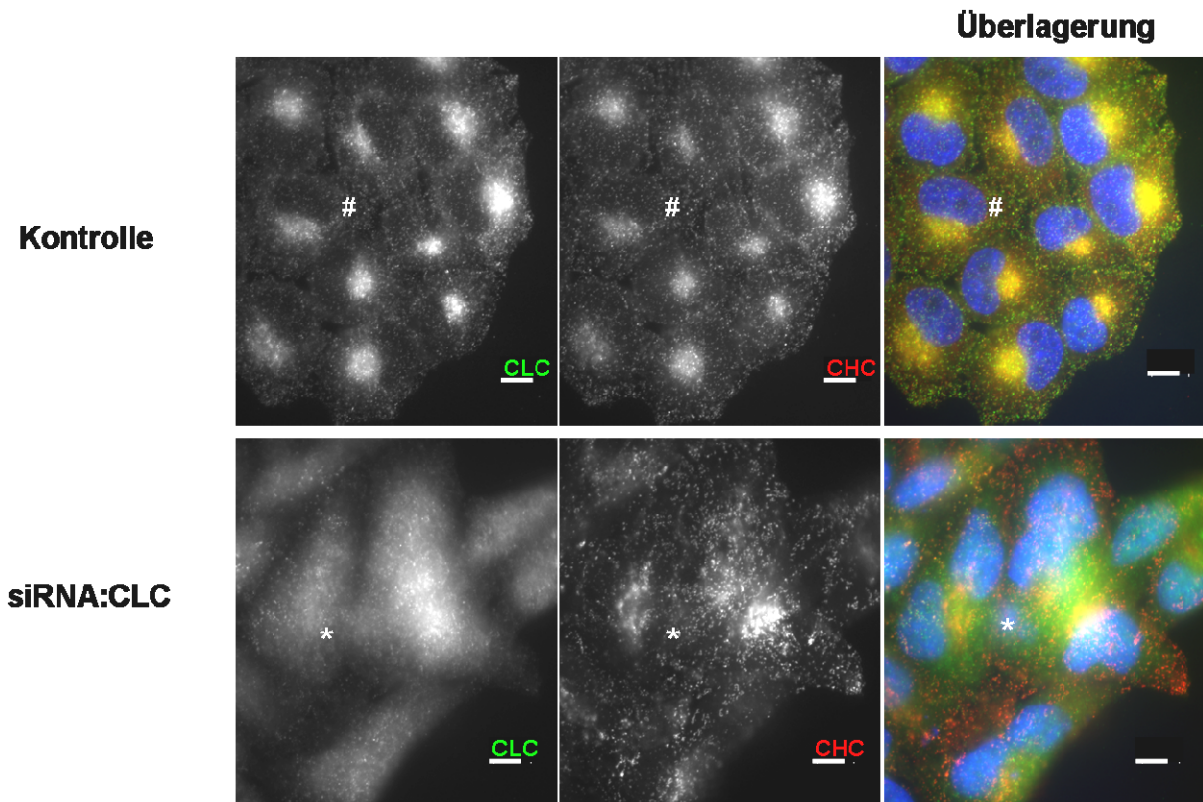
Dieser Verdacht soll in den folgenden Abschnitten durch geeignete experimentelle Ansätze erhärtet werden.

## **Morphologie von Clathrinstrukturen an der Plasmamembran**

Die Ergebnisse im letzten Abschnitt zeigen, dass das Fehlen der Clathrin leichten Kette die Morphologie des TGN, sowie des mit diesem dynamisch verbundenen endosomalen System stark verändert. Die Umverteilungen des Transferrin- und des Mannose-6-Phosphatrezeptors spiegeln die veränderte Morphologie dieses Endosomensystems deutlich wider.

Die Plasmamembran hingegen weist an der ventralen Seite der Zelle nicht wesentlich weniger Clathrin auf (Abbildung 3.6). Um die Eigenschaften des Clathrins ohne leichte Ketten an der Plasmamembran genauer zu untersuchen, wurden wie in den vorherigen Experimenten HeLa-Zellen mit Kontroll-siRNA, oder siRNA gegen die Clathrin leichten Ketten transfiziert und in der Immunfluoreszenz analysiert. In der Darstellung der Clathrin schweren Kette in Abbildung 3.17 ist zu erkennen, dass die Strukturen an der Plasmamembran wie die Strukturen des Golgiapparates gröber und im Einzelnen vergrößert erscheinen.

Abbildung 3.17



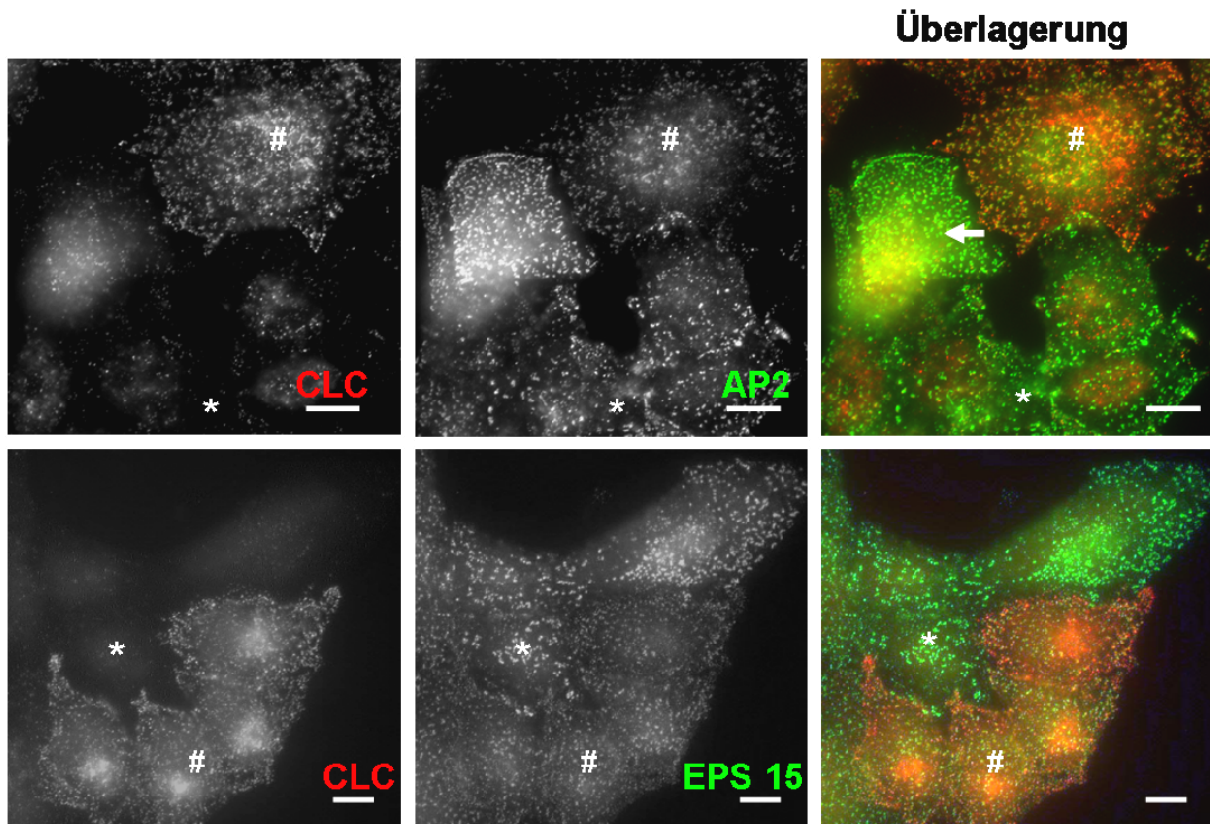
**Abbildung 3.17 Effekt der Herunterregulation der Clathrin leichten Ketten auf die Verteilung der Clathrin schweren Kette.** Die Zellen wurden zweimal mit CLC-spezifischer siRNA transfiziert und nach 72 Stunden fixiert. Es wurden ein polyklonaler Antikörper gegen die leichten Ketten und ein monoklonaler Antikörper gegen die schwere Kette verwendet. Zu beachten ist die gröbere Verteilung der schweren Kette in Abwesenheit der Clathrin leichten Ketten (\*) im Vergleich zur feineren Verteilung in den Kontrollzellen(#). Maßstabsbalken: 10µm

Für die spezifische Darstellung der clathrinbedeckten Areale an der Plasmamembran eignet sich die Markierung des Clathrinadaptors AP2. Er kommt exklusiv in Plasmamembranständigen Clathrinstrukturen vor. So kann ausgeschlossen werden, dass z.B. Endosomen dargestellt werden, die nicht mit der Plasmamembran assoziiert sind.

In Abbildung 3.16 sind Zellen zu sehen, deren CLC-Expression herunterreguliert wurde und die mit Kontrollzellen gemischt wurden. Die Zellen wurden dann immunhistochemisch gegen die Clathrin leichten Ketten, AP2 und das akzessorische Protein Eps15 gefärbt.



Abbildung 3.18



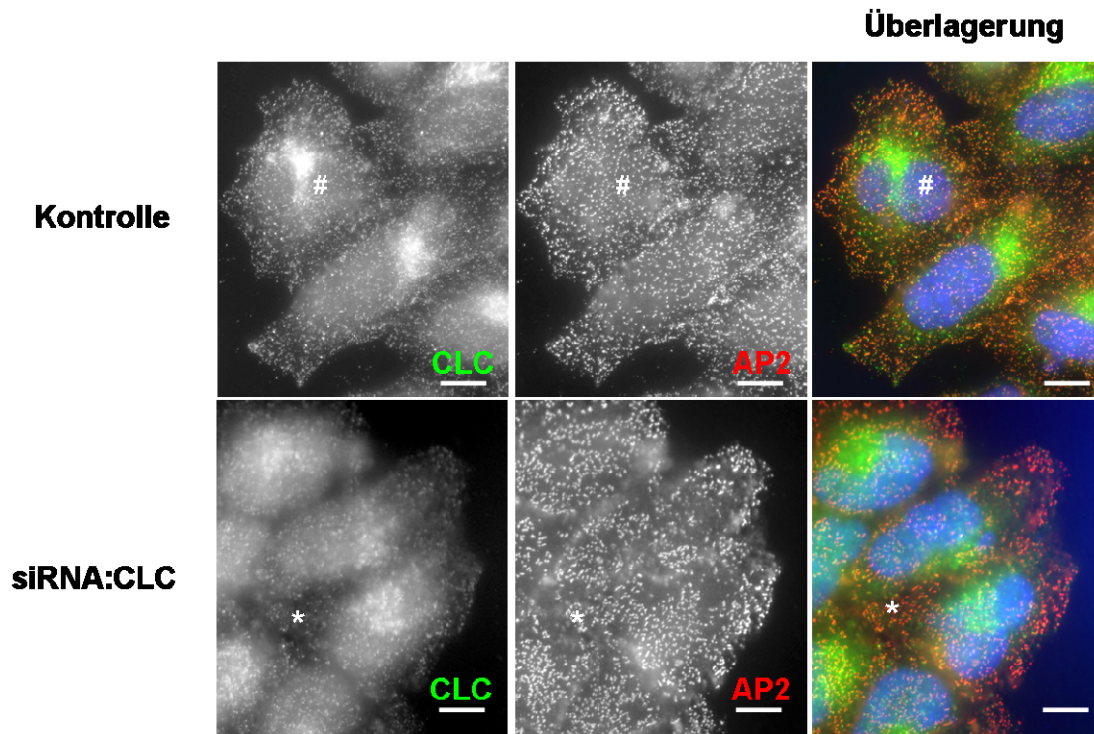
**Abbildung 3.18: Effekt der Herunterregulation der Clathrin leichten Ketten auf die Verteilung von AP2 und Eps15.** Die Zellen wurden zweimal mit CLC-spezifischer siRNA transfiziert und nach 48 Stunden mit Kontrollzellen vermischt. Die Immunfluoreszenzanalyse erfolgte weitere 24 Stunden später. Es wurden ein polyklonaler Antikörper gegen die leichten Ketten und jeweils ein monoklonaler Antikörper gegen AP 2 und Eps15 verwendet. Zu beachten ist die gröbere Verteilung des Adaptors und des akzessorischen Proteins in Abwesenheit der Clathrin leichten Ketten (\*) Vergleich zur feineren Verteilung in den Kontrollzellen(#). Maßstabsbalken: 10µm

Wie in der AP2 – Färbung zu sehen ist, ist das AP2 in den meisten „knock down“-Zellen weniger gleichmäßig über die Zellen verteilt und findet sich, im direkten Vergleich zur Kontrolle, in größeren Strukturen wieder. In einigen Zellen jedoch ist die Verteilung des AP2 kaum verändert (Pfeil). In der Darstellung des akzessorischen, AP2-bindenden Proteins Eps15, welches ein Marker für clathrinhaltige Strukturen an der Plasmamembran und am Golgi ist (Chi et al. 2008), zeigt sich derselbe Phänotyp. Wie AP2 sammelt es sich in größeren, ungleichmäßig über die Membran verteilten Strukturen.

Nach eigenen Beobachtungen, sowie wie in Saffarian et al. 2009 gezeigt, befinden sich in HeLa-Zellen, zumindest an der ventralen Seite der Plasmamembran auch größere zum Teil flache Clathrinstrukturen. Um auszuschließen, dass es sich bei den im „knock down“ beobachteten groben Strukturen nicht um ein Ergebnis tagelanger Kultivierung handelt, wurde

das Experiment ohne Vermischung von CLC-depletierten Zellen und Kontrollzellen durchgeführt (Abbildung 3.17).

**Abbildung 3.19**



**Abbildung 3.19: Effekt der Herunterregulation der Clathrin leichten Ketten auf die Verteilung von AP2 in ungemischten Zellen.** Die Zellen wurden zweimal mit CLC-spezifischer siRNA transfiziert und nach 72 Stunden fixiert. Es wurden ein polyklonaler Antikörper gegen die leichten Ketten und ein monoklonaler Antikörper gegen AP 2 verwendet. Zu beachten ist die gröbere Verteilung des Adaptors und des akzessorischen Proteins in Abwesenheit der Clathrin leichten Ketten (\*) Vergleich zur feineren Verteilung in den Kontrollzellen(#). Maßstabsbalken: 10µm

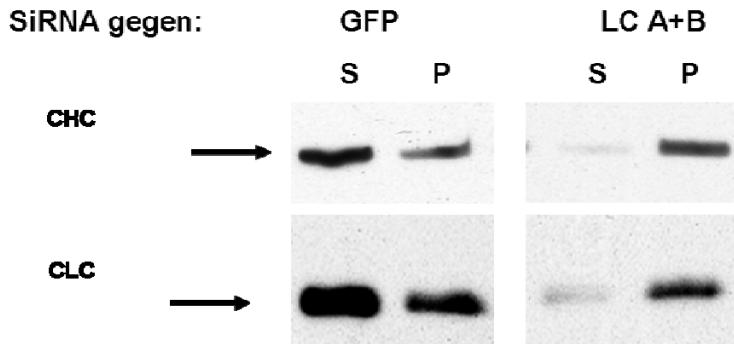
Wie in Abbildung 3.19 zu sehen, ist das ventrale AP-2 in CLC-depletierten Zellen (\*) deutlich größer verteilt als in den analog behandelten Kontrollzellen (#). Im Gegensatz zu den in Abbildung 3.18 repassagierten Zellen, ist der Phänotyp hier noch deutlicher.

An dieser Stelle kann zusammengefasst werden, dass die Herunterregulation der Clathrin leichten Ketten zu einer Vergrößerung der clathrinhaltigen Strukturen an der Plasmamembran führt. Sie liegt in scheinbar unveränderter Menge in größeren „Aggregaten“ vor. Die Ausdehnung dieser Aggregate ist abhängig davon, ob die Zellen vor der Begutachtung passagiert wurden.

Die Vergrößerung der verbleibenden Clathrinstrukturen führt zu der Frage ob das Fehlen der leichten Ketten zu einer vermehrten Membranständigkeit der Clathrin schweren Kette führt. Um dies zu untersuchen wurden Kontrollzellen und CLC-depletierte Zellen in partikuläre

(membranhaltige) und lösliche Anteile fraktioniert und die Fraktionen auf ihren Gehalt an Clathrin schwerer und leichter Kette hin untersucht (Abbildung 3.20).

**Abbildung 3.20**

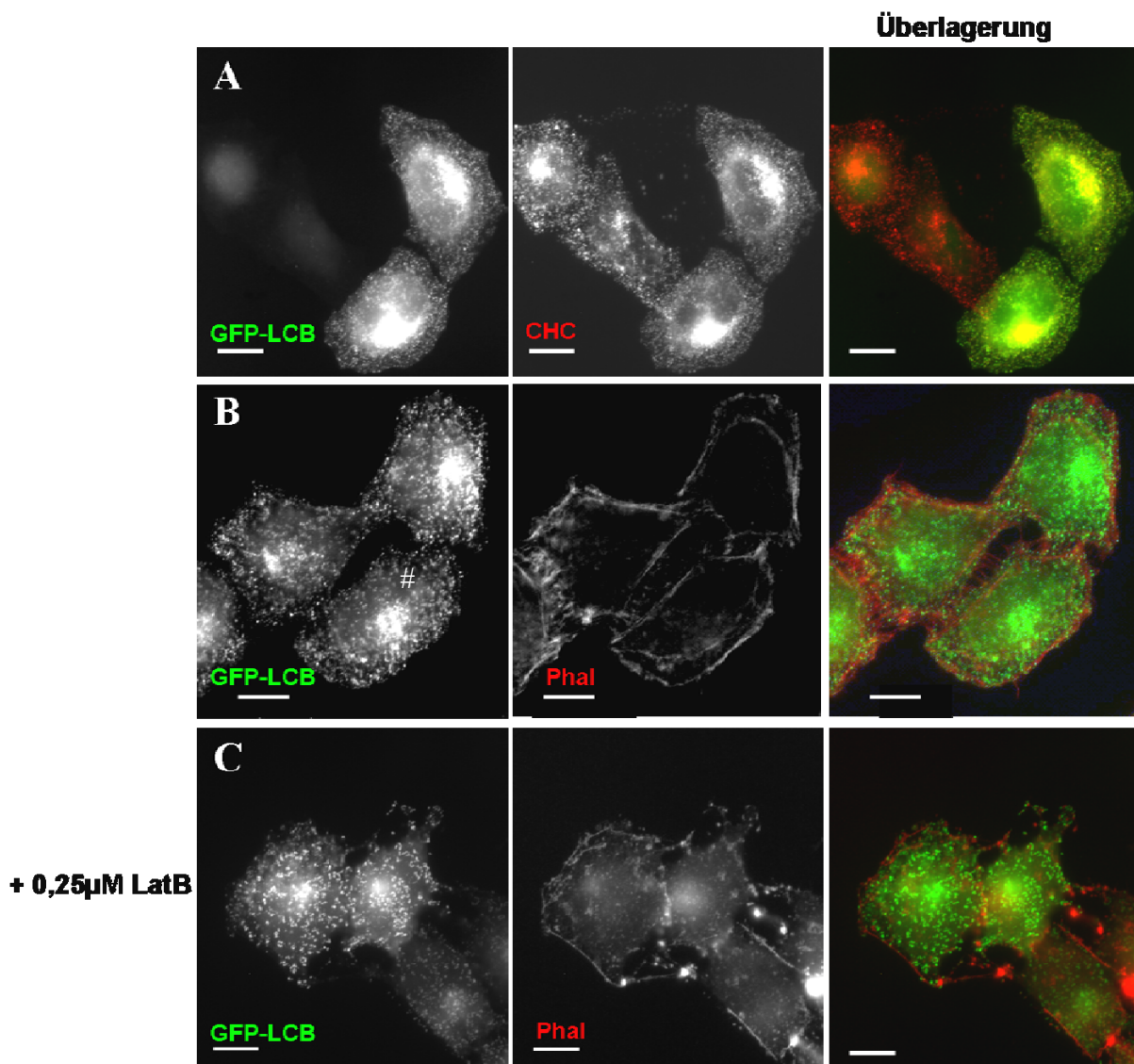


**Abbildung 3.20: Verteilung von Clathrin schwerer Kette zwischen Membranstrukturen und Cytosol.** HeLa-Zellen wurden zweimal mit siRNA gegen GFP (Kontrolle) oder gegen LC A und B wie beschrieben transfiziert und 72 Stunden nach der ersten Transfektion durch mehrmaliges Einfrieren und Auftauen aufgebrochen. Anschließend wurden die partikulären Bestandteile (Pellet - P) von den löslichen (Überstand – S) per Ultrazentrifugation getrennt. Beide Fraktionen wurden in Probenpuffer lysiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und geblottet. Der Nachweis von Clathrin schwerer und leichter Kette zeigt, dass unter den gewählten Bedingungen in der Kontrolle der größere Teil der schweren Kette in der löslichen Fraktion zu finden ist. In Abwesenheit der leichten Kette findet sich die übrig gebliebene schwere Kette hingegen hauptsächlich in der unlöslichen Fraktion.

Unter den gewählten Bedingungen (siehe Abschnitt 2 „Zellfraktionierung“) liegt in kontrolltransfizierten Zellen („GFP“) das Clathrin zum größeren Teil in der löslichen Fraktion vor. In CLC-depletierten Zellen ist die Menge der schweren Kette deutlich reduziert und der größere Teil der verbliebenen Menge ist in der partikulären Fraktion zu finden. Dieses Ergebnis wurde in drei unabhängigen Experimenten bestätigt. Es lässt den Schluss zu, dass die Herunterregulierung der Clathrin leichten Kette eine erhöhte Membranständigkeit der schweren Kette zur Folge hat.

Es wurde bereits gezeigt, dass die Herunterregulation der Clathrin leichten Ketten zu einer Aggregation des Aktinzytoskeletts an der Plasmamembran führt (Poupon et al. 2008). Bisher wurde der Effekt der Depletion der CLC auf das Aktin und assoziierte Proteine wie Hip1 und Hip 1R beschrieben. In diesem Zusammenhang sollte nun geklärt werden, ob die beobachteten vergrößerten „Clathrin-Plaques“ an der Plasmamembran in Abwesenheit der Clathrin leichten Ketten im Zusammenhang mit dem Aktinzytoskelett stehen.

Abbildung 3.21



**Abbildung 3.21: Einfluss von Aktin auf Clathrinstrukturen an der Plasmamembran.**

**A:** HeLa-Zellen wurden mit HeLa-Zellen gemischt, die das Konstrukt GFP-LCB stabil exprimieren. Die Zellen wurden fixiert und mit einem monoklonalen Antikörper gegen die Clathrin schwere Kette immungefärbt. Die Darstellung des Clathrins in Zellen mit bzw. ohne die GFP-leichten Ketten weist keine Unterschiede auf

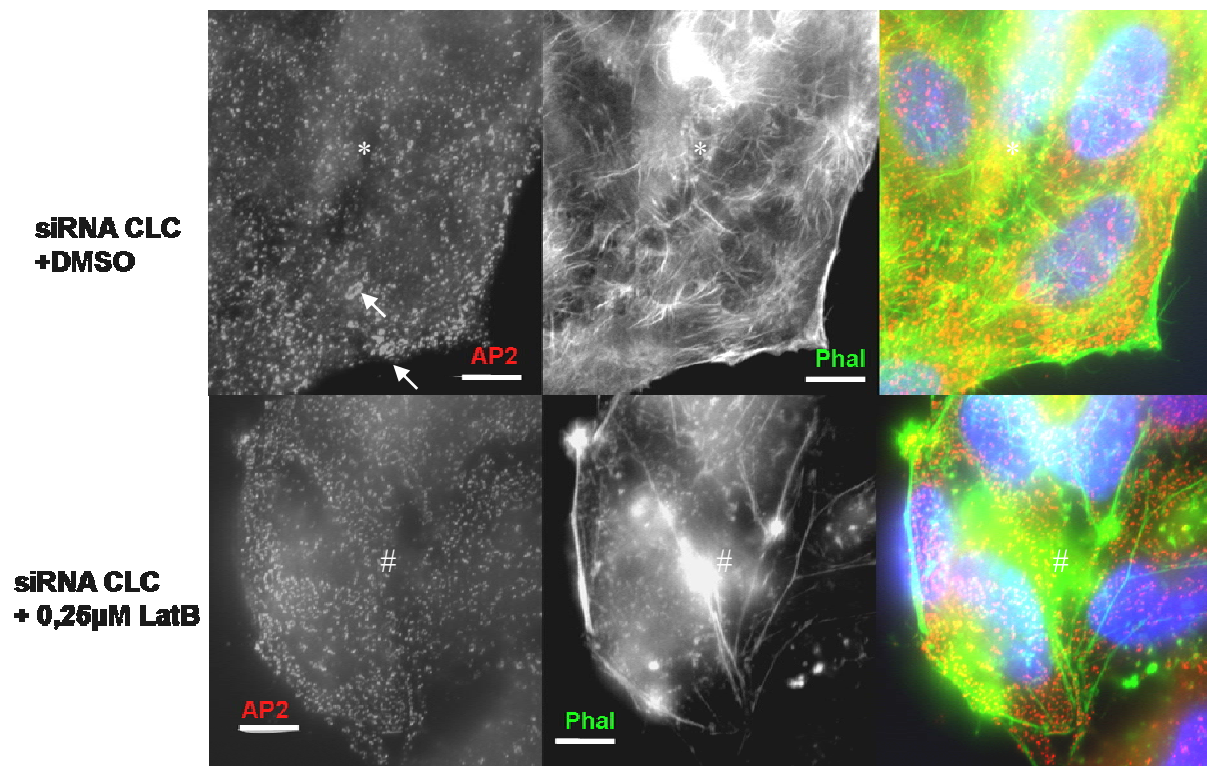
**B:** HeLa-Zellen, die das Konstrukt GFP-LCB stabil exprimieren wurden mit fluorochromiertem Phalloidin (rot) gefärbt. Die Färbung zeigt die für Aktin und Clathrin typische Verteilung.

**C:** HeLa-Zellen, die das Konstrukt GFP-LCB stabil exprimieren, wurden für 30 Minuten mit  $0,25\mu\text{M}$  Latrunculin B (LatB) in DMEM + 0,1% BSA inkubiert und anschließend fixiert. Die Immunfluoreszenzanalyse erfolgte durch Anfärben der Zellen mit rot fluorochromiertem Phalloidin. Zu beachten ist die gröbere Verteilung des Clathrins an der Plasmamembran bei gleichzeitiger Depolymerisation und teilweiser Aggregation des Aktins.

In Abbildung 3.21 ist der Einfluss der Depolymerisation des Aktins auf Clathrin an der Plasmamembran dargestellt. Zur Markierung des Clathrins wurde in diesem Fall konstitutiv exprimierte GFP-LCB verwendet. In Abbildung 3.19 A ist zu erkennen, dass die Verteilung von GFP-LCB der der Clathrin schweren Kette entspricht. Die Verteilung der GFP-LC zeigt

in den folgenden Abbildungen den Effekt von Latrunculin B auf Clathrin. Die Clathrinstrukturen an der Plasmamembran erscheinen beim Vergleich von Kontrolle (Abbildung 3.19 B) und Latrunculin B (Abbildung 3.21 C) größer zu werden. Das Aktin wird unter Latrunculin B-Einfluss, wie im bereits beschrieben (Abbildung 3.15 und 3.16), teilweise diffuser und aggregiert. GFP-LCB eignet sich somit in der stabilen Expression als Marker für die Verteilung des Clathrins. Die Vergrößerung der „Clathrin-Plaques“ an der ventralen Seite der Plasmamembran gelang durch Herunterregulation der Clathrin leichten Ketten und durch Depolymerisation des Aktinzytoskeletts in Anwesenheit der CLC. Abschließend stellte sich die Frage, ob die Kombination der beiden Manipulationen einen kumulativen Effekt, d.h. eine Verstärkung des Phänotyps der vergrößerten Plaques mit sich bringen würde. Hierzu wurden CLC-depletierte Zellen wie vorher beschrieben mit Latrunculin B behandelt und mit unbehandelten, CLC-depletierten verglichen (Abbildung 3.22). In der Kontrolle (Abbildung 3.22, „siRNA CLC+DMSO“) zeigt sich der bereits in Abbildung 3.17 gezeigte Phänotyp der vergrößerten Clathrin-Plaques, repräsentiert durch das gefärbte AP2. Vereinzelt sind sich windende längliche Strukturen zu erkennen, die mehr als einen Mikrometer lang werden (Pfeile). In den zusätzlich mit Latrunculin B behandelten Zellen finden sich ebenfalls vergrößerte Plaques. Die Häufigkeit der besonders großen, „wurmartigen“ AP2-Strukturen scheint vergrößert.

Abbildung 3.22



**Abbildung 3.22: Kombiniertes Effekt von Latrunculin B und CLC-Depletion.** Die Zellen wurden zweimal mit CLC-spezifischer siRNA transfiziert und nach 72 Stunden für 30 Minuten mit 0,25µM Latrunculin B (LatB) oder nur DMSO in DMEM + 0,1% BSA inkubiert und anschließend fixiert. Die Immunfluoreszenzanalyse erfolgte durch Anfärben der Zellen mit einem Antikörper gegen AP2 und grün fluorochromiertem Phalloidin. Zu beachten ist die gröbere Verteilung des Adaptors allein in Abwesenheit der Clathrin leichten Ketten (\*) Vergleich zur tendenziell noch gröberen Verteilung in den zusätzlich mit Latrunculin B behandelten Zellen (#). Maßstabsbalken: 10µm

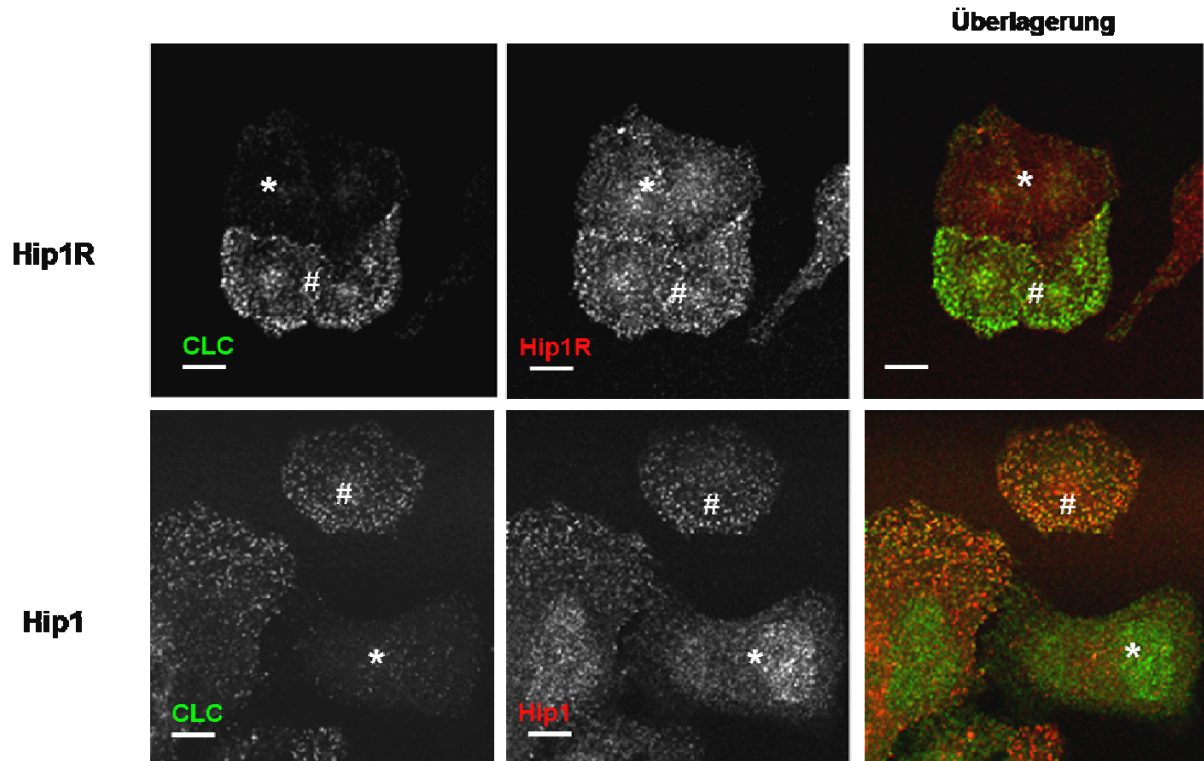
Als Ergebnis kann festgehalten werden, dass sowohl durch Depletion der Clathrin leichten Ketten als auch durch Depolymerisation des Aktinzytoskeletts die Clathrinstrukturen an der Olasmamembran vergrößert werden. Tendenziell erscheint der Effekt der CLC-Depletion allein etwas stärker als der des Latrunculins. Die Kombination beider Manipulationen scheint den Phänotyp zu verstärken.

Wie bereits beschrieben, binden die aktinbindenden Proteine Hip1 und Hip1R an die Clathrin leichten Ketten und verknüpfen so die membranständigen Clathrinnetzwerke mit dem Aktinzytoskelett. Beide Proteine sind sich in ihrem modularen Aufbau sehr ähnlich. Sie bilden jedoch ausschließlich Homodimere (Wilbur et al. 2008).

Im Folgenden wurde die Verteilung von Hip1 und Hip1R in Abwesenheit der Clathrin leichten Ketten untersucht. Wie in Abbildung 3.23 zu sehen, ändert sich die Verteilung von Hip1R in Abwesenheit der CLC (\*) im Vergleich zu den Kontrollzellen(#) nicht.

Im Gegensatz dazu erscheint die Verteilung von Hip1 in Zellen ohne leichte Ketten (\*) diffuser.

**Abbildung 3.23**



**Abbildung 3.23: Effekt der Herunterregulation der Clathrin leichten Ketten auf die Verteilung von Hip1 und Hip1R:** Die Zellen wurden zweimal mit CLC-spezifischer siRNA transfiziert (\*) und nach 48 Stunden mit Kontrollzellen (#) vermischt. Die Immunfluoreszenzanalyse erfolgte weitere 24 Stunden später. Es wurden ein Antikörper gegen die Clathrin leichten Ketten und jeweils ein Antikörper gegen Hip1R und Hip1 verwendet. Zu beachten ist die diffusere Verteilung von Hip1 in Abwesenheit der leichten Ketten im Vergleich zur nahezu unveränderten Verteilung von Hip1R. Maßstabsbalken: 10µm

Der vorliegende Befund lässt auf unterschiedliches Verhalten der beiden Proteine in Abwesenheit der Clathrin leichten Ketten schließen. Die Rekrutierung von Hip1 in clathrinbedeckte Strukturen scheint mehr von der Präsenz der Clathrin leichten Ketten abzuhängen als die von Hip1R.

Die genauen Eigenschaften von Clathrinnetzwerken an der Plasmamembran und ihre Veränderungen sind mit den verwendeten lichtmikroskopischen Methoden aufgrund der geringen Auflösung nicht zu ergründen. So stellt sich zum Beispiel die Frage, ob es sich bei den beobachteten „Aggregaten“ um jeweils mehrere einzelne Clathrinstrukturen handelt, die zu nah aneinander liegen, um sie getrennt voneinander aufzulösen. Auch bleibt unklar, in

welchem Zustand – z.B. flach, oder invaginiert - die Netzwerke vorliegen, oder welche Dynamik sie aufweisen. Auch ihre endozytotische Aktivität ist unbekannt.

Um die Eigenschaften des Clathrins ohne leichte Ketten an der Plasmamembran genauer zu charakterisieren, wurde der ventrale (adhärente) Teil der Plasmamembran präpariert. Hierzu wurden die Zellen einem kurzen Ultraschallimpuls ausgesetzt. Der für diese Behandlung relativ resistente Teil der Zellen, die an dem Substrat adhärierende Plasmamembran, konnte so exklusiv im Elektronenmikroskop dargestellt werden.

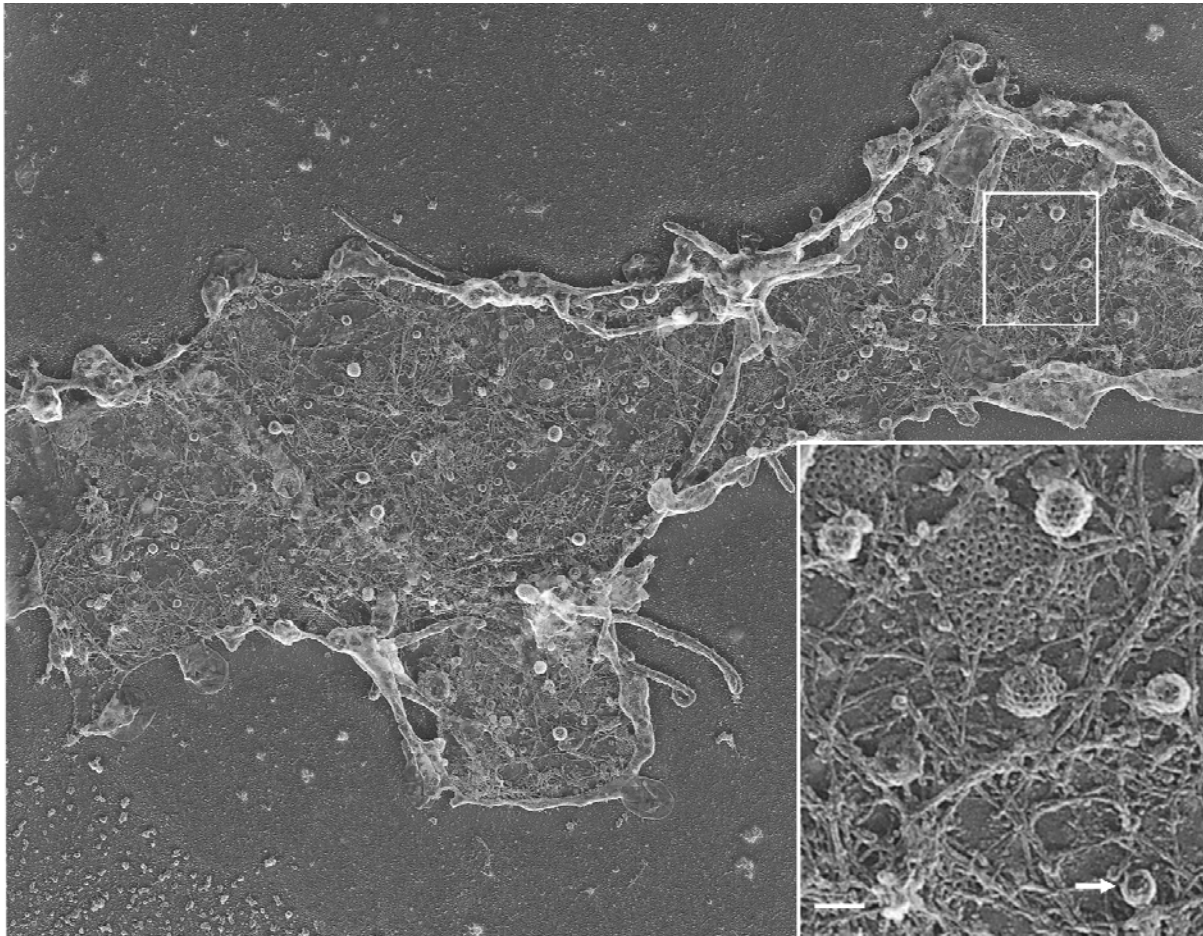
In Abbildung 3.22 ist eine elektronenmikroskopische Aufnahme der ventralen Plasmamembran einer HeLa-Zelle. Die Präparation ermöglicht es, die innere Seite der Plasmamembran darzustellen und somit unter anderem Clathrinnetzwerke direkt sichtbar zu machen. In der Übersicht sind sowohl ausgedehnte flache, als auch gekrümmte Clathrinnetze auszumachen. Die Clathrinstrukturen liegen, vergleichbar mit dem Bild in der Immunfluoreszenz, gleichmäßig über die Membran verteilt. Clathrinstrukturen, die im Begriff scheinen sich einzustülpen, liegen sowohl vereinzelt, als auch am Rand von größeren, flachen Netzwerken vor. Sie haben etwa einen Durchmesser von 100-150nm, während die Ausdehnung der flachen Strukturen mehrere Hundert Nanometer erreicht.

Neben den auffälligen Clathrinnetzen finden sich ungeordnet und in der Regel in großer Menge Fasern unterschiedlicher Stärke und Orientierung. Die Fasern verlaufen auch teilweise über Clathrinnetzwerke hinweg oder scheinen in ihnen zu enden. Es handelt sich hierbei wahrscheinlich um Teile des Aktinzytoskeletts, welches im Bereich der Plasmamembran besonders ausgeprägt ist (siehe z.B. Abbildung 3.21 und 3.22). Durch die Präparation für die Elektronenmikroskopie (Fixierung, Kontrastierung, Bedampfung) erscheint es gebündelt und dicker, als man es für Aktin vermuten würde (Heuser et al. 1985).

Neben Clathrin und Aktin lassen sich auch clathrinunabhängige Endozytoseformen ausmachen. Sie sind als nicht-clathrinbedeckte Membraneinstülpungen zu erkennen, die etwas kleiner sind als die clathrinbedeckten (Abbildung 3.24, Pfeil). Bei manchen Invaginationen dieser Art ergibt sich der Eindruck einer Querstreifung. Hierbei könnte es sich um caveolinvermittelte Endozytose handeln.



**Abbildung 3.24**

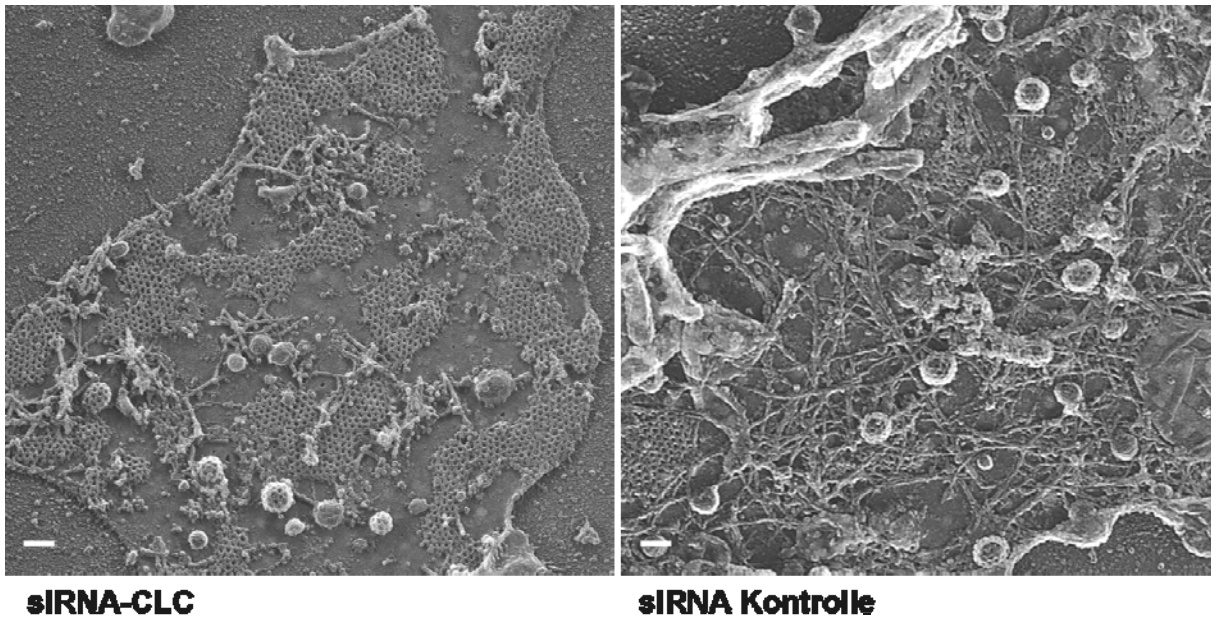


**Abbildung 3.24: Elektronenmikroskopische Darstellung der ventralen Plasmamembran einer HeLa-Zelle.** Auf Deckgläsern gewachsene HeLa-Zellen wurden, wie in Meyerholz et al. 2005 und in den Methoden beschrieben, mit Ultraschall behandelt. Die auf dem Deckglas verbliebenen Zellreste wurden fixiert, kontrastiert und durch Rotationsbedampfung mit Pt/C für die Elektronenmikroskopie präpariert. Zu sehen ist der komplette ventrale Teil der Plasmamembran einer HeLa-Zelle in der Übersicht. Wie in dem Ausschnitt gezeigt, finden sich gleichmäßig verteilt sowohl flache, als auch sich einstülpende Clathringitter. Sie sind in der Regel auch häufig an Rändern flacher Netzwerke zu sehen. Vergrößerung: 1: 5000; Maßstabsbalken im Ausschnitt: 100nm

Zur Analyse der Effekte der Depletion der Clathrin leichten Ketten wurde die vorgestellte Methode auf Zellen angewandt, die mit siRNA gegen die CLC und Kontroll-siRNA transfiziert wurden.

In Abbildung 3.25 sind jeweils typische Ausschnitte zu sehen. Beim Vergleich von Kontroll- und „knock down“-Zellen zeigt sich, dass die flachen Netzwerke in Zellen ohne leichte Ketten deutlich häufiger und ausgedehnter sind. Sie zeigen eine wie bereits in Abbildung 3.19 und 3.22 lichtmikroskopisch zu erkennende wurmartige Morphologie. Auch fällt auf, dass wesentlich weniger sich einstülpende Clathrin-„buds“ zu sehen sind.

**Abbildung 3.25**

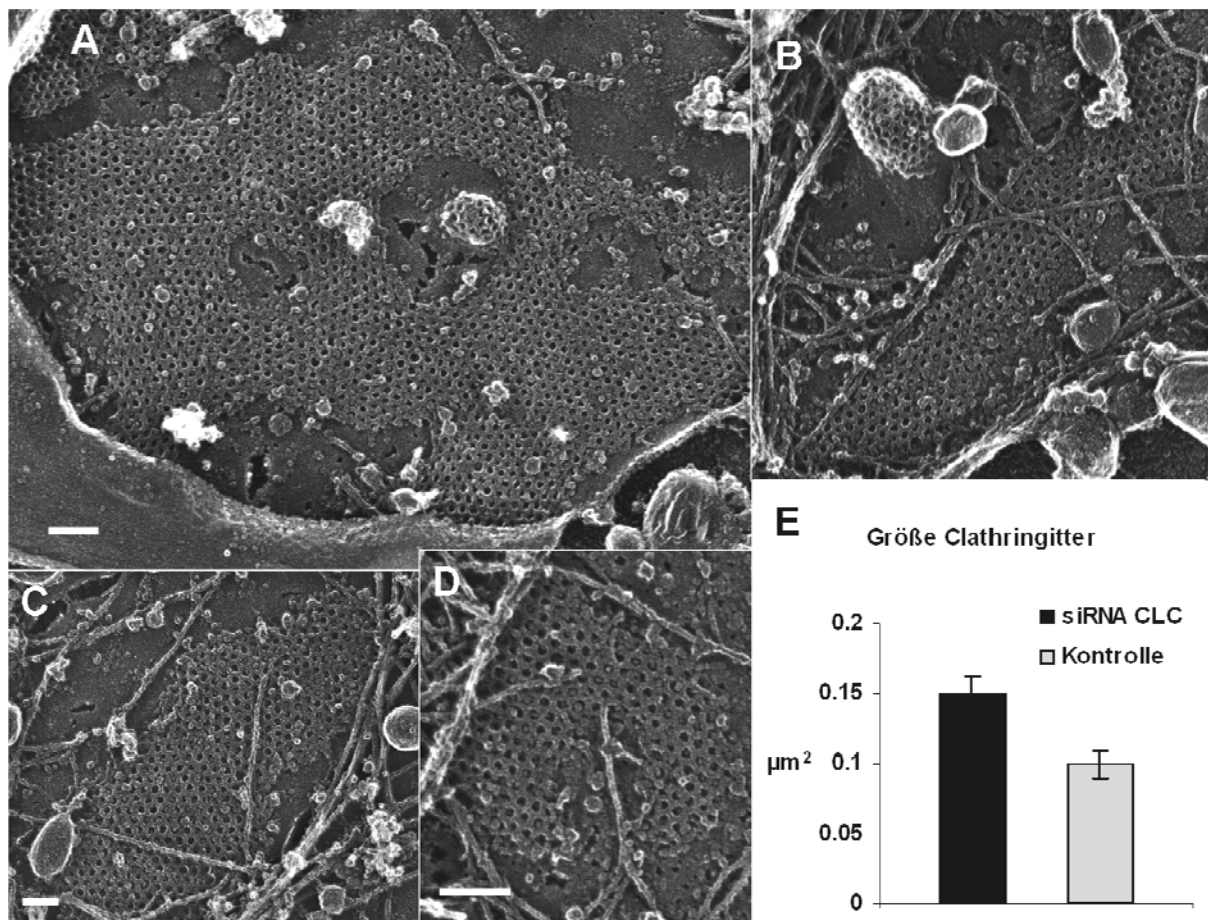


**Abbildung 3.25: Elektronenmikroskopische Darstellung der ventralen Plasmamembran in CLC-depletierten HeLa-Zellen.** Auf Deckgläsern gewachsene HeLa-Zellen wurden wie beschrieben transfiziert und nach 72 Stunden, wie in Meyerholz et al. 2005 und in den Methoden beschrieben, mit Ultraschall behandelt. Die auf dem Deckglas verbliebenen Zellreste wurden fixiert kontrastiert und durch Rotationsbedampfung mit Pt/C für die Elektronenmikroskopie präpariert. In Abwesenheit der leichten Ketten sind die Clathrinstrukturen vergrößert. Maßstabsbalken im Ausschnitt: 100nm

Der Eindruck eines offensichtlich größeren Anteils flacher Clathringitter wird durch das Auftreten vergrößerter Gitter verstärkt. In Abbildung 3.26 sind einige Beispiele für die zu beobachtenden Morphologien der Clathringitter in CLC-depletierten Zellen zu sehen. Der häufigste Phänotyp der Clathringitter sind längliche, gerade oder gekrümmte Gitter (Abbildung 3.26 B-D), die im Schnitt etwa 50% größer sind, als die korrespondierenden Strukturen in den Kontrollen (Abbildung 3.26 E). In seltenen Fällen nahm die Ausdehnung der Clathringitter überraschende Ausmaße an, wie in Abbildung 3.26 A zu sehen. Das hier gezeigte Clathringitter bedeckt eine Fläche von etwa  $3 \mu\text{m}^2$ ! Im Vergleich zur durchschnittlichen Fläche der Gitter in Zellen ( $\sim 0,02 \mu\text{m}^2$ ) ohne Clathrin leichte Ketten liegt dies deutlich über dem Durchschnitt.

Eine signifikante Veränderung im Durchmesser der sich einstülpenden Clathrinstrukturen wurde nicht festgestellt. Vergrößerte „buds“ (wie in Abbildung 3.26 B zu sehen) traten sowohl in der Kontrolle als auch im „knock down“ auf. Die Verteilung der beschriebenen Strukturen war in den CLC-depletierten Zellen wesentlich ungleichmäßiger als in Kontrollzellen.

**Abbildung 3.26**



**Abbildung 3.26 Ausdehnung von Clathringittern in CLC-depletierten HeLa-Zellen.**

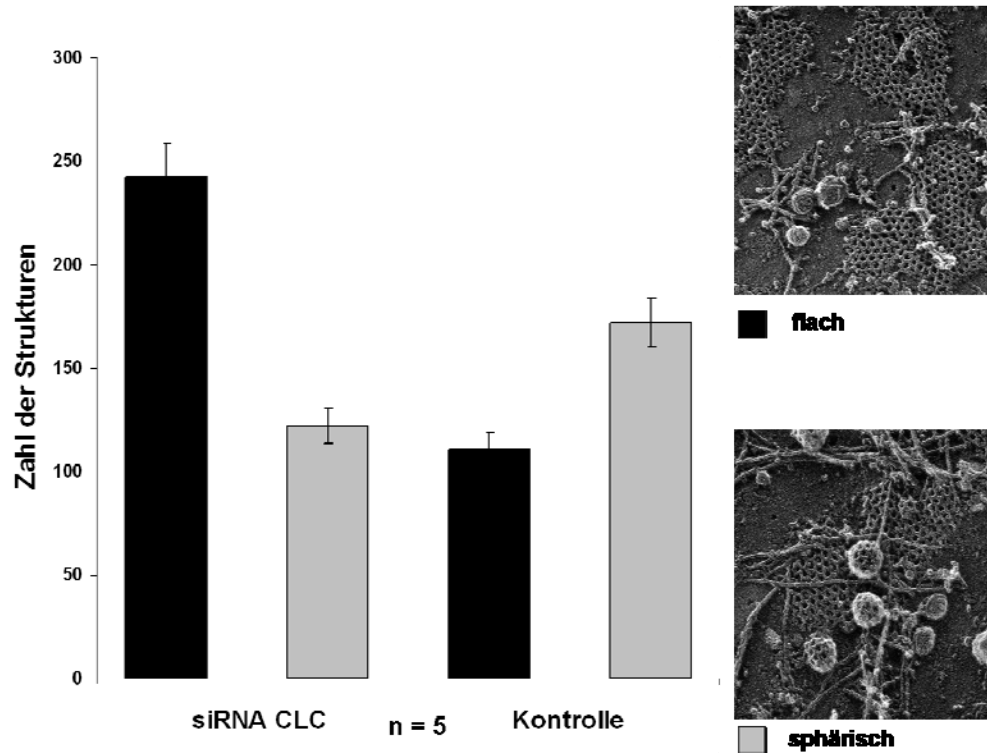
Die Transfektion und Präparation erfolgte wie bereits beschrieben. Abgebildet wurden für den „knock down“ charakteristische Strukturen. Für die Statistik wurden Präparate aus 3 verschiedenen siRNA-Experimenten ausgewertet. Die Flächen der Gitter wurden mit ImageJ bestimmt und in  $\mu\text{m}^2$  umgerechnet. N (ausgewertete Strukturen) = 200; Maßstabsbalken im Ausschnitt: 100nm

Um den Eindruck des veränderten Verhältnisses von flachen zu einstülpenden Clathrinstrukturen zu konkretisieren, wurden die Strukturen gezählt. Hierbei wurden Übersichten mit gleicher Anzahl und je ähnlicher Größe von Membranabschnitten ausgewählt. Es wurde zwischen sphärischen und flachen Gittern unterschieden. Flache Gitter mit sich einstülpenden Anteilen wurden dabei wie solitäre Clathrin-„buds“ als sphärisch kategorisiert. Zusammenhängende Gitter mit mehreren „buds“ wurden einfach gezählt.

Wie in Abbildung 3.25 zu sehen, ist der Anteil flacher Clathrinstrukturen in CLC-depletierten Zellen deutlich höher als in Kontrollzellen. In Zellen mit Clathrin leichten Ketten überwiegen hingegen sphärische Clathringitter. Ausserdem ist die durchschnittliche Zahl an Clathringittern in Abwesenheit der Clathrin leichten Ketten in einem Ausschnitt leicht erhöht.

Eine vermehrte Membranständigkeit des Clathrins ohne leichte Ketten wurde auch biochemisch nachgewiesen (Abbildung 3.18).

**Abbildung 3.27**



**Abbildung 3.27: Anzahl und Struktur von Clathringittern der ventralen Plasmamembran in CLC-depletierten HeLa-Zellen.**

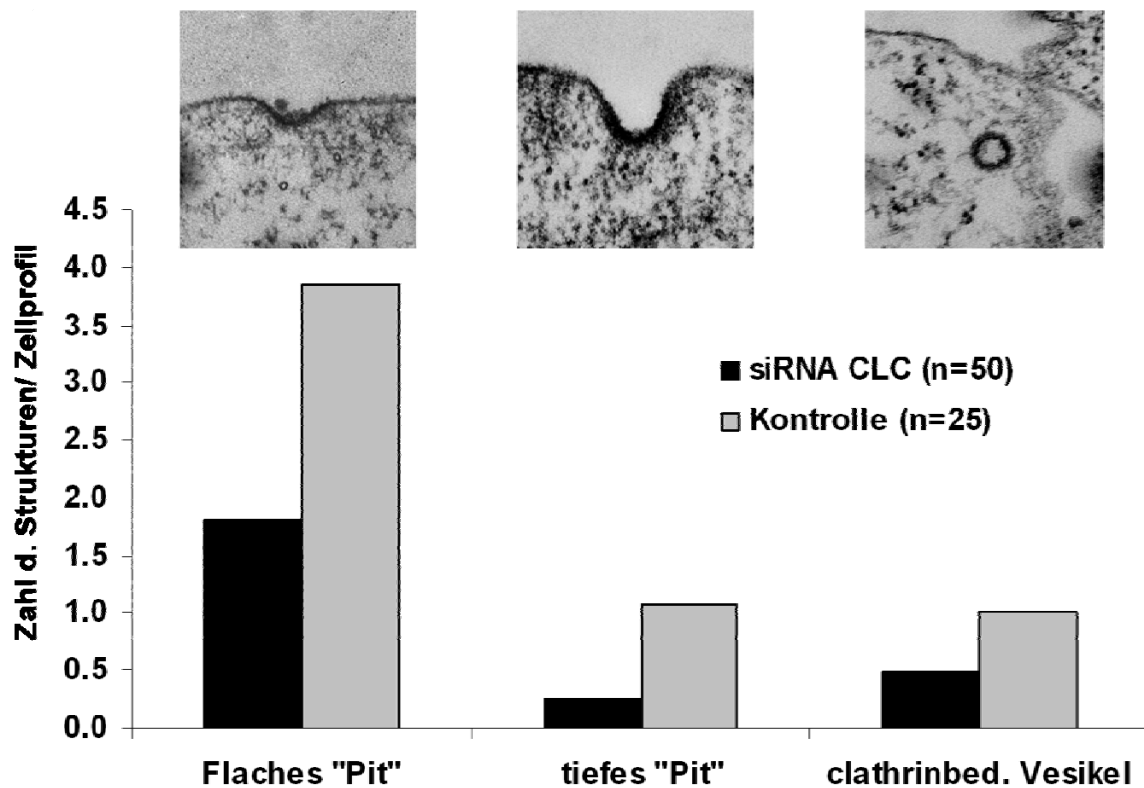
In einem gewählten Bereich (Beispiel siehe Abbildung 3.24) wurden die vollständig flachen Clathringitter und solche mit Invaginationen gezählt. N (analysierte Ausschnitte) = 5, Die Ausschnitte wurden nach Gleichheit in Zahl und Ausdehnung der analysierten Membranabschnitte ausgewählt. Der Anteil flacher Strukturen nimmt in Abwesenheit der leichten Ketten stark zu.

Das Aktinzytoskelett ist besonders empfindlich und nicht zuverlässig mit der verwendeten Methode darzustellen. Die Häufigkeit des Auftretens flacher Gitter korrelierte nicht mit dem Erhalt des Aktinzytoskeletts. Es scheint sich somit bei dem demonstrierten Phänotyp nicht um ein Präparationsartefakt zu handeln.

Um die gewölbten Clathrinnetze an der Plasmamembran mit einer anderen morphologischen Methode darzustellen, wurden Ultradünnschnitte von Kontrollzellen und solche ohne leichte Ketten angefertigt. Hierfür wurden die Zellen nach der Fixierung in Epon eingebettet, anschließend mit einem Ultramikrotom ultradünn (~700 Å) geschnitten, und dann kontrastiert (Details siehe Abschnitt 2 „Elektronenmikroskopie“). Wie in Abbildung 3.28 zu sehen, kann man im Querschnitt der Zellen Membraninvaginationen erkennen, die von einem

elektronendichten Saum umgeben sind. Hierbei handelt es sich um Clathrinbedeckte Einstülpungen.

**Abbildung 3.28**



**Abbildung 3.28: Elektronenmikroskopische Darstellung von Clathrin an der Plasmamembran im Ultradünnschnitt.**

Auf Deckgläsern gewachsene HeLa-Zellen wurden wie beschrieben transfiziert und nach 72 Stunden, wie in Simionescu & Simionescu et al. 1976 fixiert, eingebettet, geschnitten und kontrastiert. Die Präparate wurden im Elektronenmikroskop analysiert und die Zahl der flachen, tiefen und vollständig internalisierten Clathrinbedeckten Strukturen pro Zellprofil gezählt. In Abwesenheit der Clathrin leichten Ketten finden sich wesentlich weniger gekrümmte Clathringitter. Perfekt flache Clathrinstrukturen können mit dieser Methode nicht abgebildet werden.

Für die Auszählung wurden die Clathrinstrukturen in die Kategorien „flaches Pit“ tiefes Pit und clathrinbedecktes Vesikel eingeteilt. Die angegebenen Größen entsprechen der Anzahl der Strukturen pro Zellprofil. Vollständig flache Clathringitter konnten mit dieser Methode nicht erfasst werden, da sich die Kontrastierung bei flacher Membran nicht von der Umgebung abhebt. Als Ergebnis kann festgehalten werden, dass in Zellen mit herunterreguliertem CLC-Niveau deutlich weniger (jeweils mindestens 50%) Clathrin“pits“ zu finden sind. Der Anteil an tiefen Einstülpungen erscheint besonders klein in Zellen ohne Clathrin leichte Ketten. Die deutliche Verringerung von „Pits“ in der Querschnittbetrachtung der Zellen bestätigt die Beobachtung aus den vorangegangenen Experimenten, in denen in

„Ripp-off“-Experimenten ein Anstieg komplett flacher Clathrinstrukturen an der Plasmamembran und eine Verringerung des Auftretens von „Pits“ gezeigt werden konnte. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass mittels Licht- und Elektronenmikroskopie die Natur clathrinbedeckter Strukturen an der ventralen Seite der Plasmamembran genauer charakterisiert werden konnte. Hierbei wurde festgestellt, dass eine Depletion der Clathrin leichten Kette zu einer erhöhten Membranständigkeit einer Vergrößerung und einer Umverteilung der clathrinbedeckten Areale führt. Die Areale sind mehrheitlich flach langezogen und zum Teil leicht gekrümmt. Die Zahl beobachteter clathrinbedeckter Membraneinstülpungen nimmt deutlich ab.

### **Mikroinjektion von fluorochromiertem Clathrin**

In den vorangegangenen Abschnitten wurde ausführlich besprochen, welchen Einfluss die Clathrin leichte Kette auf die Expression der schweren Kette hat. Die erste Erkenntnis dabei war, dass die Herunterregulation der leichten Kette auch zu einer Verringerung der schweren Kette führt. Durch eine geeignete Transfektionsstrategie kann dieser Effekt minimiert, aber nicht verhindert werden (Abbildung 3.2). Desweiteren wurde gezeigt, dass eine Überexpression der schweren Kette nur in Ko-Überexpression der leichten Kette effektiv ist. Bei gleichzeitiger Depletion der Clathrin leichten Ketten durch siRNA war keine effiziente Expression möglich.

Zur Bestätigung der durch Transfektion von siRNA erhaltenen Phänotypen in der Verteilung der schweren Kette im Golgi-Apparat (Abschnitt 3.2) und an der Plasmamembran (Abschnitt 3.3) ist die Komplementation die beste Methode. Dabei musste allerdings nicht nur die herunterregulierte leichte Kette in den Zellen ersetzt werden, sondern auch die schwere Kette. Da eine Expression der Proteine nicht Erfolg versprechend war, wurde die Methode der Mikroinjektion gewählt. Hierzu wurde die aus Schweinehirn gereinigte Clathrin schwere Kette mit Alexa 488 Succinyl-Ester fluorochromiert und anschließend mikroinjiziert. So konnte durch die Anpassung der Mikroinjektionszeit und der Konzentration des injizierten Clathrins die Komplementation unter wesentlich kontrollierteren Bedingungen durchgeführt werden.

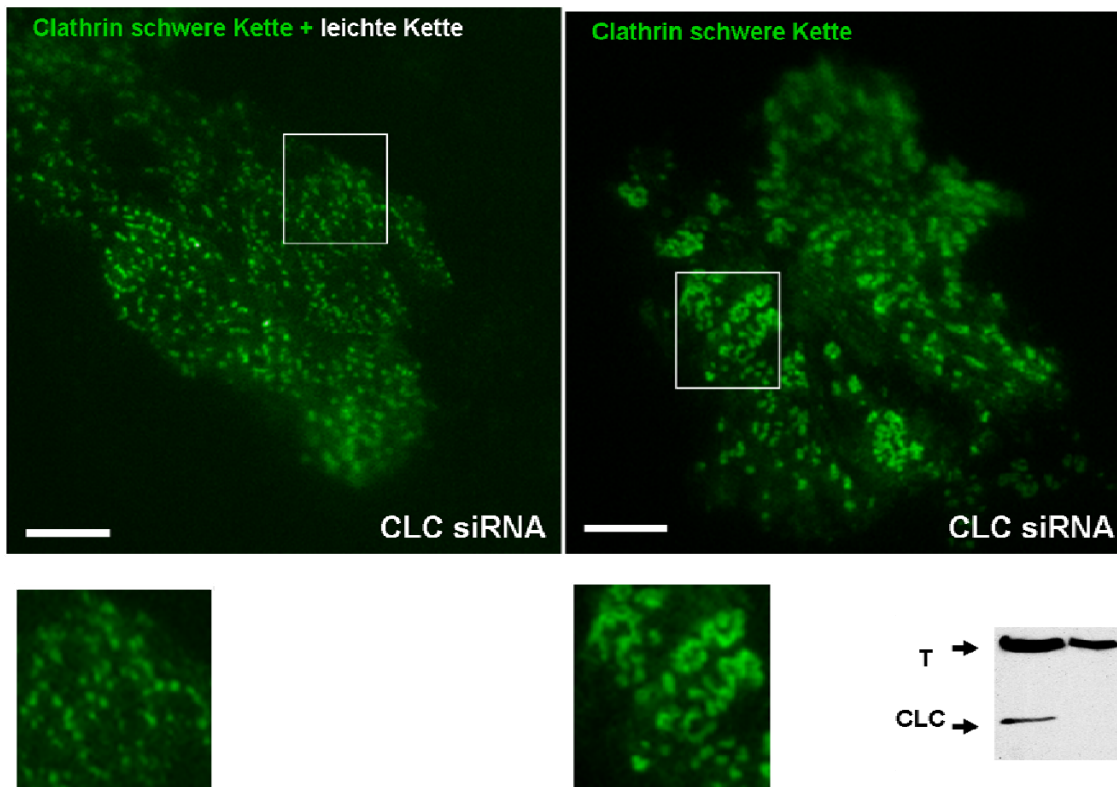
In Abbildung 3.29 A sind die Ergebnisse eines solchen Experiments dargestellt. Bei der verwendeten fluoreszenzmikroskopischen Methode handelt es sich um „TIRF“ (Total Internal Reflektion). Bei dieser Methode wird durch im kritischen Winkel eingestrahktes Licht an der Phasengrenze zwischen Glas-Objektträger und Zelle (in wässriger Lösung) ein

elektromagnetisches Feld erzeugt. Dieses Feld penetriert die Zellen nur bis zu 200 nm weit und regt so nur in diesem Bereich Fluorophore an. Dadurch gelingt es mit der TIRF-Methode ausschließlich Strukturen an der Plasmamembran darzustellen.

Die CLC-depletierten Zellen wurden 4 Stunden vor der Analyse mit fluorochromierter schwerer Kette allein oder zusammen mit der leichten Kette mikroinjiziert. Wie zu erkennen ist, stellt sich das Clathrin inklusive leichter Kette an der Plasmamembran gleichmäßig verteilt punktiert dar. Nach der Injektion der schweren Kette allein hingegen, kam es häufig zu stark vergrößerten Ansammlungen von Clathrin an der Membran. Die Form und Verteilung dieser Strukturen erinnert besonders an die in der Elektronenmikroskopie dargestellten Phänotypen (Abbildung 3.26 und 3.27). Auch hier sind die abnorm großen, wurmartigen Strukturen ungleichmäßig über die Ausdehnung der Zelle verteilt. Da mittels der TIRF-Mikroskopie die Plasmamembran nahezu exklusiv dargestellt werden kann, kann wie bei der Präparation der Membranen für die Elektronenmikroskopie davon ausgegangen werden, dass es sich um membranständige Strukturen handelt.

Um die Dynamik des Clathrins an der Plasmamembran genauer zu untersuchen, wurden Teile des Clathrins an der Membran selektiv mit einem Laser ausgebleicht und die Erholung der Fluoreszenz beobachtet (Fluorescence Recovery After Photobleach - FRAP).

Abbildung 3.29 A



B

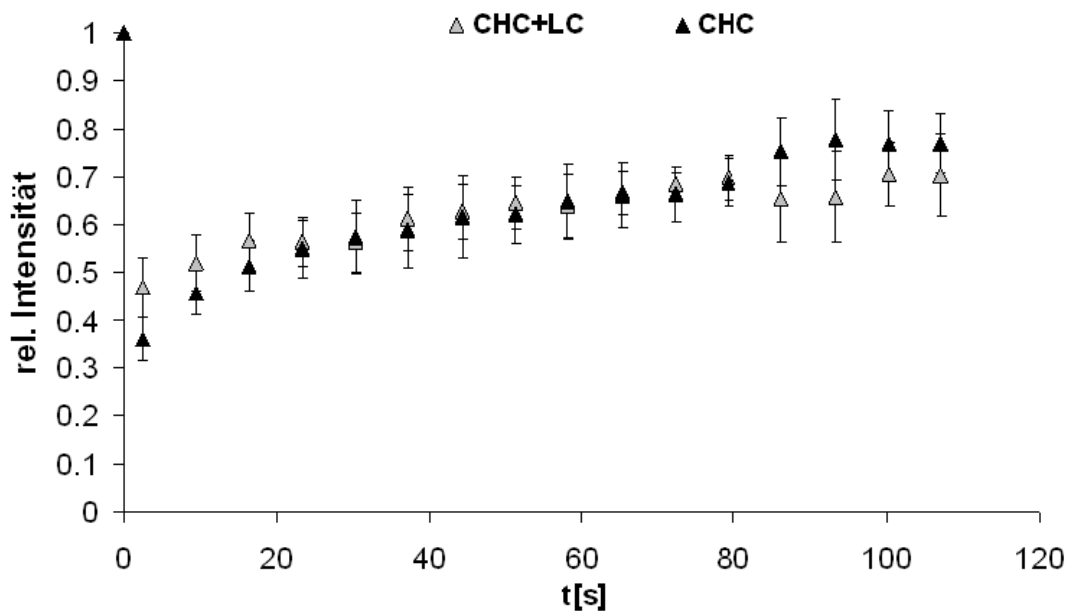


Abbildung 3.29 Mikroinjektion von fluorochromierter Clathrin schwerer Kette in CLC-depletierte Zellen – Plasmamembran.

In Glasbodenschalen kultivierte HeLa-Zellen wurden zweimal mit CLC-spezifischer siRNA transfiziert und 68 Stunden später mit Clathrin schwerer Kette, rekombiniert mit leichter Kette (links) oder mit schwerer Kette allein mikroinjiziert.



**A:** Die Zellen wurden nach vierstündiger Erholung in einem TIRF-Mikroskop analysiert. Die Qualität der Depletion der leichten Ketten wurde im Westernblot überprüft. In Zellen ohne leichte Ketten sammelt sich die Clathrin schwere Kette in stark vergrößerten Arealen (siehe vergrößerte Ausschnitte. Maßstabsbalken 20µm).

**B:** Mikroinjizierte Zellen wurden wie in „A“ beschrieben behandelt und dann in einem definierten Bereich mit einem Laser gebleicht. Die anschließende Erholung der Fluoreszenz wurde gemessen. Es fällt auf, dass es keinen Unterschied in der Erholung zwischen der schweren Kette allein und der mit leichten Ketten gibt. Für die Auswertung wurden je 10 Bleichexperimente aus mindestens vier verschiedenen Zellen durchgeführt.

Bei der Beobachtung der Erholung der Fluoreszenz konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Clathrin schweren Kette allein und der schweren Kette rekombiniert mit der leichten festgestellt werden (Abbildung 3.29 B). Es fällt auf, dass das Bleichen der Strukturen die Fluoreszenz des Clathrins nur auf etwa 40% der Ausgangsfluoreszenz reduziert hat. Um das stabile Fluorofor Alexa 488 vollständig zu bleichen, wäre eine wesentlich höhere Strahlendosis bei einer Wellenlänge von 488 nm notwendig gewesen. Diese Dosis, die durch mehrfaches Bleichen erzielt wurde, erwies sich allerdings für die Zellen als zu zytotoxisch. Weiterhin fällt auf, dass die Erholung relativ langsam ( $HWZ \approx 60$  Sekunden) und ungleichmäßig erfolgt. Die Erholung allein zeigt an, dass die Strukturen einem dynamischen Austausch von Clathrin mit der Umgebung unterliegen.

Mit dem in Abbildung 3.29 dokumentierten Experiment wurde der beobachtete Phänotyp der Vergrößerung der Clathringitter an der Plasmamembran in Abwesenheit der leichten Ketten bestätigt. Eine Erhöhung der Konzentration der schweren Kette in der Zelle (durch Mikroinjektion) führte zu einer starken Vergrößerung Clathrin-beschichteter Membranbereiche. Dieser Effekt konnte durch Beifügen der leichten Ketten aufgehoben werden. Der Phänotyp erfüllt somit das Kriterium der Komplementierbarkeit.

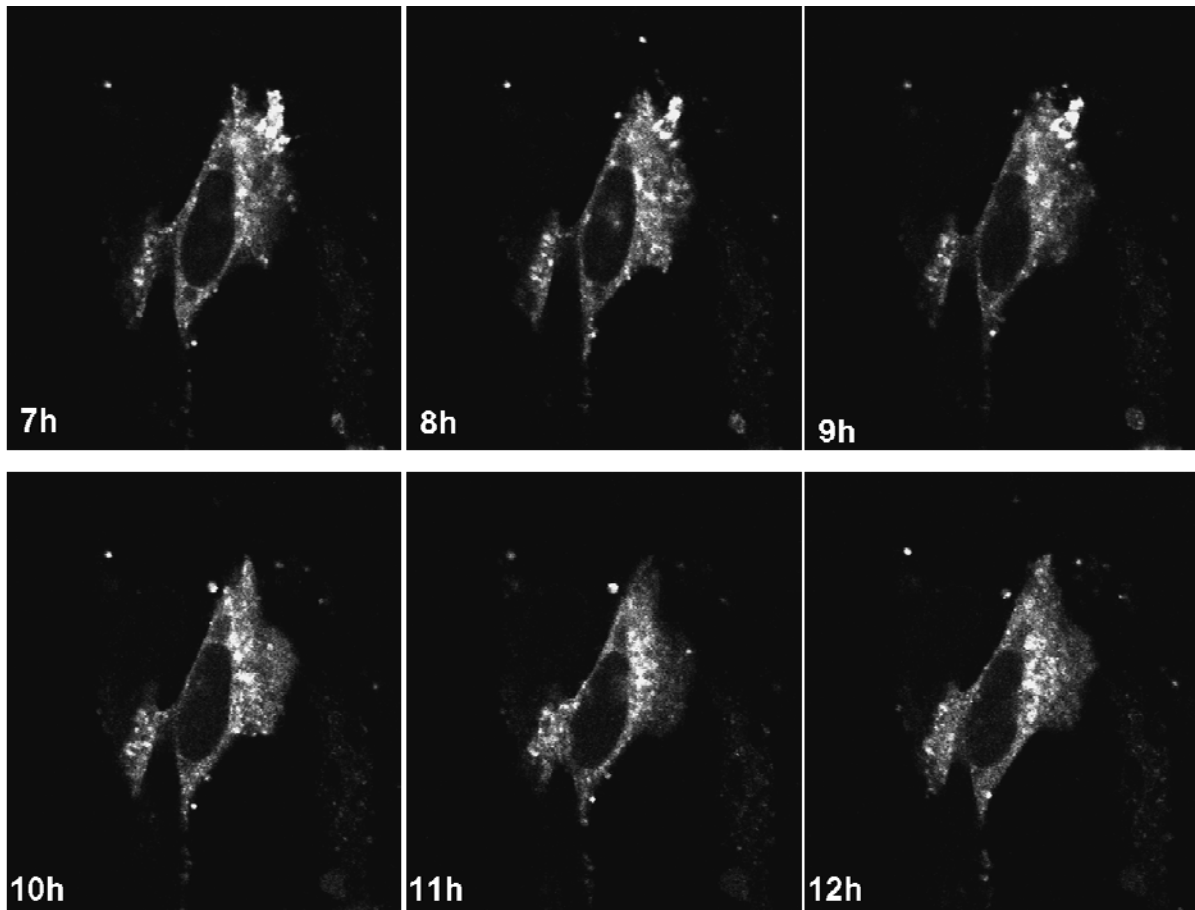
Wie in Abschnitt 3.2 beschrieben, sind auch das TGN und endosomale Kompartimente in Abwesenheit der leichten Kette verändert. In den Experimenten zu Abbildung 3.29 konnte auch bei Mikroinjektion fluorochromierten Clathrins der Phänotyp der breiteren, aggregierten Verteilung in der Zelle beobachtet werden. Allerdings konnte bei Ko-Mikroinjektion der leichten Kette mit der schweren Kette die typische perinukleäre Verteilung des TGNs nicht wiederhergestellt werden. Da in den beschriebenen Experimenten nach der Injektion eine feste Erholungszeit von vier Stunden eingehalten wurde, musste die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass die „Erholung“ der Clathrinverteilung in diesem Bereich länger dauert. Um den zeitlichen Verlauf der Clathrinverteilung im Golgi-Apparat zu verfolgen, wurden die Zellen nach der Mikroinjektion in einem konfokalen „Live-Cell“-Mikroskop mit

Autofokusfunktion untersucht. Diese Untersuchung ermöglichte es, einzelne, mikroinjizierte Zellen in der gewünschten Fokusebene über viele Stunden hinweg zu untersuchen.

Als Beispiel für den Verlauf der Umverteilung von Alexa 488-schwerer Kette, rekonstituiert mit leichten Ketten ist in Abbildung 3.30 ein sechsständiger Ausschnitt dargestellt.

Die Injektion des Clathrins führte zunächst zu Aggregaten, die sich breit über die Zelle verteilten. Etwa 10 Stunden (+/- 1,5 Stunden) nach der Mikroinjektion beginnen sich die Aggregate aufzulösen. Gleichzeitig sammeln sich Clathrinhaltige Strukturen im perinukleären Bereich und zeigen eine Verteilung wie sie für Clathrin in dieser Region typisch ist (siehe z.B. Abbildung 3.11, Kontrollzellen). Aus diesem Ergebnis kann geschlossen werden, dass die Organisation des TGN wieder dem von Kontrollzellen entspricht.

**Abbildung 3.30**

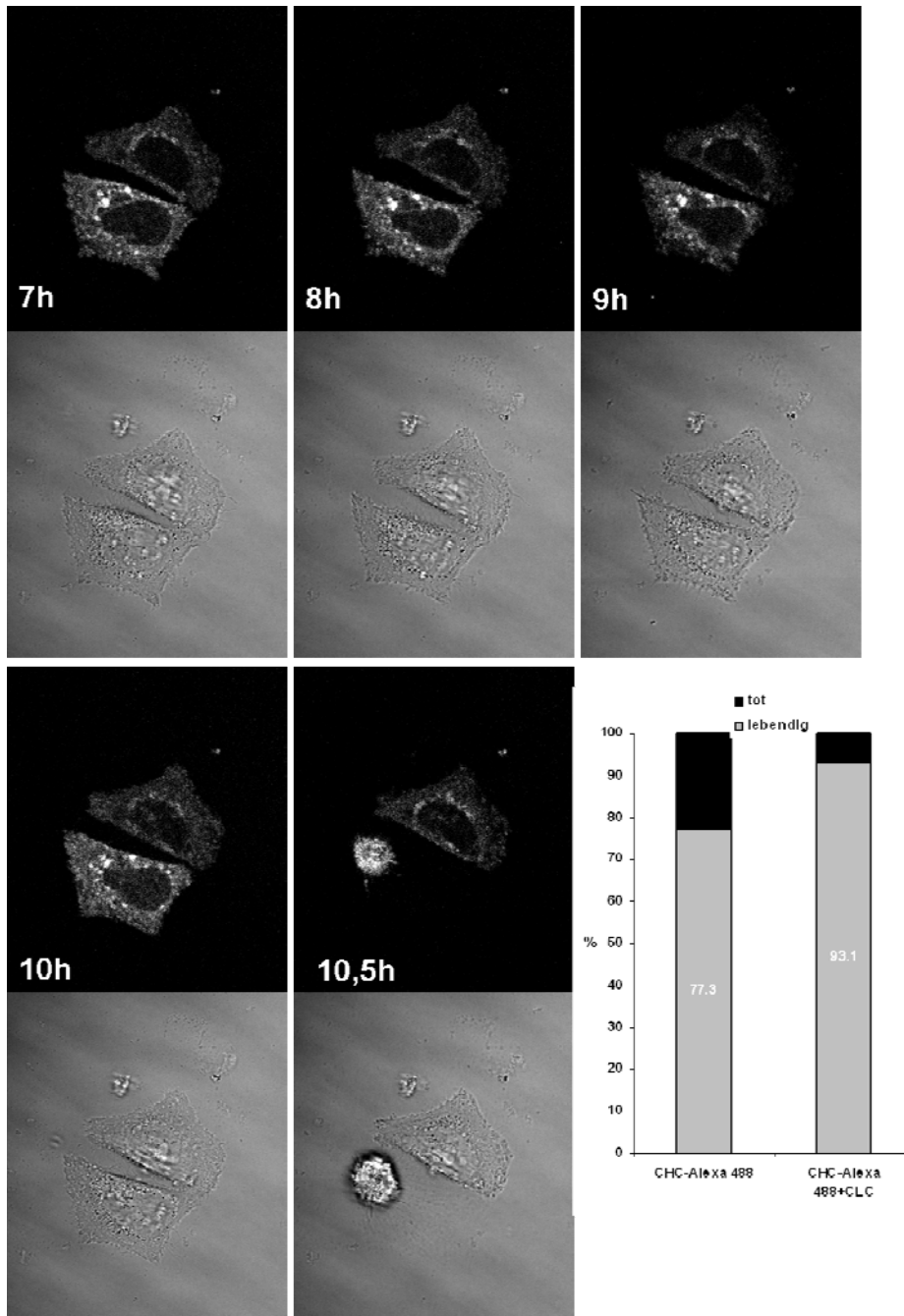


**Abbildung 3.30 Mikroinjektion von fluorochromierter Clathrin schwerer und leichter Kette in CLC-depletierte Zellen**

In Glasbodenschalen kultivierte HeLa-Zellen wurden zweimal mit CLC-spezifischer siRNA transfiziert und nach 68 Stunden mit Clathrin schwerer Kette, rekombiniert mit leichter Kette, mikroinjiziert. Die Erholung der Zellen wurde in einem konfokalen „Live-Cell“-Mikroskop analysiert. Die anfängliche atypische, breite und aggregierte Lokalisation

des fluorochromierten Clathrins (CHC+CLC) wandelt sich nach längerer Erholung (etwa 12 Stunden) in die typische perinukleäre Verteilung.

**Abbildung 3.31**



**Abbildung 3.31 Mikroinjektion von fluorochromierter Clathrin schwerer Kette allein in CLC-depletierte Zellen – TGN.**

In Glasbodenschalen kultivierte HeLa-Zellen wurden zweimal mit CLC-spezifischer siRNA transfiziert und 68 Stunden später mit Clathrin schwerer Kette mikroinjiziert. Die Erholung der Zellen wurde in einem konfokalen „Live-Cell“-Mikroskop analysiert.

Die Menge der mikroinjizierten schweren Kette variierte und führte bei der Injektion der schweren Kette allein zu einer erhöhten Todesrate der Zellen innerhalb eines Zeitraums zwischen 4 bis 18 Stunden nach der Mikroinjektion. Die Todesrate nach Injektion des

Komplexes aus CHC und CLC war nur etwa ein Drittel so hoch. In den meisten beobachteten Zellen verteilte sich die schwere Kette auch nach längerer Erholung atypisch.

Die Injektion von schwerer Kette allein führte in den meisten Zellen nicht zu einer Ausbildung der typischen Verteilung des Clathrins. Vielmehr entstanden größere Aggregate ohne größere Änderung in Größe und Lokalisation (Abbildung 3.31). Es ist gut zu erkennen, dass mit der Technik der Mikroinjektion trotz konstanter Parameter wie Injektionszeit und Druck die Menge an mikroinjiziertem Clathrin von Zelle zu Zelle variiert. Entsprechend fielen die gebildeten Aggregate des Clathrins in den Zellen unterschiedlich groß aus. Die Konzentration für die Mikroinjektion wurde in Vorversuchen auf eine minimale Lethalität hin titriert. Wie in Abbildung 3.30 zu sehen war es den Zellen in Anwesenheit der leichten Kette häufig möglich, auch große Mengen mikroinjizierten Clathrins zu verteilen. Die Zahl der Zellen, die sich, wie in Abbildung 3.31 zu sehen, abrunden und in Apoptose gehen, war bei der Injektion der Clathrin schweren Kette allein dreimal so hoch wie bei mitinjizierter leichter Kette. Für die Statistik wurden aus den Zeitreihenaufnahmen die vitalen Zellen vier Stunden nach der Mikroinjektion und 18 Stunden nach der Mikroinjektion bestimmt. So sollte vermieden werden, dass Zellen, die aufgrund des mechanischen Stresses durch die Injektion in den Zelltod gehen, mit erfasst werden. Bei der Auswertung der einzelnen Bilderserien wurden zum Teil, besonders in den Serien immer wieder auch Zellteilungen beobachtet wurden. Es wurde sowohl nach der Injektion von schwerer Kette allein, als auch nach Injektion des Komplexes aus leichter und schwerer Kette Teilungen beobachtet. Die Zahl der aufgenommenen Ereignisse ist allerdings zu klein, um sie statistisch auswerten zu können.

## **Untersuchungen zur Funktionalität von GFP-CLC**

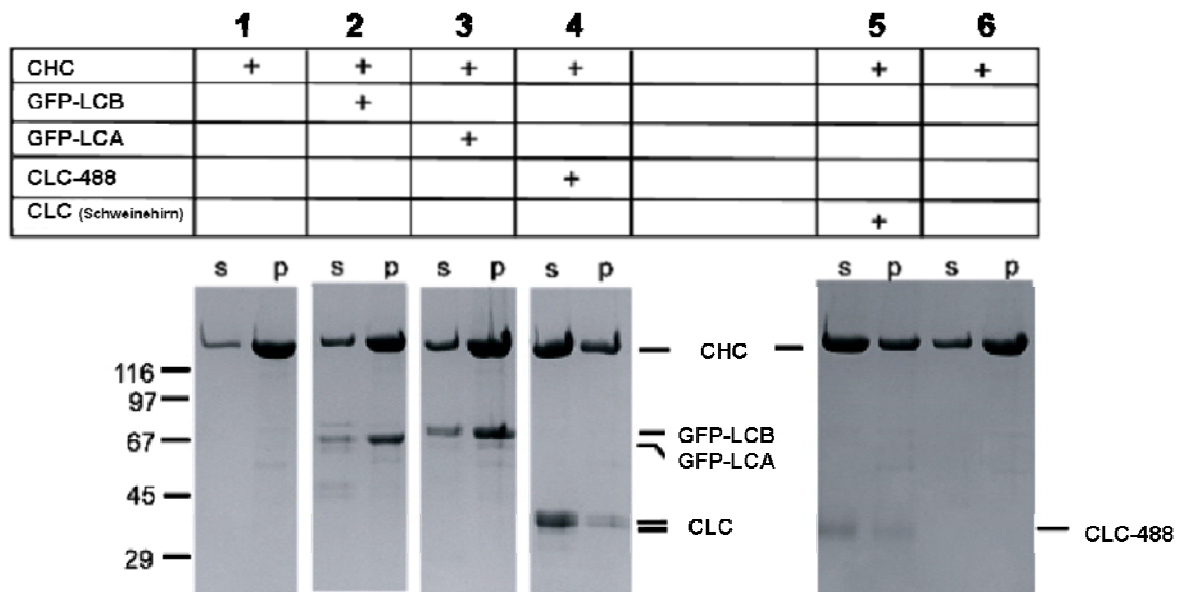
Im vorangegangenen Abschnitt wurde Clathrin mittels Mikroinjektion von fluorochromierter Clathrin schwerer Kette allein oder mit leichten Ketten, in CLC-depletierten Zellen dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass die schwere Kette in Abwesenheit der leichten Kette an der ventralen Plasmamembran stark vergrößerte Strukturen ausbildet. Die Umorganisation des TGN das zusammen mit Endosomen weit über die Zelle verteilt ist, stellt sich hier auch verstärkt dar. Beide Phänotypen konnten durch die Mikroinjektion des intakten Clathrins (schwere und leichte Kette) aufgehoben werden. Somit wurde gezeigt, dass die beschriebenen Änderungen des Verhaltens der schweren Kette in Abwesenheit der leichten Kette, direkt auf das Fehlen der regulatorischen Funktion der leichten Ketten zurückzuführen ist. Die transiente oder auch stabile Expression von Fusionsproteinen aus GFP (oder

andersfarbigen Derivaten) und Clathrin leichten Ketten stellt eine Standardmethode zur Visualisierung von Clathrin in der Fluoreszenzmikroskopie dar. Aufbauend auf die Möglichkeit, die Dynamik des Clathrins in der lebenden Zelle zu beobachten, haben sich verschiedene Ansätze zur Charakterisierung dieser Dynamik etabliert (Ellenberg et al. 1999, Rappoport et al. 2008). Entscheidend hierbei sollte sein, dass das verwendete Konstrukt selbst die Eigenschaften des Clathrins in der Zelle nicht verändert.

Im Folgenden soll eine funktionelle Analyse des GFP-CLC-Konstruktes *in vitro* und *in situ* stehen. Der klassische Ansatz bei der Verwendung des Konstruktes ist die Überexpression unter Kontrolle eines CMV-Promotors. Reinigt man Clathrin aus stabil GFP-CLC exprimierenden Zellen auf und trennt seine Komponenten in der SDS-PAGE auf, so zeigt sich dass neben den rekombinanten GFP-CLC auch noch endogene leichte Ketten vorliegen (Dannhauser et al. 2006; Hoffmann et al. 2010). Somit lässt sich festhalten, dass bei der Charakterisierung von GFP-CLC-Konstrukten immer die Dynamik des Gemisches aus endogenen und rekombinanten leichten Ketten dargestellt wird. Dieses gewinnt besonders an Bedeutung, wenn es darum geht, isoformspezifische Unterschiede zu verifizieren, oder den Einfluss von Mutationen auf diesem Weg zu untersuchen. Für die Charakterisierung wurden die GFP-CLC (Isoform A und B) in das pGEX-6P-Vektorsystem kloniert, mit dessen Hilfe sie als GST-GFP-CLC Fusionsproteine in Bakterien exprimiert werden können. Nach der Aufreinigung mit Hilfe des fusionierten GST-Proteins, wurde selbiges durch die Verwendung einer spezifischen Protease (Precision-Protease<sup>TM</sup>) abverdaut und die rekombinanten GFP-CLC chromatographisch gereinigt. Anschließend konnten sie mit gereinigten Clathrin schweren Ketten komplexiert werden. Dieser Komplex wurde für „Assembly“-Experimente verwendet (Abbildung 3.31). Wie bereits gezeigt wurde, beeinflussen die Clathrin leichten Ketten das Polymerisationsverhalten der schweren Ketten auch in lebenden Zellen (siehe z.B. Abbildung 3.19, 3.25 und 3.29). Diese negativ-regulierende Eigenschaft der leichten Ketten wurde bereits *in vitro* beschrieben (Ungewickell&Ungewickell et al. 1991). Zur genaueren Charakterisierung der GFP- sowie der fluorochromierten leichten Ketten, wurden Zusammenlagerungsexperimente durchgeführt. Hierbei wurde die Clathrin schwere Kette allein, oder mit verschiedenen leichten Ketten rekombiniert durch Dialyse gegen den „Assembly“-Puffer zur Zusammenlagerung gebracht. Die so entstandenen Clathrinkäfige können mittels Ultrazentrifugation pelletiert und so vom unpolymerisierten Clathrin abgetrennt werden. Anschließend kann durch Vergleich des Überstands (s) mit dem Pellet (p) der Anteil des zusammengelagerten Clathrins bestimmt werden. In Abbildung 3.31 ist das Ergebnis von Zusammenlagerung unter Einfluss verschiedener leichter Ketten dargestellt. In

den Ansätzen 1 und 6 sind jeweils Zusammenlagerungen von schweren Ketten allein zu sehen. Der größte Anteil des Clathrins (CHC) findet sich hier zusammengelagert im Pellet, da die inhibitorische Wirkung der leichten Ketten fehlt. In Spur 4 und 5 ist ihr hemmender Effekt hingegen zu sehen.

**Abbildung 3.32**



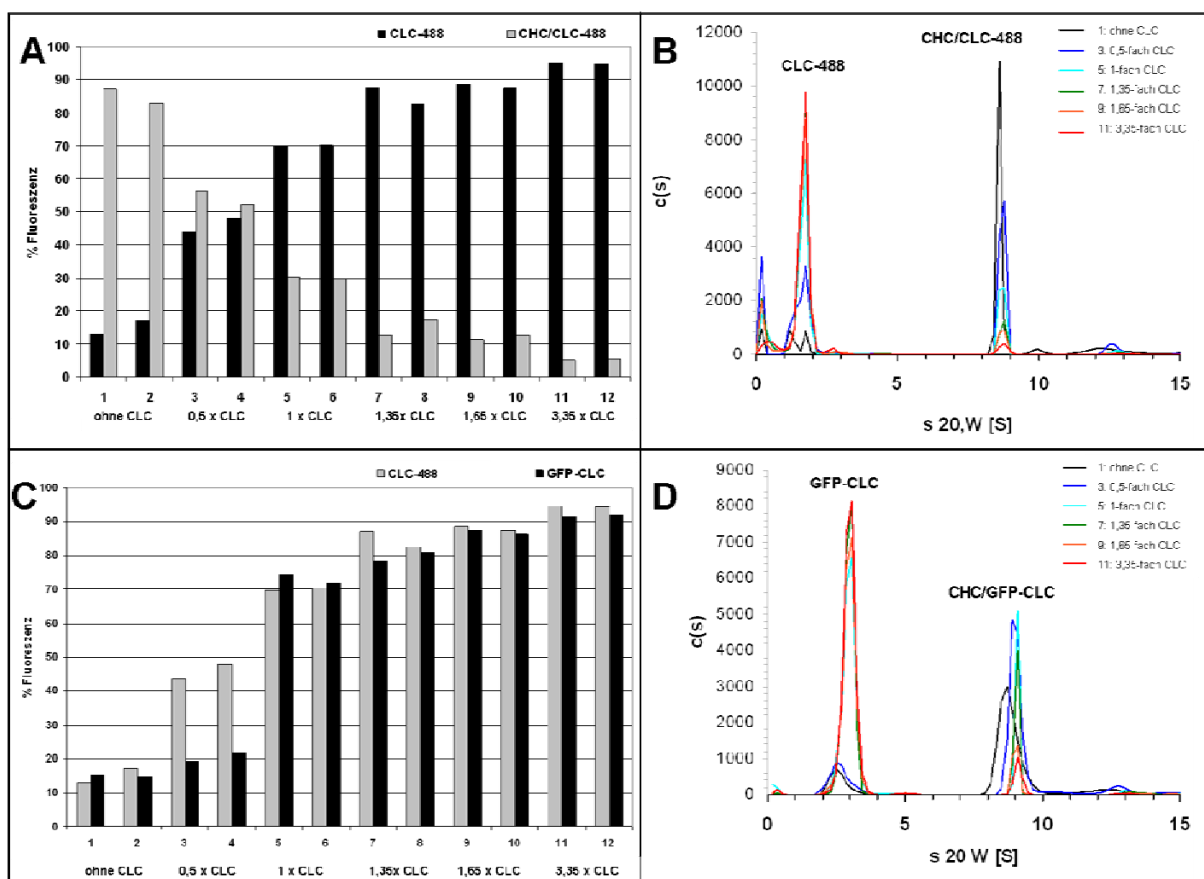
**Abbildung 3.32 Einfluss der Clathrin leichten Ketten auf die Zusammenlagerung von Clathrin in Käfige.**

Clathrin schwere Kette(CHC), aufgereinigt aus Schweinehirn wurde allein (Ansätze 1+ 6) oder rekombiniert mit verschiedenen Clathrin leichten Ketten (Ansätze 2-5) über Nacht gegen „Assembly“-Puffer A (+Ca<sup>2+</sup>) dialysiert. Am nächsten Tag wurde zusammengelagertes Clathrin durch Ultrazentrifugation abgetrennt. Die pelletierten Clathrinkäfige (p) und der Überstand (s) wurden mit SDS-Puffer versetzt, in gleichen Volumina denaturiert und mittels SDS-PAGE und Coomassiefärbung analysiert. In Abwesenheit der Clathrin leichten Ketten (Ansätze 1+6) lagert sich der größte Teil der schweren Kette zusammen. In Anwesenheit von GFP-LCA oder GFP-LCB (Ansätze 2+3) findet ebenfalls die Zusammenlagerung mit ähnlicher Effizienz statt. Im Gegensatz dazu inhibieren unbehandelte(CLIC) und fluorochromierte (CLC-488) die Zusammenlagerung deutlich (Ansätze 4+5). CLC, CLC-488: LCA und B, Schweinehirn; GFP-LCA: human, nicht-neuronale Isoform; GFP-LCB: bovin, neuronale Isoform.

Die unmarkierten leichten Ketten, sowie die mit Alexa 488 fluorochromierten CLC inhibieren die Zusammenlagerung, so dass der größere Teil des Clathrins unpolymerisiert im Überstand (s) verbleibt. Im Gegensatz dazu findet sich bei Zugabe der GFP-CLC (Ansatz 2, GFP-LCB und Ansatz 3 GFP-LCA) der größte Anteil im Pellet. Offenbar scheinen die GFP-leichten Ketten die Zusammenlagerung des Clathrins *in vitro* nicht signifikant zu hemmen.

Ein weiteres Charakteristikum der leichten Ketten ist ihre hoch affine Bindung an die schwere Kette. Die Bindungskonstante beträgt minimal  $K_B = 10^7 \text{ M}^{-1}$  und wurde sogar auf  $K_B = 10^{10} \text{ M}^{-1}$  postuliert (Ungewickell et al. 1983; Winkler et al. 1983). Zur Analyse des Bindungsverhaltens der fluorochromierten- sowie der GFP-leichten Ketten wurden in Zusammenarbeit mit PD Dr. Uthe Curthe (Institut f. Biophysikalische Chemie, MHH) Kompetitionsexperimente durchgeführt. Hierbei wurde eine konstante Menge fluoreszierender CLC (CLC-488 oder GFP-CLC mit ansteigenden Mengen unmarkierter leichter Ketten vermischt und zur Bindung mit einer konstanten Menge schwerer Kette inkubiert. Die Gemische wurden in einer Ultrazentrifuge mit Fluoreszenzdetektion analysiert. Die unmarkierten leichten Ketten wurden jeweils im Doppelansatz (Ansätze 1-12) in 0; 0,5; 1; 1,35; 1,65; 3,35 - fachen molaren Überschuss eingesetzt.

**Abbildung 3.33**



**Abbildung 3.33 Analyse der Kompetition von CLC-488 und GFP-CLC jeweils mit unbehandelten leichten Ketten in der Ultrazentrifuge**

Clathrin schwere Kette (CHC), aufgereinigt aus Schweinehirn, wurde mit Mischungen von unmarkierten leichten Ketten mit fluoreszierenden Clathrin leichten Ketten (aus dem Schweinehirn und mit Alexa 488 markiert oder rekombinant fusioniert mit GFP exprimiert, A und B 1:1 gemischt) in ansteigendem molaren Verhältnis, rekombiniert. Anschließend wurden die Ansätze in einer Konzentration von  $0,2 \mu\text{M}$  (schwere Kette) bei 50.000 upm in einer

analytischen Ultrazentrifuge analysiert. Der Verlauf der Konzentrationen wurde durch Detektion der Fluoreszenz, angeregt bei 488 nm, verfolgt.

Es wurden jeweils Doppelansätze analysiert: 1+2: ohne unmarkierte CLC, 3+4: 0,5 facher Überschuss unmarkierter CLC, 5+6: einfacher Überschuss unmarkierter CLC, 7+8: 1,35-facher Überschuss unmarkierter CLC, 9+10: 1,65-facher Überschuss unmarkierter CLC, 11+12: 3,35-facher Überschuss unmarkierter CLC.

**A:** Verteilung der Fluoreszenz freier, 488-markierter leichter Ketten (CLC-488) und des Komplexes aus schwerer und markierter leichter Kette (CHC/CLC-488) jeweils im Doppelansatz. Bei ansteigendem Anteil an unmarkierter leichter Kette (ansteigende Probennummer) sinkt die Fluoreszenz des schneller sedimentierenden Komplexes. Die der langsamer sedimentierenden freien CLC-488 steigt hingegen.

**B:** Überlagerung der korrigierten Sedimentationsprofile der fluoreszierenden leichten Ketten (Auftragung: S-W-20 gegen die Konzentration) bei verschiedenen Anteilen unmarkierter leichter Ketten. Das Konzentrationsmaximum bei niedrigen s-werten (etwa 1,8) repräsentiert die freien fluorochromierten leichten Ketten (CLC-488). Das zweite Maximum (etwa 8,8) zeigt den Komplex aus schwerer und leichter Kette an (CHC/CLC-488). Die Verteilung der gebundenen und ungebundenen CLC-488 verändert sich, wie in A dargestellt mit Zugabe der unmarkierten leichten Ketten.

**C:** Vergleich der Anteile von freien CLC-488 und GFP-CLC bei Kompetition mit ansteigenden Mengen unmarkierter leichter Ketten in der analytischen Ultrazentrifuge. Während die fluorochromierten leichten Ketten gleichmäßig von den unmarkierten leichten Ketten verdrängt werden, ist die Verdrängung der GFP-CLC bei substöchiometrischem Anteil (0,5-facher Überschuss) unmarkierter CLC deutlich schlechter (Ansätze 3+4, 0,5xCLC). Möglicherweise liegt ein kooperatives Bindungsverhalten der GFP-CLC mit der CHC vor.

**D:** Überlagerung der korrigierten Sedimentationsprofile der GFP- leichten Ketten (Auftragung: S-W-20 gegen die Konzentration) bei verschiedenen Anteilen unmarkierter leichter Ketten. Das Maximum der freien GFP-leichten Ketten (GFP-CLC) liegt bei höheren s-Werten (etwa 3). Auch das Maximum des Komplexes aus CHC und GFP-CLC (CHC/GFP-CLC) ist leicht zu höheren s-Werten verschoben. Seine Position verschiebt sich außerdem in Abhängigkeit zum Anteil der unmarkierten CLC. Das Verhältnis der Maxima der einzelnen Sedimentationskurven spiegelt die Verdrängung der GFP-CLC aus dem Komplex mit der schweren Kette durch die unmarkierten leichten Ketten wider.

In Abbildung 3.33 A ist das aus den Fluoreszenzintensitäten ermittelte Verhältnis der Banden der sedimentierenden Spezies, freie leichte Kette und der Komplex aus schwerer und leichter Kette dargestellt. Mit zunehmender Menge unmarkierter leichter Ketten (CLC) werden die fluoreszierenden leichten Ketten aus dem Komplex mit den schweren Ketten verdrängt. Die Fluoreszenzintensität der Komplexbande (CHC/CLC-488; grau) nimmt ab, wohingegen die der freien leichten Ketten zunimmt (CLC-488; schwarz). In Abbildung 3.32 B sind die Konzentrationen der fluoreszierenden Spezies als Funktion der Sedimentation aufgetragen. Hierfür wurde der Kurvenverlauf der Sedimentationen nach ihrer Position abgeleitet ( $ds/dx$ ) und für Standardbedingungen ( $H_2O$ ,  $20^\circ C$ ) korrigiert. Die Kurve besitzt zwei Maxima, von denen jenes bei niedrigen S-Werten ( $S_{w20} = 1,8$ ) die freien leichten Ketten repräsentiert. Der Komplex aus schweren und leichten Ketten hat einen höheren S-Wert ( $S_{w20} = 8,6$ ). Das



Verhältnis der Höhen der beiden Maxima je eines Ansatzes (Farbe) zeigt das Verhältnis von freien und gebundenen fluoreszierenden leichten Ketten an. Wie in Abbildung 3.32 zu sehen ist, ist der Verlauf der Verdrängung der CLC-488 aus dem Komplex gleichmäßig. Jedoch fällt auf, dass bei einfachem Überschuss (Ansätze 5 und 6), bei dem fluoreszierende und unmarkierte leichte Ketten in gleichen Mengen vorliegen, mehr als die Hälfte der fluoreszierenden leichten Ketten aus dem Komplex verdrängt wurden. Die Fluoreszenz des Komplexes ist kleiner als 50% der Gesamtfluoreszenz (Fluoreszenz freier und im Komplex CHC/CLC gebundener leichter Ketten). Daher kann angenommen werden, dass die Affinität der fluorochromierten leichten Ketten geringer ist als die der unmarkierten. Eine genauere Bestimmung der Affinität gelingt beim Vergleich aller Ergebnisse der Titration mit den theoretisch berechneten Ergebnissen. Dabei kann man sich auf die Annahme stützen, dass alle eingesetzten Spezies der leichten Ketten die gleiche Art der Bindung an die schwere Kette eingehen. Wären die Affinitäten aller Spezies (fluorochromiert und unmarkiert) gleich hoch, so müsste die Abnahme der Fluoreszenz des Komplexes in dem Maße abnehmen, in dem die Konzentration der unmarkierten leichten Ketten zunimmt. Aus der Abweichung der realen Fluoreszenz des Komplexes zu dem theoretischen Wert lässt sich das Verhältnis der Affinitäten der beiden Spezies abschätzen.

Diese Schätzung ergab etwa den Faktor 3. Das bedeutet für die Bindungskonstanten der leichten Ketten:  $K_{B,CLC} = \sim 3 \cdot K_{B,CLC-488}$ . Die fluorochromierten CLC binden also etwa 3 mal schlechter an die schwere Kette als die unmarkierten CLC. Bei einer Affinität von  $K_B > 10^7$  ist dieser Faktor vernachlässigbar klein.

Die GFP-leichten Ketten wurden auf die gleiche Weise analysiert. In Abbildung 3.33 C ist der Anteil der freien GFP-CLC (A und B wurden zur Analyse 1:1 gemischt) und der CLC-488 bei ansteigender Menge unmarkierter leichter Ketten aufgetragen. Die Menge beider Spezies nimmt zu, woraus geschlossen werden kann, dass GFP-CLC wie auch die CLC-488 von den unbehandelten CLC aus dem Komplex mit der schweren Kette verdrängt wurden. Beim Vergleich des Anteils der verdrängten GFP-CLC fällt auf, dass bei Zugabe von 0,5-fachem Überschuss CLC (Abbildung 3.33 C, Ansätze 3 + 4) wesentlich weniger GFP-CLC frei vorliegen als fluorochromierte CLC. Im darauf folgenden Titrationspunkt (Ansätze 5 + 6) entspricht die Menge allerdings der der fluorochromierten. Die Verdrängung der GFP-CLC von der schweren Kette verläuft also ungleichmäßig. Diese Abweichungen könnten auf ein anderes Bindungsverhalten hinweisen.

Die Auftragung der Änderung der Konzentration der Spezies in Abhängigkeit zur Sedimentationsgeschwindigkeit (Abbildung 3.32 D) ergibt wieder zwei Maxima, die den

vorkommenden Spezies, freie GFP-CLC und CHC/GFP-CLC, zugeordnet werden können. Das Maximum der freien GFP- leichten Ketten liegt nicht exakt bei einem S-Wert ( $S_{w20} = 1,7- 2,1$ ). Mit zunehmender Konzentration der freien GFP-CLC nimmt der S-Wert leicht zu. Auch die Sedimentation des Komplexes ändert sich mit fortschreitender Verdrängung der GFP-CLC durch die unmarkierten CLC aus dem Komplex ( $S_{w20} = 8,7-9,1$ ). Zusätzlich zeigt sich, dass der „Peak“ umso breiter ist, je mehr GFP-CLC noch im Komplex verblieben ist (geringerer Anteil an unbehandelten CLC).

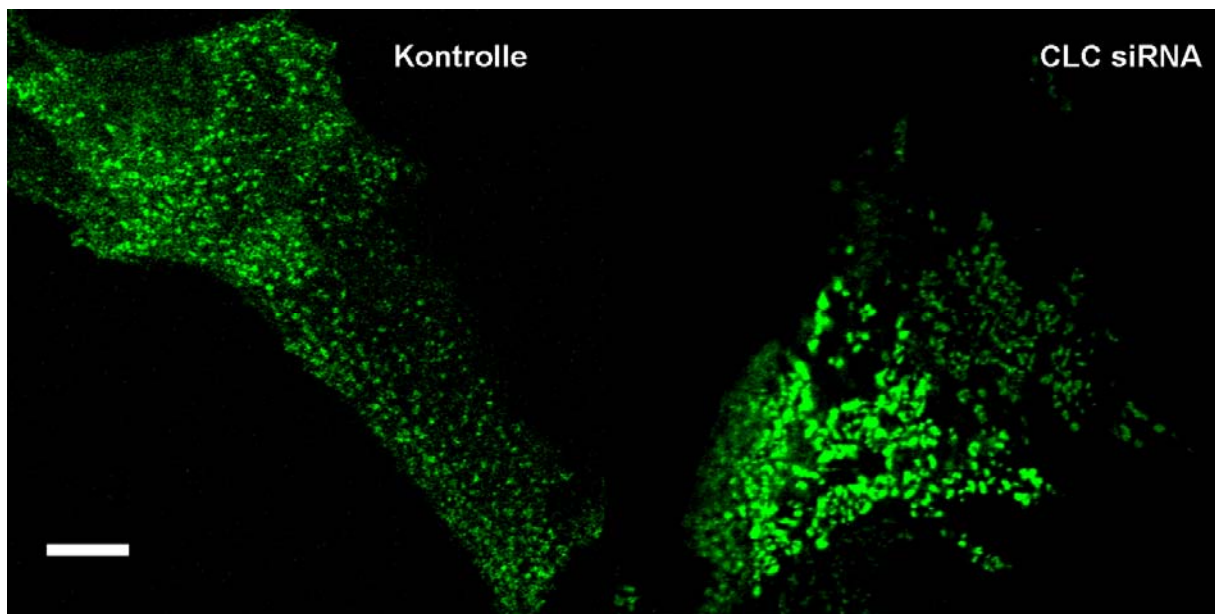
Die Erhöhung des S-Wertes der freien GFP-CLC kann durch das größere Molekulargewicht erklärt werden. Die Änderung des Sedimentationsverhaltens mit zunehmender Konzentration könnte ein Hinweis auf intermolekulare Interaktion (Dimerisierung) der GFP-CLC sein.

Die Verbreiterung der „Peaks“ die dem Komplex der leichten Ketten mit der schweren Kette zuzuschreiben ist, ist wiederum ein Zeichen für eine veränderte Konformation des Komplexes in Anwesenheit der GFP-CLC. Die Tatsache, dass der Komplex schneller sedimentiert je höher der Anteil der unmarkierten leichten Kette wird - wobei das Molekulargewicht abnimmt ( $M_{GFP-CLC} > M_{CLC}$ ), könnte sich durch eine Verringerung des hydrodynamischen Radius erklären lassen.

Es konnte somit biochemisch und biophysikalisch gezeigt werden, dass sich die GFP-CLC in ihren Eigenschaften deutlich von den nativen und den fluorochromierten CLC unterscheiden. Allein sind sie nicht, wie die anderen leichten Ketten, in der Lage die Zusammenlagerung des Clathrins in Käfige zu inhibieren (Abbildung 3.31) und weichen sowohl im Bindungsverhalten als auch in ihrem Einfluss auf die hydrodynamischen Eigenschaften des Clathrinmoleküls von den nativen CLC ab (Abbildung 3.33).

Die Fusionskonstrukte sollen nun im Weiteren in lebenden Zellen vor dem Hintergrund eines CLC-„knock downs“, also ohne die Durchmischung mit endogenen CLC, dargestellt werden. Hierzu wurden Zellen zweimal mit siRNA gegen CLC, bzw. Kontroll-siRNA transfiziert und ca. 72 Stunden später mit dem beschriebenen Komplex aus schwerer Kette und GFP-leichter Kette mikroinjiziert. Nach einer Erholungsphase von mindestens 4 Stunden wurden die Zellen in der Fluoreszenzmikroskopie analysiert.

**Abbildung 3.34**

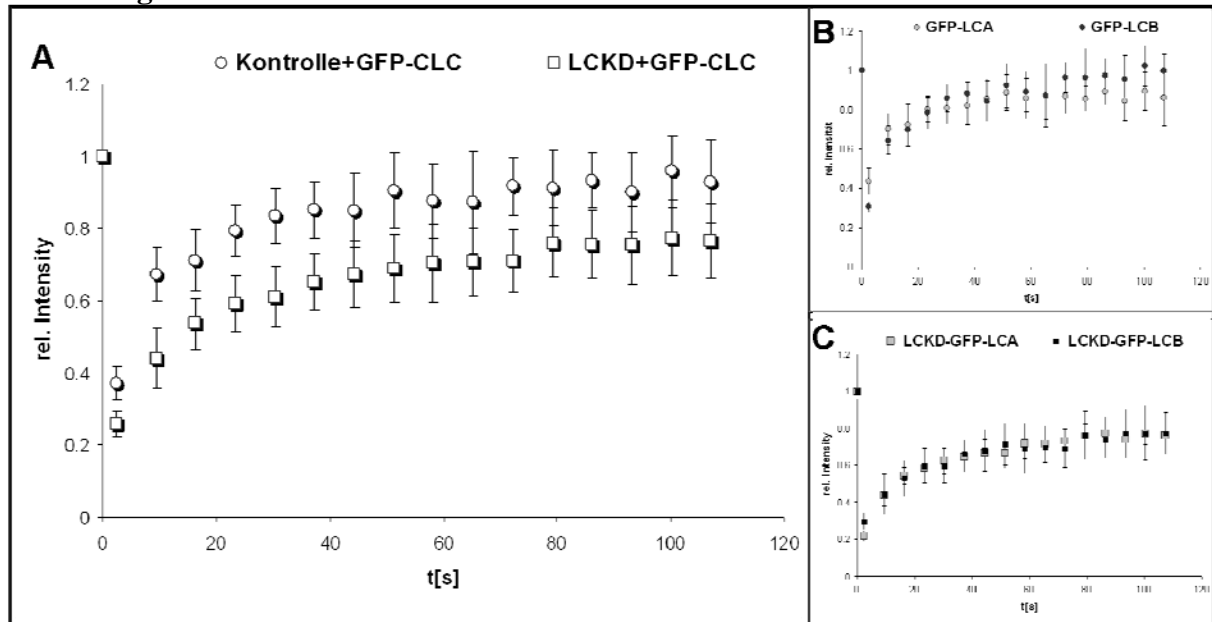


**Abbildung 3.34 Mikroinjektion von GFP-LCB komplexierter Clathrin schwerer Kette in HeLa-Zellen.**

In Glasbodenschalen kultivierte HeLa-Zellen wurden zweimal mit Kontroll- oder CLC-siRNA transfiziert und nach 68 Stunden mit Clathrin schwerer Kette, rekombiniert mit GFP-LC mikroinjiziert. Nach einer vierstündigen Erholung wurden die Zellen in einem konfokalen Lasermikroskop analysiert. In Zellen die mit Kontroll-siRNA transfiziert wurden, stellt sich das GFP-Clathrin in seiner typischen Verteilung dar. In CLC-depletierten Zellen finden sich besonders an der Plasmamembran stark vergrößerte Clathrinareale. Maßstabsbalken 20µm.

Die Mikroinjektion von Clathrin schwerer Kette komplexiert mit GFP-LCB zeigt ein unterschiedliches Verhalten in Abhängigkeit von der Expression endogener leichter Ketten (Abbildung 3.33). Zellen, die zur Kontrolle transfiziert wurden und die folglich noch Clathrin leichte Ketten exprimieren, zeigen eine normale Verteilung (Vergleiche Abbildung 1.7). In Zellen, deren Expression endogener leichter Ketten herunterreguliert wurde, ist die Clathrinverteilung an der Plasmamembran mehrheitlich größer. Die Strukturen ähneln den vergrößerten, wurmartigen Clathrinarealen, in nicht-injizierten, CLC-depletierten Zellen. Hinzu kommt die Beobachtung, dass in Kontroll-Zellen neben den Strukturen an der Membran auch zytosolisches GFP-Clathrin als Hintergrund sichtbar ist, während sich in CLC-depletierten Zellen häufig kein solcher Hintergrund in den Zellen zeigt. Ein vergleichbares Bild ergab sich bei der Injektion von GFP-LCA, rekombiniert mit schwerer Kette. Das offensichtlich veränderte Verhalten des Clathrins, dass ausschließlich aus schwerer Kette und GFP-leichten Ketten besteht, wurde wie bereits für Abbildung 3.29 beschrieben, mittels „FRAP“-Experimenten analysiert. Die Erholung der in Kontrollzellen injizierten Komplexe ähnelt stark dem Verhalten von exprimierten GFP-CLC (Abbildung 3.35 „B“). Es kann kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Isoformen festgestellt werden.

**Abbildung 3.35**



**Abbildung 3.35 FRAP nach Mikroinjektion von Clathrin schwerer Kette mit GFP-CLC in CLC-depletierte Zellen.**

In Glasbodenschalen kultivierte HeLa-Zellen wurden wie beschrieben transfiziert und 68 Stunden später mit Clathrin schwerer Kette, rekombiniert mit GFP- leichter Kette Isoform A, oder B, mikroinjiziert. Nach vierstündiger Erholung wurden die Zellen in definierten Bereichen mit einem Laser gebleicht und die Erholung der Fluoreszenz in diesen Bereichen beobachtet (FRAP). Die Fluoreszenzintensität wurde relativ zur Ausgangsintensität in Abhängigkeit zur Zeit in Sekunden aufgetragen. Für jede Messkurve wurden zehn Einzelmessungen durchgeführt.

**A:** Vergleich der Erholung der Fluoreszenz in selektiv gebleichten Arealen (FRAP) von GFP-CLC-Strukturen vor dem Hintergrund endogener Clathrin leichter Ketten („Kontrolle+GFP-CLC“) und in CLC-depletierten Zellen („LCKD+GFP-CLC“).

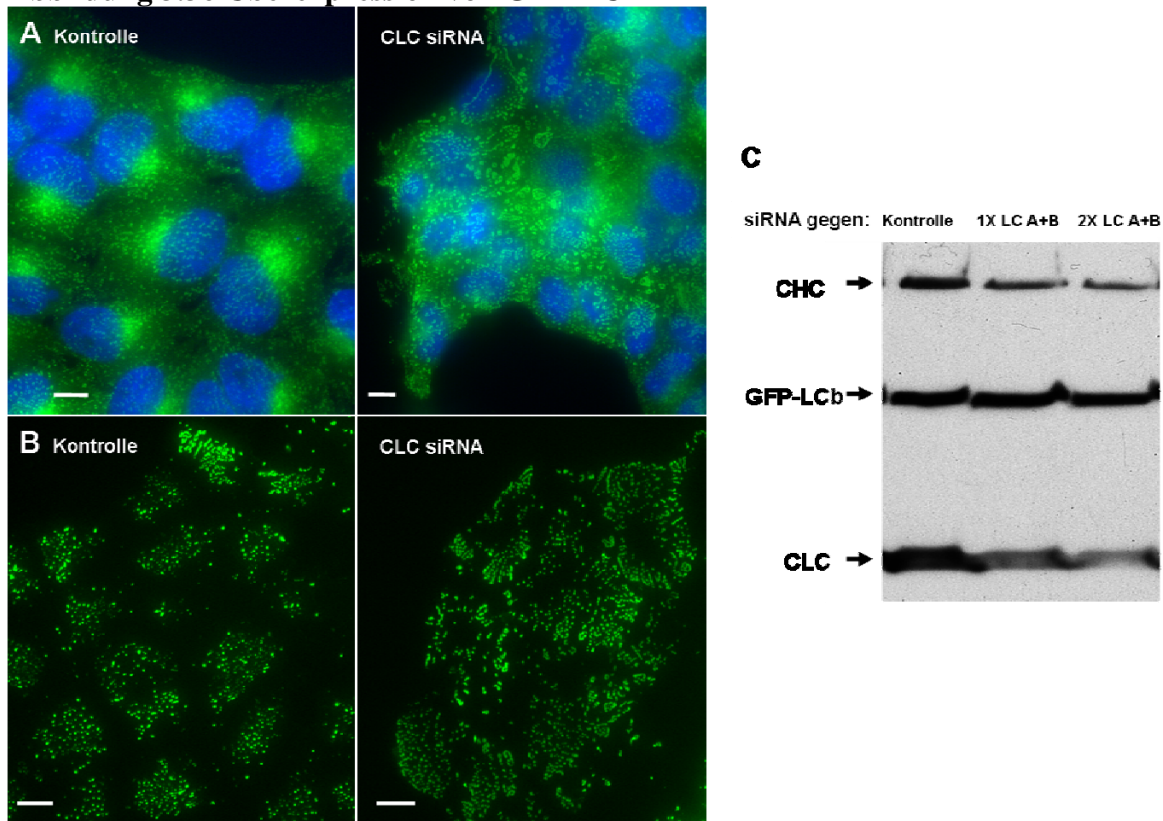
**B:** Fluoreszenzerholung von Clathrin – GFP-LCA und GFP-LCB in HeLa-Zellen vor dem Hintergrund endogener leichter Ketten.

**C:** Fluoreszenzerholung von Clathrin – GFP-LCA („LCKD-GFP-LCA“ und „LCKD-GFP-LCB“ in HeLa-Zellen ohne endogene leichte Ketten (Depletion der CLC durch siRNA).

Es wurden keine isoformabhängigen Unterschiede bei FRAP-Experimenten bei vorhandenen endogenen Clathrin leichten Ketten (B) oder ohne (C) festgestellt. Beim Vergleich der Experimente mit und ohne leichte Ketten fällt ein stärkeres Ausbleichen und eine verringerte Erholung der GFP-CLC ohne endogene leichte Ketten auf (LCKD+GFP-CLC).

Auch die Analyse derselben Komplexe nach Mikroinjektion in CLC-depletierte Zellen (Abbildung 3.35 „C“) ergab keinen sichtbaren Unterschied im Verhalten der beiden Isoformen. Allerdings scheinen Bleichen und Erholung der GFP-CLC von der Anwesenheit der endogenen leichten Ketten in den Zellen abhängig zu sein. Es fällt ein stärkeres Ausbleichen und eine verringerte Erholung der GFP-CLC ohne endogene leichte Ketten auf (Abbildung 3.35 „A“).

**Abbildung 3.36 Überexpression von GFP-LCB**



**Abbildung 3.36 Stabile Expression von GFP-LCB in CLC-depletierten Zellen.**

GFP-LCB stabil exprimierende HeLa-Zellen wurden einmal oder zweimal mit CLC-spezifischer siRNA transfiziert und nach 72 Stunden analysiert. Auf Deckgläsern kultivierte Zellen wurden fixiert und im Fluoreszenzmikroskop analysiert (A). Ein Teil der fixierten Zellen wurde durch starkes Spülen vom Deckglas geblasen (B). C: Für die Westernblot-Analyse wurden die Zellen mit 3mM EDTA in PBS abgelöst, gezählt und in SDS-Probenpuffer lysiert. Für die Auftrennung der Proben in der SDS-PAGE wurden je gleiche Mengen an Zellen aufgetragen.

Es ist zu erkennen, dass GFP-LCB-Strukturen an der Plasmamembran in CLC-depletierten Zellen deutlich vergrößert sind (A+B). Der Unterschied im Verlust der schweren Kette (CHC) bei Depletion der endogenen leichten Ketten (CLC) erscheint geringer als bei der einfachen Transfektion der CLC-siRNA (vergleiche Abbildung 3.2) und unabhängig von der Transfektionsstrategie (C). Maßstabsbalken: 10µm

Nach der Analyse der GFP-CLC durch Mikroinjektion erscheint klar, dass eine Komplementation der Depletion der endogenen leichten Ketten durch Überexpression der GFP-CLC Konstrukte nicht funktionswiederherstellend wirken würde. In Abbildung 3.35 wurden HeLa-Zellen, die stabil bovines GFP-LCB exprimieren, mit siRNA gegen die CLC transfiziert. Aufgrund eines speziebedingten Basenaustausches in der Zielsequenz des LCB-Oligos ist dieses Konstrukt resistent gegen die Depletion durch die eingesetzte siRNA.

Der zu beobachtende Phänotyp großer Clathrinstrukturen an der Plasmamembran ist in allen analysierten Zellen zu sehen und zum Teil deutlich drastischer ausgeprägt als die Vergrößerung vollständig CLC-freier Gitter (Abbildung 3.35 A,B; vergleiche z.B. Abbildung

3.17). Die Art der Transfektion (einfach oder doppelt) war dabei unerheblich für die Ausprägung der Aggregate an der Plasmamembran. Die ausschließliche Darstellung der adherenten Plasmamembran (Abbildung 3.36 B) verdeutlicht den Phänotyp. Während in den Kontrollzellen lediglich vereinzelt vergrößerte Strukturen zu sehen sind, finden sich in den „knock down“ Zellen ausschließlich grobe, unregelmäßig verteilte Strukturen.

Die Analyse der Zellen im Westernblot (Abbildung 3.36 C) zeigt, dass die Expression des GFP-LCB-Konstrukts nicht von der Transfektion mit CLC-siRNA beeinträchtigt wurde. Während die unterschiedliche Abnahme der endogenen leichten Ketten (CLC) bei einfacher und doppelter Transfektion gut zu sehen ist, zeigt sich dieser Unterschied bei den schweren Ketten nicht deutlich. Sie geht in beiden Fällen etwa gleichermaßen verloren. Es scheint, dass die Komplementation der Depletion der leichten Ketten durch GFP-LCB den Einfluss der Transfektions-Art auf die Erhaltung der schweren Kette verringert.

## 4. Diskussion

Clathrin ist ein in Eukaryoten ubiquitär verbreitetes Protein, bestehend aus einem heterohexameren Komplex aus drei trimerisierten schweren Ketten, die je eine leichte Kette gebunden haben. Das Makromolekül ist für die Struktur und Funktion eines großen Teils endozytotischer Prozesse in diesen Zellen verantwortlich (McMahon et al 2009). Außerdem kann Clathrin an der mitotischen Spindel nachgewiesen werden, wo es für den Ablauf der Mitose von Bedeutung ist (Royle et al 2005).

Über die Rolle der Clathrin leichten Ketten gibt es bisher Erkenntnisse aus *in vitro* und *in vivo* –Studien. Es wurde gezeigt, dass die leichten Ketten negative Regulatoren der Zusammenlagerung des Clathrin in seine charakteristische Käfigstruktur sind (Ungewickell et al. 1991, Brodsky et al. 1991). Weiterhin konnte die Interaktion der leichten Ketten mit dem Aktinzytoskelett über assoziierte Proteine gezeigt werden (Übersicht siehe Kaksonen et al. 2006). Zuletzt wurde die Funktion der schweren und leichten Ketten in lebenden Zellen durch die Überexpression von GFP-CLC-Fusionsproteinen und die Dynamik der fluoreszierenden Prozesse charakterisiert (Mettlen et al. 2009, Saffarian et al. 2009). Ein weiterer Ansatz war der Einsatz von CLC-spezifischer siRNA zur Verringerung ihrer Expression und die anschließende Analyse vesikulärer Transportvorgänge. Hierbei konnten verschiedene Effekte auf die intrazelluläre Verteilung von Aktin, AP1 und den Mannose-Phosphat-Rezeptor nachgewiesen werden. Die Endozytose von Transferrin und EGF erscheint nicht beeinträchtigt (Huang et al. 2004; Poupon et al. 2008). In den bisherigen Untersuchungen zu den Funktionen der leichten Kette in lebenden Zellen wurde beim Einsatz von RNAi nie der direkte Einfluss der Depletion der leichten Ketten auf das Schicksal der schweren Kette untersucht.

Ziel dieser Arbeit war es, die Funktion der Clathrin leichten Ketten in der lebenden Zelle zu charakterisieren. Hierzu sollte die Expression der leichten Ketten mittels RNA-Interferenz herunterreguliert bzw. durch Überexpression verschiedener CLC – Fusionsproteine verändert werden. Die so manipulierten Zellen sollten mit unterschiedlichen Licht- und elektronenmikroskopischen Methoden sowie biochemischen molekularbiologischen Verfahren analysiert werden. Bei den Untersuchungen stand besonders der direkte Einfluss der veränderten Expression der CLC auf die Clathrin schwere Kette im Vordergrund.

## Expression von Clathrin

Zur Untersuchung der Expression von Clathrin wurden in HeLa-Zellen die Clathrin leichte und schwere Kette mittels RNAi depletiert, bzw. als GFP-Fusionsproteine überexprimiert. Die Westernblotanalyse der Expression von Clathrin nach Transfektion von CLC-siRNA zeigt die Herunterregulierung der Clathrin leichten Ketten. Außerdem geht mit der Depletion sukzessive auch die schwere Kette verloren (Abbildung 3.2). Wie in Abbildung 3.4 gezeigt werden konnte, ist die Expression der GFP-Clathrin schweren Kette von der Koexpression der leichten Kette abhängig. Auch verändert sie sich in Abwesenheit der endogenen leichten Ketten (Abbildung 3.4 C). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass mit der Reduktion der mRNA der leichten Ketten (durch RNAi) ebenfalls die der schweren Kette verloren geht (Abbildung 3.5). Offensichtlich ist dabei die Expression der schweren Kette abhängig von der der leichten und nicht die der leichten von der der schweren (Abbildung 3.3 D, 3.4 B, 3.5 „HCKD“). Durch Kontrollen und Sequenzanalysen kann ausgeschlossen werden, dass diese Abhängigkeit durch „Miss-targeting“ der verwendeten siRNAs zustande gekommen ist.

In den bisherigen Veröffentlichungen wurden verschiedene RNAi-Transfektionsstrategien verfolgt. Sowohl eine einfache Transfektion der Zellen und die anschließende Analyse nach 96 Stunden (Poupon et al. 2008), als auch eine Doppeltransfektion mit 48 stündigem Abstand und Analyse der Zellen nach 72 bzw. 96 Stunden (Saffarian et al. 2009, Mettlen et al. 2009) wurden angewendet. Die doppelte Transfektion in 24 stündigem Abstand und die anschließende Analyse der Zellen 72 Stunden nach der ersten Transfektion (Huang et al. 2004) wurde auch in dieser Arbeit angewandt.

Der Vergleich der Einfach- und Doppeltransfektionsstrategie im 24 Stundenintervall (Abbildung 3.2) verdeutlicht den Vorteil der Doppeltransfektion: Die Herunterregulierung der Expression der CLC bei doppelter Transfektion der siRNA ist schneller. Dies kann durch die Sättigung der Zellen mit siRNA erklärt werden, da durch die wiederholte Transfektion mehr siRNA in die Zellen gebracht wird. Im Gegensatz zur einfachen Transfektion folgt der Abfall des exprimierten Niveaus der CLC bei der Doppeltransfektion der bereits bekannten Halbwertszeit der leichten Ketten (~28 Stunden, Brodsky et al. 1985). Ein Restniveau von etwa 20% entspricht dem Ablauf von mehr als 2,5 Halbwertszeiten (~3 Tage). Es findet unter diesen Bedingungen also keine Neusynthese der leichten Ketten statt. Bei der einfachen Transfektion hingegen dauert die Verringerung auf das entsprechende Niveau länger (~96 Stunden, vergleiche Poupon et al. 2008), was auf einen Rest an CLC-Expression schließen lässt. Die Strategie der „Doppeltransfektion“ zur Verbesserung der „Knock-down“-Effizienz

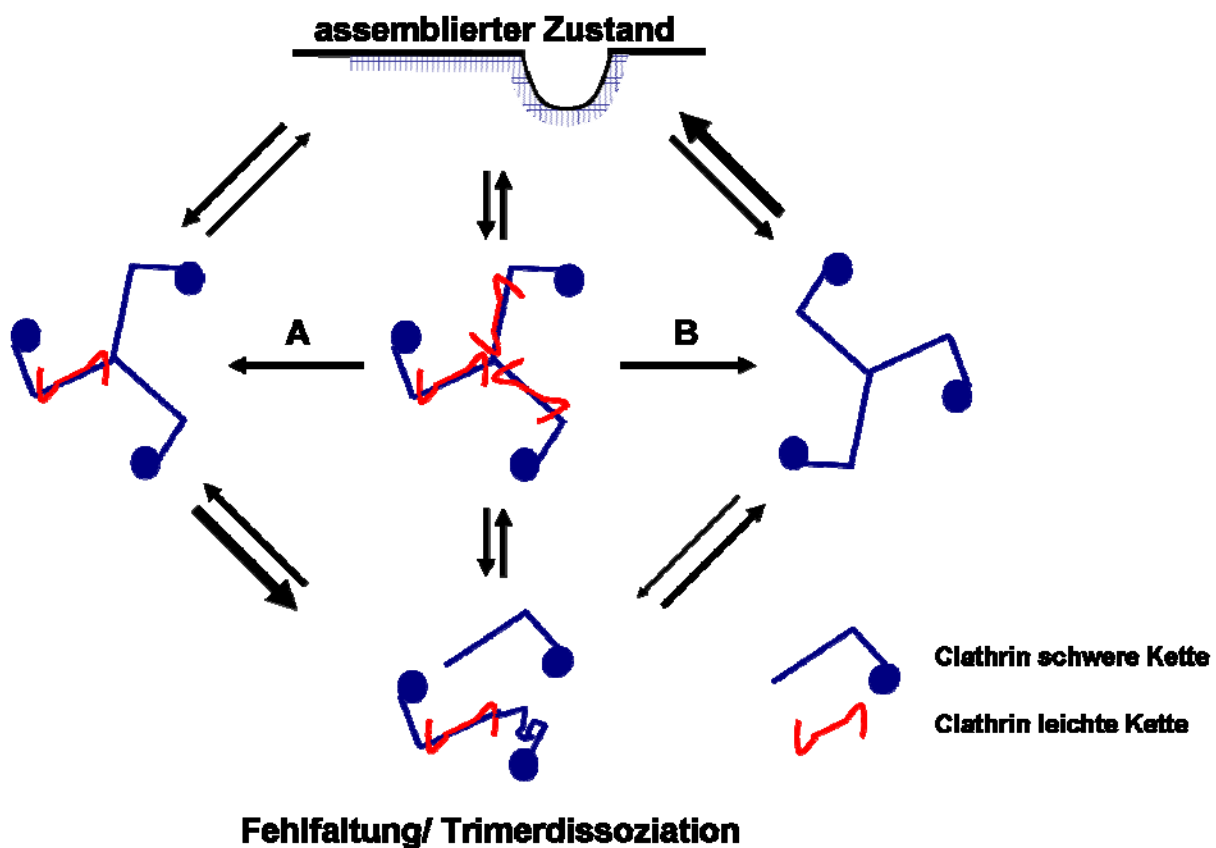


ist mittlerweile eine weit verbreitete Methode bei der Anwendung der RNAi. Neben der Effizienz ist auch das Ausmaß der Verringerung der Expression der schweren Kette abhängig von der Transfektionsstrategie (Abbildung 3.2, vergleiche A&C vs B&D). Die Stabilität der schweren Kette ist deutlich besser bei doppelter Transfektion in einem 24-stündigen Intervall. Möglicherweise liegt der Grund für diesen Effekt in der Protein-RNA- oder RNA-RNA-Regulation der Expression der CHC-mRNA. Für die Klärung dieses Sachverhalts wäre nicht nur, wie geschehen, die Bestimmung der mRNA-Menge der schweren Ketten bei Einsatz von CLC-siRNA (Abbildung 3.5) notwendig. Vielmehr müssten auch die Sequenz der untranslatierten Abschnitte der mRNA von schweren und leichten Ketten mit möglichen regulatorischen Abschnitten untersucht werden. Außerdem sollte untersucht werden, ob mikro RNAs in die Regulation der Expression der schweren Kette involviert sind. Die Sättigung der RISC (RNA-Induced-Silencing-Complex) mit den transfizierten siRNAs könnte dazu führen, dass endogene miRNAs nicht mehr prozessiert werden und somit die Expression der schweren Kette verändert wird.

Eine Erklärung für die bessere Erhaltung der schweren Kette bei schneller Verringerung des Anteils der leichten Ketten könnten die beobachteten vergrößerten Netzwerke an der Plasmamembran (Abbildung 3.19 und 3.25) und die Aggregate in breiter Verteilung in der Zelle (Abbildung 3.11) sein. Erfahrungsgemäß ist die Stabilität der schweren Kette im assemblierten Zustand (Käfige) größer. Dies ist plausibel, da das Netzwerk aus Clathrinmolekülen weniger Schnittstellen für Proteasen präsentiert (Maskierung durch Bindung) und die Trimerisierung der schweren Ketten durch die Fixierung der Triskelia im Polymer stabilisiert wird (Chen et al. 2005). Außerdem sinkt durch die Interaktion mit anderen schweren Ketten die Wahrscheinlichkeit einer spontanen Entfaltung und die in der Folge mögliche fehlerhafte Rückfaltungen der schweren Kette (Stabilisierung durch Interaktion). Übertragen auf den Zustand der schweren Kette in lebenden Zellen bedeutet dies, dass bei Reduktion der leichten Ketten die schwere Kette dann gut erhalten bleibt, wenn die das Assembly negativ regulierenden leichten Ketten quantitativ fehlen. Im Fall der einfachen Transfektion führt das Restniveau der leichten Ketten zu einer zumindest partiellen Inhibition der Assemblierung (und somit der Stabilisierung) der schweren Kette. Dies sorgt daher für eine schnellere Degradation der schweren Ketten, die bereits keine leichten Ketten mehr gebunden haben (Übersicht siehe Abbildung 4.1). Zu beweisen wäre diese Hypothese durch Messung der Halbwertszeit der schweren Kette unter den verschiedenen Transfektionsbedingungen. Es müsste sich eine kürzere Halbwertszeit bei einfacher Transfektion als bei doppelter Transfektion zeigen.

Bei der Durchführung eines „Pulse-Chase“ Experiments konnte allerdings in Abwesenheit der leichten Kette die schwere Kette nicht quantitativ immungefällt werden. Daher war keine Halbwertszeitbestimmung in Abwesenheit der leichten Ketten möglich. Die Probleme sind wahrscheinlich auf die erhöhte Aggregationsneigung der schweren Kette ohne leichte Kette zurückzuführen. Bei der Vorklärung der Zelllysate durch Zentrifugation ging so wahrscheinlich ein großer Teil der schweren Kette verloren.

**Abbildung 4.1**



**Abbildung 4.1 Effekt unterschiedlicher starker Depletion der leichten Ketten**

Durch unterschiedliche Transfektionsstrategien („A“ vs „B“) kommt es zur teilweisen Depletion („A“) oder zur nahezu vollständigen Depletion („B“) der CLC. Im Fall A wirken verbleibende leichte Ketten inhibitorisch auf die Zusammenlagerung der Triskelia in Gitter („assemblierter Zustand“). Durch das teilweise Fehlen der leichten Ketten werden die Triskelia jedoch destabilisiert und behalten mit geringerer Wahrscheinlichkeit ihre Faltung bei („Fehlfaltung/ Trimerdissoziation“). Die schwere Kette wird abgebaut. Im Fall B sorgt der geringere Anteil der CLC durch ihre quantitativere Depletion für eine Steigerung der Zusammenlagerung der schweren Kette. Dadurch sinkt der Anteil der freien Triskelia und es kommt zu weniger Fehlfaltung und Trimerdissoziation.

Zur Bestätigung des beobachteten Phänotyps wurden verschiedene Transfektionskontrollen sowie ein sogenanntes Komplementationsexperiment durchgeführt. Der Effekt des Verlustes

der schweren Kette bei Depletion der leichten Kette ist generell zelltyp- und speziesunabhängig (Abbildung 3.3 A). Hier zeigt sich auch, dass der dem Clathrin funktionell nahe stehende Bindungspartner AP2 nicht herunterreguliert ist, wie es auch bei der Herunterregulation der Clathrin schweren Kette nicht der Fall ist (Hinrichsen et al. 2003, Poupon et al. 2008). Der Verlust der schweren Kette ist nicht abhängig von der Herunterregulation einer einzelnen CLC-Isoform (Abbildung 3.3 B). Daher ist es sehr unwahrscheinlich, dass es sich um einen siRNA-spezifischen „Off-Target“- oder CLC-isoformspezifischen Effekt handelt. In diesem Zusammenhang wurde der direkte Einfluss der Depletion der leichten Ketten auf die Expression der schwere Kette bisher nicht in der Literatur beschrieben. Allerdings wurde bei der Präsentation der Ergebnisse in Form eines Posters (Dannhauser et al. 2008) von verschiedenen wissenschaftlichen Gruppen bestätigt, dass es zu einer Reduktion der schweren Kette bei Depletion der leichten Kette kommt (persönliche Gespräche mit P. McPherson und J. Chen, ASCB-Kongress 2008).

Der Ausgleich der durch CLC-siRNA reduzierten endogenen CLC durch Überexpression der siRNA-resistenten GFP-LCb (bovin, neuronale Variante) führte zu einer teilweisen Stabilisierung der Expression der schweren Kette (Abbildung 3.36). Auch hatte die Transfektionsstrategie (einfach/doppelt) keinen signifikanten Einfluss auf die Erhaltung der schweren Kette. Eine mögliche Erklärung ergibt die mikroskopische Analyse der komplementierten Zellen. Hier finden sich stark vergrößerte GFP-Clathrin-Aggregate an der Plasmamembran (Abbildung 3.36 A, B). Somit zeigt sich in lebenden Zellen, was vorangehend *in vitro* gezeigt werden konnte (Abbildung 3.32): die Fusion der CLC mit GFP führt dazu, dass die leichten Ketten die Zusammenlagerung des Clathrins nicht mehr hemmen (vergleiche auch Hoffman et al. 2010).

Nach der vorangehend formulierten Hypothese könnte die Steigerung der Zusammenlagerungsneigung des Clathrins durch alleinige Expression von GFP-CLC für eine verbesserte Erhaltung der schweren Kette sorgen. Dieses Ergebnis stützt auch die Annahme, dass unterschiedliche Transfektionsstrategien und die resultierenden unterschiedlichen Restmengen endogener leichter Ketten zu einer unterschiedlich guten Assemblierung/Erhaltung der schweren Kette führen. Auch zeigt sich hier, dass die Expression der GFP - leichten Ketten nicht vollständig den Verlust der endogenen CLC ersetzen kann. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass die Expression der leichten und schweren Ketten auf mRNA-Ebene (Wahrscheinlich in den untranslatierten Bereichen) in Abhängigkeit zueinander reguliert werden. Eine weitere Schlussfolgerung aus diesem Ergebnis ist, dass es

nicht zu einer vollständigen Depletion der endogenen leichten Ketten kommen muss, um die „assemblysteigernden“ Eigenschaften der GFP-CLC zur Ausprägung zu bringen.

Die Tatsache, dass die Expression der schweren Kette ebenfalls von der Koexpression der leichten Kette abhängt (Abbildung 3.4) ist ein Hinweis darauf, dass die Regulation der Expression von schwerer und leichter Kette auch auf Proteinebene stattfindet.

Die Immunpräzipitation von GFP-CHC-Fusionsproteinen (Abbildung 3.4 B) zeigt außerdem, dass sich die rekombinante schwere Kette zu Triskelia zusammenlagert, die endogene schwere Ketten und GFP-CHC enthalten.

Es ist bereits bekannt, dass die leichte Kette die Trimerisierung der schweren Kette unterstützt (Ybe et al. 2003). Für die erhöhte Stabilität von CHC in Gegenwart von CLC in Zellen gab es bereits Hinweise in der Literatur: Bei der Aufreinigung rekombinanter schwerer Kette aus Insektenzellen wurde die Koexpression von leichten und schweren Ketten beschrieben (Rappaport et al. 2007). Wahrscheinlich war diese Strategie für die Expression und Reinigung der schweren Kette erfolgreicher als die alleinige Expression der schweren Kette.

Die Verknüpfung der Expression von schwerer und leichter Kette erscheint auch plausibel, da die leichten Ketten, im Gegensatz zu den schweren Ketten, mit relativ geringen anabolen Ressourcen synthetisiert werden können. Da, wie im Ergebnisteil dargestellt, die Funktion der schweren Ketten entscheidend von den leichten Ketten beeinflusst wird, macht es Sinn, nur schwere Kette zu exprimieren, wenn genug regulatorische und zugleich stabilisierende leichte Ketten vorhanden sind. Tatsächlich wurde bei der Mikroinjektion der fluorochromierten schweren Ketten in Abhängigkeit zu den leichten Ketten festgestellt, dass in Abwesenheit von leichter Kette die Mortalität der Zellen deutlich ansteigt (Abbildung 3.31). Eine Erklärung für diese höhere Sterblichkeit der Zellen ist die Übersättigung der Zellen mit schwerer Kette. Das Bestreben zur Zusammenlagerung und die begrenzte Möglichkeit, dies in Assoziation zur Membran zu vollziehen, lässt die Clathrin schwere Kette wahrscheinlich zum Teil in den Zellen ausfallen und schädigt diese dadurch irreparabel.

Das mengenmäßige Verhältnis zwischen schwerer und leichter Kette wurde in der Literatur bisher unter anderem auch als substöchiometrisch beschrieben (Girard et al. 2005). Diese Beobachtungen konnte ich in HeLa-Zellen nicht machen. Vielmehr wurde eine ungefähre Stöchiometrie von 1:1 bestimmt (Hoffmann et al. 2010). Bezugnehmend auf die beschriebene Stabilitäts- und Expressionsabhängigkeit der schweren von der leichten Kette ist ein substöchiometrisches Verhältnis von CHC: CLC unplausibel. Tatsächlich ist sogar ein leichter Überschuss der leichten Ketten nicht unwahrscheinlich. Die aus den RNAi-Experimenten ermittelte Halbwertszeit der CLC sind vergleichbar mit den bereits beschriebenen (Brodsky et

al.1985). Auch in eigenen Pulse Chase Experimenten wurden Hinweise auf diese Halbwertszeiten gefunden (Daten nicht gezeigt). Die deutlich kürzere Halbwertszeit der leichten Ketten könnte durch einen konstitutiven Pool an zytosolischen leichten Ketten, die nicht an schwere Ketten gebunden sind, erklärt werden. Leichte Ketten sind unstrukturiert, sehr proteaseempfindlich und haben in ihrer freien Form mit großer Wahrscheinlichkeit eine geringere Halbwertszeit als in ihrer gebundenen. Plausibel ist auch, das zytosolische freie CLC freie Bindungsstellen an schweren Ketten (z.B. posttranslational entstanden, oder durch Dissoziation) im Zytosol sättigen um ihre Faltung zu stabilisieren.

Die Regulation der Genexpression von Clathrin wurde in Abhängigkeit von der Aktivierung des Androgenrezeptors beschrieben (Presscott et al. 1998). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass sowohl die Expression der schweren als auch der leichten Ketten-mRNA durch die Aktivierung des Androgenrezeptors steigerbar ist. Die Steigerung der CHC-mRNA-Expression verlief dabei anders als die der beiden leichten Ketten. Während die Verstärkung der CLC-Expression durch ein Androgen (Miboleron) erst signifikant nach 20 Stunden begann, zeigte die schwere Kette schon vorher eine geringe aber signifikante Erhöhung der Expression. Nach 20 Stunden erfuhr sie dann eine kontinuierliche Steigerung auf das fünffache des Ausgangswertes. Für die Expression der leichten Ketten wurde außerdem eine geringere Sensitivität für das eingesetzte Androgen beim Vergleich mit den schweren Ketten beschrieben.

Die erste, für meine Arbeit relevante Schlussfolgerung aus dieser Publikation ist, dass es eine Kopplung der Expression von leichter und schwerer Kette gibt. Sie könnte darin bestehen, dass beide Untereinheiten des Clathrins, leichte und schwere Ketten, unabhängig voneinander androgenabhängig exprimiert werden. Allerdings könnten die geringere Dosisabhängigkeit und der verzögerte Verlauf der Expression der leichten Ketten auch auf eine schwere Ketten-abhängige Expression der leichten Ketten hinweisen. Der in Prescott et al. gezeigte Abfall der kurzfristigen Überhöhung der schwere Ketten-mRNA Expression könnte durch Fehlen der Steigerung der leichten Ketten-mRNA-Expression zustande kommen. Diese Annahme wird auch durch die Tatsache gestützt, dass die Expression der schweren Kette auf Proteinebene (Prescott et al. 1998) dem Verlauf der Expression der CLC-mRNA ähnelt.

Die Tatsache, dass die Expression der mRNAs, stimuliert durch Androgene, für leichte und schwere Ketten unterschiedlich stark gesteigert wird (CLC: 2-fach; CHC: 5-fach), kann durch die unterschiedliche Länge der mRNAs erklärt werden. Die mRNA der humanen CHC-mRNA (CLTC-1; human) ist etwa 7,5-mal so lang wie die der leichten Ketten (CLTA, CLTB; human). Bei gleicher Translationsgeschwindigkeit ergibt sich ein etwa dreifacher Überschuss

der leichten Ketten zu den schweren. Berücksichtigt man außerdem, dass die Isoformen A und B auf individuellen Genen kodiert sind und somit parallel exprimiert werden, verdoppelt sich sogar dieser Überschuss.

Die Daten der vorliegenden Dissertation weisen ebenfalls auf eine Abhängigkeit der Expression der schweren und leichten Kette. Auch hier zeigt sich, dass die schwere Kette auf mRNA und Proteinebene in Abhängigkeit zur leichten exprimiert wird (Abbildung 3.2; 3.4 und 3.5). Allerdings wurde nicht gezeigt, dass die Expression der schweren Kette die Expression der leichten Kette stimulieren kann. Um dieses zu testen, müsste die komplette mRNA der schweren Kette (inklusive untranslatierter Bereiche) in Zellen überexprimiert und dann die Expression der leichten und schweren Ketten analysiert werden. Durch selektive Expression und Mutation der untranslatierten Bereiche könnte so der regulatorisch aktive Teil der mRNA bestimmt werden.

Die Tatsache, dass die rekombinante Expression der schweren Kette in Koexpression einer rekombinanten leichten Kette effizient verläuft (Abbildung 3.4 B, Rappoport et al. 2007), könnte ein Hinweis darauf sein, dass die leichte Kette bereits bei der Translation der schweren Kette und ihrer gleichzeitigen Faltung benötigt wird. Ohne die leichten Ketten könnte es dabei zu einer Fehlfaltung und Verlangsamung der Translation oder einem direkten Abbau der translatierten schweren Kette kommen. Um dies zu klären, müsste z.B. gezeigt werden, ob die schwere Kette in Abwesenheit der leichten vermehrt ins Proteasom transportiert wird. Hierzu könnten im CLC-„knock down“ oder in der Überexpression der schweren Kette, in Anwesenheit eines Proteasomeninhibitors wie Lactacystin, die Lokalisation und die exprimierten Clathrinmengen bestimmt werden. Würde die schwere Kette in Abhängigkeit zur leichten Kette in das Proteasom transloziert werden (ubiquitinyliert werden), so müsste sich in Abwesenheit der leichten Ketten die Menge exprimierten Clathrins durch den Einsatz von Lactacystin steigern lassen. Bei der Durchführung eines solchen Experiments konnte keine solche Steigerung festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Allerdings konnte durch Probleme beim Nachweis der Ubiquitinylierung im Westernblot nicht zweifelsfrei die Wirkung des Lactacystin nachgewiesen werden.

Von Acton et al. wurde ein anderer Ansatz zur spezifischen Depletion einer Isoform der leichten Ketten gewählt (Acton et al. 1993). Durch die gezielte Zerstörung des Isoform A – Gens gelang die Generierung von Zelllinien (CR1-Lymphoid-Zellen und PC12 Pheochromozytomzellen), die keine LCA-mRNA exprimierten, sondern ausschließlich LCB (Acton et al. 1993). In Zellen, die nach Induktion über 48 Stunden keine LCA mehr exprimierten, wurde der Anteil der leichten Ketten durch LCB relativ zur Menge der

schweren Kette kompensiert. Über die Expression der schweren Kette in diesen Zellen treffen die Autoren keine Aussage. Dieser Effekt bei Depletion der einzelnen Isoformen ist in HeLa-Zellen nicht direkt apparent (Abbildung 3.3 B). Im LCA-„knock-down“ bleibt die Menge der LCB nahezu unverändert. Betrachtet man jedoch die drastische Verringerung der schweren Kette in diesen Zellen, so kann man durchaus sagen, dass die Menge an LCB relativ zur Menge der schweren Kette zugenommen hat. Ob sich dieser Effekt in den von Acton und Kollegen verwendeten Zellen gezeigt hat, ist unbekannt. Allerdings muss beachtet werden, dass die Zelllinien laut Autoren unterschiedliche Verhältnisse der Isoformen A und B exprimieren. So exprimieren CR1-Zellen nach Acton einen sechsfachen Überschuss an LCA gegenüber LCB, PC12-Zellen einen dreifachen Überschuss an LCB gegenüber A. Unter der Annahme, dass der stabilisierende Effekt der leichten Ketten auf die schwere Kette isoformunabhängig ist, hätte die Depletion der LCA in den unterschiedlich exprimierenden Zellen mutmaßlich einen unterschiedlich starken Effekt auf die Erhaltung der schweren Kette und somit die untersuchte Funktion. Bei der Weiterführung der Untersuchung der Regulation der Expression von Clathrin sollte dies im Hinblick auf mögliche Isoformspezifitäten hin untersucht werden.

Eine Verknüpfung der Expression zweier Untereinheiten ist für andere makromolekulare Komplexe bereits hinlänglich bekannt: Der gut charakterisierte pflanzliche Enzymkomplex „RuBisCo“ ist ein Beispiel für die regulierte Koexpression zweier funktionell eng verknüpfter Untereinheiten eines Komplexes. Die Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase katalysiert die Reaktion von Ribulose-1,5-bisphosphat und CO<sub>2</sub> zu 3-D-Phosphoglycerat und ist somit der kohlenstofffixierende Schritt im Calvin-Zyklus. Ihre Aktivität ist lichtabhängig. Sie liegt als Hexadecamer vor und wird aus acht identischen kleinen und acht identischen großen Untereinheiten im Chloroplasten assembliert. Die große Untereinheit ist im Chloroplastengenom, die kleine Untereinheit hingegen im Genom im Zellkern kodiert (Mizioro and Lorimer et al. 1983; Spreitzer and Salvucci et al. 2002).

Die kleinen Untereinheiten der RuBisCo sind an der Katalyse direkt nicht beteiligt, erhöhen aber die Spezifität der großen Untereinheit für das Substrat. Wie beim Clathrin auch, sind die großen Untereinheiten aus Eukaryoten in Abwesenheit der kleinen Untereinheit weniger stabil. (Karkehabad et al. 2005). Nach Stimulierung durch Licht steigt die Expression beider Untereinheiten an. Dabei kommt es zu einer koordinierten Expression der beiden Untereinheiten, sowohl auf Protein als auch auf RNA-Ebene (Berry et al. 1985). Dies ist vergleichbar mit der androgenstimulierten Expression von Clathrin LNCaP-Zellen (Prescott et al. 1998). Man geht im Fall der „RuBisCo“ heute davon aus, dass die Expression der

Untereinheiten untereinander prä- und posttranslational reguliert ist (McCormac et al.1997, Sheen et al. 1999).

Dieser sehr gut untersuchte Makrokomplexes ist ein Beispiel für die Koordination der Expression von enzymatisch aktiver und regulatorischer Untereinheit. Die genannten Aufgaben und Eigenschaften der großen und kleinen Untereinheit der RuBisCo sind mit den in dieser Arbeit aufgezeigten Eigenschaften der Clathrinuntereinheiten vergleichbar. Abschließend kann gesagt werden, dass es sehr plausibel ist anzunehmen, dass auch die Expression von Clathrin leichter und schwerer Kette regulatorisch verknüpft ist.



## Clathrin in der Organellmorphogenese

Im vorangehenden Abschnitt wurde der Einfluss der leichten Ketten auf die Expression der Clathrin schweren Kette besprochen. In diesem Zusammenhang spielte bei der Interpretation der Daten besonders die gesteigerte Zusammenlagerung der schweren Ketten in quantitativer Abwesenheit der leichten Ketten und die dadurch erhöhte Stabilisierung eine Rolle.

Bei der Analyse der Lokalisation von Clathrin in Abhängigkeit zu den leichten Ketten können räumlich zwei Bereiche der Zellen unterschieden werden. Der eine Bereich ist die Plasmamembran, hier ist Clathrin an den meisten stattfindenden endozytotischen Prozessen beteiligt. Die mikroskopischen Beobachtungen finden hier an der ventralen, adherierenden Seite der Zellen statt. Der andere Bereich ist das TGN. Hier ist Clathrin normalerweise besonders stark im perinukleären Bereich lokalisiert. Außerdem ist Clathrin in fein verteilten endosomalen Strukturen breit über die Zelle verteilt zu finden. Der clathrinvermittelte Transport von Vesikeln ist dort ein zentraler Prozess zur Sortierung und Prozessierung endozytierten Materials.

In den Abbildungen 3.8-12 wird die Auswirkung der Depletion der leichten Ketten auf die Morphologie des TGN beschrieben. Die Reduktion der leichten Ketten hat dabei direkte Auswirkungen auf die Morphologie des TGN (repräsentiert durch TGN46, Abbildung 3.10), die Verteilung des lokalen Clathrinadaptors AP1 sowie für das Kompartiment typische Rezeptoren wie den Transferrin und den Mannose-6-Phosphat-Rezeptor (Abbildung 3.8-10). Während die Kolo-kaliation von AP1 und den Rezeptoren in Folge der CLC-Depletion reduziert wird, kolo-kalisieren die schwere Kette und ihre Adaptoren AP1 und AP2 weiterhin in hohem Maße (Abbildung 3.11 und 3.18). Ergänzend findet man bei einer einfachen Fraktionierung der Zellen in lösliche und partikuläre Fraktion die schwere Kette in Abwesenheit der leichten zum größten Teil in der partikulären Fraktion (Abbildung 3.20). Dies ist ein Hinweis auf die vermehrte Membranlokalisation der schweren Kette.

Diese gesteigerte „Neigung“ des Clathrins, sich an Membranen zusammenzulagern, kann als Ursache der Umverteilung der schweren Kette in größere Strukturen gewertet werden. Die Umverteilung der Adaptoren wiederum kann als Folge der veränderten Verteilung der schweren Kette interpretiert werden. In der Konsequenz kommt es zu der beschriebenen Veränderung des Golgi-Apparates und zur Beeinträchtigung des Transports des Transferrin- und Mannose-6-Phosphat-Rezeptors.

Durch den Einsatz des Inhibitors Brefeldin A kann speziell die Membranrekrutierung von AP1 im Golgi-Apparat unterbunden werden. In der Folge kommt es zur Auflösung von AP1-

haltigen Clathrinstrukturen (Abbildung 3.13). Nach einer 90-minütigen Erholung entspricht die Verteilung des AP1 sowohl in Kontrollzellen als auch in CLC-depletierten Zellen dem jeweiligen Phänotyp vor der Behandlung (Abbildung 3.14). Daraus kann geschlossen werden, dass die im CLC-„knock down“ beobachteten AP1-Strukturen membranständige (BFA-sensitive), dynamische Aggregate sind. Dies steht im Einklang mit der Tatsache, dass in CLC-depletierten Zellen der Transport des Transferrinrezeptors nicht gestört, sondern lediglich anders lokalisiert ist (Abbildung 3.9). Die Dynamik der Strukturen zeigt sich auch in Mikroinjektionsexperimenten. Die in „knock-down“-Zellen beobachtete breitere Verteilung des Clathrins im Bereich des Golgi-Apparates konnte durch Injektion von schwerer Kette und leichter Kette wieder annähernd „normalisiert“ werden (Abbildung 3.30).

Für die Organisation des Golgi-Apparates ist auch die Funktion des Aktinzytoskeletts von Bedeutung. Dabei wird die ARF1-abhängige Rekrutierung von AP1 und Clathrin an TGN-Membranen unter Beteiligung von CYFIP gesteuert (Anitei et al. 2010). In dieser erst kürzlich erschienen Arbeit wurde gezeigt, dass CYFIP („cytoplasmatic fragile-X mental retardation interacting Protein), ein CHC-bindendes Protein, bei der Bildung und Morphogenese von Clathrinstrukturen im TGN beteiligt ist. Diese Verknüpfung von Clathrin und der Morphologie des TGN bietet einen Ansatz zur Erklärung des Phänotyps der drastischen Umverteilungen intrazellulärer Kompartimente in CLC-depletierten Zellen. Eine Reduktion und gleichzeitige vermehrte Zusammenlagerung der schweren Kette muss demnach zur Konsequenz haben, dass die von ihr abhängigen AP1 haltigen Strukturen eine Veränderung erfahren. Inwieweit außerdem die veränderte Rekrutierung von Hip1R in diesem Bereich eine Rolle spielt, müsste noch geklärt werden.

Die Depolymerisation des F-Aktins durch Einsatz des Inhibitors Latrunculin B hat einen drastischen Effekt auf den Golgi-Apparat. In den Abbildungen 3.15 und 3.16 ist gezeigt, dass die Depolymerisation des Aktins einen deutlichen Effekt auf die Verteilung von AP1 und den Mannose-6-Phosphatrezeptor hat. Die beobachteten Phänotypen sind denen durchaus ähnlich, die in Folge der Depletion der leichten Ketten beobachtet wurden. Dies begründet sich wahrscheinlich darin, dass die Störung den gleichen morphogenen Mechanismus (Anitei et al. 2010) beeinflusst. Allerdings ist auch zu beachten, dass eine längere Depolymerisierung des Aktinskeletts zu einer Änderung der gesamten Morphologie (Abrundung) der Zellen führt. In der Konsequenz muss auch die Verteilung der Organellen verändert sein.

In der Literatur wurden bereits Effekte der Depletion der leichten Ketten auf den vesikulären Transport des TGN beschrieben. Unter anderem wurde eine verstärkte Konzentrierung von AP1 und des M6P-Rezeptors im perinukleären beschrieben (Poupon et al. 2008). Dies ist eine

andere Verteilung, als sie in dieser Arbeit dargelegt wird (Abbildung 3.8). In der zitierten Arbeit wurde die Transfektionsstrategie der „Einmaltransfektion“ zur Reduktion der leichten Ketten angewandt (vergl. Abbildung 3.2 A, C). Diese Strategie führt im Vergleich zur Doppeltransfektion zu einer größeren Reduktion der schweren Kette. Bezugnehmend auf die Beobachtung, dass der Verlust der schweren Kette primär im Bereich des Golgi-Apparates immanent wird (Abbildung 3.6), liegt die Vermutung nahe, dass die Phänotypen in diesen Arbeiten durch vermehrte Depletion der schweren Kette verursacht werden. Unterstützt wird diese Annahme dadurch, dass die von Poupon und Kollegen beschriebenen Phänotypen jenen ähneln, die für die Depletion der schweren Kette beschrieben wurden (Hinrichsen et al. 2003, 2005, eigene Daten). Dies könnte auch der Grund sein, warum in Poupon et al. 2008 die Größe von AP2-Strukturen als unverändert beschrieben wird. Möglicherweise ist hier die restliche Menge an schwerer Kette ohne leichte Kette schon zu gering für eine ungehemmte Polymerisation an Membranen.

Der in Abschnitt 4.1 diskutierte Verlust der schweren Kette bei CLC-Depletion wird auch bei Betrachtung der subzellulären Verteilung der schweren Kette deutlich. Es fällt auf, dass der wesentliche Teil der schweren Kette im Bereich des Golgi-Apparats verloren geht (Abbildung 3.6). An der ventralen Plasmamembran hingegen scheint das Signal der schweren Kette nicht abzunehmen. Bei der Betrachtung der schweren Kette an der Plasmamembran von CLC-depletierten Zellen zeigt sich, dass die Clathrinstrukturen zum Teil stark vergrößert sind (Abbildungen 3.17-3.19). Dieser Phänotyp ist vergleichbar mit dem der größeren Verteilung größerer CHC-Strukturen im Inneren der Zellen. Die verstärkte „Assemblierungsneigung“ des Clathrins ohne leichte Ketten wird hier besonders apparent. Die Begutachtung der Membranen in der Ultrastruktur bestätigt dies (Abbildung 3.25). Zusammengenommen bestätigt sich Licht- und Elektronenmikroskopisch der Eindruck, dass die relative Membranassoziation der schweren Kette deutlich erhöht ist (siehe auch Fraktionierung in Abbildung 3.20).

Der Einfluss des Aktinzytoskeletts auf die Clathrinvermittelte Endozytose wurde bereits vielfach beschrieben und ist bezüglich seiner Bedeutung für diesen Prozess Gegenstand aktueller Diskussionen (Chen et al. 2005). Besonders von Bedeutung ist in diesem Zusammenhang, dass die Clathrin leichten Ketten durch ihre Bindung von Hip1 und Hip1R Einfluss auf die Rekrutierung von Aktin in clathrinbedeckte Strukturen nehmen (Kaksonen et al. 2006; Wilbur et al. 2008). Bei der Untersuchung der Lokalisation von Hip1 und Hip1R in CLC-depletierten Zellen zeigen beide Proteine unterschiedliche Phänotypen. Während die Lokalisation von Hip1R praktisch unverändert bleibt, wird die Verteilung von Hip1 diffuser

(Abbildung 3.23). Der Grund für dieses Verhalten könnte darin liegen, dass Hip1R im Gegensatz zu Hip1 mit seiner C-terminalen prolinreichen Domäne auch SH3-Domänen binden kann (Brett & Traub et al. 2006). Diese Domänen sind z.B. durch Dynamin, GRB2 und Amphiphysin in Clathrinstrukturen vertreten. Die Tatsache, dass Hip1 zusätzlich AP2 binden kann, scheint nicht auszureichen, um seine Rekrutierung aufrecht zu erhalten. Zuletzt konnte gezeigt werden, dass die beiden Proteine mit großer Wahrscheinlichkeit als Homodimere und nicht wie früher angenommen auch als Heterodimere vorkommen (Wilbur et al. 2008). Das differentielle Verhalten der beiden Proteine im CLC-„knock-down“ ist nun eine Bestätigung dieser Tatsache in lebenden Zellen.

Die Verteilung von Hip1R in CLC-depletierten Zellen wurde bereits früher beschrieben (Poupon et al. 2008). Die dort beobachtete Reduktion des Hip1R-Signals und die diffusere Verteilung konnte für die Plasmamembran nicht bestätigt werden. Abgesehen von der Tatsache, dass in Poupon et al. 2008 die Aufnahmen eher auf den perinukleären Bereich fokussiert sind, wurde ein anderer Antikörper verwendet. Für die Klärung der aufgezeigten Unterschiede wäre es nötig, experimentell beide Transfektionsstrategien und verwendete Antikörper zu vergleichen.

Zuletzt wurde der Einfluss des Aktinzytoskeletts auf die Endozytose von sogenannten „Clathrin-Plaques“ beschrieben (Saffarian et al. 2009). Dabei schien die Depolymerisierung des Aktinzytoskeletts durch Latrunculin A (Konzentration von 5  $\mu$ M) Einfluss auf die Bildung und Größe dieser Plaques zu haben. In eigenen Experimenten wurde Latrunculin B in einer Konzentration von 0,25  $\mu$ M verwendet (Abbildungen 3.15, 3.16, 3.121 und 3.22). Latrunculin B hat eine höhere Affinität zu Aktin und hat sich in eigenen Experimenten effektiver als Latrunculin A erwiesen. Hierbei wurde festgestellt, dass, bei kurzer Einwirkzeit des Inhibitors (A oder B), in der Immunfluoreszenz keine Veränderung der stabilen Clathrin-Plaques festzustellen war (Daten nicht gezeigt). Bei längerer Einwirkzeit (30 Minuten) hingegen kam es zu deutlichen Vergrößerung der Clathrinstrukturen an der ventralen Plasmamembran. Der Phänotyp war dabei dem der CLC-Depletion sehr ähnlich. Die Vergrößerung der Clathrin-Plaques in Latrunculin B behandelten „knock-down“-Zellen erscheint verstärkt (Abbildung 3.21). Eine mögliche Erklärung für diesen Effekt könnte der Einfluss der Depolymerisierung des Aktinskeletts auf die Morphologie der Zellen sein. Bei längerer Anwendung von Latrunculin runden sich die Zellen sukzessive ab. Dies führt zu einer Verringerung des Zellvolumens und somit zu einer Steigerung der Clathrinkonzentration. Aus *in vitro*-Untersuchungen ist bekannt, dass die Zusammenlagerung des Clathrins konzentrationsabhängig ist (Ungewickell et al. 1991). Eine Vergrößerung der

Clathrinkonzentration (durch Reduktion des Zellvolumens durch Abrundung) würde somit das Gleichgewicht in Richtung Zusammenlagerung verschieben. Noch deutlicher ist der Effekt, den eine hypertonische Behandlung (0,45M Sucrose) der Zellen hat. Das Gros des Clathrins befindet sich nach einer solchen Behandlung in der partikulären Zellfraktion (Hoffmann et al. 2010). Beobachtet man Zellen unter hypertonischen Bedingungen im Phasenkontrast, so wird deutlich, dass sie sich abrunden und so das Zellvolumen deutlich abnimmt. Dies könnte der Grund für die stark gesteigerte Assemblierung des Clathrins unter diesen Bedingungen sein.

Ein weiterer Hinweis darauf, dass die regulatorische Wirkung der leichten Ketten auf die Zusammenlagerung des Clathrins unabhängig vom Aktin ist, ist die starke Stimulation der Zusammenlagerung des Clathrins in exklusiver Anwesenheit der GFP-leichten Ketten. In Zellen, die stabil mit GFP-LCB transfiziert wurden, sind die clathrinhaltigen Strukturen an der Plasmamembran bei Reduktion der endogenen leichten Ketten durch RNAi stark vergrößert (Abbildung 3.36). Zudem konnte *in vitro* gezeigt werden, dass Clathrin, ausschließlich rekombiniert mit GFP-CLC, stark zur Zusammenlagerung in Käfige neigt (Abbildung 3.32, Hoffmann et al. 2010). Dies spricht dafür, dass die GFP-leichten Ketten in lebenden Zellen direkt die Vergrößerung der Clathringitter hervorrufen. Da die GFP-CLC jedoch in der Lage sind, Hip1 und Hip1R zu binden, wird die Verknüpfung zwischen Clathrin und Aktin nicht unterbrochen. Daraus kann der Schluss gezogen werden, dass die Regulation der Zusammenlagerung des Clathrins durch die leichten Ketten in lebenden Zellen unabhängig von der Rekrutierung des Aktinzytoskeletts ist.

Schlussendlich ist die Komplementation der aberanten Clathrinverteilung in Abwesenheit der leichten Ketten durch Mikroinjektion intakten Clathrins (Abbildungen 3.29 A, 3.30, 3.31 und 3.34) der Nachweis dafür dass die leichten Ketten für die Verteilung der schweren Kette verantwortlich sind. Die Verteilung der schweren Kette wiederum nimmt direkten Einfluss auf die Morphologie des TGN.

## Clathrin in dynamischen Prozessen

Im vorangegangenen Abschnitt wurde der Einfluss der leichten Ketten auf die Lokalisation des Clathrins diskutiert. Manipulationen der leichten Ketten führen zu Änderungen der Lokalisation der schweren Kette sowie ihrer Stabilität. In der Folge verändert sich die Form clathrinabhängiger Zellorganellen. Die Inhibition der Zusammenlagerung der schweren Kette in Gitter scheint dabei eine der zentralen Rollen der leichten Ketten zu sein.

Bei der Analyse der Ultrastruktur der ventralen Plasmamembran und der Zellprofile im Ultradünnschnitt zeigt sich, dass die dortigen Clathringitter in Abwesenheit der leichten Ketten stark vergrößert und vorwiegend flach sind (Abbildungen 3.24-3.28). Die Vergrößerung kann durch die gesteigerte Zusammenlagerung bei fehlender Inhibition durch die leichten Ketten erklärt werden. Der geringere Anteil sich invaginierender Strukturen hingegen scheint vordergründig ein Zeichen für verringerte endozytische Aktivität zu sein. Bei der Analyse der Endozytose von Transferrin konnte bei 37°C kein quantitativer Unterschied zwischen Kontrollzellen und CLC-siRNA behandelten Zellen festgestellt werden (Abbildung 3.9 A). Die unveränderte Aufnahme von Transferrin, sowie von EGF in CLC-depletierten Zellen wurde bereits früher beschrieben (Huang et al. 2004; Poupon et al. 2008). Tatsächlich ist die Verringerung des Anteils von Invaginationen nur relativ zur gestiegenen Zahl flacher Strukturen stark gesunken. Beim Vergleich der absoluten Zahlen der invaginierenden Clathringitter von „knock-down“-Zellen und Kontrollzellen zeigt sich eine Reduktion von schätzungsweise 25% in CLC-depletierten Zellen (Abbildung 3.27).

Bei der Untersuchung der Endozytose von Transferrin wurden Hinweise darauf gefunden, dass bei verringerter Temperatur (22°C) in einem kurzen Zeitintervall (vergl. Keen et al. 2008) Zellen ohne leichte Ketten mehr Transferrin aufnehmen als Kontrollzellen (Abbildung 3.9 B). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Endozytose beschleunigt ist. Das wäre unter der Annahme plausibel, dass die Einstülpung von Clathrinpolymeren in Abwesenheit der leichten Ketten schneller verläuft. Der Grund hierfür könnte wiederum darin liegen, dass die leichten Ketten negative Regulatoren der Bindung von Hip1R und Hip1 an Aktin-Komplexe sind. In Abwesenheit der leichten Ketten würde ihre Bindung an aktinassoziierte Proteine nicht mehr inhibiert und Aktin könnte so besser an dem sich bildenden Vesikel angreifen und die Invagination unterstützen.

Es ist allerdings auch anzumerken, dass die Aufnahme von Transferrin in HeLa-Zellen bei 37°C sehr schnell und effizient ist. Dies ist durch die vermehrte Expression des Transferrinrezeptors auf der Oberfläche der Zellen (eine häufige Eigenschaft von

Krebszellen) begründet. Moderate Abweichungen in der Geschwindigkeit der Endozytose sind nur unter sehr limitierenden Bedingungen (Zeit und Temperatur) messbar. Schlussendlich ist so auch möglich, dass die Verringerung der Endozytoseereignisse, wie es in der Ultrastruktur beobachtet wurde (Abbildung 3.27), durch Geschwindigkeit und Effizienz der Endozytose unter den gewählten Bedingungen kompensiert wird. Der Anschein vermehrter transferrinhaltiger früher Endosomen in CLC-depletierten Zellen könnte auch durch die breitere Verteilung des frühen Endosoms (repräsentiert durch EEA1 - siehe Abbildung 3.12) erklärt werden.

Für Clathrin-Plaques an der ventralen Seite der Plasmamembran wurde ein alternativer endozytotischer Prozess veröffentlicht (Saffarian et al. 2009). Hierbei werden ganze Plaques, die im Wesentlichen aus flachen Clathringittern bestehen, aktinabhängig endozytiert. Dort wird im Weiteren berichtet, dass die Plaques bei Depletion der leichten Ketten nicht gebildet werden.

Bei der Begutachtung lebender Zellen, mikroinjiziert mit fluorochromierter schwerer Kette allein oder rekombiniert mit leichten Ketten, wurde keine „ad hoc“-Internalisierung von großen Plaques beobachtet. Zwar kann nicht völlig ausgeschlossen werden, dass Plaques auf diesem Weg internalisiert werden, jedoch gilt mit Sicherheit, dass die geringe Häufigkeit dieser Endozytoseform nicht ausreicht, um die unverändert schnelle Endozytose von Transferrin zu erklären. Die Tatsache, dass in Saffarian et al. bei Depletion der leichten Ketten keine Bildung von Plaques der schweren Kette beobachtet wurde, kann verschiedene Gründe haben: Erstens unterscheidet sich die Art der Transfektion (Saffarian et al.: Retransfektion nach 48 Stunden) von der in dieser Arbeit (Retransfektion nach 24 Stunden). Daher ist unklar, wie viel schwere Kette konserviert wurde. Eine reduzierte Expression der schweren Kette führt zwangsläufig zur Reduktion von Plaques (eigene Beobachtung). Zweitens wurden in Saffarian et al. die Zellen etwa 10 Stunden vor der Analyse umgesetzt. Es ist dabei plausibel anzunehmen, dass vorhandene Plaques durch das Ablösen internalisiert und innerhalb von 10 Stunden nicht neu aufgebaut wurden. In Experimenten wurden vergrößerte Plaques in Abwesenheit der CLC zuverlässig, nur ohne zwischenzeitliche Passage der Zellen, beobachtet (Abbildung 3.19). Drittens wurden in dieser Veröffentlichung für die CLC-RNAi-Experimente Astrozyten verwendet (U373). Möglicherweise besteht eine Zelltypabhängigkeit bei der Bildung und den Eigenschaften von Clathrin-Plaques. In Anbetracht der Tatsache, dass verschiedene Zelllinien unterschiedliche Motilitäten aufweisen, ist dieses sogar wahrscheinlich. So ist es für eine sich fortbewegende Zelle unabdingbar, Plaques vom Substrat zu lösen und neu zu bilden, um eine gerichtete Bewegung zu vollziehen. Die in

dieser Arbeit verwendeten HeLa-Zellen sind immobil. Dies hat wahrscheinlich die Bildung großer Plaques sowie die Konservierung der Clathrin schweren Kette in Abwesenheit der leichten begünstigt.

Zur Analyse der Dynamik von Clathrin an der Plasmamembran in lebenden Zellen ist die FRAP-Methode (Fluorescence Recovery After Photobleaching) etabliert. Voraussetzung dafür ist die (meist grüne) Fluoreszenz der zu analysierenden Proteine in den Zellen. Bei der Durchführung des Experiments wird selektiv ein Bereich clathrinhaltiger Strukturen an der Plasmamembran mit intensiver Laserbestrahlung gebleicht. Anschließend wird die Erholung der Fluoreszenz in Abhängigkeit zurzeit gemessen. Die so zu ermittelnde Halbwertszeit der Erholung gilt als Maß für den Austausch des Proteins an der Membran.

Für die GFP-CLC wurden in solchen FRAP-Experimenten Halbwertszeiten von etwa 30-60 Sekunden bestimmt (Hoffman et al. 2010). Bisher wurde dabei davon ausgegangen, dass das Verhalten der GFP-leichten Ketten das ganze Triskelion widerspiegelt. Begründet wurde dieses durch die hohe Bindungskonstante des Komplexes aus schwerer und leichter Kette. Tatsächlich konnte erst durch Mikroinjektion von fluorochromierten leichten Ketten allein oder rekonstituiert mit schweren Ketten diese Frage beantwortet werden (Hoffmann et al. 2010). Injizierte leichte Ketten wurden nicht in Clathrinstrukturen in der Zelle inkorporiert. Der Komplex aus schwerer und leichter Kette hingegen kolokalisierte innerhalb kürzester Zeit nach der Injektion mit endogenem Clathrin. Freie leichte Ketten wurden nur nach Depletion der endogenen leichten Ketten durch RNAi sofort in Clathrinstrukturen inkorporiert. Daraus kann geschlossen werden, dass die leichten Ketten in lebenden Zellen sehr fest an die schwere Kette binden und eine geringe „Off“-Rate besitzen. Folglich repräsentiert eine Messung ihres Verhaltens das des ganzen Clathrinmoleküls. Darüber hinaus sind diese Ergebnisse ein Indiz dafür, dass die Stöchiometrie von leichter und schwerer Kette in HeLa-Zellen nahe eins liegt. Bei einer niedrigeren Stöchiometrie müsste eine große Zahl von CLC-Bindungsplätzen auf den schweren Ketten nicht besetzt sein. In der Folge müsste es zum sofortigen Einbau von freien leichten Ketten nach der Injektion kommen, wie es in CLC-depletierten Zellen demonstriert wurde (Hoffmann et al. 2010).

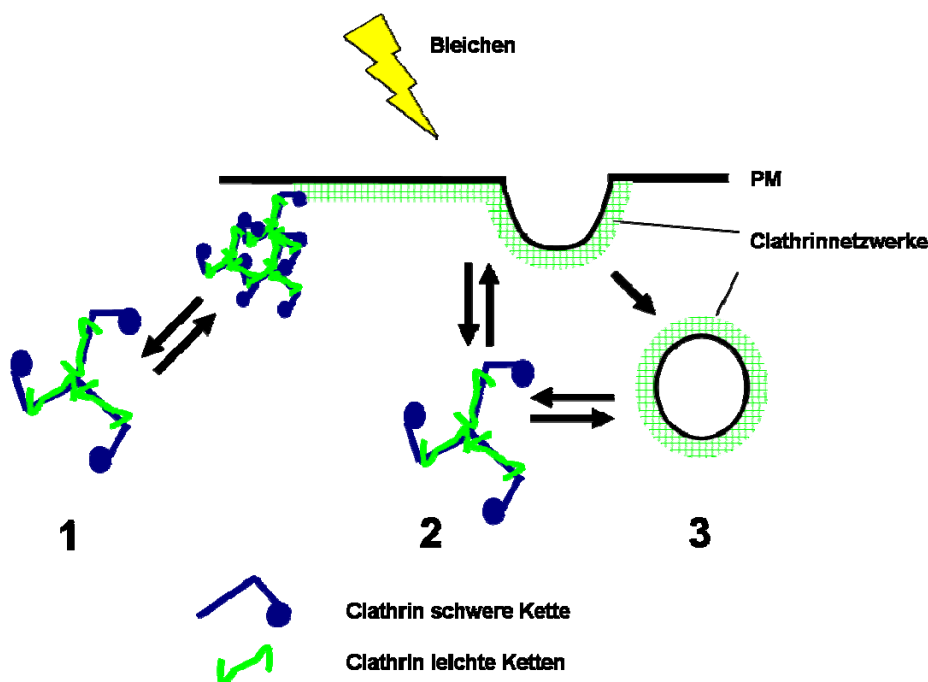
Die FRAP-Analyse von mikroinjizierter, fluorochromierter Clathrin schwerer Kette, mit und ohne leichte Kette ergab keinen signifikanten Unterschied in der Erholung der Fluoreszenz (Abbildung 3.29 B). Interessanterweise scheint mit der Verschiebung des Gleichgewichts der Polymerisationsreaktion des Clathrins in Richtung Polymer nicht eine Beschleunigung der Austauschprozesse einher zu gehen. Die starke Ähnlichkeit der unterstützt auch die Erkenntnis, dass die leichte Kette als Reporter die „Aktivität“ der schweren Kette beschreibt.



Die beim Bleichen verbliebene Restfluoreszenz ist höher als bei Experimenten mit GFP üblich (vergleiche Abbildung 3.35). Wahrscheinlich ist dieser Unterschied sowie der flachere Verlauf der Erholung in der höheren Photostabilität des Alexa 488-Fluorochroms begründet.

Bei der Interpretation von FRAP-Experimenten ist generell zu berücksichtigen, dass Clathringitter an der Plasmamembran verschiedenen Austauschprozessen unterliegen, die in der Summe zur Messung einer Zeit für die Erholung der Fluoreszenz führen. In die Messung gehen das Abschnüren von Vesikeln, das Neupolymerisieren von Clathrin aus dem Zytosol an das bestehende Gitter und der Austausch im Gitter gebundener und freier Triskelien ein (Abbildung 4.2).

**Abbildung 4.2**



**Abbildung 4.2 Dynamische Gleichgewichte von membranständigen Clathringittern**

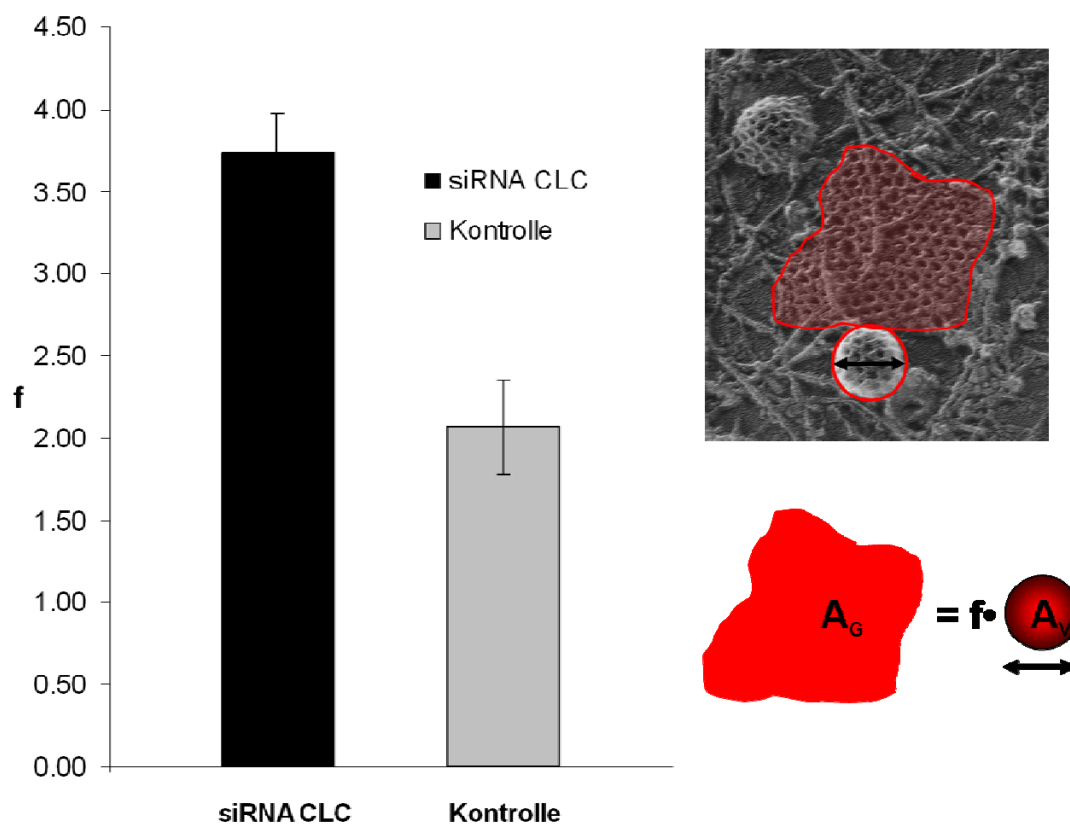
Die Gleichgewichte des Neupolymerisieren des Clathrins (1), des Austausches von löslichen und gebundenen Triskelien (2) sowie der Prozess des sich Abschnürens von Vesikeln (3) gehen als Summe in die gemessene Erholung der Fluoreszenz nach dem Bleichen ein.

Um die mit Clathrin bedeckte Membranfläche mit der endozytotischen Aktivität (Clathrinvermittelte Endozytose) zu vergleichen, wurde für jedes Präparat der flache Anteil der Clathringitter in Vesikeln ausgedrückt. Hierzu wurde ausgehend von den Daten aus Abbildung 3.29 und 3.30 der durchschnittliche Durchmesser der einstülpenden Clathringitter dafür verwendet, eine durchschnittliche Vesikeloberfläche zu berechnen. Somit kann die Durchschnittsgröße der flachen Gitterstrukturen in „Vesikeläquivalenten“ angegeben werden.

Dieses Äquivalent entspricht der Zahl an zu bildenden Vesikeln, die theoretisch notwendig ist, um ein flaches Gitter vollständig zu internalisieren.

Die Berechnung der benötigten Vesikel, um Clathringitter vollständig zu internalisieren, spiegelt erneut die Vergrößerung der Gitter in CLC-depletierten Zellen wider. Wie aus Abbildung 4.3 ersichtlich bräuchte man im Schnitt knapp vier Vesikel für Gitter ohne leichte Ketten und nur wenig mehr als zwei für Gitter mit intaktem Clathrin.

**Abbildung 4.3**



**Abbildung 4.3: Umrechnung der Fläche der Clathringitter in Vesikeloberfläche.**

Die Oberfläche der Vesikel wurde aus dem gemessenen Durchmesser (ImageJ) der sich einstülpenden Clathrinstrukturen errechnet und so die theoretische Zahl an Vesikeln („f“) bestimmt, die im Durchschnitt für ein Clathringitter (Flächenbestimmung siehe Abbildung 3.27 E) zur vollständigen Internalisation benötigt wird. A<sub>G</sub>: Fläche Clathringitter; A<sub>V</sub>: Oberfläche Vesikel

In Kontrollzellen entspricht die Fläche einer Clathrin – „Plaque“ etwa der Oberfläche von zwei Vesikeln durchschnittlicher Größe (Abbildung 4.3). Der Zeitraum der Einstülpung und Abschnürung eines Clathrinvesikels beträgt etwa 60 Sekunden. Diese Zeitspanne entspricht etwa der einer typischen Halbwertszeit wie sie in FRAP-Experimenten gemessen wird (s.o).

Somit ist plausibel, dass während der Messung nicht nur Clathrin austauscht, sondern auch durch Abschnürung und Neupolymerisation weg- bzw. hinzukommt. Prinzipiell ist es auch möglich, dass durch sehr kurz aufeinander folgende Internalisation zweier Vesikel eine Plaque vollständig internalisiert werden kann.

In CLC-depletierten Zellen ist die Anzahl der zur Internalisierung benötigten Vesikel nahezu doppelt so hoch wie in der Kontrolle (Abbildung 4.3). Da die Erholung der Fluoreszenz jedoch offensichtlich unabhängig von den leichten Ketten ist (Abbildung 3.29 B), kann man abschätzen, dass der Einfluss sich abschnürender Vesikel auf die Fluoreszenzerholung kleiner als der der anderen Prozesse ist.

Die FRAP-Analyse von Mikroinjizierten GFP-CLC, rekombiniert mit schwerer Kette, ergab keinen isoformspezifischen Unterschied in der Fluoreszenzerholung. Allerdings wurden Unterschiede im Verlauf von Bleichung und Erholung der GFP-CLC in Abhängigkeit zur Präsenz der endogenen leichten Ketten festgestellt (Abbildung 3.35). Die größere Spreizung zwischen initialer Fluoreszenz ( $t = 0$ ) und maximal gebleichtem Zustand ( $t_2$  - Minimum der Fluoreszenz) kann durch die vergrößerte Menge an gut zu bleichendem Fluorofor (GFP) in den bestrahlten Strukturen erklärt werden.

In Abwesenheit der endogenen leichten Ketten sind alle vorhandenen Bindungsplätze auf den schweren Ketten von GFP-CLC besetzt. In der Folge steigt die Fluoreszenz in der Erholungsphase auf ein niedrigeres Niveau an. Offensichtlich ist die Halbwertszeit der Fluoreszenzerholung nicht abhängig vom Hintergrund der endogenen CLC.

Dieses Experiment zeigt auch, dass es sich bei den GFP-Clathrin-„Aggregaten“ an der Plasmamembran um dynamische Strukturen handelt.

Bei der Untersuchung clathrinvermittelte Prozesse in lebenden Zellen ist die Verwendung von GFP-leichten Ketten weit verbreitet. Zuletzt wurden aus der statistischen Auswertung des Verhaltens einzelner Clathrinstrukturen Rückschlüsse auf die auf die Funktion der Isoformen der leichten Ketten gezogen (Mettlen et al. 2009). In diesem Zusammenhang ist besonders herauszustellen, dass sich die Eigenschaften der GFP-CLC in Abhängigkeit des Hintergrundes von endogenen CLC ändern. So scheint die Fusion mit GFP die inhibitorisch Eigenschaft der leichten Ketten auf die Zusammenlagerung der schweren Kette *in vitro* (Abbildung 3.32) und in lebenden Zellen (Abbildung 3.36) aufzuheben. Im zuletzt genannten Fall wird die „Deregulation“ durch Depletion des Hintergrundes endogener CLC durch RNAi immanent.

Dieser Effekt ist unabhängig davon, ob das GFP an den N- oder C-Terminus fusioniert wird (Hoffmann et al. 2010). Als Grund kann hierfür angebracht werden, dass besonders der N-Terminus der leichten Ketten molekular in die Inhibition des „Assembly“ der schweren

Ketten involviert ist. Dort finden sich drei konservierte negativ geladene Aminosäurereste, die entsprechend komplementär geladene Reste im Bereich des „Knies“ zwischen der Proximalen und Distalen Domäne der schweren Kette binden können (Chen & Brodsky et al. 2005). Hip1 und Hip1R steigern die Zusammenlagerung des Clathrins, indem sie mit ihrer „Coiled Coil-Domäne“ an den Teil des N-terminus der CLC binden, der die kritischen Aminosäuren enthält (Wilbur et al. 2008). Mutiert man diese negativen Reste zu positiven, so wird die Bindung der Hip-Proteine inhibiert (Chen et al. 2005).

Die Phosphorylierungsstellen der LCB in lebenden Zellen (Aminosäuren S 11 und S 13) liegen nur unweit der kritischen assemblyregulativen negativen Reste (E20,E21,D22). Zwischen den beiden Serinen, die in lebenden Zellen durch CKII phosphoryliert werden (Hill et al. 1988, Dannhauser et al. 2006), liegt ein negativ geladener Aminosäurerest (E). In phosphoryliertem Zustand ergibt sich durch die negative Ladung der konjugierten Phosphate ein negatives Triplet, vergleichbar mit dem der drei konservierten Reste. Möglicherweise kann die leichte Kette B die Maskierung der kritischen Reste durch die Bindung Hip1 oder Hip1R in phosphoryliertem Zustand so kompensieren und weiter regulierend wirken.

Die Interaktion dieser Reste mit der schweren Kette, aus der sich auch die Abhängigkeit des Assemblys zum pH-Wert und der Ionenstärke ergibt, ist auch abhängig von der Konformation der N-Termini. Dabei nehmen die Enden der leichten Ketten auf unpolymerisierten Triskelia eine andere Konformation ein als im Clathringitter (Wilbur et al 2010). Da die unstrukturierten und somit flexiblen Enden der leichten Ketten im Polymer parallel angeordnet sind, kommen sie sich räumlich sehr nah (vergl. Abbildung 1.4 B). GFP zeichnet sich durch eine schwache Dimerisierungsneigung aus (Shaner et al. 2005). Durch den geringen Abstand der GFP-Moleküle im Clathrinpolymer wird sie wahrscheinlich begünstigt. Dies verhindert wiederum die Interaktion der leichten und schweren Ketten zur Kontrolle des „Assemblys“. Außerdem besteht die Möglichkeit, dass das GFP durch seine Größe und globuläre Struktur die Interaktion sterisch behindert. GFP-CLC-überexprimierende Zellen exprimieren gleichzeitig konstitutiv endogene leichte Ketten. Bei der Präzipitation von Clathrin schwerer Kette aus GFP-CLC-exprimierenden Zellen werden sowohl GFP-CLC als auch endogene CLC kopräzipitiert (Dannhauser et al. 2006, Hoffmann et al. 2010). Das bedeutet, dass die GFP-CLC die endogenen nur teilweise verdrängt haben. Sie sind somit durch endogene „verdünnt“. Diese „Verdünnung“ reduziert die Wahrscheinlichkeit der GFP-GFP-Interaktion, was zur Unterdrückung des Einflusses des GFP auf die Clathrinpolymerisation führt. Außerdem reicht dieser Anteil an endogenen CLC mutmaßlich zur normalen Regulation aus. In Abbildung 3.36 zeigt sich, dass auch eine unvollständige

Depletion der leichten Ketten durch einfache Transfektion der CLC-siRNAs ausreicht um den Effekt des GFP auf schwere Kette immanent zu machen. Somit kann eine Konzentrationsabhängigkeit des GFP für diesen Effekt angenommen werden.

Als Alternative zum GFP wurde die Mikroinjektion von fluorochromiertem Clathrin etabliert (Abbildungen 3.29-3.31, Hoffmann et al. 2010) Diese Methode bietet eine gute Alternative zur Expression von GFP und bietet darüber hinaus die Möglichkeit, die schwere Kette in Abwesenheit der leichten Ketten in lebenden Zellen zu charakterisieren.

Die Fluorochromierten leichten Ketten binden mit einer leicht verringerten Affinität an die schwere Kette (etwa dreimal schwächer). Betrachtet man jedoch die Größe der Bindungskonstante ( $K_B \geq 10^7 \cdot M^{-1}$ ), so ist die Erniedrigung der Affinität bedingt durch die Fluorochromierung als marginal zu bewerten.

Im Gegensatz zu den GFP-CLC-Fusionsproteinen sind sie außerdem wesentlich fotostabiler und haben den gleichen inhibitorischen Effekt auf die Zusammenlagerung der schweren Kette wie die unmarkierten leichten Ketten (Hoffmann et al. 2010).

## Fazit

Zusammenfassend kann über die Rolle der Clathrin leichten Ketten gesagt werden, dass sie sowohl *in vitro* als auch in lebenden Zellen die wichtigsten Regulatoren der Clathrin schweren Kette sind. Ihre Regulation lässt sich in drei Bereiche auftrennen: Expression, Polymerisation und Bindung.

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal gezeigt, dass die Depletion der leichten Ketten in lebenden Zellen nicht nur die Bindung akzessorischer Proteine verhindert sondern auch Einfluss auf die Expression und den Erhalt der schweren Kette hat. Auch die Regulation der Zusammenlagerung ist hiervon betroffen. Dies zeigt, dass ein Eingriff in die Funktion der leichten Ketten (durch RNAi, sowie Fusion mit GFP) Auswirkungen auf verschiedenen Ebenen auf die Clathrin schwere Kette hat.

Aus den in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnissen über die Eigenschaften der leichten Ketten in lebenden Zellen muss geschlossen werden, dass die Rolle der CLC allein in der Regulation der schweren Kette sehr komplex ist. Jeglicher Eingriff in das „System Clathrin“ muss daher immer unter Berücksichtigung der daraus resultierenden Änderungen für beide Untereinheiten bewertet werden.

Für die Klärung noch offener Fragen, wie die der funktionellen Unterschiede der beiden Isoformen A und B bzw. die Rolle der Phosphorylierung von LCB, ist die Durchführung von *in vitro* Experimenten erfolgsversprechend. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Übertragung der Erkenntnisse aus *in vitro* Experimenten auf die Situation in lebenden Zellen möglich ist.

Trotz der zentralen Bedeutung des Clathrins für die Homöostase eukaryotischer Zellen ist bisher wenig über die Genregulation von leichter und schwerer Kette bekannt. Die weitergehende Untersuchung dieses Zusammenhangs würde zu einem besseren Verständnis der Regulation des Clathrins im Speziellen und somit der Endozytose im Allgemeinen führen.

## 5. Literatur

**Acton**, S. L., Wong, D. H., Parham, P., Brodsky, F. M., & Jackson, A. P. Alteration of clathrin light chain expression by transfection and gene disruption. *Molecular biology of the cell* 1993; 4(6), 647-60.

**Ahle** S, Mann A, Eichelsbacher U, Ungewickell E. Structural relationships between clathrin assembly proteins from the Golgi and the plasma membrane. *EMBO J* 1988; 7:919-929.

**Bellve** KD, Leonard D, Standley C, Lifshitz LM, Tuft RA, Hayakawa A, Corvera S, Fogarty KE. Plasma membrane domains specialized for clathrin-mediated endocytosis in primary cells. *J Biol Chem* 2006; 281(23):16139-16146.

**Berry**, J. O., Nikolau, B. J., Carr, J. P., & Klessig, D. F. Transcriptional and post-transcriptional regulation of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase gene expression in light- and dark-grown amaranth cotyledons. *Molecular and cellular biology* 1985; 5(9), 2238-46.

**Bonazzi**, M., & Cossart, P. Bacterial entry into cells: a role for the endocytic machinery. *FEBS letters* 2006; 580(12), 2962-7. doi: 10.1016/j.febslet.2006.04.010.

**Brett**, T. J., & **Traub**, L. M. Molecular structures of coat and coat-associated proteins: function follows form. *Current opinion in cell biology* 2006; 18(4), 395-406. doi: 10.1016/j.ceb.2006.06.014.

**Brodsky** FM, Chen CY, Knuehl C, Towler MC, Wakeham DE. Biological basket weaving: formation and function of clathrin-coated vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001; 17:517-568.

**Brodsky**, F. M. Clathrin structure characterized with monoclonal antibodies. I. Analysis of multiple antigenic sites. *The Journal of cell biology* 1985; 101(6), 2047-54. Retrieved from

**Brodsky**, F. M. Clathrin structure characterized with monoclonal antibodies. II. Identification of in vivo forms of clathrin. *The Journal of cell biology* 1985; 101(6), 2055-62.

**Chen, C.,** Reese, M. L., Hwang, P. K., Ota, N., Agard, D., Brodsky, F. M. Clathrin light and heavy chain interface: alpha-helix binding superhelix loops via critical tryptophans. *The EMBO journal* 2002; 21(22), 6072-82.

**Chen CY,** Brodsky FM. Huntingtin-interacting protein 1 (Hip1) and Hip1-related protein (Hip1R) bind the conserved sequence of clathrin light chains and thereby influence clathrin assembly in vitro and actin distribution in vivo. *J Biol Chem* 2005; 280(7):6109-6117.

**Chen CY,** Reese ML, Hwang PK, Ota N, Agard D, Brodsky FM. Clathrin light and heavy chain interface: alpha-helix binding superhelix loops via critical tryptophans. *Embo J* 2002; 21(22):6072-6082.

**Chin DJ,** Straubinger RM, Acton S, Nathke I, Brodsky FM. 100-kDa polypeptides in peripheral clathrin-coated vesicles are required for receptor-mediated endocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:9289-9293.

**Confalonieri, S.,** Salcini, A. E., Puri, C., Tacchetti, C., & Di Fiore, P. P. Tyrosine phosphorylation of Eps15 is required for ligand-regulated, but not constitutive, endocytosis. *The Journal of cell biology* 2000; 150(4), 905-12.

**Chu DS,** Pishvae B, Payne GS. The light chain subunit is required for clathrin function in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 1996; 271(51):33123-33130.

**Dannhauser P.N.** Charakterisierung der Phosphorylierungsstellen der Clathrin leichten Kette b Diplomarbeit 2006; Fachbereich Chemie, Universität Hannover

**Dannhauser, P. N.** Groos, S. Ungewickell, E. J.. Morphology of clathrin in clathrin light chain-depleted cells. *Mol Bio Cell* 2008; (Suppl.19 ), Abstract 919

**Daukas G,** Zigmond SH. Inhibition of receptor-mediated but not fluid-phase endocytosis in polymorphonuclear leukocytes. *J Cell Biol* 1985; 101(5 Pt 1):1673-1679.



**DeLuca-Flaherty C, McKay DB, Parham P, Hill BL.** Uncoating protein (hsc70) binds a conformationally labile domain of clathrin light chain LCa to stimulate ATP hydrolysis. *Cell* 1990; 62(5):875-887.

**Doherty, G. J., & McMahon, H. T.** Mechanisms of endocytosis. *Annual review of biochemistry* 2009; 78, 857-902. doi: 10.1146/annurev.biochem.78.081307.110540.

**Duwel M, Ungewickell EJ.** Clathrin-dependent association of CVAK104 with endosomes and the trans-Golgi network. *Mol Biol Cell* 2006;17(10):4513-4525.

**Edeling MA, Smith C, Owen D.** Life of a clathrin coat: insights from clathrin and AP structures. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7(1):32-44.

**Ehrlich M, Boll W, Van Oijen A, Hariharan R, Chandran K, Nibert ML, Kirchhausen T.** Endocytosis by random initiation and stabilization of clathrin-coated pits. *Cell* 2004; 118(5):591-605.

**Engqvist-Goldstein, A. E., Zhang, C. X., Carreno, S., Barroso, C., Heuser, J. E., Drubin, D. G.** RNAi-mediated Hip1R silencing results in stable association between the endocytic machinery and the actin assembly machinery. *Molecular biology of the cell* 2004; 15(4), 1666-79. doi: 10.1091/mbc.E03-09-0639.

**Erdmann KS, Mao Y, McCrea HJ, Zoncu R, Lee S, Paradise S, Modregger J, Biemesderfer D, Toomre D, De Camilli P.** A Role of the Lowe Syndrome Protein OCRL in Early Steps of the Endocytic Pathway. *Dev Cell* 2007;13(3):377-390.

**Fotin, A., Cheng, Y., Sliz, P., Grigorieff, N., Harrison, S. C., Kirchhausen, T.** Molecular model for a complete clathrin lattice from electron cryomicroscopy. *Nature* 2004; 432(7017), 573-9. doi: 10.1038/nature03079.

**Gaidarov I, Santini F, Warren RA, Keen JH.** Spatial control of coated-pit dynamics in living cells. *Nat Cell Biol* 1999; 1(1):1-7.

**Gallop, J. L., & McMahon, H. T.** BAR domains and membrane curvature: bringing your curves to the BAR. *Biochemical Society symposium* 2005; (72), 223-31.

**Girard M**, Allaire PD, McPherson PS, Blondeau F. Non-stoichiometric relationship between clathrin heavy and light chains revealed by quantitative comparative proteomics of clathrin-coated vesicles from brain and liver. *Mol Cell Proteomics* 2005; 4(8):1145-1154.

**Groos S**, Reale E, Luciano L. Re-evaluation of epoxy resin sections for light and electron microscopic immunostaining. *J Histochem Cytochem* 2001; 49(3):397-406.

**Hasse S**, Ungewickell EJ, Groos S. Clathrin and clathrin-accessory proteins in rat kidney cortex epithelia. *Histochem Cell Biol* 2006; 126(2):219-229.

**Hasson, T.** Myosin VI: two distinct roles in endocytosis. *Journal of cell science* 2003; 116(Pt 17), 3453-61. doi: 10.1242/jcs.00669.

**Heisenberg W.** *Der Teil und das Ganze. Gespräche im Umkreis der Atomphysik.* Piper, München 1969, 7. Auflage 2001 ISBN 3-492-22297-8

**Heuser J.** Effects of cytoplasmic acidification on clathrin lattice morphology. *J Cell Biol* 1989; 108(2):401-411.

**Heuser J.** The production of 'cell cortices' for light and electron microscopy. *Traffic* 2000; 1(7):545-552.

**Heuser J**, Kirchhausen T. Deep-etch views of clathrin assemblies. *J Ultrastruct Res* 1985; 92:1-27.

**Heuser JE**, Anderson RG. Hypertonic media inhibit receptor-mediated endocytosis by blocking clathrin-coated pit formation. *J Cell Biol* 1989; 108:389-400.

**Hill BL**, Drickamer K, Brodsky FM, Parham P. Identification of the phosphorylation sites of clathrin light chain LCb. *JBiolChem* 1988; 263:5499-5501.

**Hinrichsen L**, Harborth J, Andrees L, Weber K, Ungewickell EJ. 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; 278(46):45160-45170.

**Hinrichsen** L. Analyse der Clathrin vermittelten Endozytose mittels RNA Interferenz  
Dissertation 2005; naturwissenschaftliche Fakultät Universität Hannover

**Hinrichsen** L, Meyerholz A, Groos S, Ungewickell EJ. Bending a membrane: How clathrin affects budding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(23):8715-8720.

**Hirst** J, Miller SE, Taylor MJ, von Mollard GF, Robinson MS. EpsinR is an adaptor for the SNARE protein Vti1b. *Mol Biol Cell* 2004; 15(12):5593-5602.

**Hirst** J, Sahlender DA, Li S, Lubben NB, Borner GH, Robinson MS. Auxilin depletion causes self-assembly of clathrin into membraneless cages in vivo. *Traffic* 2008; 9(8):1354-1371.

**Hoffmann**, A., Dannhauser, P. N., Groos, S., Hinrichsen, L., Curth, U., Ungewickell, E. J. A comparison of GFP-tagged- clathrin light chains with fluorochromated light chains in vivo and in vitro. *Traffic* 2010; doi: 10.1111/j.1600-0854.2010.01084.x.

**Huang** F, Khvorova A, Marshall W, Sorkin A. Analysis of clathrin-mediated endocytosis of epidermal growth factor receptor by RNA interference. *J Biol Chem* 2004; 279(16):16657-16661.

**Huang** KM, Gullberg L, Nelson KK, Stefan CJ, Blumer K, Lemmon SK. Novel functions of clathrin light chains: clathrin heavy chain trimerization is defective in light chain-deficient yeast. *J Cell Sci* 1997; 110 ( Pt 7):899-910.

**Hutterer**, A., & Knoblich, J. A. Numb and alpha-Adaptin regulate Sanpodo endocytosis to specify cell fate in *Drosophila* external sensory organs. *EMBO reports* 2005; 6(9), 836-42. doi: 10.1038/sj.embor.7400500.

**Jackson** AP, Seow HF, Holmes N, Drickamer K, Parham P. Clathrin light chains contain brain-specific insertion sequences and a region of homology with intermediate filaments. *Nature* 1987; 326(6109):154-159.

**Kaksonen, M.,** Toret, C. P., & Drubin, D. G. Harnessing actin dynamics for clathrin-mediated endocytosis. *Nature reviews. Molecular cell biology* 2006; 7(6), 404-14. doi: 10.1038/nrm1940.

**Kalchman, M. A.,** Koide, H. B., McCutcheon, K., Graham, R. K., Nichol, K., Nishiyama, K., et al. HIP1, a human homologue of *S. cerevisiae* Sla2p, interacts with membrane-associated huntingtin in the brain. *Nature genetics* 1997; 16(1), 44-53. doi: 10.1038/ng0597-44.

**Karkehabadi, S.,** Peddi, S. R., Anwaruzzaman, M., Taylor, T. C., Cederlund, A., Genkov, T., et al. Chimeric small subunits influence catalysis without causing global conformational changes in the crystal structure of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Biochemistry* 2005; 44(29), 9851-61. doi: 10.1021/bi050537v.

**Kirchhausen T,** Harrison SC, Parham P, Brodsky FM. Location and distribution of the light chains in clathrin trimers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983; 80:2481-2485.

**Kirchhausen T,** Toyoda T. Immunoelectron microscopic evidence for the extended conformation of light chains in clathrin trimers. *J Biol Chem* 1993; 268(14):10268-10273.

**Keen JH,** Willingham MC, Pastan I. Clathrin and coated vesicle proteins Immunological characterization. *J Biol Chem* 1981; 256(5):2538-2544.

**Larkin JM,** Brown MS, Goldstein JL, Anderson RG. Depletion of intracellular potassium arrests coated pit formation and receptor-mediated endocytosis in fibroblasts. *Cell* 1983; 33(1):273-285.

**Lee DW,** Zhao X, Yim YI, Eisenberg E, Greene LE. Essential role of cyclin-G-associated kinase (Auxilin-2) in developing and mature mice. *Mol Biol Cell* 2008; 19(7):2766-2776.

**Lee DW,** Zhao X, Zhang F, Eisenberg E, Greene LE. Depletion of GAK/auxilin 2 inhibits receptor-mediated endocytosis and recruitment of both clathrin and clathrin adaptors. *J Cell Sci* 2005; 118(Pt 18):4311-4321.

**Legendre-Guillemain V**, Metzler M, Lemaire JF, Philie J, Gan L, Hayden MR, McPherson PS. Huntingtin interacting protein 1 (HIP1) regulates clathrin assembly through direct binding to the regulatory region of the clathrin light chain. *J Biol Chem* 2005; 280(7):6101-6108.

**Legendre-Guillemain V**, Metzler M, Charbonneau M, Gan L, Chopra V, Philie J, Hayden MR, McPherson PS. HIP1 and HIP12 display differential binding to F-actin, AP2, and clathrin. Identification of a novel interaction with clathrin light chain. *J Biol Chem* 2002; 277(22):19897-19904.

**Liu, A. P.**, Loerke, D., Schmid, S. L., & Danuser, G. Global and local regulation of clathrin-coated pit dynamics detected on patterned substrates. *Biophysical journal* 2009; 97(4), 1038-47. doi: 10.1016/j.bpj.2009.06.003.

**Loerke D**, Mettlen M, Yarar D, Jaqaman K, Jaqaman H, Danuser G, Schmid SL. Cargo and dynamin regulate clathrin-coated pit maturation. *PLoS Biol* 2009; 7(3):e57.

**Loerke D**, Wienisch M, Kochubey O, Klingauf J. Differential control of clathrin subunit dynamics measured with EW-FRAP microscopy. *Traffic* 2005; 6(10):918-929.

**Mani M**, Lee SY, Lucast L, Cremona O, Di Paolo G, De Camilli P, Ryan TA. The Dual Phosphatase Activity of Synaptojanin1 Is Required for Both Efficient Synaptic Vesicle Endocytosis and Reavailability at Nerve Terminals. *Neuron* 2007; 56(6):1004-1018.

**Marsh, M.**, & Helenius, A. Virus entry: open sesame. *Cell* 2006; 124(4), 729-40. doi: 10.1016/j.cell.2006.02.007.

**McCormac, D.**, Boinski, J. J., Ramsperger, V. C., & Berry, J. O. C4 Gene Expression in Photosynthetic and Nonphotosynthetic Leaf Regions of *Amaranthus tricolor*. *Plant physiology* 1997; 114(3), 801-815.

**Mettlen M**, Stoeber M, Loerke D, Antonescu CN, Danuser G, Schmid SL. Endocytic Accessory Proteins Are Functionally Distinguished by Their Differential Effects on the Maturation of Clathrin Coated Pits. *Mol Biol Cell* 2009.

**Meyerholz, A., Hinrichsen, L., Groos, S., Esk, P., Brandes, G., Ungewickell, E. J.** Effect of clathrin assembly lymphoid myeloid leukemia protein depletion on clathrin coat formation. *Traffic* 2005; 6(12), 1225-34. doi: 10.1111/j.1600-0854.2005.00355.x.

**Mengaud, J., Ohayon, H., Gounon, P., Mege R-M, & Cossart, P.** E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *L. monocytogenes* into epithelial cells. *Cell* 1996; 84(6), 923-32.

**Motley, A. M., Berg, N., Taylor, M. J., Sahlender, D. A., Hirst, J., Owen, D. J.** Functional analysis of AP-2 alpha and mu2 subunits. *Molecular biology of the cell* 2006; 17(12), 5298-308. doi: 10.1091/mbc.E06-05-0452.

**Nossal, R.** Energetics of clathrin basket assembly. *Traffic* 2001; 2(2), 138-47.

**Ooms, L. M., Horan, K. A., Rahman, P., Seaton, G., Gurung, R., Kethesparan, D. S.** The role of the inositol polyphosphate 5-phosphatases in cellular function and human disease. *The Biochemical journal* 2009; 419(1), 29-49. doi: 10.1042/BJ20081673.

**Owen, D. J., Collins, B. M., & Evans, P. R.** Adaptors for clathrin coats: structure and function. *Annual review of cell and developmental biology* 2004, 20, 153-91. doi: 10.1146/annurev.cellbio.20.010403.104543.

**Pauly, B. S., & Drubin, D. G.** Clathrin: an amazing multifunctional dreamcoat? *Cell host & microbe* 2007; 2(5), 288-90. doi: 10.1016/j.chom.2007.10.007.

**Pelkmans, L., & Zerial, M.** Kinase-regulated quantal assemblies and kiss-and-run recycling of caveolae. *Nature* 2005; 436(7047), 128-33. doi: 10.1038/nature03866.

**Perrais D, Merrifield CJ.** Dynamics of endocytic vesicle creation. *Dev Cell* 2005;9(5):581-592.

**Poupon, V., Girard, M., Legendre-Guillemain, V., Thomas, S., Bourbonniere, L., Philie, J.** Clathrin light chains function in mannose phosphate receptor trafficking via regulation of actin assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105(1), 168-73. doi: 10.1073/pnas.0707269105.

**Prescott, J. L., & Tindall, D. J.** Clathrin gene expression is androgen regulated in the prostate. *Endocrinology* 1998 139(4), 2111-9

**Puthenveedu** MA, von Zastrow M. Cargo regulates clathrin-coated pit dynamics. *Cell* 2006;127(1):113-124.

**Rappoport**, J. Z., Kemal, S., Benmerah, A., & Simon, S. M. Dynamics of clathrin and adaptor proteins during endocytosis. *American journal of physiology. Cell physiology* 2006; 291(5), C1072-81. doi: 10.1152/ajpcell.00160.2006.

**Royle**, S. J., Bright, N. A., & Lagnado, L. Clathrin is required for the function of the mitotic spindle. *Nature* 2005; 434(7037), 1152-7. doi: 10.1038/nature03502.

**Roth** TF, Porter KR. Yolk Protein Uptake In The Oocyte Of The Mosquito *Aedes Aegypti*. *L. J Cell Biol* 1964; 20:313-332.

**Saffarian** S, Cocucci E, Kirchhausen T. Distinct Dynamics of Endocytic Clathrin-Coated Pits and Coated Plaques. *PLoS Biol* 2009; 7(9):e1000191.

**Senetar** MA, Foster SJ, McCann RO. Intracellular inhibition mediates the interaction of the I/LWEQ module proteins Talin1, Talin2, Hip1, and Hip2 with actin. *Biochemistry* 2004; 43(49):15418-15428.

**Schmid** EM, McMahon HT. Integrating molecular and network biology to decode endocytosis. *Nature* 2007; 448(7156):883-888.

**Shaner** NC, Steinbach PA, Tsien RY. A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat Methods* 2005; 2(12):905-909.

**Sheen, J.** C4 GENE EXPRESSION. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* 1999, 50, 187-217. doi: 10.1146/annurev.arplant.50.1.187.

**Traub** LM. Clathrin couture: fashioning distinctive membrane coats at the cell surface. *PLoS Biol* 2009; 7(9):e1000192.

**Ungewickell** E, Branton D. Assembly units of clathrin coats. *Nature* 1981; 289(5796):420-422.

**Ungewickell, E.**, Ungewickell, H., Holstein, S. E., Lindner, R., Prasad, K., Barouch, W. Role of auxilin in uncoating clathrin-coated vesicles. *Nature* 1995; 378(6557), 632-5. doi: 10.1038/378632a0.

**Ungewickell E.** Biochemical and immunological studies on clathrin light chains and their binding sites on clathrin triskelions. *EMBO J* 1983; 2:1393-1400.

**Ungewickell E**, Ungewickell H. Bovine brain clathrin light chains impede heavy chain assembly in vitro. *J Biol Chem* 1991; 266:12710-12714.

**Wakeham, D. E.**, Abi-Rached, L., Towler, M. C., Wilbur, J. D., Parham, P., Brodsky, F. M. Clathrin heavy and light chain isoforms originated by independent mechanisms of gene duplication during chordate evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102(20), 7209-14. doi: 10.1073/pnas.0502058102.

**Wiejak, J.**, & Wyroba, E. Dynamin: characteristics, mechanism of action and function. *Cellular & molecular biology letters* 2002; 7(4), 1073-80. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12511974>.

**Wilbur, J. D.**, Hwang, P. K., & Brodsky, F. M. (2005). New faces of the familiar clathrin lattice. *Traffic* 2005; 6(4), 346-50. doi: 10.1111/j.1600-0854.2005.00277.x.

**Wilbur, J. D.**, Hwang, P. K., Ybe, J. A., Lane, M., Sellers, B. D., Jacobson, M. P. Conformation switching of clathrin light chain regulates clathrin lattice assembly. *Developmental cell* 2010; 18(5), 841-8. doi: 10.1016/j.devcel.2010.04.007.

**Wilbur JD**, Chen CY, Manalo V, Hwang PK, Fletterick RJ, Brodsky FM. Actin binding by Hip1 (huntingtin-interacting protein 1) and Hip1R (Hip1-related protein) is regulated by clathrin light chain. *J Biol Chem* 2008; 283(47):32870-32879.

**Winkler FK**, Stanley KK. Clathrin heavy chain, light chain interactions. *EMBO J* 1983; 2:1393-1400.

**Wong, D. H.**, Ignatius, M. J., Parosky, G., Parham, P., Trojanowski, J. Q., Brodsky, F. M. Neuron-specific expression of high-molecular-weight clathrin light chain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 1990; 10(9), 3025-31.



**Wu X, Zhao X, Baylor L, Kaushal S, Eisenberg E, Greene LE.** Clathrin exchange during clathrin-mediated endocytosis. *J Cell Biol* 2001; 155(2):291-300.

**Wu X, Zhao X, Puertollano R, Bonifacino JS, Eisenberg E, Greene LE.** Adaptor and Clathrin Exchange at the Plasma Membrane and trans-Golgi Network. *Mol Biol Cell* 2003; 14(2):516-528.

**Ybe JA, Ruppel N, Mishra S, VanHaaften E.** Contribution of cysteines to clathrin trimerization domain stability and mapping of light chain binding. *Traffic* 2003; 4(12):850-856.

**Ybe, J. A., Mishra, S., Helms, S., & Nix, J.** Crystal structure at 2.8 Å of the DLLRKN-containing coiled-coil domain of huntingtin-interacting protein 1 (HIP1) reveals a surface suitable for clathrin light chain binding. *Journal of molecular biology* 2007; 367(1), 8-15. doi: 10.1016/j.jmb.2006.12.052.

**Ybe, J. A., Perez-Miller, S., Niu, Q., Coates, D. A., Drazer, M. W., Clegg, M. E., et al.** (2007). Light chain C-terminal region reinforces the stability of clathrin heavy chain trimers. *Traffic* 2007; 8(8), 1101-10. doi: 10.1111/j.1600-0854.2007.00597.x.

**Ybe, J. A., Greene, B., Liu, S. H., Pley, U., Parham, P., Brodsky, F. M.** Clathrin self-assembly is regulated by three light-chain residues controlling the formation of critical salt bridges. *The EMBO journal* 1998; 17(5), 1297-303. doi: 10.1093/emboj/17.5.1297.

**Ybe, J. A., Perez-Miller, S., Niu, Q., Coates, D. A., Drazer, M. W., Clegg, M. E.** Light chain C-terminal region reinforces the stability of clathrin heavy chain trimers. *Traffic* 2007; 8(8), 1101-10. doi: 10.1111/j.1600-0854.2007.00597.x.

**Zaremba, S., & Keen, J. H.** Assembly polypeptides from coated vesicles mediate reassembly of unique clathrin coats. *The Journal of cell biology* 1983; 97(5 Pt 1), 1339-47.

**Zhang CX, Engqvist-Goldstein AE, Carreno S, Owen DJ, Smythe E, Drubin DG.** Multiple roles for cyclin G-associated kinase in clathrin-mediated sorting events. *Traffic* 2005; 6(12):1103-1113.

## 6. CURRICULUM VITAE

Geburtstag 25.11.1980 in Celle  
Familienstand ledig  
Staatsangehörigkeit Deutsch

### Schulausbildung

---

1993 - 2000 Hölty-Gymnasium Celle  
Abschluss: Abitur Durchschnittsnote 1,7  
Prüfungsfächer: Biologie, Geschichte, Englisch und Mathematik

Anschließend:

2000 - 2001 Zivildienst als Pflegeassistent, St. Josephstift Celle

### Studium

---

2001 - 2006 Leibniz Universität Hannover  
Abschluss: Diplom Biochemie Endnote: Sehr gut  
Prüfungsfächer: Biochemie, Biophysikalische Chemie, Virologie

### Praktische Erfahrung

---

August - September 2004 Großversuch (Studiuminternes Praktikum)  
Thema: *Etablierung und Test des "Tandem Affinity Purification" (TAP) Systems" (Strategene)*  
Institut für Biochemie, Medizinische Hochschule Hannover  
Betreuerin: Prof. Dr. T. Tamura-Niemann

September - Oktober 2004 Isotopenpraktikum für Biochemiker ( Erwerb der Berechtigung zum Umgang mit Radioaktiven Reagenzien )

Oktober 2004 Praktikum zu dreidimensionalen Computerdarstellungen von Proteinstrukturen.

November - Dezember 2004 Großversuch  
Thema: *Charakterisierung einer potentiellen Auxilin 1 Kinase.*  
Institut für Zellbiologie, Medizinische Hochschule Hannover  
Betreuer: Prof. Dr. E. Ungewickell

April - Mai 2005 Zertifizierter Kurs zur Versuchstierkunde (Kategorie B – FELASA)

April - Juli 2005 Fortbildungslehrgang „Gentechnische Sicherheit“  
(nach § 15 Abs. 2 Satz 1 Nr.3 GenTSV)

Juni - August 2005 Großversuch  
Thema: *Klonierung des HIV-Proteins Gag.*  
Institut für Virologie, Tierärztliche Hochschule Hannover  
Betreuer: PD Dr. G. Zimmer

- Jan.- Juli                      2006 Diplomarbeit:  
Thema: *Charakterisierung der Phosphorylierungsstellen der Clathrin leichten Kette b*  
 Betreuer: Prof. Dr. E. Ungewickell  
 Institut für Zellbiologie, Medizinische Hochschule Hannover
- Seit September                2006 Laborbetreuung internationaler Studenten.
- Seit Dezember                2007 Vorlesung zur praktischen Anwendung von „RNA-Interferenz“ für internationale PhD-Studenten

#### Berufliche Erfahrung

---

- Seit September                2006 Wissenschaftlicher Assistent zur Promotion  
 Institut für Zellbiologie/ Elektronenmikroskopie  
 Medizinische Hochschule Hannover  
Thema: *Analyse der regulatorischen Rolle der Clathrin leichte Ketten Isoformen a und b in der clathrinvermittelten Endozytose*  
 Betreuer: Prof. Dr. E. Ungewickell

#### Publikationen

---

1. ***Rat kidney expresses multiple variants of Amphiphysin II (Bin1)***  
 Bargsten A.\*, Dannhauser P.N.\*, Ungewickell E.J., Groos S.  
 Hannover Medical School, Department of Cell Biology, Center of Anatomy  
 Germany \*Authors contributed equally  
 Eur J Cell Biol. 87S1 (Suppl. 58): 7 (2008), [www.elsevier.de/ejcb](http://www.elsevier.de/ejcb)
  
2. ***Morphology of Clathrin Lattices in Clathrin Light Chain-Depleted Cells.***  
 P. N. Dannhauser, S. Groos, E. J. Ungewickell;  
 Cell Biology, Hannover Medical School, Hannover, Germany  
 Mol. Biol. Cell 19 (suppl), abstract 919, (2008),  
[www.ascb.org/files/am08/abstracts/regular.pdf](http://www.ascb.org/files/am08/abstracts/regular.pdf)
  
3. ***Bin1 (Amphiphysin 2) takes part in the generation of microvillus-like structures in absorbing epithelial cells***  
 Wittrock I.M.\*, P. N. Dannhauser\*, Bargsten A.T. Groos S.;  
 Hannover Medical School, Department of Cell Biology, Center of Anatomy, Hannover,  
 Germany \*Authors contributed equally  
 Eur J Cell Biol. 89S1 (Suppl. 60): 65 (2009), [www.elsevier.de/ejcb](http://www.elsevier.de/ejcb)
  
4. ***A comparison of GFP-tagged- clathrin light chains with fluorochromated light chains in vivo and in vitro***  
 Anika Hoffmann\*, Philip N. Dannhauser\*, Stephanie Groos, Lars Hinrichsen, Ute Curth  
 and Ernst J. Ungewickell \*Authors contributed equally  
 Traffic. 2010 Sep;11(9):1129-40.