

"Untersuchungen zur Rolle des Armadillo-Proteins p0071 bei der  
Zytokinese humaner Zellen"

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Herrn René Keil

geb. am: 19.12.1978      in: Altenburg

Gutachter /in

1. Frau Prof. Dr. M. Hatzfeld
2. Herr Prof. Dr. G. Reuter
3. Herr Prof. Dr. W. Birchmeier

Halle (Saale), Dezember 2009

Verteidigungsdatum: 27.05.2010

*Die Neugier steht immer an erster Stelle eines Problems, das gelöst werden will. (Galileo Galilei)*

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1	DIE ARMADILLO-PROTEIN-FAMILIE .....	1
1.2	DIE CATENINE SIND MULTIFUNKTIONELLE ARM-PROTEINE.....	2
1.3	P0071 GEHÖRT ZUR ARMADILLO-PROTEIN-FAMILIE.....	5
1.4	DIE REGULATION VON GTPASEN DER RAS-SUPERFAMILIE.....	7
1.5	DIE REGULATION DER ZY TOKINESE .....	9
1.5.1	<i>Motorproteine in der Mitose und Zytokinese .....</i>	<i>9</i>
1.5.1.1	<i>Die Rolle der Dyneine in der Zytokinese .....</i>	<i>10</i>
1.5.1.2	<i>Die Rolle der Kinesine in der Zytokinese.....</i>	<i>10</i>
1.5.1.3	<i>Die Rolle von Myosin-II in der Zytokinese .....</i>	<i>11</i>
1.5.2	<i>Die Ausbildung der zentralen Spindel.....</i>	<i>12</i>
1.5.3	<i>Die Regulation der RhoA-Aktivität während der Zytokinese .....</i>	<i>14</i>
1.5.4	<i>Die Assemblierung und Kontraktion des Aktomyosin-Ringes.....</i>	<i>17</i>
1.5.5	<i>Vesikeltransport während der Zytokinese .....</i>	<i>18</i>
1.6	ZIELSTELLUNG.....	22
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>23</b>
2.1	MOKEKULARBIOLOGISCHE METHODEN .....	23
2.1.1	<i>Isolation von RNA aus humanen Zelllinien.....</i>	<i>23</i>
2.1.2	<i>Reverse Transkription .....</i>	<i>23</i>
2.1.3	<i>Polymerase-Kettenreaktion.....</i>	<i>24</i>
2.1.4	<i>Ortsgerichtete Mutagenese .....</i>	<i>25</i>
2.1.5	<i>Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren.....</i>	<i>25</i>
2.1.6	<i>Aufreinigung von Nukleinsäuren.....</i>	<i>26</i>
2.1.7	<i>Klonierung von PCR-Fragmenten mittels TA-System.....</i>	<i>26</i>
2.1.8	<i>Behandlung von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....</i>	<i>26</i>
2.1.9	<i>Ligation .....</i>	<i>27</i>
2.1.10	<i>Herstellung Transformations-kompetenter Bakterien.....</i>	<i>28</i>
2.1.11	<i>Transformation von Plasmid DNA.....</i>	<i>28</i>
2.1.12	<i>Präparation von Plasmid-DNA.....</i>	<i>28</i>
2.1.13	<i>Sequenzierung .....</i>	<i>29</i>
2.2	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN .....	29
2.2.1	<i>Kultivierung der verwendeten Zelllinien.....</i>	<i>29</i>
2.2.2	<i>Einfrieren und Auftauen von Zellen .....</i>	<i>30</i>
2.2.3	<i>Transfektion humaner Zellen .....</i>	<i>30</i>
2.2.3.1	<i>Transfektion mittels Lipofektion .....</i>	<i>30</i>
2.2.3.2	<i>Transfektion durch Kalziumphosphat-Kopräzipitation .....</i>	<i>30</i>
2.2.4	<i>Synchronisation humaner Zellen mittels Doppel-Thymidinblock .....</i>	<i>31</i>
2.2.5	<i>Synchronisation humaner Zellen mittels Thymidin und Nocodazol.....</i>	<i>32</i>

## **Inhaltsverzeichnis**

---

2.2.6	<i>Immunzytologie</i> .....	32
2.2.7	<i>Bimolekulare-Fluoreszenz-Komplementation</i> .....	33
2.2.8	<i>Mikroskopische Beobachtungen lebender Zellen</i> .....	34
2.2.9	<i>Durchflusszytometrie</i> .....	34
2.2.10	<i>Untersuchungen zur Aktivität von RhoA, Rac1, Cdc42 und Rab11</i> .....	35
2.2.10.1	<i>Untersuchung der Aktivität von Rho-GTPasen mittel Raichu-Biosensoren</i> .....	35
2.2.10.2	<i>Untersuchung der Aktivität von RhoA und Rab11 mittels GST-Pulldown</i> .....	36
2.3	<b>BIOCHEMISCHE METHODEN</b> .....	36
2.3.1	<i>Proteinisolation</i> .....	36
2.3.2	<i>Isolation mitotischer Mikrotubuli</i> .....	36
2.3.3	<i>Proteinkonzentrationsbestimmung</i> .....	37
2.3.4	<i>SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese</i> .....	37
2.3.5	<i>Coomassie-Färbung von Polyacrylamid-Gelen</i> .....	38
2.3.6	<i>Western Blot</i> .....	38
2.3.7	<i>Expression von GST- bzw. His<sub>6</sub>-Fusionsproteinen</i> .....	39
2.3.8	<i>Expression von Proteinen in Retikulozytenlysat</i> .....	40
2.3.9	<i>Immunpräzipitation</i> .....	40
2.3.10	<i>GST-Pulldown</i> .....	41
2.3.11	<i>Hefe-Dihybrid</i> .....	41
2.3.12	<i>GDP/GTP-Austausch-Analyse</i> .....	42
2.4	<b>STATISTISCHE AUSWERTUNG</b> .....	43
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>44</b>
3.1	<b>p0071 IST BETEILIGT AN DER REGULATION DER RHOA-AKTIVITÄT WÄHREND DER ZYTOKINESE</b> .....	<b>44</b>
3.1.1	<i>p0071 ist involviert in die Aktomyosin-basierte Einschnürung während der Zytokinese</i> .....	45
3.1.2	<i>p0071 beeinflusst die Aktivität der kleinen GTPase RhoA</i> .....	48
3.1.3	<i>p0071 interagiert mit RhoA</i> .....	50
3.1.4	<i>p0071 interagiert mit dem Rho-GEF ECT2</i> .....	53
3.2	<b>DIE ROLLE VON p0071 IM RAB11-VERMITTELTEN MEMBRAN-TRANSPORT WÄHREND DER ZYTOKINESE</b> .....	<b>57</b>
3.2.1	<i>p0071 und Snapin sind an der Fusion Rab11-positiver Vesikel während der Zytokinese beteiligt</i> .....	57
3.2.2	<i>Das Rho-GEF ECT2 ist an der Regulation der Rab11-Aktivität während der Zytokinese beteiligt</i> .....	66
3.3	<b>KIF3B TRANSPORTIERT p0071 WÄHREND DER ZYTOKINESE ZUM ZENTRAKKÖRPER</b> .....	<b>72</b>
3.3.1	<i>ECT2 und p0071 werden nicht gemeinsam transportiert</i> .....	72
3.3.2	<i>p0071 interagiert mit der KIF3-Untereinheit KIF3b</i> .....	74

## **Inhaltsverzeichnis**

---

3.3.3	<i>KIF3b wird für den Transport von p0071 zum Zentralkörper benötigt.....</i>	77
3.3.4	<i>KIF3b ist über den Transport von p0071 an der Regulation der RhoA-Aktivität während der Zytokinese beteiligt.....</i>	84
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>93</b>
4.1	DIE ROLLE VON P0071 BEI DER REGULATION DER RHOA-AKTIVITÄT WÄHREND DER ZYTOKINESE.....	94
4.2	FUNKTIONEN VON P0071, ECT2 UND SNAPIN BEI DER FUSION VON RAB11-VESIKELN .....	101
4.3	DER TRANSPORT VON P0071 ZUM ZENTRALEKÖRPER ERFOLGT KIF3B-ABHÄNGIG.....	106
4.4	P0071 ALS BINDEGLIED ZWISCHEN AKTOMYOSIN-BASIERTER EINSCHNÜRUNG UND VESIKEL-BASIERTER ABSCHNÜRUNG .....	111
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>113</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>115</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>I</b>
7.1	ERGÄNZENDE ERGEBNISSE .....	I
7.2	PUFFERLÖSUNGEN .....	II
7.3	VERWENDETE GERÄTE .....	IV
7.4	VERWENDETE DNA-OLIGONUKLEOTIDE .....	IV
7.5	VERWENDETE siRNAs UND PLASMIDE .....	VI
7.6	VERWENDETE BAKTERIEN- UND HEFESTÄMME .....	X
7.7	VERWENDETE ZELLINIEN .....	X
7.8	VERWENDETE KITS .....	X
7.9	VERWENDETE ANTIKÖRPER.....	XI
7.10	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	XII
7.11	ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	XVI
7.12	TABELLENVERZEICHNIS.....	XVIII

# 1 Einleitung

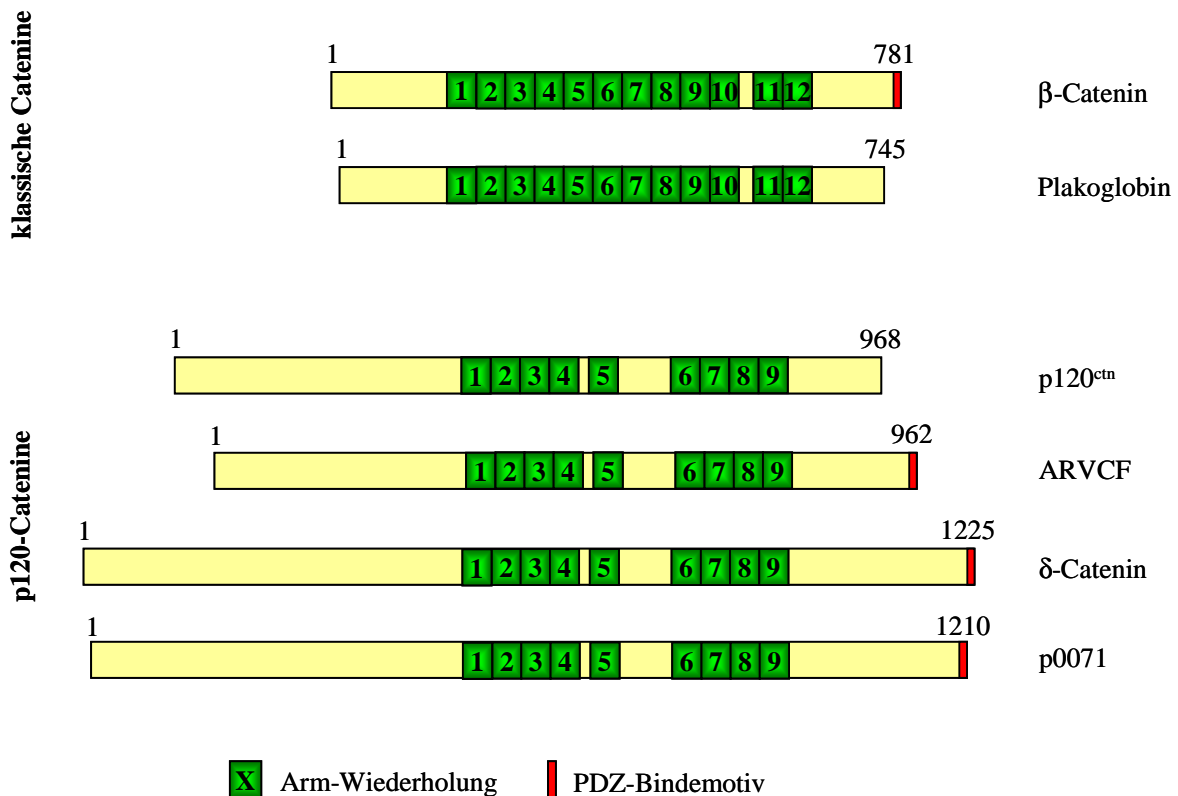
## 1.1 Die Armadillo-Protein-Familie

In der Arm- (Armadillo) Protein-Familie werden eine Vielzahl von Proteinen zusammengefasst, die in Größe und Funktion variieren. Charakterisiert werden diese Proteine durch ihre zentrale Arm-Domäne. Die Arm-Domäne ist aus einer variablen Anzahl eines 42 Aminosäuren (As) langen, sich wiederholenden Motivs (Arm-Wiederholungen) aufgebaut. Dieses Motiv wurde ursprünglich im Segment-Polaritätsgenprodukt Armadillo aus *Drosophila melanogaster* identifiziert (RIGGLEMAN *et al.*, 1989; PEIFER *et al.*, 1994). Strukturanalysen lassen vermuten, dass die dreidimensionale Struktur der Arm-Wiederholungen unter den Arm-Proteinen konserviert ist. Eine einzelne Arm-Wiederholung besteht aus drei  $\alpha$ -Helices. Zwei aufeinander folgende Arm-Wiederholungen interagieren so miteinander, dass eine rechtsgewundene Superhelix entsteht, die eine positiv geladene Oberfläche für Protein-Protein-Interaktionen bildet (HUBER *et al.*, 1997; CHOI und WEIS, 2005). Die N- und C-terminalen Domänen der Arm-Proteine unterscheiden sich im Gegensatz zu den Arm-Domänen sehr deutlich in Größe und Sequenz. Vermutlich wird ein Teil der unterschiedlichen Funktionen der Arm-Proteine über deren N- und C-terminale Domänen vermittelt. Neben zahlreichen Vertretern im Tierreich existieren auch Arm-Proteine im Reich der Pflanzen und der Pilze, was für eine frühe Entstehung dieser Proteinfamilie in der Evolution spricht (COATES, 2003).

Für Proteine mit einer Arm-Domäne sind vielfältige Funktionen beschrieben. Importin- $\alpha$ , das in vielen Eukaryoten identifiziert wurde, ist zum Beispiel am Kernimport von Proteinen mit Kern-Lokalisierungssignal beteiligt (YANO *et al.*, 1994; MOROIANU *et al.*, 1995; GOLDFARB *et al.*, 2004). Ein weiterer Vertreter der Arm-Proteinfamilie, Smg-GDS, wurde als GEF (Guanosinnukleotid-Austauschfaktor) für die Ras-verwandte GTPase (Guanosintriphosphatase) Rap1 beschrieben. Bemerkenswert ist dabei, dass die Arm-Domäne von Smg-GDS nahezu das gesamte Protein ausmacht und somit höchstwahrscheinlich der GDP/GTP-Austausch von einem Teil der Arm-Domäne katalysiert wird (YAMAMOTO *et al.*, 1990; KIKUCHI *et al.*, 1992; PEIFER *et al.*, 1994).

Die Arm-Proteine werden anhand der Organisation ihrer Arm-Domäne und ihrer Funktion in verschiedene Unterfamilien eingeteilt. Die beiden wichtigsten Unterfamilien sind die klassischen Catenine und die p120-Catenine (Abb. 1-1). Zu den klassischen Cateninen gehört zum Beispiel das Segment-Polaritätsgenprodukt Armadillo, welches das *D. melanogaster*-Homolog zum  $\beta$ -Catenin der Säugetiere darstellt.  $\beta$ -Catenin und Plakoglobin werden

ebenfalls zu den klassischen Cateninen gezählt. Zu den p120-Cateninen gehören p120<sup>ctn</sup>, p0071,  $\delta$ -Catenin und ARVCF (*armadill-rrepeat gene deleted in velo cardio facial syndrome*) sowie die entfernter verwandten Plakophiline 1-3. Vertreter der klassischen und der p120-Catenine wurden sowohl in Vertebraten, als auch in Evertebraten identifiziert, wobei die Anzahl an p120-Cateninen in Vertebraten besonders in Säugetieren deutlich zunimmt (HATZFELD, 1999; HATZFELD, 2005; MCCREA und PARK, 2007).



**Abb. 1-1: Schematischer Aufbau der humanen klassischen Catenine und der p120-Catenine**

Die Arm-Domäne der klassischen Catenine (oben) besteht aus 12 Arm-Wiederholungen, wobei die beiden letzten Arm-Wiederholungen durch eine kurze Sequenz von der übrigen Arm-Domäne getrennt sind. Die Arm-Domäne der p120-Catenine (unten) besteht dagegen nur aus neun, auch räumlich anders organisierten Arm-Wiederholungen.

## 1.2 Die Catenine sind multifunktionelle Arm-Proteine

Die Catenine aus der Arm-Proteinfamilie ( $\beta$ -Catenin, Plakoglobin und p120-Catenine) haben als Strukturproteine in AJs (*adherens junctions*) und Desmosomen gemeinsame Funktionen. Cadherine vermitteln den Zell-Zell-Kontakt in AJs und Desmosomen. Diese transmembranen Glykoproteine gehen über ihre N-terminale, extrazelluläre Domäne Kalzium-abhängige Bindungen ein. Die intrazelluläre Domäne variiert innerhalb der Cadherin-Superfamilie und wurde zur Unterteilung der Cadherine in Unterfamilien herangezogen. Vertreter

der Superfamilie sind unter anderem die klassischen Cadherine der AJs (E- (epithelial), N- (neuronal) und P- (plazental) Cadherin), sowie die desmosomalen Cadherine (Desmocolline und Desmogleine) (PATEL *et al.*, 2003). Kürzlich wurden die Cadherine basierend auf Sequenz- und Strukturanalysen der extrazellulären Domänen neu klassifiziert und die klassischen sowie die desmosomalen Cadherine in der Familie C-1 des CMB (*cadherin major branch*) zusammengefasst (HULPIAU und VAN ROY, 2009).

Die Catenine aus der Arm-Proteinfamilie regulieren in AJs und Desmosomen die Stabilität der Cadherine und verknüpfen diese über weitere Proteine mit dem Aktin-Zytoskelett bzw. mit Intermediärfilamenten (GOODWIN und YAP, 2004). Neben dieser Rolle als Strukturproteine werden den Arm-Cateninen Funktionen in verschiedensten Signalwegen in der Zelle zugeschrieben. Gut charakterisiert sind solche Funktionen bisher für  $\beta$ -Catenin und p120<sup>cas</sup>.

$\beta$ -Catenin, der bekannteste Vertreter der Arm-Protein-Familie, hat multiple Funktionen als Strukturprotein in AJs und als Signaltransduktionsmolekül des Wnt-Signalweges im Zytoplasma sowie im Zellkern. In AJs interagiert  $\beta$ -Catenin über seine Arm-Domäne mit einem C-terminalen Abschnitt der Cadherine (E- und N-Cadherin), der als CBD (Catenin-Bindedomäne) beschrieben wurde. Über die Interaktion mit  $\alpha$ -Catenin vernetzt  $\beta$ -Catenin die Cadherine mit dem Aktin-Zytoskelett. Diese Vernetzung bewirkt eine Verstärkung der Cadherin-basierten Zell-Zell-Adhäsion (OZAWA *et al.*, 1989; GATES und PEIFER, 2005; PEREZ-MORENO und FUCHS, 2006). Die Interaktion der klassischen Cadherine mit  $\beta$ -Catenin, die durch verschiedene Proteine, darunter die Src-Kinase, beeinflusst wird, kontrolliert die Menge an zytoplasmatischem  $\beta$ -Catenin. Kommt die  $\beta$ -Catenin-Cadherin-Interaktion zum Beispiel aufgrund des Fehlens klassischer Cadherinen an der Zelloberfläche nicht zustande, führt dies zu erhöhten Mengen von  $\beta$ -Catenin im Zytoplasma (BEHRENS *et al.*, 1993; ROURA *et al.*, 1999; HUBER und WEIS, 2001; QI *et al.*, 2006). Zytoplasmatisches  $\beta$ -Catenin wird konstitutiv von einem Komplex aus CK1 (Casein-Kinase 1), GSK3- $\beta$  (Glykogen-Synthase-Kinase 3- $\beta$ ), APC (*adenomatous polyposis coli*) und Axin phosphoryliert. Phosphoryliertes  $\beta$ -Catenin wird durch den  $\beta$ -TrCP-E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex ( *$\beta$ -Transducin repeat containing protein*) ubiquityliert und über das 26S Proteasom abgebaut (YOST *et al.*, 1996; HART *et al.*, 1999; LIU *et al.*, 2002; XING *et al.*, 2003; LUO und LIN, 2004). Vereinfacht dargestellt, akkumuliert  $\beta$ -Catenin nach Aktivierung des Wnt-Signals im Zytoplasma, da die für den  $\beta$ -Catenin-Abbau verantwortlichen Proteine Axin und GSK3- $\beta$  über Dishevelled an den Wnt-Rezeptor-Komplex an der Zelloberfläche rekrutiert werden (YANAGAWA *et al.*, 1995; BHANOT *et al.*, 1996; STEITZ *et al.*, 1996; YANAGAWA *et*



*al.*, 1997; PINSON *et al.*, 2000; WEHRLI *et al.*, 2000).  $\beta$ -Catenin transloziert in den Zellkern, interagiert dort unter anderem mit Transkriptionsfaktoren der TCF/LEF-Familie (*T cell factor/lymphoid enhancer factor*) und aktiviert auf diese Weise die Transkription zahlreicher Gene, wie zum Beispiel *myc* und *cyclinD1*, die während der Embryonalentwicklung essentiell sind, aber auch eine Rolle bei der Entstehung diverser maligner Tumoren haben (BEHRENS *et al.*, 1996; KORINEK *et al.*, 1997; TAKEMARU und MOON, 2000).

p120<sup>ctn</sup>, der Prototyp der p120-Catenine, wurde erstmals 1989 als Src-Substrat beschrieben (REYNOLDS *et al.*, 1989). In AJs interagiert p120<sup>ctn</sup> wie  $\beta$ -Catenin mit klassischen Cadherinen. Diese Interaktion erfolgt nicht über die CBD sondern über die Juxtamembrandomäne der klassischen Cadherine und ist essentiell für die Membranlokalisierung und die Stabilität des gesamten Cadherin/Catenin-Komplexes (REYNOLDS *et al.*, 1994; SHIBAMOTO *et al.*, 1995; ZHU und WATT, 1996; IRETON *et al.*, 2002; DAVIS *et al.*, 2003; XIAO *et al.*, 2003). Neben dieser Funktion als Strukturprotein hat p120<sup>ctn</sup> wie  $\beta$ -Catenin zusätzliche Funktionen als Signaltransduktionsmolekül. So konnte für p120<sup>ctn</sup> eine Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor Kaiso gezeigt werden (DANIEL und REYNOLDS, 1999). Kaiso fungiert als Histon-Deacetylase-abhängiger Transkriptionsrepressor. Die Bindung von p120<sup>ctn</sup> an Kaiso verhindert dessen DNA-Assoziation und damit die Kaiso-vermittelte Transkriptionsrepression. Interessanterweise reguliert Kaiso die Transkription der  $\beta$ -Catenin/TCF/LEF-Zielgene *cyclinD1* und *matrilysin* negativ, wodurch p120<sup>ctn</sup> über Kaiso mit dem Wnt-Signalweg in Berührung kommt (DANIEL *et al.*, 2002; PARK *et al.*, 2005; SPRING *et al.*, 2005).

Die Überexpression von p120<sup>ctn</sup>, das im Gegensatz zu  $\beta$ -Catenin im Zytoplasma stabil ist, führte in Fibroblasten zu drastischen morphologischen Veränderungen, die sich in der Bildung von langen dendritischen Fortsätzen äußerten (REYNOLDS *et al.*, 1996). Die Bildung dieser Fortsätze konnte durch die gleichzeitige Expression von dominant aktivem RhoA (RhoA-DA) signifikant reduziert werden (ANASTASIADIS *et al.*, 2000). Dies war der erste Hinweis, dass zytoplasmatisches p120<sup>ctn</sup> über die Rho-GTPasen (Abs. 1.4) dynamische Prozesse des Aktin-Zytoskeletts regulieren könnte. p120<sup>ctn</sup> fungiert in diesem Zusammenhang als GDI (GDP-Dissoziationsinhibitor) für die Rho-GTPase RhoA, indem p120<sup>ctn</sup> direkt mit RhoA interagiert und es im inaktiven Zustand im Zytoplasma bindet (ANASTASIADIS *et al.*, 2000; ANASTASIADIS und REYNOLDS, 2001). Außerdem wurde ein aktivierender Einfluss von p120<sup>ctn</sup> auf die Rho-GTPasen Rac1 und Cdc42 beschrieben. p120<sup>ctn</sup> interagiert mit dem GEF Vav2 und induziert darüber die Aktivierung von Rac1 und Cdc42. Die Interaktion von p120<sup>ctn</sup> mit dem RhoA-GAP-Protein (GTPase-aktivierendes Protein)

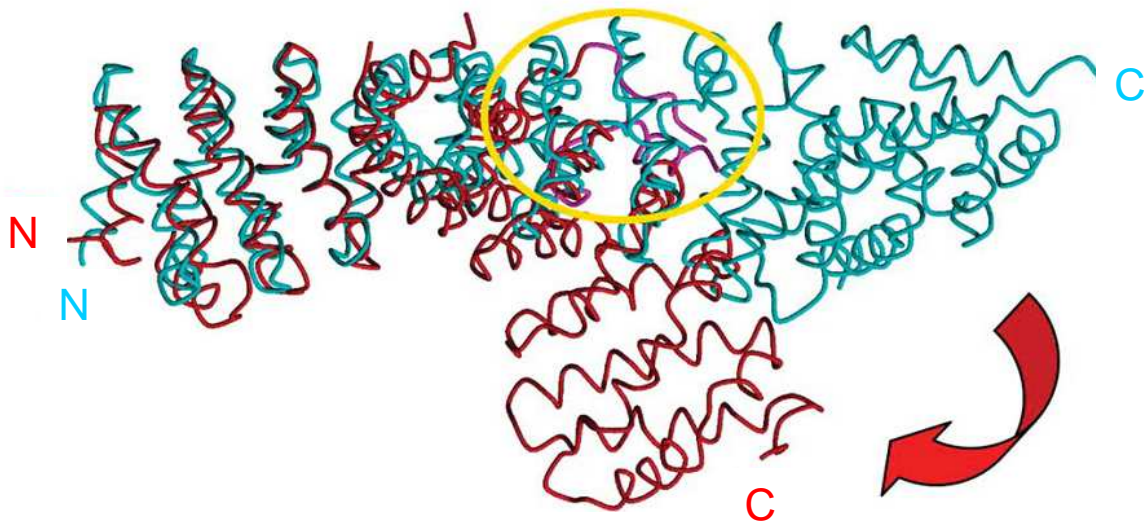
p190RhoGAP kann gleichzeitig zur Inaktivierung von RhoA führen. p120<sup>ctn</sup> ist somit an der komplementären Regulation von Rac1 und Cdc42 auf der einen Seite sowie RhoA auf der anderen Seite beteiligt (NOREN *et al.*, 2000; WILDENBERG *et al.*, 2006). Die Aktivierung von Rac1 und Cdc42 sowie die Inhibierung der RhoA-Aktivität durch zytoplasmatisches p120<sup>ctn</sup> führen zu verringerter Zell-Kontraktilität und erhöhter Zell-Motilität (GROSHEVA *et al.*, 2001). Die zytoplasmatischen Funktionen von p120<sup>ctn</sup> im Rho-Signalweg werden wie beim  $\beta$ -Catenin teilweise über die Interaktion mit den klassischen Cadherinen reguliert. Die Überexpression von Cadherinen sequestriert zytoplasmatisches p120<sup>ctn</sup> zur Plasmamembran (PM), während der Verlust von E-Cadherin die Menge an zytoplasmatischem p120<sup>ctn</sup> erhöht (REYNOLDS und ROCZNIAK-FERGUSON, 2004). Außerdem konnte durch den *knockout* von p120<sup>ctn</sup> in der Haut von Mäusen gezeigt werden, dass p120<sup>ctn</sup> über den RhoA-NF $\kappa$ B-Signalweg an Entzündungsprozessen beteiligt ist (PEREZ-MORENO *et al.*, 2006).

Für die ebenfalls zu den p120-Cateninen gehörenden Proteine  $\delta$ -Catenin und ARVCF konnte ebenfalls eine Rolle bei der Regulation von Rho-GTPasen gezeigt werden (KIM *et al.*, 2002; MARTINEZ *et al.*, 2003; FANG *et al.*, 2004). Vermutlich ist die Fähigkeit, GTPasen der Rho-Familie zu regulieren, eine Eigenschaft der p120-Catenine, die in unterschiedlichen zellulären Zusammenhängen unterschiedliche Konsequenzen hat.

### 1.3 p0071 gehört zur Armadillo-Protein-Familie

p0071 wurde erstmals 1996 als Mitglied der Arm-Protein-Familie beschrieben. Das Protein besteht aus 1211 Aminosäuren (As) und ist in drei Domänen, die N-terminale Kopf- (As 1-508), die zentrale Arm- (Arm; As 509-988) und die C-terminale Schwanz-Domäne (As 989-1211) unterteilt (HATZFELD und NACHTSHEIM, 1996). Am C-Terminus von p0071 befindet sich außerdem ein PDZ-Bindemotiv (PSD-95/Dlg-A/ZO-1) (DEGUCHI *et al.*, 2000). p0071 gehört zur Unterfamilie der p120-Catenine. Mit seinen nächsten Verwandten, p120<sup>ctn</sup>, ARVCF und  $\delta$ -Catenin, teilt p0071 65% bis 81,5% Sequenzhomologie in der Arm-Domäne (HATZFELD, 1999; HATZFELD, 2005; HATZFELD, 2007). Ausgehend von Sequenzvergleichen wurde angenommen, dass die Arm-Domäne der p120-Catenine aus zehn Arm-Wiederholungen besteht. Strukturanalysen der Arm-Domäne von Plakophilin 1 zeigten jedoch, dass eine vorhergesagte Arm-Wiederholung eine längere Insertion ist. Wie in Abb. 1-2 dargestellt, hat diese Insertion zur Folge, dass die Arm-Domänen der p120-Catenine im Gegensatz zu den gestreckten Arm-Domänen von  $\beta$ -Catenin und Importin- $\alpha$  abgewinkelt sind (HUBER *et al.*, 1997; KOBE, 1999; CHOI und WEIS, 2005).

p0071 wird in einer Vielzahl von Geweben, wie zum Beispiel im Herz, in der Haut, in der Skelettmuskulatur, im Gehirn und im Gastrointestinaltrakt exprimiert. Wie alle p120-Catenine ist p0071 ein Zell-Zell-Kontakt-assoziiertes Protein (HATZFELD und NACHTSHEIM, 1996; SCHRODER *et al.*, 2000). p120<sup>ctn</sup> ist ausschließlich in AJs zu finden und reguliert dort die Stabilität von E-Cadherin (Abs. 1.2). Die entfernter mit p0071 verwandten Plakophiline 1-3 sind Bestandteil der desmosomalen Plaques und vernetzen über Desmoplakin und Plakoglobin Intermediärfilamente mit den desmosomalen Cadherinen (HATZFELD, 2005; HATZFELD, 2007). Wie p120<sup>ctn</sup> ist p0071 in den AJs vieler epithelialer Zelllinien zu finden. Darüber hinaus lokalisiert p0071 auch in Desmosomen (HATZFELD und NACHTSHEIM, 1996). Über seine Kopf-Domäne interagiert p0071 mit dem desmosomalen Cadherin Desmocollin 3a und den desmosomalen Plaque-Proteinen Desmoplakin und Plakoglobin. Die p0071-Arm-Domäne ist verantwortlich für die Interaktion mit den in AJs vorkommenden E-, N- und OB- (Osteoblast) Cadherinen. Außerdem ging die Überexpression von p0071 mit einer Verringerung der Desmosomenzahl und -größe einhergehend, während zusätzlich vermehrt AJs ausgebildet wurden. Aufgrund dieser Ergebnisse und der unter den p120-Cateninen einzigartigen dualen Lokalisation in Desmosomen und AJs wird vermutet, dass p0071 das Zusammenspiel beider Zell-Zell-Kontakt-Typen regulieren könnte (HATZFELD *et al.*, 2003; SETZER *et al.*, 2004).



**Abb. 1-2: Schematische Darstellung der Arm-Domänen von Plakophilin1 und  $\beta$ -Catenin**

Die Arm-Domäne von Plakophilin 1 ist in rot, die von  $\beta$ -Catenin in blau dargestellt. Der gelb umrandete Bereich zeigt die für die Biegung in der Arm-Domäne von Plakophilin 1 verantwortliche Region. Diese Region wurde ursprünglich für eine weitere Arm-Wiederholung gehalten (CHOI und WEIS, 2005).

Über seine C-terminale PDZ-Bindedomäne interagiert p0071 mit den PDZ-Proteinen PAPIN (*plakophilin-related armadillo repeat protein-interacting PDZ protein*) und Erbin (IZAWA *et al.*, 2002; JAULIN-BASTARD *et al.*, 2002; LAURA *et al.*, 2002). Die Funk-

tionen von PAPIN sind bisher weitgehend unbekannt, wobei eine Funktion bei der Regulation von Zellproliferation und -polarität angenommen wird (CHAIB *et al.*, 2001; OHNO *et al.*, 2002). Erbin, dessen Lokalisation durch die Rho-GTPasen Rac1 und Cdc42 reguliert werden kann, ist in die Aufrechterhaltung der Zellpolarität involviert (IZAWA *et al.*, 2002). Über eine gemeinsame Funktion von p0071 mit PAPIN oder Erbin bei der Etablierung oder Aufrechterhaltung der Zellpolarität kann allerdings nur spekuliert werden.

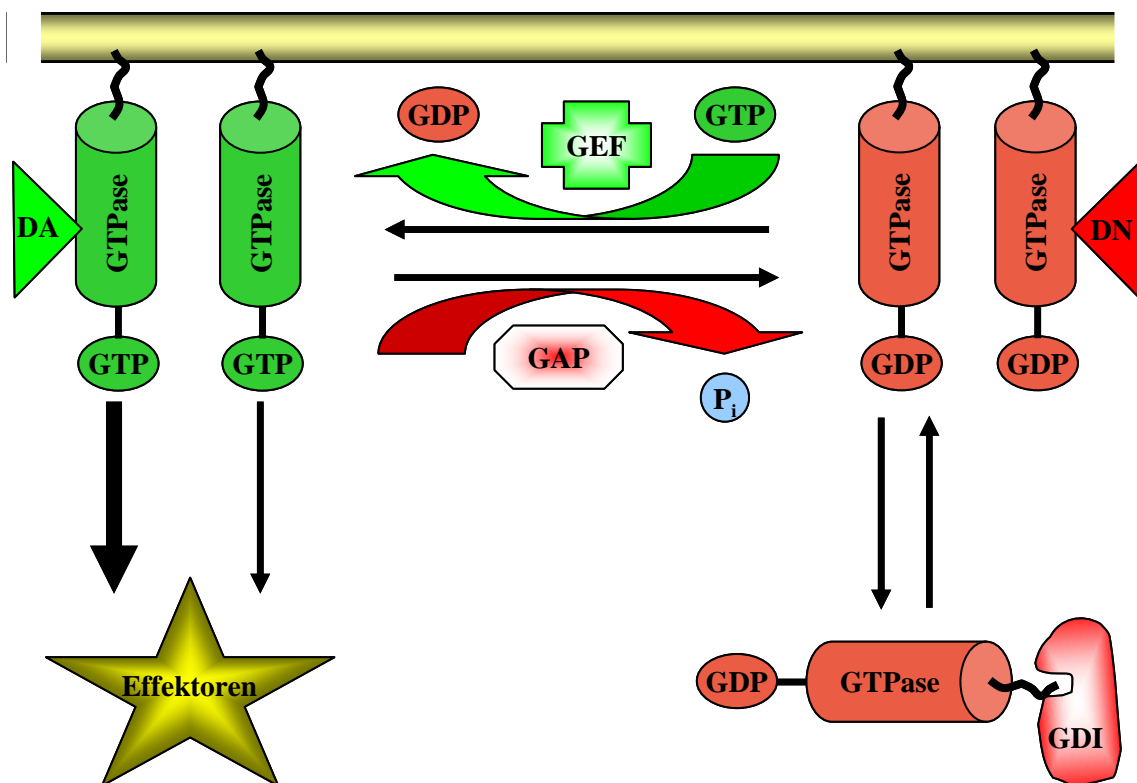
Die Lokalisation von p0071 im Zytoplasma und im Zellkern legt nahe, dass p0071 weitere Funktionen neben der Regulation der Zell-Zell-Adhäsion besitzt. So konnten Ohno und Mitarbeiter (OHNO *et al.*, 2002) zeigen, dass exogenes p0071 während der Zytokinese am kontraktilen Aktomyosin-Ring akkumuliert, was auf eine mögliche Funktion von p0071 in der Mitose hinweist. Der Aufbau und die Kontraktion des kontraktilen Ringes erfolgt unter Kontrolle der Rho-GTPasen (Abs. 1.4). Da für p120<sup>ctn</sup> (Abs. 1.2) und  $\delta$ -Catenin (ABU-ELNEEL *et al.*, 2008) eine Rolle bei der Regulation von Rho-GTPasen in unterschiedlichen Zusammenhängen beschrieben wurde, erschien es möglich, dass p0071 ebenfalls die Aktivität von Rho-GTPasen regulieren könnte.

## 1.4 Die Regulation von GTPasen der ras-Superfamilie

Die Ras-Superfamilie der kleinen GTPasen umfasst beim Menschen über 150 Mitglieder. Die onkogenen Ras-Proteine sind die Prototypen dieser großen Familie, die auf Basis von Sequenzhomologien und Funktionsähnlichkeiten in Unterfamilien eingeteilt wurden. Neben den Ras-GTPasen bilden Ran, die Rho-, die Rab- und die Arf-GTPasen fünf Unterfamilien (WENNERBERG *et al.*, 2005). Alle regulatorischen Ras-GTPasen wirken als molekulare Schalter, die zwischen einem inaktiven GDP-gebundenen und einem aktiven GTP-gebundenen Zustand wechseln können (Abb. 1-3).

GTPasen der ras-Superfamilie sind durch eine hohe Affinität zu GDP (Guanosindiphosphat) und GTP (Guanosintriphosphat) sowie durch niedrige intrinsische GTP-Hydrolyse- und GDP/GTP-Austausch-Raten charakterisiert. Die Aktivität aller ras-GTPasen wird durch GEFs und GAPs reguliert. GEFs aktivieren die GTPasen, indem sie den Austausch von GDP durch GTP katalysieren (SCHMIDT und HALL, 2002). GAPs stimulieren die intrinsische GTPase-Aktivität, wodurch das gebundene GTP zu GDP hydrolysiert und die GTPase inaktiviert wird (BERNARDS, 2003). Der Wechsel zwischen GDP- und GTP-gebundenem Zustand ist mit einer Konformationsänderung verbunden, die es den GTPasen ermöglicht, mit einem ihrer Effektor-Proteine zu interagieren (BISHOP und HALL, 2000).

Ein weiterer wichtiger Aspekt bei der Regulation der meisten GTPasen ist deren Lokalisation. Über verschiedene, meist C-terminale Prenyl-Reste können diese GTPasen mit Membranen der Zelle assoziieren. In diesem Zusammenhang wird die Membranassoziation der Rho- und Rab-GTPasen von so genannten GDIs reguliert. GDIs binden über eine hydrophobe Tasche an den C-terminalen Prenylrest dieser GTPasen im GDP-gebundenem Zustand, halten diese im Zytoplasma und verhindern so deren Assoziation mit Membranen, GEFs und Effektoren (OLOFSSON, 1999; DERMARDIROSIAN und BOKOCH, 2005).



**Abb. 1-3: Die Regulation der GTPasen der Ras-Superfamilie**

GDIs binden an die C-terminalen Prenyl-Gruppen einiger Ras-GTPasen, sequestrieren diese im inaktiven, GDP-gebundenem Zustand im Zytoplasma und verhindern damit deren Interaktion mit Regulatoren und Effektoren. Assoziieren die GTPasen mit Membranen sind sie zugänglich für GEFs. Diese katalysieren den GDP/GTP-Austausch und aktivieren darüber die GTPasen. Aktivierte GTPasen induzieren über ihre Effektoren anschließend eine spezifische Zellantwort. Zur Inaktivierung der GTPasen stimulieren GAPs die Hydrolyse des gebundenen GTP. Inaktive GTPasen können im Anschluss wieder mit GDIs reassoziieren. Zur Analyse von GTPase-Funktionen kommen oftmals Mutanten der GTPasen zum Einsatz. Dominant negative GTPasen (DN) sind durch eine Punktmutation nicht mehr in der Lage mit ihren Effektoren zu interagieren, da deren Aktivierung (GDP/GTP-Austausch) nicht mehr möglich ist. Da diese GTPasen aber die Regulatoren (GEFs) binden können, verhindern sie auf diese Weise die Aktivierung der endogenen GTPasen. Dominant aktive GTPasen (DA) fehlt durch eine Punktmutation die Fähigkeit zur GTP-Hydrolyse. Sie sequestrieren dadurch Effektoren, induzieren die GTPase-spezifische Zellantwort und können darüber hinaus gleichzeitig die Funktion der GTPasen inhibieren, die über die gleichen Effektoren wirken (HEASMAN und RIDLEY, 2008).

## 1.5 Die Regulation der Zytokinese

Der Prozess, bei dem es nach Verdopplung und Segregation des genetischen Materials zur physikalischen Trennung der Tochterzellen kommt, wird als Zytokinese bezeichnet. Trotz zum Teil erheblicher Unterschiede im Ablauf der Zytokinese, besonders zwischen tierischen und pflanzlichen Zellen, sind viele Regulatoren innerhalb der Eukaryoten konserviert. In den nachfolgenden Abschnitten werden die Regulation und der Ablauf der Zytokinese in tierischen Zellen beschrieben.

Die Zytokinese muss zeitlich und räumlich streng koordiniert mit der Chromosomen-segregation ablaufen, um Fehler bei der Verteilung des genetischen Materials zu verhindern. Der so genannte Spindel-*checkpoint* sichert die korrekte Segregation der Chromosomen und reguliert den Eintritt der Zellen in die Anaphase. Der über die E3-Ubiquitin-Ligase APC/C (*Anaphase Promoting Complex/Cyclosome*) vermittelte proteolytische Abbau von Cyclinen am Ende der Metaphase inaktiviert die Cdks (*Cyclin dependent kinases*) und induziert den Beginn der Zytokinese. Cdks phosphorylieren bis zur Inaktivierung des Spindel-*checkpoints* eine Vielzahl von Proteinen, die essentiell für den Beginn der Anaphase und Zytokinese sind, wodurch diese Proteine in einem inaktiven Zustand gehalten werden (BURKE und STUKENBERG, 2008; PESIN und ORR-WEAVER, 2008).

Die Zytokinese beginnt mit der Umorganisation der Mikrotubuli der Teilungsspindel. Im Zuge dieses Prozesses kommt es zur Rekrutierung wichtiger Regulatoren, wodurch gleichzeitig die Position der zukünftigen Teilungsfurche markiert wird (Abs. 1.5.2). Dort kommt es zur Assemblierung und Kontraktion des so genannten Aktomyosin-Ringes unter der Kontrolle der Rho-GTPasen und ihrer Effektoren (Abs. 1.5.3 und Abs. 1.5.4). Für die endgültige Trennung der Tochterzellen sind Vesikeltransport- und -fusionsprozesse unabdingbar, bei denen die GTPase Rab11 eine wichtige Rolle einnimmt (Abs. 1.5.5). Außerdem sind an der Zytokinese verschiedene Motorproteine beteiligt, die Transportprozesse im Verlauf der Zytokinese koordinieren sowie Veränderungen des Aktin- bzw. Tubulin-Zytoskeletts vermitteln (Abs. 1.5.1).

### 1.5.1 Motorproteine in der Mitose und Zytokinese

Transportvorgänge sind essentiell für die Aufrechterhaltung von Morphologie und Funktion der Zelle. Die Zytoskelett-assoziierten Motorproteine werden den Myosinen, den Dyneinen und den Kinesinen zugeordnet. Die Motorproteine der Myosin-Superfamilie vermitteln die Kontraktibilität von Aktomyosin-Filamenten sowie den Aktin-assoziierten Trans-

port von Organellen und Membranvesikeln (SEABRA und COUDRIER, 2004). Dyneine und Kinesine sind Mikrotubuli-assoziierte Motorproteine, die ursprünglich im Gehirn identifiziert wurden. Die Hydrolyse von ATP führt zu Konformationsänderungen, die eine Bewegung entlang von Mikrotubuli ermöglichen (GENNERICH und VALE, 2009). Mikrotubuli, die aus den monomeren Untereinheiten  $\alpha$ -Tubulin und  $\beta$ -Tubulin aufgebaut sind, haben ein definiertes Plus- und Minus-Ende. Die Länge der Mikrotubuli wird über die Polymerisation und Depolymerisation von  $\alpha$ -/ $\beta$ -Tubulin-Heterodimeren reguliert, wobei die Plus-Enden weitaus dynamischer sind als die Minus-Enden. Die Orientierung der Mikrotubuli gibt den Kinesinen und Dyneinen die Richtung des Transportes vor. Motorproteine der Kinesin-Familie bewegen sich bis auf einige Ausnahmen in Richtung des Plus-Endes und Mitglieder der Dynein-Familie in Richtung des Minus-Endes (HIROKAWA und NODA, 2008).

### 1.5.1.1 Die Rolle der Dyneine in der Zytokinese

Die aus jeweils zwei schweren, zwei Intermediär-, zwei leichten Intermediär- und dreimal zwei leichten Ketten aufgebauten Dyneine sind während der Mitose am Zusammenbruch der Kernhülle beteiligt, indem sie die Kernmembran und assoziierte Proteine in Richtung der Spindelpole transportieren (SALINA *et al.*, 2002). Außerdem spielen die Dyneine bei der Regulation des Spindel-*checkpoints* eine Rolle. Durch den Transport der Proteine Mad1 und Mad2 vom Kinetochor zu den Spindelpolen wird Cdc20 vom inhibierenden Einfluss des Mad2-BubR1-Komplexes befreit und APC/C aktiviert (KARESS, 2005). Vermutlich spielt der Dynein-Dynactin-Komplex auch eine Rolle bei der Lokalisierung der für die Zytokinese wichtigen Mikrotubuli-assoziierten Proteine MKLP1 (*mitotic kinesin like protein 1*) und AuroraB (DELCROS *et al.*, 2006).

### 1.5.1.2 Die Rolle der Kinesine in der Zytokinese

Die Familie der Kinesine umfasst in Säugetieren mehr als 40 Mitglieder, die in 14 Unterfamilien zusammengefasst sind. Typisch für alle Kinesine ist eine konservierte, ca. 360 As große, globuläre Motordomäne. Diese Domäne ist sowohl für die Mikrotubuli-Assoziation, als auch für die ATP-Hydrolyse verantwortlich. Außerhalb der Motordomäne unterscheiden sich die Kinesine jedoch deutlich voneinander. Für ihre Funktionalität bilden die meisten Kinesine über ihre C-terminale  $\alpha$ -helikale Domäne Homo- oder Heterodimere. Die Assoziation der Kinesine mit ihren *cargo*-Molekülen erfolgt oftmals über Adapterproteine, die mit der  $\alpha$ -helikalen Domäne interagieren (MIKI *et al.*, 2005; HIROKAWA und NODA, 2008).

Für 12 Kinesine konnten in einer siRNA-basierten Analyse eine Funktion in der Mitose bzw. der Zytokinese gezeigt werden (ZHU *et al.*, 2005b). Kinesin-5 zum Beispiel, auch als Eg5 bekannt, ist einer der wichtigsten Regulatoren für den Aufbau der Teilungsspindel. Als Homotetramer kann Eg5 Mikrotubuli miteinander vernetzen und diese auch gegeneinander verschieben, was essentiell für den dynamischen Prozess der Teilungsspindel-Assemblierung ist (KASHINA *et al.*, 1996a; KASHINA *et al.*, 1996b; KAPITEIN *et al.*, 2005). Die Kinesine KIFC1, MCAK, CENP, KIF14, KIF18, Kid und KIF4 haben Funktionen bei der Anordnung der Chromosomen und bei dynamischen Prozessen der Teilungsspindel (ZHU *et al.*, 2005b). Für die Kinesine MKLP1, MKLP2, KIF4, KIF14 und KIF3 konnte eine Rolle in der Zytokinese nachgewiesen werden. MKLP1, MKLP2 und KIF4, die in Abs. 1.5.2 genauer beschrieben sind, haben Funktionen bei der Umorganisation der Teilungsspindel und der Positionierung der Teilungsfurche. KIF14 spielt eine Rolle bei der Lokalisation der Kinase Citron, einem Effektor der GTPase RhoA (GRUNEBERG *et al.*, 2006).

Ein weiteres Kinesin mit Funktionen in der Zytokinese ist KIF3. KIF3 ist ein heterotrimerer Komplex aus den Kinesin-2-Familienmitgliedern KIF3a und KIF3b, die das funktionelle Motordimer bilden und dem Adapterprotein KAP3, das die Bindung an *cargo*-Moleküle vermittelt. Das KIF3a-KIF3b-Heterodimer kann Proteine allerdings auch ohne KAP3 transportieren. Der KIF3-Komplex ist fast ubiquitär exprimiert und am Transport von Organellen, Membranvesikeln und Proteinkomplexen in verschiedensten Geweben beteiligt (YAMAZAKI *et al.*, 1995; YAMAZAKI *et al.*, 1996; TAKEDA *et al.*, 2000). Für die Unter-einheit KIF3b konnte eine Rolle in der Mitose und der Zytokinese gezeigt werden. Die Überexpression von dominant negativen KIF3b-Mutanten führt in humanen Zellen zu Bildung von multipolaren Spindeln, was mit einer fehlerhaften Chromosomensegregation einhergeht (FAN und BECK, 2004; HARAGUCHI *et al.*, 2006). Außerdem interagiert KIF3b mit Syne 1 (*synaptic nuclear envelope protein 1*) und ist verantwortlich für dessen Lokalisation am Zentralkörper. In diesem Zusammenhang ist KIF3b am Transport von Membranvesikeln zur Teilungsfurche beteiligt (FAN und BECK, 2004).

### 1.5.1.3 Die Rolle von Myosin-II in der Zytokinese

Die Superfamilie der Myosine umfasst in Säugetieren mindestens 18 Mitglieder. Myosine sind Aktin-assoziierte Motorproteine, die sowohl makroskopische Prozesse wie die Muskelkontraktion als auch mikroskopische Prozesse wie den Transport von Organellen regulieren. Für die Bewegung entlang von Aktinfilamenten hydrolysieren die Myosine ATP (DE LA CRUZ und OSTAP, 2004). Myosin-II, das ursprünglich in Muskeln identifiziert



wurde, ist in höheren Eukaryoten verantwortlich für die Einschnürung der Zellen während der Zytokinese. Ein Myosin-II-Komplex besteht aus zwei schweren Ketten (MHC), die die Motordomäne beinhalten, zwei essentiellen leichten Ketten (MELC) und zwei regulatorischen leichten Ketten (MRLC). Die Phosphorylierung der MRLC am S19 und T18 führt in höheren Eukaryoten zur Aktivierung von Myosin-II. Die S19-Phosphorylierung induziert die Bildung von bipolaren Myosin-II-Filamenten und erhöht die Affinität der MHCs zu filamentösem Aktin (F-Aktin), was zur Assemblierung des Aktomyosin-Komplexes und zu dessen Kontraktion führt. Eine verstärkte Bildung von Myosin-II-Filamenten konnte nach der Diphosphorylierung am S19 und T18 beobachtet werden (MABUCHI und OKUNO, 1977; SCHOLEY *et al.*, 1980; SELLERS *et al.*, 1981; SELLERS *et al.*, 1985; IKEBE *et al.*, 1988; TAN *et al.*, 1992). Da die Assemblierung und Kontraktion von Aktomyosin-Komplexen nach der Phosphorylierung der MRLC erfolgt, wird diese streng reguliert. Eine Reihe von MRLC-Kinasen und die MRLC-Phosphatase kontrollieren die Phosphorylierung der MRLC am S19 und T18. In der Zytokinese erfolgt die Kontrolle der Myosin-II-Aktivität über ROK (Rho-Kinase) und die Kinase Citron (Abs. 1.5.4).

### **1.5.2 Die Ausbildung der zentralen Spindel**

In einem der ersten Schritte der Zytokinese kommt es zur Umstrukturierung der Teilungsspindel. Durch Proteinkomplexe mit Mikrotubuli-bündelnden Eigenschaften werden die anti-parallel überlappenden Mikrotubuli der Teilungsspindel am Ende der Anaphase zur zentralen Spindelregion umorganisiert. Die zentrale Spindelregion legt die Position der zukünftigen Teilungsfurche fest, indem sie als Plattform zur Lokalisierung von Regulatoren und Effektoren dient, die an der Assemblierung des Aktomyosin-Ringes beteiligt sind. Diese Positionierung muss räumlich und zeitlich streng koordiniert werden, so dass jede Tochterzelle eine einzelne Kopie des genetischen Materials erhält. Die zeitliche Koordinierung der Spindelreorganisation erfolgt unter Kontrolle von Cdk1. Cdk1 phosphoryliert und inhibiert PRC1 (*protein regulator of cytokinesis 1*) und das Motorprotein MKLP1. Beide Proteine sind essentiell für die Ausbildung der zentralen Spindelregion. Aus diesem zentralen Mikrotubuli-Bündel und dem Aktomyosin-Ring entsteht zum Ende der Zytokinese eine lichtmikroskopisch sichtbare Struktur, die von Flemming (FLEMMING, 1891) als Zentralkörper beschrieben wurde und den Ort der Abschnürung markiert (GLOTZER, 2005; BARR und GRUNEBERG, 2007).

Während der Metaphase verhindert die Cdk1-Phosphorylierung die Bindung von PRC1 an Mikrotubuli. Nach der Inaktivierung der Cdk1 interagiert PRC1 mit dem Kinesin

KIF4, das PRC1 am Plus-Ende der Mikrotubuli der Teilungsspindel konzentriert. PRC1 ordnet und bündelt anschließend diese antiparallelen überlappenden Mikrotubuli (JIANG *et al.*, 1998; MOLLINARI *et al.*, 2002; KURASAWA *et al.*, 2004; VERNI *et al.*, 2004). Cdk1 phosphoryliert außerdem MKLP1 und inhibiert darüber die Assemblierung des Zentralspindlin-Komplexes (MISHIMA *et al.*, 2004; NIIYA *et al.*, 2005). Der Zentralspindlin-Komplex wird aus einem Dimer des Kinesin-6 MKLP1 (Pavarotti in *D. melanogaster* und ZEN4 in *Caenorhabditis elegans*) und einem Dimer des GAP-Proteins MgcRacGAP (CYK-4 in *C. elegans*) gebildet. Wie PRC1 wird der Zentralspindlin-Komplex während der Anaphase am Plus-Ende der sich überlappenden Mikrotubuli der Teilungsspindel konzentriert und ist an der Stabilisierung und Bündelung von Mikrotubuli beteiligt. Außerhalb des Zentralspindlin-Komplexes ist weder MgcRacGAP noch MKLP1 in der Lage Mikrotubuli zu bündeln (ADAMS *et al.*, 1998; POWERS *et al.*, 1998; MATULIENE und KURIYAMA, 2002; MISHIMA *et al.*, 2002; SOMERS und SAINT, 2003).

An der Umstrukturierung der Teilungsspindel ist außerdem die mitotische Kinase AuroraB beteiligt, die vermutlich die Rekrutierung von MKLP1 an die Mikrotubuli steuert. AuroraB ist die enzymatisch aktive Komponente des CPC (*chromosomal-passenger-complex*), die durch die nicht enzymatischen Komponenten INCENP (*inner centromere protein antigens* 135/155 kDa), Survivin und Borealin reguliert wird (RUCHAUD *et al.*, 2007). AuroraB wird durch MKLP2 an das Plus-Ende der sich überlappenden Mikrotubuli der Teilungsspindel transportiert (GRUNEBERG *et al.*, 2004). In *C. elegans* und *D. melanogaster* wurde gezeigt, dass AuroraB-Orthologe MKLP1 phosphorylieren und darüber dessen Mikrotubuli-Assoziation regulieren (GUSE *et al.*, 2005). Humanes MKLP1 kann *in vivo* und *in vitro* durch AuroraB phosphoryliert werden. Diese Phosphorylierung scheint zwar nicht verantwortlich für die Mikrotubuli-Assoziation von MKLP1 zu sein, ist aber trotzdem über die Regulation des Kernexports von MKLP1 essentiell für die Zytokinese. Außerdem konnte gezeigt werden, dass in humanen Zellen INCENP die Rekrutierung von MKLP1 an die Teilungsspindel beeinflusst (ZHU *et al.*, 2005a; NEEF *et al.*, 2006).

Auch Plk1 (*polo-like-kinase 1*), eine Serin/Threonin-Kinase, ist an der Reorganisation der Teilungsspindel beteiligt. Plk1 interagiert über seine C-terminale PBD (Polo-Box-Domäne) mit einer Vielzahl von Phosphoproteinen, die selbst Substrat der Plk1 sein können oder zur Anreicherung von Plk1 an einem bestimmten Ort in der Zelle dienen. In der Metaphase ist Plk1 aufgrund der dominierenden Cdk1-Aktivität mit Cdk1-Substraten an den Spindelpolen und Kinetochoren assoziiert. Die Inaktivierung von Cdk1 nach erfolgter Chromosomensegregation und der damit verbundenen Dephosphorylierung der Cdk1-Substrate

führt zur direkten Assoziation von Plk1 mit den Mikrotubuli der Teilungsspindel. Plk1 phosphoryliert das Mikrotubuli-assoziierte Motorprotein MKLP2, was zum Transport von Plk1 an das Plus-Ende der sich überlappenden Mikrotubuli der Teilungsspindel führt. Dort phosphoryliert Plk1 PRC1, bindet über seine PBD an phosphoryliertes PRC1 und akkumuliert an der Teilungsspindel (NEEF *et al.*, 2003; PETRONCZKI *et al.*, 2008). Die Aktivität von Plk1 scheint die Lokalisation von AuroraB und INCENP zu beeinflussen und damit die Umstrukturierung der Teilungsspindel (PETRONCZKI *et al.*, 2007). Eine weitere Funktion von an der zentralen Spindelregion konzentriertem Plk1 ist die Rekrutierung von ECT2, dem Hauptaktivator der GTPase RhoA (Abs. 1.5.3), was zur Assemblierung und Kontraktion des Aktomyosin-Ringes führt.

### 1.5.3 Die Regulation der RhoA-Aktivität während der Zytokinese

Die Rho-GTPasen sind bekannt als die Hauptregulatoren des Aktin-Zytoskeletts. Die Aktivierung von RhoA, Rac1 oder Cdc42 führt zur Bildung kontraktiler Aktomyosin-Filamente (RhoA), aktinreicher Lamellipodia (Rac1) oder aktinreicher Filopodia (Cdc42). Rho-GTPasen beeinflussen die Zellpolarität, Membrantransportvorgänge, die Aktivität von Transkriptionsfaktoren und dynamische Prozesse des Tubulin-Zytoskeletts. Diese Vielzahl an Funktionen regulieren die Rho-GTPasen über ihre Effektoren, von denen bis heute mehr als 50 im humanen Genom identifiziert wurden (ETIENNE-MANNEVILLE und HALL, 2002; JAFFE und HALL, 2005).

Der Hauptaktivator von RhoA während der Zytokinese ist das GEF-Protein ECT2 (*epithelial cell transforming gene 2*). ECT2 ist das Säugetier-Homologe des Genprodukts Pebble aus *D. melanogaster*, das erstmals 1993 als Regulator für GTPasen der Rho-Familie beschrieben wurde (MIKI *et al.*, 1993). Der C-terminale Bereich von ECT2 enthält nacheinander eine DH- und eine PH-Domäne (Dbl-homolog bzw. Pleckstrin-homolog). Dbl war das erste Rho-GEF, das als Protein mit transformierenden Eigenschaften in diffusen B-Zell-Lymphomen beschrieben wurde (SRIVASTAVA *et al.*, 1986). Die DH-Domäne, die auch als GEF-Domäne bezeichnet wird, katalysiert den Guaninnukleotid-Austausch der Rho-GTPasen Rac1, Cdc42 und RhoA *in vitro* (TATSUMOTO *et al.*, 1999). Die genaue Funktion der PH-Domäne von ECT2, die bei den meisten Rho-GEFs C-terminal zur DH-Domäne gelegen ist, wurde noch nicht aufgeklärt. Für einige GEFs konnte eine Funktion dieser Domäne bei deren Lokalisation und Aktivitätsregulation gezeigt werden. Außerdem scheint die PH-Domäne Protein-Protein-Interaktionen zu vermitteln (BLOMBERG *et al.*, 1999). Die zentrale S-Domäne von ECT2 beinhaltet zwei Kernlokalisierungssignale, deren Funktions-

verlust die transformierenden Eigenschaften von ECT2 induziert (SAITO *et al.*, 2004). Der N-terminale Bereich von ECT2 enthält zwei aufeinander folgende BRCT-Domänen (*breast cancer 1 C-terminal*). Diese Domäne ist in vielen Proteinen konserviert, die in DNA-Reparatur-Mechanismen und Zell-Zyklus-Kontrolle involviert sind (BORK *et al.*, 1997). Die BRCT-Domänen von ECT2 regulieren dessen GEF-Aktivität, indem sie eine intramolekulare Interaktion mit der C-terminalen Domäne von ECT2 eingehen. Auf diese Weise wird die Bindung von Rho-GTPasen an die GEF-Domäne von ECT2 verhindert (KIM *et al.*, 2005).

Für das ECT2-homologe Protein Pebble aus *D. melanogaster* konnte eine Funktion als essentielles Rho-GEF in der Zytokinese gezeigt werden. Über die Regulation der Rho1-Aktivität vermittelt Pebble die Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts an der Teilungsfurche (PROKOPENKO *et al.*, 1999). Verschiedene experimentelle Ansätze belegen diese Funktion für ECT2 auch bei der Zytokinese von Säugezellen. Die Inaktivierung von ECT2 durch die Überexpression der regulatorischen N-terminalen Domäne, die Injektion inhibitorischer Antikörper (Ak) sowie die Reduktion der ECT2-Expression mittels siRNAs verhindern die kortikale Akkumulation von aktivem RhoA und damit die Assemblierung des Aktomyosin-Ringes (TATSUMOTO *et al.*, 1999; KIM *et al.*, 2005; YUCE *et al.*, 2005). Während der Interphase liegt ECT2 normalerweise in der inaktiven Konformation im Zellkern vor. Mit Eintritt in die Mitose wird ECT2 hyperphosphoryliert, was essentiell für die Aktivität von ECT2 scheint (TATSUMOTO *et al.*, 1999). Die Kinase Cdk1 ist an dieser Hyperphosphorylierung beteiligt. Cdk1 phosphoryliert ECT2 *in vitro* an mindestens drei Threonin-Resten, unter anderem am T814, wofür bisher keine Funktion *in vivo* gezeigt werden konnte. Die Phosphorylierung von ECT2 am T412 erhöht die Affinität von Plk1 zu ECT2. Plk1 phosphoryliert ECT2 *in vitro* im N- (As 1-421) und C- (As 753-882) terminalen Bereich des Proteins. Eine Cdk1-phosphodefiziente Mutante T412A, die nur eine geringe Affinität zu Plk1 aufweist, stimuliert die RhoA-Aktivität in der Zelle im Vergleich zur Phosphomimik-Mutante und zum WT-Protein kaum, so dass über eine Rolle der Plk1-Phosphorylierungen bei der Aktivierung von ECT2 spekuliert werden kann (NIIYA *et al.*, 2006). Cdk1 phosphoryliert ECT2 außerdem am T342, wodurch eine Konformationsänderung induziert wird, die ECT2 in die offene Konformation überführt. In der offenen Konformation liegen die BRCT-Domänen von ECT2 nicht mehr assoziiert mit der DH-Domäne vor. Diese Modifikation reicht jedoch nicht aus, um ECT2 vollständig zu aktivieren, so dass spekuliert wird, dass diese Cdk1-Phosphorylierung nachgeschalteten ECT2-Regulatoren die Interaktion mit den BRCT-Domänen zur weiteren Aktivierung von ECT2 ermöglicht (KIM *et al.*, 2005; HARA *et al.*, 2006). Die Tatsache, dass ECT2 zu Beginn der Mitose hyperphosphoryliert wird, diese

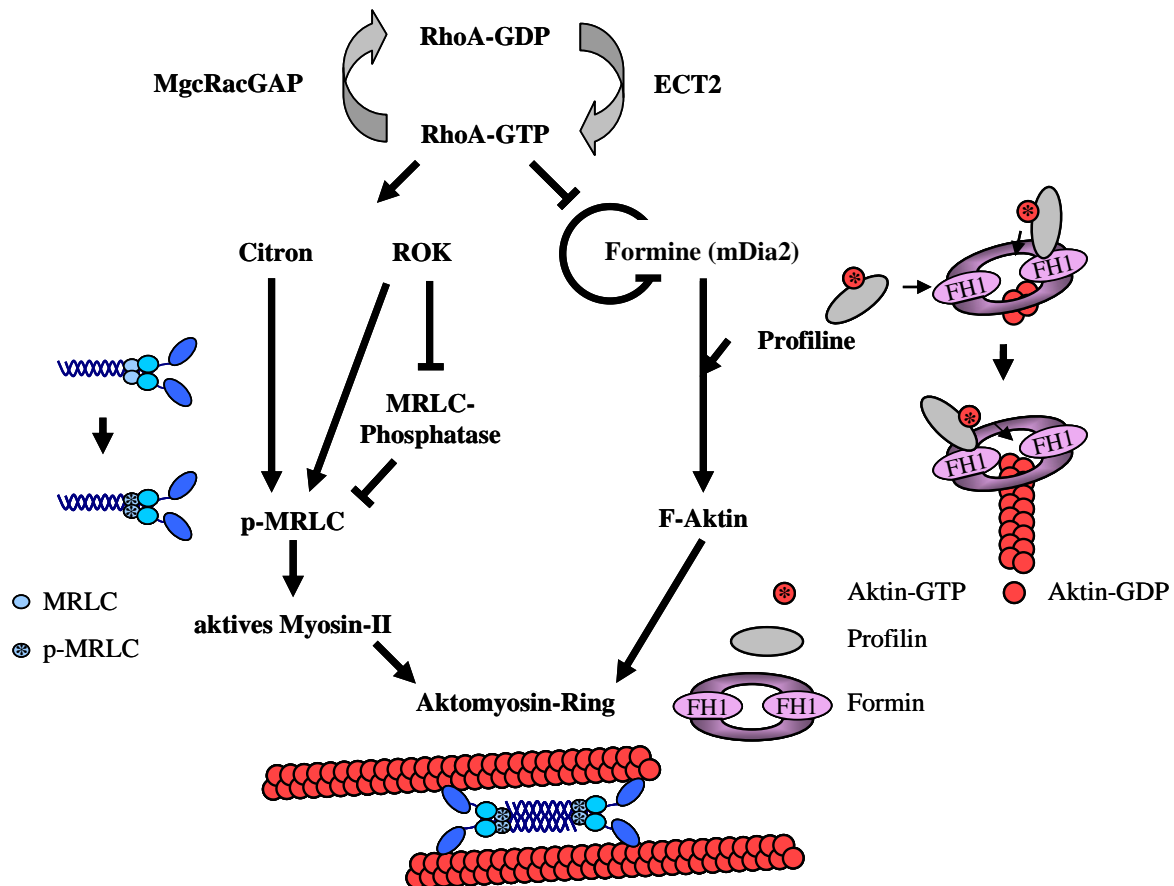
Phosphorylierungen essentiell für die GEF-Aktivität von ECT2 sind, aber aktives RhoA in größeren Mengen erst 90 Minuten nach Beginn der Mitose zum Zeitpunkt der Zytokinese in der Zelle nachzuweisen ist, lässt vermuten, dass neben der Aktivierung von ECT2 auch dessen Lokalisation essentiell für den Verlauf der Zytokinese ist (TATSUMOTO *et al.*, 1999; KIMURA *et al.*, 2000).

Während der Anaphase wird ECT2 im Komplex mit Mikrotubuli-assoziierten Motorprotein MKLP1 und MgcRacGAP zur zentralen Spindel transportiert. ECT2 interagiert über seine BRCT-Domänen mit dem RhoA-inaktivierenden Protein MgcRacGAP. Die Phosphorylierung von MgcRacGAP durch Plk1 ist essentiell für diese Interaktion. In diesem Zusammenhang ist eine weitere Funktion der Cdk1-Phosphorylierung am T342 von ECT2 beschrieben wurden. Diese verhindert die Assoziation von ECT2 und MgcRacGAP. Erst die Dephosphorylierung von ECT2 nach der Inaktivierung von Cdk1 ermöglicht ECT2 die Bindung an MgcRacGAP, wodurch ECT2 weiter in der offenen Konformation gehalten wird (YUCE *et al.*, 2005; BURKARD *et al.*, 2009; WOLFE *et al.*, 2009). An der zentralen Spindel konzentriertes ECT2 katalysiert die lokale Aktivierung von RhoA, was zur Ausbildung einer am äquatorialen Zellkortex gelegenen Zone aus aktivem RhoA führt (NISHIMURA und YONEMURA, 2006).

MgcRacGAP reguliert die Aktivität von RhoA negativ, indem es dessen intrinsische GTPase-Aktivität stimuliert. Die Phosphorylierung von MgcRacGAP durch AuroraB während der Zytokinese verringert dessen GAP-Aktivität gegenüber Rac1 und Cdc42, wodurch die GAP-Aktivität gegenüber RhoA dominierend wird (MINOSHIMA *et al.*, 2003). Die GAP-Aktivität von MgcRacGAP scheint essentiell für den Verlauf der Zytokinese zu sein, da deren Inhibierung in humanen Zellen sowie in *D. melanogaster*-Embryonen zur Bildung mehrkerniger Zellen führt (LEE *et al.*, 2004a). Die Experimente von Miller und Mitarbeitern (MILLER und BEMENT, 2009) legen die Vermutung nahe, dass für Assemblierung und Kontraktion des Aktomyosin-Ringes RhoA ständig den Zyklus von Aktivierung und Inaktivierung durchlaufen muss. Die Tatsache, dass es um die zentrale Spindel zur Akkumulierung von aktivem RhoA kommt, zeigt, dass dieser Zyklus am Beginn der Zytokinese in Richtung der Aktivierung von RhoA verschoben sein muss. In diesem Zusammenhang könnten bisher unbekannte Proteine eine Rolle spielen, die gemeinsam mit ECT2 und/oder MgcRacGAP das Gleichgewicht von Aktivierung und Inaktivierung in die eine oder andere Richtung verschieben.

### 1.5.4 Die Assemblierung und Kontraktion des Aktomyosin-Ringes

Am äquatorialen Zellkortex akkumuliertes RhoA induziert schließlich über seine Effektoren die Assemblierung und Kontraktion des Aktomyosin-Ringes. Die Inhibierung von RhoA durch die C3-Transferase verhindert wie die konstitutive Aktivierung von RhoA diese Prozesse (KAMIJO *et al.*, 2006; MORIN *et al.*, 2009). Assemblierung und Kontraktion des Aktomyosin-Ringes erfolgen durch die Aktivierung von Myosin-II und die Polymerisation von Aktin. ROK und die Kinase Citron vermitteln die Myosin-II-Aktivierung. Als Antwort auf die Akkumulation von aktivem RhoA phosphorylieren ROK und Citron die regulatorische leichte Kette des Myosin-II (MRLC) am S19 bzw. am T18 und S19, induzieren darüber die Assemblierung des Myosin-II mit F-Aktin und stimulieren die Myosin-II-Motoraktivität. ROK hemmt gleichzeitig die Myosin-II-inhibierende MRLC-Phosphatase (AMANO *et al.*, 1996; KIMURA *et al.*, 1996; YAMASHIRO *et al.*, 2003).



**Abb. 1-4: Die RhoA-abhängige Regulation der Aktomyosin-Ring-Assemblierung**

RhoA-GTP initiiert über ROK und Citron die Phosphorylierung der MRLC, was zur Aktivierung des Myosin-II führt. Außerdem hebt aktives RhoA die Autoinhibierung der Formine (im speziellen mDia2) auf, die daraufhin zusammen mit den Profilinen die Polymerisierung von monomerem Aktin zu unverzweigten Aktin-Filamenten katalysieren. F-Aktin und aktives Myosin-II assemblieren zum Aktomyosin-Ring, der durch die Myosin-II-vermittelten Kräfte kontrahiert (PIEKNY *et al.*, 2005).

Die Polymerisierung von monomerem Aktin zu F-Aktin erfolgt während der Zytokinese von Säugetier-Zellen unter Kontrolle des Formins mDia2 (WATANABE *et al.*, 2008). Prinzipiell katalysieren die Formine über ihre FH2-Domäne (Formin homolog) die *de novo*-Synthese von unverzweigten Aktin-Filamenten. Über ihre FH1-Domäne können die Formine zusätzlich mit Profilin interagieren, das seinerseits Aktin-Monomere bindet, wodurch die Polymerisierung des Aktin-Filaments beschleunigt wird (PRUYNE *et al.*, 2002; ROMERO *et al.*, 2004; OTOMO *et al.*, 2005). Da der Aktomyosin-Ring in der PM verankert ist, führt dessen Kontraktion zur Bildung der Teilungsfurche (Abb. 1-4).

### 1.5.5 Vesikeltransport während der Zytokinese

Der Vesikeltransport ist der Mechanismus in der Zelle, über den Material von einem Membran-Kompartiment zum nächsten bzw. an die PM gelangt. Die Vesikel werden dabei entlang des Tubulin- und des Aktin-Zytoskeletts über Motorproteine der Dynein-, Kinesin- und Myosin-Familien transportiert (LEE *et al.*, 2004b). Die Fusion der Vesikel mit ihrer Zielmembran wird von sogenannten SNARE-Proteinen (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor*) vermittelt. SNAREs sind kleine Transmembranproteine, bei denen t-SNAREs (*target*) und v-SNAREs (*vesicle*) unterschieden werden. Vereinfacht dargestellt, bilden auf der Zielmembran lokalisierte t-SNAREs mit den Vesikel-assoziierten v-SNAREs einen Komplex, der die Fusion des Vesikels mit der Zielmembran ermöglicht, wobei die SNARE-assoziierten Proteine eine unterstützende Funktion haben (JAHN und SCHELLER, 2006). Für die meisten Vesikelfusionsprozesse sind neben den SNAREs weitere Komponenten notwendig. Sogenannte *tether* verankern die Vesikel an der Zielmembran und ermöglichen die anschließende Fusion. *tether* können einzelne lange Proteine oder große aus mehreren Untereinheiten bestehende Komplexe sein (WHYTE und MUNRO, 2002). Eine wichtige Rolle spielt in diesem Zusammenhang der oktamere Exozyst-Komplex. Dieser Multiprotein-Komplex wurde 1996 in Hefen entdeckt und besteht aus Sec3, Sec5, Sec6, Sec8, Sec10, Sec15, Exo70 und Exo84 (TERBUSH *et al.*, 1996). Sechs der Exozyst-Komponenten gelangen über sekretorische Vesikel des Golgi-Apparats zur PM. Dort markieren Exo70 und Sec3, deren Transport unabhängig vom Golgi-Apparat erfolgt, den Zielort der Vesikel. Die vollständige Assemblierung des Exozyst-Komplexes scheint essentiell für die Fusion von Vesikeln mit der PM zu sein, da das Ausschalten des Exozyst-Komplexes mit einer Akkumulation von Vesikeln am eigentlichen Fusionsort einhergeht (HSU *et al.*, 1999; MUNSON und NOVICK, 2006). An Vesikeltransportvorgängen beteiligt sind außerdem GTPasen der Rab-Familie (*Ras-like proteins in the brain*), die wie die Rho-GTPasen zur

Superfamilie der Ras-GTPasen gehören. Die Lokalisierung und Aktivierung der Rab-GTPasen erfolgt ebenfalls über GDIs, GEFs und GAPs. Über ihre Effektoren vermitteln aktivierte Rab-GTPasen verschiedenste Prozesse beim Vesikeltransport. Rab-GTPasen sind an der Bildung und Abschnürung von Vesikeln beteiligt, sie kontrollieren über die Interaktion mit verschiedenen Motorproteinen die Motilität der Vesikel und regulieren die Fusion von Vesikeln über den Abbau der Vesikelhülle und die Interaktion mit Proteinen auf der Akzeptor-Membran. Da jeder dieser Schritte von spezifischen Rab-GTPasen vermittelt wird, werden die Rab-GTPasen auch als die Koordinatoren des Vesikeltransports bezeichnet (STENMARK, 2009).

Durch die RhoA-abhängige Einschnürung der Teilungsfurche und die gleichzeitige Aktivität der Mikrotubuli-bündelnden Faktoren (PRC1, Zentralspindlin) wird der Zentralkörper gebildet. Der Zentralkörper liegt in der Mitte einer dünnen zytoplasmatischen Brücke, die die Tochterzellen weiterhin verbindet. Die Auflösung dieser Brücke (Abschnürung) trennt die Tochterzellen endgültig voneinander. Lange Zeit galt die Aktomyosin-basierte Einschnürung von Säugerzellen während der Zytokinese als ausreichend, um diese auch zu separieren. Von der Zytokinese der Pflanzen war die Abhängigkeit vom gerichteten Vesikeltransport und der Fusion dieser Vesikel zur Phragmoplast-Ausbildung schon länger bekannt (BALUSKA *et al.*, 2006). Auch in großen embryonalen Zellen, wie den Eiern von Amphibien, ist die Abhängigkeit der Zytokinese von Vesikeltransportvorgängen gezeigt worden (BLUEMINK und DE LAAT, 1973). Bei der Zellularisierung von *D. melanogaster*-Embryonen wird die Vergrößerung der Teilungsfurche ebenfalls durch Membraninsertion über Vesikeltransport erreicht (FULLILOVE und JACOBSON, 1971).

Gromley und Mitarbeiter identifizierten 2003 (GROMLEY *et al.*, 2003) das bis dahin unbekannte Centriolin, das am Zentralkörper lokalisiert. Die Verringerung der Centriolin-Expression mittels siRNA führte dazu, dass die Zellen nach der Mitose über lange zytoplasmatische Brücken verbunden blieben. Da die Aktomyosin-Ring-vermittelte Einschnürung der Zellen normal verlief, deuteten diese Ergebnisse an, dass Vesikeltransportvorgänge auch in Säugerzellen für eine erfolgreiche Zytokinese benötigt werden. Proteom-Analysen von isolierten Zentralkörpern aus Säugerzellen zeigten außerdem, dass ca. ein Viertel der Zentralkörper-assoziierten Proteine dem Golgi-Apparat zugeordnet werden können (SKOP *et al.*, 2004). Dies unterstützte die Hypothese, dass Vesikeltransport auch in Säugetierzellen während der Zytokinese stattfindet und zeigte außerdem, dass die beteiligten Komponenten zumindest im Tierreich konserviert sein könnten. Am Vesikeltransport in der Zytokinese sind Komponenten des Trans-Golgi-Netzwerkes (TGN), SNAREs sowie SNARE-assoziierte Proteine, der



Exozyst-Komplex, durch Rab-GTPasen regulierte Recycling-Endosomen und Clathrin-abhängige Endozytose-Prozesse beteiligt (MONTAGNAC *et al.*, 2008; PREKERIS und GOULD, 2008).

Eine zentrale Rolle beim Vesikeltransport in der Zytokinese scheint die Rab-GTPase Rab11 einzunehmen. Rab11 lokalisiert an intrazellulären Vesikeln des TGN und des Recycling-Endosoms. Darüber ist Rab11 unter anderem am Transport bzw. Recycling von GLUT4 (Glukose-Transporter), dem Transferrin-Rezeptor und E-Cadherin beteiligt (URBE *et al.*, 1993; ULLRICH *et al.*, 1996; GREEN *et al.*, 1997; KESSLER *et al.*, 2000; LOCK und STOW, 2005). Eine Reihe von Studien belegt eine Rolle von Rab11 in der Zytokinese tierischer Zellen. In *C. elegans*-Embryonen führt die Verringerung der Rab11-Expression zur Rückbildung der Teilungsfurche (SKOP *et al.*, 2001) und bei der Zellularisierung von *D. melanogaster*-Embryonen werden Rab11-Vesikel für die Vergrößerung der Teilungsfurche benötigt (PELLISSIER *et al.*, 2003; RIGGS *et al.*, 2003). Außerdem konnte eine wichtige Rolle für Rab11 in der meiotischen Zytokinese in *D. melanogaster* gezeigt werden (GIANSANTI *et al.*, 2007). In Säugetierzellen vermittelt Rab11 den Transport von Recycling-Endosomen zur Teilungsfurche (FIELDING *et al.*, 2005; WILSON *et al.*, 2005). Aktives Rab11 interagiert mit sogenannten FIPs (*Rab11-family-interacting proteins*), die durch eine C-terminale Rab11-Bindedomäne gekennzeichnet sind (PREKERIS *et al.*, 2000; PREKERIS *et al.*, 2001). FIP3 und FIP4 sind die Homologen des Proteins Nuf (*nuclear fallout*) aus *D. melanogaster*, das ebenso wie Rab11 essentiell für die Zellularisierung von *D. melanogaster*-Embryonen ist. FIP3 und FIP4 vermitteln vermutlich einen Teil der Rab11-Funktionen in der Zytokinese von Säugerzellen (PREKERIS und GOULD, 2008). Dabei sind FIP3 und FIP4 in der Lage neben Rab11 zwei GTPasen der Arf-Familie (ADP-Ribosylierungs-Faktor) zu binden. Am Zentralkörper interagieren Komplexe aus Rab11 und FIP3 bzw. FIP4 mit Arf5 oder Arf6 (HICKSON *et al.*, 2003; FIELDING *et al.*, 2005; WILSON *et al.*, 2005). Während die genaue Funktion von Arf5 unbekannt ist, ist Arf6 verantwortlich für die Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts an der PM. Ob Arf6 diese Rolle auch während der Zytokinese ausübt, ist ebenso ungeklärt wie die Funktion der Interaktion von Rab11 mit Arf5 und Arf6 in der Zytokinese (D'SOUZA-SCHOREY und CHAVRIER, 2006). Da Arf6 mit Rab11-FIP3-positiven Recycling-Endosomen assoziiert vorliegt, bevor diese den Zentralkörper erreichen, scheint Arf6 nicht für die Lokalisation von Rab11 benötigt zu werden (SCHONTEICH *et al.*, 2007). Interessanterweise interagieren sowohl Rab11 (mit Sec15) als auch Arf6 (mit Sec10) mit Komponenten des Exozyst, so dass davon auszugehen ist, dass Rab11-Vesikel über den Exocyst-Komplex am Zentralkörper verankert werden (PRIGENT *et al.*, 2003; WU *et al.*,

2005). Untersuchungen in *Schizosaccharomyces pombe* und *D. melanogaster* legen eine Funktion des Exozyst-Komplexes während der Zytokinese, vermutlich bei der Lokalisierung von sekretorischen Vesikeln des Golgi-Apparates, nahe (WANG *et al.*, 2002; ECHARD *et al.*, 2004). In Säugerzellen ist Centriolin an der Rekrutierung des Exozyst-Komplexes zum Zentralkörper beteiligt. Weiterhin scheint die Lokalisation der SNARE-Proteine Endobrevin/VAMP8 (v-SNARE) und Syntaxin-2 (t-SNARE), sowie die Lokalisation des SNARE-assoziierten Proteins Snapin ebenfalls abhängig von Centriolin. Das Fehlen von Centriolin am Zentralkörper geht mit der Fehllokalisierung des Exozyst-Komplexes, der beschriebenen SNARE-Proteine und von Snapin einher. Dies führt schließlich zur Akkumulation von sekretorischen Vesikeln am Zentralkörper aufgrund der nicht stattfindenden Vesikelfusionsprozesse (GROMLEY *et al.*, 2005).

Trotz der Vielzahl an identifizierten Komponenten, die am Vesikeltransport während der Zytokinese beteiligt sind, ist besonders die Regulation dieser Prozesse und das Zusammenspiel mit der Aktomyosin-basierten Zelleinschnürung weitgehend unbekannt.

## 1.6 Zielstellung

Zu Beginn dieser Arbeit war bekannt, dass p0071 zum einen während der Mitose an den Spindelpolen und am Zentralkörper lokalisierte und zum anderen nach Überexpression die Entstehung mehrkerniger Zellen induzierte. Aufgrund dieser beiden Befunde wurde eine Funktion von p0071 während der Mitose bzw. Zytokinese postuliert. Die Zytokinese, die für die Trennung der Tochterzellen verantwortlich ist, hängt im wesentlichen von der unter Kontrolle der GTPase RhoA stehenden Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts zur Einschnürung der sich teilenden Zelle sowie dem Transport und der anschließenden Fusion von Membranvesikeln zur Abschnürung der Tochterzellen ab. Die möglichen Funktionen von p0071 bei diesen Teilprozessen sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit charakterisiert werden.

Das als putativer Interaktionspartner für p0071 mittels Hefe-Dihybrid-Analyse identifizierte Rho-GEF ECT2 legte zusammen mit Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts, die durch die Überexpression von p0071 induziert wurden, eine potentielle Funktion von p0071 bei der Regulation der RhoA-Aktivität über ECT2 während der Zytokinese nahe.

Zusammen mit Rab11 und Snapin, die ebenfalls als Interaktionspartner für p0071 identifiziert wurden, könnte p0071 in Vesikeltransport- und/oder Vesikelfusionsprozesse involviert sein.

Obwohl bei der Aufklärung beider Teilprozesse in den letzten Jahren große Fortschritte zu verzeichnen waren, blieb die Vernetzung beider Vorgänge weitgehend ungeklärt. Aufgrund der möglichen Interaktionen von p0071 mit ECT2, Rab11 und Snapin ist eine Beteiligung von p0071 an der Koordination von Einschnürung und Abschnürung denkbar.

Da die räumliche und zeitliche Koordination der Teilprozesse den fehlerfreien Ablauf der Zytokinese sichert, sollte ebenfalls untersucht werden, wie die Regulation möglicher Funktionen von p0071 während der Zytokinese erfolgen könnte. In diesem Zusammenhang könnte das Mikrotubuli-assoziierte Motorprotein der Kinesin-2-Familie KIF3b eine wichtige Rolle bei der Lokalisation von p0071 spielen.

## 2 Material und Methoden

Die verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, von den Firmen Sigma-Aldrich (München) und Karl Roth (Karlsruhe) bezogen. Zellkulturmedien und Zusätze wurden von der Firma PAA (Cölbe) bezogen.

### 2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.1.1 Isolation von RNA aus humanen Zelllinien

Die Isolation von RNA aus humanen Zelllinien erfolgte mittels Guanidiniumthiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion (CHOMCZYNSKI und SACCHI, 1987). Die in Zellkulturschalen kultivierten Zellen ( $1 \times 10^6$  Zellen) wurden hierfür zweimal mit PBS gewaschen, anschließend in 500  $\mu$ l GTC-Reagenz lysiert und das Lysat in flüssigem Stickstoff zur effizienteren Lyse eingefroren. Das gefrorene Lysat wurde in einem Wasserbad bei RT (Raumtemperatur) wieder aufgetaut und anschließend für 10 Minuten bei 13.000x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in einem neuen Reaktionsgefäß mit 1/5 Volumen Chloroform versetzt, durch mehrmaliges Invertieren gut gemischt, für 3 Minuten bei RT inkubiert und für 15 Minuten bei 13.000x g und 4°C zentrifugiert. Die Fällung der in der oberen wässrigen Phase enthaltenen RNA erfolgte im Anschluss durch Zugabe von einem Volumen Isopropanol und durch Zentrifugation der Lösung für 10 Minuten bei 13.000x g und RT. Nach dem Waschen der präzipitierten RNA mit 500  $\mu$ l 80%-igem Ethanol und dem Trocknen der RNA wurde diese durch Zugabe von 15  $\mu$ l RNase/DNase-freiem Wasser (Invitrogen, Karlsruhe) gelöst. Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte photospektrometrisch bei 260 nm am Genequant 1300 (GE Healthcare, München). Bei einer optischen Dichte von 1 ( $OD_{260nm} = 1$ ) und einer Schichtdicke der Quarzküvette von 10 mm entspricht die RNA-Konzentration 40  $\mu$ g/ml. Zur Qualitätskontrolle der isolierten RNA wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt (Abs. 2.1.5). Nicht degradierte RNA zeigt nach der Auftrennung im Agarose-Gel zwei Banden in Verhältnis von 2:1. Diese werden durch die 28S- und die 18S-rRNA gebildet. Die isolierte RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

#### 2.1.2 Reverse Transkription

Mit dieser Methode wird die zuvor isolierte RNA in cDNA umgeschrieben. Die hier verwendeten kurzen DNA-Hexanukleotide jeder möglichen Sequenz (so genannte *Random-*

*Primer*; Roche, Mannheim) hybridisieren mit der RNA, welche in einem zweiten Reaktionsschritt durch die Reverse Transkriptase (Superscript<sup>TM</sup>-II; Invitrogen), mittels dNTPs (Desoxynukleotidtriphosphate; Fermentas, St. Leon-Rot) entlang der Matrize in 5'→3'-Richtung zu einer cDNA verlängert werden.

Reaktionsansatz:	RNA (1 µg/µl)	2 µl
	<i>Random-Primer</i> (100 µM)	1 µl
	RNase/DNase-freies Wasser	9 µl

Dieser Ansatz wurde zur Denaturierung von RNA-Sekundärstrukturen für 10 Minuten bei 70°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine 5-minütige Abkühlung der Ansätze auf Eis, wobei die *Random-Primer* mit der RNA hybridisierten. Im Anschluss wurden 4 µl 5x Reaktionspuffer; 2 µl DTT (100 mM); 2 µl dNTP-Mix (je 2,5 mM) und 1 µl Superscript<sup>TM</sup>-II (200 U/µl) zugesetzt (alle Invitrogen). Der Ansatz wurde durch kurzes Zentrifugieren gemischt und im Thermocycler T3 (Biometra, Göttingen) für 10 Minuten bei 20°C, 60 Minuten bei 42°C und 5 Minuten bei 90°C inkubiert. Die synthetisierte cDNA wurde abschließend mit 80 µl RNase/ DNase-freiem Wasser versetzt, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

### 2.1.3 Polymerase-Kettenreaktion

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist es möglich, von einer DNA-Matrize (so genanntes Template) eine große Zahl identischer Kopien anzufertigen. Auf diese Weise ist es möglich, die Expressionsprodukte verschiedener Gene zu klonieren und anschließend zu untersuchen. Zur Klonierung eines bestimmten Expressionsproduktes mittels PCR benötigt man ausschließlich eine kurze Sequenz am Anfang und am Ende des zu amplifizierenden Produktes zur Synthese von spezifischen Oligonukleotid-Primern (Tab. 7-1). Prinzipiell enthält jeder PCR-Ansatz das Template, die vier dNTPs, die beiden Primer und eine hitzestabile DNA-Polymerase. Ein zyklisch ablaufendes Temperatur-Programm zur Template-Denaturierung (96°C für 30 Sekunden), Primer-Anlagerung (50°C bis 65°C für 30 Sekunden) und DNA-Synthese (68°C oder 72°C; 60 Sekunden je 1 kb Fragmentlänge) führt zur exponentiellen Vermehrung der entsprechenden DNA-Fragmente.

In dieser Arbeit kam für die Klonierung verschiedener Genprodukte aus cDNA der High Fidelity-PCR-Enzym-Mix (Fermentas) nach Protokoll des Herstellers zum Einsatz. Der Ansatz wurde durch kurzes Zentrifugieren gemischt und die PCR im Thermocycler T3 mit entsprechendem Programm durchgeführt.

### 2.1.4 Ortsgerichtete Mutagenese

Mit Hilfe einer ortsgerichteten Mutagenese ist es möglich, die Sequenz der über eine PCR amplifizierten DNA zu verändern. Dabei kommen Primer zum Einsatz, die nicht zu 100% identisch mit der Template-Sequenz sind. In der vorliegenden Arbeit wurden cDNA-Sequenzen, die bereits in Vektoren kloniert waren, durch die ortsgerichtete Mutagenese verändert. Die dafür verwendeten Primer (Tab. 7-2) wurden so konstruiert, dass in der entsprechenden PCR zirkuläre doppelsträngige DNA-Moleküle mit je zwei Einzelstrangbrüchen und der gewünschten Mutation entstehen. Diese DNA-Moleküle sind im Gegensatz zu den aus dem *E. coli*-Stamm JM109 isolierten (Abs. 2.1.12) Template-Plasmiden nicht methyliert. Die nach der PCR durchgeführte Behandlung mit der Restriktionsendonuklease Dpn I führte deshalb nur zur Degradation der Template-Plasmide. Die neu entstandenen DNA-Moleküle wurden anschließend transformiert (Abs. 2.1.11) und durch Sequenzierung analysiert (Abs. 2.1.13). Auf diese Weise wurden Plasmide zur Expression dominant aktiver (DA) und dominant negativer (DN) Mutanten der GTPasen RhoA und Rab11 hergestellt.

### 2.1.5 Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Agarose ist ein lineares Polysaccharid (...D-Galaktose/3,6-anhydro-L-Galaktose...), das durch Erhitzen in Pufferlösung nach dem Abkühlen eine homogene Gelmatrix bildet. Im elektrischen Feld wandern die durch ihre Phosphatgruppen negativ geladenen Nukleinsäuren zur Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit und die Auftrennung von RNA- bzw. DNA-Fragmenten hängen in erster Linie von deren Größe und Konformation der Fragmente, der Konzentration der Agarose und der elektrischen Spannung ab. Die Auftrennung der Nukleinsäuren nach Molekulargewicht erfolgte in 0,75%-igen bis 2,5%-igen Agarose-Gelen. Die entsprechende Menge Agarose wurde dazu in TBE-Puffer gelöst und mit 0,3 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Ethidiumbromid ist ein Fluoreszenzfarbstoff der in Nukleinsäuren interkaliert, wodurch sich dessen Fluoreszenzemission unter UV-Licht vervielfacht. Die DNA-Proben wurden mit 6x DNA-Ladepuffer sowie RNase/DNase-freiem Wasser gemischt und das Gel damit beladen. Im Fall von RNA wurde jeweils 1 µg in 18 µl RNase/DNase-freiem Wasser mit 2 µl 10x RNA-Ladepuffer versetzt. Zur Denaturierung der Sekundärstrukturen der RNA wurde der Ansatz für 5 Minuten bei 65°C erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt. Die so behandelten Proben wurden auf ein 1%-iges Agarose-Gel aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde in horizontalen Elektrophoresekammern in TBE-Puffer bei 75 V für 30 Minuten bis 90 Minuten durchgeführt.

### 2.1.6 Aufreinigung von Nukleinsäuren

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe des *PCR Purification Kit* oder des *Gel Extraction Kit* (beide Genomed, Löhne). Dabei kommen Silika-Gel-Säulen zum Einsatz, an die freie Nukleinsäuren bei niedrigem pH-Wert durch ein im Puffer enthaltenes chaotropes Salz binden, während Verunreinigungen die Säule passieren.

Für die Aufreinigung von DNA-Fragmenten mittels Gelextraktion wurde die entsprechende Probe mit DNA-Ladepuffer versetzt und auf ein entsprechendes Agarose-Gel aufgetragen. Nach der Gelelektrophorese konnten unter schwachem UV-Licht die Banden entsprechender Größe mit Hilfe eines Skalpellens ausgeschnitten werden. Je 100 mg Gel wurden mit 300 µl Puffer H1 versetzt und für 10 Minuten bei 50°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Aufreinigung über die Silika-Gel-Säulen nach dem Protokoll des Herstellers. Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten über das *PCR Purification Kit* wurde analog durchgeführt. Abweichend wurden die entsprechenden Proben ohne vorherige Gelelektrophorese mit 5 Volumen Puffer P1 versetzt und die Silika-Gel-Säule mit dieser Lösung beladen.

### 2.1.7 Klonierung von PCR-Fragmenten mittels TA-System

Große PCR-Produkte wurden mit Hilfe des Topo-TA-Systems (Invitrogen) kloniert. Hierbei nutzt man die Terminale-Transferase-Aktivität der Taq-Polymerase, die wie einige andere hitzestabile Polymerasen ohne 3'→5'-Exonuklease-Aktivität den amplifizierten Fragmenten am 3'-Ende einen Adenosinnukleotid-Überhang anfügt. Diese PCR-Fragmente können in den linearisierten, über 3'-Thymidinnukleotid-Überhänge verfügenden Topo-TA-Vektor effizient ligiert werden. Die Klonierungsreaktion erfolgte für 30 Minuten bei RT nach dem Protokoll des Herstellers. Anschließend wurde der Ansatz in den *E. coli*-Stamm JM109 transformiert (Abs. 2.1.11).

### 2.1.8 Behandlung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme, die DNA sequenzspezifisch hydrolysieren können. Nach ihren Eigenschaften werden die Restriktionsendonukleasen in drei Typen unterteilt, wobei in der Molekularbiologie hauptsächlich Restriktionsendonukleasen vom Typ II zum Einsatz kommen. Diese binden DNA sequenzspezifisch und hydrolysieren diese direkt an der meist palindromischen Erkennungssequenz von vier, sechs oder acht Basenpaaren. Die Hydrolyse der Phosphodiesterbindung kann entweder symmetrisch oder asymmetrisch erfolgen, wodurch im ersten Fall doppelsträngige Enden (glatte Enden)

und im zweiten Fall einzelsträngige Enden (klebrige Enden) entstehen. Restriktionsendonukleasen wurden in der vorliegenden Arbeit für die Klonierung von DNA-Fragmenten und die Identifizierung von Plasmiden verwendet.

Zur Klonierung von DNA-Fragmenten wurde das entsprechende PCR-Produkt oder der Ursprungsvektor mit den gleichen Restriktionsendonukleasen behandelt wie der Zielvektor bzw. mit Restriktionsendonukleasen, die identische Überhänge erzeugen. Die verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden inklusive der benötigten Puffer von Fermentas bezogen.

Präparativer Ansatz:	DNA (1 µg/µl)	10 µl
	10x Puffer	5 µl
	RNase/DNase-freies Wasser	33 µl
	Restriktionsendonuklease (10 U/µl)	2 µl
Analytischer Ansatz:	Plasmid-DNA	1 µl
	10x Puffer	1,5 µl
	Restriktionsenzyme (10 U/µl)	je 0,25 µl
	RNase/DNase-freies Wasser	13 µl

Die Ansätze wurden für 3 Stunden bei 37°C im T3-Thermocycler inkubiert. Im Anschluss wurde die DNA gelelektrophoretisch aufgetrennt und im Fall des präparativen Ansatzes mittels *Gel Extraction Kit* aufgereinigt (Abs. 2.1.5 und Abs. 2.1.6)

### 2.1.9 Ligation

DNA-Ligasen katalysieren unter Verwendung von ATP die Ausbildung einer Phosphodiesterbindung zwischen der 3'-Hydroxylgruppe eines DNA-Fragments und der 5'-Phosphatgruppe des anderen DNA-Fragments. Mit Hilfe der in der vorliegenden Arbeit verwendeten T4-Ligase (Fermentas) können DNA-Fragmente, die durch Hydrolyse mit Restriktionsendonukleasen entstanden sind, kovalent verknüpft werden. Das Mengenverhältnis zwischen eingesetztem Zielplasmid und zu klonierendem Fragment sollte zwischen 1:1 und 1:5 liegen. Um diese Mengenverhältnisse abschätzen zu können, wurde vor der Ligation eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt (Abs. 2.1.5).

Ligationsansatz:	PCR-Fragment	x µl
	Zielvektor	y µl
	10x Ligasepuffer	1 µl
	T4-DNA-Ligase (1 U/µl)	0,5 µl
	RNase/DNase-freies Wasser	add 10 µl



Die Ligation erfolgte für 2 Stunden bei RT. Anschließend wurde der Ansatz für die Transformation des *E. coli*-Stammes JM109 verwendet (Abs. 2.1.11)

### **2.1.10 Herstellung Transformations-kompetenter Bakterien**

Zur Herstellung kompetenter *E. coli* der Stämme JM109 und BL21 DE3 (beide Stratagene, La Jolla; USA) wurde jeweils eine Kolonie über Nacht bei 37°C in 10 ml LB-Medium unter Schütteln inkubiert. Die von dieser Vorkultur am nächsten Morgen angeimpfte Hauptkultur (100 ml LB-Medium) wurde bei 37°C unter Schütteln bis zu einer  $OD_{600nm} = 0,3$  inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde für 10 Minuten bei 3.000x g und 4°C zentrifugiert, das Pellet in 30 ml TFB-I resuspendiert und die Lösung für 8 Minuten auf Eis inkubiert. Das nach einer erneuten 10-minütigen Zentrifugation bei 3.000x g und 4°C erhaltene Bakterienpellet wurde vorsichtig durch Schwenken in einem Eis-Wasserbad in 4 ml TFB-II resuspendiert. Die Bakterien wurden in auf -80°C vorgekühlte 1,5 ml Reaktionsgefäße (jeweils 100 µl) verteilt und bei -80°C gelagert.

### **2.1.11 Transformation von Plasmid DNA**

Zur Transformation von Plasmid-DNA wurde ein Aliquot kompetenter *E. coli* (100 µl) auf Eis aufgetaut, mit 10 µl Ligationsansatz bzw. 50 ng Plasmid-DNA in 10 µl RNase/DNase-freiem Wasser versetzt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien einem Hitzeschock bei 42°C für 90 Sekunden unterzogen und danach für weitere 2 Minuten auf Eis inkubiert. Die transformierten Bakterien wurden mit 900 µl LB-Medium versetzt, 60 Minuten bei 37°C unter Schütteln inkubiert und auf LB-Agar-Platten mit entsprechendem Selektionsantibiotika (100 µg/ml Ampicillin oder 50 µg/ml Kanamycin) ausplattiert. Die LB-Agar-Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

### **2.1.12 Präparation von Plasmid-DNA**

Zur Analyse der auf Selektions-LB-Agar-Platten gewachsenen Kolonien wurden von diesen Übernachtskulturen in 5 ml LB-Medium mit entsprechendem Selektionsantibiotikum angeimpft. Je 1,5 ml der Übernachtskulturen wurden für 1 Minute bei 13.000x g und RT zentrifugiert und die Pellets in 100 µl GET-Puffer resuspendiert. Durch Zugabe von 200 µl 0,2 M NaOH mit 1% SDS, mehrmaligem Invertieren des Reaktionsgefäßes und anschließender 5-minütiger Inkubation erfolgt die Lyse der Bakterien. Zur Präzipitation der genomischen DNA, sowie gelöster Proteine wurden 150 µl 3 M Natriumacetat (pH 4,8) hinzugefügt. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 13.000x g und RT wurde der Überstand in

ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die gelöste Plasmid-DNA durch Zugabe von 2 Volumen Isopropanol für 30 Minuten bei RT gefällt. Das nach 15-minütiger Zentrifugation bei 13.000 x g und RT erhaltene Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen und erneut für 5 Minuten zentrifugiert. Nach dem Trocknen des Pellets wurde dieses in 50 µl 10 mM Tris/HCl (pH 8,0) gelöst, mit 50 ng RNase A versetzt und bei 37°C für 30 Minuten inkubiert.

Sollten Plasmide zur Transfektion humaner Zelllinien präpariert werden, erfolgte dies mit Hilfe der Jetstar Plasmid-Aufreinigungssysteme (Genomed). Je nach Menge der benötigten DNA kamen das Miniprep-, das Midiprep- oder das Maxiprep-Kit zum Einsatz. Bei diesen Systemen wird über alkalische Lyse isolierte Plasmid-DNA über Silika-Gel-Säulen weiter aufgereinigt.

Die Analyse der präparierten Plasmide erfolgte mittels Restriktionsendonukleasen (Abs. 2.1.8) und anschließender Sequenzierung (Abs. 2.1.13). Die Plasmid-Konzentration wurde photospektrometrisch bei 260 nm bestimmt. Bei einer  $OD_{260nm} = 1$  und einer Schichtdicke der Quarzküvette von 10 mm entspricht die DNA-Konzentration 50 µg/ml.

### **2.1.13 Sequenzierung**

2 µg Plasmid-DNA wurde eingetrocknet und zur Sequenzierung an die Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) geschickt.

## **2.2 Zellbiologische Methoden**

### **2.2.1 Kultivierung der verwendeten Zelllinien**

In dieser Arbeit wurden die Zelllinien HEK293, HeLa und MCF-7 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellen, Braunschweig) verwendet. Die Zellen wurden in DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) versetzt mit 10% FBS (*fetal bovine serum*) und 1 mM Natriumpyruvat bei 37°C, 20% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Alle 2 bis 3 Tage wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde das Kulturmedium verworfen, die Zellen mit PBSE (*phosphate buffered saline + EDTA*) gewaschen und durch Zugabe von 0,05% Trypsin/PBSE abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden im Kulturmedium aufgenommen und für 5 Minuten bei 1.000x g zentrifugiert, anschließend in Kulturmedium resuspendiert und auf mehrere Zellkulturschalen verteilt.

### 2.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die Lagerung der Zellen erfolgte im flüssigen Stickstoff bei  $-196^{\circ}\text{C}$ . Die Zellen wurden in Kulturmedium bei  $37^{\circ}\text{C}$  aufgetaut und für 5 Minuten bei  $1.000\times g$  zentrifugiert. Das Zellpellet wurde im vorgewärmten Kulturmedium resuspendiert und in Zellkulturschalen überführt.

Zum Einfrieren der Zellen wurden diese, wie im Abs. 2.2.1 beschrieben, abgelöst und zentrifugiert. Das Zellpellets wurde in auf Eis gekühltem Einfriermedium (DMEM versetzt mit 10% DMSO und 20% FBS) aufgenommen und in Einfrier-Röhrchen überführt. Das Einfrieren erfolgte bei  $-80^{\circ}\text{C}$  über Nacht in einem mit Isopropanol gefüllten Einfrierbehälter (Kühlungsrate von  $-1^{\circ}\text{C}/\text{Minute}$ ). Anschließend wurden die Zellen im flüssigen Stickstoff gelagert.

### 2.2.3 Transfektion humaner Zellen

Transfektion ist ein Prozess, in dem exogene Nukleinsäuren in eine eukaryotische Zelle durch biochemische oder physikalische Methoden eingebracht werden. In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Methoden verwendet: die Transfektion mittels Lipofektion und die Kalziumphosphat-Kopräzipitation.

#### 2.2.3.1 *Transfektion mittels Lipofektion*

Transfektionsreagenzien zur Lipofektion von eukaryotischen Zellen bestehen im Prinzip aus einer Mischung eines polykationischen Lipids und eines Phospholipids. Diese Lipide bilden kationische Liposomen aus, die spontan mit den negativ geladenen Nukleinsäuren akkumulieren. Die entstandenen unilamellaren Vesikel fusionieren mit der PM und gelangen durch Endozytose in die Zellen (FELGNER *et al.*, 1987; FELGNER und RINGOLD, 1989). In der vorliegenden Arbeit kam für die Transfektion von Plasmid-DNA und siRNAs *Lipofectamine2000* (Invitrogen) zum Einsatz. Die Transfektion der aufgeführten Vektoren (Tab. 7-4, 7-7) bzw. siRNAs (Tab. 7-3) erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.

#### 2.2.3.2 *Transfektion durch Kalziumphosphat-Kopräzipitation*

In einer Kalziumchlorid und Natriumphosphat enthaltenden Lösung kopräzipitiert die zu transfizierende DNA mit dem entstehenden Kalziumphosphat. Die Präzipitate werden von den Zellen durch Endozytose aufgenommen. Zur Erhöhung der Transfektionseffizienz werden

die Zellen 6 Stunden nach Zugabe der Präzipitate mit Glycerin-Puffer behandelt (GRAHAM und VAN DER EB, 1973; PARKER und STARK, 1979).

Die zu transfizierenden Zellen wurden mit einer Zelldichte eingesät, so dass sie ca. 20 Stunden später eine Konfluenz von ca. 70% erreichten. Eine Stunde vor der Transfektion wurde das Kulturmedium gewechselt. Mit Hilfe der Kalziumphosphat-Kopräzipitation wurde ausschließlich Plasmid-DNA (Tab. 7-7) nach folgendem Protokoll transfiziert.

Transfektionsansatz 20 cm <sup>2</sup> -Schale: Plasmid-DNA (0,5 µg/µl)	42,5 µl
2 M CaCl <sub>2</sub>	37,5 µl
RNase/DNase freies Wasser	220 µl

Die DNA-Lösung wurde tropfenweise in 300 µl DNA-Präzipitationspuffer gegeben, der währenddessen ständig durchmischt wurde. Nach 10-minütiger Inkubation wurde der Transfektionsansatz den Zellen in 2,4 ml Kulturmedium zugegeben und diese 6 Stunden bei 37°C, 20% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem Glycerin-Puffer behandelt. Dazu wurde das Transfektionsmedium entfernt, die Zellen mit FBS-freiem Medium gewaschen, mit 1 ml Glycerin-Puffer versetzt und 3 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift mit FBS-freiem Medium wurden die Zellen in Kulturmedium inkubiert.

#### 2.2.4 Synchronisation humaner Zellen mittels Doppel-Thymidinblock

Das für die Synchronisation von Zellen eingesetzte Desoxythymidin (Thymidin) reguliert allosterisch die Ribonukleotid-Reduktase. Der Überschuss an Thymidin bewirkt die Hemmung der dCTP-Synthese. Der daraus resultierende Mangel an dCTP bringt schließlich die DNA-Synthese zum Erliegen, wodurch Thymidin behandelte Zellen am Ende der G<sub>1</sub>-Phase bzw. am Beginn der Synthesephase arretiert werden.

HEK293-Zellen wurden 24 Stunden nach der Transfektion in einer Dichte von  $0,4 \times 10^5$  Zellen pro cm<sup>2</sup> ausgesät und mit 5 mM Thymidin enthaltendem Kulturmedium für 16 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit FBS-freiem Medium gewaschen, 12 Stunden im Kulturmedium inkubiert und danach erneut für 12 Stunden mit 5 mM Thymidin behandelt. Nach dreimaligem Waschen mit FBS-freiem Medium wurden die synchronisierten Zellen für 12 Stunden in Kulturmedium gehalten und anschließend immunzytologisch (Abs. 2.2.6) analysiert.

### 2.2.5 Synchronisation humaner Zellen mittels Thymidin und Nocodazol

HEK293- bzw. HeLa-Zellen wurden ohne vorherige Transfektion oder 24 Stunden nach der Transfektion in einer Zelldichte von  $0,5 \times 10^5$  bzw.  $0,25 \times 10^5$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  in Kulturmedium mit 5 mM Thymidin ausgesät. Nach 20-stündiger Inkubation wurden die Zellen dreimal mit FBS-freiem Medium gewaschen, 4 Stunden im Kulturmedium inkubiert und anschließend 8 Stunden mit 30 ng/ml Nocodazol behandelt. Die Mikrotubuli-depolymerisierende Wirkung des Nocodazol verhindert die Ausbildung der Teilungsspindel, wodurch die Zellen in der Prometaphase arretiert werden. Nach dreimaligem Waschen mit FBS-freiem Medium wurden die Zellen bis zum erforderlichen Mitosestadium in Kulturmedium inkubiert.

### 2.2.6 Immunzytologie

Mit Hilfe der Immunzytologie können Proteine in fixierten Zellen sichtbar gemacht werden. Dafür werden Antikörper (Ak) eingesetzt, die an das zu untersuchende Protein in der Zelle binden. In einem zweiten Schritt werden die verwendeten Primär-Ak mit Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Sekundär-Ak markiert. Die angefertigten Präparate wurden an einem Nikon Eclipse E600 Mikroskop aufgenommen, das mit einer Vosskühler CCD-1300-QLN-Kamera und der Software NIS-Elements AR 2.30 MuTech MV1500 (Nikon, Düsseldorf) ausgestattet war. Die Bearbeitung und Auswertung der Bilder erfolgte mit der Software ImageJ Version 1.42. Zur Anfertigung der immunzytologischen Präparate wurden die Zellen auf Poly-L-Lysin beschichteten DG (Deckgläschen) ausgesät, eventuell transfizierte und/oder synchronisiert und anschließend auf unterschiedliche Weise fixiert.

#### *Formaldehyd-Fixierung*

Die auf den DG befindlichen Zellen wurden mit PBS gewaschen und für 10 Minuten in 4% FA (Formaldehyd) bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Permeabilisierung in 0,5% Triton X-100/PBS für 15 Minuten bei RT.

#### *Methanol-Fixierung*

Die in PBS gewaschenen DG wurden für 10 Minuten in Methanol bei  $-20^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach der 15-minütigen Trocknung erfolgte eine 10-minütige Permeabilisierung in Mikrotubuli-stabilisierendem Puffer bei RT.

#### *Methanol/Aceton-Behandlung*

Die in PBS gewaschenen DG wurden für 10 Minuten in Methanol bei  $-20^\circ\text{C}$  und anschließend für 2 Minuten in Aceton bei  $-20^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach 45-minütiger Trocknung bei RT konnten die DG weiterverarbeitet werden.

### *Trichloressigsäure-Fixierung*

Nach dem Waschen der DG in eiskaltem PBS erfolgte die Fixierung in eiskalter 10%-iger TCA-Lösung (Trichloressigsäure) für 15 Minuten. Die DG wurden im Anschluss mit PBS gewaschen und in 0,5% Triton X-100/PBS für 5 Minuten bei RT permeabilisiert.

Nach der Fixierung und Permeabilisierung wurden die Zellen auf den DG für mindestens 30 Minuten zum Verhindern unspezifischer Ak-Bindungen in 1% Milchpulver/PBS (Sucofin, Zeven) bei RT inkubiert. Die Inkubation mit den Primär-Ak (Tab. 7-12) erfolgte ebenfalls in 1% Milchpulver/PBS bei 4°C über Nacht. Nach dreimaligem Waschen mit PBS für 5 Minuten und 10-minütiger Inkubation in 1% Milchpulver/PBS wurden die Zellen mit den in 1% Milchpulver/PBS verdünnten Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Sekundär-Ak (Tab. 7-13) für eine Stunden bei RT inkubiert. Außerdem konnten die Zellen in diesem Schritt zur Markierung der DNA bzw. von filamentösem Aktin mit DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol; 2,5 µg/ml) bzw. Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Phalloidinen (Alexa Fluor 488 und Alexa Fluor 594; 0,5 U/ml; DAPI und die Phalloidine wurden von Invitrogen bezogen) inkubiert werden. Anschließend wurden die Zellen dreimal in PBS, einmal in Wasser und abschließend einmal in 96% Ethanol gewaschen. Nach 15-minütiger Trocknung erfolgte das Einbetten der Präparate in Mowiol.

### **2.2.7 Bimolekulare-Fluoreszenz-Komplementation**

BiFC (Bimolekulare-Fluoreszenz-Komplementation) ist eine Methode zur Visualisierung der Interaktion von Proteinen in der Zelle. Dabei werden die Fluoreszenzproteine (BFP, CFP, GFP, YFP; *blue-, cyan-, green-, yellow-fluorescent-protein*) in zwei nicht-fluoreszierende Fragmente geteilt, die mit jeweils einem der zu untersuchenden Proteine fusioniert werden. Interagieren beide Proteine, können beide nicht-fluoreszierende Fragmente so in räumliche Nähe gebracht werden, dass das funktionelle Fluoreszenzprotein rekonstituiert werden kann. Über diese Fluoreszenz kann der Ort der Interaktion in der Zelle identifiziert werden. Außerdem kann BiFC über die Intensität der rekonstituierten Fluoreszenz dazu verwendet werden, um die Interaktion von Proteinen zu quantifizieren.

Für die BiFC-Analysen in dieser Arbeit wurden die zu untersuchenden Proteine mit jeweils einer nichtfluoreszierenden Hälfte des Venus-Proteins (Variante des YFP; V1-Flag entspricht der N- und V2-HA der C-terminalen Hälfte) fusioniert. Die entsprechenden Plasmide wurden in HEK293-Zellen transfiziert und das BiFC-Signal mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Sollten BiFC-Signale quantifiziert werden, wurde neben den BiFC-Plasmiden ein Plasmid zur Expression von RFP (*red-fluorescent-protein*) kotransfiziert, so

dass mittels Durchflusszytometrie (Abs. 2.2.9) die Intensität des BiFC-Signals von ausschließlich RFP-exprimierenden Zellen bestimmt werden konnte. Auf diese Weise sollten Unterschiede in der Transfektionseffizienz als Ursache für unterschiedliche BiFC-Effizienzen ausgeschlossen werden. Außerdem wurde die Expression der Fusionsproteine mittels Western Blot (WB) analysiert (Abs. 2.3.6).

### **2.2.8 Mikroskopische Beobachtungen lebender Zellen**

Mit dem Live-Cell-Imaging können lebende Zellen am Mikroskop beobachtet und dabei „Zeitraffer-Aufnahmen“ mikroskopischer Vorgänge angefertigt werden. Es können sowohl morphologische Veränderungen der gesamten Zelle als auch die Lokalisation von fluoreszierenden Molekülen und Proteinen beobachtet werden. Für die Live-Cell-Imaging-Analysen wurden die Zellen in spezielle Zellkulturschalen mit dünnem Glasboden eingesät und den Versuchsvorgaben entsprechend behandelt. Die Aufnahme der Bilder erfolgte entweder am Leica TCS-SP2 mit der Leica-Confocal-Software Version 2.61.1537 (Leica Microsystems, Wetzlar) bzw. am Zeiss Axio Observer mit der Software AxioVision Rel. 4.7 (Carl Zeiss, Jena). In beiden Fällen wurden die Zellen während der Aufnahmen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Bearbeitung und Auswertung der Bilder erfolgte mit der Software ImageJ Version 1.42.

### **2.2.9 Durchflusszytometrie**

Bei der Durchflusszytometrie werden die Zellen einer Einzelzellsuspension durch hydrodynamische Fokussierung an einem Laserstrahl vorbeigeleitet. Dabei werden von jeder Zelle gleichzeitig Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht sowie je nach Ausstattung des Durchflusszytometers mehrere vorher festgelegte Fluoreszenzen detektiert.

Das Vorwärtsstreulicht korreliert mit der Zellgröße, das Seitwärtsstreulicht mit der Granularität der Zellen, so dass über diese beiden Parameter unter anderem intakte lebende Zellen von apoptotischen und/oder nekrotischen Zellen unterschieden werden können.

Die durchflusszytometrischen Messungen erfolgten am FACScan mit Hilfe der Software CellQuest<sup>TM</sup> (BD Bioscience, Heidelberg). Das verwendete Durchflusszytometer verfügt über einen Argonlaser, der monochromatisches Licht mit einer Wellenlänge von 488 nm emittiert. Über die Auswahl verschiedener Emissionsfilter war es unter anderem möglich, das vom rekonstituierten Venusprotein und vom RFP emittierte Licht einer Zelle gleichzeitig zu detektieren.

## 2.2.10 Untersuchungen zur Aktivität von RhoA, Rac1, Cdc42 und Rab11

Wie bei allen GTPasen der Ras-Familie führt der Austausch von GDP durch GTP auch bei RhoA und Rab11 zu einer Konformationsänderung, die deren Interaktion mit spezifischen Effektoren ermöglicht (Abs. 1.4). Die Bindedomänen dieser Effektoren werden genutzt, um den Aktivierungsstatus der GTPasen untersuchen zu können. Mit Hilfe der *Raichu*-Biosensoren kann der Einfluss bestimmter Substanzen und/oder Proteine auf die Aktivität der exogenen GTPasen untersucht werden (Abs. 2.2.10.1). Werden die entsprechenden bakteriell exprimierten Bindedomänen an Glutathion-Sepharose immobilisiert und mit Zelllysaten inkubiert, können aus diesen spezifisch aktive GTPasen präzipitiert werden (Abs. 2.2.10.2).

### 2.2.10.1 Untersuchung der Aktivität von Rho-GTPasen mittel *Raichu*-Biosensoren

Die Plasmide der *Raichu*-Biosensoren wurden uns freundlicherweise von Dr. Matsuda (Osaka, Japan) zur Verfügung gestellt. In der vorliegenden Arbeit kamen Biosensoren zur Untersuchung der Aktivität von RhoA, Rac1 und Cdc42 zum Einsatz. Diese Biosensoren bestehen aus einer Rho-GTPase und der GTPase-Bindedomäne ihres Effektors zwischen YFP und CFP. Die Interaktion der aktiven GTPase mit ihrem Effektor bringt YFP und CFP im Biosensor in eine für FRET (Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer) geeignete Entfernung. Die Aktivität der Rho-GTPasen der Biosensoren in einer Zelle lässt sich somit über das emittierte FRET-Signal bestimmen (NAKAMURA *et al.*, 2006). FRET ist ein von Theodor Förster entdeckter physikalischer Prozess, bei dem die Energie eines angeregten Fluoreszenzfarbstoffs (FRET-Donor) strahlungsfrei auf einen zweiten Fluoreszenzfarbstoff (FRET-Akzeptor) übertragen werden kann (FÖRSTER, 1948).

HEK293-Zellen wurden 72 Stunden nach deren Transfektion mit den Biosensoren in 4% FA fixiert und anschließend mittels Mowiol eingebettet. Die FRET-Effizienz der Biosensoren wurde am Leica TCS-SP2 bestimmt. Dabei wurde der FRET-Akzeptor (YFP) durch einen Laserstrahl (514 nm) ausgebleicht. Die Fluoreszenzintensität des FRET-Donors (CFP) wurde vor und nach dem Bleichen des YFP gemessen. Aus dem Anstieg der CFP-Fluoreszenzintensität wurde die FRET-Effizienz mit Hilfe folgender Formel bestimmt:

$$\text{FRET}_{\text{EFF}} = (D_{\text{postbleach}} - D_{\text{prebleach}}) / D_{\text{postbleach}};$$

für alle Bildpunkte mit  $D_{\text{postbleach}} > D_{\text{prebleach}}$  ( $D$  = Fluoreszenzintensität des FRET- Donors)



### 2.2.10.2 Untersuchung der Aktivität von RhoA und Rab11 mittels GST-Pulldown

Zur Aktivitätsbestimmung von RhoA in Zelllysaten kam kommerziell erhältliche Rhotekin-Sepharose (Millipore, Schwalbach) bzw. selbst hergestellte ROK-RBD-Sepharose (RhoA-Bindedomäne) zum Einsatz (Abs. 2.3.10). Der GST-PD (Pulldown) zur Bestimmung der Aktivität von Rab11 in Zelllysaten wurde mit selbst hergestellter mit FIP4-Sepharose (Abs. 2.3.10) durchgeführt. Für die Aktivitätsbestimmungen wurden die Zellen in MLB-Puffer lysiert (Abs. 2.3.1) und 1 - 2 mg dieser Proteinlösungen mit ca. 40 µg der entsprechenden Sepharose für 60 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen der Sepharose wurden die Mengen an gebundenem RhoA bzw. Rab11 mittels SDS-PAGE und WB analysiert (Abs. 2.3.4 und Abs. 2.3.6).

## 2.3 Biochemische Methoden

### 2.3.1 Proteinisolation

Zur Isolation von Proteinen aus Zellen wurden diese zweimal mit eiskaltem TBS (*tris buffered saline*) gewaschen und anschließend im entsprechenden Lysepuffer aufgenommen. Den entsprechenden Lysepuffern wurden vor der Verwendung Protease- (10 µg/ml Aprotinin; 10 µg/ml Leupeptin; 1 mM Pefabloc) und Phosphataseinhibitoren (1 mM NaVO<sub>3</sub>; 10 mM NaF) zugesetzt. Die Proben wurden zum Aufschluss in flüssigem Stickstoff eingefroren und konnten anschließend bei -80°C gelagert werden. Die tiefgefrorenen Lysate wurden in einem Wasserbad bei RT aufgetaut und zum Pelletieren der Zelltrümmer sowie der ungelösten Proteine für 10 Minuten bei 14.000x g und 4°C zentrifugiert. Von den Überständen wurde vor den entsprechenden Untersuchungen die Proteinkonzentration bestimmt (Abs. 2.3.3).

### 2.3.2 Isolation mitotischer Mikrotubuli

Zur Isolation mitotischer Spindeln wurden HeLa-Zellen mit Thymidin und Nocodazol in der Prometaphase synchronisiert (Abs. 2.2.5). 90 Minuten nach dem Entfernen des Synchronisationsmediums wurde dem Kultivierungsmedium Taxol (5 µg/ml) zur Stabilisierung der Mikrotubuli für 3 Minuten zugegeben. Die Zellen wurden anschließend in dem Taxolhaltigen Medium vorsichtig von der Zellkulturschale gelöst, durch Zentrifugation für 5 Minuten bei 300x g pelletiert und einmal in PBS (+ 5 µg/ml Taxol) gewaschen. Das nach erneuter Zentrifugation erhaltene Zellpellet wurde vorsichtig in 1 ml MT-Isolations-Puffer-I resuspendiert. Die Zellyse erfolgte durch eine 15-minütige Inkubation bei 37°C. Während der Inkubation wurde das Lysat aller 2 Minuten vorsichtig durchmischt. Das Lysat wurde

2 Minuten bei 700x g zentrifugiert, das Pellet in 1 ml MT-Isolations-Puffer-I resuspendiert, 5 Minuten bei 37°C inkubiert und erneut zentrifugiert. Nach dem Waschen des Pellets mit 100 µl MT-Isolations-Puffer-II und einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde das Pellet in 300 µl MT-Isolations-Puffer-II resuspendiert und 10 Minuten bei RT inkubiert. Ab diesem Zeitpunkt waren die isolierten Mikrotubuli unter dem Mikroskop sichtbar. Die isolierten Mikrotubuli wurden durch eine 3-minütige Zentrifugation bei 1.500x g gesammelt, in 1x SDS-Ladepuffer aufgenommen und mittels SDS-PAGE und WB analysiert (Abs. 2.3.4 und Abs. 2.3.6).

### **2.3.3 Proteinkonzentrationsbestimmung**

Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte mit dem *MicroBC-Assay* (Interchim, Montlucon, Frankreich). Im alkalischen Milieu reduzieren Proteine  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$  (Biuret-Reaktion). Das BCA (*bicinchoninic acid*) komplexiert mit den gebildeten  $\text{Cu}^+$ -Kationen im Verhältnis 2:1. Dabei entsteht ein purpurner Farbstoff, dessen Absorptionsmaximum bei 562 nm liegt und der einen sensitiven Nachweis von Proteinen ermöglicht.

Als Standard diente eine Verdünnungsreihe von bekannten BSA- (bovines Serum-Albumin) Konzentrationen (5 bis 250 µg/µl). Jeweils 100 µl der BSA-Verdünnungen bzw. der verdünnten Proteinproben wurden mit 100 µl nach Herstellerangaben angefertigter BCA-Lösung versetzt. Nach 30- bis 60-minütiger Inkubation bei 60°C wurde die Absorption der Proben bei 562 nm gemessen und die Proteinkonzentration der Proben über lineare Regression mit Hilfe der Software Microsoft EXCEL bestimmt.

### **2.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Das für die SDS-PAGE (Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) eingesetzte Acrylamid ist ein Monomer, das durch Zugabe freier Radikale über ein Zweikomponenten-Redoxsystem aus Ammoniumpersulfat und Tetramethylethyldiamin in einer Kettenreaktion Polymere ausbildet. Diese Polymere werden in Gegenwart von bifunktionellem N, N'-Methylenbisacrylamid zu einer Gelmatrix (Polyacrylamid) quervernetzt.

Die Gelelektrophorese wurde unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Das dazu verwendete SDS besteht aus einer hydrophoben Kette und einer hydrophilen Sulfatgruppe. Über die Dodecylreste lagern sich die SDS-Moleküle an hydrophobe Aminosäurereste der gefalteten Proteine an und denaturieren diese dadurch. Die meisten Proteine binden etwa 1,4 g SDS pro Gramm Protein, wobei sich die negativ geladenen Sulfatgruppen auf der Oberfläche der entstehenden SDS-Proteinkomplexe befinden. Aufgrund dieser Eigenschaften

des SDS sind die Proteine über ein konstantes Ladung/Masse-Verhältnis vergleichbar und können nun während einer Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt werden.

Für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden 20 bis 80 µg Protein in 24 µl des entsprechenden Lysepuffers aufgenommen und mit 8 µl 4x SDS-Ladepuffer versetzt. Die Proben wurden anschließend bei 95°C für 5 Minuten im Heizblock denaturiert. Neben den zu untersuchenden Proben wurden 5 µl des *prestained* Protein Markers (Fermentas) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 90 V für 120 Minuten in Tris/Glycin-SDS-PAGE-Laufpuffer. Je kleiner die zu untersuchenden Proteine waren, umso mehr Acrylamid enthielt das Trenngel. Die Rezepte zur Herstellung der unterschiedlichen Polyacrylamid-Gele stammen aus dem Standardwerk: *Molecular Cloning, A laboratory manual, Second Edition* (SAMBROOK et al., 1989). Im Anschluss an die SDS-PAGE wurden die Gele entweder mittels Coomassie (Abs. 2.3.5) gefärbt oder die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran übertragen (Abs. 2.3.6).

### 2.3.5 Coomassie-Färbung von Polyacrylamid-Gelen

Coomassie-Brillant-Blau R250 ist ein Triphenylmethan-Farbstoff. Er lagert sich an die basischen Seitenketten der As an und färbt damit unspezifisch Proteine. Zur Analyse von Proteinexpressionen in Bakterien oder zur Analyse von Proteinaufreinigungen wurden die Gele in der Coomassie-Färbelösung aufgeköcht und 10 Minuten in der heißen Lösung inkubiert. Zum Entfernen des nicht an Proteine gebundenen Farbstoffs wurden die Gele mehrmals in Entfärber-Lösung aufgeköcht.

### 2.3.6 Western Blot

Beim WB werden Proteine durch ein senkrecht zum Polyacrylamid-Gel gerichtetes elektrisches Feld auf eine Membran übertragen. An der Membranoberfläche binden die Proteine aufgrund hydrophober Wechselwirkungen, wobei das Muster der gelelektrophoretischen Auftrennung erhalten bleibt und die Proteine für Ak zugänglich sind. In der vorliegenden Arbeit wurden die Proteine aus dem Polyacrylamid-Gel durch das Semi-Dry-Blot-Verfahren auf eine Nitrozellulosemembran (Whatman, Dassel) bei 1 mA/cm<sup>2</sup> für 2 Stunden transferiert (Abb. 2-1). Zur Kontrolle des Proteintransfers erfolgte im Anschluss eine Färbung mit Ponceau-Rot. Nach dem Entfärben der Membran mit TBST (*tris buffered saline* + Tween20) und einer 1-stündigen Inkubation in 5%-Milchpulver/TBST zur Absättigung der freien Proteinbindungsstellen der Nitrozellulosemembran wurden die Primär-Ak (Tab. 7-12) über Nacht bei 4°C in 5%-Milchpulver/TBST inkubiert. Durch mehrmaliges Waschen in TBST wurden unspezifisch gebundene Ak entfernt, bevor die Membran mit dem

entsprechenden HRP-konjugiertem (Meerrettich-Peroxidase) Sekundär-Ak (Tab. 7-13) ebenfalls in 5%-Milchpulver/TBST für 1 Stunde bei RT inkubiert werden konnte. Nach mindestens drei weiteren Waschschrritten in TBST erfolgte die Detektion des mit den eingesetzten Ak markierten Proteins mittels CL (Chemilumineszenz). Dafür wurden die Membranen mit einer CL-Lösung inkubiert und das emittierte Licht mit einem lichtempfindlichen Film (Roche) detektiert.

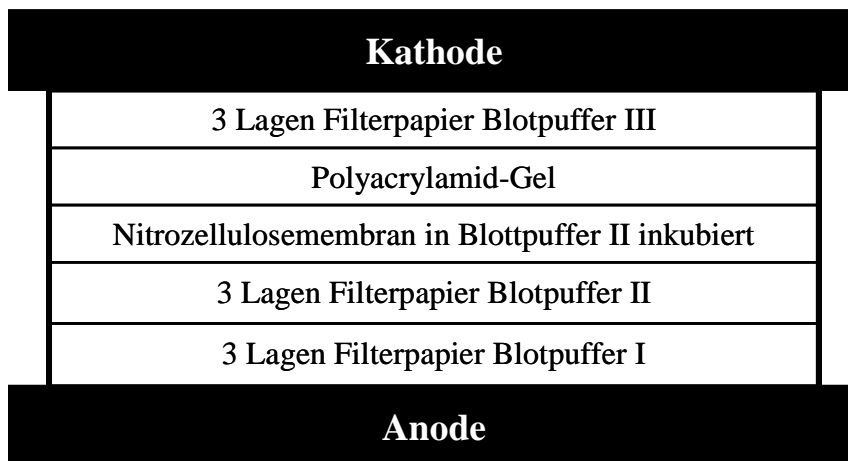


Abb. 2-1: Schematischer Aufbau eines WB nach dem *Semi-Dry-Blot*-Verfahren

### 2.3.7 Expression von GST- bzw. His<sub>6</sub>-Fusionsproteinen

Die Expression von Proteinen erfolgte im *E. coli*-Stamm BL21 DE3. Dieser wurde dazu mit Plasmiden transformiert (Abs. 2.1.11), die für die entsprechenden GST- (Glutathion-S-Transferase) bzw. His<sub>6</sub>-Fusionsproteine codieren. Mehrere Kolonien wurden zum Animpfen einer Vorkultur in 25 ml 2x YT-Medium (100 µg/ml Ampicillin) verwendet, die bis zu einer OD<sub>600nm</sub> ≥ 4,0 bei 37°C unter Schütteln inkubiert wurde. Von dieser Vorkultur wurde die Hauptkultur in 250 ml 2x YT-Medium (100 µg/ml Ampicillin) angeimpft und dabei deren OD<sub>600nm</sub> auf 0,4 eingestellt. Die Expression erfolgte für 16 Stunden bei 20°C durch Zugabe von IPTG (0,2 mM). Nach der Expression wurden die Bakterien durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 4.000x g und 4°C geerntet. Die Bakterien konnten im Anschluss bei -80°C gelagert werden. Um zu analysieren, ob das gewünschte Protein exprimiert wurde und ob dieses löslich war, wurden die Bakterien in PBS durch Ultraschall aufgeschlossen und unlösliche Proteine und Zelltrümmer durch Zentrifugation für 30 Minuten bei 14.000x g und 4°C abgetrennt. Das entstandene Pellet wurde in 1x SDS-Ladepuffer aufgenommen, 5 Minuten bei 95°C inkubiert und 5 Minuten bei 14.000x g zentrifugiert. Die Analyse der PBS- und der SDS-Fraktion erfolgte mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung (Abs. 2.3.4 und Abs. 2.3.5).

### 2.3.8 Expression von Proteinen in Retikulozytenlysat

Retikulozyten sind die Vorläuferzellen der Erythrozyten. Sie besitzen zwar keinen Zellkern mehr jedoch die Fähigkeit zur Proteinbiosynthese. Die Lysate von Kaninchen-Retikulozyten können deshalb zur zellfreien *in vitro*-Expression von Proteinen eingesetzt werden. Das in der vorliegenden Arbeit zum Einsatz gekommene *TNT<sup>®</sup> Coupled Reticulocyte Lysate* (Promega, Mannheim) ermöglichte außerdem die Transkription von T7-Polymerase-abhängigen Promotoren direkt im Retikulozytenlysat. Für die *in vitro* Transkription und Translation von Myc-p0071-WT sowie HA-KIF3b-WT wurden jeweils 1 µg der Plasmide p0071-WT-pcDNA4 und KIF3b-WT-pGADT7 dem nach Angaben des Herstellers vorbereiteten Retikulozytenlysat zugesetzt. Die *in vitro* Transkription/Translation erfolgte anschließend für 30 Minuten bei 30°C. Die Expression der entsprechenden Proteine wurde mittels SDS-PAGE und WB analysiert (Abs. 2.3.4 und Abs. 2.3.6).

### 2.3.9 Immunpräzipitation

Die IP (Immunpräzipitation) ist eine Affinitätsaufreinigung von Antigenen mit Hilfe eines spezifischen Ak. Der Ak wird mit einem Proteinlysat, welches das Antigen enthält, inkubiert und anschließend der Antigen-Ak-Komplex über Protein A- oder Protein G-Agarose präzipitiert. Neben dem Antigen-Ak-Komplex werden auch die mit dem Antigen assoziierten Proteine kopräzipitiert. Nach mehreren Waschschritten zum Entfernen von ungebundenen Proteinen wird das Präzipitat mittels SDS-PAGE und WB analysiert.

Für die IP von Proteinen aus Kaninchen-Retikulozyten-Lysaten wurden Myc-KIF3b-WT und HA-p0071-WT in unabhängigen Ansätzen exprimiert. Nach erfolgter Translation wurden beide Lysate gemischt und für 30 Minuten bei 30°C inkubiert. Anschließend erfolgt die Zugabe von 1 µg eines spezifischen Myc-Ak (anti-Myc-Maus; BD Bioscience) oder eines unspezifischen Kontroll-Ak (*Mouse Control IgG*; Abcam, Cambridge; UK). Im Anschluss an eine Inkubation bei 30°C für 30 Minuten wurden die Lysate mit 15 µl Protein A-Agarose (Fisher Scientific, Schwerte) versetzt und weitere 30 Minuten bei 30°C inkubiert. Die Protein A-Agarose wurde anschließend viermal mit 400 µl IP-Puffer gewaschen und in 20 µl 2x SDS-Ladepuffer aufgenommen. Die IP von in HEK293-Zellen exprimierten Proteinen erfolgte analog. Zur Präzipitation von EGFP-Fusionsproteinen wurden die entsprechenden Zelllysate in IP-Puffer mit jeweils 2 µg eines anti-EGFP-Ak (anti-EGFP-Kaninchen; Invitrogen) bei 4°C über Nacht inkubiert. Die Immobilisierung der Antigen-Ak-Komplexe mit jeweils 20 µl Protein A-Agarose erfolgte bei 4°C für 2 Stunden. Sollten Flag-Fusionsproteine aufgereinigt werden oder deren Interaktionen untersucht werden, wurden die entsprechenden

HEK293-Zelllysate in IP-Puffer mit 30 µl anti-Flag-Agarose für 1 Stunde bei 4°C inkubiert. Sowohl die Protein A-Agarose als auch die anti-Flag-Agarose wurden viermal mit 400 µl IP-Puffer gewaschen und in 20 µl 2x SDS-Ladepuffer aufgenommen. Die Analyse aller Präzipitate erfolgte mittels SDS-PAGE und WB (Abs. 2.3.4 und Abs. 2.3.6).

### **2.3.10 GST-Pulldown**

Sogenannte PD-Analysen sind *in vitro* Methoden, um die physikalische Interaktion zwischen zwei oder mehreren Proteinen zu untersuchen. Sie sind eine Form der Affinitätsaufreinigung und der IP sehr ähnlich, außer dass an Stelle eines Ak eines der zu untersuchenden Proteine direkt an eine Matrix immobilisiert wird. Beim GST-PD wird ein bakteriell exprimiertes GST-Fusionsprotein in einer Enzym-Substrat-Reaktion an Glutathion-Sepharose (Fisher Scientific) gekoppelt. Diese Protein-Sepharose kann anschließend mit Zelllysaten, *E. coli*-Zellextrakten bzw. aufgereinigten Proteinen inkubiert werden. Die Bindung von Proteinen wird anschließend mittels SDS-PAGE und WB analysiert (Abs. 2.3.4 und Abs. 2.3.6).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Pellets von Bakterien, die GST, GST-p0071-Arm, GST-Rab11-WT, -DA, -DN, GST-ROK-RBD bzw. GST-FIP4-(As 592-637) exprimierten, in GST-Lysepuffer (Zugabe von 1 mM DTT; 1 mM Pefabloc SC; 10 µg/ml Aprotinin; 10 µg/ml Leupeptin) resuspendiert und die Bakterien anschließend mittels Ultraschall aufgeschlossen. Zur Abtrennung von Bakterienresten und unlöslichen Proteinen wurden die Lysate für 30 Minuten bei 14.000x g und 4°C zentrifugiert. Zum Immobilisieren der GST-Fusionsproteine wurden die Überstände für 15 Minuten bei 4°C mit in GST-Lysepuffer äquilibrierter Glutathion-Sepharose inkubiert. Mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung des Gels konnte die Bindung der GST-Fusionsproteine an die Glutathion-Sepharose überprüft werden. Durch Zugabe weiterer Glutathion-Sepharose wurde die Konzentration von unterschiedlichen Protein-Sepharosen angeglichen. Neben der Analyse von Protein-Protein-Interaktionen wurden GST-Pulldown-Analysen in dieser Arbeit auch genutzt, um den Aktivitätsstatus der GTPasen RhoA und Rab11 in Zelllysaten zu untersuchen (Abs. 2.2.10.2).

### **2.3.11 Hefe-Dihybrid**

Beim Hefe-Dihybrid handelt es sich um eine Methode zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen, bei der sich die Eigenschaften des Hefe-Transkriptionsfaktors GAL4 zu Nutze gemacht werden. GAL4 kann genetisch in zwei Fragmente getrennt werden, die einzeln

in der Hefe keine Aktivität besitzen. Als GAL4-BD wird dabei die DNA-Bindedomäne bezeichnet. Ohne die über GAL4-BD vermittelte DNA-Interaktion kann die als GAL4-AD bezeichnete Aktivierungsdomäne ihre transkriptionsinduzierende Wirkung nicht entfalten. Beide Domänen befinden sich normalerweise auf einer Polypeptidkette. Sie sind allerdings auch dann wirksam, wenn sie durch zwei interagierende Proteine, mit denen sie fusioniert sind, in einem Komplex zusammengebracht werden. Über GAL4-abhängige Reportergene können somit Interaktionen von Proteinen analysiert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden die cDNAs der zu untersuchenden Proteine in die Hefe-Expressionsvektoren pGBKT7 (für GAL4-BD-Fusionsproteine) bzw. pGADT7 (für GAL4-AD-Fusionsproteine) kloniert (beide Clontech, Saint-Germain-en-Laye; Frankreich). Die entsprechenden Plasmide wurden in den Hefestamm YRG2 nach Vorgaben des *Yeast Protocols Handbook* (Clontech) kotransformiert. Die Selektion der transformierten Hefen erfolgte auf SD-Agar (*minimal synthetic defined*) ohne die As Tryptophan (W) und Leucin (L). Zusätzlich wurden die transformierten Hefen mit Hilfe von SD-Agar ohne Tryptophan, Leucin und Histidin (H) auf Histidin-Auxotrophie getestet. Da das Reportergen *his3* im Hefestamm YRG2 unter der Kontrolle von GAL4 steht, zeigt eine Histidin-Auxotrophie die Interaktion der exprimierten Fusionsproteine an. Um die Wahrscheinlichkeit falsch positiver Ergebnisse zu verringern, wurden die GAL4-AD- und GAL4-BD-Fusionsproteine einzeln in YRG2 exprimiert und auf Histidin-Auxotrophie analysiert. Zusätzlich ermöglicht der Hefestamm YRG2 die Analyse der GAL4-Aktivität über das Reportergen *lacZ*. Die Analyse der  $\beta$ -Galaktosidase-Expression erfolgte nach den Vorgaben des *Yeast Protocols Handbook*.

### 2.3.12 GDP/GTP-Austausch-Analyse

Zur Bestimmung der GDP/GTP-Austausch-Aktivität von ECT2 gegenüber RhoA in Abhängigkeit von p0071 wurde das *RhoGEF Exchange Assay Biochem Kit* (Cytoskeleton, Denver, USA) verwendet. Dabei wird die Aufnahme des fluoreszierenden Nukleotid-Analogons *mant*-GTP (*N-methylanthraniloyl*) in die GTPase gemessen. Wenn *mant*-GTP von der GTPase gebunden wird, steigt dessen Fluoreszenz (Anregung: 360 nm; Emission 440 nm) deutlich an. Deshalb kann über den Fluoreszenzanstieg des *mant*-GTP auf die Aktivität eines GEF-Proteins gegenüber einer GTPase geschlossen werden.

Während das RhoA-Protein im *RhoGEF Exchange Assay Biochem Kit* enthalten war, wurden ECT2-WT, ECT2-(As 415-883) und p0071-WT als Flag-Fusionsproteine in HEK293-Zellen exprimiert. Die Zellen wurden mit Thymidin und Nocodazol in der Prometaphase synchronisiert und nach Erreichen der Zytokinese in RIPA-Puffer lysiert. Die Aufreinigung der

Flag-Fusionsproteine erfolgte mittels anti-Flag-Agarose (Abs. 2.3.9). Die Messung des GDP/GTP-Austauschs von RhoA wurde unter folgenden Bedingungen in einer 96-well-Mikrotiterplatte durchgeführt:

2x Reaktionspuffer (enthält <i>mant</i> -GTP)	50 $\mu$ l
RhoA (50 $\mu$ M)	4 $\mu$ l
RNase/DNase-freies Wasser	6 $\mu$ l

Nach fünf Messungen der *mant*-GTP-Fluoreszenz (440 nm) bei einer Anregungswellenlänge von 360 nm aller 30 Sekunden wurden jeweils 30  $\mu$ l der anti-Flag-Agarose zugegeben. Dabei wurden jeweils 15  $\mu$ l Flag-ECT2-WT-, Flag-ECT2-(As 415-883)- und Flag-p0071-WT-anti-Flag-Agarose mit 15  $\mu$ l in RIPA-Puffer äquilibrierter anti-Flag-Agarose versetzt, um die GDP/GTP-Austausch-Aktivität der einzelnen Proteine bestimmen zu können. Außerdem wurden 15  $\mu$ l Flag-ECT2-WT- und 15  $\mu$ l Flag-p0071-WT-anti-Flag-Agarose gemischt, um den Einfluss von p0071 auf ECT2 analysieren zu können. Als Kontrolle dienten 30  $\mu$ l in RIPA-Puffer äquilibrierter anti-Flag-Agarose. Nach der Zugabe der anti-Flag-Agarose wurde die Fluoreszenzintensität des *mant*-GTP über 30 Minuten alle 30 Sekunden gemessen.

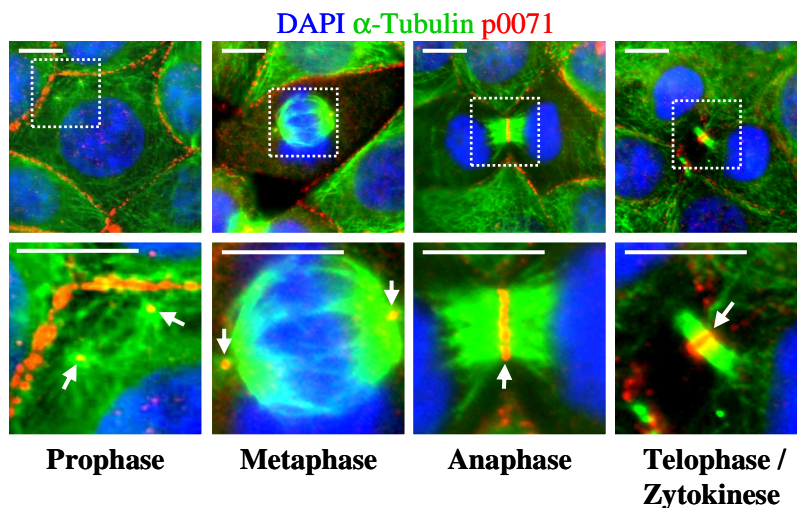
## 2.4 Statistische Auswertung

Soweit nicht besonders erwähnt wurden alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Quantifizierungen anhand mindestens drei unabhängiger Experimente durchgeführt. Die Standardabweichungen wurden als Fehlerbalken in den einzelnen Diagrammen dargestellt. Der zweiseitige heteroskedastische Student's t-Test wurde zur Bestimmung der statistischen Signifikanz zwischen zwei Populationen genutzt (\*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.005$ ).



### 3 Ergebnisse

Ein Ausgangspunkt für die vorliegende Arbeit war die genauere Untersuchung der intrazellulären Lokalisation von p0071, um Funktionen neben der bekannten Rolle bei der Regulation der Zell-Zell-Adhäsion charakterisieren zu können (Abb. 3-1; zur Verfügung gestellt von Fr. Dr. Annika Wolf). Endogenes p0071 (rot) ist mit der perizentrosomalen Region während der Prophase und den Spindelpolen im Verlauf der Metaphase assoziiert. Im Verlauf der Anaphase wird p0071 zum zentralen Mikrotubuli-Bündel rekrutiert und akkumuliert schließlich am Zentralkörper während der Zytokinese (WOLF *et al.*, 2006). Aus diesen Voruntersuchungen wurde auf eine Funktion von p0071 in der Mitose geschlossen, die in der vorliegenden Arbeit genauer aufgeklärt werden sollte.



**Abb. 3-1: p0071 liegt Zentrosom-, Spindelpol- und Zentralkörper-assoziiert während der Mitose vor**

In Methanol-fixierten MCF-7-Zellen wurde endogenes p0071 (rot) und  $\alpha$ -Tubulin (grün) mit Hilfe spezifischer Ak markiert. In der unteren Reihe sind die weiß umrandeten Regionen vergrößert dargestellt. Die weißen Pfeile zeigen den Ort der p0071-Lokalisation. Die Balken entsprechen einer Größe von 5  $\mu$ m (WOLF *et al.*, 2006).

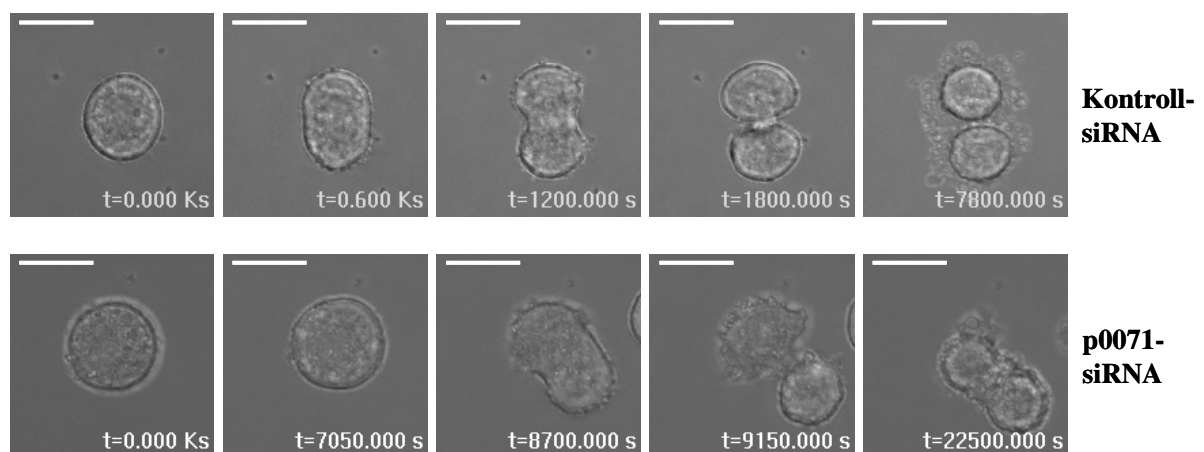
#### 3.1 p0071 ist beteiligt an der Regulation der RhoA-Aktivität während der Zytokinese

Aus Vorarbeiten war außerdem bekannt, dass sowohl die Überexpression von p0071 als auch eine Verringerung der p0071-Expression mittels siRNA oder shRNA-Konstrukten zur Entstehung von mehrkernigen Zellen führte. Eine intensivere Analyse dieses Phänotyps zeigte, dass alle Mitosestadien hinsichtlich der Ausbildung der Spindeln und hinsichtlich der Chromosomen-Segregation normal abliefen. Multipolare Spindeln traten erst nach dem Erscheinen von mehrkernigen Zellen auf und konnten somit als deren Ursache ausgeschlossen

werden (WOLF *et al.*, 2006). Diese Untersuchungen ließen den Schluss zu, dass p0071 an der Regulation des letzten Schritts der Mitose, der Zytokinese, beteiligt sein könnte. Die Zytokinese beginnt mit der Einschnürung der Zellen am Ende der Anaphase und separiert die Tochterzellen.

### 3.1.1 p0071 ist involviert in die Aktomyosin-basierte Einschnürung während der Zytokinese

Um eine mögliche Rolle von p0071 bei der Regulation der Zytokinese zu überprüfen, wurden *Live-Cell-Imaging*-Analysen durchgeführt (Abb. 3-2). Hierfür wurden HeLa-Zellen, die mit Kontroll- oder p0071-siRNA transfiziert wurden, mittels Thymidin und Nocodazol in der Prometaphase arretiert. 30 Minuten nach Entfernen des S-Mediums (Nocodazol-haltiges Synchronisationsmedium) wurde begonnen, Bilder sich teilender Zellen alle 150 Sekunden aufzunehmen. Diese Untersuchungen zeigten deutlich, dass die mit p0071-siRNA-behandelten Zellen (untere Reihe) zu einem späteren Zeitpunkt mit der Einschnürung (Eintritt in die Zytokinese) begannen als die Kontrollzellen (obere Reihe). Neben dem verzögerten Beginn der Einschnürung konnten außerdem Deformationen der Zellen im Verlauf der Zytokinese beobachtet werden. Letztendlich waren diese Zellen zumeist nicht mehr in der Lage die Tochterzellen vollständig abzuschnüren.

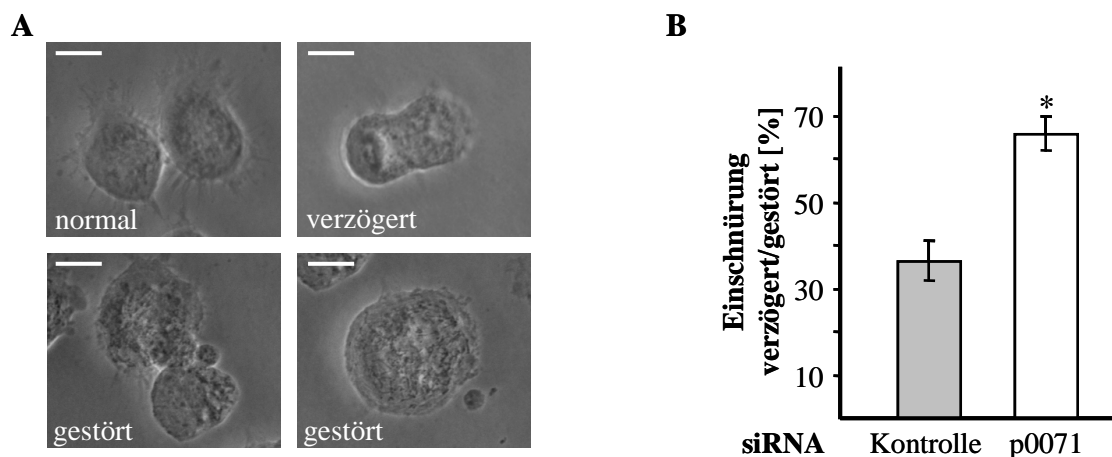


**Abb. 3-2: Die Verringerung der p0071-Expression geht mit verspäteter Einschnürung und Defekten bei der Abschürung einher**

HeLa-Zellen wurden mit Kontroll- oder p0071-siRNA transfiziert und durch die sukzessive Behandlung mit Thymidin und Nocodazol in der Prometaphase. 30 Minuten nach dem Entfernen des Nocodazol-haltigen Mediums wurden Bilder sich teilender Zellen alle 150 Sekunden aufgenommen. Die Balken entsprechen einer Größe von 10  $\mu\text{m}$ .

Um den Effekt der verzögerten Einschnürung quantifizieren zu können, wurden HeLa-Zellen mit Kontroll- bzw. p0071-siRNA transfiziert und in der Prometaphase arretiert. 90 Minuten nach dem Entfernen des S-Mediums wurden die Zellen mit FA fixiert und

anschließend hinsichtlich des Zytokinese-Fortschritts untersucht (Abb. 3-3). Zum Zeitpunkt der Fixierung war die Einschnürung bei der überwiegenden Mehrzahl der Kontrollzellen weit fortgeschritten (Abb. 3-3 A; links oben). Es wurden aber auch Zellen beobachtet, bei denen die Zytokinese verzögert ablief (Abb. 3-3 A; rechts oben), die starke Deformationen aufwiesen (Abb. 3-3 A; links unten) oder sich gar nicht abschnürten (Abb. 3-3 A; unten rechts). In Zellen mit einer verringerten p0071-Expression wurden ungefähr zweimal häufiger verzögerte oder gestörte Zytokinesen (ca. 70% der Zytokinesen gestört) beobachtet als in den Kontrollzellen (ca. 35% der Zytokinesen gestört). Da die Behandlung mit Nocodazol sowohl die Entstehung von Zellen mit multipolaren Spindeln (ALIEVA und VOROB'EV, 1987) als auch Apoptose (BUMBASIREVIC *et al.*, 1995) induziert, erklärt dies den relativ hohen Anteil gestörter Zytokinesen in den Kontrollzellen.



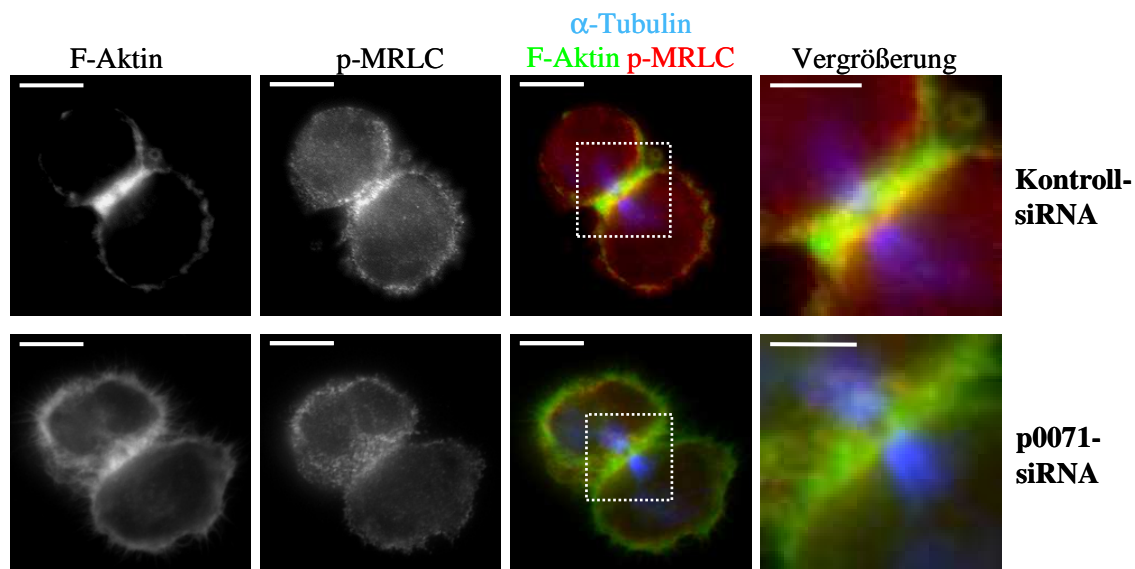
**Abb. 3-3: Die Verringerung der p0071-Expression induziert Defekte bei der Einschnürung mitotischer HeLa-Zellen**

HeLa-Zellen wurden mit Kontroll- bzw. p0071-siRNA transfiziert und anschließend in der Prometaphase arretiert. 90 Minuten nach Entfernen des S-Mediums wurden die Zellen mittels FA fixiert und der Verlauf der Zytokinese analysiert. (A) Beispielbilder für die Klassifizierung normaler, verzögerter und gestörter Zytokinesen (Hellfeld). Die Balken entsprechen einer Größe von 10  $\mu\text{m}$ . (B) Zur Quantifizierung des Zytokinese-Fortschritts wurden bei Kontroll- und p0071-siRNA-transfizierten Zellen die gestörten bzw. verzögerten Zytokinesen gezählt und durch die Anzahl aller beobachteter Zytokinesen geteilt. Im Diagramm ist der Prozentsatz aufgetretener gestörter bzw. verzögerter Zytokinesen dargestellt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (STABW) aus drei unabhängigen Experimenten, bei denen jeweils mindestens 100 Zellen gezählt wurden. (\*  $p \leq 0,05$ )

Während der Zytokinese akkumulieren F-Aktin und Myosin-II am Zelläquator und bilden den kontraktilen Aktomyosin-Ring, der für die mechanische Einschnürung der Zelle verantwortlich ist (GLOTZER, 2005). Die vorliegenden Ergebnisse deuteten auf eine Rolle für p0071 bei der Ausbildung dieses kontraktilen Ringes hin. Um dies zu untersuchen, wurden HeLa-Zellen mit Kontroll- bzw. p0071-siRNA transfiziert, synchronisiert und 90 Minuten nach Entfernen des S-Mediums mit FA fixiert. Mittels Alexa488-konjugiertem Phalloidin konnte F-Aktin (grün) visualisiert werden. Zusätzlich kam ein Ak zur Markierung der am S19

phosphorylierten regulatorischen leichten Kette des Myosin-II (p-MRLC; rot) zum Einsatz (Abb. 3-4). Diese Phosphorylierung der MRLC induziert die Selbstassemblierung des Myosin-II zu bipolaren Filamenten. Außerdem korreliert diese Phosphorylierung mit der Myosin-II-ATPase-Aktivität und dementsprechend mit der Kontraktilität von Aktomyosin-Filamenten in der Zelle (Abs. 1.5.1.3). Durch die gleichzeitige Markierung von F-Aktin und p-MRLC können kontraktile Aktomyosin-Filamente in der Zelle sichtbar gemacht werden, wie sie bei Assemblierung und Kontraktion des Aktomyosin-Ringes entstehen (Abs. 1.5.4).

Zellen, die mit p0071-siRNA transfiziert wurden (Abb. 3-4; untere Reihe), weisen deutlich weniger F-Aktin an der Teilungsfurche auf als Kontrollzellen (Abb. 3-4; obere Reihe). Zusätzlich akkumuliert weniger p-MRLC in diesem Bereich, was auf eine gestörte Assemblierung von Aktomyosin-Filamenten im äquatorialen Bereich der mitotischen Zellen hinweist.

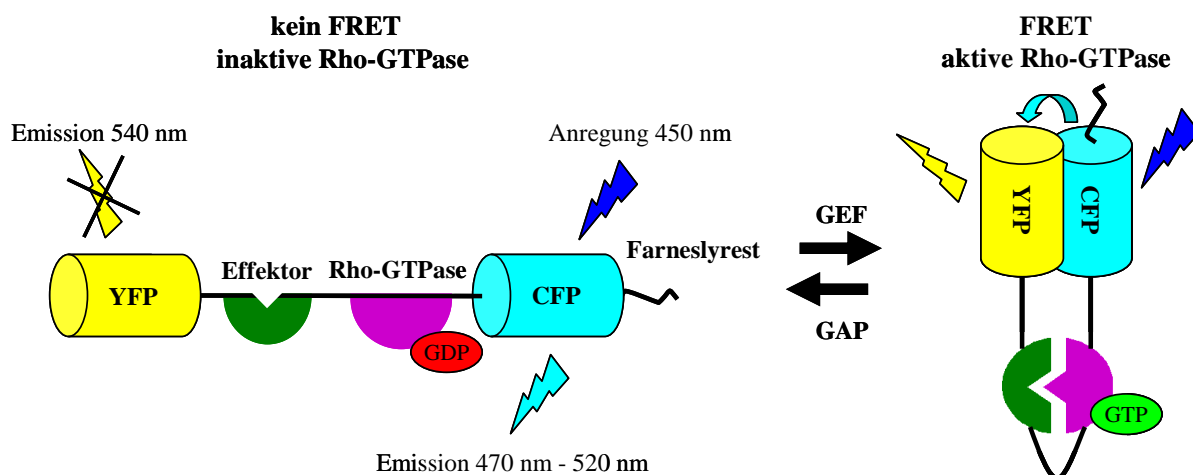


**Abb. 3-4: p0071 wird für den Aufbau des Aktomyosin-Ringes während der Zytokinese benötigt**  
HeLa-Zellen wurden mit Kontroll- oder p0071-siRNA transfiziert und anschließend in der Prometaphase arretiert. 90 Minuten nach Entfernen des S-Mediums wurden die Zellen mittels FA fixiert und p-MRLC (rot) und  $\alpha$ -Tubulin (blau) mit Hilfe spezifischer Ak markiert. Zur Visualisierung von F-Aktin wurde Phalloidin-Alexa488 (grün) verwendet. Die Balken entsprechen 5  $\mu$ m bzw. in der Vergrößerung der weiß umrandeten Bereiche 10  $\mu$ m.

Die Ergebnisse der mikroskopischen Analysen lassen auf eine Beteiligung von p0071 an der Regulation der Zytokinese schließen. Dabei könnte p0071 in die Assemblierung des Aktomyosin-Ringes involviert sein, da die Verringerung der p0071-Expression die Akkumulation von Aktomyosin-Filamenten entlang der Teilungsfurche stört (Abb. 3-4). Dies wäre eine Erklärung für die beobachteten verzögerten und gestörten Zytokinesen (Abb. 3-2 und Abb. 3-3) und die vermutlich daraus resultierende Mehrkernigkeit nach der Transfektion von p0071-siRNA.

### 3.1.2 p0071 beeinflusst die Aktivität der kleinen GTPase RhoA

Der Aufbau und die Kontraktion des Aktomyosin-Ringes im Verlauf der Zytokinese wird im wesentlichen von der kleinen GTPase RhoA kontrolliert (TAKAISHI *et al.*, 1995; KIMURA *et al.*, 2000; KAMIJO *et al.*, 2006). Dabei induziert aktives RhoA über die Kinasen ROK und Citron, die Phosphorylierung der MRLC, was zur Assemblierung und Aktivierung des Myosin-II führt. Außerdem induziert aktives RhoA über die Formine die Polymerisierung von Aktin-Filamenten (Abs. 1.5.4). Da eine verringerte Expression von p0071 mit der Ausbildung des Aktomyosin-Ringes interferierte (Abs. 3.1.1), wurde im Folgenden untersucht, ob p0071 an der Regulation der RhoA-Aktivität beteiligt ist.



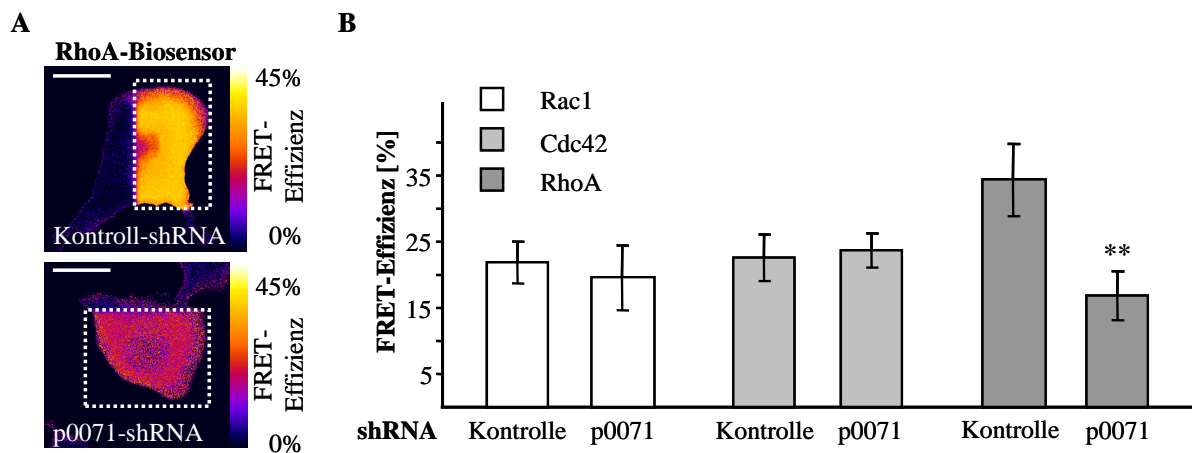
**Abb. 3-5: Schematische Darstellung der *Raichu*-Biosensoren**

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Biosensoren zur Bestimmung der Aktivität von Rho-GTPasen befinden sich zwischen YFP und CFP eine Rho-GTPase (RhoA, Rac1 und Cdc42) und die spezifische RhoA- bzw. Cdc42/Rac1-Bindedomäne eines Effektorproteins (PKN für RhoA; PAK1 für Rac1 und Cdc42). Im inaktiven Zustand kann die Rho-GTPase nicht mit ihrem Effektor interagieren, so dass der Abstand zwischen YFP und CFP für FRET zu groß ist. Die Interaktion der aktiven Rho-GTPase mit ihrem Effektor bringt YFP und CFP in eine für FRET geeignete Distanz (NAKAMURA *et al.*, 2006).

Die Aktivität der Rho-GTPasen wurde zunächst mittels *Raichu*-Biosensoren bestimmt (Dr. Matsuda; Osaka, Japan). Diese Biosensoren bestehen aus einer Rho-GTPase und der GTPase-Bindedomäne eines ihrer Effektoren. An deren beiden Enden sind YFP (N-terminal vom Effektor) und CFP (C-terminal von der Rho-GTPase) fusioniert. C-terminal zum CFP befindet sich das CAAX-Motiv der entsprechenden GTPase, an dem das exprimierte Fusionsprotein posttranslational mit einem Farnesylrest modifiziert wird. Dieser ist essentiell für die Membranlokalisierung der Rho-GTPasen. Die Rho-GTPasen interagieren nur im aktiven Zustand mit ihren Effektoren (Abs. 1-4). Diese Interaktion bringt YFP und CFP im Biosensor in eine für FRET geeignete Entfernung (Abb. 3-5). Die Aktivität der Rho-GTPasen der Biosensoren korreliert somit direkt mit dem emittierten FRET-Signal (NAKAMURA *et al.*, 2006).

Um den Einfluss von p0071 auf die Aktivität der Rho-GTPasen Rac1, Cdc42 und RhoA zu bestimmen, wurden HEK293-Zellen mit dem Plasmid für den entsprechenden

Raichu-Biosensor (*raichu-1026* für Rac1; *raichu-1069* für Cdc-42; *raichu-1298* für RhoA) und einem Kontroll- bzw. einem p0071-shRNA-Plasmid kotransfiziert. 72 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit FA fixiert und FRET-Messungen durchgeführt.



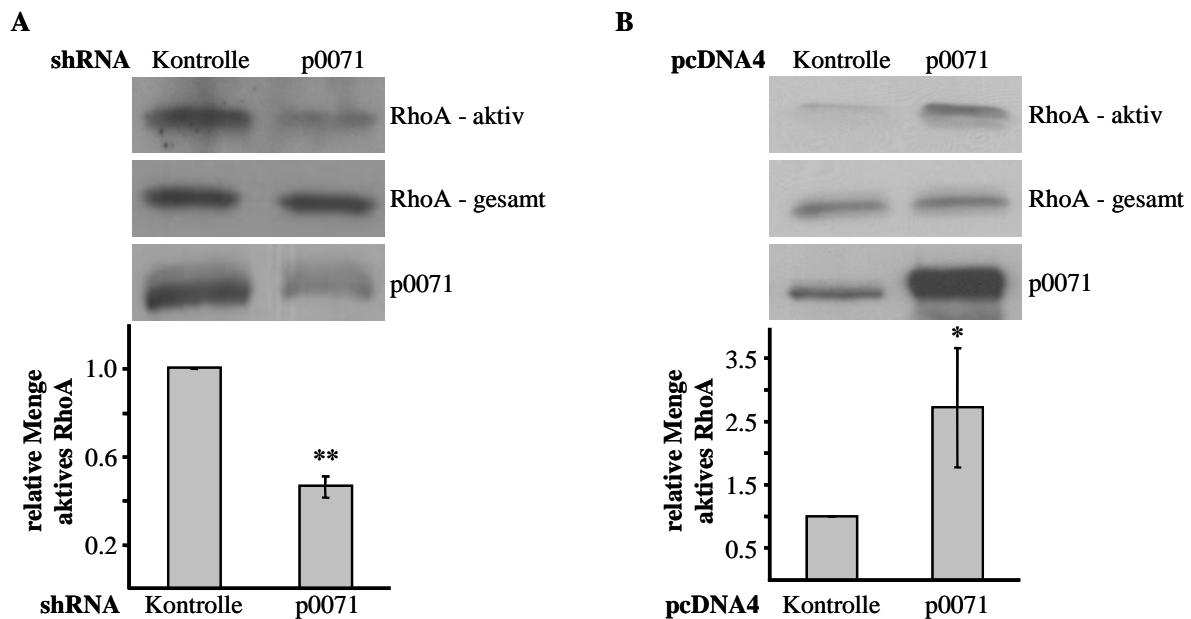
**Abb. 3-6: FRET-Effizienz der Biosensoren für die Aktivität der Rho-GTPasen in Abhängigkeit von p0071**

HEK293-Zellen wurden mit dem entsprechenden Biosensor und einem Kontroll- bzw. p0071-sh-RNA-Konstrukt kotransfiziert. 72 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mittels FA fixiert und die FRET-Effizienz durch Akzeptor-Photobleichen bestimmt. (A) Falschfarbendarstellung der FRET-Effizienz des RhoA-Biosensors in Abhängigkeit der p0071-Expression. Die weißen Rechtecke markieren die gebleichte Region. (B) Die FRET-Effizienzen der Biosensoren für Rac1, Cdc42 und RhoA wurde in Zellen bestimmt, die mit Kontroll- bzw. p0071-shRNA-Konstrukten kotransfiziert wurden. Das Diagramm zeigt die mittleren FRET-Effizienzen  $\pm$  STABW von jeweils 20 Zellen aus drei unabhängigen Transfektionen. (\*\*  $p \leq 0,005$ )

Für den RhoA-Biosensor wurden in p0071-shRNA transfizierten Zellen signifikant verringerte FRET-Effizienzen in Vergleich zur Kontrolle gemessen. Die FRET-Effizienzen der Biosensoren für Rac1 und Cdc42 waren dagegen unbeeinflusst (Abb. 3-6). Dies legt nahe, dass p0071 spezifisch in die Regulation der Aktivität der kleinen GTPase RhoA involviert ist. Mit Hilfe eines biochemischen Tests wurde dieser Einfluss weiter untersucht. Dabei kam die bakteriell exprimierte RhoA-Bindedomäne des Rhotekin (Rhotekin-RBD) zum Einsatz. Rhotekin ist ein Effektor von RhoA und interagiert ausschließlich mit aktivem RhoA (REID *et al.*, 1996). Mit der an Glutathion-Sepharose immobilisierten Rhotekin-RBD kann folglich aktives RhoA aus Zelllysaten präzipitiert und im WB quantifiziert werden (REN *et al.*, 1999).

Der RhoA-Aktivitätstest wurde in HEK293-Zellen 72 Stunden nach der Transfektion mit Kontroll- bzw. p0071-shRNA-Plasmiden (Abb. 3-7 A) und 48 Stunden nach der Transfektion mit pcDNA4 bzw. Flag-p0071-WT-pcDNA4 durchgeführt (Abb. 3-7 B). Mit diesen Untersuchungen konnte die Abhängigkeit der RhoA-Aktivität in der Zelle von der p0071-Expression gezeigt werden. Eine Verringerung der p0071-Expression mittels shRNA reduzierte die Menge an aktivem RhoA auf 46,5% ( $\pm$  5%). Die Überexpression von p0071 erhöhte die RhoA-Aktivität in der Zelle auf 272% ( $\pm$  95%), wobei eine moderate Expression

von p0071 die Aktivität von RhoA deutlicher stimuliert als eine sehr starke p0071-Expression (siehe Anhang; Abb. 7-2).



**Abb. 3-7: Die Aktivität von RhoA wird von p0071 beeinflusst**

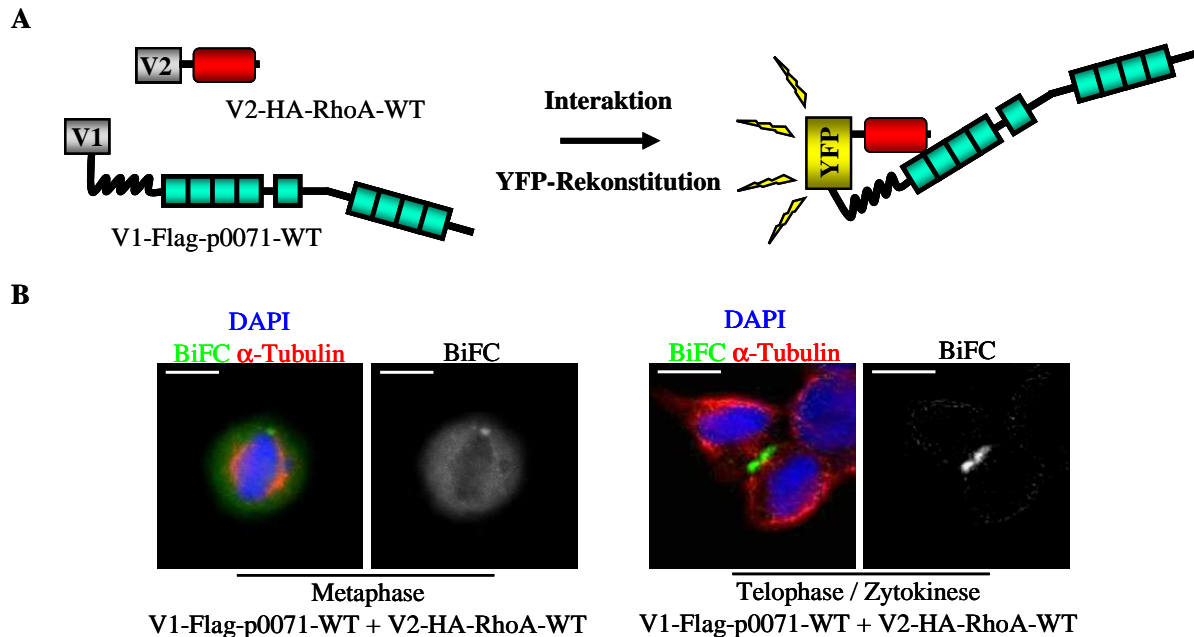
RhoA-Aktivitätstest von HEK293-Zellen 72 Stunden nach der Transfektion mit Kontroll- bzw. p0071-shRNA-Plasmiden (A), sowie 48 Stunden nach der Transfektion von pcDNA4 (Kontrolle) und Flag-p0071-WT-pcDNA4 (B). Für die Quantifizierung wurde jeweils die Menge an aktivem, präzipitiertem RhoA auf die eingesetzte Gesamtmenge RhoA abgeglichen. Die erhaltenen Werte wurden relativ zu den Kontrollen aufgetragen. Die Fehlerbalken repräsentieren die STABW aus drei unabhängigen Experimenten. (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,005$ )

Die verringerte Expression von p0071 induzierte Störungen bei der Umorganisation des Aktin-Zytoskeletts, die zum Aufbau des kontraktiven Aktomyosin-Ringes benötigt werden (Abb. 3-4). Die in diesem Abschnitt dargestellten Ergebnisse lassen vermuten, dass dieser Effekt auf eine Rolle von p0071 bei der RhoA-Aktivitätsregulation zurückgeht.

### 3.1.3 p0071 interagiert mit RhoA

Um aufzuklären, wie p0071 an der Regulation der Aktivität der GTPase RhoA beteiligt sein könnte, wurde zuerst untersucht, ob p0071 selbst mit RhoA interagiert. Hierfür wurden BiFC-Analysen durchgeführt, die zum einen die Lokalisation der Interaktion in der Zelle ermöglichen und zum anderen eine Quantifizierung von Interaktionen über Fluoreszenzintensitäten erlauben. Bei BiFC-Analysen werden die zu untersuchenden Proteine mit jeweils einer nichtfluoreszierenden Hälfte der Venusvariante des YFP (V1 und V2) fusioniert. Interagieren beide Proteine *in vivo*, kann das fluoreszierende YFP rekonstituiert werden (Abb. 3-8 A). In HEK293-Zellen, die V1-Flag-p0071-WT und V2-HA-RhoA-WT koexprimierten, war das BiFC-Signal während der Metaphase nur schwach und diffus im Zytoplasma

verteilt. In der Telophase kam es zu einer Verstärkung und Akkumulation dieses Signals am Ort der Einschnürung, was auf eine Interaktion von p0071 mit RhoA während der Zytokinese hindeutet (Abb. 3-8 B).

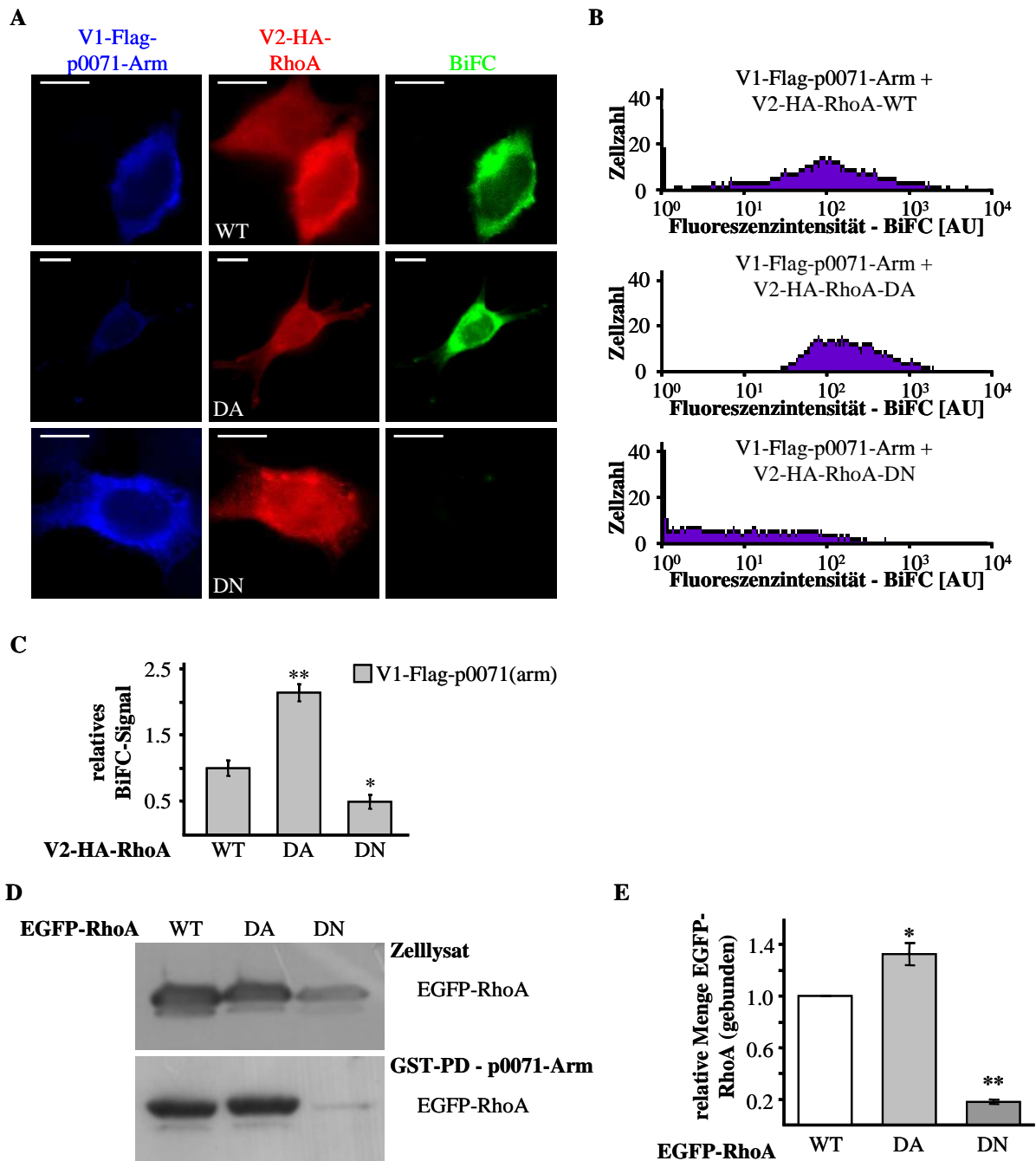


**Abb. 3-8: p0071 und RhoA interagieren am Ort der Einschnürung während der Zytokinese**

(A) Kommen bei der Interaktion zweier Proteine, die mit jeweils einer nichtfluoreszierenden Hälfte (V1 und V2) des YFP fusioniert sind, diese YFP-Fragmente in räumliche Nähe, kann das fluoreszierende YFP rekonstituiert werden. (B) HEK293-Zellen wurden mit Plasmiden, die für V1-Flag-p0071-WT bzw. V2-HA-RhoA-WT codieren, kotransfiziert und anschließend synchronisiert. Die Zellen wurden sowohl in der Metaphase als auch in der Telophase fixiert und  $\alpha$ -Tubulin (rot) mit Hilfe spezifischer Ak markiert. Die DNA (blau) wurde mit DAPI gefärbt. Das BiFC-Signal, das den Ort der Interaktion von exogenem p0071 und RhoA anzeigt, ist grün dargestellt. Die Balken entsprechen einer Größe von 5  $\mu$ m.

In Interphasezellen konnte ebenfalls ein diffuses BiFC-Signal nach Koexpression von V2-HA-RhoA-WT und V1-Flag-p0071-Arm beobachtet werden (Abb. 3-9 A; oberer Reihe). Für die dominant aktive (DA) Mutante von RhoA erschien das BiFC-Signal im Vergleich am stärksten (Abb. 3-9 A; mittlere Reihe). Zellen, die dominant negatives (DN) RhoA exprimierten, zeigten dagegen kein oder nur ein sehr schwaches BiFC-Signal (Abb. 3-9 A; untere Reihe). Zur Quantifizierung dieser Unterschiede wurde die BiFC-Fluoreszenzintensität von jeweils 20.000 Zellen am Durchflusszytometer gemessen. Dabei konnte gezeigt werden, dass die mittlere YFP-Fluoreszenzintensität in V1-Flag-p0071-Arm und V2-HA-RhoA-DA koexprimierenden Zellen ca. zweimal stärker war als in Zellen, die V1-Flag-p0071-Arm und V2-HA-RhoA-WT koexprimierten. Im Vergleich zu diesen Zellen war das BiFC-Signal ungefähr um die Hälfte reduziert, wenn anstelle von RhoA-WT RhoA-DN exprimiert wurde (Abb. 3-9 B, C). Aus diesen Untersuchungen kann auf eine bevorzugte Interaktion der p0071-Arm-Domäne mit der aktiven Form von RhoA geschlossen werden.





**Abb. 3-9: p0071-Arm interagiert bevorzugt mit aktivem RhoA**

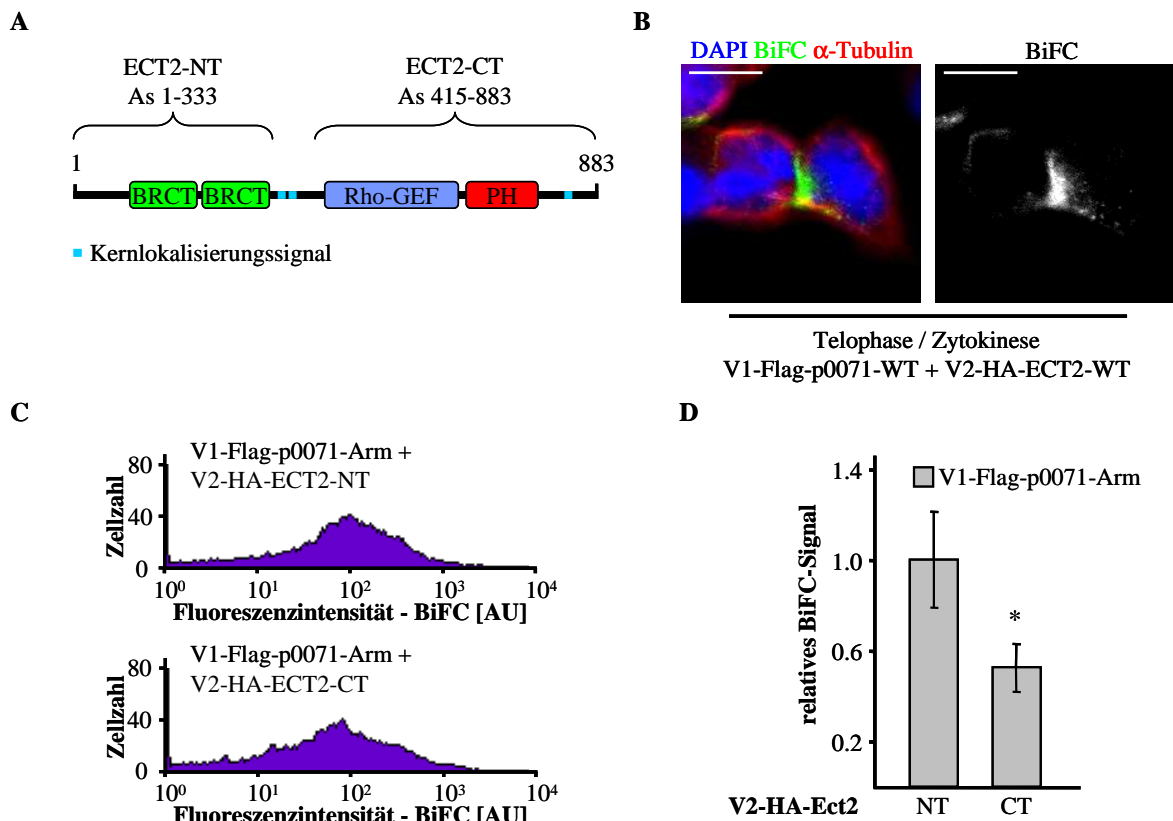
(A) HEK293-Zellen wurden mit Plasmiden, die für ein Fusionsprotein aus V1-Flag und der p0071-Arm-Domäne (V1-Flag-p0071-Arm) sowie V2-HA-RhoA-WT, -DA oder -DN codieren, kotransfiziert, 18 Stunden später fixiert und das BiFC-Signal analysiert. Durch den Einsatz spezifischer Ak gegen das Flag- (blau) und das HA-Epitop (rot) konnten kotransfizierte Zellen identifiziert und das BiFC-Signal (grün) analysiert werden. Die Balken entsprechen 5  $\mu$ m. (B) Zur Quantifizierung der BiFC-Effizienz wurde die Intensität der YFP-Fluoreszenz (BiFC-Signal) der Zellen 18 Stunden nach der Transfektion am Durchflusszytometer analysiert. (C) Die mittleren YFP-Fluoreszenzintensitäten aus drei unabhängigen Experimenten mit jeweils 20.000 untersuchten Zellen, wurden relativ zum erhaltenen Wert für RhoA-WT  $\pm$  STABW aufgetragen. (D) Die an Glutathion-Sepharose immobilisierte Arm-Domäne von p0071 wurde auf die Interaktion mit in HEK293-Zellen exprimiertem RhoA-WT, -DA und -DN untersucht. Die entsprechenden Eluate wurden mittels WB auf Anwesenheit von EGFP-RhoA untersucht (GST-PD). (E) Die Menge an präzipitiertem RhoA wurde auf die eingesetzte RhoA-Menge (Zelllysat) abgeglichen. Diese Werte wurden relativ zu dem Wert für RhoA-WT aufgetragen. Die Fehlerbalken geben die STABW aus zwei unabhängigen Experimenten an. (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,005$ )

Um den Einfluss des Aktivierungsstatus von RhoA auf die Interaktion mit p0071 in einem unabhängigen System zu untersuchen, wurde die p0071-Arm-Domäne als GST-Fusionsprotein bakteriell exprimiert und an Glutathion-Sepharose immobilisiert. RhoA-WT, -DA und -DN wurden als EGFP-Fusionsproteine in HEK293-Zellen exprimiert. Die gewonnenen Zellextrakte wurden mit der p0071-Arm-Sepharose inkubiert und das Eluat auf Anwesenheit von EGFP-RhoA untersucht. Mit Hilfe dieses Ansatzes konnte eine Interaktion der Arm-Domäne von p0071 mit RhoA auch *in vitro* gezeigt werden (Abb. 3-9 D). Zusätzlich konnte die Präferenz von p0071 für die aktive Form von RhoA bestätigt werden (ca. 140%  $\pm$  10% im Vergleich zu EGFP-RhoA-WT). Inaktives RhoA konnte dagegen kaum mit GST-p0071-Arm präzipitiert werden (ca. 20%  $\pm$  2% im Vergleich zu EGFP-RhoA-WT; Abb. 3-9 E). Da die Expression von RhoA-WT und der RhoA-Mutanten variierte, wurde die Menge an präzipitiertem RhoA auf die Menge an RhoA im Zelllysate abgeglichen.

Mit den in diesem Abschnitt vorgestellten Experimenten konnte eine Assoziation zwischen p0071 und RhoA während der Zytokinese am Ort der Einschnürung gezeigt werden (Abb. 3-8 B). BiFC- und GST-PD-Untersuchungen legen nahe, dass die Interaktion beider Proteine abhängig von der Aktivität von RhoA ist (Abb. 3-9). Da für p0071 ebenfalls eine Rolle bei der Regulation der Aktivität von RhoA gezeigt werden konnte (Abs. 3.1.2), lassen die in diesem Abschnitt gezeigten Ergebnisse die Vermutung zu, dass aktives RhoA durch die Bindung an p0071, in diesem Zustand stabilisiert wird.

### 3.1.4 p0071 interagiert mit dem Rho-GEF ECT2

Die Analyse der p0071-Überexpression und der p0071-Depletion führten zu der Hypothese, dass p0071 die Aktivität von RhoA in der Zelle reguliert (Abs. 3.1.2). Rho-GTPasen werden typischerweise durch GEFs aktiviert. Da p0071 keine klassische Rho-GEF-Domäne besitzt, stellte sich die Frage, ob p0071 mit dem RhoA-Aktivator in der Zytokinese, dem Rho-GEF ECT2, interagiert und zusammen mit ECT2 die RhoA-Aktivität moduliert. Die N-terminale Domäne von ECT2 ist für dessen Regulation verantwortlich und führt bei Überexpression zu einer Verringerung der RhoA-Aktivierung während der Zytokinese (Abs. 1.5.3). Eine in der Arbeitsgruppe durchgeführte Hefe-Dihybrid-Untersuchung zeigte, dass die p0071-Arm-Domäne ausschließlich mit der N-terminalen, regulatorischen Domäne von ECT2 interagiert und nicht mit der C-terminalen GEF-Domäne.



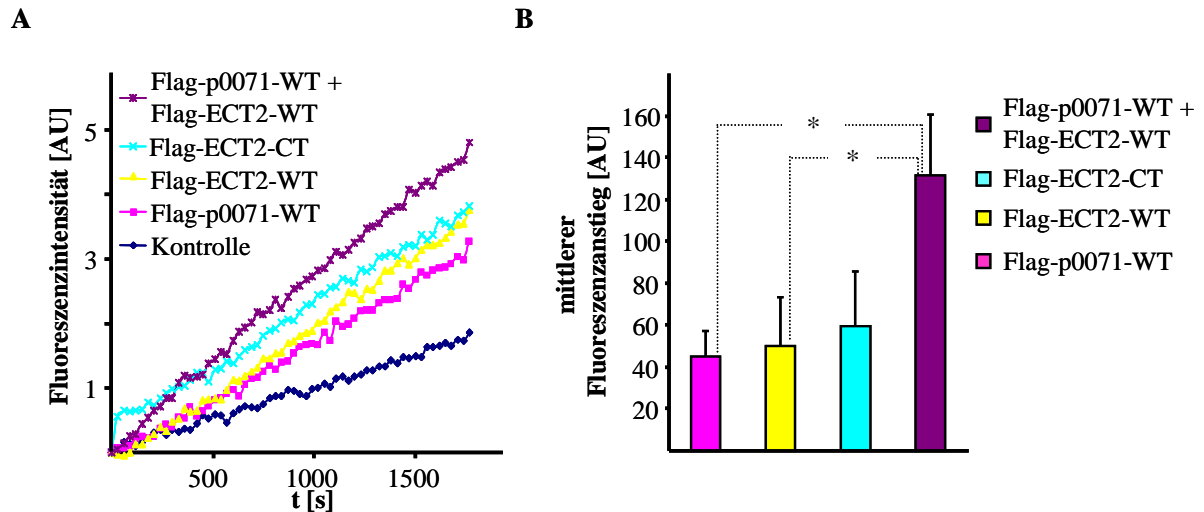
**Abb. 3-10: ECT2 interagiert mit p0071 während der Zytokinese am Ort der Einschnürung über seine regulatorische N-terminale Domäne**

(A) Schematische Darstellung des Rho-GEF Proteins ECT2. ECT2-NT beinhaltet die beiden BRCT-Domänen ohne die beiden Kernlokalisierungssignale im zentralen Bereich von ECT2. ECT2-CT umfasst die für die RhoA-Aktivitätsregulation essentielle Rho-GEF-Domäne (SAITO *et al.*, 2004). (B) HEK293-Zellen, die V1-flag-p0071-WT und V2-HA-ECT2-WT exprimierten, wurden in der Prometaphase synchronisiert und 90 Minuten nach Entfernen des S-Mediums während der Zytokinese mit FA fixiert. Die Markierung von  $\alpha$ -Tubulin (rot) erfolgte mit Hilfe spezifischer Ak, die Markierung der DNA (blau) erfolgte mit DAPI. Das grün dargestellte BiFC-Signal zeigt den Ort der Interaktion von p0071 und ECT2. Die Balken entsprechen 10  $\mu$ m. (C, D) HEK293-Zellen wurden mit Plasmiden, die für V1-Flag-p0071-Arm, V2-HA-ECT2-NT bzw. V2-HA-ECT2-CT und RFP codieren, kotransfiziert. Die BiFC-Effizienz wurde 18 Stunden nach der Transfektion mittels Durchflusszytometrie analysiert. Um transfektionsbedingte Unterschiede bei der BiFC-Effizienz ausschließen zu können, wurde ausschließlich die YFP-Fluoreszenz (BiFC-Signal) der rot-fluoreszierenden Zellen bestimmt und im Diagramm dargestellt. Die Fehlerbalken geben die STABW aus drei unabhängigen Experimenten an, bei denen jeweils 5.000 rot-fluoreszierende Zellen analysiert wurden. (\*  $p \leq 0,05$ )

Um zu untersuchen, ob p0071 und ECT2 während der Zytokinese *in vivo* einen Komplex bilden können, wurden BiFC-Analysen durchgeführt (Abb. 3-10). Viele der untersuchten HEK293-Zellen, die V1-Flag-p0071-WT- und V2-HA-ECT2-WT-exprimierten, zeigten ein deutliches BiFC-Signal am Zentralkörper (Abb. 3-10 B; BiFC), was auf eine Assoziation von p0071 und ECT2 während der Zytokinese hinweist. Außerdem wurden die BiFC-Analysen mit der p0071-Arm-Domäne, sowie der N- und C-terminalen Domäne von ECT2 durchgeführt. Dabei konnte eine höhere BiFC-Effizienz zwischen p0071-Arm und ECT2-NT beobachtet werden als zwischen p0071-Arm und ECT2-CT (Abb. 3-10 C, D), wodurch die Hefe-Dihybrid-Untersuchungen prinzipiell betätigt werden konnten. Da p0071

mit RhoA interagiert, könnte das relativ deutliche BiFC-Signal zwischen p0071-Arm und ECT2-CT auch indirekt über an ECT2 gebundenes RhoA vermittelt werden. Das in der Hefe vorkommende RhoA-Homologe Rho1 ist offenbar nicht in der Lage als Bindeglied zwischen ECT2-CT und p0071-Arm zu fungieren.

Bisher konnte gezeigt werden, dass p0071 und ECT2 während der Zytokinese am Zentralkörper assoziiert vorliegen. Die Interaktion beider Proteine wird vermutlich von der regulatorischen Domäne (As 1-333) von ECT2 vermittelt (Abb. 3-10). Diese Daten lassen den Schluss zu, dass p0071 an der Modulation der RhoA-Aktivität auf zwei Wegen beteiligt sein könnte. Zum einen kann dies über die Stabilisierung von aktivem RhoA (Abs. 3.1.3) und zum anderen über die Interaktion mit dem Rho-GEF ECT2 erfolgen. Ob p0071 an der Regulation der ECT2-GDP/GTP-Austausch-Aktivität gegenüber RhoA beteiligt ist, wurde mittels *mant*-GTP (*N-methylanthrniloly*) untersucht. *Mant*-GTP emittiert nach Anregung bei 360 nm Licht mit einer Wellenlänge von 440 nm. Nach der Bindung an GTPasen verdoppelt sich die Fluoreszenzemission des *mant*-GTP, weshalb dieses benutzt werden kann, um die GDP/GTP-Austausch-Raten von GTPasen in Abhängigkeit von regulatorischen Proteinen zu untersuchen. ECT2 weist nur im hyperphosphorylierten Zustand eine GDP/GTP-Austausch-Aktivität gegenüber RhoA auf (TATSUMOTO *et al.*, 1999). Außerdem ist es sehr wahrscheinlich, dass auch p0071 während der Mitose modifiziert wird, um seine Funktionen wahrzunehmen. Aus diesem Grund wurde die GDP/GTP-Austausch-Analyse nicht mit rekombinantem ECT2 und p0071 durchgeführt. Stattdessen wurden ECT2-WT; ECT2-CT und p0071-WT als Flag-Fusionsproteine aus synchronisierten HEK293-Zellen in der Zytokinese aufgereinigt. Dabei konnte überraschenderweise für p0071 eine GDP/GTP-Austausch-Aktivität gegenüber RhoA beobachtet werden, die nahezu der von ECT2-WT entsprach. Außerdem wies ECT2 in Gegenwart von p0071-WT eine signifikante gesteigerte GDP/GTP-Austausch-Rate gegenüber RhoA auf (Abb. 3-11). Diese übertraf die Aktivität der GEF-Domäne von ECT2 (Flag-ECT2-CT), die theoretisch die maximale Aktivität haben sollte, die ECT2 gegenüber RhoA erreichen kann (KIM *et al.*, 2005). Dies lässt vermuten, dass p0071 nicht die GEF-Aktivität von ECT2 stimuliert. Vielmehr könnten beide Proteine im Komplex additiv den GDP/GTP-Austausch von RhoA katalysieren.



**Abb. 3-11: Der Einfluss von p0071 auf die GEF-Aktivität von ECT2 gegenüber RhoA**

In HEK293-Zellen wurden Flag-p0071-WT und Flag-ECT2-WT exprimiert. Die Zellen wurden in der Prometaphase synchronisiert, 90 Minuten nach dem Entfernen des S-Mediums während der Zytokinese lysiert und anschließend die Flag-Fusionsproteine über anti-Flag-Agarose aufgereinigt. Von diesen Präzipitaten wurde die GEF-Aktivität von ECT2 gegenüber RhoA mittels *mant*-GTP bestimmt. Nach der Bindung an GTPasen verdoppelt sich die Intensität des vom *mant*-GTP emittierten Fluoreszenzlichtes bei 440 nm. Über diesen Fluoreszenzanstieg konnte die GDP/GTP-Austausch-Aktivität der eingesetzten an anti-Flag-Agarose immobilisierten Proteine bestimmt werden. (A) Zunahme der *mant*-GTP-Fluoreszenzintensität über der Zeit (t) in Sekunden. Als Kontrolle dienten 30  $\mu$ l in RIPA-Puffer äquilibrierter anti-Flag-Agarose., sowie die über anti-Flag-Agarose präzipitierte ECT2-GEF-Domäne (Flag-ECT2-CT). (B) Im Diagramm ist der mittlere *mant*-GTP-Fluoreszenzintensitätsanstieg  $\pm$  STABW über die Zeit aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt. (\*  $p \leq 0,05$ ).

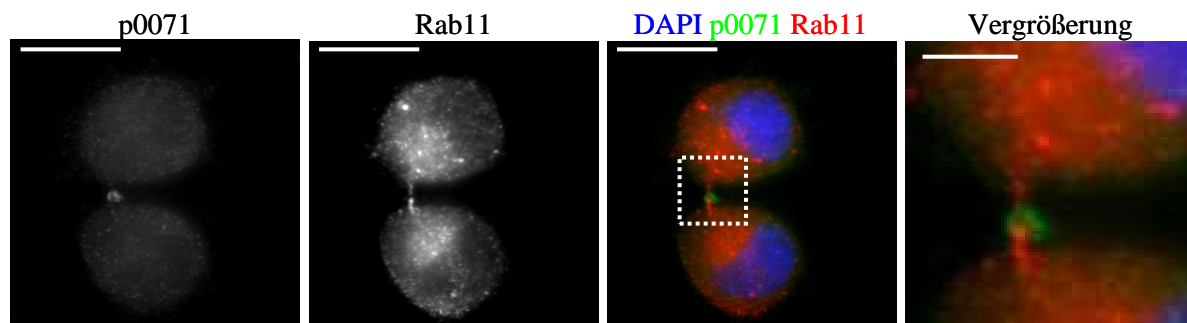
Zusammenfassend legen die in Abs. 3.1 gezeigten Daten eine Rolle von p0071 bei der RhoA-kontrollierten Assemblierung und Kontraktion des Aktomyosin-Ringes während der Zytokinese nahe. ECT2 und p0071 könnten in diesem Zusammenhang einen Komplex entlang der Teilungsfurche bilden, der den GDP/GTP-Austausch von RhoA stimuliert. p0071 stabilisiert vermutlich aktives RhoA, das dadurch effizienter über seine Effektoren ROK, Citron und mDia2 die Aktivierung von Myosin-II und die Polymerisierung von Aktin induziert.

## 3.2 Die Rolle von p0071 im Rab11-vermittelten Membrantransport während der Zytokinese

Neben der Reorganisation des Zytoskeletts kommt es im Verlauf der Zytokinese zum gerichteten Transport von Membranvesikeln zur Teilungsfurche. Die zusätzliche Membran wird für die Vergrößerung der Zelloberfläche im Verlauf der Einschnürung und schließlich für die Abschnürung der Tochterzellen benötigt. Es wurde beschrieben, dass die GTPase Rab11 zusammen mit Arf6, seinen Effektoren Rab11-FIP3 und Rab11-FIP4 sowie dem Exozyst-Komplex an Transport bzw. Fusion von Vesikeln während der Zytokinese beteiligt ist (Abs. 1.5.5). Vor Beginn dieser Arbeit wurde in einer Hefe-Dihybrid-Analyse Rab11 als möglicher Interaktionspartner von p0071 identifiziert. Aufgrund der gut charakterisierten Rolle von Rab11 während der Zytokinese wurde im Folgenden die mögliche Interaktion zwischen Rab11 und p0071 untersucht und versucht aufzuklären, ob p0071 in den Rab11-vermittelten Membrantransport während der Zytokinese involviert ist.

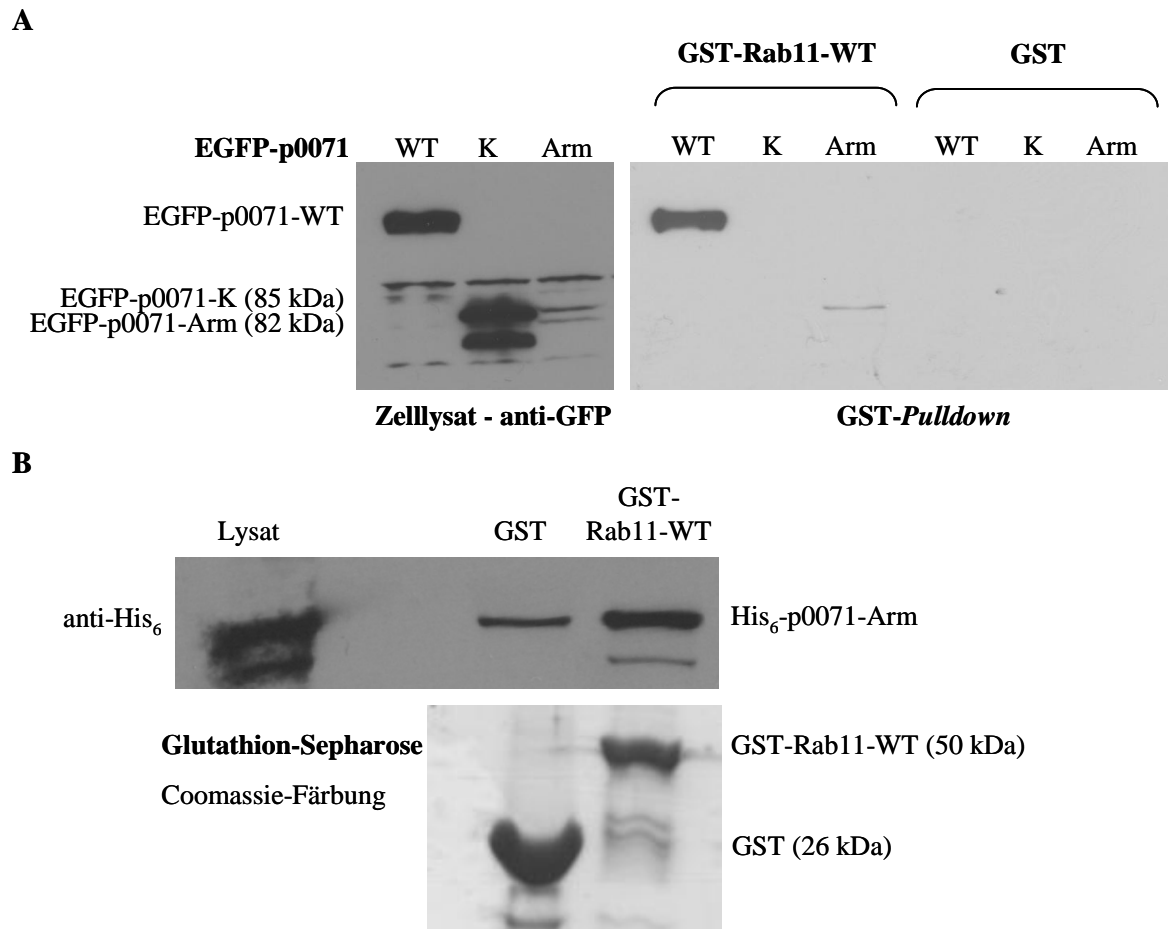
### 3.2.1 p0071 und Snapin sind an der Fusion Rab11-positiver Vesikel während der Zytokinese beteiligt

Um eine mögliche gemeinsame Rolle von p0071 und Rab11 beim Transport von Membranvesikeln zu untersuchen, wurde als erstes die Lokalisation beider Proteine während der Zytokinese analysiert (Abb. 3-12). In mit 10% TCA fixierten HeLa-Zellen wurden p0071 (grün) und Rab11 (rot) mit Hilfe spezifischer Ak markiert und die DNA (blau) mittels DAPI gefärbt. Rab11, das im Verlauf der Mitose diffus im Zytoplasma verteilt vorliegt, lokalisiert während der Zytokinese entlang der zytoplasmatischen Brücke, welche die Tochterzellen verbindet. p0071 akkumuliert, wie schon beschrieben, am Zentralkörper.



**Abb. 3-12: Rab11 und p0071 zeigen eine überlappende Lokalisation am Zentralkörper**

HeLa-Zellen wurden mit 10% TCA fixiert und anschließend p0071 (grün) und Rab11 (rot) mit spezifischen Ak markiert. Die DNA (blau) wurde mittels DAPI gefärbt. Die Balken entsprechen 10 µm bzw. 5 µm in den Vergrößerungen der weiß umrandeten Regionen.



### Abb. 3-13: Rab11 interagiert mit p0071 über dessen Arm-Domäne

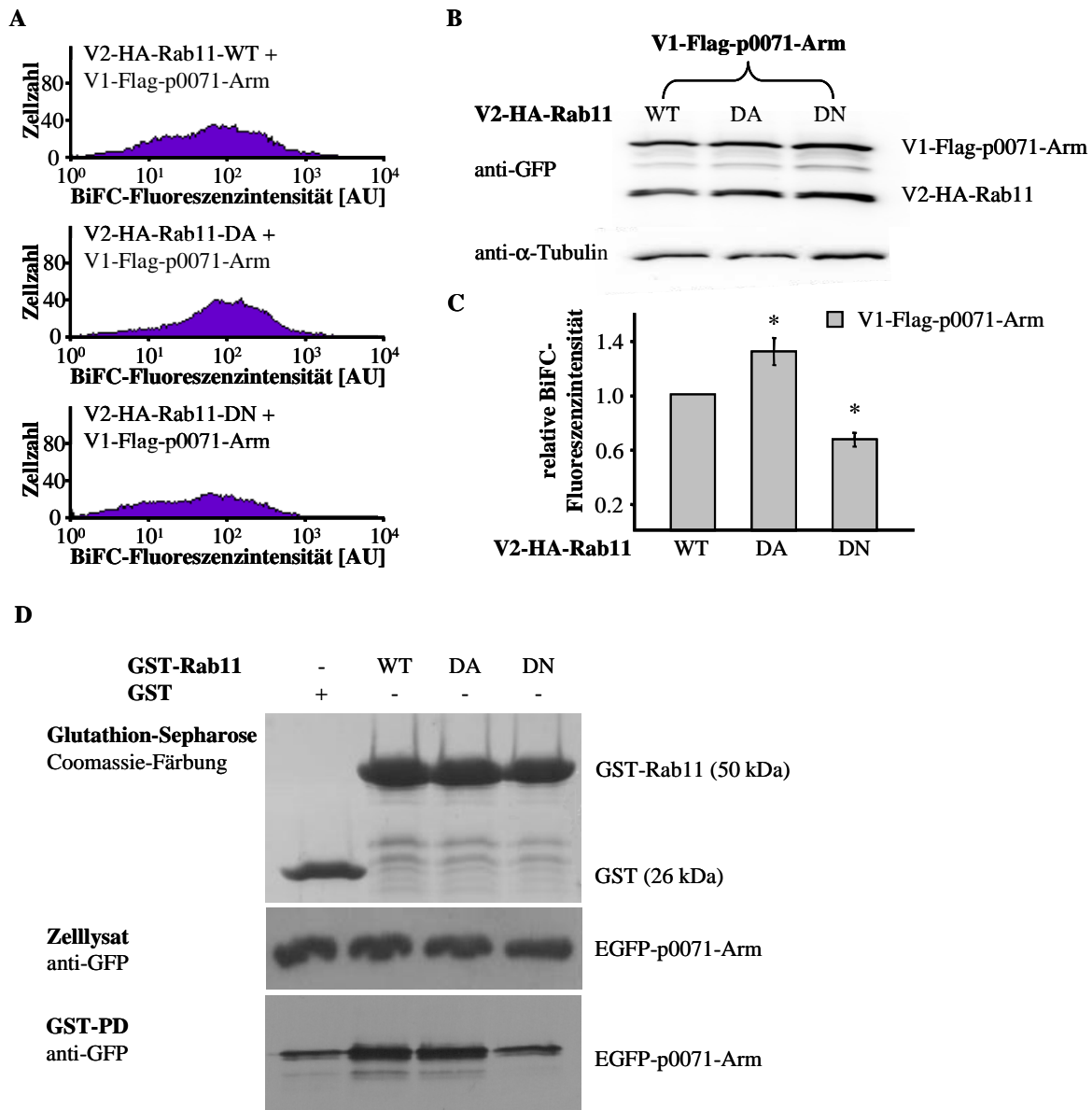
(A) In HEK293-Zellen exprimierte EGFP-Fusionsproteine (Zelllysate) von p0071-WT, der p0071-Kopf-Domäne (As 1-509; K) und der p0071-Arm-Domäne (As 510-989; Arm) wurden mit bakteriell exprimiertem, an Glutathion-Sepharose immobilisiertem GST-Rab11-WT bzw. GST inkubiert. Die Bindung von EGFP-p0071-WT, -K bzw. Arm an GST-Rab11-WT und GST wurde mittels WB analysiert (GST-Pulldown). (B) Bakteriell exprimiertes His<sub>6</sub>-p0071-Arm wurden mit bakteriell exprimiertem, an Glutathion-Sepharose immobilisiertem GST-Rab11-WT bzw. GST inkubiert. Die Bindung von His<sub>6</sub>-p0071-Arm an die verwendete Glutathion-Sepharose wurde mittels WB untersucht.

Zur Untersuchung der möglichen Interaktion zwischen Rab11 und p0071 wurden in HEK293-Zellen p0071-WT, die p0071-Kopf- und die p0071-Arm-Domäne als EGFP-Fusionsproteine exprimiert. Die entsprechenden Lysate wurden mit bakteriell exprimiertem, an Glutathion-Sepharose immobilisiertem GST-Rab11-WT inkubiert. Die Bindung von p0071-WT, p0071-Kopf und p0071-Arm an GST-Rab11-WT wurde mittels WB untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass p0071-WT mit Rab11-WT interagiert. Diese Interaktion wird über die Arm-Domäne von p0071 vermittelt, die trotz schwacher Expression in HEK293-Zellen deutlich im Eluat der Rab11-WT-Glutathion-Sepharose nachgewiesen werden konnte. Die Kopf-Domäne von p0071, deren Expression in HEK293-Zellen sehr viel stärker war, zeigte dagegen keine Interaktion mit Rab11. Um die Spezifität der Interaktion zu zeigen, wurden die HEK293-Lysate ebenfalls mit bakteriell exprimiertem, an Glutathion-

Sepharose immobilisiertem GST durchgeführt. In den entsprechenden Eluaten konnten keines der exprimierten p0071-Fusionsproteine nachgewiesen werden (Abb. 3-13 A). Um zu untersuchen, ob Rab11 und die p0071-Arm-Domäne direkt interagieren oder deren Interaktion über unbekanntes Protein im HEK293-Zelllysat vermittelt wird, wurde bakteriell exprimiertes His<sub>6</sub>-p0071-Arm sowohl mit an Glutathion-Sepharose immobilisiertem GST-Rab11-WT als auch mit immobilisiertem GST inkubiert. Auch dabei konnte eine spezifische Bindung der p0071-Arm-Domäne an GST-Rab11 gezeigt werden (Abb. 3-13 B). Zusammen mit der im Hefe-System gefundenen Interaktion zwischen Rab11 und der p0071-Arm-Domäne weisen diese Experimente auf eine direkte Interaktion zwischen p0071 und Rab11 *in vitro* hin.

Als GTPase kann Rab11 zwischen dem inaktiven GDP-gebundenen und dem aktiven GTP-gebundenen Zustand wechseln (Abs. 1.4). Um zu untersuchen, ob die Interaktion von p0071 mit Rab11 abhängig von der Rab11-Aktivität ist, wurden BiFC-Analysen durchgeführt. HEK293-Zellen wurden mit Plasmiden, die für V1-Flag-p0071-Arm, V2-HA-Rab11-WT, -DA oder -DN und RFP codieren, transfiziert. 18 Stunden nach der Transfektion wurde die Fluoreszenz des RFP genutzt, um transfizierte Zellen mittels Durchflusszytometrie zu identifizieren. Gleichzeitig wurde die Fluoreszenzintensität des rekonstituierten YFP (BiFC) gemessen. Um Unterschiede der BiFC-Effizienz ausschließen zu können, die auf eine unterschiedliche Expression der verwendeten Konstrukte zurückzuführen ist, wurde deren Expression mittels WB analysiert (Abb. 3-14 B). Trotz gleicher Expression der eingesetzten Konstrukte war die BiFC-Effizienz zwischen Rab11-DA und p0071-Arm im Vergleich zu Rab11-WT und p0071-Arm signifikant auf 140% erhöht. Die BiFC-Effizienz zwischen Rab11-DN und p0071-Arm war dagegen deutlich geringer (60% im Vergleich zu Rab11-WT; Abb. 3-14 A und C). Um diesen Effekt in einem unabhängigen System untersuchen zu können, wurde Zelllysate von EGFP-p0071-Arm-exprimierenden HEK293-Zellen mit rekombinant hergestelltem, an Glutathion-Sepharose immobilisiertem GST-Rab11-WT, -DA bzw. -DN inkubiert und diese anschließend auf die Bindung von EGFP-p0071-Arm mittels WB untersucht (Abb. 3-14 D). Dabei konnte gezeigt werden, dass die Arm-Domäne von p0071 mit Rab11-WT und Rab11-DA *in vitro* deutlich stärker interagiert als mit Rab11-DN. Das zur Kontrolle an Glutathion-Sepharose immobilisierte GST bindet EGFP-p0071-Arm im gleichen Maß wie Rab11-DN. Die durch die Bindung von GTP an Rab11 induzierte Konformationsänderung scheint demnach auch die Interaktion zwischen Rab11 und p0071 zu beeinflussen.

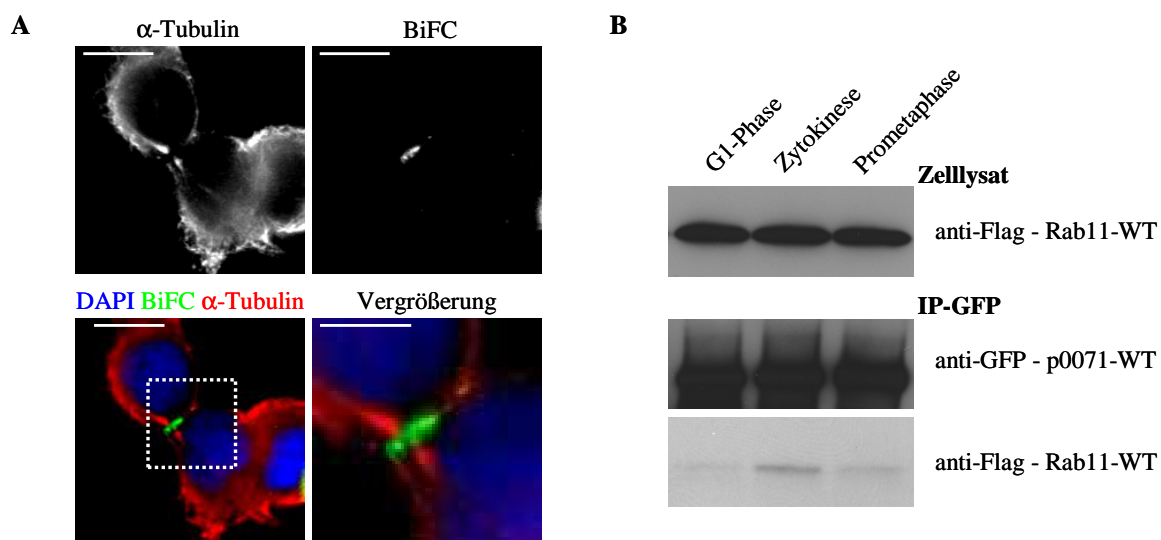




**Abb. 3-14: Die Arm-Domäne von p0071 interagiert bevorzugt mit aktivem Rab11**

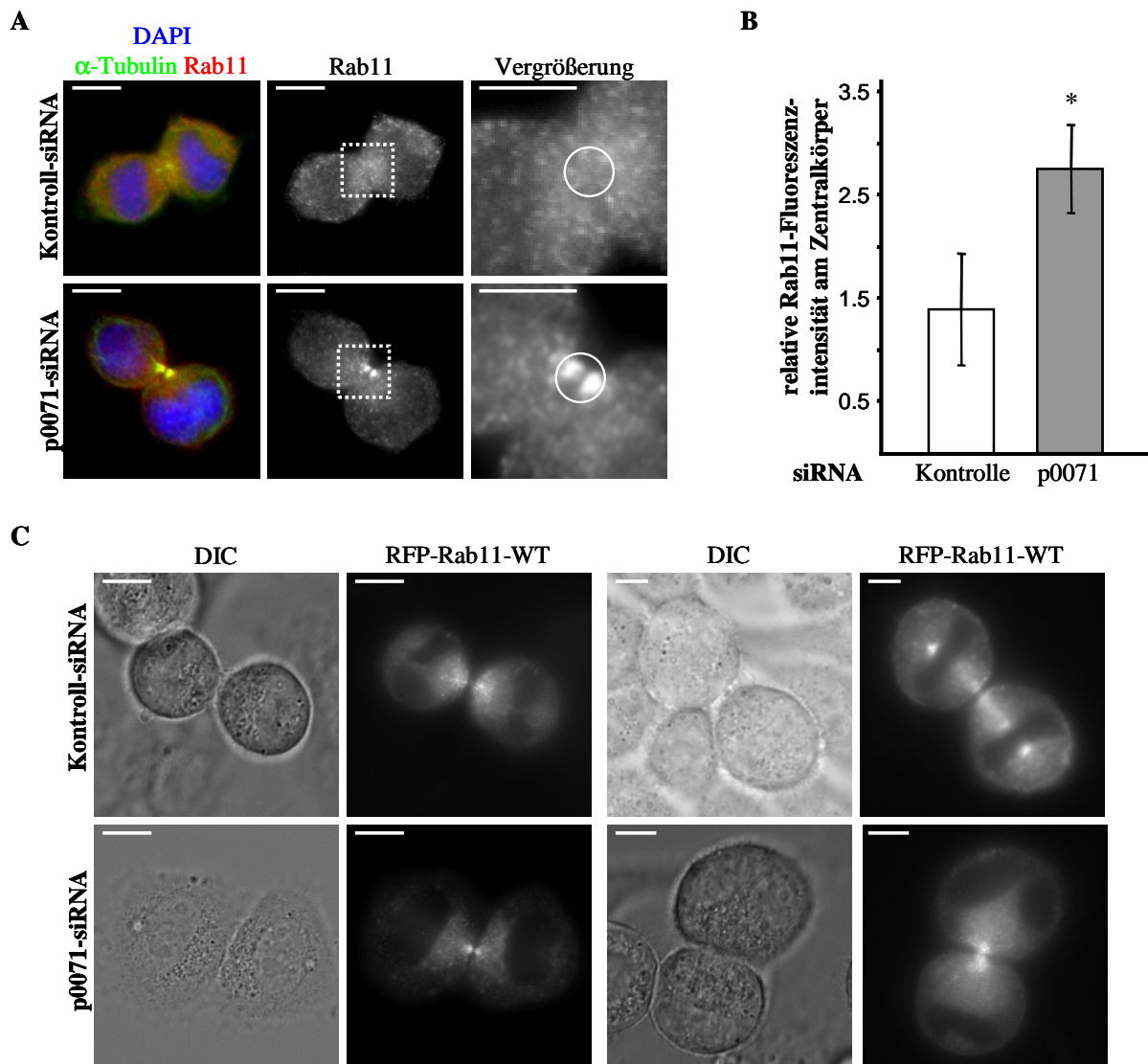
HEK293-Zellen wurden für BiFC-Analysen mit Plasmiden transfiziert, die für V1-Flag-p0071-Arm, V2-HA-Rab11-WT, -DA oder -DN und RFP codieren. (A) 18 Stunden nach der Transfektion wurde die Fluoreszenz des rekonstituierten YFP der RFP-exprimierenden Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. (B) Um auszuschließen, dass die dargestellten Unterschiede in der BiFC-Effizienz auf eine unterschiedliche Expression der Interaktionspartner zurückzuführen ist, wurde deren Expression mittels WB untersucht, wobei ein GFP-Serum zum Einsatz kam, mit dem sowohl V1 als auch V2 detektiert werden können. (C) Im Diagramm sind die mittleren BiFC-Effizienzen zwischen p0071-Arm und Rab11-WT, -DA bzw. -DN aus drei unabhängigen Experimenten aufgetragen. Dazu wurde jeweils die Fluoreszenzintensität des rekonstituierten YFP (BiFC) von mind. 5.000 RFP-exprimierenden Zellen bestimmt. Die Fehlerbalken geben die STABW aus drei unabhängigen Experimenten an. (\*  $p \leq 0,05$ ) (D) In HEK293-Zellen wurde EGFP-p0071-Arm exprimiert. Das Zelllysate wurde mit bakteriell exprimiertem und an Glutathion-Sepharose immobilisiertem GST, GST-Rab11-WT, -DA und -DN inkubiert. Die Mengen der an der Glutathion-Sepharose immobilisierten bakteriell exprimierten Proteine wurden durch Coomassie-Färbung des entsprechenden SDS-Polyacrylamid-Gels überprüft. Die Eluate wurden mittels WB auf Anwesenheit von EGFP-p0071-Arm mit einem spezifischen Ak gegen GFP analysiert.

Die Interaktion von Rab11 und p0071 sowie die für beide Proteine beschriebenen Funktionen in der Zytokinese lassen die Vermutung zu, dass es dabei für p0071 und Rab11 eine gemeinsame Funktion gibt. Um dies zu untersuchen wurde zuerst analysiert, ob beide Proteine während der Zytokinese einen Komplex *in vivo* bilden können. Für die BiFC-Analyse wurden V1-Flag-p0071-WT und V2-HA-Rab11-WT in HEK293-Zellen exprimiert, in der Prometaphase synchronisiert und diese im entsprechenden Mitosestadium mit FA fixiert. Mit Hilfe spezifischer Ak wurde  $\alpha$ -Tubulin (rot) markiert. Die Färbung der DNA (blau) erfolgte mit DAPI. Das BiFC-Signal, das auf einen Komplex aus Rab11-WT und p0071-WT hindeutet, ist deutlich um den Zentralkörper am Ort der Abschnürung lokalisiert (Abb. 3-15 A). In mitotischen Zellen, von Prometaphase bis Anaphase zeigte sich wie bei den BiFC-Analysen zwischen p0071 und RhoA ein schwaches diffuses BiFC-Signal im Zytoplasma (Abb. 3-8). Mit Hilfe einer IP konnte zusätzlich gezeigt werden, dass während der Zytokinese deutlich mehr Flag-Rab11-WT mit EGFP-p0071-WT präzipitiert werden konnte als in der Prometaphase und der G1-Phase (Abb. 3-15 B). Hierfür wurden Flag-Rab11-WT und EGFP-p0071-WT exprimierende HEK293-Zellen in der Prometaphase synchronisiert und IPs mit Zelllysaten von verschiedenen Zeitpunkten nach dem Entfernen des S-Mediums angefertigt (0 Minuten - Prometaphase; 90 Minuten - Zytokinese; 240 Minuten - G1 - Phase).



**Abb. 3-15: Rab11 und p0071 interagieren während der Zytokinese**

(A) HEK293-Zellen wurden mit Plasmiden, die für V1-Flag-p0071-WT bzw. V2-HA-Rab11-WT codieren, kotransfiziert und anschließend in der Prometaphase synchronisiert. 90 Minuten nach dem Entfernen des S-Mediums wurden die Zellen mittels FA fixiert und  $\alpha$ -Tubulin (rot) mit spezifischen Ak sowie die DNA (blau) mit DAPI markiert. Das BiFC-Signal, das den Ort der Interaktion von p0071 und Rab11 anzeigt, ist grün dargestellt. (B) HEK293-Zellen wurden mit Plasmiden, die für Flag-Rab11-WT bzw. EGFP-p0071-WT codieren, kotransfiziert und synchronisiert. Nach Erreichen der Prometaphase, der Zytokinese bzw. der G1-Phase wurden die Zellen lysiert und die Lysate mit an Protein A-Sepharose immobilisiertem anti-GFP-Ak inkubiert. Die Eluate wurden anschließend mittels WB auf Anwesenheit von EGFP-p0071-WT (IP-GFP - anti-GFP) und Flag-Rab11-WT (IP-GFP - anti-Flag) analysiert.

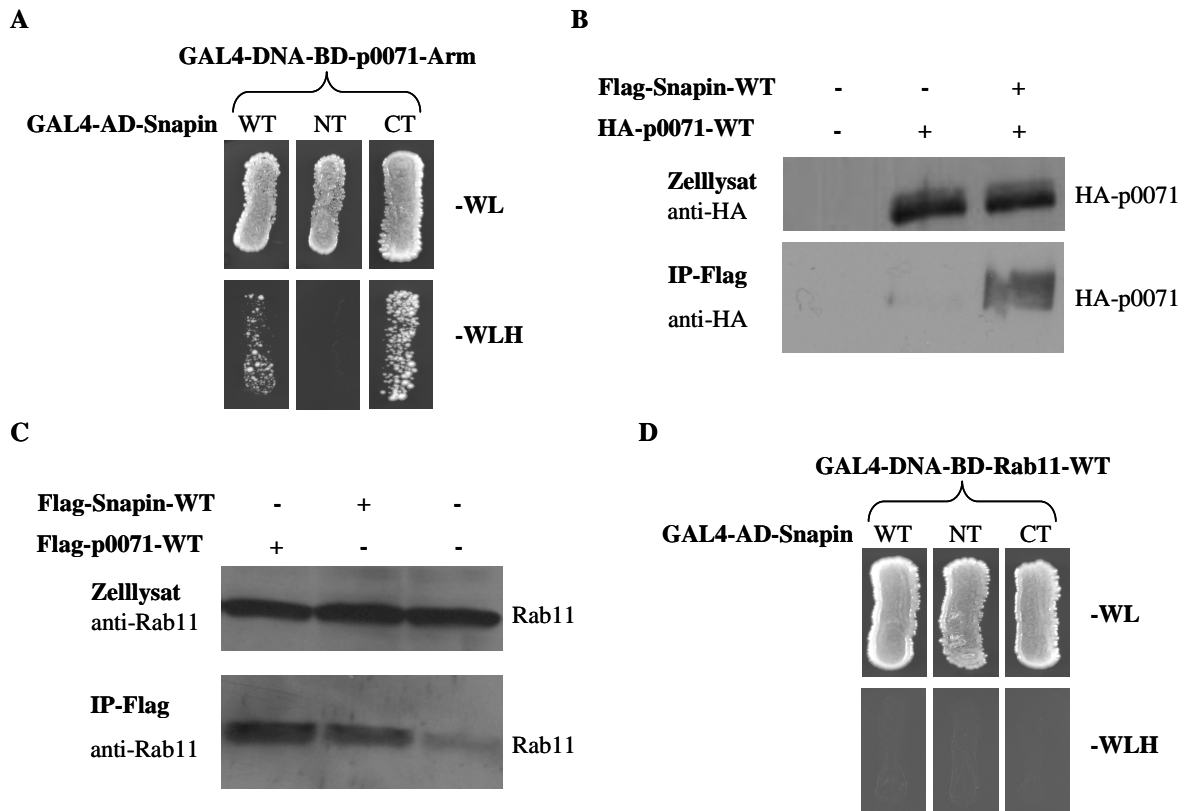


**Abb. 3-16: Die Verringerung der p0071-Expression geht mit der Akkumulation von Rab11 an der Teilungsfurche einher**

(A, B) HeLa-Zellen wurden mit Kontroll- bzw. p0071-siRNA transfiziert, synchronisiert und 90 Minuten nach Entfernen des S-Mediums mit 10% TCA fixiert. Rab11 (rot) und  $\alpha$ -Tubulin (grün) wurden mit spezifischen Ak und die DNA (blau) mittels DAPI markiert. Die Balken in (A) entsprechen 10  $\mu$ m bzw. 5  $\mu$ m in den Vergrößerungen. (B) Zur Quantifizierung der p0071-siRNA-induzierten Rab11-Akkumulation wurde die Rab11-Fluoreszenzintensität am Zentralkörper (Kreisfläche von 4,9  $\mu$ m<sup>2</sup>) durch die Rab11-Fluoreszenzintensität der gesamten Zellen geteilt und der mittlere Quotient  $\pm$  STABW von jeweils 30 vermessenen Zellen aus zwei unabhängigen Experimenten im Diagramm dargestellt. (\*  $p \leq 0,05$ ) (C) RFP-Rab11-WT exprimierende HeLa-Zellen wurden mit Kontroll- bzw. p0071-siRNA transfiziert. 48 Stunden nach der siRNA-Transfektion wurde die Rab11-Lokalisation in lebenden, sich teilenden Zellen anhand der Fluoreszenz des RFP verfolgt. Zellen in der Zytokinese wurden mittels DIC (Differentialer Interferenz Kontrast) über den dann sichtbaren Zentralkörper identifiziert. Die Balken entsprechen 10  $\mu$ m.

Die gezeigten Experimente deuten auf die Existenz eines Komplexes aus Rab11 und p0071 sowie auf eine gemeinsame Funktion beider Proteine während der Zytokinese hin. p0071 könnte sowohl am Transport von Rab11-Vesikeln als auch an deren Bindung an die bzw. an deren Fusion mit der Zielmembran beteiligt sein. Um zwischen diesen Möglichkeiten

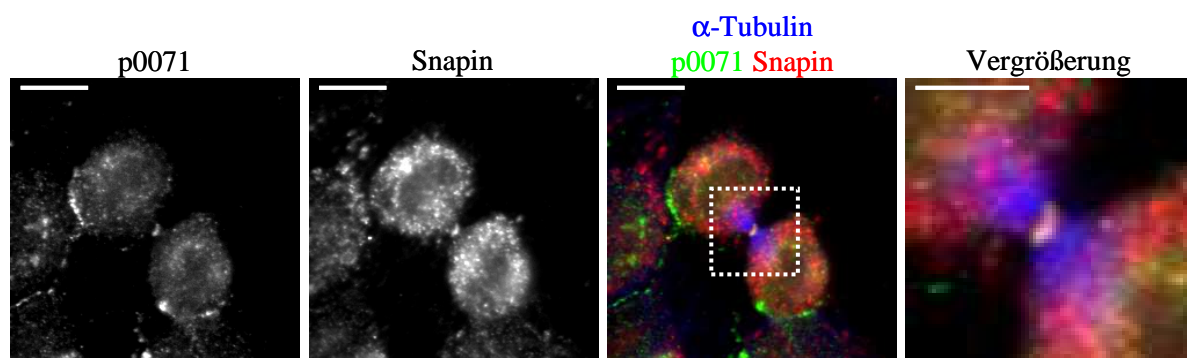
zu unterscheiden, wurde die Expression von p0071 in HeLa-Zellen verringert. Diese Zellen wurden anschließend synchronisiert und die Rab11-Lokalisation während der Zytokinese analysiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass sowohl endogenes (Abb. 3-16 A, B) als auch exogenes (Abb. 3-16 C) Rab11 in HeLa-Zellen mit verringerter p0071-Expression um den Zentralkörper akkumulierte. Dies legt nahe, dass Rab11 unabhängig von p0071 zum Zentralkörper transportiert wird. Die Akkumulation von Rab11-Vesikel deutet vielmehr auf eine Funktion von p0071 beim „Andocken“ und/oder der Fusion dieser Vesikel hin.



**Abb. 3-17: Rab11, p0071 und Snapin bilden einen Komplex**

(A) YRG2-Hefe-Zellen wurden mit Plasmiden, die für GAL4-DNA-BD-p0071-Arm und GAL4-AD-Snapin-WT, -NT oder -CT codieren, kotransformiert. Zur Selektion der kotransformierten Hefe-Zellen wurden diese auf SD-Agarplatten ohne Tryptophan und Leucin (-WL) ausplattiert. Das gleichzeitige Wachstum dieser Hefen auf SD-Agarplatten, denen außerdem Histidin (-WLH) fehlte, zeigt durch die dafür notwendige Aktivierung des Reportergens *his3* die Interaktion der exprimierten Proteine an. (B) HEK293-Zellen wurden mit Plasmiden die für Flag-Snapin-WT und HA-p0071-WT codieren, kotransfiziert. Die Lysate wurden mit anti-Flag-Agarose inkubiert und die Eluate mittels WB auf die Anwesenheit von p0071 untersucht (IP-Flag - anti-HA). Um die unspezifische Bindung von p0071 an die anti-Flag-Agarose ausschließen zu können wurden Lysate von untransfizierten HEK293-Zellen und von nur HA-p0071-WT exprimierenden HEK293-Zellen eingesetzt. Die Menge an p0071 in den eingesetzten Lysaten wurde ebenfalls im WB analysiert (Zellysat - anti-HA). (C) Lysate von HEK293-Zellen, die entweder Flag-p0071-WT oder Flag-Snapin-WT exprimierten, wurden mit anti-Flag-Agarose inkubiert. Die entsprechenden Eluate wurden mittels WB auf die Anwesenheit von endogenem Rab11 untersucht (IP-Flag - anti-Rab11). Lysat von untransfizierten HEK293-Zellen diente als Spezifitätskontrolle. (D) Die Analysen zur Interaktion von Rab11-WT mit Snapin-WT, -NT und -CT wurden in YRG2-Zellen, wie unter (A) beschrieben, durchgeführt.

Die Hypothese, dass p0071 an der Fusion von Rab11-positiven Vesikeln beteiligt sein könnte, wird durch die Identifizierung von Snapin als weiteren potentiellen Interaktionspartner von p0071 mittels Hefe-Dihybrid-Analyse unterstützt. Snapin ist ein ursprünglich an der Membran von synaptischen Vesikeln beschriebenes SNARE-assoziiertes Protein (ILARDI *et al.*, 1999). Auch für Snapin wurde eine Funktion im Zusammenhang mit Vesikelfusionsprozessen während der Zytokinese beschrieben (GROMLEY *et al.*, 2005). Zur Verifizierung der Interaktion zwischen p0071 und Snapin wurden Snapin-WT (As 1-136), Snapin-NT (As 1-78) und Snapin-CT (As 79-136) als GAL4-AD-Fusionsprotein zusammen mit p0071-Arm als GAL4-DNA-BD-Fusionsprotein in Hefestamm YRG2 koexprimiert (Abb. 3-17 A; -WL). Über die Aktivierung des Reportergens *his3* konnte gezeigt werden, dass die Arm-Domäne von p0071 im Hefe-System mit Snapin-WT und der C-terminalen Domäne von Snapin interagiert (Abb. 3-17 A; -WLH). Mit Hilfe einer Flag-IP konnte außerdem gezeigt werden, dass in HEK293-Zellen exprimiertes HA-p0071-WT mit Flag-Snapin-WT im Komplex vorliegt (Abb. 3-17 B). Interessanterweise konnte endogenes Rab11 sowohl mit Flag-p0071-WT als auch mit Flag-Snapin-WT präzipitiert werden (Abb. 3-17 C). Diese Ergebnisse lassen zwei Schlussfolgerungen zu: Zum einen könnten zwei unabhängige Komplexe, bestehend aus Rab11 und p0071 bzw. Rab11 und Snapin, *in vivo* gebildet werden. Zum anderen besteht die Möglichkeit, dass in einem Komplex aus p0071, Rab11 und Snapin, p0071 Rab11-positive Vesikel über Snapin an den SNARE-Komplex der Zielmembran bindet. Die Untersuchungen im Hefestamm YRG2, die keine Interaktion zwischen Rab11 und Snapin zeigten, sprechen für die Existenz eines Rab11-p0071-Snapin-Vesikel-Fusionskomplexes *in vivo* (Abb. 3-17 D), schließen aber die Existenz von zwei unabhängigen Komplexen *in vivo* nicht aus.

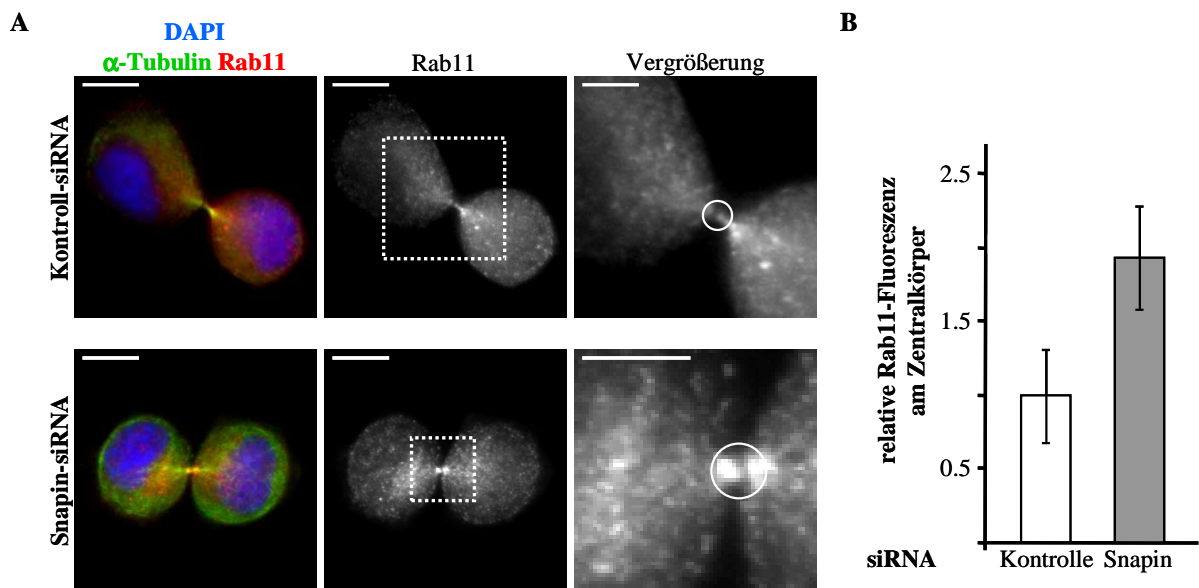


**Abb. 3-18: Snapin und p0071 kolokalisieren während der Zytokinese am Zentralkörper**

In mit Methanol fixierte HeLa-Zellen wurden mittel spezifischer Ak  $\alpha$ -Tubulin (blau), p0071 (grün) und Snapin (rot) markiert. Die Balken entsprechen 10  $\mu$ m bzw. 5  $\mu$ m in den Vergrößerungen.

Für eine gemeinsame Rolle von p0071 und Snapin bei der Fusion von Rab11- Vesikeln spricht auch die Lokalisation von Snapin im Verlauf der Zytokinese. Snapin akkumuliert

zusammen mit p0071 am Zentralkörper (Abb. 3-18), während Rab11 entlang der zytoplasmatischen Brücke lokalisiert, welche die Tochterzellen miteinander verbindet (Abb. 3-12). Dieser funktionelle Zusammenhang zwischen Rab11 und Snapin konnte durch den Einsatz Snapin-spezifischer siRNAs gezeigt werden. In HeLa-Zellen, deren Snapin-Expression mittels siRNA reduziert wurde, akkumulierte Rab11 während der Zytokinese stark am Zentralkörper, während in den Kontroll-siRNA-transfizierten HeLa-Zellen Rab11 dort nur leicht angereichert vorlag (Abb. 3-19). Dies impliziert, dass Snapin auch an der Fusion von Rab11-Vesikeln während der Zytokinese beteiligt ist.



**Abb. 3-19: Die Verringerung der Snapin-Expression mittels siRNA induziert die Akkumulation von Rab11 am Zentralkörper**

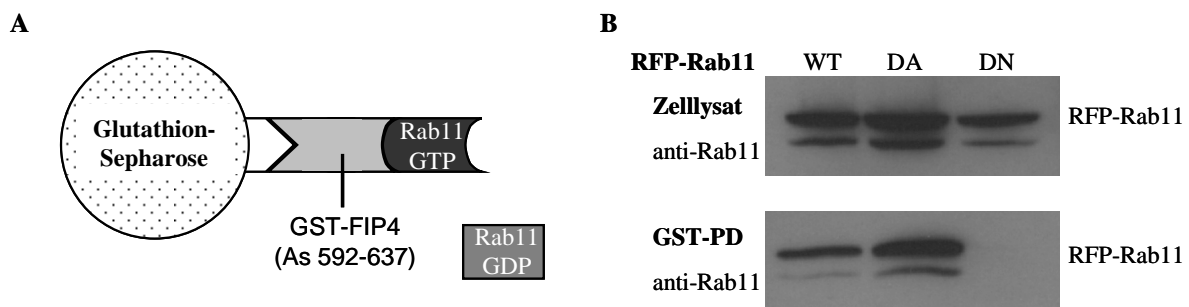
(A) HeLa-Zellen wurden mit Kontroll- bzw. Snapin-siRNA transfiziert, synchronisiert und 90 Minuten nach Entfernen des S-Mediums mit Methanol fixiert. Rab11 (rot) und  $\alpha$ -Tubulin (grün) wurden mittels spezifischer Ak und die DNA (blau) mit DAPI markiert. Zellen, die sich in der Zytokinese befanden, wurden auf die Lokalisation von Rab11 am Zentralkörper analysiert. Die Balken entsprechen  $10\ \mu\text{m}$  bzw.  $5\ \mu\text{m}$  in den Vergrößerungen. (B) Zur Quantifizierung der Snapin-siRNA-induzierten Rab11-Akkumulation wurde die Rab11-Fluoreszenzintensität am Zentralkörper (Kreisfläche von  $4,9\ \mu\text{m}^2$ ) durch die Rab11-Fluoreszenzintensität der gesamten Zellen geteilt und der mittlere Quotient  $\pm$  STABW von jeweils 15 vermessenen Zellen im Diagramm dargestellt.

Die in diesem Abschnitt aufgeführten Experimente legen nahe, dass p0071 sowohl mit Rab11 als auch mit Snapin eine direkte Interaktion eingehen kann (Abb. 3-13 und Abb. 3-17). Da auch Rab11 und Snapin *in vivo* einen Komplex bilden, jedoch vermutlich nicht direkt miteinander interagieren, könnte p0071 die Interaktion zwischen beiden Proteinen vermitteln (Abb. 3-17). Die These wird von der Beobachtung gestützt, dass die Behandlung von Zellen mit p0071- oder Snapin-siRNA die Akkumulation von Rab11 am Zentralkörper zur Folge hatte (Abb. 3-16 und Abb. 3-19), woraus außerdem auf eine gemeinsame Funktion von p0071 und Snapin bei der Fusion von Rab11-Vesikeln geschlossen werden kann. Die Regulation der Interaktion zwischen p0071 und Rab11 erfolgt vermutlich über die Aktivität von Rab11, da

die Affinität von p0071 zu aktivem Rab11 höher zu sein scheint als zu inaktivem Rab11 (Abb. 3-14).

### 3.2.2 Das Rho-GEF ECT2 ist an der Regulation der Rab11-Aktivität während der Zytokinese beteiligt

Die Aktivität von Rab11 wird, wie die von allen Mitgliedern der Ras-ähnlichen GTPasen, über GEFs, GAPs und GDIs reguliert. Nur aktives GTP-gebundenes Rab11 ist in der Lage mit seinen Effektoren zu interagieren und darüber die für die Zytokinese essentiellen Funktionen zu vermitteln (Abs. 1.4). Trotz der identifizierten Effektoren FIP3 und FIP4 ist bisher nichts über die Regulation der Rab11-Aktivität im Verlauf der Mitose bekannt. Informationen zu dieser Regulation könnten wie im Fall von RhoA wichtige Informationen zur Aufklärung der räumlichen und zeitlichen Koordination der Membrantransportprozesse während der Zytokinese liefern.

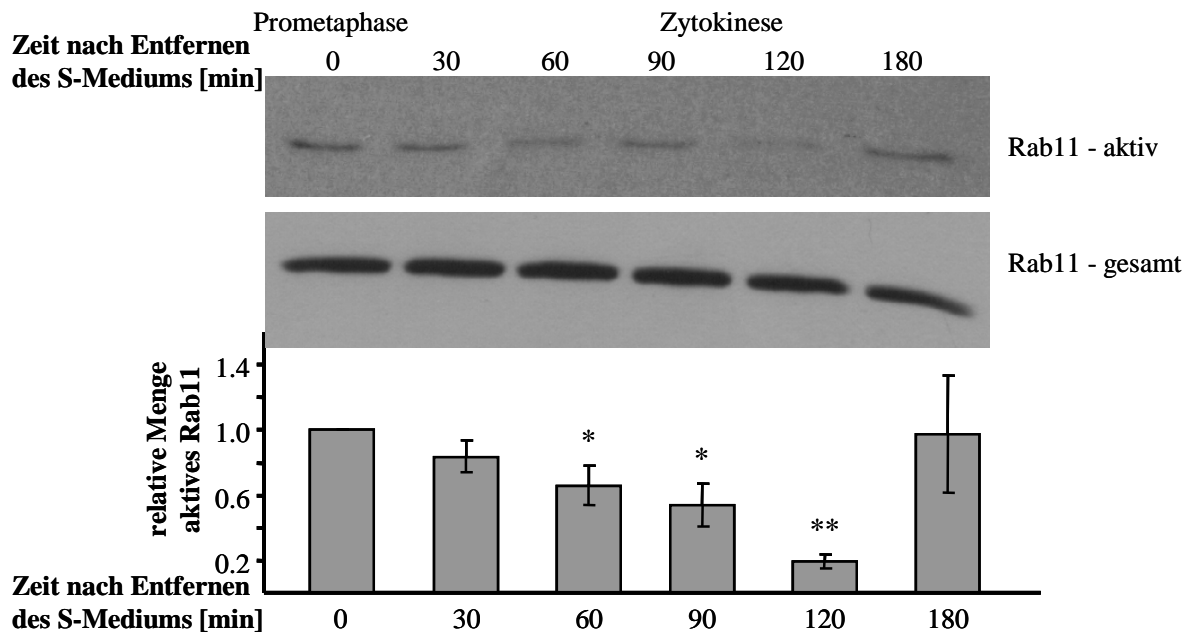


**Abb. 3-20: Die an Glutathion-Sepharose immobilisierte Rab11-Bindedomäne vom Rab11-Effektor FIP4 präzipitiert aktives Rab11 aus Zellysaten**

(A) Schematische Darstellung des Rab11-Aktivitätstests mit an Glutathion-Sepharose immobilisierter Rab11-Bindedomäne von FIP4 (FIP4-Sepharose), die nur aktives GTP-gebundenes Rab11 aus Zellysaten präzipitieren sollte. (B) Um die Funktionalität der FIP4-Sepharose zu testen, wurde in HEK293-Zellen RFP-Rab11-WT, -DA bzw. -DN exprimiert und dies mittels WB überprüft (Zellysat - anti-Rab11). Die Lysate wurde anschließend mit FIP4-Agarose inkubiert und die Bindung von RFP-Rab11 an diese durch WB-Analysen untersucht (GST-PD - anti-Rab11).

Da es zur Analyse der Rab11-Aktivität kein etabliertes Testsystem wie im Fall von RhoA gibt, wurde, um die Aktivität von Rab11 während der Zytokinese analysieren zu können, ein Rab11-Aktivitätstest entworfen. Dafür wurde die Rab11-Bindedomäne (As 592-637) vom Rab11-Effektor FIP4 bakteriell als Fusionsprotein mit GST exprimiert und dieses Fusionsprotein an Glutathion-Sepharose immobilisiert (FIP4-Sepharose). Da Rab11 nur im aktiven GTP-gebundenem Zustand mit seinen Effektoren interagiert, wurde die FIP4-Sepharose dazu eingesetzt, um aktives Rab11 aus Zellysaten zu präzipitieren (Abb. 3-20 A). Um zunächst das Testsystem zu validieren, wurden HEK293-Zellen mit Plasmiden transfiziert, die für RFP-Rab11-WT, -DA bzw. -DN codieren und die Lysate mit der FIP4-Sepharose inkubiert. Die Eluate wurden im WB auf die Anwesenheit von Rab11 analysiert. Dabei

konnte gezeigt werden, dass Rab11-DA am besten von der FIP4-Sepharose präzipitiert werden konnte. Trotz gleicher eingesetzter Rab11-Mengen wurde deutlich weniger RFP-Rab11-WT aus Zelllysaten präzipitiert und kaum RFP-Rab11-DN. Daraus kann geschlossen werden kann, dass inaktives Rab11 nicht an die FIP4-Sepharose bindet und dass aus Rab11-WT exprimierenden Zellen präzipitiertes RFP-Rab11 im aktiven Zustand an die FIP4-Sepharose gebunden haben muss (Abb. 3-20 B).



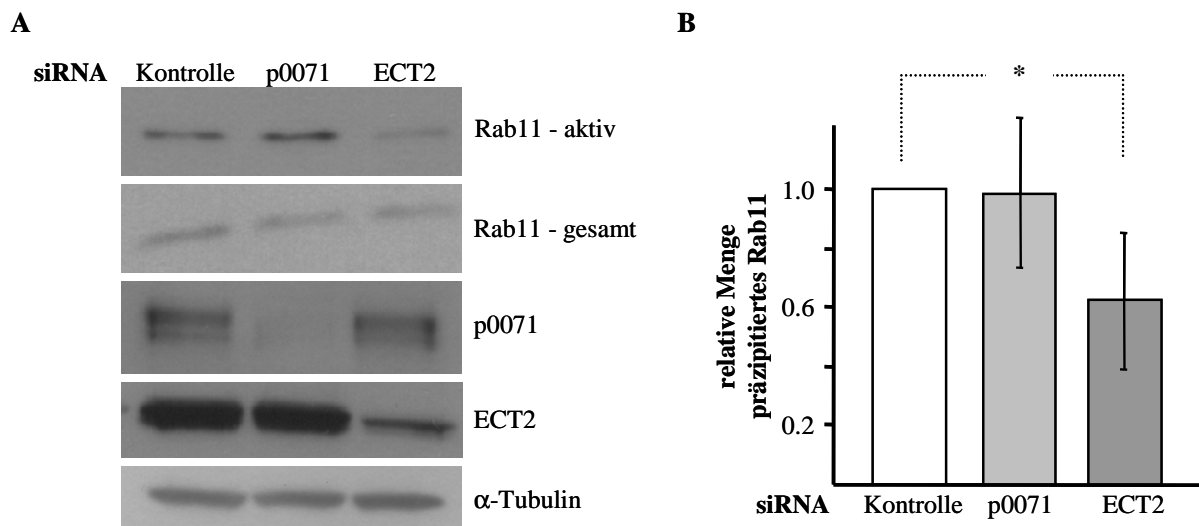
**Abb. 3-21: Die Menge an aktivem Rab11 in der Zelle nimmt im Verlauf der Mitose ab**

HeLa-Zellen wurden in der Prometaphase synchronisiert und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Entfernen des S-Mediums lysiert. Die Lysate wurde mit FIP4-Sepharose inkubiert und auf Anwesenheit von Rab11 mittels WB analysiert. Zur Normierung wurde jeweils die Menge an präzipitiertem Rab11 (aktiv) durch die Menge an eingesetztem Rab11 (gesamt) geteilt und relativ zum Kontrollwert (0 min) aufgetragen. Im Diagramm ist die mittlere relative Menge an präzipitiertem (aktivem) Rab11  $\pm$  STABW aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt. (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,005$ )

Um zu untersuchen, ob und wie sich die Aktivität von Rab11 während der Mitose verändert, wurden HeLa-Zellen in der Prometaphase synchronisiert und zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem Entfernen des S-Mediums lysiert. Zu Beginn des Experiments befanden sich ca. 80% bis 90% der Zellen in der Prometaphase (0 min). Ca. 70% der Zellen durchliefen die Mitosestadien Metaphase (30 min), Anaphase (60 min), Telophase (90 min) und Telophase/Abschnürung (120 min) synchron (Abb. 3-3). Nach 180 min hatten diese Zellen die Mitose abgeschlossen. Die zu den verschiedenen Zeitpunkten gewonnenen Lysate wurden mit FIP4-Agarose inkubiert und die entsprechenden Eluate mittels WB auf die Anwesenheit von Rab11 analysiert. Die maximale Aktivität hatte Rab11 demnach in der Prometaphase. Im Verlauf der Zytokinese nahm die Menge an präzipitiertem Rab11 stetig ab und erreicht zum Ende der Zytokinese (120 min) ihr Minimum (Abb. 3-21). Da das prä-



zipitierte Rab11 die Menge an aktiviertem Rab11 in der Zelle widerspiegelt, kann man aus diesem Experiment schließen, dass nach der Metaphase die Menge an aktivem Rab11 abnimmt. Ab der Anaphase stellen Vesikelfusionsprozesse die Vergrößerung der Zelloberfläche sicher (ALBERTSON *et al.*, 2005), für die Rab11 wahrscheinlich im aktiven Zustand vorliegen muss (WILSON *et al.*, 2005). Aus diesem Grund erscheint die Verringerung der Rab11-Aktivität im Verlauf der Mitose auf den ersten Blick paradox. Die Ergebnisse legen allerdings nahe, dass aktives Rab11 bei oder nach der Fusion von Vesikeln inaktiviert wird und dass bei Prozessen mit vielen Vesikelfusionsereignissen wie zum Beispiel der Abschnürung der Zellen während der Zytokinese sehr viel aktives Rab11 „verbraucht“ wird. Nach dem Ende der Zytokinese konnte ungefähr die Menge an Rab11 präzipitiert werden wie in der Prometaphase (0 min), was für eine Reaktivierung von Rab11 nach erfolgreicher Zytokinese spricht (Abb. 3-21).

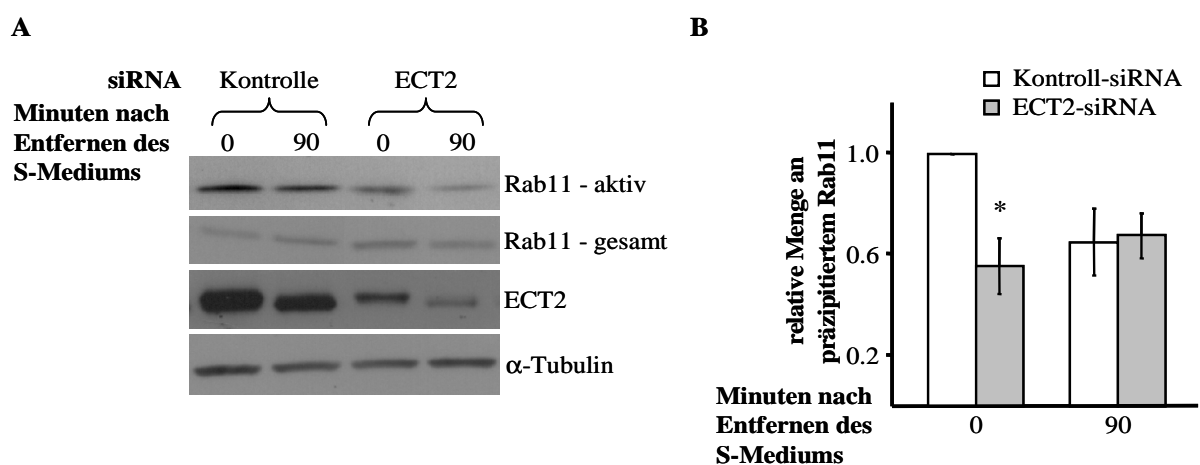


**Abb. 3-22: Die Verringerung der ECT2-Expression mittels siRNA führt in Interphase-Zellen zu geringeren Mengen an aktivem Rab11**

(A) HeLa-Zellen wurden mit Kontroll-, p0071- bzw. ECT2-siRNAs transfiziert. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und mit FIP4-Sepharose inkubiert. Die Menge an präzipitiertem Rab11 (Rab11 - aktiv) wurde mittels WB analysiert. Mittels WB wurden außerdem in den Lysaten die Mengen an Rab11 (Rab11 - gesamt), p0071, ECT2 und  $\alpha$ -Tubulin bestimmt. (B) Im Diagramm ist die mittlere relative Menge an präzipitiertem Rab11  $\pm$  STABW aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Zur Normierung wurde jeweils die Menge an präzipitiertem Rab11 (Rab11 - aktiv) durch die Menge an eingesetztem Rab11 (Rab11 - gesamt) geteilt und relativ zum Wert der Kontroll-siRNA-behandelten Zellen aufgetragen. (\*  $p \leq 0,05$ )

Da sich bereits in der Prometaphase größere Mengen an aktivem Rab11 in der Zelle befinden, muss die Rab11-Aktivierung zumindest teilweise bereits vor der Zytokinese bzw. vor dem Transport von Rab11 zur Teilungsfurche stattfinden (Abb. 3-21). Welche Proteine an der Aktivierung von Rab11 beteiligt sind, ist bisher unbekannt. Da eine Interaktion zwischen p0071 und Rab11 gezeigt werden konnte, wurde untersucht ob p0071 an der Regulation der Rab11-Aktivität beteiligt sein könnte. Da p0071 bevorzugt mit aktivem Rab11 zu interagieren

scheint, ist eine p0071-abhängige Stabilisierung von aktivem Rab11 denkbar. Ein weiterer potentieller Kandidat für die Regulation der Rab11-Aktivität war das GEF-Protein ECT2, das der Hauptaktivator von RhoA während der Zytokinese ist. Die Spezifität von ECT2 für einzelne GTPasen scheint über die Phosphorylierung von ECT2 reguliert zu sein (TATSUMOTO *et al.*, 1999; NIIYA *et al.*, 2006), so dass es möglich erschien, dass ECT2 auch ein GEF für Rab11 sein könnte. Um zu untersuchen, ob ECT2 und/oder p0071 einen Einfluss auf die Aktivierung von Rab11 in der Zelle haben, wurden HeLa-Zellen mit Kontroll-, p0071- bzw. ECT2-siRNA transfiziert und 48 Stunden nach der Transfektion lysiert. Zur Bestimmung der Rab11-Aktivität wurden die Lysate mit FIP4-Sepharose inkubiert und die Eluate mittels WB auf die Anwesenheit von Rab11 untersucht. In den Lysaten wurden zur Kontrolle der siRNA-Transfektion außerdem die Mengen von p0071, ECT2 und  $\alpha$ -Tubulin bestimmt (Abb. 3-22 A). Die Verringerung der ECT2-Expression durch siRNAs ging dabei mit einer signifikanten Reduktion der mit FIP4-Sepharose präzipitierten Rab11-Menge einher, was für eine Rolle von ECT2 bei der Regulation der Rab11-Aktivität spricht. p0071 scheint dagegen in Interphase-Zellen keinen Einfluss auf die Aktivität von Rab11 zu haben (Abb. 3-22).

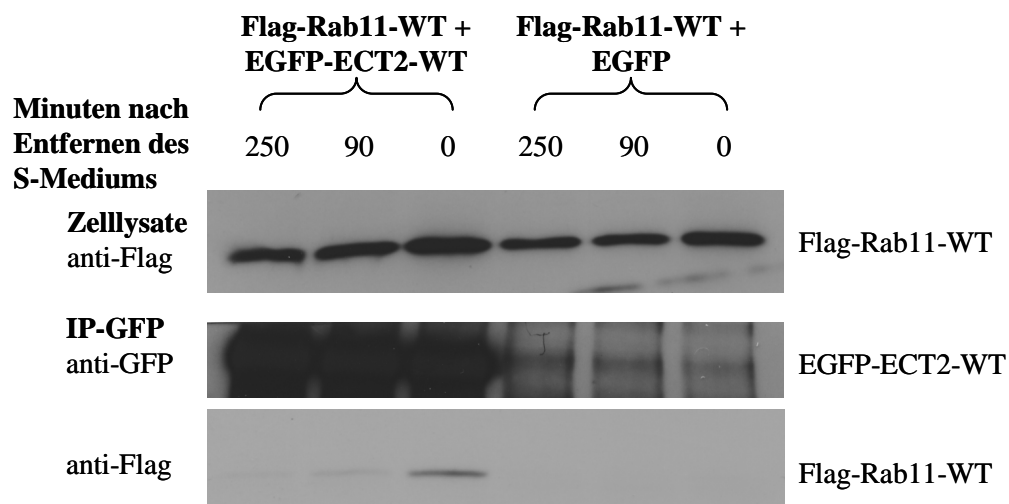


**Abb. 3-23: ECT2-siRNA-behandelte Zellen zeigen eine geringere Rab11-Aktivität in der Prometaphase als Kontroll-siRNA-behandelte**

(A) HeLa-Zellen wurden mit Kontroll- bzw. ECT2-siRNA transfiziert und synchronisiert. Es wurden Lysate von Zellen in der Prometaphase (0 min) und während der Zytokinese (90 min) angefertigt und diese mit FIP4-Sepharose inkubiert. Mittels WB wurden sowohl die Mengen an präzipitiertem Rab11 (Rab11 - aktiv) als auch die Mengen von Rab11 (Rab11 - gesamt), ECT2 und  $\alpha$ -Tubulin in den entsprechenden Lysaten bestimmt. (B) Im Diagramm ist die mittlere relative Menge an präzipitiertem Rab11 aus zwei unabhängigen Experimenten dargestellt. Zur Normierung wurde jeweils die Menge an präzipitiertem Rab11 (Rab11 - aktiv) durch die Menge an eingesetztem Rab11 (Rab11 - gesamt) geteilt und relativ zum Wert der Kontroll-siRNA-behandelten Zellen aufgetragen. (\*  $p \leq 0,05$ )

Der Einfluss von ECT2 auf die Aktivität von Rab11 wurde außerdem in mitotischen Zellen untersucht, um zu klären, ob die beobachtete Verringerung der Rab11-Aktivität in ECT2-siRNA-behandelten Interphase-Zellen mit Beginn der Zytokinese durch andere

unbekannte Rab11-Regulatoren ausgeglichen werden kann. Dafür wurden Kontroll- bzw. ECT2-siRNA-transfizierte HeLa-Zellen in der Prometaphase synchronisiert. Zelllysate wurden von den in der Prometaphase arretierten Zellen, sowie 90 Minuten nach Entfernen des S-Mediums angefertigt und diese mit FIP4-Agarose inkubiert. Die Menge an präzipitiertem Rab11, sowie die Mengen von Rab11, ECT2 und  $\alpha$ -Tubulin in den Zelllysaten wurden mittels WB analysiert (Abb. 3-23 A). Die Rab11-Aktivität von ECT2-siRNA-behandelten, war in Prometaphase arretierten Zellen im Vergleich zur Kontrolle auf ca. 55% reduziert. Eine zusätzliche Verringerung der Rab11-Aktivität 90 Minuten nach Entfernen des S-Mediums war in ECT2-siRNA-transfizierten Zellen nicht festzustellen (Abb. 3-23 B). Da die meisten der ECT2-siRNA-transfizierten und mit Nocodazol synchronisierten Zellen sich nicht Ein- und Abschnüren (siehe Anhang; Abb. 7-1 C), kann dieses Ergebnis als weiterer Beleg für die Rab11-Inaktivierung infolge von Vesikelfusionsprozessen angesehen werden.



**Abb. 3-24: Rab11 und ECT2 kopräzipitieren während der Prometaphase**

Flag-Rab11-WT und EGFP-ECT2-WT sowie Flag-Rab11-WT und EGFP exprimierende HEK293-Zellen wurden in der Prometaphase synchronisiert und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Entfernen des S-Mediums lysiert und mit an Protein A-Agarose immobilisiertem GFP-Ak inkubiert. Die Lysate und Präzipitate wurden mittels WB auf die Anwesenheit von Flag-Rab11-WT und EGFP-ECT2 analysiert.

Die in Abb. 3-22 und Abb. 3-23 gezeigten Ergebnisse legen nahe, dass ECT2 ein Regulator der Aktivität von Rab11 ist. Um einen Hinweis darauf zu erhalten, zu welchem Zeitpunkt ECT2 in die Regulation der Rab11-Aktivität eingreifen könnte, wurde untersucht, ob und wann ECT2 mit Rab11 interagiert. Dafür wurden HEK293-Zellen mit Plasmiden, die für Flag-Rab11-WT und EGFP-ECT2-WT codieren, transfiziert. Nach der Synchronisation dieser Zellen mittels Thymidin und Nocodazol wurden diese in der Prometaphase (0 Minuten), der Zytokinese (90 Minuten) und der G1-Phase (240 Minuten) lysiert und die Lysate mit an Protein A-Agarose immobilisiertem GFP-Ak inkubiert. Mittels WB wurde die Anwesenheit

von Flag-Rab11-WT in den entsprechenden Lysaten sowie in den Präzipitaten der IP analysiert. Dabei ist zu sehen, dass trotz gleicher eingesetzter Mengen an Flag-Rab11-WT (Zelllysate - anti-Flag) und gleicher Mengen an präzipitiertem EGFP-ECT2-WT (IP-GFP - anti-GFP), Flag-Rab11-WT fast ausschließlich in der Prometaphase kopräzipitiert werden konnte. Als Kontrolle dienten Lysate von HEK293-Zellen, die Flag-Rab11-WT und EGFP exprimierten. Dabei konnte zu keinem der analysierten Zeitpunkte Flag-Rab11-WT präzipitiert werden (Abb. 3-24).

Die in diesem Abschnitt vorgestellten Ergebnisse versuchen auf Basis eines neu entwickelten Testsystems Einblicke in die Regulation der Rab11-Aktivität in der Zytokinese humaner Zelllinien zu gewinnen. Mit Hilfe der FIP4-Sepharose kann aus Zelllysaten aktives Rab11 präzipitiert und diese Mengen mittels WB quantifiziert werden (Abb. 3-20). Dabei konnte gezeigt werden, dass die Menge an präzipitiertem Rab11 zum Zeitpunkt der Abschnürung in HeLa-Zellen am geringsten ist, was eine verstärkte Inaktivierung von Rab11 durch die Fusion von Vesikeln vermuten lässt (Abb. 3-21). An der Regulation der Rab11-Aktivität scheint das Rho-GEF-Protein ECT2 beteiligt zu sein, dessen reduzierte Expression mit verringerten Mengen von aktivem Rab11 in Interphase- und Prometaphase-Zellen einherging (Abb. 3-22 und Abb. 3-23). Zudem deutet die Kopräzipitation von ECT2 und Rab11 in der Prometaphase darauf hin, dass ECT2 die Aktivität von Rab11 tatsächlich in mitotischen Zellen reguliert (Abb. 3-24).

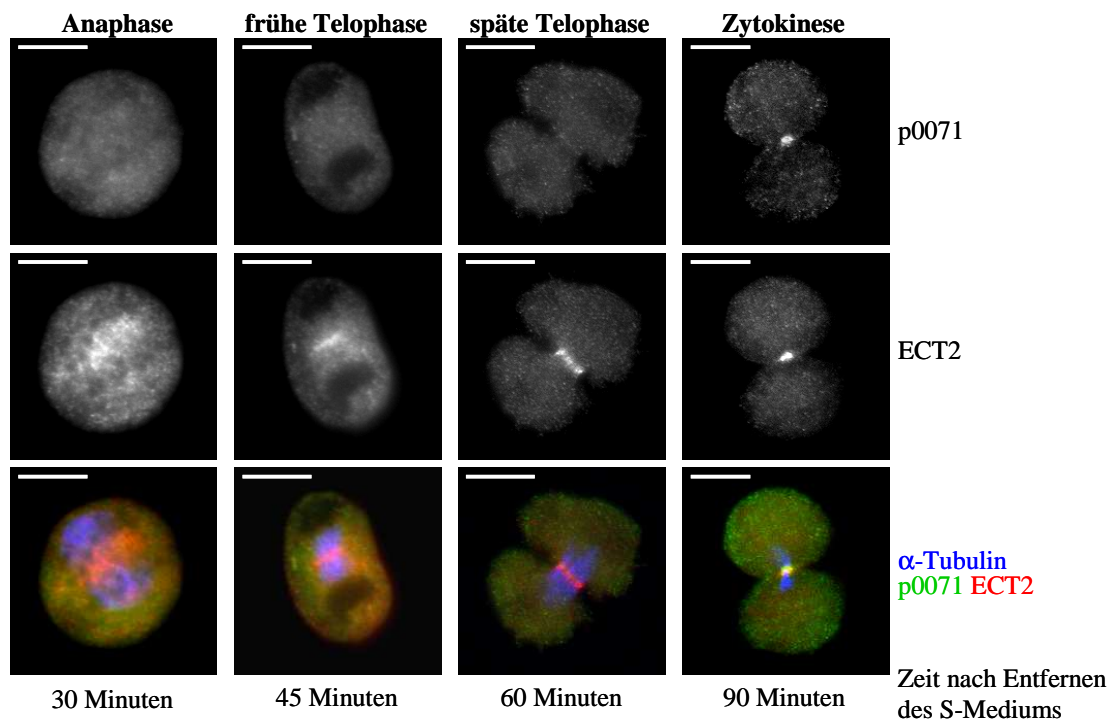
Basierend auf den in Abs. 3.2 gezeigten Ergebnissen kann folgendes Modell für die Funktionen von p0071, Rab11, ECT2 und Snapin bei der Vesikel-basierten Abschnürung postuliert werden: ECT2 interagiert mit Rab11 und aktiviert dieses zum Beginn der Mitose. Im aktiven Zustand erfolgt der Transport von Rab11 an der Oberfläche von Vesikeln auf bisher unbekanntem Weg zur zytoplasmatischen Brücke, durch welche die Tochterzellen nach der Aktomyosin-basierten Einschnürung verbunden bleiben. Dort interagiert Rab11 mit p0071, das mit Snapin im Komplex am Zentralkörper vorliegt. p0071 und Snapin vermitteln dann gemeinsam die Fusion der Rab11-positiven Vesikel mit der PM am Zentralkörper. Dabei kommt es zur Hydrolyse des an Rab11 gebundenen GTP, was die Verringerung der Rab11-Aktivität zu diesem Zeitpunkt erklären würde.

### 3.3 KIF3b transportiert p0071 während der Zytokinese zum Zentralkörper

Die in Abs. 3.1 und Abs. 3.2 vorgestellten Ergebnisse legen nahe, dass p0071 sowohl Funktionen bei der Aktomyosin-vermittelten Einschnürung als auch bei der Fusion von Vesikel bei der Abschnürung der Tochterzellen während der Zytokinese inne hat. Von entscheidender Bedeutung für den Verlauf der Zytokinese ist es, dass die beteiligten Proteine zur richtigen Zeit an den richtigen Ort gelangen. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit die Translokation von p0071 während der Zytokinese untersucht.

#### 3.3.1 ECT2 und p0071 werden nicht gemeinsam transportiert

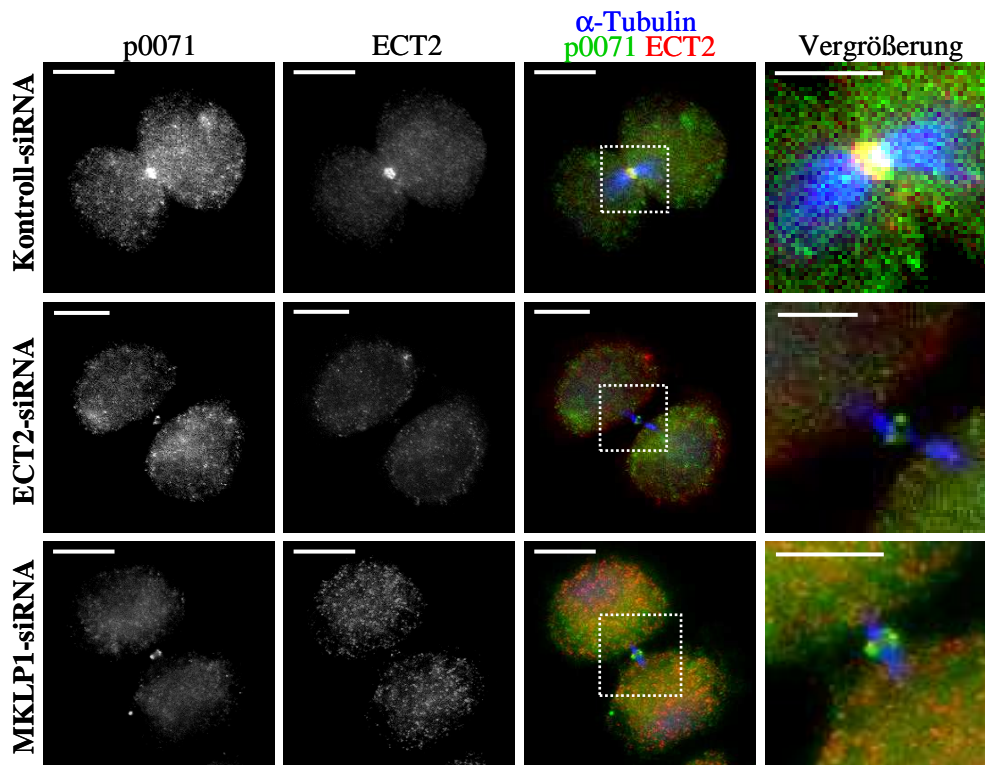
Mikrotubuli-assoziierte Motorproteine aus der Familie der Kinesine transportieren eine Vielzahl von Proteinen, die an der Zellteilung beteiligt sind (Abs. 1.5.2.1). ECT2 wird vom Kinesin MKLP1 transportiert und gelangt im Zentralspindlin-Komplex zusammen mit dem GAP-Protein MgcRacGAP zur zentralen Spindelregion (MISHIMA *et al.*, 2002; YUCE *et al.*, 2005). Aufgrund der gezeigten Interaktion zwischen ECT2 und p0071 wurde zunächst untersucht, ob beide Proteine gemeinsam transportiert werden.



**Abb. 3-25: p0071 folgt ECT2 an den Zentralkörper**

HeLa-Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem Entfernen des S-Mediums mit Methanol fixiert und  $\alpha$ -Tubulin (blau), p0071 (grün) und Ect2 (rot) mit Hilfe spezifischer Ak markiert. Die Balken entsprechen 10  $\mu$ m.

In HeLa-Zellen wurde die Lokalisation von p0071 und ECT2 im Verlauf der Mitose analysiert (Abb. 3-25). HeLa-Zellen wurden dafür zunächst in der Prometaphase synchronisiert, zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem Entfernen des S-Mediums fixiert und mit Hilfe spezifischer Ak  $\alpha$ -Tubulin (blau), p0071 (grün) und ECT2 (rot) markiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass ECT2 deutlich vor p0071 an der zentralen Spindel nachzuweisen ist. Erst mit beginnender Einschnürung zum Anfang der Zytokinese akkumuliert p0071 entlang der Teilungsfurche und zeigt schließlich am Zentralkörper eine ausgeprägte Kolokalisation mit ECT2. Dies weist darauf hin, dass p0071 nicht zusammen mit ECT2 im Zentralspindlin-Komplex transportiert wird.



**Abb. 3-26: Die verringerte Expression von ECT2 bzw. MKLP1 beeinflusst die p0071-Zentralkörper-Assoziation**

HeLa-Zellen wurden mit Kontroll-, ECT2- bzw. MKLP1-siRNA transfiziert, in der Prometaphase synchronisiert und 90 Minuten nach Entfernen des S-Mediums mit 10% TCA fixiert. Die Markierung von  $\alpha$ -Tubulin (blau), p0071 (grün) und ECT2 (rot) erfolgte mit Hilfe spezifischer Ak. Die Balken entsprechen 10  $\mu$ m bzw. 5  $\mu$ m in den Vergrößerungen.

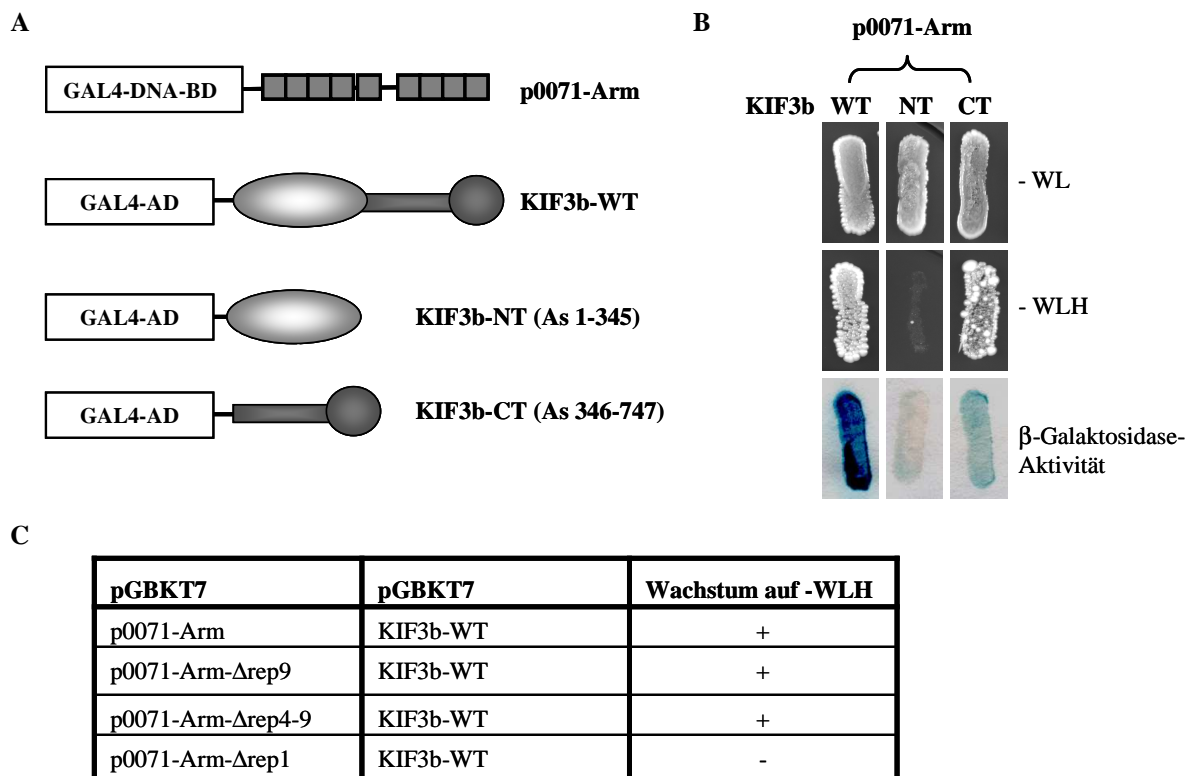
Um zu untersuchen, ob der Transport von p0071 zum Zentralkörper abhängig von ECT2 oder dem Zentralspindlin-Motorprotein MKLP1 ist, wurde die Expression beider Proteine mittels siRNA in HeLa-Zellen verringert. Die transfizierten Zellen wurden in der Prometaphase synchronisiert, 90 Minuten nach dem Entfernen des S-Mediums mit 10% TCA fixiert und mit spezifischen Ak  $\alpha$ -Tubulin (blau), p0071 (grün) und ECT2 (rot) markiert. Zum dargestellten Zeitpunkt zeigten nur ca. 10% der mit Ect2- oder MKLP1-siRNA-transfizierten

Zellen die Ausbildung einer Teilungsfurche, während sich über 60% der Kontrollzellen normal einschnürten (siehe Anhang; Abb. 7-1 C). In den wenigen ECT2- und MKLP1-siRNA-transfizierten Zellen, die sich normal einschnürten, war ECT2 nicht mehr am Zentralkörper zu detektieren. Außerdem wiesen diese Zellen sowohl eine verringerte Assoziation von p0071 am Zentralkörper als auch Störungen bei der Ausbildung der zentralen Spindel auf, so dass der beobachtete Effekt auf die p0071-Lokalisation durch die gestörten Mikrotubuli-Dynamiken induziert sein könnte (Abb. 3-26).

Die Daten veranlassen zu der Vermutung, dass p0071 und ECT2 in zwei unabhängigen Komplexen zur zentralen Spindelregion transportiert werden (Abb. 3-25) und dort einen RhoA-Aktivitäts-regulierenden Komplex bilden (Abs. 3.1.2 bis Abs. 3.1.4). Trotzdem ist es möglich, dass der Transport von p0071 zum Zentralkörper teilweise von ECT2 und MKLP1 abhängig ist (Abb. 3-26).

### 3.3.2 p0071 interagiert mit der KIF3-Untereinheit KIF3b

In einer Hefe-Dihybrid-Analyse wurde vor Beginn dieser Arbeit KIF3b als möglicher Interaktionspartner von p0071 identifiziert. KIF3b ist eine Untereinheit des heterotrimeren KIF3-Komplexes. Dieser Mikrotubuli-assoziierte Motorprotein-Komplex der Kinesin-2-Familie besteht außerdem aus KIF3a und KAP3. KIF3a und KIF3b bilden ein Heterodimer, das für die Bewegung des Proteins entlang der Mikrotubuli verantwortlich ist. KAP3 wird für die Bindung von einigen zu transportierenden Proteinen benötigt, obwohl auch der KIF3a/3b-Komplex allein Proteine transportieren kann (YAMAZAKI *et al.*, 1995; YAMAZAKI *et al.*, 1996; JIMBO *et al.*, 2002). Da eine Rolle für KIF3b in der Zytokinese bereits beschrieben wurde (FAN und BECK, 2004; HARAGUCHI *et al.*, 2006), erschien es möglich, dass der KIF3-Komplex den Transport von p0071 während der Zytokinese vermittelt. Um zu untersuchen, ob KIF3b am Transport von p0071 beteiligt ist, wurde als erstes die Interaktion der p0071-Arm-Domäne mit KIF3b im Hefesystem genauer analysiert. Neben KIF3b-WT wurden auch der N- und der C-terminale Abschnitt von KIF3b untersucht. Der N-terminale Abschnitt von KIF3b (KIF3b-NT; As 1 - 345) beinhaltet die Motordomäne. Für die Interaktion mit den zu transportierenden Proteinen wird der C-terminale Abschnitt (KIF3b-CT; As 346 - 747) benötigt (YAMAZAKI *et al.*, 1995).



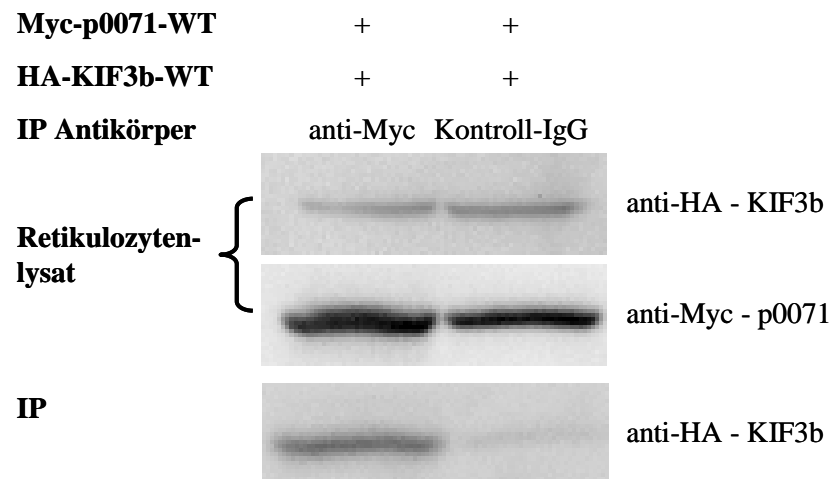
**Abb. 3-27: Die p0071-Arm-Domäne interagiert direkt mit KIF3b über dessen C-terminale Domäne im Hefe-Dihybrid-System**

YRG2-Hefe-Zellen wurden mit den unter (A) schematisch dargestellten Konstrukten kotransformiert und auf Selektions-SD-Agarplatten (-WL) sowie auf Reporter-SD-Agarplatten (-WLH) ausplattiert (B). Die auf Selektions-SD-Agarplatten gewachsenen Kolonien wurden außerdem auf ihre  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität untersucht. (C) Zur Identifizierung der Arm-Wiederholungen, über die die p0071-KIF3b-Interaktion vermittelt wird, wurden verschiedene p0071-Arm-Deletionsmutanten in YRG2-Hefe-Zellen mit KIF3b-WT koexprimiert. Die Interaktion der entsprechenden Proteine wurde durch Wachstum auf -WLH-SD-Agarplatten überprüft.

Als GAL4-AD-Fusionsproteine wurden KIF3b-WT, -NT bzw. -CT jeweils mit p0071-Arm als GAL4-DNA-BD-Fusionsprotein im Hefestamm YRG2 koexprimiert (Abb. 3-27 A). Die Selektion der Hefen, die sowohl eines der drei KIF3b-Konstrukte als auch p0071-Arm exprimierten, erfolgte auf Selektions-SD-Agarplatten ohne die Aminosäuren Tryptophan und Leucin (Abb. 3-27 B, -WL). Die Aktivierung des Reportergens *his3* wurde in diesen Hefen über ihr Wachstum auf Reporter-SD-Agarplatten, denen neben Tryptophan und Leucin auch Histidin fehlt, überprüft (Abb. 3-27 B, -WLH). Die Aktivierung des Reportergens *lacZ* wurde über die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der auf -WL-SD-Agar gewachsenen Kolonien untersucht (Abb. 3-27 B, untere Reihe). Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass die p0071-Arm-Domäne mit KIF3b im Hefe-System interagiert und dass diese Interaktion über den C terminalen Abschnitt von KIF3b vermittelt wird. Hefen, die KIF3b-NT und p0071-Arm exprimierten, zeigten weder  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität noch Wachstum auf -WLH-SD-Agar. Außerdem wurden verschiedene p0071-Arm-Deletionsmutanten in YRG2-Hefe-Zellen mit KIF3b-WT koexprimiert. Darüber sollten die Arm-Wiederholungen identifiziert werden, die



für die Interaktion zwischen p0071 und KIF3b verantwortlich sind. Die C-terminal verkürzten Arm-Domänen ( $\Delta$ rep 9 fehlt die letzte Arm-Wiederholung;  $\Delta$ rep4-9 fehlen die Arm-Wiederholungen 4 bis 9) waren noch immer in der Lage mit KIF3b-WT zu interagieren, während die Deletionsmutante, der die erste Arm-Wiederholung fehlt ( $\Delta$ rep1) diese Fähigkeit verloren hatte (Abb. 3-27 C). Daraus kann auf eine entscheidende Rolle der ersten drei Arm-Wiederholungen bei der Interaktion von p0071 mit KIF3b geschlossen werden.



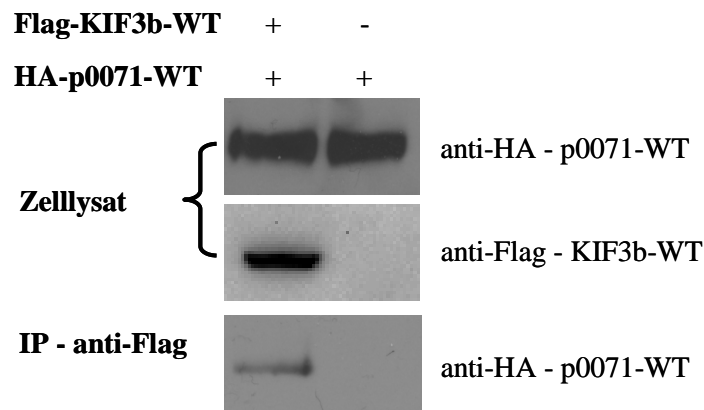
**Abb. 3-28: p0071 und KIF3b interagieren *in vitro* direkt miteinander**

In Retikulozytenlysate wurden Myc-p0071-WT und HA-KIF3b-WT *in vitro* exprimiert. Die Lysate wurden anschließend mit je 1  $\mu$ g eines Myc-spezifischen Ak bzw. eines Kontroll-Maus-IgGs inkubiert und diese an ProteinA-Agarose immobilisiert. Die entsprechenden Eluate wurden im WB auf Anwesenheit von HA-KIF3b-WT mit Hilfe eines HA-spezifischen Ak untersucht

Um die Interaktion von p0071 und KIF3b in einem unabhängigen System zu untersuchen, wurden p0071-WT und KIF3b-WT als Myc-tag- bzw. HA-tag-Fusionsprotein in Retikulozytenlysate exprimiert. Anschließend wurde mittels IP die Interaktion zwischen p0071 und KIF3b *in vitro* analysiert. In Retikulozytenlysaten, in denen Myc-p0071-WT und HA-KIF3b-WT exprimiert wurden (Abb. 3-28; Retikulozytenlysate, anti-HA und anti-Myc), konnte mit einem spezifischen Myc-Ak HA-KIF3b-WT kopräzipitiert werden. Wurde die IP dagegen mit einem Kontroll-IgG durchgeführt, konnte nur eine sehr geringe Menge HA-KIF3b-WT kopräzipitiert werden (Abb. 3-28, IP - anti-HA), die auf eine unspezifische Bindung des Proteins an die Protein A-Agarose oder an das Kontroll-IgG zurückzuführen ist. Da im Retikulozytenlysate weder KAP3 noch verwandte Proteine vorhanden sind, die eine Interaktion zwischen p0071 und KIF3b vermitteln könnten, ist davon auszugehen, dass p0071 und KIF3b *in vitro* direkt miteinander interagieren.

Um zu untersuchen, ob ein Komplex aus p0071 und KIF3b auch *in vivo* gebildet wird, wurden Flag-KIF3b-WT und HA-p0071-WT in HEK293-Zellen exprimiert und eine IP mit anti-Flag-Agarose durchgeführt. Zur Kontrolle dienten Zellen, die nur HA-p0071-WT

exprimierten. Dabei konnte p0071 nur präzipitiert werden, wenn sowohl Flag-KIF3b-WT als auch HA-p0071-WT exprimiert waren (Abb. 3-29).



**Abb. 3-29: p0071 und KIF3b interagieren *in vivo***

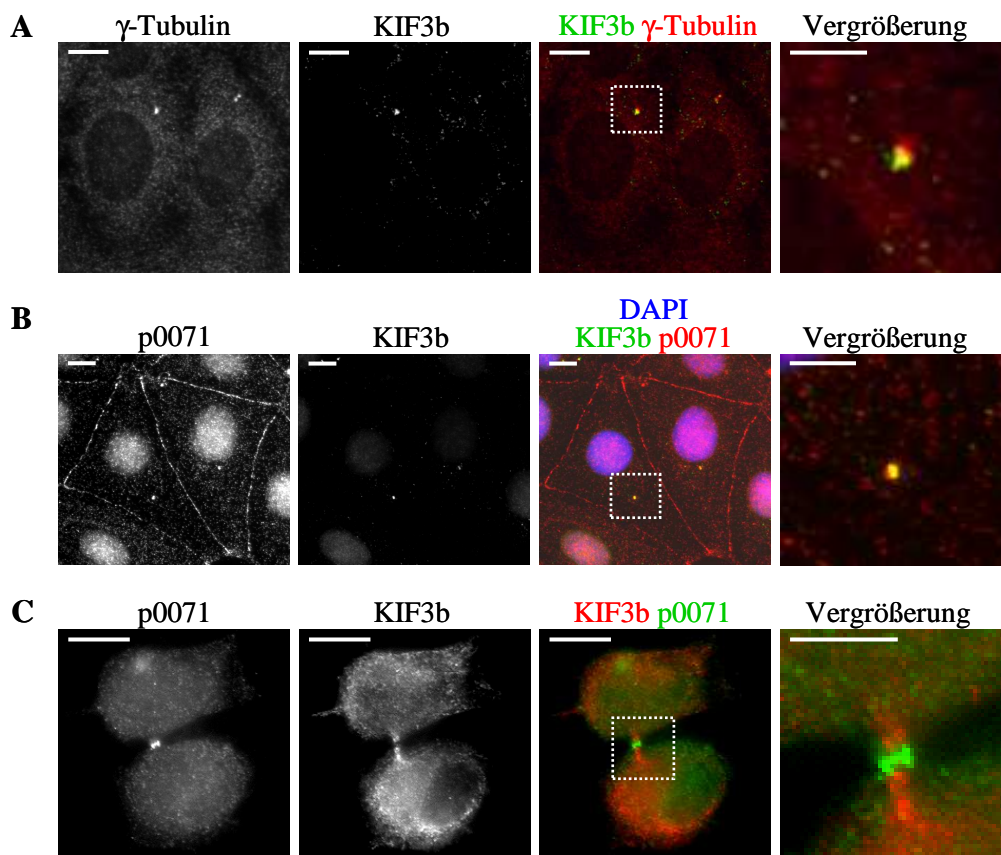
In HEK293-Zellen wurde HA-p0071-WT entweder zusammen mit Flag-KIF3b-WT oder alleine exprimiert (Zellysat). Die Lysate wurden mit anti-Flag-Agarose inkubiert und die entsprechenden Eluate mittels WB auf Anwesenheit von p0071 untersucht (IP - anti-Flag).

Zusammenfassend lassen die in diesem Abs. vorgestellten Ergebnisse darauf schließen, dass p0071 und KIF3b direkt miteinander interagieren und *in vivo* einen Komplex bilden, was eine Transportfunktion von KIF3b für p0071 nahe legt. Die Interaktion von p0071 mit dem C-terminalen Bereich von KIF3b wird dabei vermutlich über die ersten Arm-Wiederholungen der Arm-Domäne von p0071 vermittelt.

### 3.3.3 KIF3b wird für den Transport von p0071 zum Zentralkörper benötigt

Aufgrund der Interaktion zwischen p0071 und KIF3b (Abs. 3.3.2) erschien eine Rolle von KIF3b beim Transport von p0071 zum Zentralkörper wahrscheinlich. In einer ersten Untersuchung wurde die Lokalisation beider Proteine in der Interphase und während der Zytokinese analysiert. Während der Interphase ist endogenes KIF3b (grün) in MCF-7-Zellen fast ausschließlich am Zentrosom zu finden. Das Zentrosom wurde über die Markierung von  $\gamma$ -Tubulin (rot) mit Hilfe spezifischer Ak sichtbar gemacht (Abb. 3-30 A). KIF3b (grün) und p0071 (rot) kolokalisieren während der Interphase in MCF-7-Zellen deutlich in einer punktförmigen Struktur im Zytoplasma (Abb. 3-30 B). Da sowohl für KIF3b als auch p0071 (WOLF *et al.*, 2006) durch die Kolokalisation mit  $\gamma$ -Tubulin eine Zentrosomen-Assoziation gezeigt werden konnte, ist davon auszugehen, dass beide Proteine während der Interphase am Zentrosom vorliegen. In synchronisierten HeLa-Zellen, die während der Zytokinese fixiert wurden, war keine Kolokalisation zwischen p0071 (grün, Zentralkörper-assoziiert) und KIF3b (rot, am zentralen Mikrotubuli-Bündel) zu beobachten (Abb. 3-30 C). Ein KIF3b-abhängiger

Transport von p0071 wird durch diese Beobachtung jedoch nicht ausgeschlossen. Zum einen könnte durch die Bindung an KIF3b das Epitop, das zur Ak-Detektion von p0071 benötigt wird, nicht zugänglich sein. Zum anderen ist es denkbar, dass die Konzentration von p0071 bzw. von Kinesin-Cargo-Molekülen im Allgemeinen entlang der Mikrotubuli für eine Visualisierung mittels Immunzytologie zu gering ist. Dafür spricht auch, dass obwohl der Transport von ECT2 über das Mikrotubuli-assoziierte Motorprotein MKLP1 zur zentralen Spindel unbestritten ist (YUCE *et al.*, 2005), ECT2 ebenfalls nur am „Zielort“ nachgewiesen werden kann (Abb. 3-25).

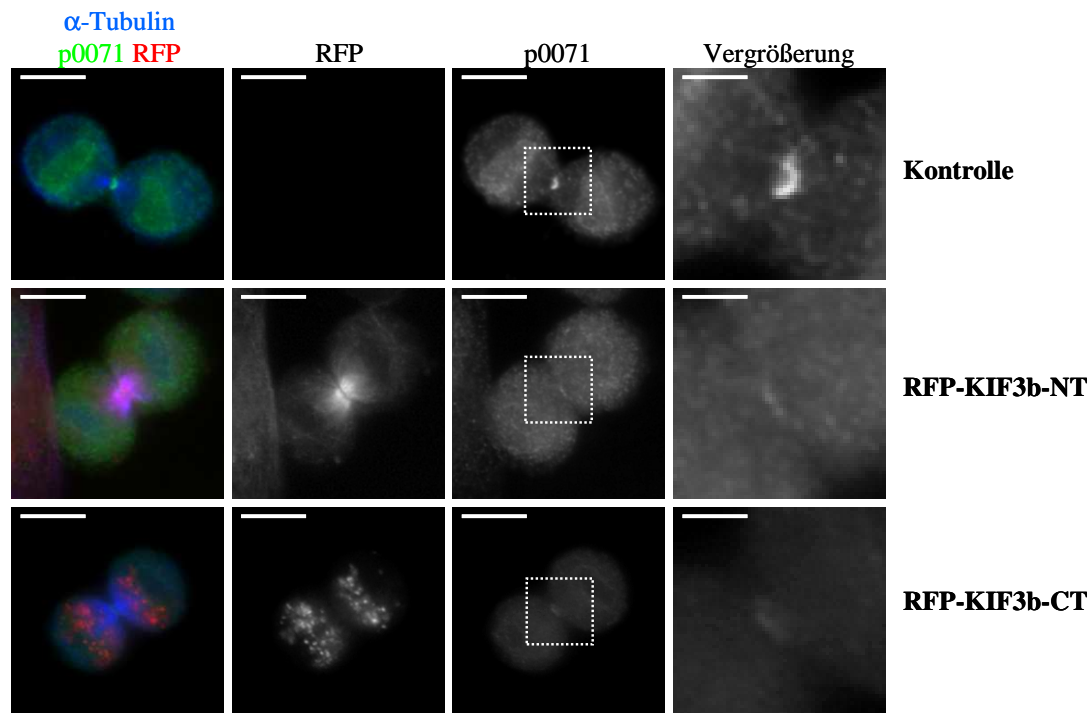


**Abb. 3-30: KIF3b und p0071 kolokalisieren während der Interphase jedoch nicht während der Zytokinese**

MCF-7-Zellen wurden in Methanol fixiert und entweder (A) KIF3b (grün) und  $\gamma$ -Tubulin (rot) oder (B) KIF3b (grün) und p0071 (rot) mit Hilfe spezifischer Ak markiert. (C) HeLa-Zellen wurden in der Prometaphase synchronisiert, während der Zytokinese fixiert und p0071 (grün) sowie KIF3b (rot) zur Visualisierung mit spezifischen Ak markiert. Die Balken entsprechen 10  $\mu$ m bzw. 5  $\mu$ m in den Vergrößerungen.

Um die mögliche Rolle von KIF3b beim Transport von p0071 während der Mitose näher zu untersuchen, kamen dominant negative Mutanten von KIF3b (FAN und BECK, 2004; HARAGUCHI *et al.*, 2006) zum Einsatz. Die N-terminale Motordomäne von KIF3b kann mit Mikrotubuli assoziieren, allerdings keine Interaktion mit p0071 (Abb. 3-27) oder anderen zu transportierenden Proteinen eingehen. Die C-terminale Domäne von KIF3b kann diese Interaktionen zwar eingehen, die gebundenen Proteine aufgrund der fehlenden Motorfunktion

jedoch nicht transportieren. HeLa-Zellen wurden mit Plasmiden, die für KIF3b-NT bzw. KIF3b-CT als RFP-Fusionsproteine codieren, transfiziert, anschließend in der Prometaphase synchronisiert, während der Zytokinese fixiert und p0071 sowie  $\alpha$ -Tubulin mit Hilfe spezifischer Ak markiert (Abb. 3-31). Zur Untersuchung der Zentralkörper-Assoziation von p0071 (grün) wurden Zellen in der Zytokinese mittels  $\alpha$ -Tubulin (blau) identifiziert. Die RFP-Fluoreszenz ermöglichte die Unterscheidung transfizierter und untransfizierter Zellen. In untransfizierten Zellen akkumulierte p0071 (Abb. 3-31; obere Reihe; Kontrolle) während der Zytokinese am Zentralkörper. Zellen, die RFP-KIF3b-NT bzw. RFP-KIF3b-CT exprimierten, zeigten eine deutliche Reduktion der p0071-Zentralkörper-Assoziation (Abb. 3-31; mittlere bzw. untere Reihe). Da beide KIF3b-Mutanten mit der Transportfunktion von endogenem KIF3b interferieren, legen diese Ergebnisse nahe, dass KIF3b an der Translokation von p0071 während der Zytokinese beteiligt ist.

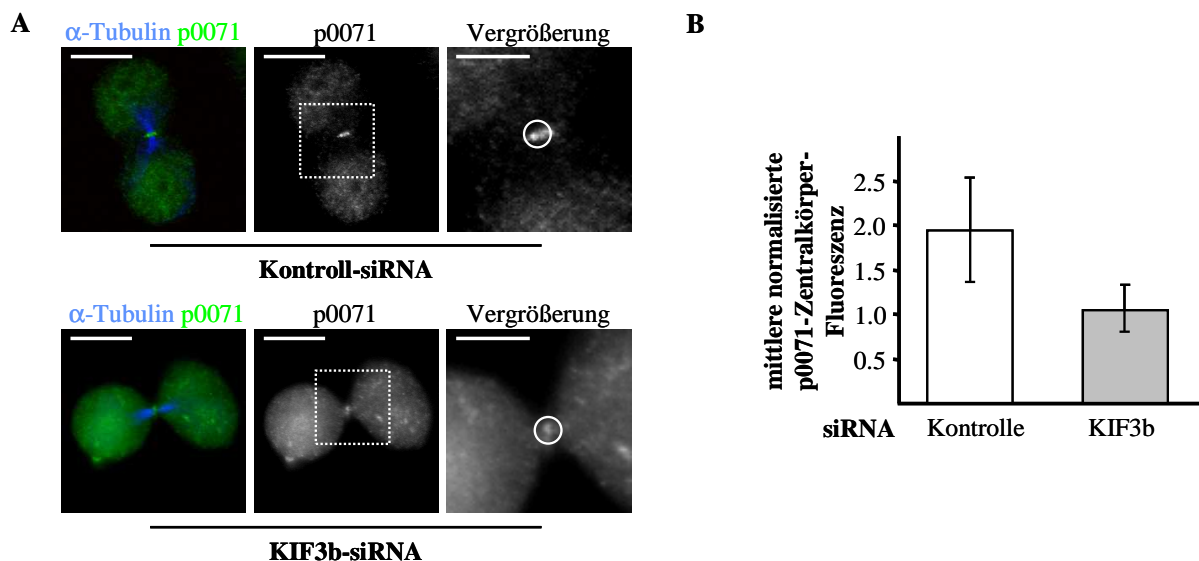


**Abb. 3-31: Die Überexpression nicht-funktionaler KIF3b-Fragmente interferiert mit der Zentralkörper-Assoziation von p0071**

HeLa-Zellen wurden mit Plasmiden, die für RFP-KIF3b-NT bzw. RFP-KIF3b-CT codieren, transfiziert, in der Prometaphase synchronisiert und während der Zytokinese mit Methanol fixiert. Mit spezifischen Ak wurden anschließend  $\alpha$ -Tubulin (blau) und p0071 (grün) markiert. Die transfizierten Zellen wurden über die Fluoreszenz des RFP identifiziert und auf das Vorhandensein von p0071 am Zentralkörper im Vergleich zu untransfizierten Zellen untersucht. Die Balken entsprechen 10  $\mu$ m bzw. 5  $\mu$ m in den Vergrößerungen.

Um indirekte Effekte durch unphysiologisch hohe Mengen der KIF3b-Mutanten in den Zellen auf den Transport von p0071 ausschließen zu können, wurde außerdem die Expression von KIF3b mittels spezifischer siRNAs verringert. WB-Analysen zeigten, dass die KIF3b-

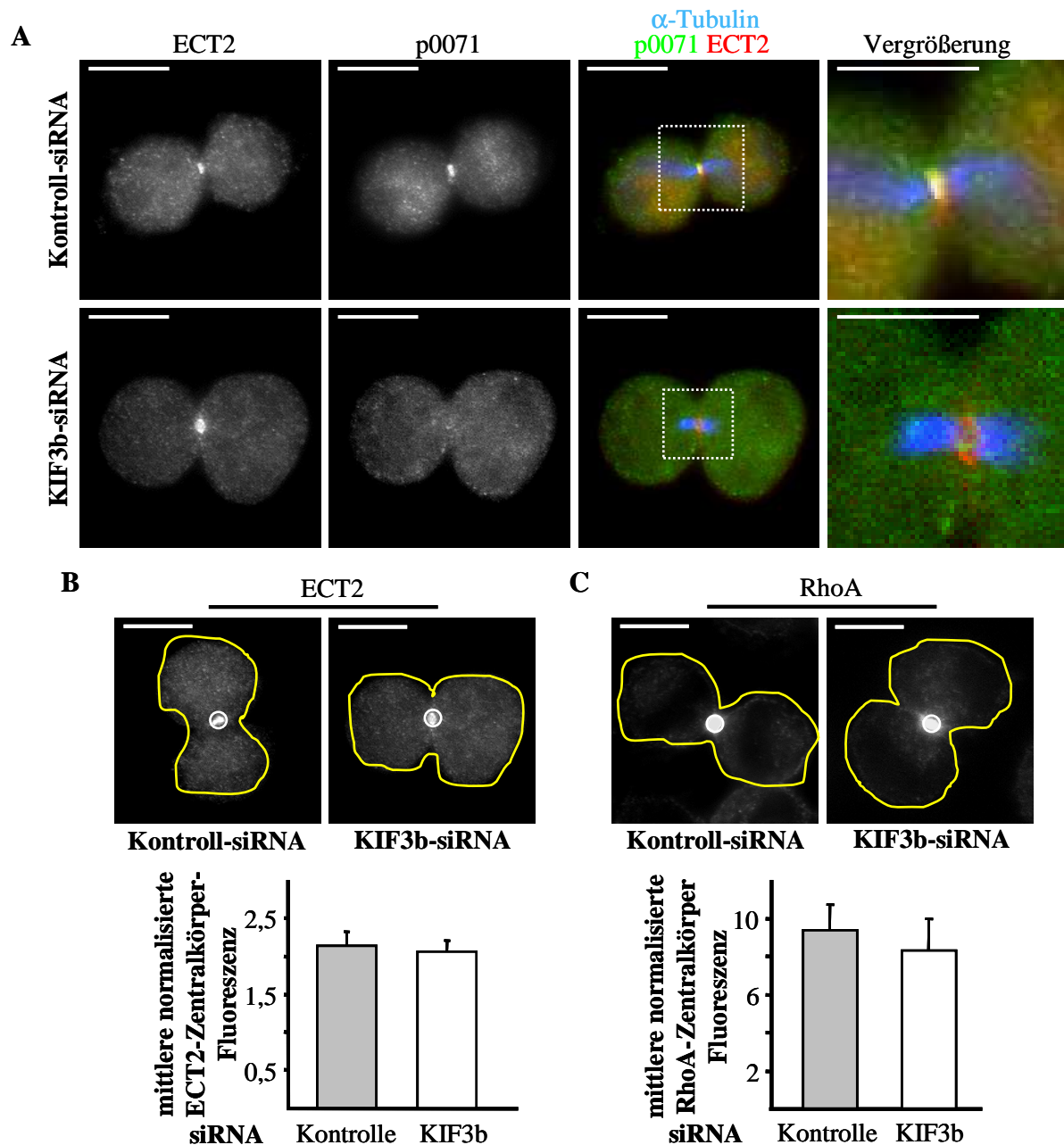
siRNA die KIF3b-Expression auf ca. 40% im Vergleich zu Kontrollzellen verringerte (Abb. 3-34). Die Reduktion der KIF3b-Expression interferierte dabei mit der Akkumulation von p0071 am Zentralkörper (Abb. 3-32 A). Zur Quantifizierung wurde die Fluoreszenzintensität von p0071 am Zentralkörper in einem Bereich von  $2,65 \mu\text{m}^2$  durch die p0071-Fluoreszenzintensität der gesamten Zelle geteilt. Die so normalisierte p0071-Zentralkörper-Fluoreszenz war in KIF3b-siRNA-transfizierten Zellen um ca. 50% geringer als in den Kontrollzellen (Abb. 3-32 B).



**Abb. 3-32: Die Verringerung der KIF3b-Expression verminderte die Zentralkörper-Assoziation von p0071**

(A) HeLa-Zellen wurden mit Kontroll- bzw. KIF3b-siRNA transfiziert, in der Prometaphase synchronisiert und während der Zytokinese mit Methanol fixiert. p0071 (grün) und  $\alpha$ -Tubulin (blau) wurden mit spezifischen Ak markiert. Die Zellen in der Zytokinese wurden über die Ausbildung des zentralen Mikrotubuli-Bündels identifiziert und auf das Vorhandensein von p0071 am Zentralkörper untersucht. Die Balken entsprechen  $10 \mu\text{m}$  bzw.  $5 \mu\text{m}$  in den Vergrößerungen. (B) Zur Quantifizierung wurde die Fluoreszenzintensität von p0071 am Zentralkörper (Kreisfläche von  $2,65 \mu\text{m}^2$ ) durch die p0071-Fluoreszenzintensität der gesamten Zellen geteilt und der mittlere Quotient  $\pm$  STABW von jeweils 20 vermessenen Zellen im Diagramm dargestellt.

Die Abb. 3-26 zeigt, dass die Lokalisation von p0071 am Zentralkörper zumindest teilweise abhängig von ECT2 ist und damit eventuell auch abhängig vom RhoA-Signalweg. Um zu untersuchen, ob der durch die KIF3b-siRNA-Behandlung induzierte p0071-Transportdefekt indirekt über ECT2 oder RhoA vermittelt wird, wurden HeLa-Zellen mit Kontroll- bzw. KIF3b-siRNA transfiziert, in der Prometaphase synchronisiert und nach Erreichen der Zytokinese mit 10% TCA fixiert. ECT2 (rot), p0071 (grün) und  $\alpha$ -Tubulin wurden mit spezifischen Ak markiert (Abb. 3-33 A). Die Zellen, die sich in der Zytokinese befanden, wurden auf die Anwesenheit von p0071 und ECT2 am Zentralkörper untersucht. In Kontroll-siRNA-transfizierten Zellen kolokalisierten p0071 und ECT2 deutlich am Zentralkörper (Abb. 3-33 A;

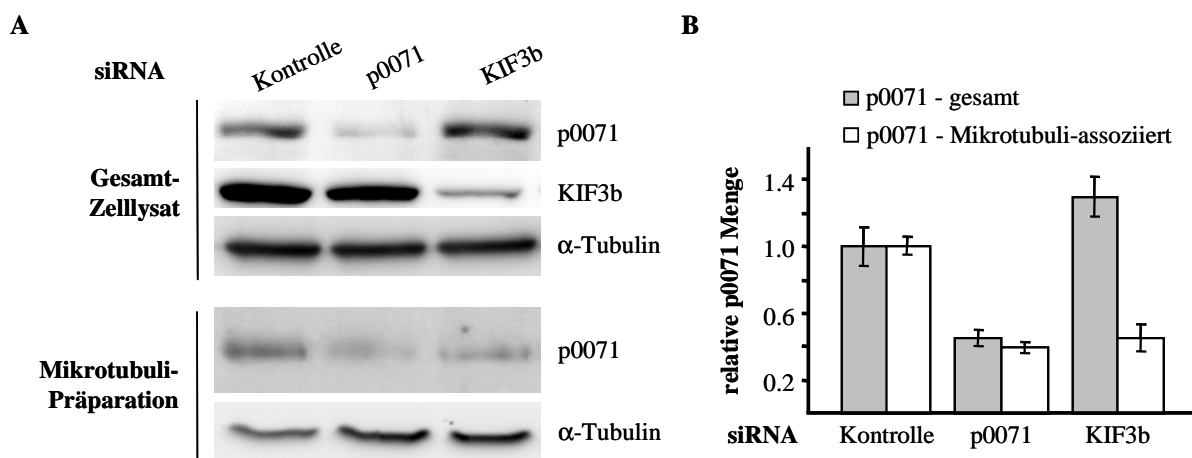


**Abb. 3-33: Die Verringerung der KIF3b-Expression mittels siRNA hat keinen Einfluss auf die ECT2- und RhoA-Translokation zum Zentralkörper**

HeLa-Zellen wurden mit Kontroll- bzw. KIF3b-siRNA transfiziert, synchronisiert und zum Zeitpunkt der Zytokinese mit 10% TCA fixiert. (A)  $\alpha$ -Tubulin (blau), p0071 (grün) und ECT2 (rot) wurden mittels spezifischer Ak sichtbar gemacht. Zellen in der Zytokinese wurden hinsichtlich der Lokalisation von p0071 und ECT2 am Zentralkörper untersucht. (B, C) Zur Quantifizierung des Einflusses von KIF3b auf die Translokation von ECT2 und RhoA während der Zytokinese wurde die Fluoreszenzintensität von ECT2 bzw. RhoA am Zentralkörper durch die entsprechende ECT2- bzw. RhoA-Fluoreszenzintensität der gesamten Zellen geteilt und der mittlere Quotient  $\pm$  STABW von jeweils 20 vermessenen Zellen im Diagramm dargestellt.

obere Reihe). In Zellen, in denen die KIF3b-Expression durch siRNA-Transfektion verringert wurde, war die ECT2-Lokalisation am Zentralkörper nicht beeinflusst, während p0071 dort stark reduziert vorlag (Abb. 3-33 A; untere Reihe). Zur Quantifizierung wurde die ECT2-Fluoreszenzintensität am Zentralkörper durch die ECT2-Fluoreszenzintensität der gesamten

Zelle geteilt und der erhaltene mittlere Quotient von jeweils zwanzig Kontroll-siRNA- und p0071-siRNA-transfizierten Zellen im Diagramm vergleichend aufgetragen (Abb. 3-33 B). Dabei konnte bestätigt werden, dass KIF3b nicht am Transport von ECT2 zum Zentralkörper beteiligt ist. Mit der gleichen Vorgehensweise wurde die Translokation von RhoA zum Zentralkörper während der Zytokinese in Abhängigkeit von der KIF3b-Expression untersucht. Auch auf die Translokation von RhoA zum Zentralkörper war kein Einfluss von KIF3b feststellbar (Abb. 3-33 C). Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die beobachteten Effekte von KIF3b auf den Transport von p0071 nicht über ECT2 und RhoA vermittelt wurden.

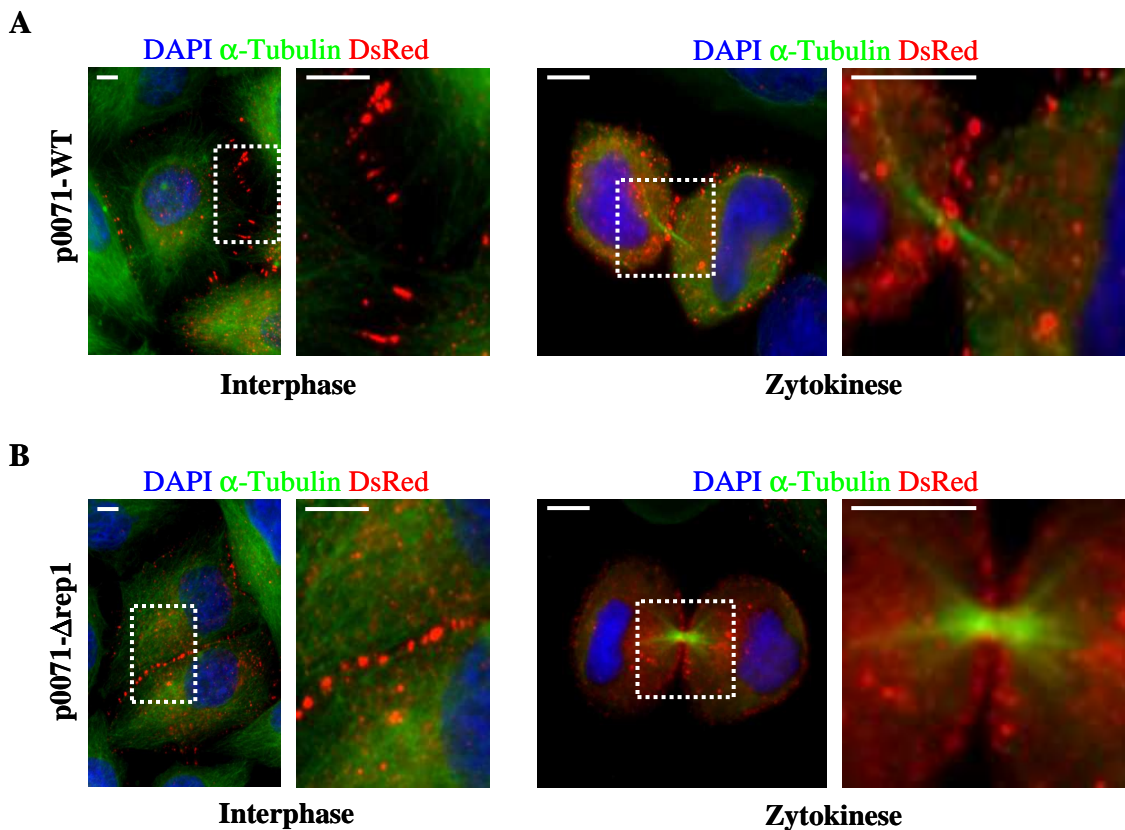


**Abb. 3-34: Die Verringerung der KIF3b-Expression reduziert die p0071-Mikrotubuli-Assoziation während der Zytokinese**

(A) HeLa-Zellen wurden mit Kontroll-, p0071- oder KIF3b-siRNA transfiziert und anschließend in der Prometaphase synchronisiert. 90 Minuten nach dem Entfernen des S-Mediums wurde eine Präparation zur Isolation der mitotischen Mikrotubuli durchgeführt. Mit den Mikrotubuli werden auch die mit ihnen assoziierten Proteine isoliert. Mittels WB wurden in den Gesamt-Zelllysaten die Mengen von p0071, KIF3b und  $\alpha$ -Tubulin analysiert. In den entsprechenden Mikrotubuli-Präparationen wurden die Mengen an p0071 und  $\alpha$ -Tubulin bestimmt. (B) Quantifizierung der in den Mikrotubuli-Präparationen detektierten Mengen von p0071 (weiße Balken) im Vergleich zu den p0071-Mengen im Zelllysate (graue Balken). In beiden Fällen diente  $\alpha$ -Tubulin zur Normalisierung. Das Diagramm zeigt die mittleren relativen p0071-Mengen  $\pm$  STABW aus drei unabhängigen Experimenten.

Um die Immunfluoreszenz-Analysen zu überprüfen, wurden Kontroll-, p0071- und KIF3b-siRNA-transfizierte Zellen synchronisiert. 90 Minuten nach Entfernen des S-Mediums befanden sich ca. 70% der Kontroll-siRNA-transfizierten Zellen in der Zytokinese (Abb. 3-3). Von diesen Zellen wurde eine Präparation der mitotischen Mikrotubuli durchgeführt, die zu diesem Zeitpunkt typischerweise überwiegend Zentralkörper und Zentralkörper-assoziierte Proteine enthält (MULLINS und MCINTOSH, 1982). Die nach der Präparation gewonnenen Lysate wurden mittels WB auf Anwesenheit von p0071 untersucht. Sowohl in den Zelllysaten als auch in den Mikrotubuli-Präparationen wurde  $\alpha$ -Tubulin zur Normalisierung der p0071-Mengen genutzt. Mit Hilfe dieser Methode konnte eine Mikrotubuli- bzw.

Zentralkörper-Assoziation von p0071 in der Zytokinese unabhängig von Immunzytologie-Analysen gezeigt werden (Abb. 3-34 A). Wurde die p0071-Expression mittels siRNA reduziert wurde auch weniger p0071 in der entsprechenden Präparation nachgewiesen. In mit KIF3b-siRNA-behandelten Zellen, war trotz unveränderter Mengen von p0071 im Gesamt-Zellysate, deutlich weniger p0071 in der Mikrotubuli-Präparation nachzuweisen (Abb. 3-34)



**Abb. 3-35: Die Zentralkörper-Assoziation einer p0071-Mutante, die nicht mit KIF3b interagiert, ist gestört**

HeLa-Zellen wurden mit Plasmiden transfiziert, die für p0071-WT-DsRed (A) bzw. p0071- $\Delta$ rep1-DsRed (B) codieren. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit Methanol fixiert und  $\alpha$ -Tubulin (grün) mittels eines spezifischen Ak markiert. Die DNA (blau) wurde mit dem Farbstoff DAPI gefärbt. Die Lokalisation der beiden DsRed-Fusionsproteine wurde sowohl in Interphase-Zellen, als auch in sich teilenden Zellen (Zytokinese) untersucht. Die Balken entsprechen jeweils 10  $\mu$ m.

Fehlt die erste Arm-Wiederholungssequenz in der Arm-Domäne von p0071 ( $\Delta$ rep1) ist p0071 nicht mehr in der Lage mit KIF3b zu interagieren (Abb. 3-27). Um zu untersuchen, ob der Transport einer KIF3b-bindungsdefizienten Mutante von p0071 *in vivo* gestört ist, wurden HeLa-Zellen mit Plasmiden transfiziert, die für p0071-WT-DsRed bzw. für p0071- $\Delta$ rep1-DsRed codieren. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen in Methanol fixiert,  $\alpha$ -Tubulin (grün) mit einem spezifischen Ak markiert und die DNA (blau) mittels DAPI gefärbt (Abb. 3-35). Die Lokalisation der p0071-DsRed-Fusionsproteine konnte aufgrund der Fluoreszenz des DsRed in Interphase-Zellen und in mitotischen Zellen analysiert werden. In Interphase-Zellen war sowohl p0071-WT-DsRed als auch p0071- $\Delta$ rep1-DsRed deutlich mit



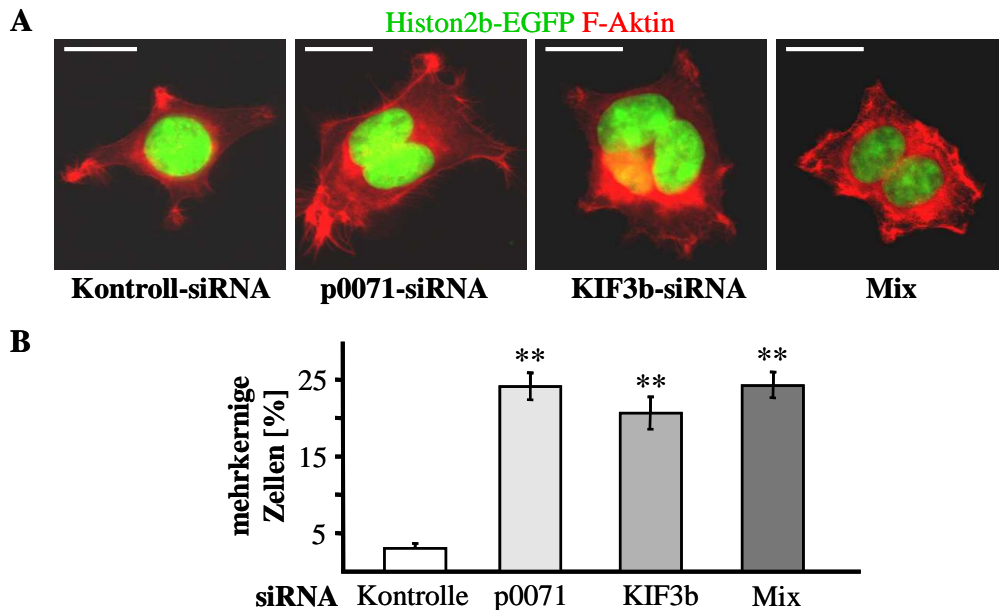
Zell-Zell-Kontakten assoziiert. Daraus kann geschlossen werden, dass das Fehlen der ersten Arm-Wiederholungssequenz in der Arm-Domäne von p0071 nicht zu einem vollständigen Funktionsverlust des Proteins führt. In mitotischen Zellen akkumuliert p0071-WT-DsRed während der Zytokinese im Bereich um das zentrale Mikrotubuli-Bündel (Aktomyosin-Ring) und entlang der gesamten Teilungsfurche. Die KIF3b-bindungsdefiziente p0071-Mutante p0071- $\Delta$ rep1-DsRed akkumulierte dagegen nicht um das zentrale Mikrotubuli-Bündel herum und war auch nur schwach entlang der Teilungsfurche lokalisiert. Der größte Teil des Proteins war vielmehr diffus im Zytoplasma zu finden. Dieses Experiment legt nahe, dass die Interaktion zwischen p0071 und KIF3b essentiell für den Transport von p0071 während der Zytokinese ist. Auf die Assoziation von p0071 mit Zell-Zell-Kontakten hat KIF3b dagegen wahrscheinlich keinen Einfluss.

In diesem Abschnitt wurde gezeigt, dass p0071 und KIF3b in Interphase-Zellen am Zentrosom kolokalisieren (Abb. 3-30). Die Überexpression von nichtfunktionellen KIF3b-Mutanten sowie die Reduktion der KIF3b-Expression mittels siRNA führten zu einer deutlichen Verringerung der Zentralkörper- bzw. Mikrotubuli-Assoziation von p0071 während der Zytokinese (Abb. 3-31, Abb. 3-32 und Abb. 3-34). Außerdem konnte ein Effekt von KIF3b auf den Transport von ECT2 und RhoA während der Zytokinese ausgeschlossen werden (Abb. 3-33), was zeigt, dass die beobachteten Effekte von KIF3b auf den Transport von p0071 nicht über diese beiden Proteine vermittelt werden. Die Tatsache, dass die KIF3b-bindungsdefiziente Mutante p0071- $\Delta$ rep1-DsRed nicht am Zentralkörper in der Zytokinese akkumuliert, lässt den Schluss zu, dass die Interaktion zwischen p0071 und KIF3b für den Transport von p0071 zum Zentralkörper benötigt wird (Abb. 3-35).

### **3.3.4 KIF3b ist über den Transport von p0071 an der Regulation der RhoA-Aktivität während der Zytokinese beteiligt**

Sowohl die Überexpression der N-terminalen Motordomäne als auch der C-terminalen Transportdomäne von KIF3b führt zur Bildung von mehrkernigen Zellen (FAN und BECK, 2004; HARAGUCHI *et al.*, 2006). Die zugrunde liegenden Mechanismen wurden bisher allerdings kaum untersucht. Um mögliche unspezifische Nebeneffekt durch die Überexpression der KIF3b-Fragmente auszuschließen, kamen in den folgenden Experimenten zur Analyse der Rolle von KIF3b in der Zytokinese ausschließlich siRNAs zum Einsatz. Zur Quantifizierung der von KIF3b-induzierten Zytokinese-Defekte wurden HEK293-Zellen mit Kontroll-, KIF3b- bzw. p0071-siRNA transfiziert, in der G1-Phase durch einen Doppel-Thymidinblock synchronisiert und die Anzahl der mehrkernigen Zellen 12 Stunden nach dem

Ende des zweiten Thymidinblocks bestimmt. Im Vergleich zur Kontrolle, bei der ca. 3% der Zellen mehrkernig waren, führte die Transfektion von KIF3b- bzw. p0071-siRNA in ca.  $20\% \pm 1,9\%$  bzw. ca.  $25\% \pm 2,3\%$  der Zellen zu Mehrkernigkeit (Abb. 3-36). Dies macht deutlich, dass beide Proteine für den normalen Ablauf der Mitose bzw. Zytokinese benötigt werden. Die Transfektion einer Mischung aus KIF3b- und p0071-siRNA (Mix) hatte keine zusätzliche Erhöhung der Anzahl mehrkerniger Zellen zur Folge, was nahe legt, dass beide Proteine über den gleichen Mechanismus an der Regulation der Zytokinese beteiligt sind.

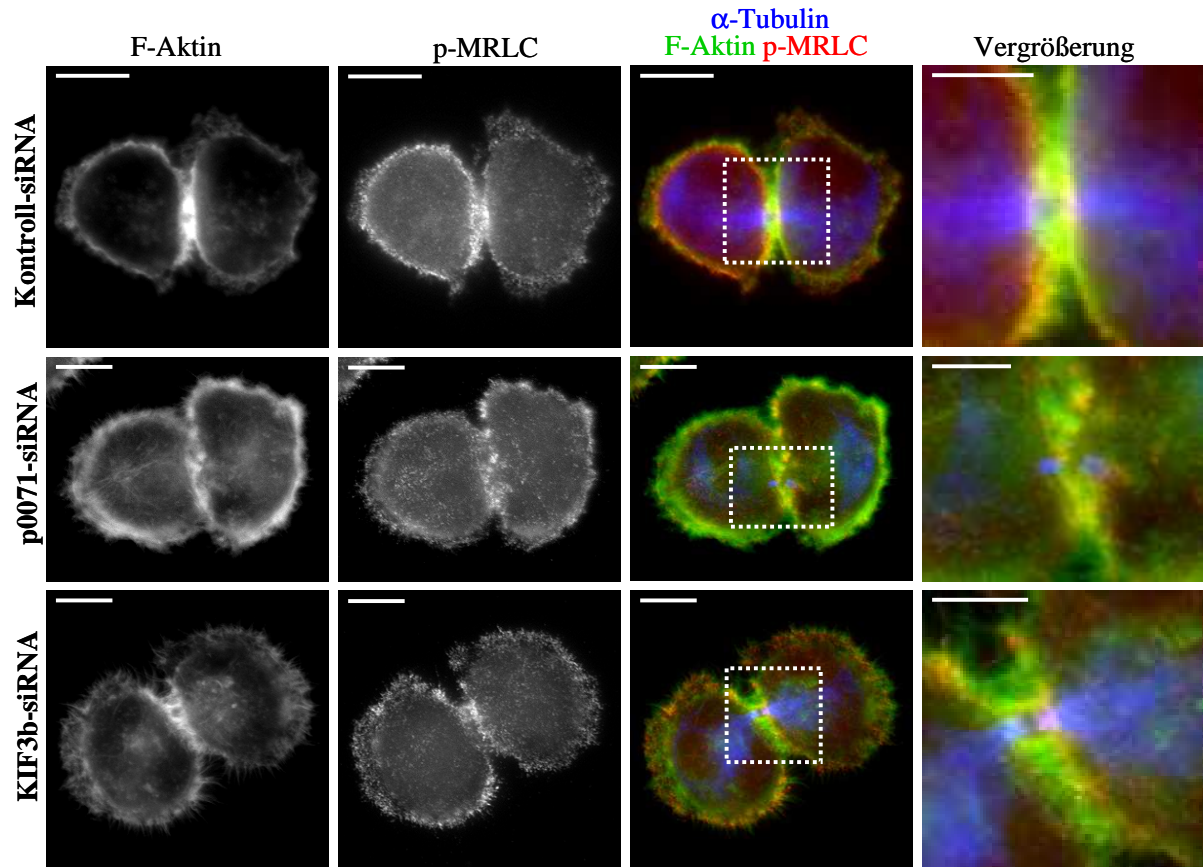


**Abb. 3-36: Die Verringerung der Expression von p0071 und KIF3b fördert die Bildung mehrkerniger Zellen**

HEK293-Zellen wurden mit Kontroll-, p0071- bzw. KIF3b-siRNA oder einer Mischung aus p0071- und KIF3b-siRNA (Mix) transfiziert. Zur Identifizierung der transfizierten Zellen wurde ein Plasmid, das für Histon2b-EGFP codiert, kotransfiziert. (A) Nach der Transfektion wurden die Zellen durch einen Doppel-Thymidinblock in der G1-Phase synchronisiert. 12 Stunden nach dem Ende des zweiten Thymidinblocks wurden die Zellen mittels FA fixiert und F-Aktin mit Alexa594-konjugiertem Phalloidin markiert. Die Zellkerne der transfizierten Zellen konnten durch die grüne Fluoreszenz des Histon2b-EGFP sichtbar gemacht werden. Die Balken entsprechen einer Größe von  $10\ \mu\text{m}$ . (B) Im Diagramm ist der mittlere Prozentsatz  $\pm$  STABW mehrkerniger Zellen aufgetragen. Es wurden in drei unabhängigen Experimenten jeweils mindestens 100 zufällig ausgewählte, transfizierte Zellen ausgezählt. (\*\*  $p \leq 0,005$ )

Die in Abs. 3.1 vorgestellten Ergebnisse lassen eine Funktion von p0071 im RhoA-Signalweg während der Zytokinese vermuten. Wird p0071 von KIF3b zum Zentralkörper transportiert, sollte die Verringerung der KIF3b-Expression ähnliche Effekte auf den RhoA-Signalweg haben, wie die Verringerung der p0071-Expression. Die Behandlung von HeLa-Zellen mit p0071-siRNA störte den Aufbau des kontraktilen Aktomyosin-Ringes (Abb. 3-4). Um zu untersuchen, ob die Reduktion der KIF3b-Expression ebenso dessen Assemblierung beeinträchtigt, wurden Zellen mit Kontroll-, p0071- bzw. KIF3b-siRNA transfiziert und während der Zytokinese mittels FA fixiert. Anhand der Akkumulation von p-MRLC (rot) und

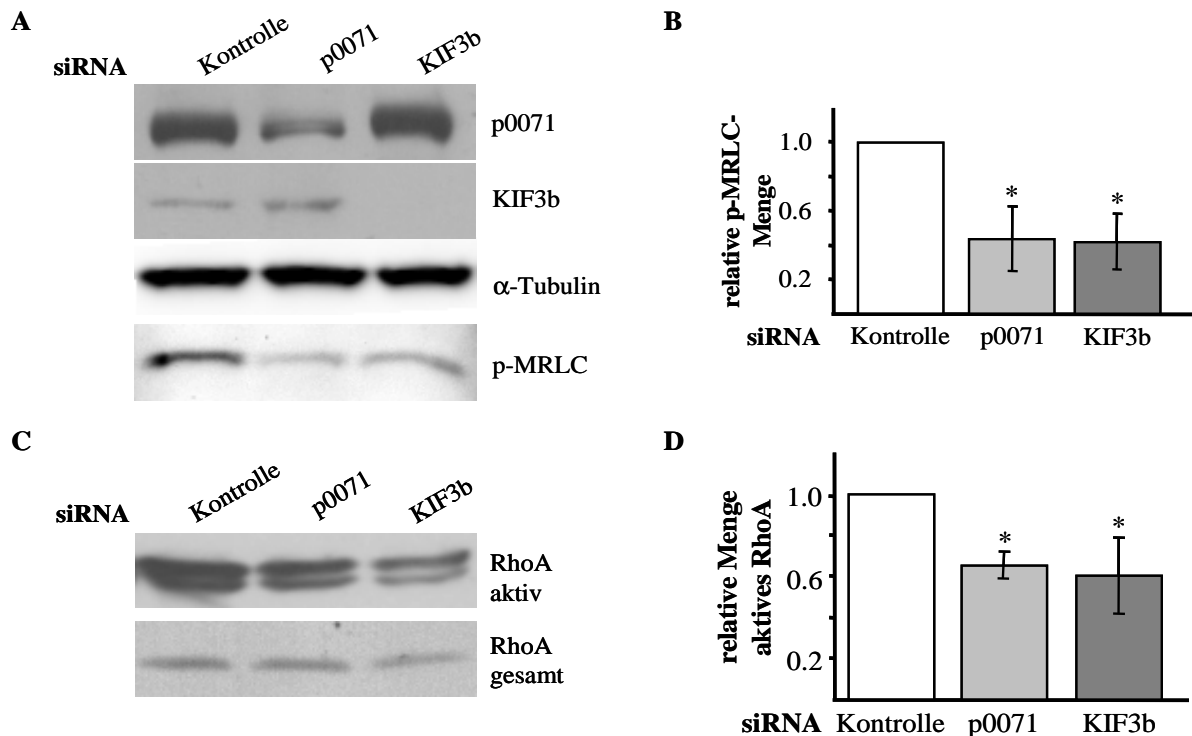
F-Aktin (grün) entlang der Teilungsfurche wurde der Aufbau des Aktomyosin-Ringes beurteilt. Sowohl p0071-siRNA-behandelte- als auch KIF3b-siRNA-behandelte Zellen zeigten deutliche Aberrationen beim Aufbau des Aktomyosin-Ringes (Abb. 3-37). Da dies unter der Kontrolle von RhoA erfolgt (Abs. 1.5.4), legen diese Befunde eine Rolle von KIF3b im RhoA-Signalweg nahe.



**Abb. 3-37: Die Verringerung der KIF3b-Expression stört den Aufbau des Aktomyosin-Ringes**  
HeLa-Zellen wurden mit Kontroll-, p0071- bzw. KIF3b-siRNA transfiziert, in der Prometaphase synchronisiert und 90 Minuten nach Entfernen des S-Mediums mittels FA fixiert. Die fixierten Zellen wurden anschließend zur Markierung von  $\alpha$ -Tubulin (blau) und p-MRLC (rot) mit spezifischen Ak inkubiert. Zur Visualisierung von F-Aktin (grün) wurde Alexa488-konjugiertes Phalloidin eingesetzt. Die Balken entsprechen 5  $\mu$ m und in der Vergrößerung der weiß umrandeten Bereiche 10  $\mu$ m.

Um eine mögliche Rolle von KIF3b im RhoA-Signalweg zu untersuchen, wurden Kontroll-, p0071- bzw. KIF3b-siRNA-transfizierte HeLa-Zellen in der Prometaphase synchronisiert und 90 Minuten nach Entfernen des S-Mediums lysiert. Die erhaltenen Lysate wurden anschließend mittels WB auf ihren p-MRLC-Gehalt untersucht. Dieser war in p0071- und KIF3b-siRNA-transfizierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollen auf ca. 40% signifikant reduziert (Abb. 3-38 A, B). Um zu prüfen, ob der Effekt der KIF3b-Depletion auf den p-MRLC-Gehalt direkt über die Aktivierung von RhoA vermittelt wird, wurde zusätzlich die RhoA-Aktivität in den Lysaten bestimmt. Sowohl die Reduktion von p0071 als auch die

Reduktion von KIF3b hatte eine Verringerung der RhoA-Aktivität während der Zytokinese auf ca. 60% zur Folge (Abb. 3-38 C, D).



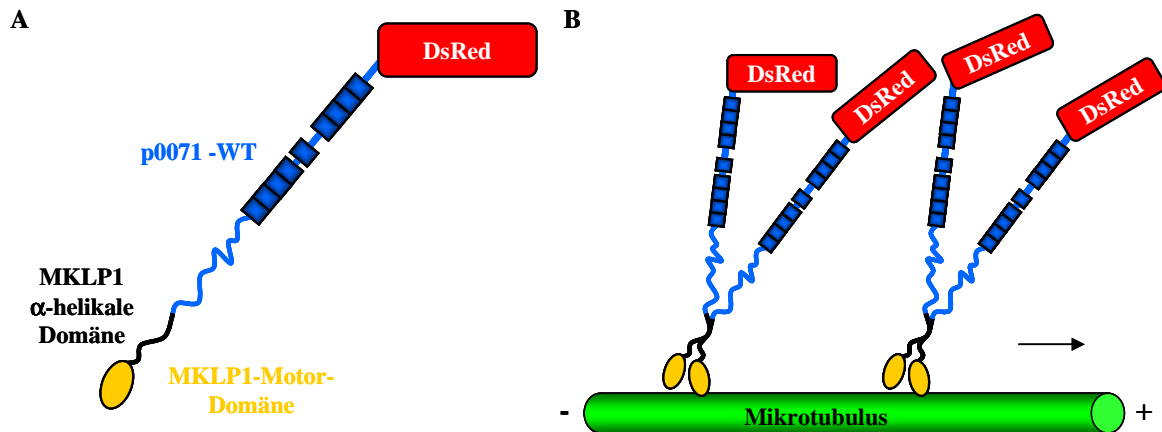
**Abb. 3-38: KIF3b ist in den RhoA-Signalweg während der Zytokinese involviert**

Synchronisierte mit Kontroll-, p0071- bzw. KIF3b-siRNA-transfizierte HeLa-Zellen wurden 90 Minuten nach dem Entfernen des S-Mediums lysiert. (A) Die Lysate wurden mittels WB auf die Mengen von p0071, KIF3b,  $\alpha$ -Tubulin und p-MRLC untersucht. (B) Das Diagramm stellt die relativen Mengen von p-MRLC  $\pm$  STABW aus drei unabhängigen Experimenten, normiert auf  $\alpha$ -Tubulin, in den unterschiedlichen Lysaten dar. (C) Mit den hergestellten Lysaten wurde außerdem ein RhoA-Aktivitätstest über ROK-RBD-Sepharose durchgeführt. Mittels WB wurde sowohl präzipitiertes RhoA (aktiv) als auch RhoA im Zelllysate (gesamt) zur Normierung nachgewiesen. (D) Die normierten relativen Mengen an aktivem RhoA  $\pm$  STABW aus drei unabhängigen Experimenten wurden vergleichend im Diagramm dargestellt. (\*  $p \leq 0,05$ )

Die bisherigen Daten zeigen einen Einfluss von KIF3b auf den RhoA-Signalweg während der Zytokinese (Abb. 3-37 und Abb. 3-38). Die durch KIF3b-siRNA-Behandlung hervorgerufenen Effekte auf den RhoA-Signalweg entsprechen denen, die nach der Transfektion von Zellen mit p0071-siRNA beobachtet werden konnten. Aufgrund dieser Erkenntnisse ist anzunehmen, dass der Einfluss von KIF3b auf den RhoA-Signalweg über den Transport von p0071 vermittelt wird.

Wenn die Funktion von KIF3b in der Zytokinese tatsächlich wesentlich von p0071 abhängt, sollte eine p0071-Variante, die unabhängig von KIF3b zum Zentralkörper transportiert werden kann, die Effekte der verringerten KIF3b-Expression aufheben oder zumindest deutlich abschwächen können. Um dies zu untersuchen, wurde p0071 an die Motordomäne von MKLP1 fusioniert. MKLP1 ist die Motorkomponente des Zentralspindlin-Komplexes. Der N-terminalen Bereich von MKLP1 beinhaltet die ATP-hydrolysierende,

Mikrotubuli-bindende Motordomäne und die  $\alpha$ -helikale Domäne, die für die Homodimerisierung notwendig ist (HIROKAWA, 1998). Erst die Dimerisierung von MKLP1 ermöglicht dessen Bewegung entlang der Mikrotubuli zu deren Plus-Ende. Aus diesem Grund wurde sowohl die MKLP1-Motordomäne, als auch die  $\alpha$ -helikale Domäne von MKLP1 N-terminal an p0071 fusioniert. Über die  $\alpha$ -helikale Domäne von MKLP1 sollten *in vivo* Dimere des Fusionsproteins gebildet werden, die sich dann entlang der Mikrotubuli bewegen können (Abb. 3-39).

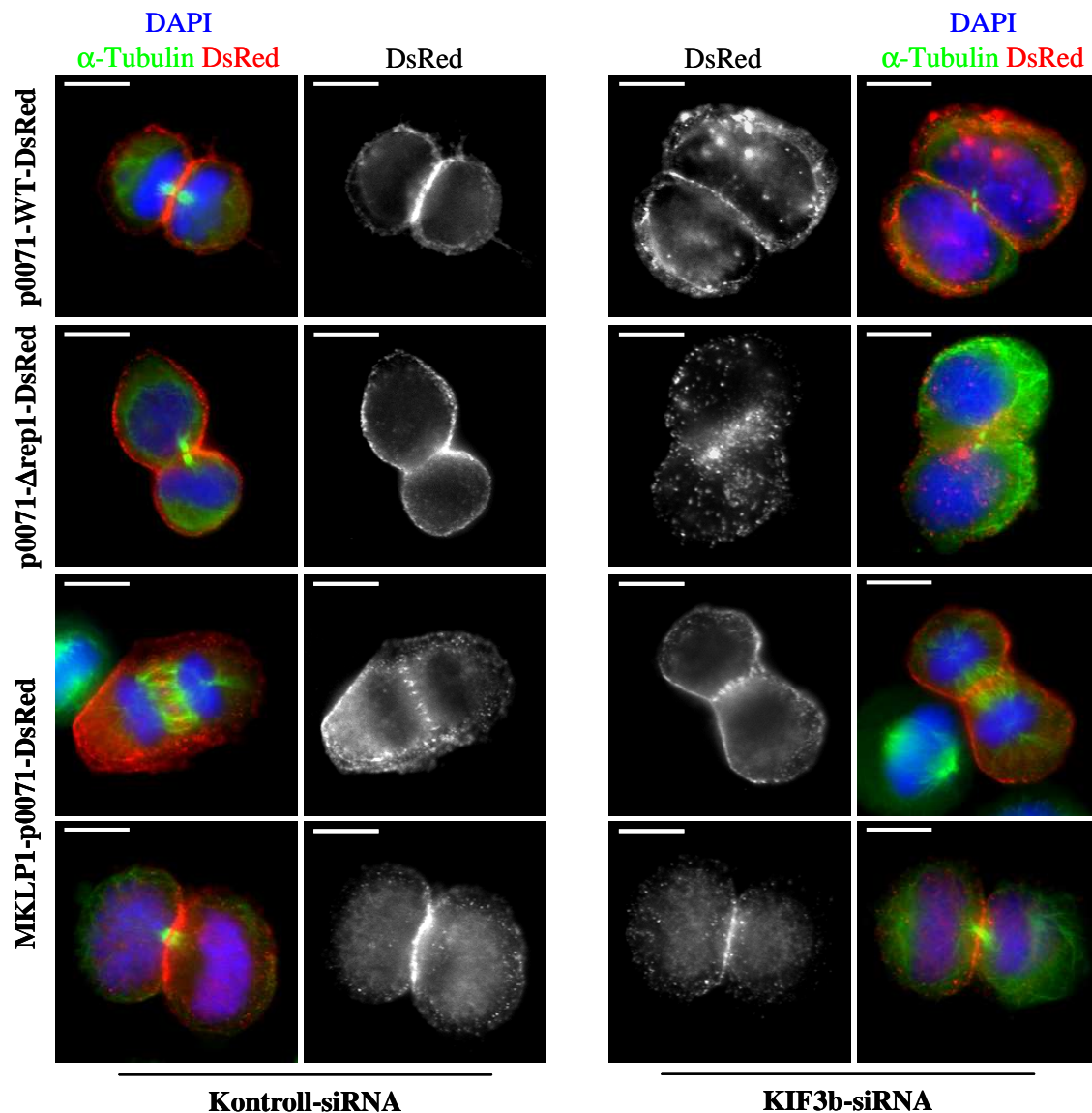


**Abb. 3-39: Schematische Darstellung des Fusionsproteins MKLP1-p0071-DsRed**

(A) Die cDNA des N-terminalen Bereichs von MKLP1 (As 1 - 617), der aus der Motordomäne (As 1 - 444) und der für die Dimerisierung notwendigen  $\alpha$ -helikalen Domäne (As 445 - 617) besteht, wurde in ein Plasmid, das für p0071-WT-DsRed codiert eingefügt. (B) *In vivo* sollten sich die Dimere des Fusionsproteins, wie dargestellt, entlang der Mikrotubuli in Richtung deren Plus-Enden bewegen können.

Die Funktionalität des Fusionsproteins wurde immunzytologisch untersucht. HeLa-Zellen wurden mit Kontroll- bzw. KIF3b-siRNA transfiziert. Nach dem Arretieren in der G1-Phase wurden die Zellen mit Plasmiden, die für die verschiedenen p0071-DsRed-Fusionsproteine (p0071-WT-DsRed, p0071- $\Delta$ rep1-DsRed, MKLP1-p0071-DsRed) codieren, transfiziert und anschließend durch Nocodazol in der Prometaphase synchronisiert. 90 Minuten nach Entfernen des S-Mediums wurden die Zellen mit Methanol fixiert. Die DNA wurde mittels DAPI (blau) und  $\alpha$ -Tubulin (grün) mit spezifischen Ak markiert. Über die Fluoreszenz des DsRed wurde die Lokalisation der p0071-Fusionsproteine analysiert. In mit Kontroll-siRNA-transfizierten Zellen akkumulierte p0071-WT-DsRed deutlich entlang der Teilungsfurche. In KIF3b-siRNA-behandelten Zellen war diese Akkumulation signifikant reduziert und mit einer verstärkten Bildung von zytoplasmatischen Aggregaten verbunden (Abb. 3-40; obere Reihe). Die KIF3b-bindungsdefiziente Mutante p0071- $\Delta$ rep1-DsRed war in Kontrollzellen und in KIF3b-siRNA-transfizierten Zellen nicht oder nur sehr schwach entlang der Teilungsfurche lokalisiert, zeigte aber wie p0071-WT-DsRed nach KIF3b-siRNA-Transfektion

eine verstärkte Bildung von zytoplasmatischen Aggregaten (Abb. 3-40; mittlere Reihe). MKLP1-p0071-DsRed war mit den zentralen Mikrotubuli in der Anaphase assoziiert und zeigte eine für MKLP1 typische Lokalisation. In Verlauf der Zytokinese akkumulierte MKLP1-p0071-DsRed wie p0071-WT-DsRed entlang der Teilungsfurche. Diese Verteilung im Verlauf der Mitose wurde nicht durch die Verringerung der KIF3b-Expression beeinflusst (Abb. 3-40; untere Reihen).

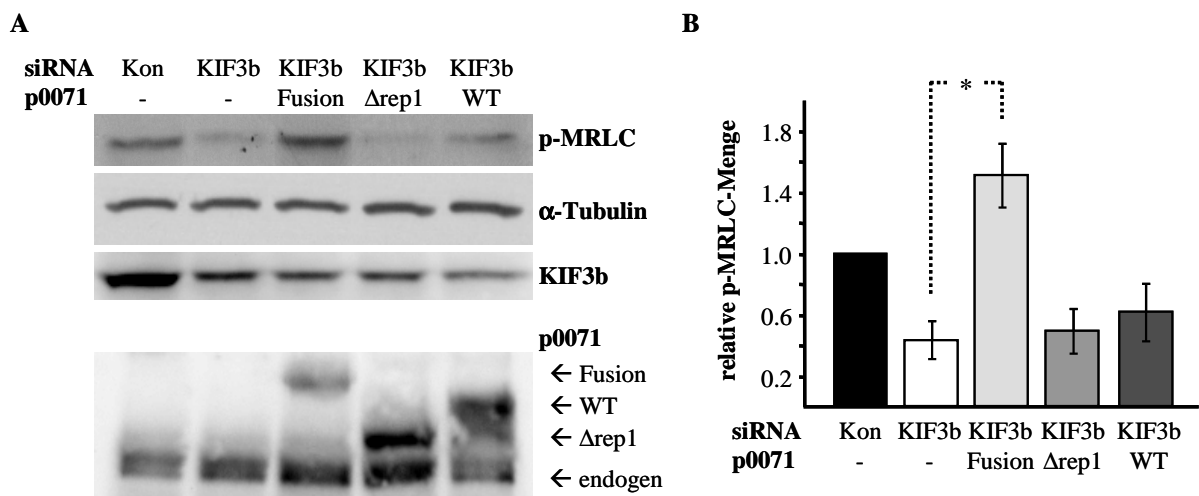


**Abb. 3-40: MKLP1-p0071-DsRed wird KIF3b-unabhängig zur Teilungsfurche transportiert**

Mit Kontroll- bzw. KIF3b-siRNA-transfizierte HeLa-Zellen mit Thymidin in der G1-Phase synchronisiert. Anschließend wurden die Zellen für 4 Stunden in Normalmedium kultiviert. In dieser Zeit wurden die Zellen mit einem für ein p0071-DsRed-Fusionsprotein-codierendem Plasmid, transfiziert und anschließend durch Nocodazol in der Prometaphase synchronisiert. 90 Minuten nach Entfernen des S-Mediums wurden die Zellen in Methanol fixiert. Die Färbung der DNA erfolgte mittels DAPI (blau) und  $\alpha$ -Tubulin (grün) wurde mit spezifischen Ak markiert. Die Lokalisation der p0071-DsRed-Fusionsproteine wurde über die Fluoreszenz des DsRed verfolgt.

Durch die fusionierte MKLP1-Motordomäne gelangte p0071 unabhängig von KIF3b zum Zentralkörper (Abb. 3-40). MKLP1-p0071-DsRed wurde im Folgenden eingesetzt, um

zu untersuchen, ob die durch KIF3b-siRNA-Behandlung hervorgerufenen Effekte auf den RhoA-Signalweg tatsächlich über den Transport von p0071 vermittelt wurden. HEK293-Zellen wurden, wie für HeLa-Zellen beschrieben (Abb. 3-40), während der Synchronisation nacheinander mit Kontroll- bzw. KIF3b-siRNA und Plasmiden, die für p0071-WT-DsRed sowie die verschiedenen p0071-Mutanten (p0071- $\Delta$ rep1-DsRed, MKLP1-p0071-DsRed) codieren, transfiziert. 90 Minuten nach dem Entfernen des S-Mediums wurden die Zellen lysiert und die Menge an p-MRLC in den Lysaten mittels WB bestimmt. In Abb. 3-41 ist zu sehen, dass in KIF3b-siRNA-transfizierten Zellen nur ca. 40% ( $\pm 11\%$ ) der Menge an p-MRLC im Vergleich zu den Kontrollzellen nachgewiesen werden konnte (siehe auch Abb. 3-38). Diese Verringerung konnte durch die zusätzliche Expression von MKLP1-p0071-DsRed in KIF3b-siRNA-behandelten Zellen verhindert werden. Die zusätzliche Expression von p0071-WT-DsRed erhöhte zwar leicht die Menge an p-MRLC in KIF3b-siRNA-behandelten Zellen. Die nachgewiesenen p-MRLC-Mengen erreichten jedoch nicht das Niveau der Kontrollzellen. Der durch KIF3b-siRNA-Transfektion induzierte Effekt auf die Phosphorylierung der MRLC während der Zytokinese wurde durch die KIF3b-bindungsdefiziente Mutante p0071- $\Delta$ rep1-DsRed nicht beeinflusst.



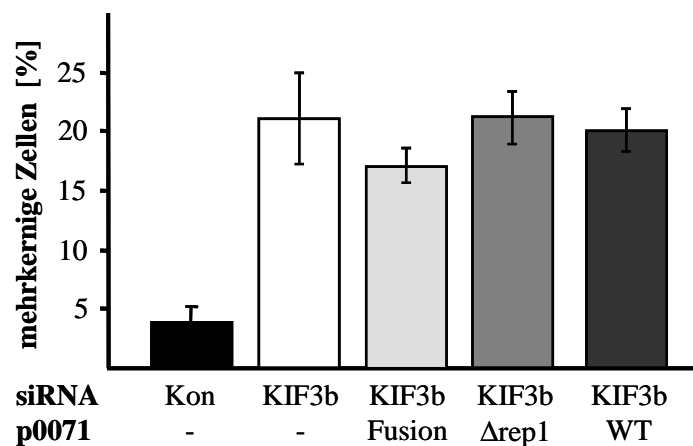
**Abb. 3-41: MKLP1-p0071-DsRed vermindert die durch KIF3b-siRNA-Behandlung induzierten Effekte auf die MRLC-Phosphorylierung während der Zytokinese**

HEK293-Zellen wurden nacheinander mit Kontroll- bzw. KIF3b-siRNA und einem Plasmid, das für eines der drei p0071-DsRed-Fusionsproteine codiert, transfiziert. Währenddessen wurden die Zellen synchronisiert und anschließend während der Zytokinese lysiert. (A) Die Lysate wurden mittels WB auf die Mengen von p0071, KIF3b und p-MRLC untersucht. Als Ladekontrolle diente  $\alpha$ -Tubulin. (B) Das Diagramm zeigt die relativen Mengen von p-MRLC normiert auf  $\alpha$ -Tubulin in den unterschiedlichen Lysaten. Die Fehlerbalken geben die STABW aus drei unabhängigen Experimenten an. (\*  $p \leq 0,05$ )

Das in Abb. 3-41 dargestellte Experiment zeigt, dass die Verringerung der p-MRLC-Menge während der Zytokinese in KIF3b-siRNA-transfizierten Zellen vermutlich auf den Verlust der p0071-Zentralkörper-Assoziation zurückzuführen ist. Durch den Einsatz einer

p0071-Mutante (MKLP1-p0071-DsRed), die unabhängig von KIF3b zur Teilungsfurche transportiert wird (Abb. 3-40), konnte die KIF3b-siRNA-induzierte Inhibierung der MRLC-Phosphorylierung verhindert werden. Da p0071- $\Delta$ rep1-DsRed keinen Einfluss auf die p-MRLC-Menge in KIF3b-siRNA-transfizierten Zellen hatte, ist anzunehmen dass p0071 die MRLC-Phosphorylierung nur beeinflussen kann, wenn es während der Zytokinese an der Teilungsfurche lokalisiert.

Weiterhin wurde untersucht, ob MKLP1-p0071-DsRed die durch KIF3b-siRNA-Behandlung induzierte Entstehung von mehrkernigen Zellen beeinflussen kann. Wie in Abb. 3-42 zu sehen ist, konnte die zusätzliche Expression von MKLP1-p0071-DsRed in KIF3b-siRNA-transfizierten Zellen die Bildung von mehrkernigen Zellen nur leicht reduzieren, wobei diese Reduktion nicht signifikant war. Die Expression von p0071-WT-DsRed und p0071- $\Delta$ rep1-DsRed in KIF3b-siRNA-behandelten Zellen hatte keinerlei Einfluss auf die Bildung mehrkerniger Zellen. Diese Ergebnisse lassen auf weitere Funktionen von KIF3b neben dem Transport von p0071 während der Zytokinese oder Mitose schließen.



**Abb. 3-42: Die durch KIF3b-siRNA-Behandlung induzierte Bildung mehrkerniger Zellen wird nicht durch MKLP1-p0071-DsRed vermindert**

HEK293-Zellen wurden entweder nur mit Kontroll-, bzw. KIF3b-siRNA transfiziert oder zusätzlich mit jeweils einem Plasmid, das für eine der drei p0071-DsRed-Fusionsproteine codiert, kotransfiziert. Zur Identifizierung der Zellkerne wurde außerdem ein Plasmid, das für Histon2b-EGFP codiert, transfiziert. Nach der Transfektion wurden die Zellen durch einen Doppel-Thymidinblock am Beginn der S-Phase synchronisiert. 12 Stunden nach Entfernen des Thymidins wurden die Zellen mittels FA fixiert. Im Diagramm ist der mittlere Prozentsatz  $\pm$  STABW mehrkerniger Zellen aufgetragen. Es wurden in drei unabhängigen Experimenten jeweils mindestens 100 zufällig ausgewählte, transfizierten Zellen ausgezählt.

Die in diesem Abschnitt vorgestellten Ergebnisse legen nahe, dass KIF3b über den Transport von p0071 zum Zentralkörper in die Kontrolle der RhoA-Aktivität während der Zytokinese involviert ist. Die verringerte RhoA-Aktivität während der Zytokinese führt in KIF3b-siRNA-behandelten Zellen wie in p0071-siRNA-behandelten Zellen zu Störungen bei der Myosin-II-Aktivierung und der Assemblierung des Aktomyosin-Ringes (Abb. 3-37 und



Abb. 3-38). Der Einsatz einer p0071-Mutante (MKLP1-p0071-DsRed), die unabhängig von KIF3b zur Teilungsfurche gelangt, bekräftigt die Hypothese, dass die gestörte p0071-Lokalisation in KIF3b-siRNA-transfizierten Zellen die Ursache für diese Beobachtungen ist (Abb. 3-39 bis Abb. 3-41).

## 4 Diskussion

Aus Voruntersuchungen war bekannt, dass endogenes p0071 während der Interphase Zentrosomen-assoziiert vorliegt. Während der Mitose lokalisiert p0071 bis zum Ende der Metaphase an den Spindelpolen. Im Verlauf der Anaphase wird p0071 zur zentralen Spindel rekrutiert und akkumuliert schließlich am Zentralkörper während der Zytokinese. Außerdem war bekannt, dass die Überexpression von p0071 sowie die Reduktion der p0071-Expression mittels siRNA zur Entstehung mehrkerniger Zellen führt (WOLF *et al.*, 2006). Diese Eigenschaften von p0071 ähneln damit der von Proteinen, die eine Rolle bei der Regulation der Mitose und/oder der Zytokinese aufweisen. Die Akkumulation von p0071 entlang der Teilungsfurche und am Zentralkörper wurde für viele Proteine wie zum Beispiel für ECT2, ROK und Citron beschrieben, die essentiell für die Aktomyosin-basierte RhoA-kontrollierte Einschnürung sind (MADAULE *et al.*, 1998; KIMURA *et al.*, 2000; KOSAKO *et al.*, 2000). Aber auch Proteine (zum Beispiel Centriolin, Snapin), die eine Rolle bei der Membranvesikel-vermittelten Abschnürung der Zellen haben, lokalisieren wie p0071 am Zentralkörper (GROMLEY *et al.*, 2005). Die beobachtete Mehrkernigkeit von Zellen nach p0071-Überexpression bzw. p0071-siRNA-Behandlung könnte demnach auf eine Rolle von p0071 sowohl bei der Regulation der Assemblierung und/oder -Kontraktion des Aktomyosin-Ring als auch bei der Vermittlung von Membrantransportvorgängen zurückgehen. Da Zentrosomen für die Ausbildung der bipolaren Teilungsspindel benötigt werden, bestand die Möglichkeit, dass p0071 über seine Zentrosomen-Assoziation auch eine Funktion bei der Positionierung und/oder Assemblierung der Teilungsspindel haben könnte (SLUDER *et al.*, 1986). Durch die Beobachtung sich teilender Zellen mit verringerter p0071-Expression stellte sich heraus, dass die Chromosomensegregationen dieser Zellen normal verliefen, aber die anschließenden Zytokinese häufig verzögert und morphologisch gestört waren (Abb. 3-2 und Abb. 3-3). Dies wurde durch Ergebnisse gestützt, die zeigten, dass in Zellen mit verringerter p0071-Expression multipolare Spindeln erst nach dem Erscheinen von mehrkernigen Zellen zu beobachten waren (WOLF *et al.*, 2006). Diese Ergebnisse implizierten eine Funktion von p0071 in der Zytokinese und nicht bei der Chromosomensegregation.

Die Zytokinese beginnt nach der Segregation der Chromosomen und führt zur physikalischen Trennung der Tochterzellen. Vereinfacht dargestellt, werden hierfür drei Teilprozesse benötigt: 1) Die Ausbildung der zentralen Spindelregion zur Lokalisierung kritischer Regulatoren und Effektoren zur Positionierung des Aktomyosin-Ringes. 2) Die Assemblierung und Kontraktion des Aktomyosin-Ringes unter Kontrolle der GTPase RhoA,

der für die Einschnürung der sich teilenden Zelle verantwortlich ist. 3) Der Transport von Membranvesikeln und deren Fusion am Zentralkörper führt schließlich zur Abschnürung der Tochterzellen, die zunächst über eine dünne zytoplasmatische Brücke, in deren Mitte sich der Zentralkörper befindet, verbunden bleiben (Abs. 1.5). Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse geben Anlass zu der Vermutung, dass p0071 sowohl an der Aktomyosin-basierten Einschnürung als auch an der Vesikel basierten Abschnürung beteiligt sein könnte. Die entsprechenden Ergebnisse werden in den folgenden Abschnitten diskutiert und es wird versucht anhand dieser Ergebnisse Modelle zu erstellen, die gleichzeitig als Arbeitshypothese für die noch offenen Fragen dienen.

#### **4.1 Die Rolle von p0071 bei der Regulation der RhoA-Aktivität während der Zytokinese**

Die Tatsache, dass in mit p0071-siRNA-transfizierten Zellen weniger F-Aktin und p-MRLC an der Teilungsfurche nachgewiesen werden konnte (Abb. 3-4), unterstützt die These einer Funktion von p0071 in der Zytokinese und legt nahe, dass p0071 an der Assemblierung und Kontraktion des Aktomyosin-Ringes beteiligt sein könnte. Da die Ausbildung der zentralen Spindel durch die Verringerung der p0071-Expression in den meisten Fällen unbeeinflusst war, sollten die beobachteten Effekte nicht auf gestörte Mikrotubuli-Dynamiken zurückgehen. Der Aktomyosin-Ring ist grundlegend aus F-Aktin und Myosin-II, das durch die Phosphorylierung der regulatorischen leichten Kette am Serin19 aktiviert wird, aufgebaut. Für die Assemblierung und Kontraktion des Aktomyosin-Ringes sind ROK, Citron (MRLC-Phosphorylierung) und mDia2 (Aktin-Polymerisierung) verantwortlich. Die Transfektion von Zellen mit mDia2-siRNA verhinderte die Akkumulation von F-Aktin entlang der Teilungsfurche (WATANABE et al., 2008). Die Inhibierung von ROK mit Y27632 resultierte zu Beginn der Anaphase in einer verminderten kortikalen Akkumulation von p-MRLC im Äquatorialbereich der Zellen (WATANABE et al., 2008; ASANO et al., 2009). Da beide Phänotypen in p0071-siRNA-transfizierten HeLa-Zellen beobachtet werden konnten (Abb. 3-4), ist anzunehmen, dass p0071 in die Regulation dieser Proteine involviert ist. Die Funktionen von ROK, Citron und mDia2 sind direkt abhängig von der RhoA-Aktivität (Abs. 1.5.4), so dass eine Rolle von p0071 bei der Kontrolle der RhoA-Aktivität während der Zytokinese vermutet wurde.

Mit Hilfe der Raichu-Biosensoren wurde der Einfluss von p0071 auf die Aktivierung der Rho-GTPasen Rac1, Cdc42 und RhoA analysiert. Dabei konnte eine Verringerung der RhoA-Aktivität in p0071-shRNA-transfizierten Zellen festgestellt werden, während die

Aktivitäten von Rac1 und Cdc42 unbeeinflusst blieben (Abb. 3-5 und Abb. 3-6). Es ist zu beachten, dass mit Hilfe der Biosensoren nur die Aktivität der exogenen GTPase des Biosensors bestimmt werden kann. Außerdem können die GTPasen der Biosensoren aufgrund der großen Entfernung zwischen dem C-terminalen Prenylrest und der GTPase (Abb. 3-5) nicht mit den für die Lokalisation essentiellen Rho-GDIs (Abs. 1.4) interagieren (NAKAMURA et al., 2006). Die Biosensoren assoziieren deshalb unspezifisch mit der Plasmamembran und mit intrazellulären Membranen, wodurch die Biosensoren teilweise deutlich anders lokalisieren als die endogenen GTPasen der Zelle. Infolge dieser Tatsache wurden die Aktivitäten der Biosensoren ausschließlich während der Interphase bestimmt und nicht im Verlauf der Mitose, wo die korrekte Lokalisation der beteiligten Proteine von großer Bedeutung ist. Da ein Einfluss von GDIs auf die Biosensoren ausgeschlossen ist, lässt die beobachtete Verringerung der RhoA-Aktivität in p0071-shRNA-transfizierten Zellen (Abb. 3-6) den Schluss zu, dass p0071 die Aktivität von RhoA direkt beeinflusst und/oder diese über GEFs und/oder GAPs reguliert. Ein Einfluss von p0071 auf die Aktivitäten von Rac1 und Cdc42 kann aus den Experimenten angesichts der fehlenden GDI-Regulation der Biosensoren nicht ausgeschlossen werden, wurde aber aufgrund der untergeordneten Bedeutung von Rac1 und Cdc42 während der Mitose bzw. Zytokinese nicht weiter untersucht.

Die Abhängigkeit der RhoA-Aktivität von der p0071-Expression konnte außerdem in einem Aktivitätstest mit Rhotekin-Sepharose gezeigt werden. Die Überexpression von p0071 führte zu erhöhten Mengen an aktivem RhoA, während die Depletion von p0071 die Mengen an aktivem RhoA in Interphase-Zellen reduzierte (Abb. 3-7). Bemerkenswert erscheint, dass die moderate Überexpression von p0071 die RhoA-Aktivität effektiver zu stimulieren schien als eine starke Überexpression von p0071 (Abb. 3-7 und Abb. 7-2). Da eine transiente Expression von Proteinen in eukaryotischen Zellen schwer zu steuern ist und die Etablierung stabiler Zelllinien scheiterte, weil trotz der Verwendung eines induzierbaren Systems (Tet-On; Invitrogen) auch unter Expressions-reprimierenden Bedingungen geringe Mengen an exogenem p0071 exprimiert wurden, die ausreichten um Zytokinesedefekte und später Apoptose auszulösen, wurde dieses Phänomen nicht systematisch in Zelllysaten mit ansteigenden p0071-Mengen untersucht. Deshalb kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich dabei um eine Experiment-bedingte Varianz handelt. Denkbar wäre allerdings auch ein negativer Rückkopplungsmechanismus, der zu großen Mengen an aktivem RhoA in der Zelle entgegensteuert. Obwohl die Untersuchungen der RhoA-Aktivität ausschließlich in Interphase-Zellen erfolgten, ist aufgrund der gezeigten Störungen bei der Assemblierung des Aktomyosin-Ringes in p0071-siRNA-behandelten Zellen anzunehmen, dass p0071 ebenfalls

an der Aktivitätsregulation von RhoA während der Zytokinese beteiligt ist. Diese Vermutung konnte durch spätere Analysen der RhoA-Aktivität in Zellen, die sich in der Zytokinese befanden, bestätigt werden. Auch bei diesen korrelierte eine verringerte p0071-Expression mit verringerten Mengen an aktivem RhoA (Abb. 3-38). Die These, dass p0071 in die Regulation der RhoA-Aktivität während der Zytokinese involviert ist, wird durch die Beobachtung unterstützt, dass die zusätzliche Expression von RhoA-DA in p0071-depletierten Zellen die Entstehung mehrkerniger Zellen signifikant reduzierte (WOLF et al., 2006). Ob der Einfluss von p0071 auf die Aktivität von RhoA nur während der Zytokinese eine Rolle spielt oder auch bei anderen Prozessen von Bedeutung ist, sollte Gegenstand zukünftiger Studien sein.

p0071 könnte an der Regulation der RhoA-Aktivität auf verschiedenen Wegen beteiligt sein. Unter anderem war eine direkte Interaktion von p0071 mit RhoA denkbar, die den Aktivitätsstatus von RhoA beeinflussen könnte. Mit Hilfe von BiFC-Analysen wurde eine Interaktion von p0071 mit RhoA am Ort der Einschnürung gezeigt. Da zwischen der Interaktion der beiden überexprimierten Proteine und dem nachweisbaren BiFC-Signal ca. 20 Minuten vergehen und ein diffuses BiFC-Signal auch schon in Metaphase-Zellen zu beobachten war, ist eine genaue Aussage, wann beide Proteine miteinander interagieren, anhand dieser Daten nicht möglich (Abb. 3-8). Eine IP beider Proteine in synchronisierten Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten könnte diese Frage klären helfen. Weitere Analysen der Interaktion zwischen p0071 und RhoA legen außerdem nahe, dass p0071 eine höhere Affinität zu aktivem RhoA aufweist (Abb. 3-9). Die Aktivierung von RhoA in der Zytokinese durch ECT2 erfolgt erst nach der Segregation der Chromosomen, woraufhin ECT2 an die zentrale Spindel rekrutiert wird und RhoA aktiviert. Die größten Mengen an aktivem RhoA sind in der Telophase während der Zelleinschnürung nachzuweisen (KIMURA et al., 2000). Daraus kann geschlossen werden, dass der Grossteil von RhoA an der Teilungsfurche im aktiven Zustand vorliegt. Die bevorzugte Interaktion von p0071 mit aktivem RhoA impliziert, dass endogenes p0071 mit aktiviertem RhoA entlang der Teilungsfurche interagiert. Diese Interaktion könnte bewirken, dass RhoA länger im aktiven Zustand bleibt, indem p0071 zum Beispiel die Bindung von RhoA-inaktivierenden GAP-Proteinen verhindert.

Neben einer Interaktion von p0071 mit RhoA konnte auch eine Interaktion mit dem Rho-GEF ECT2 mit dem BiFC-System bestätigt werden (Abb. 3-10). Wie unabhängig mittels Hefe-Dihybrid- und GST-PD-Experimenten gezeigt, interagiert die Arm-Domäne von p0071 mit der regulatorischen N-terminalen Domäne von ECT2. Für eine Interaktion beider Proteine *in vivo* sprechen Untersuchungen, die zeigten, dass die gleichzeitige Expression von p0071-WT und ECT2-NT zu einer deutlichen Abmilderung des vom N-terminalen ECT2-Fragment

induzierten Zytokinesedefekts führte (WOLF et al., 2006). BiFC-Analysen implizieren, dass p0071 und ECT2 während der Zytokinese entlang der Teilungsfurche einen Komplex bilden (Abb. 3-10). Wie im Fall der Interaktion von p0071 mit RhoA bedarf es auch hier zusätzlicher IP-Experimente, mit denen sich der Zeitpunkt der Interaktion von p0071 und ECT2 besser bestimmen lässt. Immunzytologische Untersuchungen legen jedoch nahe, dass ECT2 früher als p0071 entlang der Teilungsfurche lokalisiert wird und möglicherweise als Anker für p0071 dient (Abs. 3.3.1). Basierend auf den vorhandenen Interaktionsstudien kann p0071 über seine Arm-Domäne sowohl mit RhoA als auch mit ECT2 interagieren. Um festzustellen, ob ECT2 und RhoA um dieselbe Bindestelle auf der Arm-Domäne von p0071 konkurrieren oder an unterschiedliche Regionen binden, wären Wettbewerbsversuche mit rekombinanten Proteinen hilfreich.

Die N-terminale, regulatorische Domäne von ECT2 kann eine intramolekulare Interaktion mit der C-terminalen GEF-Domäne zur Autoinhibierung eingehen. Die Phosphorylierung von ECT2 am T431 durch Plk1 bewirkt vermutlich eine Konformationsänderung, die ECT2 in die offene Konformation überführt und die Interaktion der N-terminalen Domäne mit MgcRacGAP ermöglicht (WOLFE et al., 2009). An MgcRacGAP gebundenes ECT2 wird über MKLP1 zur zentralen Spindel transportiert. Da ECT2 RhoA effizient erst entlang der Teilungsfurche aktiviert, kann über die Notwendigkeit von zusätzlichen Regulatoren spekuliert werden, mit denen ECT2 erst an der Teilungsfurche zur vollständigen Aktivierung interagiert. In diesem Zusammenhang wäre es denkbar, dass solange ECT2 und MgcRacGAP im Komplex vorliegen, durch ECT2 aktiviertes RhoA sofort durch MgcRacGAP inaktiviert wird. Diese These wird durch Untersuchungen in *C. elegans*-Embryonen gestützt, bei denen gezeigt wurde, dass eine Mutante von MgcRacGAP ohne GAP-Aktivität die Aktivierung von RhoA in einem weiten Bereich um die Äquatorialregion induzierte. In Kontroll-Embryonen kam es fast ausschließlich zur Akkumulation von aktivem RhoA entlang der zukünftigen Teilungsfurche (MILLER und BEMENT, 2009). Da p0071 mit ECT2 vermutlich erst am Ort der RhoA-Aktivierung interagiert, könnte p0071 die sofortige Inaktivierung von RhoA durch MgcRacGAP verhindern und auf diese Weise zur lokalen Aktivierung von RhoA beitragen.

Um eine mögliche Funktion von p0071 als Regulator der RhoA-Aktivität weiter zu untersuchen, wurde die GDP/GTP-Austausch-Aktivität von ECT2 gegenüber RhoA in Abhängigkeit von p0071 analysiert (Abb. 3-11). ECT2 weist nur im hyperphosphorylierten Zustand eine GDP/GTP-Austausch-Aktivität gegenüber RhoA auf (TATSUMOTO et al., 1999). Außerdem sind für p0071 Phosphorylierungen während der Mitose gezeigt worden,

die im Zusammenhang mit den Funktionen von p0071 während der Zytokinese stehen könnten (NOUSIAINEN et al., 2006). Aus diesem Grund wurde die Analyse des GDP/GTP-Austauschs nicht mit rekombinantem ECT2 und p0071 durchgeführt. Stattdessen wurden ECT2 und p0071 als Flag-Fusionsproteine aus HEK293-Zellen in der Zytokinese aufgereinigt. Flag-p0071-WT bewirkte etwa den gleichen GDP/GTP-Austausch bei RhoA wie Flag-ECT2-WT. Dies ist überraschend, da p0071 keine herkömmliche GEF-Domäne besitzt. Die Möglichkeit einer ECT2-Kontamination im p0071-Präzipitat ist ebenso wenig auszuschließen, wie die Kontamination durch andere Rho-GEF-Proteine und durch an p0071 gebundenes RhoA selbst. Ob diese möglichen Kontaminationen jedoch in der Lage sind, zu einer GDP/GTP-Austausch-Rate zu führen, die der von überexprimiertem Flag-ECT2-WT, dem Hauptaktivator von RhoA, entspricht, bleibt fraglich. Da für das Arm-Protein Smg-GDS eine über die Arm-Domäne vermittelte GDP/GTP-Austausch-Aktivität auch für GTPasen der Rho-Familie gezeigt werden konnte, ist nicht auszuschließen, dass die beobachteten Effekte auf eine bisher unbekannte GDP/GTP-Austausch-Aktivität von p0071 gegenüber RhoA zurückzuführen sind (MIZUNO et al., 1991). Gegen eine Funktion von p0071 als GEF-Protein für RhoA spricht allerdings die bevorzugte Interaktion von p0071 mit aktivem RhoA. GEF-Proteine interagieren in der Regel mit inaktiven GTPasen (WENNERBERG et al., 2002). Da die Frage, ob p0071 tatsächlich eine GEF-Aktivität gegenüber RhoA besitzt nicht zweifelsfrei beantwortet werden kann, sollte die GDP/GTP-Austausch-Analyse trotz der zuvor genannten Vorbehalte mit rekombinantem p0071 durchgeführt werden. Dabei könnten auch p0071-Mutanten zum Einsatz kommen, die eine Phosphorylierung von p0071 an den Serinen in dessen Kopf-Domäne vortäuschen, die in einer Untersuchung als ausschließlich in der Mitose phosphoryliert identifiziert wurden (NOUSIAINEN et al., 2006).

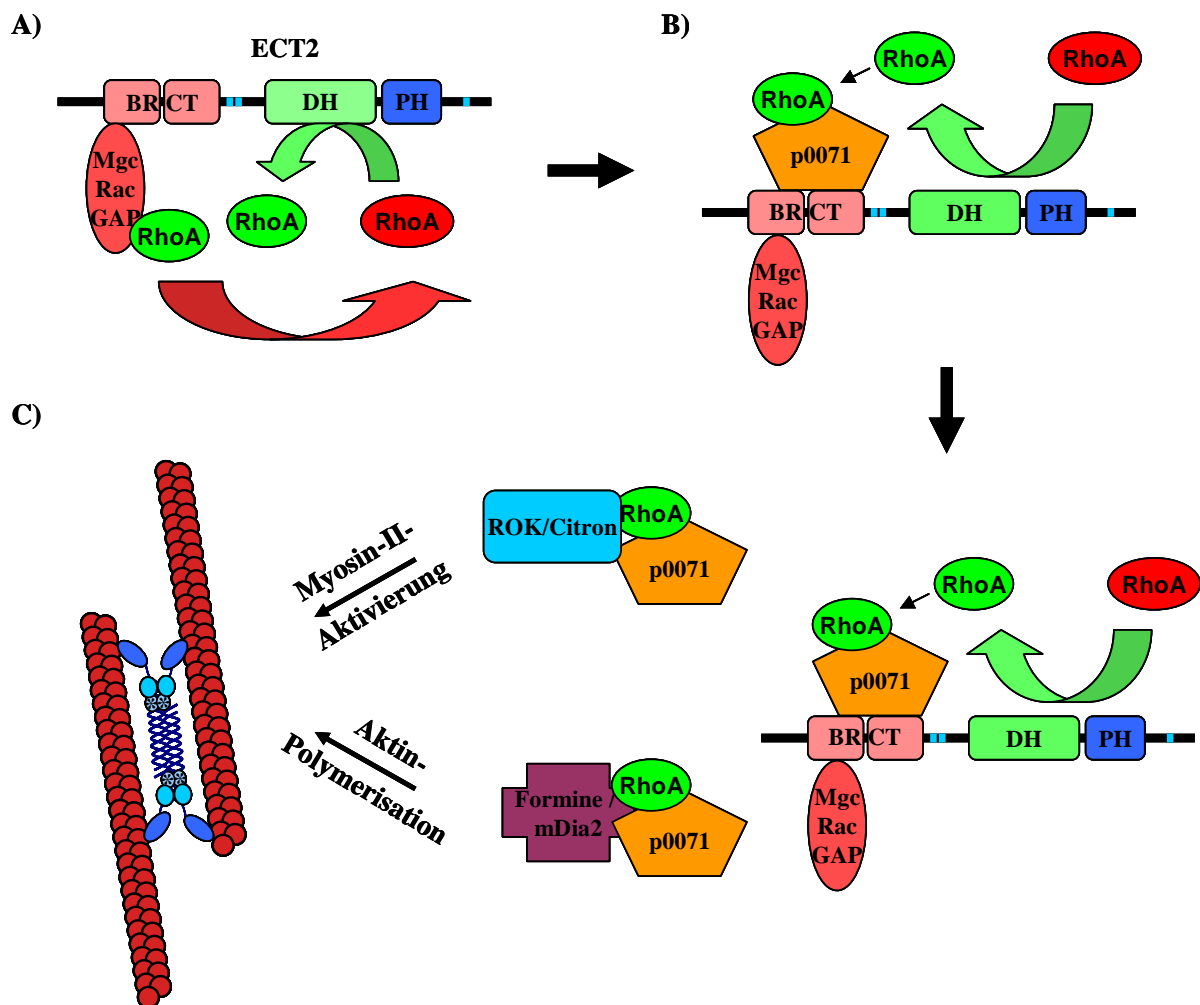
Die Analyse des GDP/GTP-Austauschs zeigte außerdem, dass Flag-p0071-WT und Flag-ECT2-WT zusammen die höchsten Austausch-Aktivitäten gegenüber RhoA aufwiesen. Damit übertrafen Flag-p0071-WT und Flag-ECT2-WT zusammen die GDP/GTP-Austausch-Aktivität der GEF-Domäne von ECT2 (Flag-ECT2-CT), woraus zu schließen ist, dass ECT2 nicht ausschließlich negativ über seine N-terminale Domäne reguliert wird (KIM et al., 2005). Vielmehr könnte ein durch p0071 induzierter Mechanismus existieren, der die GDP/GTP-Austausch-Aktivität von ECT2 gegenüber von RhoA weiter verstärkt. Es ist aber auch die Möglichkeit eines Komplexes aus p0071 und ECT2 in Betracht zu ziehen, in dem beide Proteine eine GDP/GTP-Austausch-Aktivität für RhoA besitzen und gemeinsam RhoA entlang der Teilungsfurche zur Assemblierung und Kontraktion des Aktomyosin-Ringes aktivieren. Weiterhin kann über eine Rolle von p0071 als Kofaktor für ECT2 spekuliert

werden, der nicht die GDP/GTP-Austausch-Aktivität von ECT2 gegenüber RhoA vermittelt, sondern aktives RhoA von der ECT2-GEF-Domäne sequestriert. Für diese These spricht ebenfalls die bevorzugte Interaktion von p0071 mit aktivem RhoA. ECT2 könnte dann schneller für die Aktivierung neuer RhoA-Moleküle zur Verfügung stehen. In diesem Fall müsste ein Komplex aus RhoA-GTP und p0071 von ECT2 dissoziieren und „freies“ p0071 mit ECT2 reassoziieren. Zur Überprüfung dieser Hypothese sollte eine IP durchgeführt werden, bei der die Bindung von p0071 und ECT2 an RhoA-DA während der Zytokinese untersucht wird oder eine Kompetitionsanalyse, mit der festgestellt werden könnte, ob p0071 in Gegenwart von RhoA-DA noch immer mit ECT2 assoziiert vorliegt. Es ist möglich, dass p0071 den aktiven Zustand von RhoA nicht nur stabilisiert, indem p0071 die Bindung RhoA-deaktivierender GAP-Proteine behindert, sondern auch indem p0071 die intrinsische GTPase-Aktivität von RhoA selbst inhibiert. Das bei der durchgeführten GDP/GTP-Austausch-Analyse verwendete *mant*-GTP kann zwar hydrolysiert werden, bleibt allerdings an die GTPase gebunden und kann aufgrund der unveränderten Fluoreszenzintensität nicht von gebundenem *mant*-GTP unterschieden werden (JOHN et al., 1990; LEONARD et al., 1994). Deshalb kann die mögliche Stabilisierung von aktivem RhoA durch p0071 nicht mit diesem Testsystem beobachtet werden. Mit einem GTPase-Aktivitätstest, durch den der Umsatz von GTP zu GDP zum Beispiel über den kolorimetrischen Nachweis von freierwerdendem Phosphat bestimmt werden kann, könnte eine GTPase-inhibierende Funktion von p0071 untersucht werden.

Auch wenn der Mechanismus, über den p0071 RhoA aktiviert nicht bis ins Detail aufgeklärt werden konnte, kann anhand der in Abs. 3.1 vorgestellten Ergebnisse folgendes Modell postuliert werden, dass eine Funktion für p0071 bei der räumlichen und zeitlichen Koordination der RhoA-Aktivierung beschreibt (Abb. 4-1): (A) Der gemeinsame Transport von ECT2 und MgcRacGAP zur zentralen Spindelregion stellt über wiederholte Zyklen von RhoA-Aktivierung (ECT2) und RhoA-Inaktivierung sicher, dass aktives RhoA nicht schon beim Transport von ECT2 am falschen Ort akkumuliert. (B) ECT2 akkumuliert vor p0071 entlang der Äquatorialebene der Zelle und könnte p0071 dort verankern. Ob MgcRacGAP in einem Komplex mit ECT2 und p0071 bleibt oder durch p0071 verdrängt wird, bleibt ebenso ungeklärt wie der mögliche Einfluss anderer regulatorischer Proteine. In einem hypothetischen Komplex aus ECT2, MgcRacGAP und p0071 bindet p0071 durch ECT2 aktiviertes RhoA, verhindert so die sofortige Inaktivierung durch MgcRacGAP und verschiebt das Gleichgewicht zwischen RhoA-Aktivierung und RhoA-Inaktivierung in Richtung der RhoA-Aktivierung. (C) Ein Komplex aus aktivem RhoA und p0071 dissoziiert von ECT2 und



„freies“ p0071 bindet an ECT2. Auf diese Weise kommt es zur Akkumulation von aktivem RhoA entlang der Teilungsfurche. Spekulativ bleibt auch die möglicherweise durch p0071 geförderte Rekrutierung von RhoA-Effektoren, die schließlich die Assemblierung und Kontraktion des Aktomyosin-Ringes bewirken. Ob an aktives RhoA gebundenes p0071 im Komplex mit ECT2 bleibt oder als Gerüstprotein auch Interaktionen mit RhoA-Effektoren (ROK, Citron, mDia2) eingeht, ist in Zukunft aufzuklären. Denkbar wäre in diesem Zusammenhang die Nutzung eines Konformations-spezifischen Ak, der aktives RhoA aus Zelllysaten präzipitieren kann (NewEastBioscience, USA) und die Analyse der dabei kopräzipitierten Komplexe.



**Abb. 4-1: Modell zur Rolle von p0071 bei der Aktomyosin-basierten Einschnürung**

(A) ECT2 wird im Komplex mit MgcRacGAP über MKLP1 (nicht gezeigt) zur zentralen Spindelregion transportiert. Durch die ECT2-vermittelte RhoA-Aktivierung und die MgcRacGAP-vermittelte RhoA-Inaktivierung kann aktives RhoA (grün) während des Transportes nicht akkumulieren. (B) Entlang der Teilungsfurche bindet ECT2 p0071, das durch die Bindung von aktivem RhoA dessen Inaktivierung über MgcRacGAP verhindert. (C) Durch die Dissoziation eines Komplexes aus aktivem RhoA und p0071, anschließender Bindung von „freiem“ p0071 an ECT2 und dessen Assoziation mit durch ECT2 aktiviertem RhoA kommt es zur Akkumulation von aktivem RhoA. Spekulativ ist ein Einfluss von p0071 auf die Rekrutierung von RhoA-Effektoren (mDia2, ROK und Citron), die für Assemblierung und Kontraktion des Aktomyosin-Ringes verantwortlich sind.

Untersuchungen mit konstitutiv aktivem RhoA und MgcRacGAP lassen auf eine Inaktivierung von RhoA am Ende der Zytokinese schließen (MINOSHIMA et al., 2003; WOLF et al., 2006; MORIN et al., 2009). Auch bei diesem Aspekt ist ein Einfluss von p0071 denkbar. Über einen bisher unbekanntem Rückkopplungsmechanismus könnte p0071 bei zu hoher lokaler RhoA-Aktivität aus dem ECT2-MgcRacGAP-Komplex verdrängt werden, so dass sich erneut ein Gleichgewicht aus RhoA-Aktivierung und -Inaktivierung einstellt (Abb. 4-1 A). Die Inaktivierung des durch p0071 akkumulierten RhoA könnte durch das ebenfalls für die Zytokinese essentielle p190RhoGAP erfolgen (SU et al., 2009).

## 4.2 Funktionen von p0071, ECT2 und Snapin bei der Fusion von Rab11-Vesikeln

Nach der Aktomyosin-basierten Einschnürung bleiben die Tochterzellen über eine dünne zytoplasmatische Brücke miteinander verbunden. Zur physikalische Trennung der Tochterzellen führt am Ende der Zytokinese ein Prozess, der als Abschnürung bezeichnet wird. Der Transport von Vesikeln zum Zentralkörper, der sich in der Mitte der zytoplasmatischen Brücke befindet und die anschließende Fusion dieser mit der PM scheinen essentiell für die Abschnürung zu sein (MONTAGNAC und CHAVRIER, 2008). Der Zentralkörper dient dann als strukturelle Plattform, um Vesikel für die Fusion mit der PM zu verankern. Für diese These spricht, dass für die Abschnürung essentielle Proteine, wie zum Beispiel Centriolin und Komponenten des Exozyst-Komplexes, am Zentralkörper akkumulieren (GROMLEY et al., 2003). Auch für p0071 konnte eine Assoziation mit dem Zentralkörper gezeigt werden (Abb. 3-1). Außerdem wurden vor Beginn dieser Arbeit Rab11 und Snapin als potentielle Interaktionspartner für p0071 identifiziert, für die Funktionen während der Zytokinese beim Transport von Vesikeln und deren Fusion beschrieben sind (GROMLEY et al., 2005; WILSON et al., 2005). Aufgrund dieser Befunde erschien eine Rolle von p0071 bei der Vesikel-basierten Abschnürung denkbar.

Während der Zytokinese lokalisiert Rab11 entlang der zytoplasmatischen Brücke, die die Tochterzellen verbindet. Obwohl p0071 und Rab11 in diesen immunzytologischen Analysen nur partiell kolokalisierten (Abb. 3-12), implizieren BiFC-Analysen und IP-Experimente, dass beide Proteine während der Abschnürung einen Komplex bilden (Abb. 3-15). GST-PD-Analysen zeigten zudem, dass p0071 und Rab11 direkt miteinander interagieren und dass diese Interaktion über die Arm-Domäne von p0071 vermittelt wird (Abb. 3-13). Ähnlich wie für RhoA, scheint die Arm-Domäne von p0071 bevorzugt aktives Rab11 zu binden (Abb. 3-14). Ob beide GTPasen um die Bindung an p0071 konkurrieren oder an unterschied-

lichen Bereichen in der Arm-Domäne von p0071 binden, könnte Gegenstand weiterer Studien sein, um die Regulation dieser Interaktionen während der Zytokinese verstehen zu können. Denkbar wäre auch, dass p0071 nach der Bindung an RhoA von einem RhoA-Effektor so modifiziert wird, dass RhoA dissoziiert und anschließend Rab11 binden kann. Da bisher keine Interaktions-Analysen zwischen der Kopf- sowie der Schwanz-Domäne von p0071 und den beiden GTPasen vorliegen, ist nicht auszuschließen, dass beide Domänen von p0071 an der Regulation dieser Interaktionen beteiligt sind.

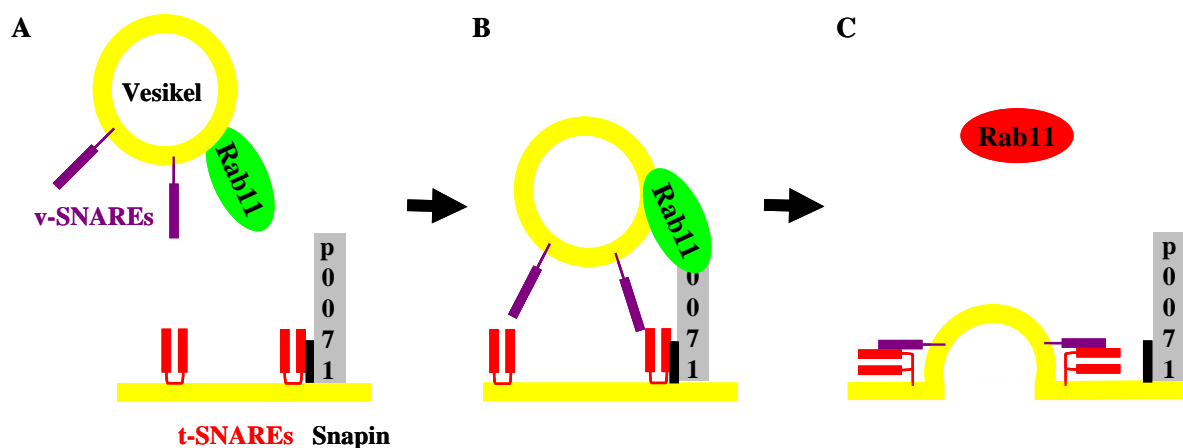
Fehlen Proteine an der Zielmembran, die für die Fusion von Vesikeln nötig sind, werden die Vesikel weiter zum Ort der Vesikelfusion transportiert und akkumulieren dort. Dies konnte unter anderem für Untereinheiten des Exozyst-Komplexes und für Snapin gezeigt werden (GROMLEY *et al.*, 2005; MUNSON und NOVICK, 2006). Die Verringerung der p0071-Expression ging in HeLa-Zellen mit der Akkumulation von endogenem Rab11 und exogenem RFP-Rab11 am Zentralkörper einher (Abb. 3-16). Dies impliziert, dass p0071 nicht für den Transport von Rab11 während der Zytokinese benötigt wird, sondern vielmehr an der Fusion der Rab11-positiven Vesikel mit der PM beteiligt ist. p0071 hätte in diesem Fall eine Funktion als *tether*, das Rab11-Vesikel an der Zielmembran verankert. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei dieser Beobachtung auch um einen Nebeneffekt der durch die p0071-siRNA-Transfektion induzierten Störungen im RhoA-Signalweg und/oder im Aktin-Zytoskelett handelt. Studien in *D. melanogaster* zeigen, dass Rab11 Funktionen bei der Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts während der Zellularisierung von Embryonen und der meiotischen Zytokinese von Spermatozyten haben könnte, die auch für Vesikeltransport und -fusion essentiell erscheinen (PELLISSIER *et al.*, 2003; RIGGS *et al.*, 2003; GIANSAANTI *et al.*, 2007). Außerdem deuten Untersuchungen von Cao und Mitarbeitern (CAO *et al.*, 2008) auf eine gemeinsame Funktion von Rab11 und Rho1 bei der Regulation der Aktin-Dynamiken entlang der Teilungsfurche in *D. melanogaster* hin. Hinweise, dass Rab11 bei der Zytokinese von Säugerzellen ebenfalls an der Aktomyosin-basierten Einschnürung beteiligt ist, gibt es bis heute allerdings nicht. Dennoch ist eine enge Verknüpfung zwischen RhoA-vermittelter Einschnürung und Rab11-basiertem Vesikeltransport bzw. Rab11-basierter Vesikelfusion bei der Zytokinese von Säugerzellen denkbar. Auf diese Weise könnte zeitlich koordiniert werden, dass Vesikeltransport und Vesikelfusion erst nach der Bildung des Aktomyosin-Ringes erfolgen. In diesem Fall wären die möglichen Funktionen von p0071 bei der Fusion von Rab11-Vesikeln nur sehr schwer zu analysieren. Gelingen könnte dies mit einer p0071-Mutante, die nicht in der Lage ist, mit Rab11 zu interagieren, aber die Funktionen von p0071 im RhoA-Signalweg wahrnehmen kann. Diese Mutante müsste in Zellen mit verringerter oder

ausgeschalteter p0071-Expression in ungefähr der Menge wie endogenes p0071 exprimiert werden.

Für eine Rolle von p0071 als *tether* für Rab11-Vesikel spricht die Interaktion zwischen p0071 und dem t-SNARE-assoziierten Protein Snapin. Snapin und p0071 kolokalisieren am Zentralkörper (Abb. 3-18) und bilden *in vivo* einen Komplex, dessen Bildung vermutlich über eine direkte Interaktion der p0071-Arm-Domäne mit der C-terminalen Domäne von Snapin vermittelt wird (Abb. 3-36 A und B). Für Snapin konnte in keine direkte Interaktion mit Rab11 im Hefe-System gezeigt werden, obwohl beide Proteine *in vivo* einen Komplex bilden (Abb. 3-36 C und D). Ob diese Komplexbildung wirklich von p0071 vermittelt wird, sollte mit IP-Experimenten in p0071-depletierten Zellen untersucht werden. Da die Verringerung der Snapin-Expression mittels siRNA, wie die Depletion von p0071 eine Akkumulation von Rab11 um den Zentralkörper zur Folge hatte, kann eine gemeinsame Funktion von p0071 und Snapin bei der Fusion von Rab11-Vesikeln postuliert werden.

Verschiedene Untersuchungen stützen die These, dass p0071, Snapin und Rab11 gemeinsam die Fusion von Vesikeln in der Zytokinese vermitteln. In *D. melanogaster* interagieren Rab11 und das p0071-verwandte Protein Armadillo mit Komponenten des Exozyst-Komplexes und sind darüber an der Fusion von DE-Cadherin-transportierenden Vesikeln mit der PM beteiligt (LANGEVIN *et al.*, 2005). Da Rab11 auch in Säugerzellen am Recycling von Cadherinen beteiligt ist (LOCK und STOW, 2005) und deren Stabilität bzw. Verbleiben auf der Zelloberfläche unter anderem von p120<sup>ctn</sup> reguliert wird (Abs. 1-1 bis 1-3), könnten Arm-Proteine neben ihren Funktionen im RhoA-Signalweg auch in Rab-GTPase-vermittelte Vesikelfusionsprozesse involviert sein. Für diese Theorie sprechen Studien, die eine Funktion als *tether* bei der Fusion von Vesikeln in Hefen und Säugerzellen für die Arm-Proteine Vac8p (WANG *et al.*, 1998) und p115 (AN *et al.*, 2009) nahe legen. Für Snapin wurde ursprünglich eine Rolle bei der Fusion synaptischer Vesikel zur Neurotransmitterfreisetzung gezeigt (ILARDI *et al.*, 1999). Aufgrund der Interaktionen mit dem ubiquitär exprimierten SNARE-assoziierten Protein SNAP23 und dem t-SNARE VAMP2 wurde eine generelle Funktion von Snapin bei der Assemblierung von SNARE-Komplexen postuliert (BUXTON *et al.*, 2003). Wie für Rab11 und Armadillo konnte auch für Snapin eine Interaktion mit einer Untereinheit des Exozyst-Komplexes (Exo70) beobachtet werden (BAO *et al.*, 2008). Die damit verbundene Rolle von Snapin beim Insulin-regulierten GLUT4-Transport impliziert eine direkte Verbindung zu Rab11, das ebenfalls am GLUT4-Transport beteiligt ist (KESSLER *et al.*, 2000).

Wie die Prozesse von Vesikeltransport und Vesikelfusion während der Zytokinese reguliert werden, ist bisher weitgehend unbekannt. Vereinfacht dargestellt, müssen die Vesikel über sogenannte *tether* (Verbindungsproteine) an der Zielmembran verankert werden. Die *tether* sorgen dafür, dass die v-SNAREs auf den Vesikeln mit den t-SNAREs auf der Zielmembran einen Komplex bilden, der die Fusion der Vesikel mit entsprechenden Membranen katalysiert. Die Rab-GTPasen sorgen durch ihre spezifische Lokalisation auf bestimmten Membranen sowie durch ihre Interaktion mit bestimmten Effektoren, Motorproteinen und *tether*-Proteinen dafür, dass die Vesikel ihr Ziel erreichen (STENMARK, 2009). Zusammen mit den in Abs. 3.2.1 dargelegten Ergebnissen ist deshalb folgendes Modell für die Fusion von Rab11-Vesikeln mit der PM am Zentralkörper vorstellbar (Abb. 4-2): (A) An der PM liegen p0071 und Snapin im Komplex vor. (B) p0071 dient über die Interaktion mit Snapin und Rab11 als *tether* für die Rab11-Vesikel und bindet diese an der Zielmembran. Vermutlich liegt Rab11 bei dieser Prozess GTP-gebunden vor, da p0071 bevorzugt mit aktivem Rab11 assoziiert. (C) p0071 katalysiert die Fusion der Rab11-Vesikel mit der PM, indem p0071 als *tether* t-SNAREs (Membran) und v-SNAREs (Vesikel) in räumliche Nähe bringt.



**Abb. 4-2: Modell zur Funktion von p0071 bei der Fusion von Rab11-Vesikeln**

(A) An der PM im Komplex mit Snapin und vermutlich t-SNAREs vorliegendes p0071 fungiert als *tether* für Rab11-Vesikel. (B) p0071 bringt über die Interaktion mit vermutlich aktivem Rab11 (grün) die v-SNAREs des Vesikels in räumliche Nähe der PM-assoziierten t-SNAREs. (C) Komplexe aus t- und v-SNAREs katalysieren die Fusion des Vesikels mit der Membran, wobei es zur Inaktivierung von Rab11 (rot) und dessen Dissoziation von der Membran kommen könnte.

Die These, dass für die Fusion von Rab11-Vesikeln mit der PM am Zentralkörper Rab11 im aktiven Zustand vorliegt, wird von der Beobachtung gestützt, dass die Überexpression von Rab11-DN die Bildung mehrkerniger Zellen induziert. Rab11 muss demzufolge während der Mitose aktiviert werden, um seine Funktionen auszuüben (WILSON *et al.*, 2005). Über die Regulation der Rab11-Aktivität ist im allgemeinen nicht viel bekannt. Es wurden zwei GDIs (GDI-1 und GDI-2) beschrieben, die an der negativen Regulation der Rab11-Aktivität beteiligt sind. Die Überexpression dieser GDIs unterbindet wie die

Überexpression von Rab11-DN den Rab11-abhängigen Transport von Proteinen zur PM (CHEN *et al.*, 1998). Das für die Entwicklung der neurodegenerativen Krankheit *Chorea Huntington* verantwortliche Protein Huntingtin zeigt eine GDP/GTP-Austausch-Aktivität für Rab11. Interessanterweise kann diese Funktion vom mutierten Huntingtin in Fibroblasten von an *Chorea Huntington* erkrankten Personen nicht mehr ausgeübt werden. In diesem Zusammenhang konnte auch gezeigt werden, dass die Überexpression von Rab11-DN in der Großhirnrinde von Mäusen motorische Dysfunktionen induzierte, die eine Eigenschaft der *Chorea Huntington* sind (LI *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2009a; LI *et al.*, 2009b). Wie und wann die Aktivierung von Rab11 während der Zytokinese erfolgt, ist allerdings nach wie vor ungeklärt. Die Beobachtungen, dass Rab11 und p0071 vorrangig in der Zytokinese miteinander interagieren und p0071 zu aktivem Rab11 eine höhere Affinität aufweist als zu inaktivem Rab11 (Abb. 3-14 und Abb. 3-15), sprechen dafür, dass Rab11 während der Zytokinese im aktiven Zustand vorliegt. Unter diesem Aspekt erscheint es möglich, dass p0071 eine Rolle bei der Aktivierung von Rab11 am Zentralkörper spielt. p0071 könnte wie bei RhoA (Abb. 4-1) die Aktivität eines Rab11-GEFs unterstützen und darüber die Fusion von Rab11-Vesikel initiieren. Eine weitere Möglichkeit war, dass p0071, wie bereits diskutiert, als *tether* für Vesikel mit aktivem Rab11 dient und die Aktivierung von Rab11 p0071-unabhängig erfolgt.

Da kein Testsystem existierte, um die Aktivität von Rab11 in der Zelle zu quantifizieren, wurde in Analogie zu den kommerziell erhältlichen Testsystemen zur Bestimmung der Aktivität von Rho-GTPasen die Eigenschaft von Rab11 genutzt, nur im aktiven Zustand mit seinen Effektoren FIP3 und FIP4 zu interagieren (WILSON *et al.*, 2005). In einem GST-PD wurde die Rab11-Bindedomäne von FIP4 (As 592-637) als GST-Fusionsprotein an Glutathion-Sepharose immobilisiert, um aktives Rab11 aus Zelllysaten zu präzipitieren (Abb. 3-20). Mit diesem Rab11-Aktivitätstest wurde die Aktivierung von Rab11 während der Mitose beobachtet. Im Gegensatz zu RhoA, dessen Aktivität zwischen Anaphase und Telophase ihr Maximum erreicht (KIMURA *et al.*, 2000), nimmt die Menge an aktivem Rab11 im Verlauf der Mitose ab (Abb. 3-40). Da es während der Mitose, im besonderen während der Zytokinese zu Vesikelfusionsprozessen kommt (Abs. 1.5.5), erlauben diese Ergebnisse den Schluss, dass Rab11 für die Fusion von Vesikeln im aktiven Zustand vorliegen muss und es während der Vesikelfusion oder nach erfolgter Vesikelfusion zur Inaktivierung von Rab11 kommt. Das inaktivierte Rab11 wird in diesem Zusammenhang wahrscheinlich nicht sofort wieder aktiviert, woraus ein Absinken der affinitätsaufgereinigten Rab11-GTP-Mengen resultierte. Aus diesem Grund ist es wahrscheinlicher, dass p0071 als *tether* für Rab11-Vesikel dient und Rab11 nicht selbst aktiviert. Bekräftigt wurde dies durch

die Beobachtung, dass p0071-depletierte Zellen keine Verringerung der Rab11-Aktivität aufwiesen (Abb. 3-22). Interessanterweise führte die Verringerung der ECT2-Expression zu signifikant reduzierten Mengen an aktivem Rab11 sowohl in Interphase-Zellen als auch in Prometaphase-arretierten Zellen (Abb. 3-22 und Abb. 3-23). Mit dem Ergebnis, dass Rab11 und ECT2 während der Prometaphase einen Komplex bilden, der weder zum Zeitpunkt der Zytokinese noch in der G1-Phase nachgewiesen werden konnte (Abb. 3-24), lässt sich eine GDP/GTP-Austausch-Aktivität von ECT2 gegenüber Rab11 postulieren. Ob diese Aktivität wirklich vorhanden ist oder nur ein denkbarer Nebeneffekt der durch die ECT2-siRNA-Behandlung induzierten RhoA-Inaktivierung, lässt sich nur eindeutig *in vitro* mit einer GDP/GTP-Austausch-Analyse feststellen. Da aber verschiedenste Phosphorylierungen von ECT2 im Verlauf der Mitose gezeigt wurden, ist in Betracht zu ziehen, dass diese die Spezifität von ECT2 gegenüber verschiedenen GTPasen verändern können.

Da verschiedene Studien postulieren, dass Rab11 im aktiven Zustand transportiert und bei der Bildung von Vesikeln aktiviert wird (FIELDING *et al.*, 2005; WILSON *et al.*, 2005; SCHONTEICH *et al.*, 2008), könnte ECT2 zum Beginn der Mitose Rab11 aktivieren und so zur Bildung von Vesikeln beitragen, die aktives Rab11 auf ihrer Oberfläche tragen. Über die Interaktion von Rab11-GTP mit einem Mikrotubuli-assoziiertem Motorprotein würden die Vesikel zur Teilungsfurche transportiert und mit der Zielmembran fusionieren, wenn dort die entsprechenden Faktoren (Rab11-Effektoren, p0071 als *tether*, SNAREs und SNARE-assoziierte Proteine wie Snapin) akkumulieren (Abb. 4 -2).

### **4.3 Der Transport von p0071 zum Zentralkörper erfolgt KIF3b-abhängig**

Von immenser Bedeutung für die Koordinierung der Zytokinese ist die Lokalisation der beteiligten Proteine zur richtigen Zeit am richtigen Ort. Aus diesem Grund wurde der Transport von p0071 während der Zytokinese genauer untersucht. Da ECT2 und p0071 miteinander interagieren, erschien ein gemeinsamer Transport beider Proteine möglich. Der Transport von ECT2 zur zentralen Spindel erfolgt gebunden an MgcRacGAP über das Mikrotubuli-assoziierte Motorprotein MKLP1 (MISHIMA *et al.*, 2002; YUCE *et al.*, 2005). Immunzytologische Analysen von ECT2 und p0071 während der Mitose zeigten, dass ECT2 in HeLa-Zellen früher als p0071 an der zentralen Spindel nachzuweisen war (Abb. 3-25). In MCF-7-Zellen ist p0071 zu dem Zeitpunkt (Abb. 3-1; Anaphase), zu dem ECT2 an die zentrale Spindel rekrutiert wird (WOLF *et al.*, 2006), noch mit den Spindelpolen assoziiert, so

dass der gemeinsame Transport beider Proteine über den Zentralspindlin-Komplex nahezu ausgeschlossen werden kann.

Nicht auszuschließen ist dagegen eine Abhängigkeit der p0071-Lokalisation von ECT2. Die Verringerung der ECT2-Expression mittels siRNA führte in HeLa-Zellen ebenso wie die Depletion von MKLP1, dem Motorprotein des Zentralspindlin-Komplexes, zu einem deutlichen Rückgang der am Zentralkörper detektierten p0071-Menge. Dies korrelierte mit der Verringerung der Assoziation von ECT2 am Zentralkörper (Abb. 3-26). Da p0071 nicht mit ECT2 gemeinsam transportiert wird, könnte ECT2 am Zentralkörper für die Verankerung von p0071 verantwortlich sein. In den wenigen ECT2- bzw. MKLP1-siRNA-behandelten Zellen die überhaupt einen Zentralkörper (ca. 10%) bildeten, wurde dies vermutlich über die noch vorhandenen Mengen an ECT2 vermittelt. Neben dem Transport von ECT2 werden MKLP1 und der Zentralspindlin-Komplex für die Bildung stabiler Mikrotubuli benötigt, so dass die MKLP1-siRNA-Behandlung über die Destabilisierung von Mikrotubuli den p0071-Transport allerdings auch indirekt beeinflussen könnte (MISHIMA *et al.*, 2002).

In einer Hefe-Dihybrid-Analyse vor Beginn dieser Arbeit konnte eine Untereinheit des zur Kinesin-2-Familie gehörenden, Transportkomplexes KIF3 als putativer Interaktionspartner für p0071 identifiziert werden. Die identifizierte Untereinheit KIF3b bildet mit KIF3a ein Heterodimer, das den zum Plus-Ende der Mikrotubuli gerichteten Transport von Proteinen oder Organellen vermittelt. Der KIF3a/KIF3b-Komplex interagiert über die C-terminalen Domänen seiner Untereinheiten mit den zu transportierenden Molekülen (YAMAZAKI *et al.*, 1995; YAMAZAKI *et al.*, 1996). Im humanen Genom existieren 41 verschiedene Kinesine, die in 14 Familien eingeteilt sind (MIKI *et al.*, 2005). Viele von diesen haben eine Rolle in der Zytokinese, um die korrekte Lokalisation kritischer Regulatoren sicherzustellen (Abs. 1.5.1.2). Auch für den KIF3-Komplex war eine Rolle in der Zytokinese beschrieben, wobei die molekularen Mechanismen und die transportierten Proteine weitgehend unbekannt blieben (FAN und BECK, 2004; HARAGUCHI *et al.*, 2006).

Mittels Hefe-Dihybrid-Analysen und IP-Experimenten konnte gezeigt werden, dass p0071 und KIF3b *in vivo* und *in vitro* einen Komplex bilden und dass die Komplexbildung von der direkten Interaktion der ersten Arm-Wiederholung von p0071 mit der C-terminalen Domäne von KIF3b abhängig ist (Abb. 3-27 bis Abb. 3-29). p0071 wäre damit nicht das erste Arm-Protein von dem eine direkte Interaktion mit dem KIF3-Komplex gezeigt werden konnte. KAP3 interagiert mit den C-terminalen Domänen von KIF3a und KIF3b ebenfalls über seine Arm-Domäne (YAMAZAKI *et al.*, 1996). Strukturelle Gemeinsamkeiten in den Arm-Domänen von KAP3 und p0071 könnten erklären, warum beide Proteine mit KIF3b inter-



agieren können. Trotz der *in vitro* festgestellten direkten Interaktion zwischen KIF3b und p0071 kann *in vivo* eine Rolle von KAP3 beim Transport von p0071 nicht ausgeschlossen werden. IP-Experimente mit Zellen, in denen die Expression von KAP3 mittels siRNAs verringert ist, könnten helfen diese Frage zu klären. Ungeklärt bleibt an dieser Stelle auch, ob KIF3a ebenfalls direkt mit p0071 interagieren kann. Für den möglichen Transport von p0071 über KIF3 ist diese Frage allerdings unerheblich, da KIF3a und KIF3b einen Motorkomplex bilden. Auffällig bei der IP von in HEK293-exprimiertem p0071 und KIF3b war, dass trotz hoher HA-p0071-WT-Expression nur geringe Mengen davon präzipitiert werden konnten (Abb. 3-29). Eine Erklärung für diese Beobachtung geben immunzytologische Untersuchungen, die zeigten, dass nur ein Teil der zytoplasmatischen Fraktion von p0071 mit KIF3b am Zentrosom kolokalisierte, während p0071 in Interphase-Zellen hauptsächlich Membran-assoziiert vorlag. (Abb. 3-30). Vermutlich liegt p0071 wie  $\beta$ -Catenin und p120<sup>ctn</sup> nur dann zytoplasmatisch vor, wenn es nicht über die Interaktion mit Cadherinen sequestriert wird. Bisher unbekannt posttranslationelle Modifikationen könnten dazu führen, dass ein Teil von p0071 im Zytoplasma auch Zentrosomen-assoziiert vorliegt.

Während der Zytokinese von HeLa-Zellen liegt p0071 konzentriert am Zentralkörper vor, während KIF3b am zentralen Mikrotubuli-Bündel lokalisiert. Aufgrund der gezeigten Interaktion zwischen p0071 und KIF3b ist es denkbar, dass p0071 durch KIF3b vom Zentrosom bzw. von den Spindelpolen zum Zentralkörper transportiert wird sobald die Zytokinese beginnt. In diesem Zusammenhang könnten Zellzyklus-abhängige Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung von p0071 und/oder KIF3b die Affinität beider Proteine zueinander verändern, wodurch der Zeitpunkt des p0071-Transportes reguliert würde. Die Tatsache, dass p0071 nicht mit KIF3b entlang der Mikrotubuli kolokalisierte, steht dabei nicht im Widerspruch zur These einer KIF3b-abhängigen Translokation von p0071. Eine wichtige Funktion von Kinesinen in der Mitose und Zytokinese scheint die lokale Konzentrationserhöhung von regulatorischen Proteinen wie zum Beispiel PRC1, Citron und ECT2 zu sein. Wie p0071 sind diese Proteine gar nicht oder nur sehr schwach entlang von Mikrotubuli nachzuweisen (MISHIMA *et al.*, 2002; ZHU und JIANG, 2005; GRUNEBERG *et al.*, 2006). Daher ist anzunehmen, dass die Menge von p0071 entlang der Mikrotubuli nicht ausreichend für eine immunzytologische Ak-Detektion ist.

Um zu untersuchen, ob p0071 während der Mitose von KIF3b transportiert wird, kamen dominant negative KIF3b-Mutanten (FAN und BECK, 2004; HARAGUCHI *et al.*, 2006) und KIF3b-siRNAs zum Einsatz. Die Assoziation von p0071 mit dem Zentralkörper wurde dabei immunzytologisch untersucht (Abb. 3-31 und Abb. 3-32). Die Überexpression

beider KIF3b-Mutanten (RFP-KIF3b-NT; -CT) verminderte deutlich die Akkumulation von p0071 am Zentralkörper. Da RFP-KIF3b-NT stark Mikrotubuli-assoziiert vorlag, ist der Grund der verringerten Assoziation von p0071 am Zentralkörper vermutlich in einer Ab-sättigung der KIF3b-Bindestellen auf den Mikrotubuli zu suchen, wodurch endogenes KIF3b am Transport von p0071 gehindert würde. Die C-terminale Domäne von KIF3b interagiert direkt mit p0071, weshalb vermutlich RFP-KIF3b-CT mit endogenem KIF3b um die Bindung an p0071 konkurriert und so die Menge an transportiertem p0071 verringerte. Da unspezi-fische Nebeneffekte durch die Überexpression der KIF3b-Mutanten nicht ausgeschlossen werden konnten, wurde die p0071-Zentralkörper-Assoziation auch in KIF3b-siRNA behan-delten Zellen analysiert. Die Quantifizierung der p0071-Fluoreszenzintensität am Zentral-körper zeigte, dass diese in Zellen mit verringerter KIF3b-Expression deutlich verringerte war. Da die Fluoreszenzintensität von p0071 am Zentralkörper in den Kontrollzellen teilweise übersättigt war, könnte der Effekt der KIF3b-siRNA-Behandlung unterschätzt worden sein. Aus diesem Grund wurden mitotische Mikrotubuli und damit assoziierte Proteine isoliert. Dabei konnte eine signifikante Reduktion von Mikrotubuli-assoziiertem p0071 in KIF3b-siRNA-behandelten Zellen beobachtet werden (Abb. 3-34). Die Möglichkeit, dass die Verringerung der Assoziation von p0071 am Zentralkörper in KIF3b-siRNA-transfizierten Zellen über RhoA und/oder ECT2 vermittelt wird, konnte ausgeschlossen werden, da KIF3b die Lokalisation beider Proteine an der Teilungsfurche nicht beeinflusst (Abb. 3-33).

Die These des KIF3b-abhängigen Transports von p0071 zum Zentralkörper wird von der Beobachtung unterstützt, dass eine p0071-Mutante, bei der die Arm-Wiederholung deletiert wurde, die für die Interaktion mit KIF3b essentiell scheint, nicht mehr am Zentralkörper akkumulierte (p0071- $\Delta$ rep1; Abb. 3-27 und Abb. 3-35). Diese Mutante konnte in Interphase-Zellen mit Zell-Zell-Kontakten assoziieren, wodurch ein völliger Funktions-verlust des Proteins ausgeschlossen werden konnte. Die Verifizierung, dass diese Mutante *in vivo* keinen Komplex mit KIF3b bilden kann, steht allerdings noch aus.

Sollte p0071 von KIF3b transportiert werden, müsste die Verringerung der KIF3b-Expression mittels siRNA den RhoA-Signalweg auf ähnliche Art und Weise beeinflussen wie die p0071-Depletion. KIF3b-siRNA-behandelte Zellen zeigten wie p0071-siRNA-behandelte Störungen bei der Assemblierung des Aktomyosin-Ringes, die über die Reduktion von F-Aktin und p-MRLC entlang der Teilungsfurche gezeigt werden konnten (Abb. 3-37). Dieser Effekt konnte auf eine reduzierte Aktivierung von RhoA während der Zytokinese zurück-geführt werden, die außerdem mit der verringerten Akkumulation von p-MRLC in diesen Zellen einher ging (Abb. 3-38). Da KIF3b weder den Transport von ECT2 noch den Transport

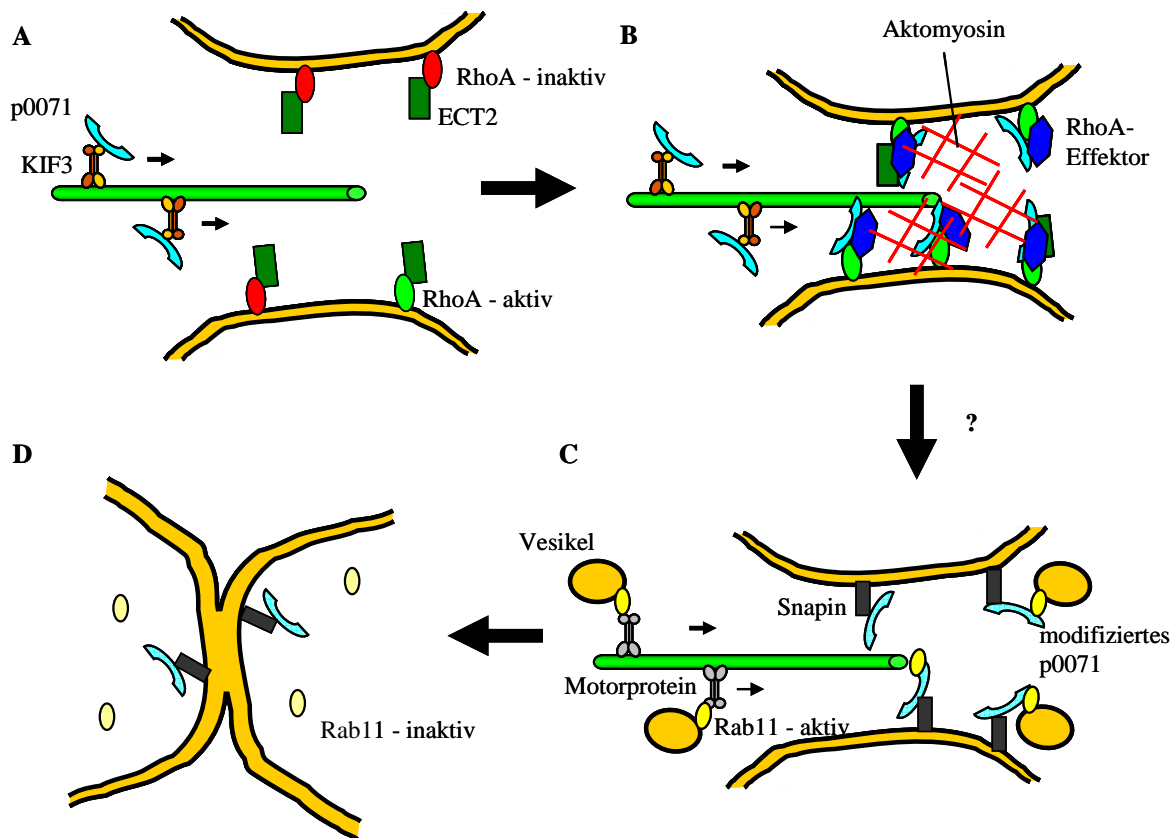
von RhoA zur Teilungsfurche vermittelte (Abb. 3-33), geht der KIF3b-siRNA-vermittelte Zytokinesedefekt (Abb. 3-36) wahrscheinlich auf den gestörten Transport von p0071 zur Teilungsfurche zurück. Dies bestätigen ebenfalls die Analysen mit einem Fusionsprotein aus p0071 und der Motordomäne von MKLP1 (MKLP1-p0071-DsRed; Abb. 3-39). Dieses Fusionsprotein lokalisiert an den Plus-Enden der überlappenden Mikrotubuli der zentralen Spindel zum Beginn der Anaphase. Weder endogenes noch exogenes p0071 zeigte in HeLa-Zellen im Gegensatz zu MKLP1 diese Assoziation mit der zentralen Spindel, weshalb davon auszugehen ist, dass die fusionierte Motordomäne von MKLP1 funktionell ist. Das MKLP1-p0071-DsRed-Fusionsprotein akkumulierte anders als p0071-WT-DsRed auch unabhängig von KIF3b entlang der Teilungsfurche und konnte die KIF3b-siRNA-induzierte Verringerung der Myosin-II-Aktivierung während der Zytokinese von HeLa-Zellen verhindern. p0071-WT-DsRed und p0071- $\Delta$ rep1-DsRed waren dazu nicht in der Lage (Abb. 3-40 und Abb. 3-41).

Anhand der im Abs. 3.3 vorgestellten Ergebnisse kann für den Transport von p0071 postuliert werden, dass KIF3b und p0071 gemeinsam am Zentrosom vorliegen und möglicherweise auch interagieren. Mit Beginn der Mitose könnten p0071 und/oder KIF3b posttranslational so modifiziert werden, dass beide Proteine eine höhere Affinität zueinander aufweisen. Auf diese Weise würde der Transport von p0071 durch den KIF3-Komplex in Richtung der Teilungsfurche zeitlich reguliert werden können. An dieser Stelle ist anzumerken, dass der Austausch von drei Serinen in der Arm-Domäne von p120<sup>ctn</sup> eine Assoziation dieser Mutante mit den Spindelpolen während der Mitose zur Folge hatte. Da auch endogenes p120 während der Mitose Spindelpol-assoziiert vorlag, kann spekuliert werden, dass eine Dephosphorylierung dieser Serine zu Beginn der Mitose zur Lokalisation von p120<sup>ctn</sup> an den Spindelpolen führte (FRANZ und RIDLEY, 2004). Da die entsprechenden Serine in der Arm-Domäne der p120-Catenine konserviert sind, könnte eine Phosphorylierung dieser den Mikrotubuli-assoziierten Transport von p0071 beeinflussen.

Nach dem KIF3b-abhängigen Transport von p0071 zur Teilungsfurche könnte dort vorhandenes ECT2 p0071 verankern und somit für dessen Akkumulation am Zentralkörper sorgen. Wie die in Abschnitt 3.1 vorgestellten Ergebnisse nahe legen, vermittelt die Akkumulation von p0071 entlang der Teilungsfurche zusammen mit ECT2 die Aktivierung von RhoA, die wiederum essentiell für Assemblierung und Kontraktion des Aktomyosin-Ringes ist. Außerdem scheint p0071 im Komplex mit Snapin an der Fusion von Rab11-Vesikeln mit der PM zur Abschürung der Tochterzellen beteiligt sein (Abs. 3.2). p0071 könnte somit die Aktomyosin-basierte Einschnürung und die Vesikel-basierte Abschnürung während der Zytokinese koordinieren helfen.

#### **4.4 p0071 als Bindeglied zwischen Aktomyosin-basierter Einschnürung und Vesikel-basierter Abschnürung**

Für das Verständnis der Zytokinese ist es essentiell die räumliche und zeitliche Koordination der stattfindenden Teilprozesse zu entschlüsseln. Die Relevanz dieser Thematik wird durch die Hypothese unterstrichen, dass fehlerhafte Zellteilungen zur Entstehung von genetisch instabilen tetraploiden Zellen beitragen, die bei der Entstehung diverser Tumoren eine Rolle spielen können (FUJIWARA *et al.*, 2005; BOVERI, 2008). Obwohl große Fortschritte bei der Aufklärung der Aktomyosin-basierten Einschnürung und der Vesikel-basierten Abschnürung gemacht wurden, sind über das Zusammenspiel beider Vorgänge nur wenige Informationen vorhanden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit implizieren, dass während der Zytokinese humaner Zellen das von KIF3b zur Teilungsfurche transportierte p0071 sowohl über die Modulation der RhoA-Aktivität an Aufbau und Kontraktion des Aktomyosin-Ringes als auch über die Interaktion mit Snapin und Rab11 an der Fusion von Vesikeln mit der PM um den Zentralkörper beteiligt ist. Aufgrund dieser Befunde ist es möglich, dass p0071 als Bindeglied zwischen beiden Vorgängen fungiert. Diese These wird durch die Tatsache unterstützt, dass Arm-Proteine über eine Vielzahl von Interaktionspartnern in verschiedenste Signalwege involviert sind (Abs. 1.1 bis Abs. 1-3). Aufgrund dieser Erkenntnisse erscheint es möglich, dass p0071 als Gerüstprotein in der Zytokinese dafür sorgt: (1) dass RhoA mit seinem Regulator (ECT2) und seinen Effektoren (ROK, Citron und Formine) interagieren kann und (2) dass im Anschluss p0071 über die Assoziation mit Snapin und Rab11 Faktoren für die Fusion von Vesikeln rekrutiert (Abb. 4-3). Ausgehend von den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit sollte in zukünftigen Untersuchungen geklärt werden, wie p0071 das Zusammenspiel von Einschnürung und Abschnürung reguliert. Denkbar wären in diesem Zusammenhang über RhoA-Effektoren induzierte Modifikationen, die p0071 die Assoziation mit Snapin und Rab11 ermöglichen.



**Abb. 4-3: Modell zur Rolle von p0071 bei der Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts und der Fusion von Rab11-Vesikeln während der Zytokinese humaner Zellen**

(A) Während der Zytokinese wird p0071 über KIF3 (Heterodimer aus KIF3a und KIF3b) zur Teilungsfurche transportiert. (B) Dort akkumuliertes ECT2 dient p0071 als Anker. p0071 führt zusammen mit ECT2 zur Anreicherung von aktivem RhoA entlang der Teilungsfurche und induziert im Komplex mit den RhoA-Effektoren ROK, Citron und mDia2 die Assemblierung und Kontraktion des Aktomyosin-Ringes. (C) Durch Phosphorylierung oder Dephosphorylierung modifiziertes p0071 interagiert mit dem SNARE-assoziierten Protein Snapin, bindet Rab11-Vesikel und vermittelt darüber die Fusion dieser Vesikel mit der Plasmamembran. (D) Diese Fusionsprozesse, bei denen es zur Inaktivierung von Rab11 kommt, führen zur physikalischen Trennung der Tochterzellen.

## 5 Zusammenfassung

p0071 gehört zur Arm-Protein-Familie der p120-Catenine, die als Regulatoren der Zell-Zelladhäsion in *adherens junctions* und in Desmosomen beschrieben worden. Neben einer Assoziation mit Zell-Zell-Kontakten sind die p120-Catenine auch im Zytoplasma und im Zellkern zu finden, woraus auf zusätzliche Funktionen in verschiedenen zellulären Signalwegen geschlossen wurde. Arbeiten zu p120<sup>ctn</sup> und  $\delta$ -Catenin legen eine gemeinsame Funktion der p120-Catenine bei der Regulation der Aktivität von GTPasen der Rho-Familie nahe. Ausgehend von Voruntersuchungen die eine Assoziation von p0071 entlang der Teilungsfurche und am Zentralkörper während der Mitose zeigten wurde die Rolle von p0071 bei der Teilung humaner Zelllinien untersucht.

Für p0071 konnte eine bisher unbekannt Funktion bei der Aktomyosin-vermittelten Einschnürung sich teilender Zellen gezeigt werden. In diesem Zusammenhang ist p0071 an der lokalisierten Aktivierung von RhoA beteiligt, die zur Assemblierung und Kontraktion des Aktomyosin-Ringes führt. An der Kontrolle der RhoA-Aktivität ist p0071 vermutlich auf zwei eng verknüpften Wegen beteiligt: 1) Durch die Interaktion mit dem RhoA-GEF ECT2 wird ein Komplex gebildet, der den GDP/GTP-Austausch zur Aktivierung von RhoA effizient katalysiert. 2) p0071 interagiert bevorzugt mit aktivem RhoA und könnte es in diesem Zustand stabilisieren und/oder als Gerüstprotein die Interaktion von RhoA mit Effektor-Proteinen begünstigen.

Um die Tochterzellen nach der Aktomyosin-basierten Einschnürung physikalisch voneinander zu trennen sind Vesikeltransport- und Vesikelfusionsprozesse essentiell. Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse geben Anlass zu der Vermutung, dass p0071 ebenfalls an der Fusion von Rab11-Vesikeln mit der Plasmamembran am Zentralkörper beteiligt ist. p0071 interagiert sowohl mit Rab11 als auch dem t-SNARE-assoziierten Protein Snapin, dessen verringerte Expression wie die verringerte p0071-Expression die Akkumulation von Rab11 um den Zentralkörper verursacht. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass Rab11 für die Fusion von Vesikeln sehr wahrscheinlich im aktiven Zustand vorliegen muss und ECT2 eine Rolle bei der Aktivierung von Rab11 spielen könnte. Dabei ist allerdings zu beachten, dass einige der beobachteten Effekte auch indirekte Folgen der gestörten RhoA-Aktivierung sein könnten.

Für den Verlauf der Zytokinese ist die räumliche und zeitliche Koordination der einzelnen Schritte essentiell. Oftmals sind es Mikrotubuli-assoziierte Motorproteine der Kinesin-Familie, die wichtige Regulatoren zu bestimmten Zeiten an bestimmten Orten in der

Zelle lokalisieren. KIF3b, eine Untereinheit des KIF3-Komplexes, interagiert mit p0071 *in vitro* und *in vivo*. Die Verringerung der KIF3b-Expression ging mit einer signifikant verringerten Assoziation von p0071 am Zentralkörper und einer gestörten Regulation der RhoA-Aktivität einher, die wie bei der Depletion von p0071 die Assemblierung des Aktomyosin-Ringes behinderte. KIF3b scheint somit essentiell für den Transport von p0071 zur Teilungsfurche und die p0071-vermittelte Modulation der RhoA-Aktivität

## 6 Literaturverzeichnis

- Abu-Elneel K, Ochiishi T, Medina M, Remedi M, Gastaldi L, Caceres A und Kosik KS** (2008) *A delta-catenin signaling pathway leading to dendritic protrusions*. J Biol Chem. 283 (47) 32781-91
- Adams RR, Tavares AA, Salzberg A, Bellen HJ und Glover DM** (1998) *pavarotti encodes a kinesin-like protein required to organize the central spindle and contractile ring for cytokinesis*. Genes Dev. 12 (10) 1483-94
- Albertson R, Riggs B und Sullivan W** (2005) *Membrane traffic: a driving force in cytokinesis*. Trends Cell Biol. 15 (2) 92-101
- Alieva IB und Vorob'ev IA** (1987) [Conditions of the reversibility of metaphase arrest and induction of multi-polar mitoses after treatment with nocodazole]. Tsitologija. 29 (5) 560-8
- Amano M, Ito M, Kimura K, Fukata Y, Chihara K, Nakano T, Matsuura Y und Kaibuchi K** (1996) *Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase)*. J Biol Chem. 271 (34) 20246-9
- An Y, Chen CY, Moyer B, Rotkiewicz P, Elsliger MA, Godzik A, Wilson IA und Balch WE** (2009) *Structural and functional analysis of the globular head domain of p115 provides insight into membrane tethering*. J Mol Biol. 391 (1) 26-41
- Anastasiadis PZ, Moon SY, Thoreson MA, Mariner DJ, Crawford HC, Zheng Y und Reynolds AB** (2000) *Inhibition of RhoA by p120 catenin*. Nat Cell Biol. 2 (9) 637-44
- Anastasiadis PZ und Reynolds AB** (2001) *Regulation of Rho GTPases by p120-catenin*. Curr Opin Cell Biol. 13 (5) 604-10.
- Asano S, Hamao K und Hosoya H** (2009) *Direct evidence for roles of phosphorylated regulatory light chain of myosin II in furrow ingression during cytokinesis in HeLa cells*. Genes Cells. 14 (5) 555-68
- Baluska F, Menzel D und Barlow PW** (2006) *Cytokinesis in plant and animal cells: endosomes 'shut the door'*. Dev Biol. 294 (1) 1-10
- Bao Y, Lopez JA, James DE und Hunziker W** (2008) *Snapin interacts with the Exo70 subunit of the exocyst and modulates GLUT4 trafficking*. J Biol Chem. 283 (1) 324-31
- Barr FA und Gruneberg U** (2007) *Cytokinesis: placing and making the final cut*. Cell. 131 (5) 847-60
- Behrens J, Vakaet L, Friis R, Winterhager E, Van Roy F, Mareel MM und Birchmeier W** (1993) *Loss of epithelial differentiation and gain of invasiveness correlates with tyrosine phosphorylation of the E-cadherin/beta-catenin complex in cells transformed with a temperature-sensitive v-SRC gene*. J Cell Biol. 120 (3) 757-66
- Behrens J, von Kries JP, Kuhl M, Bruhn L, Wedlich D, Grosschedl R und Birchmeier W** (1996) *Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1*. Nature. 382 (6592) 638-42
- Bernards A** (2003) *GAPs galore! A survey of putative Ras superfamily GTPase activating proteins in man and Drosophila*. Biochim Biophys Acta. 1603 (2) 47-82
- Bhanot P, Brink M, Samos CH, Hsieh JC, Wang Y, Macke JP, Andrew D, Nathans J und Nusse R** (1996) *A new member of the frizzled family from Drosophila functions as a Wingless receptor*. Nature. 382 (6588) 225-30
- Bishop AL und Hall A** (2000) *Rho GTPases and their effector proteins*. Biochem J. 348 Pt 2 241-55
- Blomberg N, Baraldi E, Nilges M und Saraste M** (1999) *The PH superfold: a structural scaffold for multiple functions*. Trends Biochem Sci. 24 (11) 441-5



- Bluemink JG und de Laat SW** (1973) *New membrane formation during cytokinesis in normal and cytochalasin B-treated eggs of Xenopus laevis. I. Electron microscope observations.* J Cell Biol. 59 (1) 89-108
- Bork P, Hofmann K, Bucher P, Neuwald AF, Altschul SF und Koonin EV** (1997) *A superfamily of conserved domains in DNA damage-responsive cell cycle checkpoint proteins.* Faseb J. 11 (1) 68-76
- Boveri T** (2008) *Concerning the origin of malignant tumours by Theodor Boveri. Translated and annotated by Henry Harris.* J Cell Sci. 121 Suppl 1 1-84
- Bumbasirevic V, Skaro-Milic A, Mircic A und Djuricic B** (1995) *Apoptosis induced by microtubule disrupting drugs in normal murine thymocytes in vitro.* Scanning Microsc. 9 (2) 509-18
- Burkard ME, Maciejowski J, Rodriguez-Bravo V, Repka M, Lowery DM, Clauser KR, Zhang C, Shokat KM, Carr SA, Yaffe MB und Jallepalli PV** (2009) *Plk1 self-organization and priming phosphorylation of HsCYK-4 at the spindle midzone regulate the onset of division in human cells.* PLoS Biol. 7 (5) e1000111
- Burke DJ und Stukenberg PT** (2008) *Linking kinetochore-microtubule binding to the spindle checkpoint.* Dev Cell. 14 (4) 474-9
- Buxton P, Zhang XM, Walsh B, Sriratana A, Schenberg I, Manickam E und Rowe T** (2003) *Identification and characterization of Snapin as a ubiquitously expressed SNARE-binding protein that interacts with SNAP23 in non-neuronal cells.* Biochem J. 375 (Pt 2) 433-40
- Cao J, Albertson R, Riggs B, Field CM und Sullivan W** (2008) *Nuf, a Rab11 effector, maintains cytokinetic furrow integrity by promoting local actin polymerization.* J Cell Biol. 182 (2) 301-13
- Chaib H, Rubin MA, Mucci NR, Li L, Taylor JMG, Day ML, Rhim JS und Macoska JA** (2001) *Activated in prostate cancer: a PDZ domain-containing protein highly expressed in human primary prostate tumors.* Cancer Res. 61 (6) 2390-4
- Chen W, Feng Y, Chen D und Wandinger-Ness A** (1998) *Rab11 is required for trans-golgi network-to-plasma membrane transport and a preferential target for GDP dissociation inhibitor.* Mol Biol Cell. 9 (11) 3241-57
- Choi HJ und Weis WI** (2005) *Structure of the armadillo repeat domain of plakophilin 1.* J Mol Biol. 346 (1) 367-76
- Chomczynski P und Sacchi N** (1987) *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.* Anal Biochem. 162 (1) 156-9
- Coates JC** (2003) *Armadillo repeat proteins: beyond the animal kingdom.* Trends Cell Biol. 13 (9) 463-71
- Daniel JM und Reynolds AB** (1999) *The catenin p120(ctn) interacts with Kaiso, a novel BTB/POZ domain zinc finger transcription factor.* Mol Cell Biol. 19 (5) 3614-23
- Daniel JM, Spring CM, Crawford HC, Reynolds AB und Baig A** (2002) *The p120(ctn)-binding partner Kaiso is a bi-modal DNA-binding protein that recognizes both a sequence-specific consensus and methylated CpG dinucleotides.* Nucleic Acids Res. 30 (13) 2911-9.
- Davis MA, Ireton RC und Reynolds AB** (2003) *A core function for p120-catenin in cadherin turnover.* J Cell Biol. 163 (3) 525-34.
- De La Cruz EM und Ostap EM** (2004) *Relating biochemistry and function in the myosin superfamily.* Curr Opin Cell Biol. 16 (1) 61-7
- Deguchi M, Iizuka T, Hata Y, Nishimura W, Hirao K, Yao I, Kawabe H und Takai Y** (2000) *PAPIN: A novel multiple PSD-95/Dlg-A/ZO-1 protein interacting with neural plakophilin-related Armadillo-repeat protein (NPRAP)/{delta}-catenin and p0071.* J Biol Chem.

- Delcros JG, Prigent C und Giet R** (2006) *Dynactin targets Pavarotti-KLP to the central spindle during anaphase and facilitates cytokinesis in Drosophila S2 cells*. J Cell Sci. 119 (Pt 21) 4431-41
- DerMardirossian C und Bokoch GM** (2005) *GDI: central regulatory molecules in Rho GTPase activation*. Trends Cell Biol. 15 (7) 356-63
- D'Souza-Schorey C und Chavrier P** (2006) *ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond*. Nat Rev Mol Cell Biol. 7 (5) 347-58
- Echard A, Hickson GR, Foley E und O'Farrell PH** (2004) *Terminal cytokinesis events uncovered after an RNAi screen*. Curr Biol. 14 (18) 1685-93
- Etienne-Manneville S und Hall A** (2002) *Rho GTPases in cell biology*. Nature. 420 (6916) 629-35
- Fan J und Beck KA** (2004) *A role for the spectrin superfamily member Syne-1 and kinesin II in cytokinesis*. J Cell Sci. 117 (Pt 4) 619-29
- Fang X, Ji H, Kim SW, Park JI, Vaught TG, Anastasiadis PZ, Ciesiolka M und McCreath PD** (2004) *Vertebrate development requires ARVCF and p120 catenins and their interplay with RhoA and Rac*. J Cell Biol. 165 (1) 87-98
- Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM und Danielsen M** (1987) *Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure*. Proc Natl Acad Sci U S A. 84 (21) 7413-7
- Felgner PL und Ringold GM** (1989) *Cationic liposome-mediated transfection*. Nature. 337 (6205) 387-8
- Fielding AB, Schonteich E, Matheson J, Wilson G, Yu X, Hickson GR, Srivastava S, Baldwin SA, Prekeris R und Gould GW** (2005) *Rab11-FIP3 and FIP4 interact with Arf6 and the exocyst to control membrane traffic in cytokinesis*. Embo J. 24 (19) 3389-99
- Flemming W** (1891) *Neue Beiträge zur Kenntnis der Zelle*. Arc. Mikr. Anat. 37 (1) 685-751
- Förster T** (1948) *Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz*. Ann. Physik. 6 (2) 55-75
- Franz CM und Ridley AJ** (2004) *p120 catenin associates with microtubules: inverse relationship between microtubule binding and Rho GTPase regulation*. J Biol Chem. 279 (8) 6588-94
- Fujiwara T, Bandi M, Nitta M, Ivanova EV, Bronson RT und Pellman D** (2005) *Cytokinesis failure generating tetraploids promotes tumorigenesis in p53-null cells*. Nature. 437 (7061) 1043-7
- Fullilove SL und Jacobson AG** (1971) *Nuclear elongation and cytokinesis in Drosophila montana*. Dev Biol. 26 (4) 560-77
- Gates J und Peifer M** (2005) *Can 1000 reviews be wrong? Actin, alpha-Catenin, and adherens junctions*. Cell. 123 (5) 769-72
- Gennerich A und Vale RD** (2009) *Walking the walk: how kinesin and dynein coordinate their steps*. Curr Opin Cell Biol. 21 (1) 59-67
- Gey GO, Coffman, W.D., Kubicek, M.T.** (1952) *Tissue culture studies of the proliferation capacity of cervical carcinoma and normal epithelium*. Cancer Research. 12 264-65
- Giansanti MG, Belloni G und Gatti M** (2007) *Rab11 is required for membrane trafficking and actomyosin ring constriction in meiotic cytokinesis of Drosophila males*. Mol Biol Cell. 18 (12) 5034-47
- Glotzer M** (2005) *The molecular requirements for cytokinesis*. Science. 307 (5716) 1735-9
- Goldfarb DS, Corbett AH, Mason DA, Harreman MT und Adam SA** (2004) *Importin alpha: a multipurpose nuclear-transport receptor*. Trends Cell Biol. 14 (9) 505-14

- Goodwin M und Yap AS** (2004) *Classical cadherin adhesion molecules: coordinating cell adhesion, signaling and the cytoskeleton*. J Mol Histol. 35 (8-9) 839-44
- Graham FL, Smiley J, Russell WC und Nairn R** (1977) *Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5*. J Gen Virol. 36 (1) 59-74
- Graham FL und van der Eb AJ** (1973) *A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA*. Virology. 52 (2) 456-67
- Green EG, Ramm E, Riley NM, Spiro DJ, Goldenring JR und Wessling-Resnick M** (1997) *Rab11 is associated with transferrin-containing recycling compartments in K562 cells*. Biochem Biophys Res Commun. 239 (2) 612-6
- Gromley A, Jurczyk A, Sillibourne J, Halilovic E, Mogensen M, Groisman I, Blomberg M und Doxsey S** (2003) *A novel human protein of the maternal centriole is required for the final stages of cytokinesis and entry into S phase*. J Cell Biol. 161 (3) 535-45
- Gromley A, Yeaman C, Rosa J, Redick S, Chen CT, Mirabelle S, Guha M, Sillibourne J und Doxsey SJ** (2005) *Centriolin anchoring of exocyst and SNARE complexes at the midbody is required for secretory-vesicle-mediated abscission*. Cell. 123 (1) 75-87
- Grosheva I, Shtutman M, Elbaum M und Bershadsky AD** (2001) *p120 catenin affects cell motility via modulation of activity of Rho-family GTPases: a link between cell-cell contact formation and regulation of cell locomotion*. J Cell Sci. 114 (Pt 4) 695-707.
- Gruneberg U, Neef R, Honda R, Nigg EA und Barr FA** (2004) *Relocation of Aurora B from centromeres to the central spindle at the metaphase to anaphase transition requires MKlp2*. J Cell Biol. 166 (2) 167-72
- Gruneberg U, Neef R, Li X, Chan EH, Chalamalasetty RB, Nigg EA und Barr FA** (2006) *KIF14 and citron kinase act together to promote efficient cytokinesis*. J Cell Biol. 172 (3) 363-72
- Guse A, Mishima M und Glotzer M** (2005) *Phosphorylation of ZEN-4/MKLP1 by aurora B regulates completion of cytokinesis*. Curr Biol. 15 (8) 778-86
- Hara T, Abe M, Inoue H, Yu LR, Veenstra TD, Kang YH, Lee KS und Miki T** (2006) *Cytokinesis regulator ECT2 changes its conformation through phosphorylation at Thr-341 in G2/M phase*. Oncogene. 25 (4) 566-78
- Haraguchi K, Hayashi T, Jimbo T, Yamamoto T und Akiyama T** (2006) *Role of the kinesin-2 family protein, KIF3, during mitosis*. J Biol Chem. 281 (7) 4094-9
- Hart M, Concordet JP, Lassot I, Albert I, del los Santos R, Durand H, Perret C, Rubinfeld B, Margottin F, Benarous R und Polakis P** (1999) *The F-box protein beta-TrCP associates with phosphorylated beta-catenin and regulates its activity in the cell*. Curr Biol. 9 (4) 207-10
- Hatzfeld M** (1999) *The armadillo family of structural proteins*. Int Rev Cytol. 186 179-224
- Hatzfeld M** (2005) *The p120 family of cell adhesion molecules*. Eur J Cell Biol. 84 (2-3) 205-14.
- Hatzfeld M** (2007) *Plakophilins: Multifunctional proteins or just regulators of desmosomal adhesion?* Biochim Biophys Acta. 1773 (1) 69-77
- Hatzfeld M, Green KJ und Sauter H** (2003) *Targeting of p0071 to desmosomes and adherens junctions is mediated by different protein domains*. J Cell Sci. 116 (Pt 7) 1219-33.
- Hatzfeld M und Nachtsheim C** (1996) *Cloning and characterization of a new armadillo family member, p0071, associated with the junctional plaque: evidence for a subfamily of closely related proteins*. J Cell Sci. 109 (Pt 11) 2767-78
- Heasman SJ und Ridley AJ** (2008) *Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies*. Nat Rev Mol Cell Biol. 9 (9) 690-701

- Hickson GR, Matheson J, Riggs B, Maier VH, Fielding AB, Prekeris R, Sullivan W, Barr FA und Gould GW** (2003) *Arfophilins are dual Arf/Rab 11 binding proteins that regulate recycling endosome distribution and are related to Drosophila nuclear fallout*. Mol Biol Cell. 14 (7) 2908-20
- Hirokawa N** (1998) *Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport*. Science. 279 (5350) 519-26
- Hirokawa N und Noda Y** (2008) *Intracellular transport and kinesin superfamily proteins, KIFs: structure, function, and dynamics*. Physiol Rev. 88 (3) 1089-118
- Hsu SC, Hazuka CD, Foletti DL und Scheller RH** (1999) *Targeting vesicles to specific sites on the plasma membrane: the role of the sec6/8 complex*. Trends Cell Biol. 9 (4) 150-3
- Huber AH, Nelson WJ und Weis WI** (1997) *Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of beta-catenin*. Cell. 90 (5) 871-82
- Huber AH und Weis WI** (2001) *The structure of the beta-catenin/E-cadherin complex and the molecular basis of diverse ligand recognition by beta-catenin*. Cell. 105 (3) 391-402
- Hulpiau P und van Roy F** (2009) *Molecular evolution of the cadherin superfamily*. Int J Biochem Cell Biol. 41 (2) 349-69
- Ikebe M, Koretz J und Hartshorne DJ** (1988) *Effects of phosphorylation of light chain residues threonine 18 and serine 19 on the properties and conformation of smooth muscle myosin*. J Biol Chem. 263 (13) 6432-7
- Ildardi JM, Mochida S und Sheng ZH** (1999) *Snapiin: a SNARE-associated protein implicated in synaptic transmission*. Nat Neurosci. 2 (2) 119-24
- Iretton RC, Davis MA, van Hengel J, Mariner DJ, Barnes K, Thoreson MA, Anastasiadis PZ, Matrisian L, Bundy LM, Sealy L, Gilbert B, van Roy F und Reynolds AB** (2002) *A novel role for p120 catenin in E-cadherin function*. J Cell Biol. 159 (3) 465-76
- Izawa I, Nishizawa M, Tomono Y, Ohtakara K, Takahashi T und Inagaki M** (2002) *ERBIN associates with p0071, an armadillo protein, at cell-cell junctions of epithelial cells*. Genes Cells. 7 (5) 475-85.
- Jaffe AB und Hall A** (2005) *Rho GTPases: biochemistry and biology*. Annu Rev Cell Dev Biol. 21 247-69
- Jahn R und Scheller RH** (2006) *SNAREs--engines for membrane fusion*. Nat Rev Mol Cell Biol. 7 (9) 631-43
- Jaulin-Bastard F, Arsanto JP, Le Bivic A, Navarro C, Vely F, Saito H, Marchetto S, Hatzfeld M, Santoni MJ, Birnbaum D und Borg JP** (2002) *Interaction between Erbin and a Catenin-related Protein in Epithelial Cells*. J Biol Chem. 277 (4) 2869-75.
- Jiang W, Jimenez G, Wells NJ, Hope TJ, Wahl GM, Hunter T und Fukunaga R** (1998) *PRC1: a human mitotic spindle-associated CDK substrate protein required for cytokinesis*. Mol Cell. 2 (6) 877-85
- Jimbo T, Kawasaki Y, Koyama R, Sato R, Takada S, Haraguchi K und Akiyama T** (2002) *Identification of a link between the tumour suppressor APC and the kinesin superfamily*. Nat Cell Biol. 4 (4) 323-7
- John J, Sohmen R, Feuerstein J, Linke R, Wittinghofer A und Goody RS** (1990) *Kinetics of interaction of nucleotides with nucleotide-free H-ras p21*. Biochemistry. 29 (25) 6058-65
- Kamijo K, Ohara N, Abe M, Uchimura T, Hosoya H, Lee JS und Miki T** (2006) *Dissecting the Role of Rho-mediated Signaling in Contractile Ring Formation*.
- Kapitein LC, Peterman EJ, Kwok BH, Kim JH, Kapoor TM und Schmidt CF** (2005) *The bipolar mitotic kinesin Eg5 moves on both microtubules that it crosslinks*. Nature. 435 (7038) 114-8

- Karess R** (2005) *Rod-Zw10-Zwilch: a key player in the spindle checkpoint*. Trends Cell Biol. 15 (7) 386-92
- Kashina AS, Baskin RJ, Cole DG, Wedaman KP, Saxton WM und Scholey JM** (1996a) *A bipolar kinesin*. Nature. 379 (6562) 270-2
- Kashina AS, Scholey JM, Leszyk JD und Saxton WM** (1996b) *An essential bipolar mitotic motor*. Nature. 384 (6606) 225
- Kessler A, Tomas E, Immler D, Meyer HE, Zorzano A und Eckel J** (2000) *Rab11 is associated with GLUT4-containing vesicles and redistributes in response to insulin*. Diabetologia. 43 (12) 1518-27
- Kikuchi A, Kaibuchi K, Hori Y, Nonaka H, Sakoda T, Kawamura M, Mizuno T und Takai Y** (1992) *Molecular cloning of the human cDNA for a stimulatory GDP/GTP exchange protein for c-Ki-ras p21 and smg p21*. Oncogene. 7 (2) 289-93
- Kim JE, Billadeau DD und Chen J** (2005) *The tandem BRCT domains of Ect2 are required for both negative and positive regulation of Ect2 in cytokinesis*. J Biol Chem. 280 (7) 5733-9. Epub 2004 Nov 15.
- Kim K, Sirota A, Chen Yh YH, Jones SB, Dudek R, Lanford GW, Thakore C und Lu Q** (2002) *Dendrite-like process formation and cytoskeletal remodeling regulated by delta-catenin expression*. Exp Cell Res. 275 (2) 171-84
- Kimura K, Ito M, Amano M, Chihara K, Fukata Y, Nakafuku M, Yamamori B, Feng J, Nakano T, Okawa K, Iwamatsu A und Kaibuchi K** (1996) *Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase)*. Science. 273 (5272) 245-8
- Kimura K, Tsuji T, Takada Y, Miki T und Narumiya S** (2000) *Accumulation of GTP-bound RhoA during cytokinesis and a critical role of ECT2 in this accumulation*. J Biol Chem. 275 (23) 17233-6.
- Kobe B** (1999) *Autoinhibition by an internal nuclear localization signal revealed by the crystal structure of mammalian importin alpha*. Nat Struct Biol. 6 (4) 388-97
- Korinek V, Barker N, Morin PJ, van Wichen D, de Weger R, Kinzler KW, Vogelstein B und Clevers H** (1997) *Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma*. Science. 275 (5307) 1784-7
- Kosako H, Yoshida T, Matsumura F, Ishizaki T, Narumiya S und Inagaki M** (2000) *Rho-kinase/ROCK is involved in cytokinesis through the phosphorylation of myosin light chain and not ezrin/radixin/moesin proteins at the cleavage furrow*. Oncogene. 19 (52) 6059-64
- Kurasawa Y, Earnshaw WC, Mochizuki Y, Dohmae N und Todokoro K** (2004) *Essential roles of KIF4 and its binding partner PRC1 in organized central spindle midzone formation*. Embo J. 23 (16) 3237-48
- Laura RP, Witt AS, Held HA, Gerstner R, Deshayes K, Koehler MF, Kosik KS, Sidhu SS und Lasky LA** (2002) *The Erbin PDZ domain binds with high affinity and specificity to the carboxyl termini of delta-catenin and ARVCF*. J Biol Chem. 277 (15) 12906-14.
- Lee JS, Kamijo K, Ohara N, Kitamura T und Miki T** (2004a) *MgcRacGAP regulates cortical activity through RhoA during cytokinesis*. Exp Cell Res. 293 (2) 275-82
- Lee MC, Miller EA, Goldberg J, Orci L und Schekman R** (2004b) *Bi-directional protein transport between the ER and Golgi*. Annu Rev Cell Dev Biol. 20 87-123
- Leonard DA, Evans T, Hart M, Cerione RA und Manor D** (1994) *Investigation of the GTP-binding/GTPase cycle of Cdc42Hs using fluorescence spectroscopy*. Biochemistry. 33 (40) 12323-8
- Li X, Sapp E, Chase K, Comer-Tierney LA, Masso N, Alexander J, Reeves P, Kegel KB, Valencia A, Esteves M, Aronin N und Difiglia M** (2009a) *Disruption of Rab11 activity in a knock-in mouse model of Huntington's disease*. Neurobiol Dis. 36 (2) 374-83

- Li X, Sapp E, Valencia A, Kegel KB, Qin ZH, Alexander J, Masso N, Reeves P, Ritch JJ, Zeitlin S, Aronin N und Difulgia M** (2008) *A function of huntingtin in guanine nucleotide exchange on Rab11*. Neuroreport. 19 (16) 1643-7
- Li X, Standley C, Sapp E, Valencia A, Qin ZH, Kegel KB, Yoder J, Comer-Tierney LA, Esteves M, Chase K, Alexander J, Masso N, Sobin L, Bellve K, Tuft R, Lifshitz L, Fogarty K, Aronin N und Difulgia M** (2009) *Mutant Huntingtin Impairs Vesicle Formation from Recycling Endosomes by Interfering with Rab11 Activity*. Mol Cell Biol.
- Liu C, Li Y, Semenov M, Han C, Baeg GH, Tan Y, Zhang Z, Lin X und He X** (2002) *Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism*. Cell. 108 (6) 837-47
- Lock JG und Stow JL** (2005) *Rab11 in recycling endosomes regulates the sorting and basolateral transport of E-cadherin*. Mol Biol Cell. 16 (4) 1744-55
- Luo W und Lin SC** (2004) *Axin: a master scaffold for multiple signaling pathways*. Neurosignals. 13 (3) 99-113
- Mabuchi I und Okuno M** (1977) *The effect of myosin antibody on the division of starfish blastomeres*. J Cell Biol. 74 (1) 251-63
- Madaule P, Eda M, Watanabe N, Fujisawa K, Matsuoka T, Bito H, Ishizaki T und Narumiya S** (1998) *Role of citron kinase as a target of the small GTPase Rho in cytokinesis*. Nature. 394 (6692) 491-4
- Martinez MC, Ochiishi T, Majewski M und Kosik KS** (2003) *Dual regulation of neuronal morphogenesis by a delta-catenin-cortactin complex and Rho*. J Cell Biol. 162 (1) 99-111.
- Matuliene J und Kuriyama R** (2002) *Kinesin-like protein CHO1 is required for the formation of midbody matrix and the completion of cytokinesis in mammalian cells*. Mol Biol Cell. 13 (6) 1832-45
- McCrea PD und Park JI** (2007) *Developmental functions of the P120-catenin subfamily*. Biochim Biophys Acta. 1773 (1) 17-33
- Miki H, Okada Y und Hirokawa N** (2005) *Analysis of the kinesin superfamily: insights into structure and function*. Trends Cell Biol. 15 (9) 467-76
- Miki T, Smith CL, Long JE, Eva A und Fleming TP** (1993) *Oncogene ect2 is related to regulators of small GTP-binding proteins*. Nature. 362 (6419) 462-5
- Miller AL und Bement WM** (2009) *Regulation of cytokinesis by Rho GTPase flux*. Nat Cell Biol. 11 (1) 71-7
- Minoshima Y, Kawashima T, Hirose K, Tonzuka Y, Kawajiri A, Bao YC, Deng X, Tatsuka M, Narumiya S, May WS, Jr., Nosaka T, Semba K, Inoue T, Satoh T, Inagaki M und Kitamura T** (2003) *Phosphorylation by aurora B converts MgcRacGAP to a RhoGAP during cytokinesis*. Dev Cell. 4 (4) 549-60
- Mishima M, Kaitna S und Glotzer M** (2002) *Central spindle assembly and cytokinesis require a kinesin-like protein/RhoGAP complex with microtubule bundling activity*. Dev Cell. 2 (1) 41-54
- Mishima M, Pavicic V, Gruneberg U, Nigg EA und Glotzer M** (2004) *Cell cycle regulation of central spindle assembly*. Nature. 430 (7002) 908-13
- Mizuno T, Kaibuchi K, Yamamoto T, Kawamura M, Sakoda T, Fujioka H, Matsuura Y und Takai Y** (1991) *A stimulatory GDP/GTP exchange protein for smg p21 is active on the post-translationally processed form of c-Ki-ras p21 and rhoA p21*. Proc Natl Acad Sci U S A. 88 (15) 6442-6
- Mollinari C, Kleman JP, Jiang W, Schoehn G, Hunter T und Margolis RL** (2002) *PRC1 is a microtubule binding and bundling protein essential to maintain the mitotic spindle midzone*. J Cell Biol. 157 (7) 1175-86
- Montagnac G und Chavrier P** (2008) *Endosome positioning during cytokinesis*. Biochem Soc Trans. 36 (Pt 3) 442-3

- Montagnac G, Echard A und Chavrier P** (2008) *Endocytic traffic in animal cell cytokinesis*. *Curr Opin Cell Biol.* 20 (4) 454-61
- Morin P, Flors C und Olson MF** (2009) *Constitutively active RhoA inhibits proliferation by retarding G(1) to S phase cell cycle progression and impairing cytokinesis*. *Eur J Cell Biol.* 88 (9) 495-507
- Moroianu J, Hijikata M, Blobel G und Radu A** (1995) *Mammalian karyopherin alpha 1 beta and alpha 2 beta heterodimers: alpha 1 or alpha 2 subunit binds nuclear localization signal and beta subunit interacts with peptide repeat-containing nucleoporins*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92 (14) 6532-6
- Mullins JM und McIntosh JR** (1982) *Isolation and initial characterization of the mammalian midbody*. *J Cell Biol.* 94 (3) 654-61
- Munson M und Novick P** (2006) *The exocyst defrocked, a framework of rods revealed*. *Nat Struct Mol Biol.* 13 (7) 577-81
- Nakamura T, Kurokawa K, Kiyokawa E und Matsuda M** (2006) *Analysis of the spatiotemporal activation of rho GTPases using Raichu probes*. *Methods Enzymol.* 406 315-32
- Neef R, Klein UR, Kopajtich R und Barr FA** (2006) *Cooperation between mitotic kinesins controls the late stages of cytokinesis*. *Curr Biol.* 16 (3) 301-7
- Neef R, Preisinger C, Sutcliffe J, Kopajtich R, Nigg EA, Mayer TU und Barr FA** (2003) *Phosphorylation of mitotic kinesin-like protein 2 by polo-like kinase 1 is required for cytokinesis*. *J Cell Biol.* 162 (5) 863-75
- Niia F, Tatsumoto T, Lee KS und Miki T** (2006) *Phosphorylation of the cytokinesis regulator ECT2 at G2/M phase stimulates association of the mitotic kinase Plk1 and accumulation of GTP-bound RhoA*. *Oncogene.* 25 (6) 827-37
- Niia F, Xie X, Lee KS, Inoue H und Miki T** (2005) *Inhibition of cyclin-dependent kinase 1 induces cytokinesis without chromosome segregation in an ECT2 and MgcRacGAP-dependent manner*. *J Biol Chem.* 280 (43) 36502-9
- Nishimura Y und Yonemura S** (2006) *Centralspindlin regulates ECT2 and RhoA accumulation at the equatorial cortex during cytokinesis*. *J Cell Sci.* 119 (Pt 1) 104-14
- Noren NK, Liu BP, Burridge K und Kreft B** (2000) *p120 catenin regulates the actin cytoskeleton via Rho family GTPases*. *J Cell Biol.* 150 (3) 567-80.
- Nousiainen M, Sillje HH, Sauer G, Nigg EA und Korner R** (2006) *Phosphoproteome analysis of the human mitotic spindle*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103 (14) 5391-6
- Ohno H, Hirabayashi S, Iizuka T, Ohnishi H, Fujita T und Hata Y** (2002) *Localization of p0071-interacting proteins, plakophilin-related armadillo-repeat protein-interacting protein (PAPIN) and ERBIN, in epithelial cells*. *Oncogene.* 21 (46) 7042-9.
- Olofsson B** (1999) *Rho guanine dissociation inhibitors: pivotal molecules in cellular signalling*. *Cell Signal.* 11 (8) 545-54
- Otomo T, Tomchick DR, Otomo C, Panchal SC, Machius M und Rosen MK** (2005) *Structural basis of actin filament nucleation and processive capping by a formin homology 2 domain*. *Nature.* 433 (7025) 488-94
- Ozawa M, Baribault H und Kemler R** (1989) *The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species*. *Embo J.* 8 (6) 1711-7
- Park JI, Kim SW, Lyons JP, Ji H, Nguyen TT, Cho K, Barton MC, Deroo T, Vlemminckx K, Moon RT und McCrea PD** (2005) *Kaiso/p120-catenin and TCF/beta-catenin complexes coordinately regulate canonical Wnt gene targets*. *Dev Cell.* 8 (6) 843-54.
- Parker BA und Stark GR** (1979) *Regulation of simian virus 40 transcription: sensitive analysis of the RNA species present early in infections by virus or viral DNA*. *J Virol.* 31 (2) 360-9

- Patel SD, Chen CP, Bahna F, Honig B und Shapiro L** (2003) *Cadherin-mediated cell-cell adhesion: sticking together as a family*. *Curr Opin Struct Biol.* 13 (6) 690-8
- Peifer M, Berg S und Reynolds AB** (1994) *A repeating amino acid motif shared by proteins with diverse cellular roles*. *Cell.* 76 (5) 789-91.
- Pelissier A, Chauvin JP und Lecuit T** (2003) *Trafficking through Rab11 endosomes is required for cellularization during Drosophila embryogenesis*. *Curr Biol.* 13 (21) 1848-57
- Perez-Moreno M, Davis MA, Wong E, Pasolli HA, Reynolds AB und Fuchs E** (2006) *p120-catenin mediates inflammatory responses in the skin*. *Cell.* 124 (3) 631-44
- Perez-Moreno M und Fuchs E** (2006) *Catenins: keeping cells from getting their signals crossed*. *Dev Cell.* 11 (5) 601-12
- Pesin JA und Orr-Weaver TL** (2008) *Regulation of APC/C activators in mitosis and meiosis*. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 24 475-99
- Petronczki M, Glotzer M, Kraut N und Peters JM** (2007) *Polo-like kinase 1 triggers the initiation of cytokinesis in human cells by promoting recruitment of the RhoGEF Ect2 to the central spindle*. *Dev Cell.* 12 (5) 713-25
- Petronczki M, Lenart P und Peters JM** (2008) *Polo on the Rise-from Mitotic Entry to Cytokinesis with Plk1*. *Dev Cell.* 14 (5) 646-59
- Piekny A, Werner M und Glotzer M** (2005) *Cytokinesis: welcome to the Rho zone*. *Trends Cell Biol.* 15 (12) 651-8.
- Pinson KI, Brennan J, Monkley S, Avery BJ und Skarnes WC** (2000) *An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice*. *Nature.* 407 (6803) 535-8
- Powers J, Bossinger O, Rose D, Strome S und Saxton W** (1998) *A nematode kinesin required for cleavage furrow advancement*. *Curr Biol.* 8 (20) 1133-6
- Prekeris R, Davies JM und Scheller RH** (2001) *Identification of a novel Rab11/25 binding domain present in Eferin and Rip proteins*. *J Biol Chem.* 276 (42) 38966-70
- Prekeris R und Gould GW** (2008) *Breaking up is hard to do - membrane traffic in cytokinesis*. *J Cell Sci.* 121 (Pt 10) 1569-76
- Prekeris R, Klumperman J und Scheller RH** (2000) *A Rab11/Rip11 protein complex regulates apical membrane trafficking via recycling endosomes*. *Mol Cell.* 6 (6) 1437-48
- Prigent M, Dubois T, Raposo G, Derrien V, Tenza D, Rosse C, Camonis J und Chavrier P** (2003) *ARF6 controls post-endocytic recycling through its downstream exocyst complex effector*. *J Cell Biol.* 163 (5) 1111-21
- Prokopenko SN, Brumby A, O'Keefe L, Prior L, He Y, Saint R und Bellen HJ** (1999) *A putative exchange factor for Rho1 GTPase is required for initiation of cytokinesis in Drosophila*. *Genes Dev.* 13 (17) 2301-14
- Pruyne D, Evangelista M, Yang C, Bi E, Zigmund S, Bretscher A und Boone C** (2002) *Role of formins in actin assembly: nucleation and barbed-end association*. *Science.* 297 (5581) 612-5
- Qi J, Wang J, Romanyuk O und Siu CH** (2006) *Involvement of Src family kinases in N-cadherin phosphorylation and beta-catenin dissociation during transendothelial migration of melanoma cells*. *Mol Biol Cell.* 17 (3) 1261-72
- Reid T, Furuyashiki T, Ishizaki T, Watanabe G, Watanabe N, Fujisawa K, Morii N, Madaule P und Narumiya S** (1996) *Rhotekin, a new putative target for Rho bearing homology to a serine/threonine kinase, PKN, and rhophilin in the rho-binding domain*. *J Biol Chem.* 271 (23) 13556-60
- Ren XD, Kiosses WB und Schwartz MA** (1999) *Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton*. *Embo J.* 18 (3) 578-85
- Reynolds AB, Daniel J, McCrea PD, Wheelock MJ, Wu J und Zhang Z** (1994) *Identification of a new catenin: the tyrosine kinase substrate p120cas associates with E-cadherin complexes*. *Mol Cell Biol.* 14 (12) 8333-42



- Reynolds AB, Daniel JM, Mo YY, Wu J und Zhang Z** (1996) *The novel catenin p120cas binds classical cadherins and induces an unusual morphological phenotype in NIH3T3 fibroblasts.* Exp Cell Res. 225 (2) 328-37
- Reynolds AB und Roczniak-Ferguson A** (2004) *Emerging roles for p120-catenin in cell adhesion and cancer.* Oncogene. 23 (48) 7947-56.
- Reynolds AB, Roesel DJ, Kanner SB und Parsons JT** (1989) *Transformation-specific tyrosine phosphorylation of a novel cellular protein in chicken cells expressing oncogenic variants of the avian cellular src gene.* Mol Cell Biol. 9 (2) 629-38
- Riggleman B, Wieschaus E und Schedl P** (1989) *Molecular analysis of the armadillo locus: uniformly distributed transcripts and a protein with novel internal repeats are associated with a Drosophila segment polarity gene.* Genes Dev. 3 (1) 96-113
- Riggs B, Rothwell W, Mische S, Hickson GR, Matheson J, Hays TS, Gould GW und Sullivan W** (2003) *Actin cytoskeleton remodeling during early Drosophila furrow formation requires recycling endosomal components Nuclear-fallout and Rab11.* J Cell Biol. 163 (1) 143-54
- Romero S, Le Clainche C, Didry D, Egile C, Pantaloni D und Carlier MF** (2004) *Formin is a processive motor that requires profilin to accelerate actin assembly and associated ATP hydrolysis.* Cell. 119 (3) 419-29
- Roura S, Miravet S, Piedra J, Garcia de Herreros A und Dunach M** (1999) *Regulation of E-cadherin/Catenin association by tyrosine phosphorylation.* J Biol Chem. 274 (51) 36734-40
- Ruchaud S, Carmena M und Earnshaw WC** (2007) *Chromosomal passengers: conducting cell division.* Nat Rev Mol Cell Biol. 8 (10) 798-812
- Saito S, Liu XF, Kamijo K, Raziuddin R, Tatsumoto T, Okamoto I, Chen X, Lee CC, Lorenzi MV, Ohara N und Miki T** (2004) *Deregulation and mislocalization of the cytokinesis regulator ECT2 activate the Rho signaling pathways leading to malignant transformation.* J Biol Chem. 279 (8) 7169-79.
- Salina D, Bodoor K, Eckley DM, Schroer TA, Rattner JB und Burke B** (2002) *Cytoplasmic dynein as a facilitator of nuclear envelope breakdown.* Cell. 108 (1) 97-107
- Sambrook, Fritsch und Maniatis** (1989) *Molecular Cloning, A laboratory manual, Second Edition.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Schmidt A und Hall A** (2002) *Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch.* Genes Dev. 16 (13) 1587-609
- Scholey JM, Taylor KA und Kendrick-Jones J** (1980) *Regulation of non-muscle myosin assembly by calmodulin-dependent light chain kinase.* Nature. 287 (5779) 233-5
- Schonteich E, Pilli M, Simon GC, Matern HT, Junutula JR, Sentz D, Holmes RK und Prekeris R** (2007) *Molecular characterization of Rab11-FIP3 binding to ARF GTPases.* Eur J Cell Biol. 86 (8) 417-31
- Schonteich E, Wilson GM, Burden J, Hopkins CR, Anderson K, Goldenring JR und Prekeris R** (2008) *The Rip11/Rab11-FIP5 and kinesin II complex regulates endocytic protein recycling.* J Cell Sci. 121 (Pt 22) 3824-33
- Schroder R, van der Ven PF, Warlo I, Schumann H, Furst DO, Blumcke I, Schmidt MC und Hatzfeld M** (2000) *p0071, a member of the armadillo multigene family, is a constituent of sarcomeric I-bands in human skeletal muscle.* J Muscle Res Cell Motil. 21 (6) 577-86.
- Seabra MC und Coudrier E** (2004) *Rab GTPases and myosin motors in organelle motility.* Traffic. 5 (6) 393-9
- Sellers JR, Pato MD und Adelstein RS** (1981) *Reversible phosphorylation of smooth muscle myosin, heavy meromyosin, and platelet myosin.* J Biol Chem. 256 (24) 13137-42

- Sellers JR, Spudich JA und Sheetz MP** (1985) *Light chain phosphorylation regulates the movement of smooth muscle myosin on actin filaments.* J Cell Biol. 101 (5 Pt 1) 1897-902
- Setzer SV, Calkins CC, Garner J, Summers S, Green KJ und Kowalczyk AP** (2004) *Comparative analysis of armadillo family proteins in the regulation of a431 epithelial cell junction assembly, adhesion and migration.* J Invest Dermatol. 123 (3) 426-33.
- Shibamoto S, Hayakawa M, Takeuchi K, Hori T, Miyazawa K, Kitamura N, Johnson KR, Wheelock MJ, Matsuyoshi N, Takeichi M und et al.** (1995) *Association of p120, a tyrosine kinase substrate, with E-cadherin/catenin complexes.* J Cell Biol. 128 (5) 949-57
- Skop AR, Bergmann D, Mohler WA und White JG** (2001) *Completion of cytokinesis in C. elegans requires a brefeldin A-sensitive membrane accumulation at the cleavage furrow apex.* Curr Biol. 11 (10) 735-46
- Skop AR, Liu H, Yates J, 3rd, Meyer BJ und Heald R** (2004) *Dissection of the mammalian midbody proteome reveals conserved cytokinesis mechanisms.* Science. 305 (5680) 61-6.
- Sluder G, Miller FJ und Rieder CL** (1986) *Centrosomes are required for the assembly of a bipolar spindle in animal cells.* Ann N Y Acad Sci. 466 669-73
- Somers WG und Saint R** (2003) *A RhoGEF and Rho family GTPase-activating protein complex links the contractile ring to cortical microtubules at the onset of cytokinesis.* Dev Cell. 4 (1) 29-39
- Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S und Brennan M** (1973) *A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma.* J Natl Cancer Inst. 51 (5) 1409-16
- Spring CM, Kelly KF, O'Kelly I, Graham M, Crawford HC und Daniel JM** (2005) *The catenin p120ctn inhibits Kaiso-mediated transcriptional repression of the beta-catenin/TCF target gene matrilysin.* Exp Cell Res. 305 (2) 253-65
- Srivastava SK, Wheelock RH, Aaronson SA und Eva A** (1986) *Identification of the protein encoded by the human diffuse B-cell lymphoma (dbl) oncogene.* Proc Natl Acad Sci U S A. 83 (23) 8868-72
- Steitz SA, Tsang M und Sussman DJ** (1996) *Wnt-mediated relocalization of dishevelled proteins.* In Vitro Cell Dev Biol Anim. 32 (7) 441-5
- Stenmark H** (2009) *Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic.* Nat Rev Mol Cell Biol. 10 (8) 513-25
- Su L, Pertz O, Mikawa M, Hahn K und Parsons SJ** (2009) *p190RhoGAP negatively regulates Rho activity at the cleavage furrow of mitotic cells.* Exp Cell Res. 315 (8) 1347-59
- Takaishi K, Sasaki T, Kameyama T, Tsukita S und Takai Y** (1995) *Translocation of activated Rho from the cytoplasm to membrane ruffling area, cell-cell adhesion sites and cleavage furrows.* Oncogene. 11 (1) 39-48
- Takeda S, Yamazaki H, Seog DH, Kanai Y, Terada S und Hirokawa N** (2000) *Kinesin superfamily protein 3 (KIF3) motor transports fodrin-associating vesicles important for neurite building.* J Cell Biol. 148 (6) 1255-65
- Takemaru KI und Moon RT** (2000) *The transcriptional coactivator CBP interacts with beta-catenin to activate gene expression.* J Cell Biol. 149 (2) 249-54
- Tan JL, Ravid S und Spudich JA** (1992) *Control of nonmuscle myosins by phosphorylation.* Annu Rev Biochem. 61 721-59
- Tatsumoto T, Xie X, Blumenthal R, Okamoto I und Miki T** (1999) *Human ECT2 is an exchange factor for Rho GTPases, phosphorylated in G2/M phases, and involved in cytokinesis.* J Cell Biol. 147 (5) 921-8.

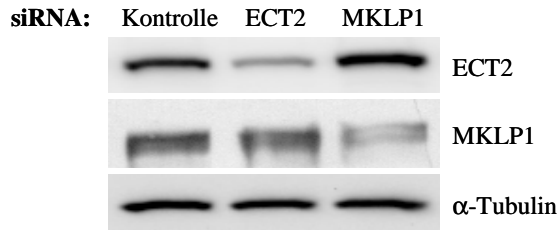
- TerBush DR, Maurice T, Roth D und Novick P** (1996) *The Exocyst is a multiprotein complex required for exocytosis in Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J.* 15 (23) 6483-94
- Ullrich O, Reinsch S, Urbe S, Zerial M und Parton RG** (1996) *Rab11 regulates recycling through the pericentriolar recycling endosome*. *J Cell Biol.* 135 (4) 913-24
- Urbe S, Huber LA, Zerial M, Tooze SA und Parton RG** (1993) *Rab11, a small GTPase associated with both constitutive and regulated secretory pathways in PC12 cells*. *FEBS Lett.* 334 (2) 175-82
- Verni F, Somma MP, Gunsalus KC, Bonaccorsi S, Belloni G, Goldberg ML und Gatti M** (2004) *Feo, the Drosophila homolog of PRC1, is required for central-spindle formation and cytokinesis*. *Curr Biol.* 14 (17) 1569-75
- Wang H, Tang X, Liu J, Trautmann S, Balasundaram D, McCollum D und Balasubramanian MK** (2002) *The multiprotein exocyst complex is essential for cell separation in Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell.* 13 (2) 515-29
- Wang YX, Catlett NL und Weisman LS** (1998) *Vac8p, a vacuolar protein with armadillo repeats, functions in both vacuole inheritance and protein targeting from the cytoplasm to vacuole*. *J Cell Biol.* 140 (5) 1063-74
- Watanabe S, Ando Y, Yasuda S, Hosoya H, Watanabe N, Ishizaki T und Narumiya S** (2008) *mDia2 induces the actin scaffold for the contractile ring and stabilizes its position during cytokinesis in NIH 3T3 cells*. *Mol Biol Cell.* 19 (5) 2328-38
- Wehrli M, Dougan ST, Caldwell K, O'Keefe L, Schwartz S, Vaizel-Ohayon D, Schejter E, Tomlinson A und DiNardo S** (2000) *arrow encodes an LDL-receptor-related protein essential for Wingless signalling*. *Nature.* 407 (6803) 527-30
- Wennerberg K, Ellerbroek SM, Liu RY, Karnoub AE, Burridge K und Der CJ** (2002) *RhoG signals in parallel with Rac1 and Cdc42*. *J Biol Chem.* 277 (49) 47810-7
- Wennerberg K, Rossman KL und Der CJ** (2005) *The Ras superfamily at a glance*. *J Cell Sci.* 118 (Pt 5) 843-6
- Whyte JR und Munro S** (2002) *Vesicle tethering complexes in membrane traffic*. *J Cell Sci.* 115 (Pt 13) 2627-37
- Wildenberg GA, Dohn MR, Carnahan RH, Davis MA, Lobdell NA, Settleman J und Reynolds AB** (2006) *p120-Catenin and p190RhoGAP Regulate Cell-Cell Adhesion by Coordinating Antagonism between Rac and Rho*. *Cell.* 127 (5) 1027-39
- Wilson GM, Fielding AB, Simon GC, Yu X, Andrews PD, Hames RS, Frey AM, Peden AA, Gould GW und Prekeris R** (2005) *The FIP3-Rab11 protein complex regulates recycling endosome targeting to the cleavage furrow during late cytokinesis*. *Mol Biol Cell.* 16 (2) 849-60
- Wolf A, Keil R, Gotzl O, Mun A, Schwarze K, Lederer M, Huttelmaier S und Hatzfeld M** (2006) *The armadillo protein p0071 regulates Rho signalling during cytokinesis*. *Nat Cell Biol.* 8 (12) 1432-40
- Wolfe BA, Takaki T, Petronczki M und Glotzer M** (2009) *Polo-like kinase 1 directs assembly of the HsCyk-4 RhoGAP/Ect2 RhoGEF complex to initiate cleavage furrow formation*. *PLoS Biol.* 7 (5)
- Wu S, Mehta SQ, Pichaud F, Bellen HJ und Quijcho FA** (2005) *Sec15 interacts with Rab11 via a novel domain and affects Rab11 localization in vivo*. *Nat Struct Mol Biol.* 12 (10) 879-85
- Xiao K, Allison DF, Buckley KM, Kottke MD, Vincent PA, Faundez V und Kowalczyk AP** (2003) *Cellular levels of p120 catenin function as a set point for cadherin expression levels in microvascular endothelial cells*. *J Cell Biol.* 163 (3) 535-45.
- Xing Y, Clements WK, Kimelman D und Xu W** (2003) *Crystal structure of a beta-catenin/axin complex suggests a mechanism for the beta-catenin destruction complex*. *Genes Dev.* 17 (22) 2753-64

- Yamamoto T, Kaibuchi K, Mizuno T, Hiroyoshi M, Shirataki H und Takai Y** (1990) *Purification and characterization from bovine brain cytosol of proteins that regulate the GDP/GTP exchange reaction of smg p21s, ras p21-like GTP-binding proteins.* J Biol Chem. 265 (27) 16626-34
- Yamashiro S, Totsukawa G, Yamakita Y, Sasaki Y, Madaule P, Ishizaki T, Narumiya S und Matsumura F** (2003) *Citron kinase, a Rho-dependent kinase, induces di-phosphorylation of regulatory light chain of myosin II.* Mol Biol Cell. 14 (5) 1745-56
- Yamazaki H, Nakata T, Okada Y und Hirokawa N** (1996) *Cloning and characterization of KAP3: a novel kinesin superfamily-associated protein of KIF3A/3B.* Proc Natl Acad Sci U S A. 93 (16) 8443-8
- Yamazaki H, Nakata T, Okada Y und Hirokawa N** (1995) *KIF3A/B: a heterodimeric kinesin superfamily protein that works as a microtubule plus end-directed motor for membrane organelle transport.* J Cell Biol. 130 (6) 1387-99
- Yanagawa S, Lee JS, Haruna T, Oda H, Uemura T, Takeichi M und Ishimoto A** (1997) *Accumulation of Armadillo induced by Wingless, Dishevelled, and dominant-negative Zeste-White 3 leads to elevated DE-cadherin in Drosophila clone 8 wing disc cells.* J Biol Chem. 272 (40) 25243-51
- Yanagawa S, van Leeuwen F, Wodarz A, Klingensmith J und Nusse R** (1995) *The dishevelled protein is modified by wingless signaling in Drosophila.* Genes Dev. 9 (9) 1087-97
- Yano R, Oakes ML, Tabb MM und Nomura M** (1994) *Yeast Srp1p has homology to armadillo/plakoglobin/beta-catenin and participates in apparently multiple nuclear functions including the maintenance of the nucleolar structure.* Proc Natl Acad Sci U S A. 91 (15) 6880-4
- Yost C, Torres M, Miller JR, Huang E, Kimelman D und Moon RT** (1996) *The axis-inducing activity, stability, and subcellular distribution of beta-catenin is regulated in Xenopus embryos by glycogen synthase kinase 3.* Genes Dev. 10 (12) 1443-54
- Yuce O, Piekny A und Glotzer M** (2005) *An ECT2-centralspindlin complex regulates the localization and function of RhoA.* J Cell Biol. 170 (4) 571-82
- Zhu AJ und Watt FM** (1996) *Expression of a dominant negative cadherin mutant inhibits proliferation and stimulates terminal differentiation of human epidermal keratinocytes.* J Cell Sci. 109 (Pt 13) 3013-23
- Zhu C, Bossy-Wetzel E und Jiang W** (2005a) *Recruitment of MKLP1 to the spindle midzone/midbody by INCENP is essential for midbody formation and completion of cytokinesis in human cells.* Biochem J. 389 (Pt 2) 373-81
- Zhu C und Jiang W** (2005) *Cell cycle-dependent translocation of PRC1 on the spindle by Kif4 is essential for midzone formation and cytokinesis.* Proc Natl Acad Sci U S A. 102 (2) 343-8
- Zhu C, Zhao J, Bibikova M, Levenson JD, Bossy-Wetzel E, Fan JB, Abraham RT und Jiang W** (2005b) *Functional analysis of human microtubule-based motor proteins, the kinesins and dyneins, in mitosis/cytokinesis using RNA interference.* Mol Biol Cell. 16 (7) 3187-99

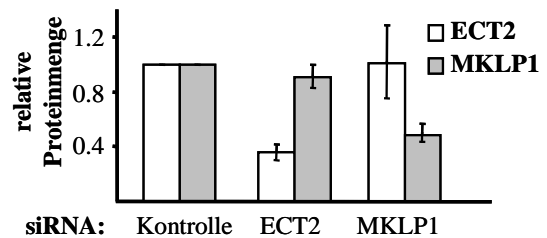
## 7 Anhang

### 7.1 Ergänzende Ergebnisse

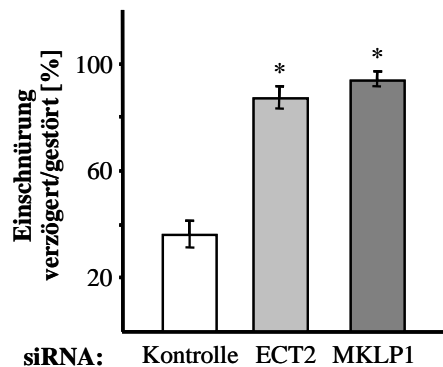
A



B

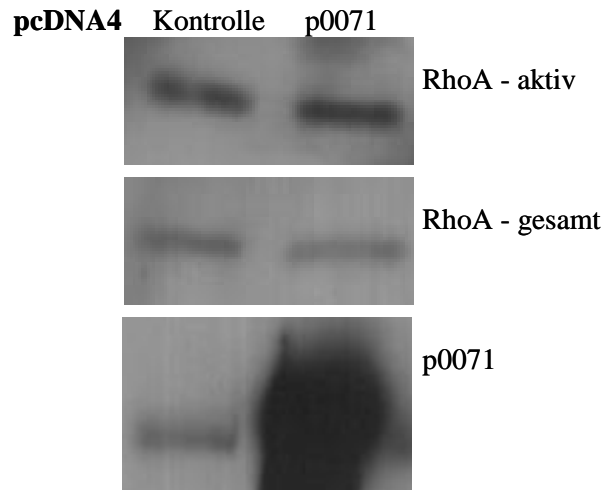


C



#### Abb. 7-1: ECT2 und MKLP1 depletierte HeLa-Zellen zeigen schwere Zytokinese-Defekte

Mit Kontroll-, ECT2- bzw. MKLP1-siRNA transfizierte Zellen wurden in der Prometaphase arretiert und 90 Minuten nach dem Entfernen des S-Mediums in 4% FA fixiert. Anschließend wurde der Verlauf der Zytokinese dieser Zellen analysiert. (A, B) WB-Analysen der ECT2- und MKLP1-Expression der transfizierten und synchronisierten HeLa-Zellen.  $\alpha$ -Tubulin diente zur Normalisierung. Die relativen ECT2- und MKLP1-Proteinmengen sind im Diagramm  $\pm$  STABW aufgetragen. (C) Zur Quantifizierung des Zytokineseverlaufs wurden die verzögerten/gestörten Zytokinesen gezählt und durch die Anzahl aller beobachteter Zytokinesen geteilt. Im Diagramm ist der Prozentsatz gestörter Zytokinesen  $\pm$  STABW aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt, bei denen jeweils mindestens 100 Zytokinesen gezählt wurden. (\*  $p \leq 0,05$ )



### Abb. 7-2: Die Überexpression von p0071 induziert die Aktivierung von RhoA

HEK293-Zellen wurden 48 Stunden nach der Transfektion von pcDNA4 (Kontrolle) bzw. Flag-p0071-WT-pcDNA4 lysiert. Die entsprechenden Lysate wurde mit Rhotekin-Sepharose inkubiert und die Eluate auf Anwesenheit von RhoA mittels WB analysiert. Die Menge an aktivem, präzipitiertem RhoA wurde auf die eingesetzte Gesamtmenge RhoA abgeglichen. Die Analyse der p0071-Expression erfolgte im WB mit Hilfe eines spezifischen Ak gegen p0071.

## 7.2 Pufferlösungen

Die verwendeten Chemikalien wurden soweit nicht anders vermerkt von den Firmen Sigma-Aldrich und Karl Roth bezogen.

<b>2x YT-Medium</b>	10 g/l NaCl; 10 g/l Hefe-Extrakt; 16 g/l Trypton
<b>4x SDS-Ladepuffer</b>	250 mM Tris/HCl (pH 6,8); 8% SDS (v/v); 10% (v/v) $\beta$ -Mercaptoethanol; 30% Glycerin (v/v); 0,25% (w/v) Bromphenolblau
<b>6x DNA-Ladepuffer</b>	0,25% (w/v) Bromphenolblau; 40% Glycerin (v/v); 100 mM EDTA; 0,1% (v/v) SDS
<b>10x Ponceau-Rot</b>	2% (w/v) Ponceau S ; 30% (w/v) TCA; 30% (w/v) Sulfosalizylsäure
<b>10x RNA-Ladepuffer</b>	0,25% (w/v) Bromphenolblau; 30% (v/v) Glycerin; 1 mM EDTA; 20 mM Natriumacetat; 40 mM Tris/HCl (pH 7,8)
<b>Blotpuffer 1</b>	0,3 M Tris/HCl (pH 10,4); 20% (v/v) Methanol
<b>Blotpuffer 2</b>	25 mM Tris/HCl (pH 10,4); 20% (v/v) Methanol
<b>Blotpuffer 3</b>	25 mM Tris/HCl (pH 9,4); 40 mM $\epsilon$ -Aminocaprinsäure; 20% (v/v) Methanol
<b>Chemiluminensenz-Lösung1</b>	100 mM Tris/HCl (pH 8,5); 25 mM Luminol; 0,4 mM Coumarinsäure
<b>Chemiluminensenz-Lösung2</b>	100 mM Tris/HCl (pH 8,5); 0,02% (v/v) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
<b>Coomassie-Entfärbelösung</b>	7,5% (v/v) Essigsäure; 5% (v/v) Methanol

<b>Coomassie-Färbelösung</b>	0,25% (w/v) Coomassie brilliant blau R250; 9,2% (v/v) Essigsäure; 45% (v/v) Methanol
<b>DNA-Präzipitationspuffer</b>	280 mM NaCl; 10 mM KCl; 12 mM Glukose; 50 mM 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)- ethansulfonsäure (HEPES); 1,5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; pH 7,05
<b>GET-Puffer</b>	25 mM Tris/HCl (pH 8,0); 50 mM Glukose; 10 mM Ethylendiamintetraacetat (EDTA)
<b>Glyzerin-Puffer</b>	50% (v/v) DNA-Präzipitationspuffer; 15% (v/v) Glyzerin
<b>GST-Lysepuffer</b>	20 mM HEPES (pH 7,5); 150 mM NaCl; 10% (v/v) Glyzerin
<b>GTC-Reagenz</b>	0,8 M Guanidiniumisothiocyanat; 0,4 M Ammonium- thiocyanat; 0,1 M Natriumacetat (pH 5); 5% (v/v) Glyzerin; 48% (v/v) Aqua-Roti-Phenol
<b>IP-Puffer</b>	20 mM Tris/HCl (pH 8); 137 mM NaCl; 1% (v/v) Igepal CA-630; 10% (v/v) Glyzerin; 2 mM EDTA
<b>LB-Agar</b>	10 g/l NaCl; 10 g/l Trypton; 5 g/l Hefe-Extrakt; 20 g/l Agar; pH 7,0
<b>LB-Medium</b>	10 g/l NaCl; 10 g/l Trypton; 5 g/l Hefe-Extrakt; pH 7,0
<b>MLB-Puffer</b>	50 mM Tris/HCl (pH 7,5); 100 mM NaCl; 5 mM MgCl <sub>2</sub> ; 1 mM EDTA; 10% (v/v) Glyzerin; 1% (v/v) Igepal CA-630
<b>Mowiol</b>	5% (w/v) Mowiol; 30% (v/v) Glyzerin; 0,25% (w/v) 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan (DABCO)
<b>MT-Isolationspuffer1</b>	100 mM Piperazin-N,N'-bis-2-ethansulfonsäure (Pipes; pH 6,9); 1 mM MgSO <sub>4</sub> ; 2 mM Ethylenglykoltetraacetat (EGTA); 0,5% (v/v) Igepal CA-630; 5 µg/ml Taxol; 2 µg/ml Latrunculin B; 200 µg/ml DNase I; 10 µg/ml Rnase A; 1 U/ml Mikrokokkus-Nuklease; 20 U/ml Benzonase
<b>MT-Isolationspuffer2</b>	1 mM Pipes; 5 µg/ml Taxol
<b>MT-stabilisierender-Puffer</b>	100 mM Pipes (pH 6,9); 4 M Glycerin; 2 mM EDTA; 1 mM EGTA; 0,5% (v/v) Triton X-100
<b>PBS</b>	135 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 1 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; pH 7,4
<b>PBSE</b>	135 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 1 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 0,5 mM EDTA; pH 7,4
<b>SD-Agar</b>	6,6 g/l <i>Yeast Nitrogen Base</i> (ohne As); 2% (v/v) Glukose; 20 g/l Agar
<b>Stripping-Puffer</b>	0,2 M Glyzin/HCl (pH 2,5); 0,05% (v/v) Tween20
<b>TBE-Puffer</b>	44,5 mM Tris/HCl; 44,5 mM Borsäure; 1 mM EDTA
<b>TBS</b>	10 mM Tris/HCl (pH 7,6); 100 mM NaCl

<b>TBST</b>	10 mM Tris/HCl (pH 7,6) ; 100 mM NaCl; 0,1% (v/v) Tween20
<b>TFB-I-Puffer</b>	30 mM Kaliumacetat (pH 5,8); 50 mM MgCl <sub>2</sub> ; 100 mM KCl; 15% (v/v) Glycerin
<b>TFB-II-Puffer</b>	10 mM 3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure (MOPS; pH 7,0); 10 mM KCl; 75 mM CaCl <sub>2</sub> ; 15% (v/v) Glycerin
<b>Tris/Glycin-Laufpuffer</b>	25 mM Tris; 19,2 mM Glycin; 0,1% (v/v) SDS
<b>YPD-Medium</b>	20 g/l Pepton; 10 g/l Hefe-Extrakt; 2% (v/v) Glukose

### 7.3 Verwendete Geräte

CO <sub>2</sub> -Inkubatoren	Heraeus Instruments; Bad Grund
Durchflusszytometer FACScan	BD Bioscience
Konfokalmikroskopsystem TCS-SP2	Leica Microsystems
Kühlzentrifuge Sigma 2-16PK	Fisher Bioblock Scientific; Illkirch Graffenstaden, Frankreich
Mikroskop-System "Cell Observer"	Carl Zeiss
Mikroskopsystem Nikon Eclipse E600	Nikon
PerfectBlue Semi-Dry Elektrobloetter	Peqlab; Erlangen
Photometer Genequant 1300	GE Healthcare; München
Schüttel-Inkubatoren	GFL; Burgwedel
SDS-PAGE-System Mini-Protean	Biorad; München
Sterilbank	Kendro; Langenselbold
Thermocycler T3	Biometra
Thermomixer	Eppendorf; Hamburg
Tischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus Instruments

### 7.4 Verwendete DNA-Oligonukleotide

**Tabelle 7-1: DNA-Oligonukleotide zur Klonierung**

Die unterstrichenen Sequenzen markieren die Erkennungssequenz der jeweiligen Restriktionsendonuklease. Hervorgehoben ist die zur Optimierung der Translation in einigen Oligonukleotiden enthaltene Kozack-Sequenz (**GCC ACC**). Die Sequenz des zu klonierenden Genprodukts ist *kursiv* dargestellt.

Name	Sequenz 5' → 3'
3+Mun I p0071 F	AAT <u>CAA TTG</u> <b>GCC ACC</b> ATG CCA GCT CCT GAG CAG GCC
3+BamH I +S p0071 R	TAA <u>GGA TCC</u> TTA CAC CCA TGA GTC TGG GGA CCC
3+Mun I KIF3b F	TAA <u>CAA TTG</u> <b>GCC ACC</b> ATG TCA AAG TTG AAA AGC TCA GAG TCA G



Name	Sequenz 5' → 3'
3+MunI KIF3b As346 F	AAT <u>CAA TTG</u> <i>GTC AAT GAG GAC CCC AAG GAT G</i>
3+SalI KIF3b As345 +S R	TAA <u>GTC GAC</u> TTA CCT TGG TTT GTT CTT AAT GTT TTT GGC AC
3+Sal I KIF3b +S R	AAG <u>GTC GAC</u> TTA CTT TGG AAC CAG CCC CCG AGA CTG
3+EcoR I RhoA F	AAT <u>GAA TTC</u> <b>GCC ACC</b> ATG GCT GCC ATC CGG AAG
3+Sal I RhoA +S R	AAT <u>GTC GAC</u> TCA CAA GAC AAG GCA CCC AGA TTT TTT C
3+KpnI Histon2B F	ACG <u>GGT ACC</u> <b>GCC ACC</b> ATG CCA GAG CCA GCG AAG TCT GCT
3+BamH I Histon2B R	ACG <u>GGA TCC</u> <i>GCG CTG GTG TAC TTG GTG AC</i>
3+EcoR I FIP4 As592 F	AAA <u>GAA TTC</u> <i>GCC ACC ATG ATA GAC ACC GCC TCG CGC</i> <i>GAT GAG C</i>
3+Sal I FIP4 +S R	TAA <u>GTC GAC</u> TTA GTG TTT GAT CTC GAG GAT GGA G
3+EcoR I Rab11 F	TTC <u>GAA TTC</u> <b>GCC ACC</b> ATG GCG GGG GCT GGT TCC GCC GCT GTA TC
3+Sal I Rab11 +S R	AAT <u>GTC GAC</u> TTA GAT GTT CTG ACA GCA CTG CAC CTT TGG CTT G
3+EcoR I Snapin F	TTC <u>GAA TTC</u> <b>GCC ACC</b> ATG GCG GGG GCT GGT TCC GCC GCT GTA TC
3+EcoR I Snapin As79 F	AAA <u>GAA TTC</u> <i>GAC CCC TAT GTT AAG AAG CTA CTT AAT GCC</i>
3+Sal I Snapin As78 +S R	AAA <u>GTC GAC</u> TCA AAG ATC CAG GGC CAC CTT CTG ATC C
3+Sal I Snapin +S R	AAA <u>GTC GAC</u> TTA TTT GCC TGG GGA GCC AGG G
3+BamH I MKLP1 F	TTT <u>GGA TTC</u> <b>GCC ACC</b> ATG AAG TCA GCG AGA GCT AAG ACA CCC
3+Sac I Mun I MKLP1 As617 R	TTT <u>GAG CTC</u> CAA TTG TTC ATG CCT TGC AAC CTG GCT TCT AAT CTG

**Tabelle 7-2: DNA-Oligonukleotide zur Mutagenese**

Das von der Mutagenese betroffene Codon ist hervorgehoben und die ausgetauschten Nukleotide des Codons zusätzlich unterstrichen.

Name	Sequenz 5' → 3'
Rab11-DA (Q70L) F	TGG GAC ACA GCA GGG <b>CTA</b> GAG CGA TAT CGA GCT ATA
Rab11-DA (Q70L) R	TAT AGC TCG ATA TCG CTC <b>TAG</b> CCC TGC TGT GTC CCA
Rab11-DN (S25N) F	CT GGT GTT GGA AAG <b>AAT</b> AAT CTC CTG TCT C
Rab11-DN (S25N) R	G AGA CAG GAG ATT <b>ATT</b> CTT TCC AAC ACC AG
RhoA-DA (Q63L) F	G GAC ACA GCT GGG <b>CTG</b> GAA GAT TAT GAT CGC C
RhoA-DA (Q63L) R	G GCG ATC ATA ATC TTC <b>CAG</b> CCC AGC TGT GTC C
RhoA-DN (T19N) F	GT GAT GGA GCC TGT GGA AAG <b>AAC</b> TGC TTG CTC ATA GTC
RhoA-DN (T19N) R	GAC TAT GAG CAA GCA <b>GTT</b> CTT TCC ACA GGC TCC ATC AC

## 7.5 Verwendete siRNAs und Plasmide

**Tabelle 7-3: Übersicht der eingesetzten siRNAs**

Sind zwei verschiedene siRNA für eine mRNA angegeben, so wurde für deren Repression ein Mix aus beiden siRNAs transfiziert.

Name der siRNA	reprimiertes Genprodukt	siRNA-Sequenz 5' → 3'
p0071-siMAX	p0071	UGGAUAACGAUAGAGUUGUUUCUCCGdTdT
KIF3b-siRNA#1	KIF3b	CCAACUUAUCUGGUUGAAdTdT
KIF3b-siRNA#2	KIF3b	GAAUAGCUGUGUGAUUGAAdTdT
ECT2-siRNA	ECT2	CAAGAGUGAUUAUUGGUUCAdTdT
MKLP1-siRNA#1	MKLP1	CGACAUAACUUACGACAAAUdTdT
MKLP1-siRNA#2	MKLP1	UUACGUGAAGCUGGUAAdTdT
Snapin-siRNA	Snapin	GACGCGUUGUCUUGGUUAACAdTdT
Kontroll-siRNA	-----	UGCGCUAGGCCUCGGUUGCUdTdT

**Tabelle 7-4: Übersicht der verwendeten shRNA-Vektoren**

Zur Generierung der aufgeführten shRNA-Vektoren wurde das *BLOCK-iT™ Inducible H1 RNAi Entry Vector Kit* (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die hervorgehobene Sequenz entspricht der *Loop*-Sequenz. Die unterstrichenen Sequenzen sind revers komplementär zur Ausbildung doppelsträngiger RNA.

Vektorname	reprimiertes Genprodukt	shRNA-Sequenz 5' → 3'
p0071-sh#4- pENTR/H1/TO	p0071	<u>GCACAUUACUCCUAUUAUGACGAAUCAUAU</u> <u>AUAGGAGUAAUGUGC</u>
p0071-sh#6- pENTR/H1/TO	p0071	<u>GAUAACGAUAGAGUUGUUUCUCGAAAGAAAC</u> <u>AACUCUAUCGUUAUC</u>
Kontroll-sh- pENTR/H1/TO	-----	<u>AAATCGCTGATTTGTGTAGTCGGAGACGACTA</u> <u>CACAAATCAGCGA</u>

**Tabelle 7-5: Übersicht der verwendeten Vektoren für die Hefe-Dihybrid-Analysen**

Die aufgelisteten Plasmide wurden für Interaktionsstudien in YRG2-Hefezellen verwendet. Die Herkunft von Plasmiden, die nicht im Rahmen der vorliegenden Arbeit konstruiert wurden ist in Klammern angegeben.

Plasmidname	exprimiertes Protein	Ausgangsvektor	Restriktions- endonukleasen
p0071-Arm-pGBKT7 (M. Hatzfeld)	GAL4-DNA-BD-p0071-Arm (As 510-988)	pGBKT7 (Clontech)	EcoR I/Sal I
p0071-Arm-Δrep4-9 (M. Hatzfeld)	GAL4-DNA-BD-p0071-Arm (ΔAs 639-988)	pGBKT7 (Clontech)	EcoR I/Sal I

Plasmidname	exprimiertes Protein	Ausgangsvektor	Restriktionsendonukleasen
p0071-Arm- $\Delta$ rep1 (M. Hatzfeld)	GAL4-DNA-BD-p0071-Arm ( $\Delta$ As 510-552)	pGBKT7 (Clontech)	Eco RI/ Xho I $\rightarrow$ Sal I
KIF3b-WT-pGADT7	GAL4-AD-KIF3b-WT	pGADT7 (Clontech)	Mun I $\rightarrow$ EcoR I/ Sal I $\rightarrow$ Xho I
KIF3b-NT-pGADT7	GAL4-AD-KIF3b-NT (As 1-345)	pGADT7 (Clontech)	Mun I $\rightarrow$ EcoR I/ Sal I
KIF3b-CT-pGADT7	GAL4-AD-KIF3b-CT (As 346-747)	pGADT7 (Clontech)	EcoR I/Sal I
Rab11-WT-pGBKT7	GAL4-DNA-BD-Rab11-WT	pGBKT7 (Clontech)	EcoR I/Sal I
Snapin-WT-pGADT7	GAL4-AD-Snapin-WT	pGADT7 (Clontech)	EcoR I/Sal I
Snapin-NT-pGADT7	GAL4-AD-Snapin-NT (As 1-78)	pGADT7 (Clontech)	EcoR I/Sal I
Snapin-CT-pGADT7	GAL4-AD-Snapin-CT (As 79-136)	pGADT7 (Clontech)	EcoR I/Sal I

**Tabelle 7-6: Übersicht der verwendeten Vektoren für die bakterielle Expression von Proteinen**

Die aufgelisteten Plasmide wurden zur Expression der angegebenen Fusionsproteine in den *E. coli*-Stamm BL21 DE3 transformiert. Die Herkunft von Plasmiden, die nicht im Rahmen der vorliegenden Arbeit konstruiert wurden ist in Klammern angegeben.

Plasmidname	exprimiertes Protein	Ausgangsvektor	Restriktionsendonukleasen
p0071-Arm-pGex-5x-1	GST-p0071-Arm (As 510-993)	pGex-5x-1 (Amersham)	EcoR I/Sal I
p0071-Arm-pRSETA (M. Hatzfeld)	His <sub>6</sub> -p0071-Arm (As 510-993)	pRSETA (Invitrogen)	EcoR I/ Sal I $\rightarrow$ Xho I
Rab11-WT-pGex-5x-1	GST-Rab11-WT	pGex-5x-1 (Amersham)	EcoR I/Sal I
Rab11-DA-pGex-5x-1	GST-Rab11-DA (Q70L)	pGex-5x-1 (Amersham)	EcoR I/Sal I
Rab11-DN-pGex-5x-1	GST-Rab11-DN (S25N)	pGex-5x-1 (Amersham)	EcoR I/Sal I
FIP4 (As 592-637)-pGex5x-1	GST-FIP4 (As 592-637)	pGex-5x-1 (Amersham)	EcoR I/Sal I

**Tabelle 7-7: Übersicht der verwendeten Vektoren für die Expression in humanen Zelllinien**

Die aufgelisteten Plasmide wurden je nach Versuchsvorgaben mittels Kalziumphosphat-Kopräzipitation bzw. Lipofektion in humane Zelllinien transfiziert. Die Herkunft von Plasmiden, die nicht im Rahmen der vorliegenden Arbeit konstruiert wurden ist in Klammern angegeben.

Plasmidname	exprimiertes Protein	Vektor	Restriktionsendonukleasen
pRaichu1026 (M. Matsuda)	Rac1-Biosensor	-----	-----
pRaichu1069 (M. Matsuda)	Cdc42-Biosensor	-----	-----
pRaichu1298 (M. Matsuda)	RhoA-Biosensor	-----	-----
pHA-C2	HA-Tag	pEGFP-C2 (Clontech)	Nhe I/EcoR I
pRFP-C2	RFP	pEGFP-C2 (Clontech)	Nhe I/Bgl II
p0071-WT-pHA-C2	HA-p0071-WT	pHA-C2	Mun I → EcoRI/ BamH I
p0071-WT-pcDNA3-Flag (S. Hüttelmaier)	Flag-p0071-WT	pcDNA3-Flag (S. Hüttelmaier)	-----
p0071-WT-pV1-Flag-C2	V1-Flag-p0071-WT	pV1-Flag-C2 (S. Hüttelmaier)	Mun I → EcoRI/ BamH I
p0071-WT-pEGFP-C2 (M. Hatzfeld)	EGFP-p0071-WT	pEGFP-C1 (Clontech)	BamH I/EcoR I
p0071-WT-pcDNA4 (M. Hatzfeld)	Myc-His <sub>6</sub> -p0071-WT	pcDNA4/TO/Myc-His (Invitrogen)	BamH I/Xho I
p0071-WT-pDsRed-N1 (M. Hatzfeld)	p0071-WT-DsRed	pDsRed-N1 (Clontech)	BamH I → Bgl II/ Xho I → Sal I
p0071-Δrep1-pDsRed-N1 (M. Hatzfeld)	p0071-Δrep1 (ΔAs 510-552) DsRed	pDsRed-N1 (Clontech)	----
MKLP1-NT-pDsRed-N1	MKLP1-(As 1-617) DsRed	pDsRed-N1	BamH I → Bgl II/ Sac I
MKLP1-p0071-WT-pDsRed-N1	MKLP1 (As 1-617)-p0071-WT-DsRed	MKLP1-NT-pDsRed-N1	Mun I → EcoRI/ BamH I
p0071-Arm-pV1-Flag-C2	V1-Flag-p0071-Arm (As 510-993)	pV1-Flag-C2 (S. Hüttelmaier)	EcoR I/Sal I
p0071-Arm-pEGFP-C2	EGFP-p0071-Arm (As 510-993)	pEGFP-C2 (Clontech)	EcoR I/Sal I
RhoA-WT-pV2-HA-C2	V2-HA-RhoA-WT	pV2-HA-C2 (S. Hüttelmaier)	EcoR I/Sal I

Plasmidname	exprimiertes Protein	Vektor	Restriktionsendonukleasen
RhoA-WT- pEGFP-C2	EGFP-RhoA-WT	pEGFP-C2 (Clontech)	EcoR I/Sal I
RhoA-DA- pV2-HA-C2	V2-HA-RhoA-DA (Q63L)	pV2-HA-C2 (S. Hüttelmaier)	EcoR I/Sal I
RhoA-DA-pEGFP-C2	EGFP-RhoA-DA (Q63L)	pEGFP-C2 (Clontech)	EcoR I/Sal I
RhoA-DN- pV2-HA-C2	V2-HA-RhoA-DN (T19N)	pV2-HA-C2 (S. Hüttelmaier)	EcoR I/Sal I
RhoA-DN-pEGFP-C2	EGFP-RhoA-DN (T19N)	pEGFP-C2 (Clontech)	EcoR I/Sal I
ECT2-WT- pV2-HA-C2	V2-HA-ECT2-WT	pVen2-HA-C2 (S. Hüttelmaier)	EcoR I/Xho I → Sal I
ECT2-WT-pEGFP-C2	EGFP-ECT2-WT	pEGFP-C2 (Clontech)	EcoR I/Xho I → Sal I
ECT2-WT- pcDNA3-Flag	Flag-ECT2-WT	pcDNA3-Flag (S. Hüttelmaier)	EcoR I/Xho I
ECT2-NT- pV2-HA-C2	V2-HA-ECT2-NT (As 1-333)	pV2-HA-C2 (S. Hüttelmaier)	EcoR I/Xho I → Sal I
ECT2-CT- pV2-HA-C2	V2-HA-ECT2-CT (As 415-883)	pV2-HA-C2 (S. Hüttelmaier)	EcoR I/Xho I → Sal I
ECT2-CT- pcDNA3-Flag	Flag-ECT2-CT (As 415-883)	pcDNA3-Flag (S. Hüttelmaier)	EcoR I/Xho I
KIF3b-WT- pcDNA3-Flag	Flag-KIF3b-WT	pcDNA3-Flag (S. Hüttelmaier)	Mun I → EcoR I/ Sal I → Xho I
KIF3b-NT-pRFP-C2	RFP-KIF3b-NT (As 1-345)	pRFP-C2	Mun I → EcoR I/ Sal I
KIF3b-CT-pRFP-C2	RFP-KIF3b-CT (As 346-747)	pRFP-C2	EcoR I/Sal I
Rab11-WT- pV2-HA-C2	V2-HA-Rab11-WT	pV2-HA-C2 (S. Hüttelmaier)	EcoR I/Sal I
Rab11-WT- pcDNA3-Flag	Flag-Rab11-WT	pcDNA3-Flag (S. Hüttelmaier)	EcoR I/ Sal I → Xho I
Rab11-WT-pRFP-C2	RFP-Rab11-WT	pRFP-C2	EcoR I/Sal I
Rab11-DA- pV2-HA-C2	V2-HA -Rab11-DA (Q70L)	pV2-HA-C2 (S. Hüttelmaier)	EcoR I/Sal I
Rab11-DA-pRFP-C2	RFP-Rab11-DA (Q70L)	pRFP-C2	EcoR I/Sal I
Rab11-DN- pV2-HA-C2	V2-HA -Rab11-DN (S25N)	pV2-HA-C2 (S. Hüttelmaier)	EcoR I/Sal I
Rab11-DN-pRFP-C2	RFP-Rab11-DN (S25N)	pRFP-C2	EcoR I/Sal I

Plasmidname	exprimiertes Protein	Vektor	Restriktionsendonukleasen
Snapin-WT- pcDNA3-Flag	Flag-Snapin-WT	pcDNA3-Flag (S. Hüttelmaier)	EcoR I/ Sal I → Xho I

## 7.6 Verwendete Bakterien- und Hefestämme

**Tabelle 7-8: Verwendete *E. coli*-Stämme**

Der *E. coli*-Stamm JM109 wurde für Klonierungsarbeiten und der Stamm BL21 DE3 für die Expression von Proteinen verwendet.

Stamm	Genotyp
BL21 DE3	<i>F' ompT, hsdSB (r<sub>B</sub><sup>-</sup>, m<sub>B</sub><sup>-</sup>), gal(λcIts857 ind1, Sam7, nin5, lacUV5-T7gene1), dcm (DE3)</i>
JM109	<i>e14<sup>-</sup>(McrA<sup>-</sup>) recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 (r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup>) supE44 relA1 Δ(lac-proAB) [F' traD36 proAB lacI<sup>q</sup>ZΔM15]</i>

**Tabelle 7-9: Genotyp des verwendeten Hefestammes YRG2**

Stamm	Genotyp
YRG2	<i>MATα, ura3-52, his3-200, ade2-101, lys2-801, trp1-901, leu2-3, 112, gal4-542, gal80-538, LYS2::UAS<sub>GALI</sub>-TATA<sub>-GALI</sub>-HIS3, URA::UAS<sub>Gal4 17mers(x3)</sub>-TATA<sub>cyc1</sub>-lacZ</i>

## 7.7 Verwendete Zelllinien

**Tabelle 7-10: Verwendete Zelllinien**

Zelllinie	Beschreibung	Referenz
HEK293	humane embryonale Nierenzellen	(GRAHAM <i>et al.</i> , 1977)
HeLa SS6	humane epitheliale Zervix-Kazinom-Zelllinie	(GEY, 1952)
MCF-7	humane Mamma-Adenokarzinom-Zelllinie	(SOULE <i>et al.</i> , 1973)

## 7.8 Verwendete Kits

**Tabelle 7-11: Verwendete Kits**

Bezeichnung	Hersteller
Jetquick Gel Extraction Kit	Genomed
Jetquick PCR Purification Kit	Genomed
Jetquick Plasmid Miniprep Kit	Genomed
Jetquick Plasmid Midiprep Kit	Genomed

Bezeichnung	Hersteller
Jetquick Plasmid Maxiprep Kit	Genomed
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen
MicroBC-Assay	Interchim
TNT® Coupled Reticulocyte Lysate	Promega
RhoGEF Exchange Assay Biochem Kit	Cytoskeleton

## 7.9 Verwendete Antikörper

**Tabelle 7-12: Eingesetzte Primär-Antikörper**

Die aufgelisteten Ak wurden wie angegeben für die Immunzytologie (IC), Western Blots (WB) und Immunpräzipitationen (IP) eingesetzt.

Name	Typ / Spezies	Verdünnungen	Herkunft
Anti-alpha-Tubulin	mAk / Maus	1:1500 IC; 1:3000 WB	Sigma
Anti-p0071-tail#10	pAk / Meerscheintchen	1:10.000 IC; 1:10.000 WB	M. Hatzfeld
Anti-phospho-MRLC	pAk / Kaninchen	1:50 IC; 1:250 WB	Cell Signaling
Anti-RhoA	mAk / Maus	1:50 IC; 1:250 WB	Santa Cruz (Santa Cruz; USA)
Anti-Flag-M2	mAk / Maus	1:1000 IC; 1:2000 WB	Sigma
Anti-HA	pAk / Kaninchen	1:500 IC; 1:1000 WB	Rockland (Gilbertsville; USA)
Anti-GFP	pAk / Kaninchen	1:2500 WB; 1:250 IP	Invitrogen
Anti-Ect2	pAk / Kaninchen	1:500 IC; 1:1000 WB	Santa Cruz
Anti-Myc	mAk / Maus	1:2000 WB; 1:200 IP	Sigma
Anti-KIF3b	pAk / Kaninchen	1:100 IC; 1:500 WB	Santa Cruz
Anti-Rab11	pAk / Kaninchen	1:250 IC	Invitrogen
Anti-Rab11	mAk / Maus	1:500 WB	BD Bioscience
Anti-His	mAk / Maus	1:2000 WB	Qiagen (Hilden)
Anti-Snapin	pAk / Kaninchen	1:100 IC	Synaptic Systems (Göttingen)
Anti-MKLP1	mAk / Maus	1:1000 WB	BD Bioscience
Maus-Kontroll-IgG	mAk / Maus	1:50 IP	Abcam

**Tabelle 7-13: Eingesetzte Sekundär-Antikörper**

Die Sekundär-Ak für die Immunzytologie (IC) waren wie angegeben mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen und die Sekundär-Ak für Western Blot-Analysen (WB) mit der Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugiert.

Name	Typ / Spezies	Verdünnungen	Herkunft
Anti-Maus Alexa Fluor 350	pAk / Esel	1:200 IC	Invitrogen

Name	Typ / Spezies	Verdünnungen	Herkunft
Anti-Maus Alexa Fluor 488	pAk / Ziege	1:400 IC	Invitrogen
Anti-Maus Cy3	pAk / Esel	1:500 IC	Dianova (Hamburg)
Anti-Meerschweinchen Alexa Fluor 488	pAk / Ziege	1:400 IC	Invitrogen
Anti-Meerschweinchen Alexa Fluor 594	pAk / Ziege	1:400 IC	Invitrogen
Anti-Kaninchen Alexa Fluor 488	pAk / Ziege	1:400 IC	Invitrogen
Anti-Kaninchen Alexa Fluor 594	pAk / Ziege	1:400 IC	Invitrogen
Anti-Meerschweinchen HRP	pAk / Esel	1:15000 WB	Dianova
Anti-Maus HRP	pAk / Esel	1:20000 WB	Dianova
Anti-Kaninchen HRP	pAk / Esel	1:40000 WB	Dianova

## 7.10 Abkürzungsverzeichnis

A	Alanin
Abb.	Abbildung
Abs.	Abschnitt
AD	Aktivierungsdomäne
AJs	<i>adherens junctions</i>
Ak	Antikörper
APC	<i>adenomatous polyposis coli</i>
APC/C	<i>Anaphase promoting complex/cyclosome</i>
Arf	ADP-Ribosylierungs-Faktor
Arm	Armadillo
ARVCF	<i>armadillo-repeat protein deleted in velo cardio-facial syndrom</i>
As	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	<i>bicinchoninic acid</i>
BD	Bindedomäne
BFP	<i>blue-fluorescent-protein</i>
BIFC	<i>Bimolecular fluorescence complementation</i>
BRCT	<i>breast cancer 1 C-terminal</i>
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	cirka
CBD	Catenin-Bindedomäne
Cdc42	<i>cell division cycle 42</i>
Cdk	<i>Cyclin dependent kinases</i>
cDNA	komplementäre DNA



CFP	<i>cyan-fluorescent-protein</i>
CK1	Casein-Kinase 1
CL	Chemilumineszenz
CMB	<i>cadherin major branch</i>
CPC	<i>chromosomal-passenger-complex</i>
CT	C-terminal
DA	dominant aktiv
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
Dbl	Diffuses B-Zell Lymphom
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DG	Deckgläschen
DH	Dbl-homolog
DIC	Differentieller Interferenz Kontrast
DMEM	<i>Dulbecco`s modified Eage`l`s medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DN	dominant negativ
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECT2	<i>Epithelial Cell Transforming Gene2</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	<i>enhanced green-fluorescent-protein</i>
EGTA	Ethylenglykoltetraacetat
et al.	<i>et altera</i>
FA	Formaldehyd
F-Aktin	filamentöses Aktin
FBS	<i>fetal bovine serum</i>
FH	Formin-homolog
FIP	<i>Rab11-family-interacting proteins</i>
FRET	<i>Fluorescence resonance energy transfer</i>
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
GDI	GDP-Dissoziationsinhibitor
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guanosinnukleotid-Austauschfaktor
GET	Glukose-EDTA-Tris
GFP	<i>green-fluorescent-protein</i>
GLUT	Glukose-Transporter
GM1	Monosialotetrahexosylgangliosid1
GSK3-β	Glykogen-Synthase-Kinase3-β

GST	Glutathion S-Transferase
GTC	Guanidiniumthiocyanat
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	Guanosintriphosphatase
H	Histidin
HA	Hämagglutinin Epitop
HEK293	<i>Human Embryonic Kidney 293</i>
HeLa	Henrietta Lacks
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
His	Histidin
HRP	Meerrettich-Peroxidase
Ig	Immunglobulin
INCENP	<i>Inner centromere protein antigens 135/155kDa</i>
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
KAP	<i>Kinesin associated protein</i>
KIF	<i>Kinesin superfamily protein</i>
L	Leucin
LB	Luria Bertani
LEF	<i>lymphoid enhancer factor</i>
mAk	monoklonaler Antikörper
<i>mant</i>	<i>N-methylantraniloyl</i>
MCF-7	<i>Michigan Cancer Foundation</i>
MELC	<i>myosin-II essential light chain</i>
MgcRacGAP	<i>male-germ-cell Rac GTPase-activating protein</i>
MHC	<i>myosin-II heavy chain</i>
MKLP1	<i>mitotic kinesin-like protein 1</i>
MLB	Magnesium-Lysepuffer
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
MRLC	<i>myosin-II regulatory light chain</i>
MT	Mikrotubuli
N	Asparagin
NaOH	Natriumhydroxid
NK $\kappa$ B	<i>nuclear factor kappa B</i>
NT	N-terminal
Nuf	<i>nuclear fallout</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
pAk	polyklonaler Antikörper
PAK1	<i>p21-Activated Kinase 1</i>
PAPIN	<i>plakophilin related armadillo repeat protein-</i>

	<i>interacting PDZ protein</i>
PBD	Polo-Box-Domäne
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PBSE	<i>phosphate buffered saline- EDTA</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
<i>PD</i>	<i>pulldown</i>
PDZ	PSD-95/Dlg-A/Zo-1
PH	Pleckstrin-homolog
Pipes	Piperazin-N,N'-bis-2-ethansulfonsäure
PKN	Protein Kinase N
Plk1	<i>Polo-like-kinase1</i>
PRC1	<i>protein regulator of cytokinesis1</i>
PT	Phosphatase
Q	Glutamin
Rab	<i>Ras-related in brain</i>
Rac1	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate1</i>
Ras	<i>Rat Sarcoma</i>
RBD	RhoA-Bindedomäne
RFP	<i>red-fluorescent-protein</i>
Rho	<i>ras homolog gene family</i>
RIPA	<i>radio-immuno-precipitation-assay</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROK	Rho Kinase
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
S	Serin
SD	<i>minimal synthetic defined</i>
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
shRNA	<i>small hairpin RNA</i>
S-Medium	Nocodazol-haltiges Synchronisationsmedium
SNARE	<i>soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor</i>
STABW	Standardabweichung
Syne1	synaptic nuclear envelope protein1
T	Threonin
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TBST	<i>tris buffered saline-Tween20</i>

TCA	Trichloressigsäure
TCF	<i>T-cell factor</i>
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
t-SNARE	<i>target-SNARE</i>
Tris	Tri(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween20	Polyoxyethylensorbitan-Monolaurylsäure
u. a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
V1 bzw. V2	Venus1 bzw. Venus2
VAMP	<i>Vesicle-associated membrane protein</i>
v-SNARE	<i>vesicle-SNARE</i>
W	Tryptophan
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
YFP	<i>yellow-fluorescent-protein</i>
YPD	Hefeextrakt-Pepton-Dextrose
YT	Hefeextrakt-Trypton
$\beta$ -TrCP	<i><math>\beta</math>-Transducin repeat containing protein</i>

## 7.11 Abbildungsverzeichnis

	Seite
Abb. 1-1: Schematischer Aufbau der klassischen Catenine und der p120-Catenine.....	2
Abb. 1-2: Schematische Darstellung der Arm-Domänen von Plakophilin1 und $\delta$ -Catenin.....	6
Abb. 1-3: Die Regulation der GTPasen der Ras-Superfamilie.....	8
Abb. 1-4: Die RhoA-abhängige Regulation der Aktomyosin-Ring-Assemblierung.....	17
Abb. 2-1: Schematischer Aufbau eines WB nach dem Semi-Dry-Blot-Verfahren.....	39
Abb. 3-1: p0071 liegt Zentrosom-, Spindelpol- und Zentralkörper-assoziert während der Mitose vor.....	44
Abb. 3-2: Die Verringerung der p0071-Expression geht mit verspäteter Einschnürung und Defekten bei der Abschürung einher.....	45
Abb. 3-3: Die Verringerung der p0071-Expression induziert Defekte bei der Einschnürung mitotischer HeLa-Zellen.....	46
Abb. 3-4: p0071 wird für den Aufbau des Aktomyosin-Ringes während der Zytokinese benötigt.....	47
Abb. 3-5: Schematische Darstellung der Raichu-Biosensoren.....	48
Abb. 3-6: FRET-Effizienz der Biosensoren für die Aktivität der Rho-GTPasen in Abhängigkeit von p0071.....	49
Abb. 3-7: Die Aktivität von RhoA wird von p0071 beeinflusst.....	50
Abb. 3-8: p0071 und RhoA interagieren am Ort der Einschnürung während der Zytokinese.....	51
Abb. 3-9: p0071-Arm interagiert bevorzugt mit aktivem RhoA.....	52

	Seite
Abb. 3-10: ECT2 interagiert mit p0071 während der Zytokinese am Ort der Einschnürung über seine regulatorische N-terminale Domäne.....	54
Abb. 3-11: Der Einfluss von p0071 auf die GEF-Aktivität von ECT2 gegenüber RhoA.....	56
Abb. 3-12: Rab11 und p0071 zeigen eine überlappende Lokalisation am Zentralkörper.....	57
Abb. 3-13: Rab11 interagiert mit p0071 über dessen Arm-Domäne.....	58
Abb. 3-14: Die Arm-Domäne von p0071 interagiert bevorzugt mit aktivem Rab11.....	60
Abb. 3-15: Rab11 und p0071 interagieren während der Zytokinese.....	61
Abb. 3-16: Die Verringerung der p0071-Expression geht mit der Akkumulation von Rab11 an der Teilungsfurche einher.....	62
Abb. 3-17: Rab11, p0071 und Snapin bilden einen Komplex.....	63
Abb. 3-18: Snapin und p0071 kolokalisieren während der Zytokinese am Zentralkörper.....	64
Abb. 3-19: Die Verringerung der Snapin-Expression mittels siRNA induziert die Akkumulation von Rab11 am Zentralkörper.....	65
Abb. 3-20: Die an Glutathion-Sepharose immobilisierte Rab11-Bindedomäne vom Rab11-Effektor FIP4 präzipitiert aktives Rab11 aus Zelllysaten.....	66
Abb. 3-21: Die Menge an aktivem Rab11 in der Zelle nimmt im Verlauf der Mitose ab.....	67
Abb. 3-22: Die Verringerung der ECT2-Expression mittels siRNA führt in Interphase-Zellen zu geringeren Mengen an aktivem Rab11.....	68
Abb. 3-23: ECT2-siRNA-behandelte Zellen zeigen eine geringere Rab11-Aktivität in der Prometaphase als Kontroll-siRNA-behandelte.....	69
Abb. 3-24: Rab11 und ECT2 kopräzipitieren während der Prometaphase.....	70
Abb. 3-25: p0071 folgt ECT2 an den Zentralkörper.....	72
Abb. 3-26: Die verringerte Expression von ECT2 bzw. MKLP1 beeinflusst die p0071-Zentralkörper-Assoziation.....	73
Abb. 3-27: Die p0071-Arm-Domäne interagiert direkt mit KIF3b über dessen C-terminale Domäne im Hefe-Diybrid-System.....	75
Abb. 3-28: p0071 und KIF3b interagieren <i>in vitro</i> direkt miteinander.....	76
Abb. 3-29: p0071 und KIF3b interagieren <i>in vivo</i> .....	77
Abb. 3-30: KIF3b und p0071 kolokalisieren während der Interphase jedoch nicht während der Zytokinese.....	78
Abb. 3-31: Die Überexpression nicht-funktioneller KIF3b-Fragmente interferiert mit der Zentralkörper-Assoziation von p0071.....	79
Abb. 3-32: Die Verringerung der KIF3b-Expression verminderte die Zentralkörper-Assoziation von p0071.....	80
Abb. 3-33: Die Verringerung der KIF3b-Expression hat keinen Einfluss auf die ECT2- und RhoA-Translokation zum Zentralkörper.....	81
Abb. 3-34: Die Verringerung der KIF3b-Expression reduziert die p0071-Mikrotubuli-Assoziation während der Zytokinese.....	82
Abb. 3-35: Die Zentralkörper-Assoziation einer p0071-Mutante, die nicht mit KIF3b interagiert, ist gestört.....	83
Abb. 3-36: Die Verringerung der Expression von p0071 und KIF3b fördert die Bildung mehrkerniger Zellen.....	85

	Seite
Abb. 3-37: Die Verringerung der KIF3b-Expression stört den Aufbau des Aktomyosin-Ringes.....	86
Abb. 3-38: KIF3b ist in den RhoA-Signalweg während der Zytokinese involviert.....	87
Abb. 3-39: Schematische Darstellung des Fusionsproteins MKLP1-p0071-DsRed.....	88
Abb. 3-40: MKLP1-p0071-DsRed wird KIF3b-unabhängig zur Teilungsfurche transportiert.....	89
Abb. 3-41: MKLP1-p0071-DsRed vermindert die durch KIF3b-siRNA-Behandlung induzierten Effekte auf die MRLC-Phosphorylierung während der Zytokinese.....	90
Abb. 3-42: Die durch KIF3b-siRNA-Behandlung induzierte Bildung mehrkerniger Zellen wird nicht durch MKLP1-p0071-DsRed vermindert.....	91
Abb. 4-1: Modell zur Rolle von p0071 bei der Aktomyosin-basierten Einschnürung.....	100
Abb. 4-2: Modell zur Funktion von p0071 bei der Fusion von Rab11-Vesikeln.....	104
Abb. 4-3: Modell zur Rolle von p0071 bei der Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts und der Fusion von Rab11-Vesikeln während der Zytokinese humaner Zellen.....	112
Abb. 7-1: ECT2 und MKLP1 depletierte HeLa-Zellen zeigen schwere Zytokinese-Defekte.....	I
Abb. 7-2: Die Überexpression von p0071 induziert die Aktivierung von RhoA.....	II

## 7.12 Tabellenverzeichnis

	Seite
Tab. 7-1: DNA-Oligonukleotide zur Klonierung.....	IV
Tab. 7-2: DNA-Oligonukleotide zur Mutagenese.....	V
Tab. 7-3: Übersicht der eingesetzten siRNAs.....	VI
Tab. 7-4: Übersicht der verwendeten shRNA-Vektoren.....	VI
Tab. 7-5: Übersicht der verwendeten Vektoren für die Hefe-Dihybrid-Analysen.....	VI
Tab. 7-6: Übersicht der verwendeten Vektoren für die bakterielle Expression von Proteinen.....	VII
Tab. 7-7: Übersicht der verwendeten Vektoren für die Expression in humanen Zelllinien.....	VIII
Tab. 7-8: Verwendete <i>E. coli</i> -Stämme.....	X
Tab. 7-9: Genotyp des verwendeten Hefestammes YRG2.....	X
Tab. 7-10: Verwendete Zelllinien.....	X
Tab. 7-11: Verwendete Kits.....	X
Tab. 7-12: Eingesetzte Primär-Antikörper.....	XI
Tab. 7-13: Eingesetzte Sekundär-Antikörper.....	XI

## **Danksagung**

Abschließend möchte ich mich recht herzlich bei all denen bedanken, die zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben. Ich danke...

Frau Prof. Dr. Mechthild Hatzfeld für die Überlassung dieser interessanten Fragestellung, für die exzellente Betreuung, für die vielen Möglichkeiten zur Diskussion meiner Ergebnisse sowie für die Hilfe und guten Ratschläge bei der Anfertigung der zu publizierenden Manuskripte.

Herrn Prof. Dr. Gunter Reuter und Herrn Prof. Dr. Walter Birchmeier für die Übernahme der Begutachtung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Hüttelmeier für die Bereitstellung der BiFC-Vektoren.

Herrn Dr. Matsuda für die Bereitstellung der Raichu-Biosensoren.

Frau Katrin Schwarze, Herrn Jens Thomas Frau Martina Fuhrmann für die Unterstützung im Labor.

der gesamten AG Hatzfeld für die angenehme Arbeitsatmosphäre, für die hilfreichen Diskussion zur Vorbereitung von Posterpräsentationen und Vorträgen sowie während der Seminare.

der DFG und dem SFB 610 "Protein-Zustände mit zellbiologischer und medizinischer Relevanz") für die Finanzierung dieser Arbeit und für die Möglichkeit, meine Ergebnisse präsentieren zu können.

meinen Eltern, die mich immer unterstützt haben und mir immer wieder mit Rat und Tat zur Seite standen.

Ganz besonderes möchte ich mich bei meiner Freundin Fr. Dr. Anja Seifert für ihre Liebe und bedingungslose Unterstützung bedanken.

Außerdem danke ich unserem Sohn Ryan Collin Seifert für sein Lächeln, dass alle Sorgen vergessen lässt.

## Lebenslauf

### Zur Person:

René Keil  
geboren am 19.12.1978 in Altenburg  
deutsche Staatsangehörigkeit  
ledig, ein Kind: Ryan Collin Seifert

### Schulausbildung:

Sept. 1985 – Jul. 1990      Grundschule Peter-Göring-POS Schule in Lucka  
Sept. 1990 – Mai 1997      Gymnasium Veit-Ludwig-von-Seckendorff in Meuselwitz  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

### Zivildienst:

Okt. 1997 – Okt.1998      Johanniter-Unfallhilfe e.V. in Lucka

### Studium:

Okt. 1999 – Jan. 2005      Studium der Biologie an der Martin-Luther-Universität Halle-  
Wittenberg in Halle/Saale, Vertiefungsrichtung Genetik,  
Abschluss: Diplom-Biologie  
Apr. 2004 – Jan. 2005      Diplomarbeit am Institut für Medizinische Immunologie  
Thema: „Untersuchungen zur Rolle von CD10 beim  
Schilddrüsenkarzinom“  
12.05. – 14.05.2004      Teilnahme am Intensivkurs „Grundlagen der Säuger Zell- und  
Gewebekultur und aktuelle Aspekte der Stammzellforschung“

### Gegenwärtige Tätigkeit:

Seit April. 2005              Anfertigung der Promotionsarbeit zum Thema „Untersuchungen zur  
Rolle des Armadillo-Proteins p0071 bei der Zytokinese humaner  
Zellen“ am Institut für Pathophysiologie der Medizinischen  
Fakultät, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg



## **Publikationen:**

**Keil, R.**, Kießling, C., and Hatzfeld, M. (2009). Targeting of p0071 to the midbody depends on KIF3. *J Cell Sci* 122, 1174-1183.

**Keil, R.**, Wolf, A., Huttelmaier, S., and Hatzfeld, M. (2007). Beyond Regulation of Cell Adhesion: Local Control of RhoA at the Cleavage Furrow by the p0071 Catenin. *Cell Cycle* 6, 122-127. Epub 2007 Jan 19. Review.

Wolf, A.\*, **Keil, R.\***, Götzl, O., Mun, A., Schwarze, K., Lederer, M., Huttelmaier, S., and Hatzfeld, M. (2006). The armadillo protein p0071 regulates Rho signalling during cytokinesis. *Nat Cell Biol* 8, 1432-1440. Epub 2006 Nov 1419. \* Contributed equally

## **Vorträge**

**René Keil**, “Untersuchungen der Rolle von CD10 beim Schilddrüsenkarzinom”, 20. Arbeitstagung für experimentelle Schilddrüsenforschung, 11.12.2004, Berlin

**René Keil**, “Role of p0071 in Rho-signalling”, Workshop des SFB 610 "Protein-Zustände mit zellbiologischer und medizinischer Relevanz", 26.11.2005, Wittenberg

**René Keil**, A. Wolf, M. Hatzfeld, “Role of p0071 in Rho-signalling”, Tagung der German Society for Cell Biology, 31.03.06, Braunschweig

**René Keil**, “Role of p0071 in Rho-signalling during cytokinesis”, Workshop des SFB 610 "Protein-Zustände mit zellbiologischer und medizinischer Relevanz", 13.05.2006, Oppurg

**René Keil**, “Does p0071 regulate vesicle targetin during cytokinesis?”, Workshop des SFB 610 "Protein-Zustände mit zellbiologischer und medizinischer Relevanz", 02.12.2006, Oppurg

**René Keil**, “Is p0071 part of a transport-complex leading vesicles to the cleavage furrow”, Workshop des SFB 610 "Protein-Zustände mit zellbiologischer und medizinischer Relevanz", 15.05.2007, Oppurg

**René Keil**, M. Hatzfeld, “Functions of p0071 in cytokinesis”, Symposium des SFB 610 "Protein-Zustände mit zellbiologischer und medizinischer Relevanz", 30.06.2007, Biotechnologisch-Biomedizinisches Zentrum Leipzig

**René Keil**, M. Hatzfeld, “Funktion von p0071 bei der Organisation des Zytoskeletts und dem Aufbau bzw. der Aufrechterhaltung von Zellpolarität”, Workshop des SFB 610 "Protein-Zustände mit zellbiologischer und medizinischer Relevanz", 01.12.2007, Oppurg

**René Keil**, M. Hatzfeld, “p0071 is involved in rab11-dependent vesicle fusion during cytokinesis”, 10. DGZ-Nachwuchswissenschaftler-Tagung: „Biology of Cell Division“, 24. September 2008, Heidelberg

**René Keil**, C. Kießling, M. Hatzfeld, “Targeting of p0071 to the midbody depends on KIF3”, Workshop des SFB 610 "Protein-Zustände mit zellbiologischer und medizinischer Relevanz", 20.03.2009, Oppurg

### **Abstracts bzw. Poster**

**René Keil**, M. Hatzfeld, “Functions of p0071 in cytokinesis”, Symposium des SFB 610 "Protein-Zustände mit zellbiologischer und medizinischer Relevanz", 13.05.2006, Biotechnologisch-Biomedizinisches Zentrum Leipzig

**René Keil**, C. Kießling, M. Hatzfeld, “KIF3b targets p0071 to the midbody”, SFB523 Symposium Intracellular Transport & Trafficking, 4. April 2008, Göttingen

**René Keil**, M. Hatzfeld, “p0071 is involved in rab11-dependent vesicle fusion during cytokinesis”, 10. DGZ-Nachwuchswissenschaftler-Tagung: „Biology of Cell Division“, 24. - 25. September 2008, Heidelberg

**René Keil**, M. Hatzfeld, “ p0071 is involved in rab11-dependent vesicle fusion during cytokinesis ”, Gordon Conference Cell Contact & Adhesion, Cell-Cell Junction Functions, Polarity And Morphogenesis, 28. Juni - 3. Juli 2009, Waterville Valley, NH

**Erklärung**

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe. Diese Dissertation wurde an keiner anderen Einrichtung vorgelegt.

Halle, den 01.12.2009

---

René Keil