Untersuchungen zur Funktion von Clathrin, Clathrin-assoziierten Proteinen und Dynamin in der Mitose

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

Diplom-Biologin Agnes Golla
geboren am 29. Mai 1978 in Kattowitz

2011

Referent: Prof. Dr. Ernst Ungewickell

Korreferent: Prof. Dr. Roland Jacobs

Tag der Promotion: 29. 11. 2011

Meiner Familie

1. Zusammenfassung

Clathrin ist das namensgebende Protein der Clathrin-vermittelten Transportprozesse an der Plasmamembran und am *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN). Zusammen mit Adaptoren und akzessorischen Proteinen umhüllt es Membranvesikel mit einer charakteristischen, fullerenähnlichen Hülle aus Clathrintriskelia. In neuerer Zeit wurde die Assoziation von Clathrin mit der mitotischen Spindel nachgewiesen [Royle et al. 2005].

In der vorliegenden Arbeit wurde Clathrin zellbiologisch und biochemisch in der Mitose untersucht. Immuncytochemische Analysen belegten Clathrins Kolokalisation mit allen drei Mikrotubulitypen der mitotischen Spindel sowie den Centrosomen. Seine enge Interaktion mit den Mikrotubuli wurde in Depolymerisationsstudien und durch die Isolierung mitotischer Spindeln nachgewiesen. In *in vitro* Bindungsstudien wurde gezeigt, dass die terminale Domäne von Clathrin indirekt an Mikrotubuli bindet. *Fluorescence Recovery After Photobleaching* Experimente verdeutlichten die dynamische Assoziation von Clathrin mit der Spindel. Die starke Bindung konnte einzig unter hypertonischen Bedingungen, unter denen Clathrin von der Spindel dissoziiert, reversibel gestört werden. Schließlich zeigten elektronenmikroskopische Untersuchungen, dass Clathrin nicht in Form von Clathrin-bedeckten Vesikeln an der Spindel vorliegt. Die Beobachtungen lassen auf eine Funktion von Clathrin in der Mitose schließen, die nicht im Zusammenhang mit der in Clathrin-vermittelten Transportprozessen steht. In RNA Interferenz Untersuchungen wurden die Auswirkungen auf den Spindelapparat nach weitgehender Elimination von Clathrin analysiert. Die Depletion von Clathrin resultierte in einem Mitosearrest, verursacht durch eine Verlängerung der Metaphase und durch Defekte im Transport der Chromosomen zur Äquatorialplatte.

Zum ersten Mal wurden auch mehrere Proteine, die in Clathrin-vermittelten Transportprozessen eine wichtige Rolle spielen, an der Spindel nachgewiesen. AP1, Dynamin, Auxilin1 und GAK kolokalisieren mit der mitotischen Spindel. RNA Interferenz Untersuchungen zeigten, dass AP1, Dynamin, Auxilin1 und GAK von Clathrin an die Spindel rekrutiert werden. Des weiteren wurden die Auswirkungen der Reduktion dieser Proteine mittels RNA Interferenz auf die Mitose untersucht. Vor allem die Depletion von Auxilin1 und GAK führte zu einem Arrest der Zellen in der Metaphase und einer Zunahme an apoptotischen Zellen. Die Depletion von GAK führt zusätzlich zu einer teilweisen Dissoziation des Clathrins von der Spindel und weist GAK damit eine wichtige Rolle bei der Regulation der Assoziation von Clathrin mit der Spindel zu. Schließlich wurde mit Hilfe von GFP-GAK Fusionsproteinen die GAK-Domäne identifiziert, die die Bindung von GAK an die Spindel vermittelt.

Summary

Clathrin plays a key role in clathrin mediated transport processes such as receptor mediated endocytosis at the plasma membrane and the sorting of lysosomal enzymes at the *trans*-Golgi network (TGN). In cooperation with adaptor and accessory proteins, clathrin forms a characteristic fullerene shaped coat. Recently, clathrin was shown to be associated with the mitotic spindle [Royle et al. 2005].

In this study cell biological and biochemical methods were used to analyse clathrin in mitosis. Immunocytochemical studies revealed its colocalization with each type of microtubules at the mitotic spindle as well as with mitotic centrosomes. The strength of clathrin`s association with the microtubules was demonstrated in depolymerisation assays and the isolation of mitotic spindles. Clathrin depleted spindles depolymerized faster indicating its role in stabilisation of the mitotic spindle apparatus. Further, *in vitro* binding studies demonstrated that the terminal domain of clathrin is able to bind tubulin indirectly. *Fluorescence Recovery After Photobleaching* experiments revealed the dynamic association of clathrin with the spindle and showed its fast exchange with its cytosolic pool. Moreover, upon treatment of mitotic cells under hypertonic conditions clathrin reversible redistributes into the cytosol. Electron microscopic analysis indicated that there are no clathrin coated vesicles at the spindle. These observations suggest clathrin`s function in mitosis that is different from the one in clathrin mediated intracellular transport. In RNA interference studies the effect of the absence of clathrin on the mitotic spindle apparatus was analysed. Depletion of clathrin resulted in an arrest of mitosis through the extension in the length of the metaphase period and defects in the transport of chromosomes to the metaphase plate.

Several proteins which play an important role in clathrin mediated pathways were also shown to associate with the spindle. AP1, dynamin, auxilin1 and GAK localize with the mitotic spindle during mitosis. RNA interference experiments were used to clarify the interaction between them and clathrin in mitosis and demonstrated that they are recruited to the spindle by clathrin. Moreover, the effects on mitosis in the absence of these proteins were demonstrated. Especially the depletion of the expression of Auxilin1 and GAK led to a mitotic arrest in the metaphase and higher proportion of apoptotic cells. Studies of GAK knock down cells revealed its exceptional role for the association of clathrin at the spindle. The depletion of GAK reduced the affinity of clathrin for the spindle. Finally, the binding domain of GAK to the spindle apparatus was identified using GFP-tagged GAK constructs.

Schlagworte: Clathrin, Mitose, mitotische Spindel, AP1, Dynamin, Auxilin1, GAK
Key words: Clathrin, mitosis, mitotic spindle, AP1, Dynamin, Auxilin1, GAK

Inhaltsverzeichnis

1. ZUSAMMENFASSUNG....4

2. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS....12

3. EINLEITUNG....15

3.1 Endozytose....16

3.2 Stadien der Clathrin-vermittelten Endozytose....19

3.3 Clathrin....22

3.4 Clathrin-assoziierte Proteine....24

3.4.1 Adaptorproteine....24

3.4.1.1 AP1....25

3.4.1.2 AP2....26

3.4.1.3 GGA....27

3.4.2 Dynamin....28

3.4.3 Auxilin1....29

3.4.4 GAK/Auxilin2....30

3.4.5 Hsc70....31

3.4.6 Weitere Clathrin Adaptoren....31

3.5 Der Zellzyklus....32

3.5.1 Regulation des Zellzyklus....33

3.5.2 Die Mitose....34

3.5.3 Die mitotische Spindel....35

3.5.4 Centrosomen....38

3.6 Zielsetzung....39

4. MATERIAL UND METHODEN....40

4.1 Verwendete Materialien....40

4.1.1 Chemikalien....40

4.1.2 Puffer und Lösungen....41

4.1.3 Kommerzielle Systeme....43

4.1.4 Zellen und Gewebe....43

4.1.5 DNA-Konstrukte....44
4.1.6 Verwendete siRNA....45
4.1.7 Verwendete Antikörper....45
4.1.8 Verbrauchsmaterialien....47
4.1.9 Benutzte Geräte....48
4.1.9.1 Laborgeräte....48
4.1.9.2 Mikroskope....50
4.1.10 Software....51
4.2 Methoden....51
4.2.1 Zellkultur....51
4.2.1.1 Kultivieren und Passagieren der Zellen....51
4.2.1.2 Transfektion....52
4.2.1.3 Herunterregulation der Proteinexpression mit siRNA....52
4.2.1.4 Synchronisation der Zellen....53
4.2.2 Aufbereitung von Gewebeextrakten....54
4.2.2.1 Herstellung von mitotischem Zytosol....54
4.2.2.2 Herstellung von Interphasen Zytosol....55
4.2.2.3 Präparation mitotischer Spindeln....55
4.2.2.4 Präparation von Mikrotubuli aus Hirngewebe....56
4.2.2.5 Präparation von Mikrotubuli-assoziierten Proteinen (MAPs)....56
4.2.3 Proteinanalytik....57
4.2.3.1 Vorbereitung der Proben....57
4.2.3.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)....57
4.2.3.3 Western-Blot....58
4.2.3.4 Densitometrische Auswertung....58
4.2.4 Bindungsexperimente....59
4.2.4.1 Polymerisation von Mikrotubuli....59
4.2.4.2 GST-Bindungsexperimente....59
4.2.5 Molekularbiologische Methoden....60
4.2.5.1 Chemische Transformation von E. coli....60
4.2.5.2 Plasmid-Präparation aus E. coli....60
4.2.5.3 Klonierung von Protein codierender cDNA....60
4.2.6 Mikroskopische Methoden....61
4.2.6.1 Indirekte Immunfluoreszenz....61
4.2.6.2 Fixierung von Tubulin....62
4.2.6.3 Endozytose von Transferrin....62
4.2.6.4 Behandlung von Zellen mit Brefeldin A (BFA)....63
4.2.6.5 Behandlung von Zellen mit Butanol....63
4.2.6.6 FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching)....63

4.2.6.7 Mikroinjektion 64
4.2.6.8 Lebendzellbeobachtungen....65
4.2.6.9 Elektronenmikroskopie....65

5. ERGEBNISSE....67

5.1 Clathrin in der Mitose....67
5.1.1 Clathrin unter dem Lichtmikroskop....68
5.1.2 Clathrin unter dem Elektronenmikroskop....73
5.1.3 Zusammenfassung....76
5.2 An Clathrin-vermittelten Transportprozessen beteiligte Proteine in der Mitose....77
5.2.1 AP1....77
5.2.2 AP2....79
5.2.3 Dynamin....79
5.2.4 GAK/ Auxilin2....83
5.2.5 Auxilin1 87
5.2.6 Weitere Proteine....88
5.2.7 Zusammenfassung....89
5.3 Auswirkungen der Depletion von Clathrin auf die Assoziation von AP 1, Dynamin, Auxilin1 und GAK mit der Spindel....90
5.3.1 Depletion der Clathrin schweren Kette 90
Auswirkungen der Depletion von Clathrin auf AP1 in der Mitose....93
5.3.2 Auswirkungen der Depletion von AP1 auf Clathrin in der Mitose....96
5.3.3 Auswirkungen der Depletion von Clathrin auf Dynamin in der Mitose....97
5.3.4 Auswirkungen der Depletion von Dynamin auf Clathrin in der Mitose....100
5.3.5 Auswirkungen der Depletion von Clathrin auf GAK in der Mitose....104
5.3.6 Auswirkungen der Depletion von GAK auf Clathrin in der Mitose....106
5.3.7 Auswirkungen der Depletion von Auxilin1 auf Clathrin in der Mitose....109
5.3.8 Vergleich der Depletion von Auxilin1, GAK und der Kodepletion von Auxilin1 und GAK....110
5.3.9 Zusammenfassung....115
5.4 Bindung von GAK an die mitotische Spindel....116
5.4.1 GFP-GAK Fusionsproteine....116
5.4.2 Zusammenfassung....120

5.5 Auswirkungen der Depletion von Clathrin, AP1, Dynamin, Auxilin1 und GAK auf die Mitose....121
5.5.1 Morphologie der Chromosomen....121
5.5.2 Zeitlicher Verlauf der Mitose....123
5.5.3 Vitalität der Zellen....127
5.5.4 Breite der Metaphaseplatte....128
5.5.5 Pol zu Pol Distanz....129
5.5.6 Multipolarität der Spindeln....130
5.5.7 Zusammenfassung....131
5.6 Untersuchung der Bindeverhältnisse von Clathrin an die mitotische Spindel....132
5.6.1 Untersuchung der Bindungsfähigkeit von Clathrin an Tubulin....132
5.6.2 Untersuchung der Bindungsfähigkeit von Clathrin an Mikrotubuli....133
5.6.3 Untersuchung von isolierten Spindeln....135
5.6.4 Zusammenfassung....136
5.7 Untersuchung der mitotischen Spindel in vivo....137
5.7.1 Inkubation mitotischer Spindeln mit Nocodazol....137
5.7.2 Inkubation mitotischer Zellen mit Latrunculin B....138
5.7.3 Inkubation mitotischer Zellen mit BFA....140
5.7.4 Inkubation mitotischer Zellen mit Butanol....141
5.7.5 Inkubation mitotischer Zellen in Sucrose....143
5.7.6 Einwirkung von Kälteschock auf mitotische Zellen....147
5.7.7 Untersuchung mitotischer Spindeln mittels FRAP....153
5.7.8 Zusammenfassung....155

6. DISKUSSION....156
6.1 Clathrin in der Mitose....156
6.2 An Clathrin-vermitteltem Transport beteiligte Proteine in der Mitose....163
6.2.1 AP1 in der Mitose....164
6.2.2 Dynamin in der Mitose....165
6.2.3 Auxilin1 und GAK in der Mitose....167
6.3 Schlussbetrachtung....175

ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....176

7. LITERATURVERZEICHNIS.....179

8. ANHANG.....203

8.1 Danksagung.....203

8.2 Curriculum Vitae.....204

2. Abkürzungsverzeichnis

AAK1	*Adaptor-ssociated kinase*
AK	Antikörper
AKAP	*A-kinase-anchoring proteins*
ANTH	*AP180-N-terminal homology*
AP	Adaptorprotein
APC	*Anaphase-promoting complex*
AP180	Assemblyprotein mit einer Molmasse von 180 kDa
Arf 6	*ADP-ribosylation factor 6*
ARK	A*dhesion-related kinase*
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5´-triphosphat
ATPase	Adenosin-5´-triphosphatase
Aux	Auxilin
BAR	*Bin-Amphiphysin-Rvs domain*
BFA	Brefeldin A
BSA	Rinderserumalbumin
C-	Carboxy
CALM	Clathrin *assembly lymphoid myeloid leukemia protein*
CCP	Clathrin-bedeckte Pits (*Clathrin coated pits*)
CCV	Clathrin-bedeckte Vesikel (*Clathrin coated vesicle*)
cDNA	*copy* DNA
CdcK	*Cell division cycle kinase*
CD59	*cluster of differation 59*
CHC	Clathrin schwere Kette (*Clathrin heavy chain*)
CHC17	Clathrin schwere Kette 17
CHC22	Clathrin schwere Kette 22
CIMPR	*Cation-independent mannose 6-phosphate receptor*
C-Nap1	*Centrosomal Nek2-associated protein 1*
CIP	Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (*calf intestine alcalinephosphatase*)
CLC	leichte Kette von Clathrin (C*lathrin light chain*)
CLIC/GEEC	*Clathrin-independent carrier/ GPI-enriched endocytic compartments*
COP	*Coatomer protein*
Da	Dalton
DEAE	O-2-Diethylaminoethyl
Dlps	*dynamin-like proteins*
DMEM	*Dulbeccos modified Eagle`s medium*
DNA	Desoxynukleinsäure
DnaJ	Bakterielles Homolog zu Hsp40
Dank	Bakterielles Homolog zu Hsp70
dNTP	*Desoxynukleotid-triphosphat*
DRP	*dynamin related protein*
DTT	Dithiotreitol
ECL	*enhanced chemolumine-scence*
E.coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Eg5	Kinesin-verwandter Motor-protein Eg5
EGF	*epidermal growth factor*
EGFR	*epidermal growth factor receptor*
EGT	Ethylenbis (oxyethylen-nitrilo) tetraacetat
ENTH	*Epsin N-terminal homology domain*
Eps15	EGF-Rezeptorprotein-substrat 15
Epsin	Eps15-interagierendes Protein
ER	Endoplasmatisches Retikulum

FCS	Fötales Kälberserum
FPLC	*fast performance liquid chromatography*
GAE	γ-adaptin ear
GAK	Cyclin G-assoziierte Kinase
GAT	GGA *and* Tom1
GBP	Golgi-Bindungspuffer
GDP	Guanosin-5´-diphosphat
GEEC	*GPI-AP-enriched early endosomal compartments*
GFP	*Green fluorescent protein*
GGA	*Golgi-localized, γ-adaptin ear homology domain, Arf-binding protein*
GPI	Glycosyl-Phosphatidyl-inositol-Anker
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosin-5´-triphosphat
GTPase	Guanosin-5´-triphosphatase
γ-TuRC	γ-Tubulin Ringkomplexe
HEPES	[4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-thansulfonsäure
Hip1	*Huntingtin interacting protein 1*
Hip1R	Hip1 *related*
HRP	Meerrettichperoxidase
HIV1	Humanes Immundefizienz-Virus
Hsc70	Cognate heat shock-protein mit einer Größe von 70kDa
Hsp70	Hsp70 Hitzeschockprotein mit einer Größe von 70 kDa
HSET	Synonym für KIFC1-kinesin family member C1
IgG	Immunglobulin
IL2Rβ	Interleukin2 Receptor β Kette
IPTG	Isopropyl-ß-D-thiogalactosid
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani Medium
LCa	Leichte Kette A
LCb	Leichte Kette B
LDLR	*low density lipoprotein receptor*
mAb	monoklonaler Antikörper
MAP	Mikrotubuli assoziiertes Protein
MHC I	*Major histocompatibility complex 1*
MHH	Medizinische Hochschule Hannover
MPF	*m-phase promoting factor*
MT	Mikrotubuli
MTOC	Mikrotubuli Organisationszentrum
MW	Molekulargewicht
N-	Amino
N-BAR	N-Bin-Amphiphysin-Rvs
NECAP	*adaptin ear-binding clathrin-associated protein*
Nek2	NIMA-related kinase 2
NIMA	*never in mitosis A*-Kinase
nm	Nanometer
NMR	Kernspinresonanz
µm	Mikrometer
P	Pellet
PAK1	*p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase1*
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	P*hoshate buffered saline*
PCR	Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*)
PD	proximale Domäne
PFA	Paraformaldehyd
PH	*pleckstrin homology*
PI	Phosphatidyinositol
PIC	Phenyl-Isoamyl-Chloroform
PIP	Phosphatidylinositolphosphat
PMSF	Phenylmethylsulfonyfluorid
PRD	Prolinreiche Domäne

PTEN	Phoshatase und Tensin homolog deletiert auf Chromosom 10
PtdIns(4,5)P_2	Phospatidylinositol-4,5 biphosphat
PtdIns(3,4,5)P_3	Phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphat
RhoA	*Ras homolog gene family, member A*
RT	Raumtemperatur
SCF	*Skp1- Cullin factor*
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese
SH	Src Homologie
SH3	Scr-homology-3 domain
siRNA	short interfering RNA
shRNA	small hairpin RNA
SNX9	Sorting nexin 9
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TBST	Tris-*buffered saline with* Tween 20
TD	Terminale Domäne
TE	Tris-EDTA
TF	Transferrin
TGN	Transgolginetzwerk
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Ü	Überstand
rpm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
VHS	Vps27-, Hrs-, STAM-Domäne
Φ	hydrophobe Aminosäurenreste

3. Einleitung

„*Omnis cellula e cellulae*“, alle Zellen entstehen aus Zellen, mit dieser Erkenntnis von Rudolf Virchow (1855), wurde das Feld der Zellbiologie geboren. Die von ihm beobachtete Zellteilung, eine der grundlegenden Eigenschaften des Lebens, fasziniert seit damals viele Forscher. Die Zellen grenzen sich sowohl voneinander, als auch von Ihrer Umwelt ab, was zur Fragestellung ihrer Nährstoffversorgung führt. Um sich selbst zu erhalten muss also die Fähigkeit der extrazellulären Partikelaufnahme gegeben sein.

Bereits in den 30er Jahren des zwanzigsten Jahrhunderts, beobachtet W. H. Lewis die Aufnahme extrazellulärer Flüssigkeiten in Makrophagen [Lewis 1931]. Das Interesse an diesem, nun Endozytose (griechisch: endo=innen, zytos=Zelle) genannten Vorgang, wuchs Mitte der 60er Jahre, nachdem Thomas Roth und Keith Porter 1964 erstmals die Grundlagen der Rezeptor-vermittelten Endozytose beschrieben [Roth & Porter 1964]. Durch verbesserte Aufreinigungsmethoden wurde der Grundstein für weitere Untersuchungen gelegt und das Clathrintriskelion entdeckt [Ungewickell & Branton 1981; Ahle & Ungewickell 1986]. Bis zum heutigen Tag wurde die Rolle des Clathrins in Clathrin-vermittelten Transportprozessen und dessen makromolekulare Käfigstruktur aufgeklärt [Fotin et al. 2004].

Erst vor wenigen Jahren wurde Clathrin an der mitotischen Spindel lokalisiert [Royle et al. 2005]. Damit ist es in die Vorgänge eines zweiten grundlegenden Mechanismus der Zelle involviert, der Mitose.

3.1 Endozytose

Durch die große Vielfalt der aufzunehmenden Partikel, die von Hormonen über Nährstoffe und Plasmamembranproteine bis zu Lipiden reicht, haben sich im Laufe der Evolution verschiedene Endozytosewege entwickelt. Grob unterschieden wird zwischen der Internalisation von festen Partikeln, der Phagozytose sowie der Aufnahme von Flüssigkeiten, der Pinozytose.

Phagozytose

Die Phagozytose ist die Aufnahme von festen Nahrungspartikeln in einzelne eukaryotische Zellen. In Vielzellern sind vor allem die Zellen der Immunabwehr, wie dendritische Zellen oder Makrophagen, in der Lage pathogene Bakterien und Viren an deren Oberflächenstruktur zu erkennen und diese zu internalisieren [Wynn & Barron 2010]. Aber auch Protisten können kleinere Partikel und Bakterien aufnehmen, indem sie Zellausläufer bilden und mit diesen die Partikel umfließen, um sie anschließend in Nahrungsvakuolen zu verdauen.

Pinozytose

Bei der Pinozytose werden kleine Mengen an Flüssigkeit aus dem Extrazellularraum in die Zellen eingeschleust. Dies geschieht in Form von endozytotischen Vesikeln, die in der Regel nicht größer als 200 nm sind. Werden größere Flüssigkeitsmengen aufgenommen, spricht man von Makropinozytose. Diese findet an gekräuselten, weite Zellausläufer bildenden Membranbereichen, den *ruffled regions*, statt. Die internalisierten Vesikel erreichen, bei diesem Aktin- und Rac1-abhängigen Prozess, eine Größe bis zu 500 nm Durchmesser. Für ihre Bildung spielen Cholesterol und die Kinase PAK1 eine wichtige Rolle [Dharmawardhane et al. 2000; Grimmer et al. 2002].

Rezeptor-vermittelte Endozytose

Ein Spezialfall der Pinozytose ist die Rezeptor-vermittelte Endozytose. Hier werden zunächst Partikel wie Nährstoffe, Hormone und Wachstumsfaktoren durch Bindung an spezifische Rezeptoren an die Zelloberfläche gebunden und konzentriert. Das erlaubt der Zelle, gezielt Moleküle und extrazelluläre Plasmamembranrezeptoren von der Zelloberfläche zu internalisieren und so unterschiedliche Vorgänge, wie die Immunantwort oder

die Signaltransduktion zu steuern. Neben der am besten charakterisierten Clathrin-vermittelten Endozytose sind mehrere Clathrin-unabhängige Wege bekannt [Doherty & McMahon 2009].

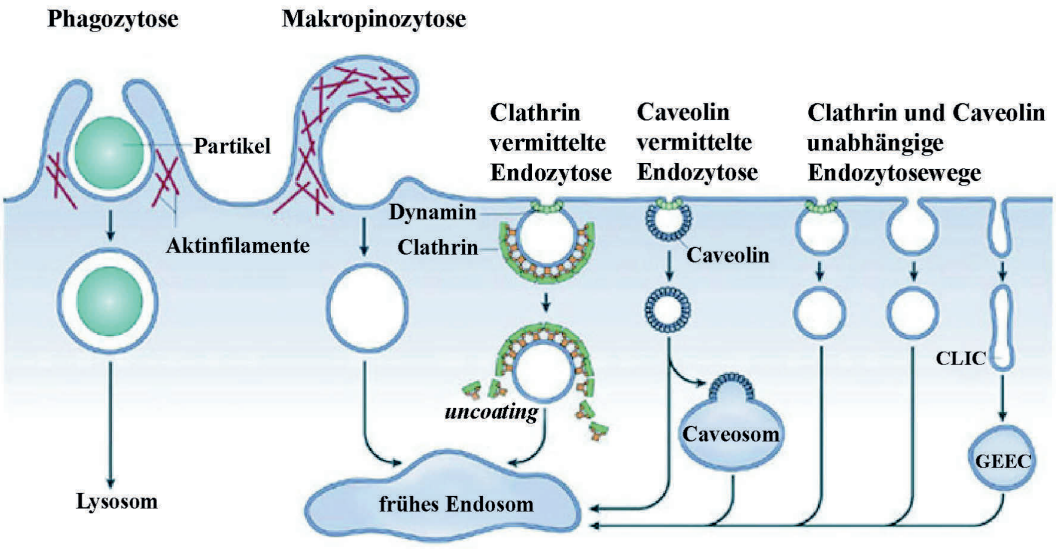


Abb. 1: Verschiedene Wege der Endozytose.

Schematische Darstellung der verschiedenen Endozytosewege. Verändert nach [Parton & Simons 2007]

Die Caveolin-vermittelte Endozytose findet in flaschenhalsartigen Einstülpungen von ca. 60-80 nm Durchmesser, den Caveolae, statt. Sie entstehen an cholesterinreichen Membranbereichen, an denen Sphingolipide, Cholestelol und GPI-verankerte Proteine angereichert werden [Parton 2003; Parton & Simons 2007]. Der Dynamin-abhängige Mechanismus führt zur Internalisation von Lipiden und lipidverankerten Proteinen sowie von Pathogenen, wie SV40-Viren oder dem Cholera Toxin [Kirkham et al. 2005; Cheng et al. 2006]. Der Transport zwischen apikaler und basolateraler Plasmamembran in polarisierten Zellen, wie z. B. den Endothelzellen, vollzieht sich ebenfalls Caveolin-vermittelt [Heltianu et al. 1989].

Die CLIC/GEEC Endozytose (*clathrin-independent carrier/ GPI-anchored protein-enriched early endocytic compartment)* stellt einen anderen Mechanismus dar, über den vor allem GPI-verankerte Proteine in Zellen eingeschleust werden. Diese werden zu Endosomen transportiert, den GEEC (*GPI-anchored protein-enriched early endocytic compartment)* [Sabharanjak et al. 2002]. Der Prozess wird von dem G-Protein Cdc42 gesteuert, an dessen GDP-gebundene Form Caveolin1 bindet und dessen Aktivität reguliert [Nevins & Thurmond 2006].

Das Caveolin-homologe Protein Flotillin bildet, ähnlich wie Caveolin, Oligomere und reichert sich in bestimmten Mikrodomänen der Plasmamembran an. An diesen findet dann die Aufnahme von Lipiden, Proteoglykanen und manchen GPI-verankerten Proteinen statt [Glebov et al. 2006; Frick et al. 2007; Payne et al. 2007]. Allerdings ist Flotillin auch in frühen Stadien des CLIC/GEEC Weges nachzuweisen [Lundmark et al. 2008], so dass nicht eindeutig belegt ist, ob Flotillin einen eigenständigen Endozytosemechanismus markiert.

Darüber hinaus existieren mehrere alternative Endozytosewege. In detergenzresistenten Mikrodomänen der Plasmamembran wird z. B. der IL2Rβ-Rezeptor angereichert und auf einem Cholesterol- und Dynamin-abhängigen Weg internalisiert. Seine Aufnahme wird ebenfalls von der Aktivität der G-Proteine RhoA und Rac1 sowie der Kinasen PAK1 und PAK2 gesteuert [Grassart et al. 2008]. Es sind auch Internalisationswege bekannt, die Dynamin- und Arf6-unabhängig ablaufen. Auf diesen Wegen werden z. B. das GPI-verankerte Protein CD59 sowie die MHC1 Proteine eingeschleust [Naslavsky et al. 2004].

Der am besten charakterisierte Endozytosemechanismus ist die Clathrin-vermittelte Endozytose, über die eine Reihe unterschiedlicher Rezeptoren und ihrer Liganden aufgenommen wird. Zu diesen gehören beispielsweise der Transferrin-Rezeptor, der das Eisenprotein Transferrin bindet, der LDL-Rezeptor (*low density lipoprotein*), über den mit Cholesterol beladenes LDL in die Zelle internalisiert wird, oder auch der EGR-Rezeptor (*epidermal growth factor*) [Schmid 1997; Brodsky et al. 2001].

Clathrin ist das namensgebende Protein dieses wahrscheinlich in allen eukaryotischen Zellen vorkommenden Endozytosetyps. Die Fähigkeit des dreibeinigen Proteins, sich zu polyedrischen Strukturen zusammenzulagern und fullerenähnliche Strukturen zu bilden, stellt die treibende Kraft der Clathrin-vermittelten Endozytose dar. Neben Clathrin ist eine ganze Reihe von Adaptoren und akzessorischen Proteinen an der Bildung und der Internalisation der Clathrin-bedeckten Vesikel (CCV, *Clathrin coated vesicles)* beteiligt, wodurch die Endozytose von transmembranen Rezeptoren-Liganden-Komplexen ermöglicht wird.

Durch Manipulation von unterschiedlichen Internalisationsmechanismen konnte nachgewiesen werden, dass viele Substrate über mehr als einen Mechanismus in die Zelle gebracht werden können. Beispielsweise werden Caveolin1-assoziierte Moleküle nicht nur Caveolin-vermittelt, sondern auch über die CLIC/GEEC Endozytose internalisiert, wodurch die Zuordnung zu einem Endozytoseweg nicht immer eindeutig ist. Beim Ausfall bzw. Inhibition eines Weges tritt folglich ein Kompensationsmechanismus in Kraft. Diese Redundanz ermöglicht somit auch dann die Aufnahme von essentiellen Nähr- und Wachstumsstoffen in die Zelle.

3.2 Stadien der Clathrin-vermittelten Endozytose

Die Clathrin-vermittelte Endozytose wird in folgende Stadien eingeteilt.

Initiations- und Invaginationsphase

In der so genannten Initiationsphase binden Adaptorproteine (APs) an integrale Membranproteine in Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PtdIns[4,5]P_2)-haltigen Regionen der zytosolischen Membranseite. Clathrinadaptoren, von denen verschiedene beschrieben wurden [Owen 2004], haben die Aufgabe, Clathrin und weitere Proteine an die Membran zu rekrutieren und dadurch eine indirekte Bindung zwischen Clathrin und Frachtmolekülen, wie z. B. Transmembranrezeptoren zu generieren.

Die Assoziation von AP2 mit der Membran erfolgt hauptsächlich durch die Bindung an PtdIns[4,5]P_2 und an spezielle Sequenzbereiche in den zytosolischen Domänen von Transmembranrezeptoren. Clathrin ermöglicht die Ausbildung eines mehrschichtigen Proteinkomplexes und führt schließlich zu einer Einstülpung der Membran, welche in diesem Stadium Clathrin-bedeckte Einstülpung (CCP, *Clathrin coated pit*) genannt wird. Die Zusammenlagerung von Clathrin zu Käfigen reicht für die Induktion der Einstülpung möglicherweise nicht aus [Nossal 2001]. Weitere Adaptoren, wie z. B. Epsin, binden PtdIns[4,5]P_2 über ihre stark konservierte ENTH-(*Epsin N-terminal homology*) Domäne. Dabei kommt es zur Konformationsänderung in der ENTH-Domäne, die dazu führt, dass sich die Membran krümmt. [Ford et al. 2002]. Zusätzlich induzieren Proteine mit einer N-BAR bzw. BAR-Domäne die Membrankrümmung. Zu diesen gehören SNX9 und Amphiphysin, die Clathrin und AP2 binden sowie Dynamin zu den sich bildenden Clathrin-bedeckten Einstülpungen rekrutieren [Lundmark & Carlsson 2004; Peter et al. 2004; Yoshida et al. 2004].

Abschnürung

In der Phase der Abschnürung wird durch BAR-Domänen Proteine die GTPase Dynamin an die sich bildenden Vesikel rekrutiert. Dynamin polymerisiert zu Spiralen um den Hals des Vesikels, der es mit der Membran verbindet, wodurch das Vesikel schließlich von der Membran abgeschnürt wird. Diesem Vorgang liegen zwei denkbare Mechanismen zugrunde.

Zum einen wird durch die Anlagerung von Dynamin um den Vesikelhals die GTPase-Aktivität von Dynamin stimuliert [Brodsky et al. 2001]. Die GTP-Hydrolyse löst eine Konformationsänderung des Proteins aus, wodurch sich die Dynaminschlingen immer weiter zusammenziehen und das Vesikel schließlich von der Membran freisetzen. Die andere

Möglichkeit impliziert, dass Dynamin für die Rekrutierung und Aktivierung weiterer Proteine, welche die Abschnürung des Vesikels katalysieren, benötigt wird [Hinshaw & Schmid 1995; McNiven 1998; Schmidt et al. 1999; Marks et al. 2001]

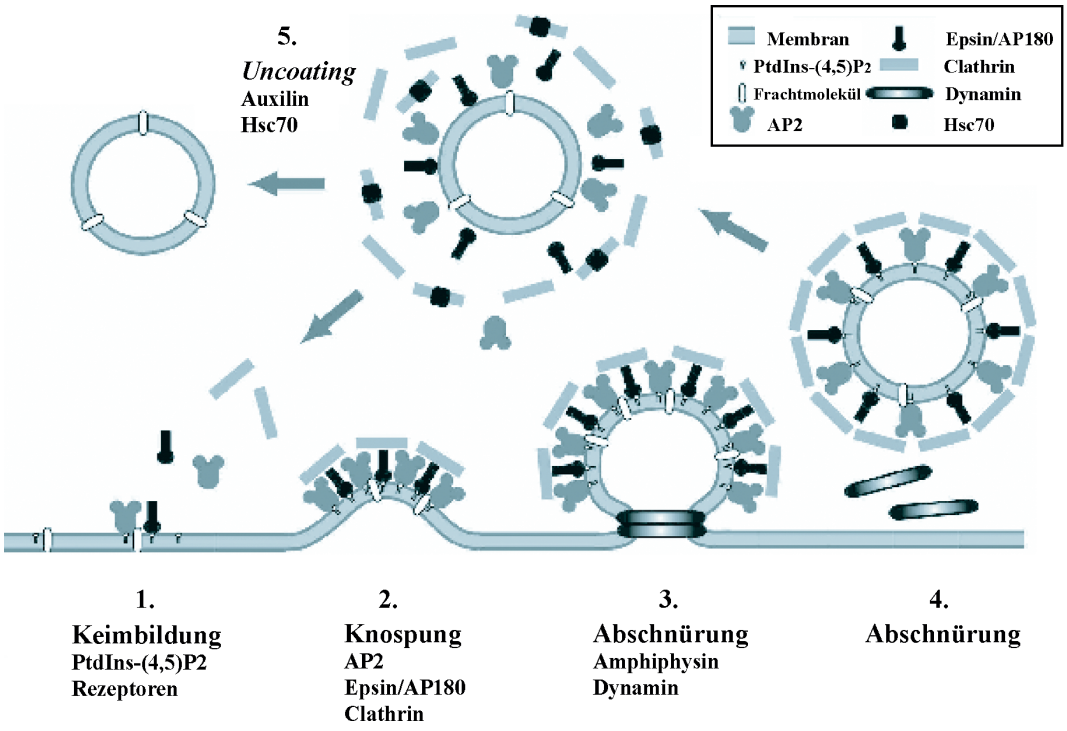


Abb. 2: Schematische Darstellung der Clathrin-vermittelten Endozytose.

1. Keimbildung: AP2 und ENTH-Domänenproteine werden an die Membran rekrutiert, wo sie an Membranlipide und Transmembranproteine (Frachtmoleküle) binden. 2. Knospung: Durch den Einfluss von Membran-krümmenden Proteinen und die Bindung von Clathrin wird die Einstülpung der Membran eingeleitet. 3-4. Abschnürung: Die GTPase Dynamin wird an den Hals des entstehenden Clathrinvesikels rekrutiert, um den sie sich ringförmig anordnet. Infolge der GTP-Hydrolyse erfährt Dynamin eine Konformationsänderung, durch die die Abschnürung des Clathrinvesikels von der übrigen Membran vermittelt wird. 5. *Uncoating:* Hsc70 wird durch GAK (im neuronalen Gewebe Auxilin1) an die Clathrin-hülle rekrutiert und aktiviert. Dadurch bindet es an die Beine der Clathrintriskelia und führt zur Dissoziation der Hülle. Die Freisetzung akzessorischer Proteine, wie AP2, Epsin oder AP180 wird durch die Synaptojanin vermittelte Veränderung der Lipidzusammensetzung bewirkt. Das nun hüllenlose Vesikel wird zu seinem Zielkompartiment transportiert, mit dem es verschmilzt.

Möglicherweise spielt auch die gleichzeitig ablaufende Aktinpolymerisation, die zwischen der Plasmamembran und dem Vesikelhals stattfindet, bei seiner Abschnürung eine Rolle. Durch diese wird mechanischer Druck seitlich auf die Clathrin-bedeckte Struktur ausgeübt, wodurch die Vesikelhalsmembranen näher aneinander rücken und unter Spannung gehalten werden. Das erleichtert die Anlagerung von Dynamin sowie die Abschnürung des Vesikels [Praefcke et al. 2004; Roux et al. 2006]. Eine Wechselwirkung zwischen Aktin und Clathrin konnte über das Protein Hip1 bzw. Hip1R nachgewiesen werden, welche an die leichten Ketten von Clathrin binden [Wilbur et al. 2008].

Uncoating

Nach der Abschnürung zerfällt die Vesikelhülle, wobei Clathrin und die Adaptorproteine unabhängig voneinander von der Membran dissoziieren [Hannan et al. 1998]. Die Dissoziation von Clathrin, das *Uncoating*, wird durch die Bindung des Chaperons Hsc70 ausgelöst, das eine N-terminale ATPase-Domäne besitzt. Aufgrund ihrer geringen ATPase-Aktivität muss diese erst durch die Interaktion mit den Kofaktoren Auxilin1 bzw. Auxilin2 (GAK) stimuliert werden [Prasad et al. 1993; Ungewickell et al. 1995; Greener et al. 2000; Umeda et al. 2000].

Kurz bevor sich das Clathrin-bedeckte Vesikel von der Membran löst, wird Auxilin verstärkt an Clathrinkäfige rekrutiert. Die Bindung findet in der Nähe des C-terminalen helikalen Dreibeins (*Tripod*) und der Überschneidung von zwei *Ankle*-Segmenten statt. Dabei interagiert Auxilin auch mit der terminalen Domäne eines dritten Clathrinbeins, so dass jede terminale Domäne ein Auxilin gebunden hat [Fotin et al. 2004]. *In vitro* ist für die Dissoziation der Clathrinhülle das C-terminale Fragment von Auxilin ausreichend, das die Clathrinbindungsdomäne und die J-Domäne trägt [Holstein et al. 1996; Greener et al. 2000; Umeda et al. 2000]. Des Weiteren wird für die Dissoziation von Clathrin das C-terminale Segment der Clathrin schweren Kette benötigt, das die Sequenz QLMLT trägt, an welche Hsc70 bindet [Gragerov & Gottesman 1994; Rappoport et al. 2008].

Nachdem Auxilin gebunden hat, rekrutiert es über seine J-Domäne Hsc70 zu den Clathrinkäfigen [Morgan et al. 2001]. Die J-Domäne trägt das Hsc70-Bindungsmotiv HPDK und stimuliert die ATPase-Aktivität von Hsc70. Nach induzierter ATP-Hydrolyse verändert das Hsc70-Molekül seine Konformation, was zu einer Verringerung der intramolekularen Interaktion zwischen Clathrintriskelia im Käfig führt. Dadurch wird der Käfig destabilisiert und zerfällt [Ahle & Ungewickell 1990; Morris et al. 1990; Ungewickell et al. 1995].

Zusätzlich führt die Dephosphorylierung von PtdIns[4,5]P_2 durch die Phosphatase Synaptojanin zu einer Destabilisierung der Interaktion von AP2 und AP180/CALM mit dem Vesikel und unterstützt die *Uncoating*-Reaktion [Cremona et al. 1999; Stenmark 2000]. Die ins Zytosol entlassenen Hsc70-gebundenen Triskelia können nach Dissoziation von Hsc-70 erneut an die Membran rekrutiert werden [Holstein et al. 1996; Sousa & Lafer 2006]. Das nun unbedeckte Vesikel wird intrazellulär zu seinem Zielkompartiment transportiert, mit dem es verschmilzt.

3.3 Clathrin

Das stark konservierte Clathrin Gen befindet sich auf Chromosom 17 (CHC17). Clathrin bildet ein Hexamer, welches aus drei schweren (192 kDa) und drei leichten (25-29 kDa) Polypeptidketten zusammengesetzt ist [Ungewickell & Branton 1981]. Die schwere Kette (CHC, *Clathrin heavy chain)* hat eine Länge von 1675 Aminosäuren (AS) und drei schwere Ketten sind über nicht kovalente Wechselwirkungen am C-Terminus miteinander zu einem Triskelion verknüpft [Ybe et al. 2003].

Die N-terminale globuläre Domäne (AS 1-390) wird über einen flexiblen *Linker* (AS 391-493) mit der distalen Domäne (AS 494-1073) verbunden, auf die die proximale (AS 1074-1522) und die Trimerisierungsdomäne (AS 1523-1675) folgen [Brodsky et al. 2001]. An die proximale Domäne binden die leichten Ketten, von denen es in Wirbeltieren zwei Isoformen gibt, die leichten Ketten A (LCA) und B (LCB) [Brodsky et al. 1987]. Wirbellose, Hefen und Insekten exprimieren hingegen nur eine Form, während in Pflanzen mehrere Isoformen vorkommen [Wakeham et al. 2005]. Die leichten Ketten spielen bei der Zusammenlagerung der Clathrin schweren Ketten eine Rolle, wo sie deren intermolekulare Bindung regulieren [Ybe et al. 1998].

Clathrintriskelia besitzen die Fähigkeit, sich zu käfigartigen Strukturen aus Penta- und Hexa- sowie Heptagonen zusammenzulagern, an deren Bildung die proximale und distale Domäne beteiligt sind [Crowther & Pearse 1981]. An der Membran liegen die Gitterstrukturen in unterschiedlichen Formen vor. Flache Netzwerke bestehen aus Hexagonen, während stärker gekrümmte Strukturen einen höheren Anteil an Pentagonen aufweisen [Kanaseki & Kadota 1969].

Clathrin selbst ist nicht in der Lage, an Lipide in der Membran zu binden. Deshalb werden Adaptorproteine benötigt, um Clathrin mit der Membran zu verbinden [Smith et al. 1998]. In Mutations- und Kristallisationsstudien sowie Bindungsstudien mit Clathrin N-terminaler Domäne und verschiedenen Liganden konnten mehrere Clathrin Bindungsmotive identifiziert werden. Das Clathrin-Box I Bindungsmotiv weist die Sequenzen [L[L,I] [D,E,N] [L,F] [D,E]] auf, sowie eine stark degenerierte Variante mit der Sequenz [LΦpΦ(-)], (Φ: große hydrophobe, p: polare und (-): saure Aminosäurereste) [Dell'Angelica et al. 1998; ter Haar et al. 2000]. Ein zweites Motiv, das Clathrin-Box II Bindungsmotiv, trägt die Sequenzen WDLW, LMDLA und LLDLL [Slepnev et al. 2000; Doray & Kornfeld 2001; Drake & Traub 2001]. Für die Bindung der terminalen Domäne von Clathrin, die die Zusammenlagerung von Clathrin an der Membran vermittelt, ist das sich oft wiederholende Tripeptid DLL verantwortlich [Morgan et al. 2000].

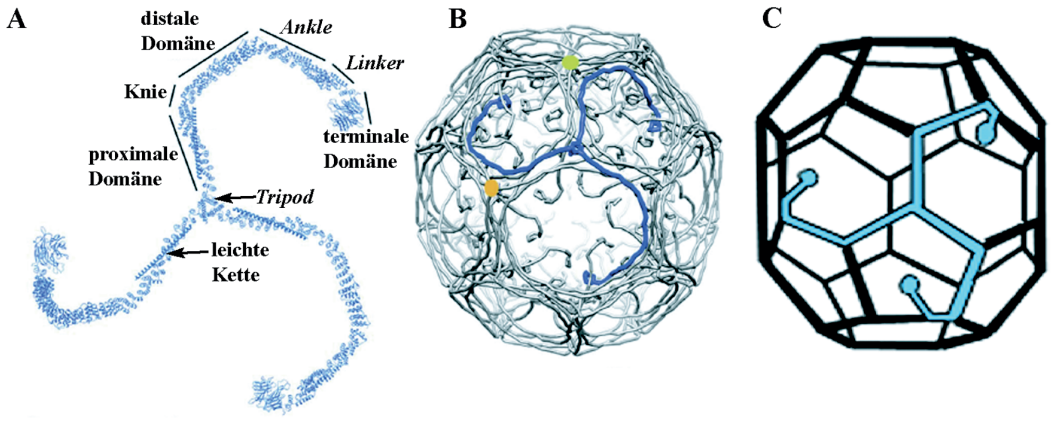


Abb. 3: Darstellung eines Clathrintriskelions und der Grundform eines Clathrinkäfigs.

A. Ein Clathrintriskelion besteht aus drei schweren und drei leichten Ketten. Die Zusammenlagerung der einzelnen schweren Ketten zu Trimeren erfolgt an der C-terminalen Trimerisierungsdomäne, auch Tripod genannt. An diese schließt sich das Clathrinbein an, das in eine C-terminale proximale Domäne, an die die leichten Ketten gebunden sind, und eine distale Domäne unterteilt ist. Die N-terminale globuläre Domäne ist über eine sog. *Ankle*- und eine flexible Linker-Domäne mit der distalen verbunden. B. Die Clathrintriskelia lagern sich zu fullerenähnlichen Strukturen zusammen. Dabei bilden die proximale und die distale Domäne die Kanten des polygonalen Gitters um Membranvesikel. Die terminale Domäne ist im Clathrinkäfig nach innen gerichtet. C. Bildung eines Clathringitters aus einzelnen Triskelia. A & B verändert nach [Xing et al. 2010]. C entnommen aus [Wilbur et al. 2005].

Eine zweite Isoform von Clathrin ist auf Chromosom 22 (CHC22) codiert und wird vorwiegend in der Skelettmuskulatur exprimiert [Liu et al. 2001; Wakeham et al. 2005]. Obwohl die räumliche Struktur von CHC 22 bisher nicht bestimmt wurde, werden ihm ähnliche Funktionen wie CHC 17 zugesprochen [Esk et al. 2010]. In Mäusen liegt CHC 22 nur als Pseudogen vor und wird nicht exprimiert [Liu et al. 2001; Wakeham et al. 2005].

Clathrin spielt eine charakteristische Rolle bei der Clathrin-vermittelten Endozytose und ist an der Abschnürung von Transportvesikeln vom *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) zu lysosomalen und endosomalen Kompartimenten beteiligt. Je nach vorhandenen Adaptorproteinen entstehen so unterschiedliche Subtypen von CCVs in der Zelle.

Neuere Untersuchungen zeigen, dass Clathrin zusätzlich zu seiner Funktion bei intrazellulären Transportvorgängen, auch eine Rolle bei der Zellteilung spielt [Royle et al. 2005]. So sind sowohl die schwere, als auch die leichte Kette von Clathrin 17 als Bestandteil der mitotischen Spindel identifiziert worden [Okamoto et al. 2000; Mack & Compton 2001]. Für seine Lokalisation an der Spindel sind die terminale Domäne und die Trimerisierung von Clathrin verantwortlich [Royle & Lagnado 2006].

3.4 Clathrin-assoziierte Proteine

3.4.1 Adaptorproteine

Adaptorproteine spielen neben Clathrin eine sehr wichtige Rolle in Clathrin-vermittelten Transportvorgängen in der Zelle. Sie rekrutieren Clathrin an die Plasmamembran während der Clathrin-vermittelten Endozytose und an die Membran des *trans*-Golgi-Netzwerks (TGN) und der Endosomen bei intrazellulären Transportvorgängen [Owen et al. 2004].

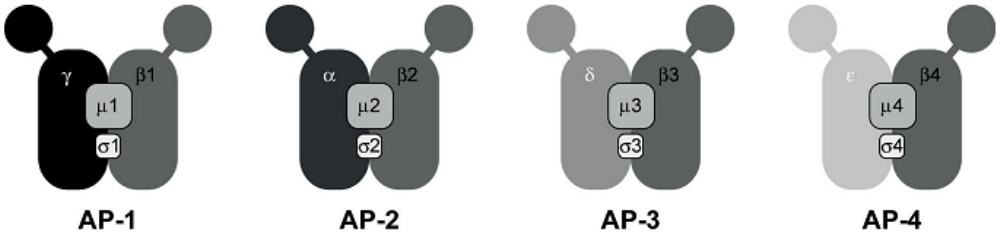


Abb. 4: Schematische Übersicht des molekularen Aufbaus der Adaptorproteine AP1 bis AP4.

Die Adaptorproteine bestehen jeweils aus zwei großen Untereinheiten (α, β1-4, γ, δ oder ε), einer mittleren (μ1-4) und einer kleinen Untereinheit (σ1-4). Die Rumpfbereiche der großen Untereinheiten sind über flexible Verbindungsbereiche mit den *Appendage*-Domänen verbunden. Nach [Robinson & Bonifacino 2001].

Es gibt vier verschiedene heterotetramere Adaptorproteine (AP), von denen AP1-3 in allen eukaryotischen Zellen vorkommen. AP4 wurde im Gegensatz dazu nur in höheren Eukaryoten nachgewiesen und wird weder in *S. cerevisiae*, noch in *D. melanogaster* und *C. elegans* exprimiert [Boehm & Bonifacino 2001]. In Epithelzellen und in neuronalen Zellen gibt es zusätzlich je eine zelltypische Adaptorkomplex-Variante, AP1B und AP3B. Die jeweiligen μ-Untereinheiten (μ1B bzw. μ3B) dieser Komplexe sowie die β3B-Untereinheit von AP3B werden gewebespezifisch exprimiert. Darüber hinaus wurden mehrere Gen- und Splicevarianten entdeckt [Boehm & Bonifacino 2001].

Die Adaptorkomplexe AP1 [Ahle et al. 1988] und AP2 [Ahle & Ungewickell 1989] waren die ersten identifizierten Clathrinadaptoren. Während AP2 den Hauptadaptor in CCVs an der Plasmamembran bildet, ist AP1 am TGN und an Endosomen zu finden. AP3 reguliert den Transport von frühen zu späten Endosomen und den *Multivesikular Bodies* (MVB), sowie den Transport zu den Lysosomen [Dell'Angelica et al. 1999; Mullins et al. 2000; Daugherty et al. 2001]. Für die β-Untereinheit von AP3 wurde ebenfalls eine direkte Bindung an Clathrin nachgewiesen [Dell'Angelica et al. 1997]. AP4 ist in den Transport am TGN involviert [Dell'Angelica et al. 1999; Hirst et al. 1999].

Alle heterotetrameren AP-Komplexe bestehen aus zwei großen (α, ß1-4 und γ, δ oder ε; 100-120 kDa), einer mittleren (μ1-4; ~50 kDa) und einer kleinen Untereinheit (σ1-4; 15-20 kDa). Die analogen Untereinheiten weisen lediglich eine Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz von 21-83 % auf, dennoch besitzen sie eine homologe Tertiärstruktur und haben viele funktionelle Gemeinsamkeiten [Boehm & Bonifacino 2001; Collins et al. 2002; Ghosh & Kornfeld 2003].

Die großen Untereinheiten werden in eine C-terminale globuläre *Appendage*-Domäne (oder *Ear*-Domäne; 15-30 kDa) und eine N-terminale *Trunk*-Domäne (60-70 kDa) gegliedert. Beide sind miteinander über eine Verbindungsdomäne (*Hinge)* von 46-410 Aminosäuren verknüpft, die im Falle der β-Untereinheit Clathrin-Box Bindemotive trägt [Shih et al. 1995; Dell'Angelica et al. 1998; ter Haar et al. 2000]. Die *Appendage*-Domänen weisen eine weitere Clathrinbindestelle auf [Knuehl et al. 2006] und interagieren mit akzessorischen Proteinen, die den Auf- bzw. Abbau der Clathrinhülle steuern [Review [Slepnev & Camilli 2000]. Durch Proteolyse können die *Ear*-Domänen der Adaptorproteine abgespalten werden [Schröder & Ungewickell 1991]. Übrig bleibt ein sog. Adaptor-Core-Komplex, der aus der *Trunk*-Domäne der großen Untereinheit und der σ-, sowie der μ-Untereinheit besteht. Der Adaptor-Core-Komplex bindet direkt an Membranen und Frachtmoleküle [Peeler et al. 1993; Traub et al. 1995]. Zusätzlich interagieren die Untereinheiten der Adaptoren miteinander. So bindet die σ-Untereinheit an die α- bzw. γ-Untereinheit, während die μ-Untereinheit mit der β-Untereinheit wechselwirkt [Page & Robinson 1995].

Adaptorproteine koordinieren die Bildung der Clathrin-bedeckten Vesikel und unterliegen, wie Clathrin, einem ständigen Austausch mit freien Proteinen im Zytosol. Der Austausch der Adaptorproteine erfolgt Clathrin-unabhängig [Wu et al. 2003].

Trotz ihrer Bedeutung für die Clathrin-vermittelte Endozytose führt die Depletion der Adaptorproteine überraschenderweise nicht zu einem vollständigen Arrest der Endozytose [Conner & Schmid 2003; Hinrichsen et al. 2003]. Während das Ausschalten von AP2 mittels RNAi die Aufnahme von Transferrin in die Zelle komplett inhibiert, wird die Internalisation von EGFR und LDLR nur um 10 % verringert [Motley et al. 2003]. Möglicherweise sind katalytisch geringe Mengen an AP2 für eine effiziente Clathrin-vermittelte Endozytose ausreichend. Das vollständige Ausschalten von AP1 und AP2 in Säugern, führt zu embryonaler Letalität [Zizioli et al. 1999; Meyer et al. 2000]. Zu einem ähnlichen Ergebnis führt das Ausschalten von AP2 in *D. melanogaster* [González-Gaitán & Jäckle 1997].

3.4.1.1 AP1

Das Adaptorprotein1 (AP1) spielt eine Rolle bei der Bildung Clathrin-bedeckter Vesikel, die sich vom TGN und den Endosomen abschnüren, um Enzyme zu den Endosomen und zurück zum TGN zu transportieren [Ahle et al. 1988; Robinson 1990; Futter et al. 1998].

Die Bildung der Clathrinhülle an die TGN-Membran wird durch die Bindung von Arf1-GTP vermittelt, das wiederum AP1 und GGAs an die TGN-Membran rekrutiert [Robinson & Bonifacino 2001]. Die Bindung von Arf1-GTP an AP1 ist direkt [Austin et al. 2000]. AP1 bindet ebenfalls an das PtdIns[2]P3 an der Golgi-Membran[Ghosh & Kornfeld 2003; Wang et al. 2003]. Durch seine Interaktion mit Arf1 ist die Bindung von AP1 ans TGN Brefeldin A (BFA) sensitiv [Robinson & Kreis 1992; Wong & Brodsky 1992; Stamnes & Rothman 1993].

Während die *Appendage*-Domänen der α- sowie der β-Untereinheiten von AP2 ca. 230 bis 300 Aminosäuren groß sind, ist die *Appendage*-Domäne der γ-Untereinheit von AP1 nur 120 AS lang [Kent et al. 2002]. Ihre Struktur konnte mit Hilfe der Röntgenkristallographie ermittelt werden. So ähnelt das γ-*Appendage* der N-terminalen Untereinheit der α- und β2-Adaptine, obwohl ihre Sequenzen in nur 12 % übereinstimmen [Hirst et al. 2000; Takatsu et al. 2000]. Zusätzlich weist das γ-Appendage eine Homologie zu einer anderen Gruppe von Proteinen auf, die ebenfalls an der Vesikelbildung zwischen dem TGN und den Endosomen beteiligt sind, den GGA [Hirst et al. 2000; Takatsu et al. 2000]. Sowohl das γ-*Appendage*, als auch die GGA interagieren mit Proteinen wie γ-Synergin und Eps15 [Page et al. 1999; Hirst et al. 2000]. Darüber hinaus bindet das γ-*Appendage* Proteine wie EpsinR, Rabaptin5, NECAP und Aftiphilin [Takatsu et al. 2000; Kalthoff et al. 2002; Kent et al. 2002; Nogi et al. 2002; Hirst et al. 2003; Mattera et al. 2003] und auch das saure Dileucinmotiv von HIV1 wird von der γ-Untereinheit von AP1 erkannt [Janvier et al. 2003].

3.4.1.2 AP2

AP2 rekrutiert Clathrin an die Plasmamembran [Robinson & Pearse 1986]. Seine Assoziation an die Membran wird vermittelt über Protein-Protein und Protein-Lipid Bindungen des α- und µ2-Adaptins, welche mit PtdIns[4,5]P_2 und PtdIns[3,4,5]P_3 interagieren [Gaidarov & Keen 1999; Collins et al. 2002; Rohde et al. 2002; Padrón et al. 2003].

Über die µ2-Domäne, die das YXXΦ Peptidmotiv trägt, bindet AP2 an den zytosolischen Teil verschiedener Rezeptoren [Owen et al. 1998]. Die Bindung wird verstärkt durch die Phosphorylierung von AP2 [Ricotta et al. 2002] durch die AAK1 [Conner & Schmid 2002]. Die Phosphorylierung führt zur Konformationsänderung und dadurch zur Aktivierung von AP2.

Die direkte Bindung von AP2 an Clathrin findet über das Clathrin-Box I Bindemotiv LLN/DLD, das sich in der β-Adaptin Domäne von AP2 befindet, statt [Owen et al. 2000]. Das α-*Appendage* von AP2 bindet an das DP[FW] und das FxDxF Motiv, das viele verschiedene Proteine tragen, so z.B die Proteine Kinase AAK1, Auxilin, Eps15 und Synaptojanin [Benmerah et al. 1996; Owen et al. 1999; Slepnev & Camilli 2000]. Das

α-*Appendage* bindet auch an ein weiteres Motiv, das WXX [FW], das Proteine wie Synaptojanin, AAK1 oder GAK1 tragen [Ritter et al. 2003; Jha et al. 2004]. Das saure Dileucinmotiv [DE]XXXL[LI] wird hingegen von den α/ σ2 und γ/ σ1 Hemikomplexen der Adaptorproteine erkannt [Doray et al. 2007].

3.4.1.3 GGA

Die GGA (*Golgi-localized, γ-containing, Arf-binding proteins*) Proteine sind teilweise homolog zu den Adaptinen, werden jedoch nicht zu den Adaptorproteinen gezählt. GGA Proteine sind Monomere, die stark konserviert in allen Eukaryoten vorkommen und Arf-abhängig Clathrin ans TGN rekrutieren. Sie beteiligen sich an der Sortierung von Mannose 6-Phosphat Rezeptor und Sortilin vom TGN zu den Endosomen [Nielsen et al. 2001; Puertollano et al. 2001a; Takatsu et al. 2001]. Drei Isoformen der ca. 65-80 kDa großen Proteine wurden bisher in Säugerzellen nachgewiesen, während in Hefen nur zwei exprimiert werden.

Das GGA Protein besitzt vier Proteindomänen: die N-terminale VHS- (Vps27, Hrs, STAM) Domäne, die GAT- (GGA and Tom1) Domäne, eine lange und flexible *Hinge*-Domäne und die C-terminale GAE- (γ-*adaptin ear*) Domäne. Die VHS-Domäne bindet an das saure Dileucinmotiv DxxLL von Frachtproteinen, die zwischen dem TGN und den Endosomen transportiert werden. Die GAT-Domäne, welche die meist konservierte Domäne des GGA ist (65 % Homologie), besitzt zwei Subdomänen [Dell'Angelica et al. 2000; Collins et al. 2003]. Mit ihrem N-terminalen „Hacken“ bindet die GAT-Domäne an das Arf1-GTP [Shiba et al. 2003], während sie mit dem C-terminalen Teil mit Rabaptin5 [Zhai et al. 2003] und Ubiquitin interagiert [Yamakami et al. 2003; Shiba et al. 2004]. Diese Fähigkeit ermöglicht den GGAs den Transport ubiquitinierter Proteine zwischen dem TGN und den Endosomen zu steuern. Die lange *Hinge*-Domäne besitzt zwei Clathrin-Box Bindemotive [Mullins & Bonifacino 2001; Knuehl et al. 2006] und ein DxxLLxx VHS-Bindemotiv. Wird dieses durch die Casein-Kinase II phosphoryliert, so bindet die *Hinge*- an die VHS-Domäne und löst eine Autoinhibition des GGA Proteins aus [Doray et al. 2002]. Die C-terminale GAE-Domäne weist eine ca. 30 %-ige Homologie zu der *Ear*-Domäne des γ-Adaptins von AP1 auf. Sie besitzt eine weitere Clathrinbindestelle [Knuehl et al. 2006]. Zusätzlich interagiert sie über das [DE]n ΦG[PDE]Φ Motiv (Φ: hydrophobe Aminosäurereste) Proteine wie Rabaptin5, EpsinR, p56, NECAP [Review [Bonifacino 2004].

Wie bereits schon für AP1, konnte für GGA1 und GGA2 eine direkte Bindung an Arf1-GTP in *yeast two-hybrid* Untersuchungen nachgewiesen werden [Bonifacino 2004]. Die Überexpression von GGA führt zur reduzierten Lokalisation von AP1 am TGN, so dass die beiden Proteine möglicherweise um die Arf1-Bindung konkurrieren [Dell'Angelica et al. 2000]. Im Gegensatz dazu steigt die Clathrinkonzentration am TGN an, was impliziert,

dass GGAs Clathrin ans TGN rekrutieren [Puertollano et al. 2001b]. Bei einer sehr hohen Überexpression von GGA verändert sich die Morphologie des Golgi [Boman et al. 2000; Poussu et al. 2000; Takatsu et al. 2000]. Werden hingegen GGA1 und GGA2 in *S. cerevisiae* depletiert, so finden Transportdefekte in *post*-Golgi-Regionen und im Transport vom TGN zu den Endosomen statt [Black & Pelham 2000; Hirst et al. 2000; Costaguta et al. 2001; Zhdankina et al. 2001].
Im Vergleich zu AP1, das am Transport vom TGN zu frühen Endosomen involviert ist, spielen GGA eine Rolle bei Transportvorgängen vom TGN zu späten Endosomen [Black & Pelham 2000].

3.4.2 Dynamin

Zu der in Eukaryoten hoch konservierten Dynamin Superfamilie gehören neben den klassischen Dynamin-Isoformen weitere große GTPasen, wie die Dlps (*dynamin like proteins*), OPA1/Mgm1-Proteine (*optic arthropy1/mitochondrial genome maintenance1*), Mx-Proteine (*myxovirus*), Mitofusine und GBPs (*guanylate-binding proteins*) [Review in: [Praefcke et al. 2004]. Die Mitglieder dieser Superproteinfamilie spielen in vielen zellulären Prozessen, wie der Endozytose, der Nukleation und Dynamik von Aktin, der Cytokinese und der Biogenese der Mitochondrien und Chloroplasten eine wichtige Rolle.
Die Säugetier-Dynamine1 und 2 gehören zu den „klassischen Dynaminen“. Diese bestehen aus fünf Proteindomänen: der großen N-terminalen GTPase-Domäne, einer mittlere Domäne, der PH-Domäne (*pleckstrin homology domain*), der GED-(*GTPase effector domain*) Domäne und der PRD-Domäne [Warnock et al. 1996]. Die stark konservierte GTPase-Domäne hat eine Länge von 300 Aminosäuren und besitzt drei GTP-Bindungsmotive, welche eine dreidimensionale GTP-Bindestruktur bilden [Niemann et al. 2001]. Die GTPase-Domäne weist zunächst eine niedrige Affinität sowohl zu GTP, als auch zu GDP auf. Erst die Oligomerisierung des Moleküls stimuliert die GTPase Aktivität. Diese wird reguliert dadurch, dass die GED-Domäne mit der GTPase-Domäne, der mittleren Domäne und sich selbst interagiert und so zu eigenem Effektor wird [Muhlberg et al. 1997; Smirnova et al. 1999; Zhang & Hinshaw 2001]. Durch die GTP-Hydrolyse wird dann ein Wechsel zwischen einer aktiven und inaktiven Form von Dynamin erreicht [Sever et al. 2000]. GTP-gebundenes Dynamin bindet effizienter an Liposome und das assemblierte Protein interagiert schneller mit SH3-Domänen anderer Proteine. Im Gegensatz zu Dynamin wird die Regulation der GTPase Aktivität anderer GTPasen, wie z. B. der Ras Proteine, erst durch Bindung von GTPase-aktivierenden Proteinen vermittelt.

Über seine PRD-Domäne interagiert Dynamin mit SH3-(Scr-homology3) Domänen anderer Proteine, während es über die PH-Domäne direkt an Phospholipide bindet. Zusätzlich hat Dynamin die Fähigkeit *in vitro* zu Spiralen-Strukturen an Lipidmembranen zu oligomerisieren [Hinshaw 2000].
Wird im ersten GTP-Bindungsmotiv das Lysin 44 gegen Alanin ausgetauscht, so erhält man eine dominant negative Dynaminmutante ($Dynamin^{K44A}$) mit der Unfähigkeit GTP zu binden und zu hydrolysieren. Die Überexpression von $Dynamin^{K44A}$ führt zur Inaktivierung der Clathrin-vermittelten Endozytose [Damke et al. 1994].
Während in *D. melanogaster* und *C. elegans* nur eine Dynamin-Isoform vorkommt, sind in Säugetieren drei Isoformen bekannt, die wiederum mehrere Splicevarianten aufweisen. Dynamin1, das ursprünglich als ein Mikrotubuli-bindendes Protein beschrieben wurde [Shpetner & Vallee 1989], kommt ausschließlich im neuronalen Gewebe vor, wo es vorwiegend in der Presynapse die Abschnürung endozytotischer Vesikel steuert. Dynamin2 wird ubiquitär exprimiert, während Dynamin3 in Hoden, der Lunge und zum Teil in Neuronen nachzuweisen ist [Sontag et al. 1994].
Dynamin2 ist sowohl an endozytotischem, als auch exozytotischem Vesikeltransport beteiligt [McNiven et al. 2000]. Darüber hinaus spielt es eine Rolle in der Reorganisation des Zytoskeletts, wie z. B. der Bildung von Podosomen und bei der Ausbildung sog. *membrane ruffling* Strukturen [Ochoa et al. 2000]. Zusätzlich ist Dynamin2 in apoptotische Prozesse involviert [Fish et al. 2000] und als einzige Isoform der Säugerzellen an der Cytokinese beteiligt [Thompson et al. 2002; Konopka et al. 2006]. Auch in Pflanzen spielt Dynamin eine Rolle beim Aufbau der neuen Zellwand, wo es sich an der Remodellierung der Plasmamembran während der Cytokinese beteiligt [Echard et al. 2004; Eggert et al. 2004].

3.4.3 Auxilin1

Das neuronale Phosphoprotein Auxilin1 gehört zur Familie der DnaJ Proteine. Auxilin1 wurde zunächst als neuronenspezifisches Clathrin-assoziiertes Protein aus Rinderhirn gewonnen [Ahle & Ungewickell 1990]. Das 110 kDa große Protein besitzt eine N-terminale PTEN/Tensin Domäne, die $PtdIns[4]P_3$ erkennt und homolog zum Tumor Supressor PTEN ist [Li & Sun 1997]. In seiner Clathrinbindedomäne befinden sich drei Clathrinbindemotive, über die Auxilin1 an Clathrin bindet. Ebenfalls besitzt es drei DPF-Bindemotive, die seine Bindung an AP2 ermöglichen [Owen et al. 1999]. Am C-Terminus von Auxilin1 befindet sich die J-Domäne, über die es spezifisch mit Hsc 70 interagiert und dessen ATPase-Aktivität stimuliert.

Neben seiner Aufgabe als Kofaktor von Hsc70 bei der Dissoziation der Clathrinhülle rekrutiert Auxilin Clathrin und Adaptorproteine an die Membran [won Lee et al. 2005] und koordiniert den Austausch von Clathrin an dieser [Wu et al. 2001]. Auch eine direkte Interaktion von Auxilin mit Dynamin konnte nachgewiesen werden, so dass Auxilin1 ebenfalls eine Rolle bei der Abschnürung der Clathrin-bedeckten Vesikel zugesprochen wird [Sever et al. 2006].
Hefe, *C. elegans* und *D. melanogaster* exprimieren nur eine Auxilin-Isoform. Die Depletion des Auxilin Gens in *D. melanogaster* ist letal und die Ausschaltung des Proteins in *C. elegans* führt zur Reduktion der Endozytose in Oozyten sowie zum Arrest in der Entwicklung des Larvenstadium [Greener et al. 2001; Hagedorn et al. 2006]. In Hefe führt die Depletion von Auxilin zur Akkumulation von Clathrin-bedeckten Vesikel und so zu Defekten bei der Endozytose [Gall et al. 2000; Pishvaee et al. 2000].
Lange Zeit konnten diese Ergebnisse in Säugetierzelllinien nicht reproduziert werden. Erst neuere Studien zeigten, dass in verschiedenen Zelllinien beide Auxilin-Isoformen in beinahe äquimolarem Verhältnis exprimiert werden [Hirst et al. 2008]. Dadurch kompensieren sie sich gegenseitig, so dass die alleinige Depletion des ubiquitär exprimierten GAK/Auxilin2 in Zelllinien ohne größere Auswirkungen auf die Internalisation von Transferrin, EGF oder CIMPR bleibt [won Lee et al. 2005; Zhang et al. 2005]. Erst durch die Kodepletion beider Isoformen wird die Inhibition der Endozytose erreicht [Hirst et al. 2008].

3.4.4 GAK/Auxilin2

Auxilin2 oder auch die Cyclin G-assoziierte Kinase (GAK) wird ubiquitär exprimiert und besitzt eine 50 %-ige Sequenzhomologie mit Auxilin1. Darüber hinaus besitzt GAK eine Serin/Threonin Kinasedomäne an seinem N-Terminus. Diese ist homolog zur Kinasedomäne der Adaptor-assoziierten Kinase1 (AAK1) [Greener et al. 2000; Umeda et al. 2000; Conner & Schmid 2002] und ist *in vitro* in der Lage, die µ-Untereinheit von AP1 und AP2 zu phosphorylieren [Kanaoka et al. 1997; Umeda et al. 2000; Korolchuk & Banting 2002]. Des Weiteren hat GAK nur zwei Clathrinbindestellen und zwei DPF Motive in seiner Clathrinbindedomäne. Als Cyklin G-assoziierte Kinase bindet GAK an Cyclin G und besitzt die Fähigkeit, Histon H1 zu phosphorylieren. Darüber hinaus kann GAK sowohl mit AP1, als auch mit AP2 interagieren. Die Überexpression von GFP-GAK führt zur Aggregatbildung in stabil transfizierten HeLa und interferiert mit der Aufnahme von Transferrin.

3.4.5 Hsc70

Das Chaperon Hsc70 (*heat-shock cognate* mit 70 kDa Molekülmasse) gehört zu den Hitzeschockproteinen [Review in: [Henderson 2010; Richter et al. 2010]. Diese Proteine beteiligen sich an der Faltung, Translokation und Kontrolle biologischer Aktivität von Proteinen. Zusätzlich sorgen sie für die Erhaltung und Auflösung von Proteinkomplexen und interagieren mit denaturierten Proteinen [Bukau & Horwich 1998]. Hsc70 überwacht die Faltung von Proteinen, sowie die Dissoziation von Proteinaggregaten und unerwünschten Protein-Protein-Interaktionen [Hendrick et al. 1993]. Es bindet generell hydrophobe Peptide bzw. exponierte hydrophobe Proteinsegmente, die auch in ungefalteten Proteinen vorkommen, wodurch seine Selektivität für Substrate relativ unspezifisch ist [Bukau & Horwich 1998]. Erst die Interaktion mit Kofaktoren bewirkt seine gerichtete Assoziation mit spezifischen Substraten. Die Kofaktoren, zu denen DnaJ-ähnliche Proteine gehören, vermitteln die Spezifität von Hsc70 für ein bestimmtes Substrat durch die Stimulation seiner ATPase-Aktivität. Die induzierte Hydrolyse von ATP führt zu einer Konformationsänderung, wodurch das gebundene Substrat fest an Hsc70 gebunden wird [Wilbanks et al. 1995].

Hsc70 besitzt eine N-terminale ATPase-Domäne (44 kDa), eine zentrale Substratbindungsdomäne (18 kDa) und eine wenig konservierte C-terminale Domäne (10 kDa).

Das Hsc70-Homolog in *E. coli* ist das Protein DnaK [Flaherty et al. 1991]. Trotz seiner geringen Sequenzübereinstimmung mit Hsc70, weisen beide Proteine strukturelle Ähnlichkeiten in der ATPase-Domäne auf. Die ATP-Hydrolyse erfolgt auch bei DnaK erst durch die Stimulation mit einem Kofaktor, dem DnaJ. Die Wirkung von DnaJ wird allerdings erst durch die Interaktion eines Substats mit der Substratbindungsdomäne von Dank verstärkt [Laufen et al. 1999; Mayer et al. 1999a].

3.4.6 Weitere Clathrin Adaptoren

Eine ganze Reihe weiterer Proteine interagieren direkt mit Clathrin. Proteine der Epsin Familie binden direkt an Clathrin und an Inositollipide sowie ubiquitinierte Frachtmoleküle [Polo et al. 2002]. Epsin selbst kann monoubiquitinyliert werden, wodurch es mit weiteren Transmembranrezeptoren interagiert [Oldham et al. 2002; Polo et al. 2002].

Das neuronale AP180 und sein ubiquitär exprimiertes Homologon CALM binden Clathrin und AP2 und beteiligen sich an der Regulation der Zusammenlagerung von Clathrinkäfigen [Camilli et al. 2002; Meyerholz et al. 2005].

3.5 Der Zellzyklus

Neben seiner Funktion in Clathrin-vermittelten Transportprozessen wurde Clathrin an der mitotischen Spindel lokalisiert [Royle et al. 2005]. Daher werden im weiteren Teil der Einleitung die Vorgänge der Zellteilung vorgestellt. Jede Zelle durchläuft einen geregelten Zellzyklus, in dem Zellwachstum und Replikation des genetischen Materials sowie dessen anschließende gleiche Verteilung auf die Tochterzellen aufeinanderfolgen. Im Laufe der Evolution hat sich der Zellzyklus zu einem sehr komplexen und exakt regulierten Mechanismus entwickelt. Fehlregulation und Störung des Systems führen zur ungeregelter Zellteilung und zur Entstehung von Krebs.

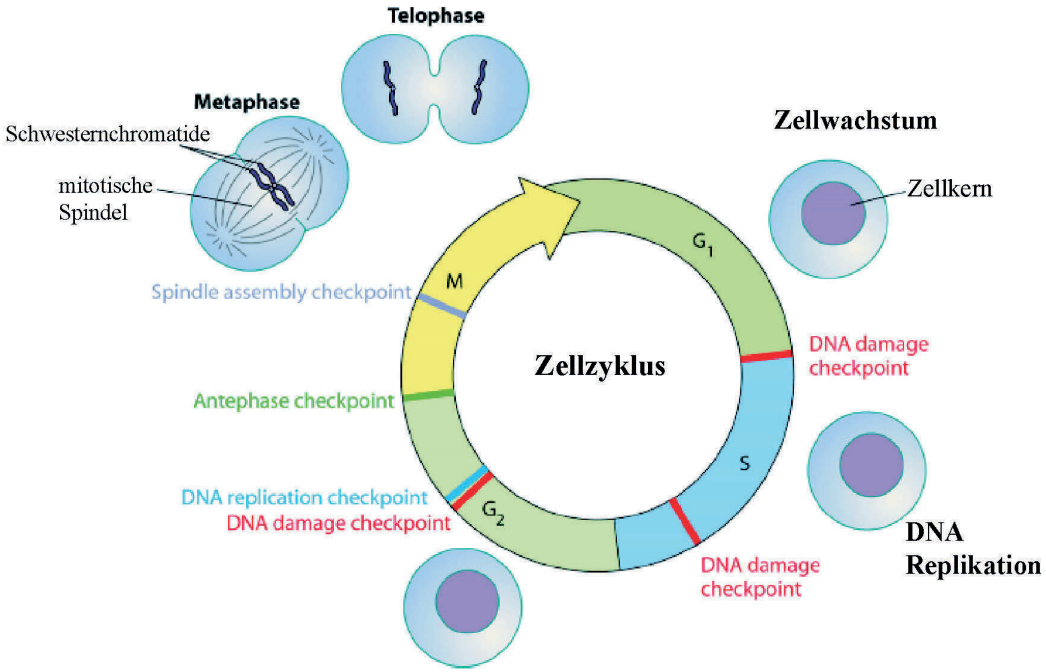


Abb. 5: Schematische Übersicht des Zellzyklus.
Verändert nach [Chin & Yeong 2010]. S: S-Phase, G: G-Phase, M: M-Phase.

Der eukaryotische Zellzyklus besteht aus zwei Phasen: der Interphase und der M-Phase [Mitchison & Carter 1975]. Die Interphase stellt die Phase zwischen zwei Teilungszyklen dar und wird in drei Stadien unterteilt: in der Synthesephase (S-Phase) finden die Replikation der DNA und die Verdoppelung des Centrosoms statt, während die Zelle in den beiden, die S-Phase begrenzenden, G-Phasen (G_1 & G_2; G=gap, engl.: Lücke) an Volumen zunimmt und sich auf den jeweils folgenden Schritt vorbereitet. Zellen, die eine

zeitliche, reversible Ruhepause in der Zellteilung einlegen, erreichen eine sog. G_0-Phase, in der die RNA- und Proteinsynthese weiterhin ablaufen, das Wachstum jedoch eingestellt wird. Die M-Phase besteht aus zwei strikt nacheinander ablaufenden Prozessen: der eigentlichen Mitose (Kernteilung) und der Cytokinese (Cytoplasmateilung).

3.5.1 Regulation des Zellzyklus

Die Prozesse der Zellteilung unterliegen einem streng regulierten Kontrollsystem, das sich aus periodisch ablaufenden biochemischen Prozessen zusammensetzt. Eine Schlüsselrolle spielen dabei cyclinabhängige Kinasen (Cdks), die durch eine Zusammenlagerung mit Cyclinen aktiviert werden [Nigg 1995; Morgan 1997].
Cycline werden Zellzyklus-spezifisch reguliert, so dass sie nur während einer bestimmten Zellzyklusphase synthetisiert und dann wieder abgebaut werden [Hochstrasser 1995]. Die Konzentration der Cdks bleibt hingegen während des gesamten Zellzyklus konstant. Jede Phase des Zellzyklus ist von einer bestimmten Kombination eines Cyclins mit der aktivierten Cdk gekennzeichnet, in der die aktivierte Cdk eine Vielzahl von Proteinen phosphoryliert. So wird z. B. der G_2/M-Übergang durch die Aktivität des Cyclin B/Cdk1-Komplexes initiiert, den man auch MPF (*M-phase promoting factor*) nennt [Nigg 1995; Morgan 1997; Murray 2004].
In Eukaryoten wurden vier unterschiedliche cyclinabhängige Kinasen sowie vier verschiedene Cycline identifiziert. Im Gegensatz dazu exprimieren Hefen nur eine Cyclin-abhängige Kinase [Nasmyth & Reed 1980].
Das Durchlaufen des Zellzyklus kann an bestimmten Kontrollpunkten (*Checkpoints*) angehalten werden, wodurch seine anspruchsvolle Regulation ermöglicht wird. Treten Fehler in vorausgegangenen Prozessen auf, so wird das Fortschreiten im Zellzyklus verhindert. Die Kontrollmechanismen arbeiten nach dem „Alles oder Nichts“-Prinzip und sind irreversibel, so dass nach dem Überschreiten eines *Checkpoints* die nächste Phase komplett vollzogen wird.
Mehrere DNA-Schadens-Kontrollpunkte (*DNA-Damage-Checkpoints*) überprüfen die Vollständigkeit und die Korrektheit der DNA Replikation und gewährleisten einen intakten Zustand des genetischen Materials. Der G2-Kontrollpunkt überwacht den Eintritt in die Mitose [Stark & Taylor 2006]. Der Spindel-Kontrollpunkt (*Spindel-Checkpoint*) in der Mitose stellt die korrekte und vollständige Bindung der Chromosomen an die Spindel sicher, bevor jene in der Anaphase getrennt werden [Gorbsky 2001].

Versagen diese Kontrollmechanismen, so treten fatale Folgen für die Zelle auf, da die resultierende Ungleichverteilung der Chromosomen zur Apoptose oder zum unkontrollierten Zellwachstum führen kann.

3.5.2 Die Mitose

Die Mitose wird in fünf Stadien unterteilt: Prophase, Prometaphase, Metaphase, Anaphase und Telophase. In der Prophase wird die in der S-Phase replizierte DNA kondensiert, so dass einzelne Chromosomen im Lichtmikroskop sichtbar werden. Die in der G_2-Phase verdoppelten Centrosomen ordnen sich an gegenüberliegenden Zellpolen an und beginnen mit dem Aufbau des bipolaren Spindelapparates. In der folgenden Prometaphase kommt es in höheren Eukaryoten zur Auflösung der Kernhülle und zur Bindung der Chromosomen an die Mikrotubuli (MT) der Spindel. Die Schwesterchromatiden werden nun in der Äquatorialebene angeordnet und erreichen ihre maximale Ausrichtung in der Metaphase. Nachdem alle Schwesterchromatiden an Mikrotubuli gebunden in der Äquatorialebene angeordnet sind, wird die Anaphase eingeleitet, in der die Schwesterchromatiden voneinander getrennt und zu entgegengesetzten Polen der Zelle gezogen werden. In der Telophase entstehen neue Kernmembranen um die beiden getrennten Chromosomensätze, woraufhin diese dekondensieren. Direkt an die Mitose schließt sich die Cytokinese an, in der eine neue Zellmembran aufgebaut wird und die zwei identischen Tochterzellen voneinander getrennt werden.

Die Regulation mitotischer Vorgänge wird durch zwei wichtige Mechanismen gesteuert: die Phosphorylierung und die Proteolyse. Phosphorylierung von Proteinen ist ein reversibler Prozess, der die Kontrolle reversibler Vorgänge, wie den Aufbau der mitotischen Spindel erlaubt. Die irreversible Proteolyse steuert die mitotischen Prozesse hingegen in eine einzige Richtung. Sie wird von der Phosphorylierung kontrolliert dadurch, dass mehrere mitotische Kinasen proteolytisch herunterreguliert werden [Nigg 2001; Pines 2006]. Die bekanntesten Kinasen der Mitoseregulation sind die Polo-Kinasen [Randall et al. 2007], die Aurora-Kinasen [Kollareddy et al. 2008] und die NIMA (*never in mitosis A*)-Kinasen [Nigg 2001]. Die wohl wichtigste von ihnen ist die Serin/Threonin Proteinkinase Cdk1, die am G2/M-Übergang durch die Phosphatase Cdc25C aktiviert wird [Izumi & Maller 1993].

3.5.3 Die mitotische Spindel

In eukaryotischen Zellen wird die Aufgabe der Chromosomenverteilung während der Mitose und der Meiose durch den bipolaren Spindelapparat ausgeführt. Seine Hauptkomponenten sind die Mikrotubuli (MT), welche zusammen mit einer Vielzahl assoziierter Proteine interagieren, um eine geordnete Verteilung des genetischen Materials zu ermöglichen.

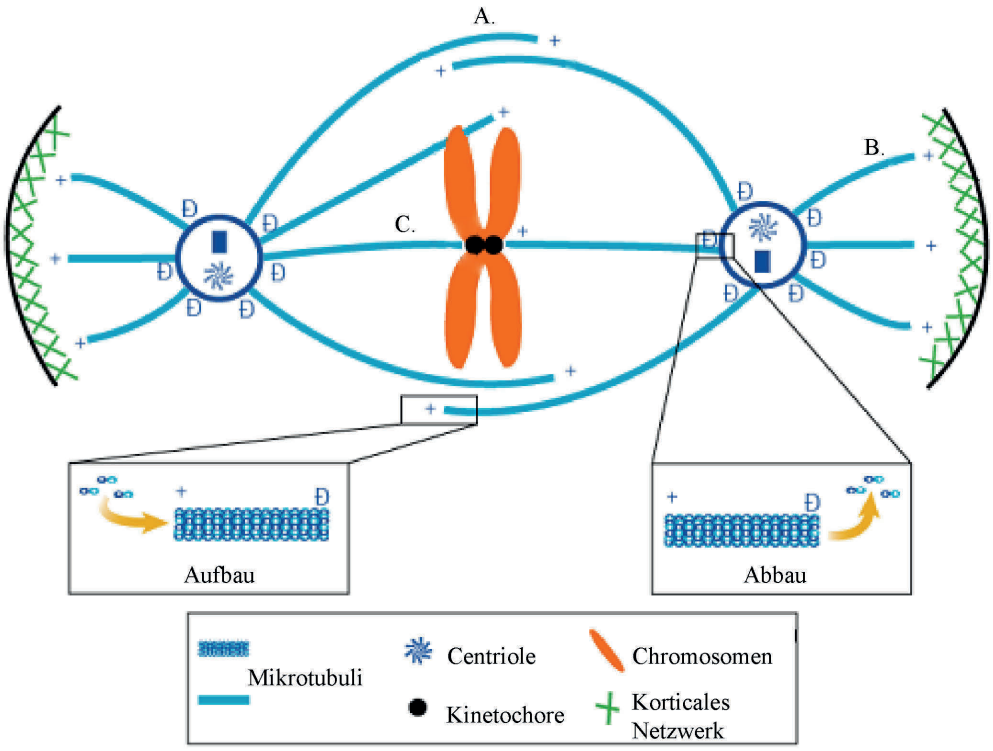


Abb. 6 Schematischer Aufbau der mitotischen Spindel.

A. Interpolare-Mikrotubuli, B. Astral-Mikrotubuli, C. Kinetochor-Mikrotubuli; modifiziert nach [Sharp et al. 2000].

In Säugerzellen besitzt eine Spindel über 3000 Mikrotubuli, die auf die beiden Spindelhälften gleichmäßig verteilt sind [McIntosh JR 1971]. Mikrotubuli sind dynamische Polymere aus α/β-Tubulin Heterodimeren. Die Bindung und die Hydrolyse von GTP durch β-Tubulin führt zu einem dynamischen Auf- und Abbau der Heterodimere an den Enden der Mikrotubuli, wodurch ihre Polarisierung bedingt wird. Ihre Minus-Enden befinden sich an den Spindelpolen, während die Plus-Enden an die Kinetochoren der Chromosomen binden. Motor Proteine der Dynein- und Kinesin- Proteinfamilie nutzen diese Polarität für ihren Transport [Hirokawa et al. 1998; Sharp et al. 2000; Lee et al. 2001a].

Der mitotische Spindelapparat besitzt drei unterschiedliche Klassen von Mikrotubuli: die Kinetochor-, die Astral- und die Interpolaren-Mikrotubuli. Die Kinetochor-Mikrotubuli dehnen sich von den beiden Spindelpolen bis zu den Chromosomen aus, wo sie lateral oder direkt mit ihrem Plus-Ende an die Kinetochorplatte der Schwesterchromatiden binden. Manchen Kinetochor-Mikrotubuli fehlt die Bindung an die Centrosomen bzw. an die Kinetochorplatte. Diese „freien“ Kinetochor-Mikrotubuli sind eng mit den durchgehenden Kinetochor-Mikrotubuli verbunden. Zusammen bilden sie eine fest gebündelte Faser, die sog. Kinetochorfaser, die eine Länge von ca. 50-100 nm erreicht [McDonald et al. 1992; McEwen et al. 1997]. Mikrotubuli in Kinetochorfasern werden durch assoziierte Proteine mechanisch stabilisiert, da sie als festes Bündel vorliegen und selbst beim Wegfall des Chromosoms durch Mikromanipulation in dieser Form erhalten bleiben [Nicklas et al. 1982].

Die zweite Klasse bilden die Astral-Mikrotubuli, die sich von den Spindelpolen bis zur Zellperipherie erstrecken. Ihr Plus-Ende interagiert mit dem Zellcortex, wodurch die Positionierung der Spindel in der Zellmitte und dadurch die Zellteilungsebene festgelegt werden. Die Interaktion zwischen Astral-Mikrotubuli und Zellkortex wird durch Proteine wie Dynein und Dynaktin vermittelt [Busson et al. 1998].

Zur dritten Klasse der Mikrotubuli werden sog. Interpolaren-Mikrotubuli gezählt. Diese erstrecken sich von den Spindelpolen zur Äquatorialplatte, bilden jedoch keinen Kontakt zu den Chromosomen aus. Die Interpolaren-Mikrotubuli des einen Zellpols interagieren mit denen des anderen und besitzen die Tendenz zur Ausbildung von Bündeln, aus jeweils sechs Mikrotubuli [Mastronarde et al. 1993]. Durch diese antiparallele Anordnung wird vor allem während der Anaphase, in der enorme Kräfte auf die Spindel einwirken, gewährleistet, dass die Struktur der Spindel erhalten bleibt. Die Anordnung der Interpolaren-Mikrotubuli wird durch das Zusammenwirken der Mikrotubuli mit den Minus- und Plusorientierten Motorproteinen begünstigt. Ein solches ist das Kinesin-ähnliche Eg5 [Mountain et al. 1999], dessen Inhibition zur Auflösung der Spindel führt [Blangy et al. 1995; Mayer et al. 1999b].

Im Verlauf des Zellzyklus ändert sich die Dynamik der Mikrotubuli drastisch. Während sie in der Interphase relativ lange und stabile Filamente bilden, wird beim Eintritt in die Mitose die Depolymerisation der Mikrotubuli initiiert. Diese wird von Proteinen wie Op18/Stathmin [Gavet et al. 1998] und Katanin [McNally et al. 2006] beschleunigt. Die kurzen und instabilen Mikrotubuli weisen in der Mitose eine Lebensdauer von nur ca. 60-90 Sekunden auf, während ihre Halbwertszeit in der Interphase bei bis zu zehn Minuten liegt [Saxton et al. 1984; Cassimeris 1999]. Diese dynamische Instabilität der mitotischen Mikrotubuli führte 1984 zu dem Model *search & capture*, das die Bindung zwischen Kinetochoren und Mikrotubuli beschreibt [Mitchison & Kirschner 1984; Kirschner

& Mitchison 1986]. Die Plus-Enden der Mikrotubuli wechseln zwischen Wachstum (*rescue*) und Abbau (*catastrophe*) und unterliegen einer dynamischen Instabilität. Findet ein wachsender Mikrotubulus zufällig ein Kinetochor, so bindet es mit seinem Plus-Ende oder lateral daran (*capture*). Dadurch stabilisiert er das Chromosom und wird andererseits selbst von diesem gegen Depolymerisation abgeschirmt. Bildet ein wachsender Mikrotubulus hingegen keinen Kontakt zu einem Kinetochor aus, so depolymerisiert es erneut [Sharp et al. 2000].

Nach der Bindung an den Mikrotubulus wird das Kinetochor in Richtung Zellpol transportiert, was wiederum die Bindung durch weitere Mikrotubuli begünstigt, bis schließlich zwischen 10-40 Mikrotubuli an ein Kinetochor gebunden sind und eine stabile Verbindung zum Zellpol darstellen. Um eine bipolare Bindung der Chromosomen zu gewährleisten, werden die gebundenen Kinetochoren durch sog. monoorientierte Kräfte in Richtung Äquatorialebene geschoben. Dadurch steigt die Wahrscheinlichkeit, dass Mikrotubuli der anderen mitotischen Aster an die Kinetochoren binden [Rieder & Salmon 1994].

Durch den lang andauernden Prozess der bipolaren Bindung nimmt die Prometaphase die längste Zeit der Mitose ein. Erst wenn alle Chromosomen an Mikrotubuli gebunden sind wird die Anaphase eingeleitet. Durch diesen sog. *spindle checkpoint* wird so sichergestellt, dass das genetische Material ordnungsgemäß vererbt wird. Die gebundenen Schwestechromatiden werden anschließend mit Hilfe des Minus-Ende gerichteten Motorproteins Dynein zu den einzelnen Zellpolen transportiert [Larsson et al. 1997; Cahu et al. 2008].

Die Spindel unterliegt der Kontrolle durch ein komplexes Netzwerk regulatorischer Aktivitäten. Motorproteine spielen eine essentielle Rolle beim Aufbau der Spindel [Nédélec et al. 1997] und bei der Vernetzung und Bündelung von Mikrotubuli [Goshima & Scholey 2010]. Mikrotubuli-assoziierte Proteine (MAPs) stabilisieren die Mikrotubuli und beeinflussen ihre Interaktion mit anderen Proteinen. Eine zentrale Rolle spielt darüber hinaus die reversible Phosphorylierung der Proteine in der Mitose [Nigg 2001]. So wird am Übergang in die Mitose die Kinase Cdk1 aktiviert, welche β-Tubulin [Fourest-Lieuvin et al. 2006] sowie eine Vielzahl wichtiger Mikrotubuli-Regulatoren, wie Eg5 und Stathmin/Op18 phosphoryliert [Larsson et al. 1997; Cahu et al. 2008].

3.5.4 Centrosomen

In Zellen gibt es spezifische Mikrotubuli-Organisationszentren (MTOC), die eine wichtige Rolle bei der Positionierung der mitotischen Spindel sowie beim Ablauf der Cytokinese spielen. In Interphasezellen bündeln sie die Enden der zytoplasmatischen Mikrotubuli und stabilisieren die langsam wachsenden Minus-Enden der Mikrotubuli, die um sie herum angeordnet werden (*microtubule nucleating activity*) [Rieder et al. 2001].
Ein wichtiger Bestandteil der MTOC der Vertebraten sind die Centrosomen, die je aus zwei zylinderförmigen symmetrischen Centriolen, sowie dem sie umgebenden pericentrosomalem Material (PCM) bestehen. Die Centriolen sind im rechten Winkel zueinander angeordnet und am proximalen Ende miteinander verbunden [Doxsey 2001]. Sie bestehen aus je neun Triplett-Mikrotubuli. Die Bindung der Mikrotubuli ans Centrosom wird über Proteine vermittelt, die an die Minus-Enden der Mikrotubuli gebunden sind, wie z. B. Ninein und Centriolin. Das pericentrosomale Material ist ein faserartiges Netzwerk von Proteinaggregaten und Ankerproteinen, die die Stabilisierung und Bündelung der Mikrotubuli sowie die Bindung von Signalmolekülen vermitteln [Lange 2002].
Während des Zellzyklus ändert sich die Zusammensetzung des pericentrosomalen Materials und auch die Centrosomen durchlaufen einen sog. Centrosomenzyklus, der eng an den Chromosomenzyklus gekoppelt ist. Beide Zyklen werden durch dieselben Proteinkinasen, wie z. B. Aurora-Kinasen, Polo-Kinasen und NIMA-Kinasen streng kontrolliert [Nigg 2001; Nigg 2002]. Neben den Kinasen sind auch Phosphatasen am Centrosomenzyklus beteiligt, so z. B. die Phosphatase Cdc14A [Mailand et al. 2002].
In der Mitose sind Centrosomen essentiell für den Aufbau und die Ausrichtung der Spindel sowie die Nukleation der Mikrotubuli [Zhang & Nicklas 1995; Wang et al. 2004]. In der Metaphase sind jedoch 75 % der Interpolaren- und 50 % der Kinetochor-Mikrotubuli nicht an die Centrosomen gebunden [Mastronarde et al. 1993; McEwen et al. 1997]. Versuche der Mikromanipulation konnten zeigen, dass die Centrosomen nach dem vollständigen Spindelaufbau für die weitere Funktion der Spindel entbehrlich sind [Nicklas et al. 1989]. In manchen tierischen Epithelzellen sowie in Pflanzenzellen fehlen die Centrosomen sogar in den MTOC und sind nicht essentiell für die Zellteilung [Doxsey 2001]. In Hefezellen übernehmen hingegen die äquivalenten Spindel-Polkörper die Aufgaben der Centrosomen.
Nach der Cytokinese enthält jede der beiden Tochterzellen jeweils nur ein Centrosom; das Mutter-Centrosom, welches im Verlaufe der Interphase verdoppelt werden muss. Die beiden Centriolen eines Centrosoms, die zunächst eng beieinander liegen und orthogonal miteinander verbunden sind, entfernen sich in der späten G_1-Phase voneinander [Chen et

al. 2002]. Am proximalen Ende der Mutter-Centriole wächst eine neue Procentriole und erreicht in der G_2-Phase ihre volle Größe. Am Ende der G_2-Phase werden γ-Tubulin Ringkomplexe (γ-TuRC) an die Centrosomen rekrutiert. Dies ist die Folge der Phosphorylierung des MAPs Asp durch die Polo-Kinase Plk1. Die γ-TuRC sind verantwortlich für die Polymerisation der heterodimeren αβ-Tubulin Untereinheiten, wodurch die Minus-Enden der Mikrotubuli der mitotischen Spindel stabilisiert und um das Centrosom herum gebündelt werden [Wiese & Zheng 2006].

Am G_2/M-Phasen-Übergang kommt es zur Phosphorylierung vieler centrosomaler Proteine und zur Expansion des pericentriolaren Materials. Nach diesem, als Reifung der Centrosomen bezeichneten Prozess, trennen sich die Centrosomen vollständig, was durch die Aktivierung der Kinase Nek2 eingeleitet wird [Faragher & Fry 2003]. Nek2 phosphoryliert das Protein C-Nap1, das in der Verbindung zwischen den beiden Centrosomen liegt, worauf dieses abgebaut wird und dadurch die vollständige Centrosomentrennung ermöglicht [Fry 2002]. Daraufhin werden die Centrosomen mit Hilfe von Motorproteinen entlang der Mikrotubuli zu den entgegengesetzten Seiten des Zellkerns transportiert. Fehlerhafte Prozesse in der Zelle führen entweder zur mehrfacher Duplikation des Centrosoms und zur Entstehung von multipolare Spindeln, oder zur Ausbildung einer monopolaren Spindel aufgrund von fehlender Verdoppelung des Centrosoms. In beiden Fällen kommt es zu Fehlern in der Kernteilung und der Cytokinese sowie zur ungleichen Verteilung der Chromosomen auf die Tochterzellen. Diese degenerativen Prozesse können zur genetischen Instabilität und Entstehung von Tumoren führen [Tarapore et al. 2001; Nigg 2002].

3.6 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, Clathrin und Clathrin-assoziierte Proteine zellbiologisch und biochemisch an der mitotischen Spindel zu untersuchen. Dabei sollte die Assoziation von Clathrin mit der Spindel analysiert und seine Funktion in der Mitose eingegrenzt werden. Zusätzlich sollte überprüft werden, ob und welche weitere Proteine, die an Clahrin-vermittelten Transportvorgängen beteiligt sind, in der Mitose eine Rolle spielen. In RNA Interferenz Untersuchungen sollten im weiteren Schritt die Bindungsverhältnisse von Clathrin und seiner Bindungspartner an der Spindel geklärt werden, sowie die Auswirkungen der Abwesenheit dieser Proteine für die Mitose.

4. Material und Methoden

4.1 Verwendete Materialien

4.1.1 Chemikalien

Das Wasser, welches für alle Versuche verwendet wurde, wurde in der Filteranlage Milli-Q der Firma Millipore gereinigt und entsalzt. Säuren und organische Lösungsmittel wurden von Baker [Deventer (NL)] bezogen.

Substanz	**Hersteller, Ort**
Agarose	BioRad, München
Ampicillin	Sigma, Taufkirchen
Bacto-Agar BD	Biosciences, Heidelberg
Brefeldin A	Sigma, Taufkirchen
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
Complete Proteaseinhibitor	Roche, Mannheim
Coomassie Brilliant Blue R250	Serva, Heidelberg
Cytochalasin B	Sigma, Taufkirchen
Desoxynukleotidtriphosphate	Roche, Mannheim
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Taufkirchen
DMEM	Gibco BRL, Karlsruhe
EDTA	Sigma, Taufkirchen
EGTA	Sigma, Taufkirchen
Ethidiumbromid	Sigma, Taufkirchen
Fötales Kälberserum	PAA Laboratories, Linz (AU)
Glutathion	Sigma, Taufkirchen
Hepes	Sigma, Taufkirchen
Isopropylthiogalactosid (IPTG)	Sigma, Taufkirchen
Luminol	Sigma, Taufkirchen
Magermilchpulver	Uelzena, Uelzen
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	BioRad, München
Natriumpyruvat	Sigma, Taufkirchen
Nocodazol	Sigma, Taufkirchen

Substanz	Hersteller, Ort
para-Hydroxycommarinsäure	Sigma, Taufkirchen
Paraformaldehyd (PFA)	Fluka, Steinheim
Penicillin / Streptomycin-Lösung	Life Technologies, Karlsruhe
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma, Taufkirchen
Pipes	Roth, Karlsruhe
Ponceau S	Sigma, Taufkirchen
Sucrose	Calbiochem, Darmstadt
Taxol, Paclitaxel	Calbiochem, Darmstadt
Transferrin	Molecular Probes, Leiden (NL)
Tris (Trizma Base)	Sigma, Taufkirchen
Triton X-100	Sigma, Taufkirchen
Trypton	BD Biosciences, Heidelberg
Thymidin	Sigma, Taufkirchen
Uranylacetat	Merck, Darmstadt

4.1.2 Puffer und Lösungen

Puffer/ Lösung/ Reagentien	Zusammensetzung
Acrylamidlösung 9 %ig, Trenngel	2g Glycerin, 7,5 ml 1,5 M Tris, 9 ml Acrylamidlösung (30 % Acrylamid und 0,3 % Bisacrylamid in H_2O) 0,3 ml 10 % SDS mit H_2O auffüllen, 17 µl TEMED, 113 µl 10 % APS, pH 8,8
Acrylamidlösung 19 %ig, Trenngel	4 g Glycerin,7,5 ml 1,5 M Tris, 19 ml Acrylamidlösung (30 % Acrylamid und 0,6 % Bisacrylamid in H_2O), 0,3 ml 10 % SDS mit H_2O auffüllen, 17 µl TEMED, 113 µl 10 % APS, pH 8,8
Blockierlösung	8 % Magermilchpulver, 0,1 % Tween 200 in PBS
BRB-80	80 mM PIPES pH 6,8, 2 mM $MgCl_2$, 1 mM EGTA
Coomassie Färbelösung	0,2 % Coomassie Brilliant Blue R 250, 10 % Essigsäure, 47,5 % Ethanol
DB Puffer	50 mM MES, 1 mM $CaCl_2$, pH 6,6
DNA-Auftragslösung, 6 fach	0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylen Zyanol FF, 15 % Ficoll 400 in H_2O
Entfärbelösung	10 % Ethanol, 10 % Essigsäure
HM-PIPES-Puffer	1 M PIPES, 10 mM $MgCl_2$, 20 mM EGTA, pH 6,9

Puffer/ Lösung/ Reagentien	**Zusammensetzung**
Homogenisationspuffer	KHM, 20 µg/ml Cytochalasin B, 20 µg/ml PMSF, 1 µg/ml ABP, 1 µg/ml AEL, 1 µg/ml Phosphatase Cocktail 1
Lösung A	200 ml 0,1 M Tris-HCl, 50 mg Luminol, pH 8,6
Lösung B	11 mg para-Hydroxycommarinsäure in 10 ml DMSO gelöst, dunkel gelagert
LB-Medium	0,5 % Hefeextrakt, 1 % NaCl, 1 % Trypton, pH 7,5
LB-Agar	LB-Medium + 1,5 % Bacto-Agar
Live cell Medium	0,1 % BSA, CO_2 independent Medium
Mikrotubuli Bindungspuffer	50 mM Hepes, 0,5 mM KCl, 0,1 mM EGTA, pH 7,5
Mikrotubuli Stabilisierungspuffer	0,5 % Triton X in BRB-80
Molekulargewichtsstandard	Je 5 mg/ml BSA, Carbanhydrase, β-Galactosidase, Ovalbumin, Phosphorylase b in SDS-Probenpuffer
Ponceau-S Färbelösung	0,2 % Ponceau S, 1 % Essigsäure
PBS	2 mM KH_2PO_4, 10 mM NaH_2PO_4, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, pH 7,4
PEM	100 mM Pipes, 2 mM EGTA, 1 mM $MgSO_4$, (pH 6,9)
PEM & Zusätze	1 % Triton X, 4 % PEG, 20 µg Taxol
Proliferationsmedium HeLa	DMEM, 1 % Natriumpyruvat, 5 % FCS, 2 % Penicillin/ Streptomycin-Lösung
Proliferationsmedium IHKE	DMEM/F12 (1:1), 100 mM Hydrocortison, 0,84 µM Insulin, 1,6 nM EGF, 64 nM Transferrin, 2,5 mM L-Glutamin, 1,25 ml Ciprobay 200, 1 % FCS, 1,26 g $NaHCO_3$, 50 µl Na_2SeO_3
Saurer Puffer	0,1 M Glycin, 0,15 M NaCl, pH 3,0
Sammelgel	1 g Glycerin, 7,5 ml 0,5 M Tris 5 ml Acrylamidlösung (30 % Acrylamid und 0,8 % Bisacrylamid in H_2O), 0,3 ml 10 % SDS, 150 µl 10 % Bromphenolblau, mit H_2O auf 30 ml auffüllen, 30 µl TEMED, 300 µl 10 % APS, pH 6,8
SDS-PAGE Laemmli-Laufpuffer	370 mM Glycin, 50 mM Tris, 0,1 % SDS pH 8,3
SDS-PAGE Probenpuffer	25 mM Tris·HCl, 2,5 % SDS, 2,5 % ß-Mecaptoethanol, 12,5 % Glyzerin, 0,5 mM EDTA, angefärbt mit Bromphenolblau pH 8,0
SOC-Medium	0,5 % Hefeextrakt, 2 % Trypton, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 20 mM Glukose (pH 7,0)
TBE-Puffer	45 mM Tris, 45 mM Borsäure, 1 mM EDTA
TBS	150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0

Puffer/ Lösung/ Reagentien	Zusammensetzung
Tartrat Puffer	10 mM Hepes, pH 7,0; 100 mM Na_2Tartrat, 1 mM EGTA, 0,5 mM $MgCl_2$, 0,02 % NaN_3
Transferpuffer	50 mM Tris, 39 mM Glycin, 0,037 % SDS, 20 % Methanol

4.1.3 Kommerzielle Systeme

Zweck	System	Hersteller, Ort
Plasmid-Minipräparation	QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
Präparation endotoxinfreier DNA	Plasmid Kit EndoFree	Qiagen, Hilden
Agarosegelextraktion	QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Eindecken der Deckgläschen	ProLong Antifade Kit	Molecular Probes, Leiden (NL)
Transfektion von DNA	Lipofectamin 2000 Transfection Reagens	Invitrogen, Karlsruhe
Transfektion von siRNA	HiperFect Transfection	Qiagen, Hilden

4.1.4 Zellen und Gewebe

Schweinehirne wurden vom Schlachthof Hannover bezogen. Daraus isolierte Clathrin-bedeckte Vesikel wurden von Frau Huberta Ungewickell und Frau Beate Großmann, Institut für Zellbiologie, MHH, nach Lindner [Lindner & Ungewickell 1992] präpariert. Ebenfalls wurden Mikrotubuli aus frischen Schweinehirnen nach Vallee [Vallee 1986a] präpariert. Gereinigtes Cy3 gekoppeltes Tubulin wurde von Frau Dr. Beate Sodeik zur Verfügung gestellt.

Zelllinie	Organismus	Hersteller, Ort
DH5α	E. coli (Plasmidexpression)	Life Technologies, Karlsruhe
BL21	E. coli (Proteinexpression)	Novagen, Madison (USA)
HeLa S3	Humane Adenokarzinomzellen, Cervix uteri	American Type Culture Collection, Manassas (USA) [Puck et al. 1956]

Zelllinie	Organismus	Hersteller, Ort
HeLa SS6	Subklon von HeLa S3	Freundliche Gabe von Klaus Weber, MPI Göttingen
HeLa SS6 GFP-LCB	Hela SS6, die mit GFP-LCB stabil transfiziert wurden	Stabil transfiziert von Beate Großmann, MH Hannover
IHKE	Immortalisierte humane Nierenepithelzellen	Freundliche Gabe von Wolf-G. Forssmann, IPF, Hannover [Hirsch et al. 1999]

4.1.5 DNA-Konstrukte

Konstrukt	Vektor	Referenz
GFP-LCB	pEGFP-C2	[Hoffmann et al. 2010]
RFP-LCB	PEGFP-C3	Freundliche Überlassung von J. Wehland, (GBF, BS) [Benesch et al. 2005]
GFP-Dynamin2	pEGFP-N1	[Cao et al. 1998]
GFP-Dynamin2 ^{K44A}	pEGFP-N1	[Cao et al. 2000]
RFP-Dynamin2	pEGFP-N1	hergestellt von H. Berke, MH Hannover
GFP-Auxilin1	pEGFP-C2	hergestellt von A. Hoffman, MH Hannover
GFP-Auxilin1 delta J	pEGFP-C2	hergestellt von A. Hoffmann, MH Hannover
Flag-Auxilin1	pCMV-Tag-2B	hergestellt von M. Düwel, MH Hannover
GFP-GAK 1-1311	pEGFP-C3	[Umeda et al. 2000]
GFP-GAK 495-1311	pEGFP-C3	hergestellt von A. Meyerholz. MH Hannover
GFP-GAK 1-833	pEGFP-C3	Agnes Golla, MH Hannover
GFP-GAK delta J	pEGFP-C3	[Umeda et al. 2000]
Myc-GAK	Pc D2-RnGAK	[Zhang et al. 2005]
RFP-Tubulin	pTag RFP	Evrogen, Moskau, (RUS)
GFP-Tubulin	pEGFP	Agnes Golla, MH Hannover

Konstrukt	Vektor	Referenz
GST-Clathrin TD	pGEX-2T	Freundliche Überlassung von J. Keen, Philadelphia (USA) [Goodman et al. 1997]

4.1.6 Verwendete siRNA

Die doppelsträngige DNA wurde von Thermo Scientific Dharmacon als 20 µl Lösung bezogen. Für die Sequenzen ergaben sich keine aktiven Überschneidungen mit denen anderer humaner mRNAs.

Zielprotein	Sequenz (5´)	Referenz
Clathrin HC	CCUGCGGUCUGGAGUCAAC/ GUU-GACUCCAGACCGCAGG	[Hinrichsen et al. 2003]
Clathrin HC	UGGAUCUCUUUGAAUACGG im pSu-perior Vektor	Freundliche Überlassung von L. Hinrichsen, MH Hannover
α-Adaptin	GAGCAUGUGCACGCUGGCCAGCU	[Hinrichsen et al. 2003]
γ-Adaptin	GACTCCAGTGGTAATCTAC im pSuper Vektor	Freundliche Überlassung von A. Ungewickell
Dynamin2	AAGUCCAAAAAGUUUACAGAC	freundliche Überlassung von R. Bauerfeind, MH Hannover
Auxilin1	UAUGUUACCUCCAGAAUUAUU	[Hirst et al. 2008]
GAK	GGUUGAGAACUUGUUGCUU	[Zhang et al. 2004]
GFP	GGCUACGUCCAGGAGCGCACC	[Stewart et al. 2003]
siGLO	RISC-Free red DY-547	Dharmacon RNAi Tech.

4.1.7 Verwendete Antikörper

Nichtkommerzielle monoklonale Antikörper wurden auf ca. 2 µg/ml verdünnt.

Antigen	Antikörper	Hersteller, Ort
Aktin	20-33	Sigma, Taufkirchen
AP2	AP.6	F. M. Brodsky, [Chin et al. 1989]

Antigen	Antikörper	Hersteller, Ort
AP2	C8	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz (USA)
AP3	δ-Adaptin	BD Biosciences, Heidelberg
α-Adaptin (AP2)	mAb100/2	Ernst Ungewickell, [Ahle et al. 1988]
γ-Adaptin (AP1)	mAb100/3	Ernst Ungewickell, [Ahle et al. 1988]
γ-Adaptin	610386	Transduction Laboratories, Lexington (USA)
Bin1	Clone 99D	Sigma, Taufkirchen
Clathrin leichte Kette	CON1	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz (USA)
Clathrin leichte Kette	R461	E. Ungewickell, [Ahle et al. 1988]
Clathrin schwere Kette	X22	F. M. Brodsky, [Brodsky 1985]
Clathrin schwere Kette	C43820	Transduction Laboratories, Lexington (USA)
Dynamin	Hudy-1	Cell Signaling Solutions, Massachusetts (USA)
Dynamin	H-300	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz (USA)
Dynamin1	D25520	Transduction Laboratories, Lexington (USA)
Eps15	Peptid 2	Biosciences, Göttingen
Epsin1	229-575	Freundliche Überlassung von L. Traub, [Drake et al. 2000]
Flag	M2	Stratagene, Santa Clara (USA)
GAK	R-360	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz (USA)
GAK	1C2	MoBiTec, Göttingen
GAK	S	Freundliche Überlassung von S. Sever, [Newmyer et al. 2003]
GAK	ELN	Freundliche Überlassung von E. Ungewickell, MH Hannover
Giantin	PRB-114C-200	Covance Research Products Inc., Denver (USA)
GFP	A11122	MoBiTec, Göttingen
GGA2	GGA2	Freundliche Überlassung von J. Hirst, [Hirst et al. 2000]
GM 130	GM 130	BD Biosciences (Heidelberg)
GST	27-4577-01	Amersham Biosciences, Little Chalfont (UK)

Antigen	Antikörper	Hersteller, Ort
Hsc70	3C5	Freundliche Überlassung von B. M. Jockusch, [Höning et al. 1994]
Myc	E910	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz (USA)
VCP	612182	BD Bioscience, Kalifornien (USA)
Bodypy	B-2752	MoBiTec, Göttingen
α-Tubulin	DM 1A	Sigma, Taufkirchen
γ-Tubulin	GTU-88	Sigma, Taufkirchen
TSG-101	Ab83	Abcam product, Cambridge (UK)
Ziegen-IgG HRP Konjugat	Maus-IgG	Cappel/ ICN Biomedicals, Aurora (USA)
Ziegen-IgG HRP Konjugat	Kaninchen-IgG	Cappel/ ICN Biomedicals, Aurora (USA)
Ziegen-IgG Rhodamin bzw. FITC Konjugat	Maus-IgG	Dianova, Hamburg
Ziegen-IgG Rhodamin bzw. FITC Konjugat	Kaninchen-IgG	Dianova, Hamburg

4.1.8 Verbrauchsmaterialien

SDS-Polyacrylamidgele für die Polyacrylamidgelelektrophorese wurden von Frau Christiane Lemke, Institut für Zellbiologie, MHH, gegossen und zur Verfügung gestellt.

Produkt	Produktbezeichnung	Hersteller, Ort
Blotpapier	3 MM Chr	Millipore, Billerica (USA)
Blot Membran	Protran	Schleicher & Schuell, Dassel
Cellulose-Acetat-Filtermembran	0,2 µm Porengröße	Sartorius, Göttingen
Chemolumineszenzfilm	Hyperfilm ECL	Amersham Biosciences, Freiburg
Deckgläschen rund	Ø 12 mm, 30 mm	Menzel-Glaser, Braunschweig
Dialyseschläuche	Spectra/Por 1	Spectrum Laboraroties Inc., Rancho Dominguez (USA)
ECL-(*Enhanced Chemiluminescence*) Filme	Hyperfilm-ECL	GE Healthcare Bio Sciences AB, Uppsala (SE)

Produkt	Produktbezeichnung	Hersteller, Ort
Elektroporationsküvetten	Gene Pulser Cuvette 0,2 cm	BioRad, München
Entsalzungssäulen	PD-10, NAP 10, NAP 5	GE Healthcare Bio Sciences AB, Uppsala (SE)
Filterpapier	695	Schleicher & Schuell, Dassel
Handschuhe	Peha-Soft	Hartmann, Heidenheim
Kupfernetze für EM	G200-C3	SCI, München
Mikroreaktionsgefäße	0,5 ml, 1,5 ml Safe Lock	Eppendorf, Hamburg
Mikroreaktionsgefäße	1,5 ml, 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Nitrozellulosemembran	Protran	Schleicher & Schuell, Dassel
Objektträger	Mattrand	Menzel-Glaser, Braunschweig
Parafilm		National Can, Greenwich (USA)
Pasteurpipetten		Brand, Wertheim
Pasteurpipetten Plastik	Transferpipette 3,5	Sarstedt, Nürnbrecht
Petrischale	Nunclon Surface	Nalge Nunc, Langenselbold
Pipettenspitzen	Plastikbrands	Brand, Wertheim
Reaktionsgefäße	15 ml, 50 ml Cellstar	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Sterile Pipetten	5, 10, 25 ml Cellstar	Sarstedt, Nürnbrecht
Skalpellklingen		Feather, Osaka (JP)
Ultrazentrifugengefäße	1,5 ml Microfuge Polyallomer	Beckman, Krefeld
Zellkulturschalen	Nunclon Surface	Nalge Nunc, Rochester (USA)

4.1.9 Benutzte Geräte

4.1.9.1 Laborgeräte

Gerät	Typ	Hersteller, Ort
Bakterieninkubator	Product Line	Heraeus, Hanau

Gerät	Typ	Hersteller, Ort
Eismaschine		Ziegra, Isernhagen
Elektrophoresekammer	Mini-Sub Cell GT	BioRad, München
Elektroporator	MicroPulser	BioRad, München
Entwicklermaschine	Optimax Typ TR	Protec, Oberstenfeld
Feinwaage	Sartorius Universal	Sartorius, Göttingen
Glas- Teflon- Homogenisator	Potter S	B. Braun Biotech International, Melsungen
Halbtrocken-Blotsystem		Forschungswerkstatt MHH, Hannover
Heizblock	DRI-BLOCK DB-2A	Techne, Jahnsdorf
Inkubatoren	Hera Cell RS 232	Heraeus, Hanau
Kamera	COOLPIX 995	Nikon, Düsseldorf
Kühlgerät für Elektrophorese	F12	Julabo, Seelbach
Leuchtplatte	Gr.1	Rex Messinstrumente, Babenhausen
Mikroinjektor	FemtoJet	Eppendorf, Hamburg
Mikromanipulator	InjectMan	Eppendorf, Hamburg
Mikroinjektionsnadel-Puller	Model P-87, Flaming/ Brown micropipette puller	Sutter Instrument, Novato (USA)
Mikroinjektionsnadel-Gläser	GB 120TF-10	Science Products, Hofheim
Mikrowelle	R-330A	Sharp, Hamburg
Mikropipetten	Nichipet	Nichiryo, Tokio (JP)
Mikrospritze	702 N	Hamilton, Bonaduz (CH)
Neubauer-Zählkammer	Brightline Hemacytometer	Hausser Scientific, Horsham (USA)
Netzgeräte	PowerPac 300, PowerPac 1000	BioRad, München
pH-Meter	MultiCal	WTW, Weilheim
Reinstwasseranlage	MilliQ	Millipore, Schwabach
Rotator	3025	GFL, Burgwedel
Rotor	5417C/R, A-8-11	Eppendorf, Hamburg
Scanner	Duoscan	Agfa, Mortsel (BL)
Schüttelinkubator	Certomat BSn1	B. Braun, Melsungen
Spektralphotometer	DU-640	Beckman, Krefeld
Sterilwerkbank	HeraSafe	Heraeus, Hanau

Gerät	Typ	Hersteller, Ort
Thermoblock	UNO-Thermoblock	Biometra, Göttingen
Ultraschallgerät	Branson Sonifier 250	Heinemann, Schwäbisch Amüd
Ultrazentrifuge	Optimax TLX	Beckman, Krefeld
Ultrazentrifuge	LE-80k Ultracentrifuge	Beckman, Krefeld
Ultrazentrifugenrotoren	TLA 45, TLA 55; TLA 100.4	Beckman, Krefeld
Ultramikrotom	Ultracut E	Beckman, Krefeld
UV-Handlampe	NU-4 KL	Konrad Benda, Wiesloch
UV-Leuchttisch	UVT-20 S	Herolab, Wiesloh
Vortex	Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia (USA)
Wasserbad	DC10	Haake, Karlsruhe
Wippinkubator	Duomax 1030	Heidolph, Schwabach
Zentrifuge	Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge	Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau
Zentrifuge	J2-HS Centrifuge	Beckman, Krefeld
Zentrifugenrotor	JA20	Beckman, Krefeld

4.1.9.2 Mikroskope

Gerät	Typ	Hersteller, Ort
Elektronenmikroskop	EM-10C	Carl Zeiss, Jena
Elektronenmikroskop	EM 902	Carl Zeiss, Jena
Elektronenmikroskop	FEI Tecnai 200	FEI Philips Electron Optics, Oregon (USA)
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 200M	Carl Zeiss, Jena
Konfokales Fluoreszenzmikroskop	Zeiss LSM 510 Meta	Carl Zeiss, Jena
Konfokales Fluoreszenzmikroskop	Olympus FV 1000	Olympus,Tokio (JP)
Lichtmikroskop	Labovert	Leitz, Wetzlar

4.1.10 Software

Programm	Hersteller, Ort
Adobe Photoshop CS3 Extended 10	Adobe Systems, San Jose (USA)
AxioVision Rel. 4.6.	Carl Zeiss Imaging Solutions, Oberkochen
ImageJ 1.4	Wayne Rasband, Nat. Inst. of Health (USA), http://rsb.info.nih.gov/nih-imageJ
Illustrator CS 11	Adobe Systems, San Jose, (USA)
Olympus FV10-ASW 2.0	Olympus, Tokyo (JP)
Open Office 3.2.1	Sun Microsystems, Inc., Santa Clare (USA)
Microsoft Exel 2000	Microsoft, Redmont (USA)
JabRef 2.5	General Public License, http://jabref.sourceforge.net
Zeiss LSM Image Browser 3.5	Carl Zeiss Imaging Solutions, Oberkochen

4.2 Methoden

4.2.1 Zellkultur

4.2.1.1 Kultivieren und Passagieren der Zellen

Die Zelllinien wurden von Frau Beate Großmann (Institut für Zellbiologie, MHH), in 10 cm Ø Petrischalen bei 37 °C und 5 % CO_2 sowie gesättigter Luftfeuchtigkeit im Inkubator kultiviert. Das Passagieren der Zellen erfolgte nach Erreichen einer Konfluenz von 60-70 %. Zum Ablösen wurden sie zunächst in vorgewärmten PBS gewaschen und anschließend mit 1 ml Trypsin/ EDTA-Lösung für 5 min im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Durch Zugabe des Proliferationsmediums wurde dieser Vorgang gestoppt. Wiederholtes Resuspendieren verhinderte die Bildung von Zellklumpen, die Zellzahl wurde bestimmt, und die Zellen im frischen Proliferationsmedium ausgesät. Für immunocytochemische Untersuchungen wurden 2×10^5 Hela SS6 Zellen auf säurebehandelte Deckgläschen (22 mm x 22 mm) in 30 mm Ø Schalen gesät. Zellen, die für Transfektionen und

RNAi Untersuchungen vorgesehen waren, wurden mit einer Zellzahl von 4 x 10^4 Zellen pro Loch in 24-Multiwell-Schalen ausgesät. In 30 mm Ø großen Petrischalen erfolgte die Kultivierung von Zellen, die für die SDS-PAGE Analyse vorgesehen waren.

Das Proliferationsmedium der immortalisierten humanen Adenokarzinom Zelllinie HeLa SS6 bestand aus Bikarbonat-gepufferten DMEM (Dulbecco's Minimum Essential Medium), angereichert mit 5 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin. Zusätzlich enthielt das Medium Natriumpyruvat und essentielle Aminosäuren. Für die HeLa S3 Zellen wurde DMEM mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin benutzt.

Die IHKE Zellen wurden in DMEM/F 12 (1:1) mit 100 mM Hydrocortison, 0,84 µM Insulin, 1,6 nM EGF, 64 nM Transferrin, 2,5 mM L-Glutamin, 1,25 ml Ciprobay 200, 1 % FCS, 1,26 g $NaHCO_3$, 50 µl Na_2SeO_3 kultiviert. Da ihre Proliferationsrate bedeutend geringer als die der HeLa Zellen war, wurden standardmäßig 1,6 x 10^4 Zellen pro Loch in 24-Multiwell-Schalen und 8,9 x 10^4 Zellen in 20 mm Ø Schalen ausgesät.

4.2.1.2 Transfektion

Die Transfektion ist eine Methode zum Einbringen von fremden Erbmaterial in kultivierte Zellen. Die Nukleinsäuren der rekombinanten Proteinen sowie Proteindomänen wurden mit Expressionsplasmiden ligiert, die auf pEGFP-N3-Vektoren basierten und GFP-Fusionsproteine exprimierten. Die Transfektion mit Plasmid-DNA erfolgte 24 h nach Aussaat der Zellen. Verwendet wurde das Transfektionsreagenz Lipofectamin TM 2000 (Invitrogen), welches aus einer Mischung von kationischen Lipiden besteht. Die positiv geladenen Gruppen dieser Moleküle interagieren mit dem negativ geladenen Rückgrat der DNA oder RNA, so dass sich eine hydrophobe Hülle um die Nukleinsäuren bildet. Diese erlaubt ein Verschmelzen mit der Zellmembran, wodurch die Fracht ins Zellinnere gelangt oder endozytiert wird [Ausubel et al. 1999]. Die Vorgaben des Herstellers für die Transfektion wurden angepasst, 0,8 µg DNA und 1 µl Lipofectamin pro Loch der 24-Multiwell-Schale erwiesen sich als Optimum. Der Transfektion folgte eine vierstündige Inkubation der Zellen bei 37 °C. Nach nun erfolgter Transfektion konnte das Medium gegen Vollmedium getauscht werden. Bei der optimalen Expressionszeit der jeweiligen Plasmid-DNA, die zwischen 6 bis 24 h variierte, fand die Auswertung der Transfektionen statt.

4.2.1.3 Herunterregulation der Proteinexpression mit siRNA

Das gezielte Ausschalten von Proteinen mittels RNA Interferenz erfolgte durch das Einschleusen synthetischer doppelsträngiger RNA Oligomere von 19-21 Basenpaaren Länge (siRNAs) in Zellen [Elbashir et al. 2001]. Die siRNA Oligomere wurden standardmäßig zusammen mit dem kationischen Transfektionsreagenz Hyperfect (Invitrogen) transfiziert. Die Auswertung der Herunterregulation der Proteinexpression (*Knockdown*)

fand jeweils bei der minimalen endogenen Konzentration des Zielproteins statt. Die Zeitpunkte variierten je nach Zielprotein zwischen 24 h bis 96 h nach Transfektion der siRNA. Für die Depletion der Clathrin schweren Kette und die Depletion von γ-Adaptin (AP1) wurden zusätzlich pSuperior- bzw. pSuper-Vektoren benutzt, die doppelsträngige shRNA Oligomere exprimierten und mit Lipofectamin TM 2000 transfiziert wurden (vgl. 3.2.1.2). Das Minimum der Proteinexpression von Clathrin und AP1 wurde 72 h nach Transfektion erreicht, so dass die Zellen zu diesem Zeitpunkt ausgewertet oder weiter behandelt wurden.

Zur Vereinfachung wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit für die Transfektion der siRNA von der Clathrin schweren Kette das Synonym „si-Clathrin“ verwendet. Dasselbe wird bei der Transfektion weiterer siRNAs benutzt, so z. B. „si-Dynamin“ für Dynamin2 siRNA, „si-AP1“ für pSuperior-Vektor mit γ-Adaptin siRNA, „si-GAK“ für siRNA GAK etc.

Bei jeder Transfektion wurde neben dem eigentlichen siRNA-Ansatz auch jeweils ein Kontrollansatz pipettiert. Als Kontrollreagenzien wurden entweder eine GFP-spezifische siRNA oder Ansätze, welche nur die Transfektionsreagenz enthielten benutzt.

4.2.1.4 Synchronisation der Zellen

In der Literatur werden unterschiedliche Protokolle für die Synchronisation von Zellen in der Mitose beschrieben. Der Arrest der Zellen in der Mitose findet allgemein mit Hilfe von Nocodazol statt, das die Mikrotubulidynamik beeinflusst und den *spindle checkpoint* aktiviert [Zieve et al. 1980]. Die Ausbeute an mitotischen Zellen kann jedoch wesentlich gesteigert werden, wenn die Zellen vor dem Nocodazolarrest vorsynchronisiert werden. Dafür finden Reagenzien wie Thymidin oder Amphicolin Verwendung, die die Zellen in der G_1/S-Phase arretieren, indem sie als Inhibitoren für die DNA Polymerase wirken [Silljé & Nigg 2006]. In der Literatur gibt es sehr viele verschiedene Protokolle zur Synchronisation der Zellen. In diesen variieren sowohl die Inkubationszeiten, als auch die Anzahl der Arretierungen in den Zellen [Harper 2005; Silljé & Nigg 2006].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Auswahl der Synchronisationsprotokolle getestet und etabliert, um eine optimale Synchronisation der Zellen für unsere Zwecke zu erreichen. Vorteilhaft für die Synchronisation der verwendeten HeLa Zellen erwies sich das Protokoll nach Sillje & Nigg [Silljé & Nigg 2006]. Es wurden jedoch für unsere Zwecke einige Veränderungen vorgenommen. Für eine optimale Synchronisation der HeLa S3 Zellen wurde die Zellzahl von 9,5 x 10^5 Zellen pro 10 cm Ø Schale ausgesät. Für kleinere Gefäße wurde die Konzentration dementsprechend herunter skaliert. In dieser Konzentration war eine Synchronisation von ca. 80 % der Zellen erreichbar. Aussaat einer geringeren oder höheren Zellzahl führte zu ineffektiver Synchronisation. Eine höhere Zellzahl verursachte den Verlust der mitotischen Zellen durch Ablösen des Zellrasens vom Petrischalenboden.

Eine gute Haftung der mitotischen Zellen war gewährleistet, wenn sich ca. 10-20 % der kultivierten Zellen in einer anderen Zellzyklusphase befanden und eine Haftunterlage für die mitotischen Zellen bildeten.

24 h nach Aussaat wurden die Zellen 16 h mit 1 mM Thymidin inkubiert, wodurch ein Arrest im Übergang von der G_1 zu S-Phase erreicht werden konnte [Adolph & Phelps 1982]. Anschließend wurde das Thymidin vorsichtig ausgewaschen und die Zellen wurden 8 h in 10 % FCS DMEM inkubiert. Folglich wurde der 16 h Thymidinblock wiederholt, und die Zellen erneut in 10 % FCS DMEM kultiviert; diesmal allerdings nur für 5 h. Nach der Erholungszeit folgte eine Inkubation in 40 ng/ml Nocodazol, die zum Arrest der Zellen in der M-Phase führte. Im Nocodazolarrest wurde die Bindung der Mikrotubuli an die Chromosomen behindert, indem die Polymerisation der Mikrotubuli beeinträchtigt wurde. Das aktivierte den *spindle checkpoint,* so dass die Zellen die Mitose nicht abschließen konnten. Der Nocodazolarrest dauerte ca. 6-8 h an und wurde mikroskopischer überwacht. War eine entsprechend hohe Anzahl an Zellen in der Metaphase angereichert, so wurde das Medium gewechselt und die Zellen für die Zeitdauer von exakt 30 min in warmen 10 % FCS DMEM inkubiert, und fixiert oder direkt weiter behandelt.

Die Synchronisation von Zellen stellt ein gutes Modell dar, um bestimmte intrazelluläre Zusammenhänge während des Zellzyklus studieren zu können, obwohl die Zellen, die aus dem Nocodazolarrest entlassen werden, keine normale Zellzykluspopulation reflektieren [Cooper 2003].

4.2.2 Aufbereitung von Gewebeextrakten

4.2.2.1 Herstellung von mitotischem Zytosol

9×10^5 HeLa S3 wurden in zwanzig bis dreißig 10 cm Ø Schalen ausgesät und wie beschrieben synchronisiert [Mack & Compton 2001]. Nachdem 80-90 % mitotischer Zellen durch einen sechsstündigen Nocodazolarrest angereichert worden sind, wurde das Medium vorsichtig bis auf ca. 1 ml abgesaugt. Die mitotischen Zellen wurden mechanisch vom Petrischalenboden abgeklopft und die Zellzahl wurde bestimmt. Anschließend wurden sie für 4 min bei 300 g und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit PBS gewaschen und in DMEM mit 10 % FCS und 20 µg/ml Cytochalasin B 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Zentrifugation 4 min lang bei 300 g pelletierte die mitotischen Zellen erneut. Danach wurde das Pellet je 2 x mit kaltem PBS mit 20 µg/ml Cytochalasin B und mit kaltem KHM mit 20 µg/ml Cytochalasin B gewaschen. Die Zellen

wurden dann im kaltem Homogenisationspuffer homogenisiert. Anschließend wurde das Homogenat 3 x kurz sonifiziert und für 15 min bei 100.000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

4.2.2.2 Herstellung von Interphasen Zytosol

9 x 10^5 Zellen wurden in zwanzig bis dreißig 10 cm Ø Schalen ausgesät und am nächsten Tag für 16 h mit Thymidin inkubiert. Das Medium wurde abgesaugt und die Schalen je mit 1 ml PBS gewaschen. Die mitotischen Zellen wurden abgeklopft und entfernt. Die übrigen Zellen wurden 3 min mit 3 mM EGTA inkubiert, bis zu ihrem Ablösen. Nach anschließender Zentrifugation für 4 min bei 300 g wurden sie 2 x in kaltem Homogenisationspuffer gewaschen, homogenisiert und sonifiziert.

4.2.2.3 Präparation mitotischer Spindeln

Zur Untersuchung der Proteine des Spindelapparates wurden Spindeln aus synchronisierten Zellen modifiziert nach Sillje und Nigg präpariert [Silljé & Nigg 2006]. Zu diesem Zweck wurden HeLa S3 in zehn bis zwanzig 10 cm Ø Schalen mit einer Zellzahl von 9,5 x 10^5 Zellen ausgesät. Die Synchronisation der Zellen wurde wie oben beschrieben durchgeführt (4.2.1.4). Der Nocodazolarrest dauerte 5-9 h und die Effizienz der Synchronisation wurde mikroskopisch überwacht. Sobald der Zeitpunkt erreicht war, an dem sich 80-90 % der Zellen in der Metaphase befanden, wurde das Wachstumsmedium dekantiert. Pro Schale wurde 1 ml PBS pipettiert und die Zellen wurden durch Abklopfen vorsichtig von den Schalen gelöst. Nach Zusammenfügen der Überstände wurden die Zellen für 4 min bei 300 g zentrifugiert. Danach wurde das Pellet 2 x sukzessive mit 10 ml PBS resuspendiert und erneut für 4 min bei 300 g zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet im Medium ohne Pen/Strep aufgenommen und 30 min bei 37 °C inkubiert. In dieser Zeit vollendeten die Zellen den Aufbau ihrer Spindeln und die Anordnung der Chromosomen in der Äquatorialebene.

Zur Stabilisierung der Mikrotubuli wurden ins Medium 5 µg/ml Taxol für 3 min hinzugefügt. Nach 4 min Zentrifugation bei 300 g, RT wurde das Pellet mit PBS, das 2 µg/ml Latrunculin B, 5 µg/ml Taxol und 1 mM PMSF enthielt, gewaschen. Die Zellen wurden erneut 4 min bei 300 g und RT pelletiert. Zur Lyse wurden die Zellen in 2,5 ml Lysispuffer aufgenommen, 15 min bei 37 °C inkubiert und anschließend für 2 min bei 700 g und RT zentrifugiert. Ein zweiter Lysisschritt 5 min bei 37 °C wurde angeschlossen. Nach erneuter Zentrifugation (2 min 700 g, RT) wurde das Pellet mit PEM-Puffer gewaschen, um DNAsen etc. zu entfernen. Schließlich wurde das Pellet in 500 µl PEM aufgenommen. Die Spindelpräparation wurde für 1 min bei 300 g und RT in der Eppendorf-Zentrifuge zentrifugiert, wonach Pellet und Überstand getrennt wurden. Das Pellet wurde ebenfalls mit

500 µl PEM versetzt und von beiden wurden 200 µl für die Untersuchung mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese entnommen. Unterschiedliche Verdünnungen der Spindelpräparation wurden auf Deckgläschen zentrifugiert.

4.2.2.4 Präparation von Mikrotubuli aus Hirngewebe

Die Präparation der Mikrotubuli wurde der Vorschrift von Vallee übernommen [Vallee 1986a]. Nachdem frische Schweinehirne in Eiswasser gewaschen worden sind, wurden Blutgefäße und die *weiße Materie* entfernt. Von der *grauen Materie* wurden 600 g für die Isolierung der Mikrotubuli verwendet. Das Gewebe wurde klein geschnitten und mit 900 ml PEM und 63 µl Mercaptoethanol versetzt. Danach wurde es 3 x 4 s im Haushaltsmixer auf der niedrigsten Einstellung zerkleinert und anschließend eiskalt im Sonifizierer (Braun) homogenisiert. Das Homogenat wurde für 15 min bei 30.000 g und 2 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und für 90 min bei 100.000 g und 2 °C zentrifugiert. Zum Überstand wurden 0,1 mM GTP und 2,5 mM ATP hinzugefügt. Anschließend wurden die Mikrotubuli 30 min bei 37 °C unter leichtem Schütteln polymerisiert, bis die Lösung viskos erschien. Die Mikrotubulilösung wurde mit 20 ml 10 % Sucrose unterschichtet und für 45 min bei 20.800 g und 37 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig von den weichen Pellets getrennt und diese wurden in 75 ml eiskaltem PEM mit 1 mM GTP gelöst. Die Lösung wurde über Nacht auf Eis gelagert, oder sofort 2 x im Sonifizierer (Braun) homogenisiert und 30 min in Eiswasser inkubiert. Im Anschluss daran wurden die depolymerisierten Mikrotubuli für 30 min bei 30.000 g und 2 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde 10-15 min bei 37 °C assembliert und für 30 min bei 30.000 g und 37 °C zentrifugiert. Zuletzt wurden die Mikrotubulipellets aliquotiert und bei -80 °C schockgefroren.

4.2.2.5 Präparation von Mikrotubuli-assoziierten Proteinen (MAPs)

Ein Aliquot der gereinigten Mikrotubulipellets (ca. 50 µl) wurde aus dem -80 °C Gefrierschrank aufgetaut und modifiziert nach Vallee präpariert [Vallee 1986b]. Dazu wurde es zunächst mit 5 x Volumen PEM mit 1 mM GTP gelöst. Anschließend wurde die Mikrotubulipräparation 30 min auf Eis inkubiert und für 30 min bei 30.000 g und 2 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 20 µM Taxol versetzt und das Tubulin 15 min bei 37 °C polymerisiert. Im nächsten Schritt wurden die Mikrotubuli für 30 min bei 30.000 g und 37 °C zentrifugiert. Zum Pellet wurde 1/10 Volumen MAP-Dissoziationspuffer (PEM mit 4 M NaCl) zugegeben und 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Lösung wurde erneut für 30 min bei 30.000 g und 37 °C zentrifugiert. Der Überstand mit den MAPs wurde anschließend mindestens 2 h gegen 200 ml PEM dialysiert. Das Pellet mit den Mikrotubuli wurde im gleichen Volumen PEM mit 1 mM GTP und Taxol aufgenommen.

4.2.3 Proteinanalytik

4.2.3.1 Vorbereitung der Proben

Von den Zellen, die zur Verwendung für die SDS-PAGE vorgesehen waren, wurde das Medium abgesaugt. Die Zellen wurden 3 x mit PBS gewaschen und in kochendem SDS-Lysispuffer aufgenommen. Für 24-Multiwell-Schalen wurde dabei pro Loch 30 µl und für 2 cm Ø Schalen 100 µl SDS-Lysispuffer verwendet. Die Zellen wurden gevortext, suspendiert und 2 min im Heizblock gekocht.

Durch die Bindung des SDS an hydrophobe Regionen der Proteine werden diese denaturiert, so dass eine stark negative Partialladung in die Polypeptidketten geführt wird, die ihre Eigenladung überdeckt. Dadurch sind alle Proteine gleich geladen und werden in der SDS-PAGE nur dem Molekulargewicht nach getrennt. Zusätzlich zur SDS-Inkubation wird den Proteinproben β-Mercaptoethanol zugefügt, um Proteine, deren Polypeptidketten durch Disulfidbrücken verknüpft sind, in Einzelketten zu zerlegen.

4.2.3.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die unterschiedlichen Proteine des Zelllysates wurden mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli [Laemmli 1970], in einem 0,8 mm dicken Gradientengel von 6,5 x 9 cm Größe aufgetrennt, der aus einem Trenngel und einem Sammelgel bestand. Der Gradient des Trenngels setzte sich aus einem Acrylamidgradienten von 9-19 % und einem Bisacrylamidgradienten von 0,09-0,38 % zusammen. Über dem Trenngel befand sich das Sammelgel aus 5 % Acrylamid, das Taschen für den Probenauftrag enthielt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte unter Kühlung mit Wasser, in der mit Laufpuffer gefüllten Elektrophoresekammer. Zur Kühlung diente eine Umwälzpumpe, die an ein 5 °C warmes Wasserbad angeschlossen war. Der Gellauf erfolgte bei einer Spannung von 80 V für 15 min und 200 V für weitere 60 min. Nachdem die Bromphenolblau-Bande die Unterkante des Gels erreicht hatte, wurde der Lauf beendet. Für die Molekulargewichtsbestimmung war es notwendig Referenzproteine mit bekanntem Peptidkettengewicht mitlaufen zu lassen. Daher wurde auf jedem Gel ein Molekulargewichtsstandard mit fünf Proteinen von 29-116 kDa aufgetragen. Wurde das Gel nicht zum Transfer auf eine Nitrozellulosemembran verwendet, so wurde es mit Coomassie Brillant Blue gefärbt. Dazu wurde das Gel 1 h bei RT in der Coomassie-Färbelösung auf einem Wippinkubator inkubiert und anschließend in Entfärbelösung gewaschen. Die entfärbten Gele wurden mit einer Digitalkamera fotografiert und anschließend in Wasser getränkter Zellophanfolie eingespannt, getrocknet und somit konserviert.

4.2.3.3 Western-Blot

Im Western-Blot können Proteine spezifisch mit Antikörpern identifiziert werden. Dazu werden sie nach der Auftrennung in der SDS-PAGE in einem halbtrockenen Western-Blot-Verfahren auf Nitrozellulosemembran transferiert. Dabei wird auf der Graphitplatte des Elektroblotters (Anode) ein „Sandwich“, bestehend aus den folgenden Komponenten, zusammengestellt: sechs Lagen in Transferpuffer getränkten Whatman 3 MM Filterpapier, eine Nitrozellulosemembran, das ungefärbte Gel sowie sechs weitere Lagen Filterpapier. Diese werden luftblasenfrei aufeinander geschichtet. Darauf wird die obere Graphitplatte (Kathode) gesetzt, und die Proteine in einem homogenen elektrischem Feld für 1 h 15 min auf die Nitrozellulosemembran übertragen.

Um Überhitzung zu vermeiden wurde der Stromfluss auf 0,8 mA/cm^2 Transferfläche begrenzt. Nach dem Transfer wurde die Nitrozellulose zur Überprüfung des Transfererfolges mit der Ponceau-S Lösung geschwenkt und mit Wasser entfärbt. Die nun sichtbaren roten Molekulargewichtsmarkerbanden wurden beschriftet und die Membran mit PBS vollständig entfärbt und zum Absättigen von unspezifischen Proteinbindungsstellen für 1 h mit Blockierlösung (6 % Milchpulver in PBS + 0,1 % Tween) inkubiert. Nach mehrfachem Waschen mit PBS wurde die Blotmembran 1 h mit einer primären Antikörperlösung in 3 % BSA in PBS auf einem Wippinkubator inkubiert. Erneutes Waschen mit PBS sollte den Hintergrund reduzieren und unspezifische Signale verhindern. Im nächsten Schritt wurde die Blotmembran 1 h mit einer sekundären Antikörperlösung inkubiert. Der an Meerrettichperoxidase gekoppelte Sekundärantikörper war gegen das Primär-IgG gerichtet. Nach der Inkubation wurde wiederum mehrfach mit PBS gewaschen, um ungebundenen Sekundärantikörper zu entfernen. Danach wurden 3 ml Lösung A mit 300 µl Lösung B und 0,9 µl 30 % H_2O_2 frisch angesetzt, und die Blotmembran 1 min mit dieser Lösung inkubiert. Anschließend wurde die Blotmembran auf ECL-Filme exponiert in einer Entwicklermaschine bei 31 °C entwickelt. Die Belichtungszeiten wurden dabei der Signalstärke angepasst.

4.2.3.4 Densitometrische Auswertung

Die gefärbten SDS-Polyacrylamidgele und die belichteten Chemolumineszenzfilme wurden digitalisiert und mit dem Programm Image J densitometrisch ausgewertet. Nach der Markierung der einzelnen Laufbahnen wurde die Fläche unter den gewünschten Peaks ermittelt.

4.2.4 Bindungsexperimente

4.2.4.1 Polymerisation von Mikrotubuli

Präparierte und bei -80 °C gelagerte Mikrotubuli (vgl. 4.2.2.4) wurden nach dem Auftauen mit 5 x Volumen BRB-80 und 1 mM GTP aufgenommen und 5 min auf Eis inkubiert. Im weiteren Schritt wurden sie für 5 min bei 100.000 g und 4 °C zentrifugiert, um eventuelle Klumpen durch das Pelettieren zu entfernen. Der Überstand wurde mit 1 mM GTP und 20 µM Taxol versetzt und 1 h bei 37 °C polymerisiert. Nachdem die polymerisierten Mikrotubuli mit 37 °C warmen 40 % Glycerol in BRB-80 unterschichtet wurden, wurden sie für 30 min bei 30.000 g und 37 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde erneut vorsichtig in warmen BRB-80 mit 1 mM GTP und 20 µM Taxol aufgenommen und es wurden ca. 15 µl große Tropfen auf Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläser getropft und 30 min bei RT inkubiert. Die Lösung wurde mit einem Stück Filterpapier abgesaugt, und die Mikrotubuli 30 min lang mit 37 °C warmen 4 % PFA fixiert. Nach 2 x Waschen in TBS wurde der erste Antikörper in 3 % BSA 30 min inkubiert. Die Mikrotubuli wurden dann 2 x kurz mit PBS gewaschen. Der zweite Antikörper wurde ebenfalls 30 min bei RT inkubiert. Alle Lösungen wurden auf 37 °C vorgewärmt.

Für Sedimentationsversuche mit polymerisierten Mikrotubuli wurden die präparierten Mikrotubuli mit gereinigtem Tubulin, das an Cy3 gekoppelt war polymerisiert.

4.2.4.2 GST-Bindungsexperimente

Zur Untersuchung der Interaktion von Clathrin und Tubulin, wurde die N-terminale Domäne von Clathrin, welche als GST-Fusionsprotein vorhanden war, verwendet. Diese wurde vor dem Versuch aus dem -80 °C Gefrierschrank aufgetaut und für 20 min bei 100.000 g und 4 °C zentrifugiert, um Aggregate zu entfernen. Dann wurde sie an GSH-Sepharose Kügelchen gekoppelt (30 µg GST-TD wurden mit 5 µl GSH Kügelchen und 15 µl Sepharose CL-4B Kügelchen gemischt).

Das Zytosol wurde zunächst für 15 min bei 100.000 g und 4 °C zentrifugiert. 200 µl Zytosol wurden mit den GST-TD GSH-Sepharose Kügelchen 1 h auf Eis inkubiert und für 1 min bei 10.600 g und 4 °C in einem Ausschwingrotor (Eppendorf) zentrifugiert. Das Pellet wurde 2 x in KHM Puffer resuspendiert und wie oben zentrifugiert. Beim dritten Durchgang wurde das resuspendierte Pellet mit 10 % Sucrose in KHM Puffer unterschichtet und erneut zentrifugiert. Der erste Überstand und die gewaschenen GST-TD Kügelchen wurden in der SDS-PAGE und im Western-Blot analysiert.

Die Bindefähigkeit der GST-TD Domäne wurde ebenfalls mit gereinigten Mikrotubuli untersucht. Dazu wurde GST-TD nicht an die GSH-Sepharose Kügelchen gebunden. Die bei -80 °C gelagerten Mikrotubuli wurden zeitnah bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und

1 h auf Eis depolymerisiert. Anschließend wurden sie für 15 min bei 100.000 g und 4 °C zentrifugiert, um Aggregate zu entfernen. Von den gereinigten Mikrotubuli wurden 100 µl 20 min bei 37 °C polymerisiert. Diesen wurde die GST-TD in Gegenwart von 5 ng/ml Taxol, 0,1 mM GTP und 0,5 mg/ml BSA in PEM versetzt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde für 30 min bei 30.000 g und 37 °C zentrifugiert und der Überstand sowie die Pellets in SDS-PAGE und Western-Blot analysiert.

4.2.5 Molekularbiologische Methoden

4.2.5.1 Chemische Transformation von E. coli

Das Einschleusen der DNA in Bakterien wurde vorwiegend mit der Methode der Thermotransformation durchgeführt. Dabei wird die die DNA in thermokompetente Bakterien über einen kurzen Hitzeschock aufgenommen. Dazu wurden Bakterien, die über einen langen Zeitraum bei -80 °C gelagert werden können, zunächst langsam auf Eis aufgetaut. Zu 50 µl der Bakteriensuspension wurden ca. 5 ng Plasmid-DNA hinzugefügt und 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock der Bakterien erfolgte für 45 s bei 45 °C. Direkt danach wurden die Bakterien 2 min auf Eis abgekühlt. Es wurden 250 µl SOC Medium hinzugefügt und die Bakterien für 1 h bei 37 °C im Schüttelinkubator inkubiert. Anschließend wurde die Suspension auf LB-Agarplatten mit zur Selektion auf das transformierte Plasmid geeigneten Antibiotika ausgestrichen.

In einigen Fällen wurde die Methode der Elektroporation durchgeführt. Bei diesem Transformationsverfahren wurde die DNA durch Spannungsinduktion in elektrokompetente Bakterien eingeschleust. Diese wurden auf Eis aufgetaut und mit der DNA versetzt. Der Transformationsansatz wurde dann in vorgekühlte 0,2 cm Elektroporationsküvetten überführt, im Elektroporator transformiert und in 500 µl SOC-Medium resuspendiert. Anschließend wurden die Bakterien wie oben beschrieben vorinkubiert und ausplattiert.

4.2.5.2 Plasmid-Präparation aus E. coli

Die Minipräparation der Plasmid-DNA wurde mit dem QIA Prep Spin Miniprep Kit bzw. Plasmid Kit Endofree gemäß den Herstellervorgaben durchgeführt.

4.2.5.3 Klonierung von Protein codierender cDNA

Klonierung der cDNA des GFP-GAK (1-833)

Als Ausgangsplasmid für die Klonierung der Kinasedomäne von GAK wurde das GFP-GAK Konstrukt verwendet, das die gesamte Proteinsequenz von GAK kodierte. Das Prinzip bestand in der Eliminierung der carboxylterminalen cDNA mit Hilfe der Endo-

nuklease *Bam*HI. Im Agarosegel wurde der den aminoterminalen Teil enthaltene Vektor vom Carboxylterminus getrennt, aus dem Gel extrahiert und anschließend religiert. Dadurch entstand die genetische Information für GAK$^{1-833}$ im pEGFP Vektor.

Klonierung der cDNA des GFP-Tubulin

Die cDNA für Tubulin wurde aus dem RFP-Tubulin Plasmid entnommen. Dazu wurde dieses mit der Endonuklease XhoI geschnitten. Die Trennung der cDNA vom Ausgangsvektor erfolgte durch die Elektrophorese im Agarosegel. Auch der Zielvektor pEGFP wurde mit demselben Restriktionsenzym geschnitten und die Effizienz der Restriktion wurde im Agarosegel analysiert. Nach anschließender DNA-Extraktion aus dem Agarosegel wurde der Zielvektor mit der cDNA ligiert.

4.2.6 Mikroskopische Methoden

4.2.6.1 Indirekte Immunfluoreszenz

Die Methode der indirekten Immunfluoreszenz ermöglicht die Lokalisation von Proteinen in der Zelle und erlaubt damit Aussagen über ihre Verteilung. Das Prinzip beruht auf dem Verfahren aus der Immunologie, bei der Antigen-Antikörper-Reaktionen (Immunantwort) zum Einsatz kommen. Bei der indirekten Immunfluoreszenz werden die zellulären Proteine in zwei Schritten mit Fluorochromen markiert, wodurch sie im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden. Zunächst werden die Zellen mit dem Primärantikörper inkubiert, der spezifisch sein zelluläres Antigen erkennt und bindet. Der Primärantikörper wird von einem Sekundärantikörper, der gegen diesen gerichtet und an ein Fluorochrom gekoppelt ist, erkannt.

Die zu untersuchenden Zellen wurden 24 h vor dem Fixieren in der gewünschten Dichte auf säuregereinigte Deckgläschen ausgesät. Zellen, die mit siRNA transfiziert wurden, wurden erst beim Erreichen der maximalen Proteinrepression fixiert. Ansätze von *in vitro* Bindungsversuchen mit Mikrotubuli und Clathrin, die zur fluoreszenzmikroskopischen Analyse bestimmt waren, wurden auf Deckgläschen zentrifugiert und fixiert.

Die Standardfixierung wurde 10 min in 4 % Paraformaldehyd in PBS bei RT durchgeführt, nachdem die Deckgläschen mit den Zellen zweifach mit PBS gewaschen wurden, um das Proliferationsmedium zu entfernen. Durch die Verwendung von Aldehyden wurde eine schonende Fixierung der Zellen gewährleistet, bei der die Bindungsfähigkeit für die spezifischen Antikörper erhalten blieb. Nach dem Fixieren wurden die Zellen mehrfach mit PBS gewaschen und 5 min in TBS inkubiert, zur Neutralisation eventuell verbliebener Formaldehydreste. Nach kurzem Waschen in PBS wurden die Zellen 5 min mit 0,1 %

Triton X-100 in TBS permeabilisiert und erneut gewaschen. Die anschließende Inkubation mit dem Primärantikörper fand in einer feuchten Kammer bei 37 °C statt. Der gewünschte Antikörper wurde in 3 % BSA in PBS gelöst und 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen mehrfach gründlich mit PBS gewaschen und mit dem Sekundärantikörper, der gegen das Primär-IgG gerichtet und mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt war, 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Deckgläschen auf Objektträgern mit Prolong Antifade fixiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Die fluoreszenzmikroskopischen Präparate wurden bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt.

Um die Spezifikation der Antikörper zu kontrollieren, wurden negative Referenzfärbungen, nur unter Verwendung des Zweitantikörpers, durchgeführt. Die Inkubation erfolgte wie oben beschrieben, mit der Ausnahme, dass statt der Inkubation des Primärantikörpers eine mit PBS erfolgte. Zeigte die Kontrollfärbung keine sichtbare Markierung, so konnte man davon ausgehen, dass die indirekte Immunfluoreszenz-Färbung auf einer spezifischen Antikörper-Reaktion basiert.

4.2.6.2 Fixierung von Tubulin

Die Standardfixierung mit 4 % PFA war für die Immunfluoreszenz von Tubulin nicht geeignet, daher wurde eine Methode gewählt, bei der die Mikrotubuli intakt blieben. Das Proliferationsmedium wurde abgenommen und die Zellen wurden einmal mit 20 °C warmen PBS gespült. Im nächsten Schritt wurden sie genau 30 s lang mit dem 20 °C vorgewärmten BRB-80 Puffer mit 0,5 % Triton inkubiert. Sofort wurde genau die gleiche Menge Glutaraldehyd in BRB-80 hinzugefügt, gut gemischt und 10 min bei 20 °C inkubiert. Während der Wartezeit wurde 0,1 % $NaBH_4$ in PBS frisch angesetzt und nachdem das Fixierungsmittel abgenommen wurde, wurde die Zellen mit der $NaBH_4$-Lösung 7 min inkubiert. Anschließend wurde sehr gründlich mit PBS gespült. Nun konnte die Immunfluoreszenz, wie oben beschrieben, fortgesetzt werden und die Zellen konnten direkt mit dem Primärantikörper behandelt werden.

4.2.6.3 Endozytose von Transferrin

Die Standardmethode zur Untersuchung der Funktionalität der Clathrin-vermittelten Endozytose ist die Untersuchung der Aufnahme von Transferrin. Transferrin bindet an den Transferrin-Rezeptor an der Zelloberfläche und wird über die Clathrin-vermittelte Endozytose internalisiert.

Zur Untersuchung der Endozytose *in vivo* wurde fluorochromiertes Transferrin benutzt. Die eingesetzten Zellen wurden zunächst 1 h bei 37 °C in DMEM mit 0,1 % BSA inkubiert, um unmarkiertes Transferrin, das im FCS enthalten ist, aus den Zellen zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen auf Eis abgekühlt und mit einer vorgekühlten Lösung aus

5-20 µg/ml fluorochromiertem Transferrin in CO_2 unabhängigem Medium mit 0,1 % BSA 1 h auf Eis inkubiert [Düwel & Ungewickell 2006; Zhao & Keen 2008]. In dieser Zeit hat das Transferrin an den Transferrinrezeptor gebunden. Anschließend erfolgte ein Mediumwechsel mit vorgewärmtem DMEM, durch den die Internalisation eingeleitet wurde. Es wurde 10 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und sofort fixiert. Nach der Fixierung wurde erneut gewaschen und die Zellen konnten für weitere Experimente genutzt werden.

4.2.6.4 Behandlung von Zellen mit Brefeldin A (BFA)

Die Behandlung von Zellen mit BFA resultiert in der Inhibition des retrograden Transports vom Golgi-Apparat zum Endoplasmatischen Reticulum (ER), wodurch es zum Kollaps des Golgi-Apparates kommt [Misumi et al. 1986; Stamnes & Rothman 1993; Traub et al. 1993]. Zur Untersuchung des Effektes von BFA auf mitotische Zellen wurden diese wie beschrieben synchronisiert. Die Zellen wurden vor der Fixierung mit frischem Medium gewaschen und 5 min mit 2 µg/ml Brefeldin A bei 37 °C inkubiert. Danach wurden sie dreimal mit PBS gewaschen und wie beschrieben fixiert.

4.2.6.5 Behandlung von Zellen mit Butanol

Durch die Zugabe primärer Alkohole wird ein schneller Abbau der Clathrin-bedeckten Gruben erzielt und die Clathrin-vermittelte Endozytose wird dadurch gestoppt [Boucrot et al. 2006]. Zur Untersuchung der mitotischen Zellen wurden diese zunächst wie beschrieben synchronisiert. Im weiteren Verlauf wurden sie 30 min mit 1-Butanol inkubiert und anschließend fixiert. Ebenfalls wurden Lebendzellbeobachtungen in Gegenwart von 1-Butanol durchgeführt, um die Auswirkung primärer Alkohole auf die mitotische Spindel zu erfassen.

4.2.6.6 FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*)

Mit Hilfe der FRAP-Technik kann die Dynamik von Proteinen in lebenden Zellen untersucht werden. Dabei wird ein Bereich fluorochromierter Proteine in Zellen ausgewählt und das Fluorochrom durch intensive Laserbestrahlung inaktiviert. Das Protein, an welches das Fluorochrom gekoppelt ist, wird dabei nicht beeinflusst. Nun kann in Lebendzellbeobachtungen belegt werden, ob es zu einer Erholung der Fluoreszenz in dem bestrahlten Bereich kommt. Diese wird auf den intrazellulären Proteinaustausch zurückgeführt. Durch FRAP Experimente können so die Austauschraten der Proteine und ihre Dynamik in unterschiedlichen intrazellulären Vorgängen bestimmt werden.

Die Untersuchung der FRAP Experimente erfolgte am konfokalen Mikroskop Zeiss LSM 510 Meta bzw. am Olympus FV 1000. Die zu untersuchenden Zellen wurden in Glasbodenschalen ausgesät, am nächsten Tag mit den gewünschten GFP-Fusionsproteinen

transfiziert und wie beschrieben synchronisiert. Die Glasbodenschalen wurden in der vorgeheizten Inkubationskammer des konfokalen Mikroskops bei 37 °C montiert. Die mitotischen Zellen, die das transfizierte GFP-Fusionsprotein exprimierten, wurden mittels FRAP untersucht. Zur Bestrahlung wurde die Wellenlänge 488 nm benutzt. Der Laserpuls erfolgte über 20 Iterationen bei einer hohen Laserleistung. Es wurden Aufnahmen im Abstand von 5 s durchgeführt, die mehrere Minuten lang waren. Die Änderung der Fluoreszenz wurde durch LSM Image Examiner 5 gegen den Hintergrund bestimmt. Es war zudem möglich, die Halbwertzeit des Austausches zu bestimmen.

4.2.6.7 Mikroinjektion

Die Mikroinjektion der Zellen fand in Glasbodenkulturschalen statt. In diese wurden die Deckgläschen, auf denen die Zellen 24 h zuvor ausgesät wurden steril überführt. Die Zellen wurden mit CO_2 unabhängigem Medium und 0,1 % BSA einmal gewaschen und in diesem ebenfalls mikroinjiziert, um eine Änderung des pH-Werts außerhalb der CO_2 angereicherten Atmosphäre zu vermeiden. Die maximale Verweilzeit der Zellen im CO_2 unabhängigem Medium betrug ca. 30 min. In Experimenten, in denen die Zellen eine längere Zeit nach Mikroinjektion kultiviert worden sind, wurden dem Medium zusätzlich FCS und Antibiotika nach der Mikroinjektion zugesetzt. Die Mikroinjektion fand in einer vorgeheizten Inkubationskammer statt, um eine konstante Temperatur von 37 °C zu ermöglichen.

Die zu injizierende Proteinlösung wurde vor dem Beladen der Injektionsnadel für 5 min bei 10.600 g zentrifugiert, um etwaige Aggregate zu entfernen, die die Nadelspitze verstopfen könnten. Die Nadel wurde von hinten durch einen Mikropipettenspitze mit der Proteinlösung beladen. Nachdem sich die Lösung in die vordere Spitze der Nadel gezogen hatte, wurde diese in die Mikroinjektionsapparatur, bestehend aus dem Injektor FemtoJet (Eppendorf) und dem Mikromanipulator InjectMan (Eppendorf), eingespannt. Die Nadel wurde in das Zellmedium abgesenkt und auf Zellebene abgesenkt. Die Injektion erfolgte am Zeiss Axiovert 200 M bei 40-facher Vergrößerung. Der Ausflussdruck wurde unter visueller Kontrolle so eingestellt, dass ein leichter stetiger Ausfluss der Proteinlösung aus der Nadel zu sehen war. Zur Mikroinjektion wurde die Nadel in eine Testzelle abgesenkt und die Mikroinjektionsebene bestimmt. Daraufhin konnte automatisch mikroinjiziert werden. Der Injektionsdruck und die Injektionszeit wurden so eingestellt, dass ein deutliches Anschwellen der Zellen zu erkennen war. Der Erfolg der Mikroinjektion konnte sofort im Fluoreszenzlicht kontrolliert werden. Um DNA-Schäden durch das Anregungslicht zu vermeiden, wurden die Zellen nur mit 35 % der Lichtintensität beleuchtet. Gleiches galt für

die Identifizierung von Clathrin-depletierten Zellen bei der Transferrin Aufnahme. Die Zellen wurden nach der Injektion mit dem Proliferationsmedium gewaschen und für mindestens 2 h im Brutschrank kultiviert.

4.2.6.8 Lebendzellbeobachtungen

Die Lebendzellbeobachtung ermöglicht die Beobachtung der Zellen unter möglichst natürlichen Bedingungen über einen längeren Zeitraum. Im Gegensatz zur Fixierung können so die aufeinanderfolgenden zellulären Prozesse „live“ miterlebt werden. Die Vorteile von Lebendzellbeobachtungen des Zellzyklus liegen darin, dass keinerlei Reagenzien zur Synchronisation der Zellen benutzt werden müssen, was stets einen Eingriff in die zellulären Geschehnisse darstellt. Für die Lebendzellbeobachtungen wurden die Zellen auf Glasbodenschalen ausgesät und mit gewünschten GFP-Fusionsproteinen transfiziert. Zur Beobachtung von Clathrin wurden HeLa Zellen gewählt, die die Clathrin leichte Kette B (GFP-LCB) stabil exprimiert hatten. Aufgrund der festen Bindung der leichten Ketten an die schweren Ketten, konnte das Verhalten von GFP-LCB auf das von Clathrin schließen lassen. Die Lebendzellbeobachtungen wurden am Fluoreszenzmikroskop Olympus FV 1000 durchgeführt, das über eine geheizte Inkubationskammer und Begasung verfügt, wodurch die Zellen über einen Zeitraum von bis zu zwei Tagen beobachtet werden konnten. Mit einer selbstgebauten Vorrichtung konnte die Inkubationslösung während der laufenden Aufnahme gewechselt werden, ohne dass die Zellen bewegt wurden. Dies wurde vor allem bei der Inkubation mit Sucrose genutzt.

4.2.6.9 Elektronenmikroskopie

Die Zellen wurden wie beschrieben in Petrischalen ausgesät und synchronisiert. Für die Tubulinfixierung wurden die Zellen genau 30 s lang mit 0,5 % Triton in BRB-80 Puffer inkubiert. Die gleiche Menge BRB-80 mit 1 % Glutaraldehyd wurde hinzugefügt und 10 min bei 20 °C inkubiert. Anschließend wurde frisch angesetztes 0,1 % $NaBH_4$ in PBS 7 min inkubiert. Nach gründlichem Spülen mit PBS wurde der erste Antikörper für 1 h inkubiert. Verwendet wurde der Clathrin leichte Ketten Antikörper „R461“ mit einer Verdünnung von 1:5000 in PBS. Nach mehrfachem Spülen wurde Protein A-Gold als zweiter Antikörper, mit einer Verdünnung von 1:50 für 45 min inkubiert. Nach erneutem Spülen folgte die Fixierung mit 3 % Glutaraldehyd in 0,1 M Cacodylat/NaCl-Puffer bei 4 °C über Nacht. Am nächsten Tag wurden die Zellen mehrfach vorsichtig mit 0,1 M Cacodylat/NaCl-Puffer gewaschen für insgesamt 20 min. Im nächsten Schritt wurden sie 1 h mit 2 % OsO_4 in Cacodylat/NaCl-Puffer im Dunkeln inkubiert und anschließend 20 min mit Cacodylat/NaCl-Puffer im Dunkeln gewaschen, wobei die Lösung mehrfach gewechselt wurde. Zur Erhöhung des Membrankontrastes folgte eine Inkubation mit 1 % Tannin in 0,1 M Cacodylat/NaCl-Puffer 1 h im Dunkeln. Überschüssiges Tannin wurde durch

Waschen mit 1 % $NaSO_4$ in 0,1 M Cacodylat/NaCl-Puffer für 5 min mit mehrfachem Lösungswechsel entfernt. Die Probe wurde durch eine Alkoholreihe (25 %, 50 %, 75 %, 90 % für je 2 x 3 min) entwässert und das Restwasser wurde durch 6 x 5 min Waschen mit absolutem Alkohol entfernt.

Aufgrund der Verwendung von Plastikschalen wurde statt der Inkubation mit Toluol, eine aufsteigende Reihe mit Epon zur Infiltration gewählt. Dazu wurde das Gemisch aus Ethanol/ Epon in einem Verhältnis von zunächst 3:1, danach 2:1 und anschließend 1:3, jeweils 30 min bei 40°C inkubiert. Anschließend wurde 3 x 45 min mit Epon bei 40 °C inkubiert. Die Polymerisation von Epon erfolgte zunächst 20 h bei 40 °C und anschließend 40 h bei 60 °C. Die Blöcke mit den Zellen wurden mit Hilfe eines Ultramikrotoms geschnitten und auf Kupfernetze für die Elektronenmikroskopie überführt. Anschließend wurden sie mit Bleizitrat/Uranylacetat kontrastiert. Die Untersuchung erfolgte am Zeiss EM 902, EM-10C oder FEI Tecnai 200 Elektronenmikroskop. Die Präparate wurden mit einer Strahlspannung von 80.000 V und einer Vergrößerung von 7.000-50.000 untersucht. Photographische Abzüge wurden mit Hilfe eines Scanners digitalisiert.

5. Ergebnisse

In der Literatur wurde Clathrin bereits mehrfach als Spindel-assoziiertes Protein beschrieben [Royle & Lagnado 2006]. Seine genaue Funktion konnte bislang jedoch nicht geklärt werden. Um diese einzugrenzen, wurde wie folgt vorgegangen.
Zunächst erfolgte die genaue Lokalisation von Clathrin in der Mitose. Anschließend wurden Clathrin-assoziierte Proteine auf ihre intrazelluläre Verteilung in der Mitose untersucht. In RNAi Untersuchungen wurde im darauffolgenden Schritt die Bedeutung von Clathrin in der Mitose geklärt. Auch eventuelle Auswirkungen auf mögliche Bindungspartner sollten durch Herunterregulation der Expression von Clathrin ermittelt werden. Schließlich wurden die Bindungsverhältnisse von Clathrin an den Mikrotubuli biochemisch untersucht. Dabei wurde versucht, die Bindung von Clathrin an der mitotischen Spindel durch den Einsatz unterschiedlicher Reagenzien *in vivo* zu unterbinden.

5.1 Clathrin in der Mitose

Zwecks immuncytochemischer Untersuchung von Clathrin in den unterschiedlichen Stadien der Mitose wurde die humane immortalisierte Adenokarzinomzelllinie HeLa SS6 verwendet, welche häufig für die Untersuchung von endozytotischen Proteinen *in vitro* eingesetzt wird. Nach Synchronisierung der HeLa SS6 Zellen, erfolgte die Markierung der Zellen mit Antikörpern gegen Clathrin und α-Tubulin, der Hauptkomponente der Spindel. Zur Darstellung beider Proteine in der Interphase wurden neben HeLa SS6 auch IHKE Zellen verwendet, eine humane immortalisierte Nieren-Epithelzelllinie. IHKE Zellen weisen sehr ausgeprägte Mikrotubuli (MT) auf und eignen sich daher hervorragend zur Darstellung von Tubulin.
Aufgrund der festen Bindung der Clathrin leichten Ketten an die schweren Ketten, konnte die Identifikation von Clathrin sowohl durch Antikörper, die gegen die Clathrin leichten Ketten gerichtet waren als auch durch Antikörper, die die Clathrin schweren Ketten erkannten, erfolgen. Im Folgendem wird daher der polyklonale Antikörper „R461“, der gegen die Clathrin leichten Ketten gerichtet ist, zur Identifikation von Clathrin verwendet.

5.1.1 Clathrin unter dem Lichtmikroskop

In der Interphase ist Clathrin in punktierten Strukturen an der Plasmamembran sowie in der perinucleären Golgiregion nachzuweisen (Abb. 7 A, D). Tubulin hingegen bildet filamentöse Strukturen aus, die am Mikrotubuli-Organisationszentrum (MTOC) entspringen und sich durch die Zelle erstrecken (Abb. 7 B, E).

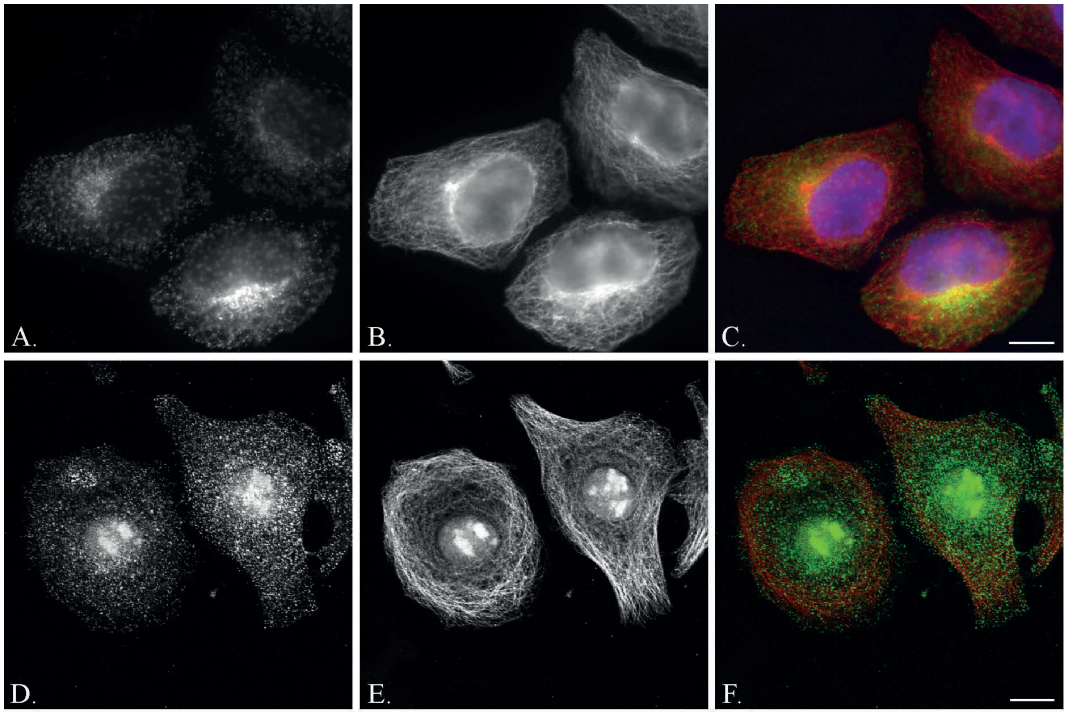


Abb. 7: Clathrin und Tubulin in der Interphase.

Hela SS6 (A-C) und IHKE Zellen (D-F) wurden immuncytochemisch gegen Clathrin (A, D; polyklonaler AK „R461“) und α-Tubulin (B, E; monoklonaler AK „DM1A“) markiert. C & F stellen die Überlagerung der beiden Fluoreszenzkanäle dar. Maßstab 10 µm.

Während beide Proteine in der Interphase nicht kolokalisiert sind, ist in der Mitose die Assoziation von Clathrin an die Mikrotubuli zu erkennen. In der ersten Phase der Mitose, der Prophase, wird der bipolare Spindelapparat gebildet. Sein Grundgerüst bilden mitotische Fasern, die aus Mikrotubuli aufgebaut sind. Der Vergleich der immuncytochemischen Färbung von Clathrin (Abb. 8 A) mit der des Tubulins in der Prophase (Abb. 8 B) zeigt eine nahezu vollständige Überlagerung beider Signale (Abb. 8 C). Clathrin befindet sich an der Spindel in unmittelbarer Nähe zu den Mikrotubuli. Auch in der Metaphase (Abb. 8 D-F), in der die Spindel ihre maximale Ausdehnung erreicht, kolokalisiert Clathrin mit dem Spindelapparat. Während sich jedoch die immuncytochemische Markierung von Tubulin fast ausschließlich auf die Spindel konzentriert (Abb. 8 E), befindet sich Clathrin zum größten Teil an der Spindel, ist aber ebenfalls an der Membran und im Zytosol nachzuweisen (Abb. 8 D).

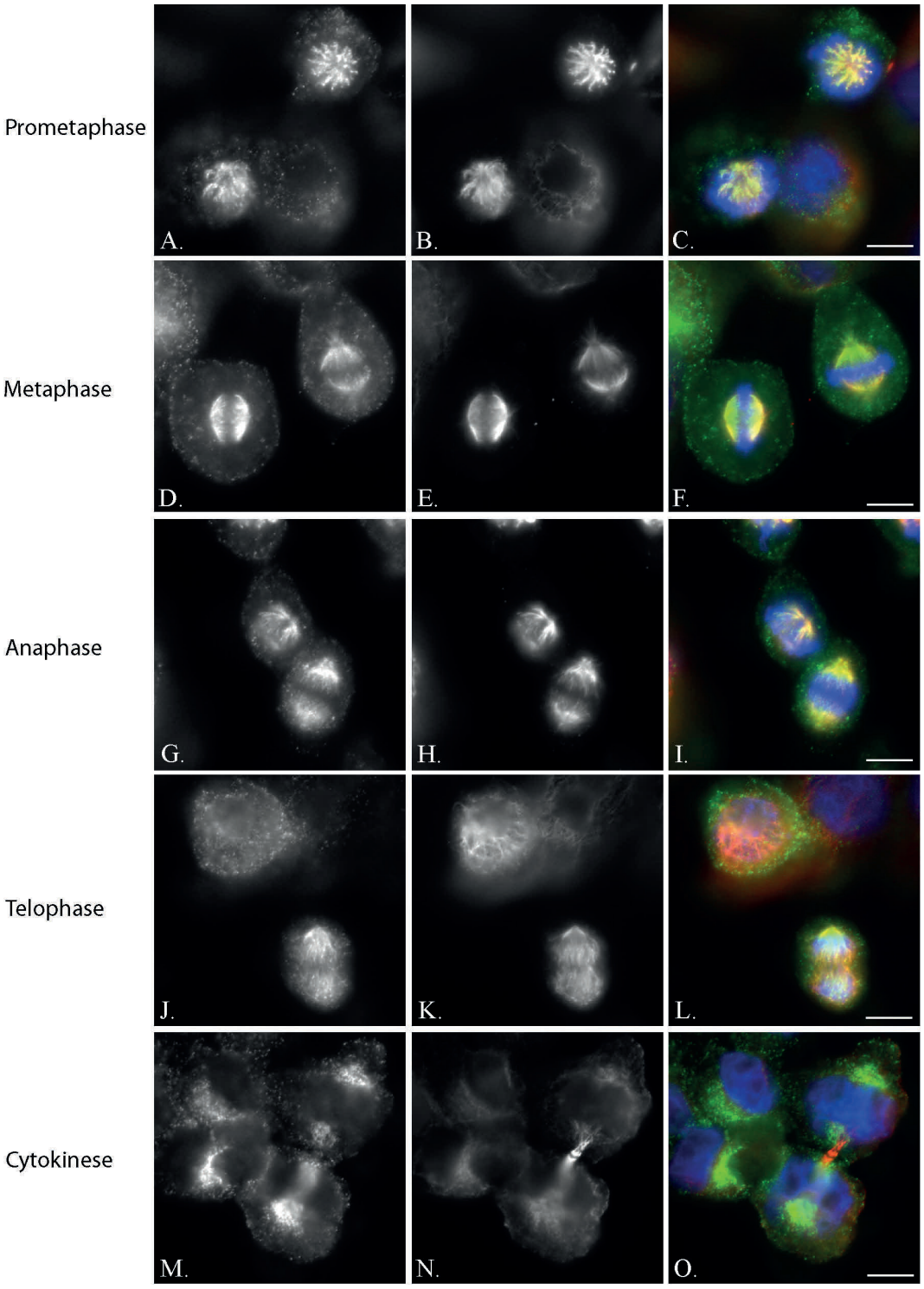


Abb. 8: Clathrin in der Mitose.

Dargestellt wurden die verschiedenen Stadien der Mitose. HeLa Zellen wurden synchronisiert und immuncytochemisch gegen Clathrin (A; D; G; J; M; polyklonaler AK „R461“) und Tubulin (B; E; H; K; N; monoklonaler AK „DM1A“) gefärbt. Überlagerung der beiden Fluoreszenzkanäle (C; F; I; L; O). In der Mitose kolokalisiert Clathrin mit α-Tubulin. Die Kolokalisation verschwindet in der Cytokinese wieder. Maßstab 10 µm.

Die Kolokalisation beider Proteine wird in der Anaphase (Abb. 8 G-I; untere Zelle) fortgesetzt. In dieser Phase werden die Chromosomen zu den beiden Zellpolen gezogen. Auch hier kolokalisiert Clathrin (Abb. 8 G) mit Tubulin (Abb. 8 H), wobei sich Clathrin jedoch vorwiegend auf die polnahen Teile des Spindelapparates konzentriert, an dem die Depolymerisation der Kinetochorfasern stattfindet und so zum Transport der Chromosomen zu den Zellpolen beiträgt.

An der zentralen Spindel, die aus Interpolaren-Mikrotubuli aufgebaut ist, kann ebenfalls Clathrin nachgewiesen werden. Insbesondere wird dies am Ende der Anaphase und dem Beginn der Telophase deutlich (Abb. 8 J-L). Zu diesem Zeitpunkt sind die Chromosomen an den Zellpolen angekommen und die Spindelfasern sind noch nicht abgebaut worden (Abb. 8 K). Clathrin ist an den Zellpolen erkennbar (Abb. 8 J) und erstreckt sich entlang der Interpolaren-Mikrotubuli bis zur Äquatorialebene der Zelle, in welcher bereits die Abschnürung der beiden Tochterzellen sichtbar wird (Abb. 8 L).

Direkt auf die Mitose folgt die Cytokinese, in der die beiden neu entstehenden Zellen voneinander getrennt werden. Bereits in der Telophase wird ein kontraktiler Ring aus Aktin und Myosin II gebildet, mit dessen Hilfe die Zelle durchgeschnürt wird. Die Interpolaren-Mikrotubuli legen die Teilungsebene der Zelle fest und sind bis zum Abschluss der Cytokinese erkennbar (Abb. 8 N). Zu diesem Zeitpunkt der Zellteilung ist eine Kolokalisation von Clathrin und den Mikrotubuli nicht mehr gegeben (Abb. 8 O). Der Spindelapparat ist bereits abgebaut. Die neu entstehenden Tochterzellen weisen auf beiden Seiten ihrer Zellkerne eine erhöhte Konzentration von Clathrin auf (Abb. 8 M). Im Vergleich dazu besitzen Interphasezellen nur eine perinucleäre Region in der Clathrin konzentriert ist, die Region am Golgi-Apparat (Abb. 7 A, D). Aus diesen Daten wird deutlich, dass Clathrin während der gesamten Mitose an der Spindel lokalisiert ist, sich jedoch nicht mehr an der Cytokinese beteiligt.

Der Spindelapparat besteht aus drei unterschiedlichen Mikrotubulitypen, den Kinetochor-, den Astral- und den Interpolaren-Mikrotubuli. Während sich die Kinetochor-Mikrotubuli von den Zellpolen zu den Chromosomen erstrecken, verbinden die Astral-Mikrotubuli die Zellpole mit der Plasmamembran. Die Interpolaren-Mikrotubuli sorgen für die Stabilität der Spindel in der Anaphase und legen die Teilungsebene der Zelle fest. Sie interagieren in einer antiparallelen Anordnung miteinander und gleiten mit Hilfe von Motorproteinen aneinander vorbei.

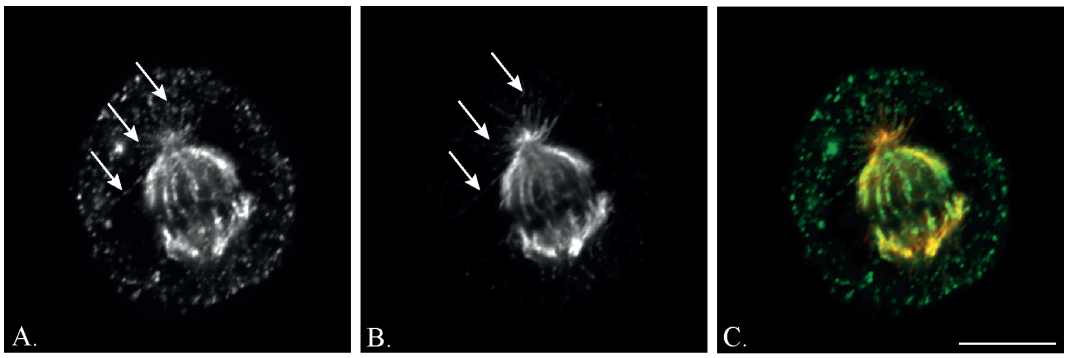


Abb. 9: Clathrin an Kinetochor- und Astral-Mikrotubuli der mitotischen Spindel.

Synchronisierte HeLa SS6 Zelle in der Metaphase. Die immuncytochemische Markierung zeigt, dass Clathrin (A; polyklonaler AK „R461“) nahezu vollständig mit dem α-Tubulin (B; monoklonaler AK „DM1A“) an den Astral-Mikrotubuli kolokalisiert (Pfeile). Maßstab 10 µm.

Abbildung 9 B zeigt deutlich, wie sich Astral-Mikrotubuli fächerartig von dem Polkörper zum Zellcortex erstrecken. Der Nachweis von Clathrin an der Spindel belegt auch seine Assoziation an den Astral-Mikrotubuli (Abb. 9 A, Pfeile).

Ferner zeigen Untersuchungen der Immunfluoreszenz die Bindung von Clathrin an den Centrosomen in der Mitose. Zur Überprüfung dieser Beobachtung, wurden immuncytochemische Färbungen von Clathrin und γ-Tubulin in Interphase und Mitose durchgeführt (Abb. 10). Abbildung 10 B stellt jeweils ein bis zwei Centrosomen in Interphasezellen dar, die durch die γ-Tubulin-Markierung gekennzeichnet sind. Clathrin (Abb. 10 A) interagiert nicht mit ihnen. In der Mitose hingegen ist Clathrin ist sehr gut an den Centrosomen zu erkennen (Abb. 10 A1, D & G), an denen es mit γ-Tubulin kolokalisiert (Abb. 10 H). In Abbildung 10 A 1-C 1 ist der direkte Vergleich zwischen Interphase- und mitotischen Centrosomen vergrößert dargestellt. Die Daten verdeutlichen, dass Clathrin in der Mitose an die Centrosomen gebracht wird, wohingegen es in der Interphase nicht im Bereich der Centrosomen nachzuweisen ist (Abb. 10 A und C 1).

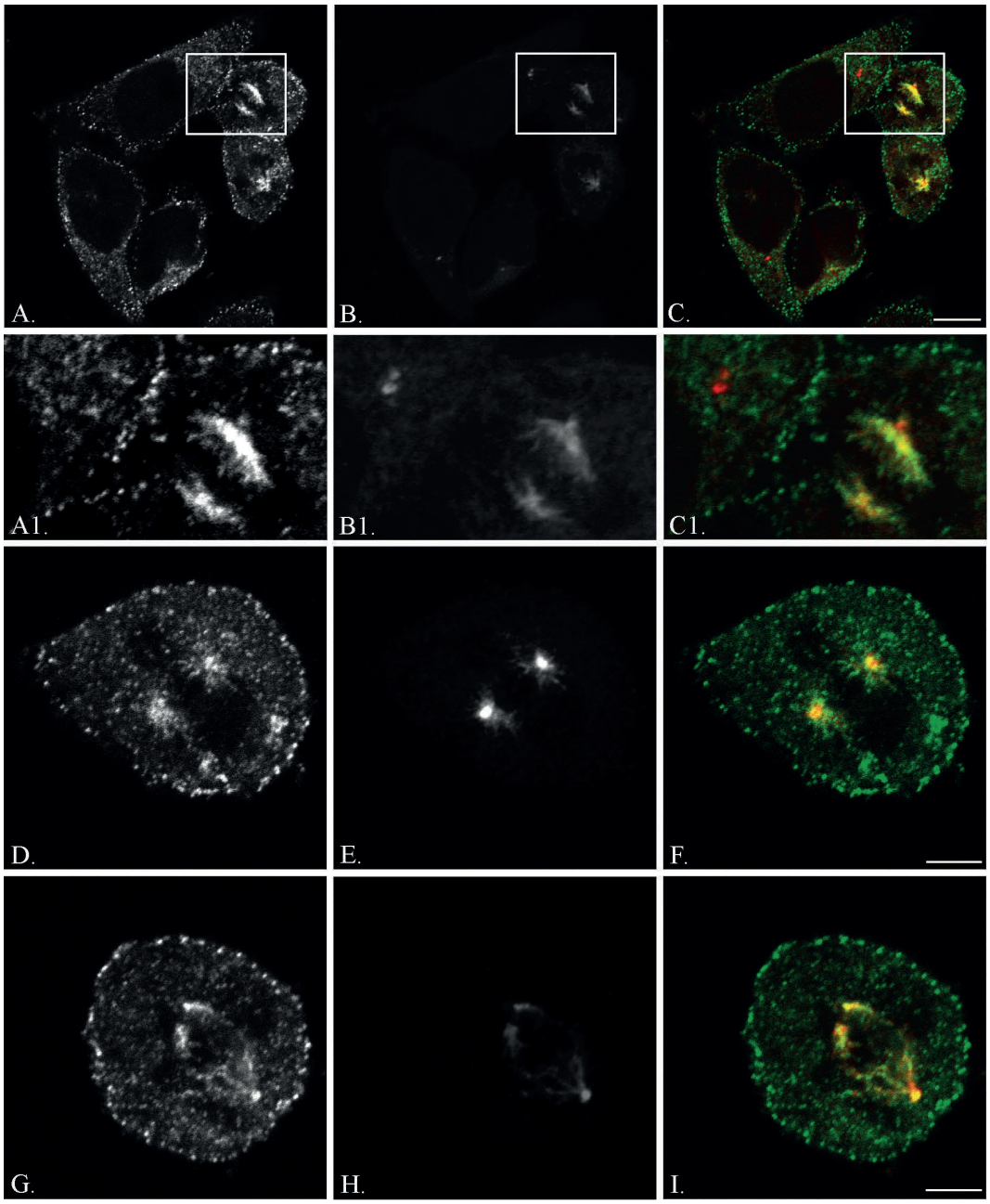


Abb. 10: Clathrin und γ-Tubulin.

HeLa SS6 Zellen in der Interphase und der Mitose wurden immuncytochemisch gegen Clathrin und γ-Tubulin markiert. Clathrin (A, A1, D, G; „R461“) kolokalisiert nahezu vollständig mit γ-Tubulin (B, B1, E, H; „GTU-88“) mit den Centrosomen der Spindel (C, C1, F,I), jedoch nicht mit den Centrosomen in der Interphase (C, C 1). A1-C1 sind Vergrößerungen von A-C. C, C1, F & I stellen die Überlagerung der beiden Fluoreszenzkanäle dar. Maßstab C=10 µm; in F und I= 5 µm.

5.1.2 Clathrin unter dem Elektronenmikroskop

In der Immunfluoreszenz ist Clathrin mittels verschiedener Clathrin-spezifischer Antikörper an der mitotischen Spindel nachzuweisen. Seine Markierung erscheint unterschiedlich stark punktiert an den Mikrotubuli der Spindel. Das Auflösungsvermögen der Lichtmikroskopie erlaubt jedoch keine Schlussfolgerung auf die Clathrin-haltigen Strukturen an der Spindel. Für eine detaillierte Darstellung von Clathrin in der Mitose wurde daher die Elektronenmikroskopie gewählt.

Zweifach synchronisierte HeLa S3 Zellen, die in Glutaraldehyd fixiert und für die Elektronenmikroskopie aufgearbeitet wurden, sollten für ein detaillierteres Bild von Clathrin an der Spindel sorgen. Abbildung 11 A stellt den Ausschnitt eines Plasmamembranbereiches mit zwei Clathrin-bedeckten Vesikeln dar. Diese sind an der elektronendichten Markierung der Plasmamembran sowie an der Immunogoldmarkierung des Clathrins zu identifizieren. Die rund 10 µm großen Goldpartikel konzentrieren sich um die beiden Vesikel, während in anderen Zellbereichen keine Goldmarkierung nachzuweisen ist.

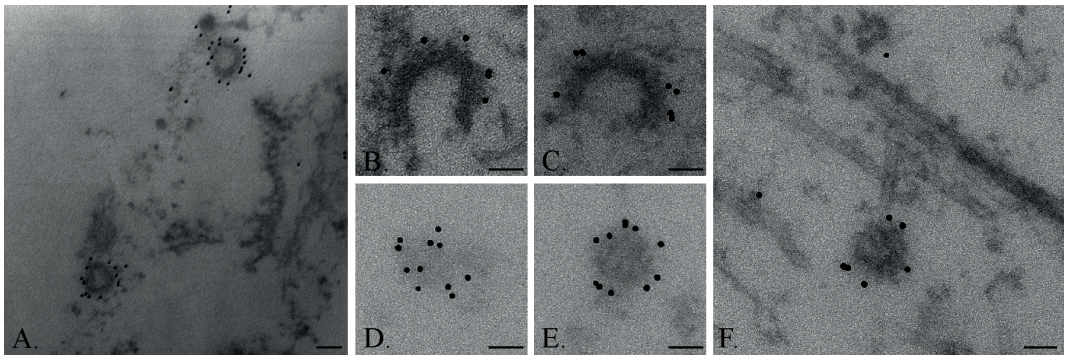


Abb. 11: Clathrin-bedeckte Vesikel im Elektronenmikroskop.

Immunogold-markierte Clathrin-bedeckte Vesikel in der Nähe der Plasmamembran (A). Clathrin-bedeckte Einstülpungen an der Plasmamembran (B & C) sowie bereits abgeschnürte Clathrin-bedeckte Vesikel im Inneren der Zelle (D & E). Ein Clathrin-bedecktes Vesikel in der Nähe der Mikrotubuli einer mitotischen Zelle (F). Maßstab 50 nm.

Im Durchschnitt befinden sich 9 Goldpartikel pro Vesikel auf jedem Ultradünnschnitt. In Plasmamembranbereichen sind tiefe goldmarkierte Einstülpungen erkennbar. Bei diesen handelt es sich um Clathrin-bedeckte Einstülpungen, welche noch nicht zu Vesikeln abgeschnürt worden sind (Abb. 11 B & C). In diesen Bereichen ist die markante elektronendichte Membran gut zu sehen, an der sich der typische Stachelsaum der Clathrin-bedeckten Vesikel befindet. Andere Clathrin-bedeckte Vesikel sind nur tangential angeschnitten. Diese sind einzig an der Goldmarkierung des Clathrins zu identifizieren (Abb. 11 D & E). Der Abstand zwischen den Goldpartikeln der Clathrin-bedeckten Vesikel

zueinander variiert zwischen 20 nm und 60 nm. Schließlich gibt es einige wenige solcher elektronendichten Strukturen, an denen eine Goldmarkierung belegt ist, in der Nähe der mitotischen Mikrotubuli (Abb. 11 F).

Der Vergleich der Morphologie von eindeutig identifizierbaren Clathrin-bedeckten Vesikeln mit Goldmolekülen an den Mikrotubuli im Ultradünnschnitt macht deutlich, dass Vesikelstrukturen nicht an Mikrotubuli nachzuweisen sind (Abb. 12A & 7 B-G). Im Ultradünnschnitt erscheinen die Mikrotubuli als lange parallel angeordnete elektronendichte Doppellinien, die sich bis zu den Chromosomen (Ch) ziehen. An manchen Schnitten ist die Kinetochorplatte (KP) gut erkennbar. Sie bildet die Bindungsstelle der Mikrotubuli an die Chromosomen (Abb.12 D & G).

Entlang der Mikrotubuli befinden sich Goldpartikel, deren Anordnung sich von denen im Clathrin-bedeckten Vesikel an der Membran in derselben Zelle unterscheidet. Der Abstand der Goldkügelchen zu den Mikrotubuli variiert im Durchschnitt von 11 nm bis 35 nm. Allerdings assoziieren viele Goldpartikel auch direkt an den Mikrotubuli (Abb. 12 D-F, kleine Pfeile). In der Nähe dieser Goldpartikel ist keine Membran nachzuweisen und sie sind ebenfalls nicht konzentriert angeordnet, so wie das in Vesikeln der Fall ist (vgl. Abb. 11). Vesikel-ähnliche Strukturen in der Nähe von Mikrotubuli finden sich nur selten in Ultradünnschnitten (Abb. 12 C). Diese durch Pfeile markierten Strukturen könnten aufgrund der elektronendichten Umgebung und der Goldpartikel-Anordnung Clathrin-bedeckte Vesikel darstellen. Die Mehrheit der Goldpartikel liegt jedoch vereinzelt an den Mikrotubuli. Darüber hinaus sind mehrfach Stellen belegt, an denen sich zwei Goldpartikel sehr dicht nebeneinander zwischen zwei Mikrotubuli befinden (Abb. 12 E großer Pfeil).

Obwohl immunogoldmarkierte Clathrin-bedeckten Vesikel in Bereichen der Plasmamembran nachgewiesen wurden, sind keine solchen an der Spindel. Diese Ergebnisse führen zu dem Schluss, dass Clathrin an der Spindel nicht in Form von Clathrin-bedeckten Vesikeln vorliegt.

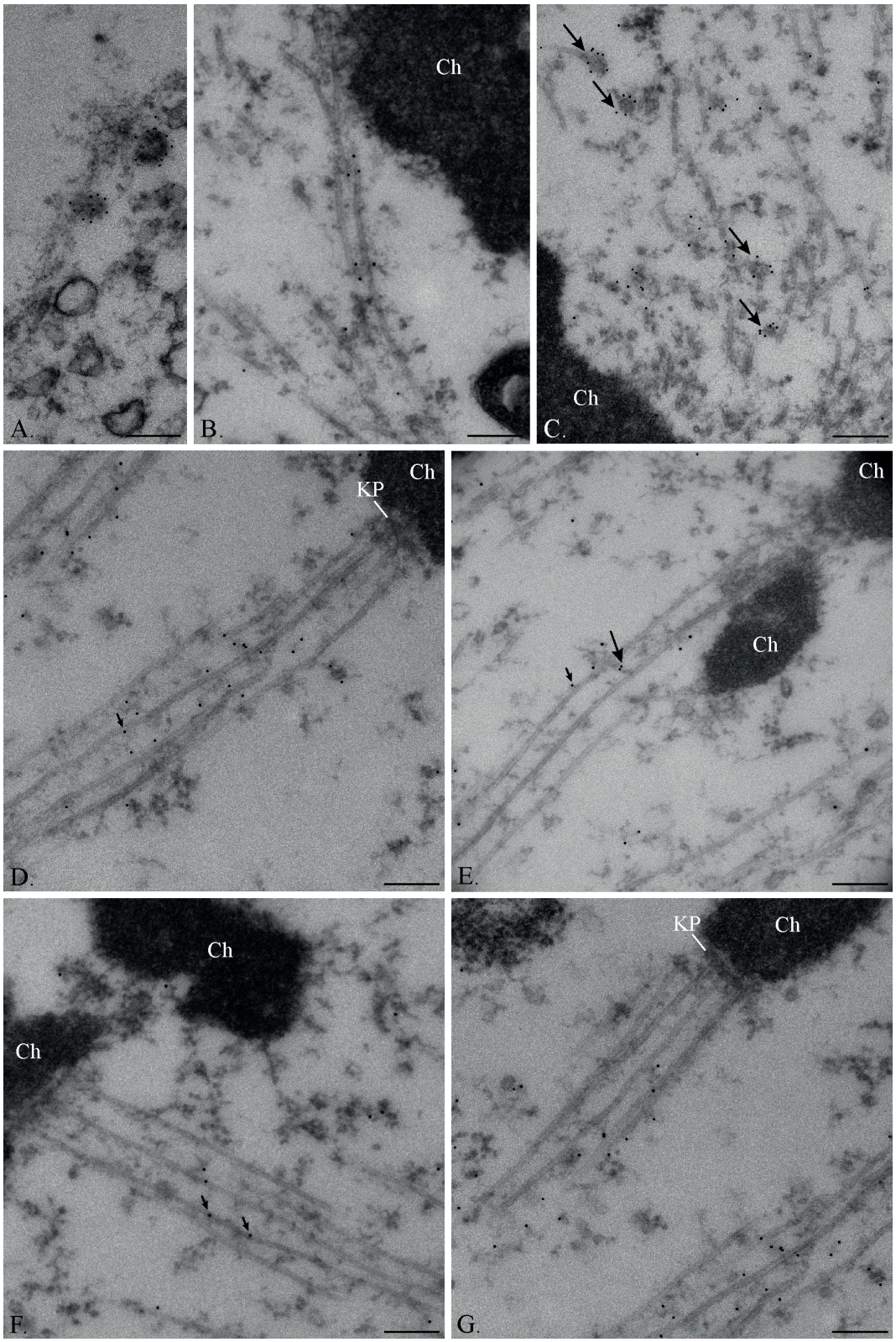


Abb. 12: Clathrinstrukturen an der mitotischen Spindel im Elektronenmikroskop.

Synchronisierte HeLa S3 Zellen wurden Immunogold-markiert gegen Clathrin. Clathrin-bedeckte Vesikel in der Nähe der Plasmamembran (A). Goldmarkierung an Spindelfasern (B). Mögliche Clathrin-bedeckte Vesikel in der Nähe der Mikrotubuli (C, Pfeile). Kinetochor-Mikrotubuli mit auffälliger vereinzelter Goldmarkierung (D-G). Kleine Pfeile markieren Goldkügelchen, die direkt mit den Mikrotubuli assoziiert sind. Großer Pfeil in E deutet auf zwei Goldkügelchen zwischen zwei parallelen Mikrotubuli hin. Maßstab 200 nm.

5.1.3 Zusammenfassung

Die Untersuchung der Verteilung von Clathrin in mitotischen Zellen ergab eine eindeutige Lokalisation von Clathrin an der Spindel in allen Stadien der Mitose. Erst in der Cytokinese kolokalisiert Clathrin nicht mehr mit Tubulin, und ist daher nicht für den Aufbau des Mittelkörpers und die weitere Trennung der beiden Tochterzellen von unmittelbarer Bedeutung.

Während der mitotischen Stadien assoziiert Clathrin mit den Kinetochor-Mikrotubuli und ist darüber hinaus eindeutig an den Astral-Mikrotubuli der Spindel zu erkennen. Zusätzlich fällt auf, dass sich Clathrin im Bereich der Centrosomen der mitotischen Zelle befindet, wo es mit γ-Tubulin lokalisiert. Hingegen ist es in Interphasezellen nicht an Centrosomen nachweisbar.

Die elektronenmikroskopische Untersuchung unterstützt die lichtmikroskopische Lokalisation von Clathrin an der Spindel. Während die goldmarkierten Strukturen in der Nähe der Plasmamembran leicht als typische Clathrin-bedeckte Vesikel identifiziert werden können, offenbaren die Goldstrukturen an den Mikrotubuli ein anderes Bild. Es gibt keine Anhaltspunkte dafür, dass Clathrin an der Spindel in Form von Clathrin-bedeckten Vesikeln auftritt. Die Goldkügelchen treten vereinzelt entlang der Mikrotubuli auf, und scheinen nicht selten direkt an den Mikrotubuli zu liegen. Diese Daten belegen, dass Clathrin in der Mitose eine andere Rolle spielt als es in Clathrin-abhängigen Transportprozessen übernimmt.

5.2 An Clathrin-vermittelten Transportprozessen beteiligte Proteine in der Mitose

An Clathrin-abhängigen Transportprozessen sind neben Clathrin weitere Proteine beteiligt. Inwieweit diese eine Rolle während der Mitose spielen, war bisher unbekannt. Aus diesem Grund wurde im weiteren Schritt das Verhalten wichtiger Bindungspartner von Clathrin in der Zellteilung untersucht.

5.2.1 AP1

Das Adaptorprotein AP1 ist in der Interphase am vesikulären Transport zwischen dem *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) und dem endosomalen Kompartiment beteiligt, an dem es die Bildung von Clathrin-bedeckten Vesikeln vermittelt. Bisher wurde es in der Literatur nicht an der mitotischen Spindel beschrieben. Immuncytochemische Analysen in synchronisierten HeLa SS6 Zellen lieferten jedoch den Nachweis für die Lokalisation von AP1 an der Spindel.
Abbildung 13 veranschaulicht, dass AP1 mit Clathrin an der Spindel kolokalisiert. Während in der Clathrinfärbung einzelne mitotische Fasern an der Spindel unterschieden werden können (Abb. 13 B, Metaphase), wirken die AP1-Punkte feiner und kontinuierlicher. Besonders deutlich wird der Unterschied in der Metaphase (Abb. 13 D-F), in der erkennbar wird, dass AP1 ebenfalls im Zytosol diffus verteilt ist (Abb. 13 D). Das führt zur Herabsetzung des Kontrastes zwischen dem AP1-Signal an der Spindel und dem im Zytosol. Im Gegensatz dazu ist kein Clathrinsignal im Zytosol nachzuweisen. Clathrin ist an der Spindel und an der Plasmamembran der mitotischen Zelle zu erkennen (Abb. 13 E). Das Signal des monoklonalen Antikörpers gegen AP1 ist in verschiedenen Stadien der Mitose an der Spindel zu beobachten. In der Prophase (Abb. 13 A, Zellen links) ist eine sehr schwache AP1-Färbung der mitotischen Fasern sichtbar. Diese werden durch das Clathrinsignal an der Spindel identifiziert (Abb. 13 B). Obwohl das Signal von AP1 in der Metaphase am stärksten erscheint, kann das Protein auch in der Anaphase an der Spindel beobachtet werden (Abb. 13 G untere Zelle).

In der Cytokinese kommt es zum Verlust der Kolokalisation zwischen AP1 und Tubulin (Abb. 13 K). Die Lokalisation von AP1 an der Spindel konnte zusätzlich mit einem polyklonalen Antikörper bestätigt werden.

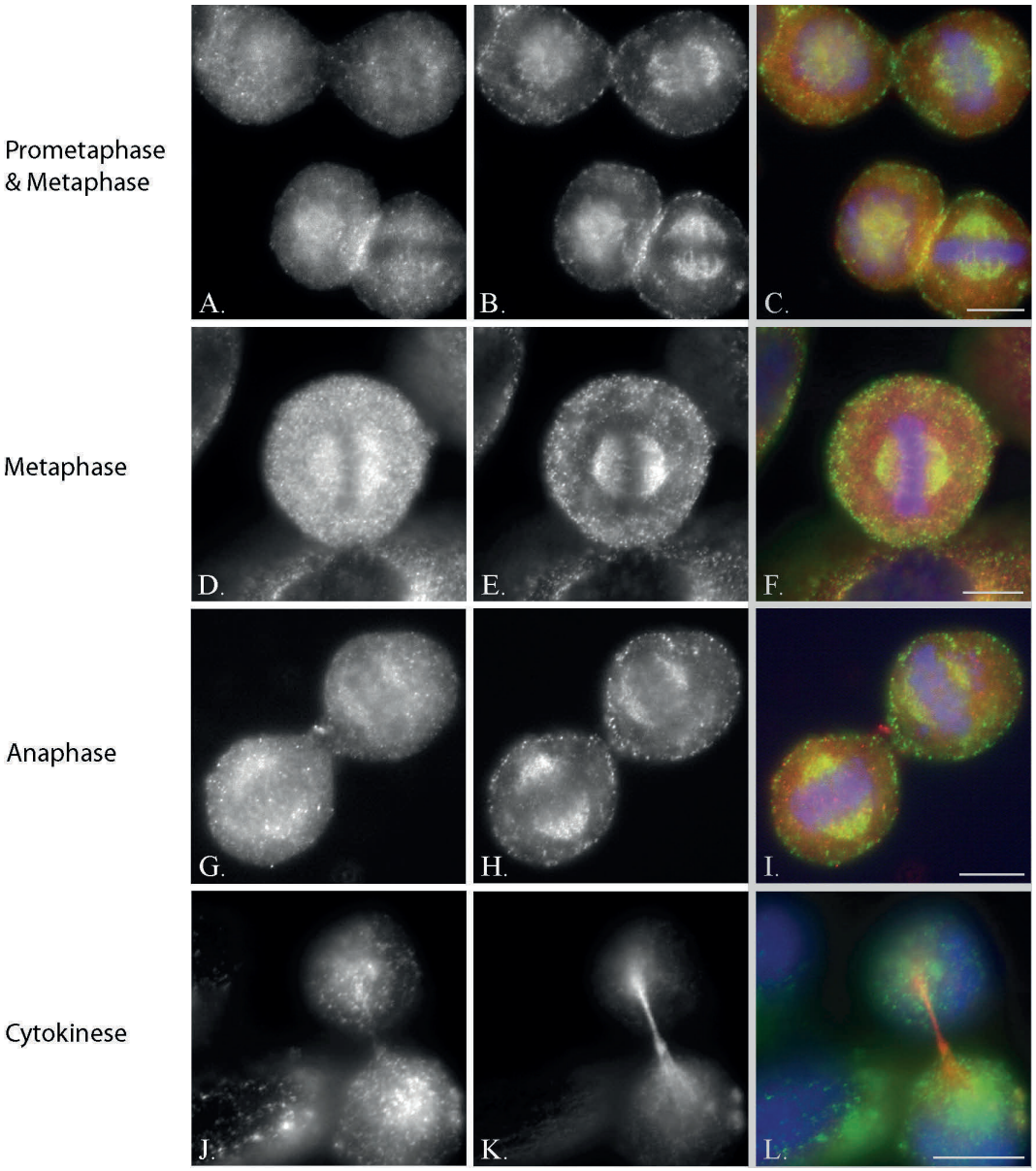


Abb. 13: Verteilung von AP1 in der Mitose.

Synchronisierte HeLa Zellen wurden immuncytochemisch gegen AP1 (A, D, G, J; monoklonaler AK „100/3“) und Clathrin (B, E, H; polyklonaler AK „R461“) markiert. Die Zellen, die sich in der Cytokinese befinden (J-L), waren zuvor transient mit RFP-Tubulin (K) transient transfiziert worden, synchronisiert und anschließend gegen AP1 (J; „100/3“) gefärbt. Maßstab 10 µm

5.2.2 AP2

Das Adaptorprotein AP2 ist wesentlich an der Clathrin-vermittelten Endozytose beteiligt und kolokalisiert mit Clathrin an der Zellmembran (Abb. 14 C & F). In der immuncytochemischen Untersuchung von AP2 (Abb. 14 B & E) war keine Kolokalisation mit Clathrin an der mitotischen Spindel erkennbar (Abb. 14 A & D). Auch die Mikroinjektion von fluorochromiertem AP2 führte nicht zu einer Kolokalisation von AP2 mit der Spindel. Ein ähnliches Bild bot sich für die Verteilung von AP3, das ebenfalls nicht an der Spindel zu finden ist.

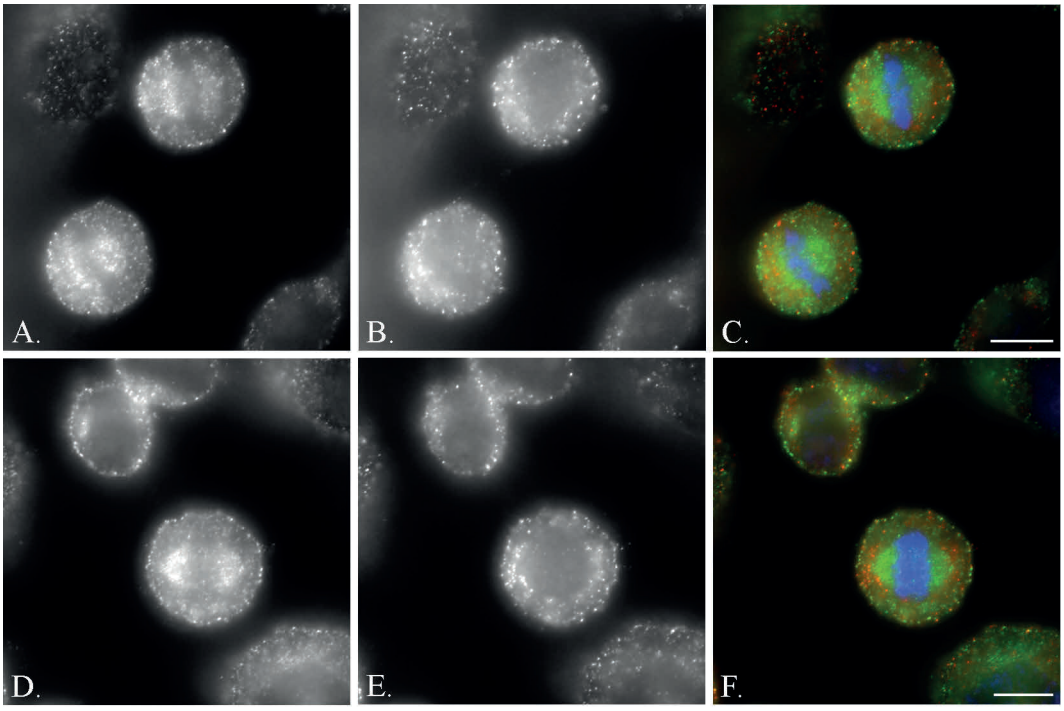


Abb. 14: Verteilung von AP2 in der Mitose.

Synchronisierte HeLa Zellen in der Metaphase, die immuncytochemisch gegen Clathrin (A & D; „R461“) und AP2 (B & E; „100/2“) markiert wurden. C & F stellen die Überlagerung der beiden Fluoreszenzkanäle dar. Maßstab 10 µm.

5.2.3 Dynamin

Dynamin spielt eine wichtige Rolle bei der Abschnürung der endozytotischen Vesikel sowie in der Cytokinese, in der es am Aufbau des kontraktilen Rings beteiligt ist [Thompson et al. 2002; Konopka et al. 2006]. Zur Untersuchung seiner Funktion während der Mitose wurden synchronisierte HeLa SS6 immuncytochemisch untersucht.

Die Markierung der Zellen mit Antikörpern gegen Dynamin und Clathrin zeigt eine Kolokalisation der beiden Proteine an der Spindel (Abb. 15 C & F). In der Metaphase ist Clathrin (Abb. 15 A & D) mit dem polyklonalen Antikörper „R461“ sehr gut an der Spindel nachzuweisen. Dynamin wurde mit dem monoklonalen Antikörper „Hudy-1“ markiert (Abb. 15 B & E), der nahezu vollständig mit Clathrin an der Spindel kolokalisiert.

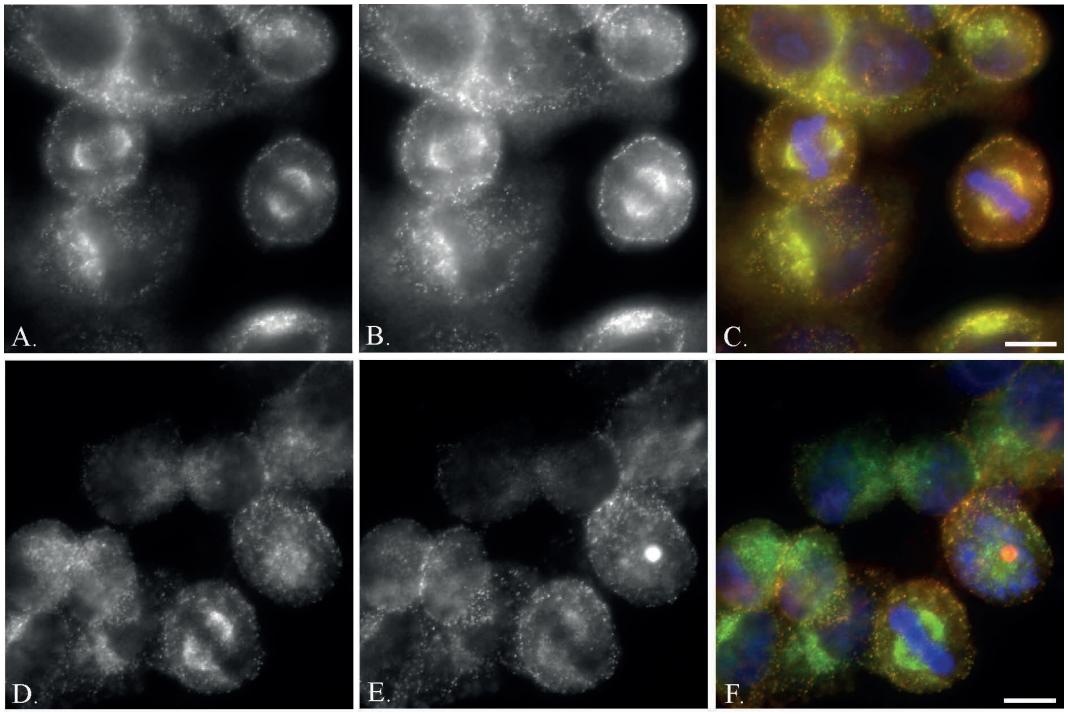


Abb. 15: Verteilung von Dynamin in der Mitose.

Immuncytochemische Markierung synchronisierter HeLa SS6 Zellen gegen Clathrin (A, D; „R461“) und Dynamin (B, E; monoklonaler AK „Hudy-1“). C & F stellen die stellen die Überlagerung der beiden Fluoreszenzkanäle dar. Maßstab 10 µm.

Die gängige Praxis ist den monoklonalen Antikörper „Hudy-1“ für den Nachweis von Dynamin in nicht neuronalen Zellen zu benutzten. Ursprünglich wurde der Antikörper gegen die neuronale Isoform von Dynamin hergestellt, eine Kreuzreaktion mit Dynamin2 ist jedoch nicht bekannt. Aufgereinigtes Dynamin2 konnte mit „Hudy-1“ biochemisch im Dot-Blot nicht nachgewiesen werden. Ein Nachweis von Dynamin2 mittels „Hudy-1“ muss also in Frage gestellt werden (vgl. 5.3.4).

Daher wurde die Lokalisation von Dynamin in der Mitose mit dem RFP-Dynamin Fusionsprotein überprüft. Zu diesem Zweck wurden HeLa SS6 Zellen verwendet, die stabil die GFP-Clathrin leichte Kette B (GFP-LCB) exprimierten. Die leichten Ketten von Clathrin binden in der Zelle immer an die schweren Ketten. Dadurch kann das exprimierte GFP-LCB Fusionsprotein zur Identifikation von Clathrin benutzt werden.

HeLa Zellen, die das GFP-LCB stabil exprimierten wurden mit dem RFP-Dynamin Fusionsprotein transient transfiziert und synchronisiert.

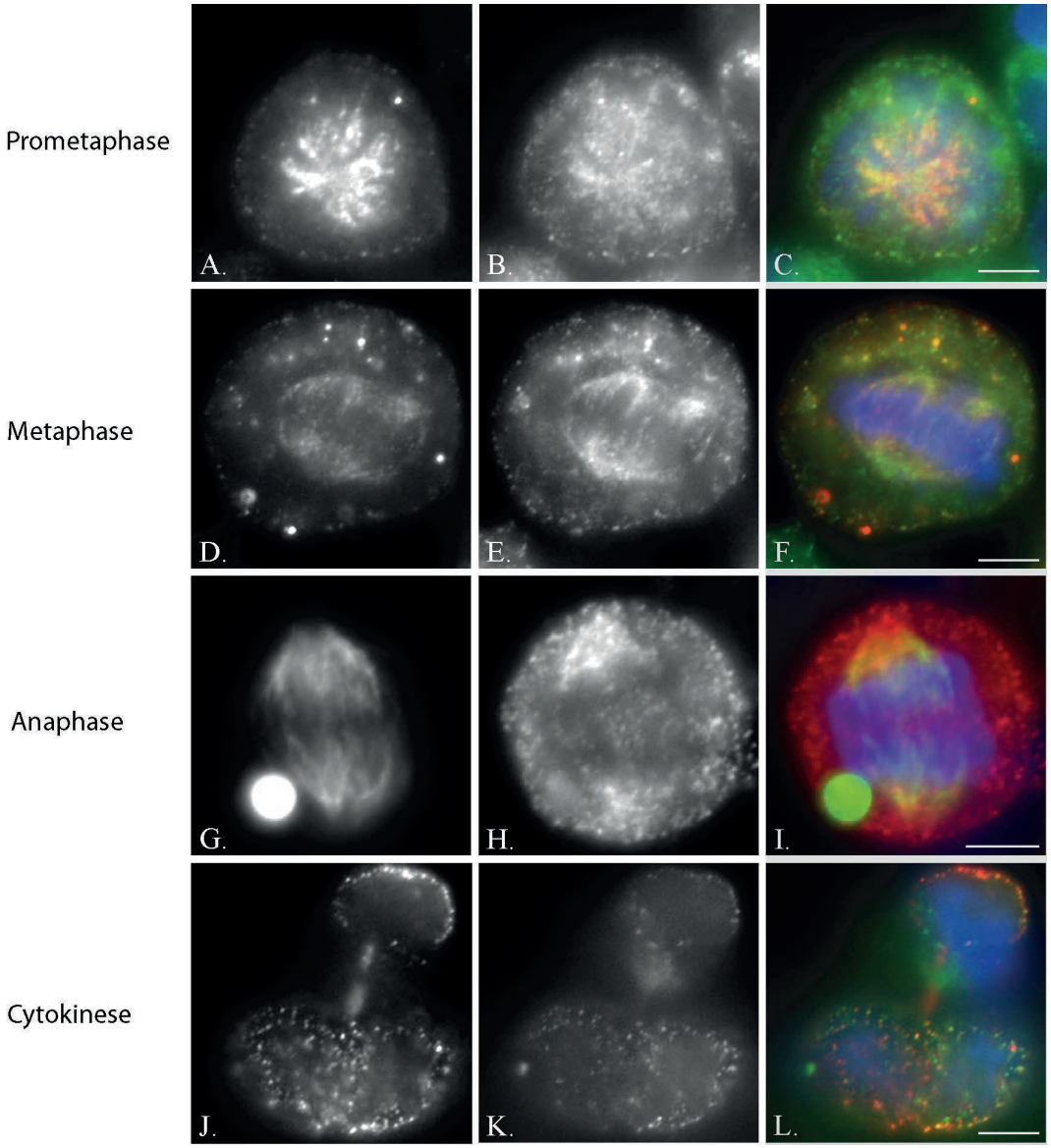


Abb. 16: Dynamin an der mitotischen Spindel.

GFP-LCB exprimierende HeLa Zellen (B; E & K) wurden transient transfiziert mit RFP-Dynamin (A; D; J). GFP-Dynamin (G) in HeLa SS6 Zellen, die immuncytochemisch gegen Clathrin gefärbt wurden (H; „R461"). Überlagerung der beiden Fluoreszenzkanäle (C; F; I; L). Maßstab 5 µm.

Abbildung 16 zeigt eine deutliche Lokalisation des RFP-Dynamin Signals an der Spindel in unterschiedlichen Stadien der Mitose. In allen Stadien ist eine sehr gute Kolokalisation mit dem GFP-LCB zu beobachten (Abb. 16 C & F). Darüber hinaus ist eine Konzentration des RFP-Dynamin in Punkten außerhalb der Spindel erkennbar, in welchen ebenfalls Clathrin in geringem Maße vorhanden ist. Die Punkte stellen vermutlich Aggregate dar, zu deren Bildung GFP/RFP-Fusionsproteine bei Überexpression neigen (Abb. 16 D & G). Allerdings hat die Gegenwart solcher Aggregate keine Auswirkungen auf die Lokalisation von Dynamin an der Spindel.

Auch in der Anaphase ist Dynamin an der Spindel erkennbar (Abb. 16 G), wo es mit Clathrin kolokalisiert. Darüber hinaus ist Dynamin in höherer Konzentration an Interpolaren-Mikrotubuli der zentralen Spindel assoziiert, an denen Clathrin im Vergleich zu Dynamin nur gering vertreten ist (Abb. 16 H). Die Kolokalisation von Dynamin und Clathrin wird in der Cytokinese mit dem Abbau der Spindel beendet. Dynamin beteiligt sich an der Durchschnürung der Zelle [Thompson et al. 2002], Clathrin hingegen erfüllt in der Cytokinese seine nächste Rolle in der Zellteilung, wo es in Clathrin-vermittelten Transportvorgängen zum Aufbau der neuen Zellmembran beiträgt [Boucrot & Kirchhausen 2007].

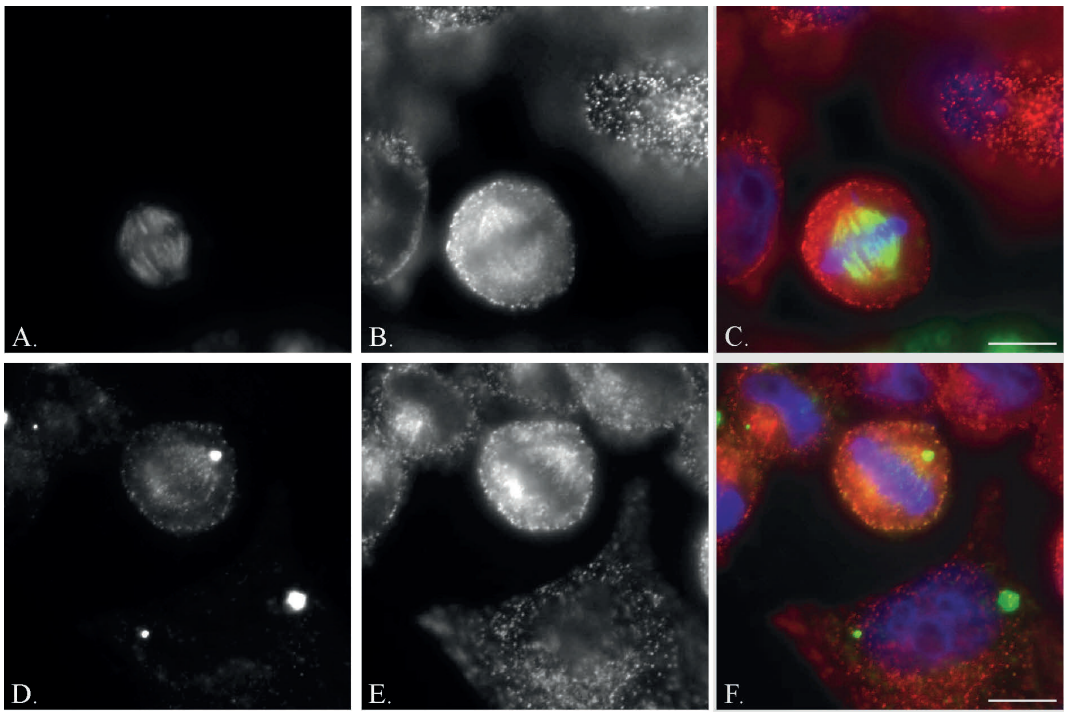


Abb. 17: GFP-Dynamin und GFP-Dynamin^{K44A} in der Mitose.

HeLa SS6 Zellen wurden transient transient mit GFP-Dynamin Wildtyp (A) und GFP-Dynamin ^{K44A} (D) transfiziert, synchronisiert und gegen Clathrin (B & E; „R461“) gefärbt. Maßstab 10 µm

Ferner wurde überprüft, ob die GTPase-inaktive Dynaminmutante Dynamin^{K44A}, durch deren Überexpression die Endozytose gehemmt wird [Damke et al. 1994] an der Spindel nachweisbar ist. Zu diesem Zweck wurden sowohl GFP-Dynamin Wildtyp, als auch die Mutante GFP-Dynamin^{K44A} in HeLa SS6 transient transfiziert und die Zellen wurden,wie beschrieben, synchronisiert und immuncytochemisch gegen Clathrin gefärbt.

Sowohl der Wildtyp, als auch die Mutante Dynamin^{K44A} sind mit der Spindel assoziiert (Abb. 17). Die Überexpression von GFP-Dynamin führt zu einer intensiven Färbung an der Spindel, die nicht mehr punktiert sondern tubulär erscheint (Abb. 17 A). Das punktierte

Signal der Mutante Dynamin^{K44A} ähnelt dem des Wildtyps und neigt bei Überexpression ebenso zur Bildung von Aggregaten (Abb. 17 D). Beide Fusionsproteine kolokalisieren mit der Clathrin an der Spindel.

Die Daten bestätigen die Anwesenheit von Dynamin an der Spindel. Sowohl mit dem monoklonalen Antikörper „Hudy-1“, als auch mit den RFP-Dynamin Fusionsproteinen konnte eine eindeutige Assoziation von Dynamin an der mitotischen Spindel nachgewiesen werden.

5.2.4 GAK/ Auxilin2

Ein weiteres Clathrin-assoziiertes Protein, das an der mitotischen Spindel lokalisiert wurde, ist die Cyclin G-assoziierte Kinase (GAK). In Clathrin-vermittelten Transportprozessen spielt GAK, als Kofaktor von Hsc70, eine entscheidende Rolle bei der Dissoziation von Clathrin von den Clathrin-bedeckten Vesikeln.

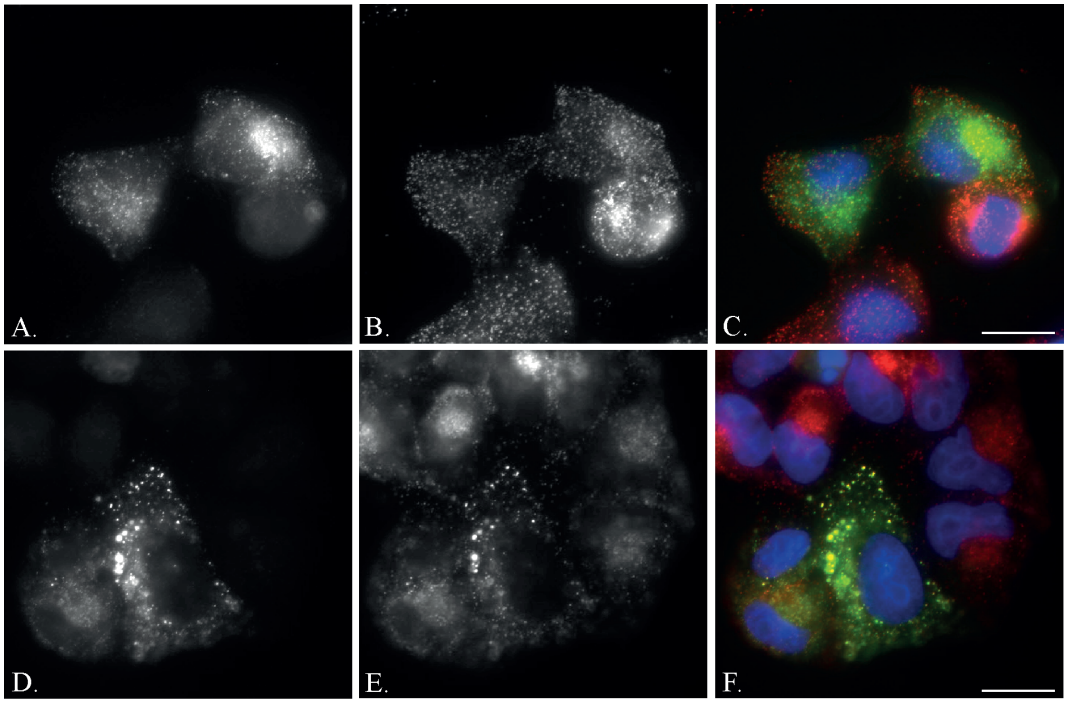


Abb. 18: GFP-GAK und Clathrin in der Interphase.

HeLa SS6 Zellen in der Interphase, die transient mit GFP-GAK (A & D) transfiziert und gegen die Clathrin schwere Kette (B & E; monoklonaler AK „X22“) gefärbt wurden. Überlagerung der beiden Fluoreszenzkanäle (C & F). Maßstab 10 µm.

Zur Untersuchung von GAK in der Mitose wurde ein GFP-GAK Fusionsprotein in HeLa SS6 transient transfiziert und in mitotischen Zellen und Interphasezellen verglichen. In der Interphase ist eine fein punktierte Verteilung von GAK in der Zelle zu beobachten.

Die Färbung überlagert sich teilweise mit der von Clathrin (Abb. 18 C & F). Bei Überexpression neigt GFP-GAK zur Bildung von Aggregaten, in welchen auch Clathrin nachgewiesen werden kann (Abb. 18 E).

In der Mitose ist GFP-GAK sehr gut an der Spindel zu erkennen (Abb. 19 A & D). Neben seiner feinen Punktierung an der Spindel konnte eine GFP-GAK Färbung im Zytosol nachgewiesen werden. An der Plasmamembran tritt eine sehr intensive Clathrinfärbung auf (Abb. 19 B & E), wohingegen in diesem Bereich nur ein sehr geringes Signal von GFP-GAK belegt ist (Abb. 19 C & F). Im Vergleich zu den relativ großen distinkten Clathrinpunkten scheint die GAK-Färbung sowohl in der Interphase, als auch in der Mitose viel feiner punktiert zu sein.

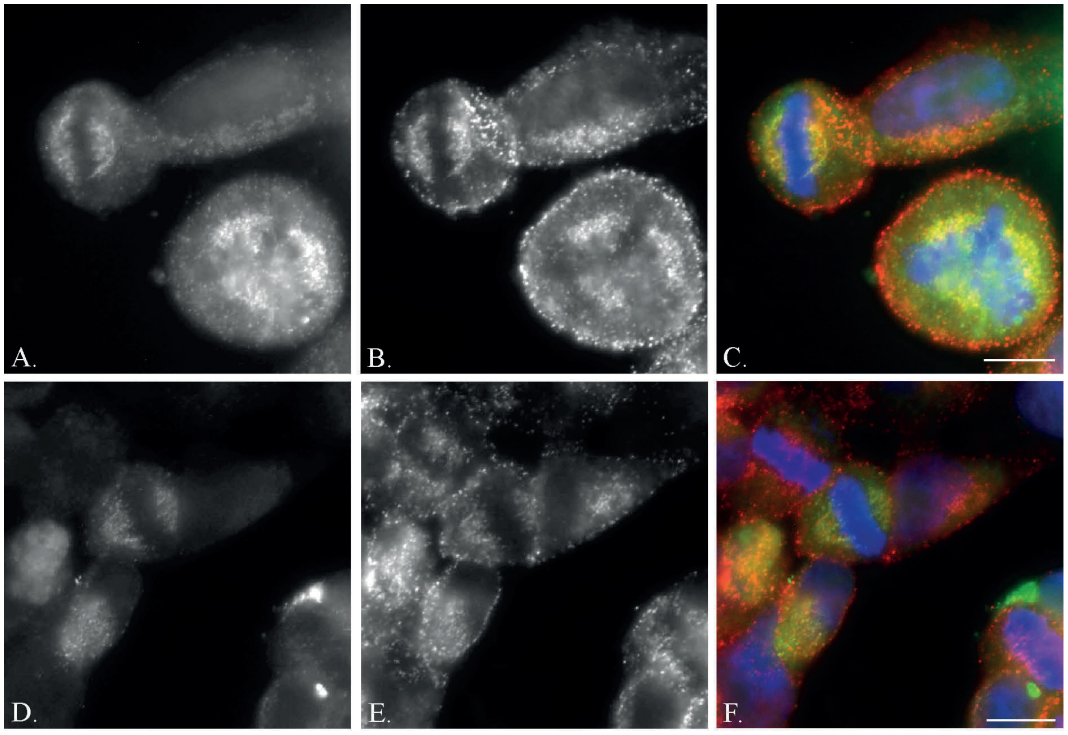


Abb. 19: GFP-GAK und Clathrin in der Mitose.

Synchronisierte HeLa SS6 Zellen, die zuvor transient mit GFP-GAK (A & D) transfiziert und gegen Clathrin (B & E; „X22“) gefärbt wurden. Überlagerung der beiden Fluoreszenzkanäle (C & F). Maßstab 10 µm.

Zusätzlich zur Untersuchung der Expression des GFP-GAK Fusionsproteins in Mitose wurde die Lokalisation von GAK mit Hilfe von Antikörpern nachgewiesen. Dazu wurden zwei polyklonale Antikörper, die gegen ein GAK-Peptid gerichtet waren, und ein monoklonaler Antikörper gegen die Clathrin schwere Kette in synchronisierten Zellen analysiert. Beide GAK-Antikörper weisen ein deutliches Signal an der Spindel auf, an der sie mit Clathrin kolokalisieren. Der verwendete, gegen GAK gerichtete polyklonale Antikörper „ELN“ (Abb. 20 A) färbt neben der Spindel auch die Centrosomen an. Auch der polyklo-

nale GAK-Antikörper „S“ weist ein sehr starkes Signal an den Centrosomen auf (Abb. 20 D). Seine zytosolische Färbung fällt jedoch weniger intensiv aus als die des ersten Antikörpers (Abb. 20).

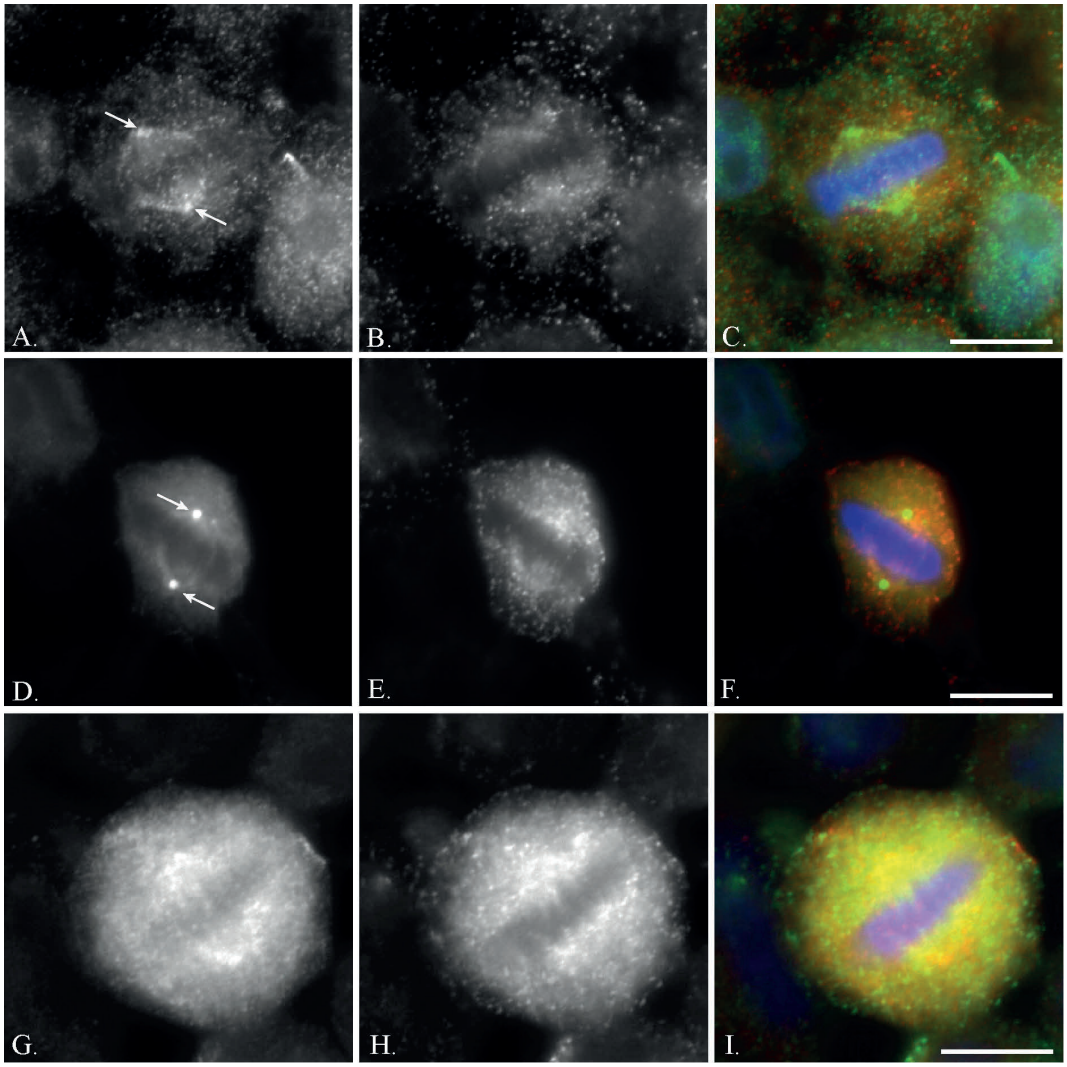


Abb. 20: Untersuchung von GAK mit verschiedenen Antikörpern in der Metaphase.

HeLa SS6 Zellen in der Metaphase, die mit unterschiedlichen Antikörpern gegen GAK (A; polyklonaler AK „ELN“, D; polyklonaler AK „S“) und Clathrin (B & E, „X22“) gefärbt wurden. Zu Beachten ist das GAK-Signal an den Centrosomen (Pfeile). Zuvor transfiziertes Myc-GAK-Fusionsprotein wurde indirekt mit einem Antikörper gegen Myc nachgewiesen (G; „E910“) und gegen Clathrin markiert (H; „R461“). Maßstab 10 µm.

Die polyklonalen GAK-Antikörper markieren im Western-Blot neben GAK weitere Banden. So erkennt der Antikörper „S“ im Western-Blot ebenfalls die neuronale Isoform von GAK, Auxilin1. Um auszuschließen, dass die Antikörper ein anderes Protein als GAK an der Spindel identifizieren, wurden HeLa SS6 Zellen mit einem Myc-GAK Fusionsprotein transient transfiziert und am folgenden Tag immuncytochemisch mit einem Antikörper gegen Myc untersucht. In Myc-GAK transfizierten Zellen konnte eine eindeutige Identifikation der

Spindel mit dem Myc-Antikörper belegt werden (Abb. 20 G). Zur Gegenfärbung wurde die Markierung der Clathrin leichten Kette gewählt (Abb. 20 H). Auch ein Myc-GAK Signal an den Centrosomen konnte beobachtet werden (hier nicht gezeigt).

Aufgrund der auffälligen Lokalisation von GAK an mitotischen Centrosomen wurde auch die Verteilung von GAK an Centrosomen der Interphase überprüft. Hierzu wurden fixierte HeLa SS6 Zellen immuncytochemisch gegen GAK und γ-Tubulin gefärbt (Abb. 21 B & E). Mit einem polyklonalen GAK-Antikörper „S“ ergibt sich durchaus eine Kolokalisation mit dem Centrosomen, sowohl in Interphasezellen, als auch in der Mitose. Das transient transfizierte GFP-GAK Fusionsprotein war jedoch aufgrund seiner starken zytosolischen Färbung schwer an Centrosomen zu erkennen.

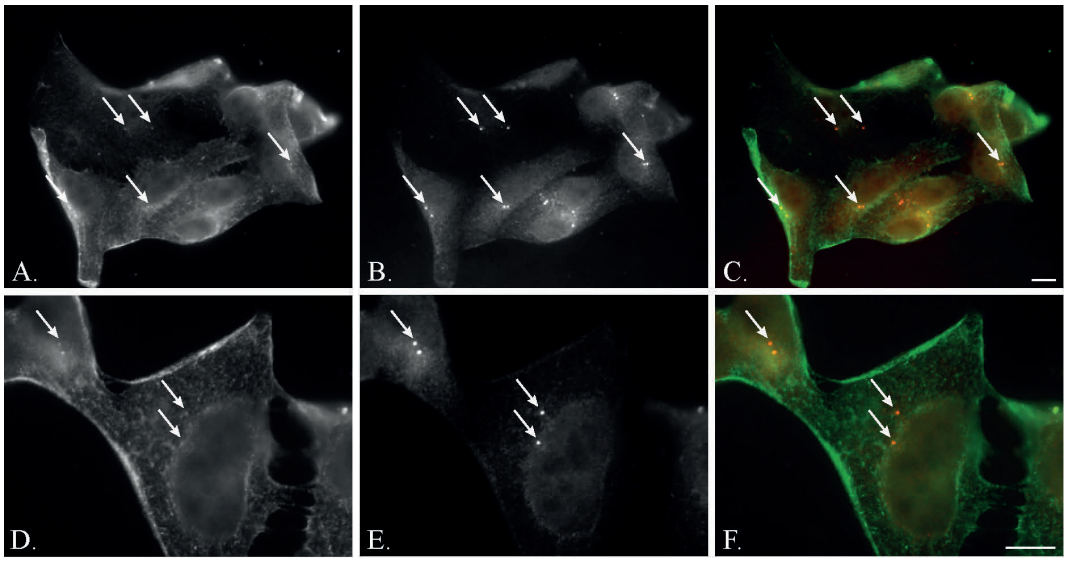


Abb. 21: GAK an den Centrosomen der Interphase.

HeLa SS6 Zellen wurden immuncytochemisch gegen GAK (A & D; polyklonaler AK „S“) und γ-Tubulin (B & E; monoklonaler AK „GTU-88“) markiert. Pfeile weisen auf die Centrosomen. Überlagerung der beiden Fluoreszenzkanäle (C & F). Maßstab 10 µm.

Während der Entstehung dieser Arbeit erschien eine Publikation, die sich mit der Rolle von GAK in der Mitose beschäftigte [Shimizu et al. 2009]. Daher und aufgrund eigener Ergebnisse, die GAK eine besondere Rolle in der Mitose zuschreiben, wurde GAK genauer untersucht. Unter Verwendung unterschiedlicher GFP-GAK Fusionsproteine wurde die Bindungsdomäne von GAK an die Spindel eingegrenzt. Diese Untersuchungen werden im weiteren Verlauf der Arbeit in einem eigenem Abschnitt behandelt (Kapitel 5.4).

5.2.5 Auxilin1

Auxilin1 ist die neuronale Isoform des ubiquitär exprimierten GAK. Beide Proteine wirken als Kofaktoren von Hsc70 bei der Dissoziation von Clathrin von Clathrin-bedeckten Vesikeln. In HeLa SS6 Zellen konnte die äquimolare Koexpression von Auxilin1 und GAK nachgewiesen werden [Hirst et al. 2008]. Zudem verhalten sich beide Proteine in Clathrin-abhängigen Transportprozessen redundant, so dass nur die Kodepletion von Auxilin1 und GAK mittels RNAi zum Arrest der Clathrin-vermittelten Endozytose in HeLa Zellen führt [Hirst et al. 2008]. Die eindeutige Lokalisation von GAK an der Spindel in HeLa Zellen führte zu der Frage, ob Auxilin1 ebenfalls mit dem Spindelapparat assoziiert ist. In synchronisierten HeLa SS6 wurde die intrazelluläre Lokalisation von Auxilin1 mit dem transient transfizierten Flag-Auxilin1 Fusionsprotein geklärt. Die immuncytochemische Färbung mit einem monoklonalen Flag-Antikörper zeigte eine intensive Färbung der Spindel in Flag-Auxilin1 transfizierten Zellen (Abb. 22 A & C). Die Daten zeigen, dass auch die neuronale Isoform von GAK, die in HeLa Zellen exprimiert wird, in der Mitose an die Spindel rekrutiert wird.

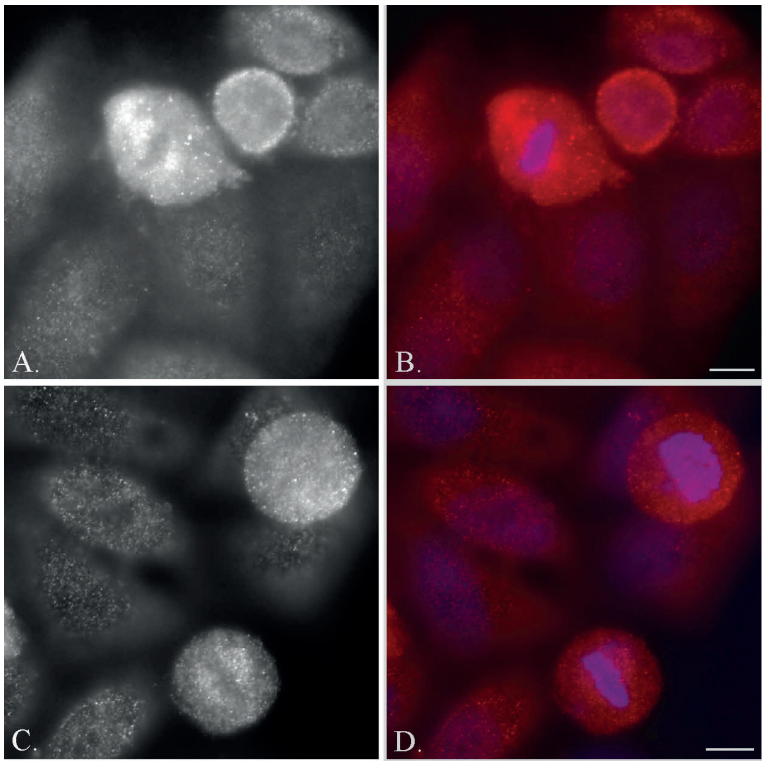


Abb. 22: Auxilin1 an der mitotischen Spindel.

HeLa SS6 Zellen wurden mit Flag-Auxilin1 transient transfiziert und immuncytochemisch gegen Flag (A & C; „M2“) gefärbt. Überlagerung mit dem Fluoreszenzkanal (B & D), der die DNA markiert („Hoechst“). Maßstab 10 µm.

5.2.6 Weitere Proteine

Darüber hinaus wurden weitere Proteine, die in Clathrin-vermittelten Transportprozessen eine Rolle spielen, auf ihre Lokalisation in der Mitose getestet. Eine Zusammenfassung der untersuchten Proteine findet sich in Tabelle 1.

Protein	**Assoziation mit der Spindel**	
AP1	ja	Adaptorprotein
AP2	nein	Adaptorprotein
AP3	nein	Adaptorprotein
Amphiphysin	nein	Membrankrümmung
Auxilin1	ja	Dissoziation von Clathrin-bedeckten Vesikeln
Auxilin2 (GAK)	ja	Dissoziation von Clathrin-bedeckten Vesikeln
Bin 1	nein	Membrankrümmung
Clint/EpsinR	nein	Membrankrümmung
Dynamin	ja	Vesikelabschnürung
Epsin	nein	Membrankrümmung
Eps 15	nein	Transport vom EGFR
GGA1	nein	Golgi-Protein
GGA2	nein	Golgi-Protein
Giantin	nein	Golgi-Protein
GM130	nein	Golgi-Protein
Hsc70	nein, aber an Centrosomen	Dissoziation von Clathrin-bedeckten Vesikeln
M6PR	nein	Golgi-Protein
OCRL	nein	Golgi-Protein
VCP	nein	ER-Protein

Tabelle 1. Zusammenfassung der Interaktion mit der Spindel
Die unterschiedlichen Proteine, die an Clathrin-vermittelten Transportvorgängen eine Funktion übernehmen, wurden immuncytochemisch auf ihre Lokalisation in der Mitose überprüft.

5.2.7 Zusammenfassung

In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass neben Clathrin weitere Proteine, die in Clathrin-vermittelten Transportvorgängen eine Rolle spielen, mit der mitotischen Spindel assoziiert sind. Immuncytochemische Untersuchungen führten zur Identifizierung von vier solcher Proteine, deren Lokalisation bisher nicht an der Spindel beschrieben wurde.

Das Adaptorprotein AP1 ist an den Clathrin-abhängigen Transportprozessen zwischen dem *trans*-Golgi-Netzwerk und den Endosomen beteiligt. In mitotischen Zellen ist eine deutliche Lokalisation von AP1 an der Spindel erkennbar. AP1 kolokalisiert mit Clathrin an der Spindel in allen Stadien der Mitose, obgleich sein Signal in der Metaphase am deutlichsten erscheint. Erst in der Cytokinese, in der die Spindel abgebaut ist, ist keine Assoziation von AP1 mit den Mikrotubuli belegt. AP1 stellt das einzige Adaptorprotein dar, das mit der Spindel interagiert. Weder AP2 noch AP3 wurden an den Mikrotubuli lokalisiert.

Ein weiteres an die Spindel bindendes Protein ist das multifunktionale Dynamin, das bei der Abschnürung von Clathrin-bedeckten Vesikeln von der Plasmamembran die entscheidende Rolle übernimmt. Seine Rolle in der Cytokinese konnte ebenfalls belegt werden, allerdings wurde seine Assoziation mit der Spindel bisher nicht beobachtet. Dynamin wurde, wie Clathrin, in allen Stadien der Mitose an der Spindel nachgewiesen. Die Dynamin Mutante ^{K44A}, deren Überexpression in Interphasezellen die Clathrin-vermittelte Endozytose hemmt, konnte ebenfalls an der Spindel lokalisiert werden.

Schließlich konnte im Rahmen dieser Arbeit der Nachweis von Auxilin1 und GAK an der Spindel erbracht werden. Auxilin1 und GAK übernehmen die Funktion eines Kofaktors für Hsc70 bei der Dissoziation von Clathrin von Clathrin-bedeckten Vesikeln. Die beiden in HeLa Zellen exprimierten Isoformen assoziieren mit der Spindel.

Darüber hinaus konnte für weitere Proteine, die in Clathrin-vermittelte Transportprozesse involviert sind, die Bindung mit der Spindel ausgeschlossen werden. So sind verschiedene Golgi-Proteine und Proteine, die die Krümmung der Membran bei der Endozytose vermitteln, nicht am Aufbau der Spindel beteiligt. Diese Daten unterstützen die Annahme aus dem ersten Ergebnisteil, dass Clathrin nicht in Form von Vesikeln mit der mitotischen Spindel assoziiert ist.

5.3 Auswirkungen der Depletion von Clathrin auf die Assoziation von AP 1, Dynamin, Auxilin1 und GAK mit der Spindel

Neben Clathrin befinden sich mehrere Proteine der Clathrin-vermittelten Transportprozesse an der mitotischen Spindel. Die Herunterregulation einzelner Proteinexpressionen mittels RNAi Untersuchungen sollte zur Klärung der Beziehungen der Proteine zueinander beitragen. Zunächst wurde die Expression der Clathrin schweren Kette in HeLa SS6 herunterreguliert. Im nächsten Schritt wurden die Auswirkungen der Abwesenheit von Clathrin auf die an der Spindel identifizierten Proteine untersucht.

5.3.1 Depletion der Clathrin schweren Kette

Die Depletion von Clathrin erfolgte entweder durch Transfektion mit dem pSuper-Vektor, der die Clathrin-spezifische siRNA exprimierte, und Lipofectamine 2000 oder durch Transfektion von zwei siRNA Oligomeren gegen die Clathrin schwere Kette und dem HiPerFect Transfektionsreagenz (Qiagen) [Hinrichsen et al. 2003].

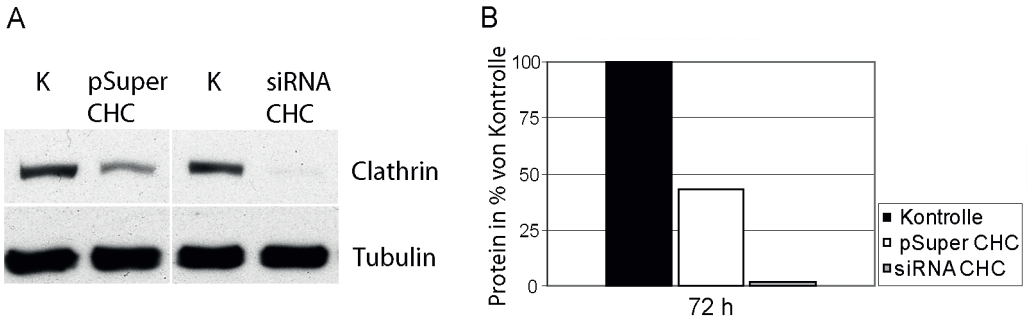


Abb. 23: Vergleich zwei unterschiedlicher Methoden der Depletion von Clathrin.

A. Die Expression von Clathrin wurde in HeLa SS6 Zellen mit dem pSuper-Vektor, der Clathrin spezifische siRNA exprimierte (pSuper CHC) und mit Clathrin siRNA Oligomeren (siRNA CHC) herunterreguliert und nach 72 h mit dem Antikörper gegen Clathrin „TD.1“ untersucht. Der Nachweis von Tubulin („DM1A“) diente als Ladungskontrolle. B. Vergleich der Effizienz der Clathrin Depletion mittels Densitometrie. K: Kontrolle; CHC: Clathrin schwere Kette.

Die maximale Depletion von Clathrin wurde 72 h nach Transfektion erreicht. Um die Zellen in der Mitose beobachten zu können, musste das Optimum der Clathrin Depletion mit der Synchronisation der Zellen zusammenfallen.

Daher wurden die Zellen so synchronisiert, dass sie zum Zeitpunkt der maximalen Depletion, 72 h nach Transfektion, in der Metaphase arretiert waren. Abbildung 23 zeigt den direkten Vergleich der Effizienz beider Methoden der Clathrin Depletion. Es wird deutlich, dass die RNAi Untersuchung zu einer größeren Depletion führt als die Verwendung der pSuper-Vektors. Die Herunterregulation der Proteinexpression mit dem pSuper-Vektor erreichte eine Effizienz von ca. 60 %, die mit den siRNA Oligomeren bis zu 98 % (Abb. 23 B). Aus diesem Grunde wurde die Transfektion mit den siRNA Oligomeren vorwiegend für biochemische Analysen gewählt, wohingegen für immuncytochemische Untersuchungen die erste Methode bevorzugt wurde.

Bei Verwendung der siRNA Oligomere für Immunfluoreszenz-Untersuchungen erfolgte eine zusätzliche Anreicherung mit Kontrollzellen, die 48 h nach Transfektion zu den Clathrin-depletierten Zellen hinzugefügt wurden. Dadurch konnten Kontroll- und depletierte Zellen nebeneinander dokumentiert werden.

In weiteren Versuchen wird bei Depletion von Clathrin von der Transfektion von „si-Clathrin“ gesprochen unabhängig davon, mit welcher Methode die Expression des Proteins herunterreguliert wurde. Die Herunterregulation der Expression von Clathrin führte zu einer verminderten Aufnahme von Transferrin, das über die Clathrin-vermittelte Endozytose internalisiert wird (Abb. 24). Die Untersuchung der Transferrinaufnahme ließ somit einen Rückschluss auf die Effizienz der Depletion von Clathrin zu (Abb. 24 A-C). In Interphasezellen konnte so der Arrest der Clathrin-vermittelten Endozytose gut identifiziert werden und zwischen Kontroll- und Clathrin-depletierten Zellen eindeutig unterschieden werden (Abb. 24). Die Zellen mit einem positiven Transferrinsignal weisen Clathrin auf, während Clathrin-depletierte Zellen kein Transferrin aufnehmen (Abb. 24 B).

Im Gegensatz dazu konnte die Aufnahme von Transferrin nicht zur Identifikation von Clathrin-depletierten Zellen in Mitose benutzt werden. Beim Eintritt der Zellen in die Mitose wird die Clathrin-vermittelte Endozytose herunterreguliert [Warren 1993], so dass nur wenig bis kein Transferrin in mitotische Zellen gelangt (Abb. 24 G). In der Kontrollzelle, in der Clathrin an der Spindel zu erkennen ist (Abb. 24 E), ist das Transferrinsignal an der Membran gut lokalisiert (Abb. 24 D). Die beiden mitotischen Zellen in der Abbildung 24 G nehmen kein Transferrin auf. Allerdings ist in beiden Zellen ein Clathrinsignal an der Spindel zu erkennen (Abb. 24 H). Obwohl dieses eindeutig schwächer erscheint als das in Kontrollzellen und die Zellen eine reduzierte Expression von Clathrin aufweisen, erscheint der Clathrin *Knockdown* nicht vollständig. Aus diesem Grund ist die Transferrinaufnahme nicht als Methode geeignet, um den Clathrin *Knockdown* in mitotischen Zellen eindeutig zu identifizieren.

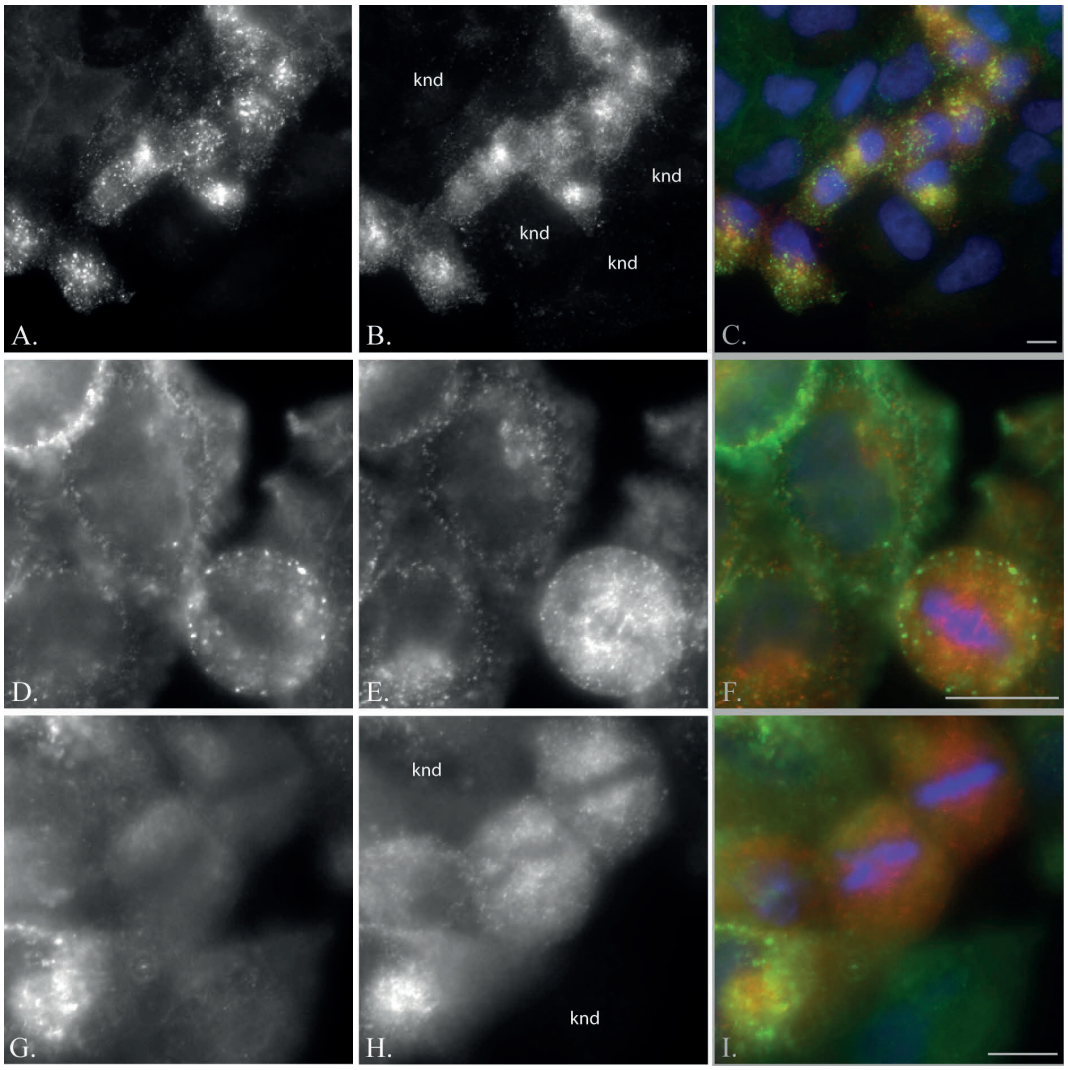


Abb. 24: Depletion von Clathrin mit anschließender Transferrin Internalisation.

In Interphasezellen kann mit Hilfe der Aufnahme von Transferrin (A) die Depletion von Clathrin (B; knd: *Knockdown*) identifiziert werden. In mitotischen Zellen wird nur wenig Transferrin aufgenommen (D & G), so dass die Abwesenheit von Transferrin nicht unbedingt auf einen Clathrin *Knockdown* schließen lässt (G & H). In D-F ist eine mitotische Kontrollzelle dargestellt. Transferrin (A, D, G); Clathrin (B, E, H, „X22“). Clathrin *Knockdown* (B & H, knd). Maßstab 10 µm.

Nachdem die Effizienz der Depletion von Clathrin im Western-Blot und durch die Internalisation von Transferrin in Interphasezellen bestätigt werden konnte, wurden die Auswirkungen der Clathrin Depletion auf die Mitose im Detail untersucht. Synchronisierte Clathrin-depletierte Zellen wurden immuncytochemisch gegen Clathrin und Tubulin gefärbt. Die Abwesenheit von Clathrin in Mitose führt zu einigen Veränderungen in der Morphologie der Spindel. Sowohl in Clathrin-depletierten Zellen als auch in Kontrollzellen bleibt der Spindelapparat vollständig erhalten (Abb. 25). Ihre Chromosomenplatten in der Metaphase ähneln einander.

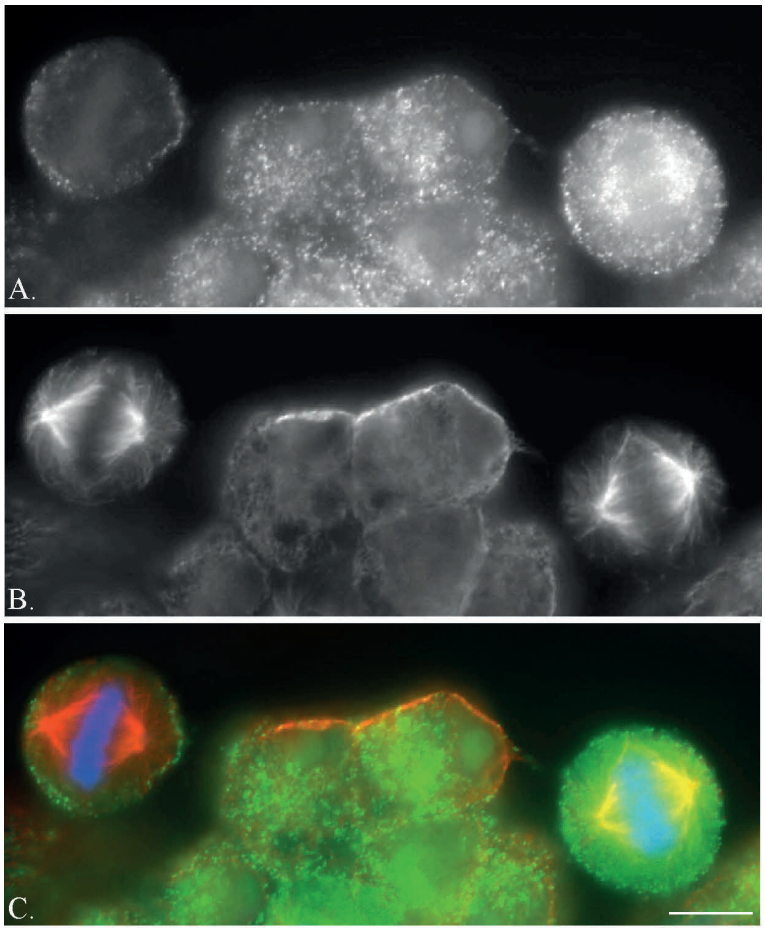


Abb. 25: Vergleich der mitotischen Spindel in Abhängigkeit von Clathrin.

HeLa SS6 Zellen wurden mit si-Clathrin transfiziert, synchronisiert und 72 h nach Transfektion immuncytochemisch gegen Clathrin (A; „R461“) und Tubulin (B; „DM1A“) gefärbt. In Abwesenheit von Clathrin zerfällt die Spindel nicht. Überlagerung der beiden Fluoreszenzkanäle (C). Maßstab 10 µm.

Die Chromosomenplatte der Kontrollzelle in Abbildung 25 C erscheint breiter als die in der Clathrin-depletierten Zelle, was allerdings durch den momentan stattfindenden Übergang in die Anaphase zurückzuführen ist.

Die Interpolaren-Mikrotubuli sind bereits gut zu erkennen (Abb. 25 B).

Auswirkungen der Depletion von Clathrin auf AP1 in der Mitose

Das Adaptorprotein AP1 ist am Aufbau von Clathrin-bedeckten Transportvesikeln am TGN und an Endosomen beteiligt und ein direkter Bindungspartner von Clathrin. In immuncytochemischen Untersuchungen konnte in dieser Arbeit die Lokalisation von AP1 an der mitotischen Spindel nachgewiesen werden, an der es in allen Stadien der Mitose mit Clathrin kolonialisiert (Abb. 13).

Die Herunterregulation der Expression von Clathrin führt zu Veränderungen in der Lokalisation von AP1 in der Zelle. Das in der Interphase in der perinucläeren Golgi-Region der Zelle verteilte AP1 erfährt bei der Herunterregulation der Expression von Clathrin eine Umverteilung (Abb. 26 A-C).

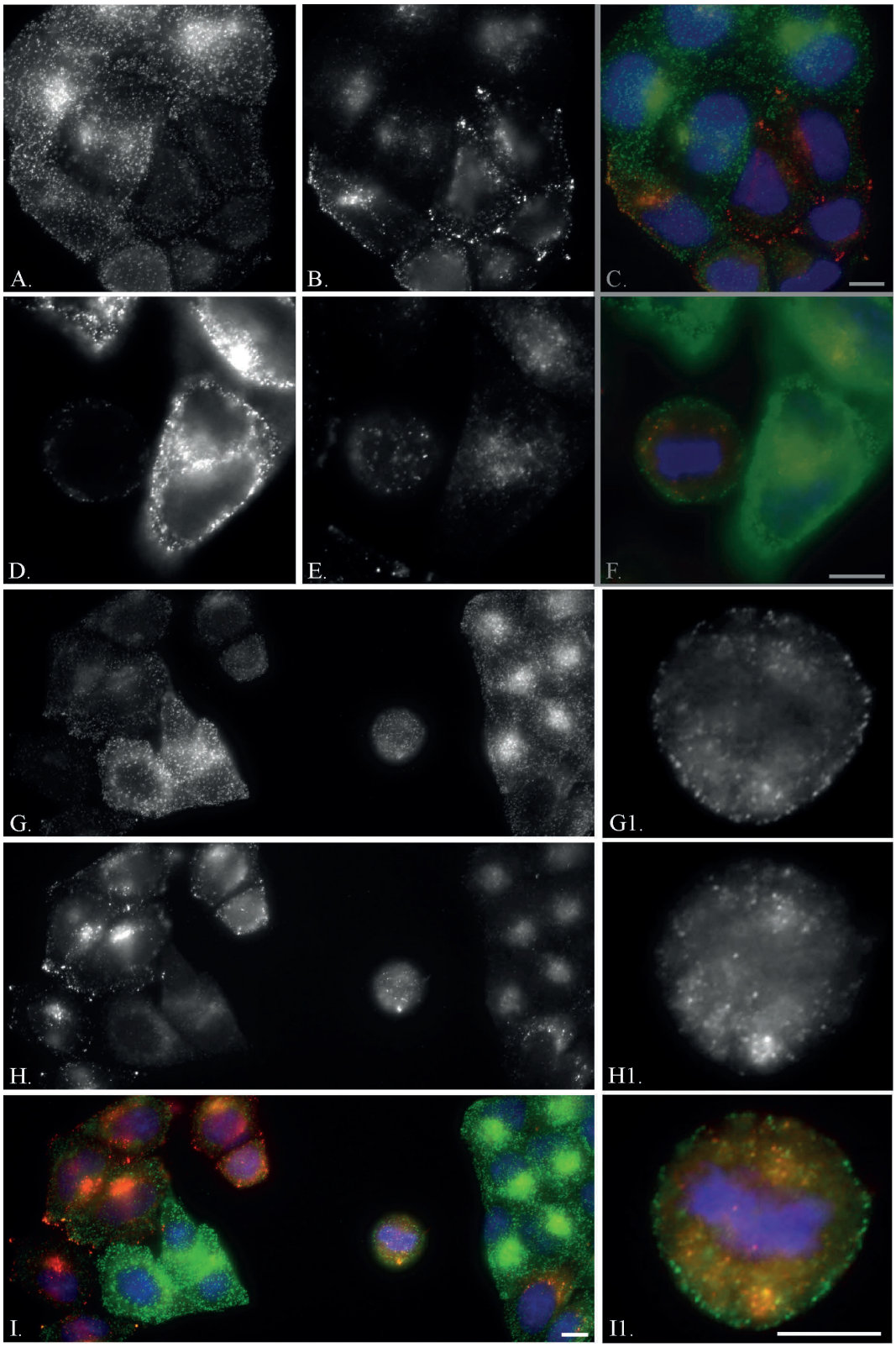


Abb. 26: AP1 in Clathrin-depletierten Zellen.

HeLa Zellen wurden mit si-Clathrin transfiziert und 72 h später immuncytochemisch gegen Clathrin (A, D, G G1; „R461“) und AP1 (B, E, H, H1; „100/3“) untersucht. Die Abwesenheit von Clathrin (A) führt in der Interphase (A-C) zu einer Umverteilung von endogenem AP1 (B). In der Mitose (D-F & G-I) ist im Clathrin *Knockdown* kein AP1 an der Spindel zu erkennen (H & H1). Überlagerung der beiden Fluoreszenzkanäle (C; F; I,I1).G1-H1 stellen die Vergrößerung der Mitose aus G-I dar. Maßstab 10 µm.

AP1 wird in Abwesenheit von Clathrin in der Nähe der Zellperipherie zu Aggregaten zusammengelagert.

In mitotischen Zellen, in denen Clathrin depletiert wurde (Abb. 26 D), ist ebenfalls kein AP1-Signal mehr an der Spindel erkennbar (Abb. 26 E). Das immuncytochemische Signal von AP1 ist im Zytosol der mitotischen Zellen lokalisiert (Abb. 26 E). Die mitotische Zelle in Abbildung 26 G weist kein Clathrin mehr an der Spindel auf, obgleich der *Knockdown* nicht vollständig ist. Die Vergrößerung in Abb. 26 G1 zeigt dieselbe Zelle in einer anderen Fokusebene, die mitten durch diese Zelle verläuft. In dieser Zelle ist weder eine Clathrin-, noch eine AP1-Färbung an der Spindel nachweisbar. Zusätzlich zur zytosolischen Verteilung von AP1 ist ein schwaches Signal ist in der Nähe der Zellpole zu erkennen (Abb. 26 H1). Diese Daten zeigen, dass AP1 in Abwesenheit von Clathrin nicht an der Spindel gebunden ist.

5.3.2 Auswirkungen der Depletion von AP1 auf Clathrin in der Mitose

Als Nächstes wurde die Lokalisation von Clathrin in mitotischen Zellen bei Abwesenheit von AP1 überprüft. Die Herunterregulation der Expression von AP1 wurde dazu mittels Transfektion des pSuperior-Vektors, der die siRNA von γ-Adaptin exprimierte durchgeführt. Im Folgenden wird dafür die Nomenklatur „si-AP1“ verwendet.

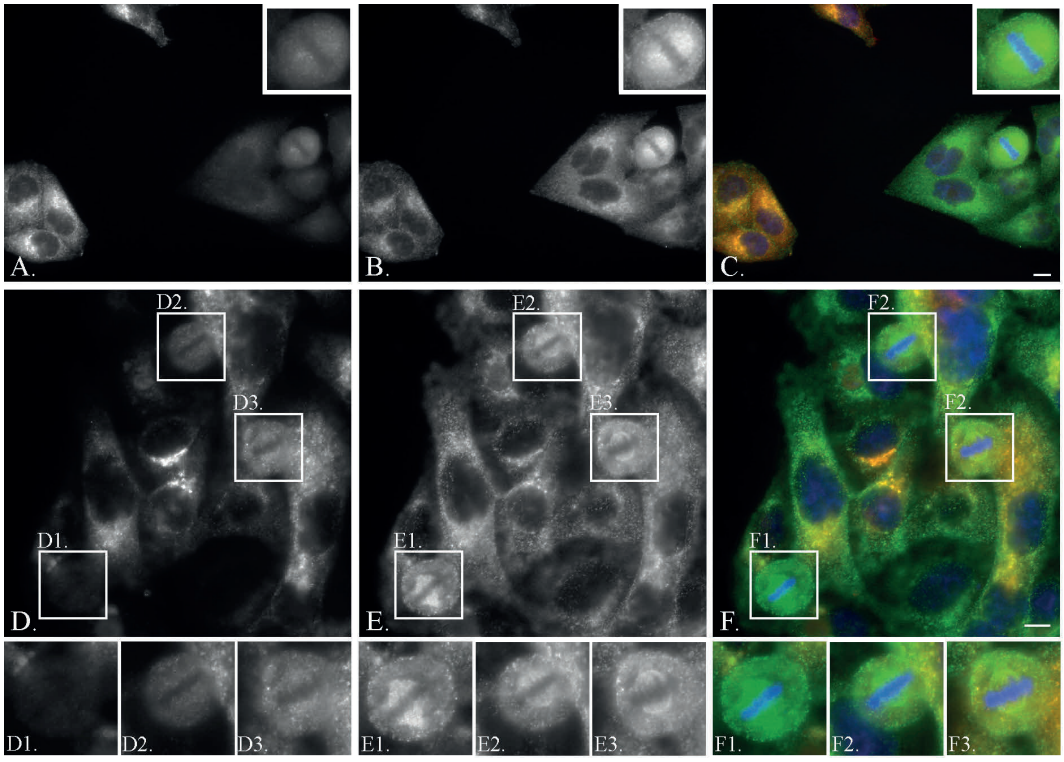


Abb. 27: Clathrin in AP1-depletierten mitotischen Zellen.

HeLa SS6 Zellen, die mit si-AP1 transfiziert und synchronisiert wurden. AP1 (A, D; monoklonaler AK „100/3“) und Clathrin (B, E; „R461“). Überlagerung der beiden Fluoreszenzkanäle (C & F). Maßstab 10 µm.

Die Depletion von AP1 führte zu einer Delokalisation von Clathrin in den perinucläeren Bereichen der Interphasezellen (Abb. 27B). In mitotischen Zellen hingegen konnte Clathrin weiterhin an der Spindel dokumentiert werden (Abb. 27 B & E1). Die Vergrößerung D1-D3 in Abbildung 27 zeigt unterschiedliche Expressionsraten von AP1 in den transfizierten mitotischen Zellen. In D1 ist eine Zelle dargestellt, deren AP1 Expression maximal reduziert ist, während die Zelle in D2 zum geringen Teil AP1 an der Spindel aufweist. Abbildung 27 D3 stellt eine Kontrollzelle mit einer gut erkennbaren Assoziation von AP1 mit der Spindel dar. Der Vergleich der immuncytochemischen Färbung von AP1 und Clathrin in diesen Zellen zeigt, dass Clathrin sowohl in Kontrollzellen, als auch in

AP1-depletierten Zellen an der Spindel vorhanden ist (Abb. 27 E1-E3). Die Stärke des Clathrinsignals unterliegt Schwankungen. Es zeigt sich jedoch, dass in AP1-depletierten Zellen die Intensität des Clathrinsignals an der Spindel zunimmt (Abb. 27 E1-E3).

5.3.3 Auswirkungen der Depletion von Clathrin auf Dynamin in der Mitose

Das multifunktionale Protein Dynamin ist in der Endozytose für die Abschnürung der Endozytosevesikel verantwortlich. In der vorliegenden Arbeit konnte die Assoziation von Dynamin mit der mitotischen Spindel sowohl mit GFP-Fusionsproteinen, als auch mit dem monoklonalen Antikörper „Hudy-1“ nachgewiesen werden. Aufgrund seiner Kolokalisation mit Clathrin an der Spindel wurde in RNAi Untersuchungen die Beziehung dieser beiden Proteine in der Mitose überprüft. Die Herunterregulation der Expression der Clathrin schweren Kette erfolgte mit dem pSuper-Vektor in HeLa SS6. Die Zellen wurden 72 h nach Transfektion auf die Lokalisation von Dynamin mit dem monoklonalen Antikörper „Hudy-1“ überprüft (Abb. 29 B, E, H). Die immuncytochemische Gegenfärbung fand mit dem polyklonalen Antikörper „R461“ gegen die Clathrin leichte Kette statt (Abb. 29 A, D, G). Die beiden Antikörper kolokalisieren sehr gut miteinander. In der Interphase nimmt bei Depletion von Clathrin die Intensität der Dynaminfärbung an Membranen ab. Eine parallele Untersuchung von Dynamin in Clathrin-depletierten Zellen im Western-Blot zeigt jedoch, dass die zelluläre Dynaminkonzentration in Abwesenheit von Clathrin konstant bleibt (Abb. 28).

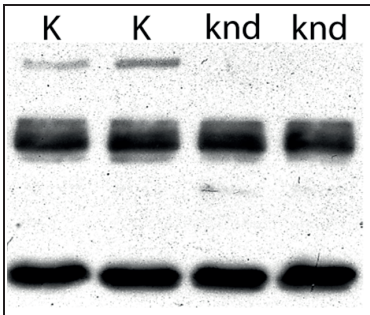


Abb. 28: Dynamin in Clathrin-depletierten Zellen.

HeLa SS6 wurden mit dem si-Clathrin transfiziert und nach 72 h untersucht. K: Kontrollzellen; knd: Clathrin *Knockdown*.

In Clathrin-depletierten Zellen (knd; „TD1“) bleibt die Konzentration von Dynamin konstant („Hudy-1“). Der Nachweis von Tubulin wurde als Ladungskontrolle verwendet („DM1A“).

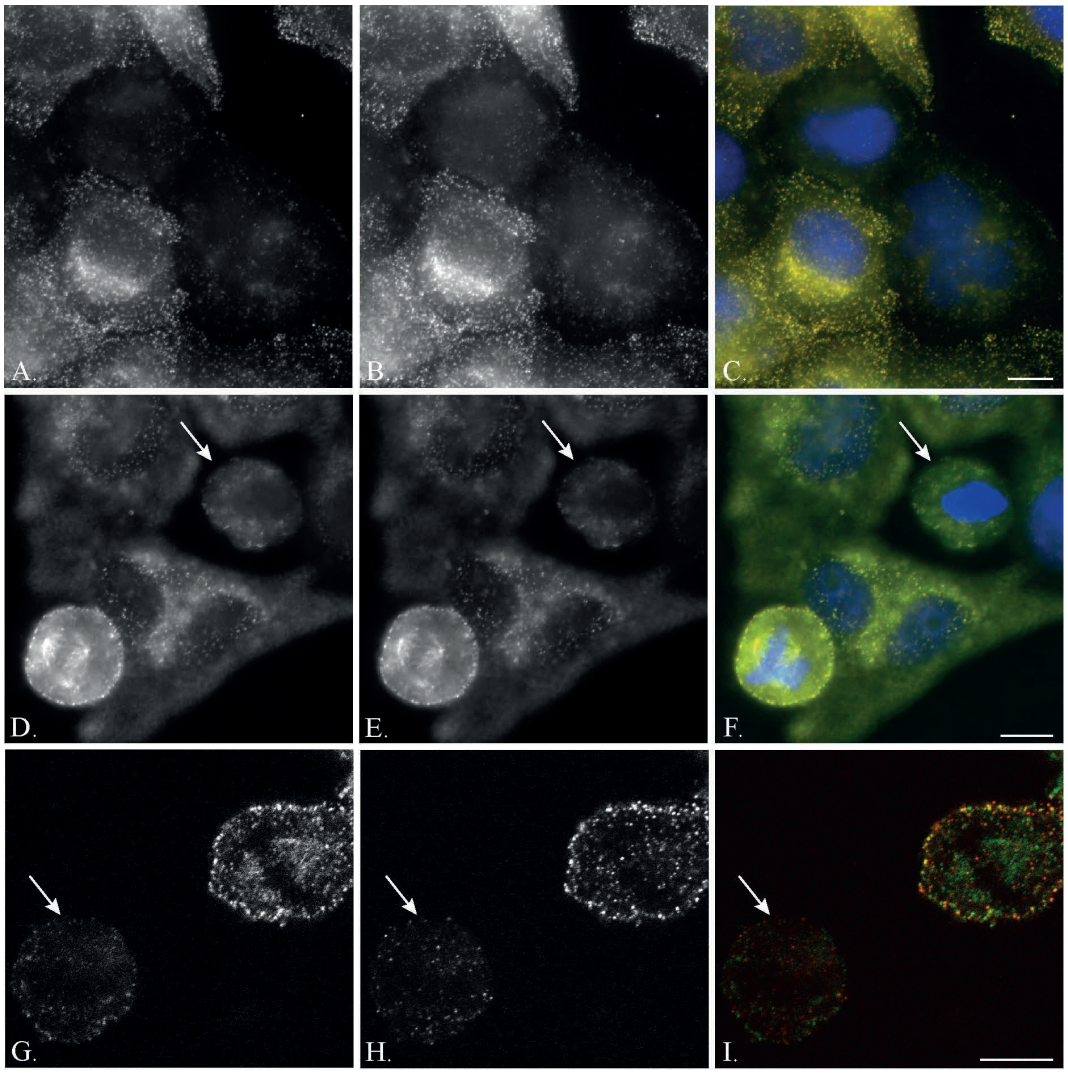


Abb. 29: Dynamin in Clathrin-depletierten Zellen.

HeLa SS6 Zellen wurden mit si-Clathrin transfiziert und immuncytochemisch gegen Clathrin (A, D, G; „R461“) und Dynamin (B, E, H; „Hudy-1“) untersucht. Interphase (A-C) und Mitose (D-I), wobei G-I konfokalmikroskopische Bilder darstellen. Die Pfeile markieren Clathrin-depletierte Zellen in der Metaphase. Maßstab 10 µm.

In mitotischen Zellen führt die Depletion der Clathrin schweren Kette zum Verlust des Dynaminsignals an der Spindel (Abb. 29 D & G, durch Pfeile markiert). Im Vergleich dazu sind beide Proteine in Kontrollzellen deutlich an der Spindel zu erkennen. Abbildung 29 H stellt eine einzelne Ebene eines konfokalen Schnittes dar. In der Kontrolle ist „Hudy-1“ schwächer an der Spindel zu erkennen, als Clathrin (Abb. 29 G). Die Abwesenheit von Clathrin an der Spindel resultiert jedoch eindeutig im Verlust der Assoziation von Dynamin mit der Spindel.

Zusätzlich wurde überprüft, wie sich das transfizierte RFP-Dynamin Fusionsprotein in einem Clathrin schwere Ketten *Knockdown* verhält. Zu diesem Zweck verwendete GFP-LCB exprimierende HeLa Zellen wurden mit si-Clathrin transfiziert, um die Expression von Clathrin herunterzuregulieren. Achtundvierzig Stunden nach Transfektion der Zellen erfolgte die Transfektion mit dem RFP-Dynamin Fusionsprotein und die Zellen wurden synchronisiert, um die Anzahl an mitotischen Zellen zu erhöhen. Als Kontrolle dienten GFP-LCB exprimierende HeLa Zellen, die mit RFP-Dynamin transfiziert wurden. In Abbildung 30 sind sowohl die Kontrollzellen (A-C), als auch Clathrin-depletierte Zellen (D-F), dargestellt. In Kontrollzellen kolokalisiert GFP-LCB (Abb. 30 A) gut mit RFP-Dynamin (Abb. 30 B) an der Spindel. Mitotische Zellen mit einer geringen Clathrinexpression (Abb. 30 D) weisen eine zytosolische Verteilung von RFP-Dynamin auf (Abb. 30 E). Eine Assoziation von RFP-Dynamin mit der Spindel ist nicht zu belegen.

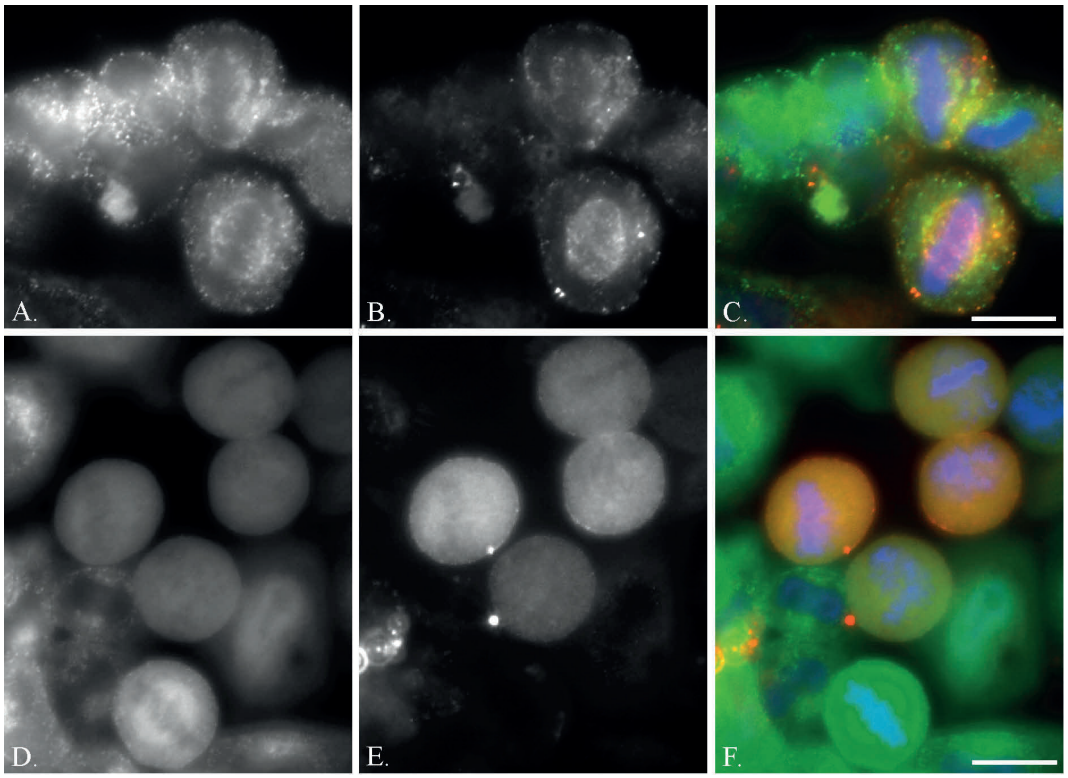


Abb. 30: RFP-Dynamin in Clathrin-depletierten Zellen

GFP-LCB exprimierende HeLa Zellen wurden mit si-Clathrin (D-F) transfiziert und mit Kontrollzellen (A-C) verglichen. Die Zellen wurden synchronisiert und 24 h vor dem Fixieren mit RFP-Dynamin transfiziert. GFP-LCB (A & D) und RFP-Dynamin (B & E). C & F stellen die Überlagerung der beiden Fluoreszenzkanäle dar. Maßstab 10 µm.

5.3.4 Auswirkungen der Depletion von Dynamin auf Clathrin in der Mitose

Die fehlende Assoziation von Dynamin an der Spindel in Clathrin-depletierten Zellen ließ vermuten, dass Dynamin über Clathrin an die Spindel rekrutiert wird. Um diese These zu überprüfen wurden die Auswirkungen einer Dynamin Depletion auf die Lokalisation von Clathrin in der Mitose untersucht. Zur Herunterregulation der Dynaminexpression in HeLa SS6 Zellen führte die doppelte Transfektion von siRNA Oligomeren (si-Dynamin), die die Expression von Dynamin2 reduzierten. Die maximale Herunterregulation der Expression von Dynamin wurde nach 72 h erreicht. Aufgrund der guten Effizienz des *Knockdowns*, wurden für immuncytochemische Untersuchungen 48 h nach Transfektion von si-Dynamin Kontrollzellen zu den depletierten Zellen gemischt. Abbildung 31 repräsentiert die Depletion von Dynamin im Western-Blot. Der Nachweis von Dynamin erfolgte mit den monoklonalen Antikörpern „H-300“ und „Hudy-1“.

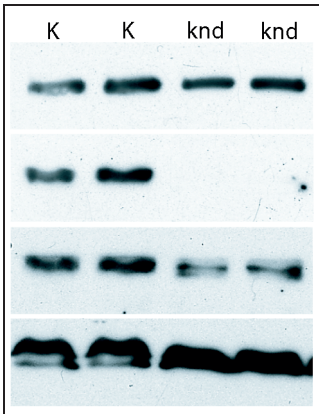


Abb. 31: Die Herunterregulation der Expression von Dynamin2.

HeLa Zellen wurden mit si-Dynamin transfiziert und 72 h später untersucht. K: Kontrolle; knd: Dynamin *Knockdown*. Der Blot wurde gegen Clathrin („TD.1“) und Dynamin mit zwei Antikörpern „H-300“ und „Hudy-1“ untersucht. Tubulin diente als Ladungskontrolle.

Die anschließende Untersuchung der Dynamin-depletierten Zellen in der Immunfluoreszenz legte jedoch ein Problem offen. Weder der monoklonale Dynamin-Antikörper „H-300“, noch der in dieser Arbeit bisher benutzte Antikörper „Hudy-1“ eigneten sich zur Identifizierung des Dynamin *Knockdowns* in der Immunfluoreszenz. Mit beiden Antikörpern konnte kein Unterschied zwischen Kontroll- und Dynamin-depletierten Zellen in der Interphase nachgewiesen werden (Abb. 32 B & E). Eine erfolgreiche Depletion von Dynamin wurde hingegen eindeutig mittels der Internalisation von Transferrin nachgewiesen (Abb. 32 A & D), zumal die Abwesenheit von Dynamin zum Arrest der Clathrin-vermittelten Endozytose führt.

Laut Herstellerdatenblatt erkennt der monoklonale Antikörper „H-300“ alle drei Dynamin-Isoformen, während der „Hudy-1“ Antikörper nur gegen das neuronale Dynamin1 gerichtet ist. In der Literatur wird der „Hudy-1“ Antikörper allerdings verbreitet zur Identifizierung von Dynamin in nicht neuronalen Zelllinien verwendet. Die immunocytochemische Untersuchung mit dem „Hudy-1“ Antikörper konnte das Vorhandensein von Dynamin an der Spindel belegen (vgl. Abb. 15). Gleichzeitig aber ist der Dynamin2

Knockdown nicht mit dem „Hudy-1“ Antikörper in der Immunfluoreszenz zu identifizieren (Abb. 32 B). Auch im Western-Blot erkennt der Antikörper „Hudy-1“ den Dynamin Knockdown nicht vollständig.

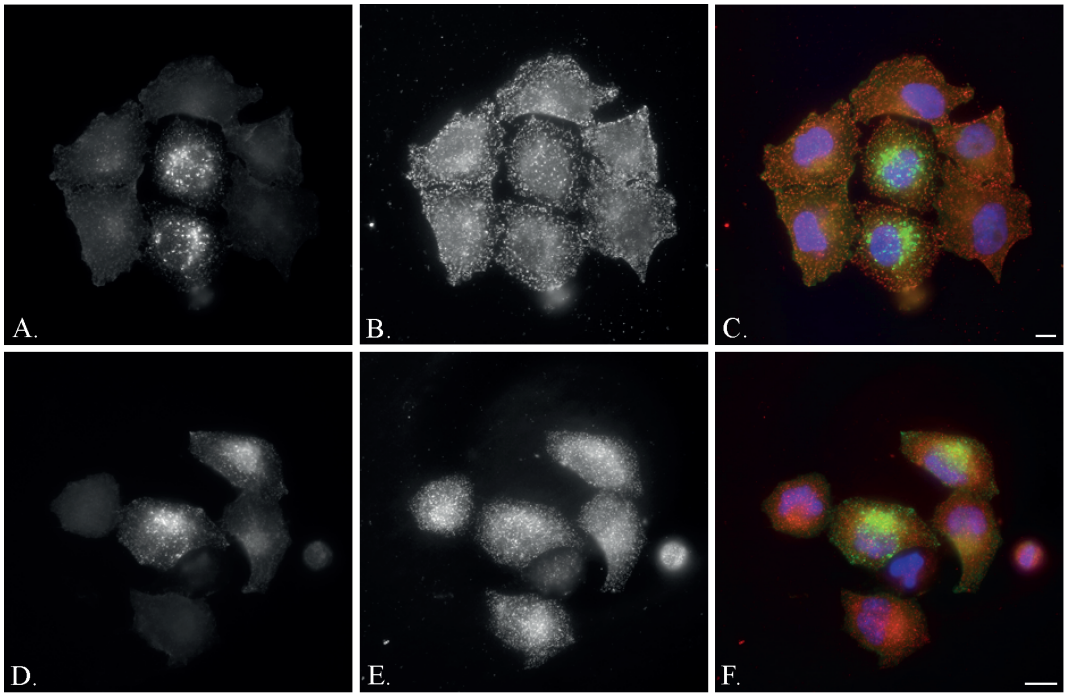


Abb. 32: Nachweis der Depletion von Dynamin mit verschiedenen Antikörpern.

Vergleich der beiden verwendeten Dynamin Antikörper in der Immunfluoreszenz. Die Effizient der Expression von Dynamin wurde durch die Aufnahme von Transferrin dargestellt (A, D). Die Antikörper gegen Dynamin (B; „Hudy-1“) und (E; „H-300“) erkennen in der Immunfluoreszenz keinen Dynamin2 *Knockdown*. Maßstab 10 µm.

Die Daten legen die Möglichkeit nahe, dass eventuell weitere Dynamin-Isoformen in HeLa Zellen exprimiert werden. Möglicherweise wird das neuronale Dynamin1, das von „Hudy-1“ erkannt wird, in dieser Zelllinie exprimiert.

Der zweite verwendete Dynamin-Antikörper war der monoklonale „H-300“ Antikörper. Während im Western-Blot ein eindeutiger Nachweis des Dynamin2 *Knockdowns* möglich war, erkannte „H-300“ keinen *Knockdown* in der Immunfluoreszenz. Ebenfalls konnte mit dem „H-300“ Antikörper keine eindeutige Lokalisation von Dynamin an der Spindel nachgewiesen werden (Abb. 33 D). Zusätzlich wurde in transfizierten Zellen nur eine partielle Kolokalisation mit GFP-Dynamin2 belegt (Abb. 33 E).

Aufgrund dieses Problems wurde im Folgenden versucht eine Methode zu finden, um den Dynamin2 *Knockdown* ohne die Verwendung von Antikörpern in der Immunfluoreszenz eindeutig identifizieren zu können.

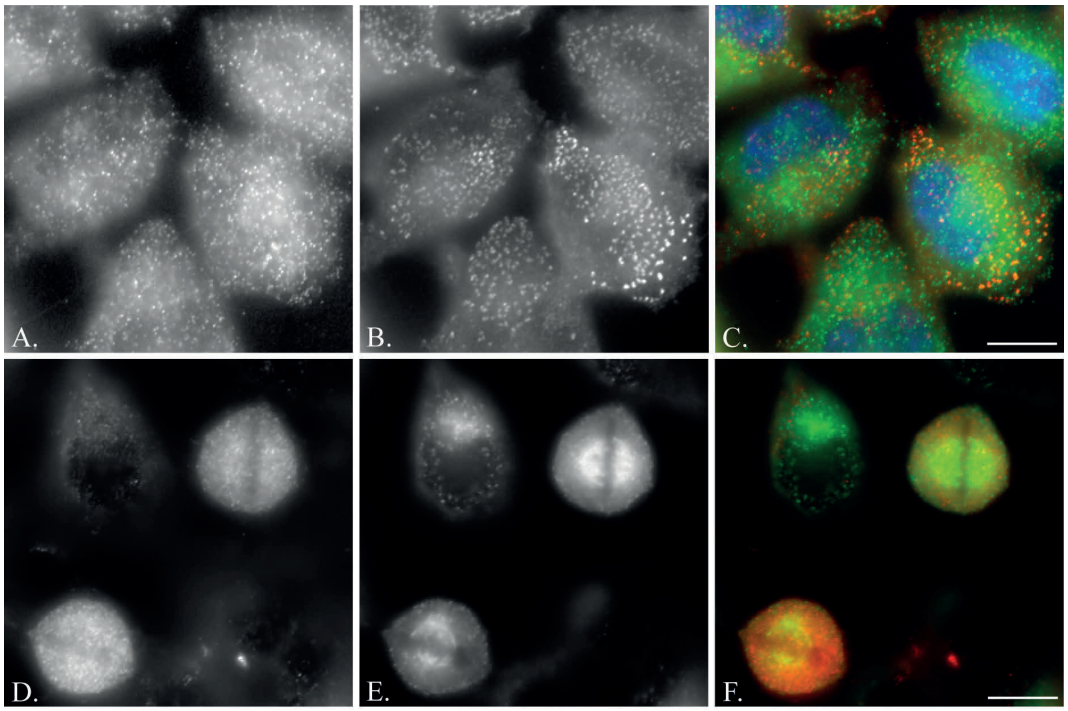


Abb. 33: Lokalisation von Dynamin mit dem monoklonalen Antikörper „H-300“.

HeLa SS6 Zellen wurden mit RFP-Dynamin2 (B & E) transient transfiziert und mit dem monoklonalen Antikörper „H-300“ (A & D) gefärbt. In mitotischen Zellen ist mit dem Antikörper „H-300“ kein eindeutiges Signal an der Spindel zu erkennen. C & F stellen die Überlagerung der beiden Fluoreszenzkanäle dar. Maßstab 10 µm.

Die Lösung gelang schließlich durch die Kotransfektion von si-Dynamin zusammen mit der fluorochromierten siRNA „siGLO“ (Abb. 34). Der Nachweis des Dynamin *Knockdowns* erfolgte durch die Aufnahme von Transferrin. In Zellen, in denen kein Transferrin internalisiert wurde, war die Expression von Dynamin herunterreguliert. In diesen Zellen konnte gleichsam „siGLO“ nachgewiesen werden (Abb. 34). Durch diese Korrelation wurde fortan die Kotransfektion der fluorochromierten siRNA „siGLO“ und der siRNA Oligomere zur Depletion der Proteinexpression verwendet.

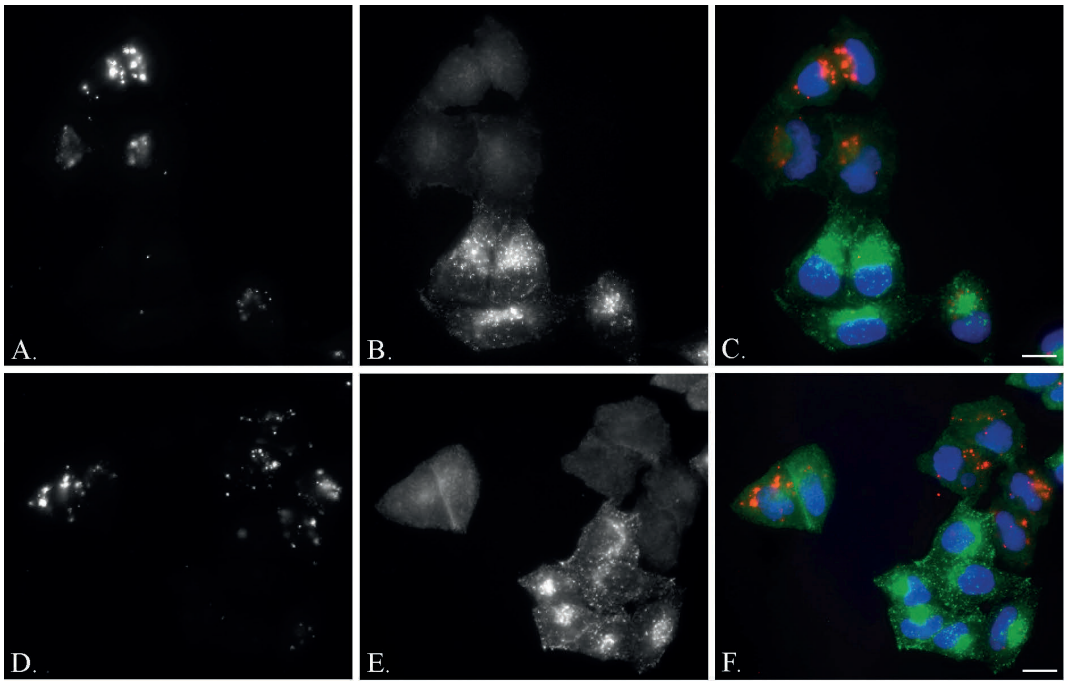


Abb. 34: Effizienz der Herunterregulation der Expression von Dynamin.

Zusammen mit der siRNA gegen Dynamin wurde die fluoreszierende siRNA „siGLO“ kotransfiziert. Der Dynamin *Knockdown* wurde 72 h nach Transfektion mit Hilfe der Aufnahme von Transferrin überprüft. „siGLO“ (A & D) markiert die transfizierten Zellen, deren Dynamin-Expression herunterreguliert ist. Diese Zellen nehmen kein Transferrin auf (B & E). Maßstab 10 µm.

Im nächsten Schritt wurden die Auswirkungen der Abwesenheit von Dynamin auf Clathrin in mitotischen Zellen überprüft. In GFP-LCB stabil exprimierenden HeLa Zellen wurde mittels RNAi die Expression von Dynamin herunterreguliert. Aufgrund der starken Bindung der Clathrin leichten Ketten an die schweren Ketten war es möglich, das GFP-LCB Fusionsprotein zur Identifikation von Clathrin zu verwenden.

Die Depletion von Dynamin wurde durch eine Kotransfektion von si-Dynamin und „siGLO“ erreicht. Die Zellen wurden synchronisiert so, dass der Zeitpunkt ihrer Arretierung in der Metaphase mit dem Optimum der minimalen Dynaminexpression zusammenfiel.

Die Untersuchung „siGLO“-positiver Zellen ergab, dass diese immer noch Clathrin an der Spindel gebunden hatten (Abb. 35). Clathrin bleibt im Dynamin *Knockdown* mit der Spindel assoziiert. Das Signal erscheint etwas schwächer als in der Kontrolle, jedoch könnte das auf die individuelle Expression von Clathrin zurückzuführen sein. Die Daten zeigen, dass Clathrin unabhängig von Dynamin mit der mitotischen Spindel interagiert. Im Gegensatz dazu benötigt Dynamin die Anwesenheit von Clathrin an der Spindel, um an diese zu binden.

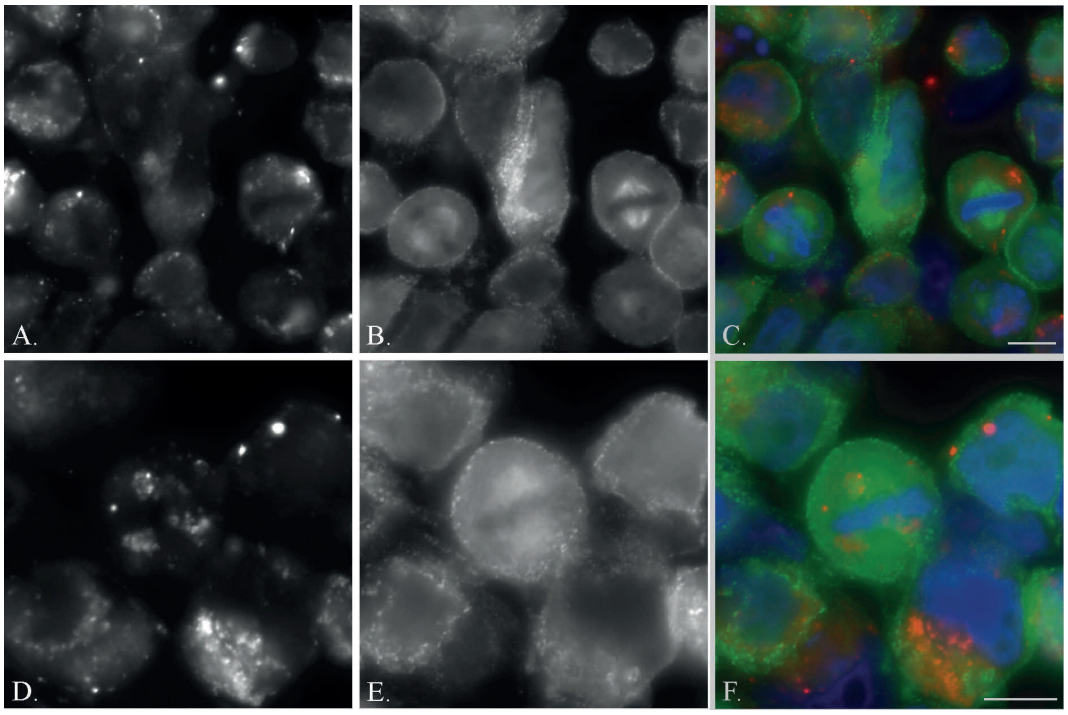


Abb. 35: Clathrin in Dynamin-depletierten Zellen.

GFP-LCB exprimierende HeLa Zellen (B & E) wurden mit si-Dynamin transfiziert und synchronisiert. Zwecks Identifizierung der mit Dynamin2 siRNA transfizierten Zellen wurde die fluorochromierte siRNA „siGLO“ kotransfiziert (A & D). In mitotischen Zellen, die „siGLO“ enthalten (A, D) ist Clathrin an der Spindel vorhanden (B, E). Maßstab 10 µm.

5.3.5 Auswirkungen der Depletion von Clathrin auf GAK in der Mitose

Die Cyclin G-assoziierte Kinase (GAK) stellt ein weiteres Clathrin-bindendes Protein dar, das an der mitotischen Spindel lokalisiert werden konnte.

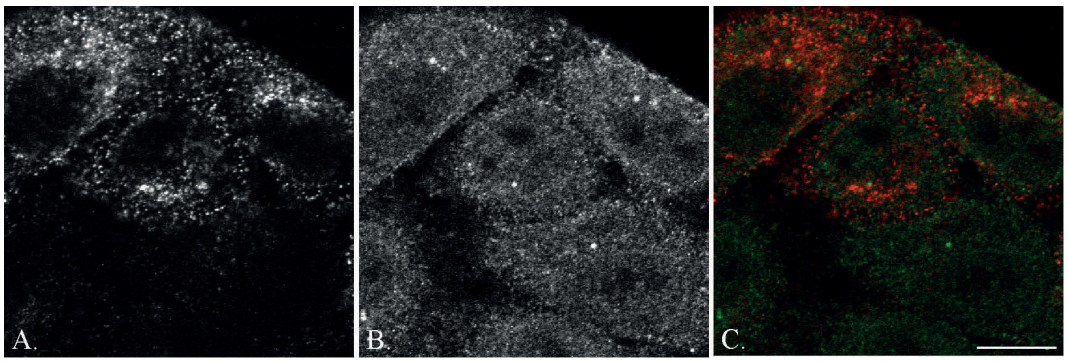


Abb. 36: GAK in Clathrin-depletierten Zellen der Interphase.

Die Expression von Clathrin wurde mit si-Clathrin herunterreguliert. In Interphasezellen, die kein Clathrin exprimieren (A; „R461“) zeigt der gegen GAK gerichtete Antikörper „S“ keine Veränderung gegenüber den Kontrollzellen. Maßstab 10 µm.

Im Folgenden wurden die Auswirkungen der Herunterregulation der Expression von Clathrin auf GAK in mitotischen Zellen untersucht.

Die immuncytochemische Untersuchung des Clathrin *Knockdowns* im Hinblick auf die Lokalisation von GAK erfolgte 72 h nach Transfektion von si-Clathrin.

In Interphasezellen ergeben sich zunächst keine Unterschiede in der Verteilung von GAK bei Abwesenheit von Clathrin (Abb. 36 B). Der polyklonale GAK-Antikörper „S“ lässt eine punktierte Verteilung von GAK in der Zelle erkennen. Auffällig ist aber die Färbung an den Centrosomen, die bei Depletion der Clathrin schweren Kette bestehen bleibt.

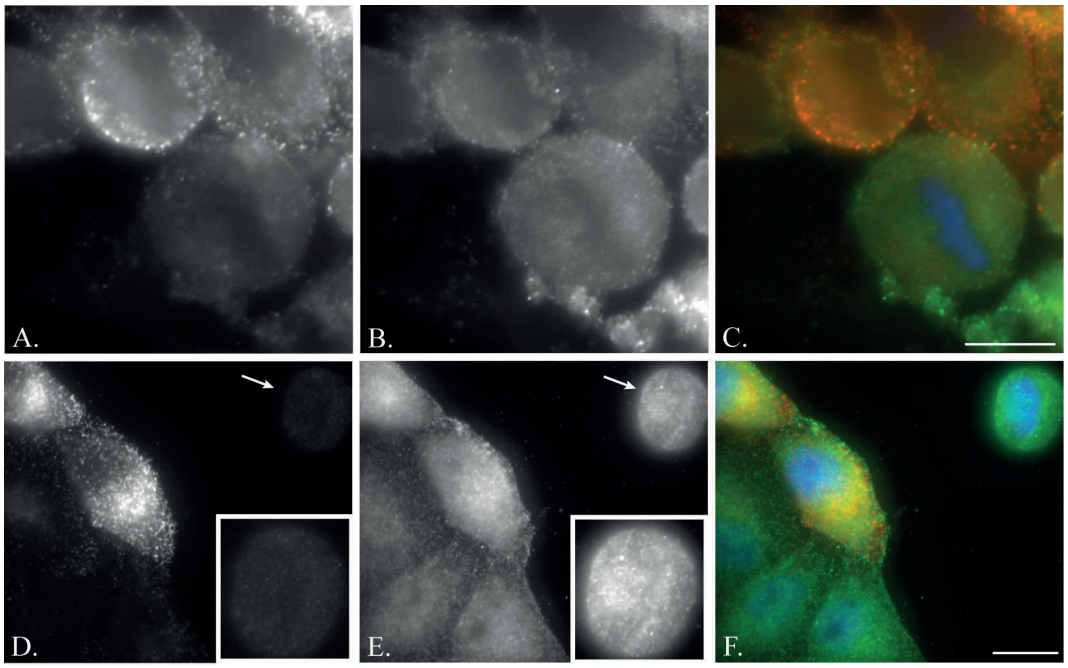


Abb. 37: GAK in Clathrin-depletierten mitotischen Zellen.

Die Expression von Clathrin wurde mit si-Clathrin herunterreguliert. In mitotischen Zellen, in denen kein Clathrin an der Spindel lokalisiert ist (A & D; „R461“), ist auch keine Färbung mit dem polyklonalen GAK-Antikörper „ELN“ nachzuweisen (B & E). Maßstab 10 µm.

In mitotischen Zellen führt der Clathrin *Knockdown* (Abb. 37 A & D) zur Dissoziation von GAK von der Spindel (Abb. 37 B & E). Die immuncytochemische Untersuchung zeigt, dass mitotische Zellen, in denen kein Clathrin an der Spindel nachgewiesen werden kann, ebenfalls kein GAK an der Spindel gebunden haben. Daraus kann man schließen, dass Clathrin die Bindung von GAK an die Spindel vermitteln könnte.

5.3.6 Auswirkungen der Depletion von GAK auf Clathrin in der Mitose

Als Nächstes wurde die Assoziation von Clathrin mit der Spindel in GAK-depletierten Zellen untersucht. Das Optimum der Depletion von GAK wurde erst 96 h nach Transfektion mit si-GAK erreicht. Die Untersuchung des GAK *Knockdowns* im Western-Blot ist in Abbildung 38 dargestellt, in dem zur Identifizierung von GAK der polyklonale Antikörper „S“ benutzt wurde. Zu erkennen ist eine geringere Expression von GAK im *Knockdown*.

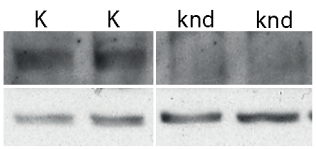


Abb. 38: Die Herunterregulation der Expression von GAK.

HeLa SS6 Zellen wurden mit si-GAK transfiziert und 96 h nach Transfektion im Western-Blot untersucht. K: Kontrolle; knd: GAK *Knockdown*. Der Blot wurde mit dem polyklonalen Antikörper „S“ inkubiert. Der Nachweis von Tubulin („DM1A“) diente als Ladungskontrolle.

In der Immunfluoreszenz wurde der GAK *Knockdown* durch die zusammen mit der si-GAK transfizierten siRNA „siGLO“ in der Mitose identifiziert. Die Herunterregulation der Expression von GAK wurde in GFP-LCB exprimierenden HeLa Zellen durchgeführt. Nach Synchronisation der Zellen erfolgte die Untersuchung von Clathrin in mitotischen GAK-depletierten Zellen. Abbildung 39 stellt mitotische Zellen dar, die „siGLO“-positiv sind (D & G) und die gleichzeitig Clathrin an der Spindel gebunden haben (Abb. 39E & H). Der Vergleich mit Kontrollzellen (Abb. 39 A-C) zeigt jedoch, dass ein Teil von Clathrin ins Zytosol dissoziiert. Allerdings bleibt das Protein zum großen Teil an der Spindel gebunden. Das zytosolische Clathrinsignal vermindert den Kontrast zwischen der Spindel und dem Zytosol. Auffällig ist darüber hinaus die Morphologie der Spindel. Im GAK *Knockdown* erscheint diese unförmiger und kleiner im Vergleich zu den in Kontrollzellen.

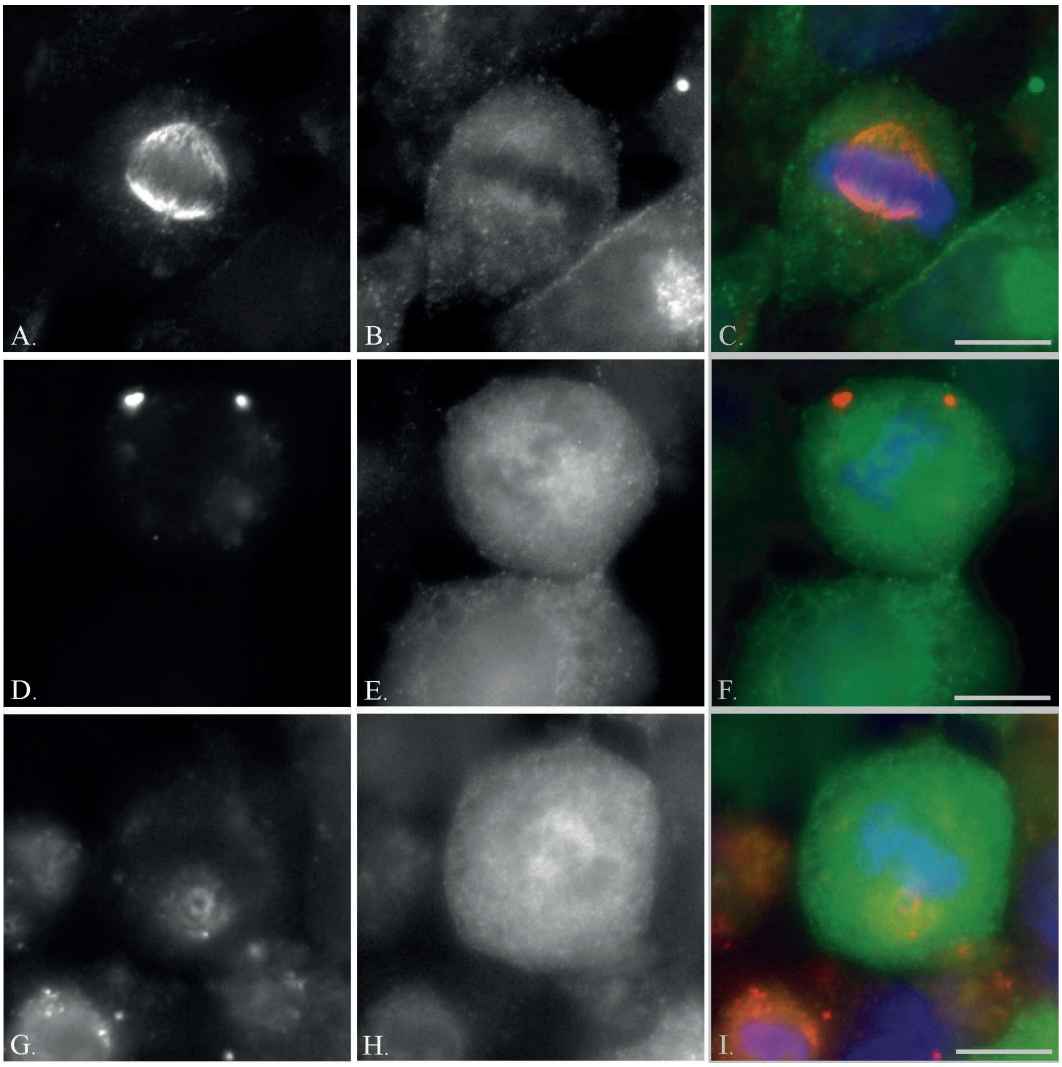


Abb. 39: Clathrin in GAK-depletierten mitotischen Zellen.

Zur Untersuchung von Clathrin in GAK-depletierten Zellen wurden GFP-LCB exprimierende HeLa Zellen mit si-GAK und der fluoreszierenden siRNA „siGLO“ transfiziert. Die Zellen wurden synchronisiert und nach 96 h untersucht. In mitotischen Zellen, die „siGLO“ aufweisen (D & G), ist Clathrin an der Spindel zu erkennen (E & H). Zur Kontrollzwecken wurden GFP-LCB exprimierende HeLa Zellen (B) immuncytochemisch gegen Tubulin gefärbt (A; „DM1A“). Maßstab 10 µm.

Das ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit an der mitotischen Spindel lokalisierte Protein Dynamin interagiert direkt mit GAK [Sever et al. 2006]. Aus diesem Grunde wurde die Verteilung von Dynamin im GAK *Knockdown* an der Spindel untersucht. Die Kotransfektion von si-GAK und „siGLO“ wurde in HeLa SS6 Zellen durchgeführt, die anschließend synchronisiert wurden. Einen Tag vor der Fixierung wurde das GFP-Dynamin Fusionsprotein in die Zellen eingeschleust. In mitotischen GAK-depletierten Zellen, die anhand von „siGLO“ identifiziert wurden, konnte nur ein sehr schwaches GFP-Dynamin Signal an der Spindel lokalisiert werden (Abb. 40 E, H, K).

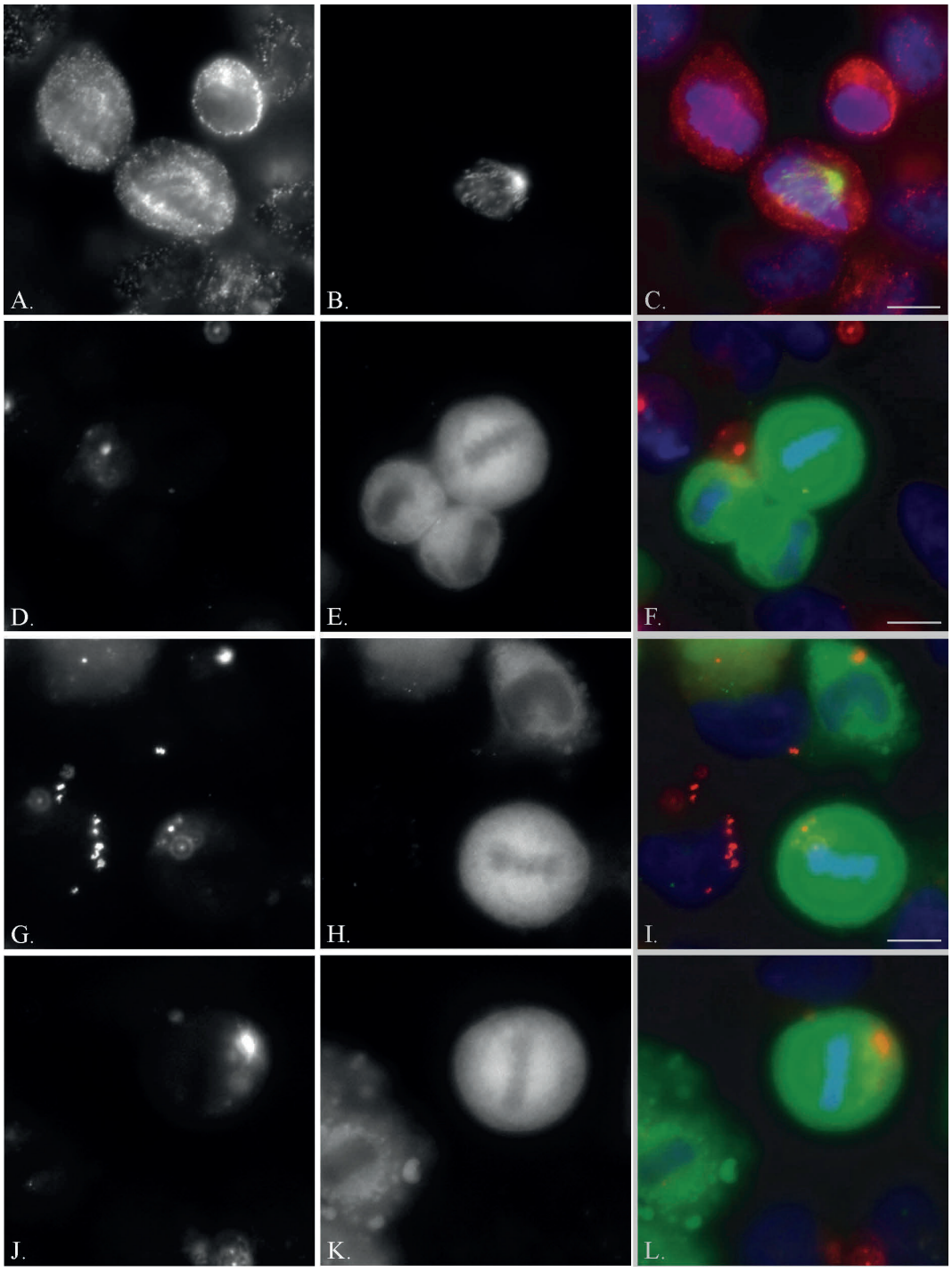


Abb. 40: GFP-Dynamin in GAK-depletierten Zellen.

Die Expression von GAK wurde in HeLa SS6 Zellen mit si-GAK und der fluoreszierenden siRNA „siGLO“ herunterreguliert. 72 h nach Transfektion wurden die Zellen mit GFP-Dynamin transient transfiziert und 24 h später untersucht. Der GAK *Knockdown* wurde durch „siGLO“ identifiziert (D; G; J). GFP-Dynamin (B; E; K; H). A-C Kontrolle. Clathrin (A; „R461“). Maßstab 10 µm.

Im Vergleich zur Kontrolle, in der Dynamin punktiert an der Spindel erscheint (Abb. 40 B), ist in GAK-depletierten Zellen ein homogenes GFP-Dynamin Signal im Zytosol zu beobachten.

5.3.7 Auswirkungen der Depletion von Auxilin1 auf Clathrin in der Mitose

In verschiedenen Zelllinien wird neben GAK auch seine neuronale Isoform Auxilin1 exprimiert [Hirst et al. 2008]. Der Nachweis der Lokalisation von Auxilin1 an der Spindel konnte in dieser Arbeit bereits eindeutig belegt werden. In RNAi Untersuchungen sollten als Nächstes die Bindungsverhältnisse mit Clathrin an der Spindel mittels RNAi Untersuchungen geklärt werden. Die Herunterregulation der Expression von Auxilin1 benötigte, wie die von GAK, vier Tage bis zum Erreichen der minimalen Expression. Im Western-Blot ist 96 h nach Transfektion eine fast vollständige Herunterregulation von Auxilin1 in HeLa SS6 Zellen nachzuweisen (Abb. 41).

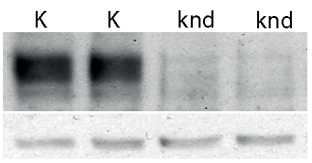


Abb. 41: Herunterregulation der Expression von Auxilin1. HeLa SS6 wurden 96 h nach Transfektion von si-Auxilin1 im Western-Blot untersucht.
K: Kontrolle; knd: Auxilin1 *Knockdown*. Der Nachweis von Tubulin wurde als Ladungskontrolle verwendet.

In mitotischen Zellen wurde der Auxilin1 *Knockdown* anhand der Fluoreszenz von „siGLO“ identifiziert. Der Vergleich der Kontrollzellen (Abb. 42 A-C) mit den Auxilin1-depletierten Zellen (Abb. 42 D-F & G-I) zeigt, dass die Bindung von Clathrin an der Spindel bei Abwesenheit von Auxilin1 fortbestehen bleibt. In „siGLO“-positiven Zellen ist ein starkes GFP-LCB Signal an der Spindel nachzuweisen (Abb. 42 E & H). In der Verteilung von Clathrin an der Spindel ergeben sich keine Auffälligkeiten beim Vergleich von Auxilin1-depletierten Zellen mit der GFP-LCB Kontrollzellen. Daraus wird deutlich, dass die Lokalisation von Clathrin an der Spindel nicht von der Expression von Auxilin1 abhängig ist. Der Auxilin1 *Knockdown* offenbart seinen Einfluss auf die Morphologie der Spindel. Die Spindelfasern erscheinen kürzer und ungeordneter. Auch die Dimension der Spindel verändert sich bei Abwesenheit von Auxilin1. Die Daten zeigen, dass Auxilin1 eine Rolle bei der Anordnung der mitotischen Fasern spielt, jedoch nicht für die Rekrutierung von Clathrin an die Spindel verantwortlich ist.

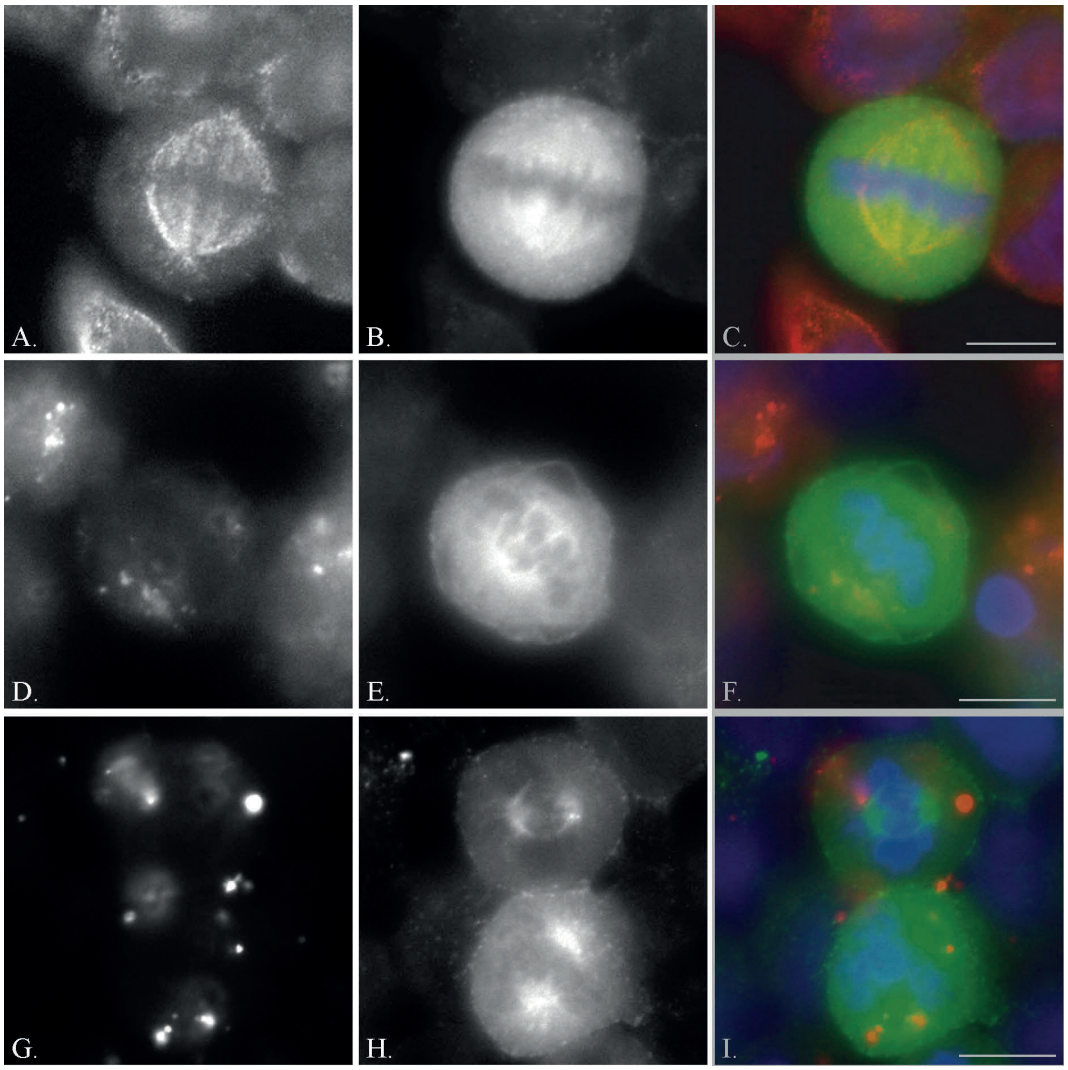


Abb. 42: Clathrin in Auxilin1-depletierten mitotischen Zellen.

GFP-LCB exprimierende HeLa Zellen wurden mit si-Auxilin1 und „siGLO“ kotransfiziert. Die Zellen wurden synchronisiert und 96 h nach Transfektion untersucht. Die mitotischen „siGLO“-positiven Zellen (D & G) weisen Clathrin an der Spindel auf (E & H). Die mitotische Kontrollzelle der GFP-LCB exprimierenden Zellen (B) wurde gegen Tubulin gefärbt (A, „DM1A“). Maßstab 10 µm.

5.3.8 Vergleich der Depletion von Auxilin1, GAK und der Kodepletion von Auxilin1 und GAK

Die verwendete HeLa Zelllinie exprimiert sowohl Auxilin1, als auch GAK, die beide im Rahmen der vorliegenden Arbeit an der mitotischen Spindel lokalisiert wurden. Bei der Depletion von Auxilin1 oder GAK ist Clathrin noch an der Spindel gebunden, obwohl sich Unterschiede herauskristallisieren.

In der Literatur konnte belegt werden, dass beide Proteine ihre Aufgaben in der Clathrin-vermittelten Endozytose gegenseitig kompensieren [Hirst et al. 2008]. Inwieweit sie dies auch in der Mitose tun sollte im nächsten Schritt untersucht werden.

Zu diesem Zweck wurde die Expression von Auxilin1 und GAK kodepletiert. Der Vergleich mit den einzelnen Knockdowns zeigt, dass erst die Kodepletion von Auxilin1 und GAK zu einer starken Reduzierung der Expression beider Proteine führt (Abb. 43).

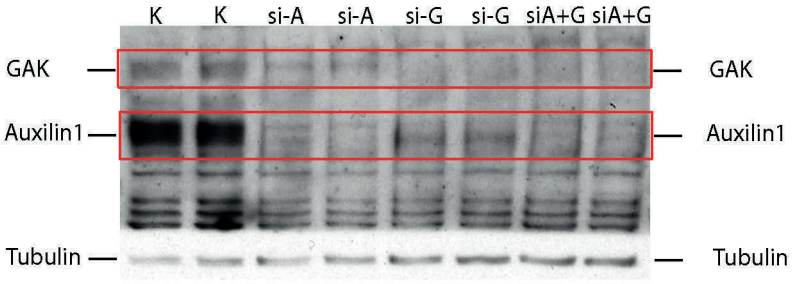


Abb. 43: Herunterregulation der Expression von Auxilin1, GAK und beiden Proteinen.

HeLa SS6 wurden mit der si-Auxilin1, si-GAK und mit siRNA gegen Auxilin1 und GAK transfiziert. Der Western-Blot wurde mit dem polyklonalen Antikörper „S“ inkubiert, der sowohl Auxilin1 als auch GAK erkennt. Tubulin wurde als Ladungskontrolle verwendet. K: Kontrolle; si-A: Auxilin1 *Knockdown;* si-G: GAK *Knockdown*; siA+G: Auxilin1 und GAK *Knockdown*.

Der polyklonale Antikörper „S“ erkennt neben Auxilin1 und GAK auch weitere Banden im Western-Blot. Diese bleiben bei der Herunterregulation von Auxilin1 oder GAK unbeeinflusst und können als Kreuzreaktion angesehen bzw. vernachlässigt werden.

Der Vergleich des Auxilin1- mit dem GAK *Knockdown* sowie mit der Kodepletion beider Proteine legt einige Unterschiede in der Verteilung von Clathrin an der Spindel offen. Zur Veranschaulichung wurden neben den oben bereits dokumentierten Epifluoreszenzbildern, Spindeln im konfokalen Mikroskop untersucht. In Abbildung 44 ist der Vergleich von GFP-LCB exprimierenden HeLa Zellen dargestellt, in denen die Expression von Auxilin1 (Abb. 44 A & D) sowie von GAK (Abb. 44 G & J) herunterreguliert wurde. Die Abwesenheit von Auxilin1 führt zu keinen Unterschieden in der Lokalisation von Clathrin in der Mitose. Clathrin kann eindeutig an der Spindel detektiert werden (Abb. 44 B & E).

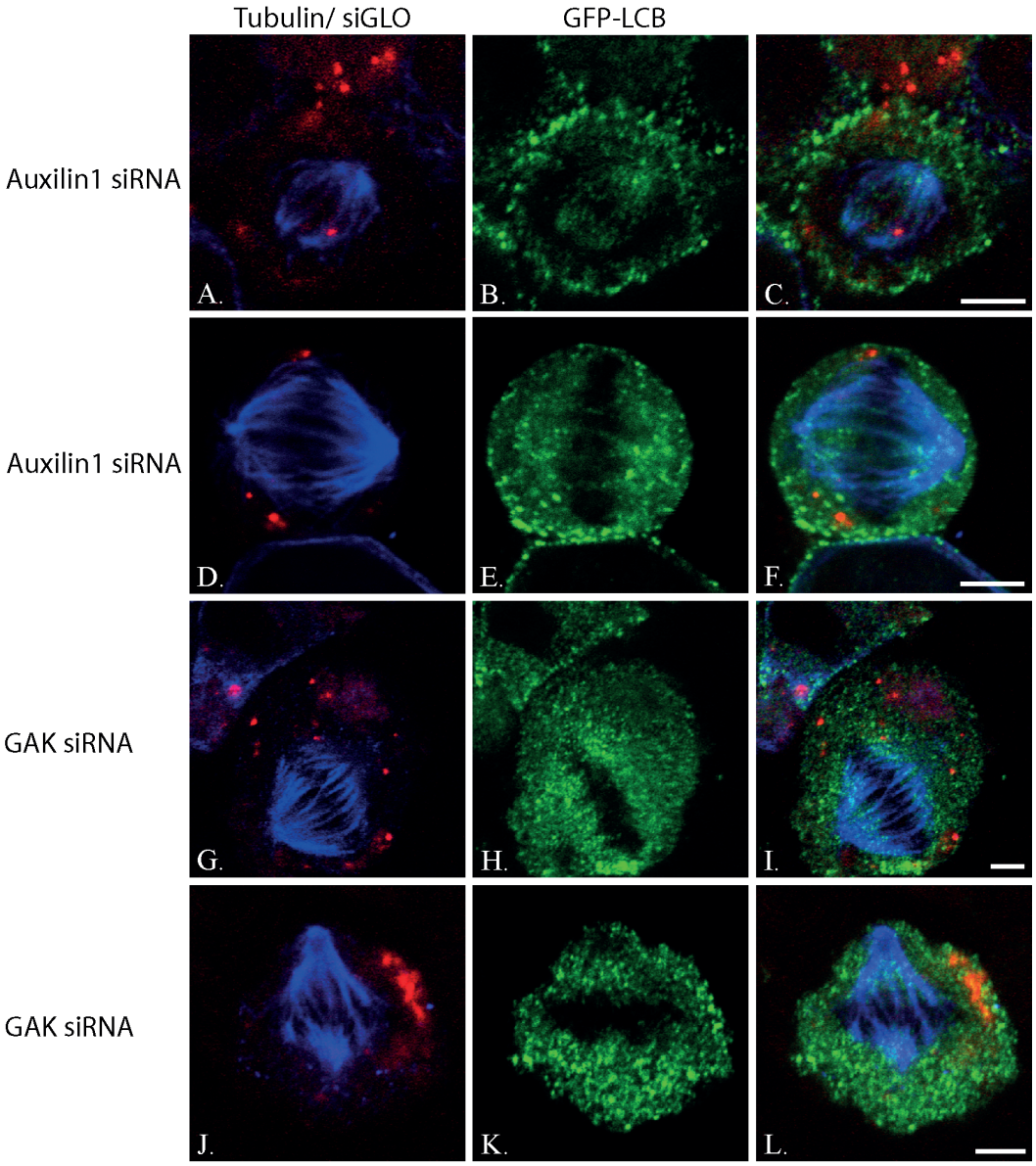


Abb. 44: Vergleich von Clathrin in Auxilin1- und GAK-depletierten Zellen.

GFP-LCB exprimierende HeLa Zellen wurden mit si-Auxilin1 und „siGLO“ (A-F; “siGLO“ ist rot markiert) sowie si-GAK und „siGLO“(G-L) kotransfiziert. Die Zellen wurden nach 96 h immuncytochemisch gegen Tubulin (blau; „DM1A“) gefärbt. Während in Auxilin1-depletierten Zellen (A & D) Clathrin an der Spindel erkennbar ist (B & E), weisen GAK-depletierte Zellen (G & J) wenig Clathrin an der Spindel auf (H & K). C, F, I & L stellen die Überlagerung der einzelnen Kanäle dar. Maßstab 10 µm

Ein deutlich anderes Bild zeigt die Herunterregulation der Expression von GAK (Abb. 44 H & K). Die Zellen weisen kein eindeutiges Clathrinsignal an der Spindel auf. Diese ist durch das GFP-LCB Signal nur schwer erkennbar, das verbreitet im Zytosol lokalisiert ist (Abb. 44 H & K). Hingegen zeigt die Färbung von Tubulin in demselben konfokalen Schnitt durch die Zelle, dass der Spindelapparat vollständig aufgebaut ist (Abb. 44 G & J). Der GAK *Knockdown* führt zur Erhöhung der Konzentration des

GFP-LCB Signals im Zytosol. Dadurch verringert sich der Kontrast zwischen der Spindel und dem Zytosol und so scheint es zunächst, dass Clathrin im GAK *Knockdown* nicht mehr an der Spindel gebunden ist (Abb. 44 H & K). Bei der Untersuchung von GAK-depletierten GFP-LCB exprimierenden Zellen, die vor der Fixierung mit Detergenz permeabilisiert wurden, wird jedoch deutlich, dass ein signifikanter Anteil von Clathrin an der Spindel verbleibt (Abb. 45 B & E).

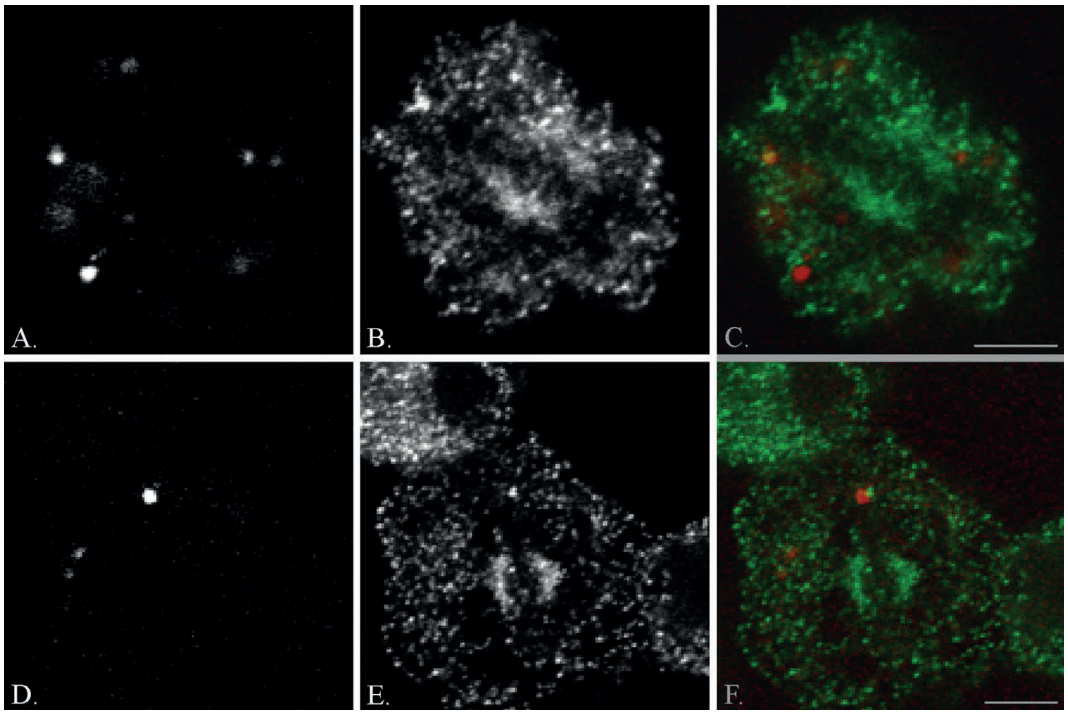


Abb. 45: GAK-depletierte Zellen, die vor dem Fixieren permeabilisiert wurden.

GFP-LCB exprimierende HeLa Zellen wurden mit si-GAK und „siGLO“ (A & D) kotransfiziert und synchronisiert. 96 h nach Transfektion wurden die Zellen 3 min permeabilisiert und anschließend fixiert. Dadurch wurden alle zytosolischen Proteine entfernt. In den extrahierten Zellen ist Clathrin an der Spindel zu erkennen (B & E). Auffällig ist die verkleinerte Morphologie der Spindel. C & F stellen die Überlagerung der einzelnen Kanäle dar. Maßstab 10 µm.

Die Untersuchungen zeigen, dass GAK im Vergleich zu Auxilin1 einen größeren Einfluss auf die Bindung von Clathrin an der Spindel hat. Die Abwesenheit von GAK führt zu einer vermehrten Freisetzung von Clathrin von der Spindel. Dadurch entsteht in nicht extrahierten Zellen der Eindruck, das gesamte Clathrin würde von der Spindel ins Zytosol dissoziieren. Im Auxilin1 *Knockdown* hingegen bleibt Clathrin vollständig an der Spindel gebunden.

Auffällig ist die veränderte Morphologie der Spindel selbst. Kontrollzellen und Auxilin1-depletierte Zellen weisen eine große Spindel im Verhältnis zur mitotischen Zelle auf (Abb. 44). GAK-depletierte Zellen zeichnen sich hingegen durch eine kleine Spindel aus. Im nächsten Abschnitt werden die Auswirkungen der *Knockdowns* auf die Spindel im Detail behandelt. Die Untersuchung von Clathrin in Zellen, in denen Auxilin1 und GAK

kodepletiert wurden, ergibt ein Bild, das eher dem GAK *Knockdown* ähnelt (Abb. 46). Zur Analyse von Clathrin wurden wiederum GFP-LCB exprimierende HeLa Zellen verwendet. Eine Kotransfektion von si-Auxilin1 und si-GAK zusammen mit der fluoreszierenden siRNA „siGLO“ sorgte für eine eindeutige Identifizierung des *Knockdowns*. Dieser wurde 96 h nach Transfektion untersucht.

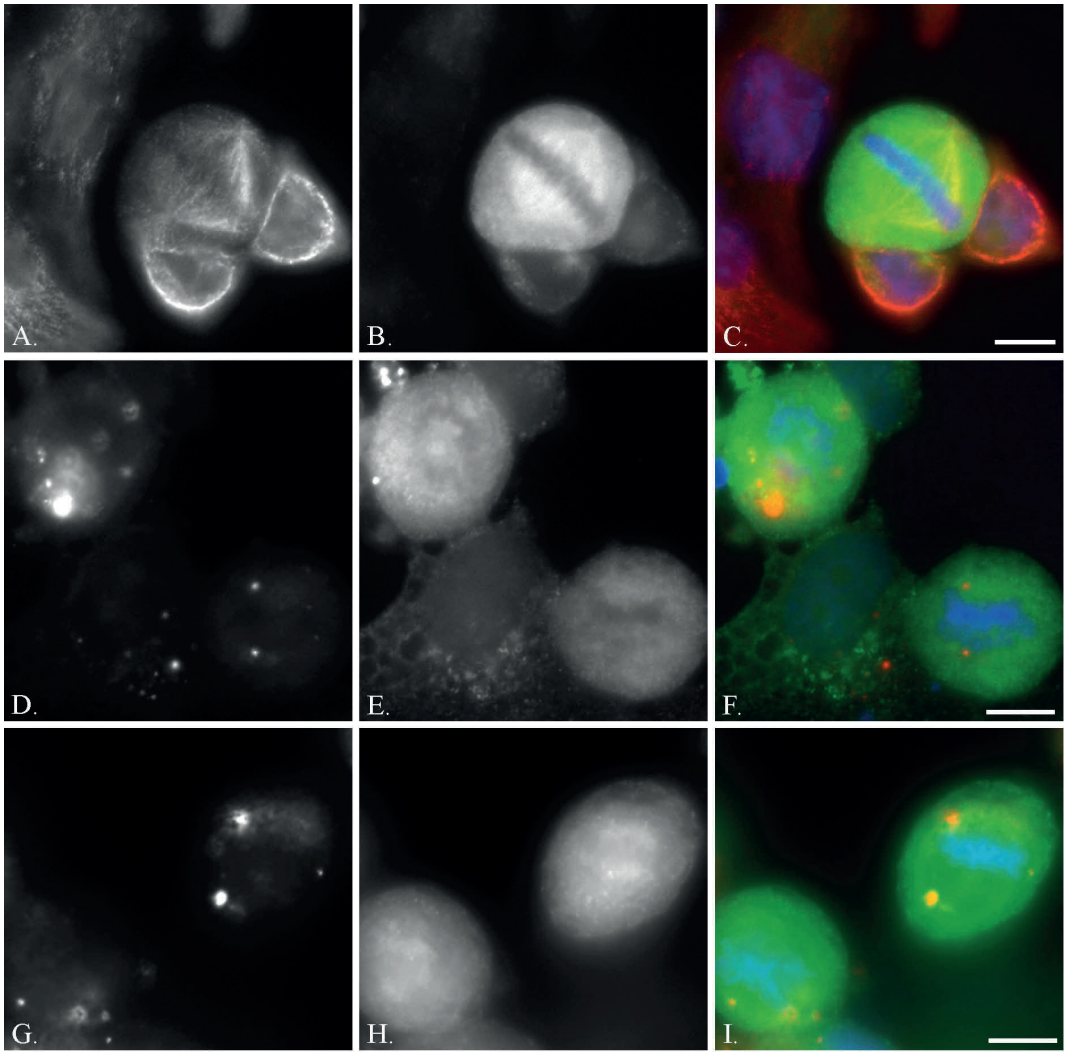


Abb. 46: Kodepletion von Auxilin1 und GAK in mitotischen Zellen.

Zur Untersuchung von Clathrin in Auxilin1 und GAK kodepletierten Zellen wurden GFP-LCB exprimierende HeLa Zellen mit si-Auxilin1 und si-GAK sowie „siGLO“ kotransfiziert und nach 96 h untersucht. In „siGLO“-positiven Zellen (D & E) ist Clathrin sehr schwach an der Spindel zu erkennen (E & H). Eine veränderte Spindelmorphologie liegt vor. Zur Kontrollzwecken wurden GFP-LCB exprimierende HeLa Zellen (B) immuncytochemisch gegen Tubulin gefärbt (A; „DM1A“). Maßstab 10 µm.

Während in Kontrollzellen Clathrin gut an der Spindel nachzuweisen ist (Abb. 46 B), weisen Auxilin1 und GAK kodepletierte Zellen ein sehr schwaches Clathrinsignal an der Spindel auf (Abb. 46 E & H). Mitotische Zellen können hier aufgrund der Anordnung der Chromosomen in der Äquatorialebene identifiziert werden. In manchen „siGLO“-positiven Zellen ist restliches Clathrinsignal an der Spindel erkennbar (Abb. 46 H). Allerdings

erscheint dieses sehr schwach und wird zusätzlich durch das Signal im Zytosol reduziert. Ähnlich wie im GAK *Knockdown* hat die Spindel bei Kodepletion von Auxilin1 und GAK geringere Ausmaße als Spindeln in Kontrollzellen. Ebenso gibt es Unterschiede in der Breite der Metaphaseplatte. Auf die Morphologie der Spindel bei Depletion der einzelnen Proteine wird im Kapitel 5.5 näher eingegangen.

5.3.9 Zusammenfassung

Die Daten in diesem Ergebnisteil zeigen, dass Clathrin für die Rekrutierung von AP1, Dynamin sowie Auxilin1 und GAK an die Spindel verantwortlich ist. Die Depletion von Clathrin führt zur Delokalisation dieser Proteine von der Spindel. Wird hingegen die Proteinexpression von AP1, Dynamin und Auxilin1 herunterreguliert, so bleibt Clathrin mit der Spindel assoziiert. Die Depletion von GAK führt teilweise zu einer Dissoziation von Clathrin von der Spindel und impliziert damit eine mögliche Funktion von GAK bei der Assoziation von Clathrin mit der Spindel.

5.4 Bindung von GAK an die mitotische Spindel

Die RNAi Untersuchungen (5.3.6) deuten auf eine wichtige Funktion von GAK in der Mitose im Bezug auf die Assoziation von Clathrin an der Spindel. Zudem erschien während der Entstehung dieser Arbeit eine Publikation, die die Rolle von GAK in der Mitose diskutiert, ohne jedoch seine Lokalisation an der Spindel nachzuweisen [Shimizu et al. 2009].

Eine eindeutige Lokalisation von GAK an der mitotischen Spindel liefern hingegen die Daten dieser Arbeit. Die Assoziation von GAK mit der Spindel belegen sowohl Untersuchungen mit unterschiedlichen Antikörpern, als auch mit GFP-GAK Fusionsproteinen. Um die Bindungsdomäne von GAK, die an die Spindel bindet, zu identifizieren, wurde im Folgenden das Protein genauer untersucht.

5.4.1 GFP-GAK Fusionsproteine

Die Transfektion von GFP-GAK Fusionsproteinen sollte für eine Klärung der Bindungsverhältnisse von GAK an die Spindel sorgen. Neben dem vollständigen GFP-GAK Fusionsprotein, das für ein Protein mit einer Länge von 1311 Aminosäuren kodiert (GFP-GAK $^{1\ 1311}$), wurden drei weitere GFP-GAK Fusionsproteine in HeLa SS6 Zellen transfiziert und analysiert.

Abb. 47: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von GAK.
Die Positionen der Schnittstellen der verwendeten Fusionsproteine wurden markiert.

Zu diesen gehörte das GFP-GAK $^{1\text{-}833}$, das die Kinasedomäne trägt. Dieses wurde aus dem GFP-GAK $^{1\text{-}1311}$ molekularbiologisch hergestellt. Das GFP-GAK $^{1\text{-}833}$ Fusionsprotein kodiert die Kinasedomäne, jedoch fehlen ihm die bekannten Clathrinbindestellen sowie die J-Domäne, die Hsc70 aktiviert. Des Weiteren wurden die Fusionsproteine GFP-GAK $^{945\text{-}1311}$ und GFP-GAK $^{1\text{-}1260}$ verwendet [Meyerholz 2002].

Das Fusionsprotein GFP-GAK $^{945\text{-}1311}$ besitzt alle bekannten Clathrinbindestellen sowie die J-Domäne. Dem GFP-GAK $^{1\text{-}1260}$ Fusionsprotein hingegen fehlt die J-Domäne. In Abbildung 47 ist eine schematische Darstellung der Domänenstruktur von GAK dargestellt.

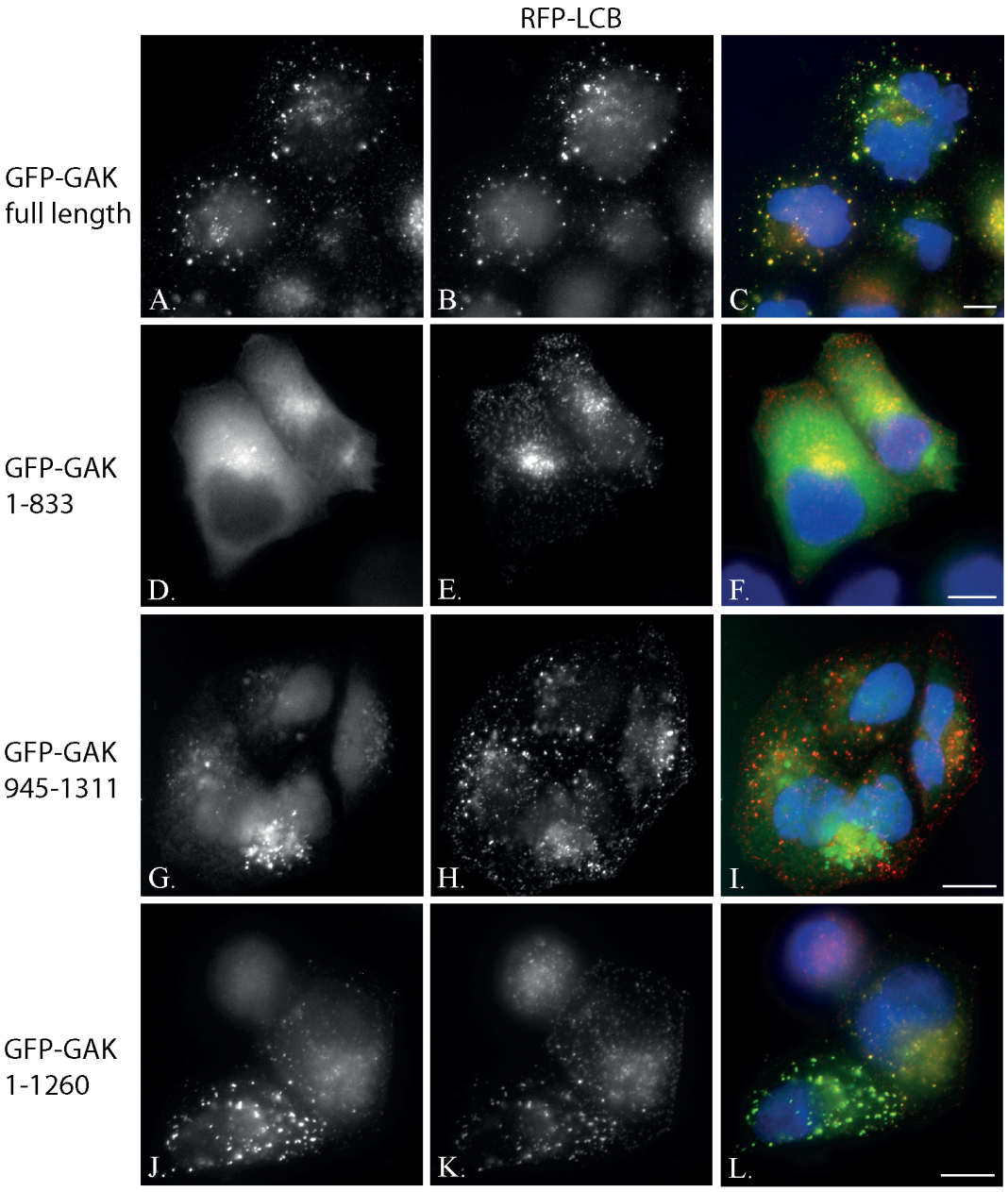


Abb. 48: Vergleich der GFP-GAK Fusionsproteine in der Interphase.

HeLa SS6 Zellen wurden kotransfiziert mit den unterschiedlichen GFP-GAK Fusionsproteinen und RFP-LCB. GFP-GAK $^{1\text{-}1311}$ (A), GFP-GAK $^{1\text{-}833}$ (D), GFP-GAK $^{945\text{-}1311}$ (G) und GFP-GAK $^{1\text{-}1260}$ (J). RFP-LCB (B, E, H, K). C, F, I und L stellen die Überlagerung der einzelnen Kanäle dar. Maßstab 10 µm.

Die vier Fusionsproteine wurden zusammen mit RFP-LCB in HeLa SS6 Zellen transient transfiziert und sowohl in der Interphase, als auch in der Mitose miteinander verglichen.

Wie bereits dokumentiert (vgl. Abb.18) ist GFP-GAK $^{1-1311}$ in der Interphase fein punktiert in der Zelle verteilt (Abb. 48 A). GFP-GAK $^{1-1311}$ kolokalisiert mit RFP-LCB und neigt bei Überexpression zur Bildung von Aggregaten (Abb. 48 A), in denen sich ebenfalls Clathrin ansammelt (Abb. 48 B).
Die Expression des GFP-GAK $^{1-833}$ Fusionsproteins führt zu einer homogenen Verteilung des Proteinfragments in den Zellen, ohne dass eine punktierte Markierung zu erkennen ist (Abb. 48 D). Das RFP-LCB Fusionsprotein erscheint hingegen normal verteilt (Abb. 48 E). GFP-GAK $^{1-833}$ enthält die Kinasedomäne von GAK, allerdings fehlen dem Fusionsprotein die Clathrinbindestellen und wahrscheinlich verteilt es sich deshalb homogen im Zytosol.
Die GFP-GAK Fusionsproteine GFP-GAK $^{945-1311}$ und GFP-GAK $^{1-1260}$ hingegen sind in einer punktierten Verteilung in den Interphasezellen zu erkennen (Abb. 48 G & J). Beide Fusionsproteine neigen zur Bildung von Aggregaten, in denen auch RFP-LCB zu beobachten ist. Beide GAK-Proteinfragmente besitzen Clathrinbindestellen, was zur Kolokalisation mit RFP-LCB führt.

Die Untersuchung der GFP-GAK Fusionsproteine in mitotischen HeLa Zellen ließ eine Übereinstimmung mit den Daten der Interphase erkennen. Das Fusionsprotein GFP-GAK $^{1-1311}$ ist in mitotischen Zellen sehr gut an der Spindel nachzuweisen, wo es fein punktiert verteilt erscheint (Abb. 49 A; vgl. auch Abb. 18). Sowohl eine Kolokalisation mit Clathrin (Abb. 18), als auch den Mikrotubuli konnte belegt werden (Abb. 49 B). Zusätzlich ist eine feine GFP-GAK Färbung im Zytosol erkennbar.
Das GFP-GAK $^{1-833}$ Fusionsprotein, das die Kinasedomäne trägt, ist hingegen nicht an der Spindel lokalisiert, sondern liegt homogen verteilt im Zytosol vor (Abb. 49 D). Weder an der Spindel, noch im Zytosol konnte ein punktförmiges GFP-GAK $^{1-833}$ Signal nachgewiesen werden. In derselben Zelle ist hingegen das kotransfizierte RFP-LCB Fusionsprotein als ein punktiertes Signal des an der Spindel zu erkennen (Abb. 49 E).
Die beiden GFP-GAK Fusionsproteine GFP-GAK $^{945-1311}$ und GFP-GAK $^{1-1260}$ verfügen über die Möglichkeit an Clathrin zu binden. In mitotischen Zellen ist GFP-GAK $^{945-1311}$ sehr gut mit der Spindel assoziiert und auch das GFP-GAK $^{1-1260}$ Fusionsprotein, dem die J-Domäne fehlt, kolokalisiert mit mit RFP-LCB an der Spindel (Abb. 49 L).

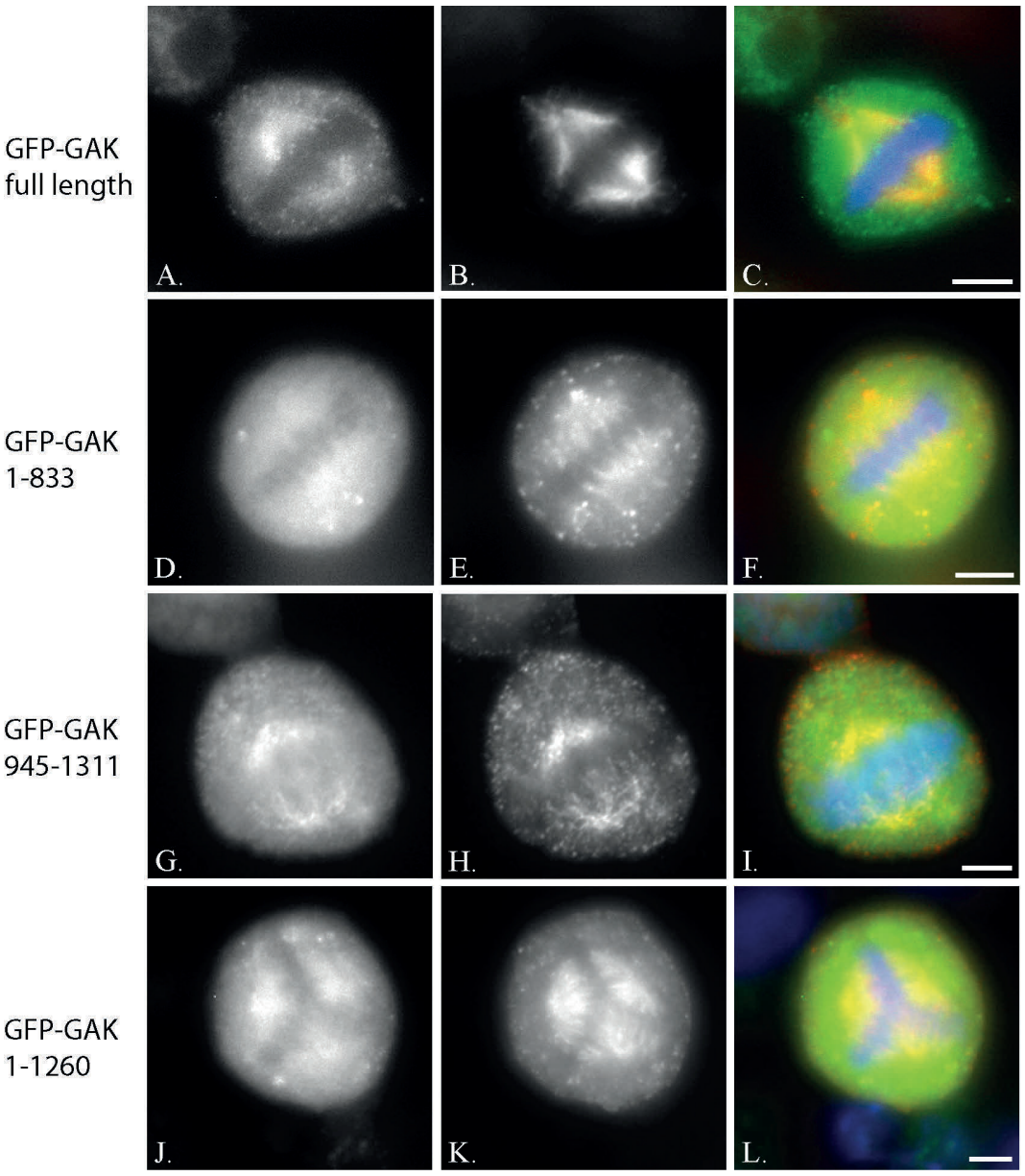


Abb. 49: Vergleich der GFP-GAK Fusionsproteine in der Mitose.

HeLa SS6 Zellen wurden kotransfiziert mit den unterschiedlichen GFP-GAK Fusionsproteinen und RFP-LCB. GFP-GAK $^{1-1311}$ (A), GFP-GAK $^{1-833}$ (D), GFP-GAK $^{945-1311}$ (G) und GFP-GAK $^{1-1260}$ (J). RFP-LCB (B, E, H, K). C, F, I und L stellen die Überlagerung der einzelnen Kanäle dar. Maßstab 10 µm.

5.4.2 Zusammenfassung

Die Ergebnisse in diesem Kapitel zeigen, dass GAK über die Domäne, welche die Clathrinbindestellen trägt, an die Spindel rekrutiert wird. Von den vier untersuchten GFP-GAK Fusionsproteinen sind die drei, die Clathrinbindestellen enthalten, an der Spindel lokalisiert. Das GFP-GAK Fusionsprotein, welches nur die Kinasedomäne trägt, ist hingegen homogen im Zytosol von Interphase- und Mitosezellen verteilt.

	Interphase			**Mitose**
Fusionsprotein	**punktiert**	**Blobs**	**Blobs mit Clathrin**	**An der Spindel**
GFP-GAK $^{1-1311}$	ja	ja	ja	ja
GFP-GAK $^{1-833}$	nein	nein	nein	nein
GFP-GAK $^{945-1311}$	ja	ja	ja	ja
GFP-GAK $^{1-1260}$	ja	ja	ja	ja

Tabelle 2. Vergleich der GFP-GAK Fusionsproteine in Interphase und Mitose.

Die Kinasedomäne ist nicht für die Rekrutierung von GAK an die Spindel verantwortlich. Ebenso wenig ist die J-Domäne für die Bindung von GAK an den Spindelapparat ausschlaggebend. Das GFP-GAK Fusionsprotein, dem die J-Domäne fehlt, wird an die Spindel rekrutiert. Die Daten grenzen die Bindestelle von GAK an die Spindel auf den Bereich zwischen der Kinase- und der J-Domäne und innerhalb der Aminosäuren 945 bis 1260 ein. In diesem Bereich befinden sich die Clathrinbindestellen. Die Daten lassen darauf schließen, dass GAK von Clathrin an die Spindel rekrutiert wird und unterstützen die Ergebnisse der RNAi Untersuchung im Abschnitt 5.3.5. In der Tabelle 2. sind die Ergebnisse der Untersuchung der GFP-GAK Fusionsproteine anschaulich zusammengefasst.

5.5 Auswirkungen der Depletion von Clathrin, AP1, Dynamin, Auxilin1 und GAK auf die Mitose

Die optimale Synchronisation der HeLa S3 sowie der IHKE Zellen wurde durch eine zweifache, 16-stündige Arretierung mit 2 mM Thymidin und einer anschließenden Inkubation der Zellen mit 40 ng/ml Nocodazol für 5-7 h erzielt. Um Metaphasen auszubilden, wurden die Zellen 30 min im Proliferationsmedium inkubiert, nachdem das Nocodazol ausgewaschen war. Zu diesem Zeitpunkt waren über 85 % der Zellen in der Metaphase synchronisiert und konnten fixiert oder in Lebendzellversuchen untersucht werden.
In vorhergehenden Kapiteln wurden endozytotische Proteine vorgestellt, die mit der mitotischen Spindel assoziiert sind (5.1 & 5.2). Im Folgenden werden die Auswirkungen ihrer Abwesenheit auf die Mitose dargestellt, die aus RNAi Untersuchungen resultieren.

5.5.1 Morphologie der Chromosomen

Die synchronisierten Zellen benötigten in der Regel 30 Minuten für den vollständigen Aufbau der mitotischen Spindel, nachdem das Nocodazol aus ihrem Medium entfernt wurde. Zu diesem Zeitpunkt bildeten die Chromosomen die Metaphaseplatte in der Äquatorialebene. Wurde mit der Fixierung gezögert, traten mehr als 50 % der Zellen nach weiteren 5 min in die Anaphase ein und teilten sich.
Im Vergleich zu Kontrollzellen benötigte der Teilungsprozess der Clathrin-depletierten Zellen eine längere Zeit. Wurden Kontrollzellen und Clathrin-depletierte Zellen parallel synchronisiert und zum gleichen Zeitpunkt fixiert, so ergaben sich Unterschiede in der Anordnung ihrer Chromosomen. Während sich die Kontrollzellen bereits zu 80 % in der Metaphase befanden, brauchten die Zellen im Clathrin *Knockdown* mehr Zeit, um die Chromosomen nach dem Nocodazolblock korrekt in der Äquatorialebene anzuordnen. Zwar war die Spindel vollständig aufgebaut, allerdings schienen viele der Chromosomen noch keine Bindung mit den Kinetochor-Mikrotubuli eingegangen zu sein. Ein Großteil der Chromosomen in Clathrin-depletierten Zellen befand sich zwischen den Zellpolen und der sich aufbauenden Metaphaseplatte (Abb. 50 E).

Noch deutlicher war die unvollständige Bindung der Chromosomen an die Mikrotubuli bei der Depletion von GAK sowie der gleichzeitigen Herunterregulation von Auxilin1 und GAK zu erkennen. In diesen Zellen resultierte die parallele Behandlung zu Kontrollzellen in einer auffälligen Anordnung der Chromosomen in mitotischen Zellen. Während 30 min nach dem Nocodazolarrest die Kontrollzellen in der Metaphase angeordnet waren, hielten sich die Chromosomen in GAK-depletierten Zellen in einem Prophase-ähnlichem Zustand auf.

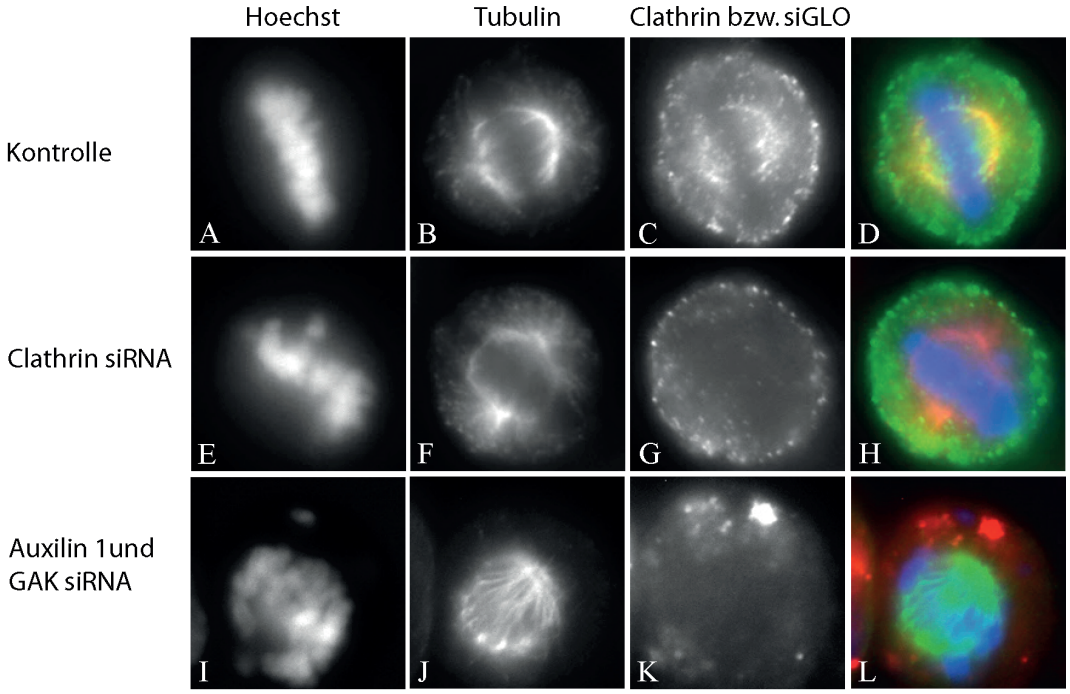


Abb. 50: Morphologie der Chromosomen in Clathrin-depletierten und Auxilin1 und GAK kodepletierten Zellen.

Die synchronisierten Zellen wurden nach 30 min Erholungsphase nach dem Nocodazolblock fixiert. Im Vergleich zur Kontrolle (A-D) haben Clathrin-depletierte Zellen (E-H) eine breitere Metaphaseplatte, dadurch dass die Chromosomen nicht vollständig in der Äquatorialebene angeordnet sind (E). Bei Depletion von Auxilin1 und GAK (I-L) verstärkt sich dieser Effekt und die Chromosomen befinden sich in einem Prophase-ähnlichem Zustand, obwohl eine vollständig aufgebaute Spindel vorhanden ist (J). Färbung der Chromosomen (A, E, I; „Hoechst“); Tubulin (B, F, J: „DM1A“); Clathrin (C, G; „R461“); „siGLO“(K). D, H & L stellen die Überlagerung der einzelnen Kanäle dar.

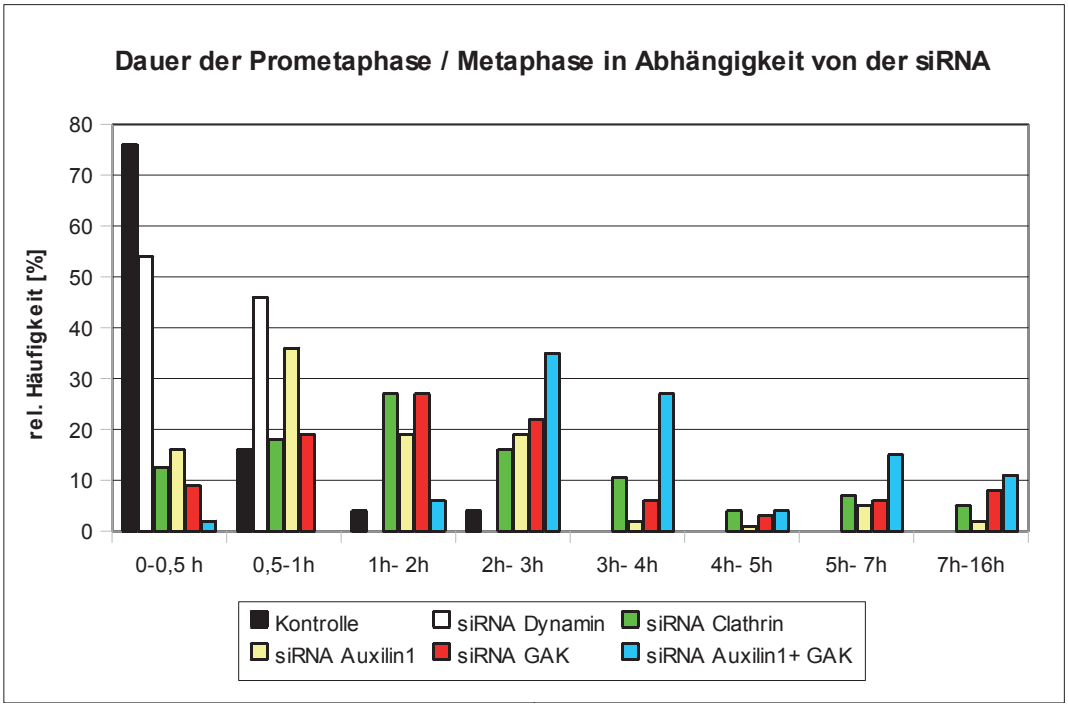
Dieser Zustand wurde verstärkt in Zellen, in denen neben der Expression von GAK auch die von Auxilin1 herunterreguliert wurde. Trotz einer bereits vollständig aufgebauten Spindel, erinnerte die Anordnung der Chromosomen an die in der Prophase (Abb. 50 I). Zusätzlich schienen die Chromosomen relativ ungeordnet in der Zelle vorzuliegen (Abb. 50 I). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde zunächst versucht, die Erholungszeiten zu verlängern, um den depletierten Zellen die Möglichkeit zu geben, ihre Metaphaseplatte aufzubauen.

In Lebendzellbeobachtungen konnte im Clathrin *Knockdown* festgestellt werden, dass die Anordnung der Chromosomen in der Äquatorialebene nach ca. 45 bis 50 min Erholungszeit aus dem Nocodazolblock abgeschlossen war. Zu diesem Zeitpunkt befand sich eine ausreichende Zahl der Zellen in der Metaphase und konnte fixiert werden. In Untersuchungen, in denen Clathrin-depletierte Zellen mit Kontrollzellen auf das Vorhandensein anderer Proteine immuncytochemisch verglichen wurden, wurden die Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten fixiert. Die Kontrollzellen wurden standardmäßig 30 min nach dem Nocodazolarrest fixiert, während in Clathrin-depletierten Zellen die Fixierung erst 50 min nach dem Nocodazolblock erfolgte.
Im GAK *Knockdown* und bei Kodepletion von Auxilin1 und GAK resultierte das Hinauszögern der Fixierung nicht in einer Anordnung der Chromosomen in der Äquatorialebene. Die GAK-depletierten Zellen befanden sich in einem Zustand, in dem die Chromosomen einem Zustand in der Prometaphase glichen.
Die Daten zeigten, dass die Depletion von Clathrin und von GAK, aber vor allem die Kodepletion von Auxilin1 und GAK den zeitlichen Verlauf der Mitose beeinflussen. Um diese Auswirkungen genauer zu untersuchen, wurden die Zellen über einen Zeitraum von 16 bis 24 Stunden in Lebendzellbeobachtungen analysiert.

5.5.2 Zeitlicher Verlauf der Mitose

Zur Untersuchung der depletierten Zellen in Lebendzellbeobachtungen, wurden HeLa SS6 Zellen gewählt, die stabil GFP-LCB exprimierten. Die Transfektion der jeweiligen siRNA Oligomere erfolgte zur besseren Identifikation der depletierten Zellen zusammen mit der fluoreszierenden siRNA „siGLO“. Die Glasbodenschalen, in denen die Zellen ausgesät worden waren, wurden mit einem Olympus FV 1000 Mikroskop untersucht, das mit einer Inkubationskammer ausgerüstet war. Diese Kammer ermöglichte Langzeitbeobachtungen der Zellen unter optimalen Wachstumsbedingungen.
Das Minimum der Proteinexpression fiel in das erste Drittel des gefilmten Zeitraums. Pro *Knockdown* wurden 93 bis 139 Zellen während ihres gesamten Teilungsvorgangs beobachtet, indem alle 15 min ein Bild aufgenommen wurde.
Die Lebendzellbeobachtungen bestätigten die zuvor gesammelten Daten. Die Herunterregulation der untersuchten Proteine führte zu einer sehr starken zeitlichen Verzögerung der Mitose (Abb. 51). Kontrollzellen haben eine recht kurze Verweilzeit in der Prometaphase und der Metaphase. Diese im Folgenden auch als „Pro-/Metaphasedauer“ bezeichnete Zeit, ist die Zeit vom Eintritt der Zellen in die Prometaphase bis zu dem Abschluss der Metaphase. Erkennbar ist der Eintritt in die Prometaphase anhand der sich bildenden

Spindel und an den sichtbar kondensierten Chromosomen, die auf den Zerfall der Kernhülle deuten. Das Ende der Metaphase wird erreicht, sobald die Trennung der Chromosomen stattfindet und damit die Anaphase eingeleitet wird.



	0-0,5 h	0,5-1 h	1-2 h	2-3 h	3-4 h	4-5 h	5-7 h	7-16 h
Kontrolle	76 %	16 %	4 %	4 %	0 %	0 %	0 %	0 %
siRNA Clathrin	13 %	18 %	27 %	16 %	10 %	4 %	7 %	5 %
siRNA Dynamin	54 %	46 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
siRNA Auxilin1	16 %	36 %	19 %	19 %	2 %	1 %	5 %	2 %
siRNA GAK	9 %	19 %	27 %	22 %	6 %	3%	6 %	8 %
siRNA Auxilin1+GAK	2 %	0 %	6 %	35 %	27 %	4 %	15 %	11 %

Abb. 51: Dauer der Pro-/Metaphase bei Depletion von Clathrin, Dynamin, Auxilin1 und GAK.

Die Proteinexpression wurde jeweils durch die Kotransfektion der spezifischen siRNA und siGLO herunterreguliert. In Lebendzellbeobachtungen wurden die Zellen über einen Zeitraum von 20 h beobachtet. In diesen Zeitraum fiel die maximale Reduktion der Proteinexpression. Während die Abwesenheit von Dynamin die Dauer der Pro-/Metaphase nur wenig verzögert, hat die Depletion von Clathrin, Auxilin1 und GAK einen signifikanten Effekt auf diese und dadurch auf die Verzögerung des gesamten Zellzyklus. In den parallel verlaufenden Untersuchungen wurden zwischen 93 bis 139 Zellen in zwei unabhängigen Experimenten ausgewertet. Die Datentabelle stellt die relative Häufigkeit der Pro-/Metaphasedauer in den einzelnen *Knockdown*s dar.

Die Untersuchung der Pro-/Metaphasedauer in Kontrollzellen zeigt, dass rund 76 % der Zellen 30 min benötigten, um die Metaphase abzuschließen und in die Anaphase einzutreten. Nach weiteren 30 min kamen nochmals 16 % hinzu, so dass innerhalb einer Stunde seit Eintritt in die Prometaphase 92 % der Kontrollzellen die Metaphase abschließen (Abb. 51).

Dynamin-depletierte Zellen, die anhand der Kotransfektion mit „siGLO“ gut zu identifizieren waren, verweilten unwesentlich länger in der „Pro-/Metaphase“, als die Kontrollzellen. Innerhalb der ersten 30 min konnten 54 % der Dynamin-depletierten Zellen diese durchlaufen. Die übrigen benötigten dafür zwischen 30-60 min.

Ein völlig anderes Bild bot sich, wenn die Expression von Clathrin herunterreguliert wurde (Abb. 51). Bis zu 30 min benötigten nur 13 % der Clathrin-depletierten Zellen für die Pro-/Metaphasedauer. Weitere 18 % der Zellen durchliefen sie zwischen 30-60 min. Innerhalb einer Stunde seit dem Eintritt in die Prometaphase haben somit insgesamt nur ca. 31 % der Clathrin-depletierten Zellen es geschafft, die anschließende Metaphase abzuschließen. Rund ein Drittel der Clathrin-depletierten Zellen (27 %) benötigte zwischen 1-2 h für die Dauer der Pro-/Metaphase, und insgesamt 26 % sogar 2-4 h für ihr Durchschreiten.

Ferner wurde die Herunterregulation der Proteinexpression von Auxilin1 und GAK einzeln und bei Kotransfektion untersucht (Abb. 51). Die Depletion von Auxilin1 führte zu einer starken Verzögerung der Pro-/Metaphase. Im Vergleich zum GAK *Knockdown* und der Kodepletion von Auxilin1 und GAK hatte die Abwesenheit von Auxilin1 jedoch einen geringeren Effekt auf die Dauer der Pro-/Metaphase.

In den ersten 30 min durchschritten ca. 16 % der Auxilin1-depletierten Zellen die Pro-/Metaphase. Nach weiteren 30 min folgten weitere 36 %, so dass bis zur 1 h insgesamt rund 52 % der Auxilin1-depletierten Zellen in die Anaphase eintraten. Für die Pro-/Metaphase benötigten 19 % der Auxilin1-depletierten Zellen 1-2 h, ebensoviele benötigten 2-3 h. Die übrigen 10 % verteilten sich auf einen Zeitraum von 3-16 h. Obwohl der Auxilin1 *Knockdown* zu einer sehr starken Verzögerung der Pro-/Metaphase führte, teilten sich schließlich alle Zellen erfolgreich.

Die Untersuchung der Depletion von GAK ergab, dass in Abwesenheit von GAK die Dauer der Pro-/Metaphase eine sehr starke zeitliche Ausdehnung erfährt. Im Vergleich zum Auxilin1 *Knockdown* verweilten die GAK-depletierten Zellen signifikant länger in der Pro-/Metaphase (Abb. 51). In den ersten 30 min konnten nur 9 % der Zellen die Metaphase abschließen. Weitere 19 % folgten zwischen 30-60 min, so dass rund 28 % der GAK-depletierten Zellen die Pro-/Metaphase in einer Stunde durchlaufen haben. Zur Erinnerung, bei den Kontrollzellen waren es in derselben Zeit 92 %. Die meisten Zellen im GAK *Knockdown* benötigten wesentlich länger. Im Zeitraum von 1-2 h durchschritten 27 % der GAK-depletierten Zellen die Pro-/Metaphase, zwischen 2-3 h waren es 22 %. Die übrigen 23 % benötigten 3-16 h als Verweilzeit.

Die Kodepletion von Auxilin1 und GAK führte zu einer weiteren Verstärkung der Auswirkungen auf die Dauer der Pro-/Metaphase (Abb. 51). Innerhalb 1 h durchschritten diese nur 2,5 %. Weitere 6 % benötigten zwischen 1-2 h, die meisten aber konnten die Meta-

phase erst nach 4 h beenden, davon innerhalb von 2-3 h (35 %) und innerhalb 3-4 h (27 %). Die übrigen 30 % der Zellen benötigten für die Pro-/Metaphase eine Zeit von 4-16 h. Davon verteilten sich 4 % auf einen Zeitraum von 4-5 h, 15 % benötigten 5-7 h und 11 % 7-16 h.

Die Lebendzellbeobachtungen verdeutlichen, dass die Depletion von Clathrin, GAK und die Kodepletion von Auxilin1 und GAK zu einer signifikanten Verzögerung der Mitose führen. Im Vergleich zwischen Clathrin- und GAK *Knockdown* zeichnet sich eine Ähnlichkeit ab. In beiden *Knockdowns* benötigt der Hauptteil der Zellen (je ca. 60 %) 1-3 h für die Pro-/Metaphase. Auffällig ist ebenfalls, dass die Depletion von Auxilin1 zur geringerer Verzögerung der Mitose führt als der GAK *Knockdown*. Werden diese beiden Proteine jedoch parallel herunterreguliert, so ist eine übermäßig lange Pro-/Metaphase von 2-3 h zu beobachten. Hingegen hat die Depletion von Dynamin nur geringe Auswirkung auf die Dauer der Mitose.

5.5.3 Vitalität der Zellen

Während der Lebendzelluntersuchungen der einzelnen *Knockdowns* fiel die Abnahme der Zellvitalität bei Kodepletion von Auxilin1 und GAK auf. Circa 25 % der untersuchten Zellen wiesen eine verminderte Vitalität auf, nachdem sie sich 1,5-10 Stunden in der Pro-/Metaphase aufhielten. Zur Vollständigkeit wurde die Anzahl der mitotischen Zellen bestimmt, die sich in diesen Zustand begaben und sich nicht mehr geteilt haben (Abb. 52).

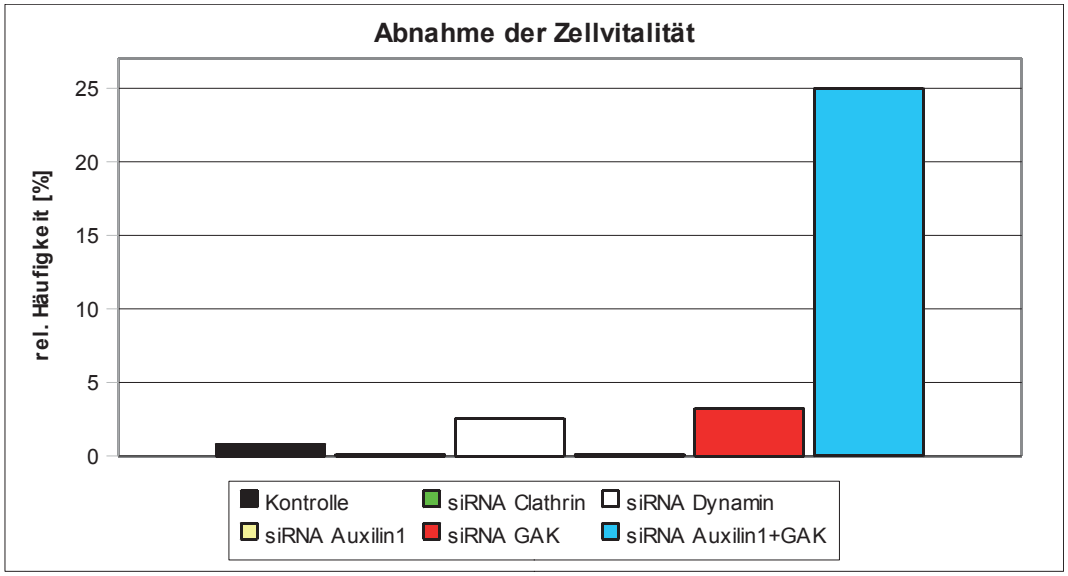


Abb. 52: Vitalität der Zellen bei Depletion der untersuchten Proteine.

In Auxilin1 und GAK kodepletierten Zellen sinkt die Zellvitalität. Während der Clathrin *Knockdown* und der Auxilin1 *Knockdown* keine Auswirkungen auf die Sterberate der mitotischen Zellen haben, steigt diese leicht in Dynamin-depletierten sowie in GAK-depletierten Zellen an.

Der Vergleich der unterschiedlichen *Knockdowns* zeigt, dass die Kodepletion von Auxilin1 und GAK als einzige eine signifikante Abnahme der Zellvitalität erkennen lässt (Abb. 52). Sowohl Kontrollzellen, als auch Clathrin-depletierte und Auxilin1-depletierte Zellen teilen sich. Bei Depletion von Dynamin und GAK sinkt die Anzahl der vitalen Zellen. Im Dynamin *Knockdown* teilen sich 2,5 % der mitotischen Zellen nicht mehr und bei Depletion von GAK haben sich 3,2 % der Zellen nach einer sehr langen Verweilzeit in der Pro-/Metaphase nicht mehr geteilt. Wird die Expression von Auxilin1 und GAK zeitgleich herunterreguliert, so schließen 25 % der Zellen die Zellteilung nicht ab und sterben (Abb. 52). Es ist anzunehmen, dass die Abnahme der Zellvitalität in mitotischen Zellen, in denen Auxilin1 und GAK kodepletiert wurden, mit der extrem langen Verzögerung der Prometaphase zusammenhängt.

5.5.4 Breite der Metaphaseplatte

Trotz der Verzögerung der Mitose, die sich aufgrund der verlängerten Pro-/Metaphase im Clathrin- und im GAK *Knockdown* einstellt, teilen sich die Zellen. Nachdem alle Chromosomen in der Äquatorialebene angeordnet und an die Mikrotubuli gebunden sind, wird die Anaphase eingeleitet. Zu diesem Zeitpunkt sind die Chromosomen in einer sog. Metaphaseplatte angeordnet. In Clathrin-depletierten Zellen ist die Metaphaseplatte breiter als die in Kontrollzellen [Royle 2006]. Aus diesem Grund wurde auch die Breite der Metaphaseplatte in den anderen untersuchten RNAi Experimenten bestimmt (Abb. 53).

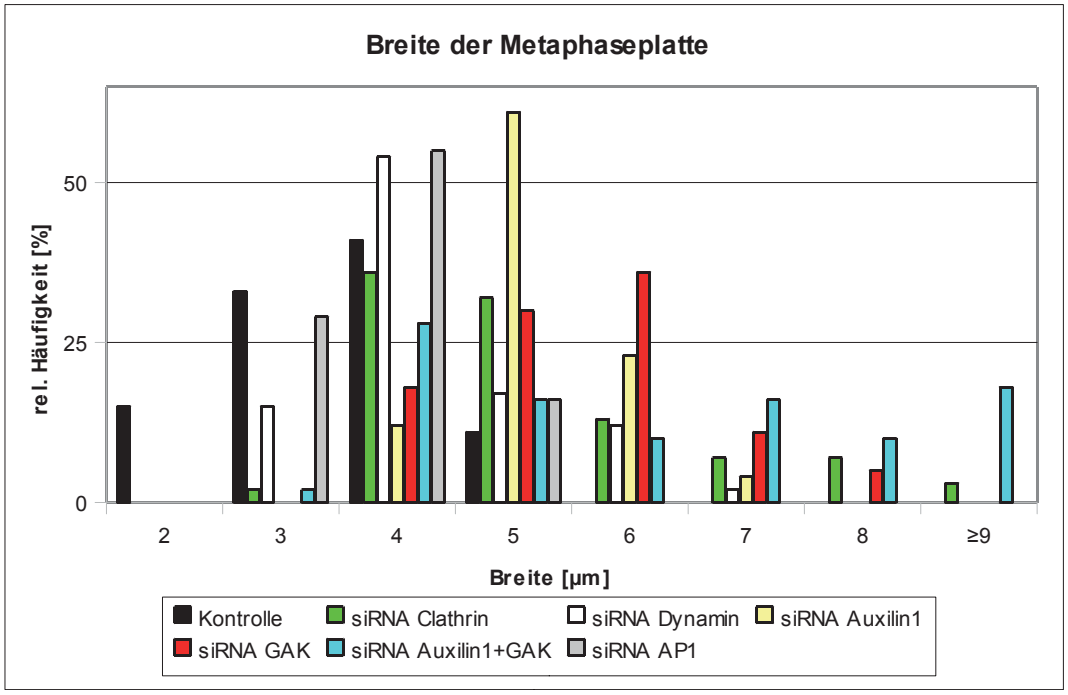


Abb. 53: Breite der Metaphaseplatte bei Depletion der untersuchten Proteine.

In depletierten HeLa SS6 Zellen wurde in der Metaphase die Breite der Metaphaseplatte gemessen. Die Depletion von Dynamin und AP1 wirkt sich auf die Breite der Metaphase nur wenig aus. In Clathrin-depletierten Zellen hingegen wird die Metaphaseplatte deutlich breiter. Die Ausschaltung von Auxilin1 und GAK verstärkt die Zunahme der Breite der Metaphaseplatte. Es wurden zwischen 59 bis 69 Zellen pro Experiment, aus mehreren voneinander unabhängig durchgeführten RNAi Untersuchungen ausgewertet.

Während in Kontrollzellen die meisten Zellen eine Metaphaseplatte der Breite von 3 µm (33 %) und 4 µm (41 %) aufweisen, vergrößert sich diese, wenn die Expression von Clathrin herunterreguliert wird. Der Großteil der Clathrin-depletierten Zellen hat eine Metaphaseplatte von 4 µm (36 %) und 5 µm (32 %), obwohl auch Zellen mit einer 6-9 µm (insgesamt 30 %) breiten Metaphaseplatte zu beobachten waren. Besonders die Depletion von Auxilin1 und GAK führt zu einer signifikant breiteren Metaphaseplatte. Diese beträgt in Auxilin1-depletierte Zellen 5 µm (61 %), wohingegen sie in GAK-depletierten

Zellen auf Werte zwischen 4-6 µm gleich verteilt ist. Im GAK *Knockdown* beträgt die Breite der Metaphaseplatte 4 µm in 18 %, 5 µm in 30 % und 6 µm in 36 % der Zellen. Wird die Expression von Auxilin1 und GAK kodepletiert, so dehnt sich die Breite der Metaphaseplatte weiter aus, so dass Zellen mit einer Metaphase von 7 µm (16 %), 8 µm (10 %) und sogar 9 µm oder mehr (18 %) nachgewiesen wurden. Die Ausschaltung der Expression von AP1 sowie von Dynamin beeinflusst hingegen die Breite der Metaphaseplatte kaum.

5.5.5 Pol zu Pol Distanz

Die Daten der Untersuchung mitotischer Zellen bei Depletion der einzelnen Proteinexpressionen belegen Unterschiede in der Morphologie der Spindel. Die Messung der Distanz der beiden Centrosomen einer Spindel der Metaphase zeigt, dass diese in den untersuchten *Knockdowns* stark variiert (Abb. 54).

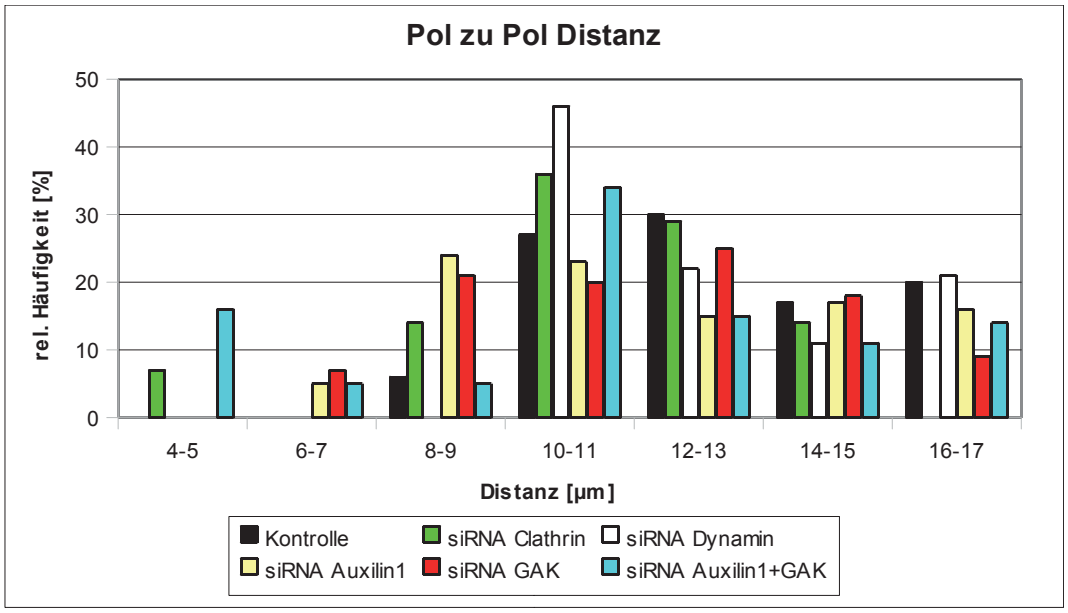


Abb. 54: Poldistanz der Spindel bei Depletion der untersuchten Proteine.

In RNAi Untersuchungen wurde in der Metaphase die Distanz der beiden Pole der mitotischen Spindel zueinander gemessen. Die Depletion von Clathrin, Auxilin1 und GAK führt zu einer Verringerung der Distanz der beiden Centrosomen zueinander. Ausgewertet wurden 95 Zellen in je zwei voneinander unabhängigen Versuchen.

Während in Kontrollzellen die durchschnittliche Distanz zwischen den Centrosomen in den meisten Zellen zwischen 10-11 µm (27 %) und 12-13 µm (30 %) beträgt, treten in Clathrin-depletierten Zellen vermehrt Zellen mit einer geringeren Distanz auf. In Abwesenheit von Clathrin konnte zwischen den Centrosomen eine Distanz von 8-9 µm (14 %) gemessen werden und in 7 % der Zellen sogar eine von 4-5 µm. Ein ähnliches Bild entsteht, wenn die Expression von Auxilin1 und GAK reduziert wird. In diesen Zellen

nimmt die Anzahl der Zellen mit einer geringeren Distanz der Centrosomen im Vergleich zu Kontrollzellen zu. In Auxilin1-depletierten Zellen weisen 24 % der Zellen eine Distanz von 8-9 µm auf. In GAK-depletierten Zellen sind es 21 %, während in nur 6 % der Kontrollzellen die Distanz von 8-9 µm gemessen wurde. Die Kodepletion von Auxilin1 und GAK verstärkt diesen Effekt so, dass in 16 % der kodepletierten Zellen der Abstand zwischen den Centrosomen auf 4-5 µm reduziert ist.

5.5.6 Multipolarität der Spindeln

Zusätzlich zur verlängerten Dauer der Pro-/Metaphase und den morphologischen Unterschieden in der Anordnung der Chromosomen, ergeben sich weitere große Auffälligkeiten beim Vergleich mitotischer Zellen in den untersuchten *Knockdowns*.

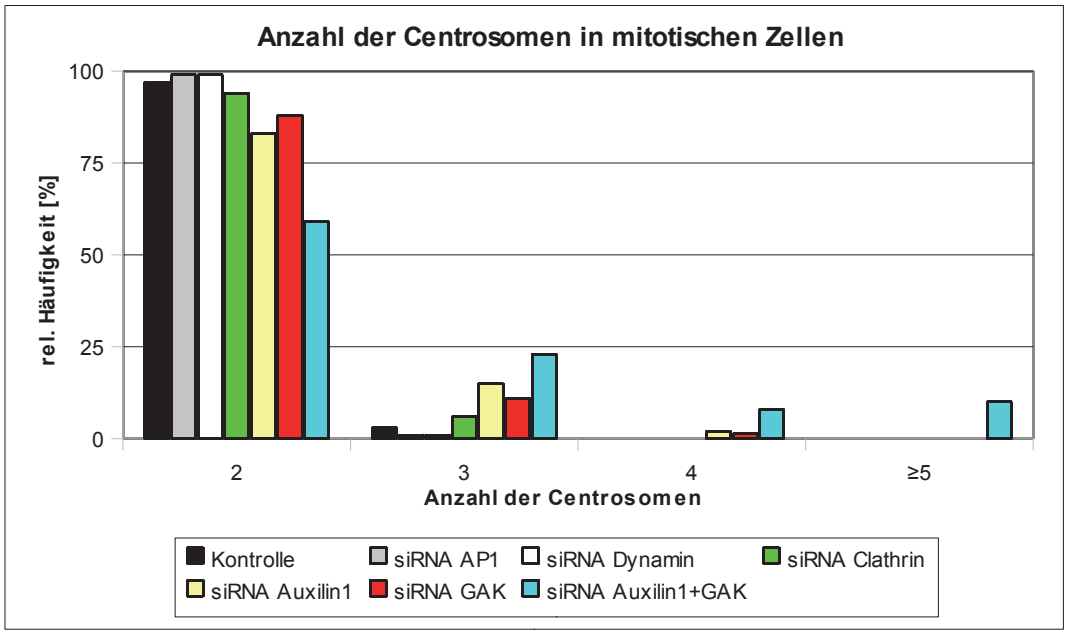


Abb. 55: Anzahl der Centrosomen bei Depletion der untersuchten Proteine.

Die Anzahl der Centrosomen in mitotischen Zellen in den RNAi Untersuchungen wurde bestimmt. In Kontrollzellen, so wie in AP1- und Dynamin-depletierten Zellen sind nur vereinzelt tripolare Spindeln zu finden. In Zellen, in denen die Expression von Clathrin herunter reguliert wurde, erhöht sich die Anzahl an tripolaren Spindeln unwesentlich. Im Gegensatz dazu steigt die Anzahl der Centrosomen in Zellen in denen Auxilin1, GAK oder beide Proteine depletiert wurden. Es wurden zwischen 95 bis 111 Zellen pro Experiment analysiert.

In Kontrollzellen und bei Depletion von AP1 bzw. Dynamin war keine signifikante Zunahme an multipolaren Spindeln nachzuweisen (Abb. 55). Clathrin-depletierte Zellen wiesen 6 % tripolare Spindeln auf. In Zellen, in denen Auxilin1, GAK oder beide Proteine zusammen depletiert wurden, stieg die Anzahl an multipolaren Spindeln signifikant an. Im

Auxilin1 *Knockdown* waren ca. 17 % der Zellen multipolar, von denen 15 % eine tripolare Spindel aufwiesen. In GAK-depletierten Zellen besaßen 11 % der Zellen eine tripolare, und 1 % eine multipolare Spindel. Wurde die Expression von Auxilin1 und GAK kodepletiert, so stieg die Anzahl der multipolaren Spindeln auf insgesamt 41 % an. Von diesen wiesen ca. 23 % eine tripolare Spindel auf, in 8 % der Zellen konnten vier Centrosomen und in 10 % der Zellen mehr als fünf Centrosomen belegt werden.

5.5.7 Zusammenfassung

Die Lebendzellbeobachtungen verdeutlichen, dass die Depletion von Clathrin, GAK und die Kodepletion von Auxilin1 und GAK den zeitlichen Verlauf der Mitose beeinflussen. Während die Abwesenheit von Clathrin zu einer moderaten zeitlichen Verzögerung der Mitose führt, resultiert die Depletion von Auxilin1, GAK und besonders die Kodepletion beider Proteine in einer großen Verzögerung des gesamten Zellzyklus durch die übermäßig lange Pro-/Metaphasedauer.

Die Depletionen von Clathrin bzw. GAK bewirken beide eine zeitliche Verzögerung der Dauer der Pro-/Metaphase. Im Clathrin *Knockdown* ist eine breitere Metaphaseplatte und eine geringere Pol zu Pol Distanz mitotischer Zellen nachzuweisen. Auch bei Depletion von Auxilin1 und GAK kommt es zu Defekten in der Anordnung der Chromosomen in der Äquatorialebene, wodurch diese stundenlang ungeordnet in der Zelle vorliegen.

Im Zusammenhang damit steht die signifikante Abnahme der Zellvitalität in mitotischen Zellen, in denen Auxilin1 und GAK kodepletiert wurden. Durch die extreme Verzögerung der Pro-/Metaphase kann die Mitose in 40 % der Zellen nicht abgeschlossen werden. Zusätzlich führt die Kodepletion von Auxilin1 und GAK zum Anstieg an multipolaren Zellen.

Die Daten verdeutlichen die besondere Bedeutung von Clathrin und GAK für den korrekten Ablauf der Mitose.

5.6 Untersuchung der Bindeverhältnisse von Clathrin an die mitotische Spindel

Der Nachweis der Assoziation von Clathrin mit der Spindel und die Hinweise darauf, dass Clathrin nicht in Form von Clathrin-bedeckten Vesikeln an der Spindel lokalisiert ist, führen zu der Frage, wie Clathrin an den Spindelapparat bindet. Zur Klärung dieser wurden im Folgenden *in vitro* Untersuchungen durchgeführt.

5.6.1 Untersuchung der Bindungsfähigkeit von Clathrin an Tubulin

Mitotisches Zytosol aus synchronisierten HeLa SS6 Zellen wurde parallel zu Interphasen Zytosol aufbereitet, in welchem die Zellen am Übergang von der G1/S Phase des Zellzyklus arretiert waren. Die biochemische Analyse der Präparation der beiden Zytosole auf die Verteilung von Clathrin und Tubulin erfolgte im Western-Blot. Zusätzlich wurden AP1 und AP2 untersucht (Abb. 56).

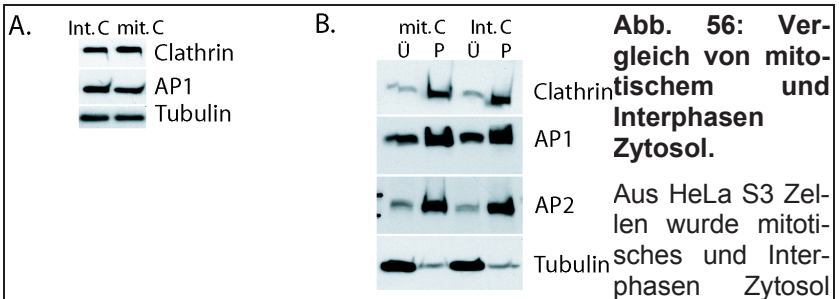


Abb. 56: Vergleich von mitotischem und Interphasen Zytosol. Aus HeLa S3 Zellen wurde mitotisches und Interphasen Zytosol hergestellt und im Western-Blot auf die Verteilung von Clathrin, Tubulin und AP1 untersucht. A. Die Verteilung der Proteine in der Zytosolprobe. B. Die unterschiedliche Verteilung der Proteine nach Zentrifugation.

Die Untersuchung von Clathrin im mitotischen und Interphasen Zytosol verdeutlicht die konstante Expression des Proteins während des gesamten Zellzyklus (Abb. 56 A). Zu ähnlichem Ergebnis führt die Untersuchung der Expression von AP1. Ferner bleibt die Verteilung von Clathrin, AP1 aber auch AP2 nach Zentrifugation in den beiden Zellzyklusphasen gleich (Abb. 56B).

Literaturdaten belegen, dass die Bindung von Clathrin an die Spindel seine N-terminale Domäne erfordert [Royle et al. 2005]. Aus diesem Grund wurde im nächsten Schritt *in vitro* Bindungsexperimente mit der GST-gekoppelten Clathrin terminalen Domäne (GST-TD) durchgeführt. Die GST-TD wurde an GSH-Sepharose Kügelchen gekoppelt und mit mitotischem sowie Interphasen Zytosol inkubiert. Die Daten der Western-Blot Analyse

verdeutlichen, dass die terminale Domäne von Clathrin sowohl im mitotischen, als auch im Interphasen Zytosol an Tubulin bindet (Abb. 57 A). In der *in vitro* Untersuchung ergeben sich dabei keine großen Unterschiede zwischen den Zytosolproben.

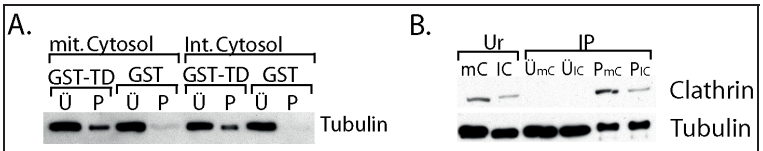


Abb. 57: Proteininteraktion von Clathrin und Tubulin.

Aus HeLa S3 Zellen wurde mitotisches und Interphasen Zytosol hergestellt. A. Die Bindungsfähigkeit von Clathrin GST-TD mit Tubulin wurde in GST-Bindungsversuchen untersucht. Mit der, an GSH-Sepharose Kügelchen gekoppelten GST-TD, wird auch Tubulin unabhängig der Zellzyklusphase gebunden. B. Immunpräzipitation mit einem monoklonalen Antikörper gegen die Clathrin schwere Kette.

Die im nächsten Schritt durchgeführte Immunpräzipitation bestätigte dieses Ergebnis (Abb. 57 B). Mit einem monoklonalen Antikörper gegen die Clathrin schwere Kette konnte neben Clathrin auch Tubulin aus dem mitotischen und dem Interphasen Zytosol gefischt werden. Die Daten zeigen eine Interaktion von Clathrin und Tubulin unter den gegebenen Umständen und weisen darauf hin, dass die Clathrin terminale Domäne zumindest indirekt an Tubulin bindet.

5.6.2 Untersuchung der Bindungsfähigkeit von Clathrin an Mikrotubuli

Im Folgenden wurden Mikrotubuli aus frischen Schweinehirnen präpariert und *in vitro* polymerisiert. Anschließend folgte die Inkubation der polymerisierten Mikrotubuli mit der Clathrin terminalen Domäne, die nicht an GSH-Sepharose Kügelchen gekoppelt war. Durch Zentrifugation bei 37 °C wurden die Mikrotubuli sedimentiert (Abb. 58) und im Western-Blot untersucht.

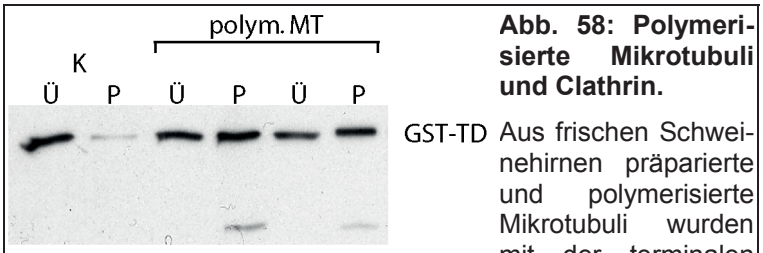


Abb. 58: Polymerisierte Mikrotubuli und Clathrin.

Aus frischen Schweinehirnen präparierte und polymerisierte Mikrotubuli wurden mit der terminalen Domäne von Clathrin inkubiert und anschließend sedimentiert. Der Western-Blot wurde mit einem Antikörper gegen GST markiert. K: Kontrolle; Ü: Überstand; P: Pellet

Ein Teil der polymerisierten Mikrotubuli befand sich nach der Zentrifugation im Pellet. Auch die terminale Domäne von Clathrin wurde im Pellet nachgewiesen, nachdem sie in Gegenwart polymerisierter Mikrotubuli inkubiert wurde. Die Daten zeigen, dass die terminale Domäne von Clathrin eine Bindestelle für Mikrotubuli oder aber Mikrotubuli-assoziierte Proteine (MAPs), die ebenfalls in der Lösung enthalten waren, trägt. Eine

vollständige Trennung der MAPs von der Mikrotubulifraktion konnte mit den gegebenen Möglichkeiten im Labor nicht erreicht werden. Daher konnte nicht mit Sicherheit belegt werden, ob Clathrin mit Tubulin direkt oder indirekt interagiert.

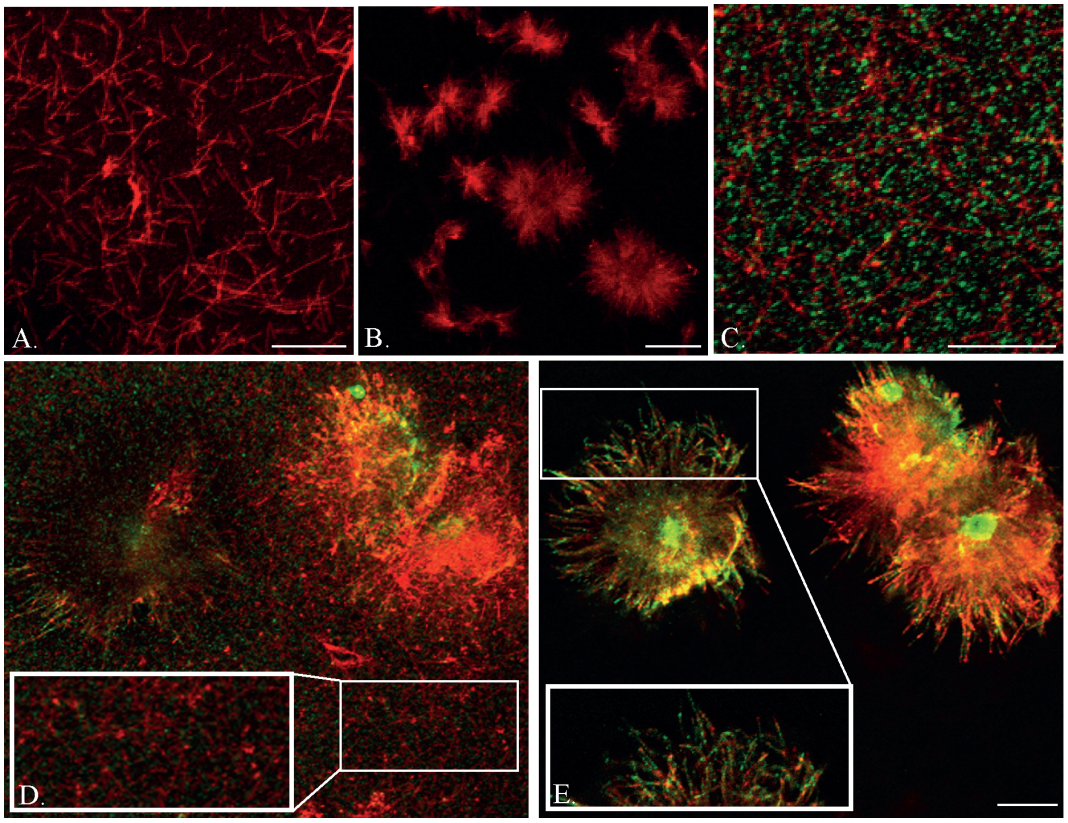


Abb. 59: Polymerisierte Mikrotubuli.

Mikrotubuli wurden mit Cy3-Tubulin inkubiert, 15 min bei 37 °C polymerisiert und auf Deckgläschen zentrifugiert. Zusätzlich zu polymerisierten Mikrotubuli (A) konnten auch Astern (B) beobachtet werden. Wurden die polymerisierten Mikrotubuli mit gereinigtem Clathrin inkubiert und immuncytochemisch gegen Clathrin gefärbt („X22“), so konnte keine direkte Kolokalisation von Clathrin und Tubulin festgestellt werden (C & D vergrößert). Allerdings konnte Clathrin an den Astern beobachtet werden (E). D & E stellen andere Bildebenen derselben Probe dar, wobei die Abbildung D auf die Deckglasebene fokussiert ist, in der Clathrin an den Mikrotubuli nicht zu sehen ist (D vergrößert). Abbildung E stellt die Fokusebene der Astern dar, an diesen Clathrin mit Tubulin kolokalisiert (E vergrößert). Maßstab 10 µm.

Zusätzlich wurden die Mikrotubuli mit Cy3 gekoppeltem Tubulin inkubiert und polymerisiert. Aufgrund der geringen Menge an vorhandenem Cy3-Tubulin konnte dieses nicht für biochemische Untersuchungen benutzt werden. Die polymerisierten Mikrotubuli, die auch MAPs enthielten, wurden dann mit Clathrin inkubiert. Nach anschließender Sedimentation auf Deckgläschen folgte eine immuncytochemische Untersuchung von Clathrin (Abb. 59). Die Mikrotubuli polymerisierten bereits nach 15 min zu unterschiedlich langen Filamenten (Abb. 59 A). Ebenfalls konnten zu Astern zusammengelagerte Mikrotubuli beobachtet werden (Abb. 59 B). Die Inkubation der Mikrotubuli mit Clathrin führt zu zwei unterschiedlichen Beobachtungen. An den Mikrotubuli konnte keine direkte Assoziation von Clathrin

beobachtet werden (Abb. 59 C). An den zu Astern zusammengelagerten Mikrotubuli wurde jedoch eine Färbung von Clathrin nachgewiesen (Abb. 59 E). Zusätzlich konnte das Clathrinsignal im Zentrum der Astern beobachten werden. Diese Daten belegen, dass die Bindung von Clathrin und Tubulin indirekt stattfindet. Clathrin bindet vermutlich an Mikrotubuli-assoziierte Proteine, welche die Bildung von Mikrotubuliastern begünstigen oder stabilisieren.

5.6.3 Untersuchung von isolierten Spindeln

Im folgenden Schritt erfolgte die Untersuchung von isolierten mitotischen Spindeln, die aus synchronisierten HeLa S3 Zellen gewonnen wurden. Nachdem diese auf Deckgläschen gebracht wurden, folgte die immuncytochemische Untersuchung von Clathrin und Tubulin (Abb. 60).

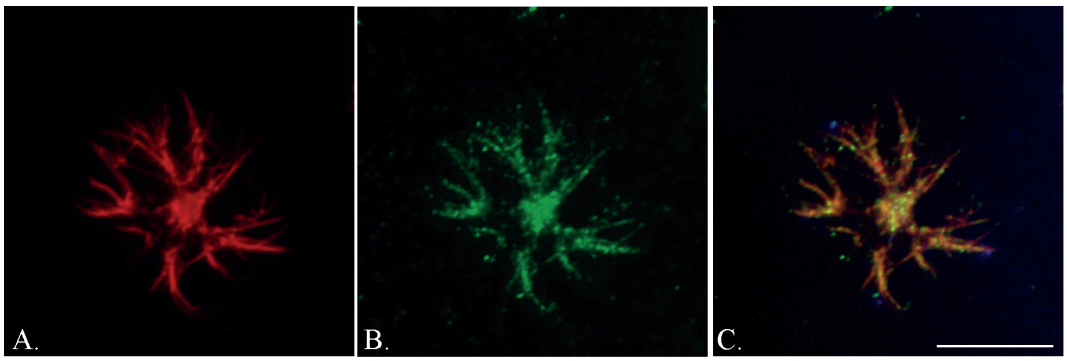


Abb. 60: Isolierte Spindeln.

Aus HeLa S3 isolierte Spindeln wurden auf Deckgläschen zentrifugiert. Die immuncytochemische Färbung von Tubulin (A; „DM1A“) und die Clathrin (D; „R461“) zeigt eine vollständige Kolokalisation der beiden Proteine. In „blau“ erkennt man die Überreste der „Hoechst“-Färbung, mit der die DNA markiert wurde. Die Kolokalisation von Clathrin und den Mikrotubuli lässt auf eine starke Interaktion der beiden Proteine in vivo schließen. Maßstab 10 µm.

Die isolierten Spindeln wurden sowohl von den Chromosomen, als auch von Membranrückständen getrennt (Abb. 60 C). Der Nachweis von Clathrin an den mitotischen Mikrotubuli konnte erbracht werden. Die immuncytochemische Färbung belegt eine Kolokalisation von Clathrin und Tubulin an den isolierten Spindeln. Die Daten weisen auf eine sehr starke Bindung von Clathrin an die Komponenten der Spindel hin. Durch die biochemische und mechanische Präparation der Spindeln, konnte die Interaktion von Clathrin und den Mikrotubuli nicht unterbunden werden. Das Ergebnis bestätigt die Daten von mitotischen Zellen, in denen nach Extraktion des Zytosols vor der Fixierung, die Assoziation von Clathrin mit der Spindel intakt blieb.

5.6.4 Zusammenfassung

Die *in vitro* Untersuchungen zeigen, dass Clathrin indirekt an Tubulin bindet. In Gegenwart von MAPs wurde in GST-Bindungsstudien die Bindung der terminalen Domäne von Clathrin an Tubulin nachgewiesen. Die terminale Domäne von Clathrin sedimentiert ebenfalls mit polymerisierten Mikrotubuli einer Mikrotubulilösung in Gegenwart von MAPs. Mikroskopische Analyse der Sedimentationsversuche unterstützt dieses Ergebnis und bestätigt die indirekte Bindung von Clathrin und Tubulin. An polymerisierten Mikrotubuli wurde kein Clathrin beobachtet, hingegen ist an Mikrotubuliastern die Lokalisation von Clathrin nachgewiesen worden.
Clathrin bleibt auch an Mikrotubuliastern der isolierten Spindeln erhalten, wodurch seine enge Bindung an die Spindel belegt wird.

5.7 Untersuchung der mitotischen Spindel *in vivo*

Die gewonnenen Daten offenbarten eine starke Interaktion von Clathrin und den Mikrotubuli an der Spindel. Um Aussagen über die Bedeutung von Clathrin für die Spindel treffen zu können, wurden mitotische Zellen *in vivo* mit Hilfe unterschiedlicher Reagenzien untersucht. Damit sollte die Interaktion von Clathrin mit der Spindel näher untersucht werden.

5.7.1 Inkubation mitotischer Spindeln mit Nocodazol

Das für die Synchronisation der Zellen verwendete Nocodazol ist ein Reagenz, das die Depolymerisation von Tubulin auslöst [Eilers et al. 1989].

In der Literatur wurde mehrfach beschrieben, dass die Inkubation von Nocodazol zur vollständigen Depolymerisation von Mikrotubuli führt. Aus diesem Grund wurden synchronisierte Zellen mit Nocodazol inkubiert um zu sehen, ob sich die Spindel vollständig abbauen lässt.

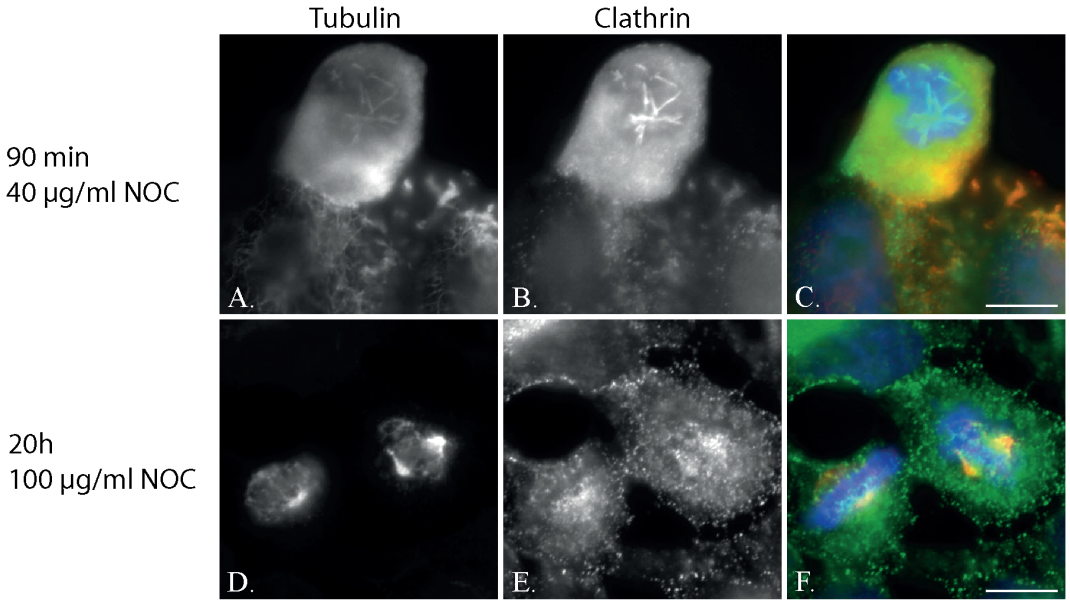


Abb. 61: Inkubation mitotischer Zellen mit Nocodazol.

Synchronisierte HeLa SS6 Zellen wurden mit 90 min mit 40 µg/ml Nocodazol (A-C) bzw. 20 h lang mit 100 µg/ml Nocodazol (D-F) inkubiert und immuncytochemisch gegen Tubulin (A, D, „DM1A“) und Clathrin (B, E, „R461“) gefärbt. C & F stellen die jeweilige Überlagerung der Kanäle dar. Maßstab 10 µm

Die Inkubation mitotischer Zellen erfolgte zunächst 90 min mit 40 µg/ml Nocodazol. Es folgte eine immuncytochemische Untersuchung der Verteilung von Tubulin und Clathrin.
Basierend auf Daten aus der Literatur wurden mitotische Zellen ebenfalls 20 h mit 100 µg/ml Nocodazol inkubiert. In beiden Fällen sind Spindeln erkennbar, deren Morphologie jedoch von der in Kontrollzellen abweicht (Abb. 61). Die zwanzigstündige Inkubation der Zellen mit 100 µg/ml Nocodazol zerstört den Aufbau der Spindeln nicht vollständig. Die mitotischen Fasern erscheinen jedoch ungeordnet. Auffällig ist die bestehende Kolokalisation der fragmentierten Spindel mit Clathrin.

5.7.2 Inkubation mitotischer Zellen mit Latrunculin B

Latrunculin ist ein Aktin-bindendes Toxin, das aus dem Schwamm des Roten Meeres *Latrunculia magnifica* gewonnen wird. Es inhibiert die Aktinpolymerisation sowohl *in vitro, als auch in vivo.* Durch die Unterbindung der Organisation der Mikrofilamente wirkt sich-Latrunculin negativ auf die intrazellulären Prozesse aus, für die F-Aktin von Bedeutung ist. So hat die, durch die Inkubation mit Latrunculin B, ausgelöste Depolymerisation von Aktin Auswirkungen auf die Clathrin-vermittelte Endozytose. Die Abwesenheit von F-Aktin führt zur Bildung von Ansammlungen von AP2 und damit zu einer Reduktion von Clathrin-bedeckten Einstülpungen und Vesikeln [Boucrot et al. 2006]. Allerdings ist die Depolymerisation von Aktin nicht essentiell für Bildung der Clathrin-bedeckten Vesikel, sondern hat Auswirkungen auf ihren Transport und die Verteilung der Clathrin-bedeckten Einstülpungen an der Plasmamembran.
Obwohl bekannt ist, dass Aktinfilamente keine direkte Funktion beim Aufbau der Spindel übernehmen [Woolner et al. 2008], gibt es Hinweise, dass die Clathrin leichte Kette indirekt mit F-Aktin assoziiert ist [Poupon et al. 2008; Wilbur et al. 2008]. Aus diesem Grund wurde im Folgenden untersucht, inwieweit die Depolymerisation von F-Aktin Auswirkungen auf die Morphologie der Spindel und die Assoziation von Clathrin an dieser hat.
Die zu diesem Zweck mit RFP-Aktin transient transfizierten und synchronisierten HeLa SS6 Zellen wurden 30 min mit 0,25 µM Latrunculin B inkubiert, fixiert und immuncytochemisch gegen Clathrin gefärbt. Die Inkubation mit Latrunculin B führte zur Depolymerisation von F-Aktin und zum Kollaps der Mikrofilamente (Abb. 62 D). Direkte Folge davon stellte die veränderte Form der Zellen dar, die ihre Spannkraft verloren und abgerundeter erschienen.

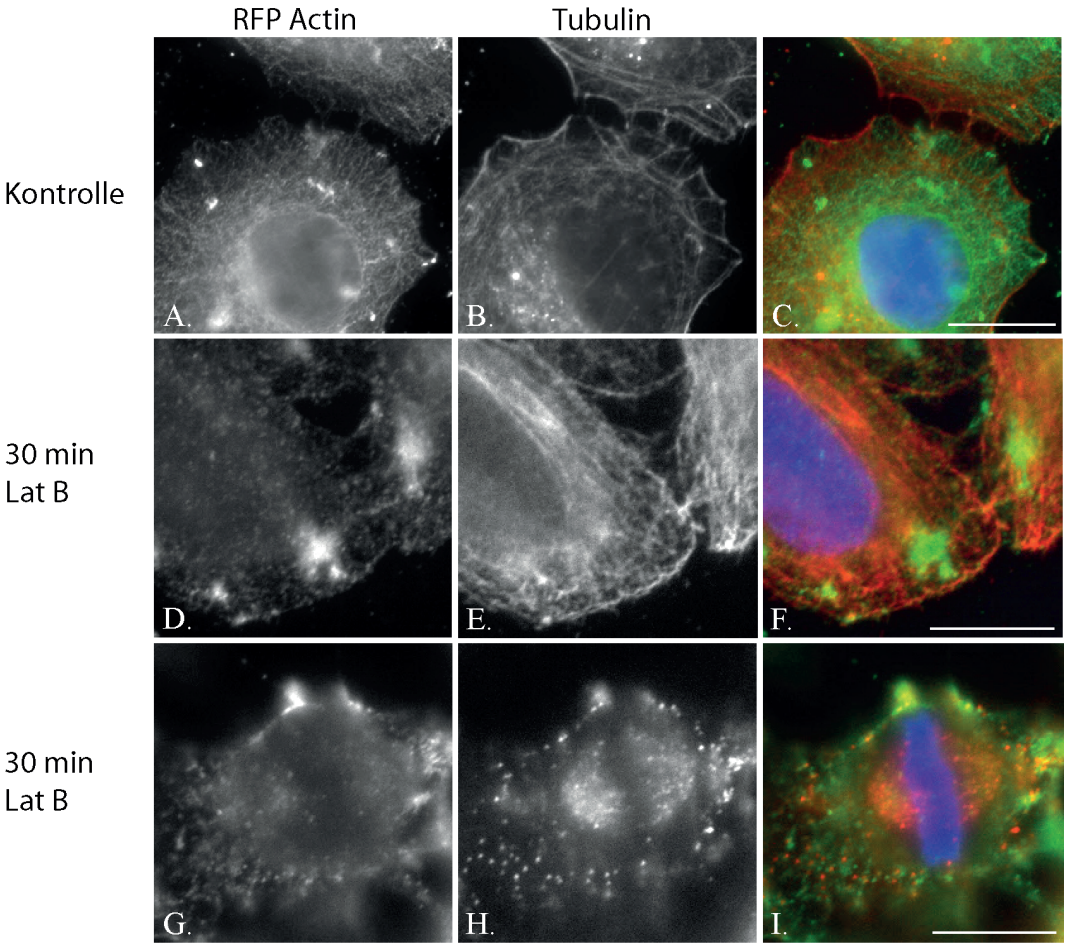


Abb. 62: Inkubation mitotischer Zellen mit Latrunculin B.

HeLa SS6 Zellen wurden mit RFP-Aktin transfiziert und gegen Tubulin (B, E; „DM1A“) und Clathrin (H; „R461“) immuncytochemisch gefärbt. In der Kontrolle (A-C) sind Aktinfilamente und Mikrotubuli in der Interphase zu erkennen. Die Inkubation mit Latrunculin B führt zur Depolymerisation der Aktinfilamente (D). Die Mikrotubuli bleiben unverändert (E). Die Inkubation von Latrunculin B auf mitotische Zellen beeinträchtigt die Spindel nicht. Clathrin (H) bleibt an der Spindel erhalten. Maßstab 10 µm.

Für die Morphologie der Mikrotubuli konnten nach Inkubation mit Latrunculin B keine Veränderungen dokumentiert werden (Abb. 62 E). Auch in mitotischen Zellen blieb die Spindel weiterhin erhalten, mit der Clathrin assoziiert war (Abb. 62 H). Ebenso wenig hatte die Inkubation mit Latrunculin B Auswirkungen auf die Form der mitotischen Zellen. Aufgrund dieser Daten kann eine direkte Verbindung zwischen der Funktion von Aktin und der Assoziation von Clathrin an der Spindel ausgeschlossen werden.

5.7.3 Inkubation mitotischer Zellen mit BFA

Brefeldin A (BFA) ist ein Metabolit aus dem Pilz *Penicillium brefeldianum,* das mit dem retrograden Transport vom Golgi-Apparat zum Endoplasmatischen Reticulum (ER) interferiert. Durch die Inhibition von Arf1 Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (Arf1-GEF) verhindert BFA die Bindung der GTPase Arf1 an die Golgi-Membran.

Es ist bekannt, dass die Rekrutierung von AP1 und den GGAs an die Membran des TGN von Arf1 abhängig ist [Traub et al. 1993; Puertollano et al. 2001b]. Durch die Dynamik der Proteinhüllen an der Golgi-Membran führt eine Blockierung der Rekrutierung von AP1 und den GGAs durch BFA zu einer raschen Umverteilung der Hüllbestandteile ins Zytosol [Stamnes & Rothman 1993; Traub et al. 1993; Puertollano et al. 2001b]. So löst die BFA-Inkubation die Umverteilung von AP1 und Clathrin aus, so dass deren perinucläere Signale verschwinden (Abb. 63 D & E).

Die Assoziation von AP1 und Clathrin mit der Spindel könnte möglicherweise mit der Verteilung der Golgi-Apparat Komponenten auf die Tochterzellen in der Mitose zusammenhängen. Um dies zu prüfen, wurden synchronisierte HeLa SS6 Zellen mit BFA inkubiert. Die Einwirkung von BFA auf den Spindelapparat ließ jedoch keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung von AP1 und Clathrin erkennen (Abb. 63 J &K). Die Lokalisation der beiden Proteine an der Spindel blieb unverändert, ebenso wie die Morphologie der mitotischen Zellen.

Diese Daten zeigen, dass die Assoziation von Clathrin und AP1 mit der Spindel nicht im Zusammenhang mit der Vererbung der Komponenten des Golgi-Apparates auf die beiden Tochterzellen während der Mitose im Zusammenhang steht. Diese These wird unterstützt durch die Untersuchung weiterer Golgi-Proteine, wie GGA oder GM 130, für die keine Lokalisation an der Spindel nachgewiesen werden konnte (vgl. Kapitel 5.2.6).

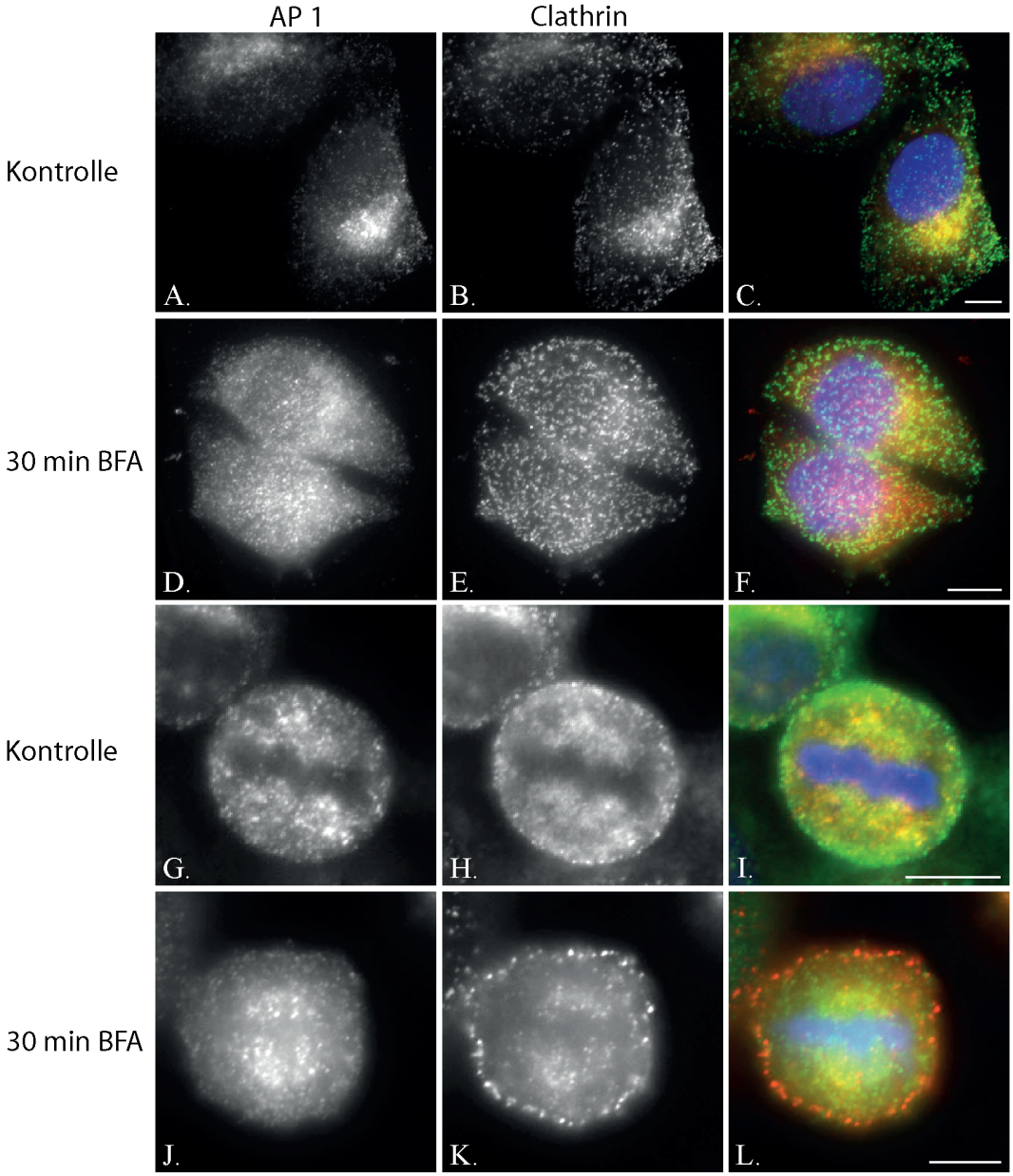


Abb. 63: Inkubation von BFA auf Zellen der Interphase und der Mitose.

HeLa SS6 Zellen wurden 30 min mit 2 µg/ml BFA inkubiert und immuncytochemisch gegen AP1 (A, D, G & J; „100/3“) und Clathrin (B, E, H & K; „R461“) gefärbt. Kontrollen (A+B und G+H). 30 min BFA Inkubation (D+E und J+K). C, F, I & L sind die Überlagerungen der einzelnen Kanäle. Maßstab 10µm.

5.7.4 Inkubation mitotischer Zellen mit Butanol

Durch die Zugabe primärer Alkohole wird ein schneller Abbau der Clathrin-bedeckten Einstülpungen erzielt und dadurch die Clathrin-vermittelte Endozytose gestoppt [Boucrot et al. 2006]. 1-Butanol verhindert die Bildung von Clathrin-bedeckten Einstülpungen und Vesikeln. Dies kann in der blockierten Internalisation von Transferrin beobachtet werden

[Boucrot et al. 2006]. Der Einfluss primärer Alkohole auf die Clathrin-vermittelte Endozytose ist reversibel. Bisher sind jedoch keine Daten über die Einwirkung primärer Alkohole auf mitotische Zellen bekannt. Daher wurden im Folgenden synchronisierte Zellen mit 1-Butanol inkubiert und die Effekte auf Clathrin an der Spindel untersucht.

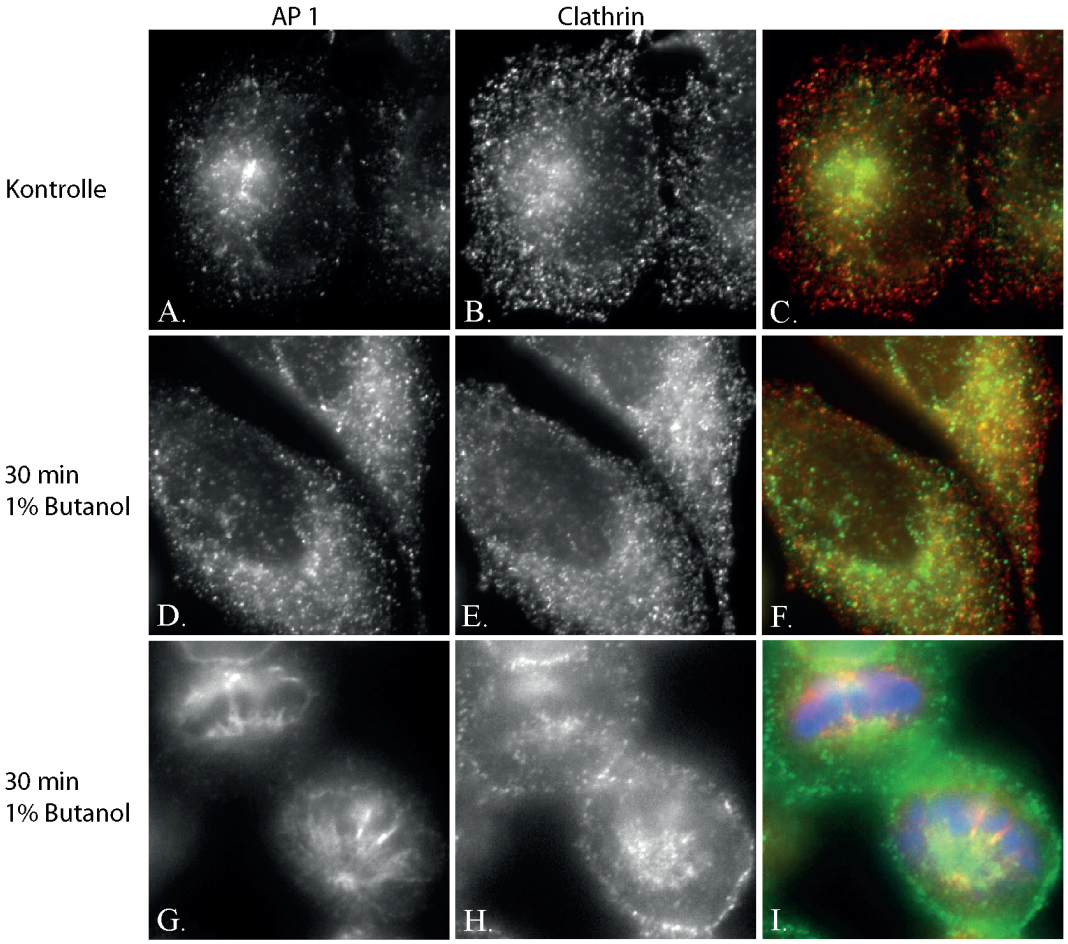


Abb. 64: Inkubation von Butanol auf Zellen in der Interphase und in der Mitose.

HeLa SS6 Zellen wurden 30 min mit 1 % Butanol inkubiert und immuncytochemisch gegen AP1 (A, D; „100/3“) und Clathrin (B, E; „R461“) gefärbt. Die mitotischen Zellen wurden gegen Tubulin (G; „DM1A“) und Clathrin (H; „R461“) gefärbt. Kontrollen (A-C). 30 min 1 % Butanol-Inkubation (D-I). C, F, I & L sind die Überlagerungen der einzelnen Kanäle. Maßstab 10 µm.

Während einer 30 min Inkubation von HeLa SS6 Zellen mit 1 % 1-Butanol nimmt die Anzahl der Clathrin-positiven Strukturen in Interphasezellen ab. Die punktierte Markierung von AP1 und auch die von Clathrin werden feiner (64 D & E). Die Form der Zellen verändert sich jedoch nicht.

Die Inkubation mitotischer Zellen mit 1-Butanol zeigt keine Auswirkungen auf den Spindelapparat (64 G & H). Die Form der Spindel bleibt erhalten und auch die Bindung von Clathrin an die Spindel bleibt unverändert. Die Daten zeigen, wie schon die Elektronenmikroskopie, dass Clathrin nicht über Membranen mit der Spindel verbunden ist.

5.7.5 Inkubation mitotischer Zellen in Sucrose

In der Interphase führen hypertonische Bedingungen zu einer unkontrollierten Assoziation von Clathrin an Membranen [Heuser & Anderson 1989]. Aus diesem Grund wurde der Einfluss von hypertonischen Bedingungen auf die Spindel und auf die Verteilung von Clathrin an der Spindel untersucht.

Synchronisierte HeLa Zellen, die das GFP-LCB Fusionsprotein stabil exprimierten, wurden in einer Zeitreihe in 0,4 M Sucrose inkubiert. Eine anschließende Immunfluoreszenzfärbung gegen α-Tubulin sollte Rückschlüsse auf die Spindelmorphologie liefern. Wie in Abbildung 65 zu erkennen ist, verändert sich unter hypertonischen Bedingungen das Clathrinsignal enorm. Bereits nach 2 min führt die Inkubation in 0,4 M Sucrose zu einer Aggregation des Clathrins an der Spindel (Abb. 65 D). Die Clathrinpunkte werden zunehmend größer und verlieren nach ca. 15 min Inkubation in Sucrose ihre Bindung an die Spindel, so dass keine Lokalisation von Clathrin an der Spindel mehr festgestellt werden kann (Abb. 65 G).

Die hypertonische Lösung zeigt jedoch keine Auswirkungen auf die Mikrotubuli der Spindel. Nach 15 min Inkubation in 0,4 M Sucrose konnte lediglich die Auflösung einiger Mikrotubuli-Chromosomen-Bindungen festgestellt werden (Abb. 65 H).

Zur Unterstützung dieser Ergebnisse wurde in Lebendzellbeobachtungen die zeitabhängige Dissoziation von Clathrin von der Spindel in hypertonischen Bedingungen durchgeführt. Dazu wurden GFP-LCB exprimierende HeLa Zellen auf Glasbodenschalen ausgesät und synchronisiert. Diese wurden anschließend am Olympus FV 1000 Mikroskop analysiert.

In Lebendzelluntersuchungen konnte eine sehr schnelle Reaktion der mitotischen Zellen auf die Zugabe der 0,4 M Sucroselösung beobachtet werden. Sekunden nach Zugabe der Sucroselösung veränderten die mitotischen Zellen ihre Form und zogen sich, aufgrund der veränderten Osmolarität, zusammen. Clathrin, das bis zur Zugabe der Sucroselösung sehr gut an der Spindel detektierbar war, verlor bereits in den ersten Minuten der Inkubation seine homogene Verteilung an der Spindel. Die Zugabe der hypertonischen Lösung führte zur Entstehung distinkter unregelmäßig verteilter Clathrinstrukturen unterschiedlicher Größe, die zunächst noch innerhalb der Spindel verteilt scheinen und im Verlauf der Inkubation von der Spindel dissoziierten. Nach 15 min Inkubation mit der Sucroselösung konnte kein Clathrin mehr an der Spindel lokalisiert werden (Abb. 66 A und Videomaterial auf der CD).

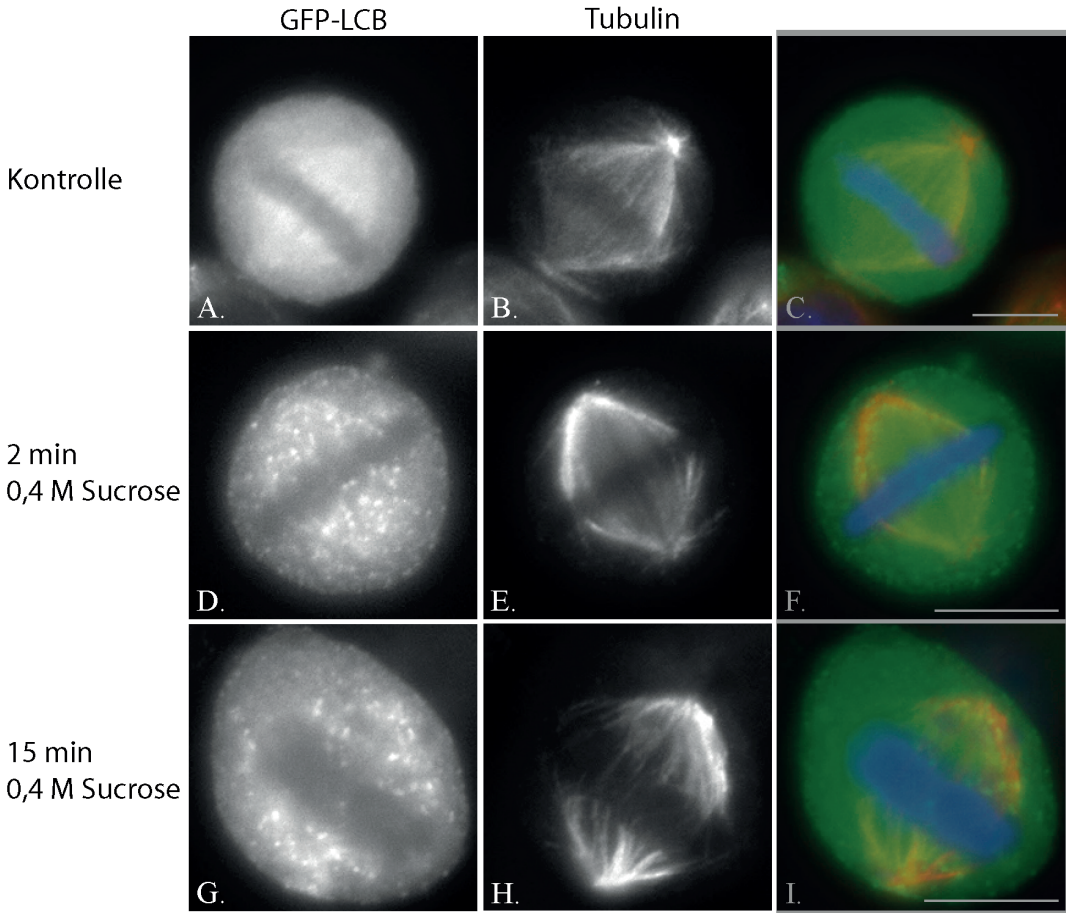


Abb. 65: Inkubation mitotischer Zellen mit Sucrose.

HeLa SS6 Zellen, welche GFP-LCB stabil exprimierten, wurden synchronisiert und mit 0,4 M Sucrose 2 min und 15 min inkubiert. Anschließend wurden sie fixiert und immuncytochemisch gegen Tubulin markiert. Während die Spindel erhalten bleibt (Tubulin, B, E, H; „DM1A"), fällt Clathrin zeitabhängig von der Spindel (A, D, G). Maßstab 10 µm.

Das Entfernen der Sucroselösung durch zweimaliges Waschen resultierte in einer vollständigen Rückkehr des Clathrins an die Spindel (Abb. 66 B). Die Erholungszeit dauerte ca. 10-15 min bis zur erneuter Lokalisation von Clathrin an der Spindel in ihrer ursprünglichen Verteilung. Nach dieser Zeit war Clathrin wieder vollständig zu seinem Ausgangszustand zurückgekehrt und war entlang der Spindel verteilt. Nach kurzer Zeit erfolgte die Vollendung der Mitose und die Zellen teilten sich.

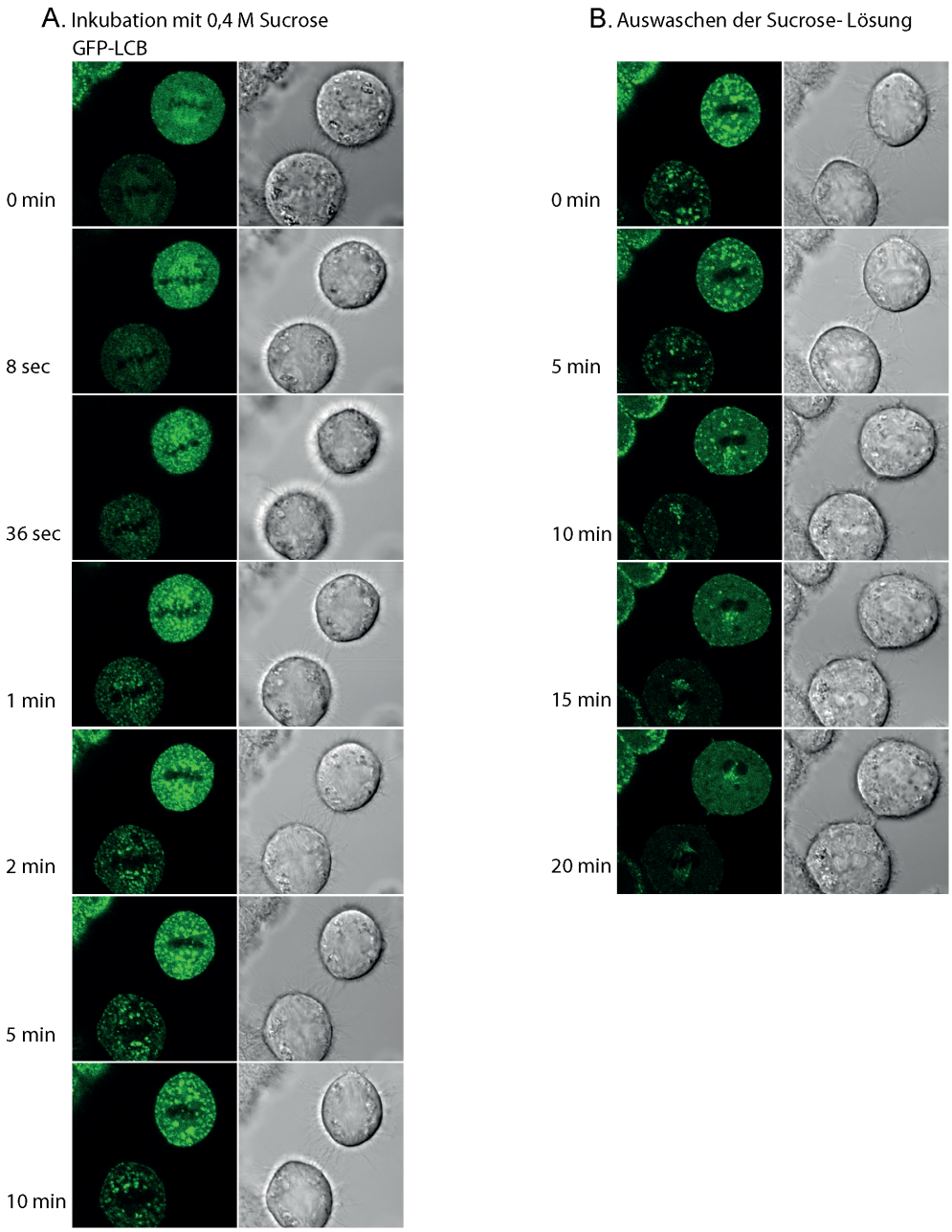


Abb. 66: Einfluss von Sucrose auf Clathrin an der Spindel.

A. Sofort nach Zugabe von 0,4 M Sucrose, verändert sich die Verteilung von Clathrin an der Spindel und nach ca. 5 min fällt Clathrin vollständig von dieser ab. Nach 10 min Inkubation ist kein Clathrinsignal mehr an der Spindel zu erkennen. B. Der Sucroseeffekt auf das Clathrin an der Spindel ist reversibel. Nach 20 min ist das Clathrinsignal erneut an der Spindel zu beobachten. Die Zellen bleiben teilungsfähig.

Des Weiteren wurde in Lebendzellbeobachtungen die Auswirkung von 0,4 M Sucrose auf den Spindelapparat selbst untersucht. Zu diesem Zweck wurde GFP-Tubulin transient in HeLa SS6 Zellen transfiziert und am Olympus FV 1000 Mikroskop untersucht (Abb. 67).

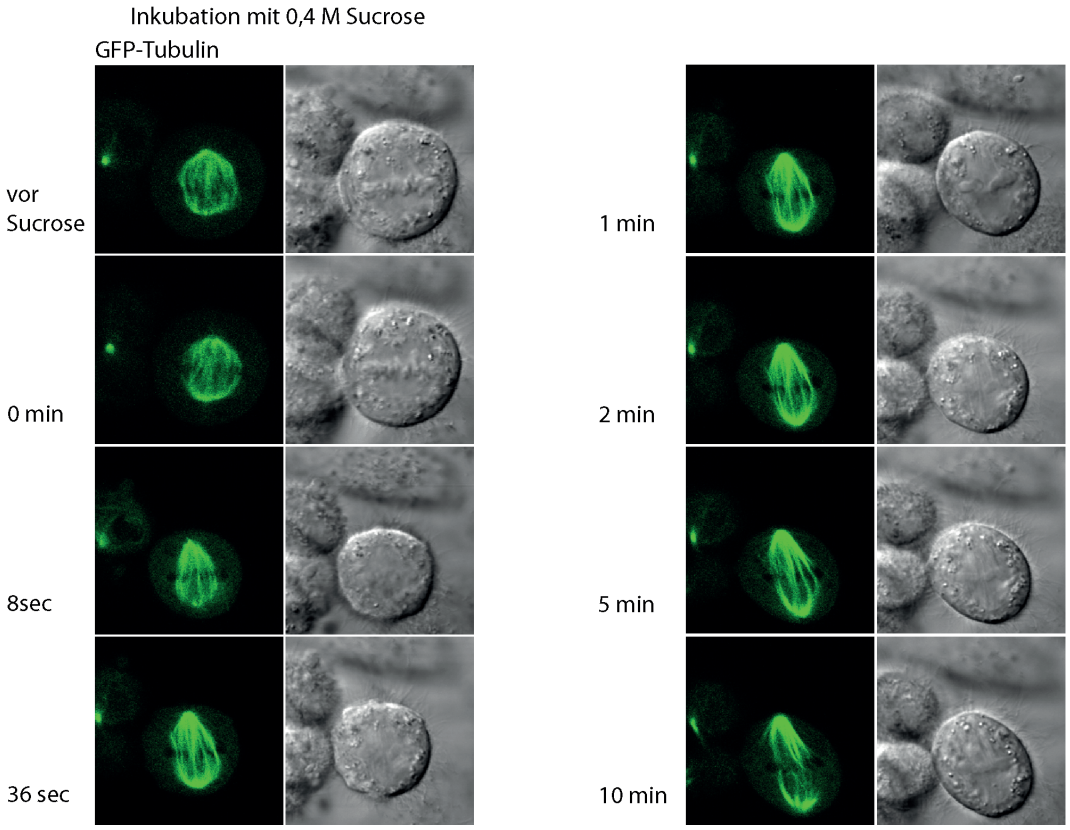


Abb. 67: Einfluss von 0,4 M Sucrose auf die Spindel in HeLa Zellen.

HeLa SS6 Zellen wurden mit GFP-Tubulin transient transfiziert und synchronisiert. Während der Inkubation in 0,4 M Sucrose dissoziiert Tubulin nicht von der Spindel. Im Gegensatz zu Clathrin, bleiben die mitotischen Fasern in ihrer ursprünglichen Form.

Im Gegensatz zu Clathrin, das bereits nach wenigen Minuten seinen Platz an der Spindel verließ und Aggregate bildete (Abb. 65 & 66), blieben die Mikrotubuli der Spindel vollständig in ihrer Form bestehen (vgl. auch Videomaterial auf der CD). Nach einer Inkubationszeit von ca. 5 min schienen manche der mitotischen Fasern jedoch die Bindung zu den Chromosomen zu verlieren.

5.7.6 Einwirkung von Kälteschock auf mitotische Zellen

In diesem Ergebnisteil wurde versucht, die Depolymerisation mitotischer Spindeln durch Kälteschock zu erreichen. Aus Literaturdaten ist bekannt, dass die Polymerisation von Tubulin temperatursensitiv abläuft [Brinkley & Cartwright 1975].

Zu diesem Zweck wurden HeLa SS6 Zellen bis zum Aufbau einer vollständigen Spindel synchronisiert. Die Zellen wurden sofort mit 4 °C kaltem Medium versetzt und auf Eis inkubiert. Das Erstellen einer Zeitreihe belegte die Depolymerisation der Spindeln. Vor der Fixierung der Zellen erfolgte die Extraktion der zytosolischen Bestandteile mit einer kalten Triton-haltigen Lösung. Durch die Extraktion wurde das depolymerisierte Tubulin, das im Zytosol vorhanden war, aus den Zellen gelöst, wodurch der Hintergrund in der anschließenden Immunfluoreszenz herabgesetzt wurde. Die Kälteschockuntersuchungen zeigen einen generellen Unterschied im Verhalten vom Tubulin in den Zellzyklusphasen (Abb. 68).

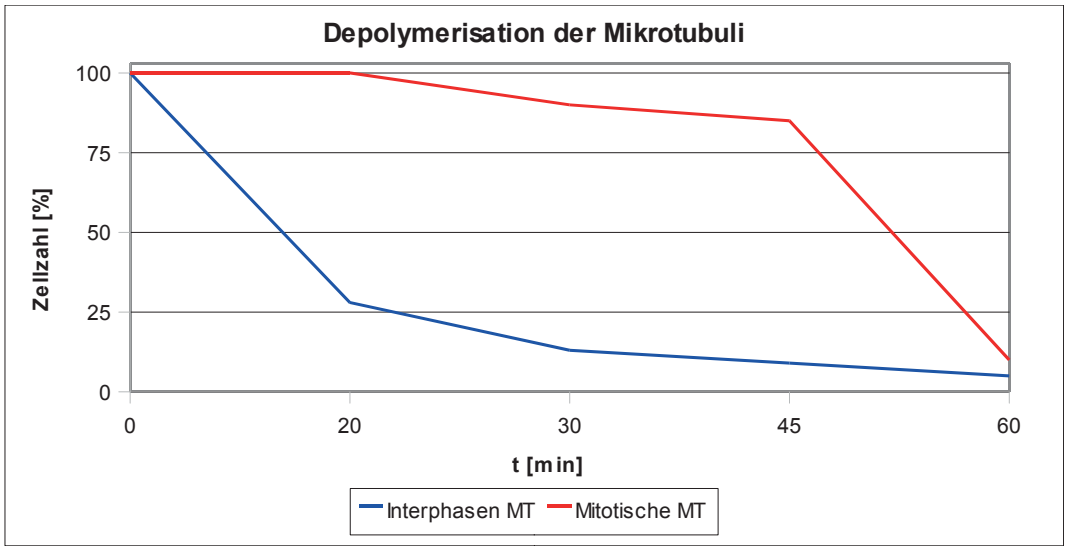


Abb. 68: Kälteinduzierte Depolymerisation der Mikrotubuli in Interphase und Mitose.

Die Zahl der Zellen mit Mikrotubuli bzw. die Zahl der Zellen mit einer intakten Spindel wurde in Abhängigkeit von der Kälteinkubation bei 4 °C dargestellt. Während die Mikrotubuli der Interphase sehr schnell auf die Kälteinkubation reagieren und depolymerisiert werden, sind Spindeln sehr stabil und werden erst nach ca. 1 h vollständig abgebaut.

In der Interphase depolymerisieren die Mikrotubuli wesentlich schneller als in der Mitose (Abb. 68). Bereits nach einer Viertelstunde Kälteinkubation sind die Mikrotubuli in den meisten Zellen depolymerisiert. Nach 20 min sind in nur ca. 22 % der Zellen Mikrotubuli zu beobachten. Ab diesem Zeitpunkt verläuft die Depolymerisation langsamer ab. Nach einer Stunde Inkubation bei 4 °C sind in über 90 % der Interphasezellen alle Mikrotubuli

depolymerisiert (Abb. 68). In einigen Zellen bleiben sehr dicke Mikrotubulibündel bestehen (Abb. 69 A). Die Depolymerisation der Mikrotubuli verändert die Morphologie der Zellen nicht. So bleibt auch Clathrin in Interphasezellen in seiner natürlichen Verteilung (Abb. 69 B).

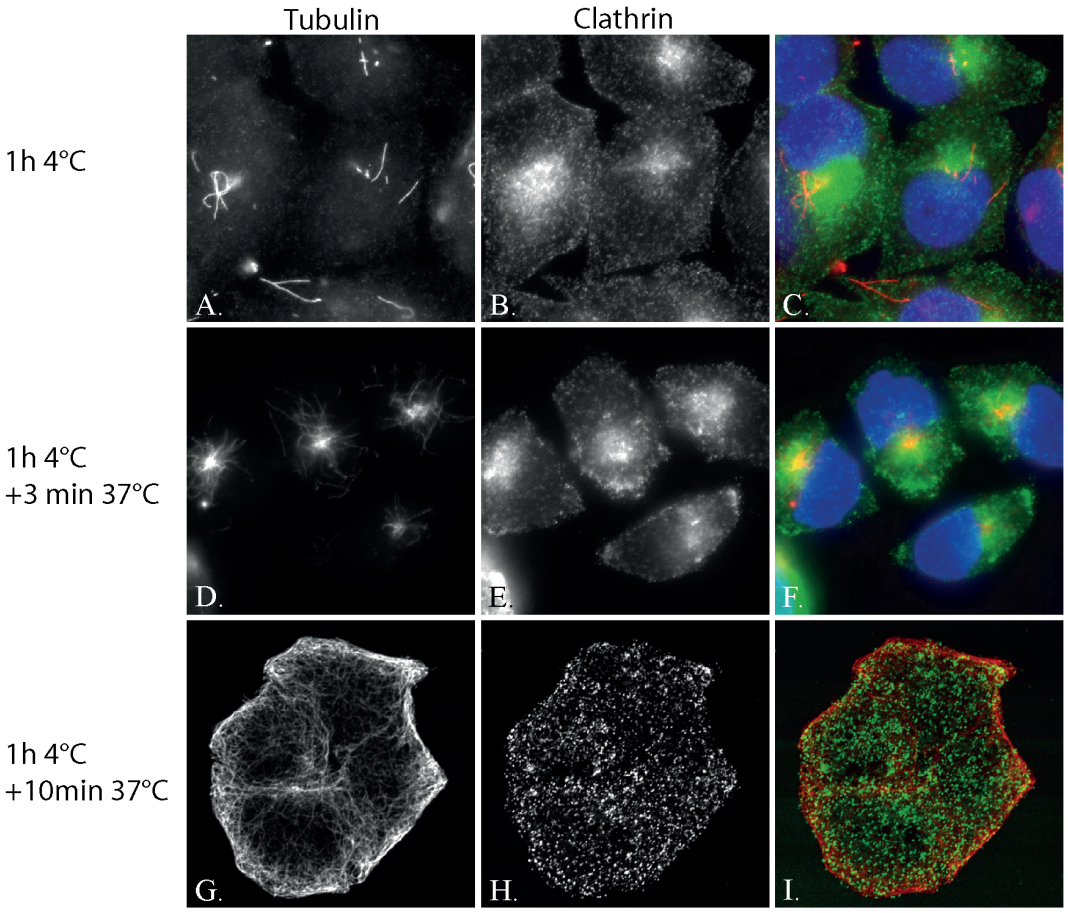


Abb. 69: Auswirkungen der Inkubation von 4 °C kaltem Medium auf Clathrin und Tubulin in Interphasezellen.

HeLa SS6 Zellen wurden 1 h mit 4 °C kaltem Medium inkubiert (A-C) und 3 min mit 37 °C warmen Medium inkubiert (D-F). Nach 10 min Inkubation mit 37 °C warmen Medium ist die Polymerisation der Mikrotubuli vollständig abgeschlossen (G-I). Die Zellen wurden vor der Fixierung extrahiert und immuncytochemisch gegen Clathrin (A, D, G; „R461“) und Tubulin (B, E, H; „DM1A“) gefärbt. Maßstab 10 µm.

Die Spindel ist ein sehr stabiles Gebilde, das wesentlich resistenter gegenüber dem Kälteschock ist. Erst nach ca. einer Stunde Inkubation bei 4 °C sind die mitotischen Fasern in fast allen Zellen depolymerisiert (Abb. 68). Übrig bleiben nur die punktförmigen Centrosomen, mit denen z. T. α-Tubulin assoziiert ist (Abb. 70 B). Die Centrosomen sind nun in die unmittelbare Nähe zur Metaphaseplatte gerückt (Abb.70 C) und in manchen Zellen sind kleine Astern aufgrund der Überbleibsel der Mikrotubuli zu erkennen. Auch Clathrin ist an den Centrosomen noch rudimentär vorhanden (Abb. 70 A).

Die Depolymerisation der Mikrotubuli durch die Abkühlung der Zelle ist reversibel. Wird das kalte Medium durch ein auf 37 °C vorgewärmtes DMEM ersetzt, so polymerisieren die Mikrotubuli erneut. Nach 2-3 Minuten sind die ersten Mikrotubuliaster sowohl an der Spindel, als auch in Interphasezellen zu sehen (Abb. 69 E).

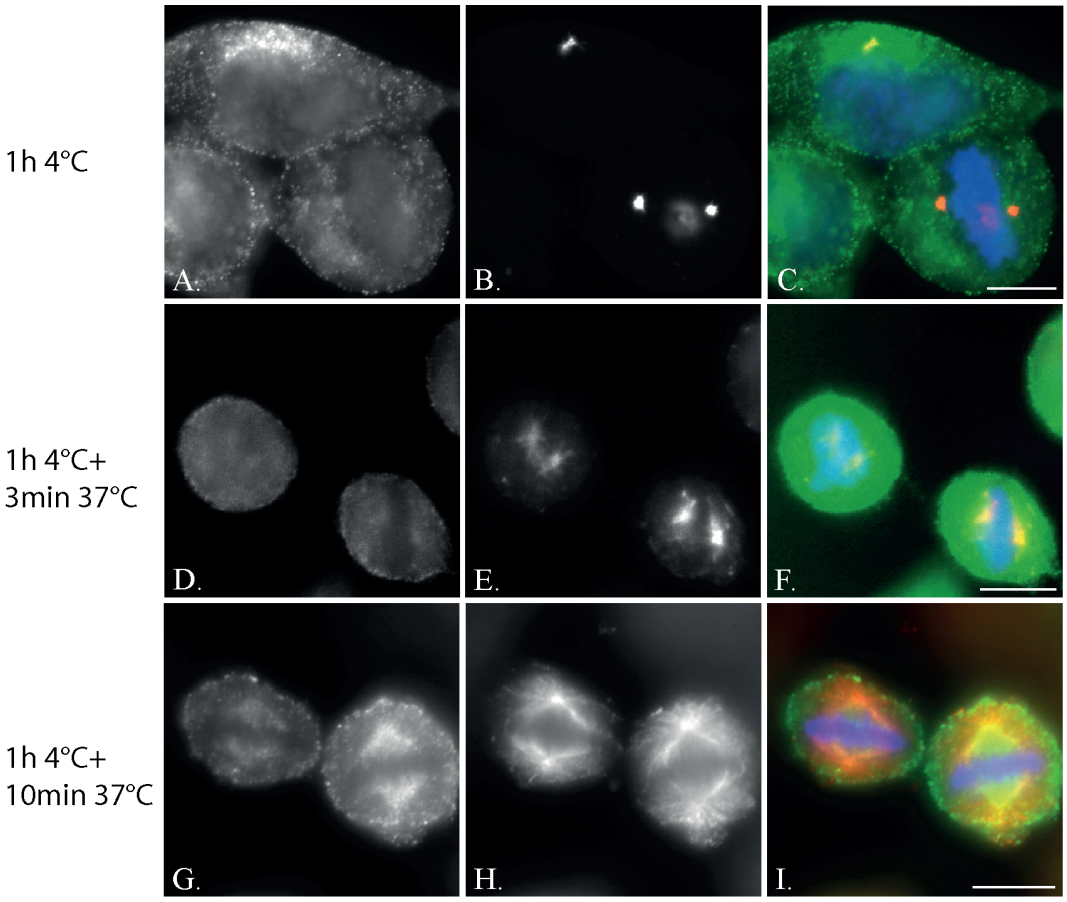


Abb. 70: Auswirkungen der Inkubation von 4 °C kaltem Medium auf Clathrin und Tubulin in mitotischen Zellen.

HeLa SS6 Zellen wurden synchronisiert und 1 h mit 4 °C kaltem Medium inkubiert (A-C). Man erkennt die mitotischen Zellen alleine anhand der Metaphaseplatte der Chromosomen. Die Zellen wurden 3 min mit 37 °C warmen Medium aufgewärmt (D-F). Nach 10 min Inkubation mit 37 °C warmen Medium ist die Polymerisation der Spindel abgeschlossen. Maßstab 10 µm.

Die Spindel erholt sich schnell, wobei der Aufbau überwiegend von den Centrosomen her ausgeht. Nach 3 min sind bereits große Mikrotubuliaster, die von den Centrosomen entspringen, zu sehen (Abb. 70 E). Clathrin scheint langsamer seinen Platz an der Spindel zu finden. In Abbildung 70 D ist nach 3 min Erwärmung noch kaum Clathrin an den neuen Aster zu erkennen. Nach 10 min Wärmeinkubation ist die Polymerisation der Mikrotubuli abgeschlossen und vollständige Spindeln mit Kinetochor- und Astral-Mikrotubuli (Abb. 70 H) sind nachzuweisen. Auch Clathrin ist wieder mit der Spindel

assoziiert (Abb. 70 G). Bei dem Wiederaufbau der Spindel ist Clathrin in den ersten 3 min weniger deutlich an den Spindelfasern zu erkennen als Tubulin. Allerdings ist es nach 10 min vollständig wieder mit der Spindel assoziiert (Abb. 70 G).

Dadurch, dass die Spindel erst nach einer Stunde Kälteschock vollständig dissoziiert war, wurde dieser Zeitpunkt als Standard für den Abbau der Mikrotubuli in Interphase- und Mitosezellen benutzt.

Durch die Kälteinkubation ist es gelungen, einfach und effizient die mitotische Spindel in vitro zu depolymerisieren, ohne die Zellen dabei mit Reagenzien zu belasten. Damit ist eine verlässliche Manipulation der Spindel gegeben. Interessant war es an dieser Stelle zu untersuchen, in wie weit sich die Depletion der Expression von Clathrin auf die Dynamik der Spindel während der Depolymerisation und der Polymerisation auswirkt.

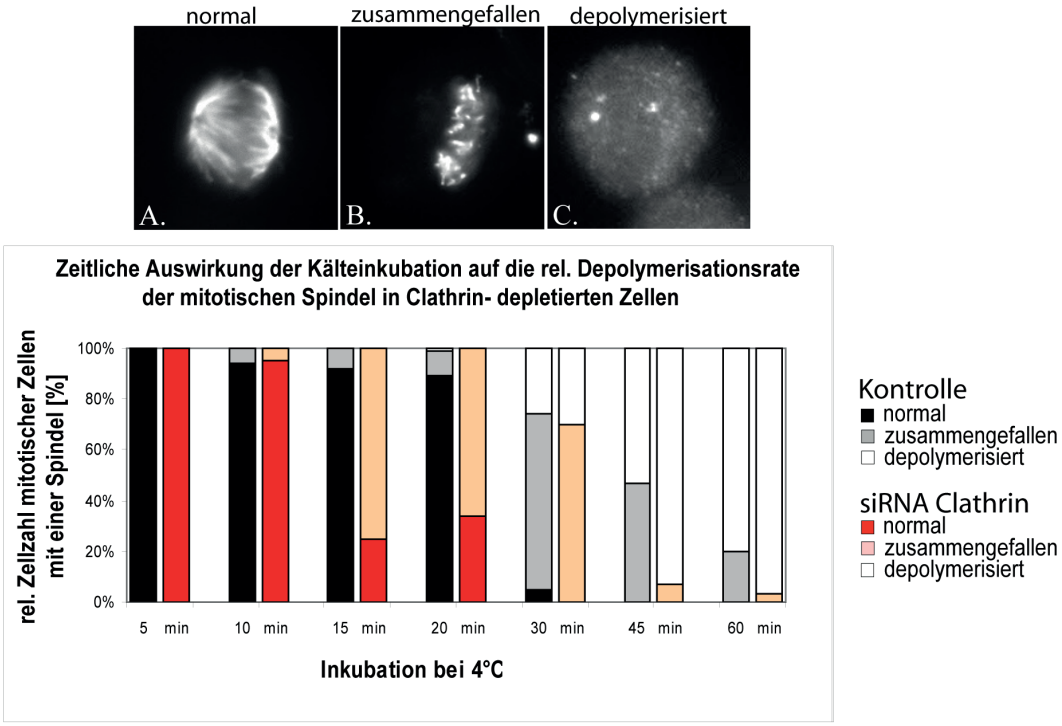


Abb. 71: Kältestabilität der mitotischen Spindel in Abhängigkeit von Clathrin.

Unter Kältebedingungen geht die Spindel (Tubulin, A; „DM1A“) zunächst in einen zusammengefallenen Zustand über (B), bevor sie vollständig depolymerisiert, so dass nur die Centrosomen übrig bleiben (C). Der Vergleich der Kälteeinwirkung in Kontrollzellen und in Clathrin-depletierten Zellen zeigt, dass die Spindel bei Abwesenheit von Clathrin schneller zusammen fällt und schneller depolymerisiert. Während nach 15 min erst 10 % der Spindeln in Kontrollzellen in sich zusammenfallen, sind es in Clathrin-depletierten Zellen bereits 75 %.

So wurde im folgenden die Expression der Clathrin schweren Kette mit Hilfe von RNAi herunterreguliert. Die Zellen wurden synchronisiert, so dass sie am 72 h Zeitpunkt nach Transfektion, dem Minimum der Clathrinexpression, in der Metaphase arretiert waren. Anschließend wurde der Nocodazolblock aufgehoben. Die Zellen wurden 50 min im Proliferationsmedium inkubiert, um eine vollständige Spindel auszubilden und möglichst viele

Chromosomen in der Äquatorialebene anzuordnen. Die Kontrollzellen brauchten für diesen Prozess nur 30 min; daher wurden die Versuche leicht zeitlich versetzt durchgeführt. Sodann wurden die Zellen bei 4 °C inkubiert, um den zeitlichen Verlauf des Abbaus der Spindel im Clathrin *Knockdown* beobachten zu können. Der Vergleich synchronisierter Kontroll- und Clathrin-depletierte Zellen legt große Unterschiede in der Stabilität der Spindel offen (Abb. 71).

In den Kontrollzellen ändert sich wenig in den ersten 20 min der Kälteinkubation. Nach 20 min erfahren ca. 10 % der Spindeln einen Zusammenfall der Spindel. Die Entfernung zwischen den Centrosomen, die normalerweise etwa 10-12 µm beträgt verringert sich um ca. die Hälfte. Damit scheinen die Spindeln ihre Stabilität bzw. Statik zu verlieren und die Centrosomen näher an die Metaphaseplatte zu rücken. Ab 30 min sind etwa 30 % der Spindeln vollständig depolymerisiert, während die übrigen vorwiegend in sich zusammengefallen sind (Abb. 71). Werden die Zellen weiter auf Eis inkubiert, treten keine normal aussehenden Spindeln mehr auf. Nach 45 min Kälteinkubation ist die Hälfte der Spindeln depolymerisiert, während die übrigen in sich zusammengefallen sind. Nach einer Stunde bleiben in rund 20 % der Zellen restliche mitotische Fasern sichtbar. In allen anderen mitotischen Zellen sind lediglich die Centrosomen zu beobachten.

Wird das gleiche Experiment nach Depletion der Clathrin schweren Kette gemacht, so fällt auf, dass die Depolymerisation der Spindel bei der Kälteinkubation beschleunigt wird (Abb. 71). Während der ersten 10 min sind noch keine Unterschiede zwischen der Spindel der Kontroll- und der Clathrin-depletierten Zellen zu beobachten. Bei 15 min sehen aber nur 25 % der Clathrin-depletierten Spindeln normal aus, während es in den Kontrollzellen noch 92 % waren. Die übrigen Spindeln sind in sich zusammengefallen. Nach 45 min der Kälteinkubation sind im Clathrin *Knockdown* die Spindeln in über 90 % der mitotischen Zellen vollständig depolymerisiert, während in Kontrollzellen noch 47 % der mitotischen Fasern zu sehen sind. Zu diesem Zeitpunkt sind in nur 10 % der Clathrin-depletierten mitotischen Zellen Überreste an mitotischen Fasern sichtbar.

Die Kälteinkubation, die zu einer Depolymerisation der Mikrotubuli führt, ist reversibel. Beim Vergleich des zeitlichen Verlaufes der Mikrotubulipolymerisation nach Kälteinkubation in unterschiedlichen *Knockdowns* fällt auf, dass sich in Zellen, in denen Clathrin herunter reguliert wurde, die Mikrotubuli ähnlich schnell wieder erholen, wie in den Kontrollzellen (Abb. 72). Nach 10 min Erwärmen ist kein Unterschied mehr zwischen den Spindeln der Kontroll- und Clathrin-depletierten Zellen zu erkennen.

Aufgrund der auffälligen Auswirkungen auf die Mitose in Zellen, in denen Auxilin1 und GAK kodepletiert wurden, wurden auch ihre Spindeln nach der Kälteinkubation untersucht. Auffällig war, dass in allen untersuchten Zellen die Polymerisation der Spindeln verzögert ablief. Während in Kontroll- und Clathrin-depletierten Zellen nach 10 min die

Polymerisation aller Spindeln vollständig war, sah es in Auxilin1- und GAK-depletierten Zellen anders aus. Nach 10 min Inkubation bei 37 °C gab es in diesen Zellen mitotische Astern, die jedoch denen in Kontrollzellen ähnelten, die bereits nach 2 min Inkubation zu sehen waren. Die mitotischen Zellen im Auxilin1 und GAK *Knockdown* erholten sich erst nach einer halben Stunde von der Depolymerisation der Spindel.

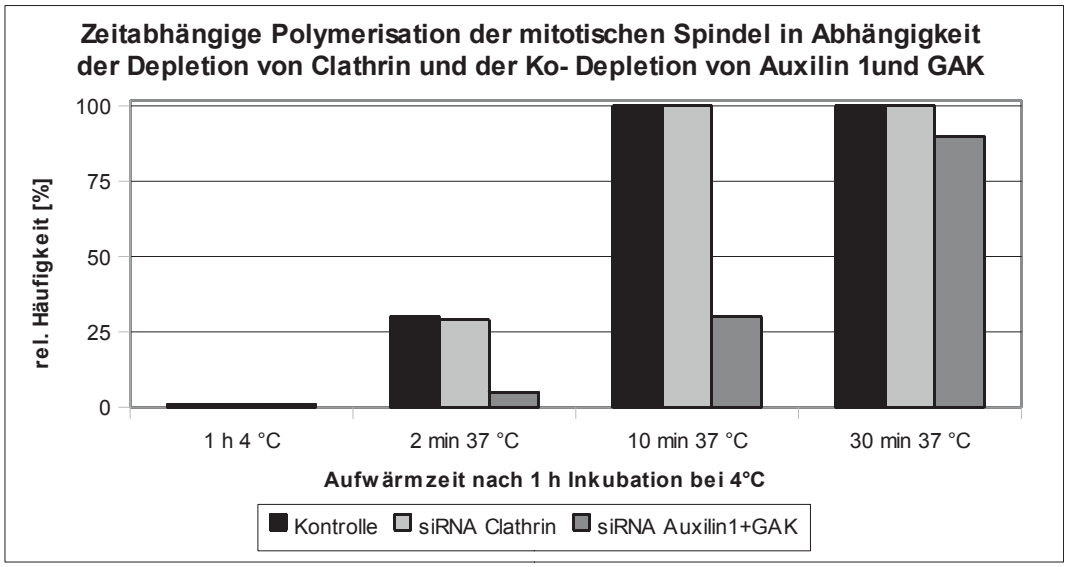


Abb. 72: Polymerisation der Spindel bei Depletion von Clathrin sowie Auxilin1 und GAK.

Nach 1 h Inkubation bei 4 °C sind alle mitotischen Spindeln depolymerisiert. Die Wiedererwärmung der Zellen verdeutlicht, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen Clathrin-depletierten Zellen und Kontrollzellen gibt. Im Gegensatz dazu, verzögert sich der Aufbau der Spindel in Zellen, in denen Auxilin1 und GAK kodepletiert wurden.

Aus diesen Daten wird deutlich, dass Clathrin nicht für einen schnellen und effektiven Aufbau der Spindel benötigt wird. Clathrin ist jedoch für den Spindelapparat wichtig, da es in Clathrin-depletierten Zellen schneller zur Depolymerisation der Spindel kommt. In Abwesenheit von Auxilin1 und GAK verzögert sich hingegen die Polymerisation der Mikrotubuli. Diese Proteine scheinen bei der Polymerisation der Spindel eine Rolle zu spielen. Die Daten unterstützen die Ergebnisse der Lebendzellbeobachtungen, in denen in Auxilin1 und GAK depletierten Zellen es zu einer Verzögerung der Prometaphase kam.

5.7.7 Untersuchung mitotischer Spindeln mittels FRAP

Um weitere Schlussfolgerungen über die Rolle von Clathrin in der Mitose ziehen zu können, wurde die Dynamik der Spindel *in vivo* mit Hilfe von FRAP untersucht. Dazu wurden GFP-LCB exprimierende HeLa Zellen synchronisiert und am konfokalen Mikroskop untersucht. In ausgewählten Bereichen wurde die Fluoreszenz von GFP-LCB an der Spindel mit Laserpulsen ausgebleicht und die Erholung des Fluoreszenzsignals zeitabhängig gemessen. Abbildung 73 stellt zwei mitotische Zellen dar, deren GFP-LCB Fluoreszenzsignal ausgebleicht wurde.

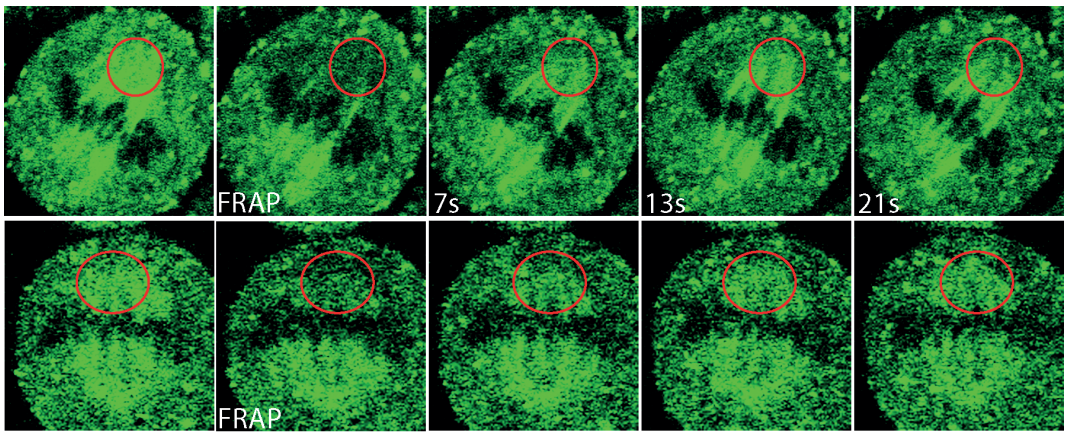


Abb. 73: FRAP einer mitotischen Spindel.

GFP-LCB exprimierende HeLa Zellen wurden mittels FRAP untersucht. Die rot markierten Felder stellen das ausgewählte Areal, das mit FRAP gebleicht wurde, dar. Dargestellt ist die zeitliche Erholung des Fluoreszenzsignals nach FRAP in zwei verschiedenen Spindeln.

In den ausgebleichten Bereichen findet bereits nach wenigen Sekunden eine vollständige Erholung des Fluoreszenzsignals statt. Zum Vergleich wurde ebenfalls die Fluoreszenz im mitotischem Zytosol untersucht. Auch hier erholt sich das GFP-LCB Signal sehr schnell. Die FRAP Untersuchungen wurden statistisch erfasst und miteinander verglichen (Abb. 74). Das GFP-LCB an der Spindel wird in einer sehr hohen Austauschrate mit freien Clathrinmolekülen im Zytosol ausgetauscht. Die Halbwertszeit der Erholung des Fluoreszenzsignals in der Spindel beträgt 6 s, während die im Zytosol einer mitotischen Zelle ca. 5 s andauert.

Im Gegensatz dazu ist das Tubulin an der Spindel sehr stabil (hier nicht gezeigt). Aus der Literatur ist bekannt, dass Tubulin an der Spindel nach dem Ausbleichen einer recht langsamen Austauschrate unterliegt [Wadsworth & Salmon 1986; Maddox et al. 2000]. Die der Literatur entnommene Halbwertszeit der Erholung nach Ausbleichen des fluorochro-

mierten Tubulins entspricht ca. 37-75 s in unterschiedlichen Zelllinien [Wadsworth & Salmon 1986]. Untersuchungen von GFP-Tubulin weisen eine Austauschrate des Fluoreszenzsignals von ca. 50 s in Hefe auf [Maddox et al. 2000].

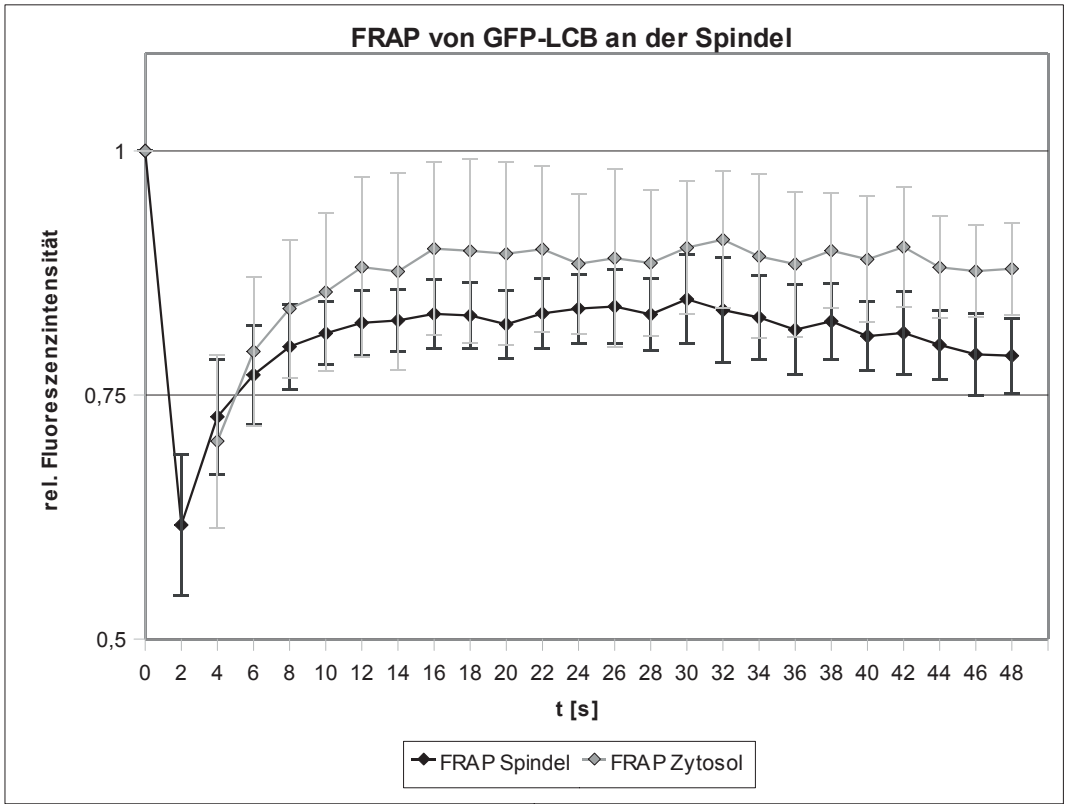


Abb. 74: Änderung der relativen Fluoreszenzintensität im FRAP Experiment.

In GFP-LCB exprimierenden HeLa Zellen wurde das Verhalten von Clathrin im FRAP Experiment untersucht. Die Messung der relativen Intensität der Fluoreszenz zeigt, dass Clathrin an der Spindel einer sehr hohen Austauschrate unterliegt. Die Änderung der Fluoreszenz im Zytosol einer mitotischen Zelle ist ähnlich wie die an der Spindel.

Ebenso ist aus der Literatur die wesentlich langsamere Austauschrate von GFP-LCB an der Plasmamembran bekannt, an der Clathrin in einem festen Gitter gebunden vorliegt [Wu et al. 2001; Loerke et al. 2005].

Schlussfolgernd daraus, unterliegt die Assoziation von Clathrin an der Spindel einem anderen Mechanismus, als dies an der Plasmamembran der Fall ist. Die hohe Austauschrate von Clathrin an der Spindel verläuft ähnlich schnell wie die Austauschrate im mitotischen Zytosol. Das deutet auf eine hohe Diffusionsrate von Clathrin hin, das möglicherweise direkt aus dem Zytosol an die Spindel gebracht wird. Das in den Mikrotubuli gebundene Tubulin hingegen unterliegt dem sog. Tretmühlenmechanismus und tauscht nur an den Mikrotubulienden aus. Die Daten unterstützen die Sucrose-Daten und zeigen, dass Clathrin sich sehr dynamisch an der Spindel verhält. Trotz der stabilen Bindung, die es mit den Mikrotubuli eingeht, findet ein ständiger Austausch von Clathrin zwischen der Spindel und dem Zytosol statt.

5.7.8 Zusammenfassung

Die *in vivo* Untersuchungen mitotischer Zellen mit unterschiedlichen Reagenzien lieferte eine Vielzahl von Erkenntnissen im Hinblick auf die Assoziation von Clathrin mit der Spindel.

Die Daten der Nocodazol-Inkubation zeigen, dass die Spindel nicht vollständig depolymerisiert und Clathrin auch mit Mikrotubulifragmenten assoziiert bleibt. Das bestätigt seine enge Assoziation mit der Spindel. Zusätzlich belegten Kälteschockuntersuchungen, dass Clathrin zeitgleich mit Tubulin an der Spindel erscheint. Die Depletion von Clathrin führte zu einer schnelleren Depolymerisationsrate der Spindel unter Kälteeinflüssen. Daraus resultiert die Funktion von Clathrin, die Spindel vor Depolymerisation zu stabilisieren.

Aktin spielt an der Assoziation von Clathrin mit der Spindel eine untergeordnete Rolle wie aus der Latrunculin B Untersuchung zu entnehmen ist. Auch die Annahme, dass Clathrin nicht in Form von Clathrin-bedeckten Vesikeln an der Spindel gebunden ist wurde durch die Einwirkung von BFA und 1-Butanol auf die Spindel bestätigt.

Eine Trennung von Clathrin und den Mikrotubuli wurde *in vivo* unter hypertonischen Bedingungen erreicht. Clathrin dissoziierte reversibel von der Spindel bei der Inkubation von 0,4 M Sucrose und bildete größere Aggregate an den Zellpolen, welche möglicherweise leere Clathrinkäfige darstellen. Die mit FRAP gemessene höhere Austauschrate des Clathrins an der Spindel im Vergleich zu der an der Plasmamembran bestätigt, dass die Wechselwirkung zwischen Clathrin und der Spindel sich von der an der Plasmamembran unterscheidet.

6. Diskussion

6.1 Clathrin in der Mitose

Clathrin spielt in der Zelle eine wichtige Rolle bei vielen Rezeptor-vermittelten Transportprozessen, die in der Literatur ausgiebig diskutiert wurden. Eine neuere Publikation dokumentiert eine weitere Funktion von Clathrin an der Spindel [Royle et al. 2005]. Bisher ist jedoch wenig über die Assoziation von Clathrin an der Spindel und seine Aufgaben in der Mitose bekannt. Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die Funktion von Clathrin in der Mitose näher zu analysieren.

Durch immuncytochemische Analysen konnte die Präsenz von Clathrin an der Spindel eindeutig nachgewiesen werden. Seine Assoziation mit der Spindel wurde sowohl für die schwere als auch die leichte Kette von Clathrin mittels unterschiedlicher Antikörper und GFP-Fusionsproteine in allen Phasen der Mitose belegt. Darüber hinaus wurde die Rekrutierung von fluorochromiertem und mikroinjiziertem Clathrin an die Spindel demonstriert. Diese Daten bestätigen frühere Beobachtungen, die über Clathrin in der Mitose erhoben worden sind [Royle et al. 2005]. Die Assoziation von Clathrin mit der Spindel wird über die Clathrin schwere Kette vermittelt [Royle et al. 2005]. Dabei spielen sowohl die terminale Domäne von Clathrin, als auch seine Fähigkeit Trimere zu bilden eine ausschlaggebende Rolle [Royle & Lagnado 2006].

Im Gegensatz zu Royles Daten wurde in dieser Arbeit eindeutig die Bindung von Clathrin an den Astral- und den Interpolaren-Mikrotubuli demonstriert. Eine Erklärung, warum Royle Clathrin nur an den Kinetochor-Mikrotubuli nachgewiesen hat, kann die unterschiedliche Stärke des Clathrinsignals liefern. Die immuncytochemische Färbung von Clathrin an der Spindel ist abhängig von den Fixierungsbedingungen bzw. der Expressionsrate des transfizierten GFP-Fusionsproteins. Die Kinetochor-Mikrotubuli weisen ein besonders starkes Clathrinsignal auf, wohingegen Clathrin an den Astral- und den Interpolaren-Mikrotubuli nur nach Permeabilisation der Zellen vor der Fixierung, mit der zytosolisches Clathrin herausgewaschen wird, gut sichtbar wird. Dies zeigt, dass Clathrin für den gesamten Spindelapparat eine Rolle spielt und seine Bindung nicht spezifisch auf die Kinetochor-Mikrotubuli beschränkt ist.

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal die Lokalisation von Clathrin im Bereich der mitotischen Centrosomen nachgewiesen (Abb. 10). Immuncytochemische Daten konnten die Kolokalisation von Clathrin mit γ-Tubulin bestätigen. Untermauert wurde diese Beobachtung durch Kälteschock-induzierte Depolymerisation des Spindelapparates. Nach vollstän-

diger Depolymerisation der Spindel konnte eine Assoziation von Clathrin mit den Centrosomen dokumentiert werden (Abb. 70 A). Bereits an anderer Stelle lieferten proteomische Analysen einen ersten Hinweis darauf, dass Clathrin eine Komponente isolierter Centrosomen darstellt [Andersen et al. 2003]

Bei Depletion von Clathrin treten allerdings keine Morphologieveränderungen der Centrosomen ein. Die Assoziation von Clathrin mit mitotischen Centrosomen ist möglicherweise durch den Ablauf der Polymerisation begründet, welche überwiegend von den Centrosomen her initiiert wird. In Kälteschock-Experimenten tritt Clathrin an den Mikrotubuli zeitgleich mit dem Aufbau der ersten Mikrotubuliastern auf. Es stabilisiert den entstehenden Spindelapparat und wird wahrscheinlich an die Centrosomen transportiert, um bereits zu Beginn der Polymerisation die Stabilität der Mikrotubuli zu gewährleisten.

Diese These wird durch eine erst kürzlich erschienene Publikation gestützt, in der die Autoren nachweisen konnten, dass Clathrin mit dem phosphoryliertem Protein TACC3 interagiert und dieses an die Spindel rekrutiert [Lin et al. 2010]. TACC3 stabilisiert die Spindel und seine Depletion führt zu ähnlichen Veränderungen der Spindel wie der Clathrin *Knockdown* [Lin et al. 2010]. Darüber hinaus wurde bereits eine Kolokalisation von TACC3 mit mitotischen Centrosomen dokumentiert [Kinoshita et al. 2005; Peset & Vernos 2008]. Eine der Aufgaben von TACC3 ist die Rekrutierung des Proteins ch-TOG an die Centrosomen [Lee et al. 2001b], das wiederum die Polymerisation der Spindel fördert [Brittle & Ohkura 2005; Barr & Gergely 2007].

Aus diesen Daten ergeben sich Hinweise darauf, dass Clathrin möglicherweise indirekt die Polymerisation der Mikrotubuli reguliert, indem es zur Rekrutierung von TACC3 an die Centrosomen beiträgt. In künftigen Untersuchungen gilt deshalb in Bindungsstudien zu klären, ob eine direkte Interaktion zwischen Clathrin und γ-Tubulin besteht. Ebenso wichtig ist es, einen möglichen Kandidaten für die Rekrutierung von Clathrin an die Centrosomen zu finden.

Nachdem die Lokalisation von Clathrin an der Spindel geklärt wurde, führten elektronenmikroskopische Untersuchungen zu einer genaueren Analyse von den Bindungsverhältnissen von Clathrin und den Mikrotubuli. Die indirekte Markierung von Clathrin mittels Immunogold offenbart sein periodisches Auftreten an den Kinetochor-Mikrotubuli. Teilweise ist eine direkte Lokalisation der Goldpartikel an den Mikrotubuli erkennbar. Darüber hinaus zeigt die elektronenmikroskopische Untersuchung, dass Clathrin nicht in Form von Clathrin-bedeckten Vesikeln an der Spindel vorliegt. In Ultradünnschnitten von mitotischen Zellen konnte kein Nachweis von Clathrinvesikeln an der Spindel erbracht werden, obwohl solche Strukturen eindeutig in anderen Bereichen der Zelle detektiert werden konnten.

Royle nahm an, dass Clathrin für die Stabilität der Kinetochor-Mikrotubuli zuständig ist, indem ein Clathrintriskelion zwei bis drei Mikrotubuli miteinander verbindet [Royle et al. 2005]. Ein Blick in die Literatur zeigt, dass bereits in früheren Arbeiten elektronenmikroskopisch Querverbindungen an Spindelfasern entdeckt worden sind [Hepler et al. 1970; Cande et al. 1974]. Bis zum heutigen Tag wurden etliche Proteine identifiziert, die zur Quervernetzung und zur Stabilisation der Spindel beitragen [Sharp et al. 2000; Manning & Compton 2008]. Möglicherweise stellt auch Clathrin eine solche Querverbindung der Mikrotubuli dar. Tatsächlich konnten elektronenmikroskopisch Goldpartikel, mit denen Clathrin markiert wurde, zwischen parallel verlaufenden Mikrotubuli nachgewiesen werden (Abb. 12 E). Weitere Daten, die für eine Transportvesikel-unabhängige Funktion von Clathrin in der Mitose sprechen, ergeben sich aus Untersuchungen von Clathrin-depletierten Zellen. Wurden diese mit einer Clathrinmutante transfiziert, die keine Vesikeltransportprozesse unterstützt, so erfolgte die Reparatur der spezifischen Clathrin *Knockdown* Veränderungen in mitotischen Zellen [Royle & Lagnado 2006]. Ein weiteres Argument gegen Clathrin-bedeckte Vesikel ist die Abwesenheit von lipophilen Plasmamembranmarkern an der Spindel [eigene Daten & [Royle et al. 2005].

Das in elektronenmikroskopischen Untersuchungen gewonnene Bild wurde in biochemischen Analysen bestätigt. Die Untersuchung isolierter Spindeln und mitotischer Astern offenbarte die Gegenwart von Clathrin an Mikrotubuli. In Bindungsversuchen mit GST-Clathrin Fusionsprotein und Tubulin bzw. Bindungsexperimenten mit Mikrotubuli konnte die indirekte Bindung von Clathrin und Tubulin nachgewiesen werden. Die Terminale Domäne von Clathrin bindet an Tubulin in Gegenwart von mitotischem Zytosol oder Mikrotubuli-assoziierten Proteinen (MAPs). Evidenzen für die direkte Bindung von Clathrin an Tubulin liegen z. Z. Nicht vor. Aus diesem Grund ist die Annahme berechtigt, dass Clathrin die Fähigkeit besitzt an bestimmte Mikrotubuli-assoziierte Proteine zu binden. In zukünftigen Experimenten sollte daher getestet werden, welche Proteine mögliche Bindeglieder zwischen Clathrin und der Spindel darstellen. Ein denkbarer Ansatz dafür ist die Untersuchung isolierter Spindeln mittels massenspektroskopischer Analyse. Dazu würden Präparationen isolierter Spindeln zunächst in der SDS-PAGE getrennt. Die zu untersuchenden Proteinbanden würden aus dem Gel herausgeschnitten, aufgearbeitet und in einem Massenspektrometer untersucht werden. Ist das Protein bereits bekannt, reicht ein einfacher Vergleich der gewonnenen Massenspektren mit Datenbanken wie sie z. B. unter http://expasy.org/tools/peptide-mass.html oder http://prospector.ucsf.edu/ zu finden sind. Vorteilhaft an dieser Methode ist die relativ geringe Datenmenge und damit eine überschaubare Handhabung der Massenspektren. Aber auch de novo Identifikation von Proteinen ist mit der Massenspektrometrie möglich.

In weiteren Untersuchungen wurde die Möglichkeit überprüft, inwieweit Clathrin als eine Komponente des Golgi-Apparates an der Spindel vorliegen könnte. Die Funktion von Clathrin im postmitotischen Aufbau des Golgi-Apparates wurde bereits dokumentiert [Radulescu et al. 2007]. Borlido et al. nahmen an, dass die Assoziation von Clathrin mit der Spindel im Zusammenhang mit der Verteilung von Golgi-Membranvesikeln auf die Tochterzellen steht [Borlido et al. 2008].
Die Inkubation mitotischer Zellen mit Brefeldin A (BFA) zeigt jedoch, dass Clathrin durch BFA nicht von der Spindel dissoziiert wird (Abb. 63). BFA inhibiert reversibel die Funktion von Arf, und induziert damit den Zerfall der Golgi-Zisternen [Hidalgo et al. 1992; Reaves & Banting 1992]. Dadurch wird in Interphasezellen eine Umverteilung der Golgi-assoziierten Proteine ausgelöst, so auch die von AP1 und Clathrin. In mitotischen Zellen bleibt die BFA-Inkubation ohne Wirkung auf die Assoziation von AP1 und Clathrin. Darüber hinaus findet die Teilung der Zellen während der BFA-Inkubation mit regulärer Dynamik statt (eigene Daten). Zusätzlich konnte die Untersuchung der Lokalisation unterschiedlicher Golgi-Proteine in mitotischen Zellen keine Hinweise auf eine Assoziation mit der Spindel liefern (Tabelle 1). Aus der Literatur ist die Verteilung des Golgi-Apparates während der Zellteilung bekannt. Beim Eintritt in die Mitose findet der Zerfall des Golgi-Apparates und des Endoplasmatischen Reticulums in Vesikel statt [Shorter & Warren 2002; Puri et al. 2004; Lowe & Barr 2007]. Nachdem diese auf die beiden entstehenden Tochterzellen verteilt werden, findet die Neubildung des Golgi-Apparates statt, bei welcher die Spindel eine wichtige Funktion übernimmt [Wei & Seemann 2009].
Aufgrund unserer Daten und ergänzender Daten aus der Literatur kann ausgeschlossen werden, dass die Lokalisation von Clathrin an der Spindel im Zusammenhang mit der Verteilung des Golgi-Apparates auf die Tochterzellen steht.

Welche Rolle spielt aber dann Clathrin in der Mitose? Um dies zu klären, wurden zunächst die Assoziation von Clathrin an die Spindel und die Dynamik der Spindel analysiert. In Depolymerisationsexperimenten konnte die enge Assoziation von Clathrin an den Mikrotubuli bestätigt werden. Die Kälteschock-induzierte Depolymerisation der Mikrotubuli resultierte in einer parallel verlaufenden Dissoziation von Clathrin und Tubulin. Lediglich das Clathrin an mitotischen Centrosomen war kälteresistent. Die anschließende Repolymerisation der Spindel zeigte, dass Clathrin nahezu zeitgleich mit Tubulin an der Spindel erscheint. Die Ausschaltung von Clathrin mittels RNAi führte zudem zu einer schnelleren Depolymerisation der Spindel. Im Gegensatz dazu hatte der Clathrin *Knockdown* keine Auswirkungen auf die Dynamik der Spindelpolymerisation. Durch Inkubation mit Noco-

dazol wurde bestätigt, dass Clathrin auch an unvollständig depolymerisierten Mikrotubuli gebunden bleibt (Abb. 61). Eine ähnliche Beobachtung wurde bereits früher gemacht [Mack & Compton 2001].

Die mitotische Spindel ist ein sehr stabiles Gebilde. Der Vergleich der Depolymerisationsdynamik von Mikrotubuli unterschiedlicher Zellzyklusphasen zeigt ein differenziertes Verhalten. Während Mikrotubuli in Interphasezellen bei Kälte sofort depolymerisieren, benötigt der Spindelapparat mehr als doppelt so lang für die Depolymerisation. Im Gegensatz dazu erfolgt eine anschließende Polymerisation der Mikrotubuli in Interphase- und in Mitosezellen mit annähernd gleicher Dynamik. Mikrotubuli werden durch eine große Anzahl von Proteinen stabilisiert [Sharp et al. 2000; Manning & Compton 2008]. Im neuronalen Gewebe sind z. B. sog. STOP-Proteine für die Resistenz der Mikrotubuli gegenüber Kälteeinflüssen verantwortlich [Bosc et al. 1999]. Auch in nicht neuronalen Zellen kommen bestimmte Isoformen der STOP-Proteine vor, die unter physiologischen Bedingungen im Zytosol verteilt sind und erst bei ungünstiger Temperaturänderung mit den Mikrotubuli assoziieren [Denarier et al. 1998]. In der Mitose stabilisieren STOP-Proteine die Spindel Temperatur-unabhängig [Denarier et al. 1998]. Sie tragen zur Resistenz des Spindelapparates gegenüber externen Faktoren wie Kälteeinflüssen bei. Die Untersuchung von Clathrin zeigt einen ähnlichen Einfluss auf die Kälteresistenz der Spindel. Die schnellere Mikrotubuli-Depolymerisation in Abwesenheit von Clathrin zeigt, dass es eine besondere Bedeutung für die Stabilität des Spindelapparates hat.

Durch die These, das Clathrin zur Stabilität der Spindel beiträgt, stellt sich die Frage welche Folgen seine Abwesenheit für die Zellteilung hat. In RNAi Experimenten wurde daher die Rolle von Clathrin in der Mitose studiert. Die Ausschaltung von Clathrin führte zu einer starken Verzögerung der Mitose. Nur 30 % der Clathrin-depletierten Zellen teilten sich im selben Zeitraum wie die Kontrollzellen (Abb. 51). Der ausschlaggebende Schritt für die Verzögerung der Mitose in Abwesenheit von Clathrin war die Arretierung der Zellen in der Pro-/Metaphase. Eine besondere Auffälligkeit war eine veränderte Morphologie der Chromosomen der Metaphase. Während die Clathrin-depletierten Zellen bereits einen vollständigen Spindelapparat ausgebildet hatten, schienen sich ihre Chromosomen in dem Stadium der Prometaphase zu befinden. Viele der Chromosomen waren weiterhin an den Zellpolen lokalisiert (Abb. 50). Darüber hinaus konnten eine breitere Metaphaseplatte und die geringere Dimension der Spindel dokumentiert werden (Abb. 53 & 54).

Die Metaphase kann erst dann abgeschlossen werden, wenn alle Chromosomen an die Kinetochor-Mikrotubuli binden und so der s*pindle checkpoint* die Anaphase einleitet [Díaz-Martínez & Clarke 2009; Ito & Matsumoto 2010].

Die Abwesenheit von Clathrin führt vermutlich direkt zu einem defizienten Transport der Chromosomen in die Äquatorialebene. Die Verzögerung der Mitose im Clathrin *Knockdown* bleibt jedoch ohne Auswirkungen auf die Teilungsfähigkeit der Zellen. Weder eine Zunahme an nekrotischen noch an apoptotischen Zellen konnte nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse stimmen mit Beobachtungen in einer anderen Zelllinie überein, in denen im Clathrin *Knockdown* keine vermehrte Apoptose belegt werden konnte [Borlido et al. 2008]. Allerdings führte der Clathrin *Knockdown* in den DKO R Zellen nicht zur Arretierung der Pro-/Metaphase [Borlido et al. 2008].
Nachdem alle Chromosomen verzögert in der Äquatorialebene angeordnet waren, verliefen die weiteren Phasen der Mitose in Clathrin-depletierten Zellen ohne signifikante Unterschiede zu den Kontrollzellen. Auch Royle hatte in NRK Zellen einen Arrest der Mitose beobachtet, indem er einen vierfach erhöhten mitotischen Index im Clathrin *Knockdown* beobachten konnte [Royle et al. 2005]. Seine Beobachtungen führte er auf die Destabilisation der Kinetochor-Mikrotubuli in Clathrin-depletierten Zellen zurück. Diese resultiert indirekt in einer Verzögerung im Transport der Chromosomen zur Äquatorialplatte [Royle et al. 2005]. Die in dieser Arbeit erhobenen Daten unterstützen diese Annahme. Das Ausschalten von Clathrin hat einen negativen Effekt auf die Dynamik der Zellteilung.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde mittels unterschiedlicher Ansätze versucht, die enge Assoziation von Clathrin mit der Spindel zu unterbrechen. Unter hypertonischen Bedingungen konnte schließlich zum ersten Mal *in vivo* eine reversible Trennung von Clathrin und den mitotischen Mikrotubuli erreicht werden, ohne endogenes Clathrin aus der Zelle zu entfernen. Durch Inkubation mitotischer Zellen mit 0,4 M Sucrose ließ sich in kurzer Zeit die Dissoziation von Clathrin von der Spindel und eine Ansammlung von Clathrin in größeren Aggregaten an den Zellpolen registrieren. Die Spindel veränderte sich dabei jedoch nicht. Allerdings führte eine fortschreitende Inkubation der Spindeln zum Verlust der Bindung zwischen einigen Kinetochor-Mikrotubuli und den Chromosomen (Abb. 67). Der beobachtete Effekt war reversibel. Nach Entfernen der Sucrose war jedoch ein verzögerter Verlauf der Mitose nachzuweisen, der möglicherweise auf den Verlust der Bindung der Kinetochor-Mikrotubuli und der Chromosomen zurückzuführen ist.
Die Änderung der Osmolarität, die durch die Zugabe von 0,4 M Sucrose hervorgerufen wird, bewirkt eine Veränderung des Zellvolumens. Das führt offensichtlich zu einem lokalen Anstieg in der Clathrinkonzentration wodurch möglicherweise die Aggregation der Clathrinmoleküle induziert wird (vgl. Videomaterial, CD). Bei diesen Aggregaten, die mit zunehmender Zeit an den Zellpolen angereichert werden, handelt es sich möglicherweise um Clathrinkäfige. Tatsächlich neigt Clathrin dazu unter hypertonischen Bedingungen

abnormale, leere Clathrinkäfige auszubilden [Heuser & Anderson 1989; Merrifield et al. 2005]. Dieser Sachverhalt konnte im Rahmen dieser Arbeit aus technischen Gründen nicht mehr geklärt werden, da mit der hier verwendeten elektronenmikroskopischen Technik keine leeren Clathrinkäfige sichtbar gemacht werden konnten. Zusätzlich ergeben sich womöglich bei näherer Untersuchung noch weitere hier nicht erfasste Effekte der hypertonischen Bedingungen auf die Mitose, die die Verzögerung der Mitose bewirken. Allerdings hat die Dissoziation von Clathrin von der Spindel unter hypertonischen Bedingungen einen ähnlichen Effekt wie der Clathrin *Knockdown* auf die mitotischen Zellen. Beide Ansätze führen zu einer Verzögerung der Mitose, indem die Spindel in der Prometaphase arretiert wird. Damit ist es gelungen, die Rolle von Clathrin an der Spindel aus einem anderen Blickwinkel darzustellen und die RNAi Resultate zu bestätigen.

Die schnelle Dissoziation von Clathrin von der Spindel unter hypertonischen Bedingungen lieferte Hinweise auf das dynamische Verhalten von Clathrin an der Spindel. Tatsächlich konnte dieses in Untersuchungen mitotischer Zellen mittels FRAP belegt werden. Die Untersuchung des Fluoreszenzsignals der Clathrin leichten Kette B (GFP-LCB) an der Spindel und im mitotischen Zytosol weisen Ähnlichkeiten in ihren Austauschraten auf. In beiden Fällen kehrt das Fluoreszenzsignal direkt nach dem Ausbleichen wieder an seine Ausgangsposition zurück. FRAP Experimente mit fluoreszierendem und mit GFP-Tubulin zeigen hingegen, dass die Austauschrate von Tubulin an der Spindel sehr viel geringer ist (eigene Daten, [Wadsworth & Salmon 1986; Maddox et al. 2000]). Die Mikrotubuli unterliegen dem sog. Tretmühlenmechanismus und der Austausch der Tubulinmoleküle ist nur an den Enden der Mikrotubuli möglich, an denen Polymerisation und Depolymerisation stattfinden. Im Gegensatz dazu sind die Clathrinmoleküle an der Spindel sehr viel dynamischer in ihrem Verhalten und tauschen ständig mit dem Zytosol aus. Die Austauschrate ähnelt der im Zytosol, wodurch die Dynamik von Clathrin an der Spindel beinahe seiner Diffusion im Zytosol entspricht.
Das Verhalten von Clathrin an der Spindel unterscheidet sich zusätzlich von seinem Verhalten an der Plasmamembran. Wird GFP-LCB an der Plasmamembran ausgebleicht, so findet der Austausch von Clathrin mit einer sehr viel langsameren Rate statt [Wu et al. 2001; Loerke et al. 2005]. An der Membran ist Clathrin in einem festen Gitter gebunden. Der Vergleich der Austauschraten an der Membran und an der Spindel liefert Hinweise darauf, dass Clathrin an der Spindel anders gebunden sein muss als Clathrin an der Plasmamembran, an der die Austauschrate niedriger ist.

Die Bindung von Clathrin an die Spindel scheint indirekt vermittelt zu sein. Auch in der Literatur konnte keine direkte Bindung an die Mikrotubuli weder für Clathrin noch für TACC3, das von Clathrin an die Spindel rekrutiert wird, nachgewiesen werden [Lin et al. 2010].
Hinweise, wie Clathrin selbst an die Spindel rekrutiert wird, finden sich in der Literatur. Es konnte nachgewiesen werden, dass der Transkriptionsfaktor B-Myb in Zusammenarbeit mit Filamin eine Bedeutung bei der Rekrutierung von Clathrin an die Spindel hat [Yamauchi et al. 2008]. Allerdings konnten weder B-Myb noch Filamin an der Spindel detektiert werden. Ebenso wurden diese Proteine, im Gegensatz zu Clathrin, nicht an isolierten Spindeln nachgewiesen [Mack & Compton 2001]. B-Myb übernimmt Aufgaben bei der Regulation des Zellzyklus und der Apoptose sowie bei der Entstehung von Krebs [Joaquin & Watson 2003; Sala 2005]. Die Aktivierung von B-Myb erfolgt durch unterschiedliche Cycline [Sala et al. 1997; Fung & Poon 2005]. Obwohl B-Myb vor allem in der S-Phase essenziell für die genomische Stabilität ist [García & Frampton 2006], scheint es auch in der Mitose eine Funktion zu spielen [Shepard et al. 2005]. In Zebrafisch Embryos führt die Depletion von B-Myb zu Defekten im Aufbau der Spindel und im Verlauf der Mitose [Shepard et al. 2005]. Wie genau die Interaktion von B-Myb und Clathrin zu verstehen ist, bleibt künftigen Untersuchungen vorbehalten.

Die Daten in dieser Arbeit haben eine wichtige Funktion von Clathrin an der Spindel belegt und dazu beigetragen, seine Assoziation mit der Spindel näher aufzuklären. Auch in der Meiose ist Clathrin an der Spindel lokalisiert worden [Hölzenspies et al. 2010] und es spielt ebenfalls in Pflanzenzellen eine wichtige Rolle an der Spindel, wo es sich am Aufbau des Phragmoplasten in der Telophase beteiligt [Samuels et al. 1995; Tahara et al. 2007]. Zusätzlich konnte bereits demonstriert werden, dass die Clathrin-vermittelte Endozytose in der Cytokinese der Pflanzen in den Aufbau des Preprophasebandes involviert ist [Karahara et al. 2009].

6.2 An Clathrin-vermitteltem Transport beteiligte Proteine in der Mitose

Die direkte Beteiligung von Clathrin an den Vorgängen in der Mitose eröffnet die Frage, ob weitere Proteine, die mit Clathrin oder den Clathrin-bedeckten Vesikeln interagieren, mit der Spindel assoziiert sind.

Ein Blick in die Literatur zeigt, dass mehrere Proteine, die bei Clathrin-abhängigen Transportprozessen eine Rolle spielen, auch in der Mitose Aufgaben übernehmen. Das β-Adaptin von AP2 interagiert mit der BubR1 Kinase, die den *spindle checkpoint* steuert [Cayrol et al. 2002]. Für Epsin wurde eine Funktion an der Organisation der Spindel nachgewiesen, obwohl Epsin nicht direkt mit den Mikrotubuli assoziiert ist [Liu & Zheng 2009]. Hsp70 wurde schließlich an den Centrosomen mitotischer Zellen lokalisiert [Rattner 1991] und die Casein Kinase1 delta (CK1 delta) wird an die Spindel und die Centrosomen in Zellen rekrutiert, in denen DNA Schäden vorhanden sind [Behrend et al. 2000]. In der vorliegenden Arbeit konnten darüber hinaus weitere Proteine identifiziert werden.

6.2.1 AP1 in der Mitose

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen lassen die eindeutige Lokalisation von AP1 an der Spindel erkennen. In RNAi Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass AP1 Clathrin-abhängig an die Spindel rekrutiert wird (Abb. 26). Hingegen wurde in AP1-depletierten Zellen die Assoziation von Clathrin an der Spindel nachgewiesen (Abb. 27). Der AP1 *Knockdown* führte zudem zu einer Zunahme des Clathrinsignals an der Spindel (Abb. 27). Andererseits ergaben sich bei Depletion von AP1 keine Auffälligkeiten für den Spindelapparat. Auch der Verlauf der Mitose schien nicht beeinträchtigt (Abb. 53). Aufgrund der fehlenden Depletionseffekte wurde der AP1 *Knockdown* daraufhin nicht genauer in Lebendzellbeobachtungen untersucht. Die Inkubation mitotischer Spindel mit Brefeldin A verdeutlichte ferner, dass die Assoziation von AP1 an der Spindel nicht im Zusammenhang mit Golgimembranen zu betrachten ist (Abb. 63).

Überraschenderweise wurde AP1 als einziges Adaptorprotein an der Spindel lokalisiert. Weder AP2 noch AP3 sind an dem Spindelapparat gekoppelt, obwohl für AP2 eine Bindung mit der BubR1 Kinase nachgewiesen werden konnte [Cayrol et al. 2002]. Die eindeutige Lokalisation von AP1 an der Spindel führt zur Diskrepanz mit Royles Daten, der keine Adaptorproteine an dem Spindelapparat nachweisen konnte [Royle et al. 2005]. Eine mögliche Erklärung dafür liefert der Vergleich der benutzten Antikörper. Während Royle für AP1 und AP2 einen Antikörper verwendete, der sowohl β1 als auch β2 erkennt, wurden in dieser Arbeit ein mono- und ein polyklonaler AP1 Antikörper, beide gerichtet gegen γ-Adaptin, eingesetzt. Möglicherweise ist das β1-Adaptin an der Spindel für den β1/β2 Antikörper nicht zugänglich, was interessante Fragestellungen aufwirft und weiterer Untersuchungen bedarf. Einen Beitrag zur Klärung der Diskrepanz zwischen Royles Ergebnissen und dieser Arbeit kann die Mikroinjektion von fluorochromiertem AP1 liefern.

6.2.2 Dynamin in der Mitose

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten zeigen, dass sowohl Dynamin als auch die Mutante Dynamin^{K44A}, deren Überexpression zur Hemmung der Endozytose führt [Damke et al. 1994], mit der Spindel assoziiert sind. Dynamin ist zusammen mit Clathrin in allen Phasen der Mitose an der Spindel kolokalisiert (Abb. 16). Im Gegensatz zu Clathrin tritt Dynamin zudem viel intensiver an Interpolaren-Mikrotubuli in der Anaphase auf (Abb. 16 G). Seine Anwesenheit in der Anaphase wurde bereits an anderer Stelle belegt [Thompson et al. 2002].

Ferner wurde in dieser Arbeit in RNAi Untersuchungen die Abhängigkeit von Clathrin und Dynamin analysiert. Die Depletion von Clathrin resultierte in einer Dissoziation von Dynamin von der Spindel. (Abb. 29). Im Gegensatz dazu blieb Clathrin an der Spindel in Dynamin-depletierten Zellen erhalten (Abb. 35). Diese Daten belegen, dass die Rekrutierung von Dynamin an die Spindel Clathrin-abhängig erfolgt. Die Abwesenheit von Dynamin auf die Mitose hatte Auswirkungen auf die Cytokinese, in der die Zellen signifikant lange verharrten. Die Dauer der Pro-/Metaphase im Dynamin *Knockdown* hingegen verlief relativ unbeeinflusst.

In der Literatur wird die Bedeutung von Dynamin für die Cytokinese, in der seine Expression auf das 50-fache ansteigt, demonstriert [Thompson et al. 2002]. Dynamin ist am Aufbau des kontraktilen Rings bei der Abschnürung der beiden Tochterzellen beteiligt [Konopka et al. 2006; Bonner & Skop 2008]. Die Depletion von Dynamin führt zu Defekten und zur Verzögerung in der Cytokinese [Wienke et al. 1999; Feng et al. 2002].

In dieser Phase der Mitose wird der Aufbau einer neuen Plasmamembran vollzogen [Albertson et al. 2005; Matheson et al. 2005], an dem Clathrin-vermittelte Transportvorgänge beteiligt sind [Schweitzer et al. 2005; Boucrot & Kirchhausen 2007]. Während die Rolle von Dynamin in der Cytokinese in der Literatur intensiv diskutiert wurde [Konopka et al. 2006], konnte seine Lokalisation an der Spindel bisher nicht belegt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal die Assoziation von Dynamin an der Spindel in allen Phasen der Mitose nachgewiesen. Diese Kolokalisation weist auf eine weitere Funktion von Dynamin in der Mitose hin, die nicht im Zusammenhang mit der Cytokinese steht. Auch Clathrin übernimmt zwei unterschiedliche Funktionen während der Zellteilungsprozesse. In der Mitose stabilisiert Clathrin den Spindelapparat und in der Cytokinese beteiligt es sich am Aufbau der neuen Plasmamembran durch Clathrin-vermittelte Transportprozesse [Boucrot & Kirchhausen 2007].

Dynamin wurde ursprünglich als Tubulin-assoziiertes Protein identifiziert [Shpetner & Vallee 1989; Scaife & Margolis 1990], dessen GTPase Aktivität von Mikrotubuli stimuliert werden kann [Maeda et al. 1992; Shpetner & Vallee 1992; Herskovits et al. 1993]. Eine neuere Studie zeigt, dass der N-terminale Teil der PRD-Domäne sowie deren intakte GTPase-Domäne verantwortlich für die Assoziation von Dynamin mit den Mikrotubuli sind [Hamao et al. 2009]. Diese Interaktion wird vom C-terminalen Teil der PRD-Domäne inhibiert. Hamao et al konnten nachweisen, dass die Dynamin-Mikrotubuli-Interaktion, die von der N-terminalen PRD-Domäne vermittelt wird, die Mikrotubuli gegen Kälteschock stabilisiert [Hamao et al. 2009]. Möglicherweise findet diese Interaktion ebenfalls in der Mitose statt und Dynamin stabilisiert die Spindel. Falls das der Fall sein sollte, agiert Dynamin nicht zusammen mit Clathrin, weil seine Abwesenheit kaum zu einer Destabilisierung der Spindel führt.

Eine weitere Überlegung ist daher, dass Dynamin die Interaktion zwischen den Mikrotubuli und Aktin vermittelt, um den Aufbau des kontraktilen Rings vorzubereiten. In der Cytokinese spielt Aktin eine entscheidende Rolle, in der es zusammen mit Myosin die beiden neu entstehenden Tochterzellen trennt [Straight & Field 2000]. Depolymerisation von Aktin führt nicht zum Zerfall der Spindel, wie die Latrunkulin B Untersuchungen gezeigt haben (Abb. 62). Allerdings verankert Aktin die Spindel am Zellcortex [Woolner et al. 2008]. Dadurch wird eine Grundlage für den Spindelaufbau und die Orientierung der Spindel gelegt [Kunda & Baum 2009]. Für Dynamin wurde in einer erst kürzlich erschienenen Publikation die direkte Bindung an Aktin und seine Rolle bei der Aktinpolymerisation nachgewiesen [Gu et al. 2010]. Bisher war bekannt, dass Dynamin mit einer Vielzahl Aktin-regulierender Proteine interagiert [Orth & McNiven 2003; Schafer 2004; Itoh et al. 2005; Unsworth et al. 2007]. Möglicherweise reguliert Dynamin die Interaktion zwischen dem Aktinzytoskelett und den Mikrotubuli des Spindelapparates. Eine Aufgabe für künftige Experimente sollte daher sein zu überprüfen, wie sich die Abwesenheit von Dynamin auf dessen gemeinsame Bindungspartner mit Aktin auswirkt.

Die Kolokalisation von Dynamin an der Spindel legt ferner seine Beteiligung an der Regulation der Mikrotubulidynamik nahe. Es konnte bereits eine direkte Bindung von Dynamin an γ-Tubulin und die daraus resultierende Bedeutung für die Kohäsion der Centrosomen dokumentiert werden [Thompson et al. 2004]. Die Depletion von Dynamin führt in der Interphase zur Spaltung der Centrosomen, wobei die Polymerisation der Mikrotubuli nicht beeinflusst wird [Thompson et al. 2004]. In dieser Arbeit wurde die Lokalisation von Dynamin an mitotischen Centrosomen beobachtet, ein Effekt auf die Centrosomen bei der Depletion von Dynamin konnte jedoch nicht festgestellt werden (Abb. 55).

Aufgrund kontroverser Literaturdaten im Bezug auf die Spezifikation des Dynamin-Antikörpers „Hudy-1“, entstand im weiteren Verlauf dieser Arbeit die Idee, eine Methode zu entwickeln, in der der Dynamin2 *Knockdown* ohne Einsatz von „Hudy-1“ eindeutig nachgewiesen werden konnte. Dies gelang durch Kotransfektion der Dynamin2 siRNA und der fluorochromierten siRNA „siGLO“ sowie durch den Nachweis der Kolokalisation beider siRNAs in derselben Zelle. Der *Knockdown* wurde mittels Internalisation von Transferrin bestätigt (Abb. 34), die in „siGLO“-negativen Zellen auftrat. Damit gelang die Etablierung einer effektiven Methode zur Identifizierung eines *Knockdowns*, der die Clathrin-vermittelte Endozytose inhibiert.

Im Gegensatz dazu war der Nachweis von Dynamin2-depletierten Zellen weder im Western-Blot noch in der Immunfluoreszenz mit dem Antikörper „Hudy-1“ möglich (Abb. 31 & 32). Interessanterweise wird der monoklonale Antikörper „Hudy-1“ in der Literatur vielfach für den immuncytochemischen Nachweis von Dynamin in HeLa Zellen verwendet, obwohl „Hudy-1“ nur die neuronal exprimierende Dynamin1-Isoform erkennt [Cao et al. 1998]. Aus der Literatur ist weder bekannt, dass „Hudy-1“ ubiquitär exprimiertes Dynamin erkennt, noch dass HeLa Zellen mehr als eine Isoform exprimieren. Durch die allgemeine Verwendung des Antikörpers zur Identifikation von Dynamin in HeLa Zellen [Massol et al. 2006; Sever et al. 2006], wurde dieser Antikörper zunächst auch in dieser Arbeit verwendet. Sowohl die Färbung der mitotischen Spindel (Abb. 15), als auch die Kolokalisation mit Clathrin sind mit „Hudy-1“ erkennbar. Erst durch die Ausschaltung von Dynamin2 mittels RNAi wurde klar, dass „Hudy-1“ nicht die Dynamin2-Isoform erkennt. Eine Kreuzreaktion des Antikörpers mit Clathrin, mit dem eine sehr gute Kolokalisation besteht, konnte ausgeschlossen werden (hier nicht gezeigt).

Dieser Konflikt liefert einen ersten Hinweis darauf, dass Dynamin1 möglicherweise auch in HeLa Zellen exprimiert wird. Bereits für Auxilin konnte nachgewiesen werden, dass neuronale Isoformen auch in nicht neuronalen Zelllinien exprimiert werden [Hirst et al. 2008]. In Zukunft gilt es diesen Sachverhalt genauer zu klären.

6.2.3 Auxilin1 und GAK in der Mitose

Durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen gelang der Nachweis der Assoziation von Auxilin1 und GAK mit der Spindel. Das ubiquitär exprimierte GAK wurde ebenfalls unabhängig von der Zellzyklusphase an Centrosomen lokalisiert (Abb. 20 & 21). Aufgrund der direkten Bindung an Clathrin [Ungewickell et al. 1995; Rappoport et al. 2008] war es an dieser Stelle interessant zu untersuchen, wie die Proteine in der Mitose miteinander interagieren. Durch Herunterregulation der Expression von Clathrin mittels RNAi konnte

nachgewiesen werden, dass sowohl Auxilin1 als auch GAK von der Spindel dissoziieren. Die Lokalisation von GAK an Centrosomen konnte zusätzlich in einigen Clathrin-depletierten Zellen weiterhin dokumentiert werden.

Bei der Analyse von Clathrin in Auxilin1- und GAK-depletierten Zellen offenbaren sich zwei unterschiedliche Effekte. Nach Ausschalten von Auxilin1 kann die Assoziation von Clathrin weiterhin an der Spindel belegt werden (Abb. 42). In Interphasezellen wird zudem eine veränderte Zellmorphologie offenbar. Der Großteil der Auxilin1-depletierten Zellen hat eine abgerundete Zellform und die Dimensionen der Spindel verringern sich (Abb. 42).

Im Gegensatz dazu führte die Analyse des GAK *Knockdowns* zu einem ganz anderen Bild. Die Abwesenheit von GAK resultierte teilweise in einer Dissoziation von Clathrin von der Spindel (Abb. 39). Densitometrische Untersuchungen konnten belegen, dass ca. 60 % von Clathrin von der Spindel ins Zytosol diffundiert. Durch die Zunahme der Konzentration von Clathrin im Zytosol wurde das Clathrinsignal an der Spindel verdeckt. Nach Permeabilisation der Zellen vor ihrer Fixierung konnte jedoch nachgewiesen werden, dass Clathrin in GAK-depletierten Zellen nicht vollständig von der Spindel dissoziiert (vgl. Abb. 39 & 45). Unlängst publizierte Daten stehen hingegen im Konflikt zu dieser Beobachtung. Shimizu et al. beschreiben im GAK *Knockdown* den vollständigen Abfall von Clathrin von der Spindel [Shimizu et al. 2009]. Aus der Publikation wird jedoch nicht klar, ob die untersuchten GAK-depletierten Zellen permeabilisiert wurden, um den Kontrast des Clathrinsignals an der Spindel heraufzusetzen. Zusätzlich zeigen Shimizu et al., dass 48 h nach Depletion von Clathrin GAK an der Spindel lokalisiert werden kann. Aufgrund dessen schlussfolgerten sie, dass GAK Clathrin an die Spindel rekrutiert [Shimizu et al. 2009].

Die Diskrepanz zwischen Shimizu et al. und den in dieser Arbeit gemachten Aussagen kann damit erklärt werden, dass die optimale Clathrin Depletion erst bei 72 h nach Transfektion erreicht wird [Hinrichsen et al. 2003]. Tatsächlich kann nach 48 h Clathrin Depletion eine restliche Assoziation von GAK mit der Spindel dokumentiert werden (eigene Daten). In dieser Arbeit wurde der Clathrin *Knockdown* erst 72 h nach Transfektion untersucht, bei vollständiger Depletion von Clathrin. Zu diesem Zeitpunkt konnte kein GAK mehr an der Spindel nachgewiesen werden.

Zusammenfassend legen die Daten in dieser Arbeit nahe, dass Clathrin Auxilin1 und GAK an die Spindel rekrutiert. Zusätzlich beeinflusst die Abwesenheit von Auxilin1 die Assoziation von Clathrin an der Spindel nicht, wohingegen sie sich negativ auf die Morphologie der Spindel auswirkt. Die Abwesenheit von GAK führt jedoch zu einer vermehrten Dissoziation von Clathrin von der Spindel und weist damit auf die Rolle von GAK bei der Regulation der Bindungsfähigkeit von Clathrin an die Spindel hin.

Aufgrund der Lokalisation von Dynamin an der Spindel und der direkten Interaktion von Dynamin mit GAK und Auxilin1 [Newmyer et al. 2003; Sever et al. 2006], wurde im weiteren Verlauf der hier vorliegenden Arbeit die Verteilung von Dynamin in GAK-depletierten mitotischen Zellen untersucht. Ziel dabei war es, die Abhängigkeit dieser Proteine voneinander zu testen. Die Daten zeigen, dass Dynamin von GAK an die Spindel rekrutiert wird. Während in Kontrollzellen ein starkes Dynaminsignal an der Spindel zu beobachten ist (Abb. 15-17), ist Dynamin in GAK-depletierten Zellen im Zytosol verteilt (Abb. 40). Untersuchungen im Auxilin1 *Knockdown* führen zu dem gleichen Ergebnis.

In dieser Arbeit wurde bereits gezeigt, dass Clathrin sowohl Dynamin als auch GAK und Auxilin1 an die Spindel rekrutiert. Zwischen Clathrin und Dynamin besteht keine direkte Bindung. GAK stellt damit ein mögliches Bindeglied der beiden Proteine dar. Die Untersuchung von GAK in Dynamin-depletierten Zellen zeigt, dass GAK mit der Spindel assoziiert bleibt (hier nicht gezeigt). Aufgrund der Tatsache, dass Clathrin im Dynamin *Knockdown* seine Lokalisation mit der Spindel nicht verliert, wird Dynamin vermutlich von Clathrin über GAK an die Spindel rekrutiert.

Die Literatur bestätigt, dass Auxilin1 und GAK in HeLa Zellen exprimiert werden und Clathrin-vermittelte Transportprozesse kompensieren können. Bei Kodepletion beider Proteine in der Mitose ist Clathrin nur noch schwach mit der Spindel assoziiert (Abb. 46). Eine Ähnlichkeit mit dem GAK *Knockdown* wird offensichtlich; allerdings ist ein restliches Clathrinsignal auch hier eindeutig an der Spindel nachzuweisen. Die Änderungen in der Morphologie der Spindel ähneln eher dem Auxilin1 *Knockdown*. Die Spindel erscheint wesentlich kleiner und unförmiger bei Kodepletion von Auxilin1 und GAK.
Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Kodepletion von Auxilin1 und GAK ähnliche Auswirkungen auf Clathrin in der Mitose hat wie der GAK *Knockdown*. Daraus resultiert eine Bedeutung von GAK für die Assoziation von Clathrin in der Mitose.
Während der Entstehung dieser Arbeit wurde GAK immer mehr eine wichtige Bedeutung in der Mitose zugeschrieben [Shimizu et al. 2009]. Deshalb wurde GAK mittels unterschiedlicher GFP-Fusionsproteine genauer untersucht. Die Eingrenzung der Bindungsdomäne von GAK an die Spindel führte zu dem Schluss, dass die Domäne zwischen den Aminosäuren 945 und 1260 für die Rekrutierung von GAK nötig ist (Abb. 47). Weder die Kinasedomäne noch die J-Domäne von GAK scheinen in erster Linie die Bindung von GAK an die Spindel zu unterstützen. Diese Daten stützen die These, dass GAK über Clathrin an die Spindel bindet, da sich zwischen den Aminosäuren 945 und 1260 die beiden Clathrinbindestellen befinden [Umeda et al. 2000; Scheele et al. 2001]. In einer kürzlich veröffentlichten Studie konnte gezeigt werden, dass die J-Domäne von GAK für

eine normale Chromosomen-Mikrotubuli-Bindung verantwortlich ist, während die Kinasedomäne keine Rolle in der Mitose spielt [Tanenbaum et al. 2010]. Tannenbaum nimmt an, dass GAK Clathrin aus Clathrin-bedeckten Vesikeln beim Eintritt in die Mitose recycelt und so Clathrins Assoziation an die Spindel vermittelt. Eine direkte Lokalisation von GAK selbst an der Spindel konnte Tannenbaum nicht nachweisen [Tanenbaum et al. 2010]. In künftigen Untersuchungen gilt es die GFP-GAK Fusionsproteine im GAK *Knockdown* zu exprimieren, um die Rolle von GAK in der Mitose noch genauer einzugrenzen. Dies war im Rahmen dieser Arbeit aus technischen Gründen nicht mehr möglich.

In dieser Arbeit wurde bereits dokumentiert, dass die Anwesenheit von Clathrin an der Spindel eine wichtige Rolle für die Dynamik der Zellteilung spielt. Wenn nun GAK die Bindungsfähigkeit von Clathrin an der Spindel beeinflusst, sollte seine Depletion ebenso zu negativen Effekten in der Mitose führen.
In RNAi Untersuchungen wurden daher die Auswirkungen der Depletion von Auxilin1, GAK und beiden Proteinen analysiert und miteinander verglichen. Obwohl bereits die Ausschaltung von Auxilin1 bzw. GAK zur Verzögerung der Mitosedauer führte (Abb. 51), übertraf die Kodepletion alle Erwartungen. Lediglich 2,5 % der Zellen erreichen die Anaphase in derselben Zeit wie 92 % der Kontrollzellen. In Abwesenheit von Auxilin1 und GAK kam es zu einer Arretierung der Mitose um bis zu 14 Stunden. Darüber hinaus führte die Kodepletion zur signifikanten Erhöhung nekrotischer bzw. apoptotischer Zellen. Auch Shimizu et al. beobachteten im GAK *Knockdown* einen erhöhten mitotischen Index, dem der Arrest der Zellen in der Prometaphase/Metaphase zugrunde lag [Shimizu et al. 2009]. Zusätzlich konnten sie feststellen, dass GAK-depletierte Zellen sich noch 2 Stunden nach Eintritt in die Mitose nicht geteilt haben. Das unterstützt unsere Daten, in denen mitotische Zellen im GAK *Knockdown* über einen sehr langen Zeitraum beobachtet wurden. Unsere Daten zeigten, dass der Eintritt der GAK-depletierten Zellen in die Anaphase um bis zu 16 Stunden verzögert wurde (Abb. 51). Diese Verzögerung resultiert vermutlich aus den Defekten im Transport der Chromosomen in die Äqutorialebene und ihrer Bindung an die Kinetochor-Mikrotubuli, zu denen die Abwesenheit von GAK führt.

Neben der Verzögerung der Metaphase äußert sich die Ausschaltung von Auxilin1, GAK und beiden Proteinen in verschieden morphologischen Auffälligkeiten. Besonders deutlich ist die Veränderung der Chromosomen-Morphologie. In GAK-depletierten Zellen und auch bei Kodepletion von GAK und Auxilin1 gibt es Zellen, die trotz ihrer aufgebauten Metaphase-Spindel, Prometaphase-Chromosomen aufweisen (Abb. 50). Ähnliches konnte auch Shimizu beobachten. Darüber hinaus konnte Shimizu im GAK *Knockdown*, durch die Lokalisation von der BubR1 Kinase an den Kinetochoren, eine fehlerhafte Bindung der

Chromosomen an die Kinetochor-Mikrotubuli belegen, [Shimizu et al. 2009]. BubR1 ist ein Signal für die Aktivierung des s*pindle assembly checkpoint* [Sudakin et al. 2001; Tang et al. 2001]. Eine andere Studie zeigte, dass der GAK *Knockdown* zu Defekten in der Entwicklung und Reifung von Mäusen führte [Lee et al. 2008].

Weitere auffällige Merkmale bei Depletion von Auxilin1, GAK und beiden Proteinen sind die vergrößerte Metaphaseplatte (Abb. 53) sowie die reduzierte Dimension der Spindel (Abb. 39 & 44). Spindeln mit geringeren Ausmaßen wurde auch an anderer Stelle im GAK *Knockdown* dokumentiert [Tanenbaum et al. 2010].
Ferner resultiert die Kodepletion von Auxilin1 und GAK in der Zunahme an multipolaren Spindeln (Abb. 55). Während das Ausschalten der Expression von GAK mittels RNAi zu einer Erhöhung der Centrosomenanzahl um ca. 15 % führt, weisen rund 40 % der GAK und Auxilin1 kodepletierten Zellen multipolare Spindeln auf. Shimizu konnte nachweisen, dass die Abwesenheit von GAK zu einer Fragmentierung des pericentripolaren Materials führt, die in multipolaren Spindeln resultiert [Shimizu et al. 2009]. Diese Daten untermauern die in dieser Arbeit nachgewiesene Assoziation von GAK an den Centrosomen und deuten auf eine Funktion von GAK bei der Regulation der Centrosomenteilung hin. Bereits für das GAK bindende Protein Dynamin konnte eine direkte Bindung an γ-Tubulin und eine Rolle bei der Kohäsion der Centrosomen nachgewiesen werden [Thompson et al. 2004]. Auch Clathrin ist an mitotischen Centrosomen lokalisiert. Möglicherweise rekrutiert Clathrin GAK und dadurch auch Dynamin an die Centrosomen und beteiligt sich an ihrer Zusammenlagerung sowie der Regulation der Mikrotubulipolymerisation. Ferner konnte die Lokalisation von weiteren Proteinen, die an Clathrin-vermittelten Transportvorgängen beteiligt sind, an den Centrosomen nachgewiesen werden. So ist für das Clathrin-bindende Protein ARH die Assoziation mit den Centrosomen der Spindel demonstriert worden [Lehtonen et al. 2008]. Bei der Clathrin-vermittelten Endozytose übernimmt ARH die endozytotische Sortierung von LDL-Rezeptoren reguliert. Darüber hinaus interagiert ARH direkt mit γ-Tubulin [Zheng et al. 1995; Moritz & Agard 2001] und spielt eine Rolle in der Zusammenlagerung der Centrosomen. Die Abwesenheit von ARH führt zu Defekten in der Centrosomen Zusammenlagerung und einer verlängerten Cytokinese. Ähnliche Effekte wurden auch bei Depletion von Dynamin beobachtet. Darüber hinaus konnte im Rahmen dieser Arbeit die Lokalisation von dem GFP-Hsc70 Fusionsprotein mit den Centrosomen der Spindel dokumentiert werden (eigene Daten). In der Literatur konnte bereits die Lokalisation von Hsp70 an den mitotischen Centrosomen demonstriert werden [Rattner 1991]. Hsc70 ist für die Dissassemblierung der Hülle von Clathrin-bedeckten Vesikeln verantwortlich, an welche es über die J-Domäne von Auxilin rekrutiert wird [Ungewickell et al. 1995; Holstein et al. 1996]. Möglicherweise interagiert

GAK mit Hsc70 und vermittelt den Abbau von Clathrinkäfigen beim Eintritt in die Mitose. In zukünftigen Untersuchungen sollte ein Fokus auf die Funktion von GAK und Clathrin an den Centrosomen gelegt werden.

Nachdem die Auswirkungen der Depletion von Auxilin1 und GAK auf den Verlauf der Mitose geklärt wurden, wurde im weiteren Schritt deren Einfluss auf die Dynamik der Spindel charakterisiert. Durch Kälteschock-Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Kodepletion von Auxilin1 und GAK zu einer Verzögerung in der Polymerisation der mitotischen Mikrotubuli führt (Abb. 72). Ähnliches wurde auch im GAK *Knockdown* allein beobachtet, jedoch weder im Clathrin noch im Dynamin *Knockdown*. Die Daten lassen die Annahme zu, dass GAK eine Rolle bei der Regulation der Spindelbildung in der Mitose übernimmt. Möglicherweise stehen die Defekte in der Mikrotubulipolymerisation im GAK *Knockdown* im Zusammenhang mit der Regulation der Clathrinbindung an der Spindel zusammen. Die Abwesenheit von Clathrin in mitotischen Zellen hat zunächst keine Auswirkung auf die Kinetik der Polymerisation der Spindel. Die erhöhte Dissoziation von Clathrin von der Spindel im GAK *Knockdown* und die Zunahme seiner Konzentration im Zytosol stört möglicherweise die Dynamik der Spindelpolymerisation. Eine erst kürzlich erschienene Publikation unterstützt diese Annahme. Im GAK *Knockdown* verläuft die Polymerisation der Mikrotubuli von den Chromosomen her verzögert [Tanenbaum et al. 2010]. Die Polymerisation der Mikrotubuli an den Kinetochoren wird durch die GTPase Ran vermittelt [Clarke & Zhang 2008]. Tanenbaum et al. vermuten einerseits, dass GAK für das Mikrotubuliwachstum von den Chromosomen benötigt wird, indem es die Funktion von Clathrin an der Spindel reguliert [Tanenbaum et al. 2010]. Allerdings zeigen sie andererseits, dass im GAK *Knockdown* der Ran-abhängige Signalweg in der Mitose nicht gestört wird [Tanenbaum et al. 2010]. Ebenfalls konnten sie für ein verwendetes GFP-Clathrin leichte Kette Fusionsprotein keine Kolokalisation mit der Spindel nachweisen, sondern lediglich eine konzentrierte Assoziation von Clathrin in der Nähe der Chromosomen [Tanenbaum et al. 2010]. Aus diesem Grund vermuteten sie, dass Clathrin in einem Ran-abhängigen Prozess an den Mikrotubuli in Chromosomennähe agiert [Tanenbaum et al. 2010]. Der mehrfach erbrachte Beweis der Kolokalisation von Clathrin an der Spindel widerlegt diese Thesen [hier gezeigt, Royle et al. 2005; Royle & Lagnado 2006]. In Zukunft bleibt jedoch zu prüfen, inwieweit Clathrin überhaupt in eine Ran-abhängige Funktion an der Spindel involviert ist.

Die Funktion von GAK in der Mitose kann auch in einem gänzlich anderen Zusammenhang betrachtet werden. Ursprünglich wurde GAK (Cyclin G assoziierte Kinase) aufgrund seiner Kinasedomäne als eine Serin/Threonin Kinase entdeckt, die mit Cyclin G interagiert

[Kanaoka et al. 1997]. Cycline bilden zusammen mit den zugehörigen Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs) Komplexe, deren Aktivierung beziehungsweise Deaktivierung durch Wachstumsfaktoren und Protoonkogene gesteuert wird [Ekholm & Reed 2000]. Die Cyclin-abhängigen Kinasen regulieren den Zellzyklus durch die spezifische Phosphorylierung und Aktivierung weiterer Proteine [Wulf et al. 2009].
Das Protein Cyclin G gehört zur Familie der Cycline und interagiert mit den Cyclin-abhängigen Kinasen über seine konservierte Cyclin-Box [Tamura et al. 1993]. Cyclin G wird während des gesamten Zellzyklus exprimiert, seine Expressionsrate sinkt jedoch beim Eintritt der Zellen in die Mitose [Tamura et al. 1993; Bates et al. 1996; Horne et al. 1996]. Überexpression von Cyclin G führt in verschiedenen Zelllinien zur Apoptose [Okamoto & Prives 1999]. Dies macht die in dieser Arbeit beobachtete Abnahme der Zellvitalität im GAK *Knockdown* plausibel. Durch die Depletion von GAK könnte Cyclin G seinen Bindungspartner verlieren, wodurch die erhöhte Konzentration am freien Cyclin G zu Apoptose führt. Tatsächlich spielt Cyclin G zusammen mit p53 eine Rolle bei dem Arrest der Mitose, der aufgrund von DNA-Schäden ausgelöst wird, sowie in der Regulation des Zellwachstums nach Reparatur der Schäden [Kimura et al. 2001]. Darüber hinaus ist der Tumorsuppressors p53 für die Regulation der Transkription des Cyclin G-Gens zuständig [Okamoto & Beach 1994; Zauberman et al. 1995].
Der Transkriptionsfaktor p53 ist in unterschiedliche Zellprozesse involviert, wie Regulation des Zellzyklus und der Apoptose, Reparatur von DNA-Schäden oder Zelldifferenzierung [Bates & Vousden 1999; Jayaraman & Prives 1999; Zuckerman et al. 2009]. Auch eine Interaktion von p53 mit Clathrin im Zellkern, das dort zu ca. 5 % exprimiert wird, wurde bereits beschrieben [Enari et al. 2006]. Die Bindung von p53 an Clathrin bedarf jedoch der Clathrin Monomere [Ohmori et al. 2008]. Interessanterweise wird auch GAK im Zellkern exprimiert, in dem es in phosphorylierter Form vorliegt [Sato et al. 2009]. GAK bindet am N- und C-Terminus von Clathrin und verhindert so dessen Trimerisierung [Sato et al. 2009]. Möglicherweise steuern GAK und Clathrin die Transkription von p53 im Zellkern. Zusammenfassend erkennen sich verschiedene Funktionen der Proteine der Clathrin-vermittelten Transportprozesse abhängig des Zellzyklus und der damit verbundenen Interaktionspartner.

Die Assoziation von Auxilin1 und GAK mit der Spindel spielt eine wichtige Rolle in der Mitose. Trotz ihrer Homologie und den Fähigkeiten Clathrin-vermittelte Transportvorgänge in HeLa Zellen zu kompensieren, decken sich ihre Aufgaben in der Mitose nicht. Auxilin1 reguliert vermutlich die Ausmaße der Spindel, da seine Ausschaltung zu verringerter Spindeldimension führt. Zusätzlich verzögert seine Depletion den Verlauf der Mitose. Die Abwesenheit von Auxilin1 beeinflusst allerdings kaum die Assoziation von Clathrin mit der

Spindel. Im Gegensatz dazu hat GAK eine wichtige Bedeutung bei der Regulation der Clathrinbindung an die Spindel. Darüber hinaus führt der GAK *Knockdown* zum Arrest der Mitose, dadurch dass die Prometaphasendynamik beeinträchtigt wird. Möglicherweise wirken die beiden Proteine gegeneinander wobei Auxilin1 die Dissoziation von Clathrin von der Spindel unterstützt, während GAK seine Assoziation fördert. Im GAK *Knockdown* würde sich somit das Clathrin Gleichgewicht an der Spindel zugunsten der Dissoziation von Clathrin verschieben. Im Auxilin1 *Knockdown* würde im Umkehrschluss GAK die Assoziation von Clathrin an der Spindel unterstützen.

Da die Spindel ein sehr dynamisches Gebilde ist und, wie in dieser Arbeit bereits gezeigt, Clathrin an der Spindel einem ständigen Austausch unterliegt, ist eine ebenso dynamische Regulation des Gleichgewichtes wahrscheinlich. Wie aus den Daten hervorgeht, spielen Auxilin1 und GAK hierbei vermutlich die entscheidende Rolle. Beide weisen eine starke Homologie auf, wobei GAK zusätzlich eine Kinasedomäne trägt [Kanaoka et al. 1997; Umeda et al. 2000; Korolchuk & Banting 2002]. Diese scheint jedoch nicht für die Assoziation von GAK an der Spindel verantwortlich zu sein (Abb. 49). In Zukunft gilt es zu klären, wie GAK die Assoziation von Clathrin an der Spindel steuert. Zusätzlich sollte untersucht werden, warum Auxilin1 einen anderen Einfluss als GAK auf die Mitose hat. Entscheidend ist, dass die in dieser Arbeit erhobenen Daten zukunftsweisend gezeigt haben, dass Auxilin1 und GAK zwei unterschiedliche Funktionen in der Mitose erfüllen.

6.3 Schlussbetrachtung

In dieser Dissertation wurde gezeigt, dass Clathrin eine wichtige Funktion an der mitotischen Spindel erfüllt. Durch seine enge und dennoch dynamische Assoziation an den Spindelapparat unterstützt Clathrin dessen Stabilität und ermöglicht gleichzeitig die Flexibilität der Spindel. Zusätzlich konnte zum ersten Mal nachgewiesen werden, dass Clathrin weitere Proteine der Clathrin-vermittelten Transportprozesse an die Spindel rekrutiert, von denen GAK eine besondere Stellung einnimmt. Die Abwesenheit von GAK führt zu großen Defekten in der Zellteilung und verhindert den normalen Verlauf der Mitose. Darüber hinaus offenbaren die Daten weitere Funktionen für Proteine der Clathrin-vermittelten Transportprozesse in der Zelle.
Der Fokus für künftige Untersuchungen sollte auf die Charakterisierung der Bindungspartner der in dieser Arbeit vorgestellten Proteine und eine Aufklärung der molekularen Mechanismen gerichtet werden, um das Zusammenspiel der komplexen Teilungsmaschinerie zu verstehen. Weiter ist die Klärung der Frage von Interesse, durch welche Signale oder posttranslationale Modifikationen die Proteine der Clathrin-vermittelten Transportprozesse in der Mitose zu ihren alternativen Aufgaben gesteuert werden.

Ein genaues Verständnis der komplexen Vorgänge in der Zellteilung ist von fundamentaler Bedeutung für die Analyse physiologischer und pathophysiologischer Zusammenhänge in der Zelle. Die vorliegende Arbeit hat einen Beitrag zur Charakterisierung von Clathrin und weiteren Proteinen der Clathrin-vermittelten Transportprozesse in der Mitose geliefert.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Verschiedene Wege der Endozytose. 17

Abb. 2: Schematische Darstellung der Clathrin-vermittelten Endozytose. 20

Abb. 3: Darstellung eines Clathrintriskelions und der Grundform eines Clathrinkäfigs.....23

Abb. 4: Schematische Übersicht des molekularen Aufbaus der Adaptorproteine AP1 bis AP4. 24

Abb. 5: Schematische Übersicht des Zellzyklus. 32

Abb. 6 Schematischer Aufbau der mitotischen Spindel.....35

Abb. 7: Clathrin und Tubulin in der Interphase. 68

Abb. 8: Clathrin in der Mitose. 69

Abb. 9: Clathrin an Kinetochor- und Astral-Mikrotubuli der mitotischen Spindel. 71

Abb. 10: Clathrin und γ-Tubulin. 72

Abb. 11: Clathrin-bedeckte Vesikel im Elektronenmikroskop. 73

Abb. 12: Clathrinstrukturen an der mitotischen Spindel im Elektronenmikroskop. 75

Abb. 13: Verteilung von AP1 in der Mitose. 78

Abb. 14: Verteilung von AP2 in der Mitose. 79

Abb. 15: Verteilung von Dynamin in der Mitose. 80

Abb. 16: Dynamin an der mitotischen Spindel. 81

Abb. 17: GFP-Dynamin und GFP-DynaminK44A in der Mitose. 82

Abb. 18: GFP-GAK und Clathrin in der Interphase. 83

Abb. 19: GFP-GAK und Clathrin in der Mitose. 84

Abb. 20: Untersuchung von GAK mit verschiedenen Antikörpern in der Metaphase. 85

Abb. 21: GAK an den Centrosomen der Interphase. 86

Abb. 22: Auxilin1 an der mitotischen Spindel. 87

Abb. 23: Vergleich zwei unterschiedlicher Methoden der Depletion von Clathrin. 90

Abb. 24: Depletion von Clathrin mit anschließender Transferrin Internalisation. 92

Abb. 25: Vergleich der mitotischen Spindel in Abhängigkeit von Clathrin. 93

Abb. 26: AP1 in Clathrin-depletierten Zellen. 94

Abb. 27: Clathrin in AP1-depletierten mitotischen Zellen. 96

Abb. 28: Dynamin in Clathrin-depletierten Zellen. 97

Abb. 29: Dynamin in Clathrin-depletierten Zellen. 98

Abb. 30: RFP-Dynamin in Clathrin-depletierten Zellen....99

Abb. 31: Die Herunterregulation der Expression von Dynamin2. 100

Abb. 32: Nachweis der Depletion von Dynamin mit verschiedenen Antikörpern. 101

Abb. 33: Lokalisation von Dynamin mit dem monoklonalen Antikörper „H-300“. 102

Abb. 34: Effizienz der Herunterregulation der Expression von Dynamin. 103

Abb. 35: Clathrin in Dynamin-depletierten Zellen. 104

Abb. 36: GAK in Clathrin-depletierten Zellen der Interphase. 104

Abb. 37: GAK in Clathrin-depletierten mitotischen Zellen. 105

Abb. 38: Die Herunterregulation der Expression von GAK. 106

Abb. 39: Clathrin in GAK-depletierten mitotischen Zellen. 107

Abb. 40: GFP-Dynamin in GAK-depletierten Zellen. 108

Abb. 41: Herunterregulation der Expression von Auxilin1. HeLa SS6 wurden 96 h nach Transfektion von si-Auxilin1 im Western-Blot untersucht. 109

Abb. 42: Clathrin in Auxilin1-depletierten mitotischen Zellen. 110

Abb. 43: Herunterregulation der Expression von Auxilin1, GAK und beiden Proteinen. 111

Abb. 44: Vergleich von Clathrin in Auxilin1- und GAK-depletierten Zellen. 112

Abb. 45: GAK-depletierte Zellen, die vor dem Fixieren permeabilisiert wurden. 113

Abb. 46: Kodepletion von Auxilin1 und GAK in mitotischen Zellen. 114

Abb. 47: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von GAK. 116

Abb. 48: Vergleich der GFP-GAK Fusionsproteine in der Interphase. 117

Abb. 49: Vergleich der GFP-GAK Fusionsproteine in der Mitose. 119

Abb. 50: Morphologie der Chromosomen in Clathrin-depletierten und Auxilin1 und GAK kodepletierten Zellen. 122

Abb. 51: Dauer der Pro-/Metaphase bei Depletion von Clathrin, Dynamin, Auxilin1 und GAK. .124

Abb. 52: Vitalität der Zellen bei Depletion der untersuchten Proteine. 127

Abb. 53: Breite der Metaphaseplatte bei Depletion der untersuchten Proteine. 128

Abb. 54: Poldistanz der Spindel bei Depletion der untersuchten Proteine. 129

Abb. 55: Anzahl der Centrosomen bei Depletion der untersuchten Proteine. 130

Abb. 56: Vergleich von mitotischem und Interphasen Zytosol. 132

Abb. 57: Proteininteraktion von Clathrin und Tubulin. 133

Abb. 58: Polymerisierte Mikrotubuli und Clathrin. 133

Abb. 59: Polymerisierte Mikrotubuli. 134

Abb. 60: Isolierte Spindeln. 135

Abb. 61: Inkubation mitotischer Zellen mit Nocodazol. 137

Abb. 62: Inkubation mitotischer Zellen mit Latrunculin B. 139

Abb. 63: Inkubation von BFA auf Zellen der Interphase und der Mitose. 141

Abb. 64: Inkubation von Butanol auf Zellen in der Interphase und in der Mitose. 142

Abb. 65: Inkubation mitotischer Zellen mit Sucrose. 144

Abb. 66: Einfluss von Sucrose auf Clathrin an der Spindel. 145

Abb. 67: Einfluss von 0,4 M Sucrose auf die Spindel in HeLa Zellen. 146

Abb. 68: Kälteinduzierte Depolymerisation der Mikrotubuli in Interphase und Mitose. 147

Abb. 69: Auswirkungen der Inkubation von 4 °C kaltem Medium auf Clathrin und Tubulin in Interphasezellen. 148

Abb. 70: Auswirkungen der Inkubation von 4 °C kaltem Medium auf Clathrin und Tubulin in mitotischen Zellen. 149

Abb. 71: Kältestabilität der mitotischen Spindel in Abhängigkeit von Clathrin. 150

Abb. 72: Polymerisation der Spindel bei Depletion von Clathrin sowie Auxilin1 und GAK.....152

Abb. 73: FRAP einer mitotischen Spindel. 153

Abb. 74: Änderung der relativen Fluoreszenzintensität im FRAP Experiment. 154

7. Literaturverzeichnis

Adolph K.W. & Phelps J.P. *Role of non-histones in chromosome structure. Cell cycle variations in protein synthesis.* J Biol Chem (257) 9086-9092, **1982**.

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

Ahle S. & Ungewickell E. *Purification and properties of a new clathrin assembly protein.* EMBO J (5) 3143-3149, **1986**.

Ahle S. & Ungewickell E. *Identification of a clathrin binding subunit in the HA2 adaptor protein complex.* J Biol Chem (264) 20089-20093, **1989**.

Ahle S. & Ungewickell E. *Auxilin, a newly identified clathrin-associated protein in coated vesicles from bovine brain.* J Cell Biol (111) 19-29, **1990**.

Albertson R., Riggs B. & Sullivan W. *Membrane traffic: a driving force in cytokinesis.* Trends Cell Biol (15) 92-101, **2005**.

Andersen J.S., Wilkinson C.J., Mayor T., Mortensen P., Nigg E.A. & Mann M. *Proteomic characterization of the human centrosome by protein correlation profiling.* Nature (426) 570-574, **2003**.

Austin C., Hinners I. & Tooze S.A. *Direct and GTP-dependent interaction of ADP-ribosylation factor 1 with clathrin adaptor protein AP-1 on immature secretory granules.* J Biol Chem (275) 21862-21869, **2000**.

Ausubel F.M., Brent R., Kingston R., Moore D., Seidman J., Smith J. & Struhl K., *Short Protocols in Molecular Biology*, John Wiley \& Sons, New York, **1999**.

Barr A.R. & Gergely F. *Aurora-A: the maker and breaker of spindle poles.* J Cell Sci (120) 2987-2996, **2007**.

Bates S., Rowan S. & Vousden K.H. *Characterisation of human cyclin G1 and G2: DNA damage inducible genes.* Oncogene (13) 1103-1109, **1996**.

Bates S. & Vousden K.H. *Mechanisms of p53-mediated apoptosis.* Cell Mol Life Sci (55) 28-37, **1999**.

Behrend L., Stöter M., Kurth M., Rutter G., Heukeshoven J., Deppert W. & Knippschild U. *Interaction of casein kinase 1 delta (CK1delta) with post-Golgi structures, microtubules and the spindle apparatus.* Eur J Cell Biol (79) 240-251, **2000**.

Benesch S., Polo S., Lai F.P.L., Anderson K.I., Stradal T.E.B., Wehland J. & Rottner K. *N-WASP deficiency impairs EGF internalization and actin assembly at clathrin-coated pits.* J Cell Sci (118) 3103-3115, **2005**.

Benmerah A., Bégue B., Dautry-Varsat A. & Cerf-Bensussan N. *The ear of alpha-adaptin interacts with the COOH-terminal domain of the Eps 15 protein.* J Biol Chem (271) 12111-12116, **1996**.

Black M.W. & Pelham H.R. *A selective transport route from Golgi to late endosomes that requires the yeast GGA proteins.* J Cell Biol (151) 587-600, **2000**.

Blangy A., Lane H.A., d'Hérin P., Harper M., Kress M. & Nigg E.A. *Phosphorylation by p34cdc2 regulates spindle association of human Eg5, a kinesin-related motor essential for bipolar spindle formation in vivo.* Cell (83) 1159-1169, **1995**.

Boehm M. & Bonifacino J.S. *Adaptins: the final recount.* Mol Biol Cell (12) 2907-2920, **2001**.

Boman A.L., Zhang C., Zhu X. & Kahn R.A. *A family of ADP-ribosylation factor effectors that can alter membrane transport through the trans-Golgi.* Mol Biol Cell (11) 1241-1255, **2000**.

Bonifacino J.S. *The GGA proteins: adaptors on the move.* Nat Rev Mol Cell Biol (5) 23-32, **2004**.

Bonner M.K. & Skop A.R. *Cell division screens and dynamin.* Biochem Soc Trans (36) 431-435, **2008**.

Borlido J., Veltri G., Jackson A.P. & Mills I.G. *Clathrin is spindle-associated but not essential for mitosis.* PLoS One (3) e3115, **2008**.

Bosc C., Oenarier E., Andrieux A. & Job D. *STOP proteins.* Cell Struct Funct (24) 393-399, **1999**.

Boucrot E. & Kirchhausen T. *Endosomal recycling controls plasma membrane area during mitosis.* Proc Natl Acad Sci U S A (104) 7939-7944, **2007**.

Boucrot E., Saffarian S., Massol R., Kirchhausen T. & Ehrlich M. *Role of lipids and actin in the formation of clathrin-coated pits.* Exp Cell Res (312) 4036-4048, **2006**.

Brinkley B.R. & Cartwright J. *Cold-labile and cold-stable microtubules in the mitotic spindle of mammalian cells.* Ann N Y Acad Sci (253) 428-439, **1975**.

Brittle A.L. & Ohkura H. *Centrosome maturation: Aurora lights the way to the poles.* Curr Biol (15) R880-R882, **2005**.

Brodsky F.M. *Clathrin structure characterized with monoclonal antibodies. II. Identification of in vivo forms of clathrin.* J Cell Biol (101) 2055-2062, **1985**.

Brodsky F.M., Chen C.Y., Knuehl C., Towler M.C. & Wakeham D.E. *Biological basket weaving: formation and function of clathrin-coated vesicles.* Annu Rev Cell Dev Biol (17) 517-568, **2001**.

Brodsky F.M., Galloway C.J., Blank G.S., Jackson A.P., Seow H.F., Drickamer K. & Parham P. *Localization of clathrin light-chain sequences mediating heavy-chain binding and coated vesicle diversity.* Nature (326) 203-205, **1987**.

Bukau B. & Horwich A.L. *The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines.* Cell (92) 351-366, **1998**.

Busson S., Dujardin D., Moreau A., Dompierre J. & Mey J.R.D. *Dynein and dynactin are localized to astral microtubules and at cortical sites in mitotic epithelial cells.* Curr Biol (8) 541-544, **1998**.

Cahu J., Olichon A., Hentrich C., Schek H., Drinjakovic J., Zhang C., Doherty-Kirby A., Lajoie G. & Surrey T. *Phosphorylation by Cdk1 increases the binding of Eg5 to microtubules in vitro and in Xenopus egg extract spindles.* PLoS One (3) e3936, **2008**.

Camilli P.D., Chen H., Hyman J., Panepucci E., Bateman A. & Brunger A.T. *The ENTH domain.* FEBS Lett (513) 11-18, **2002**.

Cande W.Z., Snyder J., Smith D., Summers K. & McIntosh J.R. *A functional mitotic spindle prepared from mammalian cells in culture.* Proc Natl Acad Sci U S A (71) 1559-1563, **1974**.

Cao H., Garcia F. & McNiven M.A. *Differential distribution of dynamin isoforms in mammalian cells.* Mol Biol Cell (9) 2595-2609, **1998**.

Cao H., Thompson H.M., Krueger E.W. & McNiven M.A. *Disruption of Golgi structure and function in mammalian cells expressing a mutant dynamin.* J Cell Sci (113 (Pt 11)) 1993-2002, **2000**.

Cassimeris L. *Accessory protein regulation of microtubule dynamics throughout the cell cycle.* Curr Opin Cell Biol (11) 134-141, **1999**.

Cayrol C., Cougoule C. & Wright M. *The beta2-adaptin clathrin adaptor interacts with the mitotic checkpoint kinase BubR1.* Biochem Biophys Res Commun (298) 720-730, **2002**.

Chen Z., Indjeian V.B., McManus M., Wang L. & Dynlacht B.D. *CP110, a cell cycle-dependent CDK substrate, regulates centrosome duplication in human cells.* Dev Cell (3) 339-350, **2002**.

Cheng Z.-J., Singh R.D., Marks D.L. & Pagano R.E. *Membrane microdomains, caveolae, and caveolar endocytosis of sphingolipids.* Mol Membr Biol (23) 101-110, **2006**.

Chin C.F. & Yeong F.M. *Safeguarding entry into mitosis: the antephase checkpoint.* Mol Cell Biol (30) 22-32, **2010**.

Chin D.J., Straubinger R.M., Acton S., Näthke I. & Brodsky F.M. *100-kDa polypeptides in peripheral clathrin-coated vesicles are required for receptor-mediated endocytosis.* Proc Natl Acad Sci U S A (86) 9289-9293, **1989**.

Clarke P.R. & Zhang C. *Spatial and temporal coordination of mitosis by Ran GTPase.* Nat Rev Mol Cell Biol (9) 464-477, **2008**.

Collins B.M., McCoy A.J., Kent H.M., Evans P.R. & Owen D.J. *Molecular architecture and functional model of the endocytic AP2 complex.* Cell (109) 523-535, **2002**.

Collins B.M., Praefcke G.J.K., Robinson M.S. & Owen D.J. *Structural basis for binding of accessory proteins by the appendage domain of GGAs.* Nat Struct Biol (10) 607-613, **2003**.

Conner S.D. & Schmid S.L. *Identification of an adaptor-associated kinase, AAK1, as a regulator of clathrin-mediated endocytosis.* J Cell Biol (156) 921-929, **2002**.

Conner S.D. & Schmid S.L. *Differential requirements for AP-2 in clathrin-mediated endocytosis.* J Cell Biol (162) 773-779, **2003**.

Cooper S. *Rethinking synchronization of mammalian cells for cell cycle analysis.* Cell Mol Life Sci (60) 1099-1106, **2003**.

Costaguta G., Stefan C.J., Bensen E.S., Emr S.D. & Payne G.S. *Yeast Gga coat proteins function with clathrin in Golgi to endosome transport.* Mol Biol Cell (12) 1885-1896, **2001**.

Cremona O., Paolo G.D., Wenk M.R., Lüthi A., Kim W.T., Takei K., Daniell L., Nemoto Y., Shears S.B., Flavell R.A., McCormick D.A. & Camilli P.D. *Essential role of phosphoinositide metabolism in synaptic vesicle recycling.* Cell (99) 179-188, **1999**.

Crowther R.A. & Pearse B.M. *Assembly and packing of clathrin into coats.* J Cell Biol (91) 790-797, **1981**.

Damke H., Baba T., Warnock D.E. & Schmid S.L. *Induction of mutant dynamin specifically blocks endocytic coated vesicle formation.* J Cell Biol (127) 915-934, **1994**.

Daugherty B.L., Straley K.S., Sanders J.M., Phillips J.W., Disdier M., McEver R.P. & Green S.A. *AP-3 adaptor functions in targeting P-selectin to secretory granules in endothelial cells.* Traffic (2) 406-413, **2001**.

Dell'Angelica E.C., Klumperman J., Stoorvogel W. & Bonifacino J.S. *Association of the AP-3 adaptor complex with clathrin.* Science (280) 431-434, **1998**.

Dell'Angelica E.C., Mullins C. & Bonifacino J.S. *AP-4, a novel protein complex related to clathrin adaptors.* J Biol Chem (274) 7278-7285, **1999**.

Dell'Angelica E.C., Ohno H., Ooi C.E., Rabinovich E., Roche K.W. & Bonifacino J.S. *AP-3: an adaptor-like protein complex with ubiquitous expression.* EMBO J (16) 917-928, **1997**.

Dell'Angelica E.C., Puertollano R., Mullins C., Aguilar R.C., Vargas J.D., Hartnell L.M. & Bonifacino J.S. *GGAs: a family of ADP ribosylation factor-binding proteins related to adaptors and associated with the Golgi complex.* J Cell Biol (149) 81-94, **2000**.

Denarier E., Fourest-Lieuvin A., Bosc C., Pirollet F., Chapel A., Margolis R.L. & Job D. *Nonneuronal isoforms of STOP protein are responsible for microtubule cold stability in mammalian fibroblasts.* Proc Natl Acad Sci U S A (95) 6055-6060, **1998**.

Dharmawardhane S., Schürmann A., Sells M.A., Chernoff J., Schmid S.L. & Bokoch G.M. *Regulation of macropinocytosis by p21-activated kinase-1.* Mol Biol Cell (11) 3341-3352, **2000**.

Doherty G.J. & McMahon H.T. *Mechanisms of endocytosis.* Annu Rev Biochem (78) 857-902, **2009**.

Doray B., Bruns K., Ghosh P. & Kornfeld S.A. *Autoinhibition of the ligand-binding site of GGA1/3 VHS domains by an internal acidic cluster-dileucine motif.* Proc Natl Acad Sci U S A (99) 8072-8077, **2002**.

Doray B. & Kornfeld S. *Gamma subunit of the AP-1 adaptor complex binds clathrin: implications for cooperative binding in coated vesicle assembly.* Mol Biol Cell (12) 1925-1935, **2001**.

Doray B., Lee I., Knisely J., Bu G. & Kornfeld S. *The gamma/sigma1 and alpha/sigma2 hemicomplexes of clathrin adaptors AP-1 and AP-2 harbor the dileucine recognition site.* Mol Biol Cell (18) 1887-1896, **2007**.

Doxsey S. *Re-evaluating centrosome function.* Nat Rev Mol Cell Biol (2) 688-698, **2001**.

Drake M.T., Downs M.A. & Traub L.M. *Epsin binds to clathrin by associating directly with the clathrin-terminal domain. Evidence for cooperative binding through two discrete sites.* J Biol Chem (275) 6479-6489, **2000**.

Drake M.T. & Traub L.M. *Interaction of two structurally distinct sequence types with the clathrin terminal domain beta-propeller.* J Biol Chem (276) 28700-28709, **2001**.

Díaz-Martínez L.A. & Clarke D.J. *Chromosome cohesion and the spindle checkpoint.* Cell Cycle (8) 2733-2740, **2009**.

Düwel M. & Ungewickell E.J. *Clathrin-dependent association of CVAK104 with endosomes and the trans-Golgi network.* Mol Biol Cell (17) 4513-4525, **2006**.

Echard A., Hickson G.R.X., Foley E. & O'Farrell P.H. *Terminal cytokinesis events uncovered after an RNAi screen.* Curr Biol (14) 1685-1693, **2004**.

Eggert U.S., Kiger A.A., Richter C., Perlman Z.E., Perrimon N., Mitchison T.J. & Field C.M. *Parallel chemical genetic and genome-wide RNAi screens identify cytokinesis inhibitors and targets.* PLoS Biol (2) e379, **2004**.

Eilers U., Klumperman J. & Hauri H.P. *Nocodazole, a microtubule-active drug, interferes with apical protein delivery in cultured intestinal epithelial cells (Caco-2).* J Cell Biol (108) 13-22, **1989**.

Ekholm S.V. & Reed S.I. *Regulation of G(1) cyclin-dependent kinases in the mammalian cell cycle.* Curr Opin Cell Biol (12) 676-684, **2000**.

Elbashir S.M., Harborth J., Lendeckel W., Yalcin A., Weber K. & Tuschl T. *Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells.* Nature (411) 494-498, **2001**.

Enari M., Ohmori K., Kitabayashi I. & Taya Y. *Requirement of clathrin heavy chain for p53-mediated transcription.* Genes Dev (20) 1087-1099, **2006**.

Esk C., Chen C.-Y., Johannes L. & Brodsky F.M. *The clathrin heavy chain isoform CHC22 functions in a novel endosomal sorting step.* J Cell Biol (188) 131-144, **2010**.

Faragher A.J. & Fry A.M. *Nek2A kinase stimulates centrosome disjunction and is required for formation of bipolar mitotic spindles.* Mol Biol Cell (14) 2876-2889, **2003**.

Feng B., Schwarz H. & Jesuthasan S. *Furrow-specific endocytosis during cytokinesis of zebrafish blastomeres.* Exp Cell Res (279) 14-20, **2002**.

Fish K.N., Schmid S.L. & Damke H. *Evidence that dynamin-2 functions as a signal-transducing GTPase.* J Cell Biol (150) 145-154, **2000**.

Flaherty K.M., McKay D.B., Kabsch W. & Holmes K.C. *Similarity of the three-dimensional structures of actin and the ATPase fragment of a 70-kDa heat shock cognate protein.* Proc Natl Acad Sci U S A (88) 5041-5045, **1991**.

Ford M.G.J., Mills I.G., Peter B.J., Vallis Y., Praefcke G.J.K., Evans P.R. & McMahon H.T. *Curvature of clathrin-coated pits driven by epsin.* Nature (419) 361-366, **2002**.

Fotin A., Cheng Y., Sliz P., Grigorieff N., Harrison S.C., Kirchhausen T. & Walz T. *Molecular model for a complete clathrin lattice from electron cryomicroscopy.* Nature (432) 573-579, **2004**.

Fourest-Lieuvin A., Peris L., Gache V., Garcia-Saez I., Juillan-Binard C., Lantez V. & Job D. *Microtubule regulation in mitosis: tubulin phosphorylation by the cyclin-dependent kinase Cdk1.* Mol Biol Cell (17) 1041-1050, **2006**.

Frick M., Bright N.A., Riento K., Bray A., Merrified C. & Nichols B.J. *Coassembly of flotillins induces formation of membrane microdomains, membrane curvature, and vesicle budding.* Curr Biol (17) 1151-1156, **2007**.

Fry A.M. *The Nek2 protein kinase: a novel regulator of centrosome structure.* Oncogene (21) 6184-6194, **2002**.

Fung T.K. & Poon R.Y.C. *A roller coaster ride with the mitotic cyclins.* Semin Cell Dev Biol (16) 335-342, **2005**.

Futter C.E., Gibson A., Allchin E.H., Maxwell S., Ruddock L.J., Odorizzi G., Domingo D., Trowbridge I.S. & Hopkins C.R. *In polarized MDCK cells basolateral vesicles arise from clathrin-gamma-adaptin-coated domains on endosomal tubules.* J Cell Biol (141) 611-623, **1998**.

Gaidarov I. & Keen J.H. *Phosphoinositide-AP-2 interactions required for targeting to plasma membrane clathrin-coated pits.* J Cell Biol (146) 755-764, **1999**.

Gall W.E., Higginbotham M.A., Chen C., Ingram M.F., Cyr D.M. & Graham T.R. *The auxilin-like phosphoprotein Swa2p is required for clathrin function in yeast.* Curr Biol (10) 1349-1358, **2000**.

García P. & Frampton J. *The transcription factor B-Myb is essential for S-phase progression and genomic stability in diploid and polyploid megakaryocytes.* J Cell Sci (119) 1483-1493, **2006**.

Gavet O., Ozon S., Manceau V., Lawler S., Curmi P. & Sobel A. *The stathmin phosphoprotein family: intracellular localization and effects on the microtubule network.* J Cell Sci (111 (Pt 22)) 3333-3346, **1998**.

Ghosh P. & Kornfeld S. *AP-1 binding to sorting signals and release from clathrin-coated vesicles is regulated by phosphorylation.* J Cell Biol (160) 699-708, **2003**.

Glebov O.O., Bright N.A. & Nichols B.J. *Flotillin-1 defines a clathrin-independent endocytic pathway in mammalian cells.* Nat Cell Biol (8) 46-54, **2006**.

González-Gaitán M. & Jäckle H. *Role of Drosophila alpha-adaptin in presynaptic vesicle recycling.* Cell (88) 767-776, **1997**.

Goodman O.B., Krupnick J.G., Gurevich V.V., Benovic J.L. & Keen J.H. *Arrestin/clathrin interaction. Localization of the arrestin binding locus to the clathrin terminal domain.* J Biol Chem (272) 15017-15022, **1997**.

Gorbsky G.J. *The mitotic spindle checkpoint.* Curr Biol (11) R1001-R1004, **2001**.

Goshima G. & Scholey J.M. *Control of mitotic spindle length.* Annu Rev Cell Dev Biol (26) 21-57, **2010**.

Gragerov A. & Gottesman M.E. *Different peptide binding specificities of hsp70 family members.* J Mol Biol (241) 133-135, **1994**.

Grassart A., Dujeancourt A., Lazarow P.B., Dautry-Varsat A. & Sauvonnet N. *Clathrin-independent endocytosis used by the IL-2 receptor is regulated by Rac1, Pak1 and Pak2.* EMBO Rep (9) 356-362, **2008**.

Greener T., Grant B., Zhang Y., Wu X., Greene L.E., Hirsh D. & Eisenberg E. *Caenorhabditis elegans auxilin: a J-domain protein essential for clathrin-mediated endocytosis in vivo.* Nat Cell Biol (3) 215-219, **2001**.

Greener T., Zhao X., Nojima H., Eisenberg E. & Greene L.E. *Role of cyclin G-associated kinase in uncoating clathrin-coated vesicles from non-neuronal cells.* J Biol Chem (275) 1365-1370, **2000**.

Grimmer S., van Deurs B. & Sandvig K. *Membrane ruffling and macropinocytosis in A431 cells require cholesterol.* J Cell Sci (115) 2953-2962, **2002**.

Gu C., Yaddanapudi S., Weins A., Osborn T., Reiser J., Pollak M., Hartwig J. & Sever S. *Direct dynamin-actin interactions regulate the actin cytoskeleton.* EMBO J (29) 3593-3606, **2010**.

ter Haar E., Harrison S.C. & Kirchhausen T. *Peptide-in-groove interactions link target proteins to the beta-propeller of clathrin.* Proc Natl Acad Sci U S A (97) 1096-1100, **2000**.

Hagedorn E.J., Bayraktar J.L., Kandachar V.R., Bai T., Englert D.M. & Chang H.C. *Drosophila melanogaster auxilin regulates the internalization of Delta to control activity of the Notch signaling pathway.* J Cell Biol (173) 443-452, **2006**.

Hamao K., Morita M. & Hosoya H. *New function of the proline rich domain in dynamin-2 to negatively regulate its interaction with microtubules in mammalian cells.* Exp Cell Res (315) 1336-1345, **2009**.

Hannan L.A., Newmyer S.L. & Schmid S.L. *ATP- and cytosol-dependent release of adaptor proteins from clathrin-coated vesicles: A dual role for Hsc70.* Mol Biol Cell (9) 2217-2229, **1998**.

Harper J.V. *Synchronization of cell populations in G1/S and G2/M phases of the cell cycle.* Methods Mol Biol (296) 157-166, **2005**.

Heltianu C., Dobrila L., Antohe F. & Simionescu M. *Evidence for thyroxine transport by the lung and heart capillary endothelium.* Microvasc Res (37) 188-203, **1989**.

Henderson B. *Integrating the cell stress response: a new view of molecular chaperones as immunological and physiological homeostatic regulators.* Cell Biochem Funct (28) 1-14, **2010**.

Hendrick J.P., Langer T., Davis T.A., Hartl F.U. & Wiedmann M. *Control of folding and membrane translocation by binding of the chaperone DnaJ to nascent polypeptides.* Proc Natl Acad Sci U S A (90) 10216-10220, **1993**.

Hepler P.K., McIntosh J.R. & Cleland S. *Intermicrotubule bridges in mitotic spindle apparatus.* J Cell Biol (45) 438-444, **1970**.

Herskovits J.S., Shpetner H.S., Burgess C.C. & Vallee R.B. *Microtubules and Src homology 3 domains stimulate the dynamin GTPase via its C-terminal domain.* Proc Natl Acad Sci U S A (90) 11468-11472, **1993**.

Heuser J.E. & Anderson R.G. *Hypertonic media inhibit receptor-mediated endocytosis by blocking clathrin-coated pit formation.* J Cell Biol (108) 389-400, **1989**.

Hidalgo J., Garcia-Navarro R., Gracia-Navarro F., Perez-Vilar J. & Velasco A. *Presence of Golgi remnant membranes in the cytoplasm of brefeldin A-treated cells.* Eur J Cell Biol (58) 214-227, **1992**.

Hinrichsen L., Harborth J., Andrees L., Weber K. & Ungewickell E.J. *Effect of clathrin heavy chain- and alpha-adaptin-specific small inhibitory RNAs on endocytic accessory proteins and receptor trafficking in HeLa cells.* J Biol Chem (278) 45160-45170, **2003**.

Hinshaw J.E. *Dynamin and its role in membrane fission.* Annu Rev Cell Dev Biol (16) 483-519, **2000**.

Hinshaw J.E. & Schmid S.L. *Dynamin self-assembles into rings suggesting a mechanism for coated vesicle budding.* Nature (374) 190-192, **1995**.

Hirokawa N., Noda Y. & Okada Y. *Kinesin and dynein superfamily proteins in organelle transport and cell division.* Curr Opin Cell Biol (10) 60-73, **1998**.

Hirsch J.R., Weber G., Kleta I. & Schlatter E. *A novel cGMP-regulated K+ channel in immortalized human kidney epitheliall cells (IHKE-1).* J Physiol (519 Pt 3) 645-655, **1999**.

Hirst J., Bright N.A., Rous B. & Robinson M.S. *Characterization of a fourth adaptor-related protein complex.* Mol Biol Cell (10) 2787-2802, **1999**.

Hirst J., Lui W.W., Bright N.A., Totty N., Seaman M.N. & Robinson M.S. *A family of proteins with gamma-adaptin and VHS domains that facilitate trafficking between the trans-Golgi network and the vacuole/lysosome.* J Cell Biol (149) 67-80, **2000**.

Hirst J., Motley A., Harasaki K., Chew S.Y.P. & Robinson M.S. *EpsinR: an ENTH domain-containing protein that interacts with AP-1.* Mol Biol Cell (14) 625-641, **2003**.

Hirst J., Sahlender D.A., Li S., Lubben N.B., Borner G.H.H. & Robinson M.S. *Auxilin depletion causes self-assembly of clathrin into membraneless cages in vivo.* Traffic (9) 1354-1371, **2008**.

Hochstrasser M. *Ubiquitin, proteasomes, and the regulation of intracellular protein degradation.* Curr Opin Cell Biol (7) 215-223, **1995**.

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 (11) 1129-1140, **2010**.

Holstein S.E., Ungewickell H. & Ungewickell E. *Mechanism of clathrin basket dissociation: separate functions of protein domains of the DnaJ homologue auxilin.* J Cell Biol (135) 925-937, **1996**.

Horne M.C., Goolsby G.L., Donaldson K.L., Tran D., Neubauer M. & Wahl A.F. *Cyclin G1 and cyclin G2 comprise a new family of cyclins with contrasting tissue-specific and cell cycle-regulated expression.* J Biol Chem (271) 6050-6061, **1996**.

Hölzenspies J.J., Roelen B.A.J., Colenbrander B., Romijn R.A.P., Hemrika W., Stoorvogel W. & van Haeften T. *Clathrin is essential for meiotic spindle function in oocytes.* Reproduction (140) 223-233, **2010**.

Höning S., Kreimer G., Robenek H. & Jockusch B.M. *Receptor-mediated endocytosis is sensitive to antibodies against the uncoating ATPase (hsc70).* J Cell Sci (107 (Pt 5)) 1185-1196, **1994**.

Ito D. & Matsumoto T. *Molecular mechanisms and function of the spindle checkpoint, a guardian of the chromosome stability.* Adv Exp Med Biol (676) 15-26, **2010**.

Itoh T., Erdmann K.S., Roux A., Habermann B., Werner H. & Camilli P.D. *Dynamin and the actin cytoskeleton cooperatively regulate plasma membrane invagination by BAR and F-BAR proteins.* Dev Cell (9) 791-804, **2005**.

Izumi T. & Maller J.L. *Elimination of cdc2 phosphorylation sites in the cdc25 phosphatase blocks initiation of M-phase.* Mol Biol Cell (4) 1337-1350, **1993**.

Janvier K., Kato Y., Boehm M., Rose J.R., Martina J.A., Kim B.-Y., Venkatesan S. & Bonifacino J.S. *Recognition of dileucine-based sorting signals from HIV-1 Nef and LIMP-II by the AP-1 gamma-sigma1 and AP-3 delta-sigma3 hemicomplexes.* J Cell Biol (163) 1281-1290, **2003**.

Jayaraman L. & Prives C. *Covalent and noncovalent modifiers of the p53 protein.* Cell Mol Life Sci (55) 76-87, **1999**.

Jha A., Agostinelli N.R., Mishra S.K., Keyel P.A., Hawryluk M.J. & Traub L.M. *A novel AP-2 adaptor interaction motif initially identified in the long-splice isoform of synaptojanin 1, SJ170.* J Biol Chem (279) 2281-2290, **2004**.

Joaquin M. & Watson R.J. *Cell cycle regulation by the B-Myb transcription factor.* Cell Mol Life Sci (60) 2389-2401, **2003**.

Kalthoff C., Groos S., Kohl R., Mahrhold S. & Ungewickell E.J. *Clint: a novel clathrin-binding ENTH-domain protein at the Golgi.* Mol Biol Cell (13) 4060-4073, **2002**.

Kanaoka Y., Kimura S.H., Okazaki I., Ikeda M. & Nojima H. *GAK: a cyclin G associated kinase contains a tensin/auxilin-like domain.* FEBS Lett (402) 73-80, **1997**.

Kanaseki T. & Kadota K. *The "vesicle in a basket". A morphological study of the coated vesicle isolated from the nerve endings of the guinea pig brain, with special reference to the mechanism of membrane movements.* J Cell Biol (42) 202-220, **1969**.

Karahara I., Suda J., Tahara H., Yokota E., Shimmen T., Misaki K., Yonemura S., Staehelin L.A. & Mineyuki Y. *The preprophase band is a localized center of clathrin-mediated endocytosis in late prophase cells of the onion cotyledon epidermis.* Plant J (57) 819-831, **2009**.

Kent H.M., McMahon H.T., Evans P.R., Benmerah A. & Owen D.J. *Gamma-adaptin appendage domain: structure and binding site for Eps15 and gamma-synergin.* Structure (10) 1139-1148, **2002**.

Kimura S.H., Ikawa M., Ito A., Okabe M. & Nojima H. *Cyclin G1 is involved in G2/M arrest in response to DNA damage and in growth control after damage recovery.* Oncogene (20) 3290-3300, **2001**.

Kinoshita K., Noetzel T.L., Pelletier L., Mechtler K., Drechsel D.N., Schwager A., Lee M., Raff J.W. & Hyman A.A. *Aurora A phosphorylation of TACC3/maskin is required for centrosome-dependent microtubule assembly in mitosis.* J Cell Biol (170) 1047-1055, **2005**.

Kirkham M., Fujita A., Chadda R., Nixon S.J., Kurzchalia T.V., Sharma D.K., Pagano R.E., Hancock J.F., Mayor S. & Parton R.G. *Ultrastructural identification of uncoated caveolin-independent early endocytic vehicles.* J Cell Biol (168) 465-476, **2005**.

Kirschner M.W. & Mitchison T. *Microtubule dynamics.* Nature (324) 621, **1986**.

Knuehl C., Chen C.-Y., Manalo V., Hwang P.K., Ota N. & Brodsky F.M. *Novel binding sites on clathrin and adaptors regulate distinct aspects of coat assembly.* Traffic (7) 1688-1700, **2006**.

Kollareddy M., Dzubak P., Zheleva D. & Hajduch M. *Aurora kinases: structure, functions and their association with cancer.* Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub (152) 27-33, **2008**.

Konopka C.A., Schleede J.B., Skop A.R. & Bednarek S.Y. *Dynamin and cytokinesis.* Traffic (7) 239-247, **2006**.

Korolchuk V.I. & Banting G. *CK2 and GAK/auxilin2 are major protein kinases in clathrin-coated vesicles.* Traffic (3) 428-439, **2002**.

Kunda P. & Baum B. *The actin cytoskeleton in spindle assembly and positioning.* Trends Cell Biol (19) 174-179, **2009**.

Laemmli U.K. *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.* Nature (227) 680-685, **1970**.

Lange B.M.H. *Integration of the centrosome in cell cycle control, stress response and signal transduction pathways.* Curr Opin Cell Biol (14) 35-43, **2002**.

Larsson N., Marklund U., Gradin H.M., Brattsand G. & Gullberg M. *Control of microtubule dynamics by oncoprotein 18: dissection of the regulatory role of multisite phosphorylation during mitosis.* Mol Cell Biol (17) 5530-5539, **1997**.

Laufen T., Mayer M.P., Beisel C., Klostermeier D., Mogk A., Reinstein J. & Bukau B. *Mechanism of regulation of hsp70 chaperones by DnaJ cochaperones.* Proc Natl Acad Sci U S A (96) 5452-5457, **1999**.

won Lee D., Zhao X., Zhang F., Eisenberg E. & Greene L.E. *Depletion of GAK/auxilin 2 inhibits receptor-mediated endocytosis and recruitment of both clathrin and clathrin adaptors.* J Cell Sci (118) 4311-4321, **2005**.

Lee D.-W., Zhao X., Yim Y.-I., Eisenberg E. & Greene L.E. *Essential role of cyclin-G-associated kinase (Auxilin-2) in developing and mature mice.* Mol Biol Cell (19) 2766-2776, **2008**.

Lee M.J., Gergely F., Jeffers K., Peak-Chew S.Y. & Raff J.W. *Msps/XMAP215 interacts with the centrosomal protein D-TACC to regulate microtubule behaviour.* Nat Cell Biol (3) 643-649, **2001b**.

Lee Y.M., Lee S., Lee E., Shin H., Hahn H., Choi W. & Kim W. *Human kinesin superfamily member 4 is dominantly localized in the nuclear matrix and is associated with chromosomes during mitosis.* Biochem J (360) 549-556, **2001a**.

Lehtonen S., Shah M., Nielsen R., Iino N., Ryan J.J., Zhou H. & Farquhar M.G. *The endocytic adaptor protein ARH associates with motor and centrosomal proteins and is involved in centrosome assembly and cytokinesis.* Mol Biol Cell (19) 2949-2961, **2008**.

Lewis W.H. *Pinocytosis* Bull. Johns Hopkins Hospital (49) 17-23, **1931**.

Li D.M. & Sun H. *TEP1, encoded by a candidate tumor suppressor locus, is a novel protein tyrosine phosphatase regulated by transforming growth factor beta.* Cancer Res (57) 2124-2129, **1997**.

Lin C.-H., Hu C.-K. & Shih H.-M. *Clathrin heavy chain mediates TACC3 targeting to mitotic spindles to ensure spindle stability.* J Cell Biol (189) 1097-1105, **2010**.

Lindner R. & Ungewickell E. *Clathrin-associated proteins of bovine brain coated vesicles. An analysis of their number and assembly-promoting activity.* J Biol Chem (267) 16567-16573, **1992**.

Liu S.H., Towler M.C., Chen E., Chen C.Y., Song W., Apodaca G. & Brodsky F.M. *A novel clathrin homolog that co-distributes with cytoskeletal components functions in the trans-Golgi network.* EMBO J (20) 272-284, **2001**.

Liu Z. & Zheng Y. *A requirement for epsin in mitotic membrane and spindle organization.* J Cell Biol (186) 473-480, **2009**.

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

Lowe M. & Barr F.A. *Inheritance and biogenesis of organelles in the secretory pathway.* Nat Rev Mol Cell Biol (8) 429-439, **2007**.

Lundmark R. & Carlsson S.R. *Regulated membrane recruitment of dynamin-2 mediated by sorting nexin 9.* J Biol Chem (279) 42694-42702, **2004**.

Lundmark R., Doherty G.J., Howes M.T., Cortese K., Vallis Y., Parton R.G. & McMahon H.T. *The GTPase-activating protein GRAF1 regulates the CLIC/GEEC endocytic pathway.* Curr Biol (18) 1802-1808, **2008**.

Mack G.J. & Compton D.A. *Analysis of mitotic microtubule-associated proteins using mass spectrometry identifies astrin, a spindle-associated protein.* Proc Natl Acad Sci U S A (98) 14434-14439, **2001**.

Maddox P.S., Bloom K.S. & Salmon E.D. *The polarity and dynamics of microtubule assembly in the budding yeast Saccharomyces cerevisiae.* Nat Cell Biol (2) 36-41, **2000**.

Maeda K., Nakata T., Noda Y., Sato-Yoshitake R. & Hirokawa N. *Interaction of dynamin with microtubules: its structure and GTPase activity investigated by using highly purified dynamin.* Mol Biol Cell (3) 1181-1194, **1992**.

Mailand N., Lukas C., Kaiser B.K., Jackson P.K., Bartek J. & Lukas J. *Deregulated human Cdc14A phosphatase disrupts centrosome separation and chromosome segregation.* Nat Cell Biol (4) 317-322, **2002**.

Manning A.L. & Compton D.A. *Structural and regulatory roles of nonmotor spindle proteins.* Curr Opin Cell Biol (20) 101-106, **2008**.

Marks B., Stowell M.H., Vallis Y., Mills I.G., Gibson A., Hopkins C.R. & McMahon H.T. *GTPase activity of dynamin and resulting conformation change are essential for endocytosis.* Nature (410) 231-235, **2001**.

Massol R.H., Boll W., Griffin A.M. & Kirchhausen T. *A burst of auxilin recruitment determines the onset of clathrin-coated vesicle uncoating.* Proc Natl Acad Sci U S A (103) 10265-10270, **2006**.

Mastronarde D.N., McDonald K.L., Ding R. & McIntosh J.R. *Interpolar spindle microtubules in PTK cells.* J Cell Biol (123) 1475-1489, **1993**.

Matheson J., Yu X., Fielding A.B. & Gould G.W. *Membrane traffic in cytokinesis.* Biochem Soc Trans (33) 1290-1294, **2005**.

Mattera R., Arighi C.N., Lodge R., Zerial M. & Bonifacino J.S. *Divalent interaction of the GGAs with the Rabaptin-5-Rabex-5 complex.* EMBO J (22) 78-88, **2003**.

Mayer M.P., Laufen T., Paal K., McCarty J.S. & Bukau B. *Investigation of the interaction between DnaK and DnaJ by surface plasmon resonance spectroscopy.* J Mol Biol (289) 1131-1144, **1999a**.

Mayer T.U., Kapoor T.M., Haggarty S.J., King R.W., Schreiber S.L. & Mitchison T.J. *Small molecule inhibitor of mitotic spindle bipolarity identified in a phenotype-based screen.* Science (286) 971-974, **1999b**.

McDonald K.L., O'Toole E.T., Mastronarde D.N. & McIntosh J.R. *Kinetochore microtubules in PTK cells.* J Cell Biol (118) 369-383, **1992**.

McEwen B.F., Heagle A.B., Cassels G.O., Buttle K.F. & Rieder C.L. *Kinetochore fiber maturation in PtK1 cells and its implications for the mechanisms of chromosome congression and anaphase onset.* J Cell Biol (137) 1567-1580, **1997**.

McIntosh JR L.S. *The distribution of spindle microtubules during mitosis in cultured human cells.* J Cell Biol. (49) 468-97, **1971**.

McNally K., Audhya A., Oegema K. & McNally F.J. *Katanin controls mitotic and meiotic spindle length.* J Cell Biol (175) 881-891, **2006**.

McNiven M.A. *Dynamin: a molecular motor with pinchase action.* Cell (94) 151-154, **1998**.

McNiven M.A., Kim L., Krueger E.W., Orth J.D., Cao H. & Wong T.W. *Regulated interactions between dynamin and the actin-binding protein cortactin modulate cell shape.* J Cell Biol (151) 187-198, **2000**.

Merrifield C.J., Perrais D. & Zenisek D. *Coupling between clathrin-coated-pit invagination, cortactin recruitment, and membrane scission observed in live cells.* Cell (121) 593-606, **2005**.

Meyer C., Zizioli D., Lausmann S., Eskelinen E.L., Hamann J., Saftig P., von Figura K. & Schu P. *mu1A-adaptin-deficient mice: lethality, loss of AP-1 binding and rerouting of mannose 6-phosphate receptors.* EMBO J (19) 2193-2203, **2000**.

Meyerholz A. *Die Funktion der Cyclin G assoziierten Kinase (GAK) in Clathrin-abhängigen Transportvorgängen.*, Dissertation, Medizinische Hochschule Hannover, **2002**.

Meyerholz A., Hinrichsen L., Groos S., Esk P.-C., Brandes G. & Ungewickell E.J. *Effect of clathrin assembly lymphoid myeloid leukemia protein depletion on clathrin coat formation.* Traffic (6) 1225-1234, **2005**.

Misumi Y., Misumi Y., Miki K., Takatsuki A., Tamura G. & Ikehara Y. *Novel blockade by brefeldin A of intracellular transport of secretory proteins in cultured rat hepatocytes.* J Biol Chem (261) 11398-11403, **1986**.

Mitchison J.M. & Carter B.L. *Cell cycle analysis.* Methods Cell Biol (11) 201-219, **1975**.

Mitchison T. & Kirschner M. *Dynamic instability of microtubule growth.* Nature (312) 237-242, **1984**.

Morgan D.O. *Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors.* Annu Rev Cell Dev Biol (13) 261-291, **1997**.

Morgan J.R., Prasad K., Hao W., Augustine G.J. & Lafer E.M. *A conserved clathrin assembly motif essential for synaptic vesicle endocytosis.* J Neurosci (20) 8667-8676, **2000**.

Morgan J.R., Prasad K., Jin S., Augustine G.J. & Lafer E.M. *Uncoating of clathrin-coated vesicles in presynaptic terminals: roles for Hsc70 and auxilin.* Neuron (32) 289-300, **2001**.

Moritz M. & Agard D.A. *Gamma-tubulin complexes and microtubule nucleation.* Curr Opin Struct Biol (11) 174-181, **2001**.

Morris S.A., Mann A. & Ungewickell E. *Analysis of 100-180-kDa phosphoproteins in clathrin-coated vesicles from bovine brain.* J Biol Chem (265) 3354-3357, **1990**.

Motley A., Bright N.A., Seaman M.N.J. & Robinson M.S. *Clathrin-mediated endocytosis in AP-2-depleted cells.* J Cell Biol (162) 909-918, **2003**.

Mountain V., Simerly C., Howard L., Ando A., Schatten G. & Compton D.A. *The kinesin-related protein, HSET, opposes the activity of Eg5 and cross-links microtubules in the mammalian mitotic spindle.* J Cell Biol (147) 351-366, **1999**.

Muhlberg A.B., Warnock D.E. & Schmid S.L. *Domain structure and intramolecular regulation of dynamin GTPase.* EMBO J (16) 6676-6683, **1997**.

Mullins C. & Bonifacino J.S. *Structural requirements for function of yeast GGAs in vacuolar protein sorting, alpha-factor maturation, and interactions with clathrin.* Mol Cell Biol (21) 7981-7994, **2001**.

Mullins C., Hartnell L.M. & Bonifacino J.S. *Distinct requirements for the AP-3 adaptor complex in pigment granule and synaptic vesicle biogenesis in Drosophila melanogaster.* Mol Gen Genet (263) 1003-1014, **2000**.

Murray A.W. *Recycling the cell cycle: cyclins revisited.* Cell (116) 221-234, **2004**.

Naslavsky N., Weigert R. & Donaldson J.G. *Characterization of a nonclathrin endocytic pathway: membrane cargo and lipid requirements.* Mol Biol Cell (15) 3542-3552, **2004**.

Nasmyth K.A. & Reed S.I. *Isolation of genes by complementation in yeast: molecular cloning of a cell-cycle gene.* Proc Natl Acad Sci U S A (77) 2119-2123, **1980**.

Nevins A.K. & Thurmond D.C. *Caveolin-1 functions as a novel Cdc42 guanine nucleotide dissociation inhibitor in pancreatic beta-cells.* J Biol Chem (281) 18961-18972, **2006**.

Newmyer S.L., Christensen A. & Sever S. *Auxilin-dynamin interactions link the uncoating ATPase chaperone machinery with vesicle formation.* Dev Cell (4) 929-940, **2003**.

Nicklas R.B., Kubai D.F. & Hays T.S. *Spindle microtubules and their mechanical associations after micromanipulation in anaphase.* J Cell Biol (95) 91-104, **1982**.

Nicklas R.B., Lee G.M., Rieder C.L. & Rupp G. *Mechanically cut mitotic spindles: clean cuts and stable microtubules.* J Cell Sci (94 (Pt 3)) 415-423, **1989**.

Nielsen M.S., Madsen P., Christensen E.I., Nykjaer A., Gliemann J., Kasper D., Pohlmann R. & Petersen C.M. *The sortilin cytoplasmic tail conveys Golgi-endosome transport and binds the VHS domain of the GGA2 sorting protein.* EMBO J (20) 2180-2190, **2001**.

Niemann H.H., Knetsch M.L., Scherer A., Manstein D.J. & Kull F.J. *Crystal structure of a dynamin GTPase domain in both nucleotide-free and GDP-bound forms.* EMBO J (20) 5813-5821, **2001**.

Nigg E.A. *Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle.* Bioessays (17) 471-480, **1995**.

Nigg E.A. *Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints.* Nat Rev Mol Cell Biol (2) 21-32, **2001**.

Nigg E.A. *Centrosome aberrations: cause or consequence of cancer progression?* Nat Rev Cancer (2) 815-825, **2002**.

Nogi T., Shiba Y., Kawasaki M., Shiba T., Matsugaki N., Igarashi N., Suzuki M., Kato R., Takatsu H., Nakayama K. & Wakatsuki S. *Structural basis for the accessory protein recruitment by the gamma-adaptin ear domain.* Nat Struct Biol (9) 527-531, **2002**.

Nossal R. *Energetics of clathrin basket assembly.* Traffic (2) 138-147, **2001**.

Nédélec F.J., Surrey T., Maggs A.C. & Leibler S. *Self-organization of microtubules and motors.* Nature (389) 305-308, **1997**.

Ochoa G.C., Slepnev V.I., Neff L., Ringstad N., Takei K., Daniell L., Kim W., Cao H., McNiven M., Baron R. & Camilli P.D. *A functional link between dynamin and the actin cytoskeleton at podosomes.* J Cell Biol (150) 377-389, **2000**.

Ohmori K., Endo Y., Yoshida Y., Ohata H., Taya Y. & Enari M. *Monomeric but not trimeric clathrin heavy chain regulates p53-mediated transcription.* Oncogene (27) 2215-2227, **2008**.

Okamoto C.T., McKinney J. & Jeng Y.Y. *Clathrin in mitotic spindles.* Am J Physiol Cell Physiol (279) C369-C374, **2000**.

Okamoto K. & Beach D. *Cyclin G is a transcriptional target of the p53 tumor suppressor protein.* EMBO J (13) 4816-4822, **1994**.

Okamoto K. & Prives C. *A role of cyclin G in the process of apoptosis.* Oncogene (18) 4606-4615, **1999**.

Oldham C.E., Mohney R.P., Miller S.L.H., Hanes R.N. & O'Bryan J.P. *The ubiquitin-interacting motifs target the endocytic adaptor protein epsin for ubiquitination.* Curr Biol (12) 1112-1116, **2002**.

Orth J.D. & McNiven M.A. *Dynamin at the actin-membrane interface.* Curr Opin Cell Biol (15) 31-39, **2003**.

Owen D.J. *Linking endocytic cargo to clathrin: structural and functional insights into coated vesicle formation.* Biochem Soc Trans (32) 1-14, **2004**.

Owen D.J., Collins B.M. & Evans P.R. *Adaptors for clathrin coats: structure and function.* Annu Rev Cell Dev Biol (20) 153-191, **2004**.

Owen D.J., Vallis Y., Noble M.E., Hunter J.B., Dafforn T.R., Evans P.R. & McMahon H.T. *A structural explanation for the binding of multiple ligands by the alpha-adaptin appendage domain.* Cell (97) 805-815, **1999**.

Owen D.J., Vallis Y., Pearse B.M., McMahon H.T. & Evans P.R. *The structure and function of the beta 2-adaptin appendage domain.* EMBO J (19) 4216-4227, **2000**.

Owen D.J., Wigge P., Vallis Y., Moore J.D., Evans P.R. & McMahon H.T. *Crystal structure of the amphiphysin-2 SH3 domain and its role in the prevention of dynamin ring formation.* EMBO J (17) 5273-5285, **1998**.

Padrón D., Wang Y.J., Yamamoto M., Yin H. & Roth M.G. *Phosphatidylinositol phosphate 5-kinase Ibeta recruits AP-2 to the plasma membrane and regulates rates of constitutive endocytosis.* J Cell Biol (162) 693-701, **2003**.

Page L.J. & Robinson M.S. *Targeting signals and subunit interactions in coated vesicle adaptor complexes.* J Cell Biol (131) 619-630, **1995**.

Page L.J., Sowerby P.J., Lui W.W. & Robinson M.S. *Gamma-synergin: an EH domain-containing protein that interacts with gamma-adaptin.* J Cell Biol (146) 993-1004, **1999**.

Parton R.G. *Caveolae--from ultrastructure to molecular mechanisms.* Nat Rev Mol Cell Biol (4) 162-167, **2003**.

Parton R.G. & Simons K. *The multiple faces of caveolae.* Nat Rev Mol Cell Biol (8) 185-194, **2007**.

Payne C.K., Jones S.A., Chen C. & Zhuang X. *Internalization and trafficking of cell surface proteoglycans and proteoglycan-binding ligands.* Traffic (8) 389-401, **2007**.

Peeler J.S., Donzell W.C. & Anderson R.G. *The appendage domain of the AP-2 subunit is not required for assembly or invagination of clathrin-coated pits.* J Cell Biol (120) 47-54, **1993**.

Peset I. & Vernos I. *The TACC proteins: TACC-ling microtubule dynamics and centrosome function.* Trends Cell Biol (18) 379-388, **2008**.

Peter B.J., Kent H.M., Mills I.G., Vallis Y., Butler P.J.G., Evans P.R. & McMahon H.T. *BAR domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin BAR structure.* Science (303) 495-499, **2004**.

Pines J. *Mitosis: a matter of getting rid of the right protein at the right time.* Trends Cell Biol (16) 55-63, **2006**.

Pishvaee B., Costaguta G., Yeung B.G., Ryazantsev S., Greener T., Greene L.E., Eisenberg E., McCaffery J.M. & Payne G.S. *A yeast DNA J protein required for uncoating of clathrin-coated vesicles in vivo.* Nat Cell Biol (2) 958-963, **2000**.

Polo S., Sigismund S., Faretta M., Guidi M., Capua M.R., Bossi G., Chen H., Camilli P.D. & Fiore P.P.D. *A single motif responsible for ubiquitin recognition and monoubiquitination in endocytic proteins.* Nature (416) 451-455, **2002**.

Poupon V., Girard M., Legendre-Guillemin V., Thomas S., Bourbonniere L., Philie J., Bright N.A. & McPherson P.S. *Clathrin light chains function in mannose phosphate receptor trafficking via regulation of actin assembly.* Proc Natl Acad Sci U S A (105) 168-173, **2008**.

Poussu A., Lohi O. & Lehto V.P. *Vear, a novel Golgi-associated protein with VHS and gamma-adaptin "ear" domains.* J Biol Chem (275) 7176-7183, **2000**.

Praefcke G.J.K., Ford M.G.J., Schmid E.M., Olesen L.E., Gallop J.L., Peak-Chew S.-Y., Vallis Y., Babu M.M., Mills I.G. & McMahon H.T. *Evolving nature of the AP2 alpha-appendage hub during clathrin-coated vesicle endocytosis.* EMBO J (23) 4371-4383, **2004**.

Prasad K., Barouch W., Greene L. & Eisenberg E. *A protein cofactor is required for uncoating of clathrin baskets by uncoating ATPase.* J Biol Chem (268) 23758-23761, **1993**.

Puck T.T., Marcus P.I. & Cieciura S.J. *Clonal growth of mammalian cells in vitro; growth characteristics of colonies from single HeLa cells with and without a feeder layer.* J Exp Med (103) 273-283, **1956**.

Puertollano R., Aguilar R.C., Gorshkova I., Crouch R.J. & Bonifacino J.S. *Sorting of mannose 6-phosphate receptors mediated by the GGAs.* Science (292) 1712-1716, **2001a**.

Puertollano R., Randazzo P.A., Presley J.F., Hartnell L.M. & Bonifacino J.S. *The GGAs promote ARF-dependent recruitment of clathrin to the TGN.* Cell (105) 93-102, **2001b**.

Puri S., Telfer H., Velliste M., Murphy R.F. & Linstedt A.D. *Dispersal of Golgi matrix proteins during mitotic Golgi disassembly.* J Cell Sci (117) 451-456, **2004**.

Radulescu A.E., Siddhanta A. & Shields D. *A role for clathrin in reassembly of the Golgi apparatus.* Mol Biol Cell (18) 94-105, **2007**.

Randall C.L., Burkard M.E. & Jallepalli P.V. *Polo kinase and cytokinesis initiation in mammalian cells: harnessing the awesome power of chemical genetics.* Cell Cycle (6) 1713-1717, **2007**.

Rappoport J.Z., Heyman K.P., Kemal S. & Simon S.M. *Dynamics of dynamin during clathrin mediated endocytosis in PC12 cells.* PLoS One (3) e2416, **2008**.

Rattner J.B. *hsp70 is localized to the centrosome of dividing HeLa cells.* Exp Cell Res (195) 110-113, **1991**.

Reaves B. & Banting G. *Perturbation of the morphology of the trans-Golgi network following Brefeldin A treatment: redistribution of a TGN-specific integral membrane protein, TGN38.* J Cell Biol (116) 85-94, **1992**.

Richter K., Haslbeck M. & Buchner J. *The heat shock response: life on the verge of death.* Mol Cell (40) 253-266, **2010**.

Ricotta D., Conner S.D., Schmid S.L., von Figura K. & Honing S. *Phosphorylation of the AP2 mu subunit by AAK1 mediates high affinity binding to membrane protein sorting signals.* J Cell Biol (156) 791-795, **2002**.

Rieder C.L., Faruki S. & Khodjakov A. *The centrosome in vertebrates: more than a microtubule-organizing center.* Trends Cell Biol (11) 413-419, **2001**.

Rieder C.L. & Salmon E.D. *Motile kinetochores and polar ejection forces dictate chromosome position on the vertebrate mitotic spindle.* J Cell Biol (124) 223-233, **1994**.

Ritter B., Philie J., Girard M., Tung E.C., Blondeau F. & McPherson P.S. *Identification of a family of endocytic proteins that define a new alpha-adaptin ear-binding motif.* EMBO Rep (4) 1089-1095, **2003**.

Robinson M.S. *Cloning and expression of gamma-adaptin, a component of clathrin-coated vesicles associated with the Golgi apparatus.* J Cell Biol (111) 2319-2326, **1990**.

Robinson M.S. & Bonifacino J.S. *Adaptor-related proteins.* Curr Opin Cell Biol (13) 444-453, **2001**.

Robinson M.S. & Kreis T.E. *Recruitment of coat proteins onto Golgi membranes in intact and permeabilized cells: effects of brefeldin A and G protein activators.* Cell (69) 129-138, **1992**.

Robinson M.S. & Pearse B.M. *Immunofluorescent localization of 100K coated vesicle proteins.* J Cell Biol (102) 48-54, **1986**.

Rohde G., Wenzel D. & Haucke V. *A phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate binding site within mu2-adaptin regulates clathrin-mediated endocytosis.* J Cell Biol (158) 209-214, **2002**.

Roth T.F. & Porter K.R. *Yolk protein uptake in the oocyte of the mosquito aedes aegypti L.* J Cell Biol (20) 313-332, **1964**.

Roux A., Uyhazi K., Frost A. & Camilli P.D. *GTP-dependent twisting of dynamin implicates constriction and tension in membrane fission.* Nature (441) 528-531, **2006**.

Royle S.J. *The cellular functions of clathrin.* Cell Mol Life Sci (63) 1823-1832, **2006**.

Royle S.J., Bright N.A. & Lagnado L. *Clathrin is required for the function of the mitotic spindle.* Nature (434) 1152-1157, **2005**.

Royle S.J. & Lagnado L. *Trimerisation is important for the function of clathrin at the mitotic spindle.* J Cell Sci (119) 4071-4078, **2006**.

Sabharanjak S., Sharma P., Parton R.G. & Mayor S. *GPI-anchored proteins are delivered to recycling endosomes via a distinct cdc42-regulated, clathrin-independent pinocytic pathway.* Dev Cell (2) 411-423, **2002**.

Sala A. *B-MYB, a transcription factor implicated in regulating cell cycle, apoptosis and cancer.* Eur J Cancer (41) 2479-2484, **2005**.

Sala A., Kundu M., Casella I., Engelhard A., Calabretta B., Grasso L., Paggi M.G., Giordano A., Watson R.J., Khalili K. & Peschle C. *Activation of human B-MYB by cyclins.* Proc Natl Acad Sci U S A (94) 532-536, **1997**.

Samuels A.L., Giddings T.H. & Staehelin L.A. *Cytokinesis in tobacco BY-2 and root tip cells: a new model of cell plate formation in higher plants.* J Cell Biol (130) 1345-1357, **1995**.

Sato J., Shimizu H., Kasama T., Yabuta N. & Nojima H. *GAK, a regulator of clathrin-mediated membrane trafficking, localizes not only in the cytoplasm but also in the nucleus.* Genes Cells (14) 627-641, **2009**.

Saxton W.M., Stemple D.L., Leslie R.J., Salmon E.D., Zavortink M. & McIntosh J.R. *Tubulin dynamics in cultured mammalian cells.* J Cell Biol (99) 2175-2186, **1984**.

Scaife R. & Margolis R.L. *Biochemical and immunochemical analysis of rat brain dynamin interaction with microtubules and organelles in vivo and in vitro.* J Cell Biol (111) 3023-3033, **1990**.

Schafer D.A. *Regulating actin dynamics at membranes: a focus on dynamin.* Traffic (5) 463-469, **2004**.

Scheele U., Kalthoff C. & Ungewickell E. *Multiple interactions of auxilin 1 with clathrin and the AP-2 adaptor complex.* J Biol Chem (276) 36131-36138, **2001**.

Schmid S.L. *Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: an integrated process.* Annu Rev Biochem (66) 511-548, **1997**.

Schmidt A., Wolde M., Thiele C., Fest W., Kratzin H., Podtelejnikov A.V., Witke W., Huttner W.B. & Söling H.D. *Endophilin I mediates synaptic vesicle formation by transfer of arachidonate to lysophosphatidic acid.* Nature (401) 133-141, **1999**.

Schröder S. & Ungewickell E. *Subunit interaction and function of clathrin-coated vesicle adaptors from the Golgi and the plasma membrane.* J Biol Chem (266) 7910-7918, **1991**.

Schweitzer J.K., Burke E.E., Goodson H.V. & D'Souza-Schorey C. *Endocytosis resumes during late mitosis and is required for cytokinesis.* J Biol Chem (280) 41628-41635, **2005**.

Sever S., Damke H. & Schmid S.L. *Dynamin:GTP controls the formation of constricted coated pits, the rate limiting step in clathrin-mediated endocytosis.* J Cell Biol (150) 1137-1148, **2000**.

Sever S., Skoch J., Newmyer S., Ramachandran R., Ko D., McKee M., Bouley R., Ausiello D., Hyman B.T. & Bacskai B.J. *Physical and functional connection between auxilin and dynamin during endocytosis.* EMBO J (25) 4163-4174, **2006**.

Sharp D.J., Rogers G.C. & Scholey J.M. *Microtubule motors in mitosis.* Nature (407) 41-47, **2000**.

Shepard J.L., Amatruda J.F., Stern H.M., Subramanian A., Finkelstein D., Ziai J., Finley K.R., Pfaff K.L., Hersey C., Zhou Y., Barut B., Freedman M., Lee C., Spitsbergen J., Neuberg D., Weber G., Golub T.R., Glickman J.N., Kutok J.L., Aster J.C. & Zon L.I. *A zebrafish bmyb mutation causes genome instability and increased cancer susceptibility.* Proc Natl Acad Sci U S A (102) 13194-13199, **2005**.

Shiba T., Kametaka S., Kawasaki M., Shibata M., Waguri S., Uchiyama Y. & Wakatsuki S. *Insights into the phosphoregulation of beta-secretase sorting signal by the VHS domain of GGA1.* Traffic (5) 437-448, **2004**.

Shiba T., Kawasaki M., Takatsu H., Nogi T., Matsugaki N., Igarashi N., Suzuki M., Kato R., Nakayama K. & Wakatsuki S. *Molecular mechanism of membrane recruitment of GGA by ARF in lysosomal protein transport.* Nat Struct Biol (10) 386-393, **2003**.

Shih W., Gallusser A. & Kirchhausen T. *A clathrin-binding site in the hinge of the beta 2 chain of mammalian AP-2 complexes.* J Biol Chem (270) 31083-31090, **1995**.

Shimizu H., Nagamori I., Yabuta N. & Nojima H. *GAK, a regulator of clathrin-mediated membrane traffic, also controls centrosome integrity and chromosome congression.* J Cell Sci (122) 3145-3152, **2009**.

Shorter J. & Warren G. *Golgi architecture and inheritance.* Annu Rev Cell Dev Biol (18) 379-420, **2002**.

Shpetner H.S. & Vallee R.B. *Identification of dynamin, a novel mechanochemical enzyme that mediates interactions between microtubules.* Cell (59) 421-432, **1989**.

Shpetner H.S. & Vallee R.B. *Dynamin is a GTPase stimulated to high levels of activity by microtubules.* Nature (355) 733-735, **1992**.

Silljé H.H.W. & Nigg E.A. *Purification of mitotic spindles from cultured human cells.* Methods (38) 25-28, **2006**.

Slepnev V.I. & Camilli P.D. *Accessory factors in clathrin-dependent synaptic vesicle endocytosis.* Nat Rev Neurosci (1) 161-172, **2000**.

Slepnev V.I., Ochoa G.C., Butler M.H. & Camilli P.D. *Tandem arrangement of the clathrin and AP-2 binding domains in amphiphysin 1 and disruption of clathrin coat function by amphiphysin fragments comprising these sites.* J Biol Chem (275) 17583-17589, **2000**.

Smirnova E., Shurland D.L., Newman-Smith E.D., Pishvaee B. & van der Bliek A.M. *A model for dynamin self-assembly based on binding between three different protein domains.* J Biol Chem (274) 14942-14947, **1999**.

Smith C.J., Grigorieff N. & Pearse B.M. *Clathrin coats at 21 A resolution: a cellular assembly designed to recycle multiple membrane receptors.* EMBO J (17) 4943-4953, **1998**.

Sontag J.M., Fykse E.M., Ushkaryov Y., Liu J.P., Robinson P.J. & Südhof T.C. *Differential expression and regulation of multiple dynamins.* J Biol Chem (269) 4547-4554, **1994**.

Sousa R. & Lafer E.M. *Keep the traffic moving: mechanism of the Hsp70 motor.* Traffic (7) 1596-1603, **2006**.

Stamnes M.A. & Rothman J.E. *The binding of AP-1 clathrin adaptor particles to Golgi membranes requires ADP-ribosylation factor, a small GTP-binding protein.* Cell (73) 999-1005, **1993**.

Stark G.R. & Taylor W.R. *Control of the G2/M transition.* Mol Biotechnol (32) 227-248, **2006**.

Stenmark H. *Cycling lipids.* Curr Biol (10) R57-R59, **2000**.

Stewart S.A., Dykxhoorn D.M., Palliser D., Mizuno H., Yu E.Y., An D.S., Sabatini D.M., Chen I.S.Y., Hahn W.C., Sharp P.A., Weinberg R.A. & Novina C.D. *Lentivirus-delivered stable gene silencing by RNAi in primary cells.* RNA (9) 493-501, **2003**.

Straight A.F. & Field C.M. *Microtubules, membranes and cytokinesis.* Curr Biol (10) R760-R770, **2000**.

Sudakin V., Chan G.K. & Yen T.J. *Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2.* J Cell Biol (154) 925-936, **2001**.

Tahara H., Yokota E., Igarashi H., Orii H., Yao M., Sonobe S., Hashimoto T., Hussey P.J. & Shimmen T. *Clathrin is involved in organization of mitotic spindle and phragmoplast as well as in endocytosis in tobacco cell cultures.* Protoplasma (230) 1-11, **2007**.

Takatsu H., Katoh Y., Shiba Y. & Nakayama K. *Golgi-localizing, gamma-adaptin ear homology domain, ADP-ribosylation factor-binding (GGA) proteins interact with acidic dileucine sequences within the cytoplasmic domains of sorting receptors through their Vps27p/Hrs/STAM (VHS) domains.* J Biol Chem (276) 28541-28545, **2001**.

Takatsu H., Yoshino K. & Nakayama K. *Adaptor gamma ear homology domain conserved in gamma-adaptin and GGA proteins that interact with gamma-synergin.* Biochem Biophys Res Commun (271) 719-725, **2000**.

Tamura K., Kanaoka Y., Jinno S., Nagata A., Ogiso Y., Shimizu K., Hayakawa T., Nojima H. & Okayama H. *Cyclin G: a new mammalian cyclin with homology to fission yeast Cig1*. Oncogene (8) 2113-2118, **1993**.

Tanenbaum M.E., Vallenius T., Geers E.F., Greene L., Mäkelä T.P. & Medema R.H. *Cyclin G-associated kinase promotes microtubule outgrowth from chromosomes during spindle assembly.* Chromosoma (119) 415-424, **2010**.

Tang Z., Bharadwaj R., Li B. & Yu H. *Mad2-Independent inhibition of APCCdc20 by the mitotic checkpoint protein BubR1.* Dev Cell (1) 227-237, **2001**.

Tarapore P., Horn H.F., Tokuyama Y. & Fukasawa K. *Direct regulation of the centrosome duplication cycle by the p53-p21Waf1/Cip1 pathway.* Oncogene (20) 3173-3184, **2001**.

Thompson H.M., Cao H., Chen J., Euteneuer U. & McNiven M.A. *Dynamin 2 binds gamma-tubulin and participates in centrosome cohesion.* Nat Cell Biol (6) 335-342, **2004**.

Thompson H.M., Skop A.R., Euteneuer U., Meyer B.J. & McNiven M.A. *The large GTPase dynamin associates with the spindle midzone and is required for cytokinesis.* Curr Biol (12) 2111-2117, **2002**.

Traub L.M., Kornfeld S. & Ungewickell E. *Different domains of the AP-1 adaptor complex are required for Golgi membrane binding and clathrin recruitment.* J Biol Chem (270) 4933-4942, **1995**.

Traub L.M., Ostrom J.A. & Kornfeld S. *Biochemical dissection of AP-1 recruitment onto Golgi membranes.* J Cell Biol (123) 561-573, **1993**.

Umeda A., Meyerholz A. & Ungewickell E. *Identification of the universal cofactor (auxilin 2) in clathrin coat dissociation.* Eur J Cell Biol (79) 336-342, **2000**.

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

Ungewickell E., Ungewickell H., Holstein S.E., Lindner R., Prasad K., Barouch W., Martin B., Greene L.E. & Eisenberg E. *Role of auxilin in uncoating clathrin-coated vesicles.* Nature (378) 632-635, **1995**.

Unsworth K.E., Mazurkiewicz P., Senf F., Zettl M., McNiven M., Way M. & Holden D.W. *Dynamin is required for F-actin assembly and pedestal formation by enteropathogenic Escherichia coli (EPEC).* Cell Microbiol (9) 438-449, **2007**.

Vallee R.B. *Purification of brain microtubules and microtubule-associated protein 1 using taxol.* Methods Enzymol (134) 104-115, **1986a**.

Vallee R.B. *Reversible assembly purification of microtubules without assembly-promoting agents and further purification of tubulin, microtubule-associated proteins, and MAP fragments.* Methods Enzymol (134) 89-104, **1986b**.

Wadsworth P. & Salmon E.D. *Analysis of the treadmilling model during metaphase of mitosis using fluorescence redistribution after photobleaching.* J Cell Biol (102) 1032-1038, **1986**.

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 (102) 7209-7214, **2005**.

Wang Q., Hirohashi Y., Furuuchi K., Zhao H., Liu Q., Zhang H., Murali R., Berezov A., Du X., Li B. & Greene M.I. *The centrosome in normal and transformed cells.* DNA Cell Biol (23) 475-489, **2004**.

Wang Y.J., Wang J., Sun H.Q., Martinez M., Sun Y.X., Macia E., Kirchhausen T., Albanesi J.P., Roth M.G. & Yin H.L. *Phosphatidylinositol 4 phosphate regulates targeting of clathrin adaptor AP-1 complexes to the Golgi.* Cell (114) 299-310, **2003**.

Warnock D.E., Hinshaw J.E. & Schmid S.L. *Dynamin self-assembly stimulates its GTPase activity.* J Biol Chem (271) 22310-22314, **1996**.

Warren G. *Membrane partitioning during cell division.* Annu Rev Biochem (62) 323-348, **1993**.

Wei J.-H. & Seemann J. *Spindle-dependent partitioning of the Golgi ribbon.* Commun Integr Biol (2) 406-407, **2009**.

Wienke D.C., Knetsch M.L., Neuhaus E.M., Reedy M.C. & Manstein D.J. *Disruption of a dynamin homologue affects endocytosis, organelle morphology, and cytokinesis in Dictyostelium discoideum.* Mol Biol Cell (10) 225-243, **1999**.

Wiese C. & Zheng Y. *Microtubule nucleation: gamma-tubulin and beyond.* J Cell Sci (119) 4143-4153, **2006**.

Wilbanks S.M., Chen L., Tsuruta H., Hodgson K.O. & McKay D.B. *Solution small-angle X-ray scattering study of the molecular chaperone Hsc70 and its subfragments.* Biochemistry (34) 12095-12106, **1995**.

Wilbur J.D., Chen C.-Y., Manalo V., Hwang P.K., Fletterick R.J. & Brodsky F.M. *Actin binding by Hip1 (huntingtin-interacting protein 1) and Hip1R (Hip1-related protein) is regulated by clathrin light chain.* J Biol Chem (283) 32870-32879, **2008**.

Wilbur J.D., Hwang P.K. & Brodsky F.M. *New faces of the familiar clathrin lattice.* Traffic (6) 346-350, **2005**.

Wong D.H. & Brodsky F.M. *100-kD proteins of Golgi- and trans-Golgi network-associated coated vesicles have related but distinct membrane binding properties.* J Cell Biol (117) 1171-1179, **1992**.

Woolner S., O'Brien L.L., Wiese C. & Bement W.M. *Myosin-10 and actin filaments are essential for mitotic spindle function.* J Cell Biol (182) 77-88, **2008**.

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

Wu X., Zhao X., Puertollano R., Bonifacino J.S., Eisenberg E. & Greene L.E. *Adaptor and clathrin exchange at the plasma membrane and trans-Golgi network.* Mol Biol Cell (14) 516-528, **2003**.

Wulf P.D., Montani F. & Visintin R. *Protein phosphatases take the mitotic stage.* Curr Opin Cell Biol (21) 806-815, **2009**.

Wynn T.A. & Barron L. *Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis.* Semin Liver Dis (30) 245-257, **2010**.

Xing Y., Böcking T., Wolf M., Grigorieff N., Kirchhausen T. & Harrison S.C. *Structure of clathrin coat with bound Hsc70 and auxilin: mechanism of Hsc70-facilitated disassembly.* EMBO J (29) 655-665, **2010**.

Yamakami M., Yoshimori T. & Yokosawa H. *Tom1, a VHS domain-containing protein, interacts with tollip, ubiquitin, and clathrin.* J Biol Chem (278) 52865-52872, **2003**.

Yamauchi T., Ishidao T., Nomura T., Shinagawa T., Tanaka Y., Yonemura S. & Ishii S. *A B-Myb complex containing clathrin and filamin is required for mitotic spindle function.* EMBO J (27) 1852-1862, **2008**.

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.* EMBO J (17) 1297-1303, **1998**.

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

Yoshida Y., Kinuta M., Abe T., Liang S., Araki K., Cremona O., Paolo G.D., Moriyama Y., Yasuda T., Camilli P.D. & Takei K. *The stimulatory action of amphiphysin on dynamin function is dependent on lipid bilayer curvature.* EMBO J (23) 3483-3491, **2004**.

Zauberman A., Lupo A. & Oren M. *Identification of p53 target genes through immune selection of genomic DNA: the cyclin G gene contains two distinct p53 binding sites.* Oncogene (10) 2361-2366, **1995**.

Zhai P., He X., Liu J., Wakeham N., Zhu G., Li G., Tang J. & Zhang X.C. *The interaction of the human GGA1 GAT domain with rabaptin-5 is mediated by residues on its three-helix bundle.* Biochemistry (42) 13901-13908, **2003**.

Zhang C.X., Engqvist-Goldstein A.E.Y., Carreno S., Owen D.J., Smythe E. & Drubin D.G. *Multiple roles for cyclin G-associated kinase in clathrin-mediated sorting events.* Traffic (6) 1103-1113, **2005**.

Zhang D. & Nicklas R.B. *The impact of chromosomes and centrosomes on spindle assembly as observed in living cells.* J Cell Biol (129) 1287-1300, **1995**.

Zhang L., Gjoerup O. & Roberts T.M. *The serine/threonine kinase cyclin G-associated kinase regulates epidermal growth factor receptor signaling.* Proc Natl Acad Sci U S A (101) 10296-10301, **2004**.

Zhang P. & Hinshaw J.E. *Three-dimensional reconstruction of dynamin in the constricted state.* Nat Cell Biol (3) 922-926, **2001**.

Zhao Y. & Keen J.H. *Gyrating clathrin: highly dynamic clathrin structures involved in rapid receptor recycling.* Traffic (9) 2253-2264, **2008**.

Zhdankina O., Strand N.L., Redmond J.M. & Boman A.L. *Yeast GGA proteins interact with GTP-bound Arf and facilitate transport through the Golgi.* Yeast (18) 1-18, **2001**.

Zheng Y., Wong M.L., Alberts B. & Mitchison T. *Nucleation of microtubule assembly by a gamma-tubulin-containing ring complex.* Nature (378) 578-583, **1995**.

Zieve G.W., Turnbull D., Mullins J.M. & McIntosh J.R. *Production of large numbers of mitotic mammalian cells by use of the reversible microtubule inhibitor nocodazole. Nocodazole accumulated mitotic cells.* Exp Cell Res (126) 397-405, **1980**.

Zizioli D., Meyer C., Guhde G., Saftig P., von Figura K. & Schu P. *Early embryonic death of mice deficient in gamma-adaptin.* J Biol Chem (274) 5385-5390, **1999**.

Zuckerman V., Wolyniec K., Sionov R.V., Haupt S. & Haupt Y. *Tumour suppression by p53: the importance of apoptosis and cellular senescence.* J Pathol (219) 3-15, **2009**.

8. Anhang

8.1 Danksagung

Diese Dissertation wurde im Institut für Zellbiologie im Zentrum Anatomie der Medizinischen Hochschule Hannover unter Leitung von Herrn Professor Dr. Ernst Ungewickell angefertigt. Ich danke ihm sehr für die Bereitstellung dieses interessanten und aktuellen Projektes sowie für die hervorragende Betreuung und ständige Diskussionsbereitschaft der Ergebnisse. Darüber hinaus möchte ich ihm dafür danken, dass er mir stets ein Vorbild eines sehr guten Wissenschaftlers war.
Herrn Prof. Dr. R. Jacobs danke ich für die Übernahme des Koreferats und Herrn Prof. Dr. A. Ngezahayo für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.
Mein besonderer Dank gilt Frau Huberta Ungewickell für die Zusammenarbeit und technische Unterstützung im Labor sowie die vielen guten Worte.
Ein großer Dank gilt auch Philip Dannhauser, der mir stets bei Rückfragen, Diskussionen und anderem geduldig geholfen hat.
Frau Beate Großmann danke ich für die Leitung der Zellkultur, Heike Böning für die Präparation der Elektronenmikroskopiepräparate und die Herstellung der Ultradünnschnitte, Christiane Lemke für die Herstellung der SDS-Polyacrylamidgele. Angelika Hundt danke ich für die Digitalisierung der Negative und die Ergebnisdokumentation und Herrn Gerd Preiss für die Entwicklung der Elektronenmikroskopie Abzüge.
Mein Dank gilt Frau Dr. Stephanie Gross für die Hilfe der Auswahl der Einbettungsverfahren für die Elektronenmikroskopie, die Anleitung bei der Elektronenmikroskopie und die stetige Hilfsbereitschaft und ein offenes Ohr. Auch Herrn Dr. Robert Lindner und Herrn Dr. Rudolf Bauerfeind danke für die Bereitstellung von Antikörpern und siRNA und ihre Diskussionsbereitschaft. Frau Dr. Beate Sodeik danke ich für die freundliche Überlassung des Cy3-Tubulins.
Anna Bargsten, Anna Linnemann, Inga Wittrock, Matthias Fett, Julian Hauser, Tobias Geßler und Markus Hoffmann danke ich für die freundliche Atmosphäre in Labor und die Doktorandenseminare.
Katrin Eisenträger und Henrik Berke danke ich für das Korrekturlesen der Arbeit und Henrik für die Hilfe bei der Dokumentationssoftware sowie der Formatierung der Arbeit.
Meinen Eltern danke ich für ihre Liebe und ihren Glauben sowie die Unterstützung bei allen meinen Entscheidungen. Meiner Schwester Anna danke ich für das Korrekturlesen und die Ermutigungen.

8.2 Curriculum Vitae

AGNES GOLLA

PERSÖNLICHE DATEN

Geburtsdatum	29.05.1978
Geburtsort	Kattowitz, Polen
Staatsangehörigkeit	deutsch

AUSBILDUNG

10/1990-07/1999	Marianne Weber Gymnasium, Lemgo Abschluss: Abitur
10/1999-07/2005	Studium der Biologie an der Universität Bielefeld, Bielefeld Abschluss: Diplom Diplomarbeit am Institut für Biochemische Zellbiologie Thema der Diplomarbeit: „Untersuchung Aktin-assoziierter Proteine in der Glattmuskulatur und in Kulturzellen“
02/2006-09/2006	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Biochemie und Molekularbiologie, Wilhelms Universität Bonn, Bonn
12/2006-11/2010	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Zellbiologie im Zentrum Anatomie, Medizinische Hochschule Hannover, Hannover Thema der Doktorarbeit: „Untersuchungen zur Funktion von Clathrin, Clathrin-assoziierten Proteinen und Dynamin in der Mitose“