Aus dem Zentrum für Biochemie der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln
Direktor: Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Henning Walczak

Veränderungen des Plasmamembran-Proteoms in AP-2-depletierten HeLa-Zellen

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
David Christian Tobys
aus Troisdorf

promoviert am 15. März 2023

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln

2022

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink

1. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. rer. nat. S. Höning
2. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. rer. nat. H. Kashkar
3. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. med. M. Rinschen

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten: Prof. Dr. rer. nat. Stefan Höning, Dr. rer. nat. Lisa Maria Kowalski und Eva Cziudaj aus dem Zentrum für Biochemie der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln, Dr. rer. nat. Stefan Müller und Astrid Wilbrand-Hennes aus der CECAD/CMMC Proteomics Facility der Universität zu Köln, Peter Zentis aus der CECAD Imaging Facility der Universität zu Köln, Dr. rer. nat. Paola Zigrino und Elke Pach aus der Klinik für Dermatologie und Venerologie der Uniklinik Köln sowie Tobias Bläske aus der Abteilung für Pflanzenphysiologie und Biochemie der Universität Konstanz (zuvor Mitarbeiter der AG Höning).

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die im Zentrum dieser Arbeit stehenden massenspektrometrischen Experimente habe ich, nach entsprechender Anleitung durch Frau Wilbrand-Hennes und mit initialer Unterstützung durch Frau Cziudaj, selbst durchgeführt. Die sich hieran anschließende, umfangreiche Datenauswertung erfolgte gemeinsam mit Herrn Prof. Dr. Höning, Herrn Dr. Müller und

Frau Dr. Kowalski unter Nutzung der Softwareplattform Perseus[1] sowie des Tabellenkalkulationsprogramms Excel (Microsoft). Zusätzlich durchgeführte Endozytose-Assays sowie durchflusszytometrische Analysen habe ich nach Anleitung durch Herrn Bläske selbstständig vorgenommen und unter Nutzung der Software FACSDiva (BD) ausgewertet. Die Subkultivierung und Transfektion herangezogener Zellen sowie die Anfertigung immunfluoreszenzmikroskopischer Präparate und Western Blots habe ich nach entsprechender Instruktion durch Frau Cziudaj und Herrn Bläske ebenfalls selbständig durchgeführt. Einzelne Immunfluoreszenzen sowie Experimente mit Reporterproteinen wurden von Frau Dr. Kowalski durchgeführt und mithilfe der Open-Source-Software ImageJ ausgewertet. Eine zusätzliche bioinformatische Auswertung mikroskopischer Aufnahmen führte Herr Dr. Zentis am CECAD durch. Migrations-Assays wurden von Frau Dr. Zigrino und Frau Pach analysiert und die Daten der Real-Time PCR stammen von Herrn Bläske.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 28.08.2022

Unterschrift: .....

Danksagung

Für die Überlassung des Themas, die fachlich herausragende und freundschaftliche Betreuung sowie die anhaltende Unterstützung, Beratung und Förderung während meiner gesamten Doktorandenzeit bedanke ich mich sehr herzlich bei Herrn Prof. Dr. Höning. Mit seiner Hilfe konnte ich mein Wissen im Bereich der Biochemie und weit darüber hinaus grundlegend vertiefen, wichtige Erfahrungen sammeln und eine Vielzahl neuer Methoden erlernen.

Des Weiteren danke ich Herrn Bläske und Frau Cziudaj für ihre Unterstützung in sämtlichen Fragen des Laboralltags, den lebhaften Austausch von Methoden und Ideen sowie die angenehme und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre.

Herrn Dr. Müller und Frau Wilbrand-Hennes danke ich für ihre Unterstützung bei der Planung und Auswertung von SILAC-Experimenten, Frau Dr. Zigrino und Frau Pach für die Durchführung von Migrations-Assays, Herrn Dr. Zentis für die bioinformatische Auswertung mikroskopischer Aufnahmen und Frau Dr. Kowalski für ihre Unterstützung unmittelbar vor Einreichung der Publikation sowie für die Durchführung von Experimenten mit Reporterproteinen.

Für die finanzielle Unterstützung zu Studienzeiten danke ich dem Köln Fortune Programm der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln sowie der Studienstiftung des deutschen Volkes.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Freunden, meiner Familie und ganz besonders meinen Eltern für ihre bedingungslose, fortwährende und uneingeschränkte Unterstützung während der gesamten Zeit meines Studiums von ganzem Herzen danken.

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 7

1. ZUSAMMENFASSUNG 11

2. EINLEITUNG 12

2.1. Membrantransport 12

2.2. Clathrin 13
2.2.1. Clathrin-Triskele 14
2.2.2. Polyedrische Clathrin-Gitter 16

2.3. Clathrin-Adaptoren 18
2.3.1. Heterotetramere Adaptorkomplexe 18
2.3.2. Struktureller Aufbau von AP-2 21
2.3.3. Funktionelle Regulation von AP-2 23
2.3.4. Monomere Clathrin-Adaptoren 25

2.4. Vesikelabschnürung und Disassemblierung 28
2.4.1. Dynamin 28
2.4.2. Hsc70 und Auxilin 30

2.5. Fragestellungen und Ziel der Arbeit 32

3. PUBLIKATION 33
Inhibition of clathrin-mediated endocytosis by knockdown of AP-2 leads to alterations in the plasma membrane proteome; DOI: 10.1111/tra.12770

4. DISKUSSION 54

4.1. Hemmung der CME 54

4.2. Bestimmung des Plasmamembran-Proteoms 55

4.3. Analyse der am stärksten akkumulierten Proteine 56

4.4. Analyse endo-/lysosomaler Proteine 59

4.5. Funktionalität der CIE 60

4.6. Medizinische Aspekte inhibierter CME 62

5. LITERATURVERZEICHNIS 65

6. ANHANG 80

6.1. Ergänzende Abbildungen (nicht publiziert) 80

6.2. Abbildungsverzeichnis 84

6.3. Research Track Project Award 85

6.4. Top Downloaded Article 86

Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström
AAK	*adaptor-associated protein kinase*
Abb.	Abbildung
ADAM	*a disintegrin and metalloproteinase*
ADP	Adenosindiphosphat
AEDP	*3-[(2-aminoethyl)dithio]propionic acid*
AG	Arbeitsgruppe
AP	*assembly polypeptide* / *adaptor protein*
APLP	*amyloid beta precursor like protein*
APP	*amyloid precursor protein*
ARF	*ADP ribosylation factor*
ARH	*autosomal recessive hypercholesterolemia protein*
ATP	Adenosintriphosphat
BACE	*beta-site of APP cleaving enzyme*
BAR	*Bin, Amphiphysin, Rvs*
BSE	Bündelsignalelement
bzw.	beziehungsweise
CA	Carboanhydrase
ca.	circa
CALM	*clathrin assembly lymphoid myeloid leukemia protein*
CB	Clathrin-Box
CBM	Clathrin-Box-Motiv
CCP	*clathrin-coated pit*
CCV	*clathrin-coated vesicle*
CD	*cluster of differentiation*
CECAD	*Cologne Cluster of Excellence on Cellular stress response in Aging-associated Diseases*
CHC	*clathrin heavy chain*
CHCR	*clathrin heavy chain repea*t
CIE	*clathrin-independent endocytosis*
CLASP	*clathrin-associated sorting protein*
CLC	*clathrin light chain*
CLIC	*clathrin-independent carrier*
CME	*clathrin-mediated endocytosis*
CMMC	*Center for Molecular Medicine Cologne*
C-terminal	Carboxy-terminal

C-Terminus	Carboxy-Terminus
C-µ2	C-terminale Hälfte von µ2-Adaptin
D	Asparaginsäure
DAB	*disabled homolog*
DOI	*digital object identifier*
Dr. med.	*doctor medicinae*
Dr. rer. nat.	*doctor rerum naturalium*
dt.	deutsch
E	Glutaminsäure
ECE	*endothelin converting enzyme*
EGF	*epidermal growth factor*
EGFR	*epidermal growth factor receptor*
engl.	englisch
ENTH	*epsin N-terminal homology*
F	Phenylalanin
FACS	*fluorescence-activated cell sorting*
FDR	*false discovery rate*
FEME	*fast endophilin-mediated endocytosis*
FERMT	*fermitin family homolog*
Fig.	*Figure*
G	Glycin
GAK	*cyclin G-associated kinase*
G-Domäne	GTPase-Domäne
GED	GTPase-Effektor-Domäne
GEEC	*GPI-anchored protein enriched endocytic compartment*
GO	*Gene Ontology*
GPCR	*G protein-coupled receptor*
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GPT	Guanosintriphosphat
gr.	griechisch
GRAF	*GTPase regulator associated with focal adhesion kinase*
HeLa	Henrietta Lacks (Spenderin von Zervixkarzinom-Epithelzellen)
HRB	*HIV-1 Rev-binding protein*
Hsc	*heat shock cognate protein*
I	Isoleucin
iBAQ	*intensity-based absolute quantitation*
IGF	*insulin-like growth factor*

K	Lysin
KD	*knockdown*
kDa	Kilodalton
KO	*knockout*
L	Leucin
LAMP	*lysosome-associated membrane glycoprotein*
lat.	lateinisch
LCA	*light chain A*
LCB	*light chain B*
LDL	*low-density lipoprotein*
LIMP	*lysosomal integral membrane protein*
LRO	*lysosome-related organelle*
LRP	*low-density lipoprotein receptor-related protein*
M	Methionin
MCT	Monocarboxylat-Transporter
min	Minute
MMP	Matrix-Metalloprotease
mRNA	*messenger RNA*
MS	*mass spectrometry*
N	Asparagin
NBD	Nukleotid-bindende Domäne
NECAP	*adaptin ear-binding coat-associated protein*
NHS	N-Hydroxysuccinimid
nm	Nanometer
N-µ2	N-terminale Hälfte von µ2-Adaptin
N-terminal	Amino-terminal
N-Terminus	Amino-Terminus
P	Prolin
PCR	*polymerase chain reaction*
pH	*potentia hydrogenii*
PH	*pleckstrin homology*
PHD	*pleckstrin homology domain*
PRD	Prolin-reiche Domäne
Prof.	Professor(in)
PTB	*phosphotyrosine-binding*
PtdIns(4,5)P_2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PTEN	*phosphatase and tensin homolog*

PTTG	*pituitary tumor-transforming gene*
Q	Glutamin
R	Arginin
Rab	*ras-related in brain*
Ras	*rat sarcoma*
RNA	*ribonucleic acid*
RNS	Ribonukleinsäure
S	*supplementary*
S.	Seite
SBD	Substrat-bindende Domäne
SD	*standard deviation*
sek	Sekunde
SILAC	*stable isotope labeling by amino acids in cell culture*
siRNA	*small interfering ribonucleic acid*
SH	*SRC homology*
SMIM	*small integral membrane protein*
SNARE	*soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor*
SNX	*sorting nexin*
T	Threonin
TfR	Transferrin-Rezeptor
TGN	trans-Golgi-Netzwerk
TIMP	*tissue inhibitor of metalloproteinases*
u. a.	unter anderem
UIM	Ubiquitin-interagierendes Motiv
VAMP	*vesicle associated membrane protein*
VBS	Verbindungssegment
VLDL	*very-low-density lipoprotein*
W	Tryptophan
X	beliebige Aminosäure
Y	Tyrosin
z. T.	zum Teil
Φ	sperrige hydrophobe Aminosäure

1. Zusammenfassung

Die Clathrin-vermittelte Endozytose (engl. *clathrin-mediated endocytosis*, CME) ermöglicht infolge einer Einstülpung der Plasmamembran und Ausbildung Protein-beschichteter Vesikel die zelluläre Aufnahme einer Vielzahl unterschiedlicher Membranproteine sowie ihrer Liganden. Zugleich nimmt die CME einen regulatorischen Einfluss auf die Zusammensetzung der Plasmamembran und wirkt sich in dieser Weise auf eine Vielzahl weiterer Zellprozesse aus. Insgesamt mehr als 50 ursprünglich aus dem Zytoplasma stammende Proteine sind im Zuge der CME an der Ausbildung der Vesikelhülle beteiligt, innerhalb derer der heterotetramere Adaptorkomplex AP-2 eine Schlüsselposition einnimmt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die CME unter Anwendung eines siRNA (engl. *small interfering RNA,* dt. kleine eingreifende RNS) -vermittelten Knockdowns (KD) der µ2-Untereinheit von AP-2 inhibiert und hieraus resultierende Veränderungen in Bezug auf die Endozytose unterschiedlicher Klassen von Membranproteinen untersucht. Hierbei stand die mittels quantitativer Massenspektrometrie erhobene Analyse des Plasmamembran-Proteoms µ2-depletierter HeLa-Zellen im Zentrum dieser Arbeit. Eine darüber hinausgehende Untersuchung einzelner Membranproteine erfolgte mittels Immunfluoreszenzmikroskopie und Durchflusszytometrie sowie unter Anwendung weiterer biochemischer und molekularbiologischer Methoden.

Die gewonnenen Daten ergaben eine mindestens anderthalbfache Akkumulation mehr als der Hälfte aller identifizierten Proteine an der Plasmamembran µ2-depletierter HeLa-Zellen. Insbesondere zeigte sich eine starke Anreicherung endosomaler und lysosomaler Proteine sowie bestimmter Integrine. Funktionell äußerte sich Letzteres in einer deutlich beeinträchtigten Zellmigration. Darüber hinaus resultierte der im Rahmen dieser Arbeit angewandte µ2-KD in einer Plasmamembrananreicherung bekannter Tumormarker (CD73, CD164, CD302) sowie des mit soliden Tumoren assoziierten Metalloenzyms Carboanhydrase 9 (CA9), das einen möglichen Angriffspunkt für eine zielgerichtete antitumorale Therapie darstellt[2] und die insgesamt stärkste Akkumulation aller Membranproteine erfuhr. Des Weiteren konnte das bislang nicht charakterisierte Membranprotein SMIM29 (engl. *small integral membrane protein 29*; Synonym: c6orf1[3]) erstmals als ein Protein identifiziert werden, das mehrere funktionale Sortierungssignale aufweist und dessen Internalisierung mittels CME erfolgt. Ferner konnte neben der quantitativen Proteom-Analyse eine Hemmung der endozytotischen Gesamtleistung in AP-2-depletierten HeLa-Zellen nachgewiesen werden, während die Funktionsfähigkeit Clathrin-unabhängiger Endozytosewege (engl. *clathrin-independent endocytosis*, CIE) kaum beeinträchtigt war.

2. Einleitung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der CME, der wichtigsten Form[4] vesikulären Transports von der Plasmamembran in das Innere eukaryotischer Zellen, sowie den Auswirkungen ihrer Hemmung auf die Gesamtheit aller Plasmamembranproteine, dem sogenannten Plasmamembran-Proteom.

2.1. Membrantransport

Eukaryotische Zellen sind von einer fünf bis acht Nanometer dicken Biomembran umgeben, die ihre natürliche äußere Begrenzung darstellt und infolgedessen die Ausbildung und Aufrechterhaltung eines sich vom Extrazellulärraum unterscheidenden inneren Zellmilieus ermöglicht[5]. Diese auch als Zell- oder Plasmamembran bezeichnete biologische Barriere wird im Wesentlichen von einer doppelten Schicht aus amphiphilen Lipiden gebildet, deren hydrophile Anteile sich in Richtung der Zelloberfläche bzw. des Zytoplasmas orientieren, wohingegen ihre hydrophoben Bereiche das nach innen gerichtete lipophile Zentrum der Membran bilden. Zusätzlich beinhaltet die Plasmamembran eine Vielzahl unterschiedlicher Membranproteine, die peripher angelagert oder als integraler Bestandteilt fest in der Lipiddoppelschicht verankert sind.

Wie alle Biomembranen weist auch die Plasmamembran Semipermeabilität auf und ist somit für nur bestimmte Moleküle in Abhängig von ihrer Größe, Ladung und Lipophilie durchlässig[6]. Bedingt durch eine laterale Beweglichkeit einzelner Membranbestandteile im Sinne des sogenannten Flüssig-Mosaik-Modells können hydrophobe Moleküle sowie Wasser weitestgehend ungehindert durch die Zellmembran diffundieren. Ionen und größere polare Moleküle, wie zum Beispiel Monosaccharide und Aminosäuren, sind hingegen auf Membranproteine angewiesen, die als Transporter oder Kanalproteine einen regulierten passiven Transport entlang des Konzentrationsgefälles bzw. unter Verbrauch von Energie einen primär oder sekundär aktiven, dem Konzentrationsgradienten entgegengerichteten Transport ermöglichen.

Darüber hinaus können eukaryotische Zellen durch eine zunehmende Einstülpung der Plasmamembran bis hin zur Ausbildung eines membranösen Transportbläschens, dem sogenannten Vesikel (lat. *vesicula*, dt. Bläschen), einen koordinierten Substanztransport von der Oberfläche ins Innere der Zelle realisieren. Dieser als Endozytose bezeichnete Transportvorgang ermöglicht eine Aufnahme von Makromolekülen und ist insbesondere für die effiziente Internalisierung von Proteinen, Phospholipiden und Polysacchariden essenziell. Gleichzeitig nimmt die Endozytose infolge einer selektiven Internalisierung von Bestandteilen der Plasmamembran einen regulatorischen Einfluss auf deren Zusammensetzung und beeinflusst auf diese Weise diverse Zellfunktionen wie Zellkommunikation[7], Zelladhäsion[8] oder

Immunabwehr[9]. Ferner lassen sich infolge morphologischer, funktionaler und mechanistischer Unterschiede verschiedene Formen von Endozytose unterscheiden. So existieren neben der Phagozytose größerer Partikel und der Makropinozytose größerer Flüssigkeitsmengen eine Reihe weiterer Formen von Endozytose, die allesamt durch die Bildung kleinerer (<200nm) Vesikel gekennzeichnet sind, sich jedoch hinsichtlich der Proteine unterscheiden, die an ihrer Umsetzung beteiligt sind[10,11].

Als physiologisch bedeutsamste[4] und zugleich am besten charakterisierte Form der Endozytose wird die CME angesehen[12]. Diese wird durch die Bildung einer strukturverleihenden und zugleich regulatorisch wirkenden Proteinhülle auf der Innenseite der Plasmamembran realisiert, deren quantitativ dominierender Bestandteil das zytoplasmatische Protein Clathrin darstellt[13]. Zusätzlich sind mehr als 50 weitere[14,15] ursprünglich aus dem Zytoplasma stammende Proteine an der Ausbildung der Proteinhülle beteiligt, die nicht nur eine Einstülpung der Plasmamembran begünstigen, sondern infolge einer Interaktion mit diversen Membranproteinen eine selektive, zielgerichtete und zugleich kontrollierte Aufnahme sogenannter Frachtproteine in das sich bildende Vesikel vermitteln[16]. Klassischerweise befinden sich hierunter zahlreiche Membranproteine, die als Rezeptoren an der Plasmamembran fungieren und nach Bindung ihres entsprechenden Liganden eine regulierte Internalisierung über das Protein-beschichtete Vesikel[17,18] im Sinne einer Rezeptor-vermittelten Endozytose erfahren.

Darüber hinaus erfolgt ein intrazellulärer vesikulärer Transport von Fracht nicht nur im Rahmen der CME von der Zellmembran in Richtung früher Endosomen, sondern auch im Zuge weiterer Transportrouten unter Einbindung zusätzlicher Zellkompartimente[19] (siehe Kapitel 2.3.1). Entsprechende Vesikel unterscheiden sich in der biochemischen Zusammensetzung ihrer jeweiligen Proteinhüllen, die insbesondere infolge einer Bindung bestimmter Phospholipide und Membranproteine einen regulatorischen Einfluss auf den Ort der Vesikelbildung nehmen.

2.2. Clathrin

Das zytoplasmatische Protein Clathrin bildet die strukturverleihende Hauptkomponente innerhalb der Hülle Protein-beschichteter Vesikel, die einen Transport zwischen post-Golgi Kompartimenten wie der Plasmamembran, Endosomen, Lysosomen und dem trans-Golgi-Netzwerk (TGN) vermitteln[20-22]. Kennzeichnend und zugleich namensgebend[13] ist die Fähigkeit von Clathrin, an zellulären Membranen zu einem polyedrischen wabenförmigen Gitter zu polymerisieren (lat. *clathrum*, dt. Gitter), das maßgeblich zur Einstülpung der assoziierten Membran beiträgt[23-25]. Im Rahmen der CME ist Clathrin gemeinsam mit weiteren Bestandteilen der sich bildenden Proteinhülle an der Initiation der Vesikelbildung beteiligt[26]. Anschließend umhüllt das gitterförmige Clathrin-Gerüst die Membran mit fortschreitender

Invagination zunehmend, bis sich unter Mitwirkung weiterer, ebenfalls aus dem Zytoplasma herangezogener Proteine[15] zunächst eine Clathrin-beschichtete Grube (engl. *clathrin-coated pit*; CCP) und unter weiterer Heranreifung schließlich ein Clathrin-beschichtetes Vesikel (engl. *clathrin-coated vesicle*; CCV) bildet[22] (Abb. 1). Nach Abschnürung von der Plasmamembran und Freisetzung in den zytoplasmatischen Raum[27] erfolgt schließlich die enzymatisch kontrollierte Disassemblierung der gitterförmigen Clathrin-Hülle[28], bevor das nun nicht mehr beschichtete Vesikel mit einem frühen Endosom fusioniert.

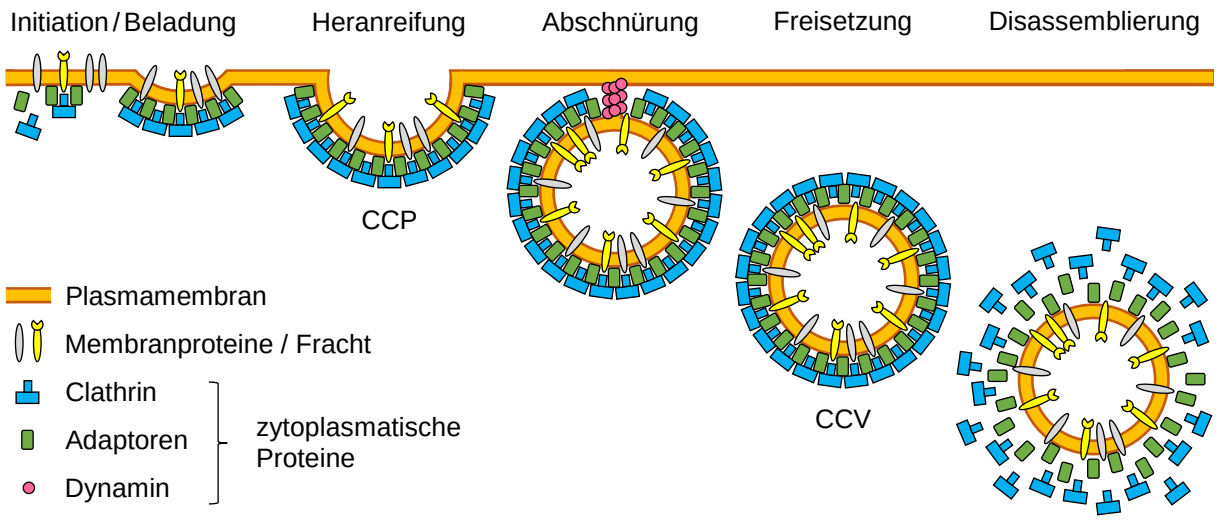


Abb. 1: Phasen der CME. Initial erfolgt im Rahmen der CME eine Interaktion erster aus dem Zytoplasma stammender Proteine mit Bestandteilen der Plasmamembran. Durch die zunehmende Anlagerung von Adaptoren, Clathrin sowie weiterer akzessorischer Proteine (Letztere nicht gezeigt) bildet sich eine immer größer werdende Proteinhülle, die Frachtproteine bindet und zugleich eine zunehmende Einstülpung der Plasmamembran ermöglicht. Auf diese Weise entsteht mit voranschreitender Heranreifung zunächst ein mit Fracht angereichertes CCP und schließlich, nach weiterer Invagination und Dynamin-vermittelter Abschnürung von der Zellmembran, ein neu gebildetes CCV. Dieses wird in den zytoplasmatischen Raum freigesetzt, in dem unmittelbar anschließend die koordinierte Disassemblierung der Vesikelhülle erfolgt.

2.2.1. Clathrin-Triskele

Im Zytoplasma gelöst bildet Clathrin Proteinkomplexe, die aus jeweils drei schweren (190kDa) und drei leichten Polypeptidketten (24-29kDa) bestehen[29,30]. Innerhalb eines solchen Clathrin-Hexamers sind die schweren Polypeptidketten (engl. *clathrin heavy chain*; CHC) in einem zentralen Knotenpunkt nicht-kovalent gebunden, von dem aus sie weitestgehend radialsymmetrisch und unter Ausbildung einer fortlaufenden Krümmung nach außen streben. Die drei leichten Polypeptidketten (engl. *clathrin light chain*, CLC) sind mit dem proximalen Anteil jeweils einer CHC assoziiert[31,32], infolgedessen der gesamte Proteinkomplex eine

dreibeinige Struktur aufweist, die als Clathrin-Triskele (gr. *triskelḗs,* dt. dreibeinig*)* bezeichnet wird (Abb. 2B).

Jedes Bein einer solchen Clathrin-Triskele weist eine Länge von rund 475Å auf[33-35] und lässt sich aufgrund seiner Morphologie in verschiedene Abschnitte unterteilen. Die N-terminal lokalisierte, annährend kugelförmige *terminale Domäne* befindet sich am peripheren Ende der CHC[36] und besteht aus insgesamt sieben viersträngigen β-Faltblättern, die trichterförmig um eine gemeinsame Achse rotierend eine als β-Propeller bezeichnete Tertiärstruktur bilden[37]. Hieran schließen sich insgesamt fünf schmalere Segmente an, die als *Verbindungssegment*, *Knöchel*, *distales Segment*, *Knie* sowie *proximales Segment* bezeichnet werden (Abb. 2A) und eine sich mehrfach wiederholende Sequenz aus jeweils rund 145 Aminosäuren (engl. *clathrin heavy chain repea*t, CHCR) als gemeinsames Strukturelement aufweisen[38]. Insgesamt acht solcher Sequenzwiederholungen, die als CHCR-0 bis CHCR-7 bezeichnet werden, erstrecken sich vom *Verbindungssegment* bis zum *proximalen Segment* einer jeden CHC[33] und setzen sich hierbei aus jeweils zehn zickzackförmig angeordneten, um die gemeinsame Molekülachse rotierenden α-Helices zusammen. Der zentrale Knotenpunkt im Zentrum der Clathrin-Triskele wird hingegen von drei einzelnen, jeweils rund 5nm langen α-Helices gebildet, die nahezu orthogonal zum vorangehenden *proximalen Segment* verlaufen. Gemeinsam bilden sie eine als *Tripod* bezeichnete dreibeinige Struktur, die infolge ausgeprägter Wechselwirkungen zwischen den drei langen α-Helices maßgeblich zur Stabilität der gesamten Triskele beiträgt[39] (Abb. 2C). An den *Tripod* schließt sich ein kurzer Bereich ohne definierte Sekundärstruktur am C-Terminus jeder CHC an.

Die Bindung der CLC an die CHC erfolgt im Bereich des *proximalen Segments* über einen im zentralen Drittel der CLC lokalisierten Bereich aus insgesamt zehn Hepadenmustern[40,41]. Dieser interagiert in Form einer rund 10nm langen α-Helix[33,42] mit interhelikalen Schleifen von CHCR-6 und CHCR-7[39] und erhöht auf diese Weise die Stabilität einzelner Clathrin-Triskelen[43] sowie ganzer Clathrin-Polymere[44]. Zugleich resultiert die Bindung der CLC infolge einer Interaktion mit zentralen CHC-Bindungsstellen[45] in einer verminderten Polymerisationsfähigkeit[46,47]. Darüber hinaus lassen sich in Bezug auf die CLC insgesamt zwei verschiedene Polypeptid-Hauptklassen voneinander unterscheiden, die als LCA (engl. *light chain A*) und LCB (engl. *light chain B*) bezeichnet werden[29,30]. Diese werden von zwei unterschiedlichen Genen kodiert[48] und weisen eine rund 60-prozentige Sequenzhomologie auf[40]. Infolge mehrerer gewebespezifischer Splice-Varianten existieren zudem unterschiedliche Isoformen, deren molekulare Massen jeweils zwischen 24 und 29kDa betragen[49]. All diese Isoformen können gleichermaßen mit dem *proximalen Segment* der CHC interagieren, infolgedessen gewebespezifische, bislang jedoch nicht näher definierte regulatorische Unterschiede möglich erscheinen.

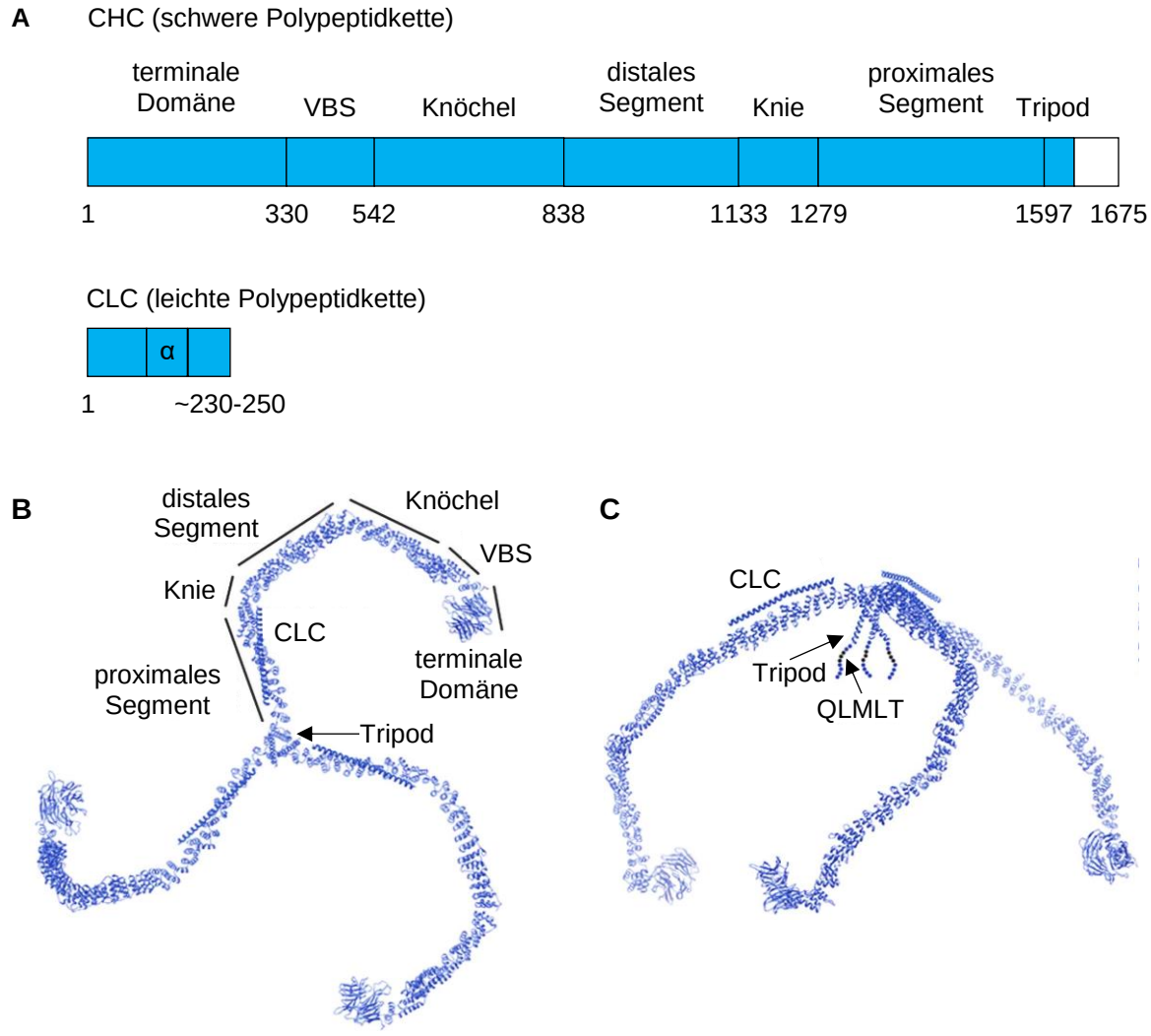


Abb. 2: Clathrin-Triskele. A: Strukturelle Organisation von CHC und CLC mit Darstellung einzelner Proteinsegmente und Angabe fortlaufend durchnummerierter Aminosäurereste an ihren Grenzen. VBS: *Verbindungssegment*. **B:** Quartärstruktur einer Clathrin-Triskele mit Kennzeichnung einzelner CHC-Segmente sowie der CLC-α-Helix. **C:** Seitenansicht einer Clathrin-Triskele mit Darstellung der CLC-α-Helix, des zentral lokalisierten *Tripods* sowie des für die koordinierte Disassemblierung relevanten QLMLT-Sequenzmotivs (abgewandelt nach Xing et. al, 2010[50]).

2.2.2. Polyedrische Clathrin-Gitter

Clathrin besitzt die Fähigkeit, durch Selbstassemblierung gitterförmige polyedrische Gerüste zu bilden, in denen einzelne Clathrin-Triskelen derart miteinander verflochten sind, dass ihre CHCs die Kanten und ihre zentralen Knotenpunkte die Ecken[33] überwiegend hexagonaler und pentagonaler Flächen bilden[25] (Abb. 3). Infolge einer unterschiedlich stark ausgebildeten Krümmung, insbesondere im Bereich der *Knie*- und *Knöchel*-Segmente einzelner Clathrin-Triskelen, kann das auf diese Weise gebildete Polymer diverse Formen annehmen, die von flachen Gerüsten bis hin zu geschlossenen, annähernd kugelförmigen Käfigen reichen[23,51]. Der Krümmungsgrad des gesamten Clathrin-Polymers resultiert hierbei hauptsächlich aus der

Anzahl im Gitter vorhandener Pentagone sowie der Interaktion einzelner Triskelen untereinander[39], wohingegen seine Größe primär aus der Anzahl vorhandener Hexagone resultiert.

Einer der kleinsten sowohl *in vitro*[33,39] als auch *in vivo*[52,53] gebildeten Clathrin-Käfige wird als *Mini-Coat* bezeichnet und besteht aus lediglich 28 Triskelen (Abb. 3A). Diese bilden ein aus insgesamt vier hexagonalen und zwölf pentagonalen Flächen bestehendes Gerüst, das die Symmetriegruppe eines Tetraeders und einen Durchmesser von rund 70nm aufweist. Größere Clathrin-Käfige, wie zum Beispiel das *in vitro* am häufigsten gebildete und aus insgesamt 36 Triskelen bestehende *Hexagonale Fass* (Abb. 3B) oder der aus insgesamt 60 Triskelen aufgebaute *Fußball* (Abb. 3C), beinhalten im Einklang mit der Euler-Charakteristik[24] ebenfalls exakt zwölf pentagonale Flächen bei zugleich steigender Anzahl an Hexagonen.

Das Clathrin-Gitter selbst besteht aus insgesamt zwei ineinander verwobenen polyedrischen Schichten, innerhalb derer insgesamt vier verschiedene Triskelen an der Ausbildung einer gemeinsamen Gitterkante beteiligt sind[54]. Die Außenseite einer jeden Kante wird hierbei von zwei antiparallel verlaufenden *proximalen Segmenten* einander direkt benachbarter Triskelen und ihre Innenseite von zwei ebenfalls antiparallel verlaufenden *distalen Segmenten* jeweils zwei Eckpunkte entfernt liegender Triskelen gebildet. Auf diese Weise ist jede CHC an der Ausbildung zweier benachbarter Gitterkanten beteiligt, die ihrerseits – weitestgehend unabhängig von Form und Größe des gebildeten Gitters[39] – durch eine Vielzahl intermolekularer Wechselwirkungen stabilisiert werden[55]. Darüber hinaus interagiert der nach innen gerichtete α-helikale *Tripod* am Knotenpunkt einer jeden Triskele mit den *Knöchel*-Segmenten dreier weiterer Clathrin-Triskelen[52], wodurch das gesamte Clathrin-Polymer zusätzlich stabilisiert wird.

In vivo weisen Clathrin-Gerüste neu gebildeter CCVs infolge unterschiedlicher Ausmaße der jeweils transportierten Fracht eine starke Heterogenität auf[24] und beinhalten neben pentagonalen sowie hexagonalen Flächen zum Teil auch weitere polyedrische Flächen. Hierzu zählen insbesondere Heptagone, die zugleich eine Erhöhung im Gitter vorhandener Pentagone bedingen[53]. Das membranöse Vesikel selbst befindet sich innerhalb solcher Clathrin-Käfige nicht zentral, sondern meist vom Zentrum versetzt leicht randständig.

Darüber hinaus bildet Clathrin an der Plasmamembran mitunter ausgedehnte flache Gitter mit bislang nicht vollständig verstandener Funktion[56,57]. Ob und inwieweit solche flachen Gitter durch einen nachträglichen Umbau einzelner Gitterkanten[58] bzw. den punktuellen Wegfall entgegenwirkender Kräfte[59-62] an der Ausbildung sphärischer CCVs beteiligt sind oder ob Vesikel-umhüllende Clathrin-Gitter *in vivo* viel mehr mit einer von Beginn an konstanten Krümmung entstehen[63,64], ist Gegenstand aktueller Forschung.

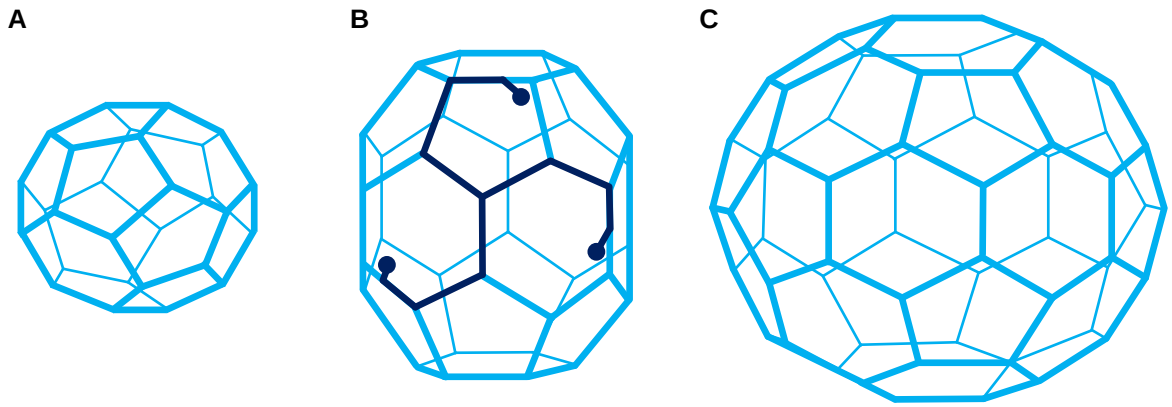


Abb. 3: Clathrin-Käfige. Räumliche Darstellung dreier unterschiedlich großer vollständig geschlossener Clathrin-Polyeder. **A:** *Mini-Coat* bestehend aus 28 Clathrin-Triskelen und vier hexagonalen Flächen. Durchmesser ca. 70nm. **B:** *Hexagonales Fass* bestehend aus 36 Clathrin-Triskelen und acht hexagonalen Flächen. Größter Durchmesser ca. 80nm. Exemplarische Hervorhebung einer einzelnen Clathrin-Triskele (dunkelblau). **C:** *Fußball* bestehend aus 60 Clathrin-Triskelen und 20 hexagonalen Flächen. Durchmesser ca. 90nm (abgewandelt nach Fotin et. al, 2004[33]).

2.3. Clathrin-Adaptoren

Clathrin ist zwar die strukturverleihende Hauptkomponente innerhalb der CCV-Hülle, aber selbst nicht in der Lage, an die Biomembran des sich bildenden Vesikels zu binden. Stattdessen erfolgt die Bindung indirekt über eine Gruppe von Proteinen, die als Clathrin-Adaptoren bezeichnet werden und sowohl Bestandteile der Vesikelmembran als auch Anteile einzelner Clathrin-Triskelen[65] sowie weiterer Proteine binden können[66,67].

2.3.1. Heterotetramere Adaptorkomplexe

Heterotetramere Adaptorkomplexe bilden nach Clathrin die zweithäufigste Komponente innerhalb der CCV-Hülle[15]. Aufgrund ihrer Fähigkeit, die Bildung polyedrischer Clathrin-Gitter *in vitro* zu begünstigen[68,69], wurden diese Proteinkomplexe initial als *Assemblierungs-Polypeptide* bezeichnet und mit den beiden Buchstaben AP (engl. *assembly polypeptide*) abgekürzt[70]. Infolge ihrer erst später erkannten Fähigkeit, klassischerweise sowohl Clathrin als auch Bestandteile der Biomembran zu binden und auf diese Weise wie ein Adapter zwischen beiden Sphären zu fungieren, setzte sich mit der Zeit eine weitere, ebenfalls durch die beiden Buchstaben AP abgekürzte Bezeichnung für die heterotetrameren Proteinkomplexe durch: *Adaptorproteine*[66].

Insgesamt fünf verschiedene heterotetramere Adaptorkomplexe können unterschieden werden, die in der Reihenfolge ihrer Erstbeschreibung als AP-1 bis AP-5 bezeichnet werden und ein hohes Maß an struktureller Homologie aufweisen[19]. Jeder der fünf Komplexe besteht

aus zwei großen (~110kDa), einer mittelgroßen (~50kDa) und einer kleinen (15–20kDa) jeweils als Adaptin bezeichneten Untereinheit[71] (Abb. 4). Während mit β-Adaptin eine der beiden großen Untereinheiten ebenso wie die mittelgroße μ- und die kleine σ-Untereinheit in Bezug auf die fünf verschiedenen heterotetrameren Adaptorkomplexe AP-1 bis AP-5 fortlaufend durchnummeriert ist (β1-β5; μ1-μ5; σ1-σ5), wird die zweite der beiden großen Untereinheiten historisch bedingt und infolge einer nur rund 25-prozentigen Sequenz-Homologie hiervon abweichend als α (AP-2), γ (Ap-1), δ (AP-3), ε (AP-4) bzw. ζ (AP-5) bezeichnet.

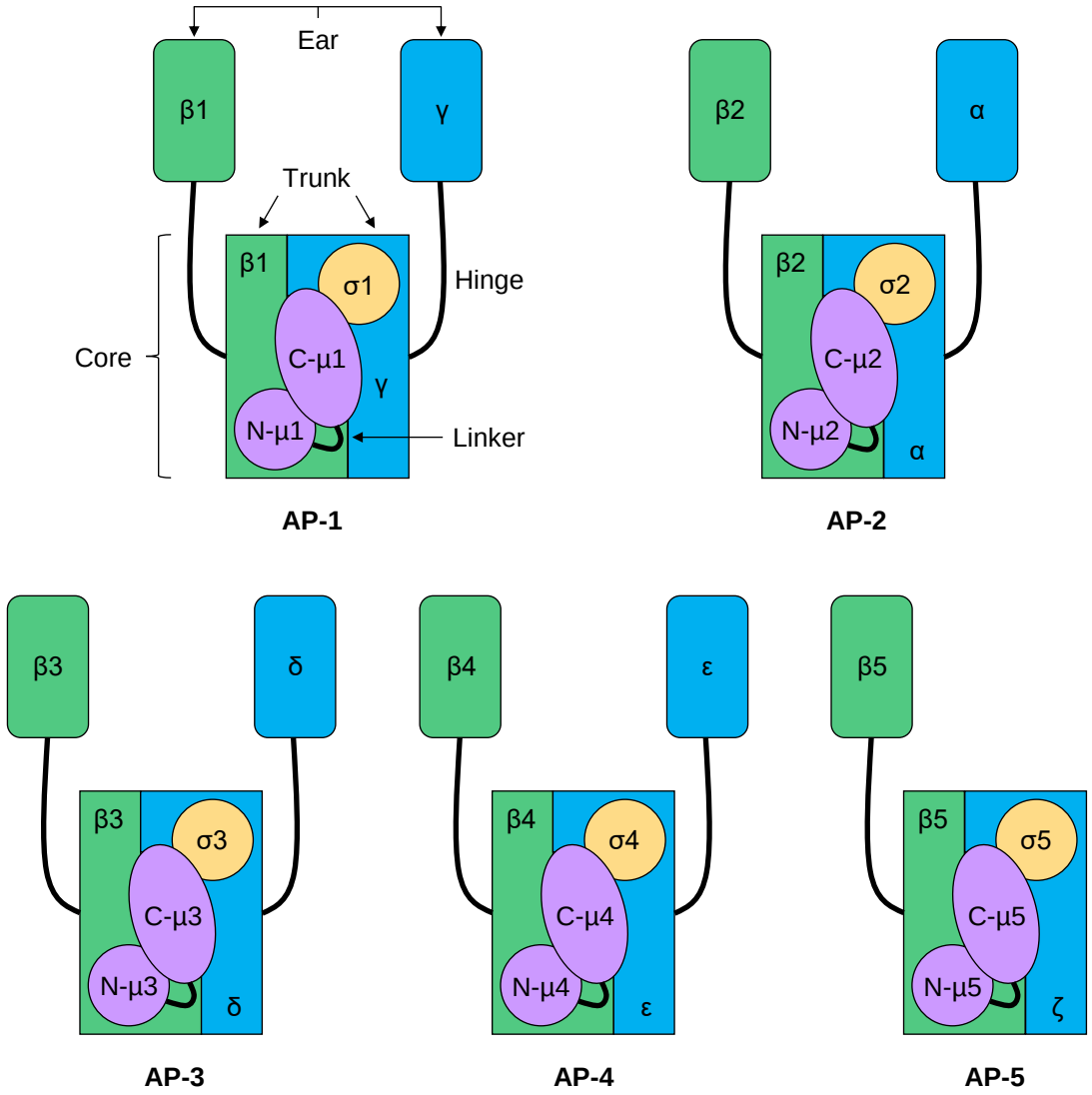


Abb. 4: Heterotetramere Adaptorkomplexe. Schematische Darstellung des strukturellen Aufbaus der fünf heterotetrameren Adaptorkomplexe AP-1 bis AP-5 mit Angabe ihrer jeweiligen Untereinheiten (siehe Haupttext). Exemplarische Kennzeichnung der *Trunk*- und *Ear*-Domänen der beiden großen Untereinheiten von AP-1, der *Hinge*-Region von γ-Adaptin, der *Linker*-Region von μ1-Adaptin sowie des *Core*-Komplexes von AP-1.

Die fünf Adaptorkomplexe sind in unterschiedlicher Weise an der intrazellulären Sortierung von Membranproteinen beteiligt und im Zuge dessen mit verschiedenen Zellkompartimenten assoziiert (Abb. 5). Während AP-1 einen Clathrin-vermittelten vesikulären Transport zwischen dem TGN und tubulären Endosomen ermöglicht, vermittelt AP-2 im Rahmen der CME einen Transport von der Plasmamembran in Richtung früher Endosomen[72,73]. AP-3 wiederum ist am Transport zwischen tubulären und späten Endosomen beteiligt[74] und interagiert in diesem Zusammenhang mit anderen endosomalen Membranabschnitten als AP-1[75,76]. Darüber hinaus ist AP-3 an der Genese Lysosom-ähnlicher Organellen (engl. *lysosome-related organelle*, LRO) beteiligt[77]. Die Interaktion zwischen AP-3 und Clathrin ist bei den relevanten Transportvorgängen nach wie vor umstritten[78]. AP-4 ist mit dem TGN assoziiert und ermöglich neben einem Clathrin-unabhängigen endosomalen Proteintransport[79] eine polarisierte Proteinsortierung in Neuronen und Epithelzellen[80,81]. Der zuletzt entdeckte und bislang am wenigsten charakterisierte Adaptorkomplex AP-5 ist mit späten Endosomen assoziiert[19], bindet ebenfalls kein Clathrin[82] und ist am retrograden Proteintransport in Richtung Golgi-Apparat beteiligt[83].

Neben den fünf ubiquitär exprimierten heterotetrameren Adaptorkomplexen existieren mindestens zwei gewebespezifische Varianten[84,85] sowie mehrere Isoformen und Splice-Varianten mit bislang weitestgehend unbekannter Funktion[86].

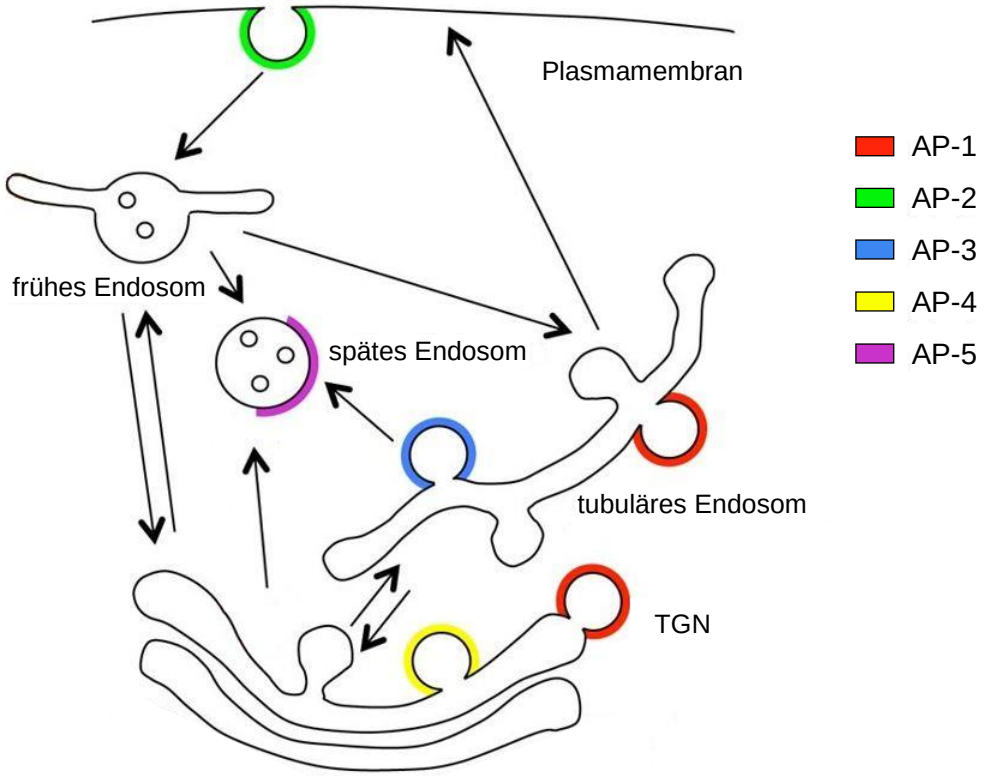


Abb. 5: Intrazelluläre Lokalisation der fünf heterotetrameren Adaptorkomplexe. Schematische Darstellung der Lokalisation der fünf heterotetrameren Adaptorkomplexe AP-1 bis AP-5 mit Kennzeichnung beteiligter Zellorganellen und Transportrouten (abgewandelt nach Hirst et al., 2011[19]).

2.3.2. Struktureller Aufbau von AP-2

Der heterotetramere Adaptorkomplex AP-2 besitzt die Fähigkeit, neben Clathrin auch Phospholipide der Plasmamembran sowie zahlreiche Fracht- und regulatorisch wirkende Proteine zu binden und im Zuge dessen als zentral koordinierender Knotenpunkt innerhalb eines Interaktionsnetzwerks zu agieren, das sich im Rahmen der CME ausbildet[52]. Hierbei vermitteln die vier Untereinheiten des Adaptorkomplexes unterschiedliche Funktionen, die sich nicht zuletzt in ihrem jeweiligen strukturellen Aufbau widerspiegeln.

Die beiden großen Untereinheiten α und β2 bestehen aus jeweils einer kompakten N-terminalen Domäne (ca. 70kDa), die als *Trunk* (dt. Rumpf) bezeichnet wird und über eine lange, flexible und proteolytisch sensible *Hinge*-Region (dt. Scharnierregion)[87] mit einer kleineren, als *Appendage* (dt. Anhängsel) oder *Ear* (dt. Ohr) bezeichneten Domäne (ca. 30kDa) am C-Terminus verbunden ist[88] (Abb. 6A). Insgesamt knapp 30 zickzackförmig angeordnete α-Helices bilden die Grundstruktur der *Trunk-Domäne*, die einer auf ihrer gesamten Länge um rund 90° gekrümmten superhelikalen Solenoid-Domäne entspricht[89] (Abb. 6B). Gemeinsam mit der mittelgroßen µ2-Untereinheit und der kleinen σ2-Untereinheit bilden die *Trunk-Domänen* der beiden großen Untereinheiten den sogenannten *Core*-Komplex (dt. Kernkomplex) von AP-2[90]. Innerhalb dieses *Core*-Komplexes interagieren allen vier Untereinheiten im Bereich ausgedehnter Kontaktflächen über meist hydrophobe Wechselwirkungen miteinander, von denen diejenigen zwischen den beiden Untereinheiten α und σ2 sowie zwischen β2 und der N-terminalen Hälfte von µ2 (N-µ2) besonders stark ausgeprägt sind. Infolge einer bedeckten Gesamtoberfläche von rund 30% in Bezug auf die jeweils kleinere Untereinheit[89] weisen die gebildeten Heterodimere α/σ2 und β2/N-µ2 einen energetisch besonders vorteilhaften und somit stabilen Zustand auf[91]. Zusätzliche, jedoch weniger großflächig ausgeprägte Interaktionen im Bereich der C-terminalen Enden beider *Trunk-Domänen* resultieren in der Ausbildung des entsprechenden Heterotetramers.

Dieses wird im Bereich des *Core*-Komplexes von einem annähernd rechteckigen, rund 80Å x 100Å großen Rahmen umschlossen, dessen äußere Begrenzung die *Trunk-Domänen* der beiden großen Untereinheiten bilden (Abb. 6C). Die beiden strukturell homolog aufgebauten Untereinheiten σ2 und N-µ2 sind hingegen im Bereich einander gegenüberliegender Eckpunkte dieses Rahmens lokalisiert und setzen sich aus jeweils einem fünfsträngigen β-Faltblatt samt angrenzender α-Helices zusammen. Gemeinsam bilden alle vier Untereinheiten eine als *Bowl* (dt. Schüssel) bezeichnete Konkavität, innerhalb derer die C-terminale Hälfte von µ2 (C-µ2) gebunden werden kann. Diese weist im Gegensatz zu N-µ2 keinerlei strukturelle Homologie zu σ2 auf, trägt im gebundenen Zustand jedoch infolge ausgeprägter Interaktionen mit den *Trunk-Domänen* des Adaptorkomplexes maßgeblich zur hohen Stabilität des gesamten Tetramers bei.

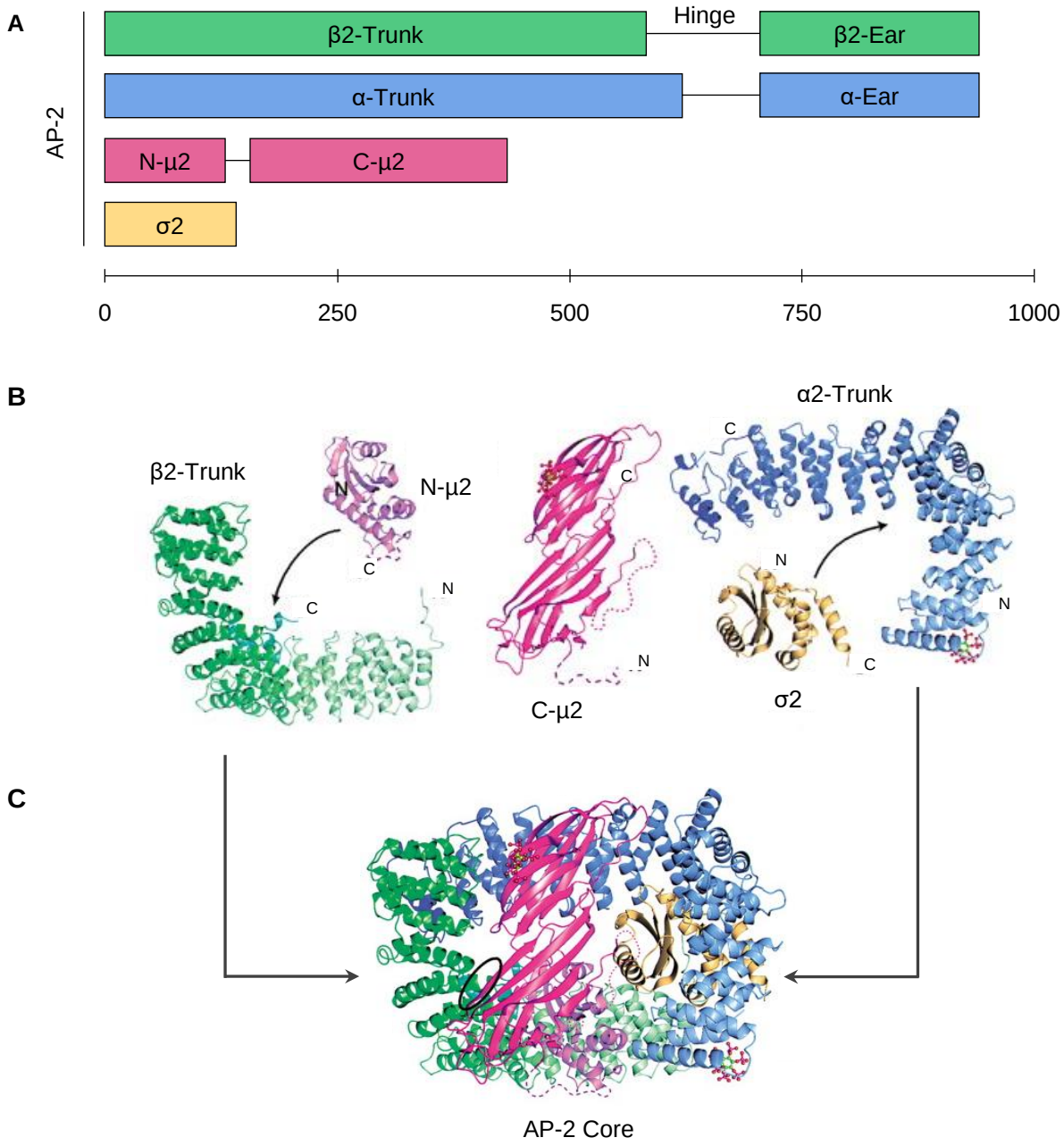


Abb. 6: Struktureller Aufbau von AP-2. A: Schematische Darstellung der vier Untereinheiten von AP-2 mit Kennzeichnung einzelner Proteindomänen und Angabe fortlaufend durchnummerierter Aminosäurereste (unterhalb der Grafik). **B:** Individuelle Darstellung aller Untereinheiten des *Core*-Komplexes von AP-2 mit Kennzeichnung ihrer jeweiligen Lokalisation (schwarze Pfeile) und Angabe ihrer N- und C-Termini. **C:** Geschlossene Konformation des *Core*-Komplexes von AP-2 mit farblicher Kennzeichnung der vier Untereinheiten (Farbschema wie in Teil-Abb. B) und Lokalisation der Untereinheit C-µ2 innerhalb der von α- und β2-*Trunk* sowie σ2 und N-µ2 gebildeten *Bowl*. Darstellung der *Linker*-Region zwischen N-µ2 und C-µ2 in Form einer gestrichelten Linie sowie Kennzeichnung der Bindungsstelle für Frachtproteine mit einer YXXΦ-Peptidsequenz im Bereich von C-µ2 durch einen schwarzen Kreis (Teil-Abb. A abgewandelt nach Kovtun et al., 2020[92]; Teil-Abb. B und C abgewandelt nach Collins et al., 2002[89]).

Gleichzeitig verhindert die Lokalisation von C-µ2 innerhalb der Adaptor-*Bowl* jedoch die Bindung des Adaptorkomplexes an Clathrin, da die hierfür wichtigste Bindungsstelle, das sogenannte *Clathrin-Box-Motiv* (CBM) der Sequenz LLNLD[93,94] innerhalb der langen, flexiblen *Hinge*-Region von β2[95] (siehe Kapitel 2.3.4), von Anteilen des *Core*-Komplexes gebunden wird[96]. Zudem ist AP-2 in einer solchen als geschlossen oder inaktiv bezeichneten Konformation außerstande, mit potenziellen Frachtproteinen zu interagieren, da die hierfür notwendigen Bindungsstellen von Anteilen der β2-Untereinheit bedeckt werden.

Konkret verfügt AP-2 im Bereich der µ2-Untereinheit über eine Bindungsstelle für Tyrosin-haltige Peptidsequenzen[97-99], die sich innerhalb des zytoplasmatischen Anteils zahlreicher Membranproteine befinden und der Konsensussequenz YXXΦ entsprechen, wobei Y die Aminosäure Tyrosin, X eine beliebige Aminosäure und Φ eine sperrige hydrophobe Aminosäure repräsentiert[100]. Eine Vielzahl klassischer über CME internalisierter Membranproteine, wie beispielsweise der Transferrin-Rezeptor (TfR)[101,102] oder das Lysosom-assoziierte Membranglykoprotein 1 (engl. *lysosome-associated membrane glycoprotein 1,* LAMP1)[103], weisen derartige, als Sortierungssignal fungierende Tyrosin-haltige Peptidsequenzen auf, anhand derer eine AP-2 vermittelte selektive Bindung und Aufnahme entsprechender Frachtproteine in das sich bildende Vesikel erfolgt[104,105].

Darüber hinaus verfügt AP-2 im Bereich der σ2-Untereinheit über eine weitere Bindungsstelle[106], die mit sauren Dileucin-Motiven interagieren kann[107], die der Konsensussequenz [DE]XXXL[LI] entsprechen[108-110]. Beispiele für Membranproteine, die ein saures Dileucin-Motiv aufweisen, sind unter anderem der an der Immunabwehr beteiligte CD4-Rezeptor (engl. *cluster of differentiation 4*)[111] sowie das lysosomale Protein LIMP-2 (engl. *lysosomal integral membrane protein type-2*)[112,113]. Infolge einer autoinhibitorisch wirkenden Bindung sowohl des CBM als auch der beiden Bindungsstellen Tyrosin- sowie saurer Dileucin-haltiger Sortierungssignale durch unterschiedliche Anteile des *Core*-Komplexes verhindert die mit über 99% im Zytoplasma dominierende[96] geschlossene Konformation von AP-2 eine vorzeitige und unkoordinierte Interaktion des Adaptorkomplexes mit Clathrin oder potenziellen Frachtproteinen fernab der Plasmamembran.

2.3.3. Funktionelle Regulation von AP-2

Erst nach Rekrutierung an die Zellmembran und infolge einer Interaktion basischer und somit positiv geladener Bindungsstellen mit negativ geladenen Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat ($PtdIns(4,5)P_2$)-Kopfgruppen der Plasmamembran[114,115] vollzieht AP-2 eine ausgeprägte Konformationsänderung[106], in Folge derer die rahmenförmige Begrenzung des *Core*-Komplexes in sich zusammenfällt und C-µ2 aus der Adaptor-*Bowl* gelöst wird (Abb. 7). Hierbei interagiert der aus dem Zytoplasma rekrutierte Adaptorkomplex in seiner zunächst noch geschlossenen Konformation mit der Plasmamembran über initial zwei freizugängliche

PtdIns(4,5)P_2-Bindungsstellen, die im Bereich der *Trunk-Domänen* von α und ß2 lokalisiert sind[116,117]. Zwei weitere, in der geschlossenen Konformation jedoch nicht frei zugängliche PtdIns(4,5)P_2-Bindungsstellen im Bereich von µ2[89,118] treten zusätzlich mit Phospholipiden der Plasmamembran in Wechselwirkung und tragen infolge elektrostatischer Anziehungskräfte maßgeblich zur umfangreichen Konformationsänderung des gesamten Adaptorkomplexes bei. Hierbei vollzieht C-µ2 eine vollständige Neuausrichtung, gekennzeichnet durch eine schraubenförmige Drehung um rund 129° und eine Verschiebung um 39Å in Bezug auf N-µ2[106]. Auf diese Weise richten sich alle vier PtdIns(4,5)P_2-Bindungsstellen sowie die beiden Bindungsstellen für das Tyrosin- und das saure Dileucin-Motiv in einer gemeinsamen Ebene aus. Erst in dieser Konformation wird eine simultane Bindung unterschiedlicher Bestandteile der Plasmamembran möglich, in Folge derer die nun als aktiv oder offen bezeichnete Konformation des Adaptorkomplexes zusätzlich stabilisiert wird.

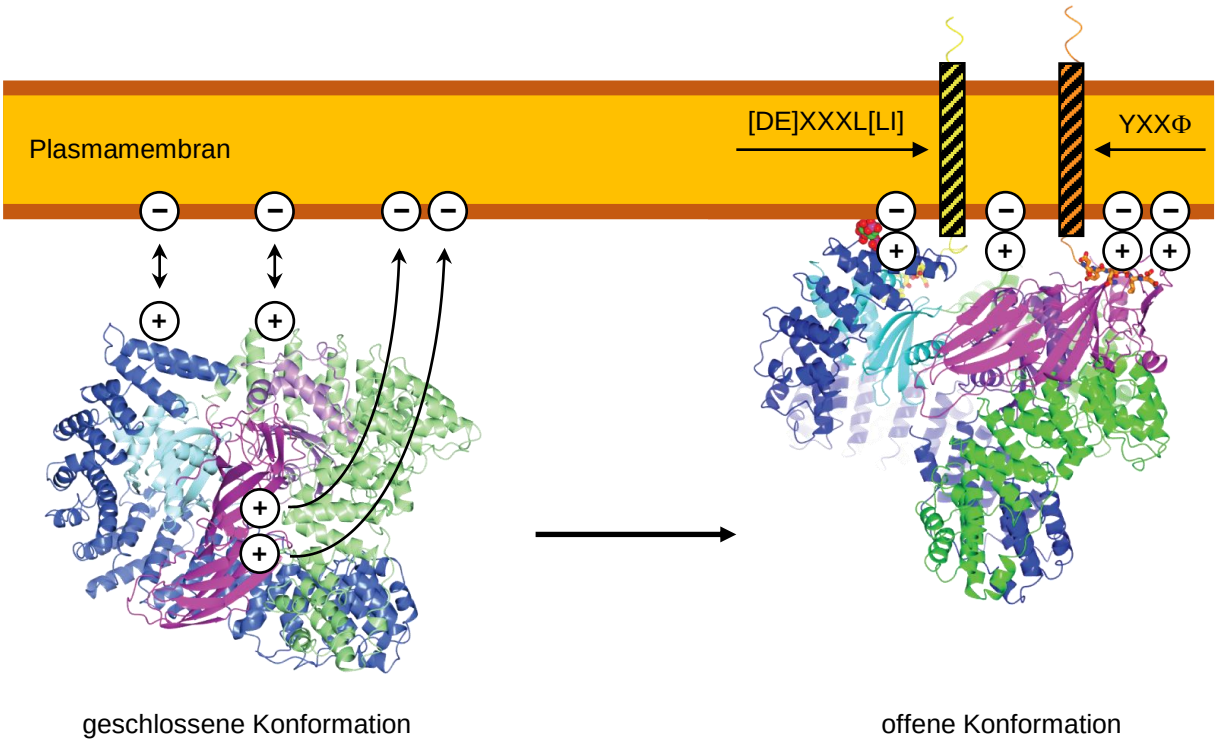


Abb. 7: Konformationsänderung von AP-2. Im Zytoplasma gelöst nimmt der heterotetramere Adaptorkomplex AP-2 nahezu ausschließlich eine kompakte geschlossene Konformation an, in der sowohl die Bindungsstelle für Frachtproteine mit einem Tyrosin-haltigen Sortierungssignal (YXXΦ) als auch zwei Phospholipid-Bindungsstellen im Bereich der Untereinheit C-µ2 von Anteilen des *Core*-Komplexes gebunden werden (links). Erst infolge einer spezifischen Interaktion mit negativ geladenen PtdIns(4,5)P_2-Kopfgruppen der Plasmamembran vollzieht AP-2 eine kontrollierte umfangreiche Konformationsänderung mit vollständiger Neuausrichtung der Untereinheit C-µ2. Diese ermöglicht AP-2 in der nun als aktiv oder offen bezeichneten Konformation (rechts) u. a. die effiziente Bindung von Phospholipiden der Plasmamembran (+/-) sowie die Bindung eines Tyrosin-haltigen und eines sauren Dileucin-haltigen ([DE]XXXL[LI]) Sortierungssignals (abgewandelt nach Jackson et al., 2010[106]).

Im Zuge der PtdIns(4,5)P_2-vermittelten Konformationsänderung löst sich neben C-µ2 auch die β2-*Hinge*-Region samt CBM aus seiner Bindungstasche im Bereich des *Core*-Komplexes[96] und ermöglicht die Bindung an die N-terminalen β-Propeller von Clathrin[93,119]. Gemeinsam mit einer zusätzlichen Bindung des CHC *Knöchel*-Segments[120] an Anteile der β2-*Ear*-Domäne[121] erfolgt auf diese Weise erst nach Bindung der Plasmamembran eine effiziente Rekrutierung von Clathrin an den Ort des sich bildenden Vesikels[122,123].

Des Weiteren ist im Bereich der *Linker*-Region (dt. Verknüpfungsregion) zwischen N-µ2 und C-µ2 ein Threonin-Rest[124] an Position 156 lokalisiert, der von der Proteinkinase AAK1 (engl. *adaptor-associated protein kinase 1*) phosphoryliert werden kann[125] und auf diese Weise eine offene Konformation des Adaptorkomplexes begünstigt[126], die mit einer verbesserten Membranbindung einhergeht[127-129]. Gleichzeitig ermöglicht die bereits zu Beginn der Vesikelbildung einsetzende und über die Dauer der weiteren Vesikelreifung kontinuierlich voranschreitende Phosphorylierung von AP-2 eine effiziente Bindung von NECAPs (engl. *adaptin ear-binding coat-associated proteins*), die mithilfe eines C-terminal lokalisierten WXXF-Motivs die *Ear*-Domäne von α-Adaptin[130-132] sowie mithilfe einer N-terminal lokalisierten PH-Domäne (engl. *pleckstrin homology*) die phosphorylierte *Linker*-Region von µ2 binden[126,133]. Zusätzlich interagieren NECAPs mithilfe ihrer PH-Domänen mit einer Vielzahl akzessorischer Proteine, die Peptidsequenzen der Form FXDXΦ aufweisen[134], und nehmen auf diese Weise - beispielsweise über die Adaptoren SNX9 (engl. *sorting nexin-9*), Amphiphysin und CALM[135] (engl. *clathrin assembly lymphoid myeloid leukemia protein*) - indirekt Einfluss auf die Anzahl und Größe neugebildeter CCVs[136]. Kürzlich publizierte Daten unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass die durch AAK1 erfolgte Phosphorylierung von µ2 und die damit eingeleitete Bindung von NECAPs ein wichtiges regulatorisches Element darstellen, welches die weitere Genese des CCV steuert[126].

2.3.4. Monomere Clathrin-Adaptoren

Neben AP-2 interagieren im Rahmen der CME zahlreiche weitere Adaptoren anhand kurzer linearer Peptidsequenzen mit der *terminalen Domäne* von Clathrin. Hierbei erfolgt die Bindung von Adaptoren, die wie AP-2 über ein CBM (LΦXΦ[DE]) verfügen, zwischen dem ersten und zweiten Blatt des β-Propellers[93,94], während die Bindung von Adaptoren wie SNX9 und Amphiphysin, die über eine sogenannte *W-Box* (PWXXW) verfügen[137], im Zentrum der *terminalen Domäne* erfolgt[138]. Zusätzlich existieren mit dem *Arrestin-Box-Motiv*[139] ([LI][LI]GXL) und dem erst kürzlich beschriebenen *Royle-Box-Motiv*[140], dessen Sequenz bislang noch nicht aufgeklärt werden konnte, zwei weitere Bindungsmotive, die eine Clathrin-Bindung einzelner Adaptoren im Bereich zwischen dem vierten und fünften (*Arrestin-Box*) bzw. sechsten und siebten (*Royle-Box*) Blatt des N-terminalen β-Propellers ermöglichen.

Darüber hinaus interagieren zahlreiche Adaptoren anhand kurzer linearer Peptidsequenzen mit den *Ear*-Domänen von AP-2[141]. Diese setzen sich im Wesentlichen aus einem neunsträngigen N-terminalen β-Sandwich, einem fünfsträngigen C-terminalen β-Faltblatt sowie einem kurzen dazwischenliegenden, proteolytisch jedoch nur schwer zugänglichen *Linker* zusammen[142,143]. Eine hydrophobe Bindungstasche an der Oberseite der α-*Ear*-Domäne ermöglicht in diesem Zusammenhang eine Bindung insbesondere der Adaptoren Amphiphysin, Auxilin, Epsin und AP180 anhand eines Bindungsmotivs, das der Konsensussequenz DP[FW] entspricht[144]. Eine leicht veränderte Konformation der β2-*Ear*-Domäne resultiert in einer Interaktion mit nur einem Bruchteil dieser Adaptoren, ermöglicht jedoch die Bindung von Clathrin[121].

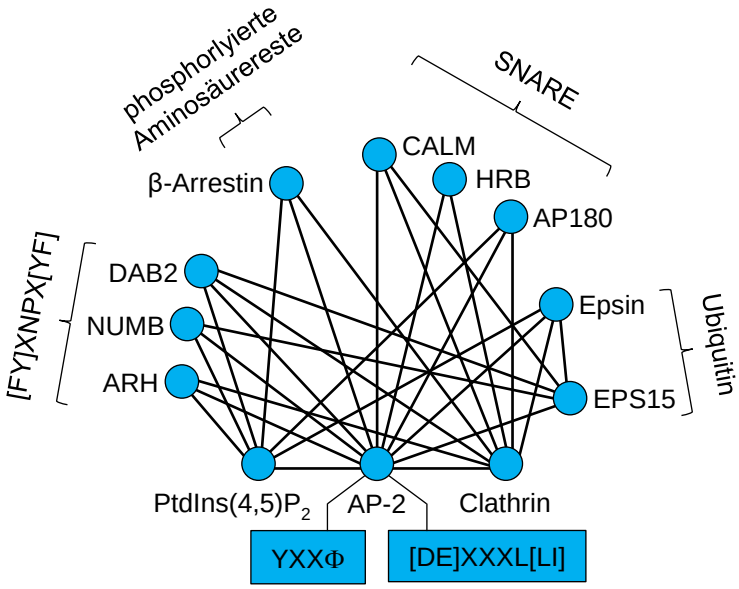


Abb. 8: Simplifiziertes Interaktionsnetzwerk. Vereinfachte Darstellung eines Netzwerks bestehend aus Wechselwirkungen zwischen AP-2, $PtdIns(4,5)P_2$ der Plasmamembran, Clathrin sowie einer Auswahl monomerer Adaptoren, die im Rahmen der CME miteinander interagieren. Zusätzliche Darstellung einzelner Bindungspartner / Sortierungssignale (abgewandelt nach Traub, 2009[16]).

Zusätzlich interagieren sämtliche Adaptoren mithilfe unterschiedlicher Bindungsdomänen mit Phospholipid-Kopfgruppen der Plasma- bzw. Vesikelmembran. Eine darüber hinausgehende Bindung von Sortierungssignalen, die allesamt im unstrukturierten zytoplasmatischen Anteil integraler Membranproteine lokalisiert sind und von kurzen linearen Peptidsequenzen über phosphorylierte Seitenketten bis hin zu ubiquitinierten Proteinbestandteilen reichen (Abb. 8), ermöglicht zudem einen hoch selektiven Transport von Frachtmolekülen im Zuge der CME[16]. Eine Bindung unterschiedlicher Sortierungssignale an verschiedene Adaptoren stellt hierbei eine zielgerichtete, variable und zugleich weitestgehend nicht-kompetitive Akkumulation von Fracht im sich bildenden CCV sicher[145]. Auf diese Weise wird beispielsweise gewährleistet, dass neben *Cargo*-Membranproteinen und deren Liganden auch die notwendigen SNARE-Proteine (engl. *soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor*) mit aufgenommen werden, die für eine spätere Vesikel-Fusion erforderlich sind[135].

Tyrosin-haltige Peptidsequenzen (YXXΦ), die von der C-terminalen Hälfte der µ2-Untereinheit gebunden werden, sowie saure Dileucin-Motive ([DE]XXXL[LI]), die mit der σ2-Untereinheit des heterotetrameren Adaptorkomplexes AP-2 interagieren, sind Beispiele für Sortierungssignale (siehe Kapitel 2.3.2). Darüber hinaus existieren weitere lineare Peptidsequenzen, die von monomeren Adaptoren, den sogenannten Clathrin-assoziierten Sortierungsproteinen (engl. *clathrin-associated sorting proteins*, CLASPs), erkannt und gebunden werden[146]. Hierzu zählen unter anderem Sortierungssignale, die der Konsensussequenz [FY]XNPX[YF] entsprechen[147] und von CLASPs mit einer PTB-Domäne (engl. *phosphotyrosine-binding*) gebunden werden[148,149]. Entsprechende Beispiele sind die beiden monomeren Adaptorproteine DAB2 (engl. *disabled homolog 2*) und ARH (engl. *autosomal recessive hypercholesterolemia protein*)[150], welche unter anderem die Endozytose des LDL-Rezeptors (engl. *low-density lipoprotein*) - eines klassischen, über CME internalisierten Frachtproteins - vermitteln[151]. Zudem sind einige CLASPs mit PTB-Domäne, wie beispielsweise der Adaptor Numb[152], an der Endozytose verschiedener Integrine beteiligt, deren β-Ketten ein NPX[YF] Sequenzmotiv aufweisen[153]. Auf diese Weise sind CLASPs unter anderem an der regulierten Ausbildung von Adhäsionskontakten beteiligt und nehmen Einfluss auf die Adhäsionsfähigkeit und Beweglichkeit der Zelle.

Neben kurzen linearen Peptidsequenzen dienen zudem posttranslationale Modifikationen einer Vielzahl von Membranproteinen als Sortierungssignal. Hierunter fallen insbesondere Transporter, Ionenkanäle und Rezeptoren, die nicht kontinuierlich, sondern nur in bestimmten Konstellationen und zeitlich begrenzt endozytiert werden. Insbesondere an Lysin gebundenes Ubiquitin stellt ein verbreitetes Sortierungssignal dar, das von einigen CLASPs, wie z.B. den Proteinen Epsin und EPS15 (engl. *epidermal growth factor receptor substrate 15*)[154], mithilfe eines *Ubiquitin-interagierenden Motivs* (UIM) erkannt und gebunden wird[155-157]. Ein Protein, das neben dem YXXΦ-Motiv und dem sauren Dileucin-Motiv zusätzlich ubiquitiniert wird, ist der Wachstumsfaktorrezeptor EGFR (engl. *epidermal growth factor receptor*)[158].

Eine weitere Form reversibler posttranslationaler Markierung von Frachtproteinen ist die Phosphorylierung. Besonders gut untersucht sind aktivierte G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (engl. *G protein-coupled receptors,* GPCRs), welche infolge einer C-terminalen Hyperphosphorylierung von Adaptoren der β-Arrestin-Familie erkannt und gebunden werden [159]. Hierbei erfolgt erst nach Bindung des aktivierten Rezeptors eine Konformationsänderung, die es β-Arrestin ermöglicht, mit der β2-*Ear*-Domäne zu interagieren und auf diese Weise sicherzustellen, dass an β-Arrestin gebundene aktivierte Rezeptoren zum CCP/CCV rekrutiert werden[123,160]. Auf diese Weise trägt die CME maßgeblich zur Regulation diverser Signalketten bei und ist an der sogenannten Rezeptor-Desensitisierung beteiligt, die einer Überstimulation der Zelle entgegenwirkt[161,162].

Der Adaptor CALM sowie sein Neuronen-spezifisches Homolog AP180 wiederum nehmen mithilfe einer N-terminal lokalisierten amphiphilen Helix regulatorischen Einfluss auf Größe und Bildungsrate von CCVs[135,163]. Gleichzeitig ist CALM in der Lage, ähnlich wie der Adaptor HRB (engl. *HIV-1 Rev-binding protein*)[164], SNARE-Proteine zu binden[165,166], die eine wichtige Funktion im Hinblick auf eine spätere Fusion des Vesikels mit seinem Zielorganell ausüben. CALM/AP180 ist neben AP-2 einer der häufigsten Adaptoren innerhalb der CCV-Hülle[15,167] und besitzt die Fähigkeit, mit beiden *Ear*-Domänen des heterotetrameren Adaptorkomplexes zu interagieren[168,169].

Darüber hinaus besitzen einige Adaptoren die Fähigkeit, sich an der Membrankrümmung des sich bildenden Vesikels zu beteiligen oder den bereits vorherrschenden Krümmungsgrad zu detektieren. Beispiele hierfür sind Proteine der Epsin-Familie, die über eine gekrümmte ENTH-Domäne (engl. *epsin N-terminal homology*) verfügen[170,171], sowie Amphiphysin, welches eine aus drei α-Helices bestehende halbmondförmige BAR-Domäne (engl. *Bin, Amphiphysin, Rvs*) besitzt[172,173]. Mithilfe einer zusätzlichen SH3-Domäne (engl. *SRC homology 3*) kann Amphiphysin zudem mit Prolin-reichen Peptidsequenzen interagieren, die der Konsensussequenz PXRPXR entsprechen, und auf diese Weise u. a. die GTPase Dynamin binden (siehe Kapitel 2.4.1)[174-176]. Infolge weiterer Bindungsstellen für die *Ear*-Domänen von AP-2 und die terminalen Domänen von Clathrin sowie aufgrund einer präferierten Bindung stark gekrümmter Membranen durch die BAR-Domäne ohne gleichzeitige Präferenz für PtdIns(4,5)P_2 der Plasmamembran erfolgt die Rekrutierung von Proteinen mit einer BAR-Domäne überwiegend an den Rand tief invaginierter Vesikel, infolgedessen eine zeitlich und örtlich fein abgestimmte Rekrutierung weiterer Proteine, wie zum Beispiel der GTPase Dynamin, zum weit herangereiften Vesikel realisiert wird[177].

2.4. Vesikelabschnürung und Disassemblierung

Die letzten beiden Phasen der CME bestehen aus einer regulierten Freisetzung des neu gebildeten CCV in den zytoplasmatischen Raum sowie der bereits unmittelbar anschließend einsetzenden enzymatisch koordinierten Disassemblierung seiner aus Clathrin, AP-2 und zahlreichen weiteren Proteinen bestehenden Vesikelhülle.

2.4.1. Dynamin

Im Rahmen der CME ist das Protein Dynamin, ein Mechanoenzym mit GTPase-Aktivität[178] und einer molekularen Masse von rund 100kDa[179], maßgeblich an der Abschnürung und Freisetzung tief invaginierter CCVs von der Plasmamembran beteiligt. Durch Selbstassemblierung unter Ausbildung eines spiralförmigen Polymers ist Dynamin imstande, die letzte tubuläre Verbindung zwischen Plasmamembran und dem sich bildenden Vesikel zu

umwickeln[180,181], Nukleotid-getrieben zu verengen[182-184] und die Vesikel-Ablösung unter GTP-Hydrolyse zu katalysieren[185,186].

Sowohl strukturell als auch funktional lässt sich Dynamin in insgesamt fünf verschiedene Domänen unterteilen[187] (Abb. 9A). Der für die Nukleotid-Bindung und -Hydrolyse notwendigen *G-Domäne* am N-terminalen Ende des Moleküls[188] schließen sich eine für die Oligomerisierung erforderliche *mittlere Domäne*[189] sowie eine für die Phospholipid-Bindung notwendige PH-*Domäne* (PHD) an[190], gefolgt von einer *GTPase-Effektor-Domäne* (GED)[191,192] sowie einer C-terminalen *Prolin-reichen Domäne* (PRD), die eine Interaktion mit SH3-Domänen weiterer Proteine ermöglicht[193-195]. Strukturell bildet hierbei die im Wesentlichen aus einem achtsträngigen β-Faltblatt bestehende *G-Domäne* das als *Kopf* bezeichnete obere Ende des Dynamin-Moleküls[196,197], das über ein flexibles *Bündelsignalelement* (BSE) aus drei kurzen α-Helices[198] und einen weitestgehend starren *Stiel* aus insgesamt vier langstreckigen α-Helices[199] mit dem siebensträngigen β-Sandwich der *PH-Domäne* am unteren als *Fuß* bezeichneten Ende des Moleküls verbunden ist[187].

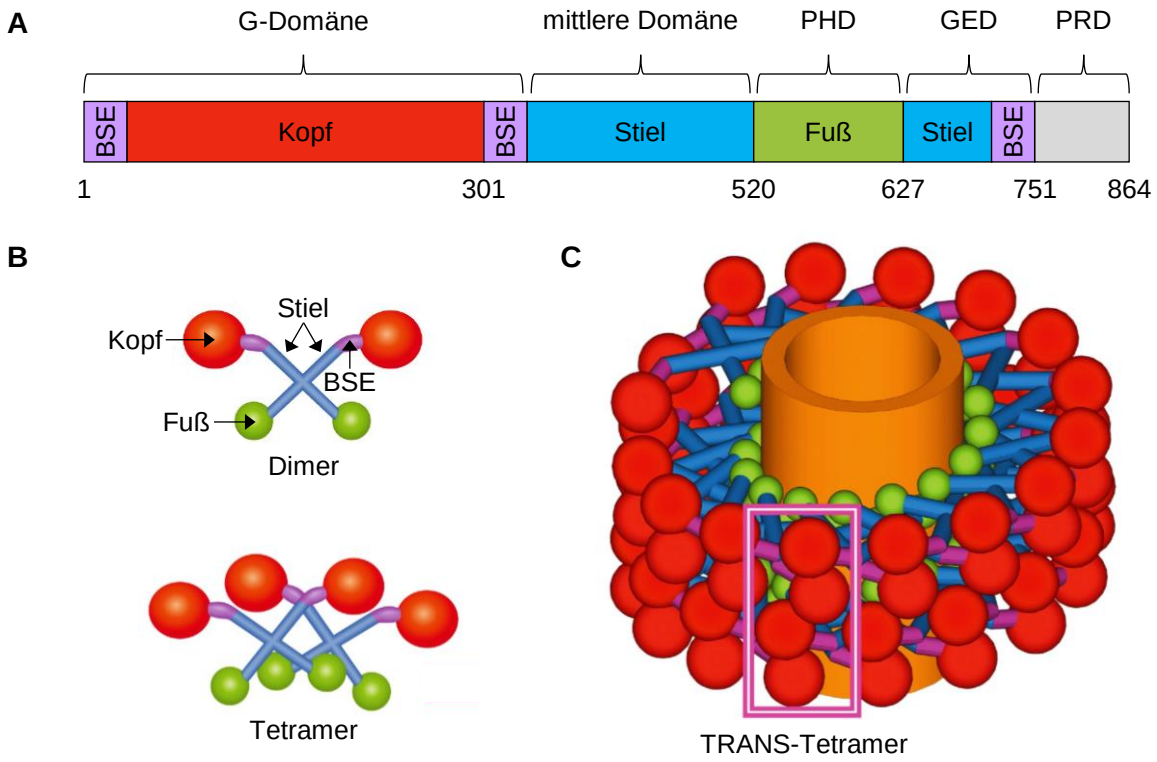


Abb. 9: Dynamin. A: Organisation der GTPase Dynamin mit Kennzeichnung einzelner funktioneller Domänen (oberhalb der Grafik) und struktureller Einheiten (innerhalb der Grafik) sowie Angabe fortlaufend durchnummerierter Aminosäurereste an ihren Grenzen (unterhalb der Grafik). **B:** Vereinfachte räumliche Darstellung eines Dynamin-Dimers mit Angabe aller strukturellen Einheiten (oben) sowie eines entsprechenden Dynamin-Tetramers (unten). **C:** Membran-umlaufende Dynamin-Helix. Gesonderte Kennzeichnung einer mit erhöhter GTPase-Aktivität einhergehenden TRANS-Tetramerisierung[200,201] vierer G-Domänen (abgewandelt nach Antonny et al., 2016[27]).

Insgesamt drei verschiedene Gene kodieren für unterschiedliche Isoformen, von denen Dynamin-1[202] und Dynamin-3[203] hauptsächlich neuronal exprimiert werden, wohingegen Dynamin-2 ubiquitär vorkommt[204]. Verschiedene Splice-Varianten erhöhen zusätzlich die Anzahl unterschiedlicher Isoformen. In Lösung oligomerisiert Dynamin zu Homodimeren[205,206] sowie vorrangig zu Homotetrameren[207-209] (Abb. 9B). Die Bindung von Phospholipiden ermöglicht eine weitere Selbstassemblierung unter Ausbildung des spiralförmigen Polymers und geht zugleich mit einer gesteigerten GTPase-Aktivität einher[209-212] (Abb. 9C).

In Abwesenheit von Nukleotiden polymerisiert Dynamin zu einer membranumhüllenden rechtsläufigen Helix mit einem Außendurchmesser von gut 50nm und einem Innendurchmesser von rund 20nm[184]. Die Interaktion mit Nukleotiden resultiert in einer Konstriktion der Dynamin-Helix, gekennzeichnet durch eine Verringerung des interhelikalen Abstands, eine Abnahme an Dynamin-Molekülen pro Helix-Windung sowie einen verminderten Außen- (~40nm) und Innendurchmesser (~7nm)[213-215]. Darüber hinaus kann das Dynamin-Polymer unter Ausbildung einer doppelläufigen Helix einen als *Superkonstriktion* bezeichneten Zustand annehmen, der einen Innendurchmesser von weniger als 4nm aufweist[216]. Ob die im Zuge der GTP-Hydrolyse freiwerdende Energie hierbei unmittelbar für eine zunehmende Konstriktion des Dynamin-Polymers genutzt wird[200,201] oder viel mehr für eine koordinierte Disassemblierung[217,218] des bereits infolge der Nukleotid-Bindung hinreichend verengten Dynamin-Polymers[219,220] benötigt wird, ist Gegenstand aktueller Forschung.

Darüber hinaus scheint Dynamin, neben seiner katalytischen Funktion im Rahmen der Vesikel-Abschnürung, zusätzlich an der Unterhaltung eines regulatorischen Checkpoints beteiligt zu sein, der den Abbau fehlerbehafteter CCPs zu einem vergleichsweise frühen Zeitpunkt der Vesikelbildung vermittelt[221-226].

2.4.2. Hsc70 und Auxilin

Die unmittelbar nach CCV-Freisetzung in den zytoplasmatischen Raum erfolgende koordinierte Disassemblierung der Vesikelhülle[227,228] wird von den beiden Proteinen Hsc70[229,230] (engl. *heat shock cognate protein 70)* und Auxilin[231,232] vermittelt. Hsc70 ist ein Chaperon mit einer molekularen Masse von rund 70kDa, das über eine große (44kDa) N-terminal lokalisierte *Nukleotid-bindende Domäne* (NBD) mit ATPase-Aktivität[233,234], eine mittelgroße (18kDa) *Substrat-bindende Domäne* (SBD)[235,236] sowie eine kleine C-terminale Domäne (10kDa) verfügt, die eine Konformationsänderung in Abhängigkeit von der Nukleotid-Bindung vollziehen kann[237]. Auxilin wiederum, das seinen Namen einer *in vitro* beobachteten erleichterten Clathrin-Polymerisation verdankt (lat. *auxilium*, dt. Unterstützung)[238], besitzt eine N-terminal lokalisierte Domäne[239] mit struktureller Ähnlichkeit zur Phosphatase PTEN (engl. *phosphatase and tensin homolog*)[240,241], die eine spezifische Bindung an Phospholipide des neugebildeten Vesikels vermittelt[228]. Eine weitestgehend unstrukturierte zentral gelegene

Domäne ermöglicht zudem eine Bindung an Clathrin, während die sogenannte J-Domäne am C-terminalen Ende des Moleküls Hsc70 bindet[242,243] und eine Steigerung der ATPase-Aktivität bedingt[244,245].

Im Rahmen der CME vermittelt Auxilin, bzw. in nicht-neuronalen Geweben das z.T. als Auxilin-2 bezeichnete ubiquitär exprimierte Protein GAK (engl. *cyclin G-associated kinase*)[246], eine spezifische Rekrutierung von Hsc70 an das frisch gebildete CCV[247,248] . Hierzu bindet Auxilin innerhalb des Clathrin-Gitters an die C-Termini einzelner CHCs im Bereich des von ihnen gebildeten *Tripods*, unterhalb der Eckpunkte des Gitters[249,250]. Die Bindung von Auxilin resultiert in einer Distorsion miteinander interagierender CHC-Segmente und bedingt eine Änderung der Achsenverhältnisse innerhalb des Clathrin-Gitters. Gleichzeitig befördert Auxilin mithilfe seiner J-Domäne ATP-gebundes Hsc70 in den Bereich unterhalb der Gittereckpunkte[50]. Hier interagiert die SBD von Hsc70 mit einer Peptidsequenz der Form QLMLT[251] innerhalb des unstrukturierten C-terminalen Bereichs einer CHC (Abb. 2C) und bindet infolge der ATP-getriebenen Konformationsänderung fest an diese. Die Bindung resultiert zunächst in einer weiteren Distorsion einzelner CHC-Segmente und führt schließlich zur Disassemblierung des gesamten Clathrin-Gitters. Diese erzielt Hsc70 entweder durch eine sterische Hinderung, infolge derer spontan auftretende thermische Fluktuationen zu einer lösenden Kraft akkumulieren[252,253], oder - wie in einem alternativen Modell postuliert - durch die aktive Kollision mit Bestandteilen der Vesikelhülle[254,255]. Nach Disassemblierung des Clathrin-Gitters löst sich Hsc70 von seinem Co-Faktor Auxilin, bleibt im ADP-gebundenen Zustand jedoch zunächst an Clathrin gebunden und verhindert auf diese Weise eine unmittelbare Reassemblierung freigesetzter Clathrin-Triskelen[256]. Erst die durch Nukleotid-Austauschfaktoren begünstigte Lösung von ADP[257] ermöglicht die koordinierte Freisetzung der gebundenen Clathrin-Triskele und erlaubt sowohl Clathrin als auch Hsc70, ebenso wie AP-2 und den übrigen Bestandteilen der Vesikelhülle, die Beteiligung an einem neuen Interaktionszyklus[258,259].

2.5. Fragestellungen und Ziel der Arbeit

Im Rahmen der CME interagieren dutzende, teils strukturverleihende, teils regulatorisch agierende Proteine in einer komplexen und zugleich fein aufeinander abgestimmten Art und Weise miteinander. Der heterotetramere Adaptorkomplex AP-2 nimmt innerhalb dieses engverflochtenen Interaktionsnetzwerks als quantitativ dominierender Adaptor mit einer Vielzahl unterschiedlicher Interaktionspartner eine Schlüsselposition ein.

In der vorliegenden Arbeit sollten daher die Auswirkungen eines siRNA-vermittelten KD von AP-2 auf die CME insgesamt sowie auf die Endozytose verschiedener Klassen von Membranproteinen im Einzelnen untersucht werden. Im Mittelpunkt hierbei stand die massenspektrometrische Analyse des Plasmamembran-Proteoms von AP-2-depletierten und -nicht-depletierten HeLa-Zellen. Ferner sollte - in Anbetracht einer kontrovers geführten Diskussion hinsichtlich der Relevanz alternativer Endozytosewege - der Einfluss einer durch den KD von AP-2 inhibierten CME auf die Endozytose einzelner Klassen von Membranproteinen bewertet werden. Ein besonderer Fokus sollte hierbei auf Membranproteine mit Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker sowie auf Proteine aus der Gruppe der Integrine gelegt werden. Abschließend sollten Proteine mit humanpathogener Relevanz identifiziert werden, die an der Plasmamembran AP-2-depletierter Zellen stark akkumulieren und somit potenzielle zukünftige Ziele für eine zielgerichtete molekulare Therapie darstellen.

3. Publikation

Check for updates

Received: 25 October 2020 | Revised: 19 November 2020 | Accepted: 19 November 2020 | Published on: 18 December 2020

DOI: 10.1111/tra.12770

ORIGINAL ARTICLE

Traffic WILEY

Inhibition of clathrin-mediated endocytosis by knockdown of AP-2 leads to alterations in the plasma membrane proteome

David Tobys[1] | Lisa Maria Kowalski[1] | Eva Cziudaj[1] | Stefan Müller[2] | Peter Zentis[3] | Elke Pach[4] | Paola Zigrino[4] | Tobias Blaeske[5] | Stefan Höning[1]

[1]Institute for Biochemistry, Medical Faculty, University of Cologne, Cologne, Germany

[2]Center for Molecular Medicine Cologne (CMMC), University of Cologne, Cologne, Germany

[3]CECAD Cluster of Excellence, University of Cologne, Cologne, Germany

[4]Department of Dermatology, Medical Faculty, University of Cologne, Cologne, Germany

[5]Department of Plant Physiology and Biochemistry, University of Constance, Constance, Germany

Correspondence
Stefan Höning, Institute for Biochemistry I, Medical Faculty, University of Cologne, Cologne, Germany.
Email: shoening@uni-koeln.de

Funding information
Cologne Fortune Program of the Medical Faculty; Deutsche Forschungsgemeinschaft, Grant/Award Number: SFB829 Project-ID 73111208

Abstract

In eukaryotic cells, clathrin-mediated endocytosis (CME) is a central pathway for the internalization of proteins from the cell surface, thereby contributing to the maintenance of the plasma membrane protein composition. A key component for the formation of endocytic clathrin-coated vesicles (CCVs) is AP-2, as it sequesters cargo membrane proteins, recruits a multitude of other endocytic factors and initiates clathrin polymerization. Here, we inhibited CME by depletion of AP-2 and explored the consequences for the plasma membrane proteome. Quantitative analysis revealed accumulation of major constituents of the endosomal-lysosomal system reflecting a block in retrieval by compensatory CME. The noticeable enrichment of integrins and blockage of their turnover resulted in severely impaired cell migration. Rare proteins such as the anti-cancer drug target CA9 and tumor markers (CD73, CD164, CD302) were significantly enriched. The AP-2 knockdown attenuated the global endocytic capacity, but clathrin-independent entry pathways were still operating, as indicated by persistent internalization of specific membrane-spanning and GPI-anchored receptors (PVR, IGF1R, CD55, TNAP). We hypothesize that blocking AP-2 function and thus inhibiting CME may be a novel approach to identify new druggable targets, or to increase their residence time at the plasma membrane, thereby increasing the probability for efficient therapeutic intervention.

KEYWORDS
ADAM10, Alzheimer, BACE1, blood-brain-barrier, endosome, lysosome, receptor internalization, surface proteomics, surfaceome, transcytosis

1 | INTRODUCTION

Endocytosis is a fundamental pathway in eukaryotic cells, by which parts of the plasma membrane, extracellular macromolecules and cellular receptors are internalized into the cytoplasm. In this way, endocytosis contributes to the distribution of lipids and proteins in the plasma membrane and affects more complex processes such as signaling,[1] antigen presentation[2] and cell migration.[3,4] More than half a dozen different endocytic pathways have been described, however, their individual contribution to the overall endocytic flux of molecules is unclear.[5,6]

The best-studied endocytic route in mammalian cells is clathrin-mediated endocytosis (CME), which is characterized by an increasing invagination of the plasma membrane and the formation of

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.
© 2020 The Authors. Traffic published by John Wiley & Sons Ltd.

clathrin-coated pits and vesicles (CCPs/CCVs). Besides the coat protein clathrin, which shapes a lattice-like structure and facilitates bending of the plasma membrane, numerous other cytosolic factors are involved in CME and contribute to the initiation, progression, scission or disassembly of CCVs.[7,8]

The heterotetrameric protein complex AP-2 is the second most abundant protein in CCVs.[9] It is composed of the two large subunits α- and β2-adaptin (~100 kDa), one medium-sized μ2-subunit (~50 kDa), as well as one small-sized σ2-subunit (~20 kDa). AP-2 recruits clathrin and more than 20 other endocytic factors, mostly via the hinge-regions and the carboxy-terminal appendages (ears) of its two large subunits.[10] AP-2 binds to the plasma membrane at sites rich in PtdIns4,5P_2, which triggers a conformational change of the adaptor complex that initiates its subsequent binding to sorting signals of cargo membrane proteins and recruitment of clathrin.[11]

Besides CME, multiple clathrin-independent endocytosis (CIE) pathways contribute to the maintenance of lipid and protein homeostasis of the plasma membrane. By definition, clathrin is not involved and membrane scission can be either dependent or independent of dynamin GTPases.[5] The cytoskeleton seems of critical importance, most likely because these pathways can internalize a large fraction of the total plasma membrane surface area within minutes.[12] Based on the molecular machinery, different clathrin-independent pathways can be categorized, for example, fast endophilin-mediated endocytosis (FEME),[13] macropinocytosis[14] or the CLIC/GEEC pathway.[15] The latter one is considered a major route for internalization of glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins, while FEME facilitates endocytosis of selected G protein-coupled receptors (GPCRs). In a different functional context, large amounts of fluid and nutrients can be taken up by macropinocytosis, which serves as a sampling of the environment.

Here, we used an acute depletion (knockdown [KD]) of the AP-2μ2-subunit to perturb CME through destabilizing AP-2 heterotetramers. We then quantified changes in the plasma membrane proteome and measured the global endocytic capacity, uptake of receptors and GPI-anchored proteins that utilize either clathrin-dependent or clathrin-independent entry pathways and determined the functional consequences of defective integrin turnover.

2 | RESULTS

2.1 | The cell surface proteome is altered in AP-2 depleted cells

Endocytosis from the cell surface can occur by various pathways and may be clathrin-dependent or -independent. To address the consequences of inhibited CME, we used acute depletion of the AP-2μ-subunit by siRNA oligonucleotides. This approach is known to result in instability and loss of AP-2 and thus inhibits the efficient formation of endocytic CCVs.[16-20] Our protocol for the KD of μ2 resulted in ≥90% depletion of μ2 mRNA and an equivalent decrease in protein expression (Figure S1A-C). The concomitant drop of α-adaptin expression by more than 60% (Figure S1A) revealed destabilization of the AP-2 complex and is indicative of the known susceptibility of its subunits for premature degradation.[16] Expression of subunits of AP-1 and AP-3 remained unaffected (Figure S1A) and localization of both complexes by immunofluorescence was equivalent in mock-treated control and μ2 KD cells (*not shown*), thus indicating that the knockdown specifically affected AP-2. As expected, staining of endocytic CCPs/CCVs by immunofluorescence almost vanished in μ2 KD cells (Figure S1D), and endocytosis of known cargoes, such as transferrin bound to its receptor, or surface-exposed LAMP1 was severely inhibited, as visualized by confocal microscopy (*not shown*) and quantified by flow cytometry (Figure S1E).

In fact, blockage of CME should affect hundreds of cell surface proteins, which for example serve as receptors, constitute channels or function as enzymes or adhesion factors. Furthermore, CME dependent retrieval of membrane proteins from intracellular organelles (eg, small vesicles, endosomes, lysosomes, diverse granules, etc.), which temporarily appear at the cell surface, should be compromised by depletion of AP-2. Hence, we determined these effects by quantitative proteomics. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC) was established, cells were either mock- or μ2 siRNA-treated and proteins at the cell surface were labeled with aminooxy-biotin,[21,22] followed by their capture from cell lysates with streptavidin-coated beads. Finally, captured proteins were processed for quantitative mass spectrometry (see Material and Methods and Figure 1A for illustration). As a first result, a total of 2412 proteins were identified based on their presence in at least three of six individual biological replicates. These proteins thus represent the HeLa surface proteome (surfaceome) of this study. The complete data set is documented in Table S1 (sheet A) and the mass spectrometry raw data are accessible via the Pride repository (data set identifier PXD014925). The list of hits was not further filtered for possible contaminating proteins, for example, those with Gene Ontology (GO) annotations of nucleus, endoplasmic reticulum (ER), cytosol, cytoskeleton or other, because a significant number of them could have been captured via direct or indirect interactions with plasma membrane proteins.

We next used the data derived from mock-treated control HeLa cells and ranked proteins by their intensity-based absolute quantification (iBAQ) light values, which reflects their relative abundance.[23] A graphical representation is depicted in Figure 1B and the complete ranking is given in Table S1 (sheet C). This ranking revealed that the seven most abundant proteins already accounted for 20% of the total cell surfaceome mass. In the same way, only few proteins covered 40% (n = 25) and 80% (n = 187) of the total protein mass. This illustrates that a rather small number of integral and GPI-anchored membrane proteins dominate the HeLa cell surface proteome. These values are in line with published data sets that describe an almost identical ranking for the highly abundant proteins 4F2hc, Basigin, CD44, CD59, ATP1B1 and ITGB1. Furthermore, the matching between the complete surface proteome data sets is very similar (see Venn diagram in Figure 1C),[24-26] allowing us to conclude that the

capture of proteins via the biotinylation labeling/streptavidin capture strategy was successful.

The depletion of AP-2 had a major impact on the surface proteome, which is graphically illustrated in the volcano plot of the surfaceome data (Figure 2). Among all 2412 identified proteins (dots in the graph), a fraction of 1628 hits is above the dashed, horizontal significance line (false discovery rate [FDR] < 0.01). These proteins

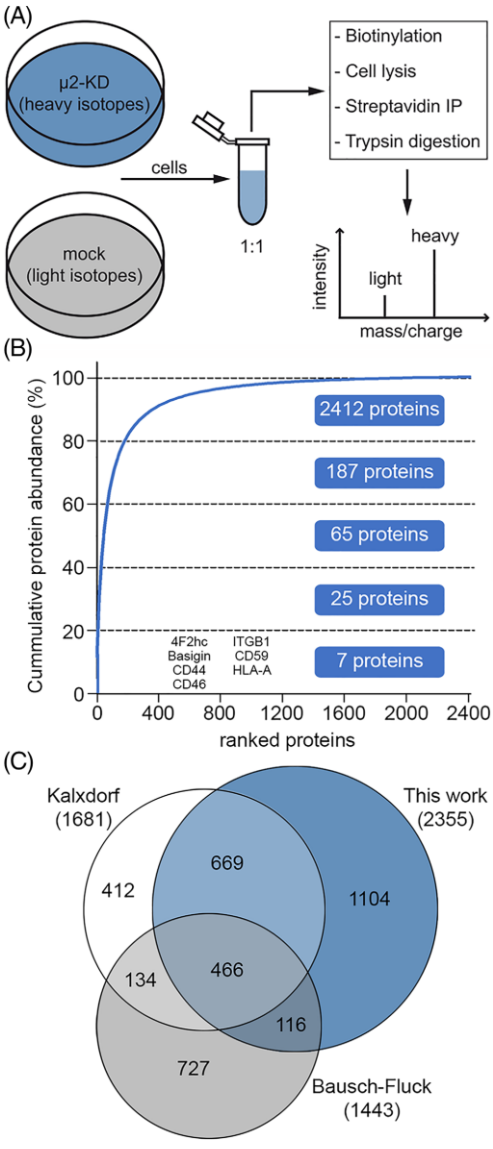


FIGURE 1 Cell surface proteomics of HeLa mock and μ2 KD cells. A, Workflow of quantitative surface proteomics in μ2 KD cells. After SILAC labeling with heavy or light lysine/arginine isotopes, heavy labeled HeLa cells were subjected to μ2 KD, while light labeled cells were mock-treated. Subsequently, equal numbers of cells were mixed 1:1, followed by cell surface biotinylation, cell lysis and isolation of labeled proteins by streptavidin immunoprecipitation (IP). After washing and tryptic digestion, proteins were identified by quantitative mass spectrometry. This workflow was carried out for six biological replicates. B, Graph displaying the cumulative protein mass from the highest to the least abundant protein. Data result from intensity-based absolute quantification (iBAQ) values of all identified proteins (surface proteome) of mock-treated HeLa cells. Names of the seven most abundant proteins, which accounted for 20% of the total protein mass, are given. The cumulative number of proteins that represented 20%, 40%, 60%, 80% or 100% of the total protein mass is displayed (blue boxes). C, Venn diagram illustrating coverage of the surface proteome of this study compared with two published data sets.[24,25] The total number of proteins identified in the respective surface proteomes are in brackets

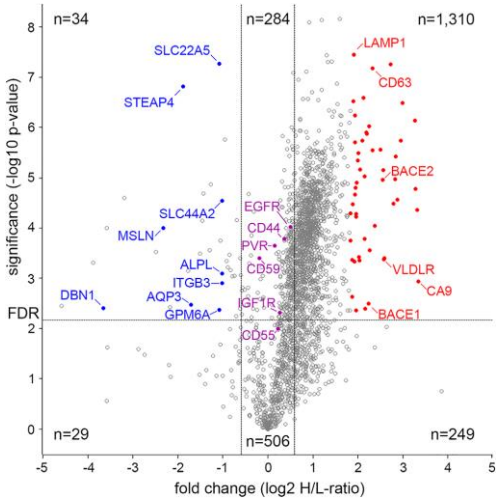


FIGURE 2 Loss of AP-2 leads to profound changes in the plasma membrane proteome. The volcano plot displays all 2412 identified surface proteins and their changes in surface expression upon KD of AP-2. Increased or decreased expression is reflected by positive or negative log2 values of the H/L-ratio. Data quality for each hit in the complete data set is indicated by the respective –log10 *P*-values. The horizontal, dashed line indicates a false discovery rate (FDR) of 0.01. Hits that were affected by a ≥1.5-fold decrease or increase are displayed left or right of the two vertical lines. The 50 most increased proteins are labeled in red (see also Table 1) and selected hits with depleted (blue), increased (red) or unchanged expression (purple) are given with their gene names

can be subdivided into three major categories: proteins with (A) increased, or (B) decreased surface expression and (C) proteins that are marginally or not affected. The vast majority of 1310 hits exhibit ≥50% increased surface expression (log2 ≥ 0.59, dots in upper right area) upon depletion of AP-2, whereas only a small fraction of 34 proteins is depleted (log2 ≤ −0.59, dots in upper left area). Proteins that are not, or only slightly affected by loss of AP-2 account for ∼12% of the surface proteome (n = 284, dots between the dashed vertical lines). To rule out the possibility that differences in labeling with the respective isotopes had influenced the heavy/light (H/L)-ratios, we confirmed an equivalent efficiency of labeling by shotgun analysis of peptides derived from cytosolic proteins, which remained in the supernatants of the biotin/streptavidin immune-isolations (*not shown*). In conclusion, we observed that depletion of AP-2 and the accompanying inhibition of CME led to major alterations in the plasma membrane proteome that affected at least half of all constituents.

For further inspection of the effects caused by μ2 KD, we focused on proteins with log2 values ≥1.5 (n = 103), which we designated "top-upregulated" (see Table S1 sheet B). The first 50 proteins in this group (see Table 1 and Figure 2, red dots in volcano plot) were elevated by 3.5-fold to more than 10-fold and one would expect AP-2 dependent cargo or other membrane proteins that depend on functional CME to be represented in this group. This indeed was the case: 90% of the hits (n = 45) were integral membrane proteins, of which 23 contain known or putative tyrosine-, acidic dileucine- or other endocytic sorting motifs within their cytoplasmic parts. All remaining 22 hits were either known cell surface receptors, channels or transporters, or they have been described to localize to and function in the endomembrane system. Even among the five hits that have been annotated as cytosolic or secreted, NDRG1, collagen 4A1, as well as Glia-derived nexin and PCSK9 are intimately linked to receptor binding and may therefore represent "true" hits.

Surprisingly, the transferrin receptor (TfR), a prominent receptor and known CME cargo was not among the top hits. This seems incompatible with published work and our own functional data (Figure 8) that show >5-fold increase upon KD of AP-2.[17,27,28] Importantly, these values, however, were obtained from quantitative fluorescence microscopy or flow cytometry using assays that probe receptor surface expression by Tf ligand binding or with anti-receptor antibodies. To sort this out, we inspected the mass spectrometry raw data and noticed unusual variations in H/L-ratios of most peptides from the extracellular part of the receptor, while H/L-ratios of the four peptides derived from the intracellular cytoplasmic tail were almost identical, resulting in a log2 H/L value of 1.75. This is equivalent with a 3.4-fold surface increase upon KD of AP-2 (Figure S2). We excluded a systematic problem, because inspection of the peptide spectra of dozens of other receptors revealed consistent H/L-ratios in all other cases. Remarkably, our mass spectrometry data on TfR surface expression are very similar to those of two other published studies that include surface proteomics of AP-2 depleted cells[29,30] which leads us to propose that surface expression of this particular receptor is underestimated by proteomics in AP-2 depleted cells. We assume that the noticeable surface accumulation of the hereditary hemochromatosis protein (HFE, log2 + 1.54) increases the probability of direct binding to the TfR receptor. In fact, HFE is an important regulator of TfR function and known to compete with Tf for receptor binding.[31,32] In addition, two endosomal factors of iron homeostasis,[33,34] the ferrireductase STEAP3[33] (log2 + 0.89) and the iron transporter NRAMP2[34] (SLC11A2, DMT1; log2 + 2.8) became surface exposed as well and are likely to be located in the intimate vicinity of the TfR. As a result, a significant surface area of the receptor is engaged in interactions, leading to decreased availability for biotinylation and capture from μ2 KD cells. While being relevant for mass spectrometry, none of the TfR interactions will affect the above mentioned assays (Tf ligand binding, anti-receptor antibodies), because the strong affinities of both interactions in the sub-nanomolar range will displace HFE and/or other interactors.

Despite this particular detail and with the exception of only a single cytosolic metabolic enzyme, strongly increased surface expression of the remaining 49 most upregulated hits in μ2 KD cells (and furthermore including the TfR) can be attributed directly to the knockdown of AP-2 and the block of CME.

2.2 | KD of μ2 affects surface expression of a diverse range of membrane proteins

The KD of AP-2 most strongly affected surface expression of the four membrane proteins CA9, TMEM123, TMEM106B and PTTG1IP, which were increased by more than 8-fold (log2 H/L > +3). The latter three contain known endocytic tyrosine sorting signals,[35–38] while sorting signals in the carboxyterminal cytoplasmic tail of CA9 remain unknown. The four proteins are functionally diverse: TMEM106B is implicated in regulation of lysosomal activity and reported to drive lung cancer metastasis,[39] TMEM123/Porimin is a cell surface receptor for mediating oncotic cell death,[35] PTTG1IP is a proto-oncogene [40] and CA9 is a regulator of extracellular carbon dioxide and an important anti-cancer drug target.[41] The latter functions as a cell surface exposed enzyme, it has a low surface abundance (iBAQ rank 1887) and is a type-I transmembrane protein with a short, 23 residues spanning cytosolic tail. To test for the presence of a functional sorting signal, we fused the CA9 cytoplasmic tail to the membrane-spanning and extracellular part of a CD8 reporter protein and probed endocytosis by immunofluorescence.[42] CD8-LAMP1, which served as a positive control, underwent rapid uptake and had a predominant vesicular localization, while tail-less CD8 resided at the plasma membrane. To our surprise, CD8-CA9 showed prominent surface staining as well and no sign of any uptake was detectable (Figure 3). At first glance, this seems in conflict with CA9 being the most strongly affected protein in AP-2 KD cells. However, others have shown that CA9 requires its intact cytoplasmic tail for delivery to the cell surface,[43] and two recent studies show intimate association of CA9 with a variety of receptors, monocarboxylate- and amino acid transporters, as well as MMP14 and integrins at the plasma membrane.[44,45] Altogether, we propose that CA9 may enter cells in direct association with interacting cell surface proteins that utilize CME.

TABLE 1 Identified surface proteins with highest enrichment upon KD of μ2

Mean value, log2 H/L	UniProt ID	Protein name	Type of protein	Endo. lyso.	iBAQ ranking	Sorting signal known/ putative
3.34	Q16790	Carbonic anhydrase 9	Type-1		1877	
3.32	E9PKT4	Porimin	Type-1		965	YRTIDEHDAII
3.28	Q9NUM4	Transmembrane protein 106B	Type-2	+	734	YVGF…ENQLVALI
3.26	P53801	PTTG binding factor	Type-1		488	YGLF…YARF
2.99	P42892	Endothelin-converting enzyme 1	Type-2		81	DEEDLV…YPNGL
2.95	A0A0D9SFM4	Sodium/hydrogen exchanger, isoform	Multi-pass		697	
2.88	P07093	Glia-derived nexin	Secreted		890	
2.83	Q92581	Sodium/hydrogen exchanger 6	Multi-pass		874	
2.83	P49281	NRAMP2	Multi-pass	o	813	YLLN
2.79	D6R9B4	Sialomucin core protein 24	Type-1		807	YHTL
2.72	A0A1B0GV11	Sodium/hydrogen exchanger, isoform	Multi-pass	o	1866	
2.58	F8W1P7	NRAMP2, isoform	Multi-pass	o	2208	YLLN
2.57	P98155	Very low-density lipoprotein receptor	Type-1		1225	NPVY
2.56	Q8IX05	CD302 antigen	Type-1		1801	
2.55	Q9Y5Z0	Beta-secretase 2 (BACE2)	Type-1	o	954	
2.50	P34810	Macrosialin	Type-1	+	1558	YQAL
2.38	Q9P1W3	Transmembrane protein 63C	Multi-pass		2299	
2.32	F8W022	LAMP3/Tetraspanin/CD63	Tetraspanin	+	101	YEVM
2.32	Q9NRX5	Serine incorporator 1	Multi-pass		640	
2.26	Q9H1B5	Xylosyltransferase 2	Type-2		2373	
2.25	Q8TCT8	Signal peptide peptidase-like 2A	Multi-pass	+	718	YQMM
2.23	P56817	Beta-secretase 1 (BACE1)	Type-1	o	2234	DDISLL
2.20	Q6ZRP7	Sulfhydryl oxidase 2	Single-pass		361	
2.18	E7ESU6	SCL38A9	Multi-pass	+	833	
2.15	P02462	Collagen alpha-1(IV) chain	Secreted		1867	
2.15	Q9BXP2	Solute carrier family 12 member 9	Multi-pass		2111	
2.14	Q6PCE3	Glucose 1,6-bisphosphate synthase	Cytosolic		2175	
2.13	Q9NP58	ABC transporter 6	Multi-pass	o	1036	
2.09	Q9UIQ6	Leucyl-cystinyl aminopeptidase	Type-2		447	ESSAKLL
2.05	P51790	H(+)/Cl(−) exchange transporter 3	Multi-pass	+	1115	YDDF…YNGF
2.04	P25116	Proteinase-activated receptor 1	Multi-pass		1834	YSIL
2.02	Q86W33	Transmembrane protein 227	Putative GPCR		993	
2.01	Q5T4K4	Zinc transporter ZIP1	Multi-pass		1279	ETRALL
2.00	P42702	Leukemia inhibitory factor receptor	Type-1		2404	YPDI…YCPPI…YIDV
1.98	Q6UXD5	Seizure 6-like protein 2	Type-1	+	760	YSPI…NPLY
1.96	O60637	Tetraspanin-3	Tetraspanin		379	YELLI
1.96	A0A0J9YYJ3	Transmembrane protein 184B	Multi-pass	o	2203	
1.96	O75071	EFCAB14	Unknown		2337	
1.94	Q9BXB1	G-protein coupled receptor 48	Multi-pass		1302	
1.94	Q8NBN3	Transmembrane protein 87A	Multi-pass	o	452	

TABLE 1 (Continued)

Mean value, log2 H/L	UniProt ID	Protein name	Type of protein	Endo. lyso.	iBAQ ranking	Sorting signal known/ putative
1.93	B7Z3R2	Two pore calcium channel protein 1	Multi-pass	+	1190	
1.93	Q4G148	Glucoside xylosyltransferase 1	Type-2		1825	
1.92	L8E8G6	Small integral membrane protein 29	Unknown		1023	LRHLL…SYDPA
1.91	P11279	LAMP1	Type-1	+	90	YQTI
1.89	O43657	Tetraspanin-6	Tetraspanin	+	465	YEIV
1.89	Q8N0Z9	VSIG4	Type-1		980	
1.87	Q92597	Protein NDRG1	Cytosolic		2026	
1.87	Q68CP4	HGSNAT	Multi-pass	+	2270	
1.84	J3KNP4	Semaphorin-4B	Type-1		1893	GYQSL
1.83	Q8NBP7	PCSK9	Secreted		921	

Note: After SILAC and KD of the AP-2 μ2-subunit in HeLa cells, cell surface proteins were biotinylated, captured by streptavidin beads and the proteome was determined by quantitative proteomics in six biological replicates. Hits with positive H/L-values were enriched in the surface proteome of KD cells and those with the highest positive ratio and a false discovery rate (FDR) < 0.01 are listed here. For each hit, a reported localization in endosomes (endo., o) or lysosomes (lyso., +), the respective ranking in surface abundance based on intensity-based absolute quantification (iBAQ) values of control HeLa cells (light isotopes), the known/predicted topology or association with the plasma membrane and any known/putative endocytic sorting signals are displayed. The complete list of enriched surface proteins in μ2 KD cells, the ranking of all identified proteins according to surface abundance and relevant literature are part of Table S1 (sheets B and C, respectively).

The list of upregulated hits in Table 1 contains one protein of unknown function, which is termed SMIM29 (small integral membrane protein 29; C6orf1). The full-length sequence comprises 102 amino acid residues with a predicted single transmembrane helix (type-I, residues 20-42). For analysis of putative sorting signals in the cytoplasmic tail of SMIM29, the carboxy-terminal 61 amino acid residues were fused to the CD8 reporter (CD8-SMIM29) and endocytosis of anti-CD8 antibodies was monitored. The reporter was rapidly internalized from the cell surface as indicated by a bright intracellular staining pattern (Figure 3). We next introduced mutations in the CD8-SMIM29 cytoplasmic tail at five different sites which may resemble either tyrosine- or dileucine-based sorting signals. Two of these mutants, L54A/L55A and Y60A exhibited heavily compromised uptake, while mutations at L73/L74, G89/Y90 and L97/L98 only marginally affected uptake. We conclude that the SMIM29 cytoplasmic tail is sufficient to drive endocytosis of a CD8 reporter because of the presence of at least two functional endocytic sorting motifs (Figure S3).

Various types of sorting signals can be recognized by AP-2,[46] while other cargo-recognizing clathrin adaptors are more restrictive. One such cargo-specific adapter is Dab2, which binds to NPXY-motifs and thereby initiates internalization of the LDL receptor and other related receptors.[47,48] Since Dab2 is a known AP-2 interactor,[49] the depletion of AP-2 should, at least to a certain extent, affect the same cargo. This indeed is the case: surface expression of the LDL receptor was elevated (log2 H/L = +1.71), as well as levels of LRP5 (+0.81), LRP8 (+1.23), LRP10 (+0.94) and LRP11 (+1.09). Other prominent Dab2 dependent cargo proteins are various integrins, whose balanced turnover requires direct binding for subsequent endocytosis.[50] Consistent with these data, we found eight integrin subunits (α2, α4, α5, αV, ß1, ß5, ß6, ß8) with increased surface expression, while only two subunits, integrin α1 and ß3 were decreased (−0.58 and −1.01). Functional integrins are α/ß heterodimeric cell adhesion receptors and thereby essential for cell interactions with extracellular matrix components.[51] Here, we observed perturbed integrin turnover at the cell surface of AP-2 KD cells and hence a cellular process such as migration might be affected.[52] To test this, we performed time-lapse video microscopy of cells seeded onto either plastic, collagen type I or fibronectin. Cell migration was monitored over 24 hours and the migrated distance was calculated by measuring the area covered by the cell sheet at the indicated time points. As shown in Figure 4, migration of μ2 KD cells strongly decreased compared to mock-treated control cells, clearly indicating that the balance of integrin expression at the cell surface and their turnover by CME was abrogated.

2.3 | Inhibition of CME blocks retrieval of endo-lysosomal constituents

The inspection of all significant hits in the surface proteome (see Figure 2) that belong to either the most-abundant, the top-up-/-down-regulated or unchanged proteins for GO annotations of cellular components (Figure 5) revealed the expected dominance of transmembrane and plasma membrane associated proteins. Only few hits have been annotated as secreted proteins, constituents of the ER, Golgi or mitochondria, illustrating the quality of this surface proteome. Another noticeable detail is the exclusive enrichment of endosomal/lysosomal constituents in the fraction of top-upregulated proteins (red arrow in Figure 5). Their increased presence most likely reflects

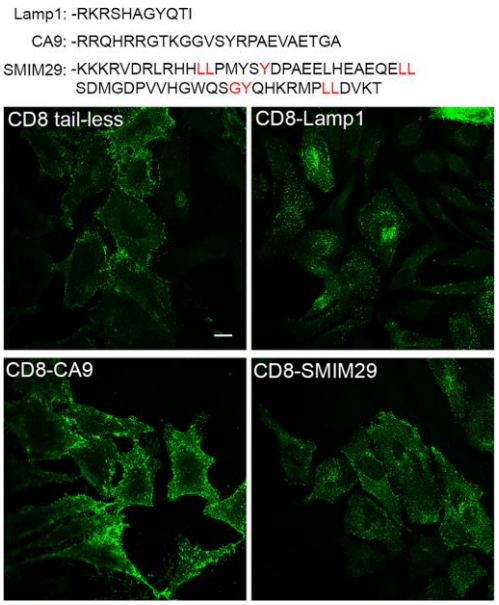


FIGURE 3 Characterization of putative sorting signals in CA9 and SMIM29. The relevance of putative endocytic sorting signals in the cytoplasmic tail sequences of CA9 and SMIM29 was analyzed with CD8 reporter constructs. The indicated variants of CD8 that either lack a cytoplasmic tail (negative control), or contain the full-length cytoplasmic tail sequences of LAMP1 (positive control), CA9 and SMIM29 were cloned and transiently expressed in HeLa cells. Endocytosis was monitored for 30 minutes at 37°C in the presence of anti-CD8 antibodies, after which cells were fixed, permeabilized and incubated with Alexa488-conjugated secondary antibodies to visualize CD8. In additional experiments with an identical setup, CD8-SMIM29 variants with mutations in different cytoplasmic tail residues were analyzed (see Figure S3). Scale bar: 10 μm

an altered exchange between the endomembrane system and the plasma membrane in μ2 KD cells. In healthy cells, two major pathways contribute to the appearance of endosomal/lysosomal membrane proteins at the cell surface: (A) delivery of newly synthesized proteins, and (B) fusion with endo/lysosomal organelles. In a pioneering work, Bonifacino and coworkers used μ2-depleted HeLa cells to show that a significant fraction of newly synthesized LAMP1, LAMP2 and CD63 reaches late endosomes/lysosomes by indirect trafficking via the plasma membrane.[20] In addition, these highly abundant lysosomal membrane proteins and other constituents of the endo/lysosomal system can become surface exposed when lysosomes fuse with the limiting membrane, for example, during repair of the plasma membrane after mechanical damage.[53,54] In the same way, fusion of multivesicular bodies with the plasma membrane is intimately linked to the formation and release of exosomes.[55] As a result of fusion, the constituents of an endo/lysosomal sub-compartment will intermingle with the components of the plasma membrane and finally, rapid endocytosis is required to maintain the equilibrium between the cell's limiting membrane and the endomembrane system.[56] Upon depletion of AP-2 this balance of exchange between intracellular compartments and the plasma membrane is perturbed as a result of impaired retrieval from the plasma membrane and thus cargo accumulates at the cell surface. This explains why major endosomal/lysosomal membrane proteins including LAMP1, LAMP2a/b, LIMP2, NCU-G1, CD63, the cobalamin transporter LMBRD1 or the lysosomal enzyme acid phosphatase appeared as strongly upregulated. The significance of this view is further supported by published data from many labs, which identified sorting motifs for AP-2 in all mentioned hits.[57]

2.4 | Protein networks are affected by depletion of AP-2

Integral plasma membrane proteins can interact with intracellular factors, which for example are required for trafficking, or maintain stable surface exposure via interactions with the cytoskeleton. Likewise, membrane-spanning helices and extracellular domains of neighboring membrane proteins can establish lateral interactions, or bind extracellular soluble ligands, matrix components or surface proteins of contacting cells. A summary of such known and predicted interactions can be visualized based on data that have been deposited in the STRING database (https://string-db.org/). Such data mining revealed that LAMP1 and all its network interactants were increased in the surfaceome of μ2 KD cells (Figure 6A, red arrows). The interactors include Rab5c, which likely accumulated at the plasma membrane because of stalled CCV formation,[58] and Vamp8, a SNARE that here became detectable at the plasma membrane as a result of endo/lysosome fusion with the plasma membrane, which had no longer been balanced by efficient CALM/AP-2-dependent endocytosis.[59] Consistent with our approach of plasma membrane proteomics, interactors of LAMP1 that are cytosolic components of the GATOR1/2 and TORC1 complexes and associate on the cytosolic site of the endo/lysosomal membrane were not identified in the proteome.[60]

Similar to LAMP1, another protein with increased (5-fold) surface expression in μ2 KD cells was CD63 and again, five of its interactors were increased in abundance, too (Figure 6B, red arrows). However, two other interactors, BST2 (tetherin) and STOM (stomatin) were decreased (blue arrows). Interestingly, both are thought to be enriched in lipid rafts,[61,62] which represent specialized areas in the plasma membrane and may engage AP-2/clathrin-independent entry pathways (see below).

The major cell surface proteases ADAM10 and BACE1/2 have essential functions in a wide variety of signal transduction and protein turnover processes and stand out for their cleavage of the amyloid precursor protein APP.[63,64] Analysis of the interactomes (Figure 6C and D) revealed increased expression levels of their major substrates, APP and its relative, the amyloid-like protein 2, APLP2.[64,65] This suggests that the surface-exposed proteases may not be fully active. Indeed, their activity can be modulated by negative regulators or inhibitors such as RTN3 and TIMP1,[66,67] which were also increased in surface expression. In this context, it is interesting to note that the

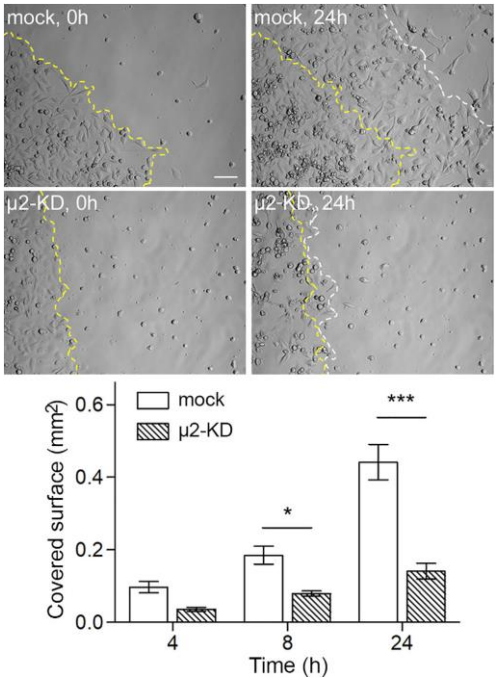


FIGURE 4 Cell migration is compromised in μ2 KD cells. As a readout of functional integrin surface expression and turnover, cell migration of μ2 KD and mock-treated cells was monitored. Equal numbers of cells were seeded in a defined fibronectin-coated area and observed for 24 hours by time-lapse video microscopy. At different time points, images were used to measure the covered area. Representative pictures of mock- (upper panel) and μ2 siRNA-treated cells (lower panel) at 0 and 24 hours are shown. Scale bar: 100 μm. A quantification of the measurements is given in the bar graph. *P*-values of data from two biological replicates were determined by GraphPad Prism 5.0 and a two-way ANOVA (**P* < .05; ****P* < .005)

activity of cell surface proteases including ADAM10, ADAM17 and BACE1/2 can be modulated by tetraspanins, such as CD81, CD151, Tspan14 and Tspan15. As constituents of a tetraspanin web, they may have an impact on localization, compartmentalization and substrate selectivity [68,69]. An obvious follow-up of this study could therefore include the comprehensive analysis of cell surface protease activity and its possible impact on the secretome in μ2 KD cells. However, such an elaborate study is beyond the scope of this work and has to be covered by future experiments.

2.5 | Clathrin-independent pathways are operating in AP-2 KD cells

Internalization via CME represents a major, albeit not exclusive entry pathway into cells, which utilize various CIE pathways to maintain

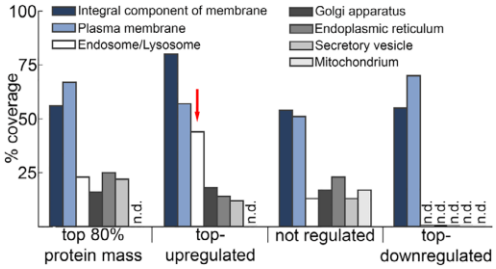


FIGURE 5 Gene Ontology (GO) annotation of the surface proteome derived from control and μ2 KD cells. The most abundant proteins covering 80% of the total protein mass of the HeLa surfaceome, the top-upregulated hits (H/L-ratio ≥ 1.5), unaffected (not-regulated) proteins and the top-downregulated hits in μ2 KD cells (H/L-ratio ≤ 1.5) were analyzed for the GO annotations of cellular compartments. A red arrow points to the data bar showing enrichment of endosomal/lysosomal constituents. See Table S1 for full data; (n.d.: not detected) [Correction added on 29 December 2020, after first online publication: Figure 5 has been corrected.]

internalization.[70] To explore this issue, we determined the global endocytic flux of proteins, which had been labeled at the cell surface with NHS-AEDP-ATTO488.[29] The cleavable disulfide containing linker in this fluorescent dye allows easy removal of the surface bound fraction by using an appropriate reducing buffer (22). After labeling on ice, one set of cells was immediately washed and processed for immunofluorescence or flow cytometry, while another batch was washed and incubated at 37°C to follow endocytosis. Subsequently, cells were placed on ice, washed and incubated in reducing buffer to remove any ATTO488 label from the cell surface, followed by further processing for imaging or flow cytometry. These experiments showed a 50% to 60% reduced internalization of ATTO488 labeled proteins within a 15 minutes time frame in μ2 KD cells (data *not shown*). This further implies that significant uptake into AP-2 depleted cells by alternate clathrin-independent pathways is ongoing.

The surface expression of cargo proteins that preferentially or exclusively utilize CIE should remain unaffected by loss of AP-2, or eventually even decrease if CIE is elevated as part of a compensatory response to the KD of AP-2. Inspection of the proteome data revealed that a number of markers for CIE including CD44 (hyaluronic acid receptor),[71] CD155 (poliovirus receptor),[72] or IGF1R (IGF1 receptor),[73] as well as various GPI-anchored proteins including the complement restricting factors CD55 and CD59,[74,75] or the folate receptor FOLR1 remained almost unaffected by loss of AP-2 (see Figure 2 and Table S1).[76] To substantiate these data, we directly quantified endocytosis of CD155/PVR, IGF1R, CD55, CD59 and FOLR1 by flow cytometry and found no significant change in uptake for 2 minutes at 37°C between mock-treated control and μ2 KD cells, while endocytosis of the TfR was almost completely abrogated (Figure 7). The same findings were obtained for longer uptake intervals extending for up to 15 minutes (*not shown*).

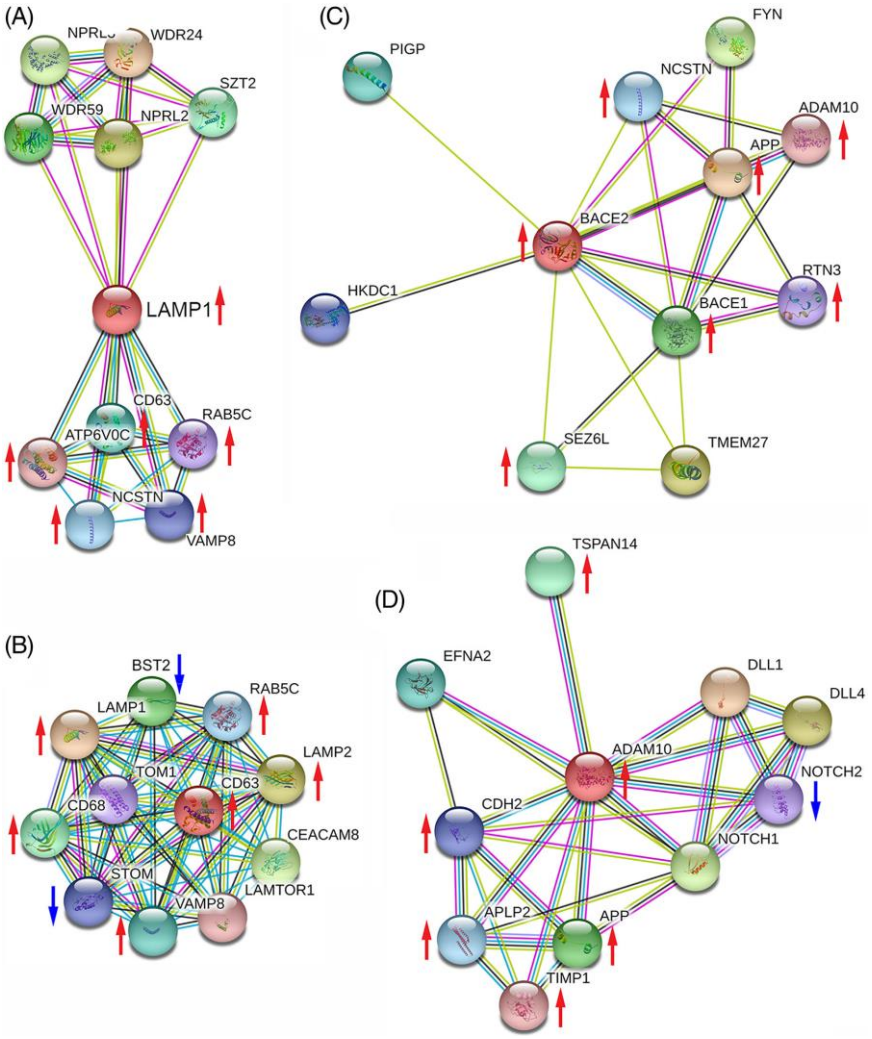


FIGURE 6 Impact of μ2 KD on protein association networks. Known and predicted protein-protein interaction networks are displayed for the lysosomal membrane proteins LAMP1, A, and CD63, B, as well as for the membrane-associated proteases BACE2, C, and ADAM10, D. All data are available through the STRING database (https://string-db.org). Arrows indicate elevated (red) or decreased (blue) surface expression upon μ2 KD. Proteins without label were not identified by surface proteomics presented in this study

The internalization of GPI-anchored proteins is thought to occur via the clathrin-independent CLIC/GEEC pathway,[12,77] although others proposed strong requirement of CME.[29] In this context, we can again consult the surface proteome data to explore the consequences of blocked CME on all 22 identified GPI-anchored proteins (Table S1, sheet D). Half of them (n = 11) belong to the fraction of hits that were not affected by the AP-2 KD, while three members (TNAP, MSLN, CPM) were depleted from the surface, and eight GPIs exhibited increased expression, with NT5E (5′-nucleotidase, CD73) being most strongly affected (2.8-fold increase). In summary, these numbers suggest that both, clathrin-dependent and independent entry pathways operate in the turnover of GPI-anchored proteins at the plasma membrane in HeLa cells. To verify the proteome data, we next probed surface expression of several proteins by

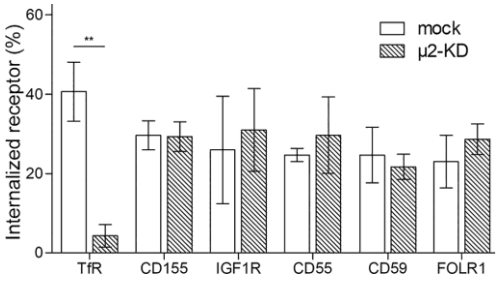


FIGURE 7 Markers of clathrin-independent endocytosis are internalized by μ2 KD cells. Endocytosis of the indicated transmembrane (TfR; CD155; IGF1R) and GPI-anchored (CD55, CD59, FOLR1) proteins was determined by flow cytometry in μ2 KD and mock-treated cells. The fraction of internalized receptors represents the calculated ratio of fluorescence signal intensities obtained after labeling on ice with endocytosis for 2 minutes at 37°C and total labeling at the cell surface on ice without endocytosis. Note that CD155, IGF1R, CD55, CD59 and FOLR1 are published markers for clathrin-independent endocytosis. Error bars represent the SEM of data from three biological replicates (**$P < .01$; two-way ANOVA)

immunofluorescence and confocal microscopy (see Material and Methods for details). The surface staining and the respective quantified mean pixel intensities of CD55 (Figure 8A) and CD59 (immunofluorescence *not shown*, quantification in Figure 8B) were equivalent between control and AP-2 KD cells, whereas TNAP staining was decreased by more than half in AP-2 KD cells. This pattern was reversed in case of NT5E, whose surface staining was increased more than 2-fold in KD cells, which is a value that almost exactly matches the data obtained by surface proteomics. In addition to the analysis of four GPI-anchored proteins, we used the same approach to show significant surface increase of the TfR (~6-fold), α2-integrin (7-fold) and CD63 (1.6-fold) (quantification in Figure 8B). Taken together, surface proteomics data in combination with direct quantification of surface expression levels and endocytosis for individual GPI-anchored proteins suggest heterogeneity in the underlying uptake pathways. In other words, CIE is a major entry route for GPIs, but a selection of them indeed require CME for turnover at the plasma membrane.

3 | DISCUSSION

CME is an essential process in mammalian cells and complete loss of the AP-2μ-subunit in ap2μ1 gene knockout mice is lethal before day 3.5 postcoitus.[78] This vital, indispensable and very early function in embryonic development makes it difficult to study CME and the requirement of individual factors by classical genetic tools. Alternative strategies involved chemical inhibitors such as Dynasore and related

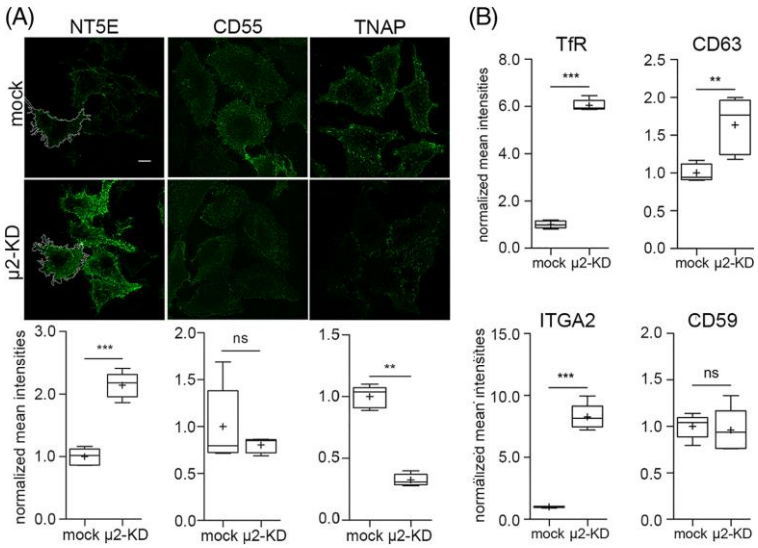


FIGURE 8 The surface expression of individual GPI-anchored proteins is altered in μ2 KD cells. Immunofluorescence at steady-state on non-permeabilized cells was used to analyze the cell surface expression of the indicated proteins, A. For quantification, the surface area of individual cells was marked (see examples in upper two images) and the derived mean intensity per pixel was normalized to the respective values of mock-treated cells. Boxplots show the median (central line) extended from 25th to 75th percentiles (box), minimum and maximum (Whiskers), as well as mean value (cross). Scale bar: 10 μm. B, Quantification of surface expression (analyzed as in A) of transmembrane (TfR, CD63, ITGA2) and GPI-anchored (CD59) receptors. Fluorescence quantification was performed using ImageJ and GraphPad Prism 5.0. Student's *t*-test revealed significance between mock-treated and μ2 KD cells. **$P < .01$; ***$P < .005$; ns: not significant)

compounds, which target dynamin function,[79,80] or Pitstop2 and endosidin9 derivatives, which target clathrin heavy chain.[81,82] Despite the general risk of unwanted site effects, no chemical inhibitors of AP-2 and no mice or human cells that lack any of the four AP-2 subunits are available. Here, we used siRNA-based KD of μ2 in HeLa cells and achieved 90% depletion of the subunit. Furthermore, quantitative mass spectrometry of cytosolic AP-2 after SILAC revealed equal depletion of the ß2-subunit, while significant amounts of α- and σ2-adaptins remained detectable (*not shown*). This is in line with the structural organization of AP-2, which is composed of two heterodimers (α/σ2 and ß2/μ2), with strong interactions between the respective subunits.[83] In μ2 KD cells, lack of μ2 inhibits formation of ß2/μ2 heterodimers during biosynthesis and thus leads to degradation of the ß2-subunit. The resulting lack of sufficient ß2/μ2 hemicomplexes blocks full complex assembly and thereby indirectly induces degradation of α/σ2-heterodimers.

Surface proteomics on AP-2 depleted cells is already available from two other published studies. In 2014, Nichols and coworkers used depletion of the AP-2 α-subunit to inhibit endocytosis, followed by quantitative surface proteomics. However, it is surprising to note that hardly any membrane protein was among the top-50 hits with highest sensitivity to the depletion of AP-2 and none of these proteins was a known AP-2 cargo (compare Table 1 of this work and supplementary Table in Bitsikas et al.[29]). It may therefore be possible that the intended degree of AP-2 depletion was not achieved in cells subjected to surface proteomics. A second surface proteome was published recently,[30] while this study was ongoing. The authors used cells with blocked CME to focus on CIE pathways and to show that endophilin-A2 and galectin-8 in particular control internalization of CD166. Again, less than half out of the top-50 hits that were most susceptible to AP-2 depletion were plasma membrane constituents and furthermore it is interesting to note that the two AP-2 subunits μ2 and ß2 were detected at iTRAQ ratios equivalent to a less than half reduction of AP-2 (see supplementary Table). The authors identified CD166 (gene name ALCAM) as being strongly depleted from the surface of their μ2 KD cells, whereas CD166 remained almost unaffected by the loss of AP-2 in all six biological replicates we analyzed (H/L-ratio = −0.18). Still, this stationary expression of CD166 is fully compatible with the view that CD166 can be regarded as an AP-2/CME independent cargo membrane protein.

The surface proteome of AP-2 depleted cells presented here was determined by a "classical" approach that involved SILAC combined with biotinylation/streptavidin capture of surface proteins. The derived material was then rigorously washed prior to all further steps of proteome identification. As a result, we are able to provide a comprehensive list of 2412 captured proteins, together with quantitative data on their relative surface abundance and the resulting changes in response to inhibited CME. The consequences include massive accumulation of major families of integral membrane proteins at the plasma membrane of μ2 KD cells, for example, nutrient receptors, integrins, transporters of various families, GPCRs, receptor-tyrosine kinases, immuno-regulatory proteins, death receptors and numerous other constituents such as proteases and more. A significant number of hits have been described to reside in endosomes and lysosomes, however, their accumulation at the cell surface is a logic consequence of the block in CME, which normally serves as a major retrieval pathway after fusion of vesicles and organelles with the plasma membrane. The data presented here may therefore be considered a first reference for changes in the protein composition of the plasma membrane in response to altered CME.

How do cells respond to acute inhibition of a major endocytic pathway? In principle, alternate entry pathways may operate unimpeded or even at elevated levels as part of a compensatory response.[84] In case of individual membrane proteins, the altered balance between biosynthesis/surface delivery and endocytosis/recycling may induce elevated intracellular degradation and stalled biosynthesis. For μ2 KD cells, we found slightly decreased proliferation (BrdU assay, *not shown*), but unchanged total protein levels of several receptors (TfR, LDLR, MPR46 and MPR300), lysosomal membrane proteins and acid hydrolases (LAMP1, CD63, CaD, ßHex), which were detected in western blots of total cellular lysates (*not shown*). However, others indeed noticed enhanced degradation of certain CIE cargo (CD44, SLC7A5 and BSG) in μ2-depleted cells [85]. We did not directly test degradation of these proteins, however, all three were identified by surface proteomics but only marginally affected (log2 H/L = ± 0.4). Given the fact that CD44, SLC7A5 and BSG belong to the most abundant proteins at the cell surface (Table S1, sheet C), this clearly indicates their dependence on clathrin-independent pathways, which is fully consistent with the original studies by the Donaldson group.[74]

HeLa and μ2 KD cells have a comparable shape, size and volume when analyzed by light scattering in flow cytometry (Figure S1E), or when observed by bright field- and fluorescence microscopy (*not shown*), which further indicates the activity of clathrin-independent endocytic routes to maintain a certain surface-to-volume ratio in μ2-depleted cells. This notion gains support from experiments that demonstrate efficient endocytosis of seven known transmembrane- and GPI-anchored marker proteins for CIE in μ2-depleted cells (see Figures 7 and 8). Noteworthy, surface proteomics revealed that eight of the 22 identified GPIs were increased in expression upon μ2 KD, with NT5E being most strongly affected (Table S1, Figure 8). Others showed that surface expression of NT5E, which hydrolyzes extracellular nucleotides, depends on kindlin-2 (FERMT2, log2 H/L = +0.8). This factor, which is enriched in focal adhesions, is thought to mediate CME indirectly via transmembrane CD39 and a direct interaction with clathrin heavy chain.[86] It seems thus likely, that individual GPI-anchored proteins may indeed enter cells by CME, for example, in a "piggy-back" mode through interactions with neighboring transmembrane proteins.

Mass spectrometry and proteomics can be essential for the identification of individual factors of the CCV-forming machinery,[9,87,88] but such proteins were mostly excluded in our data set as a result from the rigorous washing of the captured surface protein samples. This also applies to the machinery of clathrin-independent pathways, because neither cavins or caveolins, nor GRAF, a major factor of the CLIC/GEEC pathway, were present. Other factors such as Galectin-3,

CDC42, RhoA, Rac1 and Arf1 were identified and increased in the surfaceome (log2 0.58 - 0.85), which correlates with upregulated clathrin-independent entry routes.[5] However, it requires future experiments with a focus on the various clathrin-independent entry routes in order to unravel regulation and plasticity in cells with blocked CME.

A complete loss of an AP-2 subunit is unknown in humans, but already critical point mutations cause disease, such as familial hypocalciuric hypercalcemia type 3 (FHH3, MIM 600740).[89,90] The identified missense mutations affect the gene ap2s1 at a triplet that codes for Arg15 in the σ2-subunit at a site that participates in binding of dileucine signals by AP-2.[91] More recently, genetic screening of individuals with neurodevelopmental disorders and generalized epilepsy led to identification of a small group of patients with a mutation in the μ2 gene (ap2m1) resulting in Arg170Trp substitution, which is postulated to affect the conformational change in AP-2 and thus cargo recognition during the early phase of CME.[92] But still for both reported defects, it remains to be elucidated to what extend the mutants affect cargo recognition. Such questions can be addressed with the approach we describe here by using patient-derived cells, or by using established human cell-lines in which endogenous AP-2 subunits are replaced by disease-causing mutants.

In this context, it is interesting to note that in the central nervous system, interference with CME can block delivery to lysosomes, thereby modifying the autophagic capacity, which ultimately may result in accumulation and deposition of toxic protein aggregates. Such a scenario is relevant for the clearance of APP-derived fragments in Alzheimer's disease and may also contribute to the pathogenesis of other neurodegenerative disorders.[93–95] Besides membrane proteins and receptor/ligand complexes, any alteration of CME will further affect trafficking of SNARE proteins and thus will impact on the SNARE composition of intracellular organelles and their fusogenic activity. This explains why altered expression of CALM/PICALM, which binds to AP-2 and is required for endocytosis of SNAREs such as Vamp2, Vamp3 and Vamp8,[59] leads to disturbed autophagy and exacerbates tau-mediated toxicity in a zebrafish transgenic model.[96]

Although our study is based on HeLa cells as a standard cell culture model, we provide a first comprehensive and quantitative analysis of the surface proteome in response to blocked CME. The robust workflow, if applied to primary tumor cells, might help to identify new markers or targets for therapeutic antibodies. In epithelial cells, for example, of endothelia or the intestine, functional endocytosis at the apical or basolateral membrane domains of a polarized epithelial cell is a prerequisite for efficient transcytosis of molecules to the opposite membrane domain. The strategy described here could shed light on so far overlooked receptors that may bind and deliver therapeutics into cells or across an epithelium, which so far mainly depends on delivery via the TfR.[97-100] Finally, if any modulation of endocytosis becomes therapeutically relevant, one should be aware of unwanted side effects caused by the massive changes in the surface proteome that affect target cells, their secretome, as well as interactions with the surrounding extracellular matrix and neighboring cells.

4 | MATERIALS AND METHODS

4.1 | Antibodies

The following antibodies were used: anti-α adaptin (610502), anti-γ adaptin (610385), anti-δ adaptin (611329), anti-CD63 (556019) from BD BioSciences; anti-μ2 adaptin (109397), anti-CD59 (9182) and anti-IGF1R (182408) from Abcam; anti-CD155 (MA5-13493) and Transferrin-Alexa488 (T13342) from Invitrogen; anti-CD55 (311302) and anti-TNAP (327302) from BioLegend; anti-GAPDH from Millipore (MAB374); anti-FOLR1 from Novus (MAB5646); anti-TfR from R&D systems (AF2474); anti-LAMP1 (clone H4A3) and anti-δ adaptin (clone SA4) from the DSHB hybridoma bank; anti-CD8 (sc1177) and anti-CALM (sc6433) from Santa Cruz Biotechnology; anti-CD49b from BioRad (MCA2025); anti-CD73 (MABD122) from Sigma-Aldrich. Secondary antibodies were from Invitrogen.

4.2 | Cell culture and RNAi

All experiments were performed in HeLa cells (93 021 013, ECACC), grown at 37°C and 5% CO_2 in DMEM, 10% (v/v) FBS. The AP-2μ2-subunit was depleted by using siRNA *AGUGGAUGCCUUUCGGGUCAUU* (Dharmacon), which targets base pairs 241-260 of the human mRNA sequence (NM_004068; see Motley et al.[16] for details). μ2 siRNA was transfected with Oligofectamine (12 252 011, Invitrogen) in Opti-MEM (31 985 047, Thermo Fisher) in two rounds 24 and 72 hours after cell seeding and assays were performed 48 hours after the last transfection. Mock-treated control cells were subjected to the identical protocol except for the lack of siRNA.

4.3 | Plasmids and transfection

dsDNA (Thermo Fisher) coding for the cytoplasmic 24 amino acids of CA9 (RRQHRRGTKGGVSYRPAEVAETGA), the 60 amino acid residues coding sequence of the SMIM29 cytoplasmic tail (derived from A431 cDNA) and the 11 amino acids coding sequence for the LAMP1 cytoplasmic tail were cloned into CD8_pIRESpuro3 using AflII and NotI. Mutations in the cytoplasmic tail coding sequence of CD8-SMIM29 were generated using the Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit (E0554S, NEB) to obtain the following variants: Y60A, L54A/L55A, L73A/L74A, G89A/Y90A and L97A/L98A. All plasmids were transfected with FuGENE HD Transfection Reagent (E2691311, Promega) according to manufacturer's protocol. After transfection, the cells were subsequently incubated for at least 48 hours.

4.4 | Real-time PCR

cDNA was prepared by reverse transcription of 2 μg RNA with oligo dT (18) using Omniscript RT Kit (205 111, Qiagen) and used for real-time PCR with the GoTaq Kit (A600A, Promega). Gene-specific

primers of 22-26 bases directed against the 3′ region of the corresponding genes were selected for product sizes of 200-300 bases. qPCR was performed in triplicates for 40 cycles, results were normalized based on the GAPDH control and mean values were calculated.

4.5 | SILAC, plasma membrane biotinylation and mass spectrometry

The general workflow is summarized in Figure 1A. *HeLa* cells were split into aliquots, grown in SILAC-DMEM (88 364, Thermo Fisher), 10% (v/v) dFBS (281 000 900, Silantes) with light (L8622/A6969, Sigma-Aldrich) or heavy lysine/arginine isotopes (211 604 102/201604102, Silantes) and kept for 2 weeks. Cells in "heavy" medium were subsequently used for KD of the μ2-subunit, while cells in "light" medium were mock-treated. For analysis of the plasma membrane proteome, equal amounts (5×10^7 cells) of μ2 KD and mock-treated cells were mixed. All subsequent steps were adapted from Weekes et al., including biotinylation of the plasma membrane, capture of labeled proteins with streptavidin-beads and further processing for mass spectrometry.[21] In brief, the mixed suspension of KD and mock-treated cells was incubated with 1 mM sodium metaperiodate at 4°C to oxidize sialic acid residues. The reaction was stopped and quenched by addition of glycerol to a final concentration of 1 mM. Cell surface proteins were biotinylated by incubation with 200 μM aminooxy-biotin and 10 mM aniline in PBS, pH 6.7 for 90 minutes at 4°C. Cells were lysed for 30 minutes at 4°C in lysis buffer (10 mM Tris pH 7.6, 1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 5 mM IAA, 0.1 mg/mL PMSF, 1:100 protease inhibitor cocktail). Then, nuclei and debris were removed by centrifugation and biotinylated cell surface proteins were captured from the resulting supernatant using high capacity streptavidin agarose beads (20 359, Pierce; 10 μL beads/1×10^7 cells). Supernatants were kept for additional analysis, including immune-isolation of AP-2, determination of protein content, or analysis of heavy/light isotope incorporation into cytosolic proteins. Beads were transferred to snap cap spin columns and washed with 20 mL lysis buffer and PBS, 0.5% SDS. For reduction and alkylation of cysteines, beads and plasma membrane proteins were incubated first with 100 mM DTT and subsequently with 50 mM IAA, each in PBS, 0.5% SDS for 20 minutes. The material was then subjected to five washing steps including 6 M urea in 100 mM Tris-HCl, pH 8.5; 5 M NaCl; 100 mM Na_2CO_3; PBS and HPLC water. Subsequently, the beads were incubated with trypsin (V5111, Promega; 2 μg/5×10^7 cells) in 50 mM NH_4HCO_3, 2 M urea for overnight digestion at room temperature. The derived peptide-containing supernatants were acidified with formic acid to a final concentration of 1% (v/v) and transferred to StageTips containing two layers of SDB-RPS discs (SPE-Disk-Bio-RPS-47.20, Affinisep).

LC/MS analysis was performed with a Q-Exactive Plus mass spectrometer coupled to an EASY nLC1000 UPLC (Thermo Fisher). The details of peptide loading, operation of the mass spectrometer, data processing and database searches are described elsewhere[102] and the full methodology is available upon request. GO annotations and data of protein-protein interactions were identified with the UniProt (https://www.uniprot.org/) and STRING (https://string-db.org/) data repositories. For comparative data analysis and generation of a Venn diagram (Figure 1C), we used the web-based interface Meta-Chart.com. All mass spectrometry proteomics data were deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE partner repository with the data set identifier PXD041925.

4.6 | Cell migration assays

Cell migration assays were performed in 24-well tissue culture plates as previously described.[103] In brief, wells were coated with 30 μg/mL purified bovine dermal collagen type I (LS001663, CellSystems) or 10 μg/mL purified human fibronectin (11 080 938 001, Roche) diluted in PBS + 0.1 mM $CaCl_2$. Potential nonspecific binding sites were blocked with 1% heat-denatured BSA in PBS. Semi-confluent layers of cells were treated with 1.6 μg/mL mitomycin-C for 2 hours to arrest cell growth prior to further use. The cells (2×10^5/well) were seeded in cloning rings (0.5 mm diameter), placed on top of uncoated and coated wells and incubated for 2 hours at 37°C. After removal of rings, the wells were washed twice with PBS and fresh media was added. The plates were placed under a microscope stage (Olympus IX81; Olympus Biosystems) and heated to 37°C in a humidified atmosphere. Pictures of two distinct positions from each colony were taken every half hour for 24 hours. Areas migrated by cells at different time points were calculated using ImageJ software (http://rsb.info.nih.gov/ij).

4.7 | Labeling of cell surface proteins with ATTO488 dye

The global endocytic capacity of cells was determined by immunofluorescence and quantified by flow cytometry. In a first step, proteins at the cell surface were labeled on ice with NHS-AEDP-ATTO488 (AttoTech) at a final concentration of 0.1 mg/mL. After 12 minutes, the cells were washed and any remaining unconjugated dye was quenched with 50 mM glycine in PBS^{++} (0.9 mM $CaCl_2$, 0.5 mM $MgCl_2$). In a second step, endocytosis was initiated by rapid exchange of buffer for pre-warmed medium (37°C). After defined periods of time, cells were placed back on ice and ice-cold PBS^{++} was added to stop endocytosis. In a third step, any cell surface exposed ATTO-dye was removed by incubation with glutathione in cleavage buffer (50 mM glutathione, 75 mM NaCl, 1 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 1% BSA, 5 mM DTT, 0.075 N NaOH). After 40 minutes, cells that contained the endocytosed, intracellular ATTO488 labeled surface proteins were washed and then subjected to either immunofluorescence or flow cytometry.

4.8 | Immunofluorescence and image analysis

To visualize endocytosis in cells, their growth medium was exchanged for pre-warmed (37°C) medium supplemented with a primary antibody

or a fluorochrome-conjugated ligand. After defined periods of time, cells were placed on ice and medium was exchanged for ice-cold PBS^{++} to stop endocytosis. Depending on the experimental set up, cell surface associated ligands or antibodies were then removed by incubation with PBS^{++} adjusted to pH 4.0 (2 × 5 minutes). Afterwards, cells were fixed, permeabilized (if required) and incubated with appropriate fluorochrome-conjugated secondary antibodies. For steady-state localization of proteins by immunofluorescence, cells were removed from the culture, quickly washed with PBS, then fixed with paraformaldehyde followed by permeabilization with saponin, incubation with primary antibodies and their subsequent detection with appropriate secondary antibodies. Fluorescence microscopy was performed with a confocal setup (Leica SP8, Leica). Cell surface expression was quantified using data of signal intensities obtained from confocal sections after immunofluorescence at steady-state on non-permeabilized cells with the ImageJ software. The surface area of individual cells was marked in the derived sections and subsequently, the intensity of each individual pixel in an area was quantified and the mean intensity per pixel was calculated. Using GraphPad Prism 5.0, the data were normalized to the intensity of mock-treated control cells, and mean values, median, as well as 25th and 75th percentiles were calculated. The significance between mean values was calculated using the Student's *t*-test.

4.9 | Flow cytometry

Sets of mock- and μ2 siRNA-treated HeLa cells were placed on ice, washed with PBS^{++} and subsequently incubated with primary antibodies at a final concentration of 1 μg/mL. After 15 minutes, cells were either kept on ice or incubated at 37°C for different periods of time. Thereafter, cells were again put on ice, washed and incubated with 10% (v/v) goat serum in PBS. Primary antibodies at the cell surface were detected by incubation for 15 minutes with appropriate, fluorochrome-conjugated secondary antibodies. Cells were then washed and detached with trypsin. Afterwards, protease activity was inhibited with PBS supplemented with 5% (v/v) FBS. Cells were collected by centrifugation (400 × g, 5 minutes, 4°C) and resuspended in FluoroFix buffer (422 101, BioLegend). After passing through a 40 μm filter membrane, cells were subjected to flow cytometry (FacsCanto II, BD). All data were processed using FACSDiva software (BD).

4.10 | SDS-PAGE and Immunoblotting

Proteins of total cellular lysates were separated by SDS-PAGE followed by transfer onto nitrocellulose membranes that were afterwards probed for 4 hours at room temperature with primary and 30 minutes with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies. Final visualization was performed by use of SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (34 580, Thermo Fisher).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Christian Frie (Biochemistry, Cologne) and Gunter Rappl (CMMC, Cologne) for their support with flow cytometry, Astrid Wilbrand-Hennes and Christian Frese (CECAD, Cologne) for support with SILAC-based proteomics, Michael P. Weekes (University of Cambridge, UK) for detailed information about plasma membrane proteomics, as well as Sharon E. Miller and David J. Owen (MRC Cambridge, UK) for sharing μ2 siRNA and for many helpful discussions. *Peter Zentis* and *Elke Pach* were supported by the German Science Foundation (Project-ID 73111208; SFB829). This work was supported by the Köln Fortune Program of the Faculty of Medicine, University of Cologne.

Open Access funding enabled and organized by ProjektDEAL.

PEER REVIEW

The peer review history for this article is available at https://publons.com/publon/10.1111/tra.12770.

ORCID

David Tobys https://orcid.org/0000-0001-5528-6059
Stefan Höning https://orcid.org/0000-0002-5432-6976

REFERENCES

1. Irannejad R, Tsvetanova NG, Lobingier BT, von Zastrow M. Effects of endocytosis on receptor-mediated signaling. *Curr Opin Cell Biol*. 2015;35:137-143.
2. Roche PA, Cresswell P. Antigen processing and presentation mechanisms in myeloid cells. *Microbiol Spectr*. 2016;4(3):1-15.
3. Maritzen T, Schachtner H, Legler DF. On the move: endocytic trafficking in cell migration. *Cell Mol Life Sci*. 2015;72(11):2119-2134.
4. Paul NR, Jacquemet G, Caswell PT. Endocytic trafficking of integrins in cell migration. *Curr Biol*. 2015;25(22):R1092-R1105.
5. Ferreira APA, Boucrot E. Mechanisms of carrier formation during clathrin-independent endocytosis. *Trends Cell Biol*. 2018;28(3):188-200.
6. Sandvig K, Kavaliauskiene S, Skotland T. Clathrin-independent endocytosis: an increasing degree of complexity. *Histochem Cell Biol*. 2018;150(2):107-118.
7. Mettlen M, Chen PH, Srinivasan S, Danuser G, Schmid SL. Regulation of clathrin-mediated endocytosis. *Annu Rev Biochem*. 2018;87:871-896.
8. Robinson MS. Forty years of clathrin-coated vesicles. *Traffic*. 2015;16(12):1210-1238.
9. Borner GH, Antrobus R, Hirst J, et al. Multivariate proteomic profiling identifies novel accessory proteins of coated vesicles. *J Cell Biol*. 2012;197(1):141-160.
10. Cocucci E, Aguet F, Boulant S, Kirchhausen T. The first five seconds in the life of a clathrin-coated pit. *Cell*. 2012;150(3):495-507.
11. Kelly BT, Graham SC, Liska N, et al. Clathrin adaptors. AP2 controls clathrin polymerization with a membrane-activated switch. *Science*. 2014;345(6195):459-463.
12. Howes MT, Kirkham M, Riches J, et al. Clathrin-independent carriers form a high capacity endocytic sorting system at the leading edge of migrating cells. *J Cell Biol*. 2010;190(4):675-691.
13. Boucrot E, Ferreira AP, Almeida-Souza L, et al. Endophilin marks and controls a clathrin-independent endocytic pathway. *Nature*. 2015;517(7535):460-465.
14. Yao W, Rose JL, Wang W, et al. Syndecan 1 is a critical mediator of macropinocytosis in pancreatic cancer. *Nature*. 2019;568(7752):410-414.
15. Kirkham M, Fujita A, Chadda R, et al. Ultrastructural identification of uncoated caveolin-independent early endocytic vehicles. *J Cell Biol*. 2005;168(3):465-476.

16. Motley A, Bright NA, Seaman MN, Robinson MS. Clathrin-mediated endocytosis in AP-2-depleted cells. *J Cell Biol*. 2003;162(5):909-918.
17. Dugast M, Toussaint H, Dousset C, Benaroch P. AP2 clathrin adaptor complex, but not AP1, controls the access of the major histocompatibility complex (MHC) class II to endosomes. *J Biol Chem*. 2005;280(20):19656-19664.
18. Boucrot E, Saffarian S, Zhang R, Kirchhausen T. Roles of AP-2 in clathrin-mediated endocytosis. *PLoS One*. 2010;5(5):e10597.
19. Miller SE, Mathiasen S, Bright NA, et al. CALM regulates clathrin-coated vesicle size and maturation by directly sensing and driving membrane curvature. *Dev Cell*. 2015;33(2):163-175.
20. Janvier K, Bonifacino JS. Role of the endocytic machinery in the sorting of lysosome-associated membrane proteins. *Mol Biol Cell*. 2005;16(9):4231-4242.
21. Weekes MP, Antrobus R, Lill JR, Duncan LM, Hor S, Lehner PJ. Comparative analysis of techniques to purify plasma membrane proteins. *J Biomol Tech*. 2010;21(3):108-115.
22. Zeng Y, Ramya TN, Dirksen A, Dawson PE, Paulson JC. High-efficiency labeling of sialylated glycoproteins on living cells. *Nat Methods*. 2009;6(3):207-209.
23. Bausch-Fluck D, Hofmann A, Bock T, et al. A mass spectrometric-derived cell surface protein atlas. *PLoS One*. 2015;10(3):e0121314.
24. Kalxdorf M, Eberl HC, Bantscheff M. Monitoring dynamic changes of the cell surface glycoproteome by quantitative proteomics. *Methods Mol Biol*. 1647;2017:47-59.
25. Nagaraj N, Wisniewski JR, Geiger T, et al. Deep proteome and transcriptome mapping of a human cancer cell line. *Mol Syst Biol*. 2011;7:548.
26. Li Y, Wang Y, Mao J, et al. Sensitive profiling of cell surface proteome by using an optimized biotinylation method. *J Proteomics*. 2019;196:33-41.
27. Gulbranson DR, Crisman L, Lee M, et al. AAGAB controls AP2 adaptor assembly in clathrin-mediated endocytosis. *Dev Cell*. 2019;50(4):436-446. e435.
28. McCormick PJ, Martina JA, Bonifacino JS. Involvement of clathrin and AP-2 in the trafficking of MHC class II molecules to antigen-processing compartments. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(22):7910-7915.
29. Bitsikas V, Correa IR Jr, Nichols BJ. Clathrin-independent pathways do not contribute significantly to endocytic flux. *Elife*. 2014;3:e03970.
30. Renard HF, Tyckaert F, Lo Giudice C, et al. Endophilin-A3 and Galectin-8 control the clathrin-independent endocytosis of CD166. *Nat Commun*. 2020;11(1):1457.
31. Bennett MJ, Lebron JA, Bjorkman PJ. Crystal structure of the hereditary haemochromatosis protein HFE complexed with transferrin receptor. *Nature*. 2000;403(6765):46-53.
32. Lebron JA, Bennett MJ, Vaughn DE, et al. Crystal structure of the hemochromatosis protein HFE and characterization of its interaction with transferrin receptor. *Cell*. 1998;93(1):111-123.
33. Sendamarai AK, Ohgami RS, Fleming MD, Lawrence CM. Structure of the membrane proximal oxidoreductase domain of human Steap3, the dominant ferrireductase of the erythroid transferrin cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(21):7410-7415.
34. Fleming MD, Romano MA, Su MA, Garrick LM, Garrick MD, Andrews NC. Nramp2 is mutated in the anemic Belgrade (b) rat: evidence of a role for Nramp2 in endosomal iron transport. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(3):1148-1153.
35. Ma F, Zhang C, Prasad KV, Freeman GJ, Schlossman SF. Molecular cloning of Porimin, a novel cell surface receptor mediating oncotic cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(17):9778-9783.
36. Busch JI, Unger TL, Jain N, Tyler Skrinak R, Charan RA, Chen-Plotkin AS. Increased expression of the frontotemporal dementia risk factor TMEM106B causes C9orf72-dependent alterations in lysosomes. *Hum Mol Genet*. 2016;25(13):2681-2697.
37. Smith VE, Sharma N, Watkins RJ, et al. Manipulation of PBF/PTTG1IP phosphorylation status; a potential new therapeutic strategy for improving radioiodine uptake in thyroid and other tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(7):2876-2886.
38. Watkins RJ, Imruetaicharoenchoke W, Read ML, et al. Pro-invasive effect of proto-oncogene PBF is modulated by an interaction with cortactin. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016;101(12):4551-4563.
39. Kundu ST, Grzeskowiak CL, Fradette JJ, et al. TMEM106B drives lung cancer metastasis by inducing TFEB-dependent lysosome synthesis and secretion of cathepsins. *Nat Commun*. 2018;9(1):2731.
40. Read ML, Fong JC, Modasia B, et al. Elevated PTTG and PBF predicts poor patient outcome and modulates DNA damage response genes in thyroid cancer. *Oncogene*. 2017;36(37):5296-5308.
41. McDonald PC, Winum JY, Supuran CT, Dedhar S. Recent developments in targeting carbonic anhydrase IX for cancer therapeutics. *Oncotarget*. 2012;3(1):84-97.
42. Pryor PR, Jackson L, Gray SR, et al. Molecular basis for the sorting of the SNARE VAMP7 into endocytic clathrin-coated vesicles by the ArfGAP Hrb. *Cell*. 2008;134(5):817-827.
43. Hulikova A, Zatovicova M, Svastova E, et al. Intact intracellular tail is critical for proper functioning of the tumor-associated, hypoxia-regulated carbonic anhydrase IX. *FEBS Lett*. 2009;583(22):3563-3568.
44. Swayampakula M, McDonald PC, Vallejo M, et al. The interactome of metabolic enzyme carbonic anhydrase IX reveals novel roles in tumor cell migration and invadopodia/MMP14-mediated invasion. *Oncogene*. 2017;36(45):6244-6261.
45. Ames S, Andring JT, McKenna R, Becker HM. CAIX forms a transport metabolon with monocarboxylate transporters in human breast cancer cells. *Oncogene*. 2020;39(8):1710-1723.
46. Traub LM. Tickets to ride: selecting cargo for clathrin-regulated internalization. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009;10(9):583-596.
47. Keyel PA, Mishra SK, Roth R, Heuser JE, Watkins SC, Traub LM. A single common portal for clathrin-mediated endocytosis of distinct cargo governed by cargo-selective adaptors. *Mol Biol Cell*. 2006;17(10):4300-4317.
48. Maurer ME, Cooper JA. The adaptor protein Dab2 sorts LDL receptors into coated pits independently of AP-2 and ARH. *J Cell Sci*. 2006;119(Pt 20):4235-4246.
49. Traub LM. Sorting it out: AP-2 and alternate clathrin adaptors in endocytic cargo selection. *J Cell Biol*. 2003;163(2):203-208.
50. Teckchandani A, Toida N, Goodchild J, et al. Quantitative proteomics identifies a Dab2/integrin module regulating cell migration. *J Cell Biol*. 2009;186(1):99-111.
51. Barczyk M, Carracedo S, Gullberg D. Integrins. *Cell Tissue Res*. 2010;339(1):269-280.
52. Schmidt S, Friedl P. Interstitial cell migration: integrin-dependent and alternative adhesion mechanisms. *Cell Tissue Res*. 2010;339(1):83-92.
53. Encarnacao M, Espada L, Escrevente C, et al. A Rab3a-dependent complex essential for lysosome positioning and plasma membrane repair. *J Cell Biol*. 2016;213(6):631-640.
54. Reddy A, Caler EV, Andrews NW. Plasma membrane repair is mediated by Ca(2+)-regulated exocytosis of lysosomes. *Cell*. 2001;106(2):157-169.
55. van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018;19(4):213-228.
56. Schwake M, Schroder B, Saftig P. Lysosomal membrane proteins and their central role in physiology. *Traffic*. 2013;14(7):739-748.
57. Bonifacino JS, Traub LM. Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Biochem*. 2003;72:395-447.
58. Bucci C, Lutcke A, Steele-Mortimer O, et al. Co-operative regulation of endocytosis by three Rab5 isoforms. *FEBS Lett*. 1995;366(1):65-71.

59. Miller SE, Sahlender DA, Graham SC, et al. The molecular basis for the endocytosis of small R-SNAREs by the clathrin adaptor CALM. *Cell*. 2011;147(5):1118-1131.
60. Bar-Peled L, Sabatini DM. Regulation of mTORC1 by amino acids. *Trends Cell Biol*. 2014;24(7):400-406.
61. Billcliff PG, Rollason R, Prior I, Owen DM, Gaus K, Banting G. CD317/tetherin is an organiser of membrane microdomains. *J Cell Sci*. 2013;126(Pt 7):1553-1564.
62. Salzer U, Prohaska R. Stomatin, flotillin-1, and flotillin-2 are major integral proteins of erythrocyte lipid rafts. *Blood*. 2001;97(4):1141-1143.
63. Nunan J, Small DH. Regulation of APP cleavage by alpha-, beta- and gamma-secretases. *FEBS Lett*. 2000;483(1):6-10.
64. Prox J, Rittger A, Saftig P. Physiological functions of the amyloid precursor protein secretases ADAM10, BACE1, and presenilin. *Exp Brain Res*. 2012;217(3–4):331-341.
65. Andrew RJ, Kellett KA, Thinakaran G, Hooper NM. A greek tragedy: the growing complexity of Alzheimer amyloid precursor protein proteolysis. *J Biol Chem*. 2016;291(37):19235-19244.
66. He W, Lu Y, Qahwash I, Hu XY, Chang A, Yan R. Reticulon family members modulate BACE1 activity and amyloid-beta peptide generation. *Nat Med*. 2004;10(9):959-965.
67. Grunwald B, Schoeps B, Kruger A. Recognizing the molecular multifunctionality and interactome of TIMP-1. *Trends Cell Biol*. 2019;29(1):6-19.
68. Saftig P, Reiss K. The "a Disintegrin and metalloproteases" ADAM10 and ADAM17: novel drug targets with therapeutic potential? *Eur J Cell Biol*. 2011;90(6–7):527-535.
69. Saint-Pol J, Eschenbrenner E, Dornier E, Boucheix C, Charrin S, Rubinstein E. Regulation of the trafficking and the function of the metalloprotease ADAM10 by tetraspanins. *Biochem Soc Trans*. 2017;45(4):937-944.
70. Johannes L, Parton RG, Bassereau P, Mayor S. Building endocytic pits without clathrin. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2015;16(5):311-321.
71. Lakshminarayan R, Wunder C, Becken U, et al. Galectin-3 drives glycosphingolipid-dependent biogenesis of clathrin-independent carriers. *Nat Cell Biol*. 2014;16(6):595-606.
72. Brandenburg B, Lee LY, Lakadamyali M, Rust MJ, Zhuang X, Hogle JM. Imaging poliovirus entry in live cells. *PLoS Biol*. 2007;5(7):e183.
73. Sehat B, Andersson S, Girnita L, Larsson O. Identification of c-Cbl as a new ligase for insulin-like growth factor-I receptor with distinct roles from Mdm2 in receptor ubiquitination and endocytosis. *Cancer Res*. 2008;68(14):5669-5677.
74. Eyster CA, Higginson JD, Huebner R, et al. Discovery of new cargo proteins that enter cells through clathrin-independent endocytosis. *Traffic*. 2009;10(5):590-599.
75. Glebov OO, Bright NA, Nichols BJ. Flotillin-1 defines a clathrin-independent endocytic pathway in mammalian cells. *Nat Cell Biol*. 2006;8(1):46-54.
76. Sabharanjak S, Sharma P, Parton RG, Mayor S. GPI-anchored proteins are delivered to recycling endosomes via a distinct cdc42-regulated, clathrin-independent pinocytic pathway. *Dev Cell*. 2002;2(4):411-423.
77. Lundmark R, Doherty GJ, Howes MT, et al. The GTPase-activating protein GRAF1 regulates the CLIC/GEEC endocytic pathway. *Curr Biol*. 2008;18(22):1802-1808.
78. Mitsunari T, Nakatsu F, Shioda N, et al. Clathrin adaptor AP-2 is essential for early embryonal development. *Mol Cell Biol*. 2005;25(21):9318-9323.
79. Macia E, Ehrlich M, Massol R, Boucrot E, Brunner C, Kirchhausen T. Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin. *Dev Cell*. 2006;10(6):839-850.
80. McCluskey A, Daniel JA, Hadzic G, et al. Building a better dynasore: the dyngo compounds potently inhibit dynamin and endocytosis. *Traffic*. 2013;14(12):1272-1289.
81. Dejonghe W, Sharma I, Denoo B, et al. Disruption of endocytosis through chemical inhibition of clathrin heavy chain function. *Nat Chem Biol*. 2019;15(6):641-649.
82. von Kleist L, Stahlschmidt W, Bulut H, et al. Role of the clathrin terminal domain in regulating coated pit dynamics revealed by small molecule inhibition. *Cell*. 2011;146(3):471-484.
83. Collins BM, McCoy AJ, Kent HM, Evans PR, Owen DJ. Molecular architecture and functional model of the endocytic AP2 complex. *Cell*. 2002;109(4):523-535.
84. Damke H, Baba T, van der Bliek AM, Schmid SL. Clathrin-independent pinocytosis is induced in cells overexpressing a temperature-sensitive mutant of dynamin. *J Cell Biol*. 1995;131(1):69-80.
85. Dutta D, Donaldson JG. Sorting of clathrin-independent cargo proteins depends on Rab35 delivered by clathrin-mediated endocytosis. *Traffic*. 2015;16(9):994-1009.
86. Pluskota E, Ma Y, Bledzka KM, et al. Kindlin-2 regulates hemostasis by controlling endothelial cell-surface expression of ADP/AMP catabolic enzymes via a clathrin-dependent mechanism. *Blood*. 2013;122(14):2491-2499.
87. Praefcke GJ, Ford MG, Schmid EM, et al. Evolving nature of the AP2 alpha-appendage hub during clathrin-coated vesicle endocytosis. *EMBO J*. 2004;23(22):4371-4383.
88. Ritter B, Philie J, Girard M, Tung EC, Blondeau F, McPherson PS. Identification of a family of endocytic proteins that define a new alpha-adaptin ear-binding motif. *EMBO Rep*. 2003;4(11):1089-1095.
89. Gorvin CM, Metpally R, Stokes VJ, et al. Large-scale exome datasets reveal a new class of adaptor-related protein complex 2 sigma subunit (AP2sigma) mutations, located at the interface with the AP2 alpha subunit, that impair calcium-sensing receptor signalling. *Hum Mol Genet*. 2018;27(5):901-911.
90. Nesbit MA, Hannan FM, Howles SA, et al. Mutations in AP2S1 cause familial hypocalciuric hypercalcemia type 3. *Nat Genet*. 2013;45(1):93-97.
91. Kelly BT, McCoy AJ, Spate K, et al. A structural explanation for the binding of endocytic dileucine motifs by the AP2 complex. *Nature*. 2008;456(7224):976-979.
92. Helbig I, Lopez-Hernandez T, Shor O, et al. A recurrent missense variant in AP2M1 impairs clathrin-mediated endocytosis and causes developmental and epileptic encephalopathy. *Am J Hum Genet*. 2019;104:1060-1072.
93. Boland B, Yu WH, Corti O, et al. Promoting the clearance of neurotoxic proteins in neurodegenerative disorders of ageing. *Nat Rev Drug Discov*. 2018;17(9):660-688.
94. Heckmann BL, Teubner BJW, Tummers B, et al. LC3-associated endocytosis facilitates beta-amyloid clearance and mitigates neurodegeneration in murine Alzheimer's disease. *Cell*. 2019;178(3):536-551. e514.
95. Kanatsu K, Hori Y, Takatori S, Watanabe T, Iwatsubo T, Tomita T. Partial loss of CALM function reduces Abeta42 production and amyloid deposition in vivo. *Hum Mol Genet*. 2016;25(18):3988-3997.
96. Moreau K, Fleming A, Imarisio S, et al. PICALM modulates autophagy activity and tau accumulation. *Nat Commun*. 2014;5:4998.
97. Ito S, Oishi M, Ogata S, et al. Identification of cell-surface proteins endocytosed by human brain microvascular endothelial cells in vitro. *Pharmaceutics*. 2020;12(6):579. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12060579.
98. Kariolis MS, Wells RC, Getz JA, et al. Brain delivery of therapeutic proteins using an Fc fragment blood-brain barrier transport vehicle in mice and monkeys. *Sci Transl Med*. 2020;12(545):eaay1359. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aay1359.PMID:32461332.
99. Ullman JC, Arguello A, Getz JA, et al. Brain delivery and activity of a lysosomal enzyme using a blood-brain barrier transport vehicle in

mice. *Sci Transl Med*. 2020;12(545):eaay1163. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aay1163.
100. Zhao Z, Zlokovic BV. Therapeutic TVs for crossing barriers in the brain. *Cell*. 2020;182(2):267-269.
101. Wrobel AG, Kadlecova Z, Kamenicky J, et al. Temporal ordering in endocytic clathrin-coated vesicle formation via AP2 phosphorylation. *Dev Cell*. 2019;50(4):494-508. e411.
102. Zigrino P, Steiger J, Fox JW, et al. Role of ADAM-9 disintegrin-cysteine-rich domains in human keratinocyte migration. *J Biol Chem*. 2007;282(42):30785-30793.
103. Omasits U, Ahrens CH, Muller S, Wollscheid B. Protter: interactive protein feature visualization and integration with experimental proteomic data. *Bioinformatics*. 2014;30(6):884-886.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Tobys D, Kowalski LM, Cziudaj E, et al. Inhibition of clathrin-mediated endocytosis by knockdown of AP-2 leads to alterations in the plasma membrane proteome. *Traffic*. 2021;22:6–22. https://doi.org/10.1111/tra.12770

Supplementary information

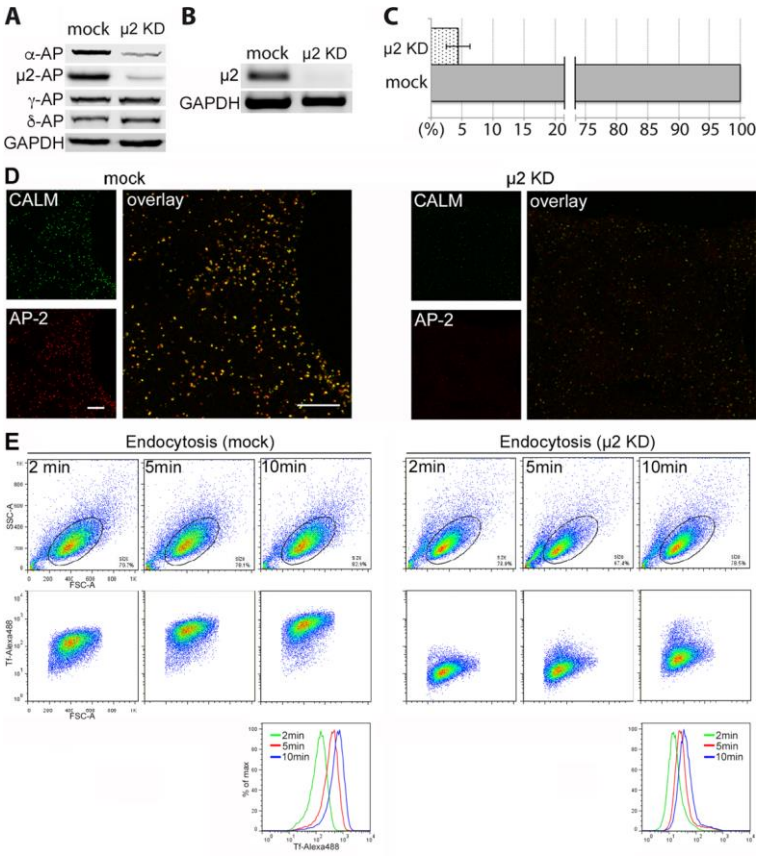
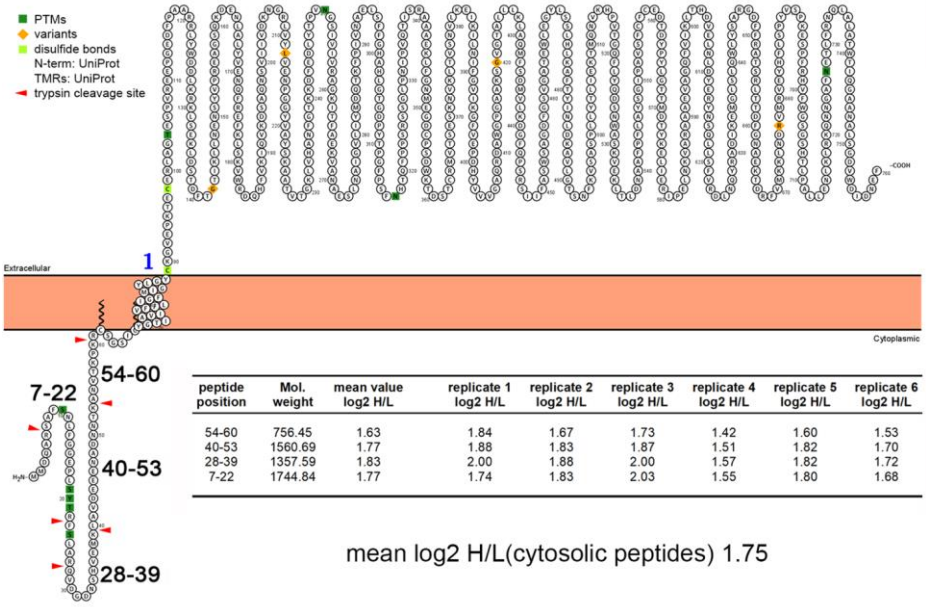


Fig. S1: Formation of endocytic CCPs/CCVs is altered and endocytosis is inhibited in μ2 KD cells. **A:** Detection of the AP-specific subunits α-AP (AP-2), μ2-AP (AP-2), γ-AP (AP-1), δ-AP (AP-3) and the non-related control protein GAPDH in western blots of total cellular lysates from mock- and μ2 siRNA-treated HeLa cells. **B:** Total cDNA from mock- and μ2 KD cells were probed by PCR for the transcripts of the AP-2 μ-subunit and GAPDH. **C:** qPCR-based quantification of μ2 and GAPDH transcripts in total cDNA preparations. Error bars represent SD of four independent experiments. **D:** Localization of the AP-2 a-subunit (red) and the clathrin-associated adaptor CALM (green) by double-immunofluorescence. Colocalization is indicated by yellow staining. Scale bars: 2 μm. **E:** Endocytosis of Tf-Alexa488 in mock and μ2 KD cells was assessed by flow cytometry at the indicated time points. The pseudo-colored light scatter measurements (first row) and the gated cells with measured Tf-Alexa488 fluorescence intensities (second row) are shown as dot plots. The colored histograms (third row) depicting the uptake over time reveal a strong inhibition of uptake in μ2 KD cells at all three time-points by more than 90%.



peptide position	Mol. weight	mean value log2 H/L	replicate 1 log2 H/L	replicate 2 log2 H/L	replicate 3 log2 H/L	replicate 4 log2 H/L	replicate 5 log2 H/L	replicate 6 log2 H/L
54-60	756.45	1.63	1.84	1.67	1.73	1.42	1.60	1.53
40-53	1560.69	1.77	1.88	1.83	1.87	1.51	1.82	1.70
28-39	1357.59	1.83	2.00	1.88	2.00	1.57	1.82	1.72
7-22	1744.84	1.77	1.74	1.83	2.03	1.55	1.80	1.68

mean log2 H/L(cytosolic peptides) 1.75

Fig. S2: Mass spectrometry of surface TfR indicates cleavage of the extracellular part in µ2 KD cells. The cartoon illustrates the type-2 topology and full-length amino acid sequence of the human transferrin receptor (TFR1; generated using Protter tool).[103] Sites of trypsin cleavage in the cytoplasmic tail are indicated by red arrowheads and the resulting four major peptides that were identified by mass spectrometry are indicated. The table summarizes data from all six biological replicates about the individual and mean log2 (H/L) ratios of these cytoplasmic tail derived peptides. Mass spectrometry revealed comparable H/L-ratios in all samples and a mean log2 value of 1.75, which corresponds to a 3.4-fold increase in TfR at the surface of µ2 KD cells.

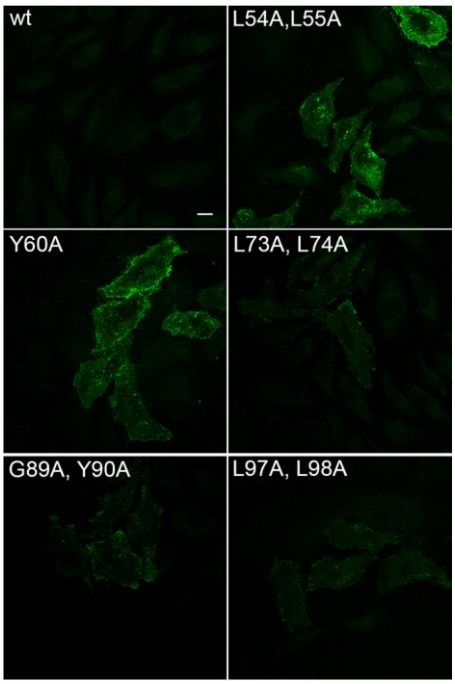


Fig. S3: Identification of sorting signals in the cytoplasmic tail of SMIM29. The SMIM29 cytoplasmic tail sequence is sufficient for endocytosis of a chimeric CD8 reporter protein (see **Fig. 3**). Based on these data, the indicated mutations were introduced into the cytoplasmic tail sequence of the CD8-SMIM29 reporter, which was then assayed for localization after incubation with anti-CD8 for 30 min at 37°C. Scale bar: 10 µm.

GPI anchored protein	log2 H/L	iBAQ ranking
CD59	-0,19	6
CD55	0,23	14
BST2	-0,47	18
FOLR1	-0,25	34
CD58	0,06	37
THY1	-0,09	146
ALPL	-1,02	218
MSLN	-2,32	276
NEGR1	0,14	293
PRNP	0,54	297
CPM	-0,74	397
ULBP2	-0,06	537
PLAUR	0,93	651
NT5E	1,51	1064
CDH13	1,11	1172
CD109	1,02	1253
LY6K	0,08	1577
HYAL2	0,98	1688
ULBP3	0,76	1918
MFI2	0,46	1954
RECK	0,67	2225
GPC1	1,21	2269

Table S1, sheet D: GPI-anchored proteins. List of all identified GPI-anchored proteins, the changes in surface expression in µ2 KD cells and their relative abundance in HeLa cells. Proteins that were further analyzed by immunofluorescence or flow cytometry are colored in blue.
Please note that the full data set of all identified 2412 proteins in six biological replicates (sheet A), the complete list of proteins that are increased in surface expression by log2 values >1.5 (n=103) upon KD of µ2 (sheet B) as well as the full ranking of HeLa cell surface proteins by their abundance based on the iBAQ values in mock-treated cells (sheet C) are available online (DOI: 10.1111/tra.12770).

4. Diskussion

Im Zentrum dieser Arbeit stand die mittels quantitativer Massenspektrometrie erhobene Analyse von Veränderungen innerhalb des Plasmamembran-Proteoms µ2-depletierter HeLa-Zellen sowie die sich hieran anschließende weitergehende Analyse ausgewählter Membranproteine. Nachfolgend sollen die Ergebnisse dieser Arbeit interpretiert, diskutiert und unter Einbeziehung entsprechender Fachliteratur in den Kontext des aktuellen wissenschaftlichen Kenntnisstandes eingeordnet werden.

4.1. Hemmung der CME

Die CME ermöglicht einen koordinierten, zielgerichteten und zugleich effizienten Transport zahlreicher Frachtmoleküle von der Oberfläche ins Innere eukaryotischer Zellen und leistet infolge ihrer Beteiligung an diversen Zellprozessen einen essenziellen Beitrag zur Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase[66]. Ein vollständiger Knockout (KO) des heterotetrameren Adaptorkomplexes AP-2, der im Rahmen der CME eine zentral koordinierende Schlüsselposition einnimmt, ist folglich mit dem Leben nicht vereinbar und wirkt bereits im Frühstadium der embryonalen Entwicklung letal[260]. In der hier präsentierten Arbeit wurde daher mittels zweifacher Transfektion von siRNA ein KD der µ2-Untereinheit von AP-2 durchgeführt. Dieser resultierte, beruhend auf RNA-Interferenz und einer hiermit einhergehenden Translationshemmung entsprechender mRNA (engl. *messenger RNA,* dt. Boten-RNS), in einer effizienten, rund 90-prozentigen Depletion der µ2-Untereinheit (Fig. S1, S. 50). Das Ausmaß der erzielten Depletion liegt hierbei in der Größenordnung vorangegangener Arbeiten[135,261]. Aufgrund der engen Bindung zwischen µ2-Adaptin und β2-Adaptin innerhalb des gemeinsam gebildeten Heterodimers (siehe Kapitel 2.3.2) verursachte der KD der µ2-Untereinheit eine ebenso effiziente Verminderung der β2-Untereinheit. Die ausbleibende Bildung des vollständigen Adaptorkomplexes resultierte zusätzlich in einem vorzeitigen, mehr als 60-prozentigen Abbau der beiden verbleibenden Adaptine α und σ2. Untereinheiten anderer Adaptorkomplexe, wie beispielsweise γ- Adaptin (AP-1) und δ-Adaptin (AP-3), wurden durch den hier angewandten µ2-KD nicht beeinflusst (Fig. S4, S. 80). Dieser erzielte stattdessen eine spezifische Depletion von AP-2 sowie eine hiermit einhergehende rund 90-prozentige Hemmung der CME, gekennzeichnet durch ein nahezu vollständiges Verschwinden detektierbarer CCPs/CCVs sowie eine stark verminderte Endozytose klassischer Frachtproteine (Fig. S5, S. 81).

4.2. Bestimmung des Plasmamembran-Proteoms

Neben der CME existieren weitere Formen von Endozytose, die jeweils eine Internalisierung bestimmter Membranproteine ohne die Ausbildung Clathrin-beschichteter Strukturen (CIE) vermitteln[262]. Um den Anteil der CME an der endozytotischen Gesamtleistung zu bestimmen und ihre Relevanz in Bezug auf die Endozytose einzelner Membranproteine sowie ganzer Proteinklassen zu untersuchen, stand die mittels quantitativer Massenspektrometrie erhobene Analyse des Plasmamembran-Proteoms AP-2-depletierter und -nicht-depletierter HeLa-Zellen im Mittelpunkt dieser Arbeit. Die hierzu angewandte Isotopenmarkierung von Aminosäuren in Zellkulturen (engl. *stable isotope labeling by amino acids in cell culture*, SILAC), die Aminooxy-Biotin-vermittelte Markierung von Zelloberflächenproteinen sowie ihre sich hieran anschließende Aufreinigung infolge eines Pulldown-Assays mit Streptavidin-Agarose resultierten in der Identifizierung von insgesamt 2412 Proteinen (Fig. 1, S. 35). Gemeinsam mit den Berechnungen zur relativen Häufigkeit jedes einzelnen Proteins sowie den etwaigen Änderungen in Bezug auf die Zelloberflächenexpression liefern die so generierten Daten eine in dieser Form erstmalig publizierte umfangreiche Referenz für Änderungen innerhalb des Plasmamembran-Proteoms bei inhibierter CME in HeLa-Zellen.

Die Analyse des iBAQ-Werts (engl. *intensity-based absolute quantitation*) aller 2412 identifizierten Proteine, der infolge einer Division aufsummierter Peptidintensitäten durch die Anzahl tryptisch-verdauter Peptidfragmente ein von der Peptidgröße unabhängiges Maß für die relative Häufigkeit jedes identifizierten Proteins darstellt[263,264], ermöglichte darüber hinaus eine erste Einordnung und weitergehende Überprüfung der erhaltenen Daten. So konnte in Übereinstimmung mit den Ergebnissen zweier weiterer Publikationen[265,266] gezeigt werden, dass lediglich sieben Proteine mehr als 20% und insgesamt 219 Proteine rund 80% der Gesamtmenge des Plasmamembran-Proteoms ausmachen.

Im Rahmen der sich anschließenden Analyse von Änderungen innerhalb des Plasmamembran-Proteoms AP-2-depletierter HeLa-Zellen wurde eine Falscherkennungsrate (engl. *false discovery rate*, FDR) <1% als Cut-Off gewählt, um größere Abweichungen zwischen einzelnen Versuchsdurchläufen auszuschließen und im Zuge dessen eine möglichst hohe Datenqualität sicherzustellen.

Die auf diese Weise identifizierten 1310 Proteine mit einer FDR <1% und einer mindestens 1,5-fachen Akkumulation an der Plasmamembran µ2-depletierter HeLa-Zellen zeigen eindrücklich die übergeordnete Rolle der CME im Hinblick auf die Internalisierung von mehr als der Hälfte aller Membranproteine (Fig. 2, S. 35).

Hierbei stellt ihre Akkumulation an der Plasmamembran infolge des ausbleibenden Recyclings neu synthetisierter bzw. hochregulierter Proteine ein direktes Resultat inhibierter CME sowie fehlender Kompensation durch alternative CIE dar.

Ebenfalls von besonderer Bedeutung ist die Identifizierung von lediglich 284 Proteinen mit einer nahezu unveränderten Expression an der Plasmamembran µ2-depletierter HeLa-Zellen. Nur diese Proteine waren durch den hier angewandten KD von AP-2 nicht betroffen, wohingegen die Hemmung der CME in einer großflächigen Änderung der überwiegenden Mehrheit des Plasmamembran-Proteoms resultierte.

4.3. Analyse der am stärksten akkumulierten Proteine

Die 50 am stärksten akkumulierten Proteine erfuhren im Zuge des erzielten µ2-KD eine 3,5- bis 10-fache Anhäufung an der Plasmamembran von AP-2-depletierten HeLa-Zellen (Table 1, S. 37-38). Ihre 90-prozentige Zusammensetzung aus integralen Membranproteinen (n=45), von denen rund die Hälfte (n=23) ein bekanntes oder mutmaßliches im Rahmen der CME fungierendes Sortierungssignal besitzt (siehe Kapitel 2.3.2), ist Ausdruck der erfolgreichen Umsetzung der hier angewandten Methode zur gezielten Bestimmung von Veränderungen innerhalb des Plasmamembran-Proteoms AP-2-depletierter Hela-Zellen. Ein vergleichbar hoher Anteil an Membran-assoziierten Proteinen innerhalb der Gruppe der am häufigsten detektierten Proteine sowie der Gruppe der am stärksten depletierten Proteine bekräftigt den Erfolg der angewandten Methode zusätzlich.

Hinsichtlich dieser Dominanz identifizierbarer Membranproteine unterscheidet sich das Plasmamembran-Proteom dieser Arbeit grundlegend von zwei weiteren Plasmamembran-Proteomen AP-2-depletierter HeLa-Zellen, die im Laufe der vergangenen acht Jahre publiziert wurden: In beiden zuvor publizierten Arbeiten konnten, im Gegensatz zur hier präsentierten Arbeit, jeweils nur vereinzelt Membranproteine innerhalb der Gruppe der am stärksten akkumulierten Proteine nachgewiesen werden. So wurde in einem 2014 publizierten Plasmamembran-Proteom α-Adaptin-depletierter HeLa-Zellen[4] kein einziges via CME internalisiertes klassisches Frachtprotein unter den 50 am stärksten vom KD betroffenen Proteinen nachgewiesen. Der Grad des erzielten KD sowie die Effizienz der dort angewandten Methode zur gezielten Anreicherung von Membranproteinen müssen folglich hinterfragt werden. Ein weiteres Plasmamembran-Proteom µ2-depletierter HeLa-Zellen, welches im Zuge einer Publikation über die Clathrin-unabhängige Internalisierung des Transmembranproteins CD166 im Jahr 2020 entstanden ist[267], beinhaltet ebenfalls nicht einmal zur Hälfte Membranproteine innerhalb der Gruppe der am stärksten vom KD beeinflussten Proteine. Der zusätzliche Nachweis einer nur rund 50-prozentigen Reduktion der beiden AP-2-Untereinheiten µ2 und ß2 in siRNA-behandelten Zellen kann nur so interpretiert werden, dass ein unvollständiger KD erzielt wurde, der mit einer lediglich geringfügigen Hemmung der CME einherging. Abgesehen von dieser Kritik zeigt jene Publikation aus dem Jahr 2020 sehr schlüssig die CME-unabhängige Internalisierung des Membranproteins CD166. Dies

wiederum steht im Einklang mit den Ergebnissen der hier präsentierten Arbeit und der nahezu unveränderten Zelloberflächenexpression von CD166 in µ2-depletierten HeLa-Zellen. Die ausbleibende Akkumulation des Proteins an der Plasmamembran AP-2-depletierter Zellen weist indirekt auf die Internalisierung durch einen Clathrin-unabhängigen Endozytose-Mechanismus hin, welcher trotz inhibierter CME weiterhin funktionsfähig ist und einer Anhäufung des Proteins an der Zelloberfläche entgegenwirkt.

Als das am stärksten akkumulierte Protein an der Plasmamembran µ2-depletierter HeLa-Zellen wurde das membranäre Metalloenzym CA9 mit einer FDR <1% nachgewiesen (Table 1, Seite 37). Hierbei handelt es sich um ein dimeres Typ-1-Transmembranprotein, dessen Untereinheiten über eine jeweils C-terminal lokalisierte, Membran-durchläufige α-Helix in der Plasmamembran verankert sind und über ausgedehnte hydrophobe Wechselwirkungen sowie eine Disulfid- und zwei Wasserstoffbrücken miteinander verbunden sind[268,269]. Das extrazellulär lokalisierte aktive Zentrum des Enzyms katalysiert mithilfe eines als Cofaktor fungierenden Zink-Ions die reversible Hydratisierung von CO_2 zu Kohlensäure[270]. Infolge einer Assoziation mit soliden Tumoren trägt es auf diese Weise zur Azidifizierung des Tumormikromilieus bei[271]. Somit beteiligt sich CA9 an der Genese diverser Tumoren[272] und stellt zugleich einen Marker für Hypoxie[273], einen prognostischen Faktor[274] und einen Angriffspunkt für eine zielgerichtete Therapie mit monoklonalen Antikörpern[275] bzw. anorganischen Inhibitoren dar[2,268]. Trotz der bekannten Überexpression von CA9 in Zervixkarzinom- und zahlreichen weiteren Tumor-Zelllinien[276] befindet sich das Protein unter Heranziehung des iBAQ-Werts lediglich an Position 1877 von insgesamt 2412 identifizierten Proteinen. Zugleich trägt es nur einen geringfügigen Anteil von weit unter 0,1% zur Gesamtmasse des Plasmamembran-Proteoms bei. Seine mehr als zehnfache Akkumulation an der Plasmamembran µ2-depletierter HeLa-Zellen ließ die Existenz eines funktionalen Sortierungssignals für CME innerhalb seines kurzen zytoplasmatischen Anteils vermuten, konnte mithilfe eines CD8-Reporterkonstrukts allerdings nicht bestätigt werden. Stattdessen scheint für die erfolgreiche und effiziente Endozytose dieses Proteins die bereits zuvor beschriebene enge Assoziation mit einer Vielzahl weiterer Membranproteine, wie zum Beispiel den Monocarboxylat-Transportern 1 und 4 (MCT1, MCT4), der Matrix-Metalloprotease 14 (MMP14), β1-Integrin sowie dem Integrin-assoziierten Glykoprotein CD98, entscheidend zu sein[277,278], die allesamt mittels CME internalisiert werden.

Mit den Proteinen Porimin, einem Zelltod-vermittelnden Zelloberflächenrezeptor[279], dem Transmembranprotein 106B, einem Regulator lysosomaler Aktivität mit Bezug zu neurodegenerativen[280,281] und onkologischen Erkrankungen[282], dem Protein PTTG1 (engl. *pituitary tumor-transforming gene 1 protein-interacting protein*), einem Protoonkogen[283], sowie dem Protein ECE1 (engl. *endothelin converting enzyme 1*), einer Zink-Metalloprotease[284] mit Bezug zu gynäkologischen Tumoren[285] und M. Alzheimer[286], weisen die Positionen zwei bis

fünf innerhalb des Proteoms zwar funktional große Unterschiede auf, werden jedoch von Typ-1- bzw. Typ-2-Transmembranproteinen gebildet, die jeweils ein bekanntes im Rahmen der CME fungierendes Sortierungssignal besitzen[279,287-290]. In allen vier Fällen stellt die starke, mehr als achtfache Akkumulation an der Plasmamembran somit eine direkte Folge ausbleibender Internalisierung infolge inhibierter CME dar.

Neben weiteren Singlepass-Transmembranproteinen mit überwiegend bekannten Sortierungssignalen sowie zahlreichen Multipass-Transmembranproteinen mit gleich mehreren zytoplasmatischen Anteilen und nur vereinzelt identifizierten Sortierungssignalen beinhaltet die Liste der am stärksten akkumulierten Proteine an Position 43 ein kleines bisher wenig erforschtes Transmembranprotein mit unbekannter Funktion (Abb. 10). Dieses als SMIM29 oder c6orf1 bezeichnete Singlepass-Transmembranprotein hat eine Sequenz von 102 Aminosäuren und beinhaltet eine vorhergesagte Membran-durchlaufende α-Helix (Typ-1), einen kurzen extrazellulären sowie einen etwas längeren zytoplasmatischen Anteil[3].

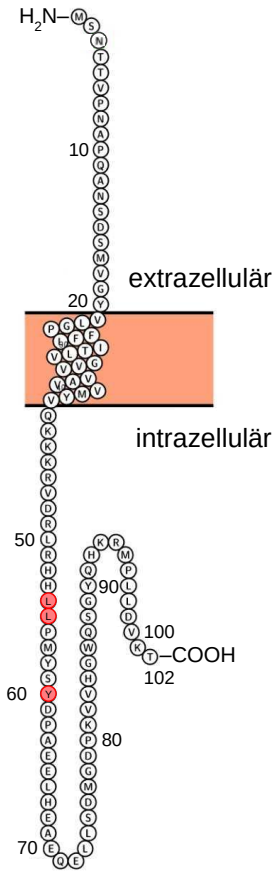


Abb. 10: SMIM29. Das in dieser Arbeit identifizierte Protein SMIM29/c6orf1 - mit starker Abhängigkeit von CME - steht mittlerweile im Fokus der Arbeitsgruppe, da es Vertreter einer neuen Proteinfamilie ist, zwischen der Plasmamembran und intrazellulären Kompartimenten transportiert wird und bei einem KD im Zebrafischmodell zu einer phänotypisch sichtbaren Veränderung führt, sodass sich eine Vielzahl neuer Fragestellungen eröffnen. Zentrale Aminosäuren eines in dieser Arbeit identifizierten Dileucin-haltigen sowie eines Tyrosin-haltigen Sortierungssignals sind in der Abb. jeweils rot hervorgehoben (erstellt mithilfe der Open-Source-Software Protter[291]).

Mithilfe eines CD8-Reporterkonstrukts sowie gezielter Mutationen innerhalb des intrazellulären Anteils von SMIM29 konnte im Rahmen dieser Arbeit sowohl ein Dileucin-haltiges (L54, L55) als auch ein Tyrosin-haltiges (Y60) Sortierungssignal innerhalb des zytoplasmatischen Anteils von SMIM29 identifiziert werden (Fig. 3, S. 39; Fig. S3, S. 52). Auf diese Weise konnte das Membranprotein SMIM29 erstmals mit CME in Verbindung gebracht

und als ein entsprechendes Frachtprotein beschrieben werden. Zugleich ebnen die Ergebnisse dieser Arbeit den Weg für eine weiterführende Analyse und funktionale Charakterisierung dieses inzwischen im Fokus der Arbeitsgruppe stehenden Singlepass-Transmembranproteins.

Innerhalb der Gruppe der am stärksten akkumulierten Proteine befinden sich mit dem LDL-Rezeptor und dem VLDL-Rezeptor (engl. *very-low-density lipoprotein*) auch Membranproteine, deren Endozytose von monomeren Adaptoren, im genannten Fall von Dab2 und ARH, vermittelt wird (siehe Kapitel 2.3.4). Ihre Anhäufung an der Plasmamembran sowie die Akkumulation weiterer Dab2-typischer Fracht, unter der sich auch die mit dem LDL-Rezeptor verwandten Proteine (engl. *LDL receptor-related protein,* LRP) LRP5, LRP8, LRP10 und LRP11 befinden, verdeutlicht die enge funktionale Interaktion zwischen AP-2 und Dab2 sowie die Auswirkungen des hier angewandten µ2-KD auf sämtliche Aspekte der CME. Diese Auswirkungen werden zusätzlich in der veränderten Oberflächenexpression eines Großteils aller Integrine sichtbar, gekennzeichnet durch die Akkumulation von insgesamt acht sowie einer Verminderung weiterer zwei Untereinheiten an der Plasmamembran µ2-depletierter Zellen. Die mittels Time-Lapse-Mikroskopie detektierte verminderte Fähigkeit zur Zellmigration AP-2-depletierter Zellen verdeutlicht darüber hinaus die beeinträchtigte Regulation der Integrin-Expression an der Plasmamembran CME-inhibierter Zellen sowie ihre hiermit einhergehende stark reduzierte Fähigkeit zur Lokomotion (Fig. 4, S. 40).

4.4. Analyse endo-/lysosomaler Proteine

Neben einer Akkumulation von bekannten Proteinen der Plasmamembran zeigen die hier vorgestellten Daten deutliche Auswirkungen des erzielten µ2-KD auf Bestandteile des endo-/lysosomalen Systems. Auch diese Proteine akkumulierten an der Zelloberfläche der AP-2-depletierten Zellen und repräsentieren einen Anteil von rund 40% der am stärksten vom KD betroffenen Proteine (Fig. 5, S. 40). Ihre Anreicherung an der Zelloberfläche kann auf einen gestörten Austausch zwischen der Plasmamembran und Bestandteilen des Endomembransystems in µ2-depletierten Zellen zurückgeführt werden. Ein solcher Austausch erfolgt unter physiologischen Bedingungen fortlaufend im Rahmen eines indirekten Transports neu synthetisierter endo-/lysosomaler Proteine über die Plasmamembran[292] sowie zusätzlich infolge einer Fusion von Endosomen und Lysosomen mit der Plasmamembran, beispielsweise im Rahmen von Reparaturmechanismen nach mechanischer Schädigung der Zelloberfläche[293,294]. Darüber hinaus trägt die Fusion multivesikulärer Körperchen mit der Plasmamembran zur Ausbildung und Freisetzung von Exosomen bei und ermöglicht auf diese Weise einen zusätzlichen Austausch zwischen den verschiedenen Zellkompartimenten[295]. Die hieraus resultierende Durchmischung von Bestandteilen der endo-/lysosomalen Membranen mit Bestandteilen der Plasmamembran erfordert eine schnelle und zugleich zielgerichtete

Endozytose von endo-/lysosomalen Membranproteinen, um die spezifische Zusammensetzung und das Gleichgewicht zwischen Plasmamembran, Endosomen und Lysosomen zu wahren[296]. Für zahlreiche Membranproteine des endo-/lysosomalen Systems, wie beispielsweise LAMP1[99,297], LAMP2[298] und CD63[299,300], sind klassische Sortierungssignale seit langem bekannt und vermitteln eine effiziente Internalisierung mittels CME[301]. Infolge des hier erzielten µ2-KD samt einhergehender Hemmung der CME blieb die gezielte Internalisierung dieser Membranproteine jedoch aus und resultierte stattdessen in der beobachteten Akkumulation an der Plasmamembran.

Darüber hinaus unterstreicht der hohe Anteil von Membranproteinen, die mit dem endo-/lysosomalen System oder der Plasmamembran assoziiert sind, sowie das Vorliegen eines nur geringen Anteils von Proteinen, die dem Zytosol oder anderen Zellkompartimenten entstammen, die Qualität des hier präsentierten Plasmamembran-Proteoms. Damit übereinstimmend erbrachte eine weitergehende Analyse der wichtigsten Interaktionspartner, dass auch die mit LAMP1 interagierenden Proteine Rab5c (engl. *ras-related in brain 5*) und VAMP8 (engl. vesicle associated membrane protein 8), welche sich an der erfolgreichen Fusion von Endosomen mit der Plasmamembran beteiligen[302,303], im Zuge des erzielten µ2-KD eine Akkumulation an der Zelloberfläche erfuhren (Fig. 6, S. 41). Im Zytosol gelöste Interaktionspartner von LAMP1 wurden entsprechend dem hier präsentierten Ansatz zur gezielten Bestimmung von Veränderungen innerhalb des Plasmamembran-Proteoms hingegen nicht nachgewiesen. Ferner weist die darüber hinaus detektierte verminderte Zelloberflächenexpression der beiden CD63-Interkationspartner Tetherin und Stomatin, bei gleichzeitiger Akkumulation anderer CD63-Interaktionspartner und bekannter Anreicherung dieser beiden Proteine innerhalb sogenannter *Lipid Rafts*[304,305], auf die weiterhin erfolgreiche Internalisierung mittels Clathrin-unabhängiger Endozytose-Mechanismen hin.

4.5. Funktionalität der CIE

Neben CME existieren mehrere Formen von CIE, jeweils gekennzeichnet durch Membranstrukturen, die sich in ihrer Form und Größe von CCVs unterscheiden, per Definition keine Clathrin-Hülle besitzen und eine Internalisierung bestimmter Frachtmoleküle selbst in CME-inhibierten Zellen vermitteln[306]. Hierzu zählt die schnelle Endophilin-vermittelte Endozytose (engl. *fast endophilin-mediated endocytosis*, FEME), die insbesondere eine Clathrin-unabhängige Internalisierung aktivierter G-Protein-gekoppelter Rezeptoren ermöglicht[307], sowie die hiervon losgelöste Endozytose bestimmter GPI-verankerter Proteine und weiterer Frachtproteine unter Ausbildung Clathrin-unabhängiger Carrier (engl. *clathrin-independent carrier*, CLIC), welche zu endozytotischen Kompartimenten heranreifen, die mit GPI-verankerten Proteinen angereichert sind (engl. *GPI-anchored protein enriched endocytic compartment*, GEEC) und eine Form tubulärer früher Endosomen darstellen[308]. Darüber

hinaus existiert mit der Makropinozytose ein von Wachstumsfaktoren, Chemokinen und Toll-like Rezeptoren ausgehender signalvermittelter Mechanismus, der eine Internalisierung großer Flüssigkeitsmengen durch Vorwölbung der Plasmamembran ohne eine spezifische Bindung bestimmter Frachtmoleküle vermittelt[306]. Wenngleich die Existenz dieser Clathrin-unabhängigen Internalisierungsmechanismen weitestgehend unumstritten ist, besteht zurzeit eine kontrovers geführte Debatte hinsichtlich ihrer physiologischen Relevanz und ihres Beitrags zur endozytotischen Gesamtleistung eukaryotischer Zellen. Dieser wurde in vorangegangenen Publikationen als vernachlässigbar gering[4] bis hin zu einem Anteil von 85% angegeben[309].

Im Rahmen der hier präsentierten Arbeit wurde die endozytotische Gesamtleistung durch eine reversible Markierung von Zelloberflächenproteinen mit NHS-AEDP-ATTO488 bestimmt und erbrachte in µ2-depletierten HeLa-Zellen eine im Vergleich zu Kontrollzellen rund 60-prozentige Verminderung (Fig. S6, S. 82; Fig. S7, S. 83). Im Umkehrschluss bedeutet dies einen durchaus bedeutsamen Anteil von CIE an der Endozytosekapazität von HeLa-Zellen. Die Daten stehen zudem im Einklang mit dem Plasmamembran-Proteom dieser Arbeit, das eine Akkumulation von gut 60% aller identifizierten Proteine sowie rund 80% aller Proteine mit einer FDR <1% ergab. Die Funktionsfähigkeit alternativer Endozytosewege in CME-inhibierten Zellen wird zusätzlich durch die nahezu unveränderte Oberflächenexpression einer Vielzahl unterschiedlicher CIE-Marker innerhalb das Plasmamembran-Proteoms AP-2-depletierter HeLa-Zellen bekräftigt. Hierzu zählen neben dem Hyaluronsäure-Rezeptor (CD44)[310], dem Poliovirus-Rezeptor (CD155)[311] und dem IGF1-Rezeptor[312] (engl. *insulin-like growth factor 1*) zahlreiche identifizierte GPI-verankerte Proteine, wie zum Beispiel die beiden innerhalb des Komplementsystems agierenden Proteine CD55[310] und CD59[313] sowie der Folat-Rezeptor FOLR1[314] (Table S1D, S. 53). Die mittels Durchflusszytometrie (engl. *fluorescence-activated cell sorting*, FACS) ermittelte Quantifizierung der Endozytoserate einer Vielzahl unterschiedlicher Membranproteine in CME-inhibierten Zellen erbrachte in Übereinstimmung mit den Daten des Plasmamembran-Proteoms ebenfalls keine verminderte Internalisierungsrate typischer CIE-Marker (Fig. 7, S. 42). Zusammengefasst zeigen die Daten dieser Arbeit eine signifikante Aktivität von CIE in CME-inhibierten HeLa-Zellen, die nicht nur zur Internalisierung bestimmter Membranproteine, sondern darüber hinaus zur Aufrechterhaltung eines konstanten Verhältnisses zwischen Zelloberfläche und -volumen beiträgt, sodass µ2-depletierte und -nicht-depletierte Zellen morphologisch kaum unterscheidbar sind.

Eine spezielle Gruppe von Membranproteinen sind solche, die einen GPI-Anker besitzen und somit weder über einen zytoplasmatischen Proteinanteil noch über etwaige Sortierungs-signale verfügen. Die hier vorgestellten Daten zum Plasmamembran-Proteom sowie die sich anschließende Analyse der Zelloberflächenexpression einzelner GPI-verankerter Proteine

mittels Immunfluoreszenz lieferten ein überraschend heterogenes Bild (Fig. 8, S. 42): Etwa ein Drittel der identifizierten GPI-verankerten Proteine zeigte eine bis zu dreifache Akkumulation, während die anderen Vertreter dieser Gruppe eine weitgehend unveränderte oder sogar verminderte Zelloberflächenexpression aufwiesen. Diese Daten deuten indirekt auf eine besondere Relevanz Clathrin-unabhängiger Internalisierungsmechanismen im Hinblick auf die Endozytose vieler GPI-verankerter Proteine hin, legen zusätzlich jedoch die Notwendigkeit von CME für die erfolgreiche Endozytose eines kleineren Teils aller an der Zelloberfläche exprimierten GPI-verankerten Proteine nahe. Die Ergebnisse einer vorangegangenen Arbeit weisen in diesem Zusammenhang zusätzlich darauf hin, dass das am stärksten akkumulierte GPI-verankerte Protein CD73, eine an der Zelloberfläche lokalisierten Nukleotidase[315], infolge einer Interaktion mit dem Protein FERMT2 (engl. *fermitin family homolog 2*) und einer hierüber vermittelten indirekten Bindung an die CHC in Abhängigkeit von CME internalisiert wird[316].
Wenngleich mittels quantitativer Massenspektrometrie grundsätzlich auch Änderungen hinsichtlich der Expression regulatorisch wirkender Proteine Clathrin-abhängiger und -unabhängiger Endozytose identifiziert werden können, ermöglichte das im Rahmen dieser Arbeit angewandte Protokoll zur gezielten Bestimmung von Zelloberflächenproteinen infolge ausgiebiger Waschschritte diesbezüglich keine Aussagen. So beinhaltet das hier präsentierte Plasmamembran-Proteom beispielsweise weder Bestandteile des heterotetrameren Adaptorkomplexes AP-2 noch Proteine der Cavin-Familie, Caveolin oder das Protein GRAF1 (engl. *GTPase regulator associated with focal adhesion kinase 1*), welches eine Hauptkomponente der CLIC/GEEC-vermittelten Endozytose darstellt[317]. Wenngleich die Akkumulation anderer Marker, wie zum Beispiel Gelectin-3[318], CDC42[314] oder Arf1[319] (engl. *ADP ribosylation factor 1)*, grundsätzlich auf eine hochregulierte CIE in CME-inhibierten Zellen hindeutet, wären weitere Experimente in abgewandelter Methodik notwendig, um die Regulation und Umsetzung Clathrin-unabhängiger Endozytosewege besser zu verstehen.

4.6. Medizinische Aspekte inhibierter CME

Während eine vollständige Hemmung von CME mit dem Leben nicht vereinbar ist[260], existieren mehrere Erkrankungen, die jeweils mit Punktmutationen innerhalb einzelner Untereinheiten des heterotetrameren Adaptorkomplexes AP-2 in Zusammenhang gebracht werden. Hierzu zählt die familiäre hypokalziurische Hyperkalzämie Typ-3, die mit Mutationen im Bereich der Bindungsstelle für saure Dileucin-Motive innerhalb der σ2-Untereinheit assoziiert ist[320,321]. Zu einem anderen Krankheitsbild gehören neurologische Entwicklungsstörungen sowie Formen generalisierter Epilepsie, welche mit einer Mutation innerhalb der µ2-Untereinheit und einer hierdurch bedingten beeinträchtigten Konformationsänderung des Adaptorkomplexes AP-2 einhergehen[322]. Inwieweit sich die beschriebenen Mutationen auf die Endozytose einzelner

Membranproteine auswirken, ist bislang nicht untersucht. Die hier präsentierte Methode zur gezielten Bestimmung von Veränderungen innerhalb des Plasmamembran-Proteoms könnte daher in zukünftigen Experimenten genutzt werden, um unter Heranziehung entsprechend mutierter Zellen dieser Frage nachzugehen und den jeweils zugrundeliegenden Pathomechanismus weiter aufzuklären.

Darüber hinaus konnte im Rahmen dieser Arbeit eine Akkumulation der membrangebundenen Proteasen ADAM10 (engl. *a disintegrin and metalloproteinase 10*), BACE1 (engl. *beta-site of APP cleaving enzyme 1*) und BACE2 an der Plasmamembran CME-inhibierter HeLa-Zellen bestimmt werden. Diese Proteine vermitteln unter anderem eine jeweils an unterschiedlicher Stelle vollzogene Spaltung des Typ-1-Transmembranproteins APP (engl. *amyloid precursor protein*), infolgedessen entweder das kurze mit Morbus Alzheimer assoziierte Peptidfragment Beta-Amyloid oder ein deutlich längeres extrazelluläres Fragment entsteht, das der Bildung von Beta-Amyloid und somit der Genese von Morbus Alzheimer entgegenwirkt[323,324]. Die zusätzliche, jeweils mehr als zweifache Akkumulation von APP sowie des verwandten Proteins APLP2 (engl. *amyloid beta precursor like protein 2*)[325] weist zum einen auf eine Abhängigkeit der Zelloberflächenexpression beider Proteine von CME und zum anderen auf eine gehemmte Aktivität der membrangebundenen Proteasen ADAM10, BACE1 und BACE2 in µ2-depletierten HeLa-Zellen hin. Diese ist am ehesten auf die Akkumulation einer Vielzahl regulatorisch bzw. inhibierend wirkender Proteine zurückzuführen, wie zum Beispiel Reticulon-3[326], TIMP1[327] (engl. *tissue inhibitor of metalloproteinases 1*) und diverser Tetraspanine[328], die sich ebenfalls infolge inhibierter CME an der Zelloberfläche der µ2-depletierten Zellen anreicherten. Wenngleich eine detaillierte Analyse der Aktivität von Proteasen und möglicher Auswirkungen auf das Sekretom AP-2-depletierter HeLa-Zellen den Rahmen dieser Arbeit überstiegen hätte, liefern die hier präsentierten Ergebnisse einen Ansatzpunkt für zukünftige Studien. Hierbei kann neben der systematischen Analyse des Sekretoms CME-inhibierter Zellen auch eine Untersuchung der CME-Aktivität sowie des Plasmamembran-Proteoms solcher Zellen stehen, die von Patientinnen und Patienten mit neurodegenerativen Erkrankungen stammen.

Neben sämtlichen Ergebnissen zur CME in AP-2-depletierten HeLa-Zellen wurden im Rahmen dieser Arbeit auch zur quantitativen Bestimmung des Plasmamembran-Proteoms HeLa-Zellen genutzt. Diese stellen, ausgehend von humanen Epithelzellen eines Zervixkarzinoms[329], das am längsten etablierte Zellsystem dar. Der angewandte µ2-KD resultierte hierbei in einer Akkumulation diverser Klassen von Zelloberflächenproteinen, von denen ein Teil als Rezeptor, Transporter oder – wie zum Beispiel im Fall von CA9 - als Antigen im Zuge einer zielgerichteten antitumoralen Therapie fungiert. Angewandt auf andere Zelllinien kann die hier beschriebene Methode Veränderungen innerhalb des Plasmamembran-Proteoms diverser Malignome zum Vorschein bringen und infolgedessen bislang unbeachtete Membranproteine als ein potenzielles Ziel für eine pharmakologische Therapie identifizieren. Die Entwicklung und

Anwendung einer therapeutisch genutzten, mehr oder minder stark erzielten Inhibition der CME könnte darüber hinaus die Verfügbarkeit von Proteinen an der Zelloberfläche erhöhen, die als Angriffspunkte für eine zielgerichtete medikamentöse Therapie fungieren. In diesem Zusammenhang sollten allerdings die hier präsentierten umfangreichen Veränderungen innerhalb des Plasmamembran-Proteoms CME-inhibierter Zellen mit Auswirkungen auf diverse Zellfunktionen nicht unterschätzt werden, die unerwünschte Nebenwirkungen zur Folge haben können.

Zusammengefasst bilden die Ergebnisse dieser Arbeit nicht nur eine in dieser Form erstmalig publizierte umfangreiche Referenz für Veränderungen des Plasmamembran-Proteoms in CME-inhibierten HeLa-Zellen, sondern liefern zugleich neue Erkenntnisse hinsichtlich der Endozytose verschiedener Klassen von Membranproteinen, einen Bezug zu diversen Erkrankungen sowie multiple Ansätze für potenzielle, sich anschließende spannende Forschungsprojekte.

5. Literaturverzeichnis

1. Tyanova S, Temu T, Sinitcyn P, et al. The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat Methods* 2016; **13**(9): 731-40.
2. Mishra CB, Mongre RK, Prakash A, Jeon R, Supuran CT, Lee MS. Anti-breast cancer action of carbonic anhydrase IX inhibitor 4-[4-(4-Benzo[1,3]dioxol-5-ylmethyl-piperazin-1-yl)-benzylidene-hydrazinocarbonyl]-benzenesulfonamide (BSM-0004): in vitro and in vivo studies. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2021; **36**(1): 954-63.
3. Kazmierczak B, Borrmann L, Bullerdiek J. Assignment of a new gene (LBH). *Genomics* 1999; **56**(1): 136-7.
4. Bitsikas V, Correa IR, Jr., Nichols BJ. Clathrin-independent pathways do not contribute significantly to endocytic flux. *Elife* 2014; **3**: e03970.
5. Nelson DL, Cox MM, Hoskins AA. Lehninger principles of biochemistry. Eighth edition ed. New York, NY: Macmillan International Higher Education; 2021.
6. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. Molecular biology of the cell. Sixth edition. ed. New York, NY: Garland Science, Taylor and Francis Group; 2015.
7. Irannejad R, Tsvetanova NG, Lobingier BT, von Zastrow M. Effects of endocytosis on receptor-mediated signaling. *Curr Opin Cell Biol* 2015; **35**: 137-43.
8. Maritzen T, Schachtner H, Legler DF. On the move: endocytic trafficking in cell migration. *Cell Mol Life Sci* 2015; **72**(11): 2119-34.
9. Charpentier JC, King PD. Mechanisms and functions of endocytosis in T cells. *Cell Commun Signal* 2021; **19**(1): 92.
10. Mayor S, Parton RG, Donaldson JG. Clathrin-independent pathways of endocytosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2014; **6**(6).
11. Sandvig K, Kavaliauskiene S, Skotland T. Clathrin-independent endocytosis: an increasing degree of complexity. *Histochem Cell Biol* 2018; **150**(2): 107-18.
12. Kaksonen M, Roux A. Mechanisms of clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2018; **19**(5): 313-26.
13. Pearse BM. Coated vesicles from pig brain: purification and biochemical characterization. *J Mol Biol* 1975; **97**(1): 93-8.
14. Bhave M, Mino RE, Wang X, et al. Functional characterization of 67 endocytic accessory proteins using multiparametric quantitative analysis of CCP dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2020; **117**(50): 31591-602.
15. Borner GH, Antrobus R, Hirst J, et al. Multivariate proteomic profiling identifies novel accessory proteins of coated vesicles. *J Cell Biol* 2012; **197**(1): 141-60.
16. Traub LM. Tickets to ride: selecting cargo for clathrin-regulated internalization. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009; **10**(9): 583-96.
17. Pearse BM. Clathrin: a unique protein associated with intracellular transfer of membrane by coated vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1976; **73**(4): 1255-9.
18. Keen JH, Willingham MC, Pastan IH. Clathrin-coated vesicles: isolation, dissociation and factor-dependent reassociation of clathrin baskets. *Cell* 1979; **16**(2): 303-12.
19. Hirst J, Barlow LD, Francisco GC, et al. The fifth adaptor protein complex. *PLoS Biol* 2011; **9**(10): e1001170.
20. Pearse BM, Bretscher MS. Membrane recycling by coated vesicles. *Annu Rev Biochem* 1981; **50**: 85-101.
21. Heuser JE, Reese TS. Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J Cell Biol* 1973; **57**(2): 315-44.
22. Roth TF, Porter KR. Yolk Protein Uptake in the Oocyte of the Mosquito Aedes Aegypti. L. *J Cell Biol* 1964; **20**: 313-32.
23. Heuser J. Three-dimensional visualization of coated vesicle formation in fibroblasts. *J Cell Biol* 1980; **84**(3): 560-83.
24. Crowther RA, Finch JT, Pearse BM. On the structure of coated vesicles. *J Mol Biol* 1976; **103**(4): 785-98.
25. Kanaseki T, Kadota K. The "vesicle in a basket". A morphological study of the coated vesicle isolated from the nerve endings of the guinea pig brain, with special reference to the mechanism of membrane movements. *J Cell Biol* 1969; **42**(1): 202-20.

26. Cocucci E, Aguet F, Boulant S, Kirchhausen T. The first five seconds in the life of a clathrin-coated pit. *Cell* 2012; **150**(3): 495-507.
27. Antonny B, Burd C, De Camilli P, et al. Membrane fission by dynamin: what we know and what we need to know. *EMBO J* 2016; **35**(21): 2270-84.
28. Sousa R, Lafer EM. The role of molecular chaperones in clathrin mediated vesicular trafficking. *Front Mol Biosci* 2015; **2**: 26.
29. Ungewickell E, Branton D. Assembly units of clathrin coats. *Nature* 1981; **289**(5796): 420-2.
30. Kirchhausen T, Harrison SC. Protein organization in clathrin trimers. *Cell* 1981; **23**(3): 755-61.
31. Ungewickell E. Biochemical and immunological studies on clathrin light chains and their binding sites on clathrin triskelions. *EMBO J* 1983; **2**(8): 1401-8.
32. Kirchhausen T, Harrison SC, Parham P, Brodsky FM. Location and distribution of the light chains in clathrin trimers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983; **80**(9): 2481-5.
33. Fotin A, Cheng Y, Sliz P, et al. Molecular model for a complete clathrin lattice from electron cryomicroscopy. *Nature* 2004; **432**(7017): 573-9.
34. Kirchhausen T, Harrison SC, Heuser J. Configuration of clathrin trimers: evidence from electron microscopy. *J Ultrastruct Mol Struct Res* 1986; **94**(3): 199-208.
35. Kirchhausen T, Harrison SC, Chow EP, et al. Clathrin heavy chain: molecular cloning and complete primary structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; **84**(24): 8805-9.
36. Kirchhausen T, Harrison SC. Structural domains of clathrin heavy chains. *J Cell Biol* 1984; **99**(5): 1725-34.
37. ter Haar E, Musacchio A, Harrison SC, Kirchhausen T. Atomic structure of clathrin: a beta propeller terminal domain joins an alpha zigzag linker. *Cell* 1998; **95**(4): 563-73.
38. Ybe JA, Brodsky FM, Hofmann K, et al. Clathrin self-assembly is mediated by a tandemly repeated superhelix. *Nature* 1999; **399**(6734): 371-5.
39. Morris KL, Jones JR, Halebian M, et al. Cryo-EM of multiple cage architectures reveals a universal mode of clathrin self-assembly. *Nat Struct Mol Biol* 2019; **26**(10): 890-8.
40. Kirchhausen T, Scarmato P, Harrison SC, et al. Clathrin light chains LCA and LCB are similar, polymorphic, and share repeated heptad motifs. *Science* 1987; **236**(4799): 320-4.
41. Scarmato P, Kirchhausen T. Analysis of clathrin light chain-heavy chain interactions using truncated mutants of rat liver light chain LCB3. *J Biol Chem* 1990; **265**(7): 3661-8.
42. Brodsky FM, Galloway CJ, Blank GS, et al. Localization of clathrin light-chain sequences mediating heavy-chain binding and coated vesicle diversity. *Nature* 1987; **326**(6109): 203-5.
43. Ybe JA, Perez-Miller S, Niu Q, Coates DA, Drazer MW, Clegg ME. Light chain C-terminal region reinforces the stability of clathrin heavy chain trimers. *Traffic* 2007; **8**(8): 1101-10.
44. Dannhauser PN, Platen M, Boning H, Ungewickell H, Schaap IA, Ungewickell EJ. Effect of clathrin light chains on the stiffness of clathrin lattices and membrane budding. *Traffic* 2015; **16**(5): 519-33.
45. Ybe JA, Greene B, Liu SH, Pley U, Parham P, Brodsky FM. Clathrin self-assembly is regulated by three light-chain residues controlling the formation of critical salt bridges. *EMBO J* 1998; **17**(5): 1297-303.
46. Ungewickell E, Ungewickell H. Bovine brain clathrin light chains impede heavy chain assembly in vitro. *J Biol Chem* 1991; **266**(19): 12710-4.
47. Wilbur JD, Hwang PK, Ybe JA, et al. Conformation switching of clathrin light chain regulates clathrin lattice assembly. *Dev Cell* 2010; **18**(5): 841-8.
48. Wakeham DE, Abi-Rached L, Towler MC, Wilbur JD, Parham P, Brodsky FM. Clathrin heavy and light chain isoforms originated by independent mechanisms of gene duplication during chordate evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; **102**(20): 7209-14.
49. Brodsky FM, Parham P. Polymorphism in clathrin light chains from different tissues. *J Mol Biol* 1983; **167**(1): 197-204.
50. Xing Y, Bocking T, Wolf M, Grigorieff N, Kirchhausen T, Harrison SC. Structure of clathrin coat with bound Hsc70 and auxilin: mechanism of Hsc70-facilitated disassembly. *EMBO J* 2010; **29**(3): 655-65.

51. Mettlen M, Loerke D, Yarar D, Danuser G, Schmid SL. Cargo- and adaptor-specific mechanisms regulate clathrin-mediated endocytosis. *J Cell Biol* 2010; **188**(6): 919-33.
52. Paraan M, Mendez J, Sharum S, Kurtin D, He H, Stagg SM. The structures of natively assembled clathrin-coated vesicles. *Sci Adv* 2020; **6**(30): eaba8397.
53. Cheng Y, Boll W, Kirchhausen T, Harrison SC, Walz T. Cryo-electron tomography of clathrin-coated vesicles: structural implications for coat assembly. *J Mol Biol* 2007; **365**(3): 892-9.
54. Smith CJ, Grigorieff N, Pearse BM. Clathrin coats at 21 A resolution: a cellular assembly designed to recycle multiple membrane receptors. *EMBO J* 1998; **17**(17): 4943-53.
55. Musacchio A, Smith CJ, Roseman AM, Harrison SC, Kirchhausen T, Pearse BM. Functional organization of clathrin in coats: combining electron cryomicroscopy and X-ray crystallography. *Mol Cell* 1999; **3**(6): 761-70.
56. Grove J, Metcalf DJ, Knight AE, et al. Flat clathrin lattices: stable features of the plasma membrane. *Mol Biol Cell* 2014; **25**(22): 3581-94.
57. Leyton-Puig D, Isogai T, Argenzio E, et al. Flat clathrin lattices are dynamic actin-controlled hubs for clathrin-mediated endocytosis and signalling of specific receptors. *Nat Commun* 2017; **8**: 16068.
58. Avinoam O, Schorb M, Beese CJ, Briggs JA, Kaksonen M. ENDOCYTOSIS. Endocytic sites mature by continuous bending and remodeling of the clathrin coat. *Science* 2015; **348**(6241): 1369-72.
59. Sochacki KA, Heine BL, Haber GJ, et al. The structure and spontaneous curvature of clathrin lattices at the plasma membrane. *Dev Cell* 2021; **56**(8): 1131-46 e3.
60. Bucher D, Frey F, Sochacki KA, et al. Clathrin-adaptor ratio and membrane tension regulate the flat-to-curved transition of the clathrin coat during endocytosis. *Nat Commun* 2018; **9**(1): 1109.
61. Saleem M, Morlot S, Hohendahl A, Manzi J, Lenz M, Roux A. A balance between membrane elasticity and polymerization energy sets the shape of spherical clathrin coats. *Nat Commun* 2015; **6**: 6249.
62. Boulant S, Kural C, Zeeh JC, Ubelmann F, Kirchhausen T. Actin dynamics counteract membrane tension during clathrin-mediated endocytosis. *Nat Cell Biol* 2011; **13**(9): 1124-31.
63. Willy NM, Ferguson JP, Akatay A, et al. De novo endocytic clathrin coats develop curvature at early stages of their formation. *Dev Cell* 2021; **56**(22): 3146-59 e5.
64. Dannhauser PN, Ungewickell EJ. Reconstitution of clathrin-coated bud and vesicle formation with minimal components. *Nat Cell Biol* 2012; **14**(6): 634-9.
65. Smith SM, Larocque G, Wood KM, et al. Multi-modal adaptor-clathrin contacts drive coated vesicle assembly. *EMBO J* 2021; **40**(19): e108795.
66. Mettlen M, Chen PH, Srinivasan S, Danuser G, Schmid SL. Regulation of Clathrin-Mediated Endocytosis. *Annu Rev Biochem* 2018; **87**: 871-96.
67. Owen DJ, Collins BM, Evans PR. Adaptors for clathrin coats: structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004; **20**: 153-91.
68. Greene B, Liu SH, Wilde A, Brodsky FM. Complete reconstitution of clathrin basket formation with recombinant protein fragments: adaptor control of clathrin self-assembly. *Traffic* 2000; **1**(1): 69-75.
69. Gallusser A, Kirchhausen T. The beta 1 and beta 2 subunits of the AP complexes are the clathrin coat assembly components. *EMBO J* 1993; **12**(13): 5237-44.
70. Zaremba S, Keen JH. Assembly polypeptides from coated vesicles mediate reassembly of unique clathrin coats. *J Cell Biol* 1983; **97**(5 Pt 1): 1339-47.
71. Park SY, Guo X. Adaptor protein complexes and intracellular transport. *Biosci Rep* 2014; **34**(4).
72. Ahle S, Mann A, Eichelsbacher U, Ungewickell E. Structural relationships between clathrin assembly proteins from the Golgi and the plasma membrane. *EMBO J* 1988; **7**(4): 919-29.
73. Robinson MS. 100-kD coated vesicle proteins: molecular heterogeneity and intracellular distribution studied with monoclonal antibodies. *J Cell Biol* 1987; **104**(4): 887-95.

74. Simpson F, Peden AA, Christopoulou L, Robinson MS. Characterization of the adaptor-related protein complex, AP-3. *J Cell Biol* 1997; **137**(4): 835-45.
75. Theos AC, Tenza D, Martina JA, et al. Functions of adaptor protein (AP)-3 and AP-1 in tyrosinase sorting from endosomes to melanosomes. *Mol Biol Cell* 2005; **16**(11): 5356-72.
76. Peden AA, Oorschot V, Hesser BA, Austin CD, Scheller RH, Klumperman J. Localization of the AP-3 adaptor complex defines a novel endosomal exit site for lysosomal membrane proteins. *J Cell Biol* 2004; **164**(7): 1065-76.
77. Dell'Angelica EC. AP-3-dependent trafficking and disease: the first decade. *Curr Opin Cell Biol* 2009; **21**(4): 552-9.
78. Prichard KL, O'Brien NS, Murcia SR, Baker JR, McCluskey A. Role of Clathrin and Dynamin in Clathrin Mediated Endocytosis/Synaptic Vesicle Recycling and Implications in Neurological Diseases. *Front Cell Neurosci* 2021; **15**: 754110.
79. Dell'Angelica EC, Mullins C, Bonifacino JS. AP-4, a novel protein complex related to clathrin adaptors. *J Biol Chem* 1999; **274**(11): 7278-85.
80. Matsuda S, Miura E, Matsuda K, et al. Accumulation of AMPA receptors in autophagosomes in neuronal axons lacking adaptor protein AP-4. *Neuron* 2008; **57**(5): 730-45.
81. Simmen T, Höning S, Icking A, Tikkanen R, Hunziker W. AP-4 binds basolateral signals and participates in basolateral sorting in epithelial MDCK cells. *Nat Cell Biol* 2002; **4**(2): 154-9.
82. Hirst J, Borner GH, Edgar J, et al. Interaction between AP-5 and the hereditary spastic paraplegia proteins SPG11 and SPG15. *Mol Biol Cell* 2013; **24**(16): 2558-69.
83. Hirst J, Itzhak DN, Antrobus R, Borner GHH, Robinson MS. Role of the AP-5 adaptor protein complex in late endosome-to-Golgi retrieval. *PLoS Biol* 2018; **16**(1): e2004411.
84. Folsch H, Pypaert M, Schu P, Mellman I. Distribution and function of AP-1 clathrin adaptor complexes in polarized epithelial cells. *J Cell Biol* 2001; **152**(3): 595-606.
85. Faundez V, Horng JT, Kelly RB. A function for the AP3 coat complex in synaptic vesicle formation from endosomes. *Cell* 1998; **93**(3): 423-32.
86. Boehm M, Bonifacino JS. Adaptins: the final recount. *Mol Biol Cell* 2001; **12**(10): 2907-20.
87. Zaremba S, Keen JH. Limited proteolytic digestion of coated vesicle assembly polypeptides abolishes reassembly activity. *J Cell Biochem* 1985; **28**(1): 47-58.
88. Heuser JE, Keen J. Deep-etch visualization of proteins involved in clathrin assembly. *J Cell Biol* 1988; **107**(3): 877-86.
89. Collins BM, McCoy AJ, Kent HM, Evans PR, Owen DJ. Molecular architecture and functional model of the endocytic AP2 complex. *Cell* 2002; **109**(4): 523-35.
90. Kirchhausen T, Nathanson KL, Matsui W, et al. Structural and functional division into two domains of the large (100- to 115-kDa) chains of the clathrin-associated protein complex AP-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; **86**(8): 2612-6.
91. Krissinel E, Henrick K. Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J Mol Biol* 2007; **372**(3): 774-97.
92. Kovtun O, Dickson VK, Kelly BT, Owen DJ, Briggs JAG. Architecture of the AP2/clathrin coat on the membranes of clathrin-coated vesicles. *Sci Adv* 2020; **6**(30): eaba8381.
93. ter Haar E, Harrison SC, Kirchhausen T. Peptide-in-groove interactions link target proteins to the beta-propeller of clathrin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; **97**(3): 1096-100.
94. Dell'Angelica EC, Klumperman J, Stoorvogel W, Bonifacino JS. Association of the AP-3 adaptor complex with clathrin. *Science* 1998; **280**(5362): 431-4.
95. Shih W, Gallusser A, Kirchhausen T. A clathrin-binding site in the hinge of the beta 2 chain of mammalian AP-2 complexes. *J Biol Chem* 1995; **270**(52): 31083-90.
96. Kelly BT, Graham SC, Liska N, et al. Clathrin adaptors. AP2 controls clathrin polymerization with a membrane-activated switch. *Science* 2014; **345**(6195): 459-63.
97. Nesterov A, Carter RE, Sorkina T, Gill GN, Sorkin A. Inhibition of the receptor-binding function of clathrin adaptor protein AP-2 by dominant-negative mutant mu2 subunit and its effects on endocytosis. *EMBO J* 1999; **18**(9): 2489-99.

98. Ohno H, Aguilar RC, Yeh D, Taura D, Saito T, Bonifacino JS. The medium subunits of adaptor complexes recognize distinct but overlapping sets of tyrosine-based sorting signals. *J Biol Chem* 1998; **273**(40): 25915-21.
99. Ohno H, Stewart J, Fournier MC, et al. Interaction of tyrosine-based sorting signals with clathrin-associated proteins. *Science* 1995; **269**(5232): 1872-5.
100. Boll W, Ohno H, Songyang Z, et al. Sequence requirements for the recognition of tyrosine-based endocytic signals by clathrin AP-2 complexes. *EMBO J* 1996; **15**(21): 5789-95.
101. Collawn JF, Lai A, Domingo D, Fitch M, Hatton S, Trowbridge IS. YTRF is the conserved internalization signal of the transferrin receptor, and a second YTRF signal at position 31-34 enhances endocytosis. *J Biol Chem* 1993; **268**(29): 21686-92.
102. Collawn JF, Stangel M, Kuhn LA, et al. Transferrin receptor internalization sequence YXRF implicates a tight turn as the structural recognition motif for endocytosis. *Cell* 1990; **63**(5): 1061-72.
103. Rohrer J, Schweizer A, Russell D, Kornfeld S. The targeting of Lamp1 to lysosomes is dependent on the spacing of its cytoplasmic tail tyrosine sorting motif relative to the membrane. *J Cell Biol* 1996; **132**(4): 565-76.
104. Owen DJ, Setiadi H, Evans PR, McEver RP, Green SA. A third specificity-determining site in mu 2 adaptin for sequences upstream of Yxx phi sorting motifs. *Traffic* 2001; **2**(2): 105-10.
105. Owen DJ, Evans PR. A structural explanation for the recognition of tyrosine-based endocytotic signals. *Science* 1998; **282**(5392): 1327-32.
106. Jackson LP, Kelly BT, McCoy AJ, et al. A large-scale conformational change couples membrane recruitment to cargo binding in the AP2 clathrin adaptor complex. *Cell* 2010; **141**(7): 1220-9.
107. Kelly BT, McCoy AJ, Spate K, et al. A structural explanation for the binding of endocytic dileucine motifs by the AP2 complex. *Nature* 2008; **456**(7224): 976-9.
108. Dietrich J, Kastrup J, Nielsen BL, Odum N, Geisler C. Regulation and function of the CD3gamma DxxxLL motif: a binding site for adaptor protein-1 and adaptor protein-2 in vitro. *J Cell Biol* 1997; **138**(2): 271-81.
109. Pond L, Kuhn LA, Teyton L, et al. A role for acidic residues in di-leucine motif-based targeting to the endocytic pathway. *J Biol Chem* 1995; **270**(34): 19989-97.
110. Letourneur F, Klausner RD. A novel di-leucine motif and a tyrosine-based motif independently mediate lysosomal targeting and endocytosis of CD3 chains. *Cell* 1992; **69**(7): 1143-57.
111. Pitcher C, Höning S, Fingerhut A, Bowers K, Marsh M. Cluster of differentiation antigen 4 (CD4) endocytosis and adaptor complex binding require activation of the CD4 endocytosis signal by serine phosphorylation. *Mol Biol Cell* 1999; **10**(3): 677-91.
112. Rodionov DG, Höning S, Silye A, Kongsvik TL, von Figura K, Bakke O. Structural requirements for interactions between leucine-sorting signals and clathrin-associated adaptor protein complex AP3. *J Biol Chem* 2002; **277**(49): 47436-43.
113. Höning S, Sandoval IV, von Figura K. A di-leucine-based motif in the cytoplasmic tail of LIMP-II and tyrosinase mediates selective binding of AP-3. *EMBO J* 1998; **17**(5): 1304-14.
114. Gaidarov I, Keen JH. Phosphoinositide-AP-2 interactions required for targeting to plasma membrane clathrin-coated pits. *J Cell Biol* 1999; **146**(4): 755-64.
115. Chang MP, Mallet WG, Mostov KE, Brodsky FM. Adaptor self-aggregation, adaptor-receptor recognition and binding of alpha-adaptin subunits to the plasma membrane contribute to recruitment of adaptor (AP2) components of clathrin-coated pits. *EMBO J* 1993; **12**(5): 2169-80.
116. Höning S, Ricotta D, Krauss M, et al. Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate regulates sorting signal recognition by the clathrin-associated adaptor complex AP2. *Mol Cell* 2005; **18**(5): 519-31.
117. Gaidarov I, Chen Q, Falck JR, Reddy KK, Keen JH. A functional phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate/phosphoinositide binding domain in the clathrin adaptor AP-2 alpha subunit. Implications for the endocytic pathway. *J Biol Chem* 1996; **271**(34): 20922-9.

118. Rohde G, Wenzel D, Haucke V. A phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate binding site within mu2-adaptin regulates clathrin-mediated endocytosis. *J Cell Biol* 2002; **158**(2): 209-14.
119. Goodman OB, Jr., Krupnick JG, Gurevich VV, Benovic JL, Keen JH. Arrestin/clathrin interaction. Localization of the arrestin binding locus to the clathrin terminal domain. *J Biol Chem* 1997; **272**(23): 15017-22.
120. Knuehl C, Chen CY, Manalo V, Hwang PK, Ota N, Brodsky FM. Novel binding sites on clathrin and adaptors regulate distinct aspects of coat assembly. *Traffic* 2006; **7**(12): 1688-700.
121. Owen DJ, Vallis Y, Pearse BM, McMahon HT, Evans PR. The structure and function of the beta 2-adaptin appendage domain. *EMBO J* 2000; **19**(16): 4216-27.
122. Wood LA, Larocque G, Clarke NI, Sarkar S, Royle SJ. New tools for "hot-wiring" clathrin-mediated endocytosis with temporal and spatial precision. *J Cell Biol* 2017; **216**(12): 4351-65.
123. Edeling MA, Mishra SK, Keyel PA, et al. Molecular switches involving the AP-2 beta2 appendage regulate endocytic cargo selection and clathrin coat assembly. *Dev Cell* 2006; **10**(3): 329-42.
124. Pauloin A, Thurieau C. The 50 kDa protein subunit of assembly polypeptide (AP) AP-2 adaptor from clathrin-coated vesicles is phosphorylated on threonine-156 by AP-1 and a soluble AP50 kinase which co-purifies with the assembly polypeptides. *Biochem J* 1993; **296 (Pt 2)**: 409-15.
125. Conner SD, Schmid SL. Identification of an adaptor-associated kinase, AAK1, as a regulator of clathrin-mediated endocytosis. *J Cell Biol* 2002; **156**(5): 921-9.
126. Wrobel AG, Kadlecova Z, Kamenicky J, et al. Temporal Ordering in Endocytic Clathrin-Coated Vesicle Formation via AP2 Phosphorylation. *Dev Cell* 2019; **50**(4): 494-508 e11.
127. Ricotta D, Conner SD, Schmid SL, von Figura K, Höning S. Phosphorylation of the AP2 mu subunit by AAK1 mediates high affinity binding to membrane protein sorting signals. *J Cell Biol* 2002; **156**(5): 791-5.
128. Olusanya O, Andrews PD, Swedlow JR, Smythe E. Phosphorylation of threonine 156 of the mu2 subunit of the AP2 complex is essential for endocytosis in vitro and in vivo. *Curr Biol* 2001; **11**(11): 896-900.
129. Fingerhut A, von Figura K, Höning S. Binding of AP2 to sorting signals is modulated by AP2 phosphorylation. *J Biol Chem* 2001; **276**(8): 5476-82.
130. Praefcke GJ, Ford MG, Schmid EM, et al. Evolving nature of the AP2 alpha-appendage hub during clathrin-coated vesicle endocytosis. *EMBO J* 2004; **23**(22): 4371-83.
131. Ritter B, Denisov AY, Philie J, et al. Two WXXF-based motifs in NECAPs define the specificity of accessory protein binding to AP-1 and AP-2. *EMBO J* 2004; **23**(19): 3701-10.
132. Ritter B, Philie J, Girard M, Tung EC, Blondeau F, McPherson PS. Identification of a family of endocytic proteins that define a new alpha-adaptin ear-binding motif. *EMBO Rep* 2003; **4**(11): 1089-95.
133. Beacham GM, Partlow EA, Lange JJ, Hollopeter G. NECAPs are negative regulators of the AP2 clathrin adaptor complex. *Elife* 2018; **7**.
134. Ritter B, Denisov AY, Philie J, et al. The NECAP PHear domain increases clathrin accessory protein binding potential. *EMBO J* 2007; **26**(18): 4066-77.
135. Miller SE, Mathiasen S, Bright NA, et al. CALM regulates clathrin-coated vesicle size and maturation by directly sensing and driving membrane curvature. *Dev Cell* 2015; **33**(2): 163-75.
136. Ritter B, Murphy S, Dokainish H, et al. NECAP 1 regulates AP-2 interactions to control vesicle size, number, and cargo during clathrin-mediated endocytosis. *PLoS Biol* 2013; **11**(10): e1001670.
137. Lundmark R, Carlsson SR. The beta-appendages of the four adaptor-protein (AP) complexes: structure and binding properties, and identification of sorting nexin 9 as an accessory protein to AP-2. *Biochem J* 2002; **362**(Pt 3): 597-607.

138. Miele AE, Watson PJ, Evans PR, Traub LM, Owen DJ. Two distinct interaction motifs in amphiphysin bind two independent sites on the clathrin terminal domain beta-propeller. *Nat Struct Mol Biol* 2004; **11**(3): 242-8.
139. Kang DS, Kern RC, Puthenveedu MA, von Zastrow M, Williams JC, Benovic JL. Structure of an arrestin2-clathrin complex reveals a novel clathrin binding domain that modulates receptor trafficking. *J Biol Chem* 2009; **284**(43): 29860-72.
140. Muenzner J, Traub LM, Kelly BT, Graham SC. Cellular and viral peptides bind multiple sites on the N-terminal domain of clathrin. *Traffic* 2017; **18**(1): 44-57.
141. Schmid EM, Ford MG, Burtey A, et al. Role of the AP2 beta-appendage hub in recruiting partners for clathrin-coated vesicle assembly. *PLoS Biol* 2006; **4**(9): e262.
142. Owen DJ, Vallis Y, Noble ME, et al. A structural explanation for the binding of multiple ligands by the alpha-adaptin appendage domain. *Cell* 1999; **97**(6): 805-15.
143. Traub LM, Downs MA, Westrich JL, Fremont DH. Crystal structure of the alpha appendage of AP-2 reveals a recruitment platform for clathrin-coat assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; **96**(16): 8907-12.
144. Brett TJ, Traub LM, Fremont DH. Accessory protein recruitment motifs in clathrin-mediated endocytosis. *Structure* 2002; **10**(6): 797-809.
145. Warren RA, Green FA, Stenberg PE, Enns CA. Distinct saturable pathways for the endocytosis of different tyrosine motifs. *J Biol Chem* 1998; **273**(27): 17056-63.
146. Maldonado-Baez L, Wendland B. Endocytic adaptors: recruiters, coordinators and regulators. *Trends Cell Biol* 2006; **16**(10): 505-13.
147. Chen WJ, Goldstein JL, Brown MS. NPXY, a sequence often found in cytoplasmic tails, is required for coated pit-mediated internalization of the low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem* 1990; **265**(6): 3116-23.
148. Garcia CK, Wilund K, Arca M, et al. Autosomal recessive hypercholesterolemia caused by mutations in a putative LDL receptor adaptor protein. *Science* 2001; **292**(5520): 1394-8.
149. Stolt PC, Bock HH. Modulation of lipoprotein receptor functions by intracellular adaptor proteins. *Cell Signal* 2006; **18**(10): 1560-71.
150. Alajlouni R, Drahos KE, Finkielstein CV, Capelluto DG. Lipid-mediated membrane binding properties of Disabled-2. *Biochim Biophys Acta* 2011; **1808**(11): 2734-44.
151. Maurer ME, Cooper JA. The adaptor protein Dab2 sorts LDL receptors into coated pits independently of AP-2 and ARH. *J Cell Sci* 2006; **119**(Pt 20): 4235-46.
152. Nishimura T, Kaibuchi K. Numb controls integrin endocytosis for directional cell migration with aPKC and PAR-3. *Dev Cell* 2007; **13**(1): 15-28.
153. Wegener KL, Partridge AW, Han J, et al. Structural basis of integrin activation by talin. *Cell* 2007; **128**(1): 171-82.
154. Hawryluk MJ, Keyel PA, Mishra SK, Watkins SC, Heuser JE, Traub LM. Epsin 1 is a polyubiquitin-selective clathrin-associated sorting protein. *Traffic* 2006; **7**(3): 262-81.
155. Sato Y, Yoshikawa A, Mimura H, Yamashita M, Yamagata A, Fukai S. Structural basis for specific recognition of Lys 63-linked polyubiquitin chains by tandem UIMs of RAP80. *EMBO J* 2009; **28**(16): 2461-8.
156. Kazazic M, Bertelsen V, Pedersen KW, et al. Epsin 1 is involved in recruitment of ubiquitinated EGF receptors into clathrin-coated pits. *Traffic* 2009; **10**(2): 235-45.
157. Barriere H, Nemes C, Lechardeur D, Khan-Mohammad M, Fruh K, Lukacs GL. Molecular basis of oligoubiquitin-dependent internalization of membrane proteins in Mammalian cells. *Traffic* 2006; **7**(3): 282-97.
158. Huang F, Kirkpatrick D, Jiang X, Gygi S, Sorkin A. Differential regulation of EGF receptor internalization and degradation by multiubiquitination within the kinase domain. *Mol Cell* 2006; **21**(6): 737-48.
159. Goodman OB, Jr., Krupnick JG, Santini F, et al. Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor. *Nature* 1996; **383**(6599): 447-50.
160. Burtey A, Schmid EM, Ford MG, et al. The conserved isoleucine-valine-phenylalanine motif couples activation state and endocytic functions of beta-arrestins. *Traffic* 2007; **8**(7): 914-31.

161. Gurevich VV, Gurevich EV. GPCR Signaling Regulation: The Role of GRKs and Arrestins. *Front Pharmacol* 2019; **10**: 125.
162. Rajagopal S, Shenoy SK. GPCR desensitization: Acute and prolonged phases. *Cell Signal* 2018; **41**: 9-16.
163. Ford MG, Pearse BM, Higgins MK, et al. Simultaneous binding of PtdIns(4,5)P2 and clathrin by AP180 in the nucleation of clathrin lattices on membranes. *Science* 2001; **291**(5506): 1051-5.
164. Pryor PR, Jackson L, Gray SR, et al. Molecular basis for the sorting of the SNARE VAMP7 into endocytic clathrin-coated vesicles by the ArfGAP Hrb. *Cell* 2008; **134**(5): 817-27.
165. Koo SJ, Markovic S, Puchkov D, et al. SNARE motif-mediated sorting of synaptobrevin by the endocytic adaptors clathrin assembly lymphoid myeloid leukemia (CALM) and AP180 at synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; **108**(33): 13540-5.
166. Miller SE, Sahlender DA, Graham SC, et al. The molecular basis for the endocytosis of small R-SNAREs by the clathrin adaptor CALM. *Cell* 2011; **147**(5): 1118-31.
167. Blondeau F, Ritter B, Allaire PD, et al. Tandem MS analysis of brain clathrin-coated vesicles reveals their critical involvement in synaptic vesicle recycling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; **101**(11): 3833-8.
168. Traub LM. Regarding the amazing choreography of clathrin coats. *PLoS Biol* 2011; **9**(3): e1001037.
169. Tebar F, Bohlander SK, Sorkin A. Clathrin assembly lymphoid myeloid leukemia (CALM) protein: localization in endocytic-coated pits, interactions with clathrin, and the impact of overexpression on clathrin-mediated traffic. *Mol Biol Cell* 1999; **10**(8): 2687-702.
170. Ford MG, Mills IG, Peter BJ, et al. Curvature of clathrin-coated pits driven by epsin. *Nature* 2002; **419**(6905): 361-6.
171. Itoh T, Koshiba S, Kigawa T, Kikuchi A, Yokoyama S, Takenawa T. Role of the ENTH domain in phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate binding and endocytosis. *Science* 2001; **291**(5506): 1047-51.
172. Peter BJ, Kent HM, Mills IG, et al. BAR domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin BAR structure. *Science* 2004; **303**(5657): 495-9.
173. Ramjaun AR, Philie J, de Heuvel E, McPherson PS. The N terminus of amphiphysin II mediates dimerization and plasma membrane targeting. *J Biol Chem* 1999; **274**(28): 19785-91.
174. Takei K, Slepnev VI, Haucke V, De Camilli P. Functional partnership between amphiphysin and dynamin in clathrin-mediated endocytosis. *Nat Cell Biol* 1999; **1**(1): 33-9.
175. Owen DJ, Wigge P, Vallis Y, Moore JD, Evans PR, McMahon HT. Crystal structure of the amphiphysin-2 SH3 domain and its role in the prevention of dynamin ring formation. *EMBO J* 1998; **17**(18): 5273-85.
176. David C, McPherson PS, Mundigl O, de Camilli P. A role of amphiphysin in synaptic vesicle endocytosis suggested by its binding to dynamin in nerve terminals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; **93**(1): 331-5.
177. Schoneberg J, Lehmann M, Ullrich A, et al. Lipid-mediated PX-BAR domain recruitment couples local membrane constriction to endocytic vesicle fission. *Nat Commun* 2017; **8**: 15873.
178. Shpetner HS, Vallee RB. Dynamin is a GTPase stimulated to high levels of activity by microtubules. *Nature* 1992; **355**(6362): 733-5.
179. Shpetner HS, Vallee RB. Identification of dynamin, a novel mechanochemical enzyme that mediates interactions between microtubules. *Cell* 1989; **59**(3): 421-32.
180. Hinshaw JE, Schmid SL. Dynamin self-assembles into rings suggesting a mechanism for coated vesicle budding. *Nature* 1995; **374**(6518): 190-2.
181. Kosaka T, Ikeda K. Reversible blockage of membrane retrieval and endocytosis in the garland cell of the temperature-sensitive mutant of Drosophila melanogaster, shibirets1. *J Cell Biol* 1983; **97**(2): 499-507.
182. Danino D, Moon KH, Hinshaw JE. Rapid constriction of lipid bilayers by the mechanochemical enzyme dynamin. *J Struct Biol* 2004; **147**(3): 259-67.

183. Stowell MH, Marks B, Wigge P, McMahon HT. Nucleotide-dependent conformational changes in dynamin: evidence for a mechanochemical molecular spring. *Nat Cell Biol* 1999; **1**(1): 27-32.
184. Sweitzer SM, Hinshaw JE. Dynamin undergoes a GTP-dependent conformational change causing vesiculation. *Cell* 1998; **93**(6): 1021-9.
185. Takei K, McPherson PS, Schmid SL, De Camilli P. Tubular membrane invaginations coated by dynamin rings are induced by GTP-gamma S in nerve terminals. *Nature* 1995; **374**(6518): 186-90.
186. Carter LL, Redelmeier TE, Woollenweber LA, Schmid SL. Multiple GTP-binding proteins participate in clathrin-coated vesicle-mediated endocytosis. *J Cell Biol* 1993; **120**(1): 37-45.
187. Faelber K, Posor Y, Gao S, et al. Crystal structure of nucleotide-free dynamin. *Nature* 2011; **477**(7366): 556-60.
188. Obar RA, Collins CA, Hammarback JA, Shpetner HS, Vallee RB. Molecular cloning of the microtubule-associated mechanochemical enzyme dynamin reveals homology with a new family of GTP-binding proteins. *Nature* 1990; **347**(6290): 256-61.
189. Ramachandran R, Surka M, Chappie JS, et al. The dynamin middle domain is critical for tetramerization and higher-order self-assembly. *EMBO J* 2007; **26**(2): 559-66.
190. Zheng J, Cahill SM, Lemmon MA, Fushman D, Schlessinger J, Cowburn D. Identification of the binding site for acidic phospholipids on the pH domain of dynamin: implications for stimulation of GTPase activity. *J Mol Biol* 1996; **255**(1): 14-21.
191. Sever S, Muhlberg AB, Schmid SL. Impairment of dynamin's GAP domain stimulates receptor-mediated endocytosis. *Nature* 1999; **398**(6727): 481-6.
192. Muhlberg AB, Warnock DE, Schmid SL. Domain structure and intramolecular regulation of dynamin GTPase. *EMBO J* 1997; **16**(22): 6676-83.
193. Grabs D, Slepnev VI, Songyang Z, et al. The SH3 domain of amphiphysin binds the proline-rich domain of dynamin at a single site that defines a new SH3 binding consensus sequence. *J Biol Chem* 1997; **272**(20): 13419-25.
194. Booker GW, Gout I, Downing AK, et al. Solution structure and ligand-binding site of the SH3 domain of the p85 alpha subunit of phosphatidylinositol 3-kinase. *Cell* 1993; **73**(4): 813-22.
195. Herskovits JS, Shpetner HS, Burgess CC, Vallee RB. Microtubules and Src homology 3 domains stimulate the dynamin GTPase via its C-terminal domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; **90**(24): 11468-72.
196. Reubold TF, Eschenburg S, Becker A, et al. Crystal structure of the GTPase domain of rat dynamin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; **102**(37): 13093-8.
197. Niemann HH, Knetsch ML, Scherer A, Manstein DJ, Kull FJ. Crystal structure of a dynamin GTPase domain in both nucleotide-free and GDP-bound forms. *EMBO J* 2001; **20**(21): 5813-21.
198. Chappie JS, Acharya S, Liu YW, Leonard M, Pucadyil TJ, Schmid SL. An intramolecular signaling element that modulates dynamin function in vitro and in vivo. *Mol Biol Cell* 2009; **20**(15): 3561-71.
199. Ford MG, Jenni S, Nunnari J. The crystal structure of dynamin. *Nature* 2011; **477**(7366): 561-6.
200. Chappie JS, Mears JA, Fang S, et al. A pseudoatomic model of the dynamin polymer identifies a hydrolysis-dependent powerstroke. *Cell* 2011; **147**(1): 209-22.
201. Chappie JS, Acharya S, Leonard M, Schmid SL, Dyda F. G domain dimerization controls dynamin's assembly-stimulated GTPase activity. *Nature* 2010; **465**(7297): 435-40.
202. Ferguson SM, Brasnjo G, Hayashi M, et al. A selective activity-dependent requirement for dynamin 1 in synaptic vesicle endocytosis. *Science* 2007; **316**(5824): 570-4.
203. Gray NW, Fourgeaud L, Huang B, et al. Dynamin 3 is a component of the postsynapse, where it interacts with mGluR5 and Homer. *Curr Biol* 2003; **13**(6): 510-5.
204. Cook TA, Urrutia R, McNiven MA. Identification of dynamin 2, an isoform ubiquitously expressed in rat tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; **91**(2): 644-8.
205. Cocucci E, Gaudin R, Kirchhausen T. Dynamin recruitment and membrane scission at the neck of a clathrin-coated pit. *Mol Biol Cell* 2014; **25**(22): 3595-609.

206. Grassart A, Cheng AT, Hong SH, et al. Actin and dynamin2 dynamics and interplay during clathrin-mediated endocytosis. *J Cell Biol* 2014; **205**(5): 721-35.
207. Reubold TF, Faelber K, Plattner N, et al. Crystal structure of the dynamin tetramer. *Nature* 2015; **525**(7569): 404-8.
208. Okamoto PM, Tripet B, Litowski J, Hodges RS, Vallee RB. Multiple distinct coiled-coils are involved in dynamin self-assembly. *J Biol Chem* 1999; **274**(15): 10277-86.
209. Binns DD, Barylko B, Grichine N, et al. Correlation between self-association modes and GTPase activation of dynamin. *J Protein Chem* 1999; **18**(3): 277-90.
210. Barylko B, Binns D, Lin KM, et al. Synergistic activation of dynamin GTPase by Grb2 and phosphoinositides. *J Biol Chem* 1998; **273**(6): 3791-7.
211. Warnock DE, Hinshaw JE, Schmid SL. Dynamin self-assembly stimulates its GTPase activity. *J Biol Chem* 1996; **271**(37): 22310-4.
212. Tuma PL, Stachniak MC, Collins CA. Activation of dynamin GTPase by acidic phospholipids and endogenous rat brain vesicles. *J Biol Chem* 1993; **268**(23): 17240-6.
213. Mears JA, Ray P, Hinshaw JE. A corkscrew model for dynamin constriction. *Structure* 2007; **15**(10): 1190-202.
214. Chen YJ, Zhang P, Egelman EH, Hinshaw JE. The stalk region of dynamin drives the constriction of dynamin tubes. *Nat Struct Mol Biol* 2004; **11**(6): 574-5.
215. Zhang P, Hinshaw JE. Three-dimensional reconstruction of dynamin in the constricted state. *Nat Cell Biol* 2001; **3**(10): 922-6.
216. Sundborger AC, Fang S, Heymann JA, Ray P, Chappie JS, Hinshaw JE. A dynamin mutant defines a superconstricted prefission state. *Cell Rep* 2014; **8**(3): 734-42.
217. Bashkirov PV, Akimov SA, Evseev AI, Schmid SL, Zimmerberg J, Frolov VA. GTPase cycle of dynamin is coupled to membrane squeeze and release, leading to spontaneous fission. *Cell* 2008; **135**(7): 1276-86.
218. Pucadyil TJ, Schmid SL. Real-time visualization of dynamin-catalyzed membrane fission and vesicle release. *Cell* 2008; **135**(7): 1263-75.
219. Mattila JP, Shnyrova AV, Sundborger AC, et al. A hemi-fission intermediate links two mechanistically distinct stages of membrane fission. *Nature* 2015; **524**(7563): 109-13.
220. Shnyrova AV, Bashkirov PV, Akimov SA, et al. Geometric catalysis of membrane fission driven by flexible dynamin rings. *Science* 2013; **339**(6126): 1433-6.
221. Aguet F, Antonescu CN, Mettlen M, Schmid SL, Danuser G. Advances in analysis of low signal-to-noise images link dynamin and AP2 to the functions of an endocytic checkpoint. *Dev Cell* 2013; **26**(3): 279-91.
222. Mettlen M, Stoeber M, Loerke D, Antonescu CN, Danuser G, Schmid SL. Endocytic accessory proteins are functionally distinguished by their differential effects on the maturation of clathrin-coated pits. *Mol Biol Cell* 2009; **20**(14): 3251-60.
223. Loerke D, Mettlen M, Yarar D, et al. Cargo and dynamin regulate clathrin-coated pit maturation. *PLoS Biol* 2009; **7**(3): e57.
224. Taylor MJ, Perrais D, Merrifield CJ. A high precision survey of the molecular dynamics of mammalian clathrin-mediated endocytosis. *PLoS Biol* 2011; **9**(3): e1000604.
225. Guo SK, Sodt AJ, Johnson ME. Large self-assembled clathrin lattices spontaneously disassemble without sufficient adaptor proteins. *PLoS Comput Biol* 2022; **18**(3): e1009969.
226. Partlow EA, Cannon KS, Hollopeter G, Baker RW. Structural basis of an endocytic checkpoint that primes the AP2 clathrin adaptor for cargo internalization. *Nat Struct Mol Biol* 2022; **29**(4): 339-47.
227. Lee DW, Wu X, Eisenberg E, Greene LE. Recruitment dynamics of GAK and auxilin to clathrin-coated pits during endocytosis. *J Cell Sci* 2006; **119**(Pt 17): 3502-12.
228. Massol RH, Boll W, Griffin AM, Kirchhausen T. A burst of auxilin recruitment determines the onset of clathrin-coated vesicle uncoating. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; **103**(27): 10265-70.
229. Schlossman DM, Schmid SL, Braell WA, Rothman JE. An enzyme that removes clathrin coats: purification of an uncoating ATPase. *J Cell Biol* 1984; **99**(2): 723-33.

230. Braell WA, Schlossman DM, Schmid SL, Rothman JE. Dissociation of clathrin coats coupled to the hydrolysis of ATP: role of an uncoating ATPase. *J Cell Biol* 1984; **99**(2): 734-41.
231. Ungewickell E, Ungewickell H, Holstein SE, et al. Role of auxilin in uncoating clathrin-coated vesicles. *Nature* 1995; **378**(6557): 632-5.
232. Prasad K, Barouch W, Greene L, Eisenberg E. A protein cofactor is required for uncoating of clathrin baskets by uncoating ATPase. *J Biol Chem* 1993; **268**(32): 23758-61.
233. Flaherty KM, DeLuca-Flaherty C, McKay DB. Three-dimensional structure of the ATPase fragment of a 70K heat-shock cognate protein. *Nature* 1990; **346**(6285): 623-8.
234. Chappell TG, Konforti BB, Schmid SL, Rothman JE. The ATPase core of a clathrin uncoating protein. *J Biol Chem* 1987; **262**(2): 746-51.
235. Morshauser RC, Hu W, Wang H, Pang Y, Flynn GC, Zuiderweg ER. High-resolution solution structure of the 18 kDa substrate-binding domain of the mammalian chaperone protein Hsc70. *J Mol Biol* 1999; **289**(5): 1387-403.
236. Zhu X, Zhao X, Burkholder WF, et al. Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK. *Science* 1996; **272**(5268): 1606-14.
237. Kityk R, Kopp J, Sinning I, Mayer MP. Structure and dynamics of the ATP-bound open conformation of Hsp70 chaperones. *Mol Cell* 2012; **48**(6): 863-74.
238. Ahle S, Ungewickell E. Auxilin, a newly identified clathrin-associated protein in coated vesicles from bovine brain. *J Cell Biol* 1990; **111**(1): 19-29.
239. Haynie DT, Ponting CP. The N-terminal domains of tensin and auxilin are phosphatase homologues. *Protein Sci* 1996; **5**(12): 2643-6.
240. Guan R, Dai H, Harrison SC, Kirchhausen T. Structure of the PTEN-like region of auxilin, a detector of clathrin-coated vesicle budding. *Structure* 2010; **18**(9): 1191-8.
241. Lee JO, Yang H, Georgescu MM, et al. Crystal structure of the PTEN tumor suppressor: implications for its phosphoinositide phosphatase activity and membrane association. *Cell* 1999; **99**(3): 323-34.
242. Malinverni D, Jost Lopez A, De Los Rios P, Hummer G, Barducci A. Modeling Hsp70/Hsp40 interaction by multi-scale molecular simulations and coevolutionary sequence analysis. *Elife* 2017; **6**.
243. Jiang J, Taylor AB, Prasad K, et al. Structure-function analysis of the auxilin J-domain reveals an extended Hsc70 interaction interface. *Biochemistry* 2003; **42**(19): 5748-53.
244. Kityk R, Kopp J, Mayer MP. Molecular Mechanism of J-Domain-Triggered ATP Hydrolysis by Hsp70 Chaperones. *Mol Cell* 2018; **69**(2): 227-37 e4.
245. Barouch W, Prasad K, Greene L, Eisenberg E. Auxilin-induced interaction of the molecular chaperone Hsc70 with clathrin baskets. *Biochemistry* 1997; **36**(14): 4303-8.
246. Greener T, Zhao X, Nojima H, Eisenberg E, Greene LE. Role of cyclin G-associated kinase in uncoating clathrin-coated vesicles from non-neuronal cells. *J Biol Chem* 2000; **275**(2): 1365-70.
247. Bukau B, Horwich AL. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* 1998; **92**(3): 351-66.
248. Kelley WL. The J-domain family and the recruitment of chaperone power. *Trends Biochem Sci* 1998; **23**(6): 222-7.
249. Fotin A, Cheng Y, Grigorieff N, Walz T, Harrison SC, Kirchhausen T. Structure of an auxilin-bound clathrin coat and its implications for the mechanism of uncoating. *Nature* 2004; **432**(7017): 649-53.
250. Smith CJ, Dafforn TR, Kent H, et al. Location of auxilin within a clathrin cage. *J Mol Biol* 2004; **336**(2): 461-71.
251. Rapoport I, Boll W, Yu A, Bocking T, Kirchhausen T. A motif in the clathrin heavy chain required for the Hsc70/auxilin uncoating reaction. *Mol Biol Cell* 2008; **19**(1): 405-13.
252. Rothnie A, Clarke AR, Kuzmic P, Cameron A, Smith CJ. A sequential mechanism for clathrin cage disassembly by 70-kDa heat-shock cognate protein (Hsc70) and auxilin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; **108**(17): 6927-32.

253. Bocking T, Aguet F, Harrison SC, Kirchhausen T. Single-molecule analysis of a molecular disassemblase reveals the mechanism of Hsc70-driven clathrin uncoating. *Nat Struct Mol Biol* 2011; **18**(3): 295-301.
254. Sousa R, Lafer EM. The Physics of Entropic Pulling: A Novel Model for the Hsp70 Motor Mechanism. *Int J Mol Sci* 2019; **20**(9).
255. De Los Rios P, Ben-Zvi A, Slutsky O, Azem A, Goloubinoff P. Hsp70 chaperones accelerate protein translocation and the unfolding of stable protein aggregates by entropic pulling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; **103**(16): 6166-71.
256. Newmyer SL, Schmid SL. Dominant-interfering Hsc70 mutants disrupt multiple stages of the clathrin-coated vesicle cycle in vivo. *J Cell Biol* 2001; **152**(3): 607-20.
257. Packschies L, Theyssen H, Buchberger A, Bukau B, Goody RS, Reinstein J. GrpE accelerates nucleotide exchange of the molecular chaperone DnaK with an associative displacement mechanism. *Biochemistry* 1997; **36**(12): 3417-22.
258. Theyssen H, Schuster HP, Packschies L, Bukau B, Reinstein J. The second step of ATP binding to DnaK induces peptide release. *J Mol Biol* 1996; **263**(5): 657-70.
259. Takeda S, McKay DB. Kinetics of peptide binding to the bovine 70 kDa heat shock cognate protein, a molecular chaperone. *Biochemistry* 1996; **35**(14): 4636-44.
260. Mitsunari T, Nakatsu F, Shioda N, et al. Clathrin adaptor AP-2 is essential for early embryonal development. *Mol Cell Biol* 2005; **25**(21): 9318-23.
261. Motley A, Bright NA, Seaman MN, Robinson MS. Clathrin-mediated endocytosis in AP-2-depleted cells. *J Cell Biol* 2003; **162**(5): 909-18.
262. Johannes L, Parton RG, Bassereau P, Mayor S. Building endocytic pits without clathrin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2015; **16**(5): 311-21.
263. Schwanhausser B, Busse D, Li N, et al. Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* 2011; **473**(7347): 337-42.
264. Nagaraj N, Wisniewski JR, Geiger T, et al. Deep proteome and transcriptome mapping of a human cancer cell line. *Mol Syst Biol* 2011; **7**: 548.
265. Kalxdorf M, Eberl HC, Bantscheff M. Monitoring Dynamic Changes of the Cell Surface Glycoproteome by Quantitative Proteomics. *Methods Mol Biol* 2017; **1647**: 47-59.
266. Bausch-Fluck D, Hofmann A, Bock T, et al. A mass spectrometric-derived cell surface protein atlas. *PLoS One* 2015; **10**(3): e0121314.
267. Renard HF, Tyckaert F, Lo Giudice C, et al. Endophilin-A3 and Galectin-8 control the clathrin-independent endocytosis of CD166. *Nat Commun* 2020; **11**(1): 1457.
268. De Simone G, Supuran CT. Carbonic anhydrase IX: Biochemical and crystallographic characterization of a novel antitumor target. *Biochim Biophys Acta* 2010; **1804**(2): 404-9.
269. Alterio V, Hilvo M, Di Fiore A, et al. Crystal structure of the catalytic domain of the tumor-associated human carbonic anhydrase IX. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; **106**(38): 16233-8.
270. Hilvo M, Baranauskiene L, Salzano AM, et al. Biochemical characterization of CA IX, one of the most active carbonic anhydrase isozymes. *J Biol Chem* 2008; **283**(41): 27799-809.
271. Swietach P, Wigfield S, Cobden P, Supuran CT, Harris AL, Vaughan-Jones RD. Tumor-associated carbonic anhydrase 9 spatially coordinates intracellular pH in three-dimensional multicellular growths. *J Biol Chem* 2008; **283**(29): 20473-83.
272. Chiche J, Brahimi-Horn MC, Pouyssegur J. Tumour hypoxia induces a metabolic shift causing acidosis: a common feature in cancer. *J Cell Mol Med* 2010; **14**(4): 771-94.
273. Pastorekova S, Ratcliffe PJ, Pastorek J. Molecular mechanisms of carbonic anhydrase IX-mediated pH regulation under hypoxia. *BJU Int* 2008; **101 Suppl 4**: 8-15.
274. Kirkpatrick JP, Rabbani ZN, Bentley RC, et al. Elevated CAIX Expression is Associated with an Increased Risk of Distant Failure in Early-Stage Cervical Cancer. *Biomark Insights* 2008; **3**: 45-55.
275. McDonald PC, Winum JY, Supuran CT, Dedhar S. Recent developments in targeting carbonic anhydrase IX for cancer therapeutics. *Oncotarget* 2012; **3**(1): 84-97.
276. Pastorek J, Pastorekova S. Hypoxia-induced carbonic anhydrase IX as a target for cancer therapy: from biology to clinical use. *Semin Cancer Biol* 2015; **31**: 52-64.

277. Ames S, Andring JT, McKenna R, Becker HM. CAIX forms a transport metabolon with monocarboxylate transporters in human breast cancer cells. *Oncogene* 2020; **39**(8): 1710-23.
278. Swayampakula M, McDonald PC, Vallejo M, et al. The interactome of metabolic enzyme carbonic anhydrase IX reveals novel roles in tumor cell migration and invadopodia/MMP14-mediated invasion. *Oncogene* 2017; **36**(45): 6244-61.
279. Ma F, Zhang C, Prasad KV, Freeman GJ, Schlossman SF. Molecular cloning of Porimin, a novel cell surface receptor mediating oncotic cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; **98**(17): 9778-83.
280. Schwenk BM, Lang CM, Hogl S, et al. The FTLD risk factor TMEM106B and MAP6 control dendritic trafficking of lysosomes. *EMBO J* 2014; **33**(5): 450-67.
281. Stagi M, Klein ZA, Gould TJ, Bewersdorf J, Strittmatter SM. Lysosome size, motility and stress response regulated by fronto-temporal dementia modifier TMEM106B. *Mol Cell Neurosci* 2014; **61**: 226-40.
282. Kundu ST, Grzeskowiak CL, Fradette JJ, et al. TMEM106B drives lung cancer metastasis by inducing TFEB-dependent lysosome synthesis and secretion of cathepsins. *Nat Commun* 2018; **9**(1): 2731.
283. Read ML, Fong JC, Modasia B, et al. Elevated PTTG and PBF predicts poor patient outcome and modulates DNA damage response genes in thyroid cancer. *Oncogene* 2017; **36**(37): 5296-308.
284. Xu D, Emoto N, Giaid A, et al. ECE-1: a membrane-bound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of big endothelin-1. *Cell* 1994; **78**(3): 473-85.
285. Smollich M, Gotte M, Yip GW, et al. On the role of endothelin-converting enzyme-1 (ECE-1) and neprilysin in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2007; **106**(3): 361-9.
286. Funalot B, Ouimet T, Claperon A, et al. Endothelin-converting enzyme-1 is expressed in human cerebral cortex and protects against Alzheimer's disease. *Mol Psychiatry* 2004; **9**(12): 1122-8, 059.
287. Busch JI, Unger TL, Jain N, Tyler Skrinak R, Charan RA, Chen-Plotkin AS. Increased expression of the frontotemporal dementia risk factor TMEM106B causes C9orf72-dependent alterations in lysosomes. *Hum Mol Genet* 2016; **25**(13): 2681-97.
288. Watkins RJ, Imruetaicharoenchoke W, Read ML, et al. Pro-invasive Effect of Proto-oncogene PBF Is Modulated by an Interaction with Cortactin. *J Clin Endocrinol Metab* 2016; **101**(12): 4551-63.
289. Smith VE, Sharma N, Watkins RJ, et al. Manipulation of PBF/PTTG1IP phosphorylation status; a potential new therapeutic strategy for improving radioiodine uptake in thyroid and other tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; **98**(7): 2876-86.
290. Valdenaire O, Barret A, Schweizer A, et al. Two di-leucine-based motifs account for the different subcellular localizations of the human endothelin-converting enzyme (ECE-1) isoforms. *J Cell Sci* 1999; **112 Pt 18**: 3115-25.
291. Omasits U, Ahrens CH, Muller S, Wollscheid B. Protter: interactive protein feature visualization and integration with experimental proteomic data. *Bioinformatics* 2014; **30**(6): 884-6.
292. Janvier K, Bonifacino JS. Role of the endocytic machinery in the sorting of lysosome-associated membrane proteins. *Mol Biol Cell* 2005; **16**(9): 4231-42.
293. Encarnacao M, Espada L, Escrevente C, et al. A Rab3a-dependent complex essential for lysosome positioning and plasma membrane repair. *J Cell Biol* 2016; **213**(6): 631-40.
294. Reddy A, Caler EV, Andrews NW. Plasma membrane repair is mediated by Ca(2+)-regulated exocytosis of lysosomes. *Cell* 2001; **106**(2): 157-69.
295. van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2018; **19**(4): 213-28.
296. Schwake M, Schroder B, Saftig P. Lysosomal membrane proteins and their central role in physiology. *Traffic* 2013; **14**(7): 739-48.
297. Höning S, Griffith J, Geuze HJ, Hunziker W. The tyrosine-based lysosomal targeting signal in lamp-1 mediates sorting into Golgi-derived clathrin-coated vesicles. *EMBO J* 1996; **15**(19): 5230-9.

298. Hatem CL, Gough NR, Fambrough DM. Multiple mRNAs encode the avian lysosomal membrane protein LAMP-2, resulting in alternative transmembrane and cytoplasmic domains. *J Cell Sci* 1995; **108 (Pt 5)**: 2093-100.
299. Rous BA, Reaves BJ, Ihrke G, et al. Role of adaptor complex AP-3 in targeting wild-type and mutated CD63 to lysosomes. *Mol Biol Cell* 2002; **13**(3): 1071-82.
300. Hunziker W, Geuze HJ. Intracellular trafficking of lysosomal membrane proteins. *Bioessays* 1996; **18**(5): 379-89.
301. Bonifacino JS, Traub LM. Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Biochem* 2003; **72**: 395-447.
302. Han HJ, Sudo K, Inazawa J, Nakamura Y. Isolation and mapping of a human gene (RABL) encoding a small GTP-binding protein homologous to the Ras-related RAB gene. *Cytogenet Cell Genet* 1996; **73**(1-2): 137-9.
303. Bucci C, Lutcke A, Steele-Mortimer O, et al. Co-operative regulation of endocytosis by three Rab5 isoforms. *FEBS Lett* 1995; **366**(1): 65-71.
304. Billcliff PG, Rollason R, Prior I, Owen DM, Gaus K, Banting G. CD317/tetherin is an organiser of membrane microdomains. *J Cell Sci* 2013; **126**(Pt 7): 1553-64.
305. Salzer U, Prohaska R. Stomatin, flotillin-1, and flotillin-2 are major integral proteins of erythrocyte lipid rafts. *Blood* 2001; **97**(4): 1141-3.
306. Ferreira APA, Boucrot E. Mechanisms of Carrier Formation during Clathrin-Independent Endocytosis. *Trends Cell Biol* 2018; **28**(3): 188-200.
307. Boucrot E, Ferreira AP, Almeida-Souza L, et al. Endophilin marks and controls a clathrin-independent endocytic pathway. *Nature* 2015; **517**(7535): 460-5.
308. Kirkham M, Fujita A, Chadda R, et al. Ultrastructural identification of uncoated caveolin-independent early endocytic vehicles. *J Cell Biol* 2005; **168**(3): 465-76.
309. Howes MT, Kirkham M, Riches J, et al. Clathrin-independent carriers form a high capacity endocytic sorting system at the leading edge of migrating cells. *J Cell Biol* 2010; **190**(4): 675-91.
310. Eyster CA, Higginson JD, Huebner R, et al. Discovery of new cargo proteins that enter cells through clathrin-independent endocytosis. *Traffic* 2009; **10**(5): 590-9.
311. Brandenburg B, Lee LY, Lakadamyali M, Rust MJ, Zhuang X, Hogle JM. Imaging poliovirus entry in live cells. *PLoS Biol* 2007; **5**(7): e183.
312. Sehat B, Andersson S, Girnita L, Larsson O. Identification of c-Cbl as a new ligase for insulin-like growth factor-I receptor with distinct roles from Mdm2 in receptor ubiquitination and endocytosis. *Cancer Res* 2008; **68**(14): 5669-77.
313. Glebov OO, Bright NA, Nichols BJ. Flotillin-1 defines a clathrin-independent endocytic pathway in mammalian cells. *Nat Cell Biol* 2006; **8**(1): 46-54.
314. Sabharanjak S, Sharma P, Parton RG, Mayor S. GPI-anchored proteins are delivered to recycling endosomes via a distinct cdc42-regulated, clathrin-independent pinocytic pathway. *Dev Cell* 2002; **2**(4): 411-23.
315. Colgan SP, Eltzschig HK, Eckle T, Thompson LF. Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). *Purinergic Signal* 2006; **2**(2): 351-60.
316. Pluskota E, Ma Y, Bledzka KM, et al. Kindlin-2 regulates hemostasis by controlling endothelial cell-surface expression of ADP/AMP catabolic enzymes via a clathrin-dependent mechanism. *Blood* 2013; **122**(14): 2491-9.
317. Lundmark R, Doherty GJ, Howes MT, et al. The GTPase-activating protein GRAF1 regulates the CLIC/GEEC endocytic pathway. *Curr Biol* 2008; **18**(22): 1802-8.
318. Lakshminarayan R, Wunder C, Becken U, et al. Galectin-3 drives glycosphingolipid-dependent biogenesis of clathrin-independent carriers. *Nat Cell Biol* 2014; **16**(6): 595-606.
319. Kumari S, Mayor S. ARF1 is directly involved in dynamin-independent endocytosis. *Nat Cell Biol* 2008; **10**(1): 30-41.
320. Gorvin CM, Metpally R, Stokes VJ, et al. Large-scale exome datasets reveal a new class of adaptor-related protein complex 2 sigma subunit (AP2sigma) mutations, located at the interface with the AP2 alpha subunit, that impair calcium-sensing receptor signalling. *Hum Mol Genet* 2018; **27**(5): 901-11.

321. Nesbit MA, Hannan FM, Howles SA, et al. Mutations in AP2S1 cause familial hypocalciuric hypercalcemia type 3. *Nat Genet* 2013; **45**(1): 93-7.
322. Helbig I, Lopez-Hernandez T, Shor O, et al. A Recurrent Missense Variant in AP2M1 Impairs Clathrin-Mediated Endocytosis and Causes Developmental and Epileptic Encephalopathy. *Am J Hum Genet* 2019; **104**(6): 1060-72.
323. Wang X, Zhou X, Li G, Zhang Y, Wu Y, Song W. Modifications and Trafficking of APP in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Front Mol Neurosci* 2017; **10**: 294.
324. Andrew RJ, Kellett KA, Thinakaran G, Hooper NM. A Greek Tragedy: The Growing Complexity of Alzheimer Amyloid Precursor Protein Proteolysis. *J Biol Chem* 2016; **291**(37): 19235-44.
325. Prox J, Rittger A, Saftig P. Physiological functions of the amyloid precursor protein secretases ADAM10, BACE1, and presenilin. *Exp Brain Res* 2012; **217**(3-4): 331-41.
326. He W, Lu Y, Qahwash I, Hu XY, Chang A, Yan R. Reticulon family members modulate BACE1 activity and amyloid-beta peptide generation. *Nat Med* 2004; **10**(9): 959-65.
327. Grunwald B, Schoeps B, Kruger A. Recognizing the Molecular Multifunctionality and Interactome of TIMP-1. *Trends Cell Biol* 2019; **29**(1): 6-19.
328. Saint-Pol J, Eschenbrenner E, Dornier E, Boucheix C, Charrin S, Rubinstein E. Regulation of the trafficking and the function of the metalloprotease ADAM10 by tetraspanins. *Biochem Soc Trans* 2017; **45**(4): 937-44.
329. Masters JR. HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly. *Nat Rev Cancer* 2002; **2**(4): 315-9.

6. Anhang

6.1. Ergänzende Abbildungen (nicht publiziert)

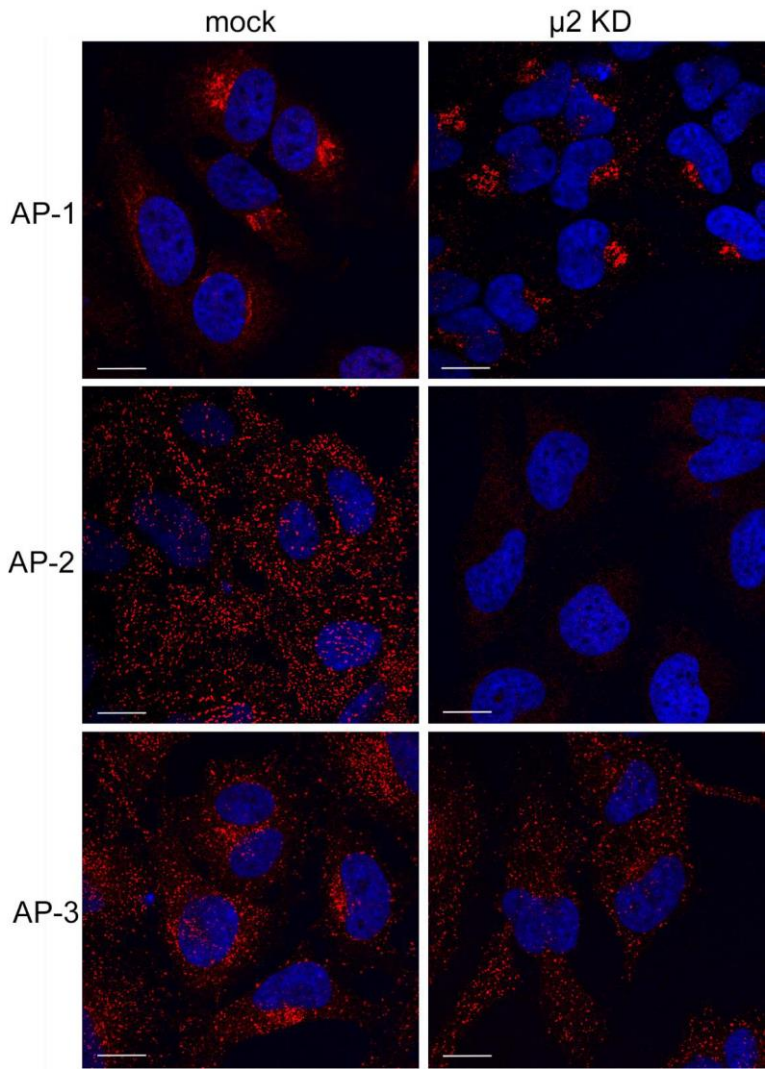


Fig. S4: Localization of AP complexes in µ2-depleted cells. HeLa cells were either mock-treated or incubated with µ2 siRNA (µ2 KD), then grown on glass coverslips and used for indirect immunofluorescence. Antibodies specific for subunits of AP-1 (γ-adaptin), AP-2 (α-adaptin) and AP-3 (δ-adaptin) were used to detect the localization of the three complexes. Loss of µ2 resulted in almost complete loss of AP-2 staining in µ2 KD cells, while the localization and the intensities of AP-1 and AP-3 remained comparable to the mock-treated controls. Bars are 10 µm.

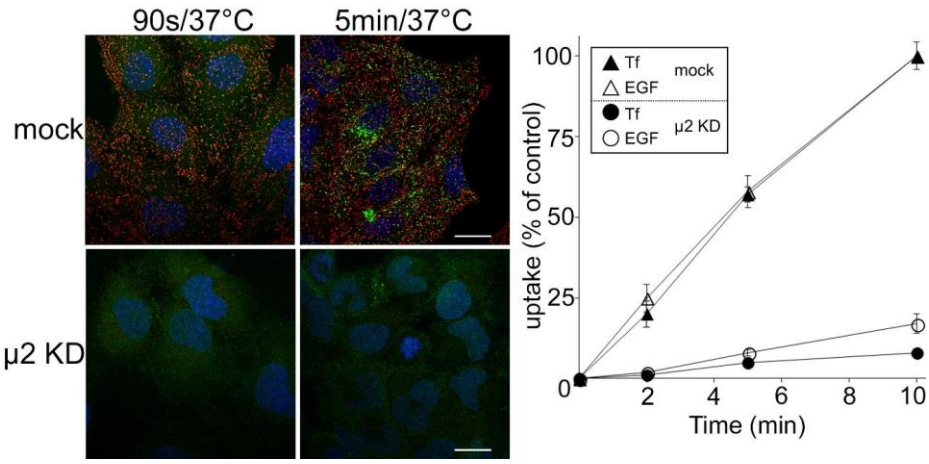


Fig. S5: Clathrin-mediated endocytosis is abolished in AP-2 depleted cells. **A:** Immuno-fluorescence of endocytosed transferrin (green) and the endocytic CCP/CCV marker CALM (red). Bars are 10 µm. **B:** Aliquots of cells as in A were assayed by FACS for endocytosis of the transferrin and EGF receptors (see Material and Methods for details). The 10min values of uptake in mock-treated cells were set to 100% and all other values were related to that. Error bars represent SD between three independent experiments.

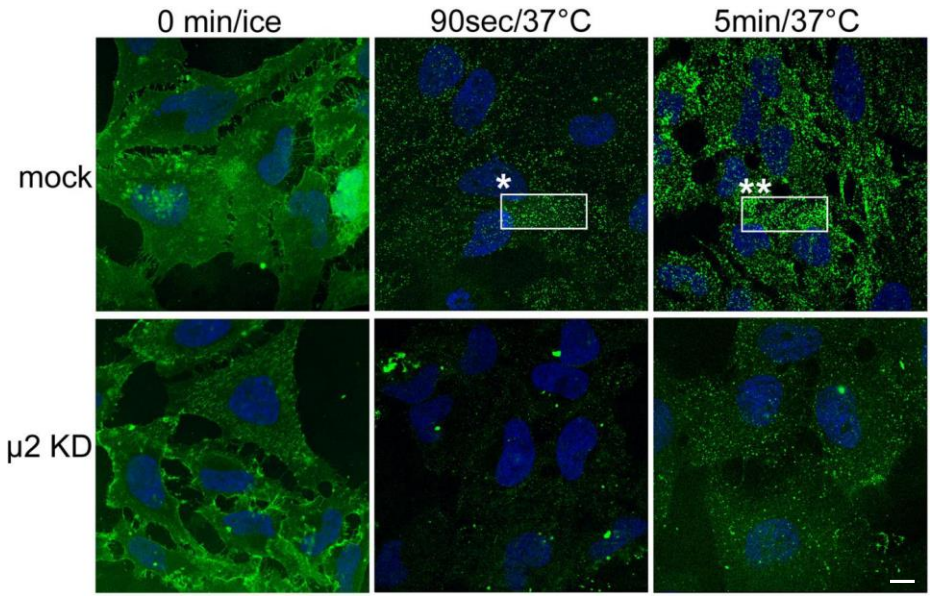


Fig. S6: The global endocytic capacity is reduced in μ2 KD cells. Mock-treated and μ2 KD HeLa cells were incubated with NHS-AEDP-ATTO488 on ice to label plasma membrane proteins. After washing, cells were incubated at 37°C for the indicated intervals, then placed back on ice an incubated with reducing buffer to remove ATTO488 from the cell surface. Then, cells were fixed permeabilized and stained for the CCP/CCV marker protein CALM (red) and DNA (blue). For clarity, labelling of CALM is omitted here. The boxed areas with all three labels are shown as blow-ups in Fig. S7 to illustrate colocalisation of ATTO488 in CALM-positive CCPs/CCVs. Scale bar: 10μm.

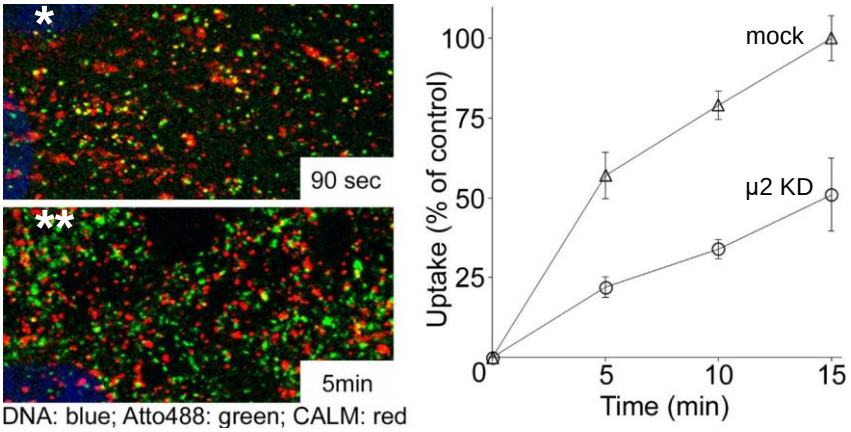


Fig. S7: The global cellular endocytic flux is partially inhibited by loss of AP-2. Images: High magnification images of ATTO488 label (green) and CALM-positive CCPs/CCVs (red) in mock-treated cells after 90sec (*****) and 5min (******) of endocytosis. Original images of plasma membrane labelling and subsequent endocytosis with ATTO488 are shown in Fig. S6. **Graph:** FACS-based analysis of the global endocytic rate after plasma membrane labelling. The 15min value of uptake in mock-treated cells was set to 100% and all other values were related to that. Error bars represent SD between three independent experiments.

6.2. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Phasen der CME 14

Abb. 2: Clathrin-Triskele 16

Abb. 3: Clathrin-Käfige 18

Abb. 4: Heterotetramere Adaptorkomplexe 19

Abb. 5: Intrazelluläre Lokalisation der fünf heterotetrameren Adaptorkomplexe 20

Abb. 6: Struktureller Aufbau von AP-2 22

Abb. 7: Konformationsänderung von AP-2 24

Abb. 8: Simplifiziertes Interaktionsnetzwerk 26

Abb. 9: Dynamin 29

Abb. 10: SMIM29 58

Fig. 1: Cell surface proteomics of HeLa mock and µ2 KD cells 34

Fig. 2: Loss of AP-2 leads to profound changes in the plasma membrane proteome 34

Fig. 3: Characterization of putative sorting signals in CA9 and SMIM29 38

Fig. 4: Cell migration is compromised in µ2 KD cells 39

Fig. 5: Gene Ontology (GO) annotation of the surface proteome 39

Fig. 6: Impact of µ2 KD on protein association networks 40

Fig. 7: Markers of clathrin-independent endocytosis are internalized by µ2 KD cells 41

Fig. 8: The surface expression of individual GPI-anchored proteins is altered in µ2 KD cells 41

Fig. S1: Formation of endocytic CCPs/CCVs is altered & endocytosis is inhibited in µ2 KD cells .. 49

Fig. S2: MS of surface TfR indicates cleavage of the extracellular part in µ2 KD cell 50

Fig. S3: Identification of sorting signals in the cytoplasmic tail of SMIM29 51

Fig. S4: Localization of AP complexes in µ2-depleted cells 80

Fig. S5: Clathrin-mediated endocytosis is abolished in AP-2 depleted cells 81

Fig. S6: The global endocytic capacity is reduced in µ2 KD cells 82

Fig. S7: The global cellular endocytic flux is partially inhibited by loss of AP-2 83

6.3. Research Track Project Award

DIE MEDIZINISCHE FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT ZU KÖLN

verleiht gemeinsam mit dem
Förderkreis Medizin Köln e.V.

den

Research Track Project Award 2015

für das Projekt:

„Inhibition of the endocytic flux as a potential approach to boost therapeutic intervention against cell surface antigens"

an

David Christian **T o b y s**
Institut für Biochemie I

Köln, den 19. Februar 2016

Der Dekan der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln
Universitätsprofessor Dr. Dr. h. c. Th. Krieg

6.4. Top Downloaded Article