

**Subzelluläre Lokalisierung des hochkonservierten
Gerüstproteins hMon2 in Säugerzellen und
Identifizierung neuer Interaktionspartner**

Von der Fakultät Chemie der Universität Stuttgart
zur Erlangung der Würde eines Doktors der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigte Abhandlung

Vorgelegt von

Dipl.-Chem. Anna Maria Eisele (geborene Anna-Maria Bürger)
aus Konin (Polen)

Hauptberichter: Prof. Dr. Dieter H. Wolf
Mitberichter: PD Dr. Wolfgang Hilt

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Dezember 2012

Institut für Biochemie der Universität Stuttgart

2013

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	5
1. Zusammenfassung	8
2. Abstract	10
3. Einleitung	12
3.1 Die eukaryotische Zelle und ihre Kompartimentalisierung	12
3.2 Membrantransport zwischen den Kompartimenten	12
3.2.1 Intrazelluläre Transportwege	13
3.3 Vesikelbildung und die beteiligten Proteine	15
3.3.1 Clathrin	15
3.3.2 Adapterproteine	17
3.3.3 COPI und COPII Hüllproteine.....	19
3.3.4 Die Arf GTPasen	20
3.3.5 Arf-Aktivierung	21
3.3.6 Arf-GEFs	22
3.3.7 Arf-GEFs und die Wechselwirkung mit dem Toxin Brefeldin A.....	23
3.4 BIG/Sec7 und GBF/Gea/GNOM Proteinfamilien.....	23
3.4.1 Interaktionspartner von BIG/Sec7 und GBF/Gea/GNOM Arf-GEFs	24
3.5 Mon2/Ysl2 Unterfamilie	26
3.5.1 Interaktionspartner von Hefe Ysl2p/Mon2p.....	29
3.5.2 <i>mon-2</i> in <i>C. elegans</i>	31
3.5.3 Neue Befunde über das humane hMon2 und <i>Drosophila</i> Mon2 Protein	31
3.6 Bedeutung des Zytoskeletts und der Motorproteine für den intrazellulären Membrantransport	32
3.7 Ziel dieser Arbeit.....	35
4. Material und Methoden	36
4.1 Material	36
4.1.1 Chemikalien.....	36
4.1.2 Geräte.....	36
4.1.3 Nährmedien für Hefe und Bakterien.....	36
4.1.4 Antikörper.....	37
4.1.4.1 Primärantikörper	38
4.1.4.2 Sekundärantikörper	39
4.1.5 Verwendete Puffer und Lösungen	40
4.1.6 Verwendete Proteaseinhibitoren.....	40
4.1.7 Primer	40
4.1.8 Sequenzierprimer	41
4.1.9 siRNA Duplexe.....	41
4.1.10 Bakterienstämme	41
4.1.11 Hefestämme	42
4.1.12 Plasmide.....	42
4.1.13 Zelllinien.....	44
4.2 Methoden.....	44
4.2.1 Molekularbiologische Methoden.....	44
4.2.1.1 Bestimmung der DNA-Konzentration/Quantifizierung von Plasmid-DNA	44
4.2.1.2 Analytische und präparative Agarose-Gelelektrophorese	44
4.2.1.3 Erzeugung von DNA-Konstrukten	45
4.2.1.4 Polymerasekettenreaktion	47
4.2.1.5 Vermehrung und Restriktionsverdau von Plasmid-DNA	47

4.2.1.6	Restriktionsverdau von DNA-Fragmenten für anschließende Ligation	48
4.2.1.7	DNA-Sequenzierung.....	48
4.2.1.8	Transformation von DNA in <i>E. coli</i> durch Hitzeschock.....	49
4.2.1.9	Transformation von Hefe mit Plasmid-DNA durch Hitzeschock.....	49
4.2.2	Proteinanalytik.....	50
4.2.2.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	50
4.2.2.2	Western Blot	51
4.2.2.3	Anfärbung der Proteine mit Silber.....	52
4.2.2.4	Anfärbung der Proteine mit Coomassie Brilliant Blau R-250.....	53
4.2.2.5	Anfärbung der Proteine mit kolloidalem Coomassie Brilliant Blau G-250.....	53
4.2.2.6	Sensitive Anfärbung der Proteine mit Coomassie Brilliant Blau G-250	54
4.2.2.7	Massenspektrometrie	54
4.2.2.8	Quantitative Proteinbestimmung nach Bradford	55
4.2.3	Biochemische Methoden	55
4.2.3.1	Präparation von Proteinextrakten für Proteinexpressionskontrolle	55
4.2.3.2	Kultivierung von Hefe	56
4.2.3.3	Erzeugung von Zellaliquots mit 50 OD ₆₀₀ Einheiten.....	56
4.2.3.4	Koimmunpräzipitationsexperimente mit Hefezellen	57
4.2.3.5	Koimmunpräzipitation von hMon2 mit HA-GGA1 und HA-GGA3 aus HEK293T Zellen.....	58
4.2.3.6	Koimmunpräzipitation von endogenen Proteinen mit eGFP-hMon2 aus HEK293T Zellen.....	58
4.2.3.7	Koimmunpräzipitation von Proteinen mit endogenem hMon2 aus HEK293T Zellen für die Massenspektrometrie.....	59
4.2.3.8	Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure	61
4.2.3.9	Präparation von Aktin Aliquots	61
4.2.3.10	Kosedimentation von eGFP-hMon2 und dessen Fragmenten mit polymerisiertem Aktin	61
4.2.3.11	Transiente Transfektion.....	62
4.2.3.12	hMon2 Depletion mittels RNAi in HeLa Zellen.....	63
4.2.3.13	Fixierung von Zellen und indirekte Immunfluoreszenz.....	64
4.2.3.14	Zeitraffer-Videomikroskopie	65
4.2.3.15	Nocodazolbehandlung von eGFP-hMon2 transient exprimierenden HeLa Zellen.....	65
4.2.3.16	Internalisierungsversuche von Fluorophor-Tfn in HeLa Zellen	65
4.2.3.17	Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen aus <i>E.coli</i> BL21	66
4.2.3.18	Pulldown Experimente mit GST-KHC771-963 und GST-KLC2 Fusionsproteinen	67
5.	Ergebnisse	68
5.1	Suppression der hMon2 Expression mittels RNAi.....	68
5.2	Depletion von hMon2 in HeLa Zellen verursacht Veränderungen in der subzellulären Verteilung von Clathrinadapterproteinen.....	69
5.3	Depletion von hMon2 verursacht Tubulation von fluoreszenzmarkierten Tfn-positiven Organellen	73
5.4	HA-GGA1 und HA-GGA3 binden hMon2 im Immunpräzipitationsversuch.....	75
5.5	Transiente Expression und Immunfluoreszenzuntersuchungen von eGFP-hMon2 in HeLa Zellen.....	76
5.5.1	Kokolisierung von eGFP-hMon2 mit Clathrinadapterproteinen in HeLa Zellen.....	77
5.5.2	eGFP-hMon2 lokalisiert am <i>trans</i> -Golgi-Netzwerk.....	81

5.5.3	Perinukleare eGFP-hMon2 positive Strukturen bewegen sich Richtung Zellkortex.....	88
5.5.4	Lokalisierung von eGFP-hMon2 und seiner Fragmente	90
5.5.5	Dimerisierung von hMon2 erfolgt auch über die C-terminale F-Domäne	92
5.6	Protein-Proteininteraktionsstudien mit hMon2	94
5.6.1	Identifizierung von neuen Bindungspartnern von hMon2 durch Koimmunpräzipitation und Massenspektrometrie.....	94
5.6.2	Identifizierung von Kinesin-1 und Myosin II als hMon2 Bindepartner mittels Koimmunpräzipitationsversuchen	98
5.6.3	Weitere gefundene mögliche Interaktionspartner von hMon2	100
5.6.4	Kinesin-1 koimmunpräzipitiert mit eGFP-hMon2 aus HEK293T Zellysaten	101
5.6.5	Interaktionsstudien von hMon2 mit Kinesin-1 und KLC2	103
5.6.6	eGFP-hMon2 wird mit Kinesin-1 in HeLa Zellen kolokalisiert.....	104
5.6.7	Isolierung von Ysl2p oder HA-hMon2 mit Venus-Myo2p mittels Koimmunpräzipitation.....	105
5.7	Untersuchungen auf Interaktion von hMon2 mit dem Aktinzytoskelett.....	107
5.7.1	eGFP-hMon2 kosedimentiert mit polymerisiertem Aktin.....	107
5.7.2	eGFP-hMon2 wird mit Strukturen des Aktinzytoskelett kolokalisiert.....	109
6.	Diskussion	111
6.1	Wechselwirkung von hMon2 mit den Adapterproteinen	111
6.2	Lokalisierung von hMon2	112
6.3	hMon2 Depletion verändert Tfn-positive Kompartimente.....	113
6.4	eGFP-hMon2 wird mit mRFP-ARF1 kolokalisiert	114
6.5	Die C-terminale F-Domäne ist wichtig für die subzelluläre Verteilung und Dimerisierung von hMon2	115
6.6	Vermeintliche Rolle von hMon2 bei der Vesikelbiogenese und dessen Transport innerhalb der Zelle.....	116
6.6.1	Verwandtschaft von hMon2 mit den großen Sec7-Arf-GEFs	118
6.6.2	Vorgeschlagene subzelluläre Verteilung von hMon2.....	119
7.	Abbildungsverzeichnis	121
8.	Tabellenverzeichnis.....	122
9.	Referenzen.....	123
	Lebenslauf.....	135
	Danksagung.....	136
	Erklärung über die Eigenständigkeit der Dissertation.....	137

Abkürzungen

°C	Grad Celcius
ADP	Adenosindiphosphat
AF	Alexa Fluor/Alexa Fluorophor
AF-Tfn	Alexa Fluor488/546-konjugiertes Tfn
ALP	alkalische Phosphatase
Amp	Ampicillin
AP	heterotetramere Clathrinadapterproteinkomplexe (engl., <i>assembly polypeptide</i>)
ARF/Arf	ADP-Ribosylierungsfaktor
ATP	Adenosintriphosphat
B-CIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
bp	Basenpaare
BSA	engl., <i>bovine serum albumin</i>
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CHC	Clathrin Schwere Kette (engl., <i>clathrin heavy chain</i>)
CI-MPR/M6PR	kationunabhängiges Mannosephosphatrezeptor (engl., <i>cation independent MPR</i>)
CLC	Clathrin Leichte Kette (engl., <i>clathrin light chain</i>)
COPI	engl., <i>coat protein complex I</i>
COPII	engl., <i>coat protein complex II</i>
CPY	Carboxypeptidase Y
ctv	engl., <i>cytosole to vacuole</i>
Δ	Deletion
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	engl., <i>enhanced GFP</i>
eIF	eukaryoter Initiationsfaktor
ELISA	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest/nachweis (engl., <i>enzyme linked immunosorbent assay</i>)
ERGIC	engl., <i>ER to Golgi intermediate compartment</i>
GEF	Guanylnukleotid-Austauschfaktor (engl., <i>guanyl-nucleotide exchange factor</i>)
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GGA	engl., <i>Golgi-localized, γ-ear-containing, ADP ribosylation factor-binding proteins</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
GTPase	Guanosintriphosphatase
h	Stunde
HEK293T	menschliche embryonale Nierenzellen (engl., <i>Human Embryonic Kidney</i>)

HeLa	humane Gebärmutterhalskrebszellen (Zervixkarzinom)
IgG	Immunglobulin G
IP	Immunpräzipitation
IZI	Institut für Zellbiologie und Immunologie
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KHC	Kinesin Schwere Kette (engl., <i>kinesin heavy chain</i>)
KLC	Kinesin Leichte Kette (engl., <i>kinesin light chain</i>)
Ko-IP	Koimmunpräzipitation
l	Liter
LB	Laura-Bertani-Medium
LY	engl., <i>lucifer yellow</i>
m	Gewicht einer Masse
μ	Mikro
M	Mol
m/v	Masse je Volumen (g/ml)
MCS	engl., <i>multiple cloning site</i>
min	Minute
MIP	maximale Intensität Projektion (engl., <i>maximum intensity projection</i>)
ml	Mikroliter
ml	Mililiter
mM	Milimol
MON2	Gen kodiert für Mon2p/Ysl2p (Deletionsstamm ist sensitiv zu Monensin)
MPR	Mannosephosphatrezeptor
mRNP	engl., <i>messenger ribonucleoprotein</i>
MTOC	Mikrotubuli-organisierendes Zentrum (engl., <i>microtubule organizing center</i>)
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von $\lambda = 600$ nm
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	engl., <i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	<i>para</i> -Formaldehyd
PNS	engl., <i>postnuclear supernatant</i>
RFP	rot fluoreszierendes Protein (engl., <i>red fluorescent protein</i>)
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz, RNA-Silencing
RT	Zimmertemperatur
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Na-Dodecylsulfat (engl., <i>sodium-dodecyl sulfate</i>)
sec	Sekunde/(n)
siRNA	engl., <i>small interfering RNA</i>
TEN	tubuläres endosomales Netzwerk (engl., <i>tubular endosomal</i>)

	<i>network</i>)
TGN	<i>trans</i> -Golgi Netzwerk
TPR	engl., <i>tetratricopeptide repeats</i>
Transferrin	Tfn
Transferrin Rezeptor	TfnR
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Upm	Drehzahl, Umdrehungen pro Minute
UTR	engl., <i>untranslated region</i>
v	Volumen
v/v	Volumen je Volumen (ml/ml)
WT	Wildtyp
xg	g-Zahl, x-fache Beschleunigung g
Y2H	Hefe-Zwei-Hybrid (engl., <i>Yeast Two-Hybrid</i>)
YPD	Glucose Vollmedium (engl., <i>yeast peptone dextrose</i>)
YSL2	Gen codiert für Ysl2p (engl., <i>YPT51 synthetic lethal</i>)

1. Zusammenfassung

Intrazellulärer Proteintransport findet über Transportvesikel entlang der endozytotischen und sekretorischen Wege der Zelle statt. Regulation und Mechanismus dieser hochdynamischen Prozesse wird von zahlreichen spezifischen Proteinen an den verschiedenen Stufen des Vesikeltransports überwacht. Während meiner Doktorarbeit habe ich das humane hMon2 Protein, welches vermutlich eine besondere Funktion an der Vesikelbildung und -transport hat, untersucht.

Das hMon2 Protein (190 kDa) ist das humane Ortholog von Ysl2p (187 kDa) der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, welches bereits mehrfach untersucht wurde. Ysl2p assoziiert peripher mit endosomalen Membranen, wird für den endozytotischen Membrantransport und die Aufrechterhaltung der Struktur der Vakuole benötigt. Ysl2p ist ein Mitglied des endosomalen Membranremodulierungskomplexes Ysl2p-Neolp-Arl1p-Dop1p. Die Multidomänenproteine der Mon2/Ysl2 Familie sind in bestimmten Sequenzbereichen mit den großen Arf-GEF Untergruppen BIG/Sec7 und GBF/Gea/GNOM verwandt.

Ich habe mittels mikroskopischer Untersuchungen gefunden, dass siRNA vermittelte Depletion von hMon2 in HeLa Zellen Veränderungen in der subzellulären Verteilung der Adapterproteine AP-1, AP-3, GGA1, GGA3 und EpsinR verursacht. Während die Adapterproteine in Kontrollzellen hauptsächlich in der Zellmitte oder als feine Strukturen im Zytoplasma verteilt sind, wurden diese in hMon2 depletierten Zellen diffus umverteilt oder als vergrößerte Strukturen in der Zellperipherie vorgefunden. Dabei ist die Morphologie des *trans*- und *cis*-Golgi-Apparats nicht betroffen, da die subzelluläre Verteilung von dem *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) und endosomalen Markerprotein TGN46, dem *cis*-Golgi Protein GM130 und Arf1 nicht verändert wird. Weiter, weisen die Zellen morphologische Veränderungen des endosomalen rezyklierenden Kompartiments auf, was durch Aufnahmeexperimente mit Alexa Fluor-Transferrin (AF-Tfn) gezeigt wurde. Diese tubulären Kompartimente sind mit AP-1 und GGA3 positiven pleomorphen Strukturen dekoriert. hMon2 wurde mit dem Golgin p230 (TGN Markerprotein), mRFP-ARF1 und teilweise mit den endosomalen und *trans*-Golgi assoziierten Clathrinadapterproteinen GGA1, GGA3, AP-1 und EpsinR lokalisiert. Zudem konnte im Immunpräzipitationsversuch eine Bindung von hMon2 mit GGA1, sowie mit GGA3 gezeigt werden. Kolokalisierung wurde auch mit internalisiertem AF-Tfn und dem TfnR beobachtet. Dagegen wurde eGFP-hMon2 nicht mit den *cis*-Golgi Markerprotein GM130 und der Untereinheit des COPI Hüllproteins β -COP kolokalisiert.

Darüber hinaus, konnte ich durch Bindungsexperimente erste Hinweise auf eine mögliche Interaktion von hMon2 mit Aktin, dem aktinabhängigen nichtmuskulären Motorprotein Myosin II und dem mikrotubuliabhängigen ubiquitären Motorprotein Kinesin-1 (KIF5B) sammeln. Am Mikroskop war auch eine gute Überlappung von eGFP-hMon2 und Kinesin-1 an Organellen in der Zellmitte zu sehen. Die Ergebnisse wurden durch Zeitraffermikroskopieuntersuchungen, wo sich eGFP-hMon2 positive vesikelartige Strukturen von der Zellmitte in Richtung Zellperipherie möglicherweise entlang der Bahnen des Zytoskeletts bewegen, unterstützt.

Auch konnte ich zeigen, dass HA-hMon2 und möglicherweise auch Ysl2p mit dem prozessiven Hefe Motorprotein Venus-Myo2p interagieren könnten. Weitere Experimente mit verkürzten Versionen von hMon2 haben gezeigt, dass der C-Terminus essentiell für hMon2 Dimerisierung und Funktion ist.

Bisher deuten meine Ergebnisse darauf hin, dass das Multidomänenprotein hMon2 in dem Bereich der Zelle vorkommt, wo vesikulärer Membranverkehr am TGN und tubulär endosomalen Netzwerk (TEN) stattfindet, und dass es möglicherweise ein molekulares Verbindungsglied von Membrantransportprozessen und Zytoskelett darstellen könnte. Vermutlich ist es an der Regulation der Rekrutierung von Adapterproteinen während der Vesikelbiogenese, aber auch bei Abschnürung der Vesikel und deren Transport beteiligt. Ebenso unterstützen die Ergebnisse die Verwandtschaft von hMon2 mit den 200 kDa Arf-GEF Proteinen.

2. Abstract

Intracellular protein transport occurs via vesicular transport along the secretory and endocytic pathways. The regulation and mechanism of these highly dynamic processes is controlled by numerous specific proteins at various steps of this vesicular transport. During my doctoral work I examined the human hMon2 protein, which most probably has a specific function in the vesicle biogenesis and transport.

hMon2 protein (190 kDa) is the human orthologue of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* Ysl2p (187 kDa), which has been multiply studied. Ysl2p associates peripherally with Golgi and endosomal membranes, it is required for endocytic membrane transport and the maintenance of the vacuole structure. Ysl2p is a component of the endosomal Ysl2p-Neo1p-Arl1p-Dop1p membrane remodelling complex.

The multidomain proteins of the Mon2/Ysl2 family is closely related in specific sequence regions to the large Arf-GEF family subgroups BIG/Sec7 and GBF/Gea/GNOM.

By microscopy analysis I have found that siRNA mediated depletion of hMon2 in HeLa cells causes changes in the subcellular distribution of adaptor proteins AP-1, AP-3, GGA1, GGA3 and EpsinR. While in control cells the adapter proteins were distributed mainly in the cell center and in small foci in the cytoplasm, in hMon2 depleted cells they were found on enlarged structures or diffusely redistributed to the cell periphery. The morphology of the *trans*- and *cis*-Golgi apparatus was not affected, because the subcellular distribution of the *trans*-Golgi network (TGN) and endosomal marker protein TGN46, the *cis*-Golgi protein GM130 and Arf1 was not altered. Further, cells display morphological changes of the endosomal recycling compartment showed by Alexa Fluor-transferrin (AF-Tfn) uptake assays. This tubular compartment is decorated with AP-1 and GGA3 positive pleomorphic structures. hMon2 was localized with the golgin p230 (TGN marker protein), mRFP-ARF1 and partially with the endosomal and *trans*-Golgi associated clathrin adaptor proteins GGA1, GGA3, AP-1 and EpsinR. Additionally, binding of hMon2 with GGA1, as well as with GGA3 could be shown by immunoprecipitation experiments. Colocalization was also found with internalized AF-Tfn and TfnR. In contrast, eGFP-hMon2 was not colocalized with the *cis*-Golgi marker protein GM130 and COPI coat protein subunit β -COP.

Furthermore, by binding experiments I could show that hMon2 interacts with actin and the actin dependent non-muscle motor protein Myosin II and the microtubule dependent ubiquitous kinesin-1 motor protein, KIF5B. Under the microscope there was also great

overlap of eGFP-hMon2 and kinesin-1 on organelles in the cell center detectable. Time-lapse microscopy studies support these findings where eGFP-hMon2 positive vesicle-like structures move from the cell center to the cell periphery probably along cytoskeletal tracks.

I could also show that HA-hMon2 and potentially yeast Ysl2p interact with the yeast processive motor protein Venus-Myo2p. Further experiments with truncations of hMon2 revealed that the C-terminus is essential for hMon2 dimerization and function.

Until now, my findings point the multidomain protein hMon2 to be present in the region where vesicular membrane traffic at *trans*-Golgi network (TGN) and tubular endosomal network (TEN) takes place, and maybe to act as a molecular link between membrane transport processes and the cytoskeleton. It probably participates in the regulation of adapter protein recruitment during the vesicle biogenesis and also in the vesicle fission and transport. My results also support the relationship of hMon2 to the 200 kDa Arf-GEF Sec7 family. However, further investigations are required to ascertain the function of hMon2.

3. Einleitung

3.1 Die eukaryotische Zelle und ihre Kompartimentalisierung

Eukaryotische Zellen sind von einer Plasmamembran umhüllt. Diese bietet sowohl eine Barriere zur Umgebung, um die interne Zusammensetzung aufrecht erhalten zu können, als auch einen Anschluss zur Kommunikation. Die eukaryotischen Zellen haben außerdem mit intrazellulären Membranen ummantelte Reaktionsräume. Diese Kompartimente, auch Organellen genannt, besitzen eine charakteristische Zusammensetzung und Morphologie, und erfüllen einzigartige und spezialisierte Funktionen. Jede Organelle verfügt ein spezifisches Repertoire an Lipiden und Proteinen, die ihre Identität bestimmen und den Ablauf unterschiedlicher, individueller Stoffwechselfvorgänge ermöglichen. Zu den Organellen zählen unter anderem der Nukleus, das Endoplasmatische Retikulum (ER), der Golgi-Apparat, Endosomen, Lysosomen und Mitochondrien. Der Stoffaustausch zwischen den Organellen wird durch kleine membranumhüllte Bläschen (im Fachjargon Vesikel) aufrecht erhalten. Diese werden an der Donormembran gebildet und fusionieren mit der Membran einer Akzeptororganelle, dem Ziel. Verschiedene intrazelluläre Verkehrswege sind verantwortlich für den Austausch von Membranen und Frachtproteinen. Diese Prozesse sind streng organisiert, wobei der Materialfluss durch Regulation von spezifischen Proteinen genau kontrolliert wird (Nakayama, 2004; Alberts, 2008; Vassilieva und Nusrat, 2008).

3.2 Membrantransport zwischen den Kompartimenten

Diverse unterschiedliche zytosolische, integrale oder membranassoziierte Proteine kontrollieren intrazelluläre Transportprozesse des endozytotischen und sekretorischen Transportweges und definieren mitunter die Eigenschaften der Organellen. Abbildung 3.1 macht deutlich, welche Transportwege es innerhalb der eukaryotischen Zelle gibt (Bonifacino und Glick, 2004; Nakayama, 2004). Für die Kommunikation zwischen den Organellen und dem Frachttransport werden diverse Transportvesikel mit unterschiedlicher Zusammensetzung gebildet. An der Vesikelbildung sind spezifische Gerüst- und Hüllproteine mit ihren Hilfsproteinen beteiligt (siehe Kapitel 3.3) (Spang, 2008).

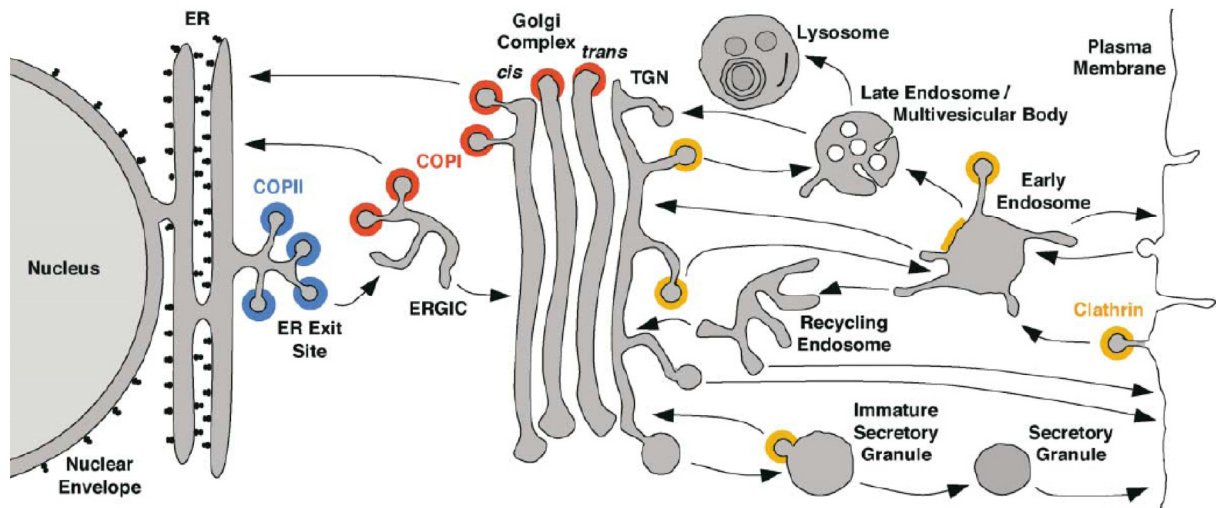


Abbildung 3.1 Überblick über intrazelluläre Kompartimentalisierung und Transportwege.

Die Abbildung zeigt Kompartimente und die vielen möglichen Schritte des endozytischen, sekretorischen und lysosomalen/vakuolären Transportwegs zwischen den Organellen und der PM (angezeigt durch Pfeile). Die subzelluläre Verteilung von Hüllproteinen COPII (blau), COPI (rot) und Clathrin (gelb) wird angezeigt. Die Clathrinhüllen werden an verschiedenen Membranen mit spezifischen Adapterproteinen und zusätzlichen Hilfsproteinen gebildet (siehe Kapitel 3.3). Gut untersucht ist die Bildung von COPII-Vesikeln am ER und clathrinumhüllten Vesikeln an der Plasmamembran, weniger von denen am TGN (*trans*-Golgi Netzwerk) und Endosomen, und von COPI-Vesikeln am ERGIC (engl., *ER to Golgi intermediate compartment*) und *cis*-Golgi. (Abbildung angepasst nach Bonifacino und Glick, 2004)

3.2.1 Intrazelluläre Transportwege

Als Endozytose bezeichnet man die Aufnahme von extrazellulären Molekülen von der Zelloberfläche in membranumschlossene Kompartimente, durch Einstülpen und Abschnüren der Plasmamembran unter Entstehung von membranumschlossenen Vesikeln. In Säugetierzellen existieren verschiedene endozytische Eingänge und Wege. Diese werden grob in clathrinabhängig (lat., *clathri*, Gitter) und clathrinunabhängig klassifiziert. Zu den clathrinunabhängigen Wegen gehören Abknospungen von glatten Vesikeln ohne Hülle, Endozytose über Lipidmikrodomänen, auch Lipidrafts genannt (engl., *lipid rafts*), über Caveolae und Caveosomen, Phagozytose und Makropinozytose (Doherty und McMahon, 2009).

Als gut untersucht und bekannt gilt die clathrinabhängige rezeptorvermittelte Endozytose an der Plasmamembran, bei der eine erhöhte Konzentration von Rezeptoren in den

clathrinumhüllten Grübchen eine effiziente Aufnahme von Liganden erlaubt. Aufgenommene Moleküle durchlaufen komplexe endosomale Kompartimente mit speziell strukturierten und funktionellen Lipid-Protein-Mikrodomänen (Gruenberg, 2001). Das endozytotische System besteht aus vielen Kompartimenten, welche verschiedene Rollen während der Sortierung, Verarbeitung und Degradation von internalisierter Fracht spielen. Frühe Endosomen bilden Sortierungs- und Rezyklierungskompartimente. Sie sind dynamisch und verändern ihre Architektur als Antwort auf Endozytosesignale. Die aufgenommenen Lipide, Liganden oder Proteine (Fracht) werden von diesen Stationen über verschiedene Transportwege zu ihren Zielen geschickt. Das geschieht über Transportvesikel oder Reifungsprozesse (Rink et al., 2005) der Endosomen, wobei die Frachtmoleküle zurück zur Plasmamembran rezyklieren, in rezyklierende Endosomen sortiert oder zu späten Endosomen und Lysosomen/Vakuole gebracht werden (Seaman, 2008). Perinukleare rezyklierende Endosomen sind von frühen Endosomen zu unterscheiden. Rezyklierende Endosomen befinden sich in der Nähe der Mikrotubuli-organisierenden Zentren (MTOC, engl., *microtubule organizing center*). Sie gelangen entlang der Mikrotubuli zur Zelloberfläche (siehe Kapitel 3.6) (Hopkins et al., 1994; Lin et al., 2002; Sheff et al., 2002). Bei dem Rezyklierungsweg bleiben die Liganden in den sortierenden Endosomen mit ihrem Rezeptor assoziiert und gelangen mittels rezyklierenden Endosomen zurück an die Plasmamembran (z.B. Transferrin (Tfn) Rezeptor TfnR (Mellman, 1996; Sheff et al., 2002)), oder zum *trans*-Golgi Netzwerk (TGN) und Golgi-Apparat (Yamashiro et al., 1984). Beim Degradationsweg durchläuft der Ligand-Rezeptor-Komplex endosomale Kompartimente deren pH sinkt, was zur Dissoziation des Liganden von seinem Rezeptor führt. Der LDL (engl., *low density lipoprotein*) Rezeptor (LDLR) wird über ein rezyklierendes Endosom an die Zelloberfläche zurückgebracht, während sein Ligand LDL über multivesikuläre Körperchen und späte Endosomen zu den Lysosomen gelangt und verdaut wird. Alternativ findet man, dass sowohl der Rezeptor (z.B. EGFR, engl., *epidermal growth factor receptor*) als auch sein Ligand EGF im Lysosom abgebaut werden (Braulke und Bonifacino, 2009). Bei der Transzytose wird die Fracht eines Transportvesikels (z.B. Fc-Rezeptoren und IgGs) von der Oberfläche zur gegenüberliegenden Seite einer polarisierten Zelle (z.B. barrierebildendes Epithel; Epithelzellen des Darmes, Hirn-Blut-Schranke) mittels der rezeptorvermittelten Endozytose und Exozytose übertragen. Somit kontrollieren die Endosomen viele wichtige physiologische Prozesse, einschließlich der Absorption von Nährstoffen, der Hormon-vermittelter Signaltransduktion, der Immunkontrolle und der Antigenpräsentation (Seaman, 2008).

Über den sekretorischen Weg werden neusynthetisierte Proteine an ihre Ziele gebracht (Gerdes, 2008). Die Proteine gelangen vom ER über das intermediäre Kompartiment ERGIC (engl., *ER to Golgi intermediate compartment*) zum Golgi, wo sie modifiziert und von dort aus weiter an ihren Bestimmungsort sortiert werden. Dabei werden die Proteine selektiv geordnet und in unterschiedliche Vesikel gepackt.

Damit die Fracht an das richtige Ziel gelangt, ist eine Beteiligung von spezifischen Proteinen, welche den Ablauf kontrollieren und regulieren, und dem Zytoskelett der Zelle (siehe Kapitel 3.6) notwendig.

3.3 Vesikelbildung und die beteiligten Proteine

Die unterschiedlichen Transportwege sind durch bestimmte Faktoren, wie zytoplasmatische Sortierungssignale von Frachtproteinen, die Art der Hüllproteine (Clathrin mit den spezifischen Adapterproteinen, COPI (engl., *coat protein complex*), COPII), den ADP-Ribosylierungsfaktoren (Arfs) und den Guanylnukleotid-Austauschfaktoren (engl., *guanyl nucleotide exchange factor*, GEF) gekennzeichnet.

Bei clathrinvermittelten Transportvorgängen spielen vielen zusätzliche Proteine eine bedeutende Rolle, die je nach Transportweg und der zu transportierenden Fracht spezifisch variieren. Diese Proteine werden an die Donormembran rekrutiert. Dort bestimmen und reichern sie die Fracht der Transportvesikel an. Gleichzeitig assemblieren sie zusammen mit Clathrin zu einem Gittergerüst an den ausstülpenden Knospen. Nach der Abschnürung eines Vesikels zerfällt das Gerüst und das Vesikel gelangt zu dem Akzeptorkompartiment mit dem es durch Membranverschmelzung fusioniert (Kirchhausen, 2000b).

3.3.1 Clathrin

Clathrinumhüllte Vesikel sind am besten bekannt durch Untersuchungen des Verkehrs von der Plasmamembran zu den Endosomen (Endozytose), wo Liganden wie Hormone und andere signalübertragende Moleküle, Tfn, Immunglobuline, Lipoproteine, Viren und Rezeptoren in die Zelle eintreten. Clathrinhüllen spielen auch beim Vesikelverkehr zwischen Endosomen

und dem *trans*-Golgi Netzwerk (TGN) eine wichtige Rolle (McMahon und Mills, 2004; Robinson, 2004; Traub, 2005).

Clathrin besitzt eine charakteristische sogenannte Triskelionform (aus dem griechischen, dreibeinig), die aus drei schweren (engl., *clathrin heavy chain*, CHC) und drei leichten Ketten (engl., *clathrin light chain*, CLC) besteht. Während der Einstülpung einer Membran und der Vesikelbildung setzen sich die Triskelioneinheiten hauptsächlich zu einem hexagonalen und pentagonalen Gitterkorb zusammen (Kirchhausen, 2009). Dieser ist unter dem Elektronenmikroskop als stachelige Clathrinhülle in Form von Grübchen und Belägen zu erkennen (siehe Abbildung 5.14). Die Bindungen zwischen den Triskelioneinheiten, der an der Membran bereits bestehenden Clathrinbeläge, ändern sich während der Membranverformung bei der Vesikelbildung in einem dynamischen Prozess in einer Weise, dass ummantelte Grübchen und Knospen entstehen. Diese veränderte Clathrinhülle fungiert dabei als stabilisierendes Gerüst.

In der Hefe zeigen genetische und bildgebende Experimente, dass eine Wechselwirkung zwischen Clathrin und Aktindynamik während der Endozytose besteht (Kaksonen et al., 2005; Newpher et al., 2005; Kaksonen et al., 2006). Die Verbindung von Clathrin und Aktin bei der Vesikelbiogenese scheint von der Zellart und der Clathringitterstruktur abhängig zu sein.

Untersuchungen von Clathrin an der Plasmamembran durch die Gruppe von Tom Kirchhausen (2009) haben gezeigt, dass Clathrin in humanen HeLa und Affenierenzellen COS7 an der adhärierenden Membran längerlebige (>3 min) Clathrinbeläge bildet und dass das Aktinzytoskelett essentiell für die Formung, Einwärtsbewegung und Ablösung der Beläge ist (Kirchhausen, 2009) (siehe Abbildung 3.2, B). Dabei werden bei der Einwärtsbewegung der großen weniger dynamischen und planaren Beläge kurze und verzweigte Aktinfilamente gebraucht, welche sich kurz bevor die Membran abgeschnürt wird bilden (Saffarian et al., 2009).

Interessant ist, dass das Aktinzytoskelett für die bisher anerkannte konventionelle Zusammensetzung und Knospung der wachsenden, sogenannten kanonischen Grübchen (siehe Abbildung 3.2, A) nicht generell benötigt wird (Engqvist-Goldstein und Drubin, 2003). Die Knospung dieser Vesikel konnte durch eine Behandlung der Zellen mit dem Aktindepolymerisationsreagenz Latrunkulin A nicht verhindert werden. Kanonische Grübchen wurden bisher an der freien und adhärierenden Plasmamembran beobachtet.

Somit werden zwei Modi (siehe Abbildung 3.2) der Bildung von Clathrinhüllen und Internalisierung an der Plasmamembran unterschieden (Saffarian et al., 2009). Mit diesem

Modell wurden viele ursprüngliche Interpretationen in Frage gestellt und gleichzeitig Konflikte beseitigt.

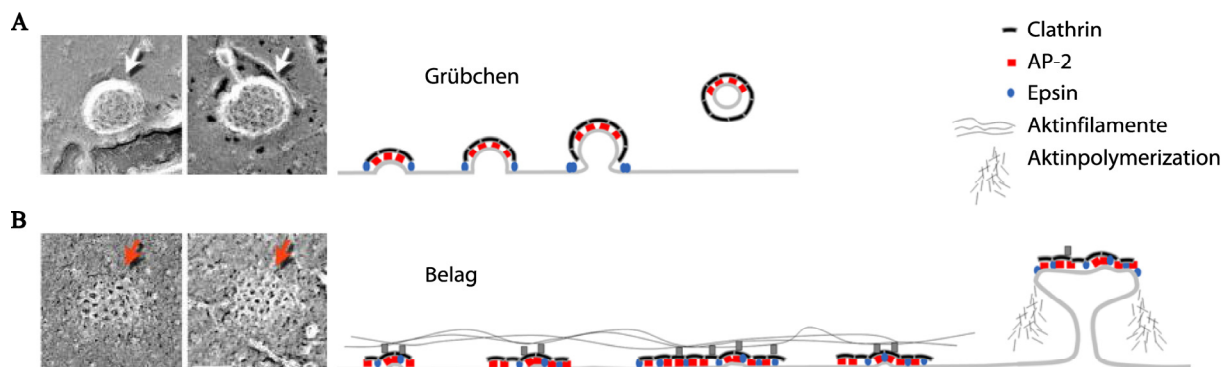


Abbildung 3.2 Bildung von clathrinumhüllten Strukturen an der Plasmamembran in humanen Zellen.

In der Abbildung links sind Bilder aus der Elektronenmikroskopie, die Clathringitter in Form von Grübchen (A, weiße Pfeile) und Belägen (B, rote Pfeile) zeigen. (A) zeigt die sogenannte kanonische clathrinummantelte Grübchen (engl., *clathrin-coated pits*) an der freien und adhärenen Plasmamembran. (B) zeigt langlebige planare clathrinummantelte Beläge (engl., *clathrin-coated plaques*) an der adhärenen Membran mit kurzen und verzweigten Aktinfilamenten, welche kurz bevor die Membran sich abschnürt gebildet werden. (Abbildung angepasst nach Tom Kirchhausen, 2009 und Saffarian et al., 2009)

3.3.2 Adapterproteine

Für einen selektiven Transport von endozytotischer und sekretorischer Fracht von einem membranumschlossenen Kompartiment/Plasmamembran zum anderen spielen die Hüllproteinkomplexe (Adapterprotein/Clathrin, COPs) eine wichtige Rolle bei der Vesikelbiogenese; der Auswahl und Anhäufung der Frachtproteine an spezialisierten Membranmikrodomänen und der Deformation dieser Membranflecken in kleine umhüllte Vesikel. Die Hüllproteine rekrutieren auch zusätzliche Faktoren, die für die Interaktion mit dem Zytoskelett und Vesikelfusion an der Akzeptormembran benötigt werden (Nakagawa et al., 2000; Bonifacino und Lippincott-Schwartz, 2003; Delevoeye et al., 2009).

Die Auslese der Fracht erfolgt über die Interaktion von zytosolischen Domänen der Transmembranproteine (Rezeptoren) und Komponenten der Hülle, den Adapterproteinen (Bonifacino und Traub, 2003) (siehe unten). Eukaryotische Zellen weisen eine Vielzahl von Adapterproteinen auf. Die bestuntersuchten Adapterproteine sind die heterotetrameren AP-1, AP-2, AP-3 und AP-4 Komplexe (wobei AP ursprünglich für *assembly polypeptide* steht

(Zaremba und Keen, 1983)), die monomeren GGA Proteine (engl., *Golgi-localized, γ -ear-containing, ADP ribosylation factor-binding proteins*) und Epsin Proteine. Diese stelle ich in diesem Kapitel kurz vor.

Die heterotetrameren Adapterproteine bestehen aus verwandten Untereinheiten, die auch Adaptine genannt werden. Sie bestehen aus den β , μ , σ und den spezifischen γ (AP-1), α (AP-2), δ (AP-3) und ε (AP-4) Adaptinen (Robinson und Bonifacino, 2001). Alle Untereinheiten, γ , α , δ und ε , besitzen am C-Terminus eine konservierte Gelenkdomäne (engl., *hinge domain*) und eine sogenannte Ohr- oder Anhang-Domäne (engl., *ear/appendage domain*). Sie sind für die Bindung von Hilfsproteinen (engl., *accessory protein/factors*, welche anderen Proteinen bei der Funktion und subzellulären Verteilung helfen), wie beispielsweise ARF1, zuständig (siehe Kapitel 3.3.4) (Hanners und Tooze, 2003). Die Gelenkdomäne der β Untereinheit interagiert mit dem Strukturprotein Clathrin (Gallusser und Kirchhausen, 1993). Während der Endosomalen und lysosomalen Sortierung interagieren die μ Adaptine der Adapterproteine mit Tyrosin-basierten Sortierungssignalen, mit dem Konsensusmotiv YXX \emptyset oder NPXY der zytosolischen Domänen von Frachtproteinen. Dabei ist Y Tyrosin, X ist eine beliebige Aminosäure und \emptyset ist eine Aminosäure mit einer großen hydrophoben Seitenkette, N ist Asparagin und P ist Prolin). Die μ Adaptine oder/und β Adaptine interagieren mit Dileucin-basierten Motiven [DE]XXXL[LI] mit Asparaginsäure D, Glutaminsäure E, beliebiger Aminosäure X, Leucin L und Isoleucin I (Bonifacino und Traub, 2003). Für die endozytotische Internalisierung sind andere Motive (DP(F/W) und FXDXF, mit Phenylalanin F, Tryptophan W), mit welchen die α Untereinheit von AP-2 interagiert, verantwortlich (Bonifacino und Traub, 2003).

Sehr gut untersucht ist, dass AP-1 lösliche lysosomale Hydrolasen, im Komplex mit dem Mannosephosphatrezeptor (MPR), sortiert (Lobel et al., 1989; Kornfeld, 1992; Meyer et al., 2001). Diese Hydrolasen sind für den Transport in clathrinumhüllten Vesikeln vom TGN zu den Endosomen bestimmt. Dort, im sauren pH, dissoziieren die Hydrolasen (Ligand) von ihren MPRs, wobei die Rezeptoren zurück zum TGN kehren. Das AP-2 wirkt an der Plasmamembran bei der Auswahl von Proteinen in clathrinumhüllte Vesikel bei der rezeptorvermittelten Endozytose. AP-3 ist an der Auslese von lysosomalen Proteinen in vesikulierende Membranen, die vom späten Golgi direkt zu Lysosomen transportiert werden, mit oder ohne Clathrin beteiligt (Stepp et al., 1997; Odorizzi et al., 1998). AP-4 wurde am TGN, den späten Endosomen und Lysosomen an nicht clathrinbedeckten Vesikeln lokalisiert (Dell'Angelica et al., 1999).

Die monomeren GGA Proteine bestehen aus der VHS- (VPS-27, Hrs und STAM) Domäne, GAT- (GGA und TOM1) Domäne, einer Verlängerungsdomäne (engl., *hinge domain*) und der C-terminalen GAE- (engl., *gamma-adaptin ear*) Ohrdomäne. Die C-terminale Domäne ist mit der Ohrdomäne der γ Untereinheit des AP-1 Komplexes verwandt. Die GGA Proteine binden über die *hinge*-Domäne an Clathrin. Über die VHS Domäne interagieren sie mit der ACLL (engl., *acidic-cluster-dileucine*) DXXLL Konsensussequenz der Frachtproteine (Bonifacino und Traub, 2003).

Die Clathrinadapterproteine GGA sind zusammen mit dem Strukturprotein Clathrin an der vesikulierenden Membranen zu finden. Dort lesen sie die für den TGN zu Endosomen Transport bestimmte Fracht aus (Storch et al., 2004). GGAs wurden zusammen mit AP-1 am clathrinumhüllten Vesikeln am TGN und endosomalen Membranen gefunden, aber ob sie zusammen, entgegengerichtet oder parallel in einem Transportweg fungieren wird noch untersucht (Meyer et al., 2001; Doray et al., 2002; Lui et al., 2003).

Weitere bei der Vesikelbiogenese und Erkennung der Fracht wirkende Clathrinadapter sind einige Proteine der ENTH/ANTH- (engl., *epsin N-terminal homology/AP180 N-terminal homology*) Domänenproteinfamilie. Das humane Epsin1 Protein agiert an der Bildung clathrinbedeckter Vesikel an der Plasmamembran während der Endozytose (Wendland et al., 1999). Das Epsin-ähnliche Protein EpsinR (engl., *epsin related*) (Mills et al., 2003), auch CLINT (engl., *clathrin interactor*) (Kalthoff et al., 2002) oder Enthoprotin genannt (Wasiak et al., 2002), ist am intrazellulären Vesikeltransport zwischen dem TGN und Endosomen (Duncan et al., 2003) beteiligt. Sie binden an Inositolphospholipide der Membran über die ENTH-Domäne, Clathrin, GGA, AP-1 und AP-2 Proteine und sind wichtig für die Deformation der Membran (Wendland, 2002; Legendre-Guillemin et al., 2004; Horvath et al., 2007). Sie nehmen bei der Erkennung und Rekrutierung von ubiquitylierten Transmembranproteinen in clathrinumhüllte Vesikel über ihre UIM-Domänen (engl., *ubiquitin-interacting motif*, Ubiquitin-Interaktionsmotiv) teil (Legendre-Guillemin et al., 2004).

3.3.3 COPI und COPII Hüllproteine

Zusammen mit den Adapterproteinen stellt Clathrin einen wichtigen Regulator für den Vesikeltransport sowohl zwischen Plasmamembran, Endosomen und TGN, als auch im endozytotischen und sekretorischen Transport. Darüber hinaus gibt es Hüllproteinkomplexe

COPI und COPII, die unabhängig von Clathrin arbeiten und Homologien zu den Clathrinadapterproteinen haben. COPII vermittelt den anterograden Transportweg vom ER zum Golgi (Export), wobei COPI beim Transport innerhalb der Golgi Zisternen und im retrograden Transportweg vom Golgi zum ER teilnimmt (Kirchhausen, 2000b). COPI wird auch durch Arf1 (siehe Kapitel 3.3.4) an die Membran rekrutiert, dabei wird Arf1 mit der konservierten γ -COP Ohrdomäne (siehe unten) gebunden. COPII wird von Sar1 GTPase an die ER Membran rekrutiert (Aridor und Traub, 2002).

COPI besteht aus zwei Subkomplexen, F und B, mit jeweils vier und drei Untereinheiten (McMahon und Mills, 2004). Eine COPI Untereinheit des F Subkomplexes besitzt eine γ -COP Ohrdomäne, die Homolog zu γ -Ohr von AP-1 ist (McMahon und Mills, 2004). Eine Untereinheit des B Subkomplexes enthält WD40 Wiederholungen, die ähnlich der terminalen Domäne von Clathrin sind (Takatsu et al., 2001). COPII Hüllkomplexe bestehen aus vier Untereinheiten, zwei davon haben WD40 Wiederholungen und zwei stellen die Funktion der Frachtrekrutierung der AP Komplexe dar. Die Sar1 GTPase ist ähnlich zu Arf1, hat jedoch keine Myristoylmodifizierung und wird vom spezifischen Guanylnukleotid-Austauschfaktor (vergleiche Kapitel 3.3.4 und 3.3.6) aktiviert und an die ER Membran rekrutiert (Yoshihisa et al., 1993).

3.3.4 Die Arf GTPasen

Eukaryotische Zellen besitzen drei Arten von umhüllten Vesikeln, die für den intrazellulären Membranverkehr von wesentlicher Bedeutung sind. Das sind die clathrinummantelte Vesikel (siehe Kapitel 3.3.1) die an der Endozytose von der Zellmembran und an der Exozytose vom Golgi-Apparat, und die COPI- und COPII-umhüllten Vesikel (siehe Kapitel 3.3.3), die bei dem Transport zwischen ER und Golgi beteiligt sind (Kreis und Pepperkok, 1994; Schekman und Orci, 1996). Die Bildung der Clathrin- und COPI-Hüllen und somit die Entstehung von Transportvesikeln wird durch kleine GTP-bindende Arf Proteine, die zu der regulierenden GTPasen Ras Superfamilie gehören, reguliert. Die Arf Familie ist in drei Untergruppen eingeteilt, die Arf, Arf-like (Arl) und SAR GTPasen (Kahn et al., 2006).

Es gibt sechs verschiedene ARF Proteinisoformen (ARF1-ARF6) in Säugern (Kahn et al., 2006). Fünf davon (ARF1-ARF5) fungieren am Golgi und Endosomen (Volpicelli-Daley et al., 2005). Die Rolle von Arf1 bei der Rekrutierung und Erhaltung von Hüllproteinkomplexen an der Membran ist am besten charakterisiert. Arf1-GTP rekrutiert AP-1, AP-3 und AP-4 und

GGA an die Membran des TGNs (Rothman, 1996; Rothman und Wieland, 1996; Ooi et al., 1998) und COPI an die Membran des *cis*-Golgi (Bonifacino und Lippincott-Schwartz, 2003; Bethune et al., 2006). Arf6 wurde vor allem an der Plasmamembran lokalisiert. Dort ist Arf6 vor allem bei der Endozytose beteiligt. Um Plasmamembranproteine zu rezyklieren pendelt Arf6 zwischen Plasmamembran und Endosomen (D'Souza-Schorey et al., 1998; Yang et al., 1998). In Säugerzellen gibt es 22 ARL Proteine (Kahn, 2009), deren Vertreter auch am Golgi lokalisiert wurden. Die primäre Sequenzidentität zwischen Arfs und Arls beträgt 40-60%. Man geht davon aus, dass diese Proteine einerseits in der Funktion überlappen und andererseits spezifisch mit ihren Regulationsproteinen und Effektorproteinen wechselwirken. Jedoch gibt es darüber noch nicht genug Erkenntnisse. Bisher konnte keine Überlappung von Arf und Arl Proteinen in der Funktion beobachtet werden.

Ein verbreitetes Modell für die Biogenese der umhüllten Vesikel am Golgi ist, dass an die Membran lose assoziiertes Arf (als Arf-GDP) durch Aktivierung von einem (membranassoziiertes) Arf-GEF an die Doppellipidschicht fest bindet (siehe Kapitel 3.3.5). Aktiviertes Arf (Arf-GTP) hat eine erhöhte Affinität zu Effektorproteinen, wie Membranmodulationsproteine (lipidmodifizierende Enzyme) und Hüllkomponenten (Adapterproteine APs, GGAs und COPI), und rekrutiert diese an die Membran. Die Adapterproteine bringen schließlich Hüllproteine (Clathrin) an die vesikulierende Membran (Anders und Jürgens, 2008; Kahn, 2009).

3.3.5 Arf-Aktivierung

Zur Ausübung ihrer Funktion als regulierende GTPasen im Membranverkehr interagieren Arfs mit verschiedenen Proteinen (siehe Kapitel 3.3.4) (Kahn, 2009). Zur Aktivierung benötigen sie einen spezifischen Guanylnukleotid-Austauschfaktor und die Membran. Die GDP gebundene Form von Arf wechselt zwischen cytosolischer und lose membranassoziiertes Form. Membranassoziiertes Arfs durchlaufen einen GTP-abhängigen Zyklus, in dem sie von inaktiver (Arf-GDP) Form in die aktive (Arf-GTP) und fest membrangebundene Form wechseln. Der dabei vom GEF katalysierte Austausch von GDP zu GTP bewirkt eine Konformationsänderung von Arf, wodurch die Freisetzung des N-terminalen hydrophoben Myristoylrests und die amphipatische α -Helix zur Verankerung an der Membran führt (Kahn et al., 1991). Aktives Arf-GTP interagiert mit seinen Effektorproteinen (Hüllproteine, Lipid-modifizierende Enzyme und andere Proteine).

Andererseits wird die Hydrolyse von GTP- zur GDP-Form von GTPase aktivierenden Proteinen (GAPs) katalysiert. Die Form ist nicht aktiv und der N-terminale Fettsäurenanker ist sozusagen eingezogen und von Arf selbst maskiert.

Vermutlich wird immer ein GEF für die Aktivierung von Arfs benötigt (siehe Kapitel 3.3.4, unten), da in Versuchen, bei welchen ein GEF Protein depletiert wurde, die Rekrutierung von Arf-abhängigen Adapterproteinen verloren ging (Lefrancois und McCormick, 2007; Manolea et al., 2008).

3.3.6 Arf-GEFs

Arf-GEFs bilden eine Familie der Guanylnukleotid-Austauschfaktoren, die den Austausch von GDP zu GTP an Arf Proteinen katalysieren (siehe Kapitel 3.3.5). Die Arf-GEFs sind in allen Eukaryoten hochkonserviert. Sie teilen eine konservierte Sec7-Domäne und werden deshalb auch Sec7-GEFs genannt. Die Sec7-Domäne wurde nach dem zuerst identifizierten *SEC7* Gen in der Hefe *S. cerevisiae*, das im Proteintransport beteiligt war, benannt (Achstetter et al., 1988; Franzusoff und Schekman, 1989).

Es wurden acht Unterfamilien der Sec7-GEFs in Eukaryoten gefunden und eine in Bakterien, welche durch Gentransfer von eukaryotischen Wirtszellen weiter gegeben wurde (Cox et al., 2004). Abhängig von anderen vorhandenen Domänen und der Homologie, werden sie in große (~170-200 kDa, GBF/Gea/GNOM und BIG/Sec7), mittelgroße (~100-150 kDa, BRAG, EFA6, SYT1 und SYT2) und kleine (~40-80 kDa, ARNO/cytohesin, F-Box und BACT) Arf-GEFs eingeteilt (Cox et al., 2004; Anders und Jürgens, 2008). Die mittelgroßen GEFs wirken vor allem in Transportwegen zwischen den Endosomen und der Plasmamembran (Shin und Nakayama, 2004; Casanova, 2007; Gillingham und Munro, 2007). Die großen Familien GBF/Gea, BIG/Sec7 und kleine ARNO/cytohesin Proteine interagieren mit Klasse I Arfs (Arf1-Arf3). Wobei die ARNO/cytohesin Familie zuerst durch aktives Arf6-GTP (Klasse III) an die Plasmamembran rekrutiert wird, wo sie infolge einer regulatorischen Kaskade Arf1 aktiviert (Cohen et al., 2007). Für das Verständnis der Ergebnisse dieser Arbeit werden im Kapitel 3.4 und 3.4.1 die großen Arf1-GEF Familien GBF/Gea/GNOM und BIG/Sec7 näher beschrieben.

3.3.7 Arf-GEFs und die Wechselwirkung mit dem Toxin Brefeldin A

Der Pilzmetabolit Brefeldin A (BFA) ist ein bekannter Inhibitor des Membrantransports am Golgi (Donaldson et al., 1992; Mouratou et al., 2005), der die Arf-Aktivierung durch GEFs blockiert (Peyroche et al., 1999; Renault et al., 2003). BFA blockiert die Funktion vieler Sec7-Domänen Proteine, unter anderem BIG1 (Togawa et al., 1999), BIG2, Sec7p, GBF1 (Claude et al., 1999), Gea1p und Gea2p (Peyroche et al., 1999). Dabei bindet BFA den Komplex aus Arf-GDP und der Sec7-Domäne eines GEFs, blockiert die Konformationsveränderung und verhindert somit die GDP-Freisetzung (Cherfils und Melancon, 2005; Zeghouf et al., 2005). Dadurch kann kein GTP gebunden werden und das Arf Protein bleibt inaktiv (vergleiche Kapitel 3.3.5).

3.4 BIG/Sec7 und GBF/Gea/GNOM Proteinfamilien

Außer der katalytischen Sec7-Domäne (siehe oben, Kapitel 3.3.6) besitzen die großen Multidomänen-Arf1-GEF Proteine der BIG/Sec7 und GBF/Gea/GNOM Unterfamilien fünf nichtkatalytische Domänen (Cox et al., 2004; Mouratou et al., 2005). Diese sind DCB (engl., *dimerization/cyclophilin binding region*) und HUS (engl., *homology upstream of Sec7*) vor der Sec7-Domäne, gefolgt von HDS1 (engl., *homology downstream of Sec7*), HDS2 und HDS3. Neuerdings wurde innerhalb der BIG/Sec7 Untergruppe eine Homologie am C-Terminus gefunden, die sogenannte HDS4-Domäne (Bui et al., 2009) (siehe Abbildung 3.3). Die höchste Überlappung in der Funktion hat die Sec7-Domäne, folgend von den N-terminalen DCB- und HUS-Domänen. Die HUS-Domäne beinhaltet die sogenannte HUS-BOX mit dem stark konservierten YD Motiv (Mouratou et al., 2005), die eine wichtige Rolle während des Membranverkehrs und der Funktion der GBF/Gea Proteine der Hefe und des Menschen spielt (Park et al., 2005; Ramaen et al., 2007; Deng et al., 2009). Für die GDP-zu-GTP-Austauschaktivität der Sec7-Domäne ist die Glutaminsäure der sogenannten Glutaminsäurefingersequenz FRLPGE, die vor allem in Hefen, Pflanzen und Menschen konserviert ist (Goldberg, 1998; Beraud-Dufour et al., 1999), verantwortlich. In anderen eukaryotischen Spezies, z.B. dem *Dictyostelium discoideum* (Schleimpilz) der Mycetozoa, *Tetrahymena thermophila* und *Cryptosporidium parvum* der Alveolata und *Trichomonas vaginalis* der Protist Gruppe (Protozoen), sind nur die Aminosäuren F und GE vorzufinden (Bui et al., 2009). Die nach der Sec7-Domäne folgenden HDS1 und HDS2 sind im

geringerem Ausmaß konserviert, wobei die zweite Hälfte von HDS2 mehr Übereinstimmung in den Aminosäuresequenzen zeigt (vor allem in der BIG/Sec7 Familie). Eine Konservierung der HDS3-Domäne der zwei großen Sec7-GEF Unterfamilien konnte nur in Hefen, Pflanzen und Säugern, während die der HDS4-Domäne nur in der BIG/Sec7 Untergruppe in Hefen, Pflanzen, Algen und Säugern gefunden werden (Bui et al., 2009).

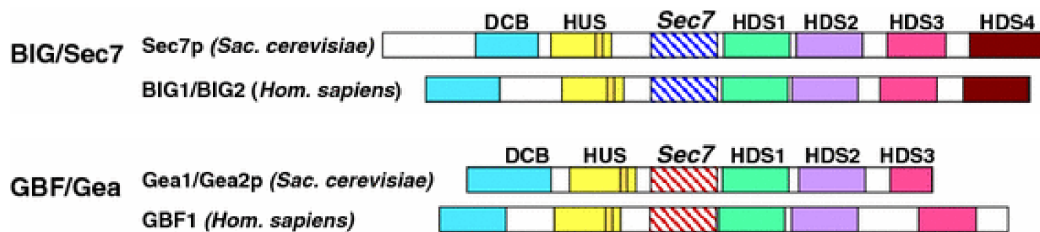


Abbildung 3.3 Domänenstruktur von BIG/Sec7 und GBF/Gea Arf-GEFs.

Die Abbildung zeigt konservierte Domänen innerhalb der BIG/Sec7 und der GBF/Gea Familien. Beide Sec7-GEF Gruppen teilen fünf nicht-katalytische homologe Domänen, DCB, HUS mit der HUS-BOX, HDS1, HDS2 und HDS4, und eine katalytische Sec7-Domäne. Die BIG/Sec7-GEFs besitzen eine zusätzliche konservierte Domäne HDS4 am C-Terminus. (Abbildung wurde verändert nach Bui et al., 2009)

3.4.1 Interaktionspartner von BIG/Sec7 und GBF/Gea/GNOM Arf-GEFs

Die Proteine der Unterfamilien BIG/Sec7 und GBF/Gea/GNOM ließen aufgrund ihrer Sequenzhomologien und konservierten Domänen auf wichtige und verwandte Funktionen schließen. Mittels unterschiedlicher Herangehensweisen (Hefe-2-Hybrid, GST-Pulldown, Koimmunisolierung, siRNA vermittelte Depletionsversuche, Kollokalisierungsstudien) wurden viele Interaktionspartner dieser Proteine gefunden (zusammengefasst in (Cox et al., 2004; Shin und Nakayama, 2004; Mouratou et al., 2005; Casanova, 2007; Anders und Jürgens, 2008; Bui et al., 2009)).

GBF1 interagiert direkt mit dem kleinen G Protein Rab1 (Monetta et al., 2007), dem Rab1 Effektor p115 (Garcia-Mata und Sztul, 2003) und der COPI Untereinheit γ -COP (Deng et al., 2009). Diese Proteine spielen eine essentielle Rolle beim Transport zwischen ER und *cis*-Golgi. Rab Proteine sind hauptsächlich bei der Membranfusion beteiligt, wo sie Tetheringkomplexe regulieren und SNARE (engl., *soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor*) Proteine paaren (Behnia und Munro, 2005). p115 ist wichtig für die Membranfusion. Es bindet an Membranen während des ER-zu-Golgi Transports, interagiert

mit SNARE Proteinen und unterstützt deren Paarung (Short et al., 2005). Diese Interaktionen lassen vermuten, dass GBF1 eine Rolle bei der Vesikelknospung und bei Fusionsprozessen spielt. Die direkte Interaktion von γ -COP und GBF/Gea ist konserviert in der Hefe (Sec21p und Gea1/2p) und im Menschen (Deng et al., 2009). Das Protein BIG1 interagiert direkt mit Exo70 (Xu et al., 2005) und mit den Motorproteinen Myosin IXb (Saeki et al., 2005) und Kinesin KIF21A (Shen et al., 2008). Es könnte für den Transport von sekretorischen Vesikeln zu Plasmamembran verantwortlich sein. Auch interagiert BIG1 über die DCB-Domäne mit sich selbst (Ramaen et al., 2007). Dieser Befund unterstützt die zuvor gefundene Dimerisierung der DCB-Domäne des *Arabidopsis thaliana* Proteins GNOM (Grebe et al., 2000). Zudem konnte gezeigt werden, dass die DCB-Domänen die HUS-Domänen der BIG1 und GBF1 Proteine binden können (Ramaen et al., 2007). Des Weiteren wurde gezeigt, dass BIG2 beim TfnR Transport involviert ist (Shin et al., 2004; Shen et al., 2006). Die Depletion von BIG2 führt auch zur Tubulierung von Tfn oder TfnR positiven und mit Rab11 markierten Organellen, vermutlich den rezyklierenden Endosomen. Die Überexpression einer Mutante von BIG2 (E738K), welche die Funktion als GEF nicht besitzt, tubuliert auch das TGN, jedoch nicht das *cis*-Golgi (Shinotsuka et al., 2002a; Shinotsuka et al., 2002b; Shin et al., 2004; Ishizaki et al., 2008). BIG2 rekrutiert über die Aktivierung von ARF1 AP-1 an Membranen, und reguliert somit den Frachtverkehr (Shin et al., 2004; Shen et al., 2006). Shinotsuka et al., (2002b) haben bei Expression der BIG2 (E738K) Mutante ein verändertes subzelluläres Verteilungsmuster von AP-1 und GGA1 beobachtet. Dagegen hat Ishizaki et al., (2008) nach Depletion von BIG1, BIG2 oder beider Proteine nur die Verteilung von AP-1 und nicht von GGA3 und β -COP als verändert beschrieben. Shin et al., (2004) zeigten eine Kolkalisierung von BIG2 mit AP-1 und GGA3. Zudem hat eine Überexpression von BIG2 die durch BFA verursachte Dissoziation von AP-1 von Membranen, aber nicht von COPI, verhindert (Shinotsuka et al., 2002a). Für das Hefe Sec7p wurde eine Bindung von Sec21p (COPI Untereinheit) und Sec24p (COPII Untereinheit) gezeigt (Deitz et al., 2000). Auch für das humane GBF1 wurde eine Interaktion mit GGA Proteinen vorgeschlagen (Lefrancois und McCormick, 2007), jedoch ist bekannt, dass GBF1 vor allem am *cis*-Golgi und weniger an späten Golgimembranen, während GGAs am *trans*-Golgi und Endosomen fungieren (Hirst et al., 2001; Puertollano, 2004). Neueste Ergebnisse im Labor von Sean Munro (Christis und Munro, 2012) haben gezeigt, dass Arl1 Sec71, das *Drosophila melanogaster* Ortholog von BIG1/2, bindet, und dass in HeLaM Zellen die subzelluläre Verteilung von BIG1 und BIG2 abhängig von ARL1 ist, da nach Depletion von ARL1 BIG1 und BIG2 am TGN nicht mehr lokalisiert werden konnten.

Für die Rekrutierung von Hüllproteinen an Membranen und die Bildung von Transportvesikeln wird bisher die Arf-Aktivierung durch GEF Proteine, als allgemein akzeptiertes Modell, vorausgesetzt (vgl. Kapitel 3.3.5). In Hefe wurde gezeigt, dass Ggas an Arf binden können, es jedoch nicht für ihre subzelluläre Verteilung und Funktion benötigen (Boman et al., 2002). Interessanterweise wurde kürzlich gefunden, dass GBF1 COPI unabhängig von ARF1 an die Golgimembran rekrutieren kann. Es wurde ein Modell erstellt, bei dem COPI zuerst mit dem ARF1-GEF GBF1 (bzw. Gea1 und Gea2 in der Hefe) interagiert, bevor ein Nukleotidaustausch am ARF1 stattfindet (Deng et al., 2009). Dieses Modell, in welchem ein GEF die Adapterproteine zur Membran bringt, bietet eine mögliche Erklärung für die Beobachtung, dass ein Arf1 Protein unterschiedliche Hüllproteinkomplexe (AP-1/Clathrin, GGA/Clathrin, AP-3, AP-4, COPI) an verschiedenen Membranen in der Zelle rekrutieren kann.

Die GEF Proteine scheinen bei der Virusvermehrung eine wichtige Rolle zu spielen (Belov und Ehrenfeld, 2007; Bui et al., 2009). Dabei rekrutieren unterschiedliche virale Proteine unterschiedliche Hüllkomponenten (GBF1, BIGs, ARFs, GGA3, COPI) zu den vom Virus reorganisierten Membranen, wo sie spezialisierte Organellen regenerieren (Zeghouf et al., 2005; Belov et al., 2007a; Belov et al., 2007b). Die virale Replikation wird von dem Pilzmetabolit BFA, das die Arf-Aktivierung durch die Sec7-Domäne von GEFs verhindert (siehe Kapitel 3.3.7), blockiert. Mann vermutet, dass die GEFs bei der viralen Replikation eine andere Rolle als beim Zellmetabolismus spielen (Belov et al., 2010; Hsu et al., 2010). Denn es ist nicht die Sec7-Domäne, sondern der N-Terminus (DCB- und HUS-Domänen, vergleiche Abbildung 3.3) des GEF Proteins GBF1 für die Replikation vom Virus wichtig. Mann vermutet, dass durch die Bildung des GEF-ARF-GDP-BFA Komplexes der N-Terminus des GEF Proteins von viralen Proteinen nicht mehr gebunden werden kann (Belov et al., 2010).

3.5 Mon2/Ysl2 Unterfamilie

Die Proteine der Mon2/Ysl2 Unterfamilie sind evolutionär konserviert. Bis jetzt wurde aus dieser Gruppe vor allem das Protein Ysl2p (186 kDa) der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* untersucht (siehe Kapitel 3.5.1). Auch wurden *mon-2* des Fadenwurms *Caenorhabditis elegans* (siehe Kapitel 3.5.2), das Mon2 Protein der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* und das humane hMon2 (190 kDa) untersucht (siehe Kapitel 3.5.3). Das Gen *YSL2* (engl.,

YPT51 synthetic lethal) wurde zuerst von Birgit Singer-Krüger in einen Screen für Mutanten, die mit der Deletion von *YPT51* synthetisch letal sind, identifiziert, weshalb der Proteinname Ysl2p entstand (Singer-Krüger und Ferro-Novick, 1997). Ypt51p ist eine Rab GTPase die beim Transport von frühen zu späten Endosomen beteiligt ist. Später wurde Ysl2p in einem Screen für Mutanten gefunden, die sensitiv auf Toxine, wie das Pilzgift Brefeldin A (siehe Kapitel 3.3.7) und das Antibiotikum Monensin, sind und wurde deshalb Mon2p genannt (Muren et al., 2001).

Ursprünglich wurde eine deutliche Homologie von Hefe Ysl2p zu einigen Vertretern der BIG/Sec7 Familie im Bereich des N-Terminus erkannt (Muren et al., 2001). Die großen Sec7-Arf-GEFs wurden in fünf nicht-katalytische Domänen und die katalytische Sec7 Domäne gegliedert (siehe Kapitel 3.4). Die Proteine der Mon2/Ysl2 Familie besitzen sechs konservierte Bereiche, A bis F, definiert in Efe et al., (2005), wobei bei einigen die E-Domäne fehlt (siehe Abbildung 3.4, A). Dabei ist die B-Domäne homolog zu der DCB-Domäne und die C-Domäne zu der HUS-Domäne mit dem hochkonservierten YD-Motiv der großen Sec7-GEF Proteine, verdeutlicht in Abbildung 3.4, B anhand der Sec7p und BIG1 Proteine (Kapitel 3.4). Auch die D-Domäne besitzt homologe Bereiche zu den HDS1-, HDS2- und HDS3-Domänen (HDS1-3 Domänen) (Efe et al., 2005; Gillingham et al., 2006). Die Abbildung 3.4, C zeigt schließlich die Verwandtschaft dieser fünf nicht-katalytischen Domänen von Sec7-GEFs (BIG/Sec7 und GBF/Gea) und der Mon2/Ysl2 Proteine im Mensch und Hefe. Dabei ist die katalytische Sec7-Domäne mit ihren katalytischen Aminosäuren in der Mon2/Ysl2 Familie nicht deutlich konserviert (Abbildung 3.4, C). Sequenzvergleiche und Vorhersagen der Sekundärstruktur durch die Gruppe von Dr. Birgit Singer-Krüger haben die Anwesenheit einer entfernt verwandten Sec7-Domäne mit zehn α -Helices bestätigt (Jochum et al., 2002). Bisher wurde die Aktivität der Proteine als GEF nicht gezeigt. Die nur in der Mon2/Ysl2 Familie konservierten kleinen Bereiche A und F haben eine Ähnlichkeit von 40% und 42% (Efe et al., 2005), mit überwiegend geladenen und hydrophoben Aminosäuren (siehe Abbildung 3.4, A). Die Prognose der Sekundärstruktur und die Art der Aminosäuren lassen vermuten, dass diese Bereiche für die Proteinbindung verantwortlich sind (siehe Kapitel 3.5.1). Die Homologie der Mon2/Ysl2 Familie zu den anderen großen GEFs deutet auf überlappende Funktionen dieser Multidomänenproteine.

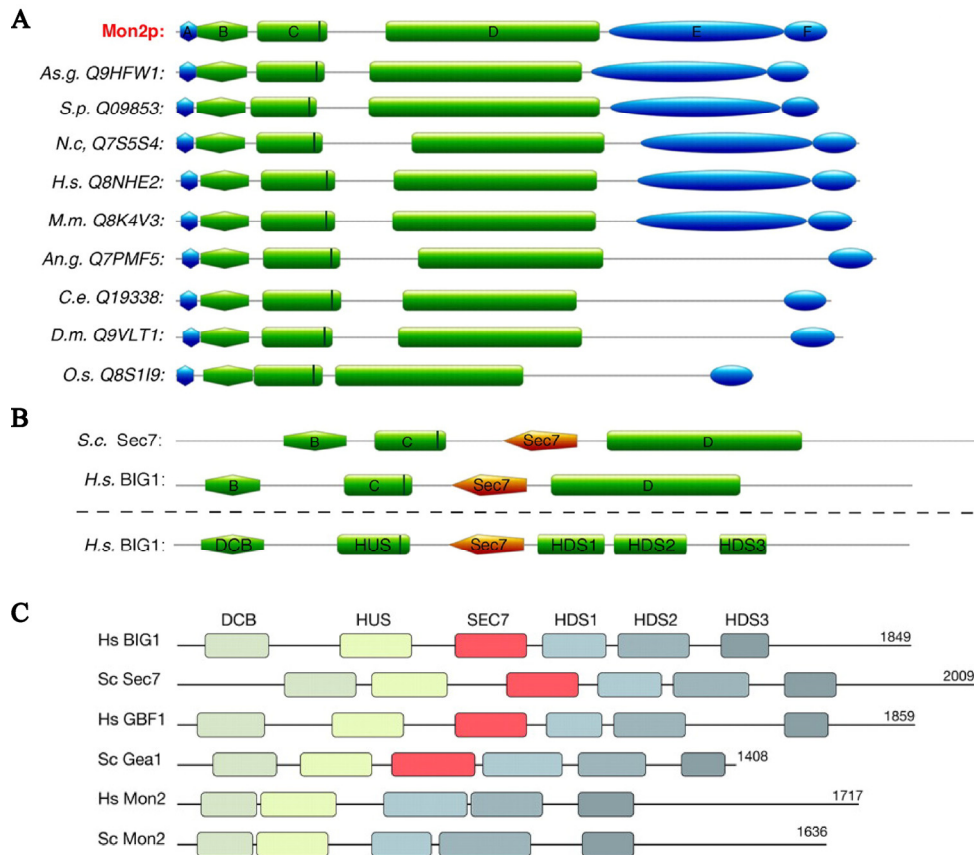


Abbildung 3.4 Konservierte Domänen in der Ysl2/Mon2 Familie und Homologie zu den großen Multidomänen-Sec7-GEFs Familien BIG/Sec7 und GBF/Gea.

(A) Repräsentation von sechs konservierten Domänen A bis F innerhalb der orthologen Proteine der Ysl2/Mon2 Familie in verschiedenen Eukaryoten (links; sind Mon2 Proteine mit Zugangsnummern für Datenbanken /gekennzeichnet). Blaue Domänen A und F sind nur in der Ysl2/Mon2 Familie konserviert, während die grünen auch in den Sec7-GEFs auftreten. (B) Darstellung des Sec7p aus der Hefe und das humanen BIG1, mit den konservierten B, C, D (grün) und der katalytischen Sec7-Domäne. Unter dem Strich wird eine Definition und Einteilung der Domänen nach Moratou et al., 2005 gezeigt. Dabei entspricht bei BIG1 die B- der DCB- und die C- der HUS-Domäne. Die D-Domäne wurde in drei Bereiche (HDS1, HDS2 und HDS3) gegliedert. (A und B) Der senkrecht schwarze Strich in der C- bzw. HUS-Domäne stellt das konservierte YD-Motiv dar. (C) zeigt eine schematische Repräsentation der konservierten Domänen der großen Sec7-Arf-GEF Familien BIG/Sec7 und GBF/Gea sowie der Ysl2/Mon2 Familie aus der Hefe *S. cerevisiae* und dem Menschen. Dabei wird die das Vorhandensein der fünf nicht-katalytischen Domänen der Sec7-Arf-GEFs in der Mon2/Ysl2 Familie verdeutlicht. Dafür wird jeweils einer der ähnlichen Proteine BIG1 und BIG2, Gea1p und Gea2p stellvertretend vorgestellt. (Abbildung angepasst nach Efe et al., 2004 und Gillingham et al., 2005)

3.5.1 Interaktionspartner von Hefe Ysl2p/Mon2p

Aus den Ergebnissen von Gelfiltrationsuntersuchungen wird vermutet, dass das Hefe Ysl2p mit großen Proteinkomplexen assoziiert und Oligomere bildet. Durch Koimmunpräzipitationsversuche wurde gezeigt, dass Ysl2p mit sich selbst interagiert (Efe et al., 2005). Die Untersuchungen von Maja Lasić haben erwiesen, dass die C-terminalen 100 Aminosäuren von Ysl2p für die Homodimerisierung essentiell sind (Maja Lasić, Dissertation 2008). Des Weiteren wird der C-terminalen F-Domäne (siehe Abbildung 3.4) mit ihren hydrophoben und geladenen Aminosäuren eine spezifische Wechselwirkung mit anderen Proteinen, die vermutlich auch in meisten Eukaryoten konserviert sind, zugeschrieben (Efe et al., 2005).

Genetische und biochemische Versuche haben eine Interaktion von Ysl2p mit dem Arf-like Protein Arl1p (siehe Kapitel 3.3.4), das sowohl im Verkehr des endosomalen Systems als auch bei der vakuolären Proteinsortierung fungiert, bewiesen (Jochum et al., 2002). Die Interaktion findet über den N-Terminus von Ysl2p, einschließlich der vermeintlichen Sec7-Domäne (Teil der A-, B- und C-Domäne, siehe Abbildung 3.4), statt. Auch die putative Sec7-Domäne des Ysl2p allein bindet an Arl1p, jedoch schwächer als der gesamte N-Terminus. Ob Ysl2p ein GEF für Arl1p ist, ist nicht bekannt. Jedoch kann Arl1p ohne *MON2* aktiviert werden (Gillingham et al., 2006). Neueste Ergebnisse aus dem Labor von Anne G. Rosenwald (Manlandro et al., 2012) haben gezeigt, dass Mon2p ein wichtiger Regulator der Bindung von Nukleotiden am Arl1p ist. Arl1p wird in der nukleotidfreien Form von Mon2p *in vivo* stabilisiert. Weiter zeigen noch nicht veröffentlichte Daten, dass Mon2p die Bindung von GTP γ S Nukleotid am Arl1p *in vitro* verhindert (in Vorbereitung; Chaves et al.). Rosenwald et al., (2012) vermuten, dass Mon2p kein GEF für Arl1p ist. Ein bekanntes GEF für Arl1p ist Syt1 (Chen et al., 2010). Syt1p unterstützt die Aktivierung von Arl1p am späten Golgi, um Imh1p zu rekrutieren. Arl1 Proteine interagieren mit dem Golgin Imh1p (Ortholog von humanen p230/golgin-245/tGolgin-1), der bei der Anbindung von endosomalen Vesikeln an das TGN fungiert. Eine Interaktion zwischen Imh1p und Mon2p wurde nicht gefunden (Chen et al., 2010).

Das Ysl2p interagiert direkt mit Neo1p, einem essentiellen Mitglied aus der Drs2 Familie, der P4-Typ Transmembranprotein-ATPasen und potentiellen Aminophospholipidtranslokasen (Tang et al., 1996; Pomorski et al., 2003; Wicky et al., 2004). Diese Flippasen verlagern Phosphatidylserine (PS) und Phosphatidylethanolamine (PE) von der inneren zur äußeren zytosolischen Schicht der Doppellipidmembran, gekoppelt mit ATP-Verbrauch (Balasubramanian und Schroit, 2003; Natarajan et al., 2004). Das *NEO1* Gen der Hefe wurde

zuerst in einem Screen als ein Multikopie-Suppressor der Sensitivität gegen das Antibiotikum Neomycin isoliert (Prezant et al., 1996). Später wurde *NEO1* als Suppressor der Wachstumsstörung von *Ysl2* Mutanten entdeckt (Wicky et al., 2004). Ein Modell wird vorgeschlagen, worin Ysl2p, Arl1p und Neo1p in einem Netzwerk während der Vesikelbildung fungieren (Wicky et al., 2004; Singer-Krüger et al., 2008). Neuerdings wurde das Protein Dop1p als ein Mitglied dieses Membranremodulierungsnetzwerks Neo1p-Ysl2p-Arl1p identifiziert (Barbosa et al., 2010). Bereits zuvor wurde auch das *DOPI* Gen als ein Multikopie-Suppressor von *Ysl2* Mutanten beschrieben (Efe et al., 2005) und es wurde eine direkte Interaktion zwischen Ysl2p und Dop1p gezeigt (Gillingham et al., 2006). Dop1p ist ein peripheres Membranprotein, das bis zu 50% mit oder in der Nähe von Ysl2p subzellulär lokalisiert wurde. Es ist an endosomalen und TGN Membranen zu finden, essentiell für das Zellwachstum und wichtig für die Zellpolarität (Gillingham et al., 2006; Barbosa et al., 2010). Zudem bindet Dop1p an Neo1p im Immunpräzipitationsversuch (Barbosa et al., 2010).

Versuche im Labor von Dr. Birgit Singer-Krüger in der Hefe haben erste Hinweise auf eine Interaktion von Ysl2p mit Clathrinadapterproteinen gegeben (Lasić, Dissertation 2008). Maja Lasić hatte Untersuchungen von Proteinen des Ysl2p-Arl1p-Neo1p Netzwerks hinsichtlich der Rekrutierung von Clathrinadapterproteinen durchgeführt. Wachstumsexperimente zeigten, dass *GGA1* und *GGA2* genetisch mit *NEO1* und *ARL1* interagieren. Es konnte eine Bindung des N-terminalen Bereichs von Gga2p mit sowohl Arl1p als auch Ysl2p gezeigt werden, was bei letzterem vermutlich unabhängig von Arl1p stattfindet, da die Interaktion auch in *Aar11* Mutanten stattfand (Lasić, Dissertation 2008). Dr. Birgit Singer-Krüger zeigte schließlich, dass die aufgereinigten Proteine GST-Gga2p-VHS und His-Ysl2p direkt interagieren (Singer-Krüger et al., 2008). Gleiches wurde für GST-Gga1p-VHS bestätigt.

Auch wurde eine *YSL2* Mutante zusammen mit einer *TIF3* Mutante in einem Screen für synthetische Letalität gefunden (Coppolecchia et al., 1993). Tif3p ist ein Initiationsfaktor der Translation, was damals ein Hinweis auf eine Verbindung zwischen der Proteinsynthese und dem Membrantransport gab (Deloche et al., 2004).

Auf eine Wechselwirkung von Ysl2p mit dem Zytoskelett deutet der Befund, dass eine Deletion von *YSL2* und *ARC18* Genen sich synthetisch letal auf die Zellen auswirkt (Efe et al., 2005). Das Arc18p ist eine Untereinheit des Arp2/3 Komplexes, welches die Neubildung von Aktinfilamenten (Nukleation) in kortikalen Flecken aktiviert und für die Verzweigung der Filamente verantwortlich ist (Winter et al., 1999). Des Weiteren haben *Ysl2* Hefemutanten eine veränderte Organisation des Aktinzytoskeletts (Singer-Krüger und Ferro-Novick, 1997).

3.5.2 *mon-2* in *C. elegans*

Im Fadenwurm *C. elegans* spielt *mon-2* eine bedeutende Rolle bei der asymmetrischen Teilung von epithelialen Stammzellen (Kanamori et al., 2008). Bei der Untersuchung eines lipidmetabolisierenden Enzyms *ipla-1* in *C. elegans*, wurde *mon-2* als ein Supressor von Phänotypen der *ipla-1* Mutante gefunden. *mon-2* Mutation in *ipla-1* Mutanten haben den Defekt der Spindelorientierung und Polarität der epithelialen Stammzellen supprimiert.

3.5.3 Neue Befunde über das humane hMon2 und *Drosophila* Mon2 Protein

Neue Befunde über das humane hMon2 und das Mon2 Protein der Fruchtfliege *Drosophila* wurden vor kurzem veröffentlicht (Tanaka et al., 2011; Tomita et al., 2011).

Viren bedienen sich für ihre Vermehrung zellulärer Proteine der Wirtszelle, sogenannter Wirtsfaktoren (Bieniasz, 2009). Sie docken an Rezeptoren der Plasmamembran an und werden in die Wirtszelle endozytiert. Das eingeschleuste Genom wird dort vermehrt. Anschließend werden neue Viruspartikel assembliert und freigesetzt. Kawaoka Y. und seine Gruppe haben gefunden, dass das Hefe Mon2p/Ysl2p und humane hMon2 für eine ausreichende Produktion von infizierenden HIV-1 Partikeln benötigt werden (Tomita et al., 2011). Das virale Gag Protein wird für die Knospung der viralen Partikel an der Plasmamembran benötigt. In einem Hefescreen wurde in *mon2* Mutanten das virale HIV-1 Gag Protein nicht mehr an der Plasmamembran lokalisiert und somit auch keine Virus-ähnliche Partikel (engl., *virus-like partikels*, VLP) im Kulturmedium vorgefunden. Das gleiche Phänomen wurde in humanen Zellen beobachtet. Nach Depletion von hMon2 wurde kein Gag Protein (p24-Domäne) an der Plasmamembran detektiert. Zudem hat die Elektronenmikroskopie gezeigt, dass weniger Viruspartikel freigesetzt werden. Durch Y2H-Experimente konnte gezeigt werden, dass das hMon2 die p24-Domäne des Gag Proteins bindet.

In *Drosophila* Zellen wurde hMon2 am Golgi und an golgistammenden Endosomen lokalisiert. Es hat eine wichtige Rolle bei der Reorganisation von kortikalem Aktin für die Bildung von langen F-Aktin Filamenten und Verankerung von Komponenten am Kortex des Keimplasmas (ein bestimmter Bereich im Zytoplasma der Oocyte/Eizelle) (Tanaka et al., 2011). Mon2 interagiert mit Aktinnukleatorproteinen Capu und Spir (Y2H, IP), die bei der

osk RNA Verteilung in der Eizelle fungieren und für die Osk-induzierte Bildung von Aktinausstülpungen benötigt werden. hMon2 ist auch wichtig für die Verankerung von Osk an den hinteren Pol und für die Osk-induzierte Bildung von F-Aktin Ausstülpungen, welche in *mon2* Mutanten nicht mehr gebildet werden. Zudem ist Mon2 wichtig für die Akkumulierung der Rho1 GTPase an dem posterioren Pol der Eizelle, welche auch, wie seine Interaktionspartner Capu und Spir, für die Bildung von langen Aktin Filamenten am Zellkortex und Verankerung von Keimplasma am hinteren Pol der Eizelle verantwortlich ist. Die Akkumulierung von Rho1 am hinteren Pol der Eizelle war in *mon2* Mutanten nicht mehr vorzufinden. Wie bei der *mon2* Mutante, ist die Osk-induzierte Aktinremodellierung bei der *rab5* Mutante gestört, wo kortikale F-Aktin Bündel desorganisiert vorliegen. Eine Doppeldeletionsmutante *mon2 rab5* verhindert diesen Defekt. Hier wurden keine lange Aktin Filamente beobachtet.

3.6 Bedeutung des Zytoskeletts und der Motorproteine für den intrazellulären Membrantransport

Das Zytoskelett ist ein bewegliches Gerüst in der eukaryotischen Zelle, das die Zellgestalt festlegt und stabilisiert, sowie in die räumliche Verteilung, Beweglichkeit, die Morphologie von endozytotischen Kompartimenten und im Transport von Frachtmolekülen oder Organellen einbezogen ist (Doherty und McMahon, 2008; Clauss, 2009). Es besteht aus einem Netzwerk von Aktinkabeln (Mikrofilamenten), Mikrotubuli und Intermediärfilamenten, welches ständig reorganisiert wird. Aktin- und Mikrotubulifilamente sind sehr wichtig zu Beginn der Endozytose, im sekretorischen Weg und für die Dynamik und Verteilung von Organellen und Frachtmolekülen. Dem Zytoskelett bedienen sich molekulare Motoren, um diese Fracht innerhalb der Zellen zu transportieren. Es gibt drei große Superfamilien der Motorproteine, die aktinbasierten Myosine, sowie mikrotubulibasierten Kinesine und Dyneine (Alberts, 2008; Horton H. Robert, 2008; Clauss, 2009).

Die Kinesinproteine, auch KIFs genannt, sind wichtige molekulare Motoren, die für einen gerichteten Transport von unterschiedlicher Fracht zuständig sind (Hirokawa et al., 2009). Als Dimere bringen sie membranumgebene Organellen, Proteinkomplexe und mRNAs in mRNP (engl., *messenger ribonucleoprotein*) Komplexen an ihre Ziele (Kanai et al., 2004). Sie wandern entlang der Mikrotubuli vorwiegend von Minuspol in Richtung Pluspol. Die mit ATP Verbrauch verbundene Konformationsänderung der Proteine erzeugt Energie für deren

Vorwärtsbewegung, durch sogenannte Schritte. Kinesinproteine besitzen eine relativ hohe Prozessivität, d.h. sie machen viele Schritte bevor sie sich vom Filament loslösen (Holzbaur und Goldman, 2010). Kinesinproteine werden nach phylogenetischen Analysen in 15 Unterfamilien eingeordnet (Lawrence et al., 2004; Hirokawa et al., 2009). Um den intrazellulären Transport zu verstehen, wurden die meisten Untersuchungen in polarisierten Neuronen und Epithelzellen durchgeführt (Hirokawa und Noda, 2008). Kinesinproteine binden ihre Fracht direkt oder über Gerüst- und Adapterproteine (Hirokawa et al., 2009). Beispielweise bindet das Kinesin KIF13A seine M6PR-Ladung über das Clathrinadapterprotein AP-1 (Delevoeye et al., 2009; Lakkaraju et al., 2009). Das Kinesin-1/KIF5 interagiert über KLC2 mit Gadkin/ γ -BAR, welches mit AP-1 wechselwirkt (Schmidt et al., 2009). Zusammen fungieren diese Proteine bei der Bildung und Transport von einer Subpopulation von TGN stammenden Vesikeln, die Tfn und Rab4 beinhalten (Schmidt et al., 2009).

Die Kinesin-1 Familie besteht aus 3 Subtypen von KIF5 (KIF5A, KIF5B, KIF5C), die miteinander nah verwandt sind. Während KIF5A und KIF5C neuronenspezifisch sind, wird das KIF5B ubiquitär exprimiert. Das Kinesin-1, auch KIF5 oder uKHC (ubiquitäres KHC) genannt, kann Heterotetramere aus zwei schweren Ketten (KHC, engl. *kinesin heavy chain*) und zwei leichten Ketten (KLC, engl. *kinesin light chain*) bilden (Hirokawa und Noda, 2008; Hirokawa et al., 2009). Somit kann das Kinesin-1 seine Frachtkomplexe auch über KLC binden (McCart et al., 2003; Wozniak und Allan, 2006). Dieser heterotetramere Komplex wird konventionelles Kinesin genannt (DeBoer et al., 2008). In mehreren Organismen darunter auch humanen Zellen gibt es unterschiedliche KLC Isoformen, die auf Grund von alternativem Spleißen der pre-mRNA entstehen (Cyr et al., 1991; McCart et al., 2003). Diese Isoformen könnten für die Spezifität der Frachtbindung und funktionelle Vielfältigkeit notwendig sein (Wozniak und Allan, 2006).

Dyneine sind am Minus-Ende gerichteten Transport von biologischer Ladung auf Mikrotubuli beteiligt (Allan, 2011) und sind auch prozessive Motoren (Holzbaur und Goldman, 2010). In Fibroblasten wird die Ladung in Richtung Zellmitte, wo sich MTOC, das sich in der Nähe von Kern liegt, befindet, transportiert. Dagegen läuft Dynein in neuronalen Dendriten oder polarisierten Epithelzellen in Richtung oder weg vom Zellkern, da die Mikrotubuli mit ihrem Plus- oder Minus-Ende zum Zellkern gepolt sein können (Allan, 2011).

In Eukaryoten gibt es eine Vielzahl von Myosinproteinen, die in 24 Myosin Klassen eingeordnet sind (Thompson und Langford, 2002; Foth et al., 2006; Goodson und Dawson, 2006). Sie arbeiten als Monomere, Dimere oder Multimere. Menschen besitzen 40 Gene für

die Myosine und mindestens 11 unterschiedliche Myosinproteinklassen (Goodson und Dawson, 2006). Nicht-muskuläre Myosinproteine tragen und/oder fixieren Organellen und Vesikel entlang von Aktinkabeln und sind auch an der Entstehung von Vesikeln beteiligt. Die meisterforschten Myosine, welche eine Rolle im vesikulären Transport entlang der Aktinkabel spielen, sind die prozessiven Myosin I, Myosin V und Myosin VI (Holzbaur und Goldman, 2010). Das humane nicht-muskuläre nicht-prozessive (dissoziiert leicht von Aktin ab) Myosin II ist ein wichtiger Motor in vielen zellulären Prozessen während des Wachstums, Entwicklung, Zellpolarität, Zellteilung und Zellmigration (Conti und Adelstein, 2008; Narumiya und Watanabe, 2009). Es assembliert zu einem bipolaren Minifilament, um F-Aktinfilamente zu kontrahieren (Bresnick, 1999; Conti und Adelstein, 2008). Es wurde auch gezeigt, dass Myosin II bei der Biogenese von Vesikeln am TGN und Golgi wirkt (Müsch et al., 1997; Stow et al., 1998; Duran et al., 2003; Valente et al., 2010). Dort schnürt Myosin II in Zusammenarbeit mit Aktin und Kinesin-1 die tubulärvesikuläre Transportträger von der Donormembran ab (Müsch et al., 1997; Miserey-Lenkei et al., 2010). Der genaue Mechanismus ist noch nicht geklärt, jedoch wird vermutet, dass das Aktin kurz vor der Abschnürung des Vesikels rekrutiert wird.

In der knospenden Hefe *S. cerevisiae* ereignet sich die aktinabhängige Bewegung von Fracht oder Organellen über ein oder mehrere Myosinproteine oder über die Triebkraft von Arp2/3-vermittelten Aktinpolymerization (Fagarasanu und Rachubinski, 2007). Typ I Myosin Myo3p und Myo5p bei dem Internalizationsschritt der Endozytose. Das Typ II Myosin, Myo1p ist bei der Zytokinese beteiligt. Die Typ V Myosine Myo2p und Myo4p transportieren verschiedene Frachtmoleküle und Organellen entlang der Aktinkabel und sind bei der Vererbung von Organellen in die Tochterzelle beteiligt (Govindan et al., 1995; Reck-Peterson et al., 2001; Bretscher, 2003; Fagarasanu und Rachubinski, 2007).

Durch Gruppenzusammenarbeit von Motorproteinen, die aus unterschiedlichen Sets aus Myosin, Kinesin oder/und Dynein bestehen, können eine Fracht weiter und durch schnelle Anpassung an kreuzenden Zytoskelettbahnen effizienter transportieren. So kann eine Organelle oder Fracht von Kinesin und Dynein auf Mikrotubuli und lokal von Myosin auf Aktinfilament getragen werden (Klumpp und Lipowsky, 2005; Holzbaur und Goldman, 2010; Driver et al., 2011).

3.7 Ziel dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, das humane hMon2 Protein zu untersuchen. Das Hefe Ysl2p spielt eine wichtige Rolle im vesikulären Membrantransport innerhalb der Zelle. Zudem haben kürzlich veröffentlichte Daten gezeigt, dass Mon2 bei der Aktinremodellierung und Verankerung von Proteinen im Keimplasma von *Drosophila* Oocyten und bei der viralen Vermehrung im Mensch und Hefe beteiligt ist. Auch die Verwandtschaft der Mon2/Ysl2 Proteinfamilie zu den großen Sec7-GEFs BIG/Sec7 und GBF/Gea/GNOM, die bereits vermehrt auch im humanen System untersucht werden, hat das Interesse an hMon2 geweckt. Es ist zu erwarten, dass die Grundlagenforschung von dem großen Mulidomänenprotein hMon2 sehr nützlich ist.

Untersuchungen von hMon2 sollten mit unterschiedlichen Versuchsansätzen und Methoden erfolgen. Mittels siRNA vermittelten Knockdown von hMon2 in HeLa Zellen, sollte das Verhalten, die subzelluläre Verteilung und die Morphologie von endozytotischen Markern und Organellen untersucht werden. Mittels Expression von eGFP-hMon2 und Kolokalisierungsstudien in humanen HeLa Zellen sollte das subzelluläre Vorkommen von hMon2 ermittelt werden. Massenspektrometrieanalyse in HEK293T (engl., *Human Embryonic Kidney*, menschliche embryonale Nierenzellen) Zellen sollte neue Interaktionspartner identifizieren und somit Einblicke in mögliche Funktion und Bedeutung von hMon2 schaffen.

4. Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Bio-Rad (München), Calbiochem (Darmstadt), Fluka (Taufkirchen), Merck (Darmstadt), Qiagen (Hilden), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma-Aldrich (Deisenhofen) bezogen.

4.1.2 Geräte

Es wurden Geräte von den Firmen Bio-Rad, Heraeus, Beckman, Kontron, Gilson und VWR verwendet. Die Herkunft besonderer Geräte wird in den entsprechenden Kapiteln genannt.

4.1.3 Nährmedien für Hefe und Bakterien

Zur Kultivierung von Hefe und Bakterien wurden die in den Tabelle 4.1 und Tabelle 4.2 beschriebenen Medien verwendet. Alle Medien wurden durch 30 minütiges Autoklavieren bei 121°C sterilisiert. Zur Herstellung von Festmedium (Agar-Platten) wurden gleiche Anteile von zweifach (2x) konzentrierten Flüssigmedien und 4% (m/v) Agar, das zuvor in einer Mikrowelle aufgeköcht wurde, vermischt und jeweils ca. 15 ml in Petrischalen (10 cm Durchmesser, BioGreiner) gegossen.

Zur selektiven Kultivierung von mit Plasmid transformierten Bakterien wurden zum LB-Medium und LB-Agar-Platten entweder 100 µg/ml Ampicillin oder 30 µg/ml Kanamycin zugegeben. Die Plasmide (siehe Kapitel 4.1.12) trugen ein Gen, das den Bakterien eine Resistenz gegen ein bestimmtes Antibiotikum verleiht (siehe Tabelle 4.1).

Zur selektiven Kultivierung von mit Plasmid transformierten Hefen wurde ein SD-Selektionsmedium (siehe Tabelle 4.2) verwendet. Diese Plasmide verleihen den Zellen

Prototrophie für bestimmte Supplemente, die dann im SD-Medium nicht zugegeben werden (siehe Tabelle unten).

Tabelle 4.1. Für die Kultivierung von Bakterien wurden folgende Medien verwendet.

Medium	Zusammensetzung
LB-Medium	1% (m/v) Bacto®-Trypton, 0,5% (m/v) Bacto®-Hefeextrakt, 0,5% (m/v) NaCl, pH 7,5
LB-Agar-Platten	LB-Medium mit 2% (m/v) Bacto®-Agar
SOC-Medium	2% (m/v) Bacto®-Trypton, 0,5% (m/v) Bacto®-Hefeextrakt, 0,45 (m/v) Glukose, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ , pH 7,4
LB+Amp-Selektionsmedium	LB-Medium oder LB-Agar-Platten mit 100 µg/ml Ampicillin (LB+Amp)
LB+Kan-Selektionsmedium	LB-Medium oder LB-Agar-Platten mit 30 µg/ml Kanamycin (LB+Kan)

Tabelle 4.2. Für die Kultivierung von Hefe wurden folgende Medien verwendet.

Medium	Zusammensetzung
YPD-Vollmedium	1% (m/v) Bacto®-Hefeextrakt, 2% (m/v) Bacto®-Pepton, 2% (m/v) Glukose, pH 5,5
YPD-Agar-Platten	YPD-Vollmedium mit 2% (m/v) Bacto®-Agar
SD-Medium	0,67% (m/v) Bacto®-Hefe Stickstoff (Basis), 2% (m/v) Glukose, pH 5,6
SD-Selektionsmedium	SD-Medium mit den benötigten Supplinen: 0,3 mM Adenin, 0,2 mM Uracil, 0,3 mM Histidin, 1,7 mM Leucin, 1 mM Lysin, 0,4 mM Tryptophan
SD-Agar-Platten	SD-Selektionsmedium mit 2% (m/v) Bacto®-Agar

4.1.4 Antikörper

Die meisten Antikörper wurden in kleinen Aliquots mit Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt. Zur Verwendung wurde ein Aliquot aufgetaut und mit 50% (v/v) Glycerin bei -24°C aufbewahrt. Bei 4°C gelagerte Antikörper wurden mit 10 mM NaN₃ versetzt.

4.1.4.1 Primärantikörper

Tabelle 4.3 Verwendete Primärantikörper für Immunblotting

Antikörper gegen [Klon]	Wirt	Verdünnung	Quelle/Geschenk von
γ -Adaptin (AP-1) mAb [100/3]	Maus	1/1000	SIGMA, Angelika Haußer
β -Aktin mAb [AC-15]	Maus	1/4000	SIGMA, Gerrit van Meer
Dynein HC mAb [440.4]	Maus	1/100	SIGMA-ALDRICH, USA
GGA3 mAb [8]	Maus	1/1000	BD Bioscience
EIF3S10, pAB (A01)	Maus	1/1000	Abnova Coporation
EpsinR, affinitätsgereinigt	Kaninchen	1/2500	Margret Robinson, Cambridge, UK (Hirst et al., 2000)
GFP pAb (Serum, A6455)	Maus	1/1000-1/2500	Molecular Probes
HA mAb [16B12]	Maus	1/1000-1/2000	Covance
hMon2, affinitätsgereinigtes Serum	Kaninchen	1/500-1/1000	Birgit Singer-Krüger, Stuttgart (Singer-Krüger et al., 2008)
Kinesin-1 mAb [H2]	Maus	1/1000	abcam, Cambridge, UK
MYH9/10 mAb [3H2]	Maus	1/500-1/1000	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Ysl2p (Serum)	Kaninchen	1/500	Birgit Singer-Krüger, Stuttgart (Jochum et al., 2002)

Tabelle 4.4. Verwendete Primärantikörper für indirekte Immunfluoreszenz

Antikörper gegen [Klon]	Wirt	Verdünnung	Quelle/ Geschenk von
γ -Adaptin (AP-1) mAb [100/3]	Maus	1/1000	SIGMA, Angelika Haußer
δ -Adaptin (AP-3) mAb [SA4]	Maus	Konzentrat 1/400 Ascites 1/1000	DSHB Iowa, USA
EEA1 mAb [14/EEA1]	Maus	1/100	BD Bioscience
EpsinR affinitätsgereinigt	Kaninchen	1/250	Margret Robinson, Cambridge, UK (Hirst et al., 2000)
GGA1 pAb, affinitätsgereinigt	Kaninchen	1/750	Margret Robinson, Cambridge, UK (Hirst et al., 2000)
GGA3 mAb [8]	Maus	1/50	BD Bioscience
GM130 mAb [35]	Maus	1/300	BD Bioscience, Angelika Haußer
Kinesin-1 mAb [SUK4]	Maus	Konzentrat 1/50 (Ascites 1/1000)	DSHB Iowa, USA
MYH9/10 mAb [3H2]	Maus	1/200	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
p230 mAb [15/p230 trans Golgi]	Maus	1/300	BD Bioscience, Angelika Haußer
TGN46 pAb	Schaf	1/150	AbD Serotec, Joost Holthuis, ME, Utrecht

Tabelle 4.5 Verwendete Antikörper für Immunpräzipitation

Antikörper gegen	Wirt	Quelle
HA mAb [3F10]	Ratte	Roche
GFP pAb (Serum, A6455)	Maus	Molecular Probes
hMon2 (Serum) #1511-1	Kaninchen	Birgit Singer-Krüger
hMon2 affinitätsgereinigt	Kaninchen	Birgit Singer-Krüger
Präimmunserum #1511-1 (Serum vor Immunisierung gegen hMon2)	Kaninchen	Birgit Singer-Krüger
Präimmunserum #1511-2 (Serum vor Immunisierung gegen hMon2)	Kaninchen	Birgit Singer-Krüger
Präimmunserum #1681-1 (Serum vor Immunisierung gegen ATP9A)	Kaninchen	Birgit Singer-Krüger
Präimmunserum #1681-2 (Serum vor Immunisierung gegen ATP9A)	Kaninchen	Birgit Singer-Krüger

4.1.4.2 Sekundärantikörper

Tabelle 4.6 Verwendete Sekundärantikörper für Immunblot

Sekundärantikörper	gekoppelt an	Verdünnung	Quelle	Bezeichnung
Ziege-anti-Maus IgG (H+L)	Alkalische Phosphatase	1/1000	Kirkegaard and Perry Laboratories	075-1806
Ziege-anti-Kaninchen IgG (H+L)	Alkalische Phosphatase	1/1000	Kirkegaard and Perry Laboratories	0751-1506

Tabelle 4.7 Verwendete Sekundärantikörper für quantitativen Immunoblot

Sekundärantikörper	gekoppelt an	Verdünnung	Quelle
Ziege-anti-Maus	IRDye® 800	1/1000	Rockland
Ziege-anti-Kaninchen	IRDye® 801	1/1000	Rockland

Tabelle 4.8 Verwendete Sekundärantikörper für indirekte Immunfluoreszenz

Sekundärantikörper	gekoppelt an	Verdünnung	Quelle/ Geschenk von
Esel-anti-Schaf/Ziege IgG	FITC	1/204	AbD Serotec, Joost Holthuis, ME, Utrecht
Ziege-anti-Maus	Alexa Fluor 488	1/500-1/1000	Invitrogen
Ziege-anti-Kaninchen	Alexa Fluor 488	1/500-1/1000	Invitrogen
Ziege-anti-Maus IgG (H+L)	Alexa Fluor 546	1/500-1/1000	Invitrogen
Ziege-anti-Kaninchen	Alexa Fluor 546	1/500-1/1000	Invitrogen

4.1.5 Verwendete Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden mit entmineralisiertem und durch die Milipore® Anlage gefilterten Wasser angesetzt, anschließend für die Sterilität 30 min lang bei 121°C autoklaviert. Häufig verwendete Puffer und Lösungen werden unten aufgelistet, andernfalls in den entsprechenden Kapiteln beschrieben.

Bei Experimenten mit der Zellkultur wurde 10x PBS (26,8 mM KCl, 1,37 M NaCl, 80 mM Na₂HPO₄, 14,7 mM KH₂PO₄) verwendet. Für alle anderen Experimente wurde 10x PBS (26,8 mM KCl, 1,37 M NaCl, 56 mM Na₂HPO₄, 10,8 mM NaH₂PO₄, 14,7 mM KH₂PO₄) benutzt.

4.1.6 Verwendete Proteaseinhibitoren

In dieser Arbeit verwendete Proteaseinhibitoren wurden bei -24°C in 50 µl Aliquots gelagert. 1000x CLAP enthält jeweils 5 mg/ml Chymostatin, Leupeptin, Antipain, Pepstatin in DMSO, 50xPIC enthält 0,005% (m/v) Leupeptin, 0,025% (m/v) Pepstatin, 5 mM Pefabloc, 2,5 mM Phenantrolin, 1000x PMSF entspricht 1 M PMSF in DMSO.

4.1.7 Primer

Tabelle 4.9 Primer die für diese Doktorarbeit verwendet wurden

Primer	Sequenz	Klonierung von
5hMon2Pro1188	5'-CCACCTGTAGTTAATGTAC-3'	pEGFP-C1-hMON2-ΔF
3hM2Val1595,stop	5'-AACCTTTAGGGCCCTCAGACTTTATTACTGAAGGAAAAC-3'	pEGFP-C1-hMON2-ΔF
Eco,hMonEG1596	5'-CATACGAATTCTCCCAACACCTCAAGAAGGC-3'	pEGFP-C1-hMON2-F
XhoSalstop,KIAA	5'-ACCTTGTCGACTCGAGAAATGTCTTCTCACAG-3'	pEGFP-C1-hMON2-F
5KLC2ecoRI,met1	5'-CCTAGAATTCATGGCCATGATGGTGTTC-3'	pGEX-T4-3-KLC2
3KLC2st623,SalI	5'-GCTAGTCGACTTAGCCACCAGGGAGCTTC-3'	pGEX-T4-3-KLC2
5KIF5BecoRI771M	5'-CGTAGAATTCATGCAAGATAGACGAGAAC-3'	pGEX-T4-3-KHC771-963
3KIF5Bst964SalI	5'-CCTTGTCGACTTACACTTGTTTGCTCC-3'	pGEX-T4-3-KHC771-963

4.1.8 Sequenzierprimer

Tabelle 4.10 Verwendete Sequenzierprimer

Primer	Sequenz	Sequenzierung von
klc2mv774	5'-GCTGCCACCTGCTCAAT-3'	pGEX-4T-3-KLC2
pGex for	von MWG, KLC2V	pGEX-4T-3-KLC2, pGEX-4T-3-KHC771-963
pGex rev	von MWG, KLC2R	pGEX-4T-3-KLC2, pGEX-4T-3-KHC771-963

4.1.9 siRNA Duplexe

Um die Expression von hMON2 Gen (KIAA1040) mittels RNA-Interferenz (RNAi) in den HeLa Zellen zu verringern (Genknockdown), wurden die HP GenomWide siRNAs Hs_KIAA1040_2_HP (5'-CAGAGAUUUAUAGAACAA-3') gegen die Zielsequenz CAGA GAT ATT ATA GAA CAA und die Hs_KIAA1040_3_HP (5'-AGAACUCAAUUAGUUUA-3') gegen die Zielsequenz A GAA CTC AAT ATT AGT TTA von Qiagen GmbH (Freiburg) verwendet. Als Negativkontrolle wurde die AllStars Negative Control siRNA verwendet (Singer-Krüger et al., 2008).

4.1.10 Bakterienstämme

In dieser Arbeit wurde der *Escherichia coli* (*E. coli*) Stamm DH5 α zur Amplifizierung von Plasmid-DNA verwendet (siehe Kapitel 4.2.1.8). *E. coli* BL21 wurde für die Expression rekombinanter GST-Fusionsproteine verwendet (siehe Kapitel 4.2.3.17) (siehe Tabelle 4.11).

Tabelle 4.11 In dieser Arbeit verwendete *E.coli*

Bakterienstamm	Genotyp	Herkunft
DH5 α	F ['] /endA1 hsdR17(<i>r_km_{k+}</i>) supE44 thi-1 recA1 gyrA (Nal _r) relA1 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) _{U169} (ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15)	Invitrogen (Hanahan, 1983)
BL21	F ⁻ <i>ompT</i> hsdS _B (<i>r_B⁻ m_B⁻</i>) <i>gal dcm</i>	Novagene, Madison, WI

4.1.11 Hefestämme

In dieser Arbeit wurden in der Tabelle 4.12 ausgeführten Hefestämme verwendet. Die Kultivierung dieser Stämme wird im Kapitel 4.2.3.2 beschreiben.

Tabelle 4.12 In dieser Arbeit verwendete Hefestämme

Hefestamm	Genotyp	Quelle*
AB8	BS64 + pRS315-HA-hMON2 + pRS316-GFP-hMON2	diese Arbeit
AB9	BS64 + pRS315-HA-hMON2	diese Arbeit
AB10	BS64 + pRS316-GFP-hMON2	diese Arbeit
BS64	MATa his4 ura3 leu2 lys2 bar1-1	Birgit Singer-Krüger
BS1924	BS64 + pRS315-ADH1-HA-hMON2-F + pRS316-Vektor	Birgit Singer-Krüger
BS1925	BS64 + pRS315-ADH1-HA-hMON2-F + pRS316-GFP-hMON2	Birgit Singer-Krüger
BS1926	BS64 + pRS315-ADH1-HA-hMON2-F + pRS316-GFP-hMON2-ΔF	Birgit Singer-Krüger
BS1934	BS64 + pRS315-HA-hMON2 + pRS316-GFP-hMON2-ΔF	Birgit Singer-Krüger
BS1935	BS64 + pRS315-HA-hMON2	Birgit Singer-Krüger
BS1936	BS64 + pRS316-GFP-hMON2-ΔF	Birgit Singer-Krüger
BS1948	Stamm mit nicht markiertem MYO2 + YSL2-CEN Plasmid	Birgit Singer-Krüger und Lois Weisman
BS1949	Stamm mit MYO2::Venus::kan + YSL2-CEN Plasmid	Birgit Singer-Krüger und Lois Weisman
BS1951	Stamm mit nicht markiertem MYO2 + HA-hMON2-CEN Plasmid	Birgit Singer-Krüger und Lois Weisman
BS1953	Stamm mit MYO2::Venus::kan + HA-hMON2-CEN Plasmid	Birgit Singer-Krüger und Lois Weisman

*Alle in der Tabelle erwähnte Plasmide wurden von Birgit Singer-Krüger oder von Lois Weisman geliefert (siehe Kapitel 4.1.12). Der Stamm mit MYO2::Venus::kan und Stamm mit nicht markiertem MYO2 wurde freundlicherweise von Lois Weisman zur Verfügung gestellt.

4.1.12 Plasmide

In dieser Arbeit verwendete Plasmide für die Proteinexpression in Hefe Zellen (siehe Tabelle 4.13).

Tabelle 4.13 Plasmide für Proteinexpression in Hefe

Plasmidname	Selektion in Hefe	Selektion in <i>E. coli</i>	Quelle
pRS315-HA-hMON2	SD-Leu	LB+Amp	Birgit Singer-Krüger
pRS316-GFP-hMON2	SD-Ura	LB+Amp	Birgit Singer-Krüger
pRS316-GFP-hMON2-ΔF	SD-Ura	LB+Amp	Birgit Singer-Krüger und ich
pRS315-ADH1-HA-hMON2-F	SD-Leu	LB+Amp	Birgit Singer-Krüger und ich
YSL2-CEN Plasmid	SD-Leu	LB+Amp	Birgit Singer-Krüger
HA-hMON2-CEN Plasmid	SD-Leu	LB+Amp	Birgit Singer-Krüger

In dieser Arbeit verwendete Plasmide für die Proteinexpression in *E. coli* (siehe Tabelle 4.14).

Tabelle 4.14 Plasmide für Proteinexpression in *E. coli* Bakterien

Plasmidname	Eigenschaften	Quelle	Selektion
pGEX-T4-3 Vektor	Codiert für GST-Epitop	GE Healthcare Europe, GmbH	LB+Amp
pGEX-T4-3-KLC2	GST-KLC2	diese Arbeit	LB+Amp
pGEX-T4-3-KHC771-963	GST-KHC771-963	diese Arbeit	LB+Amp
pGEX5-YPT7	GST-Ypt7	Birgit Singer-Krüger, (Jochum et al., 2002; Böttcher et al., 2006)	LB+Amp

In dieser Arbeit verwendete Plasmide für die transiente Transfektion (siehe Kapitel 4.2.3.11) von humanen Zellen (siehe Tabelle 4.15).

Tabelle 4.15 Plasmide für Proteinexpression in Säugierzellen

Plasmidname	Eigenschaften	Quelle	Selektion in <i>E. coli</i>
pcDNA3-HA-GGA1		Richard Kahn, (Boman et al., 2000)	LB+Amp
pcDNA3-HA-GGA3		Richard Kahn, (Boman et al., 2000)	LB+Amp
pEGFP-GGA1	Maus GGA1	Volker Hauke, Freie Universität Berlin	LB+Amp
pmRFP-N1-ARF1		Volker Hauke, Freie Universität Berlin	LB+Kan
mCherry-hMON2		diese Arbeit, mit Birgit Singer-Krüger	LB+Kan
pcDNA3-myc-hMON2		Birgit Singer-Krüger	LB+Amp
pEGFP-C1 vector		Angelika Haußer, IZI, Universität Stuttgart	LB+Kan
pEGFP-C1-hMON2		diese Arbeit, mit Birgit Singer-Krüger	LB+Kan
pEGFP-C1-hMON2-ΔC		diese Arbeit	LB+Kan
pEGFP-C1-hMON2-ΔF		diese Arbeit	LB+Kan
pEGFP-C1-hMON2-F		diese Arbeit, mit Birgit Singer-Krüger	LB+Kan

4.1.13 Zelllinien

In dieser Arbeit wurden HeLa und HEK293T (Bereitgestellt von Angelika Hauser, IZI, Universität Stuttgart) verwendet. Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte unter sterilen Bedingungen in D-MEM (mit L-Glutamin, 4,5 g/L Glucose, PAA Laboratories GmbH) oder RPMI 1640 (RPMI) Medium (mit L-Glutamin, Invitrogen, Gibco) mit je 10% (v/v) Fötalen Rinderserum (FBS, Fetal Bovine Serum, Standard Quality EU approved, PAA Laboratories GmbH). Inkubiert wurden die Zellkulturen bei feuchter Atmosphäre mit 8% (v/v) CO₂ (bei Verwendung von D-MEM) bzw. 5% (v/v) CO₂ (bei Verwendung von RPMI) bei 37°C. Das Passagieren der Zellen erfolgte 2-3 mal in der Woche. Dabei wurden die HeLa Zellen 5 min und die HEK293T Zellen 1 min mit 1x Trypsin-EDTA (mit 0,05%/0,02% in D-PBS, PAA Laboratories GmbH) im Inkubator abgelöst. Die Zellzahl wurde mittels einer Neubauerkammer bestimmt, zuvor wurde die Zellsuspension im Volumenverhältnis von 1:1 mit 0,4% Trypanblaulösung (SIGMA) angefärbt.

4.2 Methoden

4.2.1 Molekularbiologische Methoden

4.2.1.1 Bestimmung der DNA-Konzentration/Quantifizierung von Plasmid-DNA

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte photometrisch am Spektralphotometer (GenQuant Pro, Amersham) bei einer Wellenlänge von 260 nm (OD₂₆₀). Die Reinheit der DNA wurde durch das Verhältnis der Extinktionen OD₂₆₀/OD₂₈₀ überprüft. Der Optimalwert liegt zwischen 1,8-2,0.

4.2.1.2 Analytische und präparative Agarose-Gelelektrophorese

Restriktionsverdauanalysen und Aufreinigungen von DNA-Fragmenten wurden mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. 0,8-1,2% (m/v) Agarose (GenAgarose LE, Genaxxon Biosciences) wurde in 1x TAE (40 mM Tris/Base, 5,8% (v/v) Eisessig, 50 mM EDTA/NaOH, pH 8,0) durch Kochen in einer Mikrowelle gelöst. Zu der auf mind. 60°C

abgekühlten Lösung wurde 1 µg/ml (m/v) Ethidiumbromid zugegeben und das Gel in eine dafür bestimmte Apparatur (Mini-sub cell von Bio-Rad) gegossen. Die Elektrophorese wurde das Gel einer konstanten Spannung von 130V durchgeführt. Vor dem Beladen des Gels wurden die zu analysierenden Proben mit 6x Probenpuffer (0,25% (m/v) Bromphenolblau, 0,25% (m/v) Xylen Cyanol FF, 30% (m/v) Glycerin) versetzt. Als Größenstandard diente die 1 kb-Ladder von den Firmen Invitrogen oder Roth. Die mit Ethidiumbromid angefärbten DNA-Banden wurden unter UV-Licht mit der Anregungswellenlänge von 260 nm visualisiert und fotografiert. Zur Aufreinigung präparativer DNA-Fragmente wurde das QIAquick® Gel Extraktions Kit von Qiagen verwendet.

4.2.1.3 Erzeugung von DNA-Konstrukten

Die Herstellung und Charakterisierung rekombinanter Plasmide wurden nach molekularbiologischen Standardmethoden (Sambrook, 1989) durchgeführt.

Zur Erzeugung von pEGFP-C1-hMON2 wurde myc-pcDNA3-hMON2 als Template verwendet. Die Umklonierung von hMON2 aus dem pcDNA3 Vektor in den pEGFP-C1 Vektor wurde von Dr. Birgit Singer-Krüger mit meiner Assistenz durchgeführt. Dabei wurde das Gen mit EcoRI/KpnI in die MCS (engl., *multiple cloning site*) des Vektors subkloniert. Genauso wurde bei der Klonierung von pmCherry-C1-hMON2 verfahren.

Für die Erzeugung des Plasmids pEGFP-C1-hMON2-ΔC (C: Aminosäuren 1201-1717, Basenpaare 3603-5154) wurde pEGFP-C1-hMON2 als Template verwendet. Das C-Fragment von hMON2 wurde mit Hilfe des Restriktionsenzym ApaI herausgeschnitten, wobei die Schnittstellen nach der Aminosäure 1200 von hMON2 und in der MCS des Vektors nach dem Gen vorkamen. Das Deletionsfragment wurde mit Hilfe der Gelelektrophorese isoliert, aufgereinigt und religiert (siehe Kapitel 4.2.1.6).

Zur Konstruktion von pEGFP-C1-hMON2-ΔF (F: Aminosäuren 1596-1717, Basenpaare 4786-5154) wurde pEGFP-C1-hMON2-ΔC mit ApaI linearisiert (siehe oben). Für das Insert wurde myc-pcDNA3-hMON2 als Template für eine PCR zur Amplifikation von Basenpaaren 3603-4785 (Aminosäuren 1202-1595) verwendet. Dafür wurden die Primer 5hMon2Pro1188

und 3hM2Val1595,Stop (siehe Kapitel 4.1.7) verwendet. Mit Hilfe von letzterem Primer wurde nach der Aminosäure 1595 (Basenpaar 4785) ein Stop Codon gefolgt von einer Sall und einer ApaI Schnittstelle in das Insertfragment eingeführt. Dieses PCR-Fragment wurde mit dem Restriktionsenzym ApaI geschnitten und mit dem linearisierten pEGFP-C1-hMON2-ΔC religiert (siehe Kapitel 4.2.1.6). Der Verdau mit EcoRI (Schnittstelle liegt in der MCS vor dem eingeführten hMON2 Gen im Plasmid) und Sall diente zur Untersuchung der richtigen Position eines Inserts.

Die Klonierung von pEGFP-C1-hMON2-F, dass das hMon2-F-Fragment mit den Aminosäuren 1596-1717 codiert erfolgte durch Amplifizierung (von Birgit Singer-Krüger) aus cDNA KIAA1040 mit den Plasmiden Eco,hMon21596 und XhoSalstop,KIAAt. Das gereinigte Fragment und der pEGFP-C1-Vektor wurden mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI/Sall verdaut, mittels Gelelektrophorese gereinigt und anschließend ligiert.

Für die Herstellung des pGEX-T4-3-KHC771-963 Plasmids zur Expression des Fusionsproteins GST-KHC771-963 wurden die Basenpaare 2311-2892 des C-Terminus des Kinesin-1/KIF5B mittels PCR aus humaner cDNA (Geschenk von Monilola Olayioye, IZI, Universität Stuttgart) amplifiziert (siehe Tabelle 4.16). Dabei wurden die Primer 5KIF5BecoRI771M und 3KIF5Bst964Sall verwendet (siehe Kapitel 4.1.7). Der pGEX-T4-3 Vektor und das PCR-Fragment wurden mit EcoRI/Sall verdaut, mittels Gelelektrophorese isoliert, gereinigt und anschließend ligiert (siehe Kapitel 4.2.1.6). Die Kontrollsequenzierung erfolgte mit den Primern pGex_{vor} und pGex_{rev} (siehe Kapitel 4.2.1.7).

Tabelle 4.16 Schema für die Polymerasekettenreaktion für Amplifikation von KHC771-963 DNA

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Vorheizen	95°C		
Denaturierung	95°C	5 Minuten	1x
Zugabe von Taq-Polymerase			
Denaturierung	95°C	75 Sekunden	35x
Anlagerung	54°C	75 Sekunden	
Polymerisation	72°C	90 Sekunden	
Polymerisation	72°C	7 Minuten	1x

Zur Konstruktion des Plasmids pGEX-T4-3-KLC2 für die rekombinante Expression des GST-KLC2 Fusionsproteins wurde das KLC2 Gen aus der humanen cDNA durch PCR (siehe

Tabelle 4.17) amplifiziert. Das 1,876 kbp PCR-Fragment wurde in den pGEX-T4-3 Vektor subkloniert. Vor der Ligation wurden die DNAs mit EcoRI/SalI verdaut, mittels Gelelektrophorese isoliert und gereinigt. Die Kontrollsequenzierung erfolgte mit den Primern pGEX_{vor}, klc2mv774 und pGEX_{rev} (siehe Kapitel 4.1.8, Tabelle 4.10).

Tabelle 4.17 Schema für die Polymerasekettenreaktion für Amplifikation von KLC2 DNA

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Vorheizen	98°C		
Zugabe von Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase			
Denaturierung	98°C	30 Sekunden	1x
Denaturierung	98°C	20 Sekunden	
Anlagerung	57°C (T _m +3°C)	30 Sekunden	35x
Polymerisation	72°C	80 Sekunden	
Polymerisation	72°C	10 Minuten	1x

4.2.1.4 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde wie in Tabelle 4.16 und Tabelle 4.17 beschrieben in PCR-Maschinen von Biometra durchgeführt. Verwendet wurden die Taq DNA Polymerase (Roche) und Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes) nach angepasstem Protokoll vom Hersteller. DNA-Fragmente, die für die anschließende Ligation (siehe Kapitel 4.2.1.6) amplifiziert wurden, wurden nach der PCR nach Protokoll von QIAquick® PCR Purification Kit von Qiagen aufgereinigt.

4.2.1.5 Vermehrung und Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

Für die Vermehrung von Plasmid-DNA wurde eine transformierte *E.coli* DH5α Kolonie (siehe Kapitel 4.2.1.8) in 5 ml LB-Selektionsmedium resuspendiert und bei 37°C und 220 Upm 18 h lang inkubiert. Die Minipräparation erfolgte nach dem Protokoll von QIAprep Spin Miniprep Kit von Qiagen. Anschließend wurde die Qualität der DNA durch einen spezifischen Restriktionsverdau überprüft. Dafür wurden 0,5-0,7 µg Plasmid-DNA mit 3 U

einer geeigneten Endonuklease und empfohlenem Puffer (Fermentas) in einem Reaktionsvolumen von 15 µl für 3 h bei 37°C (oder beim Temperaturoptimum der Endonuklease) inkubiert.

4.2.1.6 Restriktionsverdau von DNA-Fragmenten für anschließende Ligation

Zur Erzeugung in dieser Arbeit verwendeten Plasmide (siehe Kapitel 4.2.1.3) wurden für eine Ligation die DNA-Fragmente (das gereinigte PCR Produkt (siehe Kapitel 4.2.1.4) und die Vektor-DNA (1,5-2 µg)) bei einem Verdau mit zwei geeigneten Restriktionsenzymen mit je 25 U und bei Verdau mit einem Restriktionsenzym mit 40 U in einem Endvolumen von 70-100 µl 4 h bei 37°C oder dem Temperaturoptimum (beim Verdau mit ApaI wurde bei 30°C inkubiert) in den von Herstellern empfohlenen Puffern geschnitten. Mittels Gelelektrophorese und Gelextraktion wurden die DNA-Fragmente gereinigt (siehe Kapitel 4.2.1.2). Anschließend wurden jeweils 3 µl der gereinigten DNA-Fragmente mittels Gelelektrophorese überprüft. Für eine Ligation wurden Vektor zu Insert in einem geschätzten molaren Mengenverhältnis von 1:3,5 eingesetzt. Für die Berechnung wurden die Bandenintensitäten der mit Ethidiumbromid gefärbten DNA-Fragmente im Gel und die Fragmentgrößen berücksichtigt. Dabei wurden ca. 0,2 µg Vektor mit 4,5 U T4 DNA Ligase und 1x Ligase Puffer des pGemTeasy Kits von Promega (MADISON, WI U.S.A.) in einem Endvolumen von 15 µl verwendet. Der Ligationsansatz wurde 16-18 h bei 18°C inkubiert. Die Hälfte des Ansatzes wurde für die Transformation von *E. coli* verwendet (siehe Kapitel 4.2.1.8).

4.2.1.7 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierungen wurden durch die Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) durchgeführt. Dafür wurden 15 µl einer DNA Minipräparation mit einer DNA-Konzentration von 7,5 µg/ml (in sterilem H₂O) gesendet. Die verwendeten Primer sind im Kapitel 4.1.8 aufgelistet.

4.2.1.8 Transformation von DNA in *E. coli* durch Hitzeschock

Mittels Transformation wurde Plasmid-DNA in einen geeigneten *E. coli* Stamm (DH5 α oder BL21, siehe Kapitel 4.1.10) eingeführt. Dazu wurden 70-100 μ l Aliquots der Bakterien bis zur Verwendung bei -80°C aufbewahrt. Die thermokompetenten Bakterien wurden 20 min auf Eis aufgetaut und mit 0,5-1 μ l (0,1-0,4 μ g) aufgereinigter Plasmid-DNA oder mit der Hälfte eines Ligationsansatzes (siehe Kapitel 4.2.1.6) versetzt. Nach 1 h ruhen auf Eis wurden die Zellen 45 sec lang bei 42°C auf einem Heizblock inkubiert, anschließend auf Eis gestellt und in 1 ml SOC Medium (siehe Kapitel 4.1.3) aufgenommen. Die Zellen wurden dann in ein steriles Reagenzglas transferiert und bei 37°C und 220 Upm für 1 h in einen Schüttelinkubator gestellt. Bei einer Transformation mit Plasmid-DNA wurden 25 μ l - 200 μ l der Suspension auf LB-Agarplatten (siehe Kapitel 4.1.3) mit zur Selektion auf das transformierte Plasmid geeigneten Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Bei einer Transformation mit DNA eines Ligationsansatzes wurden drei mal 330 μ l der Zellsuspension auf drei geeignete LB-Selektionsplatten ausplattiert.

4.2.1.9 Transformation von Hefe mit Plasmid-DNA durch Hitzeschock

Mittels Transformation wird Plasmid-DNA in Hefezellen eingeschleust. Die Zellen wurden während der Prozedur nicht gerüttelt und es wurde steril gearbeitet. 100 ml YPD-Medium (siehe Kapitel 4.1.3) wurden mit 50 μ l Hefezellen (BS64) einer frischen 48 h bei 30°C inkubierten Vorkultur angeimpft und über Nacht bei 26°C bis zur einer Zelldichte von $1-2 \times 10^7$ Zellen/ml inkubiert. 50 ml der Kultur wurden in einem 50 ml Falcon bei 4000 Upm (Eppendorf Zentrifuge 5804R) 5 min lang zentrifugiert. Die Zellen wurden zwei mal mit ca. 25 ml TE Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA/NaOH, pH 8,0) gewaschen, anschließend in 5 ml 0,1 M LiOAc Lösung aufgenommen und 1 h lang bei RT inkubiert. Die Zellen wurden zentrifugiert und erneut in 5 ml 0,1 M LiOAc Lösung aufgenommen. In einem 1,5 ml Eppendorfgefäß wurden 150 μ l dieser Suspension mit 3 μ l Heringsperma DNA, 2 μ l Plasmid-DNA (Minipräparation) und 350 μ l 50% (m/v) steril filtriertem Polyethylenglykol 3350 ultra pure vermischt und 1 h lang bei RT inkubiert. Nach der Zugabe von 50 μ l DMSO wurden die Zellen 5 min lang bei 42°C inkubiert und anschließend auf Eis

gestellt. 250 µl der Zellsuspension wurden auf eine Selektionsplatte ausgestrichen und bei 25°C 3 bis 5 Tage lang bis zur einer Koloniengröße von 1-2 mm inkubiert.

4.2.2 Proteinanalytik

4.2.2.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Analyse von Proteingemischen wurden diese durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt (Laemmli, 1970). Im Rahmen dieser Arbeit wurde dafür das Mini-Protean-III-System der Firma Bio-Rad verwendet. Die dabei eingesetzten Trenngele bestanden aus 7,5-12,5% und das Sammelgel aus 4% (m/v) Acrylamid (siehe Tabelle unten). Die Gelelektrophorese wurde in Geltankpuffer (190 mM Glycin, 0,1% (m/v) SDS, 25 mM Tris) bei einer konstanten Stromstärke von 23 mV pro Gel gestartet. Haben die Proben das Trenngel erreicht wurde auf 36 mA pro Gel erhöht. Vor dem Auftragen der Proben auf das Gel, wurden diese in 1x SDS-Probenpuffer (Endkonzentration, 4x SDS-Probenpuffer: 80 mM Tris/HCl pH 6,8, 10 mM EDTA/NaOH pH 8, 8% (m/v) SDS, 20% (v/v) Glycerin, 0,04% (m/v) Bromphenolblau, 10% (v/v) β-Mercaptoethanol (wurde kurz vor Gebrauch zugegeben)) durch 5 minütiges Erhitzen bei 95°C denaturiert, anschließend 5 min bei 13000 Upm (16000xg, Biofuge pico, Heraeus) und RT zentrifugiert und der Überstand in ein frisches Eppendorfgefäß überführt. Die Proben wurden bis zur Analyse bei -24°C gelagert. Generell wurden für die Elektrophorese 10-20 µl von Zellextrakten oder Gesamtzelllysaten (Input) verwendet. Von Eluaten eines Bindungsexperiments wurden 10-20 µl für den Nachweis der Isolierung (IP-Proben) und 30-40 µl für den Nachweis der Mitisolierung von Proteinen (Ko-IP Proben) verwendet. Als Proteingrößenstandard wurde der Prestained SDS-PAGE Standard High und Low Range von Bio-Rad, sowie der PageRuler SM#1811 von Fermentas verwendet.

Tabelle 4.18 Mengenangaben für die Herstellung eines Trenngels

Acrylamidkonzentration im Gel	7,5%	10%	12,5%
4x Trenngellösung (1,5 M Tris/pH 8,8, 0,4% (m/v) SDS) [ml]	2	2	2
30% (m/v) Acrylamid/0,8% (m/v) Bisacrylamidlösung [ml]	2	2,7	3,3
steriles dd. H ₂ O [ml]	4	3,3	2,7
10% (m/v) Ammoniumpersulfatlösung [μ l]	32	32	32
TEMED [μ l]	3,2	3,2	3,2
Endvolumen [ml]	8	8	8

Tabelle 4.19 Mengenangaben für die Herstellung eines Sammelgels

Acrylamidkonzentration im Gel	4%
4x Sammelgellösung (0,5 M Tris/pH 6,8, 0,4% (m/v) SDS) [ml]	1
30% (m/v) Acrylamid/0,8% (m/v) Bisacrylamidlösung [ml]	0,4
steriles dd. H ₂ O [ml]	2,6
10% (m/v) Ammoniumpersulfatlösung [μ l]	14
TEMED [μ l]	5
Endvolumen [ml]	4

4.2.2.2 Western Blot

Beim Western Blot (auch Immunblot genannt) werden Proteine mit Hilfe von Antikörpern spezifisch nachgewiesen. Dafür werden die Proteine durch SDS-PAGE (siehe Kapitel 4.2.2.1) nach Größe aufgetrennt und anschließend im Nass-Blot Verfahren auf eine Nitrozellulosemembran (BioTrace NT, Pall life sciences) überführt. Der Nachweis erfolgt dann durch spezifische Bindung von Antikörper an Antigen und die Detektion durch eine enzymatische Reaktion.

Der Proteintransfer erfolgte im Mini Trans-Blot[®] Cell System von Bio-Rad im Transferpuffer (25 mM Tris, 200 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol) und wurde mit einem Eisakku gekühlt. Vor dem Zusammenlegen des Blots wurden alle Bestandteile im Transferpuffer äquilibriert. Das Sandwich wurde in folgender Reihenfolge blasenfrei aus einem Whatmanpapier (Chromatographiebögen, 3MM CH, VWR) einem Schwämmchen, drei Whatmanpapieren, dem Gel, der Nitrozellulosemembran, drei Whatmanpapieren, einem Schwämmchen und einem Whatmanpapier zusammengelegt. Die Dauer des Transfers und die Acrylamidkonzentration des Gels war abhängig von der Proteingröße. Größere, auf 7,5%igen Gelen aufgetrennte Proteine (über 120 kDa) wurden 4 h und auf 10%igen Gelen 2 h

(ca. 70-120 kDa) bei einer konstanten Stromstärke von 200 mA in einer mit Eis gefüllten Styroporbox von außen gekühlt transferiert. Kleine Proteine der 12%iger Gele (unter 70 kDa) werden bei einer konstanten Spannung von 100 V 1 h übertragen. Zur Überprüfung des Transfers wurden anschließend die auf die Nitrozellulosemembranen übertragenen Proteine 5 min in einer Ponceau S Lösung (0,2% (m/v) Ponceau S, 5% (v/v) Eisessig) reversibel gefärbt. Entfärbung erfolgte durch Waschen mit dd. H₂O, bis der gewünschte Kontrast erreicht war.

Für die folgende Immunreaktion bei RT und Schütteln wurde die Nitrozellulosemembran in einer Milchlösung (2,5% (m/v) Magermilchpulver, 0,2% (v/v) Tween 20, 1x PBS, wenn nicht anders angegeben) 1 h geblockt. Die Milchlösung wurde nach 30 min erneuert. Danach wurde 1 h lang mit einem für das zu detektierende Protein spezifischen Primärantikörper inkubiert. Dann wurde die Membran vier mal 5 min lang mit Milchlösung gewaschen und danach 1 h lang mit einem geeigneten Sekundärantikörper inkubiert. Die Antikörper wurden in der Milchlösung wie in der Tabelle 4.3 und Tabelle 4.6 beschrieben verdünnt. Nach zweimaligem Waschen mit der Milchlösung und zweimaligem Waschen mit 0,1 M Tris/base, jeweils 5 min, wurde die Membran in der Farbreaktionslösung [Farbreaktionspuffer (50 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl, pH 9,5) mit 1x der 100x Stocklösung von NBT (3% (m/v) in 70% (v/v) DMF) und 1x der 100x Stocklösung von B-CIP (1,5% (m/v) in 50% (v/v) DMF), beide Substrate von Bio-Rad oder Calbiochem] entwickelt. Die Farbreaktion wurde durch Waschen der Membran mit dd. H₂O gestoppt. Für eine quantitative Analyse wurde die Immundetektion mit fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper (siehe Tabelle 4.6) mit Hilfe von Odyssey® Infrared Imaging Systems (LI-COR® Biosciences, Bad Homburg) und der Application Software Version 2.1 durchgeführt.

4.2.2.3 Anfärbung der Proteine mit Silber

Zur unspezifischen Färbung der Proteine mit reduziertem Silber wurden die Gele nach der SDS-PAGE (siehe Kapitel 4.2.2.1) über Nacht in Fixierlösung (50% (v/v) Methanol, 12% (m/v) TCA) geschwenkt. Um das Hintergrundsignal zu reduzieren wurden die Gele in der Fixierlösung mit 2% (m/v) CuCl₂ für 15 min und zwei mal je 10 min mit Waschlösung (10% (v/v) Ethanol, 5% (v/v) Eisessig) inkubiert. Dann wurden sie 15 min lang in 0,004% (m/v) KMnO₄-Lösung inkubiert und wieder zweimal je 10 min mit der Waschlösung und einmal 10 min mit sterilem dd. H₂O gewaschen. Die Gele wurden in frisch angesetzter

0,1% AgNO₃-Lösung 10 min inkubiert und zwei mal je 1 min mit reichlich (ca. 100 ml) sterilem dd. H₂O gewaschen. Nun wurden die Gele mit Entwicklungslösung (0,0075% (m/v) Formaldehyd, 2% (m/v) K₂CO₃) überschichtet. Die Reaktion wurde nach wenigen Minuten durch Waschen mit dd. H₂O gestoppt.

4.2.2.4 Anfärbung der Proteine mit Coomassie Brilliant Blau R-250

Eine weitere, jedoch weniger empfindliche Methode zur unspezifischen Proteinfärbung als die Anfärbung mit Silber (siehe Kapitel 4.2.2.3), ist die Färbung mit dem blauen Farbstoff Coomassie Brilliant Blau. Dafür wurden die Gele nach der SDS-PAGE in ca. 50 ml Coomassie Brilliant Blau Färbelösung (0,25% (m/v) Coomassie Brilliant Blau R-250 (Serva), 7,5% (v/v) Eisessig, 50% (v/v) Methanol) für 1 h lang auf dem Wipptisch inkubiert. Zur Entfärbung wurden die Gele mehrfach mit Entfärbelösung (1% (v/v) Eisessig, 45% (v/v) Methanol) gewaschen. Nach dem Scannen der Gele wurden sie auf einem Trockner (Fröbel Labor Geräte) bei ca. 65°C unter Vakuum 90 min getrocknet.

4.2.2.5 Anfärbung der Proteine mit kolloidalem Coomassie Brilliant Blau G-250

Ein alternatives Protokoll zur Anfärbung von Proteinen ist das mit kolloidalem Coomassie Brilliant Blau G-250 (vergleiche Kapitel 4.2.2.4). Diese Methode ermöglicht Proteine in geringerer Konzentration im Gel sichtbar zu machen. Die Proteine im Gel werden 16 h lang in die Fixierlösung (50% (v/v) Methanol, 2% (v/v) Phosphorsäure (85%)) eingelegt. Nach 3 mal 30 min lang Waschen mit dd. H₂O wird das Gel für 1 h in der Präinkubationslösung (34% (v/v) Methanol, 2% (v/v) Phosphorsäure (85%), 17% (m/v) Ammoniumsulfat) inkubiert, anschließend 3-5 Tage in der Färbelösung (34% (v/v) Methanol, 2% (v/v) Phosphorsäure (85%), 17% (m/v) Ammoniumsulfat, 0,066% (m/v) Coomassie G-250) eingelegt. Die Färbelösung wird folgendermaßen vorbereitet: Das Methanol wird mit der Phosphorsäure gemischt, dann wird das Coomassie G-250 Pulver dazugegeben. Das Gemisch wird erst mal auf 2/3 des Endvolumens mit dd. H₂O aufgefüllt. Dann wird das Ammoniumsulfat dazugegeben und bis zur Auflösung gerührt. Die Färbelösung wird mit dd. H₂O auf das Endvolumen aufgefüllt. Während der Prozedur ist das Gel stets mit der

Flüssigkeit bedeckt und auf einem Schüttler oder einer Wippe inkubiert. Ein Entfärben ist durch die Inkubation in dd. H₂O möglich.

4.2.2.6 Sensitive Anfärbung der Proteine mit Coomassie Brilliant Blau G-250

Für folgende massenspektrometrische Analysen wurden die Proteine nach folgendem Protokoll (abgewandelt von (Kang et al., 2002) unspezifisch gefärbt. Dabei war die Reihenfolge beim Ansetzen der Färbelösung (5% (m/v) Al₂(SO₄)₃x(H₂O)_x, x=14-18, 0,02% (m/v) Coomassie Brilliant Blau G-250, 10% (v/v) Ethanol, 2% (m/v) Phosphorsäure) zu beachten. Zuerst wurde das Aluminiumsulfat zum sterilen dd. H₂O (zunächst in 50% des Gesamtvolumens der Lösung) vorgelegt. Nach 5 minütigem Rühren wurde das Ethanol und dann das Coomassie Brilliant Blau G-250 zugegeben. Nachdem das Aluminiumsulfat zum größten Teil gelöst war (30 min), wurde die Phosphorsäure zugegeben und die Lösung mit H₂O auf das Endvolumen aufgefüllt. In der Färbelösung gebliebene Partikel wurden vor dem Gebrauch durch Schütteln resuspendiert. Die Färbelösung ist maximal einen Monat bei 4°C stabil.

Die Gele wurden nach der SDS-PAGE (in einer keratinfreien Box) drei mal 10 min lang mit sterilem dd. H₂O gewaschen und die Proteine in einer Fixierlösung (30% (v/v) Ethanol, 2% (m/v) Phosphorsäure) 30 min lang fixiert. Anschließend wurden die Gele 3 h lang oder über Nacht in der Färbelösung inkubiert. Um den Kontrast zwischen den Proteinbanden und dem Hintergrund zu erhöhen, wurden die Gele 1 h lang mit Wasser oder Entfärbelösung (10% (v/v) Ethanol, 2% (m/v) Phosphorsäure) behandelt. Anschließend wurde zwei mal mit H₂O gewaschen. Für den Transport (siehe Kapitel 4.2.2.7) wurden die Gele in einem Vernichtungsbeutel (Sarstedt) mit etwas sterilem dd. H₂O eingeschweißt (Krupps).

4.2.2.7 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie wurde am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ), Heidelberg, in der Zentralen Proteinanalytik im Labor von Dr. Martina Schnölzer in Zusammenarbeit mit Dr. Tore Kempf durchgeführt. Dort wurden die interessanten, mit Coomassie (siehe Kapitel 4.2.2.6) angefärbten Proteinbanden ausgeschnitten und in 0,5 ml

Reaktionsgefäßen bei -24°C bis zur Probenaufbereitung und Messung aufbewahrt.

4.2.2.8 Quantitative Proteinbestimmung nach Bradford

In 1,5 ml Eppendorfgefäße wurden 800-x µl H₂O vorgelegt. Dazu wurden x=0, 2,5, 5, 10, 20 und 40 µl IgG-Stammlösung (1 mg/ml, Rinder oder Kaninchen) als Proteinstandard zur Ermittlung der Eichgeraden und 1, 5 und/oder 10 µl der zu bestimmenden Proteinlösung zupipettiert. Die Proben wurden mit 200 µl Bradfordlösung (1,16% (m/v) Coomassie Brilliant Blau G-250, 66,6% (v/v) Phosphorsäure (88%), 33,3% (v/v) Ethanol (95%)) versetzt und gut gemischt. Nach 10 min Inkubation bei RT wurde die Extinktion jeder Probe bei 595 nm gemessen. Die Konzentration der Proben wurde anhand der Eichgerade bestimmt.

4.2.3 Biochemische Methoden

4.2.3.1 Präparation von Proteinextrakten für Proteinexpressionskontrolle

Zur Proteinexpressionskontrolle von Hefestämmen wurden Zellextrakte angefertigt. Dafür wurde eine Kolonie in 5 ml eines geeigneten Medium über Nacht (ca. 16 h) kultiviert. Es wurden 0,85 OD₆₀₀ Zelleinheiten geerntet, mit 0,5 ml TE-Puffer (50 mM Tris/HCl pH 7,5, 5 mM EDTA/NaOH, pH 8,0) gewaschen und in 100 µl dieses Puffers, welches mit dem Proteaseinhibitoren 1x CLAP (1000x CLAP enthält jeweils 5 mg/ml Chymostatin, Leupeptin, Antipain, Pepstatin in DMSO) versetzt wurde, resuspendiert. Für den mechanischen Aufschluß wurden Glaskügelchen (Größe 0,40-0,60 mm, Sartorius) von ca. 100 µl Volumen zugegeben und die Zellen fünf mal 1 min gerüttelt. Zwischendurch wurde jeweils 1 min auf Eis gekühlt. Die Proben wurden schließlich mit 100 µl 2x SDS-Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95°C inkubiert und 5 min zentrifugiert (16000xg). Die Überstände wurden zur Analyse mittels Western Blot (siehe Kapitel 4.2.2.1 und 4.2.2.2) eingesetzt.

Humane Zellen auf 2 cm² Petrischalenoberfläche wurden in 100 µl Lysepuffer (20 mM HEPES/KOH, pH 7,4, 1 mM EDTA/NaOH, pH 8,0, 0,1 M KCl, 1% (m/v) Triton X-100 mit PIC (50xPIC enthält 0,005% (m/v) Leupeptin, 0,025% (m/v) Pepstatin, 5 mM Pefabloc, 2,5 mM Phenantrolin) und 1 mM PMSF) lysiert. Dafür wurden die Zellen zuerst mit

eiskaltem PBS gewaschen und mit Lysepuffer 20 min lang auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden mit Hilfe eines Schabers (Sarstedt) in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und 20 min lang bei 4°C und 15700xg zentrifugiert. Anschließend wurden die Überstände mit 1x SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95°C gekocht. Nach folgendem fünfminütigem Zentrifugieren bei 16000xg bei RT wurden die Überstände in frische Reaktionsgefäße überführt und bei -24°C bis zur Analyse mittels Western Blot aufbewahrt.

4.2.3.2 Kultivierung von Hefe

Hefe wurde aus einem -80°C Glycerinstock auf eine entsprechende Platte ausgestrichen und bei 30°C inkubiert bis die Kolonie eine Größe von 1-2 mm erreichte. Für eine Vorkultur wurden 5 ml Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft und 2 Tage bei 30°C oder 3 Tage bei Zimmertemperatur (ca. 22°C) und 150 Upm inkubiert. Zur gewohnten Zeit (17.30 Uhr) wurden die Hauptkulturen in einem Erlenmeyerkolben (im Verhältnis Kolbenvolumen zu Kulturvolumen, 1 zu 5) gestartet. Dafür wurden für Transformanten des BS64 Stammes 300 µl Vorkultur in je 100 ml Medium angeimpft und bei 30°C und 150 Upm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6-0,8 Zelleinheiten/ml über Nacht angezogen. Die Stämme (siehe Kapitel 4.1.11) AB8, BS1924, BS1925, BS1926, BS1934 wurden in SD-Ura-Leu, BS1936, AB10 in SD-Ura, BS1935, AB8, BS1948, BS1949, BS1951 und BS1953 in SD-Leu Medium (siehe Kapitel 4.1.3) kultiviert.

4.2.3.3 Erzeugung von Zellaliquots mit 50 OD₆₀₀ Einheiten

Für Bindungsexperimente wurden frisch geerntete oder bei -80°C eingefrorene Zellen verwendet. Dafür wurden Aliquots von 50 OD₆₀₀ Zelleinheiten in 300 µl geeignetem Puffer vorbereitet. Die Zellen wurden wie in Kapitel 4.1.3 und 4.2.3.2 beschrieben kultiviert. Zellkulturen bei einer OD₆₀₀ von 0,6-0,8 Einheiten/ml wurden durch fünfminütige Zentrifugation bei 4000 Upm (2820xg, SORVALL RC 6+ Zentrifuge, F10S Rotor) bei 4°C geerntet. Die Zellen wurden zwei mal mit 200 ml eiskaltem H₂O und einmal mit 40 ml eines später während der Bindungsexperimenten verwendeten Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in gleichem Puffer mit einer Endkonzentration von

ca. 167 OD₆₀₀ Einheiten/ml resuspendiert. Davon wurden 300 ml Zellaliquots (mit ca. 50 OD₆₀₀ Einheiten) mit Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

4.2.3.4 Koimmunpräzitationsexperimente mit Hefezellen

Mittels einer Immunpräzitation wird ein Antigen isoliert. Dieses bindet an seinen spezifischen Antikörper, welcher an einer sedimentierbaren Matrix gekoppelt ist. Dabei erfolgt eine Mitisolierung von Proteinen, die mit dem Antigen wechselwirken (Koimmunpräzitation).

Bei -80°C gefrorene Aliquots mit 50 OD₆₀₀ Einheiten Hefezellen (siehe Kapitel 4.2.3.3) wurden bei 25°C aufgetaut, mit 1x CLAP, 1 mM PMSF/DMSO und 0,48 g Glaskügelchen versetzt. Die Zellen wurden durch zehnfaches 45 sec lang rütteln und 1 min kühlen auf Eis aufgeschlossen. Das Lysat wurde in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß transferiert und die Glaskügelchen mit 800 µl IP Puffer B (115 mM KCl, 5 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM EDTA/NaOH, pH 8,0, 20 mM HEPES/KOH, pH 7,8) durch 45 sec lang rütteln mit anschließenden 1 min lang kühlen gewaschen. Die vereinigten Lysate (ca. 1 ml) wurden, wenn nicht anders angegeben, mit 0,5% (m/v) NP-40 (IGEPAL CA-630, SIGMA) und 1 mM DTT 20 min auf Eis solubilisiert. Anschließend wurde 20 min bei 4°C, 13000 Upm (16200xg, himac CT 15RE Kühlzentrifuge) zentrifugiert. Der Überstand wurde abhängig vom Versuch mit entweder 2 µl eines Kaninchen-anti-GFP oder 3,5 µl Maus-anti-HA Antikörper (siehe Kapitel 4.1.4, Tabelle 4.5) versetzt und 1 h bei 8°C auf einem Überkoprotierer inkubiert. Danach wurden 60 µl einer im IP Puffer B äquilibrierten (vergleiche Kapitel 4.2.3.7) 1:3 Suspension der Protein A Sepharose CL-4B Kügelchen (GE Healthcare) zugegeben, und wieder 1 h bei 8 °C und Rotation im Kühlraum inkubiert. Die Proben wurden anschließend bei 2000 Upm (400xg, Eppendorf Zentrifuge 5415D) 2 min zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Die Sepharose Kügelchen wurden vier mal mit 1 ml eiskaltem IP Puffer A (IP Puffer B, 0,5% NP-40, 1 mM DTT) gewaschen, dann in 80-90 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen. Nach 5 minütiger Elution bei 95°C wurden die Proben 5 min bei 16000xg zentrifugiert und der Überstand in frische Eppendorfreaktionsgefäße überführt. Die Proben wurden bis zur Analyse bei -24°C aufbewahrt. Für SDS-PAGE wurden 10-40 µl der Eluate und 10-20 µl der Gesamtzelllysate (als Input) verwendet.

4.2.3.5 Koimmunpräzipitation von hMon2 mit HA-GGA1 und HA-GGA3 aus HEK293T Zellen

0,5-1 x 10⁶ HEK293T Zellen wurden auf 6 cm Platten (21 cm² Wachstumsfläche, Greiner Bio-One oder Sarstedt) ausgesät. Am folgenden Tag wurden die etwa 50 % - 70 % konfluente Zellen mit 8 µg Plasmid-DNA pcDNA3-HA-GGA1 oder pcDNA3-HA-GGA3 und 20 µl Lipofectamin2000 (Invitrogen) transfiziert (siehe Kapitel 4.2.3.11). Dabei wurden die Transfektionskomplexe in insgesamt 1 ml DMEM vorbereitet. Die Zellen wurden mit DMEM/10%FBS gewaschen und in 4 ml des gleichen Mediums transfiziert. Nach 4 h wurden die Zellen gewaschen und 4,5 ml frisches Medium zugegeben. Nach 18-20 h Proteinexpression wurde das Medium abgesaugt und die Zellen in 1 ml Lysepuffer (20 mM HEPES/KOH, pH 7,4, 1 mM EDTA/NaOH, pH 8,0, 115 mM KCl, 5 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0,8% (m/v) NP-40) mit Proteaseinhibitoren 1xPIC (50xPIC enthält 0,005% (m/v) Leupeptin, 0,025% (m/v) Pepstatin, 5 mM Pefabloc, 2,5 mM Phenantrolin) und 1 mM PMSF überschichtet. Die Zellen wurden mit Hilfe eines Schabers (Sarstedt) in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt, 20 min auf Eis inkubiert und anschließend 20 min lang bei ca. 8°C und 16000xg (13000 Upm, Biofuge pico Heraeus) im Kühlraum zentrifugiert. Die Immunpräzipitation wurde mit gleichem Prinzip wie in Kapitel 4.2.3.4 beschrieben durchgeführt. Dabei wurden die Lysate 2 h bei 8°C mit 3 µl Ratte-anti-HA (siehe Kapitel 4.1.4) inkubiert. Dann wurden die Immunkomplexe mit 60 µl 1:3 Protein A Sepharose CL-4A Suspension 1 h lang weiter inkubiert. Anschließend wurde die Sepharose viermal mit Lysepuffer gewaschen und die gebundenen Proteine in ca. 90 µl SDS-Probenpuffer eluiert und mittels Western Blot analysiert (siehe Kapitel 4.2.2.1 und 4.2.2.2).

4.2.3.6 Koimmunpräzipitation von endogenen Proteinen mit eGFP-hMon2 aus HEK293T Zellen

In HEK293T Zellen wurde eGFP-hMon2 exprimiert (siehe unten). Durch eine Immunpräzipitation gegen den eGFP-Tag von hMon2 wurden Proteine, die an hMon2 binden, koisoliert. Diese wurden anschließend mittels Western Blot untersucht.

Es wurden jeweils 2,5-3 x 10⁶ Zellen auf 60 cm² Schalen am Tag vor der Transfektion ausgesät. 75% konfluente HEK293T Zellen wurden mit 24 µg oder 48 µg Plasmid-DNA und

30 µl Lipofectamin2000 transfiziert (siehe Kapitel 4.2.3.11). Die DNA-Lipofectamin-Komplexe wurden in insgesamt 500 ml Opti-MEM I Medium vorbereitet. Vor der Zugabe der Komplexe wurden zu den Zellen 3 bis 4 ml RPMI/10%FBS vorgelegt. Nach 3,5 h wurden die Zellen gewaschen und in 10 ml frischem Medium inkubiert. Nach ca. 18 h wurden die Zellen mit PBS oder MLB Puffer (150 mM NaCl, 25 mM HEPES/KOH, pH 7,5, 1 mM EDTA/NaOH, pH 8,0, 10 mM MgCl₂ wobei die 1 M MgCl₂ Stocklösung sterilfiltriert wurde) gewaschen und mit 3 ml PBS oder MLB Puffer überschichtet und mit Hilfe eines Schabers in ein Falcon überführt. Die Zellen wurden durch 5 minütige Zentrifugation bei 500xg geerntet. Ebenso wurden gegebenenfalls die sich beim Waschen abgelösten Zellen in einem 50 ml Falcon durch Zentrifugation geerntet. Alle Zellen wurden in 1 ml MLB Puffer mit 1% (m/v) NP-40 (MLB+) mit 1x CLAP, 1mM PMSF und 1 mM DTT resuspendiert und 20 min auf Eis inkubiert. Ungelöstes Material wurde durch 5 minütige Zentrifugation bei 16200xg und 4°C sedimentiert. Vom Überstand wurden 1 µl für eine Proteinkonzentrationsbestimmung und 60 µl für SDS-PAGE entnommen. Ca. 800 µl des Überstands wurden mit 4 µl Kaninchen-anti-GFP Antikörper (in 50% (v/v) Glycerin) versetzt und 1 h lang bei 8°C im Kühlraum über Kopf rotiert. Dann wurden 60 µl einer 1:3 Protein A Sepharose CL-4A Suspension (siehe Kapitel 4.2.3.7) zugegeben und erneut 1 h inkubiert. Die Sepharose wurde fünf mal mit 1 ml eiskaltem MLB+ Puffer versetzt mit 1 mM DTT bei 400xg (Eppendorf Zentrifuge 5415D) 2 min lang gewaschen. Die Proteine wurden in 50 µl SDS-Probenpuffer durch 5 minütiges Kochen bei 95°C eluiert. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 16000xg wurde der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt und bei -24°C bis zur weiteren Analyse eingefroren.

4.2.3.7 Koimmunpräzipitation von Proteinen mit endogenem hMon2 aus HEK293T Zellen für die Massenspektrometrie

Ein Ziel dieser Arbeit war neue Interaktionspartner von hMon2 zu finden. Dafür wurde eine Immunpräzipitation des endogenen hMon2 Proteins aus Extrakten von HEK293T Zellen durchgeführt. Anschließend wurden die mit hMon2 koimmunpräzipitierte Proteine durch Massenspektrometrieanalyse analysiert.

Zuerst wurden die Antikörper an die Protein A Sepharose CL-4B vorgebunden. Dafür wurden 0,005 g Protein A Sepharose je Probe 15 min auf Eis mit kaltem MLB Puffer hydratisiert und

anschließend vier mal mit 1 ml eiskaltem MLB Puffer durch Zentrifugation von 30 sec bei 15700xg gewaschen. Für eine 1:3 Suspension wurden zu je 20 µl äquibrierter Protein A Sepharose 40 µl MLB Puffer zugegeben. In einem Eppendorfgefäß wurden 250 µl MLB Puffer und 60 µl der Protein A Sepharose Suspension vorgelegt. Dazu wurden 80 µl anti-hMon2 Serum (mit 50% (v/v) Glycerin) zugegeben (siehe Kapitel 4.1.4.1, Tabelle 4.5). Als Kontrolle wurden 80 µl 50% (v/v) Präimmenserum in Glycerin (von dem selben, #1511-1, oder anderen Kaninchen, #1511-2, #1681-1 oder #1681-2, (siehe Kapitel 4.1.4.1, Tabelle 4.5) verwendet. Die Bindung der Antikörper erfolgte 1 h lang bei 8°C auf einem Überkopftrotierer. Anschließend wurde drei mal mit je 1 ml MLB Puffer gewaschen.

Je Probe wurden die HEK293T Zellen einer T175 Zellkultur Flasche bei 90-100%iger Konfluenz verwendet. Zur Ernte wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS vorsichtig gespült und überschichtet, dann mit einem Schaber abgelöst. Anschließend wurden die Zellen in ein 50 ml Falcon Zentrifugationsröhrchen überführt. Nach 5 minütiger Zentrifugation bei 500xg bei 20°C/RT wurden die Zellen noch einmal mit 20 ml PBS gewaschen. Zur Lyse wurde das Zellpellet mit 1 ml eiskaltem MLB Puffer mit 1% (m/v) NP-40 (MLB+ Puffer), ergänzt mit 1x CLAP und 1 mM PMSF, resuspendiert und 20 min auf Eis inkubiert, anschließend 20 min lang bei 16200xg und 4°C zentrifugiert. Der Überstand von ca. 1 ml wurde zu der mit Antikörper vorgeladenen Protein A Sepharose zugegeben und 2 h bei 8°C auf einem Überkopftrotierer inkubiert. Nun wurden die Proben bei 15700xg 30 sec lang zentrifugiert und fünf mal mit je 1 ml eiskaltem MLB+ Puffer gewaschen.

Für die Massenspektrometrieanalyse wurde die Immunpräzipitation in ein-, drei- oder vierfacher Skalierung dieses Protokolls durchgeführt. Vor dem letzten Waschschrift wurden die zusammengehörenden Proben vereinigt und die Proteine zweimal mit einer Peptidlösung (synthetisches Peptid mit einer internen Sequenz DVLHRYIEDERLSGKC) 30 min auf Eis eluiert. Je Probe wurden 76 µl MLB+ mit 4 µl Peptidlösung (2 mg/ml) in sterilem dd. H₂O verwendet. Anschließend wurde mit 266 µl MLB+ Puffer gewaschen. Alle Eluate wurden vereinigt und einer TCA-Fällung unterzogen (siehe Kapitel 4.2.3.8), wobei mit einer Endkonzentration von 6% (m/v) TCA 2 h lang auf Eis inkubiert wurde. Das Pellet wurde in 40 µl 1x Probenpuffer 5 min lang bei 95°C gekocht, 5 min bei 16000xg zentrifugiert und der Überstand in ein frisches Eppendorfgefäß überführt.

4.2.3.8 Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure

Zur Aufkonzentrierung wurden die Proben auf 1 ml mit sterilem dd. H₂O aufgefüllt und mit 100 µl 0,15% Na-Deoxycholat (SIGMA) (oder bei anderen Volumen der Proben; Endkonzentration von 0,015% (m/v) Na-Deoxycholat) 10 min bei RT inkubiert. Anschließend mit 72 µl 100% (m/v) (oder 6% (m/v) Endkonzentration) Trichloressigsäure (TCA) 30 min auf Eis gefällt. Proben für die Massenspektrometrie (siehe Kapitel 4.2.3.7) wurden nach der Immunpräzipitation 2 h lang auf Eis gefällt. Die Proben wurden 20 min bei 15700xg und 4°C zentrifugiert. Die Pellets wurden mit 1 ml -24°C kaltem Aceton versetzt und wie vorher zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Pellets 10 min bei 37°C mit geöffnetem Eppendorfgefäß getrocknet. Schließlich wurden die Pellets in 1x SDS-Probenpuffer aufgenommen und bei 95°C 5 min lang gekocht. Ungelöstes Material wurde durch fünfminütige Zentrifugation entfernt. Die Überstände wurden in frische 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Proben wurden bis zur Analyse bei -24°C aufbewahrt.

4.2.3.9 Präparation von Aktin Aliquots

Die Handhabung von Aktin aus Kaninchenmuskel (AKL99, Cytoskeleton Inc. Denver, CO. USA) wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. 1 mg des lyophilisierten Aktins (enthält bereits den Puffer) wurden nach Vorschrift des Herstellers in 100 µl sterilem dd. H₂O rekonstituiert. 10 µl Aliquots mit der Konzentration 10 mg/ml wurden mit Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

4.2.3.10 Kosedimentation von eGFP-hMon2 und dessen Fragmenten mit polymerisiertem Aktin

Das Bindungsexperiment an F-Aktin wurde nach dem angepassten Protokoll aus Weed et al., 2000 durchgeführt. HEK293T Zellen (bei 75% Konfluenz auf 10 cm² Schalen) wurden mit 3,2 µg Plasmid-DNA (hMon2, hMon2-ΔF, hMon2-ΔC und hMon2-F im pEGFP-C1 Vektor) transfiziert (siehe Kapitel 4.2.3.11). Am folgenden Tag wurden die Zellen mit eiskaltem PBS

vorsichtig gewaschen. Abgelöste Zellen wurden durch eine 5 minütige Zentrifugation im 15 ml Falconröhrchen bei 500xg geerntet. Die Zellen wurden mit 200 µl Bindungspuffer (10 mM Imidazol, pH 7,2, 75 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0,5 mM DTT) ergänzt mit 1 mM EGTA, 1xCLAP und 1xPIC als Proteaseinhibitoren überschichtet und mit Hilfe eines Schabers in ein Eppendorfreaktionsgefäß oder direkt in Ultrazentrifugenröhrchen (Beckman, Nr. 343778) überführt. Die Zellen wurden mit einer 26Gx¹/₂ 0,45x13mm Kanüle (BD Microlance) und 1 ml Spritze (Terumo) durch 20 maliges Hoch- und Runterziehen der Probe auf Eis lysiert. Die Lysate wurden 1 h bei 100000xg und 4°C (54000 Upm, TLA120.0 Rotor, Beckman Optima TLX Ultrazentrifuge). Für die Aktinbindung wurde ein 10 µl Aktinaliquot (siehe Kapitel 4.2.3.9) aufgetaut, mit 30 µl Bindungspuffer, welcher mit Proteaseinhibitoren (1xPIC, 1xCLAP) und 1mM DTT versetzt wurde und 1 h bei RT für die Polymerisierung inkubiert. Die 100000xg Überstände wurden in frische Eppendorfreaktionsgefäße überführt. Davon wurden 80 µl (~50 µg Proteine) mit 18,9 µl (5,5 µM) polymerisiertem Aktin oder Bindungspuffer allein als Kontrolle in einem Gesamtvolumen von 200 µl eine halbe Stunde bei RT inkubiert. Anschließend wurde bei 100000xg und 20°C 1 h zentrifugiert. Die Überstände wurden bis zur TCA-Fällung bei -24°C aufbewahrt. Das Pellet wurde in 50 µl frisch zubereitetem Depolymerisierungspuffer [G Puffer (5 mM Tris/HCl pH 8,0, 0,2 mM CaCl₂, 0,5 mM DTT) mit frisch zugegebenen 0,2 mM ATP] resuspendiert und 1 h auf Eis inkubiert. Diese Proben wurden zusammen mit den 100000xg Überständen einer TCA-Fällung unterzogen (siehe Kapitel 4.2.3.8). Die gefällten Proteine wurden in 100 µl 1x SDS-Probenpuffer resuspendiert.

4.2.3.11 Transiente Transfektion

Zellen wurden am Vortag ausgesät. Adhärente Zellen mit 70-80% Konfluenz wurden nach dem Protokoll des Lipofectamin2000 Herstellers (Invitrogen) transfiziert. Dabei wurden, wenn nicht anders angegeben, stets je 2 cm² der verwendeten Petrischalenoberfläche 0,8 µg Plasmid-DNA (oder 1,6 µg) und 1 µl Lipofectamin2000[®] eingesetzt. Für die Bildung der Transfektionskomplexe wurde 1 µl Lipofectamin2000 in 50 µl Opti-MEM I und in einem zweiten Reaktionsgefäß die Plasmid-DNA in 50 µl Opti-MEM I verdünnt. Nach fünfminütiger Inkubation bei RT wurde die DNA-Suspension zu der Lipofektaminsuspension pipettiert. Die Zellen wurden mit 400 µl frischem Medium überschichtet. Im Gegensatz zu

HeLa Zellen wurde für die Transfektion von HEK293T Zellen das RPMI/10% (v/v) FBS als Medium verwendet. Nach 25 min Inkubation bei RT wurden die 100 µl Transfektionskomplexe zu den Zellen zugegeben und die Schälchen in den Inkubator gestellt. Bei der Transfektion mit eGFP-hMon2 und dessen Fragmenten kodierenden Plasmid-DNA wurden die Zellen nach 3-3,5 h, ansonsten nach 4 h Inkubation, ein mal mit RPMI/10% FBS gewaschen und in 0,5 ml frischen Medium inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen für weitere Experimente oder zur Analyse verwendet.

4.2.3.12 hMon2 Depletion mittels RNAi in HeLa Zellen

Die Depletion von hMon2 mittels RNAi wurde mit einem RNAi Kit der Qiagen GmbH fünf Tage lang (120 h) durchgeführt. Am Tag (ca. 18 Stunden) vor der transienten Transfektion wurden $5-6 \times 10^4$ HeLa Zellen je Schale (Loch) einer 24-Loch-Platte (mit je 2 cm^2 Petrischalenoberfläche) ausgesät. Zur Bildung der Transfektionskomplexe wurden, für je 2 cm^2 Schalenoberfläche, in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß 100 µl Opti-MEM I (RT) vorgelegt und anschließend 1,5 µl 2 µM siRNA (Endkonzentration 5 nM) und 4,5 µl HiPerFect Reagenz zugegeben. Nach kurzem Vortexen wurden die Komplexe 10 min bei RT inkubiert. Zellen bei 50%iger Konfluenz wurden mit 1 ml Opti-MEM I gewaschen, bevor 400 µl Opti-MEM I (37°C warm) vorgelegt wurde. Dann wurden die siRNA Komplexe tropfenweise zu den Zellen dazupipettiert. Nach 4 h wurden 55 µl FBS zugegeben. Die Zellen wurden über zwei Tage (52 h) im Inkubator kultiviert. Das Medium wurde abgesaugt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und in 100 µl Trypsin/EDTA (37°C) 3-5 min lang von der Schale abgelöst. Die Zellen wurden in 900 µl RPMI/10%FCS resuspendiert, in ein Eppendorfggefäß transferiert und bei 400xg 5 min zentrifugiert. Es wurden 6×10^4 Zellen in 400 µl RPMI/10%FCS in einer 24-Loch-Platte (je 2 cm^2 Oberfläche), ohne oder mit Glasdeckelchen (für Mikroskopie, siehe Kapitel 4.2.3.13) ausgesät. Anschließend wurden die Transfektionskomplexe vorbereitet und die Zellen wieder damit behandelt. Nach knappen drei Tagen (genauer 68 h) wurden die Zellen der Analyse mittels Western Blot oder Immunfluoreszenz (siehe Kapitel 4.2.2.2 und 4.2.3.13) unterzogen.

4.2.3.13 Fixierung von Zellen und indirekte Immunfluoreszenz

Für mikroskopische Untersuchungen wurden humane Zellen (HeLa) auf Glasdeckelchen (Menzel-Gläser, Q12 mm#1, VWR) in 24-Loch-Platten kultiviert. Die Zellen wurden mit 1 ml PBS gewaschen bevor sie mit 1 ml 4% (m/v) para-Formaldehyd (PFA) in PBS 30 min bei RT fixiert wurden. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden sie mit 1 ml 50 mM NH₄Cl 10 min lang inkubiert, um überschüssiges PFA abzufangen, und nochmals wie zuvor gewaschen. Bei der Fixierung von HeLa Zellen nach hMon2-Depletion mittels RNAi wurde 150 mM Glycin in 1x PBS verwendet. Anschließend wurden die Zellen mit Bindepuffer [wenn bei den Ergebnissen nicht anders angegeben (Abbildungen, Kapitel 5) mit 0,2% (m/v) Tween 20, 0,5-1% (m/v) BSA in PBS] 30 min bei RT permeabilisiert und geblockt. Dann wurden die Zellen mit einem primären Antikörper (siehe Kapitel 4.1.4) bei gewünschter Verdünnung im Bindepuffer 1 h lang bei RT inkubiert. Nach drei fünfminütigen Waschschritten mit 1 ml des gleichen Puffers wurden die Zellen 1 h lang bei RT mit einem Sekundärantikörper (siehe Kapitel 4.1.4.2) inkubiert und noch einmal wie zuvor gewaschen. Anschließend wurden die Zellen auf den Glasdeckelchen drei mal mit 1 ml PBS gespült, mit Hilfe einer Pinzette kurz im H₂O getaucht und schließlich auf 8 µl Fluoromount-G (Southern Biotech) auf einen Objektträger (VWR) eingebettet. Nach 2 stündigem Trocknen bei RT wurden die Präparate bei 4°C gelagert und möglichst am folgenden Tag mikroskopisch untersucht. Die Bildaufnahme erfolgte am konfokalen Laser Scanning Mikroskop (TSC SP2, Leica, Deutschland). Alexa Fluor 488- (AF488-) und eGFP-Epitop wurden mit der Anregungswellenlänge von 488 nm durch Argon Laser angeregt und die Emission wurde in einem spektralen Fenster von 500-535 nm detektiert. Alexa Fluor 546 (AF546) Fluorophor wurde mit der Anregungswellenlänge 543 nm durch ein Helium-Neon Laser angeregt und die emittierte Strahlung bei 555-700 nm detektiert. Zellen wurden mit einer 100.0x/1.xy HCX PL APO Objektivlinse aufgenommen. Das Pinhole war auf airy 1 eingestellt. Generell wurden die Schnappschüsse (xy-Ebene) in 0,5 nm Abständen von der unteren Zelloberfläche, die am Glasdeckelchen adhärert, in Richtung obere Zelloberfläche entlang der z-Ebene gemacht.

4.2.3.14 Zeitraffer-Videomikroskopie

Mittels Zeitraffer-Videomikroskopie wurden eGFP-markierte Proteine in lebendigen HeLa Zellen in einem Bildintervall von 2 sec über eine Zeitspanne von 5 min aufgenommen. Dafür wurden die transient transfizierten HeLa Zellen auf 35 mm Petrischalen mit integriertem Deckgläschen (FluoroDish FD35, 0,17 mm, World Precision Instruments, Inc.) kultiviert (siehe Kapitel 4.2.3.11). Während der mikroskopischen Untersuchung wurden die Zellen in phenolrotfreiem Medium (Dulbecco's Eagle Medium (Gibco) mit 10% (v/v) FBS) kultiviert. Die Aufnahmen und digitale Dokumentation erfolgten am CellObserver HD Zeiss (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) ausgestattet mit einer speziellen Inkubationskammer (mit feuchter 5% (v/v) CO₂ Atmosphäre und 37°C), einem Plan-Apochromat 63x/1.40 Oil D1 Objektiv und einem 62 HE BFP/GFP/HcRED Reflektor. Schnappschüsse wurden mit der AxioCamMR3 Kamera bei einer Belichtungszeit von 30 - 100 ms aufgenommen.

4.2.3.15 Nocodazolbehandlung von eGFP-hMon2 transient exprimierenden HeLa Zellen

HeLa Zellen wurden wie in Kapitel 4.2.3.13 beschrieben mit pEGFP-C1-hMON2 transient transfiziert und in 24-Loch-Platten auf Glasdeckelchen kultiviert. Vor der Fixierung und Färbung für die Untersuchung am Mikroskop wurden die Zellen 90 min in 5 µg/ml Nocodazol (1000x in DMSO, Calbiochem) in 1 ml RPMI/10%FBS Medium im Brutschrank inkubiert.

4.2.3.16 Internalisierungsversuche von Fluorophor-Tfn in HeLa Zellen

Für Tfn-Aufnahmeexperimente und anschließende Untersuchungen am Mikroskop wurden zu untersuchende HeLa Zellen (nach hMon2 Depletion (siehe Kapitel 4.2.3.12) oder eGFP-hMon2 Expression (siehe Kapitel 4.2.3.11) auf Glasdeckelchen in 24-Loch-Platten präpariert. Die Zellen wurden 0-2 h in SFM (serumfreies Medium, DMEM, 1% (m/v) BSA, 20 mM HEPES/NaOH, pH 7,4) kultiviert (siehe Legende Abbildung 5.3 und Abbildung 5.10). Zur Bindung von Alexa Fluor (AF)-markiertem Tfn (AF-Tfn) an die Tfn-Rezeptoren der Plasmamembran wurde die Platte auf Eis gestellt und die Zellen mit 1 ml eiskaltem SFM Medium gespült und in weiteren 1 ml dieses Mediums 5 min auf Eis gekühlt. Nach Absaugen

des Mediums wurden die Zellen in 300 µl SFM mit 25-50 µg/ml Alexa Fluor 546 (AF546) oder 488 (AF488) markiertem Tfn (Invitrogen) 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurde das Medium abgesaugt und die Zellen einmal mit 1 ml RPMI/10%FBS gewaschen und mit 0,5 ml dieses Mediums überschichtet. Die Zellen wurden im 37°C warmen Wasserbad für unterschiedlich lange Zeiten inkubiert (siehe Ergebnisse, Kapitel 5), mit kaltem PBS gespült und anschließend 20 min mit 4% (m/v) PFA in PBS fixiert und drei mal mit PBS gewaschen. Nach 10 min Inkubation mit 150 mM Glycin in PBS wurden die Zellen drei mal mit PBS gewaschen und für die Untersuchung am Mikroskop entsprechend vorbereitet (siehe Kapitel 4.2.3.13).

4.2.3.17 Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen aus *E.coli* BL21

GST-Fusionsproteine wurden in *E.coli* BL21 exprimiert und anschließend gereinigt. Die Transformation der Bakterien mit Plasmid-DNA erfolgte durch Hitzeschock (siehe Kapitel 4.2.1.8). Eine positive Transformantenkolonie wurde in 100 ml LB+Amp angeimpft und über Nacht bei 37°C und 220 Upm inkubiert. 1 l LB+Amp Flüssigmedium wurde mit 50 ml der Übernachtskultur angeimpft und bis zur einer OD₆₀₀ von 0,5 Zelleinheiten/ml bei 30°C und 150 Upm kultiviert. Die Expression von GST-Fusionsproteinen wurde durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 0,5 mM) induziert. Nach 3,5 stündiger Inkubation bei 30°C wurden die Zellen bei 4000 Upm (2820xg, SORVALL RC 6+ Zentrifuge, F10S Rotor) und RT 10 min zentrifugiert und bis zur Proteinaufreinigung bei -24°C eingefroren.

Ein Zellpellet entsprechend einer 0,5 l Kultur wurde aufgetaut und in insgesamt 40 ml 1x PBS mit 5 mM EDTA/NaOH, pH 8,0 (PBS/EDTA) und 1 mM PMSF resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf 2 Glasröhrchen verteilt (30 ml Corex Röhrchen) und dreimal je 8 sec mit Ultraschall auf Stufe vier (Supersonic Sonificator, Sonic Power) auf Eis lysiert. Zwischendurch kühlten die Zellen 1 min auf Eis. Die Lysate wurden bei 12000 Upm (17050xg, SORVALL RC 6+ Zentrifuge, F21 Rotor) und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in Ultrazentrifugenröhrchen (SCI Polyclear, 25x89 mm) überführt und bei 24000 Upm (100000xg, SW28 Rotor, CENTRIKON T-1065 Zentrifuge, Kontron Instruments) und 4°C 1 h lang zentrifugiert. Während dessen wurden 200 ml Bettvolumen von Glutathion Sepharose 4B (Amersham Biosciences) durch fünfmaliges Waschen mit PBS/EDTA äquilibriert. Zur Bindung der GST-Fusionsproteine wurde die Glutathion Sepharose mit dem 100000xg Überstand 1 h bei 8°C und Rotation in einem 50 ml Falcon inkubiert. Anschließend

wurde die Sepharose bei 2000 Upm (Eppendorf Zentrifuge 5804R) und 4°C 5 min lang zentrifugiert und drei mal mit 45 ml und einmal mit 20 ml eiskaltem PBS gewaschen. Die Sepharosekügelchen wurden anschließend in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und drei mal mit 500 µl Elutionspuffer (20 mM reduziertes Glutathion, 50 mM Tris/HCl, pH 8,0) je 15 min lang auf Eis eluiert. Die vereinigten Eluate wurden in einem Dialyseschlauch (Spectra/Por MWCO 12-14000, SPEKTRUM Laboratories, Inc.) in 2 l Dialysepuffer (10 mM HEPES/KOH pH 7,8, 1 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0,2 mM PMSF) bei 4-8°C langsam gerührt. Nach 3 h wurden die Proben in ein frisches Puffer transferiert und weiter über Nacht dialysiert. Die Proben wurden durch einminütige Zentrifugation bei 16000xg von Präzipitaten befreit und einer Proteinkonzentrationsbestimmung (siehe Kapitel 4.2.2.8) unterzogen. Aliquots mit 80 µg Protein wurden mit Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

4.2.3.18 Pulldown Experimente mit GST-KHC771-963 und GST-KLC2 Fusionsproteinen

Für ein GST-Bindungsexperiment wurden die bei -80°C eingefrorenen Aliquots mit 80 µg GST-Fusionsproteinen und Aliquots von Hefezellen mit 50 OD₆₀₀ Einheiten verwendet (siehe Kapitel 4.2.3.3 und 4.2.3.17). Je Probe wurden 60 µl von äquilibrter 1:3 Glutathion Sepharose 4B Kügelchen (mit 20 µl Bettvolumen) in 300 µl IP Puffer B (115 mM KCl, 5 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM EDTA/NaOH, pH 8,0, 20 mM HEPES/KOH, pH 7,8) resuspendiert. Dazu wurden die 80 µg der GST-Fusionsproteine gegeben und 1 h bei 8°C im Kühlraum an die Sepharose unter Rotation gebunden. Währenddessen wurden die Hefezellen wie im Kapitel 4.2.3.4 beschrieben aufgebrochen. 1 ml Zelllysate wurden mit 0,5% (m/v) Triton X-100 oder NP-40 und 1 mM DTT versetzt und 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben 20 min bei 4°C, 15700xg zentrifugiert und die Überstände in einem 15 ml Falcon vereint. Die mit GST-Fusionsproteinen beladene Glutathion Sepharose wurde drei mal mit 1 ml IP Puffer B gewaschen. Anschließend wurde diese mit ca. 850 µl Zelllysate versetzt und 1 h bei 8°C unter Rotation inkubiert. Nach vier Waschschritten mit je 1 ml IP Puffer mit 0,5% Triton X-100 und 1 mM DTT wurde die Glutathion Sepharose mit Probenpuffer versetzt und für SDS-PAGE Analyse vorbereitet (siehe Kapitel 4.2.2.1).

5. Ergebnisse

Bisher wurde das Protein Ysl2p/Mon2p nur in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* untersucht. In dieser Arbeit sollte hMon2 in Säugerzellen untersucht werden. Um erste Einsichten bezüglich der subzellulären Verteilung, Interaktionspartner und Funktion zu erhalten, wurden Experimente unterschiedlicher Art durchgeführt. Mittels Knockdown Experimenten mit siRNA wurde der Phänotyp von hMon2-depletierten HeLa Zellen untersucht. Des Weiteren wurden immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt, um das subzelluläre Vorkommen des hMon2 Proteins und die Koexistenz mit anderen Proteinen zu bestimmen. Zur Ermittlung neuer Interaktionspartner von hMon2, wurden massenspektrometrische Untersuchungen und verschiedene Bindungsstudien durchgeführt.

5.1 Suppression der hMon2 Expression mittels RNAi

Um hMon2 in humanen Zellen zu untersuchen wurde zuerst die hMON2 Genexpression mittels RNAi in HeLa Zellen supprimiert.

Zur Optimierung des hMON2-Knockdowns wurden die Zellen unterschiedlich lange mit siRNA inkubiert (zwei, drei, vier oder fünf Tage). Es wurden zwei unterschiedliche gegen hMON2 gerichtete siRNA-Oligonukleotide hMon2 siRNA#2 und hMon2 siRNA#3 (siehe Kapitel 4.1.9) verwendet. Als Negativkontrolle diente Kontroll-siRNA (AllStars negativ control, Qiagen). Ebenso wurden nicht behandelte HeLa Zellen als weitere Kontrolle zugezogen.

Mittels Immunblot konnte eine erfolgreiche Depletion von hMon2 Protein in HeLa Zellen nach fünf Tage langer siRNA-Behandlung festgestellt werden (siehe Abbildung 5.1). Dabei wurden die Zellen am zweiten Tag nach der ersten Behandlung passagiert und im Anschluss (oder am nächsten Tag) ein zweites Mal mit siRNA behandelt (siehe Kapitel 4.2.3.12). Die Expression von hMon2 in hMon2 siRNA#2 und siRNA#3 behandelten Zellen ist im Immunblot nicht detektierbar, während in den Kontrollzellen (Kontroll-siRNA und keine siRNA) die hMon2 Proteinbande nicht verändert ist. Als Ladekontrolle diente die Immunfärbung von β -Aktin (siehe Abbildung 5.1).

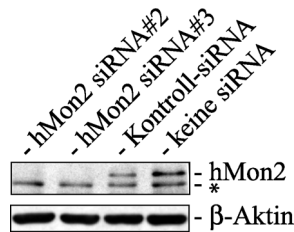


Abbildung 5.1 RNAi vermittelte Depletion von hMon2 nach 5 Tagen.

Nach 5 tägigem RNAi vermitteltem Knockdown von hMON2 ist kein hMon2 Protein im HeLa Zellextrakten zu detektieren. $5 \cdot 10^4$ HeLa Zellen wurden auf 2 cm^2 (24-Loch-Platte) am Tag vor der Transfektion ausgesät. 50% konfluente Zellen wurden mit siRNA gegen hMon2 (hMon2 siRNA#2 und #3) und Kontrolle (Kontroll-siRNA) transfiziert. Nach 2 Tagen wurden die Zellen passagiert und ein zweites Mal transfiziert. Nach 3 Folgetagen, insgesamt 5-tägiger siRNA Behandlung, wurden die Zellen lysiert (in $100 \mu\text{l}$ Lysepuffer) und mittels Western Blot ($20\text{-}50 \mu\text{g}$ Protein je Spur) analysiert. Immunblot zeigt die hMon2 Depletion mittels hMon2 siRNA#2 (Spur 1) und hMon2 siRNA#3 (Spur 2), im Vergleich zu mit Kontroll-siRNA behandelten (Spur 3) und nicht behandelten Zellen (keine siRNA, Spur 4), wo der hMon2 Expressionslevel unverändert bleibt. Für die Identifizierung von hMon2 wurde ein anti-hMon2 Antikörper (Kaninchen #1533-1) verwendet. Die Immunfärbung von β -Aktin und die mitunter vorkommende sichtbare Kreuzreaktion* des anti-hMon2 Antikörpers ermöglichen eine Ladekontrolle.

5.2 Depletion von hMon2 in HeLa Zellen verursacht Veränderungen in der subzellulären Verteilung von Clathrinadapterproteinen

Aus einer Kombination zuvorgehender Proteininteraktionsstudien innerhalb des Ysl2p-Neo1p-Arl1p Netzwerks in Hefe und der Sequenzhomologie zu den 200 kDa Arf-GEF BIG/Sec7 und GBF/Gea/GNOM Subfamilien (siehe Kapitel 3.5.1), welche eine bedeutende Rolle im vesikulären Membrantransport spielen (siehe Kapitel 3.4 ff), wurde ein Verdacht auf Interaktion von hMon2 mit den Komponenten, die während der Bildung von clathrinumhüllter Vesikel beteiligt sind, geschöpft.

Der Phänotyp von HeLa Zellen nach 5 tägigem RNAi vermitteltem hMON2-Knockdown (siehe Kapitel 4.2.3.12) wurde bezüglich des subzellulären Vorkommens der Clathrinadapterproteine untersucht. Mittels Immunblot wurde der Erfolg des Knockdowns bestätigt und gleichzeitig das Expressionslevel der Clathrinadapterproteine GGA3, AP-1 und EpsinR überprüft (siehe Abbildung 5.2, C). Für die indirekte Immunfluoreszenz (siehe Kapitel 4.2.3.13) wurden die hMon2-depletierten HeLa und Kontrollzellen auf Glasdeckelchen mit 4% (m/v) PFA fixiert und mit Antikörper gegen GGA3 gefärbt. Es wurde

eine subzelluläre Umverteilung der Clathrinadapterproteine beobachtet (siehe Abbildung 5.2, A). In Kontrollzellen befindet sich endogenes GGA3 überwiegend an perinuklearen Strukturen, das zuvor am TGN (Dell'Angelica et al., 2000) und an endosomalen Membranen in der Zellperipherie identifiziert wurde. Im Gegensatz zu diesem Phänotyp wurde GGA3 in hMon2-depletierten Zellen größtenteils in der Zellperipherie lokalisiert. 89% der Kontrollzellen (gezählte Zellen n=222) zeigen eine deutliche perinukleare Verteilung mit wenigen peripheren Strukturen von GGA3, während nur 18% der hMon2-depletierten Zellen dieses Muster zeigen. Demnach haben 82% der von hMon2 depletierten Zellen ein verändertes GGA3 Verteilungsmuster. Ebenso wurde die stationäre Verteilung von endogenem GGA1 untersucht (siehe Abbildung 5.2, A). In hMon2-supprimierten Zellen beobachtet man einen teilweisen Verlust des kompakten perinuklearen Vorkommens und eine Zunahme an diffusem Verteilungsmuster in der Zellperipherie im Vergleich zu den Kontrollzellen. Dabei zeigen 78% der Kontrollzellen (n=202) ein deutliches perinukleares Vorkommen mit wenigen peripheren Strukturen von GGA1, während nur 14% (n=413) der in hMon2-depletierten Zellen nur diese Verteilung zeigten. Demnach haben 86% der von hMon2 depletierten Zellen ein verändertes GGA1 Verteilungsmuster.

Es wurde auch die Lokalisierung der heterotetrameren Adapterproteine nach Suppression von hMon2 vorgenommen (siehe Abbildung 5.2, A). AP-1 und AP-3 sind in Kontrollzellen im Zellzentrum am TGN und fein in der Zellperipherie an endosomalen Membranen verteilt (Robinson, 2004). Nach hMON2-Knockdown sind AP-1 und AP-3 vermehrt als größere Punkte und pleomorphe, statt fein verteilte Strukturen innerhalb der Zelle vorzufinden.

Wie in McMahons Gruppe (Mills et al., 2003) gefunden, interagiert das EpsinR mit GGA Proteinen und dem γ -Adaptin (Hirst et al., 2003), einer Untereinheit von AP-1, bei der Bildung von Clathrinhüllen (siehe Kapitel 3.3.2). Demzufolge habe ich untersucht, ob die hMon2 Depletion auch eine Auswirkung auf das Verteilungsmuster von endogenem EpsinR in HeLa Zellen hat (siehe Abbildung 5.2, A). In Kontrollzellen befindet es sich sowohl im Zellzentrum am TGN als auch an Endosomen und in der Zellperipherie. Nach siRNA Behandlung gegen hMON2 ist das endogene EpsinR weniger kompakt am Zellzentrum und weniger fein in der Zellperipherie verteilt. Dort sind größere und oft pleomorphe Strukturen zu beobachten.

Um eine mögliche Fragmentierung von Golgi-Apparat und *trans*-Golgi-Netzwerk auszuschließen, wurden hMon2-depletierte Zellen und Kontrollzellen gegen die Markerproteine TGN46 gefärbt (siehe Abbildung 5.2, B). Dieser Marker eignet sich für diese Untersuchung, da bisher über eine physikalische Interaktion von Clathrinadapterproteinen

(AP-1 oder GGA3) mit TGN46 Protein nicht berichtet wurde. Abbildung 5.2, B zeigt, dass das TGN46 Verteilungsmuster durch die hMon2 Depletion nicht beeinflusst wird.

Da hMon2 Homologien zu den großen Arf-GEFs aufweist, könnte die Depletion des möglichen GEFs eine Auswirkung auf die subzelluläre Verteilung von Arf1 haben; ob zytosolisch als nicht aktiviertes GDP-gebundenes Protein oder membranassoziiert als aktiviertes GTP-gebundenes Protein. Aktiviertes GTP-gebundenes Arf1 fungiert bei der Rekrutierung von einigen Adapterproteinen an die Membran (Nie et al., 2003). Zur Untersuchung am Mikroskop wurden die auf Glasdeckelchen kultivierten HeLa Zellen 5 min lang mit -24°C kaltem Methanol fixiert und ARF1 mit Antikörpern markiert (siehe Abbildung 5.2, B). Die Immunfluoreszenzanalyse zeigte keine Unterschiede zwischen hMon2-depletierten und Kontrollzellen.

Nachdem die Clathrinadapterproteine in der Zellperipherie fehlverteilt werden, stellte sich die Frage nach der subzellulären Verteilung von Clathrin. Drei von einander unabhängige Immunfluoreszenzversuche haben entgegen der Erwartung gezeigt, dass in hMon2-depletierten HeLa Zellen das Signal von CHC1-gefärbten Strukturen stärker im Zellzentrum zu sehen ist als in den Kontrollzellen (siehe Abbildung 5.2, B).

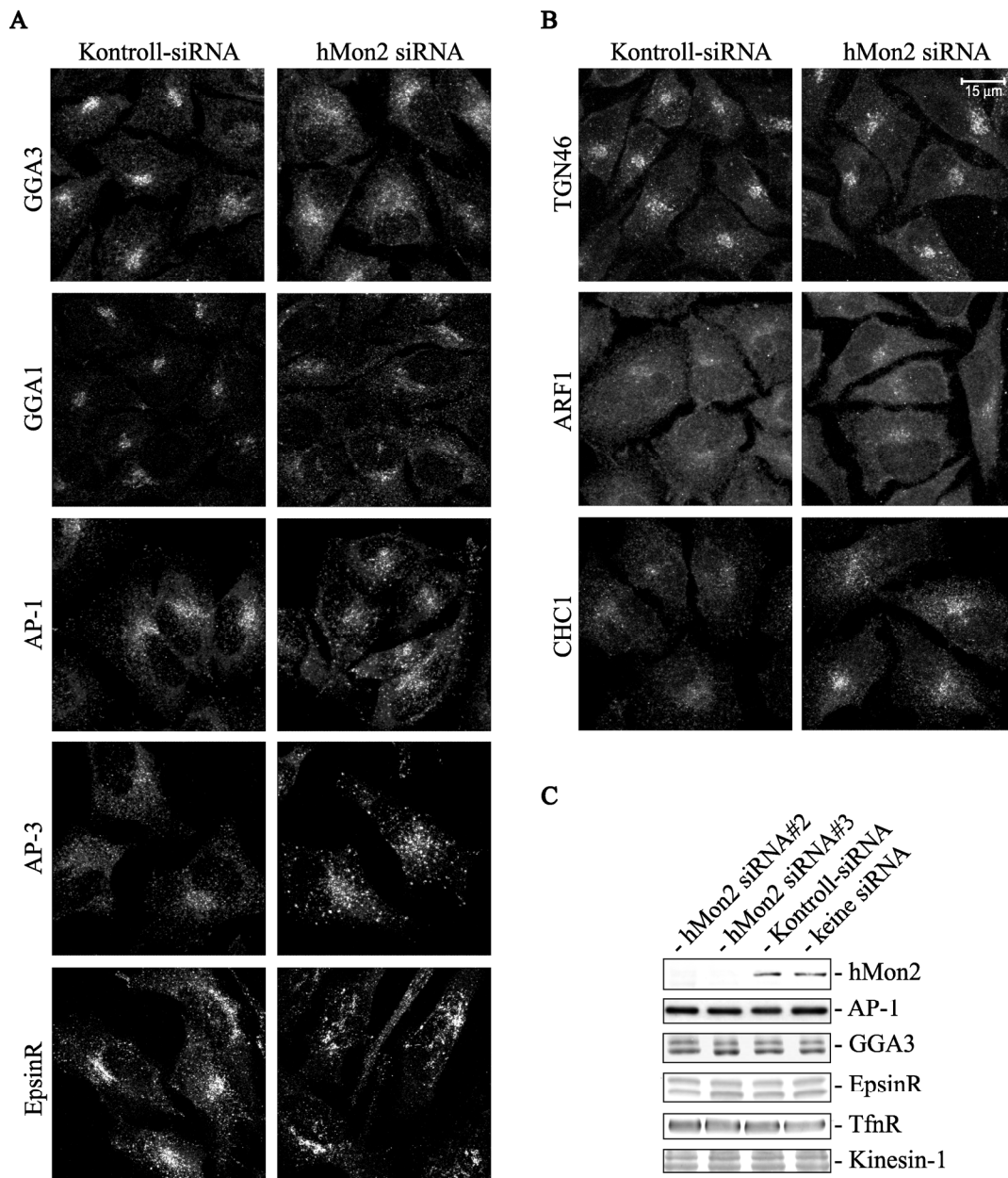


Abbildung 5.2 hMon2 Depletion durch RNAi verursacht Änderungen der typischen subzellulären Verteilung von Adapterproteinen und Clathrin in HeLa Zellen.

(A) zeigt ein verändertes subzelluläres Verteilungsmuster der Adapterproteine GGA3, GGA1, AP-1, AP-3 und EpsinR, und (B) von Clathrin nach Depletion von hMon2 (rechte Spalten) im Vergleich zu den mit Kontroll-siRNA behandelten HeLa Zellen (linke Spalten). Die TGN-Morphologie und das Verteilungsmuster von ARF1 sind durch die hMon2 Depletion nicht verändert (B). (C) zeigt unveränderte Proteinmengen von AP-1, GGA3, EpsinR, TfnR und Kinesin-1 im Zellextrakt nach hMon2 Depletion. (A-C) $5 \cdot 10^4$ HeLa Zellen wurden auf 2 cm^2 (24-Loch-Platte) am Tag vor der Transfektion ausgesät. 50% konfluente Zellen wurden mit siRNA gegen hMon2 (hMon2 siRNA) und Kontrolle (Kontroll-siRNA) transfiziert. Nach 2 Tagen wurden die Zellen passagiert und wie zuvor transfiziert. Für die Untersuchung am konfokalen Fluoreszenzmikroskop wurden die Zellen auf Glasdeckelchen herangezogen und mit 4% PFA und 150 mM Glycin in PBS fixiert. Für die Färbung von ARF1 wurden die Zellen mit Methanol fixiert. Die Proteine (A) GGA1, GGA3, AP-1, AP-3, EpsinR und (B) TGN46, ARF1 und CHC1 wurden mit entsprechenden Antikörpern visualisiert (siehe Kapitel 4.1.4). Als

Sekundärantikörper wurde ein AF488 gekoppeltes IgG verwendet (siehe Kapitel 4.1.4.2). (C) Die Überprüfung der Depletion von hMon2 erfolgte wie in der Abbildung 5.1 beschrieben. Für die Identifizierung von hMon2 wurde affinitätsgereinigter anti-hMon2 Antikörper (Kaninchen #1533-1) verwendet. Die Expression von AP-1, GGA3, EpsinR, TfnR (siehe Kapitel 5.3 unten) und Kinesin-1 (siehe Kapitel 5.6.2 bis 5.6.6) wurde mit spezifischen Antikörpern (siehe Tabelle 4.4 und Tabelle 4.8) detektiert. Die Doppelbande von GGA3 ist auf zwei Splicevarianten zurückzuführen (Wakasugi et al., 2003), die von Kinesin-1 (Schmidt et al., 2009) werden vermutlich durch Modifizierung der Proteine verursacht.

5.3 Depletion von hMon2 verursacht Tubulation von fluoreszenzmarkierten Tfn-positiven Organellen

Nachdem eine Umverteilung der Clathrinadapterproteine in hMon2-depletierten HeLa Zellen festgestellt wurde, sollte die Natur der betroffenen Organellen durch die Aufnahme von fluorophormarkiertem Tfn untersucht werden. Der TfnR und sein Ligand Tfn werden weitgehend als Markerproteine für den Rezyklierungsweg in der Zelle verwendet. Mit Eisenionen beladenes Tfn bindet an TfnR der Plasmamembran, worauf er in clathrinumhüllten Bläschen endozytiert wird. Anschließend durchläuft er die peripheren sortierenden Endosomen. Der Rezeptor wird nun zurück zur Zelloberfläche entweder direkt sortiert (schnelle Route) oder er durchläuft (langsame Rezyklierungsrouten) die perizentriolare Population von Endosomen, die sogenannten rezyklierenden Endosomen, oder das endosomale rezyklierende Kompartiment.

Von hMon2-depletierte HeLa und Kontrollzellen wurden auf Glasdeckelchen auf einer 24-Loch-Platte kultiviert (siehe Kapitel 4.2.3.16). Die Transferrinrezeptoren der Zelloberfläche wurden mit AF488-konjugiertem Tfn (AF-Tfn) 30 min auf Eis beladen. Durch Temperaturwechsel auf 37°C wurde das Tfn in die Zelle aufgenommen. Die Internalisierungszeit wurde variiert, so dass bestimmte Kompartimente mit fluoreszierendem Tfn markiert wurden. Die Zellen wurden fixiert und die Proteine GGA3 und AP-1 mit Antikörpern gefärbt. Nach 5 oder 10 minütiger Aufnahme wurden die vergrößerten AP-1 und GGA3 Strukturen in hMon2-depletierten HeLa Zellen, bei denen es sich vermutlich um Endosomen handelt, durch internalisiertes AF-Tfn markiert. Bei den Kontrollzellen wurde auch eine Überlappung von Adapterproteinen, jedoch in kleinen fein verteilten endosomalen Strukturen in der Zellperipherie, beobachtet. Nach einer 15 minütigen und vermehrt nach 30 minütiger (gezeigt in Abbildung 5.3) Internalisierung wurde eine Tubulierung von AF-Tfn-enthaltenden Kompartimenten in den hMon2-depletierten Zellen beobachtet. Diese

tubulären Organellen waren mit pleomorphen AP-1 und GGA3 Strukturen dekoriert (siehe Abbildung 5.3). Dagegen waren in den Kontrollzellen feinverteilte Tfn-positive Pünktchen mit teilweiser Überlappung mit GGA3 oder AP-1 zu sehen. Somit könnte man vermuten, dass durch die hMon2 Depletion verursachte Morphologieänderung der Transport von Frachtmolekülen, wie Tfn, zwischen frühen Endosomen, rezyklierenden Endosomen und tubulären endosomalen Netzwerk beeinflusst wird.

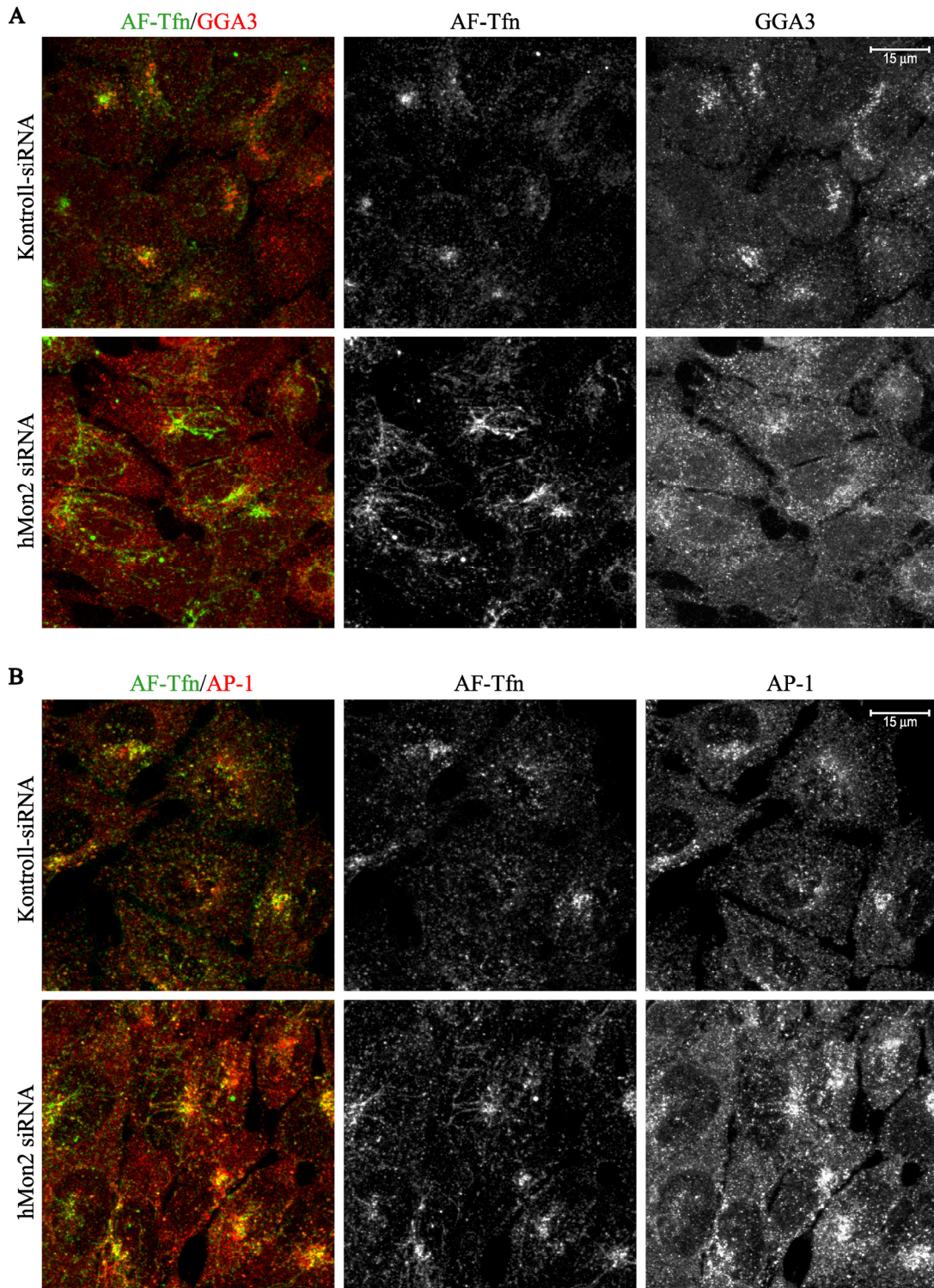


Abbildung 5.3 hMon2 Depletion verändert die typische Struktur von AF-Tfn und AP-1/GGA3 enthaltenden Kompartimenten.

hMon2 Depletion verursacht vergrößerte pleomorphe und tubuläre Strukturen die über Aufnahme von AF-Tfn sichtbar gemacht werden können. Auf diesen veränderten Strukturen werden die Adapterproteine AP-1 und GGA3 lokalisiert. HeLa Zellen wurden mit siRNA gegen hMon2 (untere Reihe) und mit Kontroll-siRNA (obere Reihe) 5 Tage lang behandelt (siehe Legende zu Abbildung 5.2). Zellen wurden 30 min lang mit 50 µg/ml AF488-markierten Transferrin (AF-Tfn) in serumfreiem Medium (SFM) auf Eis inkubiert und zur Internalisierung der AF-Tfn-TfnR Komplexe 30 min in den Inkubator bei 37°C gelegt. Die Zellen wurden mit 4% PFA fixiert, permeabilisiert und mit Antikörpern gegen GGA3 (A) und AP-1 (B) markiert (siehe Kapitel 4.2.3.13). Als Sekundärantikörper wurde Ziege-anti-Maus-AF546 verwendet. Untersuchung erfolgte am konfokalen Mikroskop (LSM-SP2, Leica).

5.4 HA-GGA1 und HA-GGA3 binden hMon2 im Immunpräzipitationsversuch

In unserem Labor wurde vor kurzem gezeigt, dass Ysl2p mit Gga1p und Gga2p direkt interagiert (siehe Kapitel 3.5.1) und die Depletion von hMon2 in HeLa Zellen eine subzelluläre Umverteilung von GGA Proteinen zur Folge hat (siehe Kapitel 5.2 und 5.3) (Singer-Krüger et al., 2008). Aufgrund dieser Ergebnisse war es interessant auch die Interaktion zwischen hMon2 und den Clathrinadapterproteinen GGA1 und GGA3 durch Bindungsexperimente im Säugersystem zu untersuchen. Dazu wurden in HEK293T Zellen HA-GGA1 oder HA-GGA3 Proteine transient exprimiert. Bei den Immunpräzipitationsexperimenten (siehe Kapitel 4.2.3.5) von HA-GGA1 und HA-GGA3 (HA-GGA1/3) konnte das endogene hMon2 Protein mitisoliert werden (siehe Abbildung 5.4, erste und zweite Spur). Dagegen war in nicht-transfizierten Kontrollzellen (nt), d.h. bei Abwesenheit der HA-GGA Proteine, kein hMon2 zu detektieren (siehe Abbildung 5.4, dritte Spur). Obwohl anfänglich wegen Problemen mit der Zellkultur nicht immer reproduzierbar, konnte die Koimmunpräzipitation in drei unabhängigen Experimenten klar nachgewiesen werden. Bei einem Experiment war das Ergebnis klar, die beiden anderen benötigten längere Entwicklungszeiten im Immunblot.

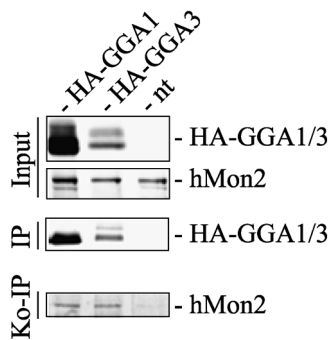


Abbildung 5.4 HA-GGA1 und HA-GGA3 binden endogenes hMon2 aus HEK293T Zellen.

Endogenes hMon2 wurde mit HA-GGA1 und mit HA-GGA3 aus HEK293T Zelllysaten koimmunpräzipitiert. $0,5 \times 10^6$ HEK293T Zellen wurden ausgesät und am folgenden Tag mit pcDNA3-HA-GGA1 und pcDNA3-HA-GGA3 transient transfiziert. Als Kontrolle wurden nicht transfizierte (nt) Zellen verwendet. Nach 18-20 h wurde mit den Zelllysaten (PNS) eine Immunpräzipitation mit Ratte-anti-HA Antikörper durchgeführt. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE (7,5% Gel) aufgetrennt und durch Immunblot analysiert. Die Abbildung zeigt oben die für die Immunpräzipitation verwendeten Zelllysate (Input, hier 3 % der Zelllysate), in der Mitte die präzipitierten HA-GGA1 und HA-GGA3 Proteine (IP), nachgewiesen mit anti-HA Antikörper, unten das mit HA-GGA1/3 koimmunpräzipitierte hMon2 (Ko-IP) in erster und zweiter Spur, detektiert mit affinitätsgereinigtem anti-hMon2 Antikörper (siehe Tabelle 4.3 und Tabelle 4.6). Für Nachweis der Ko-IP wurden circa 50% der eluierten Proteine für die SDS-PAGE verwendet.

5.5 Transiente Expression und Immunfluoreszenzuntersuchungen von eGFP-hMon2 in HeLa Zellen

Bisherige Studien haben gezeigt, dass das Hefeprotein Ysl2p am TGN und Endosomen präsent ist, dort den vesikulären Transport reguliert und im sekretorischen Weg fungiert (Avaro et al., 2002; Jochum et al., 2002; Efe et al., 2005; Gillingham et al., 2006).

Bisher wurde hMon2 nicht auf seine subzelluläre Verteilung in humanen Zellen untersucht. Für dieses Ziel wurden HeLa Zellen mit pEGFP-C1-hMON2 über 18-20 h transient transfiziert und für direkte und indirekte Immunfluoreszenzanalysen prozessiert (siehe Kapitel 4.2.3.11 und 4.2.3.13). Dabei wurden primäre und sekundäre Antikörper wie in Kapitel 4.1.4 (Tabelle 4.4 und Tabelle 4.8) beschrieben verwendet. Die Bildaufnahmen erfolgten am konfokalen Mikroskop (LSM-SP2, Leica).

5.5.1 Kolokalisierung von eGFP-hMon2 mit Clathrinadapterproteinen in HeLa Zellen

Nachdem in dieser Arbeit gezeigt wurde, dass ein hMON2-Knockdown eine deutliche subzelluläre Umverteilung von Adapterproteinen und AF-Tfn beinhaltender Organellen, jedoch keine Strukturänderung des Golgi-Apparats und TGN verursacht, stellte sich die Frage, ob hMon2 mit den Adapterproteinen und Tfn und seinem Rezeptor kolokalisiert werden kann. Typische Verteilungsmuster der Adapterproteine sind pleomorphe und punktförmige fein verteilte Strukturen innerhalb der gesamten Zelle, die sich in der Zellmitte deutlich verdichten.

Bei den mikroskopischen Untersuchungen von hMon2 und GGA1 und GGA3 wurde eine teilweise Überlappung dieser pleomorphen und punktförmigen Strukturen von hMon2 mit den monomeren Clathrinadapterproteinen GGA1 und GGA3 vor allem im perinuklearen als auch peripheralen Bereich der Zellen beobachtet (siehe Abbildung 5.5). Bei wenigen Zellen konnte man größere teilweise überlappende Strukturen von eGFP-hMon2 und GGA3 im Bereich der Zellperipherie sehen (siehe Inserts der Abbildung 5.5, untere Reihe).

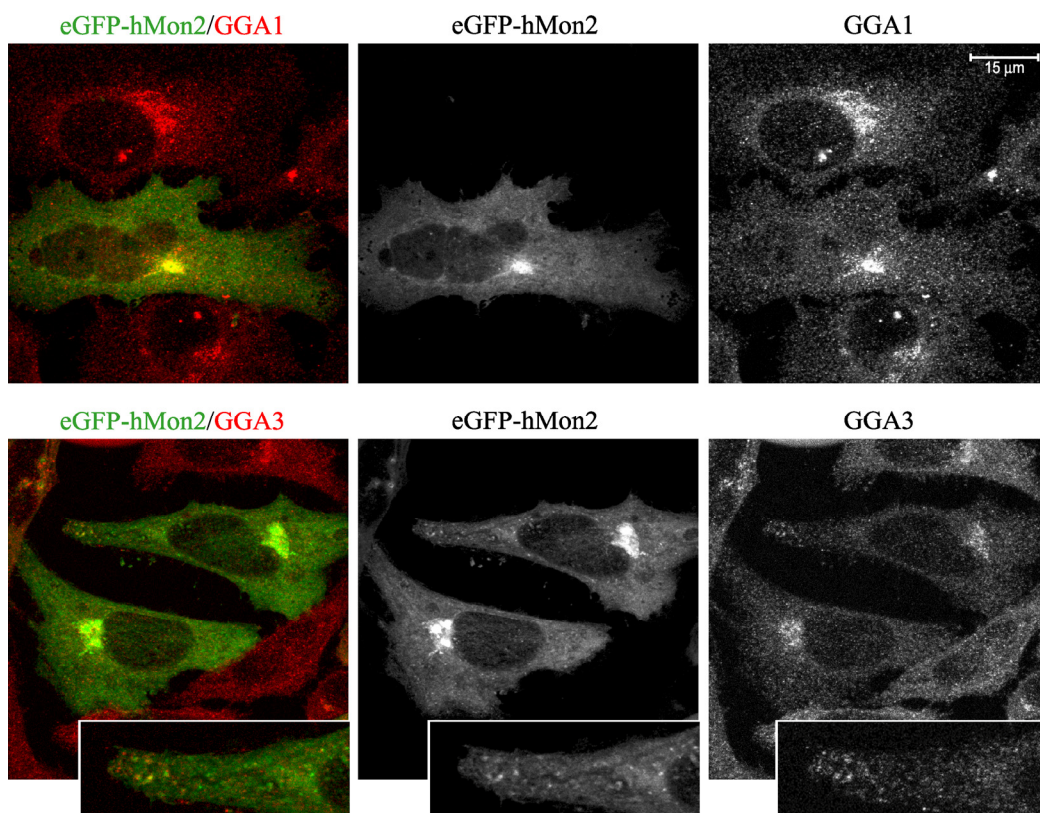


Abbildung 5.5 eGFP-hMon2 wird mit GGA1 und GGA3 oftmals kolokalisiert.

GGA1 und GGA3 werden an identischen pleomorphen und punktförmigen Strukturen in der Zellperipherie und im Zentrum der Zellen wie eGFP-hMon2 lokalisiert. eGFP-hMon2 transient

exprimierende HeLa Zellen wurden mit 4% PFA und 150 mM Glycin in PBS fixiert. Nach Permeabilisierung und Blocken mit 0,2% (m/v) Tween 20 und 0,5% (m/v) BSA in PBS wurden die endogenen Proteine GGA1 (obere Reihe) und GGA3 (untere Reihe) mit Antikörpern markiert (siehe Kapitel 4.1.4). Als Sekundärantikörper wurde ein AF546-Konjugat verwendet. Inserts zeigen eine zweifache Vergrößerung von GGA3 und eGFP-hMon2 überlappenden Strukturen in der Zellperipherie.

Außerdem konnte auch eine teilweise Überlappung von hMon2 mit dem heterotetrameren Clathrinadapterprotein AP-1 im perinuklearen Bereich der Zellen beobachtet werden. Auch hier (vergleiche Überlappung mit GGA3, Abbildung 5.5) wurde in den wenigen Zellen, bei welchen größere punktförmige eGFP-hMon2 Strukturen in der Zellperipherie vorzufinden waren, eine deutliche Überlappung dieser Strukturen mit AP-1 beobachtet (siehe Inserts in Abbildung 5.6, obere Reihe). AP-3 scheint sich in der Nähe von eGFP-hMon2 Strukturen zu befinden, jedoch sind keine deutlichen Überlappungsmuster zu erkennen (siehe Abbildung 5.6). Ebenso wurde keine Kolokalisierung mit dem Plasmamembran Clathrinadapterprotein AP-2 identifiziert.

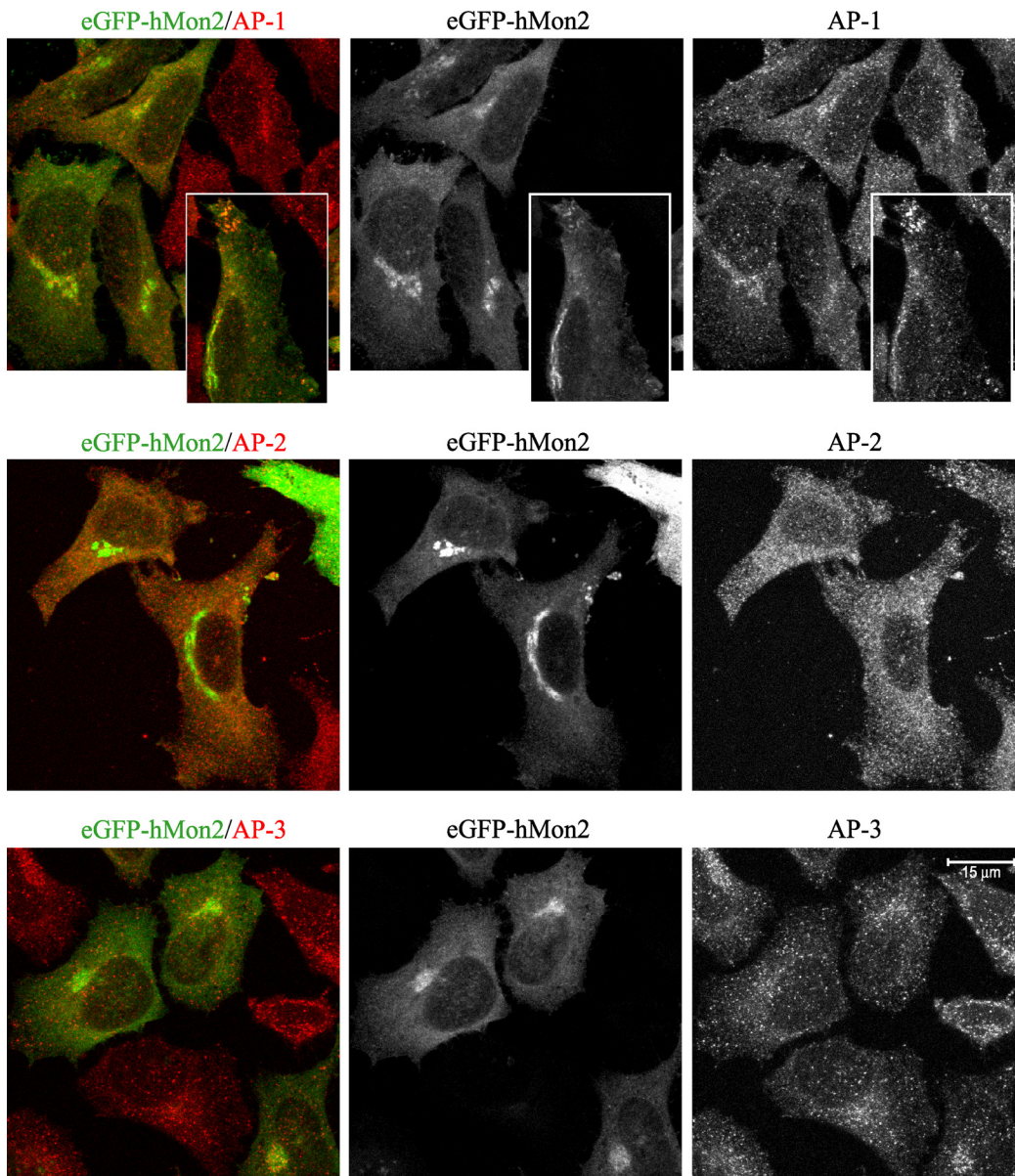


Abbildung 5.6 eGFP-hMon2 zeigt oftmals Überlappung mit AP-1, jedoch nicht mit AP-2 und AP-3.

AP-1 wird an punktförmigen Strukturen in der Zellperipherie und im Zentrum der Zelle zusammen mit eGFP-hMon2 lokalisiert. AP-2 und AP-3 wird nicht mit eGFP-hMon2 in der Zelle kolokalisiert. eGFP-hMon2 exprimierende HeLa Zellen wurden mit 4% (m/v) PFA und 150 mM Glycin im PBS fixiert. Nach der Permeabilisierung mit 0,2% (m/v) Tween 20 und 0,5% (m/v) BSA in PBS wurden AP-1 (obere Reihe), AP-2 (mitte) und AP-3 (untere Reihe) Proteine mit jeweiligen Antikörpern (siehe Tabelle 4.4) immungefärbt. Als Sekundärantikörper wurde ein AF546-Konjugat verwendet (siehe Tabelle 4.8). Inserts zeigen überlappende Strukturen von AP-1 und eGFP-hMon2 in der Zellperipherie.

Das ubiquitäre Adapterprotein EpsinR bindet Clathrin, Inositolphospholipide und die Adapterproteine GGA und AP-1 (siehe Kapitel 3.3.2). Es ist am TGN, Endosomen und an

clathrinummantelten Vesikeln, wo es vermutlich die Vesikelhülle stabilisiert, zu finden (Mills et al., 2003; Robinson, 2004).

Die mikroskopische Untersuchung auf Kolo-kalisierung von eGFP-hMon2 mit EpsinR, einem weiteren monomeren Clathrinadapterprotein, ergab eine sehr gute Überlappung dieser Proteine vor allem im Bereich des *trans*-Golgi/TGN und wenig in der Zellperipherie. Die Abbildung 5.7 zeigt HeLa Zellen, die mit -20°C Methanol fixiert wurden. Eine alternative Fixierungsmethode, wobei das Methanol Löcher an den Membranen erzeugt und ein großer Teil zytosolischer Proteine weggeschwemmt wird, wodurch die überlappenden Strukturen nicht zytosolischer Proteine besser zu erkennen sind als in Zellen, die einer Crosslinking-Fixierung mit PFA unterzogen wurden. Dabei können Membranen der Zelle durch das Methanol zum Nachteil etwas deformiert werden. Die Überlappung wurde auch bei einer Fixierung mit 4% PFA beobachtet.

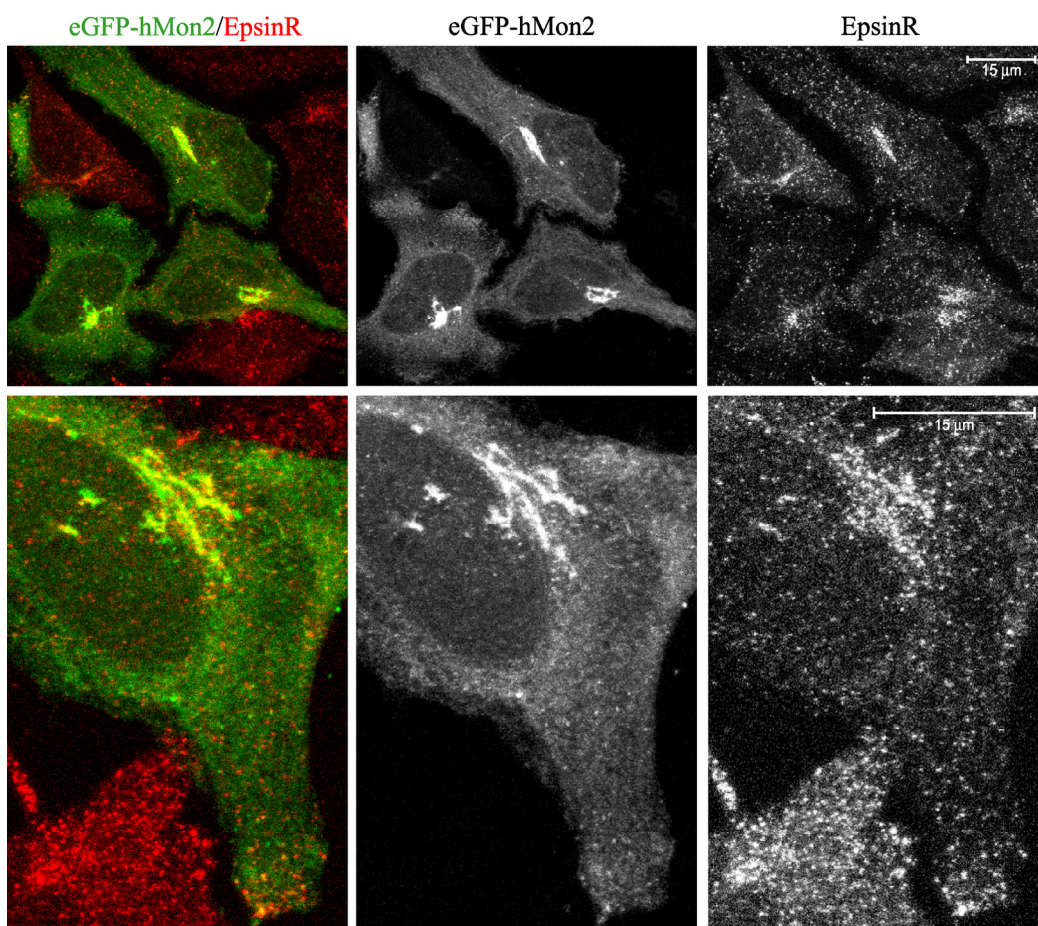


Abbildung 5.7 eGFP-hMon2 wird oftmals zusammen mit EpsinR lokalisiert.

eGFP-hMon2 und EpsinR werden zusammen in der Zellmitte, im Bereich des *trans*-Golgi und TGN, aber auch an punktförmigen Strukturen in der Zellperipherie mikroskopisch lokalisiert. HeLa Zellen wurden transient transfiziert mit pEGFP-C1-hMON2. Nach 20 h wurden sie mit -24°C kaltem Methanol fixiert. Nach der

Permeabilisierung mit 0,1% (m/v) Triton X-100 und 0,5% (m/v) BSA in PBS wurden sie mit Kaninchen-anti-EpsinR Antikörper gefärbt. Als Sekundärantikörper wurde ein AF546-Konjugat verwendet (siehe Tabelle 4.4 und Tabelle 4.8). Die untere Reihe zeigt eine 2,2-fache Vergrößerung einer Zelle mit wenigen überlappenden Strukturen von EpsinR und eGFP-hMon2 in der Zellperipherie.

5.5.2 eGFP-hMon2 lokalisiert am *trans*-Golgi-Netzwerk

Da eGFP-hMon2 stark konzentriert in der Nähe des Kerns zu beobachten war, wo endosomale Kompartimente und das Golgi erwartet werden, stellte sich die Frage, ob sich hMon2 am Golgi-Apparat befindet. Die Untersuchungen haben ergeben, dass das Signal des eGFP-hMon2 mit dem Signal des *trans*-Golgi Markerproteins p230/golgin-245 aber nicht mit dem des *cis*-Golgi Markerproteins GM130 überlappt (siehe Abbildung 5.8). Um das genauer sehen zu können wurden die HeLa Zellen 90 min vor der Fixierung mit 5 µg/ml Nocodazol im Medium behandelt (siehe Kapitel 4.2.3.15). Dadurch depolymerisieren die Mikrotubuli und die Golgi- und TGN-Strukturen fragmentieren (Cole et al., 1996). Auf den gebildeten Organellfragmenten ist das eGFP-hMon2 und das p230 Signal zusammen oder in unmittelbarer Nähe zu beobachten. GM130 ist hauptsächlich in der Nähe von eGFP-hMon2 zu finden. hMon2 befindet sich vermutlich am TGN/TEN und TGN/TEN-stammenden endosomalen Kompartimenten.

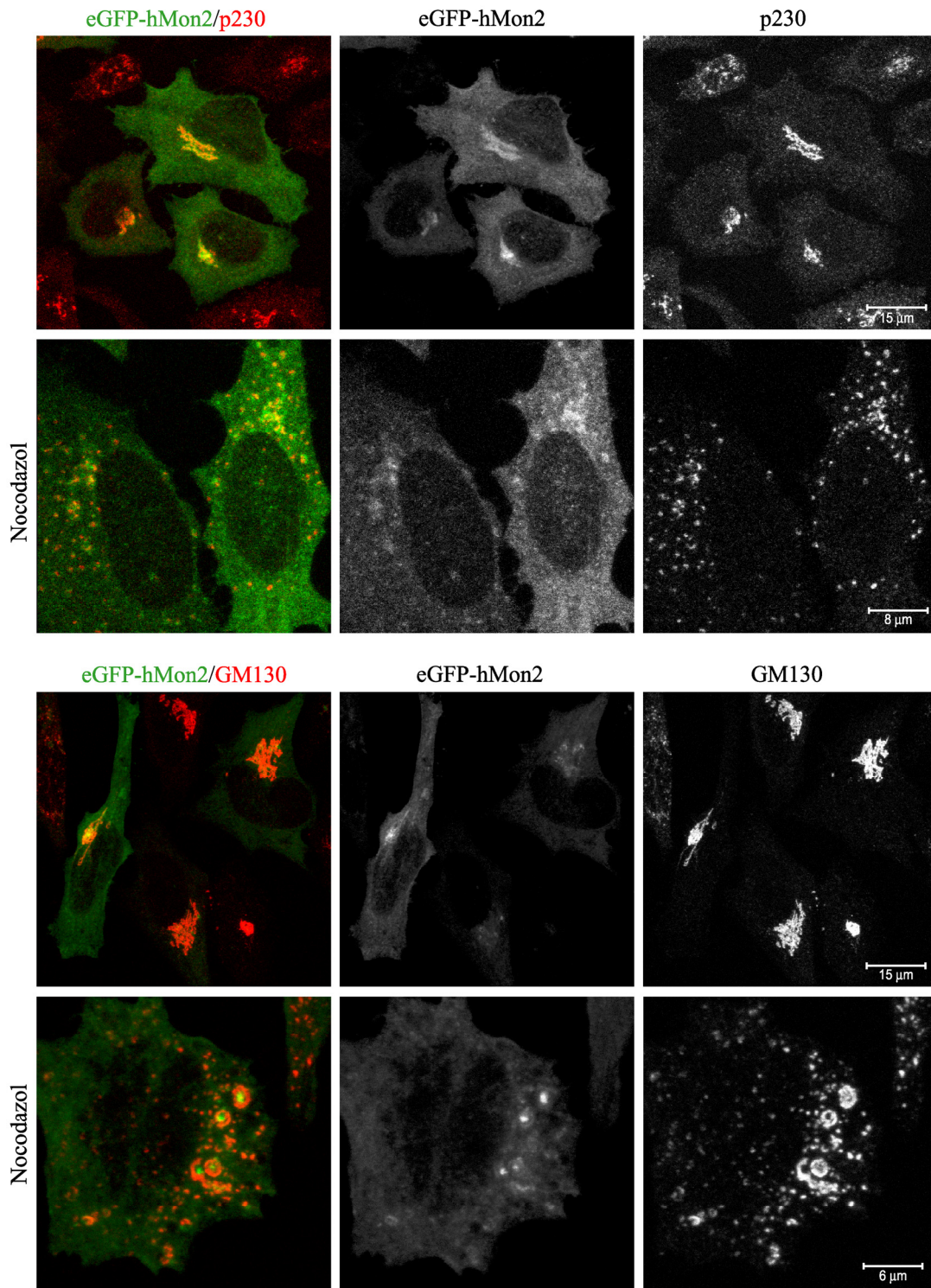


Abbildung 5.8 eGFP-hMon2 Strukturen werden am *trans*-Golgi lokalisiert.

eGFP-hMon2 wird oftmals zusammen mit dem Markerprotein p230 für *trans*-Golgi, jedoch nicht mit dem Markerprotein GM130 für cis-Golgi vorgefunden. Mit Nocodazol behandelte Zellen besitzen ein fragmentiertes Golgi-Apparat, wodurch die Koloalysierung der Proteine am Mikroskop vereinfacht wird. eGFP-hMon2 transient exprimierende HeLa Zellen wurden mit Nocodazol in DMSO (Reihen 2 und 4) oder DMSO (Reihen 1 und 3) als Kontrolle 90 min lang behandelt, mit 4% PFA und 50 mM NH₄Cl fixiert, mit 0,2% (m/v) Tween 20 und 0,5% (m/v) BSA in PBS geblockt und permeabilisiert und mit dem Antikörper gegen p230 (Reihen 1 und 2) und gegen GM130 (Reihen 3 und 4) markiert (siehe Tabelle 4.4 und Tabelle 4.8). Die mit Nocodazol

behandelten Zellen (Reihe 2 und 4) wurden größer abgebildet, um die Lokalisierung der Proteine auf den fragmentieren Strukturen besser erkennen zu können.

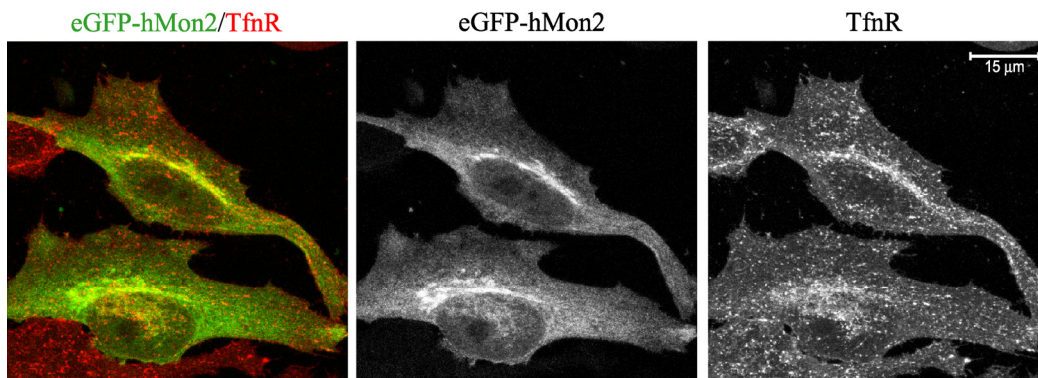


Abbildung 5.9 eGFP-hMon2 wird mit TfnR lokalisiert.

eGFP-hMon2 und TfnR werden in HeLa Zellen vor allem im perinuklearem Bereich kolokalisiert. HeLa Zellen wurden transient transfiziert mit pEGFP-C1-hMON2. Nach 20 h wurden sie mit 4% (m/v) PFA. und 50 mM NH₄Cl fixiert, mit 0,2% (m/v) Tween 20 und 0,5% (m/v) BSA in PBS geblockt und permeabilisiert, und mit anti-TfnR Antikörper markiert. Als Sekundäntikörper wurde Ziege-anti-Maus AF546 verwendet (Tabelle 4.4 und Tabelle 4.8).

Die Abbildung 5.9 zeigt, dass das pleomorphe eGFP-hMon2 Muster oftmals mit dem auch pleomorphen und punktförmigen TfnR Muster im perinuklearem Bereich überlappt. Tfn und sein Rezeptor erreichen unterschiedliche Kompartimente während des Durchlaufzyklus in der Zelle. Um herauszufinden, an welchen Kompartimenten eGFP-hMon2 und TfnR beobachtet werden, wurden eGFP-hMon2 und AF-Tfn nach verschiedenen Zeiten der AF-Tfn Aufnahme in die Zelle mikroskopisch beobachtet (siehe Kapitel 4.2.3.16). Dafür wurden HeLa Zellen mit pEGFP-C1-hMON2 transient transfiziert (siehe Kapitel 4.2.3.11). Nach ca. 20 h wurden die Zellen 2 h im serumfreien Medium SFM, anschließend zum Beladen der TfnR an der Zelloberfläche mit AF546-Tfn im gleichen Medium 30 min auf Eis inkubiert. Für eine Aufnahme der AF546-Tfn-TfnR Komplexe wurden die Zellen bei 37°C für 0 min, 2 min, 5 min und 20 min inkubiert. Bei t = 0 min oder nach 2 min, wenn das meiste AF546-Tfn über plasmamembranstammende Vesikel in frühe Endosomen transportiert wird, wurde keine Überlappung mit eGFP-hMon2 gefunden (siehe Abbildung 5.10). Nach 5 min, wenn das AF546-Tfn die rezyklierenden Endosomen durchläuft, wurde eine teilweise Überlappung von runden Strukturen im zytoplasmatischen Bereich und auch im Zellzentrum beobachtet (vergleiche Abbildung 5.9 und Abbildung 5.10). Die Überlappung von eGFP-hMon2 mit

AF546-Tfn zu späteren Zeiten nach der Aufnahme von der Plasmamembran und die Überlappung von eGFP-hMon2 mit TfnR in der Zellmitte gibt morphologisch einen Hinweis, dass sich hMon2 am endosomal rezyklierenden Kompartiment, welches in HeLa Zellen in der Nähe des TGN ist, befindet.

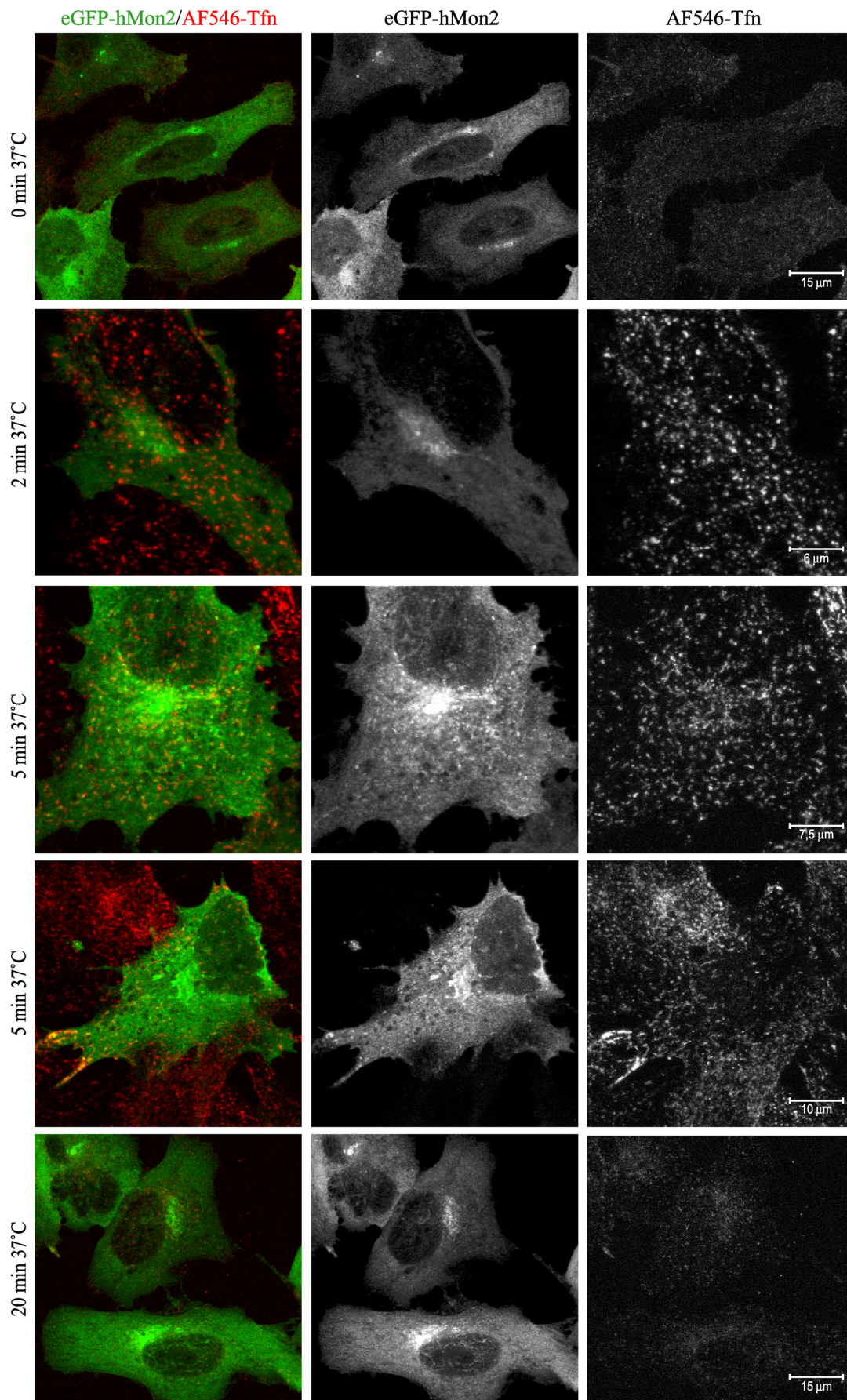


Abbildung 5.10 eGFP-hMon2 wird oftmals mit AF546-Tfn lokalisiert.

eGFP-hMon2 wird an Kompartimenten lokalisiert, die von AF546-Tfn während der Zyklisierung in der Zelle nach $t = 5$ min durchlaufen werden. HeLa Zellen wurden transient mit pEGFP-C1-hMON2 transfiziert. Nach einer Hungerung von 2 h in SFM Medium wurden die Zellen mit $25 \mu\text{g/ml}$ AF546-Tfn 30 min auf Eis inkubiert. Die Aufnahme von mit AF546-Tfn beladenen TfnR bei 37°C wurde nach verschiedenen Zeiten ($t = 0, 2, 5$ und 20 min) gestoppt. Anschließend wurden die mit Zellen mit 4% (m/v) PFA fixiert. Die Bilder wurden in geeigneter Vergrößerung aufgenommen, um die Kolokalisierung gut sichtbar zu machen.

Rezyklierende Endosomen sind von frühen Endosomen zu unterscheiden. Sie besitzen ein anderes Repertoire an Markerproteinen. Frühe Endosomen sind positiv für das Markerprotein EEA1 (engl., *early endosomal antigen*), welches beim Andocken und der Fusion von Membranen zweier Organellen wichtig ist und nach dessen Aktivierung durch Rab5-GTPase an diese Membranen peripher assoziiert (Simonsen et al., 1998; Christoforidis et al., 1999). Um die Natur der eGFP-hMon2 positiven Organellen genauer zu bestimmen wurde untersucht, ob die Signale von eGFP-hMon2 und EEA1 überlappen. Es konnte keine Kolokalisierung beider Proteine gezeigt werden (siehe Abbildung 5.11), somit ist die Präsenz von hMon2 an frühen Endosomen, die eine Fusion begehen, in humanen HeLa Zellen vermutlich auszuschließen. Dennoch wäre es möglich, dass hMon2 an anderen endosomalen Kompartimenten, welche Vesikel abknospen, fungiert.

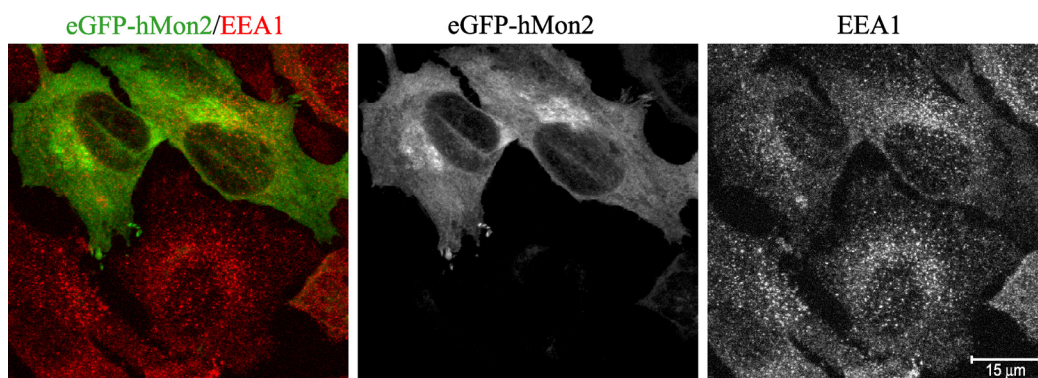


Abbildung 5.11 eGFP-hMon2 überlappt nicht mit EEA1.

eGFP-hMon2 befindet sich nicht an frühen EEA1 positiven Endosomen, da keine Überlappung von eGFP-hMon2 und dem Markerprotein EEA1 zu finden ist. eGFP-hMon2 transient exprimierende HeLa Zellen wurden mit 4% (m/v) PFA und 50 mM NH_4Cl fixiert, mit 0,2% (m/v) Tween 20 und 0,5% (m/v) BSA in PBS geblockt und permeabilisiert, anschließend gegen das früh endosomale Markerprotein EEA1 mit Antikörper gefärbt. Als Sekundärantikörper wurde Ziege-anti-Maus-AF546 verwendet (siehe Tabelle 4.4 und Tabelle 4.8).

Das Arf1 Protein wird für das Rekrutieren von AP-1, AP-3, GGA1, GGA3 und anderer Adapterproteine an die Membranen benötigt (Nie et al., 2003). Knockdown von hMon2 verursacht eine subzelluläre Umverteilung von Adapterproteinen (siehe Kapitel 5.2) und eGFP-hMon2 Strukturen überlappen teilweise mit AP-1 und GGA3 (siehe Kapitel 5.5.1). Nachdem hMon2 in der Sequenz den Arf-GEFs, die den GDP-GTP Austausch von Arf Proteinen katalysieren, ähnlich ist, wurde auch die Lokalisierung von mRFP-ARF1 und eGFP-hMon2 in HeLa untersucht. Die Zellen wurden mit Plasmiden, die für diese Proteine kodieren, transient transfiziert (siehe Kapitel 4.2.3.11). Zellen, die beide Proteine exprimieren, wurden unter dem Mikroskop analysiert. Beide Proteine lokalisieren fein verteilt im zytoplasmatischen Bereich und konzentriert an perinuklearen Strukturen (siehe Abbildung 5.12). eGFP-hMon2 und mRFP-ARF1 scheinen zum Teil an gleichen Organellmembranen präsent zu sein, was sichtbar durch überlappende Fluoreszenzmuster ist. Ob hMon2 mit ARF1 interagiert, könnte untersucht werden. In dieser Arbeit wurden keine weiteren Experimente bezüglich der Wechselwirkung von hMon2 und ARF1 Proteins durchgeführt.

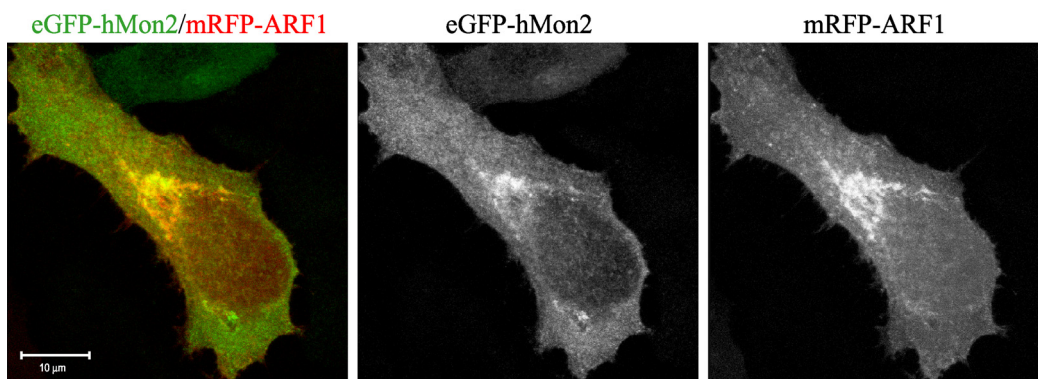


Abbildung 5.12 eGFP-hMon2 wird mit mRFP-ARF1 lokalisiert.

eGFP-hMon2 und mRFP-ARF1 werden häufig an gleichen Zellstrukturen in HeLa geortet. HeLa Zellen wurden transient transfiziert mit pEGFP-C1-hMON2 und mRFP-N1-ARF1. Nach 20 h wurden sie mit 4% (m/v) PFA und 50 mM NH₄Cl fixiert und direkt auf Objektträger in Fluoromount G eingebettet (siehe Kapitel 4.2.3.13).

5.5.3 Perinukleare eGFP-hMon2 positive Strukturen bewegen sich Richtung Zellkortex

Durch mikroskopische Untersuchungen ist aufgefallen, dass eGFP-hMon2 zum großen Teil in der perinuklearen Region situiert ist, wo normalerweise das TEN (tubuläres endosomales Netzwerk) und *trans*-Golgi Netzwerk (TGN) vorzufinden sind. Dabei sind wiederholt tubuläre Strukturen, die von der Zellmitte in Richtung Peripherie streuen, aufgefallen. Zur Untersuchung der subzellulären Verteilung und dynamischen Aktivität von eGFP-hMon2 in nicht fixierten HeLa Zellen wurden sie mittels Zeitraffervideomikroskopie an einem CellObserver Mikroskop beobachtet (siehe Kapitel 4.2.3.14). Dabei wurden Bilder in 2 sec Intervallen 5 min lang aufgenommen. Abbildung 5.13 (A-E) zeigt eGFP-hMon2 positive Strukturen, die sich vor allem von der Zellmitte, vermutlich entlang von Zytoskelettbahnen, wegbewegen. Diese Bahnen waren selten nach einer Fixierung zu beobachten. Es ist bekannt, dass bei einer Fixierung mit Methanol oder PFA die Organisation von Mikrofilamenten nicht geschützt ist (Robinson und Snyder, 2004). In Abbildung 5.13 (B) beobachtet man eine vermutlich vom TGN wachsende tubuläre Struktur. In Abbildung 5.13 (C) bei 156, 158 und 160 sec sieht man, dass sich die tubulären Strukturen in kleinere Fragmente aufteilen. In Abbildung 5.13 (E) werden Transportvesikel, die sich in Richtung der Zellmitte bewegen, aufgenommen. Diese Beobachtungen zeigen, dass eine mögliche Funktion von hMon2 im Vesikeltransport zwischen Kompartimenten, wie TGN und Endosomen, entlang von Zytoskelettbahnen bestehen könnte.

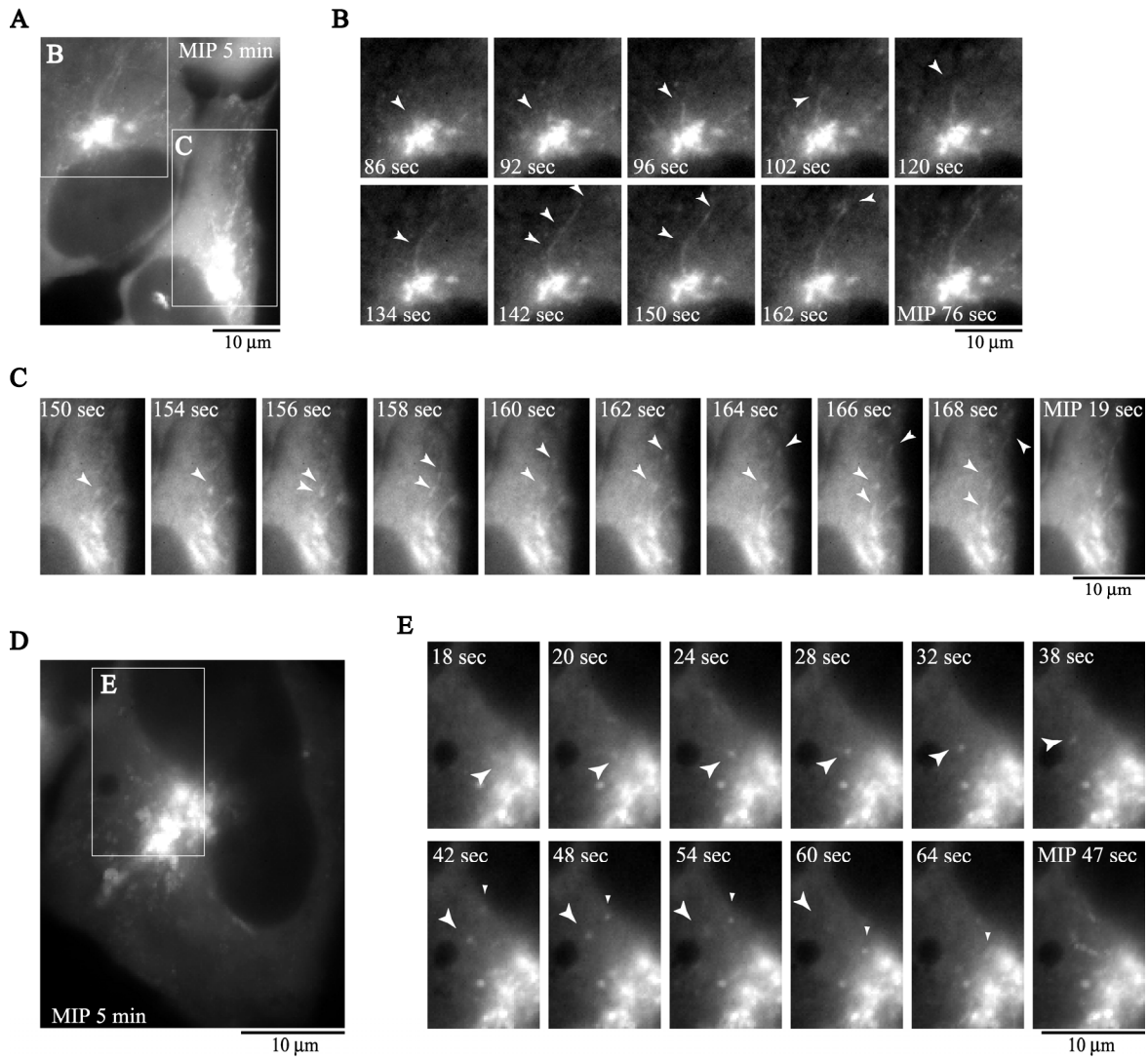


Abbildung 5.13 eGFP-hMon2 positive vesikuläre Strukturen bewegen sich innerhalb der HeLa Zellen.

Unter dem Mikroskop werden sich bewegende eGFP-hMon2 positive Strukturen beobachtet. HeLa Zellen (bei 70% Konfluenz) wurden transient transfiziert mit pEGFP-C1-hMON2 (siehe Kapitel 4.2.3.11) und am nächsten Tag bei 37°C in einer wassergesättigten Atmosphäre mit 5% (v/v) CO₂ mittels Zeitraffervideomikroskopie (Intervall von 2 sec, 5 min, Belichtungszeit 91 ms) beobachtet. (A und D) zeigen überein角度lagerte Bilder (MIP, Maximale Intensitätsprojektion) von Schnappschüssen der 5 minütigen Zeitraffervideos. Inserts in A und D zeigen einen ausgewählten Teil der Zelle (B, C und E), wo die Dynamik von eGFP-hMon2 in den angezeigten Zeitintervallen verfolgt wird. (B) zeigt relevante Schnappschüsse zwischen 86 sec-162 sec, (C) von 150 sec-168 sec und (E) 18 sec - 64 sec und am Ende der Bilderreihen jeweils die MIPs dieser Bilder. Pfeile zeigen eGFP-hMon2 als mobile tubuläre Vesikel, die sich entlang einer Bahn vom Zellzentrum entfernen (B, C und E), sowie sich dem Zentrum nähern (E, kleiner Pfeil).

5.5.4 Lokalisierung von eGFP-hMon2 und seiner Fragmente

Die großen Sec7-GEFs GBF/Gea/GNOM, BIG/Sec7 und die hMon2/Ysl2 Familie zeigen eine starke Konservierung der N-terminalen DCB- und HUS-Domänen (siehe Kapitel 3.4 und 3.5). Die Sec7-Domäne der hMon2/Ysl2 Gruppe ist nur fern mit der Sec7-Domäne der großen GEF Proteine verwandt (Jochum et al., 2002). Die HDS1-3 Domänen sind auch weniger stark konserviert (Efe et al., 2005; Gillingham et al., 2006). Der C-Terminus zwischen den drei Subgruppen ist nicht konserviert. Nach neuesten Sequenzanalysen enden Proteine der GBF1/Gea Familie nach der HDS3-Domäne, oder es folgen nur noch wenige Aminosäuren. Bei der BIG/Sec7 Gruppe wurde eine konservierte HDS4-Domäne gefunden mit einer noch unbekannter Funktion (Bui et al., 2009). hMon2/Ysl2 besitzt nach der HDS3-Domäne noch eine ungefähr 500 Aminosäuren lange C-terminale Sequenz (siehe Kapitel 3.5). In Efe et al., (2005) wurden die Proteinsequenzen der Mitglieder der hMon2/Ysl2 Familie in sechs konservierte Domänen A bis F eingeteilt, wobei die Region nach der HDS3 den Domänen E und F entspricht. Die C-terminale F-Domäne zeigt eine Sequenzähnlichkeit von 40% innerhalb der Familie (siehe Kapitel 3.5).

In dieser Arbeit wurde die C-terminale Region von hMon2 (etwa die E- und F-Domänen, siehe 3.5, Abbildung 3.4) auf eine vermutlich neue Funktion untersucht. Zuerst wurde pEGFP-C1-hMON2- Δ C (Aminosäuren 1-1200) kloniert (siehe Kapitel 4.2.1.3), welches nach der HDS3-Domäne endet, und in HeLa Zellen exprimiert (siehe Kapitel 4.2.3.11). Unter dem Mikroskop (siehe Kapitel 4.2.3.13) wurde beobachtet, dass die subzelluläre Verteilung der C-terminalen Mutante anders ist als beim Wildtyp eGFP-hMon2 (Aminosäuren 1-1717) (siehe Abbildung 5.14). Diese ist im perizentriolaren Bereich, vermutlich dem TGN/TEN, stark reduziert oder sogar verloren. Die *trans*-Golgi-Struktur ist unverändert, da das Verteilungsmuster des p230 Markerproteins nicht verändert war (Ergebnis nicht gezeigt). Für eine nähere Eingrenzung der für die subzelluläre Verteilung verantwortlichen Domäne wurden pEGFP-C1-hMON2- Δ F (Aminosäuren 1-1595) und pEGFP-C1-hMON2-F (Aminosäuren 1596-1717) konstruiert (siehe Kapitel 4.2.1.3). Unter dem Mikroskop zeigten diese Mutanten ein vergleichbares Muster wie eGFP-hMon2- Δ C. Das eGFP-C1-hMON2-F wurde wider Erwartens zum größten Teil im Zytoplasma lokalisiert. Somit kann die F-Domäne nicht allein für die subzelluläre Verteilung von hMon2 zuständig sein. Die Beobachtungen wurden in mit Methanol fixierten Zellen gemacht. Dabei wurden die zytosolischen Proteine während der Fixierung aus der Zelle zum Teil ausgeschwemmt, wodurch die an den Membranen assoziierte Proteine deutlicher zu sehen sind. Munro und

seine Gruppe zeigten (Efe et al., 2005), dass die N-terminale B-Domäne des homologen Proteins Ysl2p in *S. cerevisiae* die wichtigste Region für die Bindung an Membranen darstellt, wobei die C-Domäne die Affinität der Bindung verstärkt. Des Weiteren ist die F-Domäne von Hefe Ysl2p essentiell für die Aktivität des Proteins, jedoch nicht für das Vorkommen an den Membranen (Efe et al., 2005). Das humane und das Hefeprotein scheinen sich in der Funktion bezüglich der Membranassoziiierung der F-Domäne zu unterscheiden. Die F-Domänen von humanem hMon2 und Hefe Ysl2p könnten möglicherweise einen anderen Einfluss auf das Protein haben (siehe nächstes Kapitel).

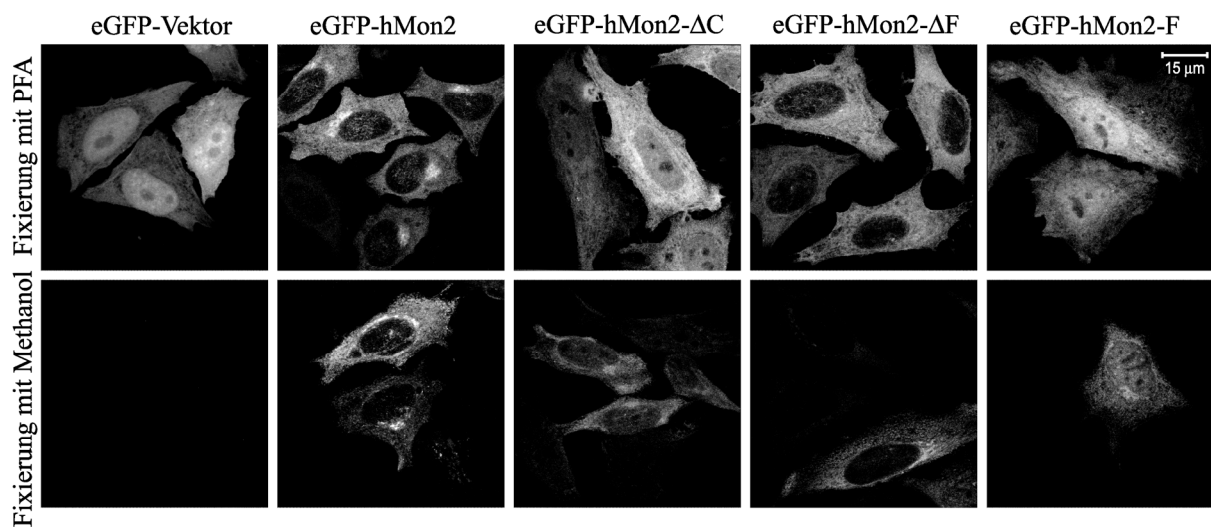


Abbildung 5.14 Der C-Terminus von hMon2 ist wichtig für die für seine subzelluläre Verteilung.

eGFP-hMon2 wird in der Zellmitte, vermutlich an TGN/TEN-Membranen lokalisiert. Eine Deletion am C-Terminus von eGFP-hMon2 (eGFP-hMon2-ΔC und -ΔF) reduziert oder unterbindet diese Beobachtung. Das C-terminale Fragment eGFP-hMon2-F wird ebenfalls weniger in der Zellmitte lokalisiert. Mit eGFP-C1-hMON2, -ΔC, -ΔF, -F und leerem Vektor (EV) transient transfizierte HeLa Zellen (bei 70% Konfluenz) wurden nach 18-20 h Wachstum 20 min mit 4% (m/v) PFA und 5 min 50 mM NH₄Cl im PBS (obere Reihe) oder mit -24°C kaltem Methanol (untere Reihe) fixiert, eingebettet und unter dem konfokalen Mikroskop (LSM-SP2, Leica) analysiert.

Es ist bekannt, dass die DCB-Domäne mit sich selbst und mit der HUS-Domäne interagieren kann (Ramaen et al., 2007). Des Weiteren kann das GNOM Protein nur als Dimer peripher an die Membran binden (Anders et al., 2008). Somit ist zu vermuten, dass die Dimerisierungseigenschaften der C-terminalen hMon2 Mutanten geschwächt ist und diese erschwert an die Membranen binden können. Die Proteine werden jedoch durch eine noch mögliche Dimerisierung zwischen den DCB- und HDS-Domänen der eGFP-hMon2 Mutanten

und den endogenen hMon2 in den HeLa Zellen peripher an die Membran gebracht. Die Beobachtungen führen zu der Vermutung, dass die F-Domäne wichtig für die Dimerisierung von hMon2 ist (vergleiche Ergebnis Kapitel 5.5.5). Die Dimerisierungsexperimente im folgenden Kapitel zeigen, dass die F-Domäne auch mit der F-Domäne interagiert (siehe Kapitel 5.5.5). Mit endogenem hMon2 in HeLa Zellen könnte ein geringer, jedoch signifikanter Anteil von eGFP-hMon2-F über die Dimerisierung der F-Domänen an die Membranen rekrutiert werden.

5.5.5 Dimerisierung von hMon2 erfolgt auch über die C-terminale F-Domäne

Aus Voruntersuchungen ist bekannt, dass das Hefe Ysl2p (Efe et al., 2005) und die Proteine der BIG/Sec7 und GBF/Gea/GNOM Familien Homodimere bilden, indem die DCB- mit einer DCB- oder HUS-Domäne (Ramaen et al., 2007) interagiert. Das *Arabidopsis thaliana* GNOM Protein kann nur als Dimer peripher an die Membranen binden (Anders et al., 2008). Das eGFP-hMon2- Δ F Protein ist im Gegensatz zum Wildtyp eGFP-hMon2 nicht an den perizentriolaren Strukturen konzentriert vorzufinden (siehe Abbildung 5.14). Das C-terminale, die F-Domäne umfassende Fragment von hMon2, eGFP-hMon2-F zeigt jedoch nur eine geringe Präsenz in diesem Bereich (vergleiche Kapitel 5.5.4, Abbildung 5.14), deshalb wurde die F-Domäne von hMon2 auf eine mögliche Dimerisierung/Multimerisierung untersucht. Die Koimmunpräzipitationsversuche wurden (nach der Standardmethode, siehe Kapitel 4.2.3.4) mit unterschiedlichen Variationen von hMon2 Mutanten (Stämme 1)-7), siehe Abbildung 5.15) durchgeführt. Dafür wurden das humane Protein und dessen Fragmente als GFP- oder HA-Fusionsproteine im Hefestamm BS64 (siehe Kapitel 4.1.11, Tabelle 4.12) exprimiert. Abbildung 5.15, Variation 1) zeigt, dass HA-hMon2 an GFP-hMon2 bindet, wodurch die Dimerisierungseigenschaft von hMon2 nachgewiesen wird (siehe Abbildung 5.15, Variation 1) Stamm AB8). GFP-hMon2 bindet auch HA-hMon2-F (siehe Abbildung 5.15, Variation 3) Stamm BS1925), was aussagt, dass die F-Domäne allein an hMon2 binden kann. GFP-hMon2- Δ F bindet HA-hMon2 aber nicht HA-hMon2-F (Variation 2) Stamm BS1934 und 4) Stamm BS1926). Dadurch ist zu vermuten, dass die F-Domäne an die F-Domäne und nicht an eine andere Region binden könnte. Die Bindungen sind spezifisch, da HA-hMon2-F oder HA-hMon2 nicht isoliert werden, wenn keine GFP-hMon2 Variante im

Versuch vorliegt (Variante 5) Stamm BS1924 und 7) Stamm BS1935). Somit habe ich gezeigt, dass die F-Domäne für eine Dimerisierung von hMon2 wichtig ist.

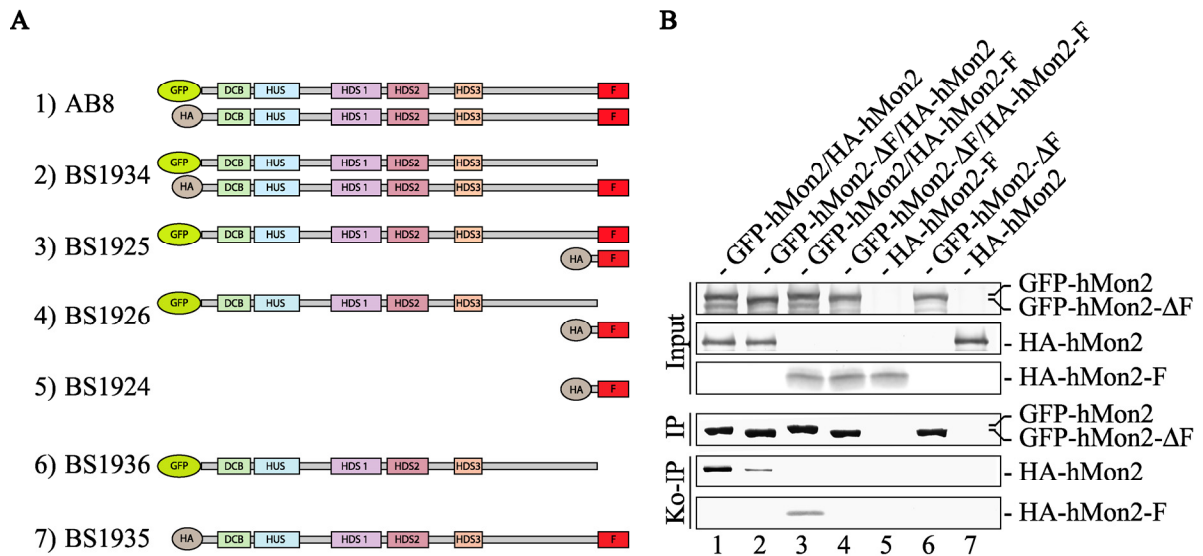


Abbildung 5.15 Die C-terminale F-Domäne von hMon2 dimerisiert.

Im Versuch wird HA-hMon2 (1) und das C-terminale Proteinfragment HA-hMon2-F (3) mit GFP-hMon2 Protein mitisoliert. GFP-hMon2-ΔF (2) bindet HA-hMon2 aber nicht die C-terminale Proteindomäne HA-hMon2-F (4). 50 OD₆₀₀-Einheiten Hefezellen, die unterschiedliche Variationen (1-7) dargestellt in A) von Wildtyp und verkürzten HA- oder GFP-markierten hMon2 Konstrukten heterolog exprimieren, wurden einer Koimmunpräzipitation mit anti-GFP Antikörper unterzogen. (B) Die Gesamtzelllysate (solubilisiert mit 0,5% (v/v) NP-40) wurden mit anti-GFP Antikörper und IgG Sepharose inkubiert. Die eluierten Proteine (IP und Ko-IP) wurden mit 7,5%, für HA-hMon2-F mit 12,5% Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Entsprechende Proteine wurden im Immunblot mit anti-GFP oder anti-HA Antikörper detektiert (siehe Kapitel 4.1.4). Abkürzungen: 1% der im Versuch eingesetzten Gesamtzelllysate (Input)*, Immunpräzipitat (IP) und Koimmunpräzipitat (Ko-IP). * Für den Nachweis von HA-hMon2-F in Gesamtzelllysaten (Input) wurde das Protein mittels anti-HA Antikörper zum Ankonzentrieren auf gleiche Weise immunpräzipitiert. Dabei wurden 50% der eluierten Proteine für die SDS-PAGE verwendet.

5.6 Protein-Proteininteraktionsstudien mit hMon2

5.6.1 Identifizierung von neuen Bindungspartnern von hMon2 durch Koimmunpräzipitation und Massenspektrometrie

In dieser Arbeit erfolgte eine Immunpräzipitation des endogenen hMon2 Proteins aus Gesamtzelllysaten von HEK293T Zellen, um durch folgende Massenspektrometrieanalyse neue Interaktionspartner von hMon2 zu finden.

Zuerst wurden Immunpräzipitationsexperimente als Vorversuche durchgeführt (siehe Kapitel 4.2.3.7). Als Antikörper wurden ein Serum nach der Immunisierung (anti-hMon2 Serum) und für die Kontrolle ein Serum vor der Immunisierung (Kontrollserum) eines Kaninchens gegen die hMon2 spezifische Peptidsequenz DVLHRYIEDERLSGKC verwendet. Zuerst wurde Protein A Sepharose mit den Antikörpern und anschließend mit Gesamtzelllysaten von HEK293T Zellen inkubiert. Nun wurde die Protein A Sepharose Matrix durch Zentrifugation vom Überstand getrennt, gewaschen und mit SDS-Probenpuffer (vergleiche Abbildung 5.16, A und B) eluiert. Dann wurden die Eluate mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Gele mit Silber oder kolloidalem Coomassie Brilliant Blau G-250 (siehe Kapitel 4.2.2.3 und 4.2.2.4) gefärbt (vergleiche Abbildung 5.16, A). Die Gele zeigten Banden von Proteinen die in beiden Eluaten und zusätzliche Banden die nur mit anti-hMon2 Serum mitisoliert wurden (siehe Abbildung 5.16, A). Ebenso konnte durch Western Blot gezeigt werden, dass hMon2 mit anti-hMon2 Serum, jedoch nicht mit Kontrollserum isoliert wurde (vergleiche Abbildung 5.16, B und C). Dabei wurde ein starkes Hintergrundsignal beobachtet, welches sich durch Elution von hMon2-Protein-Komplexen von der Sepharose Matrix durch Einsatz des zur Antikörperproduktion verwendeten Peptids (DVLHRYIEDERLSGKC) reduzieren lies (siehe Abbildung 5.16, C). Leider wurden mit dem Peptid auch Proteine, die vermutlich eine Kreuzreaktion (gekennzeichnet mit *) mit dem anti-hMon2 Serum begehen, miteluiert (siehe Abbildung 5.16, C). Mann kann auch erkennen, dass nachdem hMon2 und dessen Bindepartner mit dem Peptid in drei sukzessiven Schritten (siehe Abbildung 5.16, C, Spuren 1PE, 2PE, 3PE) scheinbar vollständig eluiert wurden, mit SDS-Probenpuffer weiteres hMon2 und andere sehr viele unspezifisch bindende Proteine eluiert wurden (siehe Abbildung 5.16, C, Spur 4SE, ersichtlich an dem dunklen Hintergrund). Für Zubereitung der Proben für die Massenspektrometrieanalyse wurde daher entschieden, hMon2 und seine Bindepartner mit Peptid zu eluieren.

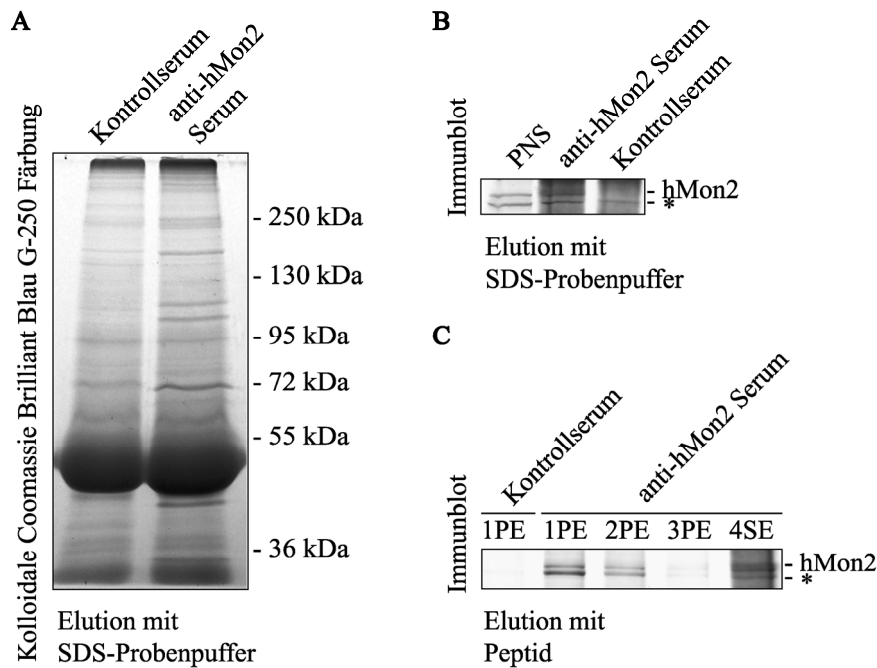


Abbildung 5.16 Koimmunpräzitationsversuche für die Ermittlung neuer Bindepertner von hMon2.

hMon2 und seine Interaktionspartner werden aus HEK293T Zellextrakten mit anti-hMon2 Antikörper isoliert. Anti-hMon2 Serum und Kontrollserum wurden mit Protein A Sepharose inkubiert. Anschließend wurden damit Zelllysate, nach Entfernen von ungelösten Zellteilen und Kernen (PNS, engl., *postnuclear supernatant*, entspricht dem Input), aus HEK293T Zellen 1 h bei 8°C inkubiert. An die Matrix gebundene Proteine wurden mit SDS-Probenpuffer eluiert (A und B). Die Proteine wurden durch SDS-PAGE separiert und mit der kolloidalen Coomassie Brilliant Blau G-250 Methode angefärbt (A) und der hMon2 Nachweis mittels Immunblot mit anti-hMon2 Antikörper durchgeführt (B und C). (C) zeigt hMon2 und seine Interaktoren, die mit einem Peptid von der Sepharose Matrix eluiert wurden. Proteine die mit Kontrollserum gebunden wurden, wurden einmal mit Peptidlösung (1PE, Peptidelution) eluiert. Proteine die mit anti-hMon2 Serum gebunden wurden, wurden drei mal sukzessive mit einer Peptidlösung (1PE, 2PE, 3PE) und anschließend mit SDS-Probenpuffer (4SE, SDS-Probenpufferelution) von der Sepharose-Matrix eluiert. * Kreuzreaktion des anti-hMon2 und Kontrollserums.

Um herauszufinden, welche Proteine mit dem anti-hMon2 Serum isoliert wurden, wurden die Proteine mittels denaturierender SDS-PAGE getrennt und die Gele mittels einer sensitiven Anfärbung der Proteine mit Coomassie Brilliant Blau G-250 (siehe Kapitel 4.2.2.6) sichtbar gemacht. Die Probenvorbereitung erfolgte mit Hilfe von Dr. Tore Kempf (DKFZ, Heidelberg). Dabei wurden die interessanten Banden, welche nur bei der IP mit anti-hMon2 und nicht mit Kontrollserum isoliert wurden, ausgeschnitten. Das waren bei der MS-Analyse BSK1395 die Banden 15, 1, 0, 6, 2, 11, 4 und 9 (siehe Abbildung 5.17, A, bei ca. >600 kDa, 250 kDa, 220 kDa, 120 kDa, 95 kDa, 61 kDa, 43 kDa) und bei der MS-Analyse BSK1401 die Banden 5, 7, 8, 14, 21, 22, 23, 24, 25 (siehe Abbildung 5.17, A, bei ca. 130 kDa, 110 kDa,

65 kDa, 55 kDa und 4 Banden zwischen ca. 38 und 48 kDa). Arbeiter der Gruppe von Dr. Martina Schnölzer haben die Proteine der Proben nach einer Vorbehandlung (Entfärbung, Reduktion und Alkylierung) durch einen enzymatischen Verdau mit Trypsin in kleinere Stücke zerlegt. Diese Peptidproben wurden für die Analyse in ein ESI-Tandem-Spektrometer injiziert.

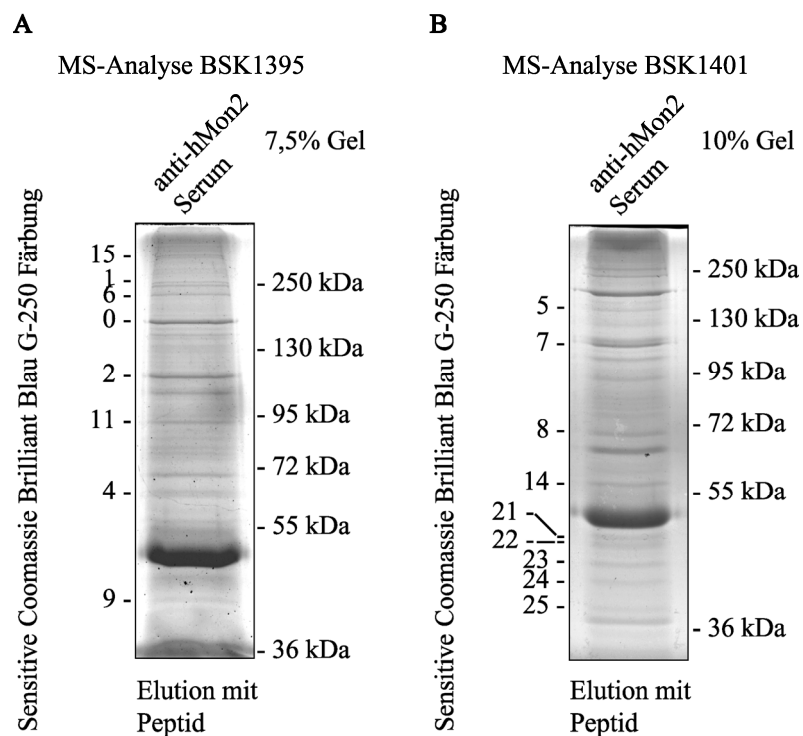


Abbildung 5.17 SDS-Gele für die MS-Analysen BSK1395 und BSK1401 zur Ermittlung neuer Interaktionspartner von hMon2.

Aus den Gelen (A) und (B) wurden Proben (Proteinbanden) für die MS-Analysen zur Ermittlung neuer Bindepartner von hMon2 in HEK293T Zellen entnommen. Die Immunpräzipitation von hMon2 und seinen Bindepartnern wurde wie in der Legende der Abbildung 5.16 beschrieben durchgeführt. Dabei wurden hMon2 und seine Interaktoren mit einer Peptidlösung von den Sepharose-Matrix eluiert, mit SDS-PAGE separiert und mit der sensitiven Coomassie Brilliant Blue G-250 Methode angefärbt. (A) zeigt das 7,5% Gel, welches für die MS-Analyse BSK1395 verwendet wurde, und (B) das 10% Gel für die MS-Analyse BSK1401. Markiert mit Nummern sind die ausgeschnittenen und untersuchten Banden. (A) Banden 15, 0, 1, 6, 2, 11, 4, 9 und (B) Banden 5, 7, 8, 14, 21, 22, 23, 24, 25.

Für die Identifizierung der Proteine wurden die ermittelten Peptide mit theoretischen Peptiden aus Datenbanken (NCBI, National Center for Biotechnology Information, www.ncbi.nlm.nih.gov) verglichen und die Identität oder Homologie bestimmt. Der Grad der Übereinstimmung der ermittelten und theoretischen Peptidmassen wird durch den "Score"-

Wert definiert. Mit Hilfe des Mascot Search Results Programms (Matrix Science) wurden dann die ermittelten Peptidmassen den Proteinen zugeordnet, die einen signifikanten Score-Wert erzielen (>30).

Je analysierte Bande wurden 20-80 Proteine mit einem Score über 30 identifiziert, viele davon aber mit einer geringeren Trefferanzahl (engl., *number of hits*). Da die Immunpräzipitation mit einem Serum durchgeführt wurde, wurden trotz der Elution mit einem Peptid (siehe oben) vermutlich eine große Zahl von nicht an hMon2 bindenden, unspezifischen Proteinen aus den Gesamtzellextrakten der HEK293T Zellen als Verunreinigung (u.a. viele Zelladhensionsproteine wie Keratine, Filamine, Taline) mitisoliert. Für weitere Untersuchungen wurde ein Fokus auf Proteine (siehe Tabelle 5.1) gesetzt, von welchen bekannt ist, dass sie in der Vesikelbiogenese oder dem Membrantransport eine Rolle spielen und mittels erneuten Immunpräzipitationen und Immunblot auf spezifische Bindung untersucht (siehe Kapitel 5.6.2). Dabei waren das ubiquitäre Protein KIF5B (uKHC, Kinesin-1), KIF4A, nicht-muskuläres Myosin 9, Myosin 10 und Myosin 14 (Myosin II A, B und C, drei Isoformen von NM-MHCII, dem Myosin II), Clathrin schwere Kette 1 (engl., *clathrin heavy chain 1*, CHC1), p230 (Golgin-245), zytoplasmatisches Dynein 1 schwere Kette 1 (Dynein-1 HC), TfnR und einige Mitglieder eukaryoter Initiationsfaktoren (eIF), vor allem Untereinheiten des eIF3 Komplexes (siehe Kapitel 5.6.3). Dabei war auch die Untereinheit des Arp2/3 Komplexes ARP3 beta vorzufinden.

Tabelle 5.1 Tabellarische Auflistung von interessanten oder/und ausgewählten Proteinen zur weiteren Untersuchung auf Bindung mit hMon2

ausgeschnittene Bande	Nr.	Identifikationsnummer	Proteininformation	Protein Score	Masse (Da)	Trefferanzahl
090622_BSK1395_15	1	gi 33350932	cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1 [Homo sapiens]	5283	534809	127
090617_BSK1395_6	2	gi 12667788	myosin, heavy polypeptide 9, non-muscle [Homo sapiens]	2218	227646	45
090617_BSK1395_0	4	gi 4758012	clathrin heavy chain 1 [Homo sapiens]	1229	193260	28
090617_BSK1395_2	4	gi 4758648	kinesin family member 5B [Homo sapiens]	885	110358	16
090617_BSK1395_6	12	gi 187956363	myosin, heavy chain 10, non-muscle [Homo sapiens]	608	229927	13
090617_BSK1395_11	9	gi 221040390	transferrin receptor (p90, CD71) [Homo sapiens]	593	85304	13
090617_BSK1395_1	20	gi 1173565	golgin-245 [Homo sapiens]	299	245291	11
090617_BSK1395_1	18	gi 33350932	cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1 [Homo sapiens]	315	534809	10
090703_BSK1401_7	16	gi 4758648	kinesin family member 5B [Homo sapiens]	437	110358	8
090617_BSK1395_6	15	gi 194383436	myosin, heavy chain 14 [Homo sapiens]	403	228835	8
090703_BSK1401_22	23	gi 381964	actin-related protein	255	42659	7
090622_BSK1395_9	34	gi 381964	actin-related protein	206	42659	7
090703_BSK1401_5	39	gi 5802957	KIF4 [Homo sapiens]	221	141402	5
090703_BSK1401_14	42	gi 5531813	dynein light chain-A [Homo sapiens]	98	56877	3
090617_BSK1395_2	40	gi 4758012	clathrin heavy chain 1 [Homo sapiens]	33	189020	1

5.6.2 Identifizierung von Kinesin-1 und Myosin II als hMon2 Bindepartner mittels Koimmunpräzipitationsversuchen

Zur Überprüfung auf Interaktion von hMon2 mit den bei Massenspektroskopieanalyse gefundenen möglichen Bindepartnern wurden weitere Immunpräzipitationsversuche (siehe Kapitel 4.2.3.7) aus HEK293T Zellen und Immunblotanalysen durchgeführt. Dabei wurde zuerst das Serum mit Protein A Sepharose inkubiert (Sepharose-IgG). Anschließend wurden damit die Zelllysate inkubiert. Danach wurden die hMon2-Bindepartner-Komplexe mit einem Überschuss an Peptid (vergleiche Kapitel 5.6.1) mittels Kompetitionsreaktion von der Sepharose-IgG Matrix eluiert. Abbildung 5.18 A und B zeigen die spezifische Bindung von hMon2 durch anti-hMon2 Serum. Mit Kontrollserum 9A (Präimmunsereum eines Kaninchens, das gegen ein anderes Protein immunisiert wurde) erfolgt keine Isolierung von hMon2. Die Proteine Kinesin-1/KIF5B und Myosin II konnten zusammen mit hMon2 kopräzipitiert werden, während das Golgin p230, Dynein-1 HC und CHC1 im Präzipitat nicht nachgewiesen werden konnten. Als weitere Kontrolle der Spezifität der Bindung von Kinesin-1 und Myosin II an hMon2 wurde ein Versuch durchgeführt, bei dem vor der Lysatzugabe die mit Antikörper gekoppelte Sepharose Matrix einmal mit (mit Peptidkompetition) und einmal ohne Peptid (ohne Peptidkompetition) inkubiert wurde (siehe Abbildung 5.18 C). Bei der Immunpräzipitation mit vorheriger Inkubation mit Peptid konnte nach Elution kein hMon2 im Western Blot detektiert werden, was auf keine oder nur geringere, nicht detektierbare Immunisolierung von hMon2 hindeutet. Kinesin-1 und Myosin II konnten demzufolge auch nicht detektiert werden. Dagegen wurden im Versuch ohne Peptidkompetition hMon2 und seine spezifischen Bindepartner Kinesin-1 und Myosin II detektiert. Hier ist aber zu erwähnen, dass im Western Blot die Banden der Proben aus der Immunpräzipitation (IP) häufig andere, geringere jedoch signifikante, Migration (langsamer) als die der Totalzellextrakte (schneller) hatten. Der Grund dafür ist unbekannt. Für die Abbildung 5.18 wurden die besten Western Blots ausgesucht.

Während dieser Versuche stand nicht mehr genügend Kontrollserum (Serum vor der Immunisierung gegen hMon2, Kontrollserum hMon2) zur Verfügung. Im Versuch wurde das Kontrollserum 9A im Vergleich zu dem Kontrollserum hMon2 als geeignete negativ Kontrolle bestätigt (siehe Abbildung 5.18 C), da es kein hMon2 unspezifisch gebunden hat.

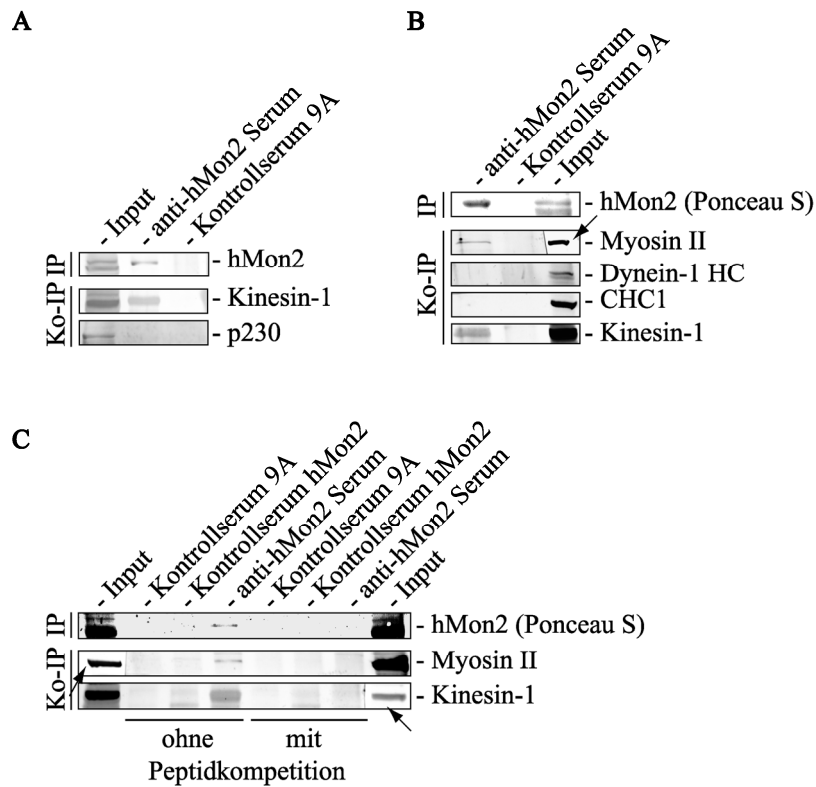


Abbildung 5.18 Endogenes hMon2 bindet an Kinesin-1 und Myosin II.

Kinesin-1 und Myosin II wird mit endogenem hMon2 aus HEK293T Zelllysaten koimmunpräzipitiert. Immunpräzipitationsversuch wurde wie im Text zur Abbildung 5.16 beschrieben durchgeführt. Die hMon2-Bindepartner-Komplexe wurden von den Sepharose-IgG Matrix mit einem Peptid eluiert. (A) bestätigt die Isolierung von hMon2 mit anti-hMon2 Serum, während mit Kontrollserum 9A kein hMon2 isoliert wird (Immunblot mit affinitätsgereinigtem anti-hMon2 Antikörper). Kinesin-1 und nicht p230 werden mit hMon2 isoliert. (B) zeigt immunpräzipitiertes hMon2 (sichtbar gemachte Färbung mit Ponceau S) und die Mitisolierung von Myosin II und Kinesin-1. Die Proteine Dynein-1 HC, CHC1 konnten nicht mitisoliert werden. (C) Im Kontrollversuch wurde zu der mit Serum IgGs beladenen Sepharose einmal Peptid und einmal kein Peptid zugegeben bevor sie mit den Zelllysaten der HEK293T Zellen inkubiert wurde. Im Versuch mit Peptidkompetition wurde kein hMon2 und kein Kinesin-1 und Myosin II detektiert. Das Kontrollserum 9A wird durch Vergleich zum Kontrollserum hMon2 als geeignete Negativkontrolle bestätigt. Die mit Pfeilen markierten Fragmente der Nitrozellulosemembran wurden abgeschnitten, um die Entwicklungszeit kürzer zu halten, als für den anderen Teil der Membran. Als Input wurde 1% der Zelllysate verwendet. Das immunpräzipitierte hMon2 Protein wurde hier durch die Färbung der Nitrozellulosemembran mit Ponceau S sichtbar gemacht. Es wurde ein Antikörper, der Myosin II Isoform A und B erkennt, verwendet (siehe Kapitel 4.1.4.1).

5.6.3 Weitere gefundene mögliche Interaktionspartner von hMon2

Bei den mittels Massenspektrometrieanalyse (siehe Kapitel 5.6.1) ermittelten Proteinen, die an hMon2 binden könnten waren viele Untereinheiten der eukaryotischen Translationsinitiationsfaktoren der eIF3 und auch eIF4 (engl., *eukaryotic translation initiation factor*) Komplexe vertreten (siehe Tabelle 5.2). Am häufigsten wurden Peptide (Trefferanzahl an Peptidmassen) der eIF3S10 Untereinheit (auch eIF3A genannt, Identifikationsnummer gi|4503509, siehe Tabelle 5.2) gefunden. Die Immundetektion mit einem anti-eIF3S10 Antikörper (siehe Kapitel 4.1.4.1) hat eine Proteinbande in HEK293T Zellen gezeigt. Jedoch migriert das Protein eIF3S10 (berechnete Größe ist ca. 167 kDa) im SDS-Gel auf der Höhe von hMon2 (berechnete Größe ist 190 kDa), weshalb die Spezifität des Antikörpers und die Anwesenheit des eIF3S10 Proteins nicht sicher bestätigt werden konnte (Daten nicht gezeigt). Für genaue Untersuchungen der vermutlichen Interaktion von hMon2 und der Untereinheiten des eIF3 Komplexes müssen andere Nachweismethoden vorgenommen werden. Beispielsweise eine Immundetektion gegen eine Untereinheit, die in der Massenspektrometrie gefunden wurde und eine andere Größe als hMon2 hat (zum Beispiel die eIF3 Untereinheiten A, B oder C).

Tabelle 5.2 Tabellarische Auflistung von Komponenten der eukaryotischen Translationsinitiationsfaktoren der eIF3 und eIF4 Komplexe aus der MS-Analyse

ausgeschnittene Bande	Nr.	Identifikationsnummer	Proteininformation	Protein Score	Masse (Da)	Trefferanzahl
090617_BSK1395_0	1	gi 4503509	Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit A [Homo sapiens]	5033	166867	264
090703 BSK1401 21	1	gi 4503521	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 6 48kDa [Homo sapiens]	1734	52587	98
090703 BSK1401 24	1	gi 4503515	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 3 gamma, 40kDa [Homo sapiens]	1572	40076	70
090703 BSK1401 22	1	gi 4503521	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 6 48kDa [Homo sapiens]	1607	52587	64
090617_BSK1395_6	3	gi 4503509	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 10 theta, 150/170kDa [Homo sapiens]	2059	166867	61
090703 BSK1401 21	3	gi 4503529	eukaryotic translation initiation factor 4A isoform 1 [Homo sapiens]	1422	42386	57
090617_BSK1395_1	4	gi 4503509	Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit A [Homo sapiens]	1719	166867	55
090703 BSK1401 22	5	gi 4503519	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 5 epsilon, 47kDa [Homo sapiens]	1058	37654	52
090703 BSK1401 25	1	gi 23397429	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit M [Homo sapiens]	1075	42932	49
090703 BSK1401 22	3	gi 48146385	EIF3S4 [Homo sapiens]	1233	35864	42
090703 BSK1401 21	13	gi 48146385	EIF3S4 [Homo sapiens]	587	35864	15
090703 BSK1401 22	13	gi 4503529	eukaryotic translation initiation factor 4A isoform 1 [Homo sapiens]	541	42386	14

Olivier Deloche und Jesus de la Cruz haben in einem Hefescreen gefunden, dass die *MON2/YSL2* Deletion mit einer Mutante des *TIF3* Gens synthetisch lethal ist (Deloche et al., 2004; Efe et al., 2005). *TIF3* kodiert für einen Initiationsfaktor der Translation und ist homolog zu humanem eIF4B (26% Aminosäureidentität) (Altmann et al., 1993). Tif3p interagiert mit der eIF3g/Tif35p Untereinheit des eIF3 Komplexes in Hefe (Vornlocher et al., 1999; Hinnebusch, 2006). Genauso interagiert eIF4B mit eIF3A in humanen Zellen (Kroczyńska et al., 2009). Wie der Name schon sagt kontrollieren die eIF Komplexe (eIF1 bis eIF6) die mRNA Translation zu Proteinen am Ribosom. eIF4 und eIF3 rekrutieren mRNA an die 40S Ribosom Untereinheit. Dabei kontrolliert eIF3 die Zusammenlagerung der 40S Ribosom Untereinheit mit der mRNA und eIF4 positioniert die 5'UTR (engl., *untranslated region*) der mRNA an die 40S Ribosom Untereinheit für die Initiierung der Translation (Gingras et al., 1999; Siridechadilok et al., 2005; Sonenberg und Hinnebusch, 2009). Diese genetische Wechselwirkung von *MON2/YSL2* mit *TIF3* unterstützt meine Ergebnisse aus der Massenspektrometrie bezüglich einer möglichen Interaktion zwischen hMon2 und den eIF Untereinheiten.

5.6.4 Kinesin-1 koimmunpräzipitiert mit eGFP-hMon2 aus HEK293T Zelllysaten

Kinesin-1 wurde zusammen mit hMon2 bei der Immunpräzipitation mit anti-hMon2 Serum isoliert (siehe Kapitel 5.6.2). Der dadurch gewonnene Hinweis auf eine Interaktion beider Proteine wurde durch einen weiteren Versuch unterstützt. In HEK293T Zellen wurde eGFP-hMon2 und eGFP-Vektor als Kontrolle transient exprimiert. Durch eine Immunpräzipitation (siehe Kapitel 2.2.3.6) mit anti-GFP Antikörper wurde Kinesin-1 mit eGFP-hMon2 präzipitiert (siehe Abbildung 5.19 A).

Bekannt ist, dass das zu hMon2 homologe Arf-GEF Protein der BIG/Sec7 Familie BIG1 mit dem C-terminalen Aminosäuren direkt nach der Sec7-Domäne (885-1849), die der Region der HDS1-3 Domänen entsprechen (siehe Kapitel 3.4), an KIF21A (ein Mitglied der Kinesin-4 Gruppe) bindet (Shen et al., 2008). Als ein Vortest für die Identifizierung des Bindebereichs von hMon2 an Kinesin-1, wurde das C-terminal deletierte eGFP-hMon2- Δ C, welches nach der HDS3-Domäne endet, untersucht (siehe Kapitel 3.5). Im Immunblot wurde eine Bindung von Kinesin-1 an eGFP-hMon2- Δ C (Δ 1200-1717) in zwei unabhängigen Versuchen detektiert (siehe Abbildung 5.19 B). In der Abbildung (A und B) gezeigte Immunpräzipitationen

wurden zusammen in einem Versuch durchgeführt, jedoch auf zwei verschiedenen Gelen elektrophoretisch separiert. Dabei gilt in B die Bindung von Kinesin-1 an eGFP-hMon2 als Positivkontrolle. Für ein aussagekräftiges Ergebnis bezüglich der Bindung von Kinesin-1 an eGFP-hMon2- Δ C, müsste die Negativkontrolle (eGFP-Vektor) auf dem selben Gel aufgetragen werden. Trotzdem ist es ein Hinweis, dass die C-terminale Aminosäuren 1200-1717 von hMon2 nicht für die Bindung an Kinesin-1 verantwortlich sind.

Im Lysat der HEK293T Zellen (Input, siehe Abbildung 5.19) ist eine Doppelbande des Kinesins zu sehen, wohingegen im Präzipitat (Ko-IP, siehe Abbildung 5.19) aber nur die obere Bande detektiert wird. Hierbei könnte es sich um eine post-tranlationäre modifizierte Version von dem Kinesin Protein handeln mit der das transient exprimierte eGFP-hMon2 interagiert. Ebenfalls könnten sich im HEK293T Zelllysat Proteine befinden, welche von anti-Kinesin-1[H2] Antikörper unspezifisch erkannt werden. Dies könnte mithilfe eines Depletionsexperiments von KIF5B überprüft werden. Dabei sollten die Proteinbanden des Kinesin Proteins im Zelllysat nicht mehr detektierbar sein.

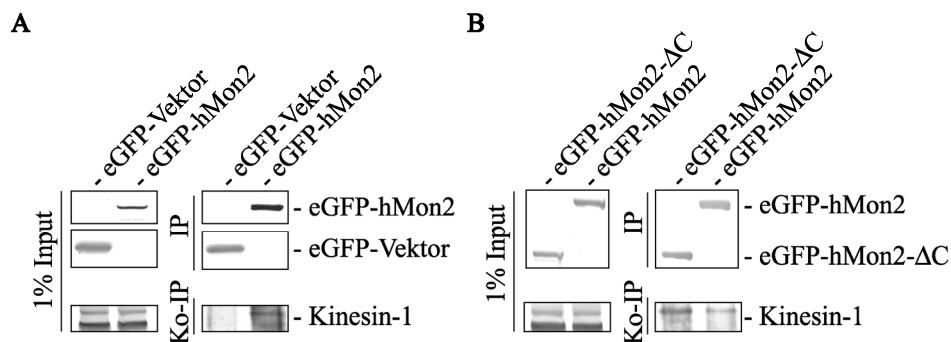


Abbildung 5.19 Koimmunpräzipitation von Kinesin-1 mit eGFP-hMon2.

Kinesin-1 wird mit eGFP-hMon2 (A) und mit eGFP-hMon2- Δ C (B) aus HEK293T Zellextrakten koimmunpräzipitiert. 75% konfluente HEK293T Zellen (auf 60 cm² Schalen) wurden mit pEGFP-C1-hMON2 oder pEGFP-C1-Vektor und (B) pEGFP-C1-hMON2 oder pEGFP-C1-hMON2- Δ C transient transfiziert. Nach 20 h wurden die Zellen geerntet und mit 1% (m/v) NP-40 (in MLB Puffer) lysiert. Bei der Immunpräzipitation von eGFP-hMon2 (A und B) oder eGFP-hMon2- Δ C (B) mittels anti-GFP Antikörper wurde Kinesin-1 mitisoliert, bei eGFP-Vektor nicht. Die Proben wurden mittels eines 7,5% Gels aufgetrennt. Für die Detektion von eGFP-Vektor wurde ein 12,5% Gel verwendet. Kinesin-1 wurde mit anti-Kinesin-1[H2] Antikörper und eGFP-hMon2, - Δ C und -Vektor mit anti-GFP Antikörper immundetektiert (Immundetektionspuffer; 3% (m/v) BSA, 0,2% Tween 20 in PBS). Abkürzungen: Im Versuch eingesetzte Gesamtzelllysate (Input), Immunpräzipitat (IP) und Koimmunpräzipitat (Ko-IP).

5.6.5 Interaktionsstudien von hMon2 mit Kinesin-1 und KLC2

Um die Ergebnisse bezüglich der Interaktion von hMon2 und dem ubiquitär exprimierten Kinesin-1/KIF5B weiter zu stützen, wurden GST-Pulldownexperimente durchgeführt. Kinesin-1 bindet seine Interaktionspartner direkt über die C-terminale Region oder indirekt über die Mitbeteiligung der Kinesin leichte Kette (KLC, siehe Kapitel 3.6) (Adio et al., 2006), deshalb wurde überprüft ob hMon2 das Kinesin-1 bei Anwesenheit von KLC2 im Versuch stärker bindet. KLC2 ist die häufigste Form von Kinesin leichte Kette in nicht-neuronalen Zellen (Rahman et al., 1998). Dafür wurden für die Bindungsexperimente die C-terminalen Aminosäuren 771-963 des Kinesin-1 Proteins KHC771-963 (KHC, engl., *kinesin heavy chain*), das KLC2 als Bindepartner allein oder zusammen mit KHC771-963 im Versuch getestet. Als GST-Fusionsproteine wurden sie in *E. coli* BL21 exprimiert (GST-KHC771-963), gereinigt (siehe Kapitel 4.2.3.17) und für die GST-Pulldownexperimente eingesetzt (siehe Kapitel 4.2.3.18). Die Reinigung wurde mit SDS-PAGE und Coomassie Brilliant Blau G-250 Färbung überprüft (siehe Abbildung 5.20, A). Die Anwesenheit von GST-KHC771-963 (migriert bei ca. 50 kDa) und GST-KLC2 (bei ca. 95 kDa) konnte bestätigt werden, jedoch waren bei beiden Proben viel freies GST (ca. 26 kDa) und bei der GST-KLC2 Probe viele kürzere Fragmente zu beobachten. Bei dem GST-Pulldownexperiment wurden bei unterschiedlichen Bedingungen jeweils insgesamt 80 µg der GST-Fusionsproteine an Glutathion Sepharose CL-4B vorgebunden, anschließend mit Zelllysaten (0,5% (m/v) Triton X-100 oder 0,5% (m/v) NP-40) von Hefe Zellen (BS64), die HA-hMon2 oder eGFP-hMon2 exprimieren, inkubiert (siehe Kapitel 4.2.3.18). Als Kontrolle wurde das rekombinante Protein GST-Ypt7p, das nicht an hMon2 binden sollte, verwendet.

Nach relativ langer Entwicklung des Immunblots wurde beobachtet, dass GST-KHC771-963 deutlich stärker an hMon2 (als eGFP- oder HA-Fusionsprotein) bindet als GST-KLC2 oder die Kontrolle GST-Ypt7p (siehe Abbildung 5.20, B entsprechend Spuren 2, 1 und 3). Das Signal von eGFP-hMon2 ist in der Abbildung 5.20, B zweite Spur gut sichtbar, während es in der ersten und dritten Spur nur wenig zu sehen ist. GST-KHC771-963 in Anwesenheit von GST-KLC2 (beide GST-Proteine im gleichen Molverhältnis eingesetzt, mit insgesamt 80 µg Protein) scheint hMon2 nicht stärker als GST-KHC771-963 allein zu binden, da die Bandenintensität deutlich schwächer ist. Vermutlich beeinflusst KLC2 die Interaktion von hMon2 und Kinesin-1 nicht.

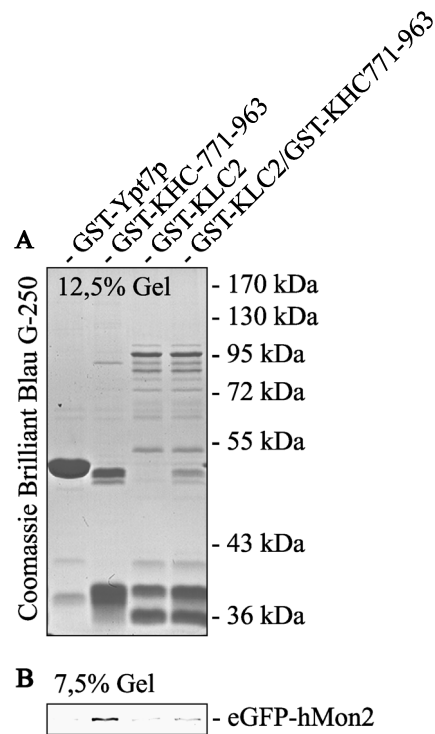


Abbildung 5.20 eGFP-hMon2 bindet an GST-KHC771-963.

Im GST-Pulldown Versuch wird eGFP-hMon2 mit GST-KHC771-963 isoliert. Zellysate (mit 0,5% Triton X-100 als Detergenz im Lysepuffer, siehe Kapitel 4.2.3.18) aus 50 OD₆₀₀ Einheiten Hefe, die heterogen eGFP-hMon2 exprimieren, wurden mit 80 µg GST-Fusionsproteinen, die 1 h an die Glutathionsepharose vorgebunden wurden, 1 h inkubiert. (A) Ein mit Coomassie Brilliant Blau G-250 gefärbtes 10% (m/v) Acrylamid-Gel zeigt die gereinigten Proteine GST-Ypt7p, GST-KHC771-963, GST-KLC2 und GST-KLC2/GST-KHC771-963. (B) Immunblot (7,5% Gel) von mitisolierten eGFP-hMon2 durch GST-KHC771-963. Eluate wurden in der gleichen Reihenfolge aufgetragen wie bei (A). eGFP-hMon2 wurde mit anti-GFP Antikörper detektiert.

5.6.6 eGFP-hMon2 wird mit Kinesin-1 in HeLa Zellen kolokalisiert

Zur Vertiefung des Befunds über die Wechselwirkung zwischen hMon2 und Kinesin-1 wurde eine Untersuchung der subzellulären Verteilung der Proteine mittels Immunfluoreszenz durchgeführt. Dafür wurde eGFP-hMon2 in HeLa Zellen transient transfiziert (siehe Kapitel 4.2.3.11). Die Zellen wurden fixiert und das Kinesin-1/KIF5B mit Antikörpern markiert (siehe Tabelle 4.4). Es wurde eine deutliche Überlappung der Fluoreszenz von eGFP-hMon2 und Kinesin-1 an perizentriolaren Strukturen gefunden. Dieses Resultat unterstützt die Befunde aus den Bindungsexperimenten (siehe Kapiteln 5.6.1 bis 5.6.5).

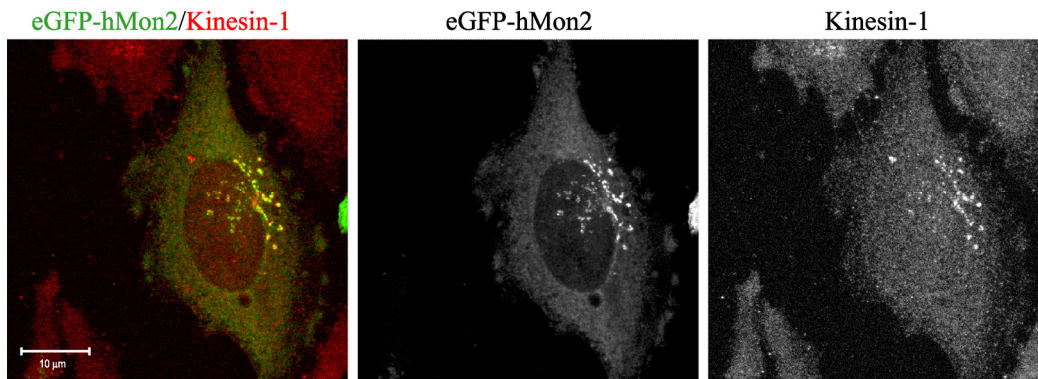


Abbildung 5.21 eGFP-hMon2 wird mit Kinesin-1 kolokalisiert.

eGFP-hMon2 und Kinesin-1 sind oftmals an gleichen subzellulären Strukturen zu beobachten. HeLa Zellen wurden transient transfiziert mit pEGFP-C1-hMON2. Nach 20 h wurden sie mit -24°C kaltem Methanol fixiert. Nach Block mit 0,1% (m/v) Triton X-100 und 0,5% (m/v) BSA in PBS wurden sie mit Maus-anti-Kinesin-1[SUK4] Antikörper immungefärbt. Als Sekundärantikörper wurde ein AF546-Konjugat verwendet (siehe Tabelle 4.4 und Tabelle 4.8).

5.6.7 Isolierung von Ysl2p oder HA-hMon2 mit Venus-Myo2p mittels Koimmunpräzipitation

Im humanen System war mit Hilfe von Massenspektrometrieanalysen und darauf folgenden Immunpräzipitationsversuchen gezeigt worden, dass hMon2 vermutlich mit Myosin II interagiert (siehe Kapitel 5.6.1 und 5.6.2). Interessant war, ob die potentielle Interaktion von hMon2 mit Myosin-Motorproteinen in der Hefe konserviert ist. Dafür wurde die Bindung zwischen Myo2p und Ysl2p, sowie heterolog exprimierten hMon2 in der Hefe untersucht.

Das Myo2p ist dafür bekannt in der Hefe bei polarisierten Transportereignissen von Organellen auf Aktinkabeln eine wichtige Rolle zu spielen (siehe Kapitel 3.6).

Im Immunpräzipitationsversuch (siehe Kapitel 4.2.3.4) konnte das Ysl2p zwar in geringen Mengen, jedoch in allen durchgeführten Versuchen signifikant, (in BS1949) mit Venus-(GFP-Variante) markierten Version von Myo2p isoliert werden (siehe Abbildung 5.22, A, Ko-IP Spur 2). Im Kontrollstamm (BS1948) mit nicht markierten Myo2p wurde kein Ysl2p isoliert. Diese Daten scheinen nicht überzeugend, da ein starkes Hintergrundsignal im Vergleich zum Signal der Ysl2p-Bande auftritt.

Das in der Hefe exprimierte humane hMon2 Protein supprimiert den Wachstumsdefekt des $\Delta ysl2$ Stamms und ist funktionell, wodurch es in der Hefe heterolog als HA-markierte Version

exprimiert werden kann und auf die Bindung von Hefe Myo2p untersucht wurde. HA-hMon2 (BS1951) konnte mit Venus-Myo2p als Bindepartner koimmunpräzipitiert werden. Diese Bindung ist spezifisch, da aus dem Kontrollstamm (BS1953) mit nicht markiertem Myo2p kein HA-hMon2 isoliert wurde (siehe Abbildung 5.22, B). Hier war die Bindung von hMon2 an Venus-Myo2p deutlich zu erkennen im Gegensatz zu der Bindung von Ysl2p an Venus-Myo2p, da der anti-HA Antikörper sein Antigen spezifisch erkennt.

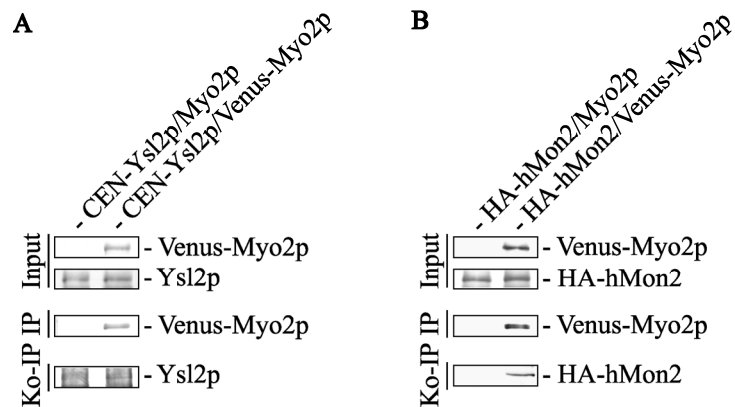


Abbildung 5.22 Koimmunpräzipitation von Ysl2p und HA-hMon2 mit Venus-Myo2p aus Hefe.

Aus Hefezelleextrakten wird mit Venus-Myo2p (A) das endogene Ysl2p und (B) HA-hMon2 isoliert. Zellysate (0,5% (m/v) NP-40) aus 50 OD₆₀₀ Hefezelleinheiten der Stämme BS1948 und BS1949 (A, Spur 1 und 2) und BS1953 und BS1951 (B, Spur 1 und 2) wurden für die Immunpräzipitation von Venus-Myo2p mittels anti-GFP Antikörper verwendet (siehe Kapitel 4.2.3.4). Nach dem Western Blot wurden die mit Ponceau S gefärbten Membranen für die Immundetektion mit alkalischer Phosphatase und ihren Substraten wegen unterschiedlich langer Reaktions- und Entwicklungszeiten passend zugeschnitten. Für die Immundetektion wurde das anti-Ysl2 Serum (A) und der anti-HA Antikörper (B) verwendet (siehe Tabelle 4.3). Abkürzungen: 1% der im Versuch eingesetzten Gesamtzellysaten (Input), Immunpräzipitat (IP) und Koimmunpräzipitat (Ko-IP).

5.7 Untersuchungen auf Interaktion von hMon2 mit dem Aktinzytoskelett

5.7.1 eGFP-hMon2 kosedimentiert mit polymerisiertem Aktin

Aufgrund mehrerer Hinweise war untersucht worden, ob hMon2 an Aktin bindet (siehe Kapitel 4.2.3.9 und 4.2.3.10). Efe et al., 2004 haben berichtet, dass eine $\Delta ysl2\Delta arc18$ Mutante synthetisch lethal ist. Arc18p ist eine Untereinheit des Arp2/3 Komplexes, welcher eine wichtige Rolle bei der Aktinfilamentpolymerisierung und Verzweigung spielt und die Neubildung von Aktinfilamenten an kortikalen Flecken aktiviert (Winter et al., 1999; Robinson et al., 2001). Des Weiteren wurde in der Analyse von neuen Bindepartnern von hMon2 durch Massenspektrometrie (siehe Kapitel 5.6.1) ein bisher wenig erforschtes mit Aktin verwandtes Protein ARP3 beta (Arp11) gefunden. Arp11 wirkt vermutlich bei der Zusammensetzung und Organisation von Aktinfilamenten und Arp1-Minifilamenten des Dynaktin Komplexes (Eckley und Schroer, 2003; Zhang et al., 2008).

Gesamtzelllysate von HeLa Zellen, die verschiedene eGFP-hMon2 Mutanten exprimieren, wurden bei 100000xg zentrifugiert, wobei die löslichen Proteine im Überstand blieben. Der Überstand wurde mit polymerisiertem Aktin und als Kontrolle ohne Aktin inkubiert. Nach einer erneuten Zentrifugation bei 100000xg konnten das F-Aktin und daran gebundene Proteine sedimentiert werden (siehe Abbildung 5.23), während die nicht gebundenen Proteine im Überstand verblieben (siehe Kapitel 4.2.3.10). Für eine quantitative Analyse wurde die Immundetektion mit fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern (siehe Tabelle 4.6) mit Hilfe des Odyssey® Infrared Imaging Systems (LI-COR® Biosciences, Bad Homburg) durchgeführt. Mit der Application Software Version 2.1 wurden die Signalintensitäten der Banden und des Gelhintergrunds bestimmt, wobei die Intensitätswerte des Hintergrunds von den Banden abgezogen wurden. Aus den ermittelten Werten wurde der prozentuale Anteil der mit Aktin kosedimentierten Proteine (P) zu Gesamtproteinen (P+S) mit der Gleichung $(P/(P+S)) \cdot 100$ [%] (Weed et al., 2000) berechnet. Durchschnittlich 34% und bis zu 55% des gesamten löslichen eGFP-hMon2 hat an Aktin gebunden und ist im Pellet zusammen mit polymerisiertem Aktin zu finden. In Kontrollpellets, ohne Aktin, wurden keine eGFP-Proteine detektiert. Die C-terminalen Deletionsmutanten eGFP-hMon2- ΔC und - ΔF und die F-Domäne haben weniger als 9% an Aktin gebunden (8,3%, 9% und 5,5%, siehe Legende Abbildung 5.23). eGFP allein bindet bis zu 0,6%. Die genaue Bestimmung dieser Werte erwies sich als nicht einfach, weil das eGFP-hMon2-F direkt unter dem depolymerisierten Aktin im SDS-Gel migriert (siehe Abbildung 5.23, Aktin/Pellet, dritte Spur) und dessen Bande im Gel nach

unten geschoben wird. Auch die Signalwerte von eGFP-hMon2- Δ C und - Δ F könnten vermutlich als zu hoch gemessen worden sein, da die gesamte Spur (siehe Abbildung 5.23, Aktin/Pellet, dritte Spur) ein erhöhtes Hintergrundsignal hatte, welches als Signal der Bande gemessen wurde. Der kleine jedoch nicht zu vernachlässigende Wert von bis zu 9% könnte auch darauf zurückgeführt werden, dass die Mutanten durch Wechselwirkungen mit endogenem hMon2 in HeLa Zellen über die DCB- und HUS-Domänen oder über die F-Domäne dimerisieren und indirekt an Aktin binden.

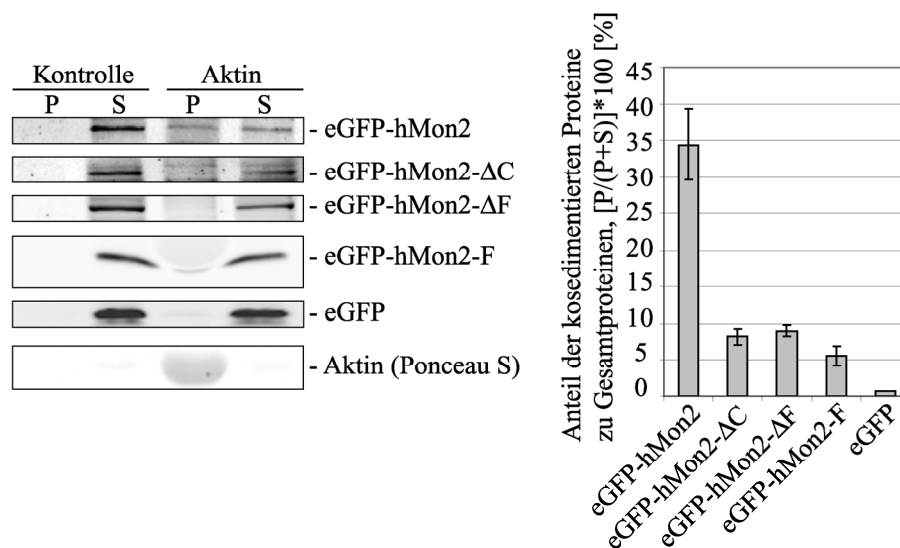


Abbildung 5.23 eGFP-hMon2 bindet an polymerisiertes Aktin.

eGFP-hMon2 wird mit polymerisiertem Aktin sedimentiert (Aktin, P). Die Proteinfragmente eGFP-hMon2- Δ C, - Δ F, -F binden schwächer an das Aktin als eGFP-hMon2. Mit eGFP-C1-hMON2, - Δ C, - Δ F, -F und eGFP-C1-Vektor als Kontrolle transient transfizierte HeLa Zellen wurden nach einem Tag lysiert und bei 100000xg zentrifugiert. Polymerisiertes Aktin wurde mit dem Überstand inkubiert. Als Kontrolle wurde den Proben kein Aktin zugegeben (erste und zweite Spur). Nach erneuter Zentrifugation bei 100000xg wurde das Pellet resuspendiert und das Aktin depolymerisiert. Die mit TCA gefällten Proteine wurden in 100 μ l SDS-Probenpuffer resuspendiert und 25-40 μ l (bei eGFP allein 12 μ l) für SDS-PAGE verwendet. Immunblot erfolgte mit anti-GFP und Ziege-anti-Kaninchen-IR800 Antikörper (siehe 4.1.4). Signale wurden am Odyssey® Infrared Imaging Systems (LI-COR® Biosciences) detektiert und deren Intensitäten mit der Application Software Version 2.1 ausgewertet. eGFP-hMon2 ist zusammen mit dem Aktin im Durchschnitt (aus 6 Versuchen) zu 34% in dem 100000xg Pellet (P) sedimentiert (siehe Diagramm). eGFP hMon2- Δ C, - Δ F, -F und -Vektor sind zu 8,3%, 9% und 5,5% im Pellet detektierbar (Durchschnitt aus mind. 3 Versuchen). eGFP allein ist zu 99,4% im Überstand (S). Die Berechnung des Anteils der mit Aktin kosedimentierten Proteine zu Gesamtproteinen wurde wie in der Literatur beschrieben durchgeführt. Die Signalintensität der Proteinbanden im Pellet (P) und Überstand (S) wurde gemessen und in die Gleichung $(P/(P+S))*100$ [%] eingesetzt (Weed et al., 2000). Rechts werden die

gemittelten Werte aus 3-6 Versuchen je Protein und deren SEM (standard deviation of the mean) in einer Grafik verdeutlicht.

5.7.2 eGFP-hMon2 wird mit Strukturen des Aktinzytoskelett kolokalisiert

Im Kapitel 5.7.1 wurde *in vitro* gezeigt, dass eGFP-hMon2 mit polymerisiertem Aktin interagiert. Für die Kolokalisierung von eGFP-hMon2 mit Aktin durch konfokale Mikroskopie wurden verschiedene Fixierungsmethoden angewendet, indem die Fixative (4% (m/v) PFA oder Methanol), Puffer und Fixierungszeiten variiert wurden. Das F-Aktin wurde mittels Bindung von mit rhodaminmarkiertem Phalloidin (Pilztoxin) sichtbar gemacht. Es konnte zunächst keine eindeutige Überlappung von filamentösen Aktinstrukturen mit eGFP-hMon2 beobachtet werden. Nach einer alternativen Fixierung der Zellen nach Straight et al., 2005 (siehe Legende zu Abbildung 5.24) konnten Rhodamin-Phalloidin-gefärbte und punktförmige Strukturen überlappend mit eGFP-hMon2 beobachtet werden (siehe Abbildung 5.24, überlappende Strukturen sind mit Pfeilen markiert). Diese wurden vor allem im unteren Bereich der Zelle (in der Nähe des Glasdeckelchens) aber auch in der Nähe vom Golgi und in der Zellperipherie beobachtet. Am besten zu beobachten waren diese punktförmigen Strukturen durch Aufnahmen mit dem konfokalen Mikroskop von der unteren, am Glasdeckelchen adhärenen Zelloberfläche bis zur Zellmitte (von 0 μm bis zu 2-2,5 μm in der z-Ebene). Wurde darüber hinaus fotografiert, so wurden diese Strukturen von filamentösem Aktin an der oberen Zelloberfläche überdeckt und waren nicht mehr zu erkennen.

Es ist möglich, dass hMon2 sich in der Nähe von Aktin Flecken befindet und dort eine Funktion erfüllt. In humanen Zellen zieht polymerisiertes verzweigtes Aktin an mit Fracht beladenen clathrinumhüllten Belägen an der Plasmamembran für die Einwärtsbewegung ins Zellinnere (siehe Kapitel 3.3.1 (Kirchhausen, 2009)). Hier ist die Remodellierung des Aktinzytoskeletts essentiell für die Bildung, Einwärtsbewegung und Ablösung der clathrinumhüllten Beläge. Dieser Mechanismus ist auch an Membranen innerhalb der Zelle denkbar. Da hMon2 mit Clathrinadapterproteinen des TGN und endosomalen Membranen interagiert, ist es möglich, dass es bei der Vesikelbiogenese an diesen Organellmembranen mit Aktin wechselwirken könnte.

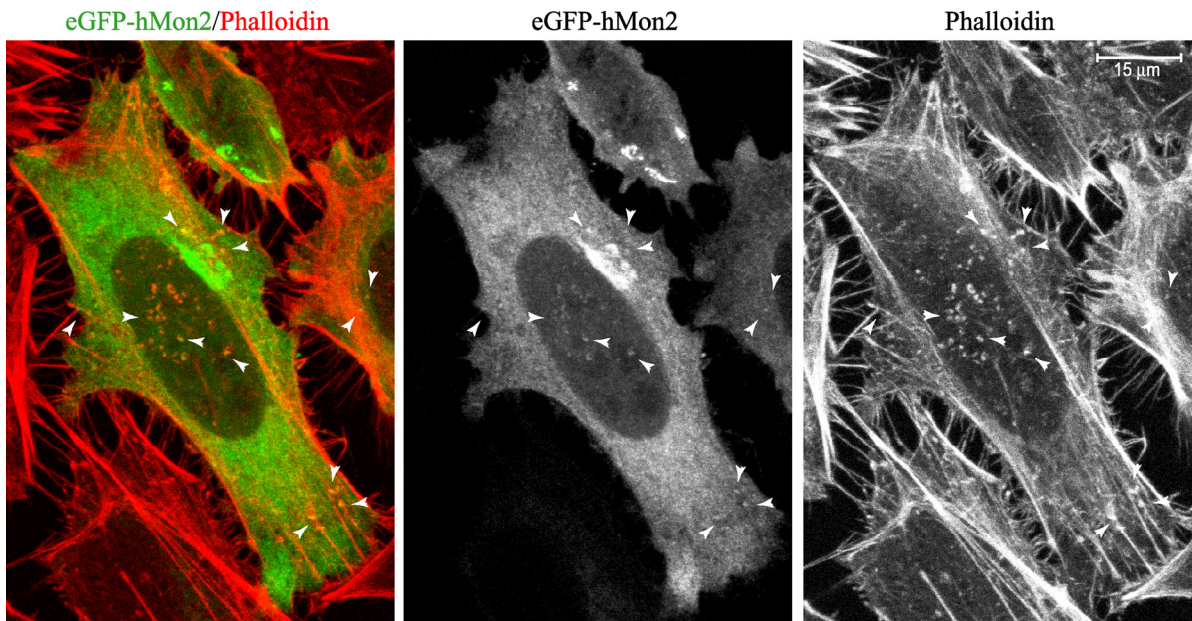


Abbildung 5.24 eGFP-hMon2 wird oftmals mit Rhodamin-Phalloidin gefärbten Strukturen lokalisiert.

eGFP-hMon2 wird auf mit Rhodamin-Phalloidin sichtbar gemachten Aktinstrukturen beobachtet. $0,5 \cdot 10^5$ HeLa Zellen wurden auf 24-Loch Platten ausgesät und am folgenden Tag mit pEGFP-C1-hMON2 transient transfiziert. Nach 20 h wurden sie mit einem Fixativ mit 4% (m/v) PFA in 1 mM $MgCl_2$, 10 mM EGTA/pH 8,0, 0,1% (m/v) Triton X-100, 80 mM PIPES (Straight et al., 2005) 10 min lang bei 37°C und anschließend mit 50 mM NH_4Cl im PBS fixiert. F-Aktin wurde durch Bindung von Rhodamin-Phalloidin in 0,1% (m/v) Triton X-100 und 0,5% (m/v) BSA in PBS visualisiert. Beispiele für Kolokalisierung wurden mit einem Pfeil markiert.

6. Diskussion

6.1 Wechselwirkung von hMon2 mit den Adapterproteinen

Das bisher wenig untersuchte humane hMon2 ist ein Ortholog von Ysl2p der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (siehe Kapitel 3.5). Ergebnisse aus der Hefe lassen auf eine Interaktion von hMon2 mit den Komponenten, die an der Bildung von clathrinumhüllten Vesikeln beteiligt sind, schließen. Untersuchungen der genetischen Wechselwirkung in der Hefe von Clathrinadapterproteinen mit den Proteinen aus dem Ysl2p-Arl1p-Neo1p Netzwerk (siehe Kapitel 3.5.1) deuteten auf eine mögliche Interaktion von hMon2 und den monomeren Clathrinadapterproteinen GGAs im Menschen (Singer-Krüger et al., 2008).

In dieser Arbeit habe ich mittels konfokaler Mikroskopie gezeigt, dass eine RNAi vermittelte Depletion von hMon2 in HeLa Zellen zu einer subzellulären Umverteilung der Clathrinadapterproteine AP-1, AP-3, GGA1, GGA3 und EpsinR führt. Sie sind weniger an der TGN-Region konzentriert und vermehrt in der Zellperipherie, fein verteilt und auch als größere pleomorphe Strukturen, zu finden. Dabei blieb die Morphologie des Golgis und des TGNs unverändert. Ob es sich bei den Strukturen um Adapterproteine auf endosomalen Kompartimenten oder bzw. und im Zytoplasma handelt, konnte nicht nachgewiesen werden. Eine fraktionelle Zentrifugation (in der Arbeit nicht gezeigt) konnte keine Hinweise auf die Verteilung der Adapterproteine zwischen membranassoziiertem und zytosolischem Pool geben. In Kontrollzellen und hMon2-depletierten Zellen wurden die GGA Proteine vor allem in der zytosolischen Fraktion vorgefunden. Diese Beobachtung stimmt mit dem Ergebnis von Dell'Angelica et al., 2000 überein, wo für GGAs gezeigt wurde, dass sie zu ungefähr 10% in der Membranfraktion und zu 90% in der zytosolischen Fraktion von HeLa Zellen vorliegen. Das liegt vermutlich an der relativ kurzen und labilen Wechselwirkung von Adapterproteinen mit ihren Interaktionspartnern an Membranen während der zügig verlaufenden clathrinumhüllten Grübchen- und Vesikelbildung. Somit kann mit einer fraktionellen Zentrifugation keine genaue Aussage bezüglich der Verteilung von Adapterproteinen zwischen Zytoplasma und Membranen gemacht werden.

GST-Pulldownexperimente haben gezeigt, dass gereinigtes His-Ysl2p und in einem *Δys12* Stamm heterolog exprimiertes HA-hMon2 an die VHS-Domäne des humanen GGA1 binden (Singer-Krüger et al., 2008). Diese Ergebnisse konnte ich durch Immunpräzipitationsversuche in HEK293T Zellen unterstützen, indem ich gezeigt habe, dass das endogene hMon2 mit HA-GGA1 und HA-GGA3 interagiert.

Die Umverteilung von EpsinR nach hMon2 Depletion macht Sinn, da EpsinR ein Adapterprotein ist, das während der Vesikelbiogenese nicht nur mit der Membran und den Clathrintriskelions, sondern auch mit GGAs und AP-1 interagiert, welche wie bereits erwähnt nach hMon2 Depletion subzellulär umverteilt sind. Auch wurde gezeigt, dass GGA Proteine mit den Epsins Ent3p und Ent5p in der Hefe interagieren (Costaguta et al., 2006). Somit ist eine mögliche direkte oder indirekte Interaktion von hMon2 mit EpsinR denkbar, was noch genau zu untersuchen ist.

Des weiteren habe ich mittels transienter Expression von eGFP-hMon2 und Kolokalisierungsstudien in HeLa Zellen gezeigt, dass die Adapterproteine EpsinR, GGA1, GGA3 und AP-1 mit eGFP-hMon2 in der Zelle oftmals zusammen vorkommen. Das AP-3 Muster scheint mit dem von eGFP-hMon2 nicht zu überlappen.

Nachdem in hMon2-depletierten Zellen ein anderes subzelluläres Verteilungsmuster der Adapterproteine beobachtet wurde, stellte sich die Frage wo Clathrin innerhalb der Zelle zu finden ist. Wider Erwartens, waren die Clathrinmoleküle nicht, wie seine Adapterproteine, vermehrt an pleomorphen Strukturen und peripher im Zytosol verteilt. Sie waren im Vergleich zu Kontrollzellen deutlich erhöht an perizentriolaren Membranen konzentriert (siehe Kapitel 5.2). Bekannt ist, dass Clathrin selbst nicht an Membranen binden kann, sondern mit Hilfe von Adapterproteinen rekrutiert wird (Schmid, 1997; Kirchhausen, 2000a). Die Bildung von clathrinummantelten Vesikeln ist zwar intensiv erforscht, jedoch gibt es immer noch viele Geheimnisse, vor allem bei den Unterschieden in der Hüllenbildung an der Plasmamembran und am TGN oder an endosomalen Kompartimenten. Auch die Art der Hüllenentstehung kann unterschiedlich sein. Kürzlich wurde entdeckt, dass es an der Plasmamembran zwei Arten von Clathrinhüllen und Vesikelbildung gibt (siehe Kapitel 3.3.1); die langlebigen Clathrinbeläge und die herkömmlichen Clathringrübchen (Kirchhausen, 2009). Dabei warten die Beläge schon an der Membran bis mit Hilfe von Aktinfilamenten die Knospung erfolgt. hMon2 könnte unter anderem für den Knospungs- und Abschnürungsvorgang von clathrinbedeckten Grübchen und Belägen benötigt werden (vergleiche Kapitel 6.6).

6.2 Lokalisierung von hMon2

Das Fluoreszenzsignal von eGFP-Mon2 ist an Kompartimenten vor allem in der Zellmitte und auch teilweise im Zytosol fein verteilt zu beobachten. Vermutlich ist hMon2 ein peripheres

Membranprotein, analog zu seinen Verwandten der Sec7-GEFs und seinem Ortholog Ysl2p. eGFP-hMon2 wurde mit dem *trans*-Golgi Marker p230/Golgin-245 kolokalisiert und befindet sich in der Nähe des *cis*-Golgi Markers GM130, was durch Nocodazolbehandlung der Zellen, die zur Golgifragmentierung führt, verdeutlicht wurde (siehe Kapitel 5.5.2). Auch wurde eGFP-hMon2 teilweise mit Clathrinadapterproteinen (siehe Kapitel 6.1), TfnR und aufgenommenen AF-Tfn in der Zellmitte (siehe Kapitel 5.5.2) kolokalisiert. hMon2 ist somit nicht an den von der Plasmamembran stammenden Vesikeln und frühen Endosomen, sondern vermutlich an den endosomalen rezyklierenden Kompartiment und dem TGN präsent.

6.3 hMon2 Depletion verändert Tfn-positive Kompartimente

Die Depletion von hMon2 in HeLa Zellen verursacht starke Tubulation von AF-Tfn-positiven Kompartimenten. Mittels sogenannter pulse-chase Aufnahmeexperimente konnte die Organellenidentität näher charakterisiert werden. Bei der Zyklisierung durchläuft AF-Tfn die endozytotischen Kompartimente mit dem Verlauf der Zeit. Somit kann das AF-Tfn auf der Plasmamembran, in frühen Endosomen oder rezyklierenden Endosomen beobachtet werden (vergleiche Kapitel 3.2.1). In hMON2-Knockdown Zellen konnte eine gravierende Morphologieänderung von Organellen im späten Transportweg des Tfn festgestellt werden. Die vergrößerten, pleomorphen und bandförmigen Strukturen waren mit GGA3 und AP-1 Adapterproteinen geschmückt (siehe Kapitel 5.3). Diese großen in der Zelle verteilten adapterproteinpositiven Strukturen stellen vermutlich Übergangskompartimente dar, die bei der hMon2 Depletion entstehen. Dieser Phänotyp bringt auf einen möglichen Gedanken, dass durch hMon2 Depletion die Abschnürung von mit Fracht beladenen Transportvesikeln, hier Tfn, gestört sein könnte. Ob hMon2 bei der Abschnürung von Vesikeln beteiligt ist, könnte untersucht werden.

Eine Depletion des Arf-GEFs BIG2 verursacht auch eine Tubulation von TfnR positiven Organellen (Shen et al., 2006). Dabei konnten Shen et al., eine sehr geringe Verzögerung der Rezyklisierung von AF-Tfn messen. Außerdem konnten sie einen erhöhten TfnR Level in den Zelllysaten in BIG2 depletierten Zellen im Immunblot detektieren. Dies konnte bei Knockdown von hMon2 nicht beobachtet werden, die TfnR Expression blieb unverändert (siehe Kapitel 5.1, Abbildung 5.1). Die bei BIG2-Knockdown beobachteten tubulären Organellen beinhalten GFP-Rab11 (Boal und Stephens, 2010), ein Markerprotein des TfnR-rezyklierenden Kompartiments (van der Sluijs et al., 1992; Ullrich et al., 1996; Ren et al.,

1998; Sheff et al., 1999; Wilcke et al., 2000). Ob die von der hMon2 Depletion betroffenen Organellen auch Rab11 tragen, konnte aufgrund von fehlenden Arbeitsmitteln nicht untersucht werden. Eine Depletion oder Überexpression von hMon2 in einer stabilen HeLa Zelllinie die Rab11 exprimiert, könnte eine genauere Antwort auf die Organellenidentität und den Ort der Funktion von hMon2 im Tfn Transport geben.

Am Rande möchte ich noch zur Diskussion beifügen, dass ich zu Beginn meiner Doktorarbeit das humane Protein ATP9A in humanen Zellen untersucht habe. ATP9A ist ein humanes Homolog von dem essentiellen Transmembranprotein Neo1p, einer putativen Aminophospholipidtranslokase (siehe Kapitel 3.5.1), in Hefe (Graham, 2004). Interessanterweise konnte ich dabei das mit myc-Epitop markierte ATP9A in den Caco2 Zellen (endotheliale Darmkrebszellen) mit internalisierten AF-Tfn (nach 15 min und später) und teilweise mit dem frühen endosomalen Markerprotein EEA1, jedoch nicht mit dem lysosomalen und spät endosomalen Protein CD63 kolokalisieren (Ergebnisse in dieser Arbeit nicht gezeigt). Dieses Ergebnis unterstützt die Vermutung bezüglich der Konservierung der Funktion von Ysl2p und Neo1p (siehe Kapitel 3.5.1) und bestärkt die Vermutung, dass hMon2 an Kompartimenten wirken könnte, die am Transport von Tfn beteiligt sind.

6.4 eGFP-hMon2 wird mit mRFP-ARF1 kolokalisiert

In HeLa Zellen konnte mikroskopisch gezeigt werden, dass eGFP-hMon2 und mRFP-ARF1 auf Membranen in der Zellmitte, bei welchen es sich vermutlich um das TGN handelt, zusammen vorkommen (siehe Kapitel 5.5.2). In Koimmunpräzipitationsexperimenten mit anti-hMon2 Serum und folgender Massenspektrometrieanalyse konnte kein ARF1 nachgewiesen werden. Eine Bindung zwischen hMon2 und ARF1 ist denkbar, jedoch könnte diese von kurzer Zeit sein und im Bindungsversuch ARF1 mit hMon2 nicht isolierbar sein. Eine Möglichkeit die Wechselwirkung zu zeigen wäre es, wie in einigen Publikationen beschrieben, zu untersuchen ob ARF1 mit hMon2 in Anwesenheit von Brefeldin A mitisoliert wird. Dieser Pilzgift bindet an GEF-Arf-GDP Intermediate und verhindert somit den GDP zu GTP Austausch, also die Arf-Aktivierung (Niu et al., 2005; Zeghouf et al., 2005). Es wurde auch gezeigt, dass diese Inhibition reversibel ist und die Brefeldin A Konzentration während des gesamten Bindungsversuchs konstant bleiben muss (Szul et al., 2007; Deng et al., 2009). Jedoch wurde in Hefe keine Wechselwirkung zwischen Mon2 und Arf1 bestätigt (Jochum et al., 2002). Nachdem eine Interaktion von hMon2 und Arl1p in Hefe nachgewiesen wurde

(siehe Kapitel 3.5.1), ist eine Wechselwirkung beider Proteine in humanen Zellen denkbar. In meiner Arbeit habe ich die benötigten Mittel nicht zu Verfügung gehabt, um das zu untersuchen. Der verwendete Antikörper anti-ARL1 (N-Term) hat das Protein im Western Blott und auch in der Immunfluoreszenz nicht spezifisch gebunden.

Nachdem kürzlich gezeigt wurde, dass Mon2p ein negativer Regulator von aktiviertem Arl1p ist (Manlandro et al., 2012), und des weiteren dass ARL1 wichtig für die Rekrutierung von BIG1 und BIG2, aber nicht GBF1, an TGN ist (Christis und Munro, 2012) sollte man die Untersuchung der Interaktion von hMon2 und ARL1 noch mal aufgreifen.

6.5 Die C-terminale F-Domäne ist wichtig für die subzelluläre Verteilung und Dimerisierung von hMon2

In dieser Arbeit habe ich gezeigt, dass das Fehlen der C-terminalen C- oder F-Fragmente von eGFP-hMon2 eine Veränderung in der subzellulären Verteilung in HeLa Zellen verursacht (siehe Kapitel 5.5.4). Die Mutanten eGFP-hMon2- Δ C und - Δ F waren im Zytoplasma zu beobachten, im Vergleich zum kompletten Protein, das stark am TGN und an endosomalen Membranen zu finden ist. Ebenfalls wurde beobachtet, dass eGFP-hMon2 mit polymerisiertem Aktin im *in vitro* Versuch kosedimentiert, während die eGFP-hMon2- Δ C und - Δ F und -F Proteinmutanten das nicht tun (siehe Kapitel 5.7.1). Aus Arbeiten in Pflanzen ist bekannt, dass das GEF Protein GMON nur als Dimer aktiv ist und an Membranen binden kann (Anders et al., 2008). So ergab sich der Verdacht, dass eventuell das Fehlen vom C-Terminus die Dimerisierung oder Multimerisierung und somit die vermutliche Aktivität von hMon2 als Hilfs- und Gerüstprotein bei der Vesikelbiogenese verhindert.

In Hefe wurde bereits gezeigt, dass Ysl2p Dimere bildet, wobei die Deletion der letzten C-terminalen 100 Aminosäuren das verhindert (Lasić, Dissertation 2008). Für das humane hMon2 konnte in dieser Arbeit ein vergleichbares Verhalten beobachtet werden (siehe Kapitel 5.5.5). Bei einer Immunpräzipitation von GFP-hMon2 wird HA-hMon2 mitisoliert. Ich habe dann schließlich gezeigt, dass die 121 C-terminalen Aminosäuren von hMon2 (F-Domäne) zu der Dimerisierungs- oder Homooligomerisierungseigenschaft von hMon2 beitragen (siehe unten). Die F-Domäne bindet an eGFP-hMon2 und nicht an eGFP-hMon2- Δ F, somit muss die Interaktion über die F-Domäne stattfinden. Die F-Domäne ist innerhalb der Mon2/Ysl2 Familie stark konserviert und besitzt überwiegend geladene und hydrophobe Aminosäuren die

zusammen mit der vorhergesagten Sekundärstruktur auf eine wichtige Funktion im Bezug auf Proteinbindung schließen lassen (Efe et al., 2005) (siehe Kapitel 3.5, Abbildung 3.4). Es muss noch andere Bereiche von hMon2 geben die für die Oligomerisierung verantwortlich sind, da das Fehlen der F-Domäne die Bindung zum ganzen Protein nicht unterbindet. Die großen Arf-GEF Proteine dimerisieren über die N-terminalen DCB- und HUS-Domänen (siehe Kapitel 3.4 und 3.5). Dabei bindet DCB- die DCB- oder die HUS-Domäne.

6.6 Vermeintliche Rolle von hMon2 bei der Vesikelbiogenese und dessen Transport innerhalb der Zelle

In meiner Arbeit habe ich mehrere Indikationen, die zu der Vermutung führen, dass hMon2 für die Vesikelmorphologie bei der Biogenese und dem Transport innerhalb der Zelle wichtig ist, gefunden. Bei der Videomikroskopie habe ich eGFP-hMon2 positive sphärische Strukturen beobachtet. Dabei handelt es sich vermutlich um Vesikel, die sich vor allem von der Zellmitte in Richtung Peripherie fortbewegen. Außerdem, konnte ich zeigen, dass die Depletion von hMon2 die Ausbildung von tubulären Strukturen verursacht, welche nach 15 minütiger Aufnahme von AF-Tfn sichtbar werden. Diese waren mit den Clathrinadapterprotein AP-1 und GGA3 positiven pleomorphen Strukturen geschmückt (siehe Kapitel 5.3). Somit ist zu vermuten, dass die Depletion des großen Multidomänenproteins hMon2 nicht nur die Adapterproteinrekrutierung, sondern auch die Membranabschnürung im späten Schritt der Vesikelentstehung beeinflussen könnte. Ich habe gezeigt, dass hMon2 mit Aktin (siehe Kapitel 5.7.1 und 5.7.2) interagiert. Auch eine mögliche Wechselwirkung mit dem nicht-muskulären nicht-prozessiven Myosin II und dem ubiquitären mikrotubulibasierten prozessiven Motorprotein Kinesin-1 (KIF5B), die durch unterschiedliche Bindungsexperimente und Kollokalisierungsstudien am konfokalen Mikroskop unterstützt werden (siehe Kapitel 5.6.4 bis 5.6.7), ist zu vermuten. Eine mögliche Hypothese ist, dass hMon2 zusammen mit diesen Proteinen an dem Abschnürungsvorgang der Vesikel von der Donormembran wirkt. Denn es wurde gezeigt, dass Kinesin KIF5B für Verlängerung der von der Donormembran entstehenden Tubuli nötig ist, bevor das nicht-prozessive Myosin II und Aktin die Rab6 positiven Transportvesikel vom Golgi abschnüren (Miserey-Lenkei et al., 2010; Valente et al., 2010). Der Mechanismus dieser Abschnürung wurde noch nicht aufgeklärt, es ist jedoch bekannt, dass Aktin für den Vorgang rekrutiert wird. hMon2 bindet an polymerisiertes Aktin *in vitro* und wurde mit Aktinstrukturen, welche durch

fluoreszenzmarkiertes Phalloidin gefärbt wurden, kolokalisiert (siehe Kapitel 5.7.1 und 5.7.2). Der Kolokalisierungsgrad war niedrig, was auch Sinn macht im Bezug darauf, dass Aktin nur kurz vor der Abschnürung der Vesikel rekrutiert wird (Valente et al., 2010).

In der Hefe koordiniert das Motorprotein Myo2p und kinesin-ähnliche Moleküle den TGN-zu-Plasmamembran-Transport (Lillie und Brown, 1992; Stow et al., 1998). Da hMon2 an Myo2p (Klasse V Myosin) bindet, kann man davon ausgehen, dass die Interaktion von hMon2 mit Motorproteinen für den Membrantransport konserviert ist. Möglicherweise bindet auch das Hefe Ysl2p an Venus-Myo2p. Der Immunpräzipitationsversuch müsste noch optimiert werden, da das Signal der Ysl2p Bande wegen hohen Hintergrund im Western Blot schlecht zu sehen und deshalb nicht überzeugend, jedoch in jedem Experiment nachweisbar war (siehe Kapitel 5.6.7).

Das Gadkin/ γ -BAR Protein bindet an das konventionelle Kinesin (heterotetramerer Komplex aus zwei Kinesin-1 und zwei KLC Proteinen) und AP-1. Zusammen sind diese Proteine bei der Bildung und dem Transport von TGN stammenden Vesikeln beteiligt (Schmidt et al., 2009). Auch hMon2 bindet Kinesin-1 (siehe Kapitel 5.6.1 bis 5.6.6) und interagiert mit Adapterproteinen (siehe Kapitel 6.1). hMon2 könnte ein wichtiges Bindeglied zwischen Vesikeln und dem Motorprotein Kinesin-1, für die Vesikelabschnürung oder den Transport, darstellen.

Bei der Videomikroskopie von eGFP-hMon2 in HeLa Zellen wurden punktförmige und tubuläre Strukturen, die sich von der Zellmitte sternförmig in Richtung Zellkortex bewegen, beobachtet. Die vermeintliche Bedeutung von hMon2 im Vesikeltransport und die mögliche Interaktion mit dem Zytoskelett wird durch Ergebnisse aus der Hefe und *Drosophila* unterstützt. Es wurde in einem Screen gefunden, dass die Deletion von *YSL2* und *ARC18*, einer Untereinheit des Aktinnukleationskomplexes Arp2/3, synthetisch lethal ist (Efe et al., 2005). Der humane Arp2/3 Komplex ist bei der Endozytose an der Plasmamembran und auch an der Entstehung von clathrinumhüllten Vesikeln am TGN beteiligt (Welch et al., 1997; Carreno et al., 2004). Er initiiert die Aktinnukleation und Ausbildung von Aktinnetzwerken (Pollard, 2007). Dazu könnte die Beobachtung, dass Clathrin in hMon2-depletierten humanen Zellen an Membranen in der Zellmitte vermehrt zu beobachten ist, ein zusätzlicher Hinweis darauf sein, dass beim Fehlen von hMon2 die Abläufe während der Clathrinhüllen- und Vesikelbiogenese, wo Aktin eine Rolle spielt, gestört sind (siehe Kapitel 6.1). Dazu haben neueste Untersuchungen von Mon2 in *Drosophila* ergeben, dass Mon2 eine wichtige Rolle bei der Reorganisierung von kortikalem Aktin für die Bildung von langen F-Aktin und

Verankerung von Keimplasma an hinterem Pol der Eizellen spielt (Tanaka et al., 2011). Die Interaktion von Mon2 Proteinen mit Aktin scheint konserviert zu sein.

6.6.1 Verwandtschaft von hMon2 mit den großen Sec7-Arf-GEFs

Bereits die Analysen der Proteinsequenz und der Domänenstruktur der Mon2/Ysl2 Familie und der großen Arf-GEFs BIG/Sec7 und GBF/Gea/GNOM haben auf Verwandtschaft dieser Multidomänenproteine in der Struktur hingewiesen (Jochum et al., 2002; Efe et al., 2005; Ramaen et al., 2007; Bui et al., 2009). Das Hefeprotein Ysl2p interagiert im Komplex mit einer vermeintlichen Aminophospholipidtranslokase Neo1p aus der Familie der P4-Typ ATPasen Drs2 am TEN und an endosomalen Membranen (Wicky et al., 2004). Analog dazu wurde gezeigt, dass das Arf-GEF Gea2p mit Drs2p am TGN wechselwirkt (Chantalat et al., 2004). Auch das humane GBF1 interagiert mit der Kupferionentranslokase ATP7A, die mit ATP9A, dem humanen Ortholog von Hefe Neo1p, verwandt ist (Graham, 2004; Holloway et al., 2007). Die Untersuchungen während meiner Doktorarbeit haben gezeigt, dass hMon2 auch in humanen Zellen Ähnlichkeiten bezüglich der subzellulären Verteilung und der Wahl der Interaktionspartner zu den Arf-GEFs besitzt. Nach einer RNAi vermittelten Depletion von hMon2 in HeLa Zellen wird ein verändertes subzelluläres Verteilungsmuster von Clathrinadapterproteinen AP-1, AP-3, GGA1, GGA3 und EpsinR (vergleiche Kapitel 6.1) und Morphologieänderung von Tfn-positiven Organellen (siehe Kapitel 5.3 und 6.3) unter dem Mikroskop beobachtet. Dabei ist die Morphologie des Golgi und TGNs nicht verändert. Knockdown von GBF1 mittels RNAi inhibiert die Assoziation von COPI mit Membranen, wobei andere Hüllproteine wie AP-1 nicht beeinflusst werden (Ishizaki et al., 2008; Manolea et al., 2008; Deng et al., 2009). Der Knockdown von BIG1 und BIG2 verhindert die Assoziation von AP-1 mit Membranen des TGNs, ohne COPI zu beeinflussen (Ishizaki et al., 2008; Manolea et al., 2008). Auch ein Knockdown oder die Überexpression von BIG2 Mutanten haben eine Auswirkung auf die Morphologie von AF-Tfn-positiven Kompartimenten (Shin et al., 2004). Genauso wie hMon2 (siehe Kapitel 5.5.2 und Diskussion im Kapitel 6.3), wurde BIG2 mit TfnR und endozytiertem AF-Tfn kolokalisiert (Shin et al., 2004; Shen et al., 2006).

hMon2 interagiert mit dem ubiquitären Kinesin-1/KIF5B. Auch das BIG1 interagiert mit einem Kinesinprotein, dem KIF21A (aus der Kinesin-4 Proteinfamilie). Das ist für den Transport von M6PR vom TGN über Endosomen zu Lysosomen verantwortlich (Shen et al.,

2008). In der Massenspektrometrieanalyse zur Ermittlung neuer Bindepartner von hMon2 wurden auch Peptide von dem bisher wenig erforschten KIF4A (aus der Kinesin-4 Familie) gefunden, jedoch mit geringerer Trefferzahl als von Kinesin-1/KIF5B (siehe Kapitel 5.6.1, Tabelle 5.1).

Für die Biogenese der clathrinumhüllten Vesikel wurde generell ein Modell vorgeschlagen, bei dem Arf Proteine von GEFs aktiviert werden, wodurch Effektorproteine, wie Adapterproteine APs, GGAs und COPI an die Membran rekrutieren werden (Anders und Jürgens, 2008; Kahn, 2009). Alternativ dazu wurde ein Modell für die Interaktion von Hüllproteinen mit GEFs vor der Arf-Aktivierung vorgeschlagen (siehe Kapitel 3.4.1) (Deng et al., 2009). Weil für Proteine der Mon2/Ysl2 Familie keine GEF Funktion gezeigt wurde, wäre ein Modell denkbar, in welchem hMon2 die Adapterproteine an die Membranen rekrutiert und andere Proteine (GEFs) die Arfs aktivieren.

Es wurde auch beobachtet, dass hMon2 als Dimer bestehen kann (siehe Kapitel 5.5.5 und 6.5). Beim GNOM ist die Homodimerisierung essentiell für die Membranbindung und Funktion als Arf-GEF (Anders et al., 2008). Es wurde gezeigt, dass die DCB Domäne von BIG1 die HUS Domäne von GBF1 binden kann, wodurch Heterodimere gebildet werden. Es ist daher denkbar, dass hMon2 mit einem 200 kDa Sec7-GEF über die DCB und HUS dimerisieren könnte, wodurch der entstandene Komplex eine GEF-Aktivität erlangen würde oder sogar die GEF-Aktivität anderer Proteine blockieren würde.

6.6.2 Vorgeschlagene subzelluläre Verteilung von hMon2

Aufgrund meiner Kollokalisierungsstudien und Bindungsexperimente ist der Wirkungsort von hMon2 in der Nähe vom TGN und TEN zu vermuten (siehe Abbildung 6.1). Möglicherweise ist es dort an der Vesikelbiogenese und in der Zusammenarbeit von Zytoskelett und Motorproteinen am TGN bei der Vesikelabschnürung beteiligt, wonach sich die Vesikel direkt oder indirekt über das rezyklierende Kompartiment in Richtung Plasmamembran bzw. Zellperipherie bewegen können (vgl. Legende Abbildung 6.1).

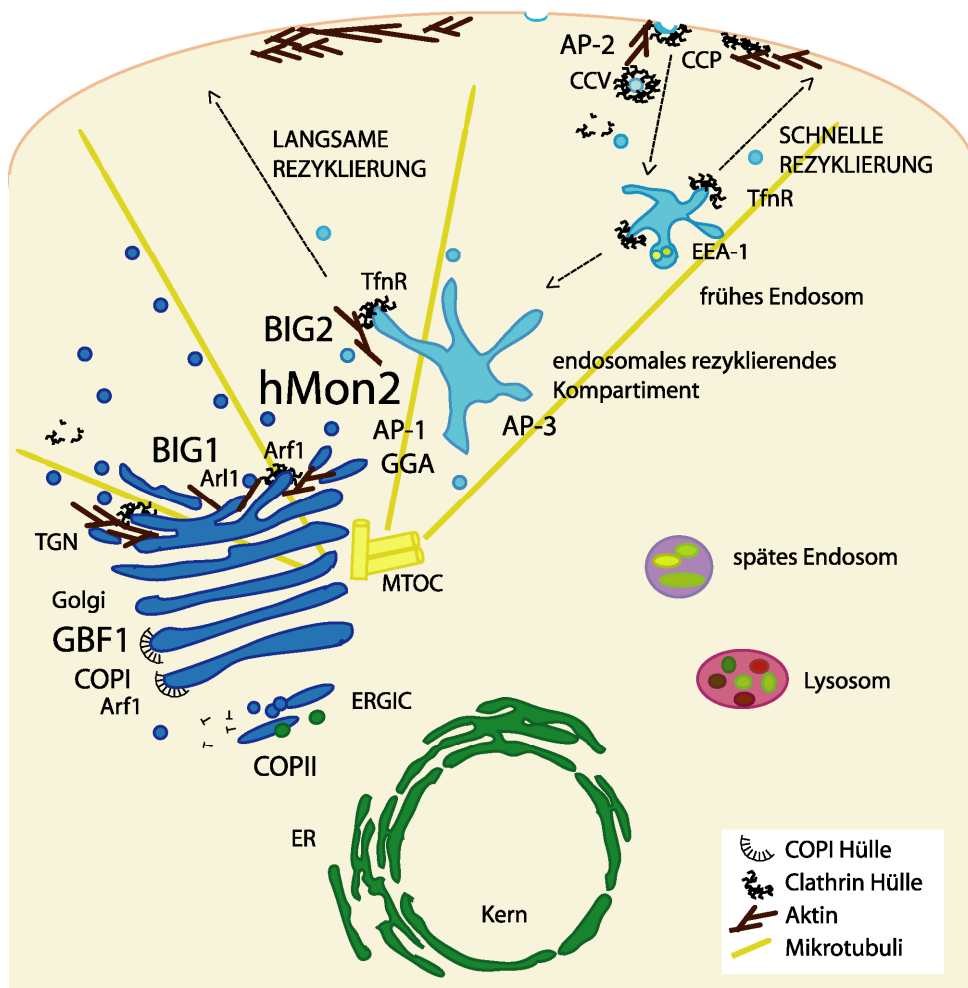


Abbildung 6.1 Vorgeschlagene Verteilung von hMon2 innerhalb der Zelle.

Die Abbildung zeigt eine vereinfachte Darstellung von Kompartimenten in HeLa Zellen und den Wirkungsort von Clathrin, Adapterproteinen, Arf1 und Arf-GEFs GBF1, BIG1 und BIG2. Pfeile zeigen die Internalisierung von TfnR und den Rücktransport über einen schnellen Rezyklierungsweg von frühen Endosomen direkt zur Plasmamembran, oder indirekt über einen langsamen Rezyklierungsweg. Dabei wird der TfnR über das endosomale rezyklierende Kompartiment zur Plasmamembran zurück transportiert wird. Die Präsenz des hMon2 Proteins ist aufgrund von Kollaborationsstudien und Bindungsexperimenten in der Nähe vom TGN und TEN zu vermuten.

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.1 Überblick über intrazelluläre Kompartimentalisierung und Transportwege. . .	13
Abbildung 3.2 Bildung von clathrinumhüllten Strukturen an der Plasmamembran in humanen Zellen.	17
Abbildung 3.3 Domänenstruktur von BIG/Sec7 und GBF/Gea Arf-GEFs.	24
Abbildung 3.4 Konservierte Domänen in der Ysl2/Mon2 Familie und Homologie zu den großen Multidomänen-Sec7-GEFs Familien BIG/Sec7 und GBF/Gea.	28
Abbildung 5.1 RNAi vermittelte Depletion von hMon2 nach 5 Tagen.	69
Abbildung 5.2 hMon2 Depletion durch RNAi verursacht Änderungen der typischen subzellulären Verteilung von Adapterproteinen und Clathrin in HeLa Zellen.	72
Abbildung 5.3 hMon2 Depletion verändert die typische Struktur von AF-Tfn und AP-1/GGA3 enthaltenden Kompartimenten.	75
Abbildung 5.4 HA-GGA1 und HA-GGA3 binden endogenes hMon2 aus HEK293T Zellen.	76
Abbildung 5.5 eGFP-hMon2 wird mit GGA1 und GGA3 oftmals kolokalisiert.	77
Abbildung 5.6 eGFP-hMon2 zeigt oftmals Überlappung mit AP-1, jedoch nicht mit AP-2 und AP-3.	79
Abbildung 5.7 eGFP-hMon2 wird oftmals zusammen mit EpsinR lokalisiert.	80
Abbildung 5.8 eGFP-hMon2 Strukturen werden am <i>trans</i> -Golgi lokalisiert.	82
Abbildung 5.9 eGFP-hMon2 wird mit TfnR lokalisiert.	83
Abbildung 5.10 eGFP-hMon2 wird oftmals mit AF546-Tfn lokalisiert.	86
Abbildung 5.11 eGFP-hMon2 überlappt nicht mit EEA1.	86
Abbildung 5.12 eGFP-hMon2 wird mit mRFP-ARF1 lokalisiert.	87
Abbildung 5.13 eGFP-hMon2 positive vesikuläre Strukturen bewegen sich innerhalb der HeLa Zellen.	89
Abbildung 5.14 Der C-Terminus von hMon2 ist wichtig für die für seine subzelluläre Verteilung.	91
Abbildung 5.15 Die C-terminale F-Domäne von hMon2 dimerisiert.	93
Abbildung 5.16 Koimmunpräzipitationsversuche für die Ermittlung neuer Bindepartner von hMon2.	95
Abbildung 5.17 SDS-Gele für die MS-Analysen BSK1395 und BSK1401 zur Ermittlung neuer Interaktionspartner von hMon2.	96
Abbildung 5.18 Endogenes hMon2 bindet an Kinesin-1 und Myosin II.	99
Abbildung 5.19 Koimmunpräzipitation von Kinesin-1 mit eGFP-hMon2.	102
Abbildung 5.20 eGFP-hMon2 bindet an GST-KHC771-963.	104
Abbildung 5.21 eGFP-hMon2 wird mit Kinesin-1 kolokalisiert.	105
Abbildung 5.22 Koimmunpräzipitation von Ysl2p und HA-hMon2 mit Venus-Myo2p aus Hefe.	106
Abbildung 5.23 eGFP-hMon2 bindet an polymerisiertes Aktin.	108
Abbildung 5.24 eGFP-hMon2 wird oftmals mit Rhodamin-Phalloidin gefärbten Strukturen lokalisiert.	110
Abbildung 6.1 Vorgeschlagene Verteilung von hMon2 innerhalb der Zelle.	120

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 4.1. Für die Kultivierung von Bakterien wurden folgende Medien verwendet.....	37
Tabelle 4.2. Für die Kultivierung von Hefe wurden folgende Medien verwendet.	37
Tabelle 4.3. Verwendete Primärantikörper für Immunblotting.....	38
Tabelle 4.4. Verwendete Primärantikörper für indirekte Immunfluoreszenz	38
Tabelle 4.5. Verwendete Antikörper für Immunpräzipitation.....	39
Tabelle 4.6. Verwendete Sekundärantikörper für Immunblot.....	39
Tabelle 4.7. Verwendete Sekundärantikörper für quantitativen Immunoblot.....	39
Tabelle 4.8. Verwendete Sekundärantikörper für indirekte Immunfluoreszenz	39
Tabelle 4.9. Primer die für diese Doktorarbeit verwendet wurden	40
Tabelle 4.10. Verwendete Sequenzierprimer	41
Tabelle 4.11. In dieser Arbeit verwendete <i>E. coli</i>	41
Tabelle 4.12. In dieser Arbeit verwendete Hefestämme	42
Tabelle 4.13. Plasmide für Proteinexpression in Hefe	43
Tabelle 4.14. Plasmide für Proteinexpression in <i>E. coli</i> Bakterien.....	43
Tabelle 4.15. Plasmide für Proteinexpression in Säugerzellen	43
Tabelle 4.16. Schema für die Polymerasekettenreaktion für Amplifikation von KHC771-963 DNA	46
Tabelle 4.17. Schema für die Polymerasekettenreaktion für Amplifikation von KLC2 DNA .	47
Tabelle 4.18. Mengenangaben für die Herstellung eines Trenngels	51
Tabelle 4.19. Mengenangaben für die Herstellung eines Sammelgels	51
Tabelle 5.1. Tabellarische Auflistung von interessanten oder/und ausgewählten Proteinen zur weiteren Untersuchung auf Bindung mit hMon2	97
Tabelle 5.2. Tabellarische Auflistung von Komponenten der eukaryotischen Translationsinitiations-faktoren der eIF3 und eIF4 Komplexe aus der MS-Analyse	100

9. Referenzen

- Achstetter, T., Franzusoff, A., Field, C. and Schekman, R. (1988) SEC7 encodes an unusual, high molecular weight protein required for membrane traffic from the yeast Golgi apparatus. *J Biol Chem*, **263**, 11711-11717.
- Adio, S., Reth, J., Bathe, F. and Woehlke, G. (2006) Review: regulation mechanisms of Kinesin-1. *J Muscle Res Cell Motil*, **27**, 153-160.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., RaV, M., Roberts, K., and Walter, P (ed.). (2008) *Molecular biology of the cell*. Garland Science, New York.
- Allan, V.J. (2011) Cytoplasmic Dynein. *Biochem Soc Trans*, **39**, 1169-1178.
- Altmann, M., Muller, P.P., Wittmer, B., Ruchti, F., Lanker, S. and Trachsel, H. (1993) A *Saccharomyces cerevisiae* homologue of mammalian translation initiation factor 4B contributes to RNA helicase activity. *EMBO J*, **12**, 3997-4003.
- Anders, N. and Jürgens, G. (2008) Large ARF guanine nucleotide exchange factors in membrane trafficking. *Cell Mol Life Sci*, **65**, 3433-3445.
- Anders, N., Nielsen, M., Keicher, J., Stierhof, Y.D., Furutani, M., Tasaka, M., Skriver, K. and Jürgens, G. (2008) Membrane association of the Arabidopsis ARF exchange factor GNOM involves interaction of conserved domains. *Plant Cell*, **20**, 142-151.
- Aridor, M. and Traub, L.M. (2002) Cargo selection in vesicular transport: the making and breaking of a coat. *Traffic*, **3**, 537-546.
- Avaro, S., Belgareh-Touze, N., Sibella-Arguelles, C., Volland, C. and Haguenuer-Tsapis, R. (2002) Mutants defective in secretory/vacuolar pathways in the EUROFAN collection of yeast disruptants. *Yeast*, **19**, 351-371.
- Balasubramanian, K. and Schroit, A.J. (2003) Aminophospholipid asymmetry: A matter of life and death. *Annu Rev Physiol*, **65**, 701-734.
- Barbosa, S., Pratte, D., Schwarz, H., Pipkorn, R. and Singer-Krüger, B. (2010) Oligomeric Dop1p is Part of the Endosomal Neolp-Ysl2p-Arl1p Membrane Remodeling Complex. *Traffic*.
- Behnia, R. and Munro, S. (2005) Organelle identity and the signposts for membrane traffic. *Nature*, **438**, 597-604.
- Belov, G.A., Altan-Bonnet, N., Kovtunovych, G., Jackson, C.L., Lippincott-Schwartz, J. and Ehrenfeld, E. (2007a) Hijacking components of the cellular secretory pathway for replication of poliovirus RNA. *J Virol*, **81**, 558-567.
- Belov, G.A. and Ehrenfeld, E. (2007) Involvement of cellular membrane traffic proteins in poliovirus replication. *Cell Cycle*, **6**, 36-38.
- Belov, G.A., Habbersett, C., Franco, D. and Ehrenfeld, E. (2007b) Activation of cellular Arf GTPases by poliovirus protein 3CD correlates with virus replication. *J Virol*, **81**, 9259-9267.
- Belov, G.A., Kovtunovych, G., Jackson, C.L. and Ehrenfeld, E. (2010) Poliovirus replication requires the N-terminus but not the catalytic Sec7 domain of ArfGEF GBF1. *Cell Microbiol*, **12**, 1463-1479.
- Beraud-Dufour, S., Paris, S., Chabre, M. and Antony, B. (1999) Dual interaction of ADP ribosylation factor 1 with Sec7 domain and with lipid membranes during catalysis of guanine nucleotide exchange. *J Biol Chem*, **274**, 37629-37636.
- Bethune, J., Wieland, F. and Moelleken, J. (2006) COPI-mediated transport. *J Membr Biol*, **211**, 65-79.
- Bieniasz, P.D. (2009) The cell biology of HIV-1 virion genesis. *Cell Host Microbe*, **5**, 550-558.

- Boal, F. and Stephens, D.J. (2010) Specific functions of BIG1 and BIG2 in endomembrane organization. *PLoS One*, **5**, e9898.
- Boman, A.L., Salo, P.D., Hauglund, M.J., Strand, N.L., Rensink, S.J. and Zhdankina, O. (2002) ADP-ribosylation factor (ARF) interaction is not sufficient for yeast GGA protein function or localization. *Mol Biol Cell*, **13**, 3078-3095.
- Boman, A.L., Zhang, C., Zhu, X. and Kahn, R.A. (2000) A family of ADP-ribosylation factor effectors that can alter membrane transport through the trans-Golgi. *Mol Biol Cell*, **11**, 1241-1255.
- Bonifacino, J.S. and Glick, B.S. (2004) The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell*, **116**, 153-166.
- Bonifacino, J.S. and Lippincott-Schwartz, J. (2003) Coat proteins: shaping membrane transport. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**, 409-414.
- Bonifacino, J.S. and Traub, L.M. (2003) Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Biochem*, **72**, 395-447.
- Böttcher, C., Wicky, S., Schwarz, H. and Singer-Krüger, B. (2006) Sjl2p is specifically involved in early steps of endocytosis intimately linked to actin dynamics via the Ark1p/Prk1p kinases. *FEBS Lett*, **580**, 633-641.
- Braulke, T. and Bonifacino, J.S. (2009) Sorting of lysosomal proteins. *Biochim Biophys Acta*, **1793**, 605-614.
- Bresnick, A.R. (1999) Molecular mechanisms of nonmuscle myosin-II regulation. *Curr Opin Cell Biol*, **11**, 26-33.
- Bretscher, A. (2003) Polarized growth and organelle segregation in yeast: the tracks, motors, and receptors. *J Cell Biol*, **160**, 811-816.
- Bui, Q.T., Golinelli-Cohen, M.P. and Jackson, C.L. (2009) Large Arf1 guanine nucleotide exchange factors: evolution, domain structure, and roles in membrane trafficking and human disease. *Mol Genet Genomics*, **282**, 329-350.
- Carreno, S., Engqvist-Goldstein, A.E., Zhang, C.X., McDonald, K.L. and Drubin, D.G. (2004) Actin dynamics coupled to clathrin-coated vesicle formation at the trans-Golgi network. *J Cell Biol*, **165**, 781-788.
- Casanova, J.E. (2007) Regulation of Arf activation: the Sec7 family of guanine nucleotide exchange factors. *Traffic*, **8**, 1476-1485.
- Chantalat, S., Park, S.K., Hua, Z., Liu, K., Gobin, R., Peyroche, A., Rambourg, A., Graham, T.R. and Jackson, C.L. (2004) The Arf activator Gea2p and the P-type ATPase Drs2p interact at the Golgi in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci*, **117**, 711-722.
- Chen, K.Y., Tsai, P.C., Hsu, J.W., Hsu, H.C., Fang, C.Y., Chang, L.C., Tsai, Y.T., Yu, C.J. and Lee, F.J. (2010) Syt1p promotes activation of Arl1p at the late Golgi to recruit Imh1p. *J Cell Sci*, **123**, 3478-3489.
- Cherfils, J. and Melancon, P. (2005) On the action of Brefeldin A on Sec7-stimulated membrane-recruitment and GDP/GTP exchange of Arf proteins. *Biochem Soc Trans*, **33**, 635-638.
- Christis, C. and Munro, S. (2012) The small G protein Arl1 directs the trans-Golgi-specific targeting of the Arf1 exchange factors BIG1 and BIG2. *J Cell Biol*, **196**, 327-335.
- Christoforidis, S., McBride, H.M., Burgoyne, R.D. and Zerial, M. (1999) The Rab5 effector EEA1 is a core component of endosome docking. *Nature*, **397**, 621-625.
- Claude, A., Zhao, B.P., Kuziemy, C.E., Dahan, S., Berger, S.J., Yan, J.P., Arnold, A.D., Sullivan, E.M. and Melancon, P. (1999) GBF1: A novel Golgi-associated BFA-resistant guanine nucleotide exchange factor that displays specificity for ADP-ribosylation factor 5. *J Cell Biol*, **146**, 71-84.
- Clauss, W., Clauss, C. (ed.). (2009) *Humanbiologie kompakt*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

- Cohen, L.A., Honda, A., Varnai, P., Brown, F.D., Balla, T. and Donaldson, J.G. (2007) Active Arf6 recruits ARNO/cytohesin GEFs to the PM by binding their PH domains. *Mol Biol Cell*, **18**, 2244-2253.
- Cole, N.B., Sciaky, N., Marotta, A., Song, J. and Lippincott-Schwartz, J. (1996) Golgi dispersal during microtubule disruption: regeneration of Golgi stacks at peripheral endoplasmic reticulum exit sites. *Mol Biol Cell*, **7**, 631-650.
- Conti, M.A. and Adelstein, R.S. (2008) Nonmuscle myosin II moves in new directions. *J Cell Sci*, **121**, 11-18.
- Coppolecchia, R., Buser, P., Stotz, A. and Linder, P. (1993) A new yeast translation initiation factor suppresses a mutation in the eIF-4A RNA helicase. *EMBO J*, **12**, 4005-4011.
- Costaguta, G., Duncan, M.C., Fernandez, G.E., Huang, G.H. and Payne, G.S. (2006) Distinct roles for TGN/endosome epsin-like adaptors Ent3p and Ent5p. *Mol Biol Cell*, **17**, 3907-3920.
- Cox, R., Mason-Gamer, R.J., Jackson, C.L. and Segev, N. (2004) Phylogenetic analysis of Sec7-domain-containing Arf nucleotide exchangers. *Mol Biol Cell*, **15**, 1487-1505.
- Cyr, J.L., Pfister, K.K., Bloom, G.S., Slaughter, C.A. and Brady, S.T. (1991) Molecular genetics of kinesin light chains: generation of isoforms by alternative splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 10114-10118.
- D'Souza-Schorey, C., Boettner, B. and Van Aelst, L. (1998) Rac regulates integrin-mediated spreading and increased adhesion of T lymphocytes. *Mol Cell Biol*, **18**, 3936-3946.
- DeBoer, S.R., You, Y., Szodorai, A., Kaminska, A., Pigino, G., Nwabuisi, E., Wang, B., Estrada-Hernandez, T., Kins, S., Brady, S.T. and Morfini, G. (2008) Conventional kinesin holoenzymes are composed of heavy and light chain homodimers. *Biochemistry*, **47**, 4535-4543.
- Deitz, S.B., Rambourg, A., Kepes, F. and Franzusoff, A. (2000) Sec7p directs the transitions required for yeast Golgi biogenesis. *Traffic*, **1**, 172-183.
- Delevoye, C., Hurbain, I., Tenza, D., Sibarita, J.B., Uzan-Gafsou, S., Ohno, H., Geerts, W.J., Verkleij, A.J., Salamero, J., Marks, M.S. and Raposo, G. (2009) AP-1 and KIF13A coordinate endosomal sorting and positioning during melanosome biogenesis. *J Cell Biol*, **187**, 247-264.
- Dell'Angelica, E.C., Mullins, C. and Bonifacino, J.S. (1999) AP-4, a novel protein complex related to clathrin adaptors. *J Biol Chem*, **274**, 7278-7285.
- Dell'Angelica, E.C., Puertollano, R., Mullins, C., Aguilar, R.C., Vargas, J.D., Hartnell, L.M. and Bonifacino, J.S. (2000) GGAs: a family of ADP ribosylation factor-binding proteins related to adaptors and associated with the Golgi complex. *J Cell Biol*, **149**, 81-94.
- Deloche, O., de la Cruz, J., Kressler, D., Doere, M. and Linder, P. (2004) A membrane transport defect leads to a rapid attenuation of translation initiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell*, **13**, 357-366.
- Deng, Y., Golinelli-Cohen, M.P., Smirnova, E. and Jackson, C.L. (2009) A COPI coat subunit interacts directly with an early-Golgi localized Arf exchange factor. *EMBO Rep*, **10**, 58-64.
- Doherty, G.J. and McMahon, H.T. (2008) Mediation, modulation, and consequences of membrane-cytoskeleton interactions. *Annu Rev Biophys*, **37**, 65-95.
- Doherty, G.J. and McMahon, H.T. (2009) Mechanisms of endocytosis. *Annu Rev Biochem*, **78**, 857-902.
- Donaldson, J.G., Finazzi, D. and Klausner, R.D. (1992) Brefeldin A inhibits Golgi membrane-catalysed exchange of guanine nucleotide onto ARF protein. *Nature*, **360**, 350-352.
- Doray, B., Bruns, K., Ghosh, P. and Kornfeld, S. (2002) Interaction of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor with GGA proteins. *J Biol Chem*, **277**, 18477-18482.

- Driver, J.W., Jamison, D.K., Uppulury, K., Rogers, A.R., Kolomeisky, A.B. and Diehl, M.R. (2011) Productive cooperation among processive motors depends inversely on their mechanochemical efficiency. *Biophys J*, **101**, 386-395.
- Duncan, M.C., Costaguta, G. and Payne, G.S. (2003) Yeast epsin-related proteins required for Golgi-endosome traffic define a gamma-adaptin ear-binding motif. *Nat Cell Biol*, **5**, 77-81.
- Duran, J.M., Valderrama, F., Castel, S., Magdalena, J., Tomas, M., Hosoya, H., Renau-Piqueras, J., Malhotra, V. and Egea, G. (2003) Myosin motors and not actin comets are mediators of the actin-based Golgi-to-endoplasmic reticulum protein transport. *Mol Biol Cell*, **14**, 445-459.
- Eckley, D.M. and Schroer, T.A. (2003) Interactions between the evolutionarily conserved, actin-related protein, Arp11, actin, and Arp1. *Mol Biol Cell*, **14**, 2645-2654.
- Efe, J.A., Plattner, F., Hulo, N., Kressler, D., Emr, S.D. and Deloche, O. (2005) Yeast Mon2p is a highly conserved protein that functions in the cytoplasm-to-vacuole transport pathway and is required for Golgi homeostasis. *J Cell Sci*, **118**, 4751-4764.
- Engqvist-Goldstein, A.E. and Drubin, D.G. (2003) Actin assembly and endocytosis: from yeast to mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **19**, 287-332.
- Fagarasanu, A. and Rachubinski, R.A. (2007) Orchestrating organelle inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Opin Microbiol*, **10**, 528-538.
- Foth, B.J., Goedecke, M.C. and Soldati, D. (2006) New insights into myosin evolution and classification. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 3681-3686.
- Franzusoff, A. and Schekman, R. (1989) Functional compartments of the yeast Golgi apparatus are defined by the *sec7* mutation. *EMBO J*, **8**, 2695-2702.
- Gallusser, A. and Kirchhausen, T. (1993) The beta 1 and beta 2 subunits of the AP complexes are the clathrin coat assembly components. *EMBO J*, **12**, 5237-5244.
- Garcia-Mata, R. and Sztul, E. (2003) The membrane-tethering protein p115 interacts with GBF1, an ARF guanine-nucleotide-exchange factor. *EMBO Rep*, **4**, 320-325.
- Gerdes, H.H. (2008) Membrane traffic in the secretory pathway. *Cell Mol Life Sci*, **65**, 2779-2780.
- Gillingham, A.K. and Munro, S. (2007) The small G proteins of the Arf family and their regulators. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **23**, 579-611.
- Gillingham, A.K., Whyte, J.R., Panic, B. and Munro, S. (2006) Mon2, a relative of large Arf exchange factors, recruits Dop1 to the Golgi apparatus. *J Biol Chem*, **281**, 2273-2280.
- Gingras, A.C., Raught, B. and Sonenberg, N. (1999) eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu Rev Biochem*, **68**, 913-963.
- Goldberg, J. (1998) Structural basis for activation of ARF GTPase: mechanisms of guanine nucleotide exchange and GTP-myristoyl switching. *Cell*, **95**, 237-248.
- Goodson, H.V. and Dawson, S.C. (2006) Multiplying myosins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 3498-3499.
- Govindan, B., Bowser, R. and Novick, P. (1995) The role of Myo2, a yeast class V myosin, in vesicular transport. *J Cell Biol*, **128**, 1055-1068.
- Graham, T.R. (2004) Flippases and vesicle-mediated protein transport. *Trends Cell Biol*, **14**, 670-677.
- Grebe, M., Gadea, J., Steinmann, T., Kientz, M., Rahfeld, J.U., Salchert, K., Koncz, C. and Jürgens, G. (2000) A conserved domain of the arabidopsis GNOM protein mediates subunit interaction and cyclophilin 5 binding. *Plant Cell*, **12**, 343-356.
- Gruenberg, J. (2001) The endocytic pathway: a mosaic of domains. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**, 721-730.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, **166**, 557-580.

- Hinnebusch, A.G. (2006) eIF3: a versatile scaffold for translation initiation complexes. *Trends Biochem Sci*, **31**, 553-562.
- Hinners, I. and Tooze, S.A. (2003) Changing directions: clathrin-mediated transport between the Golgi and endosomes. *J Cell Sci*, **116**, 763-771.
- Hirokawa, N. and Noda, Y. (2008) Intracellular transport and kinesin superfamily proteins, KIFs: structure, function, and dynamics. *Physiol Rev*, **88**, 1089-1118.
- Hirokawa, N., Noda, Y., Tanaka, Y. and Niwa, S. (2009) Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **10**, 682-696.
- Hirst, J., Lindsay, M.R. and Robinson, M.S. (2001) GGAs: roles of the different domains and comparison with AP-1 and clathrin. *Mol Biol Cell*, **12**, 3573-3588.
- Hirst, J., Lui, W.W., Bright, N.A., Totty, N., Seaman, M.N. and Robinson, M.S. (2000) 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.
- Hirst, J., Motley, A., Harasaki, K., Peak Chew, S.Y. and Robinson, M.S. (2003) EpsinR: an ENTH domain-containing protein that interacts with AP-1. *Mol Biol Cell*, **14**, 625-641.
- Holloway, Z.G., Grabski, R., Szul, T., Styers, M.L., Coventry, J.A., Monaco, A.P. and Sztul, E. (2007) Activation of ADP-ribosylation factor regulates biogenesis of the ATP7A-containing trans-Golgi network compartment and its Cu-induced trafficking. *Am J Physiol Cell Physiol*, **293**, C1753-1767.
- Holzbaur, E.L. and Goldman, Y.E. (2010) Coordination of molecular motors: from in vitro assays to intracellular dynamics. *Curr Opin Cell Biol*, **22**, 4-13.
- Hopkins, C.R., Gibson, A., Shipman, M., Strickland, D.K. and Trowbridge, I.S. (1994) In migrating fibroblasts, recycling receptors are concentrated in narrow tubules in the pericentriolar area, and then routed to the plasma membrane of the leading lamella. *J Cell Biol*, **125**, 1265-1274.
- Horton H. Robert, M.L.A., Scrimgeour K. Grey, Perry Marc D., Rawn J. David (ed.). (2008) *Biochemie*. Pearson Education Deutschland GmbH.
- Horvath, C.A., Vanden Broeck, D., Boulet, G.A., Bogers, J. and De Wolf, M.J. (2007) Epsin: inducing membrane curvature. *Int J Biochem Cell Biol*, **39**, 1765-1770.
- Hsu, N.Y., Ilnytska, O., Belov, G., Santiana, M., Chen, Y.H., Takvorian, P.M., Pau, C., van der Schaar, H., Kaushik-Basu, N., Balla, T., Cameron, C.E., Ehrenfeld, E., van Kuppeveld, F.J. and Altan-Bonnet, N. (2010) Viral reorganization of the secretory pathway generates distinct organelles for RNA replication. *Cell*, **141**, 799-811.
- Ishizaki, R., Shin, H.W., Mitsuhashi, H. and Nakayama, K. (2008) Redundant roles of BIG2 and BIG1, guanine-nucleotide exchange factors for ADP-ribosylation factors in membrane traffic between the trans-Golgi network and endosomes. *Mol Biol Cell*, **19**, 2650-2660.
- Jochum, A., Jackson, D., Schwarz, H., Pipkorn, R. and Singer-Krüger, B. (2002) Yeast Ysl2p, homologous to Sec7 domain guanine nucleotide exchange factors, functions in endocytosis and maintenance of vacuole integrity and interacts with the Arf-Like small GTPase Arl1p. *Mol Cell Biol*, **22**, 4914-4928.
- Kahn, R.A. (2009) Toward a model for Arf GTPases as regulators of traffic at the Golgi. *FEBS Lett*, **583**, 3872-3879.
- Kahn, R.A., Cherfils, J., Elias, M., Lovering, R.C., Munro, S. and Schurmann, A. (2006) Nomenclature for the human Arf family of GTP-binding proteins: ARF, ARL, and SAR proteins. *J Cell Biol*, **172**, 645-650.
- Kahn, R.A., Kern, F.G., Clark, J., Gelmann, E.P. and Rulka, C. (1991) Human ADP-ribosylation factors. A functionally conserved family of GTP-binding proteins. *J Biol Chem*, **266**, 2606-2614.

- Kaksonen, M., Toret, C.P. and Drubin, D.G. (2005) A modular design for the clathrin- and actin-mediated endocytosis machinery. *Cell*, **123**, 305-320.
- Kaksonen, M., Toret, C.P. and Drubin, D.G. (2006) Harnessing actin dynamics for clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **7**, 404-414.
- Kalthoff, C., Groos, S., Kohl, R., Mahrhold, S. and Ungewickell, E.J. (2002) Clint: a novel clathrin-binding ENTH-domain protein at the Golgi. *Mol Biol Cell*, **13**, 4060-4073.
- Kanai, Y., Dohmae, N. and Hirokawa, N. (2004) Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule. *Neuron*, **43**, 513-525.
- Kanamori, T., Inoue, T., Sakamoto, T., Gengyo-Ando, K., Tsujimoto, M., Mitani, S., Sawa, H., Aoki, J. and Arai, H. (2008) Beta-catenin asymmetry is regulated by PLA1 and retrograde traffic in *C. elegans* stem cell divisions. *EMBO J*, **27**, 1647-1657.
- Kang, D., Gho, S.G., Suh, M. and Kang, C. (2002) Highly Sensitive and Fast Protein Detection with Coomassie Brilliant Blue in Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Bull. Korean Chem. Soc.*, **11**, 1511-1512.
- Kirchhausen, T. (2000a) Clathrin. *Annu Rev Biochem*, **69**, 699-727.
- Kirchhausen, T. (2000b) Three ways to make a vesicle. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **1**, 187-198.
- Kirchhausen, T. (2009) Imaging endocytic clathrin structures in living cells. *Trends Cell Biol*, **19**, 596-605.
- Klumpp, S. and Lipowsky, R. (2005) Cooperative cargo transport by several molecular motors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 17284-17289.
- Kornfeld, S. (1992) Structure and function of the mannose 6-phosphate/insulinlike growth factor II receptors. *Annu Rev Biochem*, **61**, 307-330.
- Kreis, T.E. and Pepperkok, R. (1994) Coat proteins in intracellular membrane transport. *Curr Opin Cell Biol*, **6**, 533-537.
- Kroczyńska, B., Kaur, S., Katsoulidis, E., Majchrzak-Kita, B., Sassano, A., Kozma, S.C., Fish, E.N. and Plataniias, L.C. (2009) Interferon-dependent engagement of eukaryotic initiation factor 4B via S6 kinase (S6K)- and ribosomal protein S6K-mediated signals. *Mol Cell Biol*, **29**, 2865-2875.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lakkaraju, A., Carvajal-Gonzalez, J.M. and Rodriguez-Boulan, E. (2009) It takes two to tango to the melanosome. *J Cell Biol*, **187**, 161-163.
- Lasić, M. (Dissertation 2008) The yeast endosomal/TGN-localized Ysl2p-Arl1p-Neolp network: search for novel interaction partners.
- Lawrence, C.J., Dawe, R.K., Christie, K.R., Cleveland, D.W., Dawson, S.C., Endow, S.A., Goldstein, L.S., Goodson, H.V., Hirokawa, N., Howard, J., Malmberg, R.L., McIntosh, J.R., Miki, H., Mitchison, T.J., Okada, Y., Reddy, A.S., Saxton, W.M., Schliwa, M., Scholey, J.M., Vale, R.D., Walczak, C.E. and Wordeman, L. (2004) A standardized kinesin nomenclature. *J Cell Biol*, **167**, 19-22.
- Lefrançois, S. and McCormick, P.J. (2007) The Arf GEF GBF1 is required for GGA recruitment to Golgi membranes. *Traffic*, **8**, 1440-1451.
- Legendre-Guillemain, V., Wasiak, S., Hussain, N.K., Angers, A. and McPherson, P.S. (2004) ENTH/ANTH proteins and clathrin-mediated membrane budding. *J Cell Sci*, **117**, 9-18.
- Lillie, S.H. and Brown, S.S. (1992) Suppression of a myosin defect by a kinesin-related gene. *Nature*, **356**, 358-361.
- Lin, S.X., Gunderson, G.G. and Maxfield, F.R. (2002) Export from pericentriolar endocytic recycling compartment to cell surface depends on stable, detyrosinated (glu) microtubules and kinesin. *Mol Biol Cell*, **13**, 96-109.

- Lobel, P., Fujimoto, K., Ye, R.D., Griffiths, G. and Kornfeld, S. (1989) Mutations in the cytoplasmic domain of the 275 kd mannose 6-phosphate receptor differentially alter lysosomal enzyme sorting and endocytosis. *Cell*, **57**, 787-796.
- Lui, W.W., Collins, B.M., Hirst, J., Motley, A., Millar, C., Schu, P., Owen, D.J. and Robinson, M.S. (2003) Binding partners for the COOH-terminal appendage domains of the GGAs and gamma-adaptin. *Mol Biol Cell*, **14**, 2385-2398.
- Manlandro, C.M., Palanivel, V.R., Schorr, E.B., Mihatov, N., Antony, A.A. and Rosenwald, A.G. (2012) Mon2 is a negative regulator of the monomeric G protein, Arl1. *FEMS Yeast Res.*
- Manolea, F., Claude, A., Chun, J., Rosas, J. and Melancon, P. (2008) Distinct functions for Arf guanine nucleotide exchange factors at the Golgi complex: GBF1 and BIGs are required for assembly and maintenance of the Golgi stack and trans-Golgi network, respectively. *Mol Biol Cell*, **19**, 523-535.
- McCart, A.E., Mahony, D. and Rothnagel, J.A. (2003) Alternatively spliced products of the human kinesin light chain 1 (KNS2) gene. *Traffic*, **4**, 576-580.
- McMahon, H.T. and Mills, I.G. (2004) COP and clathrin-coated vesicle budding: different pathways, common approaches. *Curr Opin Cell Biol*, **16**, 379-391.
- Mellman, I. (1996) Endocytosis and molecular sorting. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **12**, 575-625.
- Meyer, C., Eskelinen, E.L., Guruprasad, M.R., von Figura, K. and Schu, P. (2001) Mu 1A deficiency induces a profound increase in MPR300/IGF-II receptor internalization rate. *J Cell Sci*, **114**, 4469-4476.
- Mills, I.G., Praefcke, G.J., Vallis, Y., Peter, B.J., Olesen, L.E., Gallop, J.L., Butler, P.J., Evans, P.R. and McMahon, H.T. (2003) EpsinR: an AP1/clathrin interacting protein involved in vesicle trafficking. *J Cell Biol*, **160**, 213-222.
- Miserey-Lenkei, S., Chalancon, G., Bardin, S., Formstecher, E., Goud, B. and Echard, A. (2010) Rab and actomyosin-dependent fission of transport vesicles at the Golgi complex. *Nat Cell Biol*, **12**, 645-654.
- Monetta, P., Slavin, I., Romero, N. and Alvarez, C. (2007) Rab1b interacts with GBF1 and modulates both ARF1 dynamics and COPI association. *Mol Biol Cell*, **18**, 2400-2410.
- Mouratou, B., Biou, V., Joubert, A., Cohen, J., Shields, D.J., Geldner, N., Jürgens, G., Melancon, P. and Cherfils, J. (2005) The domain architecture of large guanine nucleotide exchange factors for the small GTP-binding protein Arf. *BMC Genomics*, **6**, 20.
- Muren, E., Oyen, M., Barmark, G. and Ronne, H. (2001) Identification of yeast deletion strains that are hypersensitive to brefeldin A or monensin, two drugs that affect intracellular transport. *Yeast*, **18**, 163-172.
- Müsch, A., Cohen, D. and Rodriguez-Boulan, E. (1997) Myosin II is involved in the production of constitutive transport vesicles from the TGN. *J Cell Biol*, **138**, 291-306.
- Nakagawa, T., Setou, M., Seog, D., Ogasawara, K., Dohmae, N., Takio, K. and Hirokawa, N. (2000) A novel motor, KIF13A, transports mannose-6-phosphate receptor to plasma membrane through direct interaction with AP-1 complex. *Cell*, **103**, 569-581.
- Nakayama, K. (2004) Membrane traffic: editorial overview. *J Biochem*, **136**, 751-753.
- Narumiya, S. and Watanabe, N. (2009) Migration without a clutch. *Nat Cell Biol*, **11**, 1394-1396.
- Natarajan, P., Wang, J., Hua, Z. and Graham, T.R. (2004) Drs2p-coupled aminophospholipid translocase activity in yeast Golgi membranes and relationship to in vivo function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 10614-10619.
- Newpher, T.M., Smith, R.P., Lemmon, V. and Lemmon, S.K. (2005) In vivo dynamics of clathrin and its adaptor-dependent recruitment to the actin-based endocytic machinery in yeast. *Dev Cell*, **9**, 87-98.

- Nie, Z., Hirsch, D.S. and Randazzo, P.A. (2003) Arf and its many interactors. *Curr Opin Cell Biol*, **15**, 396-404.
- Niu, T.K., Pfeifer, A.C., Lippincott-Schwartz, J. and Jackson, C.L. (2005) Dynamics of GBF1, a Brefeldin A-sensitive Arf1 exchange factor at the Golgi. *Mol Biol Cell*, **16**, 1213-1222.
- Odorizzi, G., Cowles, C.R. and Emr, S.D. (1998) The AP-3 complex: a coat of many colours. *Trends Cell Biol*, **8**, 282-288.
- Ooi, C.E., Dell'Angelica, E.C. and Bonifacino, J.S. (1998) ADP-Ribosylation factor 1 (ARF1) regulates recruitment of the AP-3 adaptor complex to membranes. *J Cell Biol*, **142**, 391-402.
- Park, S.K., Hartnell, L.M. and Jackson, C.L. (2005) Mutations in a highly conserved region of the Arf1p activator GEA2 block anterograde Golgi transport but not COPI recruitment to membranes. *Mol Biol Cell*, **16**, 3786-3799.
- Peyroche, A., Antony, B., Robineau, S., Acker, J., Cherfils, J. and Jackson, C.L. (1999) Brefeldin A acts to stabilize an abortive ARF-GDP-Sec7 domain protein complex: involvement of specific residues of the Sec7 domain. *Mol Cell*, **3**, 275-285.
- Pollard, T.D. (2007) Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **36**, 451-477.
- Pomorski, T., Lombardi, R., Riezman, H., Devaux, P.F., van Meer, G. and Holthuis, J.C. (2003) Drs2p-related P-type ATPases Dnf1p and Dnf2p are required for phospholipid translocation across the yeast plasma membrane and serve a role in endocytosis. *Mol Biol Cell*, **14**, 1240-1254.
- Prezant, T.R., Chaltraw, W.E., Jr. and Fischel-Ghodsian, N. (1996) Identification of an overexpressed yeast gene which prevents aminoglycoside toxicity. *Microbiology*, **142** (Pt 12), 3407-3414.
- Puertollano, R. (2004) Clathrin-mediated transport: assembly required. Workshop on Molecular Mechanisms of Vesicle Selectivity. *EMBO Rep*, **5**, 942-946.
- Rahman, A., Friedman, D.S. and Goldstein, L.S. (1998) Two kinesin light chain genes in mice. Identification and characterization of the encoded proteins. *J Biol Chem*, **273**, 15395-15403.
- Ramaen, O., Joubert, A., Simister, P., Belgareh-Touze, N., Olivares-Sanchez, M.C., Zeeh, J.C., Chantalat, S., Golinelli-Cohen, M.P., Jackson, C.L., Biou, V. and Cherfils, J. (2007) Interactions between conserved domains within homodimers in the BIG1, BIG2, and GBF1 Arf guanine nucleotide exchange factors. *J Biol Chem*, **282**, 28834-28842.
- Reck-Peterson, S.L., Tyska, M.J., Novick, P.J. and Mooseker, M.S. (2001) The yeast class V myosins, Myo2p and Myo4p, are nonprocessive actin-based motors. *J Cell Biol*, **153**, 1121-1126.
- Ren, M., Xu, G., Zeng, J., De Lemos-Chiarandini, C., Adesnik, M. and Sabatini, D.D. (1998) Hydrolysis of GTP on rab11 is required for the direct delivery of transferrin from the pericentriolar recycling compartment to the cell surface but not from sorting endosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 6187-6192.
- Renault, L., Guibert, B. and Cherfils, J. (2003) Structural snapshots of the mechanism and inhibition of a guanine nucleotide exchange factor. *Nature*, **426**, 525-530.
- Rink, J., Ghigo, E., Kalaidzidis, Y. and Zerial, M. (2005) Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell*, **122**, 735-749.
- Robinson, M.S. (2004) Adaptable adaptors for coated vesicles. *Trends Cell Biol*, **14**, 167-174.
- Robinson, M.S. and Bonifacino, J.S. (2001) Adaptor-related proteins. *Curr Opin Cell Biol*, **13**, 444-453.
- Robinson, R.C., Turbedsky, K., Kaiser, D.A., Marchand, J.B., Higgs, H.N., Choe, S. and Pollard, T.D. (2001) Crystal structure of Arp2/3 complex. *Science*, **294**, 1679-1684.

- Robinson, R.W. and Snyder, J.A. (2004) An innovative fixative for cytoskeletal components allows high resolution in colocalization studies using immunofluorescence techniques. *Histochem Cell Biol*, **122**, 1-5.
- Rothman, J.E. (1996) The protein machinery of vesicle budding and fusion. *Protein Sci*, **5**, 185-194.
- Rothman, J.E. and Wieland, F.T. (1996) Protein sorting by transport vesicles. *Science*, **272**, 227-234.
- Saeki, N., Tokuo, H. and Ikebe, M. (2005) BIG1 is a binding partner of myosin IXb and regulates its Rho-GTPase activating protein activity. *J Biol Chem*, **280**, 10128-10134.
- Saffarian, S., Cocucci, E. and Kirchhausen, T. (2009) Distinct dynamics of endocytic clathrin-coated pits and coated plaques. *PLoS Biol*, **7**, e1000191.
- Sambrook, J., Fritsche, E.F., Maniatis, T. . (1989) *Molecular cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, New York.
- Schekman, R. and Orci, L. (1996) Coat proteins and vesicle budding. *Science*, **271**, 1526-1533.
- Schmid, S.L. (1997) Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: an integrated process. *Annu Rev Biochem*, **66**, 511-548.
- Schmidt, M.R., Maritzen, T., Kukhtina, V., Higman, V.A., Doglio, L., Barak, N.N., Strauss, H., Oschkinat, H., Dotti, C.G. and Haucke, V. (2009) Regulation of endosomal membrane traffic by a Gadkin/AP-1/kinesin KIF5 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 15344-15349.
- Seaman, M.N. (2008) Endosome protein sorting: motifs and machinery. *Cell Mol Life Sci*, **65**, 2842-2858.
- Sheff, D., Pelletier, L., O'Connell, C.B., Warren, G. and Mellman, I. (2002) Transferrin receptor recycling in the absence of perinuclear recycling endosomes. *J Cell Biol*, **156**, 797-804.
- Sheff, D.R., Daro, E.A., Hull, M. and Mellman, I. (1999) The receptor recycling pathway contains two distinct populations of early endosomes with different sorting functions. *J Cell Biol*, **145**, 123-139.
- Shen, X., Meza-Carmen, V., Puxeddu, E., Wang, G., Moss, J. and Vaughan, M. (2008) Interaction of brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein (BIG) 1 and kinesin motor protein KIF21A. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 18788-18793.
- Shen, X., Xu, K.F., Fan, Q., Pacheco-Rodriguez, G., Moss, J. and Vaughan, M. (2006) Association of brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 2 (BIG2) with recycling endosomes during transferrin uptake. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 2635-2640.
- Shin, H.W., Morinaga, N., Noda, M. and Nakayama, K. (2004) BIG2, a guanine nucleotide exchange factor for ADP-ribosylation factors: its localization to recycling endosomes and implication in the endosome integrity. *Mol Biol Cell*, **15**, 5283-5294.
- Shin, H.W. and Nakayama, K. (2004) Guanine nucleotide-exchange factors for arf GTPases: their diverse functions in membrane traffic. *J Biochem*, **136**, 761-767.
- Shinotsuka, C., Waguri, S., Wakasugi, M., Uchiyama, Y. and Nakayama, K. (2002a) Dominant-negative mutant of BIG2, an ARF-guanine nucleotide exchange factor, specifically affects membrane trafficking from the trans-Golgi network through inhibiting membrane association of AP-1 and GGA coat proteins. *Biochem Biophys Res Commun*, **294**, 254-260.
- Shinotsuka, C., Yoshida, Y., Kawamoto, K., Takatsu, H. and Nakayama, K. (2002b) Overexpression of an ADP-ribosylation factor-guanine nucleotide exchange factor, BIG2, uncouples brefeldin A-induced adaptor protein-1 coat dissociation and membrane tubulation. *J Biol Chem*, **277**, 9468-9473.

- Short, B., Haas, A. and Barr, F.A. (2005) Golgins and GTPases, giving identity and structure to the Golgi apparatus. *Biochim Biophys Acta*, **1744**, 383-395.
- Simonsen, A., Lippe, R., Christoforidis, S., Gaullier, J.M., Brech, A., Callaghan, J., Toh, B.H., Murphy, C., Zerial, M. and Stenmark, H. (1998) EEA1 links PI(3)K function to Rab5 regulation of endosome fusion. *Nature*, **394**, 494-498.
- Singer-Krüger, B. and Ferro-Novick, S. (1997) Use of a synthetic lethal screen to identify yeast mutants impaired in endocytosis, vacuolar protein sorting and the organization of the cytoskeleton. *Eur J Cell Biol*, **74**, 365-375.
- Singer-Krüger, B., Lasić, M., Bürger, A.M., Hausser, A., Pipkorn, R. and Wang, Y. (2008) Yeast and human Ysl2p/hMon2 interact with Gga adaptors and mediate their subcellular distribution. *EMBO J*, **27**, 1423-1435.
- Siridechadilok, B., Fraser, C.S., Hall, R.J., Doudna, J.A. and Nogales, E. (2005) Structural roles for human translation factor eIF3 in initiation of protein synthesis. *Science*, **310**, 1513-1515.
- Sonenberg, N. and Hinnebusch, A.G. (2009) Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell*, **136**, 731-745.
- Spang, A. (2008) The life cycle of a transport vesicle. *Cell Mol Life Sci*, **65**, 2781-2789.
- Stepp, J.D., Huang, K. and Lemmon, S.K. (1997) The yeast adaptor protein complex, AP-3, is essential for the efficient delivery of alkaline phosphatase by the alternate pathway to the vacuole. *J Cell Biol*, **139**, 1761-1774.
- Storch, S., Pohl, S. and Bräulke, T. (2004) A dileucine motif and a cluster of acidic amino acids in the second cytoplasmic domain of the batten disease-related CLN3 protein are required for efficient lysosomal targeting. *J Biol Chem*, **279**, 53625-53634.
- Stow, J.L., Fath, K.R. and Burgess, D.R. (1998) Budding roles for myosin II on the Golgi. *Trends Cell Biol*, **8**, 138-141.
- Straight, A.F., Field, C.M. and Mitchison, T.J. (2005) Anillin binds nonmuscle myosin II and regulates the contractile ring. *Mol Biol Cell*, **16**, 193-201.
- Szul, T., Grabski, R., Lyons, S., Morohashi, Y., Shestopal, S., Lowe, M. and Sztul, E. (2007) Dissecting the role of the ARF guanine nucleotide exchange factor GBF1 in Golgi biogenesis and protein trafficking. *J Cell Sci*, **120**, 3929-3940.
- Takatsu, H., Futatsumori, M., Yoshino, K., Yoshida, Y., Shin, H.W. and Nakayama, K. (2001) Similar subunit interactions contribute to assembly of clathrin adaptor complexes and COPI complex: analysis using yeast three-hybrid system. *Biochem Biophys Res Commun*, **284**, 1083-1089.
- Tanaka, T., Kato, Y., Matsuda, K., Hanyu-Nakamura, K. and Nakamura, A. (2011) Drosophila Mon2 couples Oskar-induced endocytosis with actin remodeling for cortical anchorage of the germ plasm. *Development*, **138**, 2523-2532.
- Tang, X., Halleck, M.S., Schlegel, R.A. and Williamson, P. (1996) A subfamily of P-type ATPases with aminophospholipid transporting activity. *Science*, **272**, 1495-1497.
- Thompson, R.F. and Langford, G.M. (2002) Myosin superfamily evolutionary history. *Anat Rec*, **268**, 276-289.
- Togawa, A., Morinaga, N., Ogasawara, M., Moss, J. and Vaughan, M. (1999) Purification and cloning of a brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein for ADP-ribosylation factors. *J Biol Chem*, **274**, 12308-12315.
- Tomita, Y., Noda, T., Fujii, K., Watanabe, T., Morikawa, Y. and Kawaoka, Y. (2011) The cellular factors Vps18 and Mon2 are required for efficient production of infectious HIV-1 particles. *J Virol*, **85**, 5618-5627.
- Traub, L.M. (2005) Common principles in clathrin-mediated sorting at the Golgi and the plasma membrane. *Biochim Biophys Acta*, **1744**, 415-437.
- Ullrich, O., Reinsch, S., Urbe, S., Zerial, M. and Parton, R.G. (1996) Rab11 regulates recycling through the pericentriolar recycling endosome. *J Cell Biol*, **135**, 913-924.

- Valente, C., Polishchuk, R. and De Matteis, M.A. (2010) Rab6 and myosin II at the cutting edge of membrane fission. *Nat Cell Biol*, **12**, 635-638.
- van der Sluijs, P., Hull, M., Webster, P., Male, P., Goud, B. and Mellman, I. (1992) The small GTP-binding protein rab4 controls an early sorting event on the endocytic pathway. *Cell*, **70**, 729-740.
- Vassilieva, E.V. and Nusrat, A. (2008) Vesicular trafficking: molecular tools and targets. *Methods Mol Biol*, **440**, 3-14.
- Volpicelli-Daley, L.A., Li, Y., Zhang, C.J. and Kahn, R.A. (2005) Isoform-selective effects of the depletion of ADP-ribosylation factors 1-5 on membrane traffic. *Mol Biol Cell*, **16**, 4495-4508.
- Vornlocher, H.P., Hanachi, P., Ribeiro, S. and Hershey, J.W. (1999) A 110-kilodalton subunit of translation initiation factor eIF3 and an associated 135-kilodalton protein are encoded by the *Saccharomyces cerevisiae* TIF32 and TIF31 genes. *J Biol Chem*, **274**, 16802-16812.
- Wakasugi, M., Waguri, S., Kametaka, S., Tomiyama, Y., Kanamori, S., Shiba, Y., Nakayama, K. and Uchiyama, Y. (2003) Predominant expression of the short form of GGA3 in human cell lines and tissues. *Biochem Biophys Res Commun*, **306**, 687-692.
- Wasiak, S., Legendre-Guillemain, V., Puertollano, R., Blondeau, F., Girard, M., de Heuvel, E., Boismenu, D., Bell, A.W., Bonifacino, J.S. and McPherson, P.S. (2002) Enthoprotin: a novel clathrin-associated protein identified through subcellular proteomics. *J Cell Biol*, **158**, 855-862.
- Weed, S.A., Karginov, A.V., Schafer, D.A., Weaver, A.M., Kinley, A.W., Cooper, J.A. and Parsons, J.T. (2000) Cortactin localization to sites of actin assembly in lamellipodia requires interactions with F-actin and the Arp2/3 complex. *J Cell Biol*, **151**, 29-40.
- Welch, M.D., DePace, A.H., Verma, S., Iwamatsu, A. and Mitchison, T.J. (1997) The human Arp2/3 complex is composed of evolutionarily conserved subunits and is localized to cellular regions of dynamic actin filament assembly. *J Cell Biol*, **138**, 375-384.
- Wendland, B. (2002) Epsins: adaptors in endocytosis? *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**, 971-977.
- Wendland, B., Steece, K.E. and Emr, S.D. (1999) Yeast epsins contain an essential N-terminal ENTH domain, bind clathrin and are required for endocytosis. *EMBO J*, **18**, 4383-4393.
- Wicky, S., Schwarz, H. and Singer-Krüger, B. (2004) Molecular interactions of yeast Neolp, an essential member of the Drs2 family of aminophospholipid translocases, and its role in membrane trafficking within the endomembrane system. *Mol Cell Biol*, **24**, 7402-7418.
- Wilcke, M., Johannes, L., Galli, T., Mayau, V., Goud, B. and Salamero, J. (2000) Rab11 regulates the compartmentalization of early endosomes required for efficient transport from early endosomes to the trans-golgi network. *J Cell Biol*, **151**, 1207-1220.
- Winter, D.C., Choe, E.Y. and Li, R. (1999) Genetic dissection of the budding yeast Arp2/3 complex: a comparison of the in vivo and structural roles of individual subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 7288-7293.
- Wozniak, M.J. and Allan, V.J. (2006) Cargo selection by specific kinesin light chain 1 isoforms. *EMBO J*, **25**, 5457-5468.
- Xu, K.F., Shen, X., Li, H., Pacheco-Rodriguez, G., Moss, J. and Vaughan, M. (2005) Interaction of BIG2, a brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein, with exocyst protein Exo70. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 2784-2789.
- Yamashiro, D.J., Tycko, B., Fluss, S.R. and Maxfield, F.R. (1984) Segregation of transferrin to a mildly acidic (pH 6.5) para-Golgi compartment in the recycling pathway. *Cell*, **37**, 789-800.

- Yang, C.Z., Heimberg, H., D'Souza-Schorey, C., Mueckler, M.M. and Stahl, P.D. (1998) Subcellular distribution and differential expression of endogenous ADP-ribosylation factor 6 in mammalian cells. *J Biol Chem*, **273**, 4006-4011.
- Yoshihisa, T., Barlowe, C. and Schekman, R. (1993) Requirement for a GTPase-activating protein in vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Science*, **259**, 1466-1468.
- Zaremba, S. and Keen, J.H. (1983) Assembly polypeptides from coated vesicles mediate reassembly of unique clathrin coats. *J Cell Biol*, **97**, 1339-1347.
- Zeghouf, M., Guibert, B., Zeeh, J.C. and Cherfils, J. (2005) Arf, Sec7 and Brefeldin A: a model towards the therapeutic inhibition of guanine nucleotide-exchange factors. *Biochem Soc Trans*, **33**, 1265-1268.
- Zhang, J., Wang, L., Zhuang, L., Huo, L., Musa, S., Li, S. and Xiang, X. (2008) Arp11 affects dynein-dynactin interaction and is essential for dynein function in *Aspergillus nidulans*. *Traffic*, **9**, 1073-1087.

Lebenslauf

Name Anna Maria Eisele (geborene Anna-Maria Bürger)
Geburtsdatum 02.02.1979
Geburtsort Konin/Polen, aufgewachsen in Murrhardt/Deutschland seit 1989
Nationalität deutsch
Familienstand verheiratet mit Frederik Eisele
Anschrift Pinnharvsgatan 5E, 43147 Mölndal, Schweden
(alternativ in Deutschland: Brennäckerstr. 36, 71540 Murrhardt)

Bildung

- Promotion am Institut für Biochemie der Universität Stuttgart von Prof. Dr. Dieter H. Wolf, bei PD Dr. Birgit Singer-Krüger, Forschung April 2006 - 2010
 - Dissertation: Subzelluläre Lokalisierung des hochkonservierten Gerüstproteins hMon2 in Säugerzellen und Identifizierung neuer Interaktionspartner
- Marie Curie Early Stage Researcher (EU Network Flippase) in Rahmen der Promotion in der Abteilung Membrane Enzymology der Universität Utrecht, Niederlande, bei PD Dr. Joost C.M. Holthuis und Prof. Dr. Gerrit F.B.P. van Meer, Sep 2006 - Feb 2007
 - Forschung an der subzellulären Lokalisierung und Funktion der vermutlichen Flippase ATP9A und seinem Bindepartner, dem Gerüstprotein hMon2 im Menschen
- Diplomarbeit am Institut für Biochemie an der Universität Stuttgart, bei PD Dr. Birgit Singer-Krüger, Aug 2005 - Feb 2006
 - Reinigung der P-Typ P4 ATPase Neo1p aus *Saccharomyces cerevisiae*
- Studium der Chemie auf Diplom an der Universität Stuttgart, 2000 - 2005
- Allgemeines Abitur am Wirtschaftsgymnasium im Backnang, Baden-Württemberg, 2000

Publikation

- Birgit Singer-Krüger, Maja Lasić, Anna-Maria Bürger, Angelika Haußer, Rüdiger Pipkorn and Yi Wang. "Yeast and human Ysl2p/hMon2 interact with Gga adaptors and mediate their subcellular distribution", *The EMBO Journal* **27**, 1423 - 1435 (2008)
<http://www.nature.com/emboj/journal/v27/n10/abs/emboj200875a.html> - a1

Danksagung

Ich bedanke mich bei allen, die zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben.

Als erstes bedanke ich mich bei PD Dr. Birgit Singer-Krüger für die Vergabe dieses interessanten Themas zur Promotion und für die Betreuung. Auch danken möchte ich für die Möglichkeit zur Erlernung zahlreicher Methoden.

Genauso bedanke ich mich bei Prof. Dr. Dieter H. Wolf für die Möglichkeit meine Arbeit am Institut für Biochemie durchführen zu können.

Ich bedanke mich bei PD Dr. Joost C.M. Holthuis und Prof. Dr. Gerrit F.B.P. van Meer für die Möglichkeit im Rahmen meiner Doktorarbeit in der Abteilung Membrane Enzymology an der Universität Utrecht, Holland, als Marie Curie Early Stage Researcher (EU Network Flippase) teilnehmen zu dürfen und für die freundliche Aufnahme. Auch bedanke ich mich bei Frau PD Dr. Birgit Singer-Krüger für die Ermöglichung dieser Gelegenheit.

Ich bedanke mich auch für die Zusammenarbeit, Unterstützung und Ermöglichung der Arbeit mit der Zellkultur bei Dr. Angelika Hausser, Dr. Monilola A. Olayioye und Gisela Link, auch für die Hilfe und Betreuung am Mikroskop bei Margarete Witkowski, Oliver Schlicker vom Institut für Zellbiologie und Immunologie, Universität Stuttgart und Herr Sonntag von der Firma Zeiss.

Ich bedanke mich bei allen Mitgliedern des Instituts für Biochemie Stuttgart (vor allem Sónia Barbosa, Maja Lasić, Claudia Böttcher und Frederik Eisele), des Instituts für Zellbiologie und Immunologie Stuttgart (vor allem Ruth Jähne, Simone Schmid, Philipp Peterburs) und der Abteilung der Membrane Enzymology in Utrecht (vor allem Patricia Verhulst, Ana Vakaru, Cathelene Puts, Fikadu G. Tafesse, Guillaume Lenoir).

Danke schön an PD Dr. Wolfgang Hilt, Frederik Eisele und Ingo Amm für das Lesen des Manuskripts.

Ganz herzlich bedanke ich mich für ein offenes Ohr und guten Rat bei Elisabeth Tosta, Dragica Kapucija, Regina Philipp, Margarete Witkowski und Cecile Lemette.

Ich bedanke mich bei meinen lieben Eltern Mirosława und Ulryk Bürger, und meinem geliebten Ehemann Frederik Eisele und unserer geliebten Tochter bei der Begleitung auf dem Weg zur Promotion.

Erklärung über die Eigenständigkeit der Dissertation

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel „Subzelluläre Lokalisierung des hochkonservierten Gerüstproteins hMon2 in Säugerzellen und Identifizierung neuer Interaktionspartner“ selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe; aus fremden Quellen entnommene Passagen und Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Name: Anna Maria Eisele

Unterschrift: _____

Datum: _____