

**Charakterisierung der AP2 dephosphorylierenden
Phosphatase PP2A und Identifikation von
B55 alpha Bindungspartnern**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln



vorgelegt von

Dominic Teichert

aus Oberhausen

Berichtersteller: Prof. Dr. Stefan Höning

(Gutachter)

Prof. Dr. Jürgen Dohmen

Tag der mündlichen Prüfung: 2.2.2011

Inhaltsverzeichnis	i
Abkürzungsverzeichnis	vii
1 Einleitung	1
1.1 Vesikulärer Transport.....	1
1.2 Clathrin-umhüllte Vesikel	3
1.3 Heterotetramere Adaptorprotein-Komplexe	7
1.3.1 Struktur der APs	7
1.3.2 Bindung der APs an Clathrin	9
1.3.3 Lokalisation der APs.....	9
1.3.4 Funktion der APs	10
1.4 Regulation von AP2	12
1.5 Phosphoregulation von Proteinen	14
1.5.1 Serin/ Threonin-spezifische Phosphatasen (PSPs).....	15
1.6 Protein-Phosphatase 2A (PP2A).....	15
1.6.1 Die katalytische PP2A-C-Untereinheit	17
1.6.2 Die regulatorische PP2A-A-Untereinheit (PR65)	18
1.6.3 Die Familien der regulatorischen PP2A-B-Untereinheiten.....	20
1.6.4 Regulation der PP2A.....	22
1.7 Fragestellung	25
2 Material und Methoden	26
2.1 Material	26
2.1.1 Geräte	26
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	28
2.1.3 Chemikalien.....	29
2.2 Molekularbiologische Materialien	31
2.2.1 Reagenzien und Fertiglösungen.....	31
2.2.2 Antibiotika	31

2.2.3	Bakterien	31
2.2.4	Kits	32
2.2.5	Enzyme	32
2.2.6	Nukleotide/ Oligonukleotide	32
2.2.7	Plasmide.....	33
2.3	Biochemische Materialien	34
2.3.1	Chromatographie-Material.....	34
2.3.2	Proteine	34
2.3.3	Reagenzien und Fertiglösungen.....	34
2.3.4	Standard-Puffer	35
2.3.5	Radioaktive Substanzen.....	35
2.3.6	Antikörper	36
2.4	Zellbiologische Materialien.....	37
2.4.1	Reagenzien und Fertiglösungen.....	37
2.4.2	Medien und Zusätze	37
2.4.3	Zelllinien	38
2.4.4	Bakuloviren.....	38
2.4.5	EDV	39
2.5	Molekularbiologische Methoden.....	39
2.5.1	Kultivierung von <i>E. coli</i>	39
2.5.2	Herstellung kompetenter Zellen.....	40
2.5.3	Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid DNA.....	42
2.5.4	Isolierung von Plasmid DNA aus <i>E. coli</i>	43
2.5.5	Anlegen einer Glycerinkultur	43
2.5.6	Konzentrationsbestimmung von DNA.....	43
2.5.7	Agarosegelelektrophorese.....	44
2.5.8	DNA Extraktion aus Agarosegelen	44

2.5.9	Hydrolyse von DNA mit Restriktionsenzymen	45
2.5.10	Hybridisierung von Oligonukleotiden	45
2.5.11	Ligation von DNA-Fragmenten	46
2.5.12	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	46
2.5.13	Reinigung von DNA-Fragmenten	48
2.5.14	DNA Sequenzierung	48
2.6	Biochemische Methoden	48
2.6.1	Ernte von Zellen	48
2.6.2	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Methode	50
2.6.3	Proteinbestimmung mittels DC-Methode bei Einsatz von Detergenzien	50
2.6.4	Proteinfällung von stark verdünnten Lösungen	51
2.6.5	SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	52
2.6.6	Coomassiefärbung von Proteinen	54
2.6.7	Westernblot und Immundetektion	55
2.6.8	Ponceaufärbung von Proteinen	56
2.6.9	Immunpräzipitation	56
2.6.10	Vorbereitung von Schweinehirn zur Aufarbeitung von Clathrin-Vesikeln	57
2.6.11	Präparation von Clathrin umhüllten Vesikeln (CCVs)	57
2.6.12	Reinigung der CCVs durch Sephacryl S1000 Gelfiltration	58
2.6.13	Ablösen (<i>uncoating</i>) von Clathrin beschichteten Vesikeln (CCVs)	59
2.6.14	Erhöhung der Konzentration von Proteinlösungen	60
2.6.15	Dialyse	60
2.6.16	Expression und Reinigung von GST-PP2A B55 α	61
2.6.17	Expression und Reinigung von GST-PP2A A α	61
2.6.18	Reinigung von 6xhis-PP2A C α	64
2.6.19	Expression und Reinigung von 6xhis-HSC70 und GST-Auxilin (547- 910)	65

2.6.20	Rekonstitution der Protein-Phosphatase 2A.....	65
2.6.21	<i>Pull-down</i>	65
2.6.22	Microcystin- <i>Pull-down</i>	66
2.6.23	Phosphorylierung von AP2 <i>in vivo</i>	66
2.6.24	<i>In vitro</i> Dephosphorylierung von AP2 / AP1	67
2.6.25	Massenspektrometrie	68
2.6.26	Berechnung der PP2A Stoffmengen in CCVs	68
2.7	Zellbiologische Methoden	69
2.7.1	Umgang mit Säugetierzellen	69
2.7.2	Umgang mit Insektenzellen	71
2.7.3	Bestimmung der Zellzahl	74
2.7.4	Immunfluoreszenz	74
3	Ergebnisse	77
3.1	Dephosphorylierung von AP2 durch PP2A	77
3.1.1	Generierung einer rekombinanten 3xFLAG B55 α -Untereinheit.....	77
3.1.2	Nachweis der siRNA-vermittelten B55 α -Suppression und rekombinanten FLAG-B55 α Expression in Zellysaten.....	78
3.1.3	Nachweis der rekombinanten B55 α -Untereinheit in PP2A	79
3.1.4	<i>In vivo</i> Nachweis der μ 2-Dephosphorylierung durch PP2A	80
3.1.5	Lokalisationsstudie mittels Immunfluoreszenz.....	81
3.1.6	Nachweis einer möglichen Bindung von AP2 an PP2A.....	84
3.2	Analyse von Clathrin-umhüllten Vesikeln (CCVs)	86
3.2.1	Nachweis von PP2A in CCVs.....	86
3.2.2	Quantifizierung der PP2A Untereinheiten in CCVs.....	87
3.2.3	CCV- <i>uncoating</i>	90
3.2.4	Proteom von CCVs.....	92

3.2.5	Identifikation von postranslationellen Modifikationen der PP2A in CCVs ..	93
3.2.6	Analyse der Interaktion von PP2A mit HSC70.....	95
3.3	Rekonstitution eines PP2A Holoenzym.....	96
3.3.1	Bakterielle Expression von B55 α	96
3.3.2	Bakterielle Expression von GST PP2A A α	98
3.3.3	Gewinnung von PP2A B55 α und PP2A c α aus Insektenzellkulturen ..	98
3.4	Identifikation von PP2A-B55 α Bindungspartnern	100
3.4.1	Immunpräzipitation von FLAG-B55 α im großen Maßstab	100
4	Diskussion	105
4.1	Modell der AP2-Membranbindung	105
4.2	Phosphorylierung der μ 2-Untereinheit	106
4.3	<i>In vivo</i> Analyse der PP2A abhängigen μ 2-Dephosphorylierung.....	107
4.4	Versuch des Nachweises einer AP2-PP2A-Interaktion	112
4.4.1	Rekonstitutionsversuche eines PP2A Holoenzym.....	112
4.5	Analyse der PP2A-HSC70 Interaktion.....	114
4.6	Analyse von CCVs	114
4.6.1	Quantifizierung von PP2A Untereinheiten in CCVs	115
4.6.2	<i>Uncoating</i> von CCVs	116
4.7	Analyse der Regulation vesikulärer PP2A.....	117
4.8	Identifikation von B55 α Bindungspartnern	117
4.8.1	Vergleich der FLAG-Immunpräzipitationen untereinander.....	118
4.8.2	Vergleich der FLAG-Immunpräzipitate mit dem CCV-Proteom	119
5	Zusammenfassung	120
6	Summary	121
7	Anhang	122
7.1	Vektorkarten.....	122

7.2 Übersicht der identifizierten Protein in CCVs	124
7.3 Übersicht der identifizierten Proteine im FLAG-Immunpräzipitat.....	129
Literaturverzeichnis	136
Erklärung	148
Curriculum vitae.....	149
Danksagung	150

Abkürzungsverzeichnis

Å	Angström
AAK1	Adaptor-assoziierte Kinase 1
Abb.	Abbildung
A. bidest	Aqua bidestillata
ADP	Adenosindiphosphat
AP1/2/3/4	Heterotetramerer Adaptorprotein-Komplex 1/2/3/4
AP-180	Adaptor-Protein 180
APC	Anaphase-promoting complex
APP	Amyloid-Precursor-Protein
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	(<i>bovine serum albumin</i>) Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
CCV	<i>Clathrin-coated vesicle</i>
cDNA	Komplementäre DNA
CHC	<i>Clathrin heavy chain</i>
CLC	<i>Clathrin light chain</i>
Da	Dalton
DMPC	Dimyristoylphosphatidylcholin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDV	Elektronische Datenverarbeitung
EE	<i>Early endosome</i>
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinase
<i>et. al.</i>	(<i>et altera</i>) und andere
fmol	Femtomol
FCS	<i>fetal calf serum</i>

g	(<i>gravity</i>) Erdbeschleunigung
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	<i>GTP exchange factor</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GGA	<i>Golgi-localized,-γ-ear-containing,-ARF-binding protein</i>
GPCR	<i>G-Protein coupled receptor</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
HEAT	Huntington, Elongations-Faktor, PP2A A, Tau
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HSP	Hitzeshockprotein
IF	Immunfluoreszenz
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
KD	<i>knock-down</i>
kDa	Kilodalton
LAMP	<i>Lysosomal associated membrane protein</i>
LB	Luria Bertani Bakterien-Medium
LE	<i>Late Endosome</i>
LMCT1	Leucin-Methyl-Carboxyl-Transferase 1
LUV	<i>large unilamellar vesicles</i>
m	Milli (10^{-3})
M	Molar (mol/l)
Min	Minute
MLV	<i>large multilamellar vesicles</i>
MPR	Mannose-6-Phosphat-Rezeptor
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MVB	<i>multivesicular bodies</i>
n	Nano (10^{-9})
Ni-NTA	Nickel-Nitril-Tri-Essigsäure
OD	Optische Dichte
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PI	isoelektrischer Punkt

PM	Plasmamembran
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNS	<i>Post nuclear supernatant</i>
PP1/ 3/ 4/ 5/ 6	Proteinphosphatase 1/ 3/ 4/ 5/ 6
PP2A	Proteinphosphatase Typ 2A
PtdIns(4,5)P ₂	Phosphatidylinositol(4,5)bisphosphat
Rab	<i>Ras-like protein from rat brain</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RT	Reverse Transkriptase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SUV	<i>Small Unilamellar Vesicles</i>
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tfn	Transferrin
TfR	Transferrinrezeptor
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
TOR	<i>target of rapamycin</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u.a.	unter anderem
U	<i>Units</i>
μ	mikro (10 ⁻⁶)
UV	Ultraviolett
ü.N.	über Nacht
UTR	<i>Untranslated Region</i>
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i>
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

Eukaryotische Zellen bilden ein kompartimentiertes und zugleich dynamisches System. Durch einen hochspezifischen und koordinierten Transport findet ein ständiger Austausch einzelner Bestandteile zwischen den Kompartimenten statt. Für diesen Austausch haben sich drei unterschiedliche Mechanismen ausgebildet, die eine Selbstregulation der Kompartimente erlauben: Die Translokation ermöglicht es, zytosolische Proteine durch die Erkennung einer speziellen Aminosäuresequenz in oder durch eine Biomembran eines Kompartiments zu transferieren. Der Schleusen-Transport (*gated transport*) gestattet und reguliert den Proteinaustausch zwischen Zytosol und Zellkern. Der vesikuläre Transport erlaubt den Austausch zwischen Kompartimenten durch Transportvesikel.

1.1 Vesikulärer Transport

Der vesikuläre Transport gestattet den Transport von Transmembranproteinen, löslichen Proteinen, extrazellulären sowie luminalen Molekülen und Lipiden zwischen intrazellulären Kompartimenten und der Plasmamembran. Die möglichen Ausgangs- und Ziel-Punkte für diesen Transport sind das endoplasmatische Retikulum (ER), der Golgi-Apparat, das endosomal-lysosomale System und die Plasmamembran. Zahlreiche gewebsspezifische und Zelltyp-abhängige Spezialisierungen sind vorhanden (z.B. in Melanozyten). Der Transport findet in membranumhüllten Vesikeln statt, deren Durchmesser zwischen 40 und 120 nm beträgt. Diese Vesikel schnüren sich von einer Donormembran ab, bewegen sich durch die Zelle und fusionieren schließlich mit der Akzeptormembran. Auf diesem Weg können zelluläre Prozesse reguliert und beeinflusst werden, wie z.B. die Aufnahme von extrazellulären Stoffen, die Degradation von zellinternen Molekülen oder die Reifung von Organellen durch Veränderung ihrer Bestandteile. Beispielsweise gelangt extrazelluläres Plasma-Transferrin und auch LDL (*low density lipoprotein*) nach Bindung an spezifische Rezeptoren an der Zelloberfläche durch Endozytose in das endosomale System. Auch nach der Synthese von Membranproteinen am rauen ER und der darauf folgenden Prozessierung im Golgi-Apparat gelangen die Proteine durch Integration in Transportvesikel schließlich zu ihrem Zielorganell, das z.B. ebenfalls ein Endosom sein kann. Diese beiden charakterisierten Wege beschreiben

den Endozytoseweg bzw. die biosynthetische Transportroute. Abbildung 1.1 veranschaulicht eine Übersicht von bekannten Transportwegen (Pfeile) in einer tierischen Modellzelle.

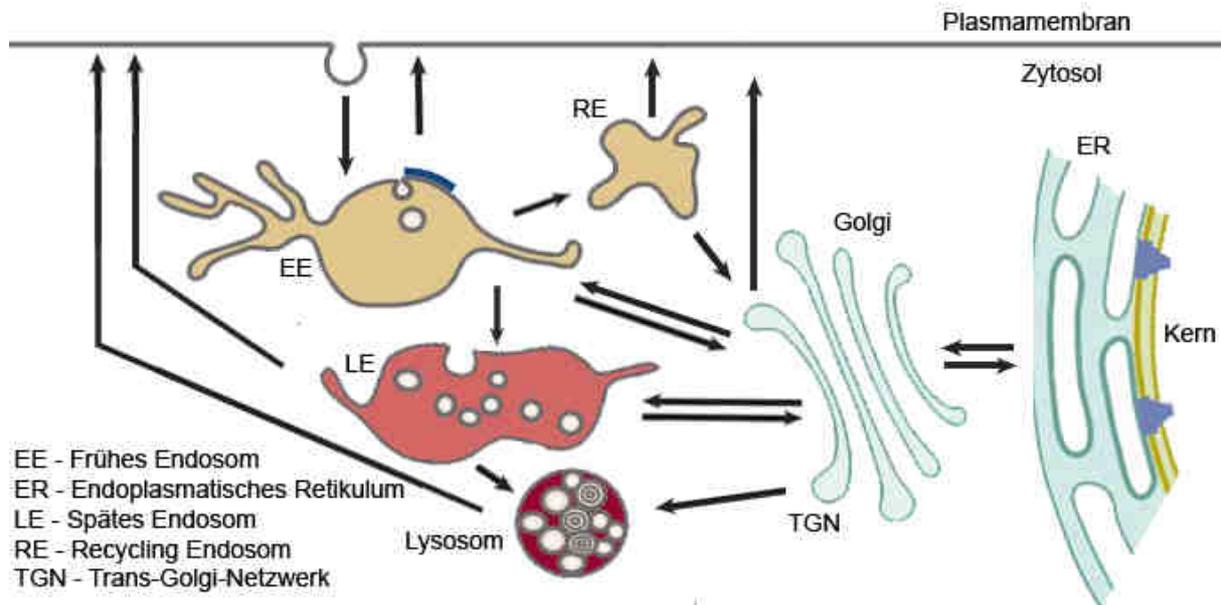


Abbildung 1.1: Vereinfachtes Schema des vesikulären Transports in einer eukaryotischen Zelle. Transportwege zwischen Kompartimenten und der Plasmamembran sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die Einleitung eines Transportprozesses ist jeweils verbunden mit der Beladung eines Vesikels. (Verändert nach (Mercer *et al.* 2010))

Das endosomal-lysosomale System setzt sich aus unterschiedlichen Organellen zusammen. Neben den frühen Endosomen (*early endosomes* = EE) und den späten Endosomen (*late endosomes* = LE oder *multivesicular bodies* = MVB) unterscheidet man zwischen Recycling-Endosomen (RE) und den Lysosomen, die sich alle in ihren Eigenschaften wie dem pH-Wert, der Proteinkomposition, der Morphologie und spezifischen Membranproteinen unterscheiden (Stoorvogel *et al.* 1996, Stoorvogel 1998). Am Trans-Golgi-Netz (TGN) abgehende Vesikel können beispielsweise mit Komponenten dieses Systems verschmelzen, wobei der direkte Transport zu Lysosomen umstritten ist. Durch Endozytose an der Plasmamembran gebildete Vesikel werden in frühe Endosomen befördert. Eine Fortsetzung des Transports in späte Endosomen und von dort in Lysosomen ist möglich. Alternativ kann der Transport auch von frühen Endosomen zu Recycling-Endosomen und von dort zurück zur Plasmamembran stattfinden. Einige Zelltypen besitzen zusätzlich besondere Organellen, denen spezialisierte Aufgaben zukommen. Diese sind

ebenfalls in das Transportsystem integriert. Beispielsweise besitzen Melanozyten die nach ihnen benannten, mit Lysosomen verwandten Melanosomen, in denen das für den UV-Strahlenschutz wichtige Melanin produziert wird.

Die Regulation der Vesikelbildung wird durch ein komplexes System koordiniert, das sich aus zytosolischen Proteinen zusammensetzt, die an die Donormembran anlagern und dort die Ausbildung der Vesikel initiieren. Im ersten Schritt muss die Erkennung der zu transportierenden Frachtmoleküle vollzogen, dann die Rekrutierung weiterer, für die Einstülpung der Membran nötiger Proteine eingeleitet werden. Nach Abschnürung eines Vesikels besitzt dieses mehr als 50 (Takei und Haucke 2001) angelagerte Proteine, die eine Hülle bilden. Es konnten mehrere Typen von beschichteten Vesikeln (*coated vesicles*) identifiziert werden, die spezifisch für den Transport zwischen Organellen sind (Aridor und Traub 2002, Kirchhausen 2000). COP I (*coat-protein*)-Vesikel sorgen für den Transport von Membranproteinen vom Golgi zum ER, COP II-Vesikel finden sich hingegen im entgegengesetzten Transportweg.

1.2 Clathrin-umhüllte Vesikel

Clathrin-umhüllte Vesikel (*Clathrin-coated vesicles/ CCVs*) besitzen eine Hülle, die aus Clathrin besteht. Ein funktionelles Clathrin-Molekül bildet ein Triskelion (Abbildung 1.2A), das sich aus drei schweren (192 kDa) und drei leichten (30 kDa) Polypeptidketten zusammensetzt (ter Haar *et al.* 1998). Die schweren Ketten (*clathrin heavy chain / CHC*) gliedern sich hauptsächlich in einen N-terminalen Bereich (terminale Domäne), ein distales Segment und einen C-terminalen, proximalen Teil, an dem die schweren mit den leichten Ketten interagieren. Untereinander verbunden sind die schweren Ketten ebenfalls an ihren proximalen Segmenten (Abbildung 1.2A/ D). Eine wie in Abbildung 1.2B dargestellte Clathrin-Hülle, die *in vitro* durch Clathrin-Polymerisation entstanden ist, setzt sich aus ca. 60 Triskelions (~200 CHCs) zusammen, die eine käfigartige Struktur aus Pentagonen und Hexagonen bilden (Ehrlich *et al.* 2004, Saffarian und Kirchhausen 2008).

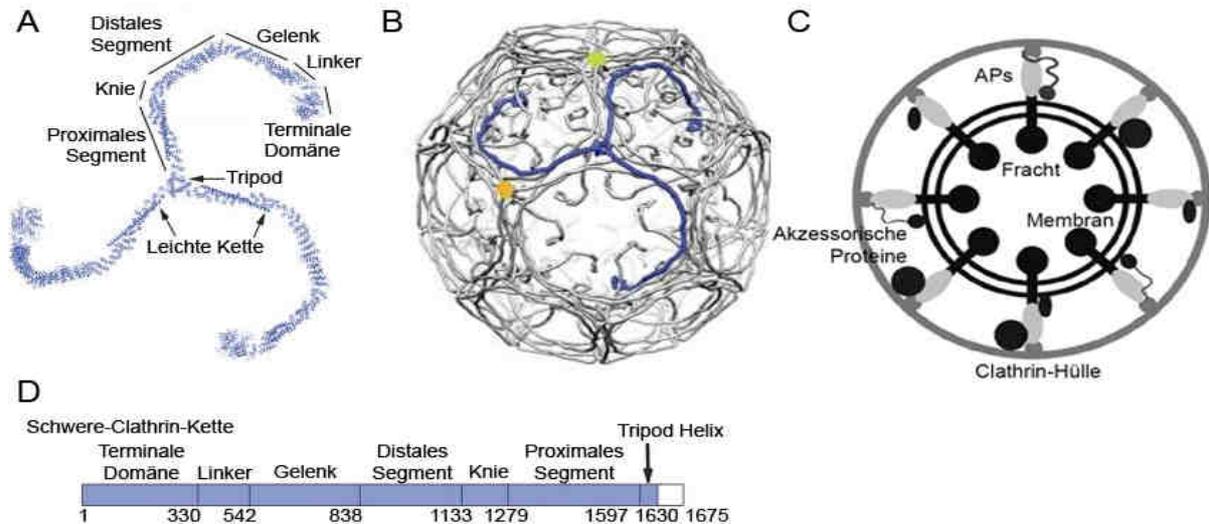


Abbildung 1.2: Struktur eines Clathrin-Triskelions und Aufbau eines CCVs. A: Triskelions setzen sich aus drei schweren und drei leichten Clathrin-Ketten zusammen. Die schweren Ketten lassen sich in Domänen unterteilen. B: Unter geeigneten *in vitro* Bedingungen können Triskelions spontan zu einem Käfig polymerisieren. Ein Triskelion (blau) und die Scheitelpunkte zweier weiterer Triskelions sind farblich gekennzeichnet (gelb und grün). C: Schematischer Querschnitt eines CCVs. D: Organisation der Domänen einer schweren Clathrin-Kette. (A, B, D: modifiziert nach Xing *et al.* 2010; C: modifiziert nach Kirchhausen 2000)

Da Clathrin jedoch nicht direkt mit Membranen interagieren kann, sind Clathrin-Adaptorproteine notwendig, um diese Interaktion zu ermöglichen (Abbildung 1.2C). Neben Adaptoren, die ausschließlich an Lipidbestandteile der Membran binden (*clathrin assembly lymphoid leukemia protein*; CALM/ AP180), konnten auch Adaptorproteine identifiziert werden, die zusätzlich mit Membranproteinen interagieren. Dazu zählen u.a. die heterotetrameren Adaptorprotein-Komplexe, β -Arrestin, welches die Internalisierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren vermittelt, und Epsin 1-3, die mono-ubiquitilierte Frachtmoleküle erkennen und deren Endozytose initiieren. Eine ausführliche Übersicht findet sich in Owen *et al.* 2004.

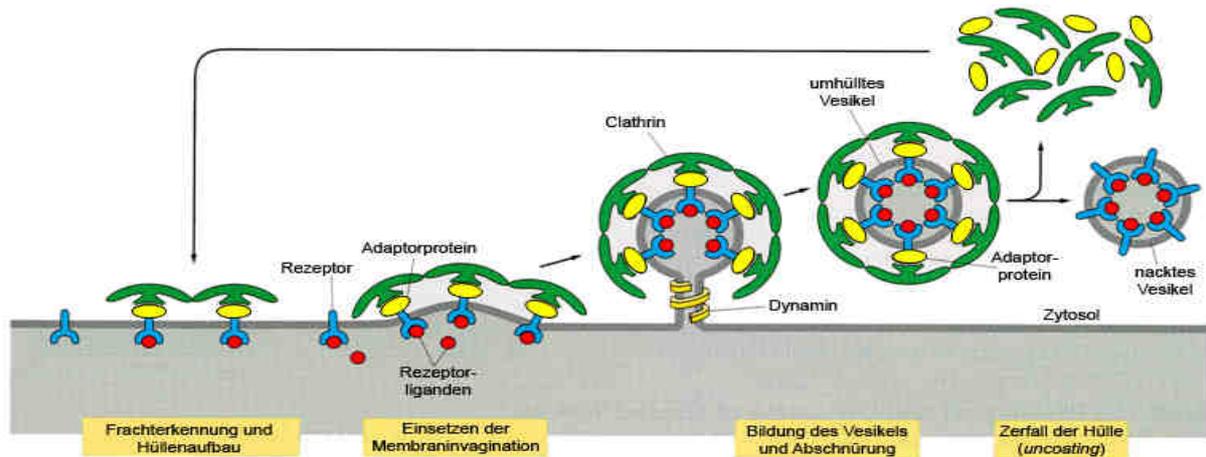


Abbildung 1.3: Bildung und Zerfall eines Clathrin-umhüllten Vesikels. Die Bildung eines CCV aus einer inneren Membran mit Transmembranproteinen, den Adaptoren und akzessorischen Proteinen und der äußeren Clathrin-Schicht. Weitere Erklärung siehe Text. (Verändert nach Alberts *et al.* 2002)

Der Prozess der Vesikelbildung bleibt, unabhängig vom Adaptor-Typ, prinzipiell gleich. Ein zu transportierendes Molekül wird von einem Adaptorprotein gebunden, das durch Interaktion mit Clathrin den Aufbau der Hülle initiiert. Strittig ist, ob, wie in Abbildung 1.3 dargestellt, mehrere Membranproteine (des gleichen oder unterschiedlichen Typs) an einer Stelle gebündelt werden, woraufhin sich die Membran dort einzustülpen beginnt. Clathrin-Triskelions umschließen dabei den abzuschnürenden Membranbereich (*Clathrin-coated pit*) mit einer mechanischen, stabilisierenden Hülle. Die Abschnürung des Vesikels von der Membran wird durch die GTPase Dynamin vermittelt. Daraufhin lösen sich die Vesikel-assoziierten Proteine ab und das „nackte“ Vesikel wird im Zytosol über das Zytoskelett zu seinem Zielorganell transportiert (Abbildung 1.3). Der Durchmesser eines CCVs beträgt ungefähr 100 nm (Owen 2004). Für die CCV-Bildung, das Abstreifen der Clathrin-Hülle, den Transport des Vesikels entlang des Zytoskeletts sowie die anschließende Fusion des Vesikels mit der Akzeptormembran sind außer Clathrin und den Adaptoren noch eine Vielzahl weiterer akzessorischer und regulatorischer Proteine nötig. Die Rekrutierung dieser Faktoren geschieht größtenteils ebenfalls durch die Adaptorproteine, die somit Ausgangspunkt für ein Protein-Protein und Protein-Lipid-Interaktions-Netzwerk sind. Abhängig von den Transportrouten entstehen CCVs mit Hilfe von unterschiedlichen Adaptorproteinen mit der Konsequenz einer variierenden Proteinkomposition der Vesikelhülle.

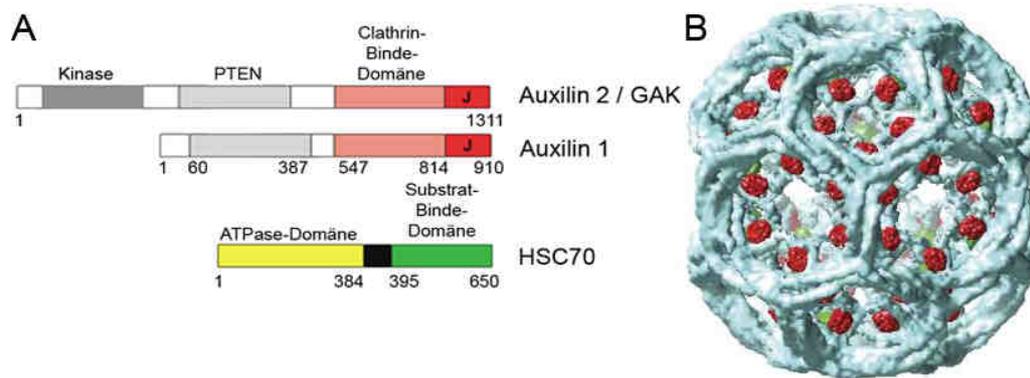


Abbildung 1.4: Komponenten des CCV-uncoating. A: Schematischer Aufbau von Auxilin2, des neuronal-spezifischen Auxilin1 und HSC70. B: Rekonstitution eines HSC70 (1-554; grün)- Auxilin1 (547-910; rot)- Clathrin (blau)- Käfigs. (Modifiziert nach Xing *et al.*, 2010)

Für das Abstreifen der Clathrin-Hülle, das *uncoating*, ist HSC70, ein Mitglied der zytosolischen Hitzeschock-Proteine (HSP) verantwortlich (Morgan *et al.* 2001). HSPs sind u.a. für die korrekte Faltung von zytosolischen Proteinen zuständig (Hartl *et al.* 1994). HSC70 ist in der Lage über ein Substrat-Binde-Motiv mit dem Triskelion zu interagieren. Ein Triskelion kann je ein HSC70 Molekül an seinem Scheitelpunkt binden (Abbildung 1.4B), was nach aktuellen Ergebnissen dazu führt, dass Druck auf die Hülle ausgeübt wird und sich da das Triskelion so verformt. Geschieht dies an mehreren Stellen, wird die Clathrinhülle derart deformiert, dass sich die Triskelions voneinander lösen und gemeinsam mit HSC70 das Vesikel verlassen (Heuser und Steer 1989, Xing *et al.* 2010). Allerdings ist, wie bei allen Vertretern der HSP70 Familie, als Voraussetzung für die Interaktion mit dem Substrat, eine Rekrutierung über die J-Domäne eines Co-Chaperons nötig. Für HSC70 konnte Auxilin als Co-Chaperon identifiziert werden (Xing *et al.* 2010). Auxilin besitzt neben der J-Domäne ebenfalls eine Clathrin-Binde-Region und eine PTEN (Phosphoinositol-Phosphatase)-Domäne, die der Bindung an Membranen dient (Abbildung 1.4 A) (Ahle und Ungewickell 1990, Holstein *et al.* 1996). Die schnelle Rekrutierung von Auxilin an ein sich abschnürendes CCV deutet auf ein zeitnahes *uncoating* nach der Abschnürung hin (Lee *et al.* 2006). Die Interaktion von Auxilin mit dem terminalen Teil einer schweren Clathrinkette sorgt bereits für eine leichte Deformation der Clathrinhülle (Xing *et al.* 2010). Ein Triskelion kann bis zu drei Auxilin-Moleküle binden. Für die Rekrutierung von HSC70 ausreichend ist ein C-terminales Fragment (Nukleotide 547 – 910), das die Clathrinbinde- und J-Domänen-Funktionen umfasst (Holstein *et al.* 1996). Zwei Isoformen von Auxilin konnten bislang identifiziert

werden. Während Auxilin 1 ausschließlich in neuronalem Gewebe exprimiert wird, lässt sich Auxilin 2 ubiquitär nachweisen. Auxilin 2 besitzt zusätzlich eine N-terminale Kinasedomäne, deren exakte Funktion *in vivo* unklar ist (Abbildung 1.4 A).

1.3 Heterotetramere Adaptorprotein-Komplexe

Die größte Gruppe der für die Bildung von CCVs verantwortlichen Adaptorproteine ist die Familie der heterotetrameren Adaptorprotein-Komplexe (APs). Bislang konnten vier Mitglieder identifiziert werden: AP1, AP2 (Pearse und Robinson 1984) und AP3 (Dell'Angelica *et al.* 1997, Simpson *et al.* 1997) finden sich in allen eukaryotischen Zellen, während AP4 (Dell'Angelica *et al.* 1999, Hirst *et al.* 1999) ausschließlich in Zellen höherer Eukaryoten exprimiert wird.

1.3.1 Struktur der APs

Die große Gemeinsamkeit der heterotetrameren Adaptorproteine ist deren homologe Zusammensetzung (Abbildung 1.5). Sie bestehen alle aus vier Untereinheiten, die sich in zwei große (~110 kDa), eine mittlere (~50 kDa) und eine kleine Untereinheit (~20 kDa) aufteilen lassen. Die Untereinheiten weisen unter den Komplexen zwischen 21 und 83% identische Aminosäuren auf, was auf einen gemeinsamen Ursprung schließen lässt. Der Homologie entsprechend wurden die Untereinheiten β 1-4, μ 1-4 und σ 1-4 getauft. Die vierte Untereinheit, mit der geringsten Homologie, wurde entgegen dieser Nomenklatur α (AP2), γ (AP1), δ (AP3) bzw. ε (AP4) benannt (Abbildung 1.5). Daneben existieren Varianzen von AP1 (μ 1A, μ 1B / σ 1A, σ 1B, σ 1C), die beispielsweise in Epithelzellen auftreten und von AP3 (μ 3A, μ 3B / β 3A / β 3B) in z.B. neuronalen Zellen. Auch von AP2 existieren Isoformen (α 1, α 2), deren Rollen in der Zelle aber völlig unbekannt sind.

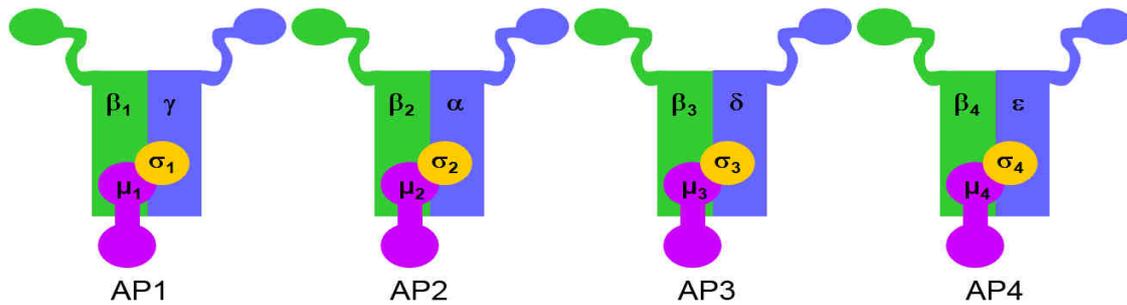


Abbildung 1.5: Die vier Vertreter der heterotetrameren Adaptorkomplexe. Die vier Komplexe bestehen aus vier Untereinheiten und werden im menschlichen Organismus ubiquitär exprimiert. Ihrer Homologie nach werden die Untereinheiten β 1-4, μ 1-4, σ 1-4 und γ , α , δ oder ϵ benannt.

In den letzten 10 Jahren gelang die Strukturaufklärung von AP1 (Heldwein *et al.* 2004, Nogi *et al.* 2002) sowie AP2 (Collins *et al.* 2002, Owen *et al.* 1999, Owen *et al.* 2000). Beide großen Untereinheiten der Komplexe lassen sich in drei Abschnitte teilen, eine N-terminale *core*-, eine *hinge*- und eine C-terminale *ear*-Domäne (Abbildung 1.6A).

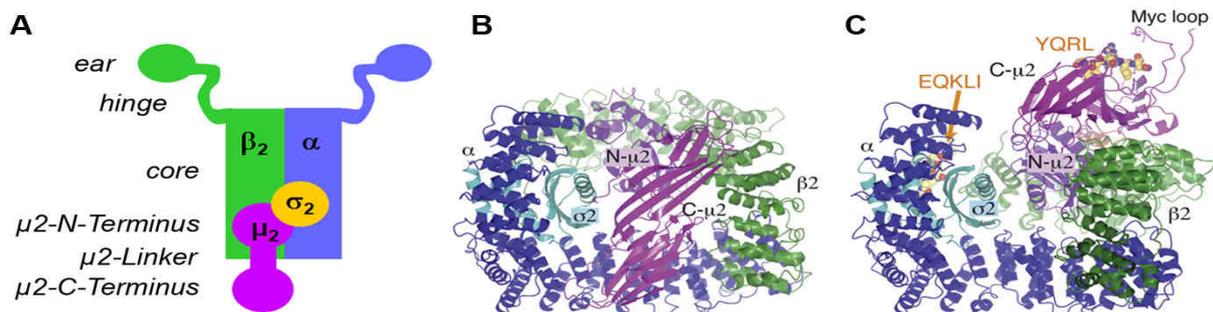


Abbildung 1.6: Struktur des Adaptor-Komplex 2. A: Die beiden großen Untereinheiten der Adaptoren werden in drei Bereiche unterteilt, *core*, *hinge* und *ear*-Domänen. Auch die μ -Untereinheit lässt sich in einen N- und einen C-terminalen Bereich sowie einen Linker aufteilen. B: In der Kristallstruktur der geschlossenen Konformation sind die Sortierungssignal-Bindestellen nicht zugänglich. C: Erst durch eine Konformationsänderung in die offene Form können Signalsequenzen gebunden werden. (B, C: Jackson *et al.* 2010)

Auch die μ -Untereinheit kann in eine N-terminale und eine C-terminale Domäne unterteilt werden. Der N-terminale Anteil ähnelt strukturell σ 2, der C-terminale Teil von μ 2 liegt in einer Mulde zwischen den großen Untereinheiten (Abbildung 1.6 B). Die Verbindung zwischen den μ 2-Domänen wird durch einen unstrukturierten Linker hergestellt. Inzwischen gelang es eine weitere Konformation des AP2-Komplexes aufzuklären. Durch das Hinzufügen von kurzen Signalpeptiden erfährt der Komplex Veränderungen in der relativen Lage der einzelnen Untereinheiten. Im Zuge der

Umlagerung bildet die unstrukturierte μ 2-Linker-Sequenz eine vierfach gewundene Helix. Die C-terminale Domäne von μ 2 dreht sich 127° um die eigene Achse (Abbildung 1.6C/ 1.7). Auch die großen Untereinheiten werden beeinflusst. Sie kollabieren nach innen, so dass eine Bindungsstelle für saure Dileucin-Signale zugänglich wird (Jackson *et al.* 2010).

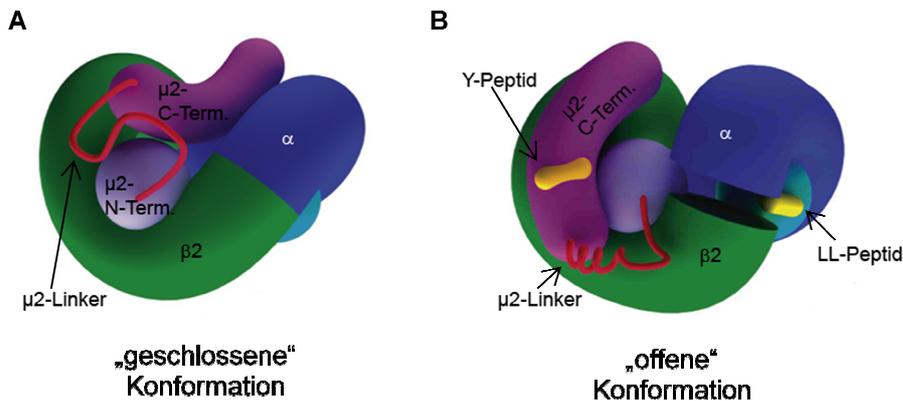


Abbildung 1.7: Konformationszustände von AP2. Die α -Untereinheit ist in blau, β 2 in grün, die N-terminale Domäne von μ 2 in lila, die C-terminale Domäne von μ 2 in magenta und σ 2 in cyan dargestellt. A: In der geschlossenen Konformation liegt C- μ 2 zwischen den großen Untereinheiten im Zentrum des *core*-Komplexes. B: In der offenen Konformation ist durch die Bindung der Tyrosin- (Y) und Dileucin-(LL)-Signalpeptide der *core* nach Innen kollabiert. Durch Drehung um die eigene Achse kommt C- μ 2 nun an der Außenseite der β 2-Untereinheit zu liegen, so das Yxx Φ -Motive (in gelb) gebunden werden können. Der zuvor unstrukturierte μ 2-Linker bildet nun eine vierfach gewundene Helix. (Modifiziert nach Jackson *et al.* 2010)

1.3.2 Bindung der APs an Clathrin

Außer AP4 besitzen alle APs eine Konsensussequenz (L[LI][DEN][LF][DE]), die mit Clathrin interagieren kann (Clathrin-Box). Diese Region befindet sich in der *hinge*-Region der jeweiligen β -Untereinheiten und bindet den N-Terminus einer schweren Kette von Clathrin (Kirchhausen 2000). Der AP2-Komplex ist zusätzlich in der Lage, über eine weitere Region des β 2-*ear* (Sandwich-Subdomäne) Clathrin zu rekrutieren (Edeling *et al.* 2006). Diese Feststellung lässt nicht vollkommen ausschließen, dass AP4 trotz fehlender Clathrin-Box nicht direkt mit Clathrin interagieren kann. Auch eine indirekte Interaktion über gemeinsame Bindungspartner ist denkbar.

1.3.3 Lokalisation der APs

Abgesehen von AP2 ist die Lokalisation und Funktion der anderen Adaptoren im Detail umstritten. Es wurde gezeigt, dass AP2 eine entscheidende Rolle bei der Clathrin-vermittelten Internalisierung von Membranproteinen an der Plasmamembran spielt.

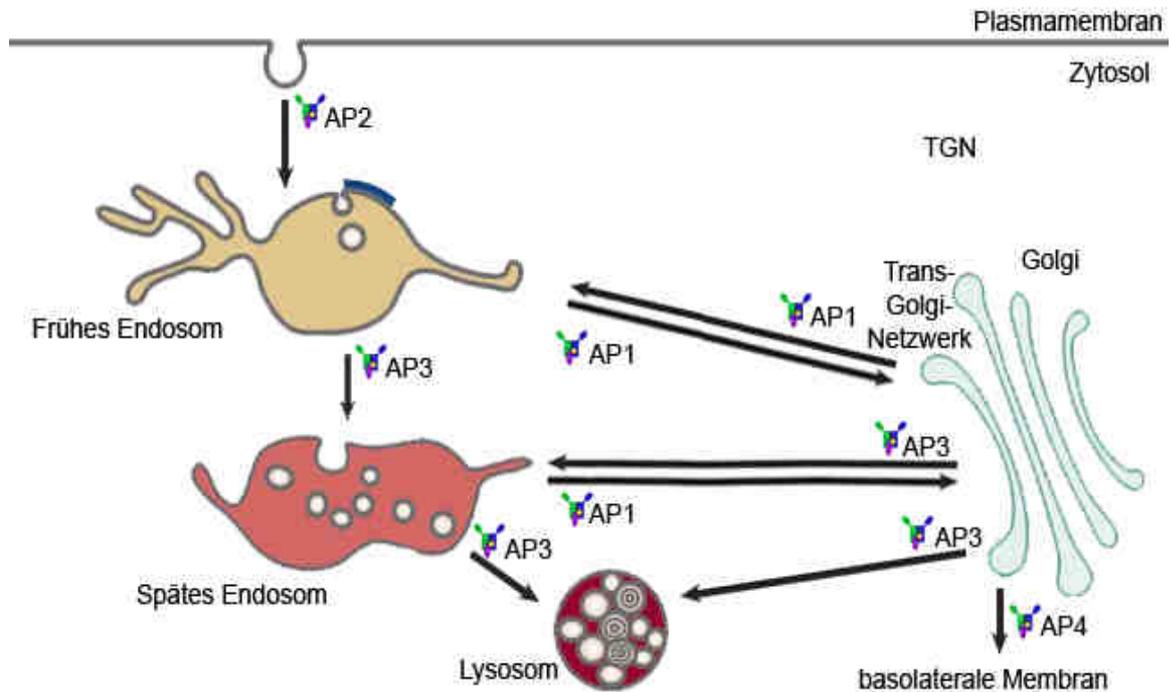


Abbildung 1.8: Lokalisation der APs. Die möglichen Transportfunktionen von AP1, AP2, AP3 und AP4 sind dargestellt. Erklärung siehe Text und Tabelle 1-1. (Modifiziert nach (Mercer *et al.* 2010))

Strittig ist, ob AP1 und AP3 an den Transportschritten vom TGN zu den Endosomen oder dem retrograden Transport beteiligt sind. AP4 ist der bislang am wenigsten charakterisierte Vertreter der APs. Vermutlich ist er u.a. an der basolateralen Sortierung in Epithelzellen vom TGN beteiligt (Abbildung 1.8).

Tabelle 1-1: Lokalisation und Funktion der APs. E: Endosom; EE: frühes Endosom; LE: spätes Endosom; LYS: Lysosom; PM: Plasmamembran; TGN: Trans-Golgi-Netzwerk

	AP1		AP2	AP3		AP4
	Isoform A	Isoform B		Isoform A	Isoform B	
Untereinheiten:						
-klein	$\sigma 1$	$\sigma 1$	$\sigma 2$	$\sigma 3$	$\sigma 3$	$\sigma 4$
-mittel	$\mu 1A$	$\mu 1B$	$\mu 2$	$\mu 3A$	$\mu 3B$	$\mu 4$
-groß konserviert	$\beta 1$	$\beta 1$	$\beta 2$	$\beta 3A$	$\beta 3B$	$\beta 4$
-groß variable	γ	γ	α	δ	δ	ϵ
Lokalisation:	TGN/E	E	PM	TGN/E	E	TGN
Postulierter Transport:	TGN → EE EE → TGN LE → TGN	basolaterale Sortierung in Epithelzellen	Endozytose	TGN → EE EE → LE TGN/E → LYS	Bildung synaptischer Vesikel	basolaterale Sortierung in Epithelzellen
Clathrinbindung:	+	+	+	+	?	?

1.3.4 Funktion der APs

Für alle APs konnte inzwischen deren Bindung an spezifische, lineare Sortierungssignale in den zytoplasmatischen Bereichen von Membranproteinen

nachgewiesen werden. So ist die Interaktion zwischen Tyrosin-haltigen Sortierungssignalen vom Yxx Φ -Typ (Φ entspricht einer großen hydrophoben Aminosäure) und Dileucin-haltigen Sortierungssignalen ([DE]xxxL[LI]) mit dem AP2-Komplex detailliert beschrieben (Iwamoto *et al.* 2002, Kelly *et al.* 2008, Owen und Evans 1998). Eine Übersicht einer Auswahl von Proteinen mit Sortierungssignalen bietet Tabelle 1-2. Mit Hilfe von gereinigten, rekombinant erzeugten C-terminalen Fragmenten von μ 1-4 konnte gezeigt werden, dass diese Yxx Φ -basierte Signale binden (Späte 2007). Für μ 4 wurde kürzlich eine bislang unentdeckte Bindestelle für ein neues Sortierungssignal (YKFFE) identifiziert, welches u.a. in dem Amyloid-Precursor-Protein (APP) vorkommt (Burgos *et al.* 2010). Die Identifikation der Bindungsstelle der Dileucin-Signale in einer hydrophoben Tasche in der kleinen AP2- σ 2-Untereinheit gelang durch Kristallisierung des Komplexes mit einem Dileucin-haltigen Peptid (Abbildung 1.6C/ 1.7B) (Kelly *et al.* 2008).

Tabelle 1-2: Übersicht einiger bekannter Proteine mit Sortierungssignalen.

Transmembranprotein	Yxx Φ -Signal	Dileucinsignal
TGN38	YQRL	-
LAMP1	YQIT	-
CD4	-	RM(phosphoS)QIKRLLSE
Tyrosinase	-	EEKQPLL
CD63	YEVM	-
Transferrin-Rezeptor	YTRF	-
Limp-II	-	DERAPLI

Da in der „geschlossenen“ Konformation sowohl die Tyrosin- wie auch die Dileucin-Signalbindungsstellen verdeckt sind, muss sich der Komplex für eine Interaktion umlagern (Vergleich Abbildung 1.7A, B). Dies geschieht im Fall von AP2, sobald der Komplex an der Plasmamembran an Phosphatidylinositol-Bisphosphat (PtdIns(4,5)P₂ / PIP₂) bindet. Dazu besitzt AP2 jeweils eine PIP₂-Interaktionsfläche in beiden großen Untereinheiten. Zwei weitere PIP₂-Bindestellen in μ 2 sind nur in der offenen Konformation zugänglich. So wird die offene Konformation des Komplexes an der Membran durch die Bindung von 4 PIP₂ und Sortierungssignalen stabilisiert (Abbildung 4.1). Ob eine gleichzeitige Bindung von Tyrosin- und Dileucinsignalen in der Zelle tatsächlich stattfindet ist nicht bekannt.

Die Konservierung der Primärstruktur zwischen den Adaptorkomplexen lässt auf einen vergleichbaren Mechanismus bei den anderen APs schließen. Einzig die

Tatsache, dass die APs an verschiedenen Kompartimenten lokalisieren, lässt vermuten, dass deren Rekrutierung zu den Organellen angepasst worden sein muss. Für AP1 wird eine PI(4)P Bindung (TGN) diskutiert (Wang *et al.* 2003), während eine AP3-Rekrutierung zu PI(3,4,5)P-reichen Membranen vermutet wird (Hao *et al.* 1997).

Die Abhängigkeit tierischer Zellen von APs, wurde durch *knock-out* Studien untersucht. AP1- (Zizioli *et al.* 1999) und AP2- (Mitsunari *et al.* 2005) defiziente Mäuse sterben im Embryonalstadium. Heterogene $\beta 2$ -*knock-out*-Mutanten sind dagegen vital, besitzen aber eine Gaumenspalte (Li *et al.* 2010). Auch der *knock-out* von AP2 (Gonzalez-Gaitan und Jackle 1997) in *Drosophila melanogaster* und von AP1 (Shim *et al.* 2000) und AP2 (Shim und Lee 2000) in *C. elegans* ist letal. Der funktionelle Verlust von AP3 ($\beta 3$) im Menschen führt zu klinischen Symptomen. Dazu zählen oculocutaner Albinismus, hämorrhagische Diathese und Lungenfibrose. Dieses Krankheitsbild ist unter dem Namen des hereditären, autosomal-rezessiven Hermansky-Pudlak-Syndroms Typ 2 bekannt. Insgesamt ist als Ursache für alle beschriebenen Phänotypen ein gestörter vesikulärer Transport zu nennen. Der Verlust von AP1 und AP2 in Hefe-Mutanten zeigt hingegen keine Lethalität (Rad *et al.* 1995).

Knock-out-Studien von AP4 in der Maus ergaben widersprüchliche Ergebnisse. Veröffentlicht wurde eine Akkumulation des AMPA-Rezeptors, sowie von AMPA-Rezeptor-regulatorischen Proteinen in Autophagosomen von Neuronen, in ansonsten vitalen Tieren, bei der Deletion des für $\beta 4$ kodierenden Gens (Matsuda *et al.* 2008). Unpublizierte Forschungsergebnisse von J.S. Bonifacino hingegen ergaben, dass der *knock-out* von $\beta 4$ letal ist.

1.4 Regulation von AP2

AP2 wird an drei der vier Untereinheiten phosphoryliert. Über die Phosphorylierungsstellen in α und $\beta 2$ und deren Funktion ist bislang nur wenig bekannt (Georgieva-Hanson *et al.* 1988, Manfredi und Bazari 1987). Es wird eine Phosphorylierung von Serin-Resten in den *hinge*-Regionen beider Untereinheiten vermutet (Wilde und Brodsky 1996). Außerdem konnten einige weitere einzelne phosphorylierte Aminosäuren in $\beta 2$ im Zusammenhang mit β -Arrestin abhängiger

Endozytose des Angiotensin-2-Typ-1-Rezeptors nachgewiesen werden (Fessart *et al.* 2007, Kim und Benovic 2002, Laporte *et al.* 1999). Diskutiert wird eine Bedeutung der Phosphorylierungen beim Ablösen von AP2 von der Membran eines CCVs.

Die erste identifizierte Phosphorylierungsstelle in AP2 war aber das Threonin156 (Thr156) in μ 2, welches sich in der *Linker*-Region (AS130-158) befindet (Pauloin und Thuriereau 1993). Arbeiten unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass die Folge dieser Phosphorylierung eine erhöhte Affinität des AP2-Komplexes zu Tyrosin-haltigen Sortierungssignalen ist. Außerdem konnten wir die für die Modifikation verantwortliche Kinase, die Adaptor assoziierte Kinase 1 (AAK1) identifizieren (Conner und Schmid 2002, Fingerhut *et al.* 2001, Ricotta *et al.* 2002). Diese *in vitro* gewonnenen Ergebnisse wurden durch weitere Publikationen unterstützt. So wurde z.B. durch Expression einer posttranslational nicht modifizierbaren μ 2 Mutante (Thr156Ala) eine Störung der Endozytose des Transferrin-Rezeptors festgestellt (Conner und Schmid 2002). Inzwischen konnte eine zweite, längere AAK1-Isoform mit einer Clathrin-Bindedomäne identifiziert werden, die auch die μ 1 Untereinheit von AP1 phosphorylieren kann (Henderson und Conner 2007). Desweiteren wurde mit der Cyclin-G-assoziierte Kinase (GAK / Auxilin 2) eine weitere Kinase gefunden, die *in vitro* ebenfalls μ 2 phosphorylieren kann (Korolchuk und Banting 2002).

Darüber hinaus wurde eine Ko-Lokalisation von AAK1 mit AP2 in (sich bildenden) CCVs beschrieben (Conner und Schmid 2002). Außerdem konnte eine Stimulation von AAK1 durch Clathrin gezeigt werden (Conner *et al.* 2003). Dies deutet darauf hin, dass die Phosphorylierung von Thr156 der Membranbindung und der damit verbundenen Öffnung des AP2-Komplexes folgt. Das phosphorylierte μ 2-Thr156 sorgt für eine Stabilisierung der offenen Konformation, so dass ein schnelles Umlagern zurück in die geschlossene Form erschwert wird, oder sogar nicht möglich ist.

Zur Ablösung des Komplexes von der Membran ist vermutlich zunächst die Dephosphorylierung von μ 2 nötig. Ebenfalls in unserer Arbeitsgruppe konnte die dafür verantwortliche Phosphatase identifiziert werden. Es konnte aus Schweinehirn ein Protein-Phosphatase 2A Holoenzym gereinigt werden, das die Dephosphorylierung katalysieren kann (Ricotta *et al.* 2008). Für AP1 konnte ein sehr

ähnlicher, wenn nicht identischer Regulationsmechanismus gezeigt werden (Ghosh und Kornfeld 2003).

1.5 Phosphoregulation von Proteinen

Die reversible Phosphorylierung von Proteinen ist ein weit verbreiteter Mechanismus. Er erlaubt die Regulation von z.B. Signalfunktionen, der Katalyse enzymatischer Reaktionen und die Interaktion mit kooperierenden Proteinen. Kovalent gebundenes Phosphat findet sich in ca. 30% der menschlichen Proteine (Depaoli-Roach *et al.* 1994). In eukaryotischen Zellen sind die Hydroxylgruppen von Serin (Ser), Threonin (Thr) und Tyrosin (Tyr) die am häufigsten phosphorylierten Aminosäuren, wobei Serin am stärksten betroffen ist. Daneben kann Histidin ebenfalls durch Phosphorylierung modifiziert werden.

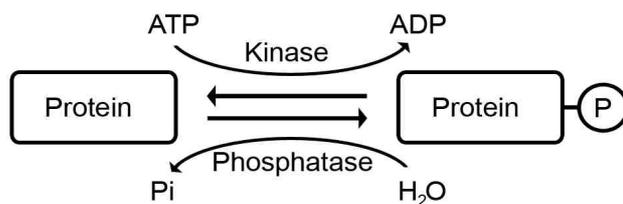


Abbildung 1.9: Phosphoregulation von Proteinen. Der Transfer einer Phosphatgruppe auf ein Protein oder dessen Entfernung erlaubt eine reversible Veränderung der Proteinoberfläche, die Einfluss auf dessen Konformation oder Interaktionsfähigkeit haben kann.

Durch Proteom-Analysen von 6600 Phosphorylierungsstellen in 2244 humanen Proteinen wurde herausgefunden, dass phosphoryliertes Serin (pSer), Phosphothreonin (pThr) und Phosphotyrosin (pTyr) in einem Verhältnis von 86,4: 11,8: 1,8 auftreten (Olsen *et al.* 2006). Durch Analyse der Sequenzierungsergebnisse des humanen Genoms wurde eine Anzahl von 518 putativen Protein-Kinasen ausgemacht (Johnson und Hunter 2005, Lander *et al.* 2001), die in zwei Familien aufgeteilt werden können: 90 Tyrosin- und 428 Serin/Threonin-Kinasen. Die Spezifität des Phosphorylierungsprozesses und deren Reversibilität ließ eine ähnliche Anzahl von Protein-Phosphatasen im Genom vermuten. Überraschenderweise konnten aber nur 107 potentielle Tyr-Phosphatasen und ca. 30 Ser/Thr-Phosphatasen gefunden werden. Während die Tyr-spezifischen

Enzyme zahlenmäßig in etwa übereinstimmen, liegt die Anzahl der Ser/Thr-spezifischen Phosphatasen deutlich unter der der Kinasen.

1.5.1 Serin/ Threonin-spezifische Phosphatasen (PSPs)

Die Gruppe der PSPs umfasst drei Familien: die Phosphoprotein-Phosphatasen (PPPs), die Metall-abhängige Protein-Phosphatasen (PPMs) und die Aspartat-basierten Phosphatasen. Die Familie der PPPs setzt sich aus der Protein Phosphatase 1 (PP1), PP2A, PP2B (Calcineurin), PP4, PP5, PP6 und PP7 zusammen. Sie stellen damit die meisten Mitglieder der PSPs. Die katalytischen Untereinheiten der PPPs interagieren mit regulatorischen Untereinheiten, um ihre Substrate zu binden. PPMs sind Phosphatasen, die abhängig von Mangan, bzw. Magnesium funktionieren. Dazu zählen die Protein Phosphatase 2C (PP2C) und die Pyruvat-Dehydrogenase-Phosphatase. PPMs besitzen, im Gegensatz zu PPPs, zusätzliche Domänen und konservierte Sequenzmotive zur Substraterkennung. Die PPMs benötigen wie auch die PPPs für die Reaktion der Dephosphorylierung ein Metall-Ion zur Aktivierung eines Wassermoleküls. Im Gegensatz dazu ist die katalytische Aktivität der Aspartat-Phosphatasen (FCP/ SCP) abhängig von einem Aspartat im aktiven Zentrum.

Bis zu 90% der Dephosphorylierung von Ser und Thr-Resten wird in Säugetierzellen durch PP1 und PP2A geregelt (Cohen 1989, MacDougall *et al.* 1991). Es wird davon ausgegangen, dass PP2A, abhängig vom Zelltyp, für 30-50% der totalen Ser/ Thr-Dephosphorylierungs-Aktivität verantwortlich ist (Longin *et al.* 2007).

1.6 Protein-Phosphatase 2A (PP2A)

PP2A ist eine trimere, in Eukaryoten hoch konservierte und mengenmäßig häufig exprimierte Phosphatase (Shi 2009). Sie ist bedeutsam bei Entwicklungsprozessen, der Zell-Proliferation, dem Zelltod, der Zell-Mobilität, in der Zytoskelett-Dynamik, der Kontrolle des Zell-Zyklus und der Regulation zahlreicher Signalwege und ist damit in fast alle zelluläre Prozesse involviert (Janssens und Goris 2001). Demzufolge führt eine Fehlregulation von PP2A zu schwerwiegenden pathologischen Konsequenzen, wie Krebs oder Alzheimer (Chen *et al.* 2004, Sontag 2001). Damit zählt PP2A zu den Tumor-Suppressoren, was umgekehrt kleine PP2A-aktivierende-Moleküle zu potentiellen Zytostatika macht (Perrotti und Neviani 2006). Die Relevanz von PP2A in

der Regulation von Signalwegen wird dadurch untermauert, dass sie von verschiedenen Viren zur Manipulation der Signaltransduktion eingesetzt wird (Arroyo und Hahn 2005).

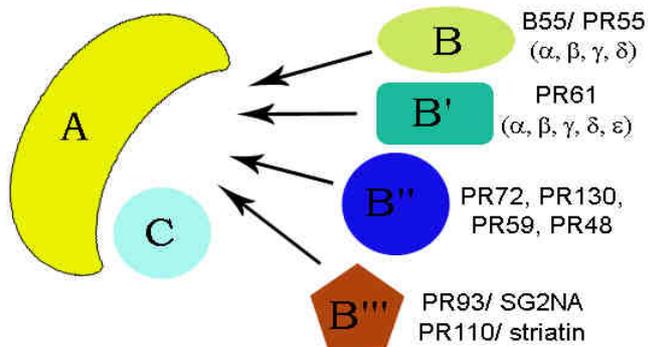


Abbildung 1.10: Schematische Darstellung der möglichen Zusammensetzung eines PP2A-Holoenzym. Ein PP2A-Holoenzym setzt sich aus einem Dimer, das aus der PP2A-A- und der katalytischen C-Untereinheit besteht sowie aus einer Vielzahl von regulatorischen B-Untereinheiten zusammen. Die ca. 70 verschiedenen Enzym-Kombinationen sind für den Großteil der Ser/Thr-Dephosphorylierungs-Aktivität verantwortlich. Außer den abgebildeten B-Untereinheiten existieren weitere Isoformen. (Modifiziert nach Janssens und Goris 2001)

Die Basis für die Vielfalt von PP2A-Substraten liegt in der Struktur des Enzyms und dessen Regulation begründet. PP2A Holoenzyme sind Trimere, bestehend aus einem *core*-Dimer und einer regulatorischen Untereinheit. Das Dimer besteht aus einer katalytischen C-Untereinheit und einer strukturellen, regulatorischen A-Untereinheit. Für beide Untereinheiten existieren je zwei Gene, die je eine Isoform (α und β) kodieren. Das Dimer kann unabhängig von B-Untereinheiten stabil in Zellen existieren (Kremmer *et al.* 1997). Abbildung 1.10 stellt neben den Untereinheiten des *core*-Enzyms die Vertreter von vier Familien der regulatorischen B-Untereinheiten dar. Durch die Kombination aus den unterschiedlichen A-B-C-Typen können theoretisch 68 verschiedene Holoenzyme gebildet werden, die sich in ihrer Substratspezifität unterscheiden. Wahrscheinlich wird diese Zahl aber aus strukturellen Gründen praktisch nicht erreicht (Zhou *et al.* 2003). Außer den dargestellten existieren noch weitere Isoformen einiger B-Untereinheiten.

Die katalytische Untereinheit kann auch mit dem $\alpha 4$ -Protein ein Dimer bilden. Der PP2A-C- $\alpha 4$ -Komplex ist verantwortlich für die Inhibition von Apoptose, aber auch in Krankheiten wie dem Opitz Syndrom involviert (Janssens und Goris 2001, Janssens *et al.* 2005, Kong *et al.* 2004, Sontag 2001). Auch das $\alpha 4$ -Homolog der Hefe (Tap42),

das eine entscheidende Komponente des Rapamycin-sensitiven TOR-Signalwegs ist, bildet einen Komplex mit PP2A C (Yang *et al.* 2007).

Prominente Interaktionspartner von PP2A A sind das kleine und mittlere T-Antigen des Polyoma- sowie das kleine T-Antigen des SV40 Virus (Abbildung 1.11), die fähig sind mit dem PP2A-core zu interagieren, um die Phosphatase-Funktion durch Verdrängung der B-Untereinheit zu manipulieren (Arroyo und Hahn 2005, Janssens *et al.* 2005).

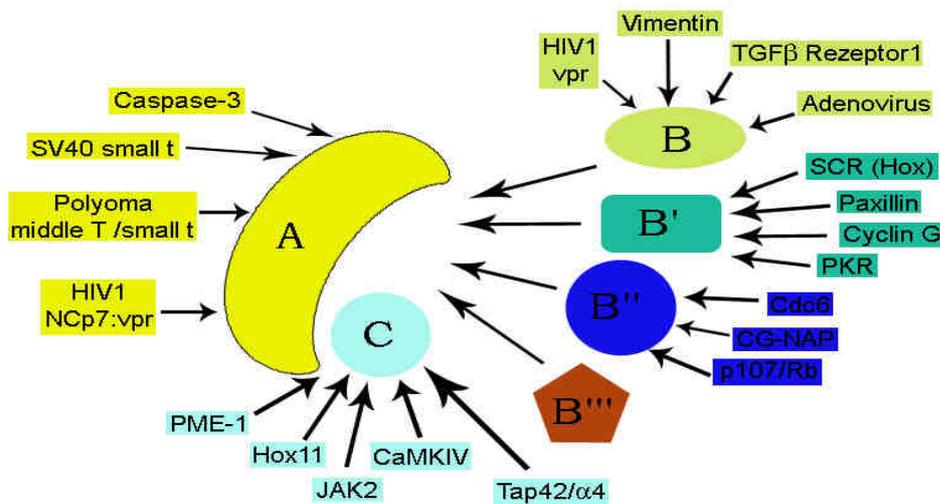


Abbildung 1.11: Interaktionen von PP2A-Untereinheiten mit zellulären und viralen Proteinen. Die Variabilität der Untereinheiten erlaubt eine Vielzahl von möglichen zellulären und viralen Interaktionspartnern. (Modifiziert nach Janssens und Goris 2001)

Untersuchungen zur Stöchiometrie der A-, B- und C- Untereinheiten in *Saccharomyces cerevisiae* haben ergeben, dass keine äquimolaren Verhältnisse vorliegen, sondern ein Verhältnis von 1:4:8 (A:B:C). PP2A A ist also deutlich unterrepräsentiert (Gentry und Hallberg 2002). In aus *Drosophila melanogaster* gewonnenen Schneider-Zellen und in humanen Zellkultur-Zellen wurde ein Bezug der Stabilität von PP2A Untereinheiten, abhängig von der Anwesenheit der anderen Untereinheiten festgestellt. In Hefen hingegen konnte keine Degradation von Untereinheiten bei verringerter oder fehlender Expression anderer Untereinheiten detektiert werden (Li *et al.* 2002, Schmitz *et al.* 2010, Wei *et al.* 2001).

1.6.1 Die katalytische PP2A-C-Untereinheit

Die beiden in Säugern ubiquitär exprimierten Isoformen α und β der katalytischen Untereinheit der PP2A mit einem Molekulargewicht von 36 kDa teilen 97% ihrer aus 309 Aminosäuren bestehenden Sequenz. Sieben der sich unterscheidenden

Aminosäuren befinden sich am N-Terminus. Eine besonders starke Expression von PP2A C lässt sich in Hirn- und Herzgewebe nachweisen. Generell wird die α -Isoform im Vergleich mit β um den Faktor 10 vermehrt gebildet (Khew-Goodall und Hemmings 1988), was u.a. auf einen stärkeren Promotor (Khew-Goodall *et al.* 1991) und eine differenzierte Kontrolle der Promotoren (Baharians und Schonthal 1998) zurückzuführen ist. Der genetische *knock-out* in Mäusen führt im Fall von C α durch ausbleibende Ausbildung des Mesoderms zu Letalität (Gotz *et al.* 2000). Die Überexpression dieser Untereinheit im Herzmuskel der Maus führt zu einer Hypertrophie. Die Überexpression einer dominant-negativen Form im Hirn hat eine Hyperphosphorylierung von Tau (Ursache von Alzheimer) zur Folge (Gergs *et al.* 2004). Die Deletion eines der beiden Gene in *Saccharomyces cerevisiae* (PPH21/PPH22) bleibt hingegen ohne schwerwiegende Auswirkungen, während der Doppel-*knock-out* ebenfalls letal ist (Sneddon *et al.* 1990).

Die Analyse der Gene von PP2A C in unterschiedlichen Spezies zeigt, dass das Gen während der Evolution kaum verändert wurde, so dass es vermutlich das am höchsten konservierte aller enzymatisch aktiven Proteine ist (Cohen *et al.* 1990). Die katalytische Domäne ist homolog zu der von der PP1. Besonders auffällig ist der C-Terminus, dessen Sequenz (T₃₀₄PDYFL₃₀₉) von der Hefe bis zum Menschen konserviert ist und darüber hinaus auch in PP4 und PP6 vorkommt (Cho und Xu 2007).

PP2A C ist außerdem primäres Ziel einer Anzahl von Tumor-induzierenden Reagenzien wie Okadasäure und Calyculin A (Ishihara *et al.* 1989). Ein weiterer Inhibitor, der dem gleichen Mechanismus folgt, ist Microcystin-LR (Xing *et al.* 2006), ein von Cyanobakterien produziertes Oligopeptid. Gekoppelt an Agarose dient es dem Präzipitieren von PP1/ PP2A. Wenigstens für Microcystin-LR und Okadasäure konnte deren Interaktion mit Aminosäuren nahe des katalytischen Zentrums gezeigt werden, welches damit blockiert wird (Xing *et al.* 2006).

1.6.2 Die regulatorische PP2A-A-Untereinheit (PR65)

Die A-Untereinheit besitzt ein Molekulargewicht von 65 kDa und ist unter zellulären Bedingungen eng mit der katalytischen C-Untereinheit verbunden. PP2A A bildet eine Plattform für die Bindung der regulatorischen B-Untereinheiten, die an die gleiche oder sich überlappende Stellen binden, wodurch die Interaktion mit mehreren

B-Untereinheiten zugleich unmöglich ist (Ruediger *et al.* 1994). Wie auch im Fall der katalytischen Untereinheit existieren in Säugern zwei PP2A A-Isoformen α und β , die zu 86% in ihren Sequenzen übereinstimmen. Die Halbwertszeit der größtenteils zytosolisch lokalisierten Proteine beträgt ca. 10 h (Zhou *et al.* 2003). Beide Isoformen weisen eine ubiquitäre Expression auf (Hemmings *et al.* 1990), wobei das Expressionsniveau der α -Isoform deutlich höher ist (Hendrix *et al.* 1993, Zhou *et al.* 2003). Während PP2A A α *Housekeeping*-Funktionen zugeschrieben werden, wurde das am N-Terminus um 12 Aminosäuren längere PP2A A β als humaner Tumor-Suppressor identifiziert (Baysal *et al.* 1998, Wang *et al.* 1998). Mutationen des PP2A A α -kodierenden Gens wurden dagegen weniger oft in Brust- und Lungen-Karzinomen diagnostiziert (Calin *et al.* 2000).

In der A-Untereinheit finden sich 15 Wiederholungen des HEAT-Motivs, einer 39-Aminosäuresequenz. Die Bezeichnung HEAT entstammt den Proteinen **H**untington, **E**longations-Faktor, PP2A **A** und der **T**OR-Kinase, die alle dieses Motiv beinhalten (Andrade und Bork 1995). Eine einzelne dieser Wiederholungen setzt sich aus je zwei antiparallelen α -Helices zusammen, die durch Schleifen aus ein bis drei Aminosäuren (*Intra-repeat-loops*) verbunden sind (Abbildung 1.12A). Die Verknüpfung mit der nächsten Wiederholung wird durch weitere Schleifen (*Inter-repeat-loops*) ermöglicht, wodurch eine sehr hydrophobe Oberfläche an der Innenseite des Proteins entsteht, die optimal für Protein-Protein-Wechselwirkungen ist (Groves *et al.* 1999).

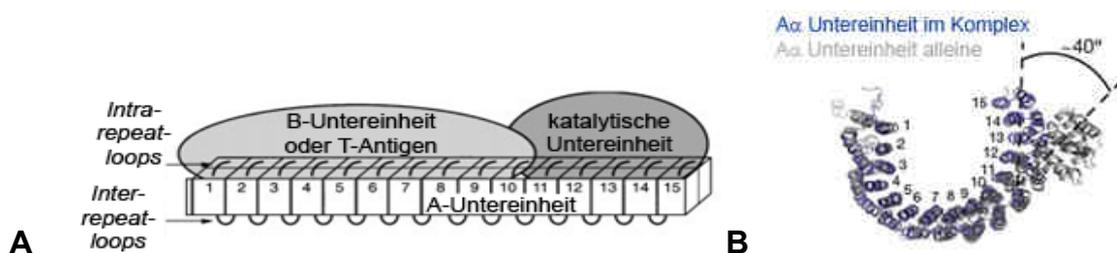


Abbildung 1.12: Struktur der PP2A-A-Untereinheit. Die A-Untereinheit besteht aus 15 sich wiederholenden Abschnitten, bestehend aus zwei α -Helices. Diese sind untereinander verbunden durch *Intra-repeat-loops*, die zudem in die Bindung der B- und C-Untereinheiten involviert sind. Untereinander sind die sich wiederholenden Sequenzen über *Inter-repeat-loops* verknüpft. Bei der Dimerisierung verschiebt sich der C-Terminus von PP2A A um 40°. (A: modifiziert nach Zhou *et al.* 2003; B: modifiziert nach Cho und Xu 2007)

Die Assoziation mit PP2A C erfolgt über die fünf C-terminalen Intra-Schleifen, während die verbleibenden Schleifen als Interaktionsfläche für die regulatorischen B-Untereinheiten zur Verfügung stehen (Abbildung 1.12 A). Die ersten 10

Wiederholungen bilden außerdem die Bindungsstelle für virale T-Antigene, die so eine Modulation der Substrat-Spezifität induzieren (Cho und Xu 2007, Ruediger *et al.* 1992, Ruediger *et al.* 1994). Ein Strukturvergleich unterschiedlicher PP2A-Enzyme zeigte darüber hinaus, dass PP2A A aufgrund der Struktur der HEAT-Wiederholungen eine flexible Grundstruktur besitzt, die es erlaubt ihre Konformation am C-Terminus um bis zu 40° zu ändern (Abbildung 1.12 B) (Shi 2009). Diese Flexibilität könnte die Grundlage für die Bindung des Dimers an unterschiedliche B-Untereinheiten bilden. *In vivo* und *in vitro* Analysen ergaben, dass obwohl sich beide Isoformen kaum unterscheiden, PP2A A β im Vergleich zu α eine deutlich geringere Bindungsaffinität zu einigen B- und den C-Untereinheiten besitzt (Tabelle 1-3).

Tabelle 1-3: Bindung von PP2A A β an B- und C-Untereinheiten (in Prozent) verglichen mit PP2A A α . (Ruediger *et al.* 2001, Zhou *et al.* 2003))

	B55 α	B56 α 1	PR72	PP2A C
PP2A A α	100	100	100	100
PP2A A β	3 \pm 2	4 \pm 2	30 \pm 6	15 \pm 3

1.6.3 Die Familien der regulatorischen PP2A-B-Untereinheiten

Bis dato konnten vier unterschiedliche Familien von regulatorischen B-Untereinheiten identifiziert werden, die um die Bindung an den PP2A-core kompetieren. Sie variieren im Expressionsniveau und in der Gewebsspezifität. Die regulatorische Untereinheit eines PP2A-Holoenzym ist für dessen subzelluläre Lokalisation und die Regulation der Substratspezifität verantwortlich. Abbildung 1.10 gibt einen Überblick über die wichtigsten B-Untereinheiten, deren Einteilung auf Gemeinsamkeiten in ihren Sequenzen beruht. Zwischen den Familien gibt es keine Ähnlichkeiten in den Primärstrukturen. Bis heute ist daher völlig unklar, wie B-Untereinheiten das core-Dimer erkennen und die Bildung eines Holoenzym initiiert wird. Einzig die Bindungsstellen mit dem Dimer wurden durch Rekonstitution und Kristallisierung zweier unterschiedlicher Holoenzyme für die Mitglieder zweier Familien von B-Untereinheiten gezeigt (Abbildung 1.13) (Xu *et al.* 2006, Xu *et al.* 2008).

Die vier Isoformen der B55- (PR55-/ B-)Familie (α , β , γ , δ) werden jeweils von einem Gen kodiert. Sie besitzen ein Molekulargewicht von ~52-55 kDa und enthalten jeweils sieben WD-40 Sequenz-Motive sowie einen β -Haarnadel-Arm (β -*hairpin arm*). Die Sekundärstruktur wird von β -Faltblättern dominiert (Abbildung 1.13 A).

WD-40 Wiederholungen sind minimal konservierte Sequenzen von typischerweise etwa 40 Aminosäuren, die häufig mit Tryptophan (W) und Aspartat (D) enden. Die Struktur der Wiederholungen ähnelt einem Propeller (Abbildung 1.13A), der eine Plattform für Protein-Protein-Interaktionen bildet (Smith *et al.* 1999).

Die Mitglieder der B55-Familie unterscheiden sich in ihrer zellulären Lokalisation sowie der gewebs- und entwicklungsspezifischen Expression (Sontag 2001). Die α und δ Isoformen sind ubiquitär exprimiert, während β und γ hauptsächlich im Hirn auftreten (Schmidt *et al.* 2002). Durch die Kristallisierung einer B55 α enthaltenden PP2A zusammen mit Microcystin-LR konnten die Interaktionsflächen zwischen B55 α und dem Dimer identifiziert werden. So wurde auch eine mögliche azide Substrat-Bindungstasche in B55 α für die Interaktion mit PP2A-Substraten ermittelt (Abbildung 1.13 C). In der Struktur bindet die B- Untereinheit über den β -Propeller an die HEAT-Wiederholungen 3-7 der A-Untereinheit. Zusätzlich interagiert der β -Haarnadel-Arm von B55 α mit den HEAT-Wiederholungen 1 und 2. Interaktionen zwischen PP2A C und dieser B-Untereinheit treten dagegen kaum auf (Xu *et al.* 2008).

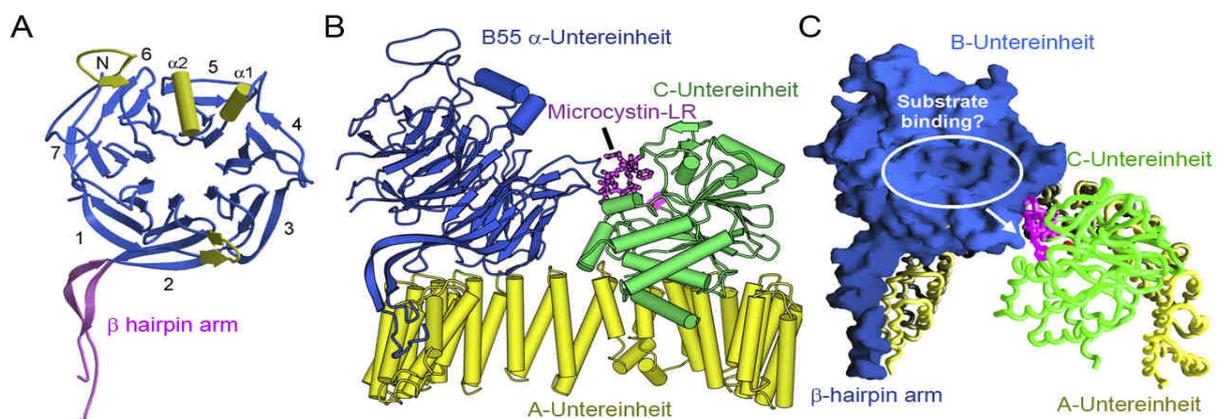


Abbildung 1.13: Struktur des PP2A-B55 α Holoenzym. A: Durch die Kristallstruktur konnten in B55 α sieben WD-40-Wiederholungen, zwei α -Helices und ein β -hairpin-Arm identifiziert werden. B/ C: Die Modelle des Holoenzym zeigen mehrere Interaktionsflächen von B55 α mit PP2A A und eine mögliche Substrat-Bindestelle. Das katalytische Zentrum ist durch Microcystin-LR besetzt. (Xu *et al.* 2008)

Neben der B55-Familie existieren drei weitere Gruppen von regulatorischen B-Untereinheiten. Die B'- (PR61/ B56) Familie besteht aus mind. acht Mitgliedern (Cho und Xu 2007, Xu *et al.* 2006), die wichtige Rollen im Zellzyklus, der Zell-Proliferation und u.a. dem Wnt-Signalweg durch Phosphoregulation einiger Schlüsselproteine wie APC, Cyclin G und Erk spielen.

Die Analyse der B''-Familie (PR59/ PR72/ PR75 / PR130) steckt noch in den Anfängen (Janssens und Goris 2001).

PR93 und PR110, Mitglieder der B'''-Familie sind in der Lage, Calmodulin in Abhängigkeit von Kalzium zu binden, was eine Funktion in Kalzium-abhängigen Signalwegen nahe legt (Janssens und Goris 2001).

1.6.4 Regulation der PP2A

Durch den Austausch der B-Untereinheiten ist die PP2A fähig, die Substratspezifität zu modifizieren. Außerdem können einzelne Untereinheiten durch posttranslationale Modifikationen beeinflusst werden. Gesichert ist bislang die Phosphorylierung der PR61-Untereinheiten an Ser337 durch die extrazelluläre Signal-regulierte Kinase (ERK), was die Dissoziation der B-Untereinheit vom A/C-Dimer zur Folge hat (Letourneux *et al.* 2006). Die Phosphorylierung von Ser37 durch Chk1 (*checkpoint-kinase 1*) hingegen führt bei PR61 γ zu einer Holoenzymbildung, was die Substraterkennung und Dephosphorylierung von Cdc25 (*cell-division-cycle mutant 25*) an Thr138 ermöglicht (Margolis *et al.* 2006). Die posttranslationale Modifikation anderer B-Untereinheiten ist nicht klar belegt. Diskutiert wird die Phosphorylierung von Ser167 der B55 α Untereinheit, die eine verringerte Bindung an das A/C-Dimer zur Folge haben soll (Schmitz *et al.* 2010).

Die zentrale Regulation von PP2A setzt aber am konservierten C-Terminus (Thr₃₀₄-Pro-Asp-Tyr₃₀₇-Phe-Leu₃₀₉) der katalytischen Untereinheit an. Beispielsweise kann das terminale Leu309 unter Verbrauch von S-Adenosyl-Methionin durch das Enzym LCMT1 (*leucine carboxyl methyltransferase 1*) an der freien Carboxylgruppe methyliert werden (De Baere *et al.* 1999). Es wird angenommen, dass 70-90% von PP2A C *in vivo* in methylierter Form vorliegt (Yu *et al.* 2001). Eine spezifische Phosphatase-Methylesterase (PME-1) ist fähig diese Modifikation reversibel zu entfernen (Longin *et al.* 2004, Ogris *et al.* 1999). Die Regulation liegt möglicherweise der unterschiedlichen Lokalisation von LCMT1 (Zytosol, Golgi, frühe Endosomen) und PME-1 (Kern) zugrunde (Longin *et al.* 2008). Über die Funktion und den Einfluss der Methylierung liegen widersprüchliche Ergebnisse vor. Einerseits wird diskutiert, dass die Modifikation für die Rekrutierung der B55-Untereinheiten notwendig ist. Grundlage dieser Annahme sind *in vivo* Experimente mit mutierter PP2A C (Deletion

von Leu309), die zeigten, dass diese Mutante nicht in der Lage ist mit rekombinantem B55 α zu interagieren. Unterstützt wird dieses Ergebnis durch die Auswertung von LCMT1-RNAi Versuchen, die eine deutliche Reduktion der zellulären B55 α -Konzentration nach 96 h ergaben (Gotz *et al.* 2000, Longin *et al.* 2007). Die Aktivität und das Expressionsniveau von LCMT1 hängen direkt mit dem Homocystein-Metabolismus zusammen, da Homocysteine Inhibitoren von Methyltransferasen sind (Longin *et al.* 2008). Bei Demenzerkrankungen treten häufig erhöhte Homocystein-Blutwerte auf. Auch die Hyperphosphorylierung von Tau, das ein B55 α abhängiges PP2A Substrat ist, geht mit Neurodegeneration im Hirn von Alzheimer-Patienten einher. Dies korreliert mit einer verminderten Expression von B55 α (Sontag *et al.* 2004). Gegen die Notwendigkeit der Methylierung zur Rekrutierung von B55-Untereinheiten spricht andererseits die *in vitro* Rekonstitution eines rekombinanten PP2A Holoenzym (A α , B55 α , C α), die ohne Anwesenheit von LCMT1 erfolgte (Xu *et al.* 2008).

Eine weitere mögliche Modifikation ist die Phosphorylierung von Tyr307 (pY307), welche zur Inaktivierung von PP2A führt. Es konnten bislang der Insulin- und der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor, sowie die Tyrosin-Kinasen pp60^{v src} und pp56^{lck} als ursächliche Kinase identifiziert werden. Die Phosphorylierung kann durch Inkubation mit dem PP2A-Inhibitor Okadasäure verstärkt werden, was auf die Möglichkeit einer auto-Dephosphorylierung zur schnellen Reaktivierung hindeutet (Chen *et al.* 1992). Dies bedeutet, dass PP2A auch eine Tyrosin-Phosphatase-Aktivität besitzt (Janssens und Goris 2001). Mutationsstudien in HeLa-Zellen führten zu dem Schluss, dass sowohl die Imitation einer Phosphorylierung (Y307D), als auch die phosphorylierungs-insensitive Y370F-Mutante die Bindungskapazität für einige Untereinheiten verlieren (Longin *et al.* 2007). Es zeigte sich auch, dass diese Mutanten nicht an L309 methyliert werden konnten.

Außer an Tyr307 kann PP2A C auch *in vitro* durch eine autophosphorylation-aktivierte Protein-Kinase an einem oder mehreren Threonin-Resten phosphoryliert werden, was ebenfalls zu einer Inaktivierung führt (Damuni *et al.* 1994, Guo *et al.* 1993). Eine putative Phosphorylierungsstelle ist das Thr304, dessen Mutation zu Aspartat zu einem Verlust der Bindungsfähigkeit des *core*-Dimers mit B55-Mitgliedern führt (Longin *et al.* 2007). Ein direkter Beweis der Phosphorylierung steht allerdings noch aus.

Desweiteren wurden zwei PP2A-inhibierende zelluläre Proteine (I_1^{PP2A} / I_2^{PP2A}) identifiziert (Li *et al.* 1995). Sie inhibieren sowohl das PP2A-core-Dimer, PP2A-C, als auch alle PP2A-Holoenzyme durch nicht-kompetitive Hemmung (Chen *et al.* 2008). Im Hirn von Alzheimer-Patienten ist die Expression von I_1^{PP2A} signifikant erhöht, was auch zu einer Hyperphosphorylierung von Tau führt (Tanimukai *et al.* 2005).

1.7 Fragestellung

Der heterotetramere Adaptorprotein-Komplex 2 (AP2), ein Schlüsselproteinkomplex bei der Clathrin-vermittelten Endozytose an der Plasmamembran, kann in zwei Konformationen vorliegen. Es konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von Thr156 in der μ 2 Untereinheit zur Stabilisierung der Membranbindung von AP2 beiträgt. Es wurde gezeigt, dass AAK1 Thr156 phosphorylieren kann und durch *in vitro* Experimenten wurde ein trimeres PP2A Holoenzym als dephosphorylierende Aktivität nachgewiesen. Im ersten Teil dieser Arbeit sollte in Zellen gezeigt werden, dass die μ 2-Dephosphorylierung durch die regulatorische B55 α Untereinheit von PP2A vermittelt wird.

Der zweite Teil befasst sich mit der Rekrutierung und der Regulation von PP2A in bzw. an Clathrin-umhüllten Vesikel (CCVs). Einerseits sollte durch biochemische Methoden eine direkte Bindung und eine zelluläre Ko-Lokalisation von PP2A und AP2 gezeigt werden. Andererseits war es Ziel posttranslationale Modifikationen der PP2A nachzuweisen, welche deren enzymatische Aktivität regulieren können.

Der dritte Teil befasst sich mit der Identifikation von Bindungspartnern von B55 α . Dazu sollte der Rekrutierungsfaktor, der für die Integration von PP2A in CCV verantwortlich ist, gefunden werden. Ein weiteres Ziel war die Ermittlung neuer B55 α abhängiger PP2A Substrate und regulatorischer Proteine.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Autoklav	Varioklav®	H+P Labortechnik
Chemilumineszenz-Detektionssystem	FluorChem™	Alpha Innotech
Chromatographie Systeme	ÄKTAexplorer™	GE Healthcare
DNA-Sequenzierer	373	Applied Biosystems
Drehrad für Reaktionsgefäße	Eigenbau	Werkstatt des Instituts
Eismaschine		Ziegra
Elektroporationsgerät	GenePulser®II	Bio-Rad
Feinwaage	CP225D	Satorius
Flüssigkeitszintillationszähler	LS 6500	Beckman
Gelapparatur für Agarosegele	Eigenbau	Werkstatt des Instituts
Gelapparatur für Polyacrylamid-Gele	Mini-Gele	Bio-Rad
Geldokumentation	2UV Transilluminator	Alpha Innotech
Geltrockner	Model 583	Bio-Rad
Heizblock	Thermostat 5320	Eppendorf
Inkubatoren	Incubator C60	Labotect
	RavenIncubator	LTE Scientific
Kühlschrank	Profi Line	Liebherr
Magnetrührgerät	MR 3001	Heidolph
Mikroliterspritzen		Hamilton
Mikroskope		
Lichtmikroskop	Modell 80i	Nikon
Konfokalmikroskop	SP5	Leica
Multikanal Photometer	Sunrise	Tecan
Neubauer Zählkammer		Brand Gläser, Wertheim
PCR Gerät	Mastercycler	Eppendorf
Phosphoimager	Fujix Bas1000	Fuji
pH-Meter		InoLab
Pipetten	Pipetman	Gilson

Profinia Protein Purification System		Biorad
Reinstwasseranlage	Optilab®	MembraPure
Sicherheits-Werkbank	HeraGuard	Heraeus
Rotoren		
Kühlzentrifuge	JA-10	Beckman
	JA-20	Beckman
	SS-34	Sorvall
Ultrazentrifuge	TI-45	Beckmann
	TLA-55	Beckman
Schüttelinkubator	Innova™4230	NewBrunswickScientific
Schüttelplattform	KS 260 basic	IKA
Spannungsgerät		Bio-Rad
Spektralphotometer	SmartSpec™3000	Bio-Rad
Stickstofftank für Zelllagerung	Locator4Plus	LabTrader™
Thermoschüttler	Thermomixer5436	Eppendorf
Transilluminator	Model TFM-20	UVP
Ultraschallgeräte	Sonifier 450	Branson
	UP200S	Dr.Hielscher GmbH
Vortex	Genie2	Bender&Hobein AG
Waage	BP610	Sartorius
Wasserbad	MP	Julabo
Wipptisch	PlatformRockerStr6	Stuart
Zellaufschlußgerät	Emulsiflex C3	Avestin
Zentrifugen		
Kühlzentrifugen	Biofuge fresco	Heraeus
	Megafuge 1.0 R	Heraeus
	RC5Cplus	Sorvall
Tischzentrifuge	5415D	Eppendorf

Ultrazentrifugen	Optima™L-70K	Beckman
	Optima™TLX	Beckman
2.1.2 Verbrauchsmaterialien		
Alluminiumfolie		Roth
Cellophanfolie		Pütz Folien
Dialyseschläuche (MWCO 8-10 kDa)	Spectra/Por®	Labomatic AG
Einfrierröhrchen	CryoTube™Vials	Nunc
Einmalspritzen	Discardit™ II	Beckton Dickinson
Einwegkanülen	Sterican	Braun
Elektroporationsküvette		Molecular BioProducts
ELISA-Platten, 96 Loch	PS Microplatte	Greiner Bio-one
Gewebekulturschalen	15cm	Nunc
Gewebekulturflaschen	75cm ³	Nunc
	75cm ³	Greiner
Konzentratoren (MWCO 10 kDa)	Amicon® Ultra	Millipore
Küvetten	PS 1,5 ml halbmikro	Plastibrand®
Magnetrührgerät	MR 3001	Heidolph
Nitrozellulose-Membran (0,1 µm Protran)	Schleicher & Schuell	
Objektträger und Deckgläschen		Thermo Scientific
Parafilm®		AmericanNationalCan™
Pasteur-Pipetten		Roth
PCR-Reaktionsgefäße 0,2 ml		Sarstedt
Petrischalen		Sarstedt
Pipettenspitzen 10+1000 µl	Diamond D10+1000	Gilson
Pipettenspitzen 200 µl		Sarstedt
Pipettierhilfen-Filtereinsatz, 0,45 µm		Integra Biosciences
Profinia GST Säulen		Biorad
Reaktionsgefäße 0,5+1,5+2 ml		Sarstedt
Skalpelle, steril		Braun

Sterilfilter:

<i>Bottle-top</i> -Filter, 0,2 µm		Sarstedt
Pufferfilter, 0,2 µm		Millipore
Spritzenaufsatz, 0,2 µm	Minisart®	Sartorius
Sterile Plastikröhrchen 10+50 ml		Sarstedt
UV-Küvetten	trUView™	Bio-Rad
Whatmanpapier GB 003		Schleicher&Schüll
Zellkulturschalen 3+6+10+15 cm		Greiner
Zentrifugengefäße	Polyallomer	Beckman

2.1.3 Chemikalien

Die Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, im Reinheitsgrad *pro analysis* bezogen:

Adenosintriphosphat		Sigma
Agar		Roth
Agarose		Roth
Albumin aus Rinderserum		Roth
Ammoniumperoxodisulfat		Roth
β-Mercaptoethanol		Sigma
Bromphenolblau		Bio-Rad
Butanol		Roth
Calyculin A		Calbiochem
Calciumchlorid		Roth
CHAPS		Roth
Chloroform		Roth
Coomassie Blau R 250		Serva
Dimethylformamid		Roth
Dimethylsulfoxid		Sigma
DTT		Roth
EDTA		Roth
Essigsäure, 37%		Roth

Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	Roth
Ficoll ®400	Amersham
Glycerin	Roth
Glycin	Roth
Hefe-Extrakt	Roth
HEPES	Roth
HPLC-Wasser	J.T.Baker
Imidazol	Roth
IPTG	Roth
Isopropanol	Roth
Kaliumacetat	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth
Kaliumchlorid	Roth
Kaliumhydroxid	Roth
Kupfer-II-sulfat-Pentahydrat	Roth
Lysozym	Merck
Magnesiumchlorid	Roth
Methanol	Roth
MOPS	Roth
Natriumacetat	Roth
Natriumborat	Roth
Natriumbutyrat	Roth
Natriumchlorid	Roth
Natriumdihydrogenphosphat	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Natriumhydrogencarbonat	Roth
Natriumhydroxid	Roth
Natriumsulfat	Roth
Ortho-Phosphorsäure	Roth
Paraformaldehyd	Merck
PMSF	Sigma

Saccharose	Roth
Salzsäure	Roth
Saponin	Roth
Sarkosyl	Sigma
SeaPlaque Agarose, low melting	Biozym
Stickstoff, flüssig	Messer Griesheim
TEMED	Serva
Trichloressigsäure	Roth
Trifluoressigsäure	Fluka
Tris	Roth
Trypsin (sequence grade)	Promega
Tryptan-Blau	Sigma
Trypton	Roth
Tween 20	Sigma

2.2 Molekularbiologische Materialien

2.2.1 Reagenzien und Fertiglösungen

DNA-Größenstandard, 1 Kb / 100 bp DNA Ladder Invitrogen, Fermentas

2.2.2 Antibiotika

Kanamycin	Sigma
Ampicillin	Serva
Gentamycin	PAA

2.2.3 Bakterien

Als Bakterienstämme wurden die *E. coli* Stämme *DH5 α* , *JM-110*, *BL21 (DH3)* und *Arctic Express (DE3)* (Stratagene) kultiviert.

2.2.4 Kits

Proof-Start-DNA Polymerase Kit	Qiagen
QIA-Plasmid MaxiKit	Qiagen
QIA-Plasmid Midi Kit	Qiagen
QIA-Plasmid Mini Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
Quick Change Site Directed Mutagenesis Kit	StrataGen

2.2.5 Enzyme

Für die enzymatischen Reaktionen wurden die vom Hersteller empfohlenen Puffer verwendet.

Tabelle 2-1: Liste der verwendeten Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonuklease	Erkennungssequenz	Herkunft
Apal	GGGCC_C	NEB
BamHI	G_GATCC	Jena Bioscience
EcoRI	G_GATCC	Jena Bioscience
HindIII	A_AGCTT	NEB
NdeI	CA_TATG	NEB
Sall	G_TCGAC	NEB
XhoI	C_TCGAG	NEB

T4-DNA-Ligase NEB

2.2.6 Nukleotide/ Oligonukleotide

dNTPs	Promega
siRNAs	Ambion
Primer	Metabion

Tabelle 2-2: Sequenzierprimer

Name	Zielvektor/	Orientierung	Sequenz (5' -3')
ST1	pGEX	5' der MCS	GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG
ST2	pGEX	3' der MCS	CCGGGAGCTGCATGTGTCTAGAGG
T3-Primer	T3-Promoter		ATTAACCCTCACTAAAGGGA
T7-Primer	T3-Promoter		TAATACGACTCACTATAGGG

Tabelle 2-3: Primer

Primer	Orientierung	Sequenz (5'-3')	Beschreibung
SH612	5'	ACGAATTCTGAGAATCTTTATTTTCAG GCACATCACCATCACCATCACATG	PP2A C mit TEV-Schnittstelle, His-Tag, EcoRI-Restriktionsschnittstelle
SH613	3'	CCGTCGACTTACAGGAAGTAGTCTGG	PP2A C mit Stopp, Sall-Restriktionsschnittstelle

Tabelle 2-4: siRNAs

Name	Protein	Bindungsstelle mRNA	sense Sequenz (5'-3')
PR55a3_3	PP2A B55 α	3'UTR (1824-1842)	GGAGAAAGCUCUGUGGAUUUU
PR55a3_4	PP2A B55 α	3'UTR (1934-1952)	GGACUAGAUUGGACUGUAUUU

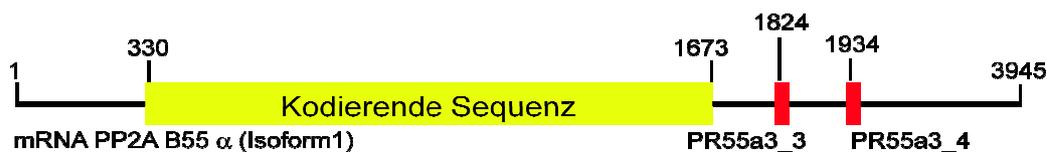


Abbildung 2.1: siRNA-Zielsequenzen in der humanen B55 α mRNA (Isoform1)

2.2.7 Plasmide

Folgende Plasmide wurden für Klonierungen verwendet (die entsprechenden Vektorkarten und Klonierungsstrategien befinden sich im Anhang 7.1):

pET28a	Novagen
pCMV-3Tag-6	Stratagene
pEYFP-C1	Clontech

Folgende cDNA enthaltende Plasmide wurden von anderer Seite freundlicherweise zur Verfügung gestellt:

Tabelle 2-5: Verwendete Fremd-Konstrukte

Name	Vektor	Fusionsprotein	Bezogen von
pcDNA1-PP2A B55 α	pcDNA1	His-humanPP2A B55 α	Caroline Preiss
pGEX-4T-3-PP2A B55 α	pGEX-4T-3	humanPP2A B55 α	Caroline Preiss
pGEX-4T-2-PP2A A α	pGEX-4T-2	GST-humanPP2A A α	Prof. Yingong Shi
pGEX-4T-3-Auxilin2 (547-910)	pGEX-4T3	GST-Auxilin2 (547-910)	Prof. Ernst Ungewickell
pRSET-HSC70	pRSET	His-rindHSC70	Dr. McKay / Ungewickell

2.3 Biochemische Materialien

2.3.1 Chromatographie-Material

2.3.1.1 Anionen-Austauscher

HiTrap Q HP 1 ml (Anionen-Austauscher)

GE Healthcare

2.3.1.2 Profinia Säulen

Bio-Scale Mini-Profinity GST Cartridge 1 ml

Bio-Rad

Bio-Scale Mini-Bio-Gel P6 Desalting Cartridge 5 ml

Bio-Rad

2.3.1.3 Säulenmaterial

Sephacryl S1000 Superfine

Pharmacia

2.3.1.4 Sonstige Chromatographie-Säulen

Superose 6 10/300 GL

GE Healthcare

HiTrap Benzamidine FF (high sub) 1 ml

GE Healthcare

2.3.2 Proteine

Microcystin-LR-Agarose

Millipore

PP2A, Dimer und Trimer

Rind

Calbiochem

Thrombin

Rind

Sigma

Transferrin (Alexa546 konjugiert)

Invitrogen

Protein-A-Agarose fast flow

Sigma

2.3.3 Reagenzien und Fertiglösungen

Acrylamid-Lösung, Rotiphorese®Gel30

Roth

Anti-FLAG-Affinitäts-Matrix

Sigma

3xFLAG Peptid	Sigma
Bradford-Reagenz	Bio-Rad
DC Protein-Assay	Bio-Rad
Chemilumineszenz Reagens (<i>Super Signal®West Dura Reagens</i>)	Pierce
Glutathion Sepharose	GE Healthcare
Ni-NTA-Agarose	Qiagen
Phosphatase Inhibitor Cocktail (I, II, III)	Sigma, Calbiochem
Protease Inhibitor Cocktail (für bakterielle und Säugerzellen)	Sigma
Protein-Größenstandards	
Precision Plus Protein™ Standard	Bio-Rad
Pro Sieve Quad Color Protein Marker, 4,6 – 300 kDa	Lonza

2.3.4 Standard-Puffer

PBS: 140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8,1 mM Na₂HPO₄; 1,5mM KH₂PO₄; pH 7,4

MES-Puffer: 0,1M MES, 1mM EGTA, 0,5 mM MgCl₂; pH 6,5

Puffer A: 50 mM Tris, 100 mM NaCl; pH 8

Puffer B: 10 mM (NH₄)₂ SO₄, 20 mM HEPES, 2 mM Mg(CH₃COO)₂·4H₂O, 25 mM KCl; pH 7.0

2.3.5 Radioaktive Substanzen

[³²P]-γ-ATP

Hartmann Analytik

[³²P]-Orthophosphat

Hartmann Analytik

2.3.6 Antikörper

Tabelle 2-6: Verwendeten Primärantikörper

Name	Antigen	Verdünnung		Immunisierte Spezies	Herkunft
		WB	IF		
à- α -AP	Rekombinantes α_A -Adaptin (AS38-215), Maus	1 :2000	-	Maus Monoklonal	Transduction
AP6 (Hybridoma)	Rekombinante α -Adaptin-„ear“-Domäne	-	1:20	Maus Monoklonal	F. M. Brodsky
à- $\beta_{1/2}$ -AP	Rekombinantes Protein (AS 75-245), human	1 :2000	-	Maus Monoklonal	Transduction
à- γ -AP	Rekombinantes Protein (AS 642-821), Maus	1:1000	-	Maus Monoklonal	Transduction
à-Clathrin schwere Kette	Gereinigtes, rekombinantes Protein (AS4-171)	1 :1000	-	Maus Monoklonal	Transduction
à-FLAG	Flag-Peptid	1 :1000	-	Maus Monoklonal	GenSkript
à-FLAG	Flag-Peptid	1:1000	-	Kaninchen Polyklonal	Delta Biolabs
à-GAPDH	Gereinigtes Protein, Kaninchen	1 :25000	-	Maus Monoklonal	Chemicon
à-GFP	Gereinigtes, rekombinantes GFP	1 :5	-	Maus Monoklonal	AG Noegel
à-HSC70 (3C5)	Gereinigtes HSC70, Schwein	1 :10	-	Maus Monoklonal	AG Höning
à- μ_2 -AP	Peptid	1 :500	-	Kaninchen Polyklonal	AG Höning
à-PP2A A α / β	Rekombinantes Protein (AS290-589)	1 :500	-	Kaninchen Polyklonal	St. Cruz
à-PP2A B55 α	Peptid (AS 398-411)	1 :2000	-	Maus Monoklonal	Upstate
à-PP2A B55 α	Peptid	1:1000	-	Kaninchen Polyklonal	Calbiochem
à-PP2A C α / β	Rekombinantes Protein	1:1000	-	Kaninchen Polyklonal	St. Cruz
à-PP2AC phosphoY307	Peptid	1:5000	-	Kaninchen Monoklonal	Abcam
X22 (Hybridoma)	Clathrin, schwere Kette	-	1:20	Maus Monoklonal	AG Höning

Tabelle 2-7: Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenz

Name	Verdünnung	Herkunft
Ziege- à –Maus-Alexa546	1:400	Invitrogen
Ziege- à –Maus-Alexa594	1:400	Invitrogen

Tabelle 2-8: Sekundärantikörper für Westernblots

Name	Verdünnung	Herkunft
Ziege- à –Maus- HRP	1:2.000	Dianova
Ziege- à –Kaninchen- HRP	1:2.000	Dianova

2.4 Zellbiologische Materialien

2.4.1 Reagenzien und Fertiglösungen

Effectene Transfektions Kit	Qiagen
Lipofectamine 2000	Invitrogen
Fluoreszenz Mounting Medium, Prolong Gold	Invitrogen

2.4.2 Medien und Zusätze

DMEM (Dulbecco modified eagle medium, high Glucose)	Gibco
DMEM ohne Phosphat, ohne Pyruvat	Gibco
DMEM ohne Phosphat, ohne Glucose	Gibco
Express Five SFM	Invitrogen
Hygromycin	Calbiochem
PBS	Gibco
Optimem	PAA
FCS	PAA
Sf-900 II SFM	Invitrogen
Trypsin/EDTA 1x	Gibco
Penicillin/Streptomycin (100x = 10.000U/ml)	Gibco
G418 (Geneticindisulfat)	PAA

Standardmedium für die Kultivierung humaner Zellen

DMEM + 10% FCS + Pen (100U/ml)/Strep (100U/ml)

2.4.3 Zelllinien

HeLa-Zellen sind menschliche epithelartige Zellen. Sie wurden aus einem Zervix-Karzinom, später als Adenokarzinom diagnostiziert, isoliert. Die Bezeichnung der Zellen geht auf den Namen der Patientin, **Henrietta Lacks**, zurück.

HEK 293-TN-Zellen exprimieren konstitutiv das große T-Antigen und ein Neomycin-Resistenz-Gen. Sie sind ein leicht transfizierbares Derivat der HEK 293 Zelllinie (ATCC: CRL-1573), ein Transformationsprodukt menschlicher Nierenzellen mit Teilen des menschlichen Adenovirus 5. Durch die Transformation besitzen die Zellen eine G418 (Geneticin/ Neomycin)-Resistenz. Der Name steht für „**H**uman **E**mbyronic **K**idney“. Die Epithelzellen wachsen adhärent. Bezogen wurden die Zellen von der AG Clemen, die sie bei Biocat erworben haben.

Sf9-Zellen entstammen einer immortalisierten Insekten-Zelllinie (Sf21) aus Ovar Zellen von *Spodoptera frugiperda*. Anders als *E. coli* und Hefen ähneln sie in der Vielfalt posttranslationaler Modifikationen den Wirbeltieren, was unter Umständen wichtig für die korrekte Proteinexpression und Faltung sein kann. Bezogen wurden die Zellen aus der AG Clemen und Mörsdorf.

Hi5-Zellen sind klonal isolierte Zellen, die aus einer *Trichoplusia ni* Zelllinie gewonnen wurden. Sie werden gewöhnlich zur Expression von rekombinanten Proteinen durch das Bakulovirus-Expression-Vektor-System verwendet. Die Kultivierung erfolgte in Express-Five SFM. Bezogen wurde die Zelllinie von der AG Clemen, die sie bei Invitrogen erwarben.

2.4.4 Bakuloviren

Die verwendeten Bakuloviren zur Expression von den PP2A B α und C α Untereinheiten wurden uns freundlicherweise von Professor Yingong Shi, Princetown (USA), überlassen (Xu, 2008).

2.4.5 EDV

Adobe Photoshop CS3	Adobe Systems Inc.
Adobe Reader 7.0	Adobe Systems Inc.
AIDA Image Analyzer	Raytest
ÄKTA-Unicorn	GE Healthcare
AlphaEase FC/FluorChem	Alpha Innotech
Endnote	Thomson
LAS AF Lite	Leica
Magellan2	Tecan
Vector NTI	Invitrogen
Office 2003 / 2007	Microsoft
Windows XP	Microsoft

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 Kultivierung von E. coli

Kanamycin (Kan)-Lösung:	25 mg/ml Kanamycin in A. bidest steril filtrieren, bei -20°C lagern
Ampicillin (Amp)-Lösung:	25 mg/ml Ampicillin in A. bidest steril filtrieren, bei -20°C lagern
Luria Bertani Bakterien-Medium: (LB Medium)	5 g NaCl 2,5 g Hefe-Extrakt 5 g Trypton add 500 ml A. bidest autoklavieren und abkühlen lassen

LB-Agarplatten:	2,5 g NaCl
	2,5 g Hefe-Extrakt
	5 g Trypton
	7,5 g Agar
	add 500 ml A. bidest
	direkt in eine 500 ml-Flasche einwiegen
	autoklavieren und abkühlen lassen

Bakterien wurden in einem geeigneten Volumen an Flüssigmedium (LB-Medium) auf dem Schüttler bei 220rpm oder auf Festmedium (LB-Agarplatten) bei 37°C über Nacht kultiviert. Die Selektionierung transformierter Bakterien erfolgte in Gegenwart der Antibiotika Ampicillin (100µg/ml) oder Kanamycin (30µg/ml).

2.5.2 Herstellung kompetenter Zellen

Bakterien werden in den Zustand der Kompetenz versetzt, um doppelsträngige Plasmid-DNA mittels Transformation aufnehmen zu können.

2.5.2.1 Herstellung elektrokompetenter *E. coli* Zellen

Zur Herstellung elektrokompetenter *E. coli* Zellen wurden 10ml LB-Medium mit *E. coli* Zellen des Stammes *BL21 DH3* aus einer Glycerinkultur angeimpft. Diese Startkultur wurde über Nacht bei 37°C inkubiert, anschließend in 1l LB-Medium überführt und bei 37°C bis zu einer OD_{600nm} von 0,3-0,35 weiter kultiviert. Danach wurden die Zellen für 15-30 min auf Eis abgekühlt und anschließend durch dreimal pelletieren und resuspendieren gewaschen und ankonzentriert. Das Sedimentieren erfolgte jeweils durch Zentrifugation der Suspension für 15 min bei 4°C mit 4.400g. Resuspendiert wurde jeweils einmal mit 1l kaltem, sterilen A. bidest; 0,5l kaltem, sterilen A. bidest; 20ml kaltem, sterilen 10%igen Glycerin und mit 2ml kaltem, sterilen 10%igen Glycerin.

Die elektrokompetenten Zellen wurden in 40µl Aliquots in sterile Eppendorf-Gefäße pipettiert und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

2.5.2.2 Herstellung chemokompetenter *E. coli* Zellen (CaCl₂-Methode)

Puffer I:	100 mM RbCl
	50 mM KCl
	30 mM KAc
	15 % (v/v) Glycerin
	pH 5,8 mit Essigsäure einstellen
Puffer II:	10 mM MOPS; pH 7
	10 mM RbCl
	75 mM CaCl ₂
	15 % (v/v) Glycerin

Die Lösungen wurden bei -20°C gelagert und vor Gebrauch sterilfiltriert.

Zur Herstellung chemokompetenter *E. coli* Zellen wurden 6ml LB-Medium mit *E. coli* Zellen des Stammes *DH5α* oder *Arctic Express* aus einer Glycerinkultur angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. 2ml dieser Startkultur wurden in 100ml LB-Medium überführt und bei 37°C bis zu einer OD_{600nm} von 0,5 kultiviert. Anschließend erfolgte die Abkühlung der Kultur unter Schwenken für 10min auf Eis und die Sedimentation der Bakterien für 5min bei 1.000xg und 4°C. Das Sediment wurde in 2ml Puffer aufgenommen, kurz gevortext und 90min bei 4°C inkubiert. Dann erfolgte erneut eine Sedimentierung der Bakterien für 5min bei 1.000xg und 4°C. Das Bakterienpellet wurde in 2ml Puffer II aufgenommen. Die chemokompetenten Zellen wurden in 100µl Aliquots in sterile Eppendorf-Gefäße pipettiert und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

2.5.3 Transformation von *E. coli* mit Plasmid DNA

SOC-Medium:	2 g Trypton
	0,5 g Hefe Extrakt
	60 µg NaCl
	19 mg KCl
	0,2 g MgCl ₂ x 6 H ₂ O
	add 100 ml A. bidest
	autoklavieren

Zur Amplifizierung von Plasmid-DNA wurde diese durch Elektroporation oder mittels Hitze-Puls in kompetente Bakterienzellen transformiert.

2.5.3.1 Transformation in elektrokompetente *E. coli* Zellen: Elektroporation

40µl elektrokompetente *E. coli* Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 1-10ng der zu transformierenden Plasmid-DNA wurde die Suspension in eine kalte, sterile Elektroporationsküvette pipettiert. Die Elektroporation erfolgte mit dem GenePulser®II (Bio-Rad) bei 5µFd; 200Ω und 2,5kV. Anschließend wurde die Bakteriensuspension sofort mit 500µl SOC-Medium versetzt und 40min bei 37°C im Schüttler inkubiert. Die Selektion der transformierten Bakterien erfolgte mit Hilfe von Kanamycin bzw. Ampicillin. Dazu wurden 100µl der Bakteriensuspension auf einer LB-Amp- bzw. LB-Kan-Agarplatte ausplattiert, die restlichen 400µl auf einer weiteren Selektionsplatte. Die Platten wurden zur Koloniebildung über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.5.3.2 Transformation in chemokompetente *E. coli* Zellen

100µl chemokompetente *E. coli* Zellen wurden auf Eis aufgetaut und 5µl des Ligationsansatzes oder 1-10ng der zu transformierenden Plasmid-DNA wurden dazugegeben. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Suspension für 15min auf Eis, dann für 1,5min bei 42°C im Wasserbad (Hitzepuls) und weitere 2min auf Eis. Die Bakterien wurden mit 1ml LB-Medium versetzt und für 40min bei 37°C im Schüttler inkubiert. Die Selektion der transformierten Bakterien erfolgte wie bei der Transformation durch Elektroporation beschrieben.

2.5.4 Isolierung von Plasmid DNA aus *E. coli*

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien erfolgte mit Hilfe des QIA-Plasmid Mini Kits sowie des QIA-Plasmid Midi Kits von Qiagen nach Angaben des Herstellers.

2.5.5 Anlegen einer Glycerinkultur

Zur langfristigen Lagerung von Bakterienkulturen wurden 750µl der Bakteriensuspension mit 250µl sterilem, 80 %-igem Glycerin versetzt und in Einfrierröhrchen pipettiert. Die Glycerinkultur wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.5.6 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von DNA wurde photometrisch bestimmt. Dazu wurde die DNA-Lösung 1:100 mit A. bidest verdünnt und die Extinktion bei 260nm gegen den Leerwert (A. bidest) gemessen. Für die Messung wurde eine Quarzküvette verwendet. Eine Absorptionsänderung von eins bei λ 260nm entspricht einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml.

Der Quotient $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ ist ein Maß für die Reinheit der DNA. DNA ohne Proteinverunreinigung hat einen Quotienten zwischen 1,8 und 2,0 (Hannon 2002, Sambrook 1989).

2.5.7 Agarosegelelektrophorese

TAE-Puffer:	40 mM Tris
	2 mM EDTA
	pH 8,0 mit Eisessig einstellen
DNA-Probenpuffer 5x:	0,25 % (w/v) Bromphenolblau
	40 % (w/v) Saccharose
	in 1x TAE
Agarose-Gel	0,8-1,5% (w/v) Agarose
	in 1x TAE aufkochen und abkühlen lassen
	0,1µg/ml Ethidiumbromid

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA in einem Agarosegel kann präparativ oder analytisch erfolgen. Die analytische Auftrennung dient zur Größen- und Mengenabschätzung der aufgetrennten DNA-Fragmente anhand eines ebenfalls im Gel aufgetrennten DNA-Größenstandards. Durch die präparative Auftrennung kann man DNA-Fragmente reinigen. Dazu erfolgt nach der elektrophoretischen Auftrennung die Extraktion der entsprechenden DNA-Bande aus dem Agarosegel. Die DNA wurde mit 5xDNA-Probenpuffer versetzt und je nach zu erwartender Größe auf ein 0,8-1,5%iges Agarosegel aufgetragen. Die Auftrennung lief bei 4V/cm in TAE-Puffer. Der im Gel enthaltene, fluoreszierende Farbstoff Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und markiert dadurch die DNA-Banden im Gel. Diese wurden auf einem UV-Transilluminator, durch die Fluoreszenzanregung von Ethidiumbromid mit UV-Licht ($\lambda=366$ nm), sichtbar gemacht und photographisch dokumentiert.

2.5.8 DNA Extraktion aus Agarosegelen

Die Extraktion von DNA aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit von Qiagen nach den Angaben des Herstellers.

2.5.9 Hydrolyse von DNA mit Restriktionsenzymen

Die endonukleolytische Spaltung von Nukleinsäuren kann einerseits präparativ zur Isolierung von DNA-Fragmenten und andererseits analytisch genutzt werden. Dazu verwendet man Restriktionsendonukleasen vom Typ II, die spezifisch, meist 4-8 Nukleotid lange, oft palindromische DNA-Sequenzen erkennen und innerhalb dieser Restriktionsschnittstellen die Hydrolyse der Esterbindung zwischen Ribose und Phosphatgruppe katalysieren. Dieser Schritt erfolgt an beiden Einzelsträngen, oft um wenige Basenpaare versetzt, so dass überhängende Enden (*sticky ends*) entstehen. Andere Enzyme erzeugen glatte Enden (*blunt ends*).

Eine geeignete DNA Menge (ca. 200-500ng für die analytische und bis zu 5µg für die präparative Spaltung) wurde mit dem Restriktionsenzym (1-10 Units/µg DNA) in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer 1 Stunde oder ü.N. bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Spaltung durch elektrophoretische Auftrennung der DNA in einem Agarosegel überprüft.

2.5.10 Hybridisierung von Oligonukleotiden

Die Hybridisierung von Oligonucleotiden ermöglicht die Generierung kurzer doppelsträngiger DNA-Fragmente aus einsträngigen Oligonukleotiden. Diese können anschließend mit einem geschnittenen Vektor ligiert werden. Durch das Auslassen des PCR-Schrittes wird die Wahrscheinlichkeit von Mutationen erheblich minimiert. Zur Hybridisierung wurden beide Oligonukleotide in gleicher Molarität in Oligonukleotid-Hybridisierungspuffer (50 mM Hepes, 100 mM NaCl pH 7,2) eingesetzt. Der Ansatz wurde für 3 Minuten im Heizblock auf 95°C erhitzt. Im Anschluss wurde der Heizblock abgeschaltet und der Ansatz langsam auf <30°C abgekühlt. Die Hybridisierung der Oligonukleotide konnte im Anschluss mittels eines 12%igen Acrylamidgels kontrolliert werden. Hierfür wurde ein Aliquot des Ansatzes in DNA-Probenpuffer (2.2.7.) aufgenommen, auf das Acrylamidgel aufgetragen und dieses in einer SDS-Gelkammer in 0,5xTBE-Puffer bei einer Spannung von 180V laufen gelassen. Nach Beendigung der Auftrennung wurde das Gel in eine wässrige Lösung von Ethidiumbromid (Endkonzentration von 0,5 µg/µl) gegeben. Die Entfernung von überschüssigem Ethidiumbromid erfolgte im Wasserbad. Durch die Einlagerung des Ethidiumbromids in die große Furche der Doppelhelix konnte die

DNA auf einem UV-Transilluminator, durch die Fluoreszenzanregung von Ethidiumbromid mit UV-Licht ($\lambda=366$ nm), sichtbar gemacht werden.

12%iges Acrylamid-Gel	1,5 ml Acrylamid-Lösung, Rotiphorese®Gel30
	2,75 ml H ₂ O
	500 μ l 5xTBE-Puffer
	50 μ l APS
	5 μ l TEMED
5xTBE-Puffer:	445 mM Tris Base pH 8
	445 mM Borsäure
	10 mM EDTA-Na ₂

2.5.11 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation ermöglicht die Verknüpfung ursprünglich getrennter, linearer DNA-Fragmente durch das Enzym DNA-Ligase. DNA-Ligasen wie die T₄-DNA-Ligase des Bakteriophagen T₄ von *E. coli* katalysieren die Veresterung von 5'-Phosphat-Enden und 3'-Hydroxyl-Enden der DNA in Anwesenheit von ATP als Kofaktor. Dabei benötigt die Ligation von glatten DNA-Enden eine höhere Enzymkonzentration als die Ligation überhängender DNA-Enden. Zur Herstellung der Expressionsvektoren enthielt der Reaktionsansatz geschnittenen Vektor und Insert im molaren Verhältnis von 1:5 und T₄-DNA-Ligase nach Angaben des Herstellers mit dem entsprechenden Puffer. Ligierte wurde der Ansatz für mindestens eine Stunde bei RT.

2.5.12 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mittels PCR kann man spezifische DNA-Fragmente *in vitro* amplifizieren. Die Methode basiert auf der enzymatischen Vermehrung eines DNA-Abschnittes zwischen zwei Oligonukleotid-Primern, die gegenläufig an komplementäre DNA-Stränge gebunden sind. Die Amplifikation erfolgte mit Hilfe von thermostabilen DNA-

Polymerasen z.B. der *Taq*-Polymerase des thermophilen Bakteriums *Thermophilus aquaticus*. Für eine exponentielle Vermehrung der DNA-Matrize müssen folgende Schritte wiederholt durchgeführt werden:

1. Denaturierung: Trennung der Ausgangs-DNA in die zwei Einzelstränge durch Erhitzen
2. *Annealing*: Anlagerung der spezifischen Oligonukleotid-Primer bei einer für die Primer spezifischen *Annealing*-Temperatur
3. Elongation: Synthese komplementärer DNA-Sequenzen ausgehend von den 3'OH-Enden der Primer durch eine thermostabile DNA-Polymerase

Die optimale *Annealing*-Temperatur ist abhängig von Länge, potentiellen Sekundärstrukturen und Cystein- und Guanin-Gehalt der Primer. Sie liegt theoretisch 2°C unter der Schmelztemperatur der Primer, die nach folgender Formel berechnet wird: Schmelztemperatur = 4 x (Anzahl G+C) + 2 x (Anzahl A+T).

Die PCR Reaktion erfolgte mit Hilfe des ProofStart™DNA Polymerase Kits von Qiagen.

Ein PCR-Ansatz enthielt:	5 µl 10x PCR-Puffer
	1 µl PCR-dNTP-Mix (je 200 µM)
	10 pmol Primer 1
	10 pmol Primer 2
	1-10 ng Ausgangs-DNA
	1 µl ProofStart™DNA Polymerase
	ad 50 µl A. bidest

Bsp. eines PCR-Programms:

95°C 5min Aktivierung der Polymerase

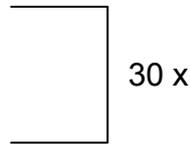
95°C 30 sek (Denaturierung)

58°C 30 sek (Annealing)

72°C 1min (Elongation)

72°C 10 min (Termination)

4°C Pause



Die PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese (2.2.7) analysiert. Die Reinigung der relevanten Fragmente erfolgte durch Extraktion aus dem Agarose-Gel mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kits von Qiagen (2.2.8).

2.5.13 Reinigung von DNA-Fragmenten

Die Reinigung von DNA nach PCR (2.2.12) bzw. Ligation (2.2.11) erfolgte mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kits (Qiagen) nach Angaben des Herstellers.

2.5.14 DNA Sequenzierung

Alle Sequenzierungen wurden vom zentralen Bioanalytik-Labor des ZMMK durchgeführt. Dazu wurden 500 ng DNA mit 1µl Sequenzierprimer (10pmol) versetzt und das Gesamtvolumen auf 6 µl aufgefüllt.

2.6 Biochemische Methoden

2.6.1 Ernte von Zellen

Bei der Ernte von HeLa Zellen wurden diese zuerst 2x mit PBS gewaschen und anschließend für 3-5 min mit Trypsin inkubiert, oder mit einem Zellschaber in PBS abgeschabt. Die Trypsin-Reaktion wurde mit serumhaltigen Medium abgestoppt und die Zellen für 5min bei 500xg und einer Temperatur von 4°C sedimentiert.

HEK293TN Zellen wurden ohne Waschen in Medium abgeschabt, anschließend für 5 min bei 500xg pelletiert und daraufhin in dem für den folgenden Versuch verwendeten, eiskalten Puffer 2x gewaschen.

2.6.1.1 Herstellung eines Zellhomogenats

Das Sediment der Zellernte wurde noch 2x mit PBS gewaschen, sedimentiert und anschließend in einer der gewünschten Proteinkonzentration entsprechenden Menge A. bidest + Proteaseinhibitor (1:500) aufgenommen. Nach 5-minütiger Inkubation wurde durch 3x 10sec Ultraschall eine Zellsuspension gewonnen.

2.6.1.2 Herstellung eines post-nuclear supernatant (PNS)

Hierfür wurden die Zellen gewaschen, sedimentiert und in einem dem Versuch entsprechenden Puffer resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen, durch 10 Passagen einer 27G-Kanüle, aufgeschlossen und danach 5 min bei 700xg zentrifugiert, um nicht aufgeschlossene Zellen und die Kernfraktion zu sedimentieren. Der Überstand wurde abgenommen und als PNS weiterverwendet. Der Zellaufschluss wurde mikroskopisch mit Hilfe von Trypan-Blau analysiert.

2.6.1.3 Fraktionierung in Zytosolischen- und Membrananteil

Die geernteten und gewaschenen Zellen wurden in Puffer + Proteaseinhibitoren (1:100) aufgenommen und mit einer Kanüle (27G) homogenisiert. Zur Generierung eines PNS wurde das Homogenat ebenfalls bei 700xg 5min zentrifugiert. Die Trennung der zytosolischen Zellanteile von den Membranen erfolgte anschließend durch eine Zentrifugation bei 100.000xg für 30min. Das Zytosol befindet sich danach im Überstand, während das Sediment die zellulären Membranen enthält. Um eine quantitative Aussage über den Proteingehalt der Zytosol- und Membranfraktionen zu erhalten wurde das Sediment in einer der zytosolischen Fraktion entsprechenden Menge Puffer resuspendiert.

2.6.1.4 Zell-Lyse durch Detergenzien

Bei der Lyse mit Detergenzien kam Triton X-100 (0,1-1%) und Sarkosyl (0,7%) zum Einsatz. Es wurde dem Lysispuffer nach dem Aufschluss durch eine Kanüle zugegeben, um Membranproteine zu extrahieren. Es folgte eine Inkubation für 15 min bei 4°C unter Rotation. Dies diente der Extraktion der zellulären Membranproteine und an die Membran gebundene Proteine um diese zu solubilisieren. Dabei

übernehmen Detergenzien einerseits mit ihrem unpolaren lipophilen Molekülanteil die Aufgabe der Lipide, indem sie mit dem hydrophoben Bereich der Membranproteine assoziieren, andererseits aber mit ihrem hydrophilen Anteil für die gute Löslichkeit sorgen. Ausschlaggebend sind bei dieser Solubilisierung die vom Detergenz gebildeten Micellen, Aggregate aus einzelnen Molekülen, in denen die hydrophilen Molekülanteile insgesamt nach außen, die hydrophoben hingegen nach innen orientiert sind. Die Micellen umschließen Membranproteine und bringen sie so als Detergenz-Protein-Komplex in Lösung.

2.6.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Methode

Die Bestimmung der Proteinkonzentration von Zelllysaten ohne Detergenzien wurde mit dem RotiQuant®-Bradford Reagenz durchgeführt. Mit diesem Kit können Konzentrationen zwischen 1 µg und 16 µg Protein pro ml Lösung quantifiziert werden. Für jede Bestimmung wurde eine Eichgerade mit BSA (0, 2, 4, 8, 12, 16 µg/ml) erstellt. Für die Probenvorbereitung wurde 800 µl H₂O mit der Probe oder dem Standard (BSA) sowie 200 µl des Bradford-Reagenz vermischt und für 10min bei RT inkubiert. Je nach Konzentration der Proben wurden 1–10 µl für die Bestimmung eingesetzt. Um eine exakte Quantifizierung vorzunehmen wurde die Probe mehrfach in unterschiedlichen Mengen eingesetzt und anschließend rechnerisch der Mittelwert der Proteinkonzentration gebildet. Der Farbstoff Coomassie-Brilliantblau G250 bindet an kationische und hydrophobe Seitenketten von Proteinen und durch diese Komplexbildung wird eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von λ 465nm zu λ 595 nm bewirkt. Zusammen mit einem Leerwert (H₂O und Bradford-Reagenz) wurden 200 µl aller Standards und Proteinproben in eine Mikrotiterplatte pipettiert und diese in einem ELISA-Reader bei λ = 595 nm gemessen. Die Bestimmung der Konzentration erfolgte durch lineare Regression.

2.6.3 Proteinbestimmung mittels DC-Methode bei Einsatz von Detergenzien

Der Bio-Rad DC Protein Assay ermöglicht die Proteinbestimmung in Detergenzhaltigen Lösungen. 1ml Reagenz A und 20 µl Reagenz S wurden gemischt um Reagenz A' zu erhalten. In einer Mikrotiterplatte wurde anschließend zur Erstellung

einer Eichgerade BSA (2, 4, 8, 12, 16 µg) vorgelegt. Außerdem wurden 1 – 8 µl der zu bestimmenden Proben auf die Platte gegeben. Nun folgte die Zugabe von 25 µl Reagenz A' und 200 µl Reagenz B zu allen Proben. Außerdem wurde ein Leerwert für die Standardreihe benötigt, der nur aus der Mischung der Reagenzien A' und B bestand. Die Ermittlung der Proteinkonzentration erfolgte im ELISA-Reader bei $\lambda = 750\text{nm}$. Dem gemessenen Farbumschlag liegt eine Kupfer-Protein-Reaktion in basischem Medium und einer Reaktion des Kupfer-vorbehandelten Proteins mit Folin-Reagenz zugrunde. Die Farbentwicklung entsteht durch die Reduktion von Aminosäuren durch das Folin-Reagenz, hauptsächlich von Tryptophan und Tyrosin.

2.6.4 Proteinfällung von stark verdünnten Lösungen

Um Proteine, die in einem großen Volumen vorliegen, in ein geringes Volumen zu überführen, bedient man sich der Fällung. Dabei werden die Proteine denaturiert.

2.6.4.1 TCA-Fällung

Bei der TCA-Fällung wurde die zu fällende Lösung auf 10% (v/v) TCA eingestellt, diese Mischung dann für 30 min oder ü.N. auf Eis inkubiert und anschließend 10 min bei 16.000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen, das Sediment mit Natriumacetat (2% NaAc in EtOH) versetzt, welches sofort wieder abgesaugt wurde. Dadurch wurde das TCA vollständig entfernt. Nach dem Trocknen des Sediments an der Luft wurden die Proteine in entsprechender Menge 2x Proteinprobenpuffer aufgenommen.

2.6.4.2 Wessel-Flügge-Fällung

Die auch als Methanol-Chloroform-Fällung bekannte Methode dient ebenfalls der Fällung von Proteinen in wässrigen Lösungen. In einem 2 ml Röhrchen wurden zu 4 Probenvolumen Methanol und einem Volumen Chloroform die zu fällende Probe gegeben und gevortext bis nur noch eine Phase erkennbar war. Nach der Zugabe von drei Probenvolumen H₂O bildeten sich 2 Phasen, die durch erneutes vortexen vermischt wurden. Anschließend wurde für 1 min bei 16.000xg zentrifugiert, die obere Phase vorsichtig abgenommen und verworfen. Die Proteine befanden sich in der Interphase. Durch die Zugabe von mind. 3 Volumen Methanol, gefolgt von Vortexen und einer 2-minütigen Zentrifugation bei 16.000xg konnten die Proteine

pelletiert werden. Nachdem der Überstand abgenommen worden war, wurde das Pellet luftgetrocknet und anschließend in Probenpuffer aufgenommen. (Wessel und Flugge 1984)

2.6.5 SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die diskontinuierliche, denaturierende SDS-PAGE nach Laemmli dient der Auftrennung von Proteinengemischen nach ihrem Molekulargewicht (Laemmli 1970). SDS (Sodiumdodecylsulfat) ist ein anionisches denaturierendes Detergenz, das an hydrophobe Bereiche der Proteinmoleküle bindet (alle 2-3 Aminosäuren) und den Proteinen so eine negative Ladung proportional zum Molekulargewicht verleiht, die auch die Eigenladung des Proteins überlagert. Die meisten Proteine binden etwa 1,4g SDS pro Gramm Protein. Auf der Oberfläche der gebildeten SDS-Protein-Komplexe findet man die negativ geladenen Sulfatgruppen des SDS. Dadurch werden alle Proteine über ein konstantes Ladung/Masse-Verhältnis vergleichbar. Im elektrischen Feld kommt es zur Auftrennung des Proteingemisches. Dabei trennt die poröse Polyacrylamidmatrix die SDS-Protein-Komplexe nach ihrem Stokes-Radius und damit nach ihrer molekularen Masse auf. Durch Zugabe von β -Mercaptoethanol werden zusätzlich eventuell vorhandene Disulfidbrücken reduziert. Es wurde ein diskontinuierliches System verwendet, in dem Proben zuerst in ein Sammelgel einlaufen und dann in einem Trenngel aufgetrennt werden. Je nach Größe des nachzuweisenden Proteins wurden Trenngele mit verschiedenen Acrylamidkonzentrationen verwendet. So wurden 12,5%-ige Trenngele für Proteine mit einer molekularen Masse zwischen 20 und 60kDa, 10%-ige Trenngele für Proteine mit einer molekularen Masse zwischen 30 und 120kDa und für Proteine mit einer molekularen Masse über 100kDa wurden 7,5%-ige Trenngele verwendet.

Trenngelpuffer:	1,5 M Tris pH 8,8 0,4 % (w/v) SDS in A. bidest
Sammelgelpuffer:	0,5 M Tris pH 6,8 0,4 % (w/v) SDS in A. bidest
APS:	10 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat in A. Bidest
Acrylamid:	Rotiphorese®Gel30
10x SDS-Lauf-Puffer:	1 % SDS 250 mM Tris/HCl pH 8,6 190 mM Glycin in A. bidest
Protein-Probenpuffer (6x):	24 ml 2 M Tris/HCl, pH 6,8 12 g SDS 45 ml 100 % Glycerin 60 mg Bromphenolblau 12 ml β -Mercaptoethanol 88ml A. bidest

Coomassie-Entfärbelösung:	50 % (v/v) Methanol
	10 % (v/v) Essigsäure
	40 % (v/v) A. bidest

2.6.7 Westernblot und Immundetektion

Nach einer SDS-PAGE werden die im Gel enthaltenen Proteine durch Transfer auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen, um anschließend mit Antikörpern einzelne Proteine nachzuweisen. Die Membran bindet die Proteine durch hydrophobe Wechselwirkungen. Die Proteinbindungsstellen der negativ geladenen Nitrozellulosemembran werden aktiviert, indem dem Transferpuffer 10% Ethanol zugesetzt wird. Die Membran besitzt eine hohe Proteinbindekapazität und eignet sich für Proteinfärbung und Immunfärbung (Rehm und Letzel). Der Proteintransfer erfolgte für 1h bei einer Stromspannung von 100V in Transferpuffer (25mM Tris, 20mM Glycin, 10% EtOH, 0,01% SDS). Danach wurde der Erfolg des Transfers durch Färben der Membran mit Ponceaurot überprüft (2.6.8.). Es folgte eine Inkubation ü.N. bei 4°C in Blockierungslösung (5% Milchpulver in PBS + 0,02% Tween), um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Die Membran wurde am Folgetag 3x mit PBS + 0,02% Tween gewaschen und dann 1h bei RT mit dem primären Antikörper in PBS + 0,02% Tween inkubiert. Falls mehrere Proteine mit unterschiedlichen Molekulargewichten detektiert werden sollten, wurde die Membran in Stücke geteilt, und diese mit entsprechenden Antikörpern inkubiert. Die Verdünnungen der einzelnen Antikörper sind unter 2.3.5 aufgelistet. Durch 3x 5min Waschen mit PBS + 0,02% Tween wurden nicht-gebundene Antikörper entfernt. Die Detektion des gebundenen primären Antikörpers auf der Membran erfolgte mit einem in PBS + 0,02% Tween 1:2000 verdünnten HRP-konjugiertem Spezies-spezifischen sekundären Antikörper, der für 1h bei RT inkubiert wurde. Ungebundener Zweitantikörper wurde durch 3x Waschen mit PBS entfernt. Mit einem Chemilumineszenz-Reagenz wurde der Zweitantikörper sichtbar gemacht und die Membran mit dem FluorChem™SP CCD-Kamerasystem von Alpha Innotech entwickelt.

2.6.8 Ponceaufärbung von Proteinen

Die Ponceaufärbung dient der reversiblen Detektion von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen, sofern die Proteinmenge >50ng/Bande beträgt. Sie dient auch der Kontrolle einer gleichmäßigen Übertragung der Proteine. Die Membran wurde für 1-2min in Ponceaurot (2% in 3%-iger Trichloressigsäure) inkubiert, die überschüssige Farbe dann mit A. bidest abgewaschen. Proteine werden in rotsichtbar.

2.6.9 Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation ist ein Standardverfahren zur Isolierung von Proteinen aus Zellextrakten. Alle Versuchsschritte fanden ausschließlich mit gekühlten Puffern bei 4°C oder auf Eis statt. Das vorbereitete Zellysate oder eine Zytosolfraktion wurde mit 4-5 µg den Zielprotein(en) spezifischen Antikörper(n) versetzt. In den meisten Fällen wurde Immunglobulin aus Maus oder Kaninchen als Negativkontrolle verwendet. Nach 2 h unter Rotation wurde Protein-A-Agarose zugegeben und die Inkubation für 2 h fortgesetzt um die Antikörper zu binden.

Für die Präzipitation von AP2 kam ein Hybridomüberstand zum Einsatz (AP6), der vor der Inkubation mit dem Zellmaterial über Nacht mit Protein-A-Agarose inkubiert wurde um den α -Adaptin Antikörper an die Matrix zu binden. Nach dreimaligem Waschen der Agarose wurde diese mit dem Zellmaterial für 4 h unter Rotation inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit konnte die Agarose mit dem Immunpräzipitat durch Zentrifugation bei 1000xg für 5 min pelletiert werden. Ein Aliquot des Überstands wurde abgenommen, um im Western Blot die Quantität der Präzipitation zu überprüfen, der Rest verworfen, das Sediment 2- bis 5-mal mit Puffer gewaschen um mögliche Verunreinigungen zu entfernen. Zuletzt wurde die Matrix durch Zugabe von Probenpuffer und folgendem Aufkochen bei 95°C eluiert.

2.6.9.1 FLAG-Immunpräzipitation im großen Maßstab

Bei den anti-FLAG-Immunpräzipitationen, die der Identifikation von Bindungspartnern diente, kam eine anti-FLAG Matrix zum Einsatz. Dabei ist der FLAG-Antikörper kovalent an eine Matrix gebunden. Da das eingesetzte Zellysate in den Experimenten ein großes Volumen einnahm und um auch unspezifische Bindungen durch kurze

Inkubationszeit zwischen Proteinen und Matrix zu minimieren, wurden 250 – 500 µl der FLAG-Matrix in eine Säule (3 oder 12 ml) gefüllt, wie in der Produktbeschreibung vorgegeben vorbereitet und anschließend mit 10 Säulenmatrixvolumen Puffer A gewaschen. Dann erfolgte die Zugabe des Zelllysats, das unter der Säule aufgefangen wurde um es anschließend erneut in die Säule zu füllen. Dann wurde die Säule mit dem 50-fachen Säulenvolumen Puffer A gewaschen, um unspezifische Proteine zu lösen. Durch 5 sich wiederholende Inkubationen mit 100 µg/ ml FLAG-Peptid in der dem Matrixvolumen entsprechenden Menge Puffer A wurde die Matrix eluiert. Da das gesamte Elutionsvolumen nicht von einer SDS-Gel-Tasche aufgenommen werden konnte, musste das Eluat in der Folge durch Wessel-Flügge Fällung auf ein geringeres Volumen begrenzt werden.

2.6.10 Vorbereitung von Schweinehirn zur Aufarbeitung von Clathrin-Vesikeln

Die für die folgenden Versuche genutzten Schweinehirne wurde freundlicherweise von der Fleischversorgung Köln GmbH unter Aufsicht des Veterinäramts Köln zur Verfügung gestellt. Die Hirne wurden unmittelbar nach den Schlachten entnommen und sofort für den Abtransport auf Eis gelagert. Um Kontaminationen durch Blutplasmaproteine zu reduzieren, wurden die Hirnhäute entfernt und das Gewebe gründlich mit VS-Wasser gespült. Die gereinigten Schweinehirne wurden in 300g Portionen bei -80°C gelagert.

2.6.11 Präparation von Clathrin umhüllten Vesikeln (CCVs)

Für die Präparation wurden 600g Schweinehirn über Nacht bei 4°C aufgetaut. Das Hirn wurde in ca. 500ml MES-Puffer (2.3.3) dreimal für 15sec im Standmixer homogenisiert, das Homogenat mit MES-Puffer auf 1 L aufgefüllt und erneut homogenisiert. Dieses Homogenat wurde für 30min bei 15.000xg (JA-10 Rotor) zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und für 1h bei 100.000xg (Ti 45-Rotor) zentrifugiert. Die Sedimente der Ultrazentrifugation, welche den gesamten membranären Pool enthalten, wurden mit jeweils 5ml MES-Puffer versetzt und mit Hilfe eines Glasstabes vom Boden der Ultrazentrifugenbecher gelöst. Der Überstand der Ultrazentrifugation (Schweinehirn-Cytosol) wurde entweder verworfen

Fraktionen wurden anschließend auf ein SDS-Gel aufgetragen um die CCVs enthaltenden Fraktionen zu identifizieren. Diese wurden vereinigt und für 30 min für 100.000xg zentrifugiert. Die Resuspendierung des Sediments erfolgte daraufhin erneut in MES-Puffer. 100 µl Aliquots wurden nach Schockfrieren bei -80°C gelagert werden. Längeres Lagern führt zu einer Veränderung der CCVs (siehe Abbildung 3.14).

2.6.13 Ablösen (*uncoating*) von Clathrin beschichteten Vesikeln (CCVs)

Um den Clathrin-Mantel, die Adaptoren AP1 / AP2 und andere Vesikel-assoziierte Proteine von dem Vesikel abzulösen wurden zwei unterschiedliche Methoden angewandt.

2.6.13.1 Uncoating von CCVs mittels Tris-Inkubation

Die gereinigten Vesikel einer CCV-Präparation wurde mit 2M Tris/HCl pH7,5 auf eine Endkonzentration von 0,5M Tris eingestellt. Um mit einem geringeren Volumen zu arbeiten, wurden die Vesikel zuvor für 30 min bei 100.000xg (TLA-55 Rotor) zentrifugiert und das Sediment in 0,5 M Tris pH 7,5 aufgenommen. Der Ansatz wurde für mindestens 1h, meist aber über Nacht bei 4°C unter Rotation inkubiert. Die Trennung der Hüllproteine von den nun teils nackten Vesikeln wurde durch Zentrifugation für 30 min bei 100.000xg (TLA-55 Rotor) erreicht. Der Überstand (Tris-Extrakt), der die abgelösten Adaptoren und Clathrin-Triskelions enthält, wurde abgenommen, das Sediment in 0,5 M Tris pH 7,5 resuspendiert.

2.6.13.2 Uncoating von CCVs mittels Uncoating-ATPase

Das Ablösen der Clathrinhülle in der Zelle wird durch die von Auxilin rekrutierte HSC70 (*Uncoating*-ATPase) katalysiert. Um den enzymatisch katalysierten, zellulären Vorgang zu rekonstituieren, wurde neben dem Tris-induzierten Ablösen der Clathrinhülle auch rekombinantes his-HSC70 und GST-Auxilin (547 – 910) verwendet. Zunächst wurden 80 µg des HSC70 in 20 µl *uncoating*-Puffer und 5 mM ATP bei 37°C in einem Ultrazentrifugations-Eppendorf-Reaktionsgefäß inkubiert. Die Zugabe der CCVs sowie von 15 µg GST-Auxilin in insgesamt 80 µl Puffer geschah nach 8 min, woraufhin eine weitere Inkubation für 30 min bei 37°C folgte. Die Reaktion wurde durch Überführung des Gefäßes auf Eis gestoppt. Zur Trennung der Hüllproteine von den Vesikeln erfolgte eine 20 minütige Zentrifugation bei 100.000xg. Die im Überstand befindlichen Vesikel-assoziierten Proteinen wurden danach

2.6.16 Expression und Reinigung von GST-PP2A B55 α

10 ml LB Medium wurden mit 100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin und 20 $\mu\text{g/ml}$ Gentamycin versetzt, mit dem expressionsvektortragenden *E. coli Arctic Express* Bakterienklon aus einer Glycerinkultur angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator wachsen gelassen. Die komplette Kultur wurde anschließend auf 500ml LB (ohne Antibiotika) expandiert und für 3 bei 30°C inkubiert, danach auf 11°C gekühlt und IPTG zugegeben (Endkonzentration 1 mM), gefolgt von einer Inkubation von 24 h bei 11°C. Im Anschluss wurden die Bakterien 15 min bei 5.000xg (SLA-3000 Rotor) pelletiert. Alle weiteren Schritte erfolgten auf Eis, oder bei 4°C. Das Sediment wurde in 40ml Puffer A+ 1 mM PMSF resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen mit dem EmulsiFlex C3 nach Angaben des Herstellers bei ~1.500 bar aufgeschlossen. Um das rekombinante Protein zu solubilisieren wurde Sarkosyl mit einer Endkonzentration von 0,7% zugegeben. Nach 20 min folgte eine 20 minütige Zentrifugation bei 14.000xg (SS-34 Rotor). Der Überstand wurde zur Inaktivierung von Sarkosyl mit 1% Triton-X-100 versetzt. Die Aufreinigung des Fusionsproteins mit dem Profinia Protein Purification System und einer GST-Säule mit anschließender Entsalzung erfolgte nach dem programmierten Standard-Protokoll. Dies führte zu einer Proteinausbeute von ca. 0,5 mg/ml.

IPTG: 500 mM IPTG
 in A. bidest
 steril filtrieren

2.6.17 Expression und Reinigung von GST-PP2A A α

Die Expression und Reinigung des rekombinante GST-Fusionsproteins erfolgte nach folgendem Protokoll: 25 ml LB Medium wurden mit 100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin versetzt, mit dem Expressionsvektortragenden *E.coli BL21(DE3)* Bakterienklon aus einer Glycerinkultur angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. 20 ml der Kultur wurden auf 400ml LB-Medium + 100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin aufgefüllt und bei 37°C weiter kultiviert. Bei einer $\text{OD}_{600\text{nm}}$ von 0,8 wurde die Kultur auf 18°C abgekühlt. Danach erfolgte die Zugabe von IPTG (Endkonzentration 0,1 mM) und eine Inkubation von 18 h bei 18°C. Anschließend wurden die Bakterien 15 min bei

5.000xg (SLA-3000 Rotor) pelletiert. Das Sediment wurde in 6 ml/mg Puffer A resuspendiert und mit 1 mM PMSF versetzt.

Tabelle 2-11: Reinigung von GST PP2A B55 α .

GST-PP2A B55 α	
Lysepuffer (Puffer A)	50 mM Tris pH 8,0 100 mM NaCl 1 mM PMSF
Profinia Laufpuffer	Puffer A
Profinia Elutionspuffer	10 mM GSH 50 mM Tris pH 8 steril filtriert, entgast
Entsalzungspuffer	Puffer A steril filtriert, entgast

Alle weiteren Schritte erfolgten auf Eis, oder bei 4°C. Die Zellen wurden anschließend mit drei jeweils ein-minütigen Impulsen Ultraschall (33% Amplitude, Sonifier 450) aufgeschlossen. Durch 60 minütige Zentrifugation bei 26.000xg (SS-34 Rotor) wurde das Lysat von Zellresten getrennt und der Überstand weiterverwendet.

2.6.17.1 Reinigung über *Profinia Protein Purification System*

Der Überstand wurde zur Injektion in das Profinia Protein Purification System verwendet. Informationen zum Ablauf des Programms siehe Tabelle 2-12. Es kam keine Entsalzungssäule zum Einsatz. Um eine höhere Proteinausbeute zu erlangen wurde der Durchfluss aus dem ersten Lauf für zwei weitere Zyklen verwendet und die Eluate schließlich vereinigt. Um das Gluthation zu entfernen und das Protein weiter zu reinigen, folgte eine Anionen-Austausch-Chromatographie (Tabelle 2-13). Dazu wurden die Eluate in den ÄKTAexplorer auf eine HiTrap Q HP mit 1 ml Bettvolumen injiziert. Ein Gradient von 0% bis 50% Elutionspuffer sorgte für die Elution des gebundenen Proteins. Zur Kontrolle der Aufreinigung wurde pro Fraktion je 15 μ l Probe entnommen und mittels Coomassie-gefärbten 10%igen SDS-Gel

dokumentiert. Die saubere PP2A A α enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und konnten für weitere Versuche verwendet werden.

Tabelle 2-12: Reinigung von GST PP2A A α über Profinia

GST-PP2A A α		
Lysepuffer	50 mM Tris pH 8,0	
Profinia Waschpuffer 1	Puffer A	6 Säulenvolumen mit 2 ml / min
Profinia Waschpuffer 2	50 mM Tris pH 8,0	6 Säulenvolumen mit 2 ml/min
Profinia Elutionspuffer	10 mM GSH	4 Säulenvolumen mit 1 ml/min

Tabelle 2-13: Reinigung von GST PP2A A α über den Anionen-Austauscher

Säule	HiTrap Q HP (1ml)
Laufpuffer	20 mM Tris, pH 8, 3 mM DTT
Elutionspuffer	20 mM Tris, 1 M NaCl, pH 8, 3 mM DTT
Flußrate	1 ml/ min
Gradient	0 – 50 %, über 20 Säulenvolumen
Fraktionsgröße	0,5 ml

2.6.17.2 Reinigung über Gluthation-Beads und Thrombin-Verdau

Der von den Zellresten befreite Überstand der Zentrifugation wurde in diesem Fall mit 500 μ l Gluthation-Beads versetzt und bei 4°C unter Rotation inkubiert. Nach 4 h wurden die Beads durch Zentrifugation für 5 min bei 700xg pelletiert werden. Der Überstand wurde verworfen, während das Sediment in 5 mal hintereinander mit je 1 ml Puffer A gewaschen wurde. Das so gereinigte Protein wurde z.B. unter 3.2.6 für einen *Pull-down* verwendet. Für die Quantifizierung der PP2A A-Untereinheit folgte der Reinigung noch ein Verdau mit Thrombin um das GST abzutrennen. Zunächst mussten die Beads mit Thrombin-Puffer gewaschen werden, dann wurden sie in 1 ml Thrombin-Puffer aufgenommen, 20 μ l Thrombin zugefügt und das Gemisch für 72 h bei 4°C inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation für 5 min bei 700xg wurden der Überstand abgenommen. Dieser enthielt die nun GST-freie PP2A A α Untereinheit. Um das Thrombin aus dem Überstand zu entfernen wurde dieser mit einer Spritze auf eine HiTrap Benzamidin FF (high sub)-Säule injiziert. Benzamidin ist ein reversibler kompetitiver Inhibitor von Serin-Proteasen und bindet deshalb spezifisch Thrombin, während andere Proteine die Säule passieren können. Durch Nachspülen mit Puffer A konnte das rekombinante Protein vollständig eluiert werden. Die

Injektion von 8 M Harnstoff sorgte für die Regeneration der Säule, die anschließend mit Puffer A gewaschen und in 20% Ethanol gelagert wurde.

Thrombin-Puffer	20 mM Tris pH 8
	150 mM NaCl
	10 mM CaCl ₂

2.6.18 Reinigung von 6xhis-PP2A C α

10 ml LB Medium wurden mit 100 μ g/ml Kanamycin versetzt, mit dem expressionsvektortragenden *E. coli* BL21 (DE3) Bakterienklon aus einer Glycerinkultur angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. Die 10 ml Kultur wurde anschließend auf 400ml LB + Kanamycin expandiert und dann für 3 h bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 0,5 mM) die Induktion der Proteinexpression für weitere 3 h bei 37°C. Die Bakterien wurden anschließend 15 min bei 5.000xg (SLA-3000 Rotor) pelletiert.

Tabelle 2-14: Reinigung von his PP2A C α .

Puffer A	50 mM Tris, 100 mM NaCl pH 8
NTA-Waschpuffer	50 mM Tris 1100 mM NaCl 10 mM Imidazol pH 8
NTA-Elutionspuffer	50 mM Tris, 100 mM NaCl, 200 mM Imidazol pH 8

Alle folgenden Schritte erfolgten auf Eis, oder bei 4°C. Das Sediment wurde in 40ml Puffer A resuspendiert und mit 1 mM PMSF versetzt. Anschließend wurden die Zellen mit Ultraschall (2x 1 min; 33% Amplitude) aufgeschlossen. Da so das Fusionsprotein nicht zu solubilisieren war, wurde 0,7% Sarkosyl zugegeben. Nach einer Inkubationsdauer von 20 min folgte eine 20 minütige Zentrifugation bei 14.000xg (SS-34 Rotor). Um das Sarkosyl zu inaktivieren, wurde der Überstand mit 1% Triton-X-100 versetzt, anschließend 10 mM Imidazol und 1 M NaCl zugegeben, dann 500 μ l Ni-NTA-Beads zugefügt. Nach 2 h Inkubation unter Rotation bei 4°C wurden die Beads pelletiert (5 min 700xg) und diese dann 5x mit je 1 ml NTA-Waschpuffer gewaschen. Die Elution erfolgte drei mal mit je 1 ml NTA-Elutionspuffer unter Rotation bei RT. Die Analyse der Eluate erfolgte in 12,5% SDS-Gelen, die Coomassie gefärbt wurden.

2.6.19 Expression und Reinigung von 6xhis-HSC70 und GST-Auxilin (547-910)

Der Expressions- und Reinigungsvorgang wurde wie in (Scheele *et al.* 2001) und (Wilbanks *et al.* 1994) beschrieben durchgeführt. Das Entfernen des GST-Tags durch proteolytischen Verdau mittels Thrombin entfiel, da die Funktion des Auxilins durch den Tag nicht beeinträchtigt wird.

2.6.20 Rekonstitution der Protein-Phosphatase 2A

Um aus dem aus Bakterien gewonnenen GST-PP2A A α und den in Insektenzellen produzierten B55 α - und C-Untereinheiten ein PP2A Holoenzym zu bilden, wurde zunächst die (wie in Xu *et al.* 2008 beschrieben) gereinigte A-Untereinheit durch eine 2 stündige Inkubation bei 4°C unter Rotation in Anwesenheit von Gluthation-beads immobilisiert. Die gefrorenen Insektenzellen wurden in Puffer A + 3 mM β -Mercaptoethanol + 1 Proteasinhinhibitor (1/500) aufgenommen und durch Ultraschall aufgeschlossen (2x 1min 25% Amplitude, 1x 1 min 35% Amplitude). Nach einer Zentrifugation für 10 min bei 100.000xg wurde der Überstand abgenommen und mit den Gluthation-Beads für 30 min bei 4°C inkubiert. Es folgten zwei Wascheschritte mit je 1 ml kaltem 50 mM Tris pH 8 100 mM NaCl. Optional ist es an diese Stelle möglich, durch über Nacht Thrombin-Verdau bei 4°C, die Phosphatase von den Beads zu trennen. Die Separation der reinen A-Untereinheit vom Dimer und dem Holoenzym ist über einen weiteren Anionen-Austauscher-Schritt möglich.

2.6.21 Pull-down

Mittels eines *Pull-down* Experiments kann die Interaktion zweier Proteine überprüft werden. Die wie in 2.6.17.2 beschriebene gereinigte, noch an den Beads gebundene A-Untereinheit und auf gleiche Weise gereinigtes GST, wurde in gleichen Mengen 2x mit je 1 ml Puffer B gewaschen und anschließend in 1 ml Puffer B resuspendiert. Dann wurde zu beiden Ansätzen 100 μ g gereinigtes HSC70 gegeben und die Mischungen für 4 h bei 4°C inkubiert. Nach dem Pelletieren der Beads wurde der Überstand abgenommen und die Beads 3x mit Puffer B gewaschen. Daraufhin wurden die Proteine mit 1 ml Elutionspuffer eluiert und Aliquots der Eluate sowie der Überstände auf einem Coomassie-gefärbten SDS-Gel analysiert.

Puffer B	10 mM $[\text{NH}_4]_2\text{SO}_4$
	20 mM HEPES pH 7
	2 mM Magnesiumacetat
	25 mM KCl
	1 mM PMSF
Elutionspuffer	20 mM GSH
	50 mM Tris pH 8

2.6.22 Microcystin-Pull-down

Microcystine sind zytosolische (Oligo-)Peptide die von in Süßwasser lebenden Cyanobakterien produziert werden. Sie inhibieren die Proteinphosphatasen, besonders PP1 und PP2A durch eine hochaffine Bindung an deren katalytisches Zentrum, was zytotoxische Effekte mit sich führt. An Agarose gekoppeltes Microcystin-LR, die am häufigsten auftretende von über 60 Microcystin-Varianten, kann zum Präzipitieren von PP1 und PP2A verwendet werden. In dieser Arbeit wurde nach dem Zellaufschluss in PBS + Proteaseinhibitoren eine Membran-/ Zytosol-Fraktionierung vorgenommen und das Zytosol mit 25 µl der mit PBS gewaschenen Microcystin-LR-Agarose für 2 h bei 4°C unter Rotation inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 1000xg mit anschließendem Abnehmen des Überstands folgte ein 3-facher Waschriff mit PBS. Schlussendlich wurde der Puffer vollständig abgenommen und die Agarose in 2x Probenpuffer aufgeköcht um das Präzipitat zu solubilisieren.

2.6.23 Phosphorylierung von AP2 *in vivo*

Um den AP2-Komplex unter *in vivo* Bedingungen zu phosphorylieren, wurden HeLa - Zellen vorsichtig 2x mit phosphatfreiem Hepes-Puffer (20mM Hepes, 150 mM NaCl pH 7,4) gewaschen und für 1h in Mangelmedium (DMEM – Phosphat, -Pyruvat, - Glukose, -FCS) unter Zellkulturbedingungen „hungern“ gelassen. Anschließend wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit Phosphat- und Pyruvat-freiem DMEM versetzt, dem zuvor 5% FCS und 1mCi ^{32}P -Orthophosphat/10ml Medium

zugesezt wurde und für 5 - 7h inkubiert. Um eine Dephosphorylierung zu verhindern, wurden in den letzten 10min die membrangängigen Serin/Threonin-Phosphataseinhibitoren Okadasäure und Calyculin A mit einer Konzentration von 100nM zugesezt. Alle folgenden Schritte erfolgten auf Eis, oder bei 4°C. Die Zellen wurden auf Eis gestellt und sofort 2x mit PBS [+ Protease-Inhibitor Cocktail (1/1000), +Phosphatase-Inhibitor Cocktail I, II und III (1/1000), + Okadasäure/Calyculin (100nM)] gewaschen und mit 2x750µl abgeschabt. Die Zellen wurden für 5min bei 400xg sedimentiert, erneut gewaschen und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde anschließend in je 1,8ml 20mM Tris, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 0,5% TX-100 pH 7,4 [+ Protease-Inhibitor Cocktail (1/500), + Phosphatase-Inhibitor Cocktail I, II und III (1/200), + Okadasäure/Calyculin (100nM)] gelöst und für 20min auf dem Drehrad bei 4°C inkubiert. Das Homogenat wurde nun für 30min bei 16000xg zentrifugiert und der Überstand für Immunpräzipitation verwendet (2.6.9.).

2.6.24 *In vitro* Dephosphorylierung von AP2 / AP1

³²P markiertes, immunisoliertes AP1 / AP2 (10 – 12.000 cpm) wurde in Dephosphorylierungspuffer für 30 min bei 37°C ohne weitere Zusätze (Negativkontrolle), mit Zytosol (5-100 µg) aus Schweinehirn oder *HeLa*-Zellen, oder kommerziell erworbener PP2A (0,05 U/ Probe) in einem Volumen von 100 µl inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 5 min bei 1000xg zentrifugiert, die Überstände verworfen, die Agarose 3x mit Dephosphorylierungspuffer gewaschen und in Probenpuffer aufgekocht. Es folgte SDS-PAGE und Westernblot.

Dephosphorylierungspuffer	50 mM Tris/HCl pH 7.2
	100 mM NaCl
	1 mM DTT

2.6.25 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie ist eine Methode mit der Masse-zu-Ladungs-Verhältnisse (m/q) von Teilchen genau bestimmt werden können. Sie basiert auf dem Prinzip, dass ionisierte Teilchen im Vakuum auf einer bestimmten Strecke beschleunigt und anschließend in einem Magnetfeld entsprechend ihrer Masse abgelenkt werden. Hierzu benötigt ein Massenspektrometer eine Ionenquelle, in der der Analyt ionisiert wird, einen Massenanalysator, der die Ionen hinsichtlich des Masse-zu-Ladungs-Verhältnisses auftrennt und einen Detektor, der den Ionenstrom misst. Massenspektrometrische Analysen wurden am Zentrum für Molekulare Medizin Köln (ZMMK) durchgeführt über LC-MS.

2.6.26 Berechnung der PP2A-Untereinheiten-Stoffmengen in CCVs

Zur Quantifizierung der PP2A Untereinheiten in CCVs kamen folgende Formeln zum Einsatz:

$$n = m / M$$

n= Stoffmenge (mol)

m= quantifizierte Masse rekombinantes Protein aus Westernblot (g)

M= Molekulargewicht rekombinantes Protein (kDa)

$$\text{Masse endogene Proteine } m = n * M$$

m= Masse endogenes Protein (g)

n= Stoffmenge aus erster Rechnung (mol)

M= Molekulargewicht endogenes Protein (kDa)

2.7 Zellbiologische Methoden

2.7.1 Umgang mit Säugetierzellen

Die adhärenenten Zellen wurden im Brutschrank auf 75 cm² Plastikkulturflaschen oder speziell beschichtete Schalen (3 bis 15 cm Durchmesser) in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre und 5%CO₂ bei 37°C kultiviert. Als Kulturmedium wurde Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) verwendet, dem 10% fetales Kälberserum (FCS) und 100U/ml Penicillin/Streptomycin zugesetzt wurde. Das Kulturmedium wurde alle 2 bis 3 Tage erneuert. Konfluente Zellen wurden geteilt. Hierbei wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 3 bis 5min bei 37°C mit Trypsin/EDTA inkubiert. Das Trypsin löst die Zellen durch den hydrolytischen Abbau verankerter Zelloberflächenproteine und der extrazellulären Matrix. Zur Inaktivierung des Trypsins wurden die Zellen mit serumhaltigem Medium gewaschen.

Zellen, die stabil mit einem Hygromycin-Resistenzgen enthaltenden Plasmid transfiziert waren, wurden in DMEM + 2 U Hygromycin/ ml Medium kultiviert.

2.7.1.1 Einfrieren von Zellen

Für die langfristige Lagerung wurden Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Zellen wurden nach dem Trypsinieren abzentrifugiert, in Einfriermedium (DMEM + 20% FCS + 10% DMSO) aufgenommen und dann in 1ml Kryoröhrchen für kurze Zeiträume bei -80°C, auf längere Zeit in flüssigen Stickstoff eingefroren.

2.7.1.2 Revitalisieren von Zellen

Zum Auftauen der Zellen wurden die Kryoröhrchen aus dem Stickstofftank entnommen, mit 80% Ethanol desinfiziert und im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, bis nur noch ein kleiner Eiskern zu sehen war. Um toxische Effekte des DMSO zu vermeiden, wurde der Ansatz mit 10 ml Medium versetzt und in Kultur gebracht.

2.7.1.3 Transfektion mit Plasmid DNA

Unter Transfektion versteht man das Einbringen von Fremd-DNA in eukaryotische Zellkulturzellen. Dabei kann man zwischen dem zeitweiligen Einbringen eines Plasmid in die Wirtszelle (transiente Transfektion) und der Integration des Plasmids in das Genom der Wirtszelle (stabile Transfektion) unterscheiden. Hier erfolgte die

Transfektion mit Hilfe und nach Anleitung des Qiagen Effectene® Transfection Reagent Kits.

2.7.1.4 Transiente Transfektion

Für die transiente Transfektion verwendet man meistens supercoiled Plasmid-DNA, weil die DNA in dieser Konformation mit höherer Effizienz transkribiert wird. Die Transkription beschränkt sich auf wenige Tage, da Fremd-DNA in der Zelle vollständig abgebaut wird.

Pro Ansatz wurden 4×10^4 Zellen einen Tag vor der Transfektion in 3cm Zellkultur-Platten mit 2 ml Medium ausplattiert und im Brutschrank inkubiert. 400ng DNA wurden mit EC-Puffer auf 100 μ l aufgefüllt, kurz gevortext, dann für 5min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 10 μ l Effectene Transfecten Reagenz zugegeben und nach vortexen für weitere 10min bei RT inkubiert. Während dessen wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 700 μ l Medium inkubiert. Der Mix nach der Inkubationszeit mit 900 μ l Medium versetzt und dann auf die Zellen geträufelt. Nach 24h wurde das Medium gewechselt, um das Transfektionsreagenz zu entfernen. Nach 48h wurden die Zellen geerntet.

2.7.1.5 Stabile Transfektion

Um Zellen stabil zu transfizieren, wurde zunächst die Methode der transienten Transfektion angewendet. 24h nach der Transfektion wurden die Zellen selektiert, indem dem Medium das Antibiotycum Hygromycin (200 U / 100 ml) zugesetzt wurden.

Die verwendeten DNA-Plasmide besaßen ein Hygromycinresistenzgen, so dass alle nicht transfizierten Zellen aufgrund der fehlenden Resistenz abstarben. Nach der Transfektion von HeLa Zellen und der Beobachtung, dass das Expressionsniveau stark abnahm wurden einzelnen Klone isoliert und getrennt weiterkultiviert. Die Kolonien der Klone die die stärkste Expression zeigten wurden in Kultur gehalten. Bei der Selektionierung der transfizierten HEK293TN Zellen wurde keine Subklonierung vorgenommen, sondern mit Mischkolonien weitergearbeitet.

2.7.1.6 Induktion des pCMV-Promotors durch Natriumbutyrat

Nachdem die Selektionierung transfizierten HeLa-Zellen nicht zu einer dauerhaft höheren Expression von rekombinantem Protein führte, wurden dem

Zellkulturmedium am Tag vor einem Experiment für 15 h 10 mM Natriumbutyrat zugesetzt. Die Inkubation mit dieser Chemikalie führt zu einer Stimulation des pCMV-Promotors, wodurch eine höhere Expression des rekombinanten Proteins erreicht wird. Am Folgetag konnten die Zellen wie oben beschrieben geerntet werden.

2.7.1.7 Transfektion mit RNA Oligonukleotiden

Die Transfektion der Zellen mit doppelsträngiger RNA diente der Supprimierung von Proteinen über RNA Interferenz (RNAi). RNAi ist ein Prozess, der die Genexpression in Eukaryoten auf dem prä- und posttranskriptionalen Level moduliert (Hannon 2002). Dazu wird doppelsträngige RNA, die eine ca. 19bp lange Sequenz besitzt und an deren 3`-Enden jeweils 2 ungepaarte Nukleotide sind, in die Zelle transfiziert. In der Zelle wird die RNA von RISC, einem Ribonukleoprotein-Komplex mit Nuklease-Aktivität gebunden. Dieser entwindet den Doppelstrang und assoziiert den Strang, der am 5`-Ende weniger GC bp enthält. Dieser Strang ist komplementär zur Ziel mRNA und bewirkt, dass eine Endonuklease des RISC diese schneidet, so dass keine Translation mehr stattfinden kann. Für die Supprimierung der Proteine wurden zwei siRNAs mit je 40 nM verwendet. Je nach Anzahl der benötigten Zellen wurde diese am Vortag auf 3, 6 oder 10cm Schalen ausplattiert. Für eine 3cm Schale wurden 2×10^5 *HeLa*-Zellen am Vortag ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag wurden pro Ansatz 2 Eppis vorbereitet, eines mit 250µl Optimem und mit der gewünschten Menge siRNA versetzt und das andere mit 250µl Optimem plus 2,5µl Lipofektamin. Nach 15-minütiger Inkubation bei RT wurden die Lösungen vereint und weitere 15min bei RT inkubiert. Bevor die RNA-haltige Lösung auf die Zellen getropft wurde, wurden diese mit PBS gewaschen und in DMEM ohne Penicillin/Streptomycin inkubiert. Eine Wiederholung der Behandlung mit siRNA am Folgetag verstärkte den *knock-down*-Effekt. 48h nach der letzten RNAi Behandlung wurden die Zellen für die jeweiligen Versuche verwendet. Die Effizienz der RNAi wurde nach SDS-PAGE mittels Westernblot nachgewiesen.

2.7.2 Umgang mit Insektenzellen

Die adhärennten Zellen wurden in 75 cm² Plastikkulturflaschen oder auf speziell beschichteten Schalen in einem Inkubator bei 28°C unter normaler Atmosphäre kultiviert. Als Kulturmedium wurde Sf9 SFM (serumfreies Medium) (Sf9 Zellen) oder

ExpressFive (Hi5 Zellen) verwendet. Das Kulturmedium konnte bis zu 25 µg/ ml Gentamycin beinhalten und wurde alle 2 bis 3 Tage erneuert. Konfluente Zellen wurden durch Abklopfen von den Flaschen gelöst und dann durch Verdünnen geteilt.

2.7.2.1 Schüttelkulturen

Um größere Mengen Zellen zu produzieren und um diese gegebenenfalls für eine Infektion mit Bakuloviren einzusetzen, wurden die eigentlich adhärennten Zellen in Erlenmeyer-Schüttelkolben transferiert. Eine Startkultur von 100 ml Medium in einem 250 ml Erlenmeyerkolben beinhaltete 2×10^5 Zellen /ml, was ca. 3 bis 5 konfluenten 75 cm^2 Flaschen entspricht. Die Inkubation erfolgte in einem Schüttelinkubator bei 28°C und 90 – 125 Umdrehungen pro Minute unter normaler Atmosphäre. Zwei mal pro Woche musste die Kultur auf 2×10^5 Zellen /ml geteilt, oder Medium hinzugefügt werden um so die Kultur zu erweitern. Jede dritte Woche wurde der Kolben erneuert, die Zellen dabei für 5 min bei 500xg zentrifugiert und anschließend in frischem Medium resuspendiert.

2.7.2.2 Infektion mit Bakuloviren

Für erste Experimente wurden 5×10^5 Zellen (Sf9 oder Hi5) mit 2 ml Medium auf 3 cm Schalen verteilt und 30 min inkubiert. Dann konnte das Medium durch frisches Medium ersetzt und variierende Mengen Bakuloviren zugefügt werden. Nach 72 h wurde das Bakuloviren enthaltende Medium abgenommen und in sterile Gefäße überführt. Zur Analyse der Zellen wurden diese mit 2x Proteinprobenpuffer von der Kulturschale gelöst. Um den abgenommenen Überstand von Zellresten zu befreien folgte eine 20 minütige Zentrifugation bei 1.000xg, der Überstand wurde bei 4°C gelagert, das Sediment verworfen. Der Überstand enthält Ausgangsmaterial für eine erneute Infektion von Insektenzellen durch Bakuloviren.

Die Infektion größerer Kulturen wurde in Schüttelkolben durchgeführt. Die Vorgehensweise entsprach dabei der Vorgabe unserer Kooperationspartner aus den USA. Eine 500 ml Schüttelkultur in einem 2 L Erlenmeyerkolben mit einer Dichte von $1,2 - 1,5 \times 10^6$ Hi5-Zellen wurde mit je 15 ml pro Überstand aus vorhergehender (aus den USA verschickter P4-) Kultur versetzt. Dabei konnten sowohl mehrere Virenstämme kombiniert, als auch einzeln zum Einsatz kommen. Die Inkubation der Kolben erfolgte wie oben beschrieben für 72 h. Dann wurde das Medium steril abgenommen, auf 50 ml Falcons verteilt und für 20 min bei 500xg bei 4°C pelletiert.

Der ÜS wurde bei 4°C gelagert, die Sedimente mit Puffer A gewaschen und bei -80°C gelagert um einen ersten Zellaufschluss zu erreichen.

2.7.2.3 Plaque-Assay

Beim Plaque-Assay zur Bestimmung der Virustiter wurden die vorhandenen Virusenthaltenden Zellüberstände in Verdünnungen von 10^{-2} bis 10^{-7} verwendet. Es wurden Sf9-Zellen einer konfluenten 75 cm² Flasche in 20 ml SFM-Medium aufgenommen und davon je 0,5 ml in jedes Loch einer 24-Loch-Zellkulturplatte ausgesät (4×10^5 Zellen/ Loch). Nach 30 min Inkubation bei 27°C wurde der Überstand abgenommen und jeweils durch 200 µl der vorbereiteten Virusverdünnungen ersetzt. Jede Verdünnung wurde 4 mal eingesetzt. Nach 1 h bei 27°C wurde der Virusüberstand entfernt und vorsichtig durch 1 ml einer Mischung aus 2.5% Seaplaque Agarose in 25 ml PBS und 30 ml 2x Medium mit 20% FCS ersetzt. Dabei ist zu beachten, dass die Mischung nach dem Erhitzen der Agarose nicht wärmer als 35°C bei der Verwendung hat, da die Zellen ansonsten sterben. Nach dem Gelieren wurde die Zellkulturplatte mit parafilm verschlossen und vier bis fünf Tage bei 27°C inkubiert. Anschließend wurden pro Loch 500 µl einer 0,01%-igen Neutralrotlösung zugegeben und für 1 h bei 27°C inkubiert, dann der Überstand abgenommen. Am darauffolgenden Tag konnten die angefärbten Virus-Plaques gezählt und für jede eingesetzte Verdünnung gemittelt werden.

Der Titer errechnet sich wie folgt:

Titer (pfu / ml) = Mittelwert Plaques / eingesetzter Virus (ml) x Verdünnungsfaktor

Pfu = Plaque bildende Einheiten (engl.: plaque forming units)

Alle nötigen Reagenzien wurden durch die AG Mörsdorf zur Verfügung gestellt.

2.7.2.4 Amplifikation rekombinanter Bakuloviren

Da sich herausstellte, dass der Titer der Bakuloviren in den aus den USA erhaltenen Zellüberständen sehr niedrig ist, musste dieser erhöht werden. Dazu wurden 5×10^5 Sf9 Zellen mit 2 ml frischem Medium auf 3 cm Kulturschalen ausgesät und diese anschließend mit 5 ml der Bakuloviren-Lösung versetzt. Die Menge der einzusetzenden Viren ergibt sich aus folgender Formel:

Inoculum (ml) = gewünschte MOI (0,01 -0,1) x Anzahl der Zellen / Titer (Pfu / ml)

MOI: Multiplizität der Infektion (engl: multiplicity of infection), beschreibt das Verhältnis Anzahl Viren pro Anzahl Zellen

Nach 72 h Inkubation wurde das Medium abgenommen, für 5 min bei 500xg zentrifugiert und 6 ml des Überstands mit 6 ml frischem Medium zu 3×10^6 Sf9 Zellen auf 6 cm Schalen gegeben. Weitere 72 h später wurde der Vorgang wiederholt und 4 ml des neuen Überstands mit 6 ml frischem Medium auf 10 cm Schalen mit 5×10^6 Sf9 Zellen gegeben. Es folgten 2 ml Überstand mit 10 ml Medium in einer Schüttelkultur mit 2×10^7 Zellen (2×10^6 Zellen / ml in 125 ml Kolben) und in einem finalen Schritt 4 ml mit 50 ml Medium (2×10^6 Zellen / ml in 1 L Kolben). Der so gewonnene Überstand wurde für eine neue Bestimmung des Titers eingesetzt.

2.7.3 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde die Neubauer Zählkammer verwendet. Dabei wurden 10 μ l der homogenen Zellsuspension in die Kammer pipettiert und die Zellen in 4 Quadranten gezählt. Die Bestimmung der Zellzahl pro ml ergab sich aus folgender Formel:

$$\text{Zellen pro ml} = n \times 10^4$$

mit

n = Mittelwert der Zellen aus den 4 ausgezählten Quadranten

2.7.4 Immunfluoreszenz

Durch Immunfluoreszenzfärbung kann die subzelluläre Lokalisierung von Zielmolekülen in Zellen sichtbar gemacht werden. Dabei binden die spezifischen Antikörper an ihre jeweiligen Antigene. Ungebundene oder unspezifisch gebundene Antikörper können durch mehrmaliges Waschen entfernt werden. Die spezifisch gebundenen Antikörper können durch verschiedene Verfahren sichtbar gemacht werden. Bei der direkten Immunfluoreszenz ist der Antikörper mit einem Farbstoffmolekül konjugiert. Häufig wird jedoch die indirekte Immunfluoreszenz

angewendet, bei der ein sekundärer, fluoreszierender Antikörper spezifisch den für das Zielprotein spezifischen primären Antikörper bindet. Die Farbmoleküle werden durch Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt und so sichtbar. Selektive Filter im Fluoreszenzmikroskop ermöglichen eine Trennung von verschiedenen Farbstoffen, so dass mehrerer Zielmoleküle gleichzeitig und/oder Strukturen in der Zelle mit unterschiedlichen Fluoreszenzen sichtbar gemacht werden können.

Zur Analyse von Zellen wurden diese auf Deckgläschen ausplattiert, evtl. nach 24h transfiziert und für weitere 24h inkubiert. Danach folgte nachstehendes Protokoll.

Die Fixierung der Zellen ist erforderlich um die Morphologie und die subzelluläre Verteilung und die Konformation der Proteine zu konservieren. Dazu wurden die Zellen nach Waschen mit PBS für 20 min bei RT mit 4%-igem Paraformaldehyd in PBS inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, zum Absättigen freier Aldehydgruppen 10 min bei RT mit 50 mM Ammoniumchlorid inkubiert, dann wieder zweimal mit PBS gewaschen. Durch 10 min Inkubation mit 0,5%-igem Saponin in PBS wurden die Zellen permeabilisiert, dann mit 0,1%-igem Saponin in PBS gewaschen. Anschließend wurden die primären Antikörper in PBS +0,1% Saponin zugegeben und 1 h bei 37°C inkubiert. Nach zwei Waschschritten mit PBS +Saponin folgte die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen für die Sekundärantikörper durch eine 15-minütige Inkubation mit 200 µl Ziegen Serum (10% in PBS). Das Serum wurde durch zwei erneute Waschschrritte mit PBS+Saponin entfernt, dann der sekundäre Antikörper in PBS +Saponin zugegeben und für 30min bei 37°C inkubiert. Es folgten je drei Waschschrritte mit PBS und H₂O.

2.7.4.1 Markierung der Transferrinrezeptoren an der Plasmamembran

Zur Detektion der Transferrinrezeptoren an der Plasmamembran wurden *HeLa*-Zellen auf Deckgläschen ausplattiert. Nach 24 h wurden die Zellen für 1 h in Serum-freiem Medium mit 0,5% BSA inkubiert, mit PBS gewaschen und anschließend für 15 min auf Eis in Anwesenheit von 20 µg/ml Alexa546-konjugiertem humanen Transferrin inkubiert. Es folgte rasch die oben beschriebene Methode der Fixierung und Präparation für die Mikroskopie.

2.7.4.2 Färbung der DNA mit dem Hoechst-Farbstoff

Dem Ansatz mit dem sekundären Antikörper wurde Hoechst-Farbstoff (Bis-Benzimid, Hoechst Nr. 33258, 25µg/ml) zugesetzt um DNA in den Zellkernen sichtbar zu machen.

2.7.4.3 Einbetten der Deckgläschen

Die Deckgläschen wurden in ca. 10µl Fluoreszenz Mounting Medium (Pro long Gold, Invitrogen) eingebettet, welches Antibleichmittel, Stabilisatoren (Natriumazid) und Signalverstärker enthält und über Nacht im Dunkeln getrocknet, um sie anschließend mit klarem Nagellack zu versiegeln.

2.7.4.4 Dokumentation am Epifluoreszenz Mikroskop und konfokalen Laser-Scanning Mikroskop (LSM)

Die Dokumentation erfolgte sowohl an einem Epifluoreszenzmikroskop als auch mit Hilfe eines konfokalen Laserfluoreszenzmikroskops, wenn untersucht werden sollte, ob zwei unterschiedliche Proteine in derselben Fokusebene lokalisieren. Die Detektion von emittiertem Licht aus einer Fokusebene ist nur am konfokalen Mikroskop möglich. Hierzu wird das emittierte Licht von der Probe auf eine variable Lochblende (*pinhole*) fokussiert und von einem hinter dem *pinhole* liegendem Detektor (ein Photomultiplier) erfasst. Liegen Fokuspunkt und *pinhole* in konjugierten Ebenen, also konfokal, kann nur Licht aus dem Fokuspunkt das *pinhole* passieren während Streulicht, das ober- oder unterhalb der Fokusebene emittiert, wirksam unterdrückt wird.

Die Untersuchung der Proben erfolgte an dem Epifluoreszenzmikroskop 80i von Nikon und am konfokalen Laser-Scanning Mikroskop TCS SP5 von Leica.

3 Ergebnisse

3.1 Dephosphorylierung von AP2 durch PP2A

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollte nachgewiesen werden, ob die verminderte Expression der regulatorischen PP2A B55 α Untereinheit zu einer verstärkten Phosphorylierung von Threonin156 (Thr156) der μ 2 Untereinheit von AP2 führt. Ein weiteres Ziel war die gemeinsame Immunpräzipitation der Phosphatase mit ihrem Substrat aus Zelllysat. Ausgangspunkt für diese Experimente waren Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe, die zeigten, dass die Dephosphorylierung von μ 2 in immunpräzipitiertem AP2 durch ein aus Schweinehirnzytosol gereinigtes PP2A Holoenzym (A β , B55 α , C β) katalysiert wird (Ricotta *et al.* 2008).

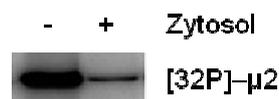


Abbildung 3.1: Dephosphorylierung von AP2 durch PP2A. Die Abbildung zeigt eine Autoradiographie der μ 2-Untereinheit von AP2, welche, nach Phosphorylierung in Gegenwart von $[^{32}\text{P}]$ -Orthophosphat, immunisoliert wurde. Das Material in der linken Spur blieb unbehandelt, während das Immunpräzipitat in der rechten Spur mit Zytosol aus Schweinehirn inkubiert wurde. Das dephosphorylierende Enzym PP2A konnte von unserer Arbeitsgruppe aus Zytosol gereinigt und identifiziert werden (Ricotta *et al.* 2008).

3.1.1 Generierung einer rekombinanten 3xFLAG B55 α -Untereinheit

Voraussetzung für die weiteren Experimente war die Generierung einer rekombinanten B55 α -Untereinheit. Dies war nötig, um mögliche Nebeneffekte bei der RNAi-vermittelten Herabregulierung der endogenen Untereinheit auszuschließen. Bei Verwendung von siRNA kann ein sogenannter *off-target*-Effekt auftreten, der dazu führt, dass neben dem eigentlichen Zielprotein auch weitere Proteine in ihrer Expression beeinflusst werden. Da es nicht möglich ist die Expression aller Proteine zu kontrollieren, ist es eine gängige Methode, in einem Kontrollexperiment die Proteinkonzentration des supprimierten Zielproteins durch Transfektion einer rekombinanten, RNAi-resistenten DNA wiederherzustellen. Der Phänotyp in diesen Zellen sollte dem von unbehandelten Zellen entsprechen, wenn kein *off-target*-Effekt auftritt. Andernfalls kann man davon ausgehen, dass die Verwendung der RNAi ungewollte und unkontrollierte Nebeneffekte hat. Für die Generierung der RNAi-insensitiven DNA wurde die kodierende Sequenz der humanen B55 α Untereinheit in

den humanen Expressionsvektor pCMV-3Tag-6 kloniert. Ausgangspunkt für die Klonierung war ein bereits in pcDNA1 vorhandenes B55 α -Konstrukt mit einem N-terminalen 6xHistidin-Tag, dessen Expression nicht nachweisbar war. Das neue, N-terminal 3xFLAG markierte Konstrukt (Abbildung 3.2A) ist aufgrund der fehlenden 3'untranslatierten Region insensitiv gegenüber der siRNA-Oligonukleotide (PR55a3_3, PR55a3_4), die zur Suppression der endogenen B55 α -Untereinheit verwendet werden (Abbildung 3.2B). Das rekombinante Protein besitzt ein nominelles Molekulargewicht von 58 kDa.

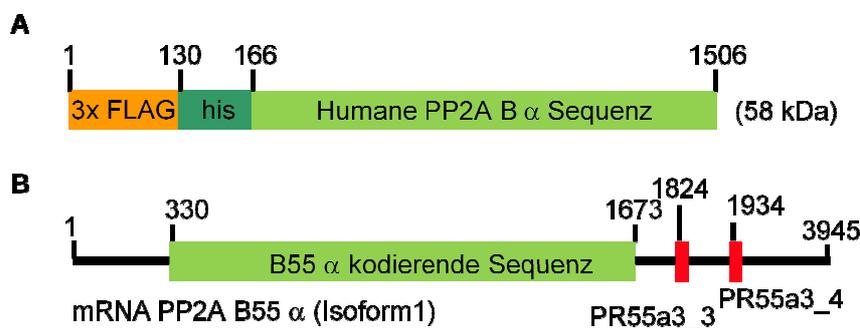


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung des 3xFLAG B55 α Konstrukts und der RNAi-Oligo-Zielsequenzen. Die humane PP2A B55 α kodierende Sequenz wurde in den pCMV-3Tag-6-Vektor transferiert, um ein 3xFLAG- und His-markiertes rekombinantes Protein mit einem Molekulargewicht von 58 kDa exprimieren zu können (A). Dieses Konstrukt ist, aufgrund der fehlenden 3'untranslatierten Region, resistent gegen die verwendeten siRNA-Oligonukleotide (rote Balken, B). Die Zahlenangaben beziehen sich auf die Nukleotidpositionen.

3.1.2 Nachweis der siRNA-vermittelten B55 α -Suppression und rekombinanten FLAG-B55 α Expression in Zelllysaten

Die Suppression der B55 α -Untereinheit durch RNAi wurde in *HeLa*-Zellen getestet, indem die Zellen zweimal im Abstand von 24 h jeweils mit beiden siRNA-Oligonukleotiden inkubiert wurden (2.7.1.7). Nach weiteren 24 h wurde ein Ansatz mit dem FLAG-B55 α -Konstrukt transfiziert (2.7.1.3), um die Resistenz der rekombinanten Untereinheit gegenüber den RNAi-Oligonukleotiden zu kontrollieren. Abbildung 3.3 zeigt den Nachweis der endogenen und rekombinanten B55 α -Untereinheit aus Lysat in Kontrollzellen und von den oben beschriebenen transfizierten Zellen 48 h nach der letzten Transfektion. Es ist eine deutliche Reduktion der Expression von endogenem B55 α zu erkennen (~96%), was durch die Expression der rekombinanten Untereinheit noch verstärkt wird (*rescue*).

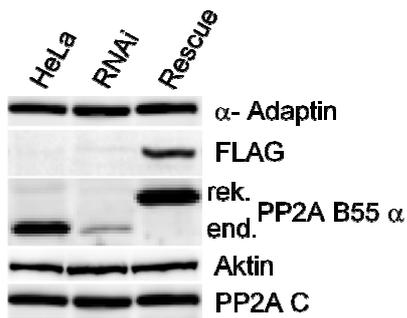


Abbildung 3.3: Nachweis der endogenen B55 α Suppression durch RNAi. Zellysate wurde aus unbehandelten *HeLa*-Zellen (linke Spur), wie auch aus -für endogenes B55 α - durch RNAi supprimierten Zellen (mittlere Spur) und zusätzlich mit rekombinanten B55 α transfizierten Zellen (rechte Spur) mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulose übertragen. Der Nachweis mit einem B55 α spezifischem Antikörper belegt die Herabregulation der Untereinheit sowie die Expression des rekombinanten, RNAi-insensitiven Proteins (in Spur 3). Ebenfalls erfolgreich war die Detektion mittels FLAG-Antikörper. Die Darstellung von α -Adaptin, PP2A_C und Aktin dient dem Nachweis gleicher Proteinmengen.

3.1.3 Nachweis der rekombinanten B55 α -Untereinheit in PP2A

Nachdem der Nachweis der Expression des FLAG-B55 α Proteins erbracht werden konnte, musste sichergestellt werden, dass die rekombinante Untereinheit Teil eines PP2A Holoenzym werden kann. Dazu wurden *HeLa*-Zellen mit dem Konstrukt transfiziert und 48 h später mittels Microcystin-LR-Agarose ein *Pull-down* der katalytischen C-Untereinheit der PP2A aus dem Zytosol dieser Zellen durchgeführt. Microcystin-LR ist ein von Cyanobakterien produziertes Oligopeptid, welches das katalytische Zentrum der Proteinphosphatasen PP1 und PP2 bindet und diese so inhibiert. Gekoppelt an Agarose lassen sich die katalytischen Untereinheiten der Phosphatasen, sowie deren Bindungspartner präzipitieren. Wie in Abbildung 3.3 gezeigt, konnte im Westernblot neben den A- und C-Untereinheiten der PP2A auch die endogene und rekombinante B55 α Untereinheiten detektiert werden, was auf einen Einbau der rekombinanten Untereinheit in das PP2A-Holoenzym schließen lässt.

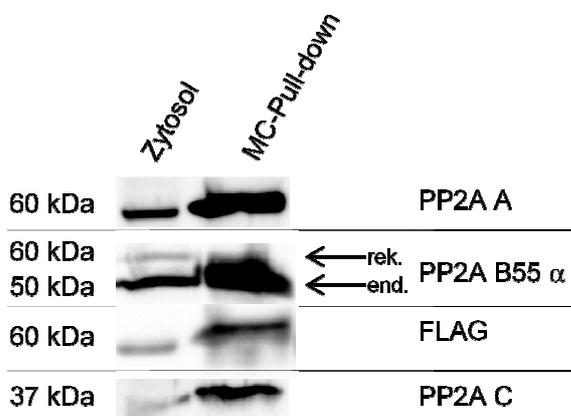


Abbildung 3.4: Nachweis des Einbaus von FLAG B55 α in ein PP2A Holoenzym. *HeLa*-Zellen wurden mit FLAG B55 α transient transfiziert. 48 h später erfolgte die Präparation von Zytosol und die Präzipitation der PP2A durch den immobilisierten Inhibitor der katalytischen C-Untereinheit, Microcystin-LR-Agarose. Ein Aliquot des Zytosols (linke Spur) und des Präzipitats (rechte Spur) wurde im Westernblot mit Antikörpern gegen alle Untereinheiten der PP2A und gegen den FLAG-Tag inkubiert. Die Anreicherung der rekombinante B55 α - Untereinheit in der rechten Spur zeigt den Einbau der rekombinanten Untereinheit in ein PP2A Holoenzym.

3.1.4 *In vivo* Nachweis der μ 2-Dephosphorylierung durch PP2A

In Vorarbeiten zu dieser Arbeit konnte ein PP2A Holoenzym aus Schweinehirn isoliert werden, welches die μ 2-Untereinheit von AP2 dephosphoryliert. Das Enzym hatte die Zusammensetzung $A\beta$, B55 α , C β (Ricotta *et al.* 2008). Da die B-Untereinheit die Substratspezifität vermittelt, sollte die siRNA-bedingte Herabregulierung von B55 α zu einem erhöhten Verhältnis phospho-Thr156/ Thr156 führen. Das Verhältnis bei RNAi-Behandlung und gleichzeitiger Expression der RNAi-insensitiven FLAG B55 α -Untereinheit (*rescue*) sollte hingegen dem Status der unbehandelten Kontrolle entsprechen. Nachdem Zellen mit [32 P]- Orthophosphat inkubiert, deren Lysat präpariert und anschließend daraus AP2 immunisoliert wurde (2.6.9), konnte im Autoradiogramm in B55 α supprimierten Zellen eine um 100% erhöhte Phosphorylierung von μ 2 nachgewiesen werden. Durch Expression der rekombinanten Untereinheit in diesen Zellen wurde der Phosphorylierungsstatus von μ 2 dem der unbehandelten Zellen wieder angeglichen. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass die rekombinante Untereinheit die Funktion der endogenen Untereinheit übernehmen kann.

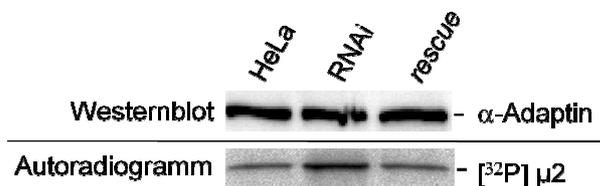


Abbildung 3.5: Der Phosphorylierungsstatus von μ 2 ist abhängig von der B55 α Expression. Gleiche Mengen von [32 P]-Orthophosphat markiertem AP2 (siehe Westernlot in der oberen Spur) wurden aus Kontroll-*HeLa*-Zellen (Spur 1), B55 α *knock-down* Zellen (Spur 2), sowie aus *rescue* Zellen (RNAi und Überexpression von FLAG-B55 α ; Spur 3) immunpräzipitiert. Im Autoradiogramm (untere Spur) konnte eine doppelt so starke Phosphorylierung von μ 2 in den RNAi Zellen detektiert werden. Die Expression der rekombinanten Untereinheit hebt diesen Effekt auf.

Auch ein Einfluss auf die Phosphorylierung der μ 1 Untereinheit von AP1 konnte festgestellt werden, indem immunisoliertes AP1 mit zytosolischen Extrakten inkubiert wurde (Abbildung 3.6).

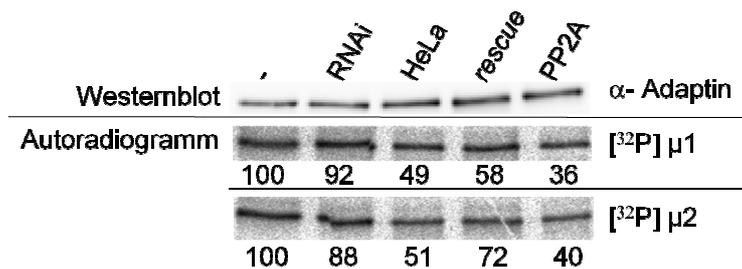


Abbildung 3.6: Die μ 1 Untereinheit von AP1 ist ebenfalls Substrat von PP2A. Gleiche Mengen von [³²P]-Orthophosphat markiertem und anschließend immunpräzipitiertem AP1 und AP2 wurden mit Zytosol aus *HeLa*-, RNAi- und *rescue*- Zellen sowie gereinigter, kommerziell erworbener PP2A inkubiert. Während das aus den RNAi Zellen präparierte Zytosol nicht effektiv in der Lage war die μ -Untereinheiten zu dephosphorylieren, wird durch die Überexpression von FLAG B55 α der Zustand des Wildtyps wieder annähernd erreicht (Vergleich Spuren 3 und 4). Die Inkubation von AP1 und AP2 mit einem gewerblich vertriebenen PP2A-Holoenzym zeigt eine effektive Dephosphorylierung beider μ -Untereinheiten (Spur 5).

3.1.5 Lokalisationsstudie mittels Immunfluoreszenz

Die bereits beschriebenen Experimente mit isolierter PP2A und die Suppression von B55 α in *HeLa*-Zellen zeigten, dass die Phosphatase die Dephosphorylierung der μ -Untereinheiten von AP1 und AP2 katalysieren kann. Durch Analysen von Immunpräparaten sollte der Effekt von RNAi vermittelter Suppression von B55 α auf die zelluläre Lokalisation von AP2, Clathrin und den Transferrin-Rezeptor untersucht werden. Dazu wurden *HeLa*-Zellen, wie unter 3.1.2 beschrieben, mit siRNA-Oligonukleotiden transfiziert und nach 72 h Immunpräparate angefertigt. Die Detektion der endogenen Proteine wurde durch spezifische Antikörper vorgenommen (2.7.4). Die Markierung der Plasmamembran-ständigen Transferrinrezeptoren wurde durch Inkubation der Zellen auf Eis mit Fluorochrom-gekoppeltem Transferrin erreicht (2.7.4.1). Es konnte eine Zunahme des an der Zelloberfläche lokalisierten Transferrin-Rezeptors um ~100% (Abbildung 3.7 A/ B), sowie eine erhöhte Anzahl von *clathrin-coated-pits* (CCPs) an der Plasmamembran, repräsentiert durch AP2 (Abbildung 3.7 C/ D) festgestellt werden. Auch die Färbung des CCV-Hüllproteins Clathrin deutet auf eine Erhöhung der Anzahl von CCPs an der Zellmembran und am TGN (Abbildung 3.7 E/ D) hin. Daraus kann geschlossen werden, dass die durch B55 α RNAi verstärkt auftretende Phosphorylierung von μ 2 zu einer regulatorischen Störung von AP2 führt, der eine Fehlsortierung von Frachtmolekülen und eine verstärkte Rekrutierung von Clathrin zur Folge hat. Die Akkumulation von Clathrin am TGN bei *knockdown* von B55 α deutet auf vergleichbare Konsequenzen durch Beeinflussung der μ 1-Phosphorylierung hin.

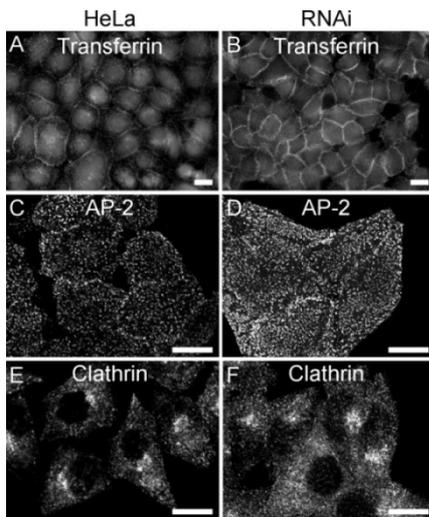


Abbildung 3.7: Die Herabregulierung von B55 α beeinflusst die Bildung von Clathrin-coated pits. HeLa-Zellen (A,C,E) und PP2A B55 α RNAi-Zellen (B,D,E) wurden auf Eis mit Alexa546-konjugiertem humanen Transferrin inkubiert, um die Transferrinrezeptoren an der Plasmamembran zu detektieren (A, B). Es konnte eine intensivere Färbung in RNAi-Zellen beobachtet werden, was auf eine erhöhte Anzahl von Rezeptoren zurückzuführen ist. Außerdem war eine Zunahme der punktförmigen Strukturen der beiden CCV-Proteine AP2 (C, D) und Clathrin (E, F) festzustellen, die auf eine Beeinflussung der Regulation bei der Bildung von CCVs hindeutet.

Der Nachweis von PP2A an Orten der Vesikelbildung sollte in den folgenden Lokalisierungsstudien gezeigt werden. Allerdings ergab die Detektion der endogenen A-, C- und B55 α -Untereinheiten in Immunfärbungen keine spezifisch angefärbten Strukturen, was einerseits auf die hauptsächlich zytosolische Lokalisation der PP2A zurückzuführen sein kann, andererseits aber auch an der Qualität der Antikörper liegen kann. Durch die Transfektion des oben beschriebenen rekombinanten B55 α Konstrukts und anschließender Detektion mittels unterschiedlicher FLAG-Antikörper konnte dieses Problem nicht behoben werden. Aus diesem Grund wurde die B55 α kodierende Sequenz in den pEYFP-C1 Vektor kloniert, um ein N-terminal YFP-markiertes Fusionsprotein zu generieren (Abbildung 3.9A). In den folgenden Experimenten wurde dieses nach transienter Transfektion in HeLa-Zellen expremiert. Der Nachweis der Integration dieser B55 α -Variante in ein PP2A Holoenzym konnte durch einen Microcystin-LR-Agarose *Pull-down* gezeigt werden (Abbildung 3.8).

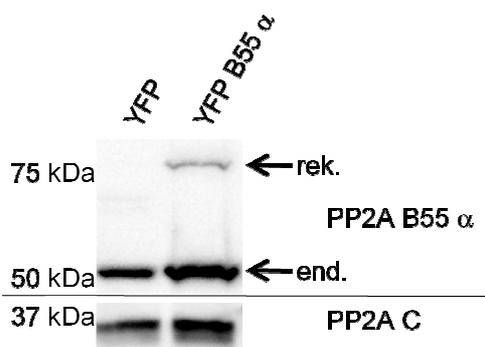


Abbildung 3.8: YFP-B55 α ist Teil eines PP2A Holoenzym. HeLa Zellen wurden transient mit YFP oder einer N-terminal YFP-fusionierten B55 α Untereinheit transfiziert. Nach Zellaufschluss in PBS und Zytosol-Membran-Fraktionierung wurde das gewonnene Zytosol mit Microcystin-LR-Agarose versetzt und die Untereinheiten im Westernblot nachgewiesen. In der rechten Spur wird durch das Signal bei ~80 kDa deutlich, dass YFP-B55 α in ein Holoenzym integriert ist. In der Kontrolle ist dieses Signal nicht vorhanden (linke Spur).

Der Gebrauch der autofluoreszierenden YFP-Markierung der B55 α Untereinheit macht die Immunfärbung dieses Proteins in einer Immunfluoreszenz überflüssig (Verkhusha und Lukyanov 2004). Nach der Präparation von YFP-B55 α transfizierter Zellen und Färbung von AP2 (2.7.4) wurden die Zellen unter einem konfokalen Mikroskop untersucht. Abbildung 3.9B zeigt Aufnahmen der Lokalisation des YFP-Fusionsproteins und AP2. Die zytosolische Verteilung der rekombinanten Phosphatase-Untereinheit unterscheidet sich nicht von der Verteilung des YFP (Abbildung 3.9C). In den Überlagerungen (rechte Spalte) lässt sich keine Ko-Lokalisation mit den durch AP2 angefärbten endozytotischen Strukturen feststellen.

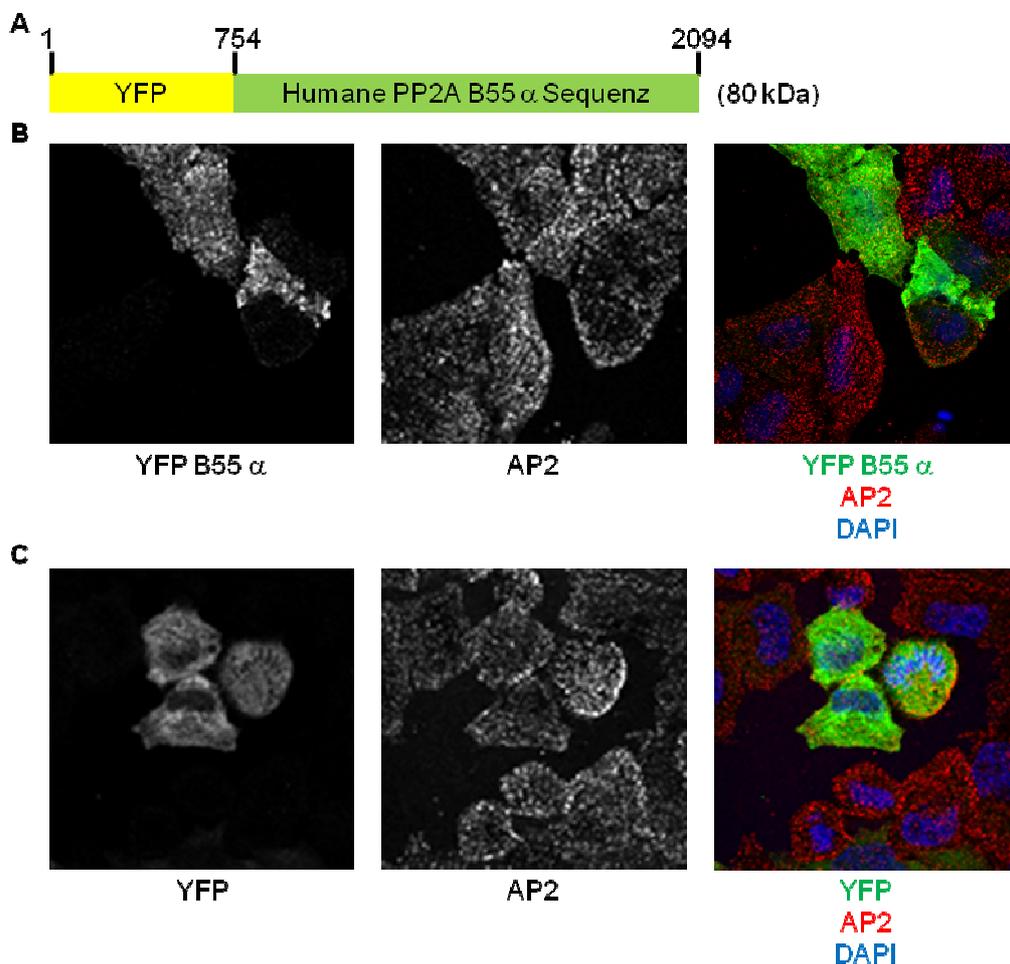


Abbildung 3.9: Schematische Darstellung und subzelluläre Lokalisation des YFP-B55 α Fusionsproteins. A. Aufbau des YFP-B55 α Konstrukts. B/C. *HeLa*-Zellen wurden 24 h nach Transfektion mit YFP-B55 α / YFP fixiert und anschließend AP2 immungefärbt. Die Analyse mittels konfokaler Mikroskopie zeigt eine deutliche Färbung von *Clathrin-coated-pits* und eine zytosolische Verteilung, sowohl von YFP, als auch dem Fusionsprotein. Eine Ko-Lokalisation ist somit nicht nachweisbar.

Dieses Ergebnis gleicht dem oben beschriebenen Problem, das bei der Verwendung von Antikörper zur PP2A-Detektion auftrat. Es bleibt die Schlussfolgerung, dass nur ein geringer Anteil der zellulären Phosphatase für die Dephosphorylierung von AP2 rekrutiert wird, wodurch sich keine klaren Strukturen in der Immunfluoreszenz abheben können.

3.1.6 Nachweis einer möglichen Bindung von AP2 an PP2A

Die zuvor gezeigte Immunfluoreszenz erwies sich als ungeeignet, um PP2A, bzw. die YFP-markierte B55 α -Untereinheit in AP2 positiven *Clathrin-coated-pits* nachzuweisen. Als Alternative sollte daher versucht werden, ob durch Ko-Immunpräzitationen eine direkte oder indirekte Bindung von PP2A an AP2 aufgezeigt werden kann. Dazu wurde AP2 aus verschiedenen Zelllinien immunisoliert und im anschließenden Westernblot versucht, die Untereinheiten der PP2A im Präzipitat nachzuweisen. Wie in Abbildung 3.10, am Beispiel von HEK293TN Zellen gezeigt, war dies nicht möglich. Auch die Variation der Versuchsbedingungen, wie Pufferbedingungen und Zellaufschluss mittels verschiedener Verfahren, führte nicht zu einem Erfolg.

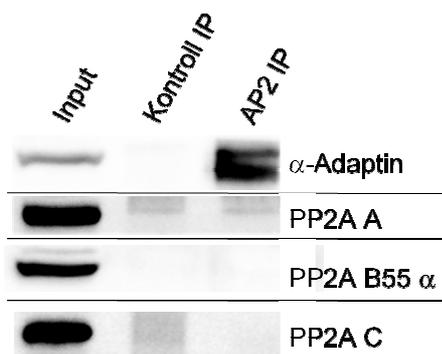


Abbildung 3.10: Immunpräzitation von AP2 mit anschließendem Nachweis der PP2A Untereinheiten. HEK293TN Zellen wurden in 0,3% Triton X-100 haltigem Puffer B lysiert, um das Lysat anschließend mit Antikörpern und Protein-A-Agarose zu inkubieren. Die Detektion der PP2A Untereinheiten im Western Blot war in den Präzipitaten nicht erfolgreich (Spur 2/ 3). Der Nachweis von α -Adaptin in Spur 3 hingegen zeigt die erfolgreiche AP2-Präzitation.

Die Präzitationen mittels Antikörpern gegen die PP2A A und C-Untereinheiten mit anschließendem Nachweis von AP2 (α -Adaptin) waren ebenfalls nicht erfolgreich (Abbildung 3.11).

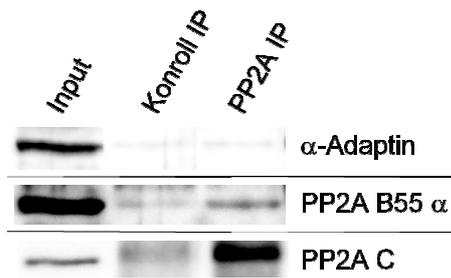


Abbildung 3.11: AP2 ko-präzipitiert nicht mit PP2A C / PP2A A. *HeLa*-Zellen wurden in Puffer B aufgeschlossen, Zytosol isoliert und dieses anschließend mit Antikörpern gegen PP2A_A und PP2A_C, sowie Kaninchen IgG (Kontrolle) versetzt. Der Nachweis von PP2A im Zytosol (Spur 1) und in der Präzipitation (Spur 3) bestätigte den Erfolg des Pulldowns. Die Detektion von α -Adaptin in den Präzipitaten verlief allerdings negativ (Spur 2/3).

Durch die Generierung der FLAG-getaggtten B55 α Untereinheit war es uns nun auch möglich, durch eine anti FLAG-Immünpräzipitation die B-Untereinheit zu isolieren. In Abbildung 3.12 ist ein Westernblot nach erfolgter B55 α -Isolierung dargestellt. Das Präzipitat enthält die rekombinante, wie auch die beiden PP2A-core Untereinheiten. Die endogene B55 α Untereinheit hingegen wurde nicht präzipitiert. Allerdings blieb der Nachweis von α -Adaptin im Präzipitat erneut aus. Der fehlende Nachweis der Bindung von PP2A an AP2 könnte bedeuten, dass diese in der Tat nicht existiert, instabil, oder aber nur sehr kurzlebig ist. Im ersten Fall wird vermutlich ein anderes Protein die Phosphatase in räumliche Nähe zu AP2 bringen. Einen möglichen Hinweis auf die Kurzlebigkeit der Interaktion geben die Kristallstrukturen von AP2 und die Erkenntnisse um die Funktion der μ 2-Phosphorylierung. Da durch die Phosphorylierung eine stabilisierende Wirkung auf die offene Konformation bewirkt wird, führt die Dephosphorylierung zu einer Destabilisierung. In der geschlossenen Konformation besitzt μ 2, besonders in der um die Phosphorylierungsstelle befindliche *Linker*-Region, keine geordnete Struktur, die womöglich nicht mit PP2A interagieren kann. Die offene Konformation hingegen weist in der μ 2-*Linker*-Region eine 4fach gewundene Helix auf (Abbildung 1.7). Falls durch eine Konformationsänderung keine Interaktion zwischen AP2 und der Phosphatase stattfinden kann, würde die PP2A nach erfolgter Dephosphorylierung sofort von AP2 abdissoziieren.

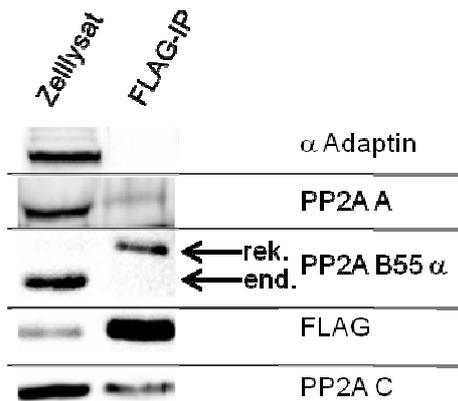


Abbildung 3.12: Anti FLAG Immunpräzipitation mit anschließendem Nachweis der PP2A Untereinheiten und α -Adaptin. *HeLa*-Zellen wurden mit FLAG-PP2A B55 α transfiziert und nach 48 h in PBS mit 0,1% Triton X-100 aufgeschlossen. Nach FLAG-Immunpräzipitation erfolgte die Detektion der gefällten Proteine im Westernblot. Ein Aliquot des Zell-Lysats diente der Kontrolle (Spur 1). Im Präzipitat (Spur 2) konnte, neben PP2A A und C, die rekombinante, nicht aber die endogene B55 α Untereinheit nachgewiesen werden. Die Detektion von α -Adaptin im Präzipitat war nicht möglich.

3.2 Analyse von Clathrin-umhüllten Vesikeln (CCVs)

Die zuvor dargestellten Ergebnisse zeigen, dass ein PP2A Holoenzym mit B55 α die μ 2 Untereinheit von AP2 dephosphorylieren kann. AAK1, die μ 2-spezifische Kinase lokalisiert mit AP2 an CCPs (Conner und Schmid 2002) und wird durch Clathrin stimuliert (Conner *et al.* 2003), was zur Stabilisierung der offenen Konformation von AP2 beisteuert. Dies sorgt für eine verstärkte Membranbindung. Die daraus resultierende Frage, ob die PP2A bei der Bildung eines CCVs bereits in ein solches integriert wird, oder erst später, im Zuge des *uncoatings* der Clathrinhülle, rekrutiert wird, soll im Folgenden beantwortet werden.

3.2.1 Nachweis von PP2A in CCVs

Bislang konnte gezeigt werden, dass PP2A die Dephosphorylierung von μ 1 und μ 2 katalysieren kann, aber weder eine Ko-Präzipitation, noch eine Ko-Lokalisierung war möglich. Die für die Reaktion nötige Interaktion muss an Vesikeln stattfinden, was die Frage aufwarf, ob PP2A Untereinheiten in CCVs nachweisbar sind. Um dies zu klären, wurden CCVs aus Schweinehirn aufgereinigt (2.6.11) und deren Protein-Bestandteile anschließend durch SDS-PAGE aufgetrennt. Durch Nachweis der PP2A-Untereinheiten im Westernblot (Abbildung 3.13) konnte gezeigt werden, dass alle 3 Untereinheiten der PP2A in den gereinigten CCVs vorhanden sind.

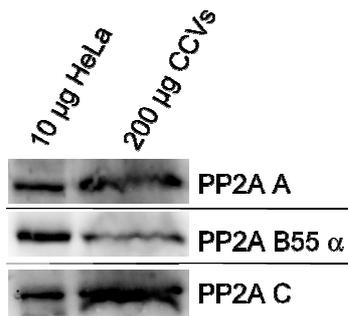


Abbildung 3.13: PP2A ist Teil des CCV-Proteoms. 10 µg Zytosol aus *HeLa*-Zellen (linke Spur) und 200 µg gereinigte CCVs (rechte Spur) wurden verwendet, um im Westernblot zu zeigen, dass PP2A Untereinheiten Teil des CCV-Proteoms sind.

3.2.2 Quantifizierung der PP2A Untereinheiten in CCVs

AP2 und Clathrin machen mengenmäßig ~50% des Gesamtproteinanteils von CCVs aus. Für ein Enzym, wie PP2A, ist zu erwarten, dass es in erheblich geringeren Konzentrationen in CCVs vorkommt. Dies sollte mit Hilfe von "quantitativen Westernblots" genauer analysiert werden, wobei rekombinant exprimierte Untereinheiten der PP2A als Proteinstandards dienen sollten. Daher wurde ein weiteres Plasmid zur bakteriellen Expression einer 6xHistidin-markierten katalytischen C α Untereinheit generiert. Die Plasmide, kodierend für GST-PP2A B55 α und GST- PP2A A α (Abbildung 3.14) waren bereits vorhanden, bzw. wurden von Professor Shi bereitgestellt.

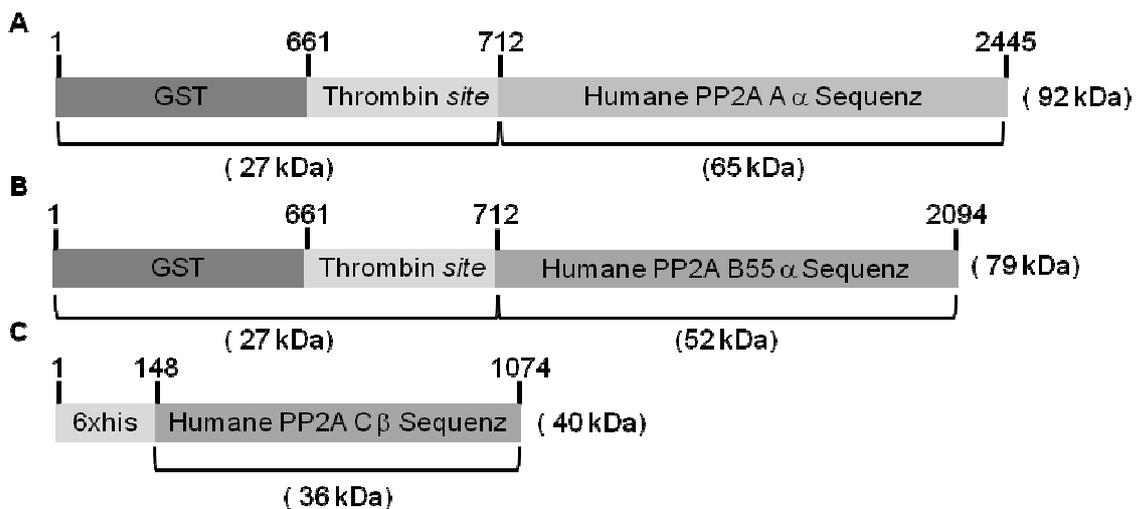


Abbildung 3.14: Schematische Darstellung von bakteriell exprimierten PP2A Untereinheiten. Die Abbildung stellt die Strukturen der PP2A-Fusionsproteine dar. Die Zahlenangaben beziehen sich auf die jeweiligen Nukleotidpositionen. Außerdem sind die Molekulargewichte der exprimierten Proteine angegeben.

Die Expression und Reinigung der rekombinanten Proteine erfolgte wie in 2.2.16-18 beschrieben. Für die Quantifizierung war es im Fall der A-Untereinheit möglich, den GST-Tag mit Thrombin proteolytisch abzuspalten. Versuche die B-Untereinheit von dem GST abzuspalten waren nicht erfolgreich. Das Molekulargewicht der 6xHistidin-markierten C-Untereinheit unterscheidet sich nur geringfügig vom endogenen Protein (siehe Abbildung 3.14C/ 3.15).

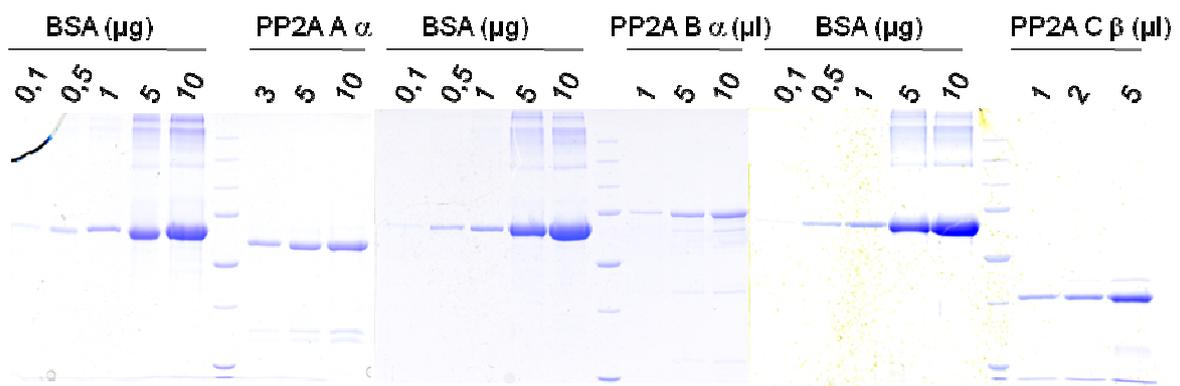


Abbildung 3.15: Coomassiegele zur Quantifizierung der gereinigten PP2A Untereinheiten. Die gereinigten rekombinanten PP2A Untereinheiten wurden in verschiedenen Mengen neben eine Konzentrationsreihe von BSA auf ein SDS Gel aufgetragen. Nach Coomassiefärbung der Gele wurde die Reinheit der gereinigten Proteine kontrolliert und die enthaltenen Proteinmengen anhand der BSA Reihe bestimmt.

Die Konzentration der aufgereinigten Proteine wurde sowohl mit der Bradford-Proteinbestimmung (2.6.2), als auch unter Zuhilfenahme einer BSA-Standardreihe (Abbildung 3.15) bestimmt (Tabelle 3-1) und daraus ein Mittelwert gebildet.

Tabelle 3-1: Bestimmung der Proteinkonzentrationen der gereinigten PP2A Untereinheiten. Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen von gereinigten PP2A Untereinheiten wurde mittels Bradford-Proteinbestimmung und densitometrischer Auswertung der Coomassiegele (Abb. 3.15) durchgeführt. Die berechneten Mittelwerte waren Ausgangspunkt für die weiteren Versuche.

	PP2A A α	PP2A B55 α	PP2A C β
Bradford ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	0,33	0,19	0,47
Coomassie ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	0,33	0,18	0,45
Mittelwert ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	0,33	0,19	0,46

Mit der Kenntnis der Proteinkonzentrationen konnten Westernblots angefertigt werden (Abbildung 3.16), um eine quantitative Analyse der PP2A Untereinheiten in CCVs zu ermöglichen. Jeder Westernblot enthielt jeweils eine Konzentrationsreihe

von gereinigten CCVs (25, 50, 100 μg) und eine zweite Konzentrationsreihe mit einer der rekombinanten PP2A Untereinheiten.

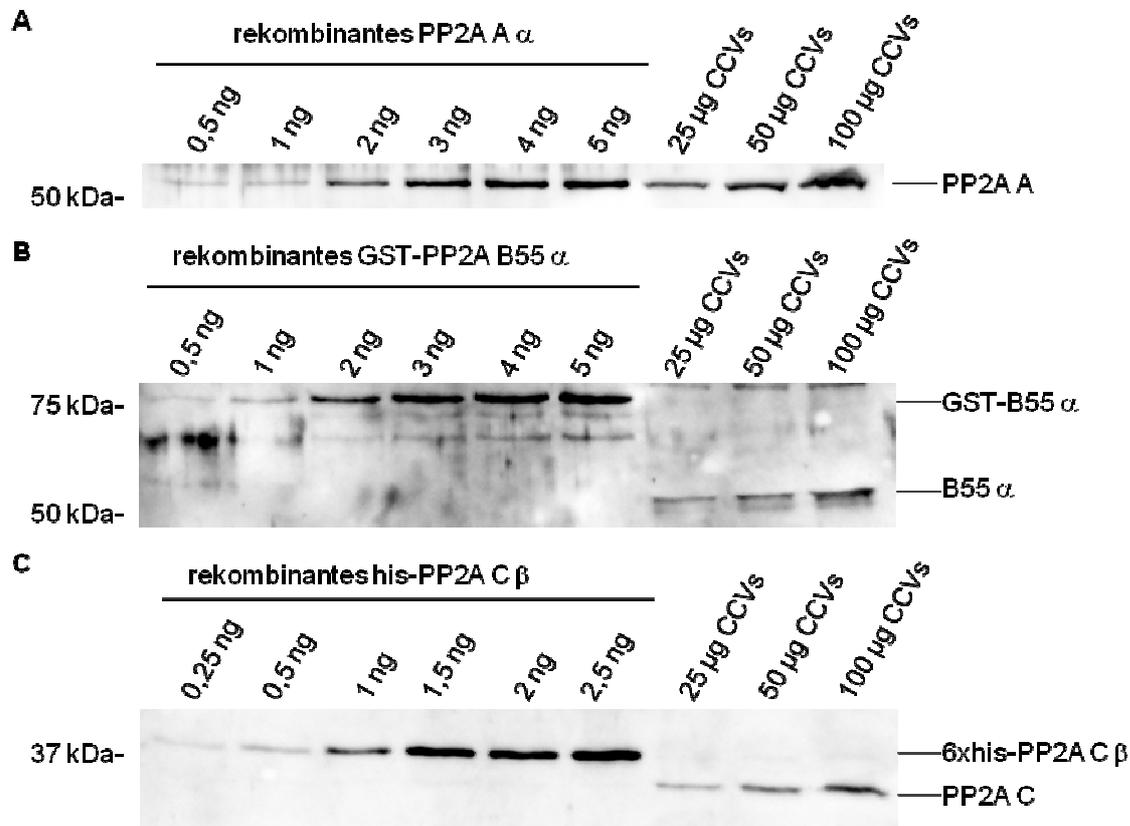


Abbildung 3.16: Quantitative Analyse der PP2A Untereinheiten in CCVs. SDS-Gele wurden mit je 25, 50 und 100 μg gereinigten CCVs, sowie definierten Mengen rekombinanter PP2A Untereinheiten beladen, diese nach Gelelektrophorese auf Nitrozellulose übertragen und mit Antikörpern die entsprechenden Proteine detektiert.

Die densitometrische Auswertung ergab die in Tabelle 3-2 dargestellten Proteinmengen, bezogen auf jeweils 1 mg CCVs. Die Bestimmung wurde für alle Untereinheiten mindestens zweimal durchgeführt und anschließend der Mittelwert gebildet (Tabelle 3-2).

Tabelle 3-2: Ergebnisse der Quantifizierung der rekombinanten PP2A Untereinheiten in CCVs. Die quantitative Analyse der Westernblots wurde für die 3 PP2A Untereinheiten 2-, bzw. 3- mal durchgeführt und ein Mittelwert gebildet, der die Proteinmenge rekombinantes Protein (ng)/ mg CCVs angibt.

	PP2A A	GST-PP2A B55 α	6xhis-PP2A C
Quantifizierung 1 (ng/ mg CCVs)	40	25	13
Quantifizierung 2 (ng/ mg CCVs)	28	19	21
Quantifizierung 3 (ng/ mg CCVs)	62	48	-
Mittelwert (ng/ mg CCVs)	43	31	17

Daraus wurden mit Hilfe der Molekulargewichte der rekombinanten Proteine die Stoffmengen der Untereinheiten bestimmt (2.6.26). Es lässt sich eine molare Verteilung der 3 Untereinheiten von ca. 400- 660 fmol/ mg CCVs kalkulieren, wobei PP2A B55 α und C annähernd stöchiometrisch vorliegen. Unter Berücksichtigung der Molekulargewichte der endogenen Untereinheiten, konnten so die in einem mg CCVs enthaltenen Mengen der Untereinheiten berechnet werden (siehe Tabelle 3-3 / Abbildung 3.17).

Tabelle 3-3: Berechnung des molaren Anteils der PP2A in CCVs.

	PP2A A	PP2A B55 α	PP2A C
Quantifizierte Menge (ng) rekombinantes Protein/ mg CCVs	43	31	17
Molekulargewicht Fusionsprotein (kDa)	65	79	40
fmol Protein/ mg CCVs	662	392	425
Molekulargewicht endogenes Protein (kDa)	65	52	36
ng endogenes Protein/ mg CCVs	43	20	15

Pro mg CCVs beträgt die Menge PP2A Holoenzym, ausgegangen von den berechneten Stoffmengen, zwischen 61 und 100 ng, was ca. 1/10.000 der CCV-Proteine ausmacht.

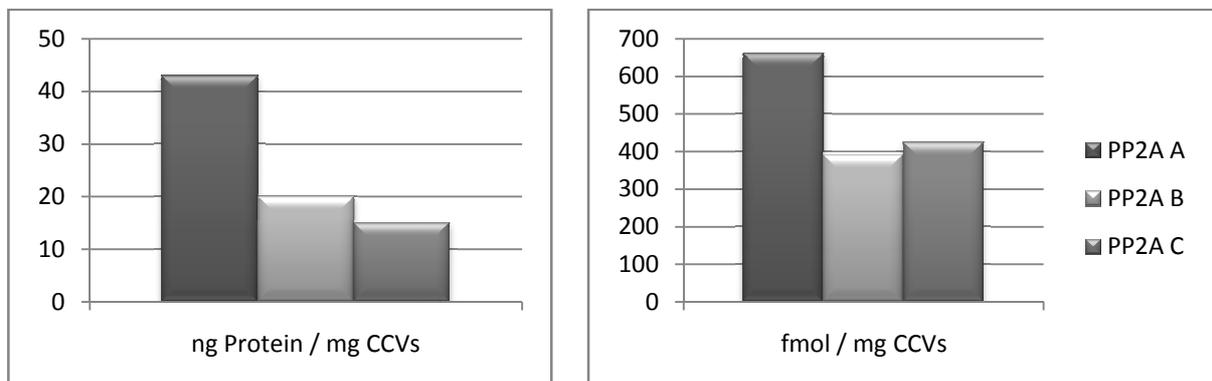


Abbildung 3.17: Grafische Darstellung der PP2A Quantifizierung in CCVs. Die berechneten Werte aus Tabelle 3-3 verdeutlichen in der graphischen Darstellung eine annähernd äquivalente Stoffmengenkonzentration der einzelnen Untereinheiten. Obwohl die verwendeten Methoden -einzeln betrachtet- relativ unpräzise sind, ergibt sich ein schlüssiges Gesamtbild, die drei Untereinheiten scheinen demnach in gleicher Anzahl in CCVs vorzuliegen.

3.2.3 CCV-uncoating

Eine weitere Frage war, ob die Verteilung der PP2A Untereinheiten beim *uncoating* eines CCVs ähnlich der von AP2 und Clathrin ist, oder ob sie am Vesikel haften

bleiben. In der lebenden Zelle wird dieser Vorgang enzymatisch durch die Rekrutierung von HSC70 und Auxilin induziert (Morgan *et al.* 2001). Die Induktion des *uncoatings* kann biochemisch an gereinigten CCVs entweder durch die Inkubation mit 0,5 M Tris pH 7.5 (2.6.13), oder auf dem enzymatischen Weg durch das Hinzufügen von rekombinantem HSC70 und Auxilin sowie ATP eingeleitet werden. In dieser Arbeit wurden sowohl das Tris induzierte, wie auch das durch rekombinantes Protein eingeleitete *uncoating* verwendet. Für die Expression von HSC70 wurde die kodierende Sequenz mit den Restriktionsenzymen NdeI und HindIII aus dem pRSET-A Vektor herausgetrennt und in den pET28a Vektor transferiert (Abbildung 7.3). Dieser Schritt war nötig, weil keine Proteinexpression nach Transformation des pRSET-A Vektors und anschließender Induktion detektierbar war. Eine Präparation der beiden Proteine aus 400 ml Kulturmedium, wie in Scheele *et al.* 2001 und Wilbanks *et al.* 1994 beschrieben, ergab eine Proteinausbeute von ~15 mg HSC70, bzw. ~7 mg Auxilin (Abbildung 3.18).

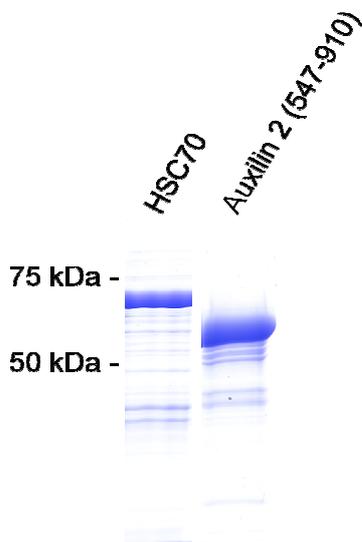


Abbildung 3.18: Gereinigte rekombinante Uncoating ATPase (HSC70) und Auxilin 2 (547-910). Die Proteine wurden in *E.coli* BL21 (DE3) exprimiert, aufgereinigt und Aliquots der Eluate auf einem SDS-Gel aufgetrennt, um die Qualität zu überprüfen.

In Abbildung 3.19A ist der Vergleich beider *uncoating*-Methoden wiedergegeben. Anders als zu erwarten war, verblieb nach dem Abfallen der Clathrinhülle -in beiden Methoden- die katalytische C-Untereinheit im Pellet und war damit nicht mit den Hüllproteinen von der Vesikelmembran „abgefallen“. Im Überstand hingegen ist kein Signal zu detektieren (wie für α Adaptin, repräsentativ für den AP2 Komplex). Die A und B55 α Untereinheiten der PP2A lösen sich hingegen teilweise vom Vesikel und

finden sich im Überstand wieder. Anzumerken ist, dass nach längerer Lagerung der CCVs bei -80°C das Verhalten der A-Untereinheit verändert war (Vergleich A und B).

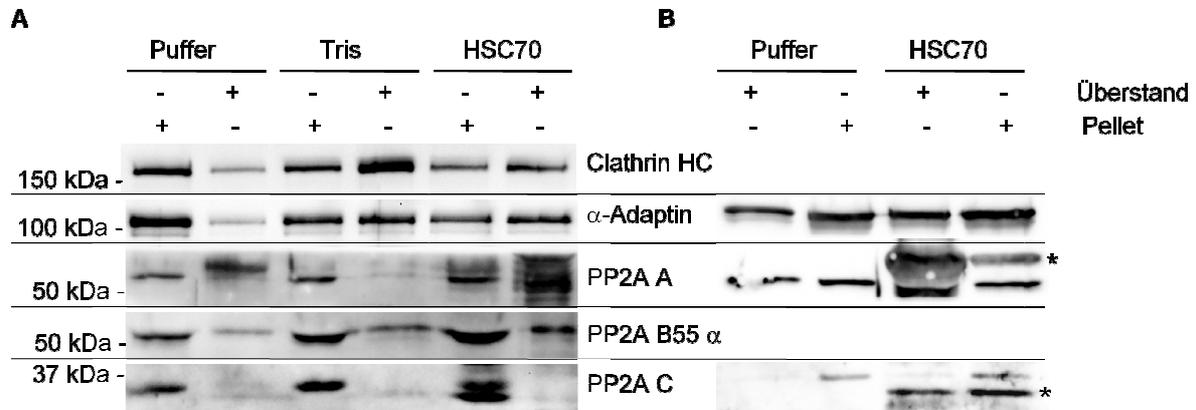


Abbildung 3.19: Uncoating von CCVs durch Inkubation mit Tris oder HSC70 / Auxilin2. Gleiche Mengen gereinigter CCVs wurden entweder für 4 h bei 4°C in 0,5 M Tris pH 7,5 oder für 30 min bei 37°C in Anwesenheit von HSC70, Auxilin und ATP in „uncoating“-Puffer inkubiert. Als Kontrolle diente die Inkubation einer äquivalenten Menge CCVs in reinem „uncoating“-Puffer. Dann folgte eine Ultrazentrifugation für 20 min, um die abgelösten Hüllproteine von den Vesikeln zu trennen, die im Pellet verweilen. Das Pellet wurde anschließend in der dem Überstand entsprechenden Menge Puffer resuspendiert. Auf den Westernblots ist zu erkennen, dass sich neben Clathrin und α -Adaptin auch B55 α vom Vesikel löst. Die PP2A C-Untereinheit hingegen verbleibt im Pellet. Für die A-Untereinheit ergibt sich ein differenziertes Bild (Vergleich A und B). In frisch präparierten CCVs löst sich die Untereinheit vom Vesikel (B), während nach längerer Lagerung der Vesikel bei -80°C die Untereinheit mit den Vesikeln präzipitiert. Das *-Symbol markiert unspezifische Signale, die durch die Zugabe der rekombinanten Proteine zu der Reaktion entstehen.

3.2.4 Proteom von CCVs

Eine frühe Idee sah vor, die PP2A aus CCVs aufzureinigen, um die einzelnen Untereinheiten auf mögliche posttranslationelle Modifikationen hin zu untersuchen. Nachdem durch die Quantifizierung der Untereinheiten festgestellt werden musste, dass nur eine äußerst geringe Menge von PP2A Untereinheiten in CCV vorhanden ist, wurde diese Idee, mögliche Modifikationen mittels Massenspektroskopie nachzuweisen verworfen. Ein weiteres Ziel der Arbeit war die Untersuchung des Rekrutierungsmechanismus der PP2A in CCVs, bzw. zu AP2/ μ 2. Die Beantwortung dieser Frage setzte allerdings voraus die Proteinbestandteile von CCVs zu kennen, da nur mit Hilfe des Proteoms eine Verbindung zwischen der Phosphatase und dem gesuchten Protein, das für die Rekrutierung verantwortlich ist, hergestellt werden kann. Zwar gab es diesem Zeitpunkt bereits 3 verschiedene Proteomanalysen von CCVs aus *HeLa*-Zellen (Borner *et al.* 2006), Ratten-Hirn (Blondeau *et al.* 2004) und Ratten-Leber (Girard *et al.* 2005), die aber nicht vollständig sind (z.B. fehlt PP2A). Aus diesem Grund wurde mit Hilfe des ZMMKs ein weiteres Proteom aus gereinigten

Schweinehirn-CCVs analysiert, da -durch technische Fortschritte bedingt- heute eine erhöhte Sensitivität der Massenspektrometer möglich ist. In Abbildung 3.20 ist das SDS-PAGE-Profil von 40 und 200 μg Schweinehirn-CCVs dargestellt. Die rechte Spur wurde in 18 Teile fragmentiert, die anschließend einzeln tryptisch verdaut wurden, um die entstandenen Peptide mittels LC-MS/MS-Analysen Proteinen zuzuordnen. Die Liste der auf diesem Weg identifizierten Proteine wurde durch Entfernung von allen mit nur einem Peptid identifizierten Proteine beschränkt (siehe 7.2). Ausgenommen davon wurden bereits bekannte CCV-Proteinbestandteile und Transmembranproteine. Damit stand nun eine umfangreiche Tabelle mit bereits bekannten, aber auch einigen neuen CCV-Proteinen zur Verfügung. Insgesamt enthält die Liste 216 Proteine. Darunter sind u.a. 55 integrale Membranproteine, 8 Clathrin-Adaptor-Proteine, 7 Zytoskelett-assoziierte Proteine.

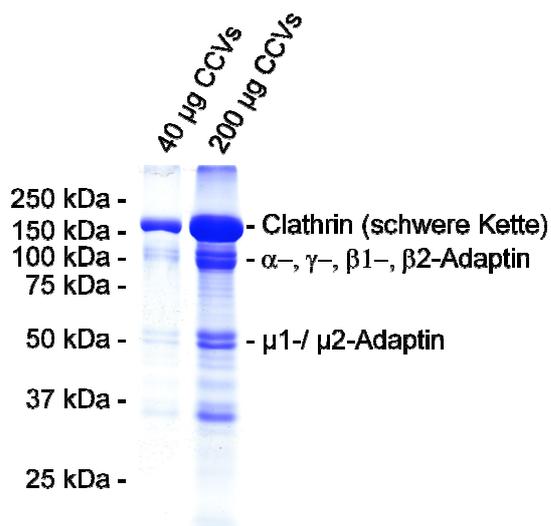


Abbildung 3.20: SDS-PAGE-Profil von CCVs. 40 μg , bzw. 200 μg CCVs wurden auf einem 10%igen SDS-Gel aufgetrennt. Deutlich zu erkennen ist die schwere Kette von Clathrin (180 kDa) und die großen Untereinheiten von AP1 und AP2 (100 kDa), sowie deren μ -Untereinheiten (~50 kDa).

3.2.5 Identifikation von postranslationellen Modifikationen der PP2A in CCVs

Die Inkubation von gereinigten CCVs mit [γ^{32}]-ATP führt im Autoradiogramm zu Signalen bei ~50 kDa, welche der Phosphorylierung der μ -Untereinheiten von AP1 und AP2 zugrunde liegen (nicht veröffentlichte Daten AG Höning), die u.a. durch die ebenfalls in CCVs enthaltene Adaptor-assoziierte Kinase 1 (AAK1) vermittelt wird.

Es bleibt die Frage, warum PP2A nicht in der Lage ist, diesen Phosphorylierungen entgegenzuwirken. Drei mögliche Ursachen sind denkbar. Zunächst wäre es möglich, dass PP2A in den Vesikeln nicht vorhanden ist. Das können wir durch die

vorangegangenen Experimente ausschließen. Die zweite Möglichkeit ist, dass kein PP2A-Holoenzym vorliegt, sondern beispielsweise ein *core*-Enzym (A/C), sowie eine getrennt davon vorhandene B55 α Untereinheit, so dass keine Substraterkennung möglich ist. Einen Hinweis darauf gibt das *uncoating*-Experiment (3.2.3). Die dritte Variante ist eine Inaktivierung der Phosphatase. Durch die Phosphorylierung von Thr307 in der katalytischen Untereinheit wird diese inaktiviert (siehe 1.6.4). Da die C-Untereinheit nicht in der Proteom-Massenanalyse identifiziert wurde, konnte nicht auf diese Daten zurückgegriffen werden. Um der Frage dennoch nachzugehen, wurde ein Westernblot von aufgetrennten CCVs angefertigt, um mit einem phospho-Y307-spezifischen Antikörper die Modifikation nachzuweisen. Wie in Abbildung 3.22 deutlich zu erkennen, ist das von diesem Antikörper erzeugte Signal im Vergleich mit dem *HeLa*-Zellen wesentlich stärker als die vergleichbaren Signale des „total“ PP2A C Antikörpers.

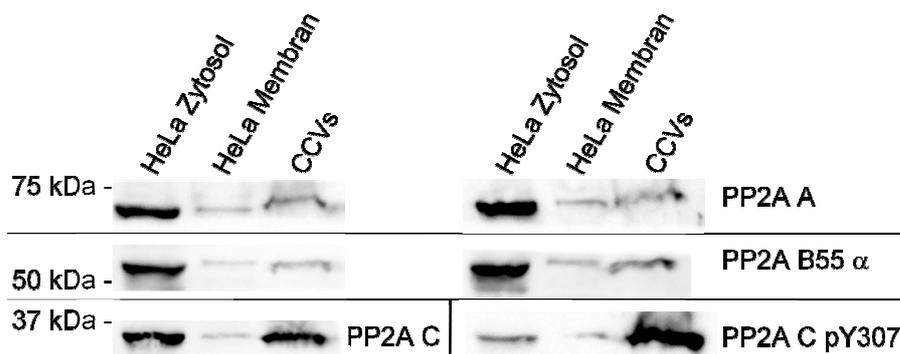


Abbildung 3.21: Nachweis von phosphorylierter PP2A in CCVs. *HeLa*-Zellen wurden in zytosolische und membranäre Teile getrennt und zusammen mit CCVs -in jeweils doppelter Ausführung- nach Auftrennung über eine SDS-PAGE auf Nitrozellulose übertragen. Der Nachweis der A und B55 α Untereinheiten dient dem Nachweis gleich aufgetragener Proteinmengen. Die Verteilung der katalytischen Untereinheit, sowie der Phosphorylierung von Y307 zeigte, dass PP2A C in CCVs stark phosphoryliert und damit inaktiv vorliegt.

Die densitometrische Auswertung der Membranfraktionen im Vergleich mit den zytosolischen Anteilen der *HeLa*-Zellen ergab eine um den Faktor 3,6 erhöhte Phosphorylierung von Y307. Der Vergleich der detektierten Signale der CCVs mit der Summe der Signale aus den Zytosol- und Membranfraktionen der *HeLa*-Zellen konnte eine um den Faktor 4,2 erhöhte Phosphorylierung bestimmt werden (Tabelle 3-4). Damit ist eine mögliche Erklärung für die Inaktivität der Phosphatase gegeben.

Tabelle 3-4: Quantifizierung der Verteilung von PP2A C / PP2A C pY307. Die durch Antikörper im Westernblot erzeugten Signale wurden quantifiziert, die Summe aus zytosolischer und Membranfraktion als 100% definiert und der prozentuale Anteil dessen in CCVs berechnet. Es ergibt sich ein deutlich höherer Anteil von phosphoryliertem Y307 in gereinigten CCVs als in *HeLa*-Zellen.

	<i>HeLa</i> -Zytosol	<i>HeLa</i> -Membran	CCVs
PP2A C	90,4%	9,6%	66,3%
PP2A C pY307	73,6%	26,4%	281%

3.2.6 Analyse der Interaktion von PP2A mit HSC70

Die „Uncoating“-ATPase HSC70 wird über Auxilin zu CCVs rekrutiert (Xing *et al.* 2010). Da wir davon ausgehen, dass die Dephosphorylierung von μ 2 ebenfalls im Zuge des *uncoatings* stattfindet, ist eine Verbindung mit der Rekrutierung von PP2A mit HSC70 naheliegend. Außerdem konnte bereits eine Interaktion zwischen HSC70 und der A α Untereinheit der PP2A durch *Pull-down* Experimente gezeigt werden (Ghosh und Kornfeld 2003). Um diese Möglichkeit näher zu untersuchen, wurde zunächst ein entsprechendes *Pull-down* Experiment wiederholt (Abbildung 3.23).

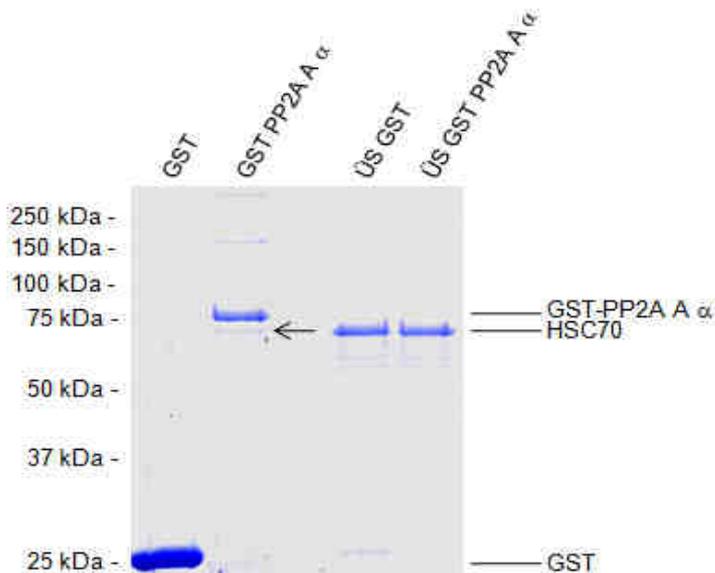


Abbildung 3.22: Pull-down von HSC70 mit GST-PP2A A α . Gleiche Mengen von an GST-Beads gebundenem GST und GST-PP2A A α wurden mit 100 μ g gereinigtem HSC70 für 4 h bei 4°C in Puffer B inkubiert, danach die beads pelletiert und 2 mal mit Puffer B gewaschen. Daraufhin wurden die gebundenen Proteine mit 10 mM GSH in 50mM Tris pH 8 eluiert und Aliquots der Eluate, sowie der Überstände auf einem SDS-Gel aufgetrennt. In Spur 2 ist im Vergleich zu Spur 1 eine zusätzliche Bande bei ~70 kDa zu erkennen (siehe Pfeil), die HSC70 repräsentiert.

Nachdem so gezeigt wurde, dass eine Interaktion der rekombinanten Proteine stattfinden kann, sollte in Folge der Nachweis von HSC70 in Immunpräzipitaten von

PP2A, sowie FLAG B55 α überexpressierende Zellen erbracht werden. Eine Interaktion von HSC70 mit dem A/C-core-Dimer wurde mit A/C spezifischen Antikörpern, eine Wechselbeziehung mit dem Holoenzym mit FLAG Antikörpern untersucht. Die in Abbildung 3.24A/ B dargestellten Westernblots zeigen, dass unter den gewählten Bedingungen keine Präzipitation von HSC70 mit der Phosphatase nachweisbar war. Die detektierten Banden bei ~70 kDa treten in gleicher Intensität auch in den Kontrollen auf, was auf eine unspezifische Bindung hindeutet.

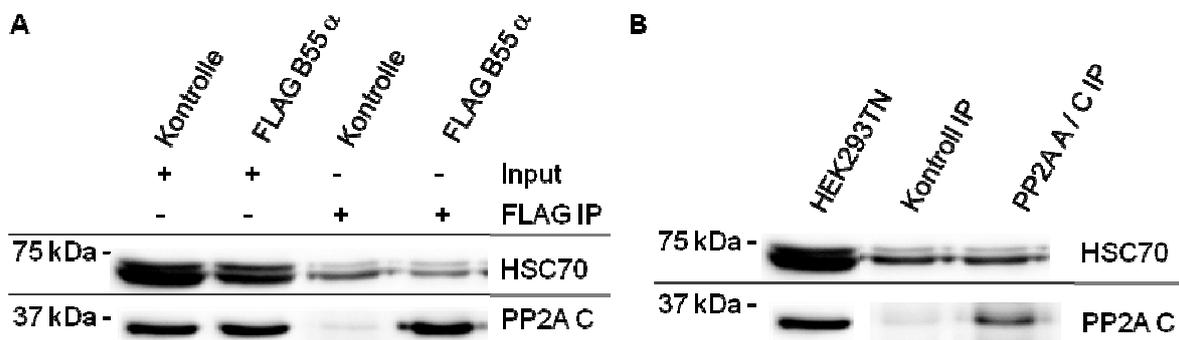


Abbildung 3.23: Immunpräzipitationen von PP2A Untereinheiten und Nachweis von HSC70. HEK293TN / FLAG B 55 α transfizierte HEK293TN Zellen wurden in Puffer B aufgeschlossen und das Lysat mit FLAG Antikörper (A) oder PP2A A / PP2A C Antikörpern (B) inkubiert. Die Präzipitation der Antikörper erfolgte mit Protein-A-Agarose. Nach dem Waschen der Agarose wurde diese in Probenpuffer aufgekoacht und die Proteine nach SDS-PAGE auf Nitrozellulose übertragen. Im Western Blot-Nachweis gegen PP2A und HSC70 konnte die Präzipitation der Phosphatase gezeigt, aber keine signifikante Ko-Präzipitation der „Uncoating“-ATPase HSC70 detektiert werden.

3.3 Rekonstitution eines PP2A Holoenzym

Die Feststellung der geringen PP2A Konzentration in CCVs und der ausbleibende Nachweis einer Interaktion von AP2 mit PP2A erforderte eine neue Strategie, um mögliche Bindungspartner der Phosphatase zu identifizieren. Dafür wurden Anstrengungen unternommen ein rekombinantes Enzym zu rekonstituieren. Dieses sollte einerseits für *Pull-down*-Experimente eingesetzt werden, aber auch für, in Kombination mit AP2-Varianten durchgeführte, Liposomen-*Spin-down*- und Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Versuche Verwendung finden.

3.3.1 Bakterielle Expression von B55 α

Zur Expression von einer mit einem N-terminal GST fusionierten B55 α Untereinheit wurde das oben beschriebene Konstrukt verwendet (Abbildung 3-14) Es stellte sich schnell heraus, dass das in *E.coli* BL21 (DE3) produzierte Protein unlöslich war

(Abbildung 3-25. Die weitere Expression wurde deshalb in *Arctic cells* bei niedriger Temperatur (11°C) für 24 h induziert (siehe 2.6.16). So konnte eine kleine Menge lösliches Protein gewonnen werden, die aber bei weitem nicht für die geplanten Experimente ausreichen. Um das unlösliche Protein reinigen zu können, wurde das Bakterienlysat für 1 h mit 0,7% Sarkosyl, einem SDS-Analogon, inkubiert. Das nun gelöste konnte mit Gluthation-Beads aufgereinigt werden.

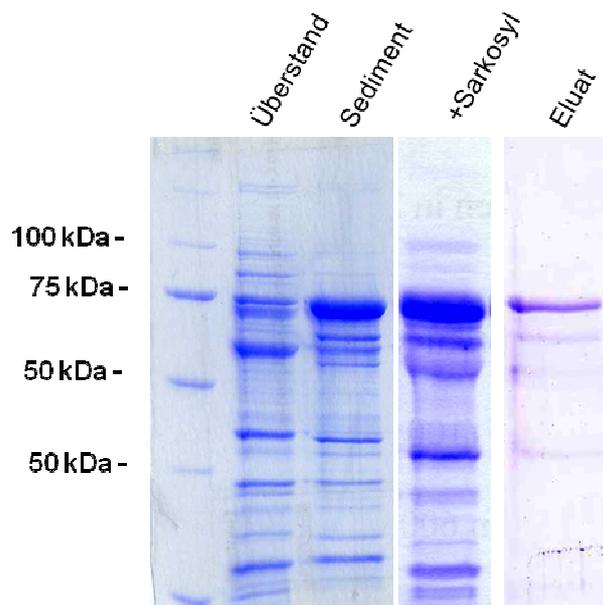


Abbildung 3.24: Aufreinigung von GST-PP2A B55 α . Transformierte *Arctic cells* wurden mit einer Emulsi-FLEX – Homogenisator aufgeschlossen und das Lysat anschließend zentrifugiert. Das rekombinante Protein (die deutliche Bande bei ~75 kDa), welches im Sediment verblieb, konnte nur durch Zufügen von Sarkosyl solubilisiert werden. Die Reinigung des Protein erfolgte mit Gluthation-Beads.

Die pGEX-Vektoren enthalten eine Thrombin-Restriktionsstelle, wodurch sich der N-terminale GST Tag abschneiden lässt. Der Versuch den Tag abzuspalten gelang allerdings nicht, was einen ersten Hinweis darauf gab, dass das gereinigte Protein in Aggregaten vorliegt und so die Erkennungssequenz der Protease verdeckt ist. Eine Gelfiltration des gereinigten Proteins über eine Superose6 Säule bestätigte diesen Verdacht, weil das Protein in einem Peak bei einem sehr großen Molekulargewicht eluierte. Diese Feststellung bedeutete, dass die gewählte Strategie nicht zum gewünschten Erfolg -der Rekonstitution eines funktionellen PP2A Holoenzym-führen wird. Es blieb die Verwendung dieses Proteins zur quantitativen Analyse von CCVs (siehe 3.2.2). Zeitgleich erschien eine Publikation, in der die Kristallstruktur exakt dieser PP2A beschrieben wurde (Xu *et al.* 2008). Die Autoren verwendeten ein bakterielles GST-PP2A-A-Konstrukt, um ein Holoenzym in Lysat aus B- und C-Untereinheiten exprimierenden Insektenzellen zu rekonstituieren. Freundlicherweise

stellten uns die Autoren sowohl ihre Bakuloviren (zur Expression von B55 α und PP2A C α) als auch das GST-PP2A A α Konstrukt zur Verfügung.

3.3.2 Bakterielle Expression von GST PP2A A α

Der zur Verfügung gestellte Vektor (pGEX 4-T2) wurde in den Bakterienstamm BL21(DE3) transformiert, ein Klon isoliert und dieser anschließend zur Expression des ca. 92 kDa großen Fusionsproteins verwendet (3.14A). Die gereinigte GST-PP2A A α Untereinheit wurde endgültig an Gluthation-Beads immobilisiert, um damit die in Insektenzellen produzierten B- und C-Untereinheiten zu fangen.

3.3.3 Gewinnung von PP2A B55 α und PP2A c α aus Insektenzellkulturen

In unserer Arbeitsgruppe waren zu Beginn meiner Arbeit noch keine Erfahrung mit der Kultivierung und dem Umgang mit Insektenzellen vorhanden. Die Etablierung der Insektenzellkultur gelang mit Hilfe der Arbeitsgruppen Clemen und Mörsdorf. So war es möglich in einem ersten Experiment, die Expression der B55 α und C α Untereinheiten in Sf9 Zellen zu erreichen (Abbildung 3.26). Es stellte sich allerdings in einem Folgeexperiment heraus, dass keine Expression im größeren Maßstab erreicht werden konnte, so dass die Ausbeute unzureichend war.



Abbildung 3.25: Westernblot-Nachweis der Expression von PP2A Untereinheiten in Sf9 Zellen durch Bakuloviren. Sf9 Zellen wurden auf 3cm Schalen ausgesät und für 72 h mit Bakuloviren inkubiert. Dann wurden die Überstände abgenommen und die Zellen in Probenpuffer aufgenommen. Der Nachweis der Expression der PP2A Untereinheiten wurde in Western Blots mittels Antikörpern durchgeführt.

Eine Titerbestimmung (2.7.2.3) der vorhandenen Bakuloviren ergab einen sehr geringen Titer von $\sim 1,6 \times 10^5$ pfu/ml. Die Erhöhung der Bakulovirenkonzentration (2.7.2.4) mit einer anschließenden neuen Titerbestimmung ergab verbesserte Werte ($\sim 2 \times 10^8$). Mit diesen Viren wurde eine 500 ml Schüttelkultur gemeinsam mit beiden Bakulovirenstämmen transduziert, Zellysat gewonnen im Folgenden mit gereinigtem

GST-PP2A A α inkubiert, um so Holoenzym zu rekonstituieren (2.6.20). Die Abbildung 3.26A zeigt zunächst die Reinigung der A-Untereinheit, gefolgt von den zwei Elutionsschritten (Elution 2 und 3) nach der Inkubation mit dem Insektenzelllysat. Da nach SDS-PAGE weder die B- noch die C-Untereinheit sichtbar gemacht werden konnten, wurde ein Western Blot angefertigt, der die Untereinheiten nachweisen sollte (Abbildung 3-26B). Wie zu erkennen ist es allerdings leider nicht möglich gewesen, größere Mengen zu gewinnen.

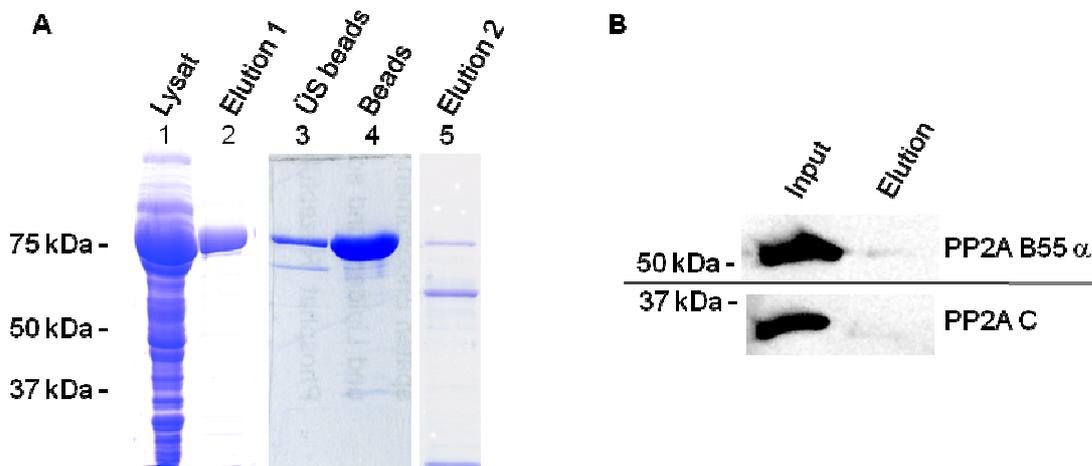


Abbildung 3.26: Rekonstitutionsversuch eines PP2A Holoenzym. A. Lysat von GST-PP2A A α exprimierenden Bakterien (Spur1). Spur 2 enthält ein Aliquot der Elution des GST-Proteins nach der Reinigung. Spuren 3 und 4 enthalten Aliquots des an GST-Beads gebundenen Eluats, bzw. des nicht gebundenen Proteins. Die Eluate der Beads aus Spur 4 nach Inkubation mit Lysat aus Insektenzellen (Spur 5). Da keine PP2A B / PP2A C entsprechenden Banden bei 50 kDa, bzw. 36 kDa zu erkennen waren, wurde der Nachweis dieser Untereinheiten im Western Blot versucht (B). Es konnte keine Anreicherung in der Elution beobachtet werden.

Die Überprüfung dieses Ergebnisses wurde in einem neuen Ansatz versucht, indem ein reines PP2A-core-Enzym rekonstituiert werden sollte. Der Versuchsablauf entsprach dem vorangegangenen Experiment, nur beschränkte sich der Einsatz der Bakuloviren auf die PP2A C kodierenden Viren. Abbildung 3.27 zeigt, dass auch hier keine effektive Rekrutierung der C-Untereinheit erreicht wurde.

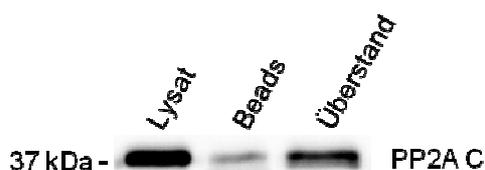


Abbildung 3.27: Nachweis der katalytischen PP2A Untereinheit im PP2A A Pull-down. Gereinigtes, an Gluthationbeads gebundenes PP2A A wurde mit Insektenzelllysat (Spur 1) inkubiert. Die Beads wurden anschließend gewaschen und in Probenpuffer aufgekocht (Spur 2). Der Differenz zwischen Spur 3 (Lysat nach der Inkubation) mit Spur 1 entspricht dem an PP2A A rekrutierte PP2A C.

Diese Experimente haben gezeigt, dass mit dem uns zur Verfügung stehenden Material keine Rekonstitution des PP2A Holoenzym -in für die Folgeexperimente nötigen Mengen- möglich war.

3.4 Identifikation von PP2A-B55 α Bindungspartnern

Wie oben beschrieben, gelang es uns nicht, die PP2A aus CCVs zu isolieren. Auch die Rekonstitution eines Holoenzym war weder mit bakteriellen, noch mit Insektenzellproteinen von Erfolg gekrönt, so dass ein *Pull-down* Experiment mit anschließender Identifikation von Bindungspartnern nicht möglich war.

Die Analyse des CCV-Proteoms (3.2.4) gibt uns eine Liste von potentiellen PP2A Interaktionspartnern. Um die Anzahl der Proteine einzugrenzen sollte durch Immunpräzipitationen von B55 α und anschließender Identifikation von Ko-Präzipitaten ebenfalls eine Liste putativer Interaktionspartner erstellt werden. Der Vergleich beider Listen auf gemeinsame Einträge soll die für eine Verbindung zwischen AP2 und PP2A in Frage kommenden Proteine eingrenzen. Außerdem können mit dieser Vorgehensweise neue B55 α Bindungspartner und potentielle PP2A Substrate identifiziert werden.

3.4.1 Immunpräzipitation von FLAG-B55 α im großen Maßstab

Um mögliche Bindungspartner, und damit potentielle für die Rekrutierung der PP2A in Frage kommenden Proteine zu präzipitieren, wurde zunächst eine stabile *HeLa*-Zelllinie etabliert, die konstitutiv ein 3xFLAG B55 α Konstrukt exprimiert. Nach der Transfektion stellte sich allerdings heraus, dass die Zellen die Expression des Konstrukts deutlich reduzierten, mit der Folge, dass kaum Protein in diesen Zellen vorhanden war. Abhilfe konnte durch eine 14 stündige Inkubation mit 10 mM Natriumbutyrat geschaffen werden, da so das Expressionsniveau des rekombinanten Proteins, durch Stimulation des CMV-Promotors, auf das der endogenen Untereinheit angehoben wurde (Abbildung 3.29) (Gorman *et al.* 1983).

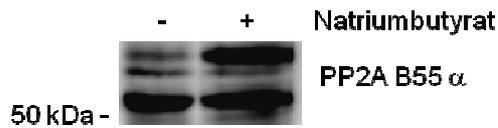


Abbildung 3.28: Stimulation des pCMV-Promotors durch Natriumbutytrat. Um die Menge der rekombinanten B-Untereinheit in stabil transfizierten HeLa Zellen zu erhöhen, wurden diese über Nacht mit Natriumbutytrat inkubiert (rechte Spur). Die linke Spur enthält Lysat der gleichen Zelllinie, die nicht stimuliert wurde.

Für ein erstes Experiment wurden vierzig 15 cm Schalen (~3303 cm² Kulturgefäßoberfläche) für eine anti FLAG Immunisolierung nach 2.6.9.1 kultiviert. Die Elution der Matrix erfolgte durch Inkubation mit einem 3x FLAG-Peptid. Die Färbung der präzipitierten und in einem 10%-igen SDS-PAGE-Gel aufgetrennten Proteine geschah mittels Silberfärbung (Abbildung 3.29 links). Alle prominenten Banden wurden im ZMMK durch *Peptide-mass-fingerprint* untersucht. Allerdings konnten außer B55 α , der katalytischen Untereinheit von PP4 und Importin4 keine weiteren Proteine identifiziert werden. Aus diesem Grund wurde das oben beschriebene Experiment mit einhundert 15 cm Schalen wiederholt. Allerdings sollte durch Zugabe von Triton X-100, in einer Endkonzentration von 0,3%, Membranproteine solubilisiert werden. Nach einer Inkubation des Lysats für 15 min bei 4°C auf einem Drehrad verlief der weitere Verlauf wie zuvor. Das Ergebnis der Präzipitation ist in Abbildung 3.29 (rechts) dargestellt. Einige der durch das ZMMK bestimmten Proteine sind neben den entsprechenden Banden aufgelistet. Dabei interessante Proteine sind das 40S ribosomale Protein S3 (rpS3), das inzwischen als Substrat der PP2A identifiziert wurde (Kim *et al.* 2009), sowie die katalytische PP2A Untereinheit, deren Fund den Beweis des erfolgreichen experimentellen Ablaufs bestätigen.

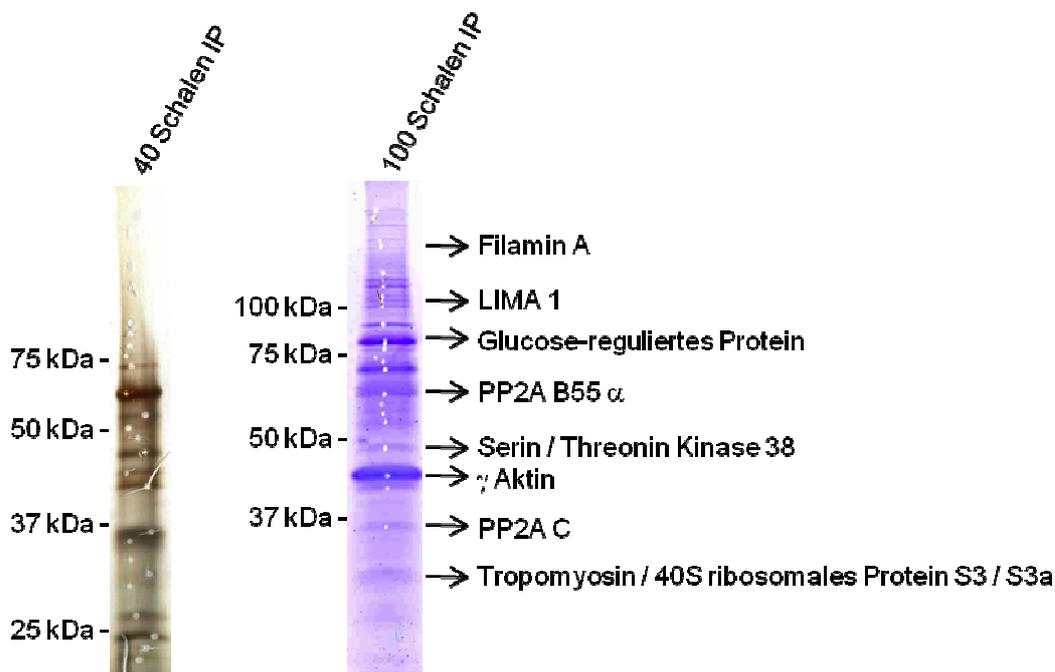


Abbildung 3.29: Anti FLAG Immunpräzitationen aus *HeLa*-Zellen zur Identifikation von potentiellen B55 α Bindungspartnern. Die Abbildung zeigt Silber, bzw. Coomassie gefärbte SDS-Gele der Elutionen von FLAG-B55 α Immunpräzitationen. Die Details des Versuchsablauf siehe Text.

- Um die erzielten Ergebnisse zu bestätigen und da keine negative Kontrolle in den vorhergehenden Versuchen verwendet wurde, musste das Experiment wiederholt werden. Da, wie oben beschrieben, in *HeLa*-Zellen keine konstitutive Expression des rekombinanten Proteins möglich war, wurden HEK293TN Zellen ebenfalls mit dem FLAG Konstrukt transfiziert. Es stellte sich heraus, dass diese Zellen einen deutlich höheren Expressionslevel zeigten und dieses auch auf einem gleichbleibendem Niveau exprimierten. So wurden für die Wiederholung der FLAG Immunpräzitation einhundert 15 cm Schalen der stabil transfizierten HEK293TN Zellen, sowie untransfizierte HEK293TN Zellen kultiviert. Der Versuchsablauf wies einen Unterschied auf. Dem Lysepuffer wurde neben Triton X-100, mit 1 mM NaF und 0,5 mM Na₃VO₄ Phosphataseinhibitoren zugegeben um die Interaktion der Phosphatase mit ihren Substraten zu stabilisieren. Die im SDS-PAGE aufgetrennten Eluate (Abbildung 3.30) wurden in jeweils 33 gleich große Stücke geschnitten und diese mittels LC-MS/MS auf ihre Proteinzusammensetzung analysiert. Da neben dem präzipitierten B55 α Konstrukt eine Kontrolle vorlag konnte durch den Vergleich der LC-MS/MS

Ergebnisse beider Eluate Ergebnisse, die aufgrund von unspezifischen Interaktionen in beiden Spuren auftauchen, eliminiert werden. So war es möglich, eine Liste mit putativen Bindungspartnern zu erstellen (Anhang 7.3). Unter den 368 Treffern finden sich überraschenderweise auch die AP2-Untereinheiten α und $\beta 2$, die mit jeweils 4 Peptiden identifiziert wurden. Außerdem enthält die Liste u.a. mind. 27 Transmembranproteine, Untereinheiten des Proteasoms und einige Vertreter der Rab-Familie.

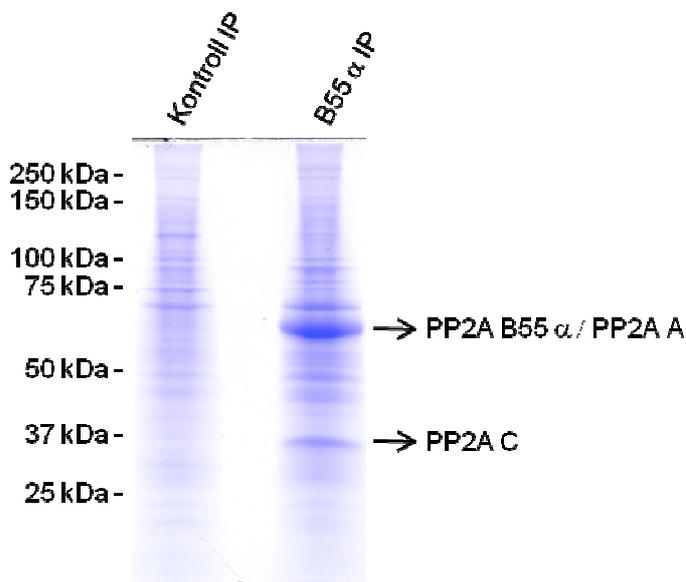


Abbildung 3.30: Anti FLAG Immunpräzipitationen aus HEK293TN Zellen. FLAG B55 α transfizierte und untransfizierte HEK293TN Zellen wurden aufgeschlossen und nach einer Immunpräzipitation die Eluate auf einem SDS-Acrylamidgel aufgetrennt. Die untransfizierten Zellen dienen als Negativkontrolle, während alle ausschließlich in der transfizierten Zelllinie präzipitierten Proteine potentielle B55 α Bindungspartner sind.

Der Vergleich mit den identifizierten Proteinen aus vorangegangenen Präzipitationen aus *HeLa*-Zellen ergab sieben Übereinstimmungen (Tabelle 3-5). Eine Datenbanksuche zeigte, dass alle diese Proteine mindestens eine Phosphorylierungsstelle besitzen und damit potentielle Substrate von PP2A sind. Die Verbindung zwischen der Phosphatase und den putativen Substraten muss in weiterführenden Experimenten bestätigt und näher untersucht werden.

Tabelle 3-5: Übersicht von mehrfach identifizierten FLAG-B55 α Bindungspartnern. Die Liste enthält alle Proteine, die sowohl in FLAG-Präzipitationen aus HEK293TN- und HeLa-Zellen identifiziert wurden. Die rechte Spalte zeigt Phosphorylierungsstellen in diesen Proteinen. Die Daten der Phosphorylierungsstellen stammen aus der „UniProt-Protein-Knowledgebase“ (www.uniprot.org).

Protein	Phosphorylierungsstellen
1. Coronin-1C	S301
2. Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 2	S2/ S67/ S105/ T111
3. Phosphate carrier protein, mitochondrial	Y196
4. Rab3 GTPase-activating protein catalytic subunit	S579/ S581/ S590
5. Serine/threonine-protein kinase 38	T26/ T74/ S281/ T444
6. Transferrin receptor protein 1	Y20/ T21/ S24
7. Tubulin beta-4 chain	Y36/ T290/ T366

Der Abgleich der 368 Proteine mit der Liste der Proteine des CCV-Proteoms zeigte 13 Übereinstimmungen (Tabelle 3-6). Diese 13 Proteine sind potentielle Rekrutierungsfaktoren von PP2A zu CCVs.

Tabelle 3-6: Liste der gemeinsam identifizierten Proteine im CCV-Proteom und der FLAG-Immunpräzipitation. Die Analyse der Proteine auf ihren biologischen Prozess wurde mittels Datenbanksuche (www.uniprot.org) durchgeführt.

Proteinbezeichnung	Biologischer Prozess
1. Alpha-soluble NSF attachment protein	Vesikel vermittelter Transport
2. AP-2 α Isoform 2	Endozytose
3. AP-2 β	Endozytose
4. Membrane-associated progesterone receptor component 1	Progesteron-Rezeptor
5. Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	Aktin-crosslinking-Protein
6. Protein-L-isoaspartate(D-aspartate) O-methyltransferase	Veresterung von Aspartyl-Resten; Protein-Reparatur; Interagiert mit <i>clathrin-light-chain</i>
7. Ras-related protein Rab-5A	Protein-Transport
8. Ras-related protein Rab10	Protein-Transport
9. Ras-related protein Ral-A	Multifunktionell; Membran- Transport
10. Septin-7	Organisation des Zytoskeletts
11. Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha isoform	Multifunktionell
12. Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1	Ionen-transport
13. Vesicle-fusing ATPase	Protein-Transport

Eine Bestätigung der Interaktion dieser Proteine mit der B55 α -Untereinheit muss durch Wiederholung der Experimente, oder alternative Versuche zur Interaktionsanalyse nachgewiesen werden.

4 Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden *in vivo* und *in vitro* Analysen zur Dephosphorylierung der μ 2-Untereinheit des Adaptorprotein-Komplexes-2 durch PP2A durchgeführt. Außerdem wurde mit massenspektroskopischen Methoden das Proteom von CCVs untersucht. Mit biochemischen Verfahren konnte der Anteil von PP2A in CCVs bestimmt werden. Diese Untersuchung ergab sich, da aufgrund der Quantität nur eine PP2A Untereinheit im CCV-Proteom gefunden wurde. Des Weiteren gelang die Erstellung einer Liste mit putativen Bindungspartnern der B55 α Phosphatase-Untereinheit. Der Vergleich der Liste mit dem CCV-Proteom ermöglicht Rückschlüsse auf die Rekrutierungsfaktoren der PP2A zu AP2.

4.1 Modell der AP2-Membranbindung

Die vorliegende Arbeit steht im Zusammenhang mit der beschriebenen Konformationsänderung von AP2 bei Membranrekrutierung. Das aktuelle Modell, das in Zusammenarbeit unserer Arbeitsgruppe mit der Gruppe um Dr. David Owen in Cambridge (UK) entstand, sieht eine Umgestaltung des gesamten AP2-core und der μ 2-Untereinheit nach folgendem Schema vor:

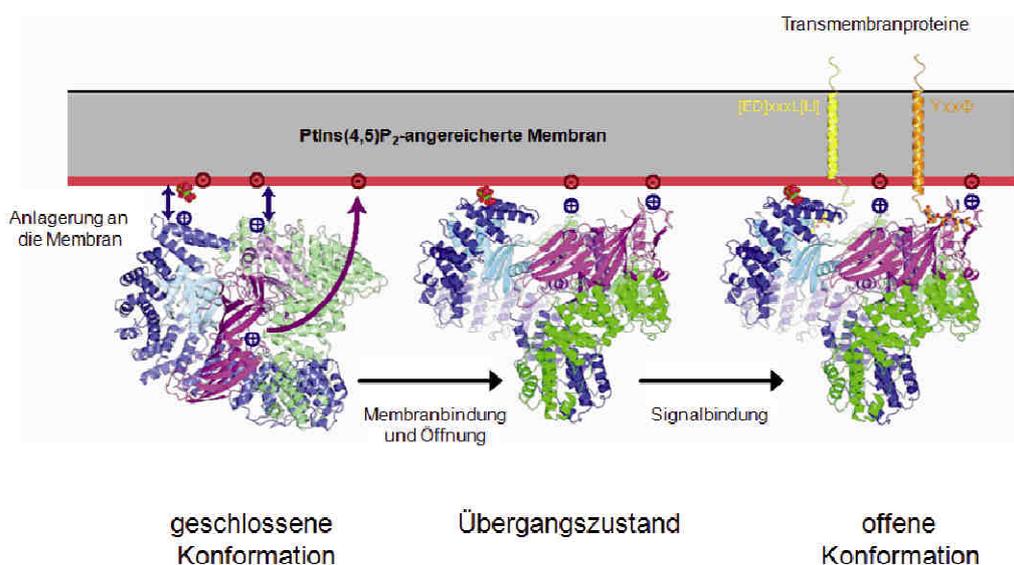


Abbildung 4.1: Modell der AP2-Konformationsänderung bei Membranbindung. Zytosolisch lokalisiertes AP2 liegt in der geschlossenen Konformation vor (links). Kommt es mit in der Plasmamembran angereichertem PtdIns(4,5)P₂ in Bindung, so öffnet sich der Komplex (Mitte). In dieser Konformation ist neben der Bindung von PtdIns(4,5)P₂ auch die Interaktion mit, in den zytosomatischen Bereichen von Transmembranproteinen lokalisierten, Sortierungssignalen (Tyrosin-basierte (YxxΦ) und saure Dileucin-Motive ([E]xxxL[L]I)) möglich. (Modifiziert nach Jackson *et al.* 2010)

AP2 in der zytosolischen, geschlossenen Form bindet Phosphatidylinositol4,5-Bisphosphat (PIP₂) in der Plasmamembran über positiv geladene Bereiche, woraufhin sich alle Untereinheiten beginnen umzulagern. Die gravierendste Bewegung führt μ 2 aus, dessen C-terminaler Bereich eine 127° Drehung um die eigene Achse vollzieht (Abbildung 1.7). Dadurch werden zwei weitere PIP₂ Bindestellen und die Bindungstaschen für Tyrosin-basierte Sortierungssignale in μ 2 und für saure Dileucin-Motive in σ 2 zugänglich. In der nun offenen Konformation befinden sich die vier PIP₂- und beide Sortierungssignal-Bindestellen in einer Ebene, so dass diese gleichzeitig Interaktionen an der Plasmamembran eingehen können. Die Bindung der vier PIP₂-Moleküle stabilisiert den offenen Konformationszustand, so dass ein „Rückklappen“ in den energetisch günstigeren, geschlossenen Zustand verhindert wird. Unterstützt wird dies durch Interaktionen mit Sortierungssignalen von zu transportierenden Molekülen. Eine dritte Stabilisierung wird durch die Phosphorylierung der μ 2-Untereinheit von AP2 (siehe unten) bewirkt (Jackson *et al.* 2010).

4.2 Phosphorylierung der μ 2-Untereinheit

Außer der oben beschriebenen Stabilisierung der offenen Konformation des AP2-Komplexes konnte *in vitro* gezeigt werden, dass die Phosphorylierung des Threonin 156 (Thr156) von μ 2 ein 20fach stärkere Affinität von AP2 zu Tyrosin-basierten Sortierungssignalen zur Folge hat (Fingerhut *et al.* 2001, Honing *et al.* 2005). *In vivo* wurde diese Beobachtung durch die Überexpression von mutiertem μ 2 (Thr156Ala) bestätigt. Diese Mutation bewirkte eine Reduktion der Endozytose des Transferrinrezeptors, der ein Tyrosin-Sortierungssignal besitzt (Olusanya *et al.* 2001). Analysen der Kristallstrukturen der beiden Konformationszustände ergaben, dass sich im geschlossenen Zustand das Thr156 in einem unstrukturierten Bereich zwischen den N- und C-terminalen Domänen von μ 2 befindet. In der geöffneten Struktur hingegen bildet dieses Segment eine vierfach gewundene Helix, an deren Ende sich das Thr156 befindet (Jackson *et al.* 2010).

Die Identifikation der für die Phosphorylierung verantwortlichen Kinase durch u.a. unsere Arbeitsgruppe (Conner und Schmid 2002, Ricotta *et al.* 2002), folgte die

Reinigung der entgegenwirkenden Phosphatase aus Schweinehirn (Ricotta *et al.* 2008). Dabei wurde die dephosphorylierende Aktivität durch verschiedene Chromatographiemethoden aus Zytosol isoliert, indem [32P]-markiertes $\mu 2$ mit den Fraktionen der Chromatographie inkubiert wurde. Die Fraktionen mit entsprechender Aktivität wurden für den folgenden Schritt verwendet, bis ein zur Homogenität gereinigtes Enzym verblieb. Die Identifikation der im Coomassiegel angefärbten Banden mittels *peptid-mass-fingerprint* ergab ein Protein-Phosphatase 2A Holoenzym und eine Kontaminante (Aktin). Auch für den strukturell verwandten Adaptorprotein-Komplex 1 konnte bereits *in vitro* eine Dephosphorylierung der $\mu 1$ -Untereinheit durch ein nicht spezifisch definiertes, aus Rindernieren gereinigtes PP2A Holoenzym, bestehend aus 65 kDa (A-), 52 kDa (B-) und 36 kDa (C-) Untereinheiten, gezeigt werden (Ghosh und Kornfeld 2003).

4.3 *In vivo* Analyse der PP2A abhängigen $\mu 2$ -Dephosphorylierung

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht die *in vivo* Untersuchung der bislang nur *in vitro* gezeigten Dephosphorylierung von $\mu 2$ durch die identifizierte PP2A. Ein Holoenzym setzt sich aus drei Untereinheiten zusammen, einem stabilen *core*-Dimer aus einer regulatorischen A- und einer katalytischen C-Untereinheit, und einer regulatorischen B-Untereinheit (Abbildung 1.10) (Cohen 1989). Für die Substratspezifität entscheidend ist die jeweilige B-Untereinheit, von der bislang mind. 17 Varianten identifiziert wurden. Sie werden aufgrund ihrer Strukturähnlichkeiten in vier Familien eingeteilt. Im Zusammenhang mit der $\mu 2$ -Dephosphorylierung wurde die B55 α -Untereinheit identifiziert, die eine von mindestens vier Isoformen der B55 Familie ist. Das markante dieser Familie sind WD40-Wiederholungen, die einen Großteil der Struktur ausmachen. Das PP2A-*core*-Dimer alleine war in diesem Experiment katalytisch nicht aktiv, was die Relevanz der B-Untereinheit hervorhebt. Der Nachweis mit einem PP2A-Holoenzym, das eine andere B-Untereinheit beinhaltet, wurde nicht durchgeführt (Ricotta *et al.* 2008). Im Zuge dieser Arbeit sollte durch *in vivo* Experimente bestätigt werden, dass die *in vitro* nachgewiesene $\mu 2$ -Dephosphorylierung nicht durch Kontaminanten verursacht wurde, sondern spezifisch durch B55 α vermittelt wird. Diese Untersuchungen sollten ebenfalls dazu dienen die Verbindung von AP2 und PP2A näher zu charakterisieren.

Die ersten Experimente dienten dem Nachweis des Status der $\mu 2$ Phosphorylierung in durch RNAi für PP2A supprimierten Zellen. Da ein *knock-down* der katalytischen Untereinheit, wie auch der A-Untereinheit, aufgrund der mannigfaltigen Substrate der PP2A, Einfluss auf eine Vielzahl von zellulären Prozessen haben würde (1.6/Abbildung 1.11), wurde von dieser Strategie abgesehen. Stattdessen generierten wir siRNA-Oligonukleotide gegen B55 α , da aufgrund der zugeordneten Funktion als Rekrutierungsfaktor spezifisch die B-Untereinheit supprimiert werden sollte. Außerdem wird auf diesem Wege vermutlich eine eingeschränkte Anzahl von Prozessen beeinträchtigt. Eine Übersicht einiger B55 α abhängiger PP2A Substrate ist in Tabelle 4-1 dargestellt.

Tabelle 4-1: Übersicht einiger B55 α abhängiger PP2A Substrate mit Literaturangaben.

B55 α abhängige PP2A-Substrate	Funktionsbereich	Literaturangabe
Akt	Signaltransduktion	(Qian <i>et al.</i> 2009)
β-Catenin	Signaltransduktion	(Zhang <i>et al.</i> 2009)
HDAC4	Histon-Deacetylierung	(Paroni <i>et al.</i> 2008)
rpS3	DNA-Reparatur/ Ribosom	(Kim <i>et al.</i> 2009)
Tau	Mikrotubuli	(Xu <i>et al.</i> 2008)
Vimentin	Intermediärfilament	(Turowski <i>et al.</i> 1999)

Erwartungsgemäß kam es nach RNAi-Behandlung für B55 α in den betroffenen Zellen zu einem Anstieg der Phosphorylierung von $\mu 2$. In gleicher Weise war auch ein Anstieg der Phosphorylierung von $\mu 1$ nachweisbar (Abbildung 3.6). Der Einsatz von RNAi birgt allerdings das Risiko, dass neben dem eigentlichen Zielprotein weitere Proteine in ihrer Expression beeinflusst werden (*off-target*-Effekt). Um dieses Phänomen ausschließen zu können, wurde in einem *rescue*-Experiment ein rekombinantes, RNAi-insensitives FLAG B55 α -Konstrukt (Abbildung 3.2) in die RNAi-Zellen transfiziert. Der Nachweis der Integration in ein PP2A Holoenzym konnte einerseits u.a. durch die Ko-Präzipitation mit PP2A C durch Microcystin-LR-Agarose (Abbildung 3.4), andererseits durch den Vergleich mit der endogenen Untereinheit mittels Gelfiltration gezeigt werden (Daten nicht gezeigt). Die Intensitäten der im Autoradiogramm detektierten Signale der Phosphorylierung der $\mu 1$ - und $\mu 2$ -Untereinheiten in den B55 α supprimierten und FLAG B55 α transfizierten Zellen (*rescue*) entsprachen denen der unbehandelten Kontrollen. Diese Ergebnisse

sprechen für die Integration der rekombinanten Untereinheit in ein PP2A Holoenzym, das die μ -Untereinheiten als Substrat erkennt und dephosphoryliert.

Die Auswirkungen der RNAi konnten in den folgenden mikroskopischen Experimenten in einer deutlichen Veränderung in der subzellulären Verteilung von AP2 und Clathrin gezeigt werden (Abbildung 3.7). So kann eine größere Anzahl von AP2- und Clathrin-positiven Strukturen an der Plasmamembran, sowie auch eine Zunahme von Clathrin am TGN beobachtet werden. Auch die erhöhte Konzentration von Transferrinrezeptoren (TfR) an der Zelloberfläche der RNAi-behandelten Zellen spricht für eine Beeinflussung der AP2-vermittelten Endozytose. Der TfR besitzt ein Tyrosin-basiertes Sortierungssignal und ist ein Frachtmolekül von AP2 (Tabelle 1-2). Die Akkumulation von Clathrin am TGN lässt sich vermutlich (u.a.) auf den manipulierten Status der μ 1-Phosphorylierung zurückführen. Die Beziehung zwischen PP2A und AP1 wurde bereits durch *in vitro* Experimente gezeigt (Ghosh und Kornfeld 2003). Immunfluoreszenzen der *rescue*-Zellen wurden nicht angefertigt, da zuvor bereits gezeigt wurde, dass durch die Expression des rekombinanten Proteins in den RNAi-Zellen die Phosphorylierung von μ 2 wieder normalisiert wird. Der Phänotyp der erhöhten Konzentration von TfRs an der Plasmamembran deckt sich mit den oben beschriebenen Beobachtungen bei der Überexpression von μ 2 Thr156Ala-Mutanten (Olusanya *et al.* 2001), obwohl der Zustand der μ 2-Proteine gegensätzlich ist. Während die Mutanten nicht an Position 156 phosphoryliert werden können, liegt, durch Suppression der B55 α Untereinheit, das Thr156 verstärkt phosphoryliert vor. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass einerseits das Thr156Ala mutierte μ 2 aufgrund der ausbleibenden Phosphorylierung nicht an der Plasmamembran bleiben kann, um CCVs zu bilden, während andererseits die anhaltende Phosphorylierung, durch Stabilisierung der offenen AP2-Konformation an der Plasmamembran, CCVs stabilisieren kann. Diese Vesikel würden für einen längeren Zeitraum existieren, weil sie vermutlich durch die AP2-Stabilisierung deutlich später zerfallen. Auch kurzfristige Interaktionen von AP2 mit der Plasmamembran, welche unter normalen Bedingungen nicht in einer Vesikelbildung resultiert, würden durch die Phosphorylierung zu einer länger anhaltenden Bindung führen. Außerdem ist auch eine fehlerhafte Formierung von AP2-Vesikeln ohne Fracht vorstellbar (Ehrlich *et al.* 2004). Dies ist ansatzweise in Abbildung 4.2 dargestellt. Die anhaltende Phosphorylierung von μ 2 könnte den Kollaps des CCPs

verhindern und so das Wachstum und die Abschnürung eines „leeren“ Vesikels verursachen. All diese Phänomene wären Ursache für eine fehlerhafte Regulation von CCVs, die eine Beeinträchtigung der Endozytose zur Folge hätten. Die genaue Ursache konnte nicht geklärt werden. Untersuchungen der Veränderung der CCV/CCP- Halbwertszeiten und der Dauer und Häufigkeit von CCV-Bildungs-Ereignissen mittels TIRF-Mikroskopie könnten hierüber Aufschluss geben. Dabei ist zu bedenken, dass die Halbwertszeit eines CCVs Zelltyp- und Organell-abhängig ist (10 sec. bis 2 min) (Ehrlich *et al.* 2004, Kirchhausen 2000).

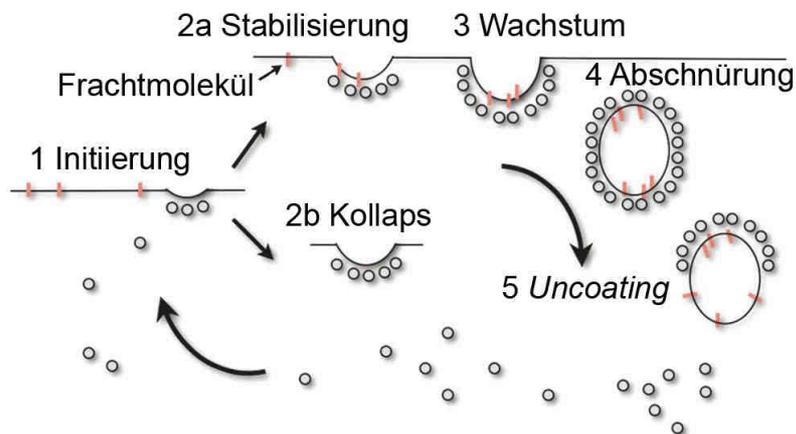


Abbildung 4.2: Endozytose durch zufällige Initiation und Stabilisierung von *clathrin-coated-pits*. Das Modell beschreibt eine zufällige Bindung von AP2 an die Plasmamembran, was eine Bildung von CCPs zur Folge hat. Wenn eine Stabilisierung durch z.B. die Inkorporation eines Frachtmoleküls auftritt, bildet sich ein CCV. Anderenfalls kollabiert das CCP nach kurzer Zeit. (Modifiziert nach Ehrlich *et al.* 2004)

Wenn die Dephosphorylierung von $\mu 2$ im Rahmen der CCV-Genese katalysiert wird, dann besteht die Möglichkeit einer Ko-Lokalisation von PP2A und AP2 in CCVs. Diese Möglichkeit wurde mittels Immunfluoreszenz überprüft. Während AP2 ohne Probleme in *Clathrin-coated-pits* an der Plasmamembran nachgewiesen werden konnten, war dies für PP2A nicht möglich. Obwohl mehrere Antikörper gegen die unterschiedlichen Untereinheiten von PP2A zum Einsatz kamen, war stets nur eine diffuse Färbung im gesamten Zytoplasma der Zellen zu beobachten. Diese Beobachtungen wurden bereits von anderen publiziert (Abbildung 4.3)(Lee *et al.*). Auch die Expression der FLAG-markierten B55 α Untereinheit hatte keinen Einfluss auf das Ergebnis. In diesem Fall war FLAG B55 α ebenfalls diffus im Zytoplasma lokalisiert (nicht gezeigte Daten).

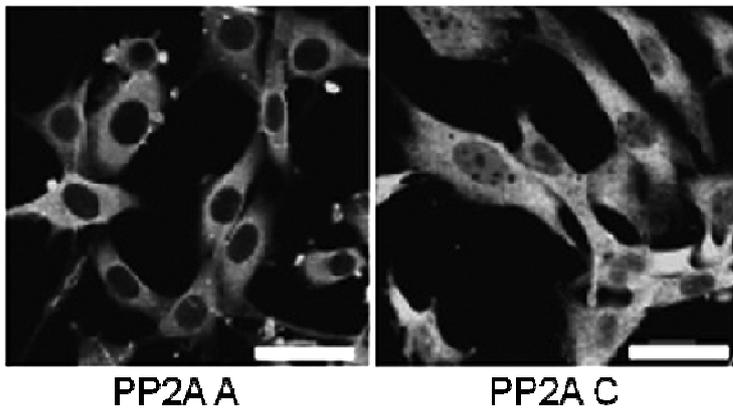


Abbildung 4.3: Immunfärbung von PP2A in NIH3T3-Zellen. Die Verteilung der PP2A Untereinheiten erstreckt sich über den gesamten Zellkörper. Die katalytische Untereinheit kann neben dem Zytosol auch im Kern nachgewiesen werden. (Modifiziert nach Lee *et al.* 2010)

Die Problematik wurde durch die Generierung eines YFP fusionierten B55 α Konstrukts umgangen, dieses in *HeLa*-Zellen exprimiert und durch einen Microcystin-LR-Pull-down der Einbau in ein PP2A Holoenzym bestätigt (Abbildung 3.8). Es wurden Immunpräparate der YFP-B55 α transfizierten Zellen angefertigt und AP2 immungefärbt (Abbildung 3.9B). Unglücklicherweise erwies sich dieser Weg auch nicht als erfolgreich, da sich abermals eine zytosolische Färbung zeigte, die keine signifikante Ko-Lokalisation mit AP2 erkennen ließ. Erklären lassen sich diese Resultate zusammenfassend dadurch, dass PP2A gewebsspezifisch bis zu 1% der zellulären Proteine ausmachen kann (Shi 2009) und deshalb vermutlich nur ein sehr geringer Anteil mit AP2 assoziiert, der dementsprechend schwierig zu detektieren ist. Andererseits ist die Interaktion –durch die Natur einer enzymatischen Reaktion bedingt– nur von kurzer Dauer. Die Verwendung von nicht-kompetitiven Phosphataseinhibitoren könnte möglicherweise Abhilfe schaffen, da so die Interaktion zwischen Phosphatase und Substrat stabilisiert wird.

Als Alternative zur indirekten Immunfluoreszenz haben wir auch die Lokalisierung einer RFP-markierten katalytischen Untereinheit nach Expression in *HeLa*-Zellen analysiert. Das Verhalten dieses Konstrukts wies allerdings Aggregatbildung auf, weshalb von einer weiteren Verwendung Abstand genommen wurde (Daten nicht gezeigt).

4.4 Versuch des Nachweises einer AP2-PP2A-Interaktion

Die Kombination der Ergebnisse aus den *knockdown*- und *in vitro*-Dephosphorylierungs-Versuchen weisen deutlich auf eine direkte Interaktion zwischen AP2 und der PP2A hin. Aus diesem Grund sollte durch Immunpräzipitationen eines der Komplexe, der jeweils andere Komplex im Präzipitat nachweisbar sein. Wie unter 3.1.6 zu sehen, scheiterten alle Versuche, beide Komplexe im Westernblot nachzuweisen. Außerdem lag eine Verknüpfung der PP2A mit dem CCV-Hüllprotein Clathrin nahe, dessen Präzipitat allerdings ebenfalls keine (signifikanten Mengen) PP2A enthielt (nicht gezeigt). Wir vermuten, dass diese Ergebnisse auf die Kurzlebigkeit der Interaktion zurückzuführen ist. Da andere Gruppen in der Lage waren in Präzipitaten von Substraten PP2A Untereinheiten nachzuweisen, oder eine rekombinante B55 α Untereinheit zu präzipitieren und dort das Substrat zu detektieren, erscheint diese Begründung nur bedingt plausibel (Tabelle 4-1). Ein nicht zu übersehender Unterschied zwischen den erwähnten Substraten und dem AP2-Komplex ist die Tatsache, dass AP2 in zwei Konformationen vorliegen kann. Die entscheidende Veränderung findet dabei in der Linker-Region zwischen N- μ 2 und C- μ 2 (Abbildung 1.7) statt, welche die Phosphorylierungsstelle (Thr156) beinhaltet. Folglich besitzt die Umgebung von Thr156 in der offenen Konformation, die definitiv Bindestelle der PP2A ist, eine andere Struktur. Es ist wahrscheinlich, dass ausschließlich μ 2 in der offenen Konformation von PP2A gebunden werden kann. Eine Interaktion, nach Umlagerung von μ 2 in den geschlossenen Zustand, hingegen ist vermutlich nicht möglich. Diese Annahme bedeutet, dass die oben beschriebenen Versuchsbedingungen nicht geeignet sind, um eine Interaktion nachzuweisen. Abhilfe kann möglicherweise die Expression einer mutierten μ 2 Untereinheit, bei der durch Austausch des Thr156 durch ein Aspartat oder Glutamat eine dauerhafte Phosphorylierung dieses Restes simuliert wird, leisten. Dies könnte eine längerfristige Bindung der PP2A an μ 2 zur Folge haben und so den Nachweis von AP2 in FLAG-Präzipitaten ermöglichen.

4.4.1 Rekonstitutionsversuche eines PP2A Holoenzym

Die Ergebnisse der Immunpräzipitationen ließen uns aber auch eine andere Strategie entwickeln. Durch die Zusammenarbeit mit der Gruppe um Dr. David Owen können wir auf verschiedene rekombinant erzeugte AP2 Mutanten zurückgreifen.

Außerdem sind wir in der Lage, endogenes AP2 aus Schweinehirn zu reinigen. Mit diesen Proteinen wären wir in der Lage, mittels an Liposomen gebundenem AP2, *Spin down*-Versuche und Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Experimente mit PP2A Untereinheiten durchzuführen. An Liposomen gebundene AP2-Komplexe befinden sich auch ohne phosphoryliertes Thr156 stabil in der offenen Konformation. Mit diesem Material sollte eine gute Interaktionsfläche für die Bindung von PP2A an AP2 gegeben sein. Die fehlende Komponente in diesem System war das PP2A Holoenzym. Alle Anstrengungen die Untereinheiten einzeln in *E.coli* zu reinigen, scheiterte zunächst an der Löslichkeit von GST-PP2A B55 α und 6xhis-PP2A C, während GST-PP2A A in großen Mengen verfügbar war. Der Einsatz von Detergenzien führte zwar zur Solubilisierung der Proteine, die allerdings nicht in ihrer nativen Faltung vorlagen, wie eine Gelfiltration von B55 α und *Pull-down*-Versuche von PP2A C mit GST-PP2A A zeigten (nicht gezeigt). Die parallele Expression der drei Untereinheiten in *E.coli* über das Duet-Vektor-System von Novagen, das die Expression von bis zu 6 Proteinen erlaubt, scheiterte ebenfalls, da zu keinem Zeitpunkt signifikante Mengen aller Untereinheiten nachweisbar waren (Daten nicht gezeigt). Während dieser Arbeit erschien zeitgleich eine Publikation mit der Kristallstruktur eines PP2A Holoenzym mit der regulatorischen B55 α Untereinheit (Xu *et al.* 2008). Die Autoren verwendeten zur Expression von B55 α und PP2A C Insektenzellen und entsprechend modifizierte Bakuloviren. Die Rekonstitution des Holoenzym gelang durch Inkubation der Insektenzell-Lysate mit bakteriell gewonnenem GST-PP2A A. Den Autoren war es so möglich, ausreichende Mengen Holoenzym herzustellen, um die Phosphatase gemeinsam mit Microcystin-LR zu kristallisieren. Freundlicherweise waren die Autoren bereit, sowohl die Bakuloviren, wie auch das verwendete PP2A A Konstrukt für unsere Experimente zur Verfügung zu stellen. Nach der Etablierung der Insektenzellkultur in unserer Arbeitsgruppe führten erste Versuche nach viraler Transduktion auch, zu einer im Westernblot nachweisbaren, Expression der Untereinheiten. Die Rekonstitution eines Holoenzym sollte in Folge durch ein Expression im größeren Maßstab eingeleitet werden. Da die Informationen über den methodischen Ablauf der Expression sowie Rekonstitution allerdings nur spärlich in Xu *et al.* 2008 beschrieben sind, mussten wir uns auf persönliche Angaben der Autoren verlassen. Mit diesen Informationen versuchten wir das Holoenzym durch Inkubation des Insektenzell-Lysats mit dem

GST-PP2A-A-Fusionsprotein zu rekonstituieren. Allerdings führte dies nicht zum Erfolg (siehe 3.3). Die Gründe hierfür sind schwierig zu ermitteln. Die naheliegende Erklärung ist, dass der verwendete Puffer (50 mM Tris pH 8 100 mM NaCl, 1 mM DTT) unter den vorhandenen Bedingungen nicht geeignet war den Komplex zu rekonstituieren. Recherche älterer Literatur ergab inzwischen, dass bereits ein solches Holoenzym, dessen drei Untereinheiten allerdings gemeinsam in Insektenzellen exprimiert wurden, über eine 6xHistidin-markierte PP2A-A-Untereinheit in 20 mM Tris pH8, 150 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 10 mM 2-Mercaptoethanol, 10% Glycerin, 0,5% Triton X-100 und 2 mM PMSF gereinigt wurde (Yan *et al.* 2000). Alternativ wurde ein Puffer bestehend aus 50 mM Tris pH7,4, 2 mM DTT, 1mM EDTA und 10% Glycerin für eine säulenchromatographische Reinigung verwendet (Kamibayashi *et al.* 1994). Der Versuch einer Rekonstituierung unter diesen Voraussetzungen steht noch aus. Eine einfache Möglichkeit diese Bedingungen zu testen, wäre ein *Pull-down* Experiment von PP2A Untereinheiten mit GST-PP2A A aus *HeLa*-Zell-Lysat.

4.5 Analyse der PP2A-HSC70 Interaktion

In Gosh *et al.* 2003 wurde eine direkte Interaktion zwischen der „Uncoating“-ATPase HSC70 und der A-Untereinheit von PP2A gezeigt. Um dieses Ergebnis zu überprüfen wurde das *Pull-down* Experimenten wiederholt. Die Bindung konnte bestätigt werden (Abbildung 3.23). Die Wiederholung der Immunpräzipitation von PP2A A/ C blieb hingegen ohne Erfolg (3.24). Als Gründe kommen die Wahl des verwendeten Puffers (dieser weicht ab von Gosh *et al.* 2003) in Frage, oder die Konkurrenz der verwendeten Antikörper um identische Interaktionsflächen. Durch den Wechsel des Lysepuffer (Ghosh und Kornfeld 2003) und Verwendung von Microcystin-LR-Agarose wären diese Probleme zu umgehen. Im Moment ist daher eine Rekrutierung der PP2A durch HSC70 nicht auszuschließen.

4.6 Analyse von CCVs

Die Fragestellung dieser Arbeit sah unter anderem vor, den Rekrutierungsmechanismus der PP2A zum Substrat – hier AP2- zu analysieren,

Desweiteren sollte auch die enzymatische Regulation der Phosphatase untersucht werden. Da beide Protein-Komplexe, funktionell bedingt, an CCVs zusammenkommen müssen, war das primäre Ziel der Nachweis der PP2A Untereinheiten in gereinigten Schweinehirn-CCVs. In den bisherigen Analysen des CCV-Proteoms konnte nur Protein-Phosphatase 1 (PP1) nachgewiesen werden (Blondeau *et al.* 2004), andere Protein-Phosphatasen hingegen nicht (Borner *et al.* 2006, Girard *et al.* 2005). Mit den vorhandenen PP2A-Antikörpern gelang in dieser Arbeit die Detektion aller Untereinheiten des Holoenzym (Abbildung 3.13). Basierend auf diesem ersten positiven Ergebnis sollte nun eine eigene Proteomanalyse von CCVs erfolgen. Besondere Aufmerksamkeit sollte auf die Identifizierung von posttranslationalen Modifikationen in den Untereinheiten von PP2A gelegt werden, um so Anhaltspunkte für die Regulation des Enzyms zu erhalten. Diese Analyse sollte durch die aktuelle Gerätegeneration an Massenspektrometern möglich sein.

Die Identifizierung der Proteine in Schweinehirn-CCVs erfolgte durch die zentrale Bioanalytik des Zentrums für Molekulare Medizin mittels LC-MS/MS-Analyse. Da das Schweinegenom zum Zeitpunkt der Datenbanksuche noch nicht vollständig veröffentlicht war, musste die Suche mit einer Datenbank erfolgen, die alle Säugetierproteine umfasst. Die Liste der identifizierten Proteine wurde von uns durch Entfernung von Proteinen mit nur einem gefundenen Peptid angepasst (Anhang 7.2). Ausnahmen stellten bereits bekannte CCV-Proteine und Transmembranproteine dar. Insgesamt konnten wir so 216 Proteine identifizieren. Ein erster oberflächlicher Vergleich mit den publizierten Daten zeigt, dass neben den zu erwartenden Proteinen wie Clathrin und AP1/ AP2 auch einige Proteine darunter sind, die CCVs noch nicht zugeordnet wurden. Einer Wiederholung dieses Experiments stand das Problem der Beschaffung frischer Schweinehirne gegenüber, da der letzte Kölner Fleischgroßhandel schließen musste. Die erhaltenen Ergebnisse müssen aber unbedingt durch eine erneute Proteomanalyse bestätigt werden.

4.6.1 Quantifizierung von PP2A Untereinheiten in CCVs

Da nur die α Isoform der regulatorische A-Untereinheit von PP2A mit 4 Peptiden (Sequenzabdeckung 7,6%) identifiziert werden konnte, kam ein Nachweis von posttranslationalen Modifikationen, die Einfluss auf die Regulation der Phosphatase

haben können, nicht in Frage. Die wahrscheinliche Erklärung für das Fehlen der anderen beiden Untereinheiten von PP2A im CCV-Proteom ist deren geringe Abundanz. Um dieser Möglichkeit näher auf den Grund zu gehen, wurden quantitative Westernblots angefertigt. Die daraus berechneten Stoffmengen (Tabelle 3-3) geben Aufschluss darüber, dass die A-, B55 α - und C-Untereinheiten in stöchiometrischen Mengen von ca. 400- 660 fmol/ mg CCVs vorliegen. Insgesamt sind nach dieser Kalkulation 61 bis 100 ng PP2A in 1 mg CCVs enthalten. Wie bei Enzymen zu erwarten macht das nur einen geringen Anteil des CCV-Proteoms aus. Die Methode ist als sehr unpräzise zu sehen, da die Bestimmung der Proteinmengen in Westernblots keine exakte Kalkulation zulässt. Dennoch weist die Tatsache, dass für alle drei Untereinheiten ähnliche Stoffmengen kalkuliert wurden, darauf hin, dass die Ungenauigkeiten nur gering waren, da die Berechnungen für jede Untereinheit voneinander unabhängig durchgeführt wurde.

4.6.2 *Uncoating* von CCVs

Nachdem es uns nicht möglich war die katalytische Untereinheit aus dem Überstand einer *uncoating*-Reaktion durch Microcystin-LR-Agarose *Pull-down*-Versuche anzureichern (nicht gezeigt), sollte die Verteilung von PP2A- Untereinheiten nach dem *uncoating* untersucht werden. Es stellte sich heraus, dass PP2A C nach dem *uncoating* vollständig an den Vesikeln verbleibt, während B55 α und PP2A A teilweise im Überstand nachzuweisen waren. Diese Ergebnis widerspricht der Theorie eines stabilen A-C-core-Dimers (Wang *et al.* 2008). Da diese Verteilung sowohl bei der Tris-Extraktion, als auch beim *uncoating* mit HSC70 zu beobachten war, ist eine Puffer-bedingte Ursache eher unwahrscheinlich. Es ist auch vorstellbar, dass die Untereinheiten getrennt zu CCVs rekrutiert, bzw. nach der Dephosphorylierungsreaktion voneinander getrennt werden. Der Versuch, durch die Inkubation von CCVs mit Crosslinkern benachbarte Proteine chemisch zu verbinden, scheiterte (nicht gezeigt). Der Nachweis von PP2A A im Westernblot war nach Inkubation mit Crosslinkern nicht erfolgreich. Vermutlich wurde die Untereinheit mit anderen Proteinen verbunden und dieser Protein-Komplex zu groß, um in das Trenngel einzulaufen. Das Sammelgel haben wir nicht im Westernblot untersucht. Eine alternative Möglichkeit zu testen, ob PP2A B55 α unabhängig vom PP2A-core-Dimer zu CCVs rekrutiert wird, ist die Expression der Δ 309-Mutante von PP2A C. Der Mutante wird zugeschrieben, nicht mit Mitgliedern der B55-Familie interagieren

zu können. Wäre die Mutante in CCVs nachweisbar, wird sie unabhängig von B55 α rekrutiert. Die Rekrutierung durch eine weitere, noch nicht in CCVs gefundene B-Untereinheit lässt sich so allerdings nicht ausschließen.

4.7 Analyse der Regulation vesikulärer PP2A

Die Untersuchung von posttranslationalen Modifikationen von vesikulären PP2A Untereinheiten war aus oben genannten Gründen nicht möglich. Eine bereits beschriebene Modifikation der katalytischen Untereinheit, ist durch Phosphorylierung von Tyr307, die zur Inaktivierung der Phosphataseaktivität führt (Einleitung 1.6.4). Der Nachweis der phosphorylierten PP2A C aus gereinigten Schweinehirn-CCVs wurde durch Verwendung eines phospho-Y307-spezifischen Antikörpers möglich. Die densitometrische Auswertung des Westernblots aus Abbildung 3.21 ergab, dass PP2A C in CCVs im Vergleich zu *HeLa*-Zellen um den Faktor 4,3 stärker phosphoryliert ist (Tabelle 3-4). Der prozentuale Anteil der phosphorylierten Form von PP2A C in CCVs lässt sich auf diesem Weg nicht bestimmen. Dies wäre durch 2-D-Gelelektrophorese möglich, da Proteine bei dieser Methode u.a. nach ihrem isoelektrischen Punkt (PI) aufgetrennt werden. Da eine Phosphorylierung eine Verschiebung des PI in den sauren Bereich zur Folge hat, kann der Anteil des phosphorylierten Proteins im Westernblot quantifiziert werden.

4.8 Identifikation von B55 α Bindungspartnern

Die durchgeführten Immunpräzipitationen von FLAG-B55 α zielten darauf ab, neue Interaktionspartner des Proteins zu identifizieren. Einerseits sollten B55 α abhängige PP2A-Substrate, andererseits der Rekrutierungsfaktor, der für die Integration der Phosphatase in CCVs verantwortlich ist, gefunden werden.

Die Expression des rekombinanten B55 α Proteins in *HeLa*-Zellen wies ~72 h nach der Transfektion ein abnehmendes Niveau auf. Auch durch eine Subklonierung konnte keine Verbesserung beobachtet werden. Erst durch Inkubation der Zellen mit Natrium-Butyrat konnte eine Erhöhung der Expression erreicht werden (Abbildung 3.28). Die Proteinexpression war dennoch nicht ausreichend, um mittels LC-MS/MS eine Vielzahl von putativen Bindungspartnern identifizieren zu können (Abbildung

3.29). Durch die große Menge an benötigten Zellen und den damit verbundenen zeitlichen und materiellen Aufwand, sahen wir zunächst davon ab, bei den Immunpräzipitationen eine Kontrolle zu verwenden. Der Wechsel zu der HEK293TN Zelllinie zeigte eine deutlich verbesserte und stabilere Expression von FLAG-B55 α . Das unter 3.4.1 beschriebene Experiment führte dadurch auch zu einer Anzahl von 702 durch LC-MS/MS identifizierten Proteinen. In diesem Experiment wurde als Kontrolle Lysat aus untransfizierten HEK293TN Zellen eingesetzt. Die identifizierten Proteine aus der Kontrolle wurden aus der Liste der FLAG-B55 α -Präzipitate entfernt, sobald das Verhältnis der identifizierten Peptide der Kontrolle denen der B55 α -Präzipitation erreichte. Außerdem wurden Proteine mit <3 identifizierten Peptiden gelöscht. Insgesamt enthält die bearbeitete Liste 368 Proteine. Neben den PP2A-*core*-Untereinheiten findet sich auch mindestens ein weiterer bekannter Interaktor der PP2A (PME1) und überraschenderweise Untereinheiten von AP2 (α , β 2) und AP3 (β 3, μ 3, σ 3) wieder. Der bekannte B55 α -Interaktor Vimentin wurde ebenfalls präzipitiert, fällt aber aus der Liste, da eine vergleichbare Menge Peptide in der Kontrolle identifiziert wurden. Die Erklärung für die Präzipitation von AP2 liegt möglicherweise an der Verwendung von Phosphataseinhibitoren und/ oder an der Menge des eingesetzten Zellmaterials. Der Gebrauch von Phosphataseinhibitoren führte in vorangegangenen Experimenten nicht zu einer Detektion von AP2-Untereinheiten in Westernblots nach FLAG-Immunpräzipitationen. Möglicherweise war die zuvor präzipitierte Menge PP2A-AP2 für eine Immundetektion von α -Adaptin nicht ausreichend. Allerdings kann, ohne eine Bestätigung dieses Ergebnisses durch eine Wiederholung des Experiments, nicht ausgeschlossen werden, dass AP2 eine Kontaminante war.

4.8.1 Vergleich der FLAG-Immunpräzipitationen untereinander

Die 7 Proteine, die nach Immunpräzipitationen aus *HeLa*-Zellen und in dem oben beschriebenen Proteom der FLAG-Präzipitation aus HEK293TN-Zellen identifiziert wurden, sind in Tabelle 3-5 zusammengefasst. Da als Ausgangsmaterial unterschiedliche Zelllinien verwendet wurden, ist aufgrund der variierenden Proteinbestandteile keine 100%-ige Übereinstimmung zu erwarten. Außerdem sind falsch positive Treffer wahrscheinlich, da die Kontrollen in den ersten Experimenten

aus den o.g. Gründen ausgelassen wurden. Interessanterweise sind alle sieben Proteine, nach Recherchen in der Uni-Prot-Datenbank (www.uniprot.org) an wenigstens einer Aminosäure phosphoryliert. Insgesamt stehen 9 Serin-, 7 Threonin- und 3 Tyrosin-Reste als potentielle Substrate der PP2A zur Diskussion (Tabelle 3-5). Eine weitergehende Analyse war bisher aus Zeitgründen nicht möglich. In einem ersten Schritt müssen die Interaktionen zwischen den aufgelisteten Proteinen experimentell bestätigt werden.

4.8.2 Vergleich der FLAG-Immunpräzipitate mit dem CCV-Proteom

Der Vergleich mit dem Proteom der CCVs zeigt eine Übereinstimmung von 13 Proteinen (Tabelle 3-6). Darunter finden sich sieben Proteine, die mit Protein-Transport, zwei Proteine die mit der Organisation des Zytoskelett in Verbindung stehen und ein Progesteron-Rezeptormolekül.

Die Bestätigungen der Interaktionen durch Ko-Immunpräzipitationen mit Westernblot-Nachweis, oder beispielsweise Hefe-2-Hybrid-Analysen stehen noch aus.

5 Zusammenfassung

Der Adaptorprotein-Komplex 2 (AP2) ist ein Schlüsselfaktor bei der Bildung von *Clathrin-coated vesicles* (CCVs), die im Rahmen der Endozytose an der Plasmamembran gebildet werden. Die Phosphorylierung von Thr156 in der μ 2-Untereinheit spielt eine entscheidende Rolle bei der Stabilisierung von AP2 an der Membran. Die Phosphorylierung erfolgt durch AAK1, als antagonistisches Enzym wurde ein trimeres Proteinphosphatase 2A (PP2A) Holoenzym durch unsere Arbeitsgruppe identifiziert. Im Rahmen dieser Arbeit soll die Relevanz der Phosphatase in Zellen überprüft und die Rekrutierung des Enzyms an CCVs untersucht werden.

Im ersten Teil wurde in *HeLa*-Zellen gezeigt, dass die Suppression der regulatorischen B55 α Untereinheit der PP2A zu einer verstärkten Phosphorylierung von μ 2 führt. Allerdings war weder der Nachweis einer Ko-Lokalisation mittels Immunfluoreszenz, noch eine Ko-Präzipitation von AP2 und PP2A Untereinheiten möglich. Demgegenüber gelang uns der Nachweis der PP2A-Untereinheiten in CCVs in einer Stöchiometrie von ungefähr 1,6:1:1 (A:B55 α :C) mit berechneten Stoffmengen von 400-660 fmol pro mg CCVs. Daraus lässt sich ableiten, dass PP2A ca. 1/10.000 μ g eines CCVs ausmacht.

Die massenspektroskopische Analyse von CCVs ermöglichte die Identifikation von 216 Proteinen, von denen einige bisher nicht als CCV-Bestandteil bekannt waren. Neben mind. 50 Transmembran-, 3 Lipidbindenden-, 9 SNARE- und 13 Zytoskelett-Proteinen beinhaltet die Liste auch die A-Untereinheit von PP2A.

Durch Verwendung eines phospho-Tyrosin-spezifischen Antikörpers gelang es zu zeigen, dass das Tyr307 der C-Untereinheit von PP2A in CCVs im Vergleich zu *HeLa*-Zellen um den Faktor 4 verstärkt phosphoryliert ist. Da bereits bekannt ist, dass diese Phosphorylierung zur PP2A-Inaktivierung führt, kann daraus gefolgert werden kann, dass die Phosphatase in CCVs vorwiegend inaktiv vorliegt.

Außerdem erfolgte eine massenspektroskopische Identifizierung von Proteinen, die zusammen mit einer FLAG-markierten B55 α -Untereinheit immunisoliert werden konnten. In weiterführenden Arbeiten müssen die Interaktionen bestätigt und deren Zusammenhang analysiert werden.

6 Summary

The adaptor complex AP2 plays a key role in clathrin-coated vesicle (CCV) formation during endocytosis at the plasma membrane. Three of the four subunits of AP2 are phosphorylated, but only the significance of μ 2 phosphorylation at Thr156 is characterised. The modification, which is catalyzed by the kinase AAK1 is necessary for stabilization of the open conformation of the complex and efficient cargo recruitment. Dephosphorylation of μ 2 is catalyzed by a trimeric protein phosphatase 2A (PP2A) holoenzyme, which was identified by our group. The aim of this thesis was to show the relevance of the phosphatase in cells and to unravel the recruitment of the enzyme to CCVs.

We took an RNAi approach to suppress the regulatory PP2A B55 α subunit in *HeLa*-cells. In the affected cells we could detect an increased level of phosphorylation of μ 2. This indicates that indeed a specific PP2A form is involved in the control of the phosphorylation at Thr156 in the μ 2-subunit of AP2. Unfortunately we failed to show a co-staining of both the enzyme and AP2. Furthermore co-precipitations of AP2 with PP2A and vice versa were not obtained. When using CCVs purified from pig brain we could detect all three PP2A subunits by westernblotting and based on the quantification we propose a stoichiometry of 1,6:1:1 (A:B55 α :C) with absolute amounts of ~400-660 fmol per mg CCVs. Thus, one out of 10.000 μ g represents PP2A. In the course of these experiments we used the CCVs to determine the proteome. A total of 437 were identified out of which 216 represent highly-relevant CCV proteins. These include 55 trans-membrane-proteins, 8 cargo adaptor proteins and at least 3 other lipid binding proteins and noteworthy the A-subunit of PP2A. Unfortunately, the low abundance of PP2A in CCVs did not allow direct identification of posttranslational modifications that may important for enzyme regulation. However, by using a phospho-tyrosine specific antibody in westernblots we revealed a high level of Y307 phosphorylation of the catalytic subunit of PP2A, which renders the enzyme inactive.

In an alternative approach we used pull-down experiments with a recombinant FLAG-tagged B55 α subunit to identify binding partners and putative new PP2A substrates. A total of 368 proteins were identified, some of which will be further characterized in future experiments.

7 Anhang

7.1 Vektorkarten

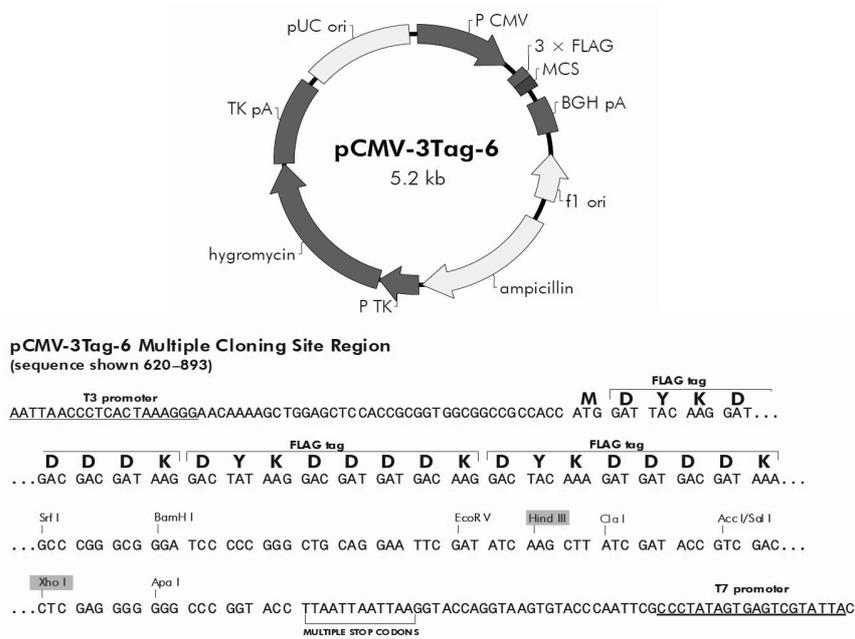


Abbildung 7.1: pCMV-3Tag-6-Vektorkarte. Die humane B55 α Sequenz wurde mit den Restriktionsendonukleasen Hind III und Xho I aus dem Expressionsvektor pcDNA1 herausgeschnitten und in den pCMV-3Tag-6 Vektor inseriert.

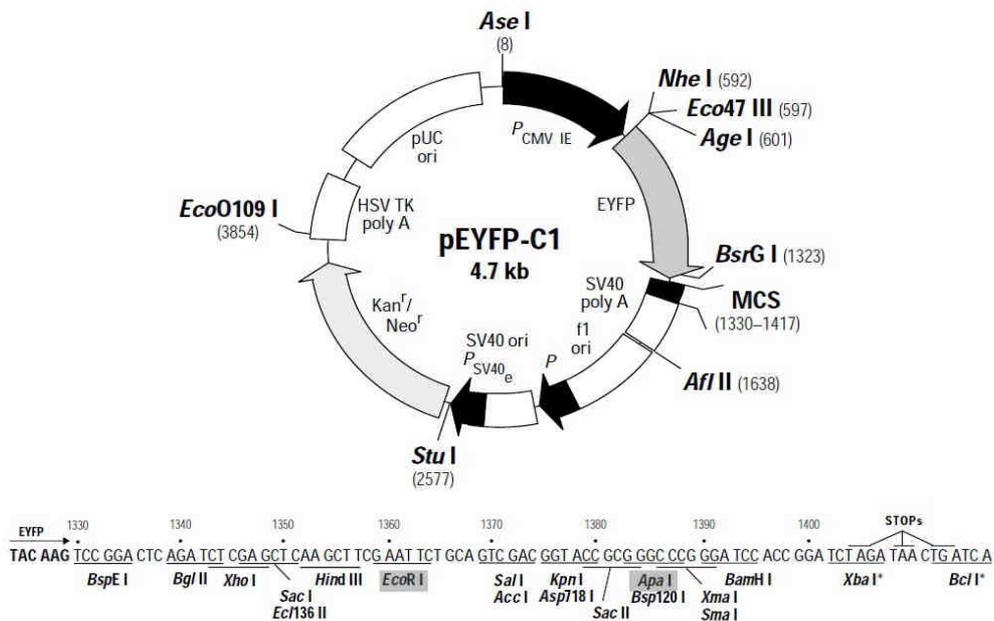


Abbildung 7.2: pEYFP-C1-Vektorkarte. Die humane B55 α Sequenz wurde über Eco R I und Apa I aus dem pCMV-3Tag-6-Vektor geschnitten und in den Vektor pEYFP-C1 inseriert.

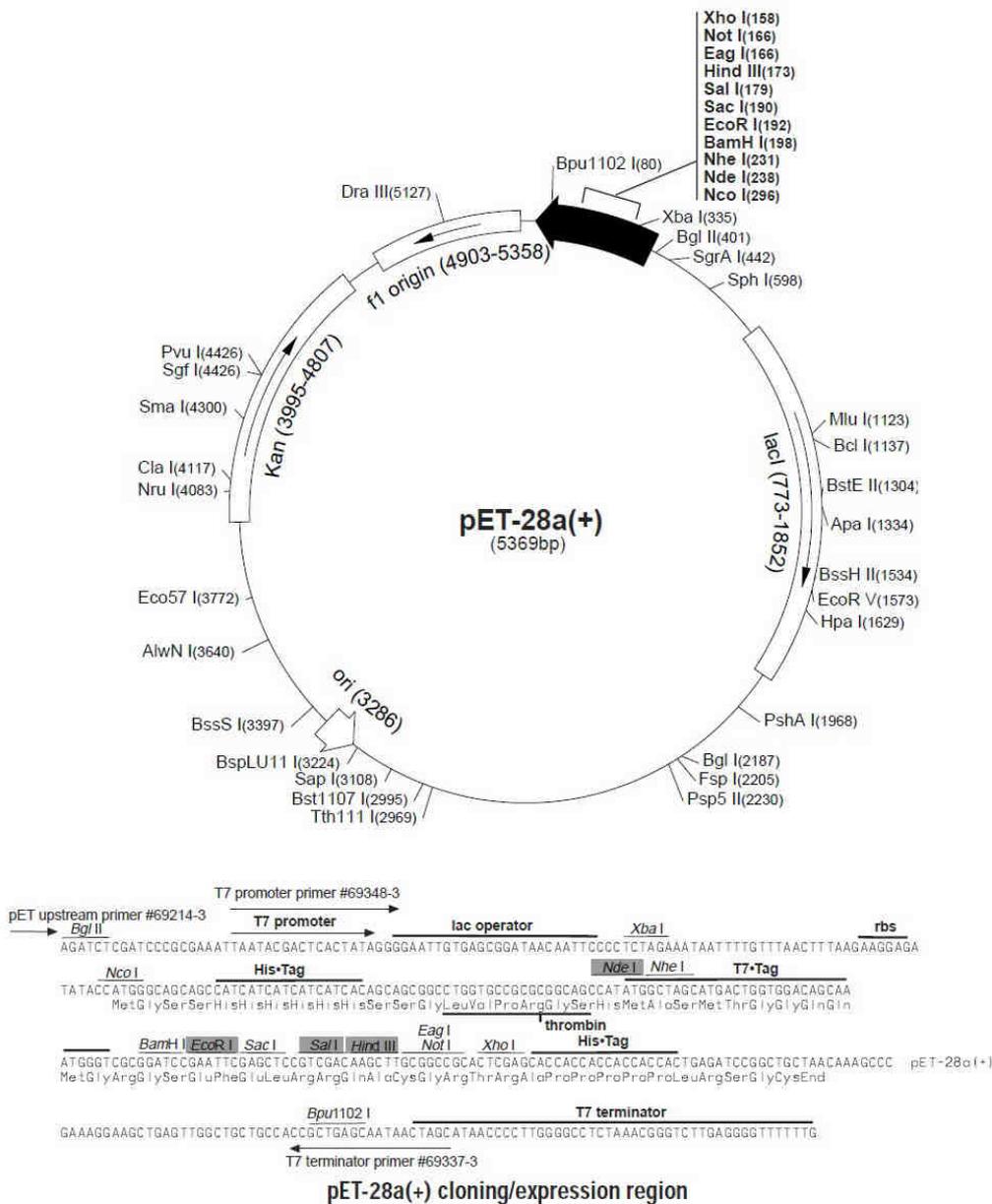


Abbildung 7.3: pET28a(+)-Vektorkarte. Die durch PCR generierte Sequenz von PP2A C β wurde über EcoR I und Sal I in den pET28 Vektor ligiert. Die HSC70-kodierende Sequenz wurde mit Nde I und Hind III aus dem Expressionsvektor pRSET-A herausgeschnitten und mit dem pET28a-Vektor fusioniert. Beide Proteine besitzen bei Expression eine N-terminale 6xHis-Markierung.

7.2 Übersicht der identifizierten Protein in CCVs

Tabelle 7-1: Alphabetische Auflistung der identifizierten Proteine, mit Accession-Nummer, gefundenen Peptiden und Funktionszuordnung. Tabelle 7-2 beschreibt den Funktionscode.

Protein	Accession	Peptides	Function
Actin, cytoplasmic 1 - Bos taurus (Bovine)	ACTB_BOVIN	27	5
Adaptin ear-binding coat-associated protein 1 OS=Pongo abelii	NECP1_PONAB	6	14
ADP-ribosylation factor 3 OS=Homo sapiens GN=ARF3 PE=1	ARF3_HUMAN	8	10
ADP-ribosylation factor-like protein 8B OS=Bos taurus	ARL8B_BOVIN	2	10
ADP/ATP translocase 4 OS=Homo sapiens GN=SLC25A31	ADT4_HUMAN	1	18, 13
Alpha-centractin OS=Homo sapiens GN=ACTR1A PE=1 SV=1	ACTZ_HUMAN	5	5
Alpha-internexin OS=Homo sapiens GN=INA PE=1 SV=2	AINX_HUMAN	4	5
Alpha-soluble NSF attachment protein OS=Bos taurus GN=NAPA	SNAA_BOVIN	10	11
Alpha-synuclein OS=Bos taurus GN=SNCA PE=2 SV=1	SYUA_BOVIN	5	4?
Amphiphysin OS=Homo sapiens GN=AMPH PE=1 SV=1	AMPH_HUMAN	6	3, 5?
Annexin A1 OS=Sus scrofa GN=ANXA1 PE=1 SV=3	ANXA1_PIG	14	11
Annexin A2 OS=Sus scrofa GN=ANXA2 PE=1 SV=4	ANXA2_PIG	10	3
Annexin A4 OS=Sus scrofa GN=ANXA4 PE=1 SV=2	ANXA4_PIG	5	11
Annexin A5 OS=Homo sapiens GN=ANXA5 PE=1 SV=2	ANXA5_HUMAN	27	3
Annexin A6 OS=Bos taurus GN=ANXA6 PE=1 SV=2	ANXA6_BOVIN	10	3
Annexin A7 OS=Bos taurus GN=ANXA7 PE=1 SV=2	ANXA7_BOVIN	14	3
AP-1 complex subunit beta-1 OS=Homo sapiens GN=AP1B1	AP1B1_HUMAN	14	2
AP-1 complex subunit gamma-1 OS=Homo sapiens GN=AP1G1	AP1G1_HUMAN	25	2
AP-1 complex subunit mu-1 OS=Bos taurus GN=AP1M1 PE=1	AP1M1_BOVIN	27	2
AP-1 complex subunit sigma-1A OS=Bos taurus GN=AP1S1	AP1S1_BOVIN	10	2
AP-1 complex subunit sigma-2 OS=Homo sapiens GN=AP1S2	AP1S2_HUMAN	3	2
AP-2 complex subunit alpha-1 OS=Homo sapiens GN=AP2A1	AP2A1_HUMAN	64	2
AP-2 complex subunit alpha-2 OS=Bos taurus GN=AP2A2 PE=2	AP2A2_BOVIN	31	2
AP-2 complex subunit beta-1 OS=Homo sapiens GN=AP2B1	AP2B1_HUMAN	79	2
AP-2 complex subunit mu-1 OS=Homo sapiens GN=AP2M1	AP2M1_HUMAN	45	2
AP-2 complex subunit sigma-1 OS=Homo sapiens GN=AP2S1	AP2S1_HUMAN	11	2
AP-3 complex subunit mu-2 OS=Rattus norvegicus GN=Ap3m2	AP3M2_RAT	1	2
AP2-associated protein kinase 1 OS=Homo sapiens GN=AAK1	AAK1_HUMAN	21	2, 14
Aquaporin-4 OS=Bos taurus GN=AQP4 PE=2 SV=3	AQP4_BOVIN	3	4
Arf-GAP domain and FG repeats-containing protein 1 OS=Bos	AGFG1_BOVIN	2	11
Astrocytic phosphoprotein PEA-15 OS=Cricetulus griseus	PEA15_CRIGR	2	19
Beta-soluble NSF attachment protein OS=Rattus norvegicus	SNAB_RAT	5	11
Brain acid soluble protein 1 OS=Bos taurus GN=BASP1 PE=1	BASP1_BOVIN	4	15
Calcitonin receptor OS=Sus scrofa GN=CALCR PE=2 SV=2	CALCR_PIG	3	4
Calcium-binding and coiled-coil domain-containing protein 1	CACO1_HUMAN	4	12
Calmodulin OS=Homo sapiens GN=CALM1 PE=1 SV=2	CALM_HUMAN	3	12
Calretinin OS=Mus musculus GN=Calb2 PE=1 SV=3	CALB2_MOUSE	4	
Cathepsin D OS=Canis familiaris GN=CTSD PE=2 SV=1	CATD_CANFA	2	4
Cation-dependent mannose-6-phosphate receptor OS=Bos	MPRD_BOVIN	5	4
CD81 antigen OS=Bos taurus GN=CD81 PE=2 SV=1	CD81_BOVIN	2	4
Choline transporter-like protein 1 OS=Homo sapiens	CTL1_HUMAN	3	4
Chronic lymphocytic leukemia deletion region gene 6 protein	CLLD6_BOVIN	2	
Clathrin coat assembly protein AP180 - Mus musculus (Mouse)	AP180_MOUSE	24	3
Clathrin heavy chain 1 OS=Bos taurus GN=CLTC PE=1 SV=1	CLH1_BOVIN	153	1
Clathrin heavy chain 2 OS=Homo sapiens GN=CLTCL1 PE=1	CLH2_HUMAN	3	1
Clathrin interactor 1 OS=Homo sapiens GN=CLINT1 PE=1 SV=1	EPN4_HUMAN	15	1
Clathrin light chain A OS=Rattus norvegicus GN=Clta PE=1 SV=1	CLCA_RAT	11	1
Clathrin light chain B OS=Homo sapiens GN=CLTB PE=1 SV=1	CLCB_HUMAN	14	1
Clavesin-2 OS=Rattus norvegicus GN=Clvs2 PE=1 SV=1	CLVS2_RAT	4	3
Clusterin OS=Sus scrofa GN=CLU PE=1 SV=1	CLUS_PIG	3	3?

Cofilin-1 OS=Homo sapiens GN=CFL1 PE=1 SV=3	COF1_HUMAN	4	5
Copine-3 OS=Pongo abelii GN=CPNE3 PE=2 SV=1	CPNE3_PONAB	2	17?
Cyclin G-associated kinase OS=Mus musculus GN=Gak PE=1	GAK_MOUSE	4	7
Dynamin-3 OS=Homo sapiens GN=DNM3 PE=1 SV=4	DYN3_HUMAN	3	6
Endophilin-A1 OS=Rattus norvegicus GN=Sh3gl2 PE=1 SV=2	SH3G2_RAT	4	3
Epidermal growth factor receptor substrate 15-like 1 OS=Homo	EP15R_HUMAN	2	3
Epsin-1 OS=Homo sapiens GN=EPN1 PE=1 SV=1	EPN1_HUMAN	9	3
Excitatory amino acid transporter 1 OS=Bos taurus GN=SLC1A3	EAA1_BOVIN	7	4
F-actin-capping protein subunit alpha-2 OS=Macaca fascicularis	CAZA2_MACFA	3	5
Fascin OS=Rattus norvegicus GN=Fscn1 PE=1 SV=2	FSCN1_RAT	3	15, 5
FXRD domain-containing ion transport regulator 6 OS=Bos taurus	FXRD6_BOVIN	3	4
Galectin-1 OS=Sus scrofa GN=LGALS1 PE=2 SV=3	LEG1_PIG	2	
Gamma-soluble NSF attachment protein OS=Bos taurus	SNAG_BOVIN	4	19
Glial fibrillary acidic protein OS=Homo sapiens GN=GFAP PE=1	GFAP_HUMAN	16	5
Guanine nucleotide-binding protein G(i), alpha-1 subunit OS=Bos	GNAI1_BOVIN	2	12
Guanine nucleotide-binding protein G(i), alpha-2 subunit	GNAI2_HUMAN	14	12
Guanine nucleotide-binding protein G(l)/G(s)/G(t) subunit beta-1	GBB1_HUMAN	12	12
Guanine nucleotide-binding protein G(l)/G(s)/G(t) subunit beta-2	GBB2_HUMAN	3	12
Guanine nucleotide-binding protein G(k) subunit alpha	GNAI3_RAT	2	12
Guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha OS=Homo	GNAO_HUMAN	25	12
Guanine nucleotide-binding protein G(q) subunit alpha OS=Homo	GNAQ_HUMAN	7	12
Guanine nucleotide-binding protein G(s) subunit alpha isoforms	GNAS1_HUMAN	5	12
Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-13 OS=Homo	GNA13_HUMAN	5	12
Guanine nucleotide-binding protein-like 1 OS=Macaca	GNL1_MACFA	5	12
Heat shock 70 kDa protein 12A OS=Homo sapiens	HS12A_HUMAN	7	16
Heat shock cognate 71 kDa protein OS=Mus musculus	HSP7C_MOUSE	25	16
Huntingtin-interacting protein 1 OS=Homo sapiens GN=HIP1	HIP1_HUMAN	14	15, 3, 5?
Inositol polyphosphate 5-phosphatase OCRL-1 OS=Homo	OCRL_HUMAN	3	6
Integrin beta-2 OS=Sus scrofa GN=ITGB2 PE=2 SV=1	ITB2_PIG	10	4
Interferon-induced GTP-binding protein Mx1 OS=Sus scrofa	MX1_PIG	5	
Intersectin-1 OS=Homo sapiens GN=ITSN1 PE=1 SV=3	ITSN1_HUMAN	1	2, 5
LAMP family protein C20orf103 homolog OS=Pongo abelii PE=2	CT103_PONAB	1	4
Leukocyte surface antigen CD47 OS=Sus scrofa GN=CD47	CD47_PIG	1	4
Limbic system-associated membrane protein OS=Homo sapiens	LSAMP_HUMAN	2	4
Low affinity immunoglobulin gamma Fc region receptor III	FCGR3_PIG	1	4
Macrophage migration inhibitory factor OS=Sus scrofa GN=MIF	MIF_PIG	2	
Major prion protein OS=Sus scrofa GN=PRNP PE=1 SV=1	PRIO_PIG	3	15
Membrane-associated progesterone receptor component 1	PGRC1_PIG	3	15
Mu-crystallin homolog OS=Mus musculus GN=Crym PE=1 SV=1	CRYM_MOUSE	2	18
Myelin basic protein OS=Bos taurus GN=MBP PE=1 SV=1	MBP_BOVIN	11	5, 15
Myelin proteolipid protein OS=Homo sapiens GN=PLP1 PE=1	MYPR_HUMAN	5	15
Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate OS=Bos taurus	MARCS_BOVIN	3	5
N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2 OS=Homo	DDAH2_HUMAN	3	
Neural cell adhesion molecule 1 OS=Bos taurus GN=NCAM1	NCAM1_BOVIN	4	15
Neurochondrin OS=Bos taurus GN=NCDN PE=2 SV=1	NCDN_BOVIN	2	12
Neuronal growth regulator 1 OS=Rattus norvegicus GN=Negr1	NEGR1_RAT	3	15
Neuronal membrane glycoprotein M6-a OS=Bos taurus	GPM6A_BOVIN	4	
Neuroplastin OS=Rattus norvegicus GN=Nptn PE=1 SV=2	NPTN_RAT	7	15, 12?
Neurotrimin OS=Homo sapiens GN=NT PE=1 SV=1	NTRI_HUMAN	4	15
Nucleoside diphosphate kinase B OS=Sus scrofa GN=NME2	NDKB_PIG	4	15
Numb-like protein OS=Homo sapiens GN=NUMBL PE=1 SV=1	NUMBL_HUMAN	4	12
P2Y purinoceptor 12 OS=Rattus norvegicus GN=P2ry12 PE=1	P2Y12_RAT	3	15
Phosphatidylethanolamine-binding protein 1 - Bos taurus (Bovine)	PEBP1_BOVIN	5	3
Phosphatidylinositol-binding clathrin assembly protein OS=Homo	PICAL_HUMAN	14	3
Plasma membrane calcium-transporting ATPase 1 OS=Sus	AT2B1_PIG	12	13
Plasma membrane calcium-transporting ATPase 2 OS=Homo	AT2B2_HUMAN	3	13

Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit beta OS=Bos	PA1B2_BOVIN	2	
Profilin-1 OS=Mus musculus GN=Pfn1 PE=1 SV=2	PROF1_MOUSE	3	5
Programmed cell death protein 6 OS=Mus musculus GN=Pcdcd6	PDCD6_MOUSE	5	12
Proline-rich transmembrane protein 2 OS=Homo sapiens	PRRT2_HUMAN	2	
Protein DJ-1 OS=Homo sapiens GN=PARK7 PE=1 SV=2	PARK7_HUMAN	6	
Protein FAM49B OS=Bos taurus GN=FAM49B PE=2 SV=1	FA49B_BOVIN	3	
Protein NDRG2 OS=Bos taurus GN=NDRG2 PE=2 SV=1	NDRG2_BOVIN	4	
Protein NDRG3 OS=Bos taurus GN=NDRG3 PE=2 SV=1	NDRG3_BOVIN	2	
Protein NDRG4 OS=Homo sapiens GN=NDRG4 PE=2 SV=2	NDRG4_HUMAN	3	
Protein S100-A1 OS=Bos taurus GN=S100A1 PE=1 SV=2	S10A1_BOVIN	2	
Protein S100-A14 OS=Homo sapiens GN=S100A14 PE=1 SV=1	S10AE_HUMAN	4	
Protein S100-A16 OS=Homo sapiens GN=S100A16 PE=1 SV=1	S10AG_HUMAN	2	
Protein SEC13 homolog OS=Homo sapiens GN=SEC13 PE=1	SEC13_HUMAN	4	
Protein transport protein Sec16A OS=Homo sapiens	SC16A_HUMAN	3	19
Protein-L-isoaspartate(D-aspartate) O-methyltransferase OS=Bos	PIMT_BOVIN	2	
Putative tyrosine-protein phosphatase auxilin OS=Bos taurus	AUXI_BOVIN	36	6
Putative ubiquitin-conjugating enzyme E2 N-like OS=Homo	UE2NL_HUMAN	2	
Rab GDP dissociation inhibitor alpha OS=Canis familiaris	GDIA_CANFA	5	10
Rab GDP dissociation inhibitor beta OS=Sus scrofa GN=GDI2	GDIB_PIG	3	10
Rab5 GDP/GTP exchange factor OS=Bos taurus GN=RABGEF1	RABX5_BOVIN	8	10
Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 OS=Homo sapiens	RAC1_HUMAN	6	15, 5
Ras-related protein Rab-10 OS=Homo sapiens GN=RAB10 PE=1	RAB10_HUMAN	4	10
Ras-related protein Rab-11B OS=Homo sapiens GN=RAB11B	RB11B_HUMAN	7	10
Ras-related protein Rab-14 OS=Homo sapiens GN=RAB14 PE=1	RAB14_HUMAN	4	10
Ras-related protein Rab-1B OS=Homo sapiens GN=RAB1B	RAB1B_HUMAN	5	10
Ras-related protein Rab-2A OS=Oryctolagus cuniculus	RAB2A_RABIT	6	10
Ras-related protein Rab-35 OS=Homo sapiens GN=RAB35 PE=1	RAB35_HUMAN	2	10
Ras-related protein Rab-3A OS=Bos taurus GN=RAB3A PE=1	RAB3A_BOVIN	10	10
Ras-related protein Rab-4A OS=Homo sapiens GN=RAB4A	RAB4A_HUMAN	3	10
Ras-related protein Rab-4B OS=Homo sapiens GN=RAB4B	RAB4B_HUMAN	10	10
Ras-related protein Rab-5A OS=Canis familiaris GN=RAB5A	RAB5A_CANFA	3	10
Ras-related protein Rab-5B OS=Homo sapiens GN=RAB5B	RAB5B_HUMAN	4	10
Ras-related protein Rab-5C OS=Bos taurus GN=RAB5C PE=2	RAB5C_BOVIN	8	10
Ras-related protein Rab-6A - Mus musculus (Mouse)	RAB6A_MOUSE	2	10
Ras-related protein Rab-6B - Homo sapiens (Human)	RAB6B_HUMAN	6	10
Ras-related protein Rab-7a OS=Pongo abelii GN=RAB7A PE=2	RAB7A_PONAB	7	10
Ras-related protein Ral-A OS=Mus musculus GN=Rala PE=1	RALA_MOUSE	6	15
Ras-related protein Rap-1A OS=Homo sapiens GN=RAP1A	RAP1A_HUMAN	5	15
Ras-related protein Rap-2b OS=Mus musculus GN=Rap2b PE=1	RAP2B_MOUSE	2	12
Reticulon-3 OS=Rattus norvegicus GN=Rtn3 PE=1 SV=1	RTN3_RAT	4	19
Rho GDP-dissociation inhibitor 1 OS=Bos taurus GN=ARHGDIA	GDIR1_BOVIN	7	12
Rho-related GTP-binding protein RhoG OS=Homo sapiens	RHOG_HUMAN	3	15
RUN domain-containing protein 3A OS=Homo sapiens	RUN3A_HUMAN	20	12
SCY1-like protein 2 OS=Mus musculus GN=Scyl2 PE=2 SV=1	SCYL2_MOUSE	2	14, 7 ?,
Secretory carrier-associated membrane protein 1 OS=Sus scrofa	SCAM1_PIG	4	19
Secretory carrier-associated membrane protein 3 OS=Bos taurus	SCAM3_BOVIN	2	19
Secretory carrier-associated membrane protein 5 OS=Pongo	SCAM5_PONAB	2	15, 19
Septin-2 OS=Homo sapiens GN=SEPT2 PE=1 SV=1	SEPT2_HUMAN	2	5
Septin-7 (Fragment) OS=Pan troglodytes GN=SEPT7 PE=2	SEPT7_PANTR	5	5
Serine/threonine-protein kinase MRCK alpha - Homo sapiens	MRCKA_HUMAN	2	7
Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory	2AAA_HUMAN	3	8
Serotransferrin - Sus scrofa (Pig)	TRFE_PIG	5	4
Sodium channel protein type 3 subunit alpha OS=Homo sapiens	SCN3A_HUMAN	2	13
Sodium- and chloride-dependent GABA transporter 1 OS=Homo	SC6A1_HUMAN	1	4
Sodium/calcium exchanger 2 OS=Homo sapiens GN=SLC8A2	NAC2_HUMAN	4	13
Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1	AT1A1_HUMAN	17	13

Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-2 OS=Mus	AT1A2_MOUSE	6	13
Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-3	AT1A3_HUMAN	51	13
Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-1 OS=Sus	AT1B1_PIG	13	13
Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-2 OS=Mus	AT1B2_MOUSE	2	13
Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 1	GTR1_SHEEP	3	4
Sorcin OS=Mus musculus GN=Sri PE=2 SV=1	SORCN_MOUSE	7	15
Sortilin-related receptor precursor - Mus musculus (Mouse)	SORL_MOUSE	3	4
Stromal membrane-associated protein 2 OS=Homo sapiens	SMAP2_HUMAN	3	19?
Superoxide dismutase [Cu-Zn] - Sus scrofa (Pig)	SODC_PIG	3	
Synaptic vesicle glycoprotein 2A OS=Rattus norvegicus	SV2A_RAT	13	14
Synaptobrevin homolog YKT6 OS=Mus musculus GN=Ykt6 PE=2	YKT6_MOUSE	2	9
Synaptogyrin-1 OS=Homo sapiens GN=SYNGR1 PE=1 SV=2	SNG1_HUMAN	2	15
Synaptogyrin-3 OS=Bos taurus GN=SYNGR3 PE=2 SV=1	SNG3_BOVIN	4	15
Synaptophysin OS=Bos taurus GN=SYP PE=2 SV=3	SYPH_BOVIN	3	15
Synaptoporin OS=Rattus norvegicus GN=Synpr PE=2 SV=2	SYNPR_RAT	7	15, 13?
Synaptosomal-associated protein 25 OS=Pongo abelii	SNP25_PONAB	26	9
Synaptotagmin-1 OS=Macaca fascicularis GN=SYT1 PE=2 SV=1	SYT1_MACFA	20	11
Synaptotagmin-12 OS=Homo sapiens GN=SYT12 PE=2 SV=1	SYT12_HUMAN	2	11
Synaptotagmin-2 OS=Homo sapiens GN=SYT2 PE=1 SV=2	SYT2_HUMAN	5	11
Syntaxin-12 OS=Homo sapiens GN=STX12 PE=1 SV=1	STX12_HUMAN	4	9
Syntaxin-1A OS=Rattus norvegicus GN=Stx1a PE=1 SV=1	STX1A_RAT	15	9
Syntaxin-1B OS=Mus musculus GN=Stx1b PE=1 SV=1	STX1B_MOUSE	20	9
Syntaxin-6 OS=Mus musculus GN=Stx6 PE=2 SV=1	STX6_MOUSE	3	9
Syntaxin-7 OS=Homo sapiens GN=STX7 PE=1 SV=4	STX7_HUMAN	2	9
Syntaxin-8 OS=Rattus norvegicus GN=Stx8 PE=1 SV=1	STX8_RAT	3	9
Syntaxin-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=STXBP1	STXB1_HUMAN	31	9
T-complex protein 1 subunit zeta OS=Bos taurus GN=CCT6A	TCPZ_BOVIN	4	5, 16
Tetraspanin-7 OS=Mus musculus GN=Tspan7 PE=2 SV=2	TSN7_MOUSE	3	4
Thy-1 membrane glycoprotein OS=Homo sapiens GN=THY1	THY1_HUMAN	2	15
Toll-interacting protein OS=Bos taurus GN=TOLLIP PE=2 SV=1	TOLIP_BOVIN	2	12
Transforming protein RhoA OS=Canis familiaris GN=RHOA PE=2	RHOA_CANFA	4	5
Transmembrane protein 119 OS=Homo sapiens GN=TMEM119	TM119_HUMAN	1	4
Transmembrane protein 163 OS=Mus musculus GN=Tmem163	TM163_MOUSE	2	4
Tubulin alpha-1B chain OS=Homo sapiens GN=TUBA1B PE=1	TBA1B_HUMAN	28	5
Tubulin polymerization-promoting protein OS=Bos taurus	TPPP_BOVIN	4	5
V-type proton ATPase 116 kDa subunit a isoform 1 OS=Bos	VPP1_BOVIN	21	13
V-type proton ATPase 16 kDa proteolipid subunit OS=Mus	VATL_MOUSE	5	13
V-type proton ATPase catalytic subunit A OS=Bos taurus	VATA_BOVIN	24	13
V-type proton ATPase subunit B, brain isoform OS=Homo	VATB2_HUMAN	16	13
V-type proton ATPase subunit C 1 OS=Bos taurus	VATC1_BOVIN	13	13
V-type proton ATPase subunit d 1 OS=Homo sapiens	VA0D1_HUMAN	19	13
V-type proton ATPase subunit D OS=Homo sapiens	VATD_HUMAN	6	13
V-type proton ATPase subunit E 1 OS=Rattus norvegicus	VATE1_RAT	18	13
V-type proton ATPase subunit F OS=Homo sapiens	VATF_HUMAN	2	13
V-type proton ATPase subunit H OS=Sus scrofa GN=ATP6V1H	VATH_PIG	10	13
Vacuolar protein sorting-associated protein 45 OS=Homo sapiens	VPS45_HUMAN	10	11, 19
Vacuolar protein sorting-associated protein 53 homolog OS=Mus	VPS53_MOUSE	1	11
Vesicle-associated membrane protein 1 OS=Homo sapiens	VAMP1_HUMAN	2	11
Vesicle-associated membrane protein 2 OS=Bos taurus	VAMP2_BOVIN	8	11
Vesicle-fusing ATPase OS=Homo sapiens GN=NSF PE=1 SV=3	NSF_HUMAN	6	11
Vesicular glutamate transporter 1 OS=Bos taurus GN=SLC17A7	VGLU1_BOVIN	11	4
Vesicular inhibitory amino acid transporter OS=Macaca	VIAAT_MACFA	6	19
Visinin-like protein 1 OS=Mus musculus GN=Vsnl1 PE=1 SV=2	VISL1_MOUSE	8	
Zinc transporter 3 OS=Bos taurus GN=SLC30A3 PE=2 SV=1	ZNT3_BOVIN	4	4

Tabelle 7-2: Erklärungen der Spalte "Function"

coat	1
cargo adaptors	2
lipid binding proteins	3
cargo soluble/membrane	4
cytoskeleton	5
fission/uncoating	6
kinase	7
phosphatase	8
SNARE	9
Arf/Rab GTPases and regulation	10
docking/fusion	11
signal transduction	12
pumps, channels, carrier	13
adaptor associated proteins	14
localizes to plasma membrane	15
chaperones	16
function in membrane trafficking	17
mitochondria	18
regulation of transport/ required for vesicle transport	19

7.3 Übersicht der identifizierten Proteine im FLAG-Immünpräzipitat

Tabelle 7-3: Alphabetische Auflistung identifizierter Proteine mit Angabe der Accession-Nummer, Anzahl gefundener Peptide in Kontrolle (Pep K) und Peptide im FLAG-B55 α Präzipitat (Pep P)

Name	Accession	Pep K	Pep P
14-3-3 protein eta OS=Homo sapiens GN=YWHAH PE=1 SV=4	1433F_HUMAN	0	14
2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase OS=Homo sapiens	CN37_HUMAN	0	9
26S protease regulatory subunit 10B OS=Homo sapiens GN=PSMC6	PRS10_HUMAN	0	39
26S protease regulatory subunit 4 OS=Homo sapiens GN=PSMC1	PRS4_HUMAN	0	17
26S protease regulatory subunit 6A OS=Homo sapiens GN=PSMC3	PRS6A_HUMAN	0	26
26S protease regulatory subunit 6B OS=Homo sapiens GN=PSMC4	PRS6B_HUMAN	0	28
26S protease regulatory subunit 8 OS=Homo sapiens GN=PSMC5	PRS8_HUMAN	0	33
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 11 OS=Homo sapiens	PSD11_HUMAN	0	26
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 12 OS=Homo sapiens	PSD12_HUMAN	0	19
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 14 OS=Homo sapiens	PSDE_HUMAN	0	14
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2 OS=Homo sapiens	PSMD2_HUMAN	9	34
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 3 OS=Homo sapiens	PSMD3_HUMAN	0	20
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 4 OS=Homo sapiens	PSMD4_HUMAN	0	16
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 6 OS=Homo sapiens	PSMD6_HUMAN	0	26
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 7 OS=Homo sapiens	PSD7_HUMAN	0	22
28S ribosomal protein S15, mitochondrial OS=Homo sapiens	RT15_HUMAN	0	5
28S ribosomal protein S2, mitochondrial OS=Homo sapiens	RT02_HUMAN	0	5
28S ribosomal protein S34, mitochondrial OS=Homo sapiens	RT34_HUMAN	0	7
28S ribosomal protein S35, mitochondrial OS=Homo sapiens	RT35_HUMAN	0	7
28S ribosomal protein S5, mitochondrial OS=Homo sapiens	RT05_HUMAN	0	3
28S ribosomal protein S7, mitochondrial OS=Homo sapiens	RT07_HUMAN	0	5
28S ribosomal protein S9, mitochondrial OS=Homo sapiens	RT09_HUMAN	0	12
39S ribosomal protein L1, mitochondrial OS=Homo sapiens	RM01_HUMAN	0	6
39S ribosomal protein L10, mitochondrial OS=Homo sapiens	RM10_HUMAN	0	6
39S ribosomal protein L11, mitochondrial OS=Homo sapiens	RM11_HUMAN	0	4
39S ribosomal protein L12, mitochondrial OS=Homo sapiens	RM12_HUMAN	0	7
39S ribosomal protein L19, mitochondrial OS=Homo sapiens	RM19_HUMAN	0	5
39S ribosomal protein L24, mitochondrial OS=Homo sapiens	RM24_HUMAN	0	6
39S ribosomal protein L28, mitochondrial OS=Homo sapiens	RM28_HUMAN	0	10
39S ribosomal protein L37, mitochondrial OS=Homo sapiens	RM37_HUMAN	0	6
39S ribosomal protein L38, mitochondrial OS=Homo sapiens	RM38_HUMAN	0	9
39S ribosomal protein L44, mitochondrial OS=Homo sapiens	RM44_HUMAN	0	5
39S ribosomal protein L45, mitochondrial OS=Homo sapiens	RM45_HUMAN	0	3
39S ribosomal protein L46, mitochondrial OS=Homo sapiens	RM46_HUMAN	0	8
39S ribosomal protein L9, mitochondrial OS=Homo sapiens	RM09_HUMAN	0	10
3-hydroxyacyl-CoA dehydratase 3 OS=Homo sapiens GN=PTPLAD1	HACD3_HUMAN	0	7
40S ribosomal protein S11 OS=Homo sapiens GN=RPS11 PE=1 SV=3	RS11_HUMAN	0	3
40S ribosomal protein S18 OS=Homo sapiens GN=RPS18 PE=1 SV=3	RS18_HUMAN	0	3
4F2 cell-surface antigen heavy chain OS=Homo sapiens GN=SLC3A2	4F2_HUMAN	0	17
60S ribosomal protein L10a OS=Homo sapiens GN=RPL10A PE=1	RL10A_HUMAN	0	9
60S ribosomal protein L12 OS=Homo sapiens GN=RPL12 PE=1 SV=1	RL12_HUMAN	0	4
60S ribosomal protein L5 OS=Homo sapiens GN=RPL5 PE=1 SV=3	RL5_HUMAN	0	16
Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member B	AN32B_HUMAN	0	8
Actin-related protein 10 OS=Homo sapiens GN=ACTR10 PE=1 SV=1	ARP10_HUMAN	0	5
Adipocyte plasma membrane-associated protein OS=Homo sapiens	APMAP_HUMAN	0	5
Alpha-soluble NSF attachment protein OS=Homo sapiens GN=NAPA	SNAA_HUMAN	0	5
Ankyrin repeat and FYVE domain-containing protein 1 OS=Homo	ANFY1_HUMAN	8	65
Ankyrin repeat and LEM domain-containing protein 2 OS=Homo	ANKL2_HUMAN	0	7
AP-2 complex subunit alpha-2 OS=Homo sapiens GN=AP2A2 PE=1	AP2A2_HUMAN	0	4
AP-2 complex subunit beta OS=Homo sapiens GN=AP2B1 PE=1 SV=1	AP2B1_HUMAN	0	4

AP-3 complex subunit beta-1 OS=Homo sapiens GN=AP3B1 PE=1	AP3B1_HUMAN	0	4
AP-3 complex subunit mu-1 OS=Homo sapiens GN=AP3M1 PE=1	AP3M1_HUMAN	0	3
AP-3 complex subunit sigma-1 OS=Homo sapiens GN=AP3S1 PE=1	AP3S1_HUMAN	0	5
Apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial OS=Homo sapiens	AIFM1_HUMAN	0	9
Arf-GAP with coiled-coil, ANK repeat and PH domain-containing protein	ACAP2_HUMAN	0	36
Arginyl-tRNA synthetase, cytoplasmic OS=Homo sapiens GN=RARS	SYRC_HUMAN	0	6
Armadillo repeat-containing X-linked protein 3 OS=Homo sapiens	ARMX3_HUMAN	0	5
Aspartyl-tRNA synthetase, mitochondrial OS=Homo sapiens	SYDM_HUMAN	0	6
ATP-binding cassette sub-family E member 1 OS=Homo sapiens	ABCE1_HUMAN	0	31
ATP-binding cassette sub-family F member 1 OS=Homo sapiens	ABCF1_HUMAN	0	3
BAG family molecular chaperone regulator 2 OS=Homo sapiens	BAG2_HUMAN	0	3
Basigin OS=Homo sapiens GN=BSG PE=1 SV=2	BASI_HUMAN	0	4
B-cell receptor-associated protein 31 OS=Homo sapiens GN=BCAP31	BAP31_HUMAN	0	15
Bcl-2-like protein 13 OS=Homo sapiens GN=BCL2L13 PE=1 SV=1	B2L13_HUMAN	0	3
Beta-centractin OS=Homo sapiens GN=ACTR1B PE=1 SV=1	ACTY_HUMAN	0	17
BTB/POZ domain-containing protein KCTD5 OS=Homo sapiens	KCTD5_HUMAN	0	8
C-1-tetrahydrofolate synthase, cytoplasmic OS=Homo sapiens	C1TC_HUMAN	0	51
CAD protein OS=Homo sapiens GN=CAD PE=1 SV=3	PYR1_HUMAN	0	20
Calmegin OS=Homo sapiens GN=CLGN PE=1 SV=1	CLGN_HUMAN	0	11
Calmodulin-regulated spectrin-associated protein 3 OS=Homo sapiens	CAMP3_HUMAN	0	4
cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit alpha OS=Homo	KAPCA_HUMAN	0	4
cAMP-regulated phosphoprotein 19 OS=Homo sapiens GN=ARPP19	ARP19_HUMAN	0	6
Carboxypeptidase D OS=Homo sapiens GN=CPD PE=1 SV=2	CBPD_HUMAN	0	3
Casein kinase II subunit alpha OS=Homo sapiens GN=CSNK2A1	CSK21_HUMAN	0	11
Casein kinase II subunit alpha' OS=Homo sapiens GN=CSNK2A2	CSK22_HUMAN	0	5
Casein kinase II subunit beta OS=Homo sapiens GN=CSNK2B PE=1	CSK2B_HUMAN	0	15
Catechol O-methyltransferase OS=Homo sapiens GN=COMT PE=1	COMT_HUMAN	0	3
Catenin alpha-1 OS=Homo sapiens GN=CTNNA1 PE=1 SV=1	CTNA1_HUMAN	0	5
CD2 antigen cytoplasmic tail-binding protein 2 OS=Homo sapiens	CD2B2_HUMAN	0	5
Cell differentiation protein RCD1 homolog OS=Homo sapiens	RCD1_HUMAN	0	5
Coatomer subunit beta OS=Homo sapiens GN=COPB1 PE=1 SV=3	COPB_HUMAN	0	17
Coatomer subunit beta' OS=Homo sapiens GN=COPB2 PE=1 SV=2	COPB2_HUMAN	0	20
Coatomer subunit delta OS=Homo sapiens GN=ARCN1 PE=1 SV=1	COPD_HUMAN	0	5
Coatomer subunit epsilon OS=Homo sapiens GN=COPE PE=1 SV=3	COPE_HUMAN	0	9
Coatomer subunit gamma OS=Homo sapiens GN=COPG PE=1 SV=1	COPG_HUMAN	0	4
Coiled-coil domain-containing protein 124 OS=Homo sapiens	CC124_HUMAN	0	15
Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing protein 3,	CHCH3_HUMAN	0	5
Cooperator of PRMT5 OS=Homo sapiens GN=COPR5 PE=1 SV=3	COPR5_HUMAN	0	7
Creatine kinase U-type, mitochondrial OS=Homo sapiens	KCRU_HUMAN	0	11
CREB-regulated transcription coactivator 3 OS=Homo sapiens	CRTC3_HUMAN	0	18
Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1 OS=Homo sapiens	CAND1_HUMAN	0	9
Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial OS=Homo	UCRI_HUMAN	0	9
Cytochrome c oxidase subunit 2 OS=Homo sapiens GN=MT-CO2	COX2_HUMAN	0	4
Cytochrome c1, heme protein, mitochondrial OS=Homo sapiens	CY1_HUMAN	0	4
Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1 OS=Homo sapiens	DYHC1_HUMAN	0	20
Cytosolic purine 5'-nucleotidase OS=Homo sapiens GN=NT5C2 PE=1	5NTC_HUMAN	0	19
D-3-phosphoglycerate dehydrogenase OS=Homo sapiens	SERA_HUMAN	0	18
Dedicator of cytokinesis protein 7 OS=Homo sapiens GN=DOCK7	DOCK7_HUMAN	0	4
Dermcidin OS=Homo sapiens GN=DCD PE=1 SV=2	DCD_HUMAN	0	4
Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate	ODP2_HUMAN	0	7
Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-	ODO2_HUMAN	0	4
DNA mismatch repair protein Msh6 OS=Homo sapiens GN=MSH6	MSH6_HUMAN	0	3
DNA replication licensing factor MCM2 OS=Homo sapiens GN=MCM2	MCM2_HUMAN	0	23
DNA replication licensing factor MCM3 OS=Homo sapiens GN=MCM3	MCM3_HUMAN	0	22
DNA replication licensing factor MCM4 OS=Homo sapiens GN=MCM4	MCM4_HUMAN	0	14
DNA replication licensing factor MCM5 OS=Homo sapiens GN=MCM5	MCM5_HUMAN	0	11

DNA replication licensing factor MCM6 OS=Homo sapiens GN=MCM6	MCM6_HUMAN	0	20
DNA replication licensing factor MCM7 OS=Homo sapiens GN=MCM7	MCM7_HUMAN	0	25
DNA-directed RNA polymerases I, II, and III subunit RPABC1	RPAB1_HUMAN	0	6
DnaJ homolog subfamily A member 1 OS=Homo sapiens GN=DNAJA1	DNJA1_HUMAN	0	6
DnaJ homolog subfamily A member 2 OS=Homo sapiens GN=DNAJA2	DNJA2_HUMAN	0	12
DnaJ homolog subfamily B member 1 OS=Homo sapiens GN=DNAJB1	DNJB1_HUMAN	0	3
DnaJ homolog subfamily B member 11 OS=Homo sapiens	DJB11_HUMAN	0	3
DnaJ homolog subfamily C member 8 OS=Homo sapiens	DNJC8_HUMAN	0	10
Dolichol-phosphate mannosyltransferase OS=Homo sapiens	DPM1_HUMAN	0	32
Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 48 kDa	OST48_HUMAN	0	9
Dynactin subunit 3 OS=Homo sapiens GN=DCTN3 PE=1 SV=1	DCTN3_HUMAN	0	3
Dynactin subunit 4 OS=Homo sapiens GN=DCTN4 PE=1 SV=1	DCTN4_HUMAN	0	3
Dynactin subunit 6 OS=Homo sapiens GN=DCTN6 PE=1 SV=1	DCTN6_HUMAN	0	3
E3 ubiquitin-protein ligase BRE1A OS=Homo sapiens GN=RNF20	BRE1A_HUMAN	0	4
E3 ubiquitin-protein ligase UBR5 OS=Homo sapiens GN=UBR5 PE=1	UBR5_HUMAN	0	3
Elongation factor 1-alpha 2 OS=Homo sapiens GN=EEF1A2 PE=1	EF1A2_HUMAN	0	73
Endophilin-B2 OS=Homo sapiens GN=SH3GLB2 PE=1 SV=1	SHLB2_HUMAN	0	3
Endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment protein 3	ERGI3_HUMAN	0	4
Enoyl-CoA hydratase domain-containing protein 1 OS=Homo sapiens	ECHD1_HUMAN	0	50
Eukaryotic initiation factor 4A-I OS=Homo sapiens GN=EIF4A1 PE=1	IF4A1_HUMAN	0	20
Eukaryotic initiation factor 4A-III OS=Homo sapiens GN=EIF4A3 PE=1	IF4A3_HUMAN	0	6
Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1 OS=Homo sapiens	IF2A_HUMAN	0	15
Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 2 OS=Homo sapiens	IF2B_HUMAN	0	3
Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 3 OS=Homo sapiens	IF2G_HUMAN	0	4
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit G OS=Homo sapiens	EIF3G_HUMAN	0	17
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit J OS=Homo sapiens	EIF3J_HUMAN	0	13
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit M OS=Homo sapiens	EIF3M_HUMAN	0	41
Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 2 OS=Homo sapiens	IF4G2_HUMAN	0	18
Eukaryotic translation initiation factor 4E OS=Homo sapiens GN=EIF4E	IF4E_HUMAN	0	7
Eukaryotic translation initiation factor 4H OS=Homo sapiens	IF4H_HUMAN	0	3
Eukaryotic translation initiation factor 6 OS=Homo sapiens GN=EIF6	IF6_HUMAN	0	5
Evolutionarily conserved signaling intermediate in Toll pathway,	ECSIT_HUMAN	0	4
Exosome complex exonuclease MTR3 OS=Homo sapiens	EXOS6_HUMAN	0	3
Exosome complex exonuclease RRP44 OS=Homo sapiens GN=DIS3	RRP44_HUMAN	0	3
Exportin-1 OS=Homo sapiens GN=XPO1 PE=1 SV=1	XPO1_HUMAN	0	4
Exportin-2 OS=Homo sapiens GN=CSE1L PE=1 SV=3	XPO2_HUMAN	0	26
Ezrin OS=Homo sapiens GN=EZR PE=1 SV=4	EZRI_HUMAN	0	23
F-actin-capping protein subunit alpha-1 OS=Homo sapiens	CAZA1_HUMAN	0	7
F-actin-capping protein subunit beta OS=Homo sapiens GN=CAPZB	CAPZB_HUMAN	0	5
FAS-associated factor 2 OS=Homo sapiens GN=FAF2 PE=1 SV=2	FAF2_HUMAN	0	8
Fatty aldehyde dehydrogenase OS=Homo sapiens GN=ALDH3A2	AL3A2_HUMAN	0	4
Filamin-A OS=Homo sapiens GN=FLNA PE=1 SV=4	FLNA_HUMAN	42	140
Filamin-C OS=Homo sapiens GN=FLNC PE=1 SV=3	FLNC_HUMAN	0	20
Galectin-3 OS=Homo sapiens GN=LGALS3 PE=1 SV=5	LEG3_HUMAN	0	4
Gem-associated protein 5 OS=Homo sapiens GN=GEMIN5 PE=1	GEMI5_HUMAN	0	7
Girdin OS=Homo sapiens GN=CCDC88A PE=1 SV=2	GRDN_HUMAN	0	9
Glutamine-rich protein 2 OS=Homo sapiens GN=QRICH2 PE=1 SV=1	QRIC2_HUMAN	0	8
Golgin subfamily A member 3 OS=Homo sapiens GN=GOLGA3 PE=1	GOGA3_HUMAN	0	7
GPI transamidase component PIG-S OS=Homo sapiens GN=PIGS	PIGS_HUMAN	0	4
Growth arrest and DNA damage-inducible proteins-interacting protein 1	G45IP_HUMAN	0	6
GTP-binding nuclear protein Ran OS=Homo sapiens GN=RAN PE=1	RAN_HUMAN	0	9
Heat shock 70 kDa protein 4 OS=Homo sapiens GN=HSPA4 PE=1	HSP74_HUMAN	0	21
Heat shock 70 kDa protein 4L OS=Homo sapiens GN=HSPA4L PE=1	HS74L_HUMAN	0	5
Heat shock protein 105 kDa OS=Homo sapiens GN=HSPH1 PE=1	HS105_HUMAN	0	6
Hematological and neurological expressed 1-like protein OS=Homo	HN1L_HUMAN	0	4
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0 OS=Homo sapiens	ROA0_HUMAN	0	4

Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 OS=Homo sapiens	ROA3_HUMAN	0	4
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F OS=Homo sapiens	HNRPF_HUMAN	0	14
High mobility group protein B2 OS=Homo sapiens GN=HMGB2 PE=1	HMGB2_HUMAN	0	3
Histone-binding protein RBBP4 OS=Homo sapiens GN=RBBP4 PE=1	RBBP4_HUMAN	0	9
Hsp90 co-chaperone Cdc37 OS=Homo sapiens GN=CDC37 PE=1	CDC37_HUMAN	0	6
Hydroxysteroid dehydrogenase-like protein 2 OS=Homo sapiens	HSDL2_HUMAN	0	3
Hypoxia up-regulated protein 1 OS=Homo sapiens GN=HYOU1 PE=1	HYOU1_HUMAN	0	4
Ig kappa chain V-II region MIL OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	KV203_HUMAN	0	4
Importin subunit beta-1 OS=Homo sapiens GN=KPNB1 PE=1 SV=2	IMB1_HUMAN	0	30
Importin-5 OS=Homo sapiens GN=IPO5 PE=1 SV=4	IPO5_HUMAN	0	12
Importin-7 OS=Homo sapiens GN=IPO7 PE=1 SV=1	IPO7_HUMAN	0	11
Importin-8 OS=Homo sapiens GN=IPO8 PE=1 SV=2	IPO8_HUMAN	0	94
Interleukin enhancer-binding factor 2 OS=Homo sapiens GN=ILF2	ILF2_HUMAN	0	8
Interleukin enhancer-binding factor 3 OS=Homo sapiens GN=ILF3	ILF3_HUMAN	0	6
Kinectin OS=Homo sapiens GN=KTN1 PE=1 SV=1	KTN1_HUMAN	0	4
Kinesin-1 heavy chain OS=Homo sapiens GN=KIF5B PE=1 SV=1	KINH_HUMAN	0	42
Kinesin-like protein KIF11 OS=Homo sapiens GN=KIF11 PE=1 SV=2	KIF11_HUMAN	11	50
Kinesin-like protein KIF13B OS=Homo sapiens GN=KIF13B PE=1	KI13B_HUMAN	0	31
Kinetochose protein Spc24 OS=Homo sapiens GN=SPC24 PE=1 SV=1	SPC24_HUMAN	0	3
La-related protein 1 OS=Homo sapiens GN=LARP1 PE=1 SV=2	LARP1_HUMAN	0	3
Large proline-rich protein BAT2 OS=Homo sapiens GN=BAT2 PE=1	BAT2_HUMAN	0	8
Large proline-rich protein BAT3 OS=Homo sapiens GN=BAT3 PE=1	BAT3_HUMAN	0	5
Leucyl-tRNA synthetase, cytoplasmic OS=Homo sapiens GN=LARS	SYLC_HUMAN	0	18
LIM domain and actin-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=LIMA1	LIMA1_HUMAN	0	13
Membrane-associated progesterone receptor component 1 OS=Homo	PGRC1_HUMAN	0	10
Membrane-associated progesterone receptor component 2 OS=Homo	PGRC2_HUMAN	0	6
Methionyl-tRNA synthetase, cytoplasmic OS=Homo sapiens	SYMC_HUMAN	0	6
Methylosome protein 50 OS=Homo sapiens GN=WDR77 PE=1 SV=1	MEP50_HUMAN	23	116
Methylosome subunit pICln OS=Homo sapiens GN=CLNS1A PE=1	ICLN_HUMAN	0	25
Mitochondrial chaperone BCS1 OS=Homo sapiens GN=BCS1L PE=1	BCS1_HUMAN	0	3
Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM50	TIM50_HUMAN	0	13
Mitochondrial import receptor subunit TOM34 OS=Homo sapiens	TOM34_HUMAN	0	3
Mitochondrial import receptor subunit TOM70 OS=Homo sapiens	TOM70_HUMAN	0	8
Mitochondrial inner membrane protein OS=Homo sapiens GN=IMMT	IMMT_HUMAN	0	12
Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7 OS=Homo sapiens	M3K7_HUMAN	0	6
Monofunctional C1-tetrahydrofolate synthase, mitochondrial OS=Homo	C1TM_HUMAN	0	6
Mps one binder kinase activator-like 3 OS=Homo sapiens	MOBL3_HUMAN	0	3
Myosin-10 OS=Homo sapiens GN=MYH10 PE=1 SV=3	MYH10_HUMAN	0	43
Myosin-9 OS=Homo sapiens GN=MYH9 PE=1 SV=4	MYH9_HUMAN	0	28
Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate OS=Homo sapiens	MARCS_HUMAN	0	9
NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial	NDUS1_HUMAN	0	3
Negative elongation factor E OS=Homo sapiens GN=RDBP PE=1	NELFE_HUMAN	0	3
Neurofibromin OS=Homo sapiens GN=NF1 PE=1 SV=2	NF1_HUMAN	0	4
Nodal modulator 3 OS=Homo sapiens GN=NOMO3 PE=2 SV=2	NOMO3_HUMAN	0	8
NSFL1 cofactor p47 OS=Homo sapiens GN=NSFL1C PE=1 SV=2	NSF1C_HUMAN	0	9
Nuclear autoantigenic sperm protein OS=Homo sapiens GN=NASP	NASP_HUMAN	0	18
Nuclear cap-binding protein subunit 1 OS=Homo sapiens GN=NCBP1	NCBP1_HUMAN	0	5
Nucleoprotein TPR OS=Homo sapiens GN=TPR PE=1 SV=3	TPR_HUMAN	0	19
Nucleosome assembly protein 1-like 1 OS=Homo sapiens	NP1L1_HUMAN	0	7
OCIA domain-containing protein 1 OS=Homo sapiens GN=OCIAD1	OCAD1_HUMAN	0	9
OTU domain-containing protein 4 OS=Homo sapiens GN=OTUD4	OTUD4_HUMAN	0	7
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase-like 4 OS=Homo sapiens	PPIL4_HUMAN	0	5
Peroxisomal multifunctional enzyme type 2 OS=Homo sapiens	DHB4_HUMAN	0	7
PEST proteolytic signal-containing nuclear protein OS=Homo sapiens	PCNP_HUMAN	0	4
Phosphate carrier protein, mitochondrial OS=Homo sapiens	MPCP_HUMAN	0	6
Phosphatidylinositol 4-kinase alpha OS=Homo sapiens GN=PI4KA	PI4KA_HUMAN	0	5

Poly(rC)-binding protein 2 OS=Homo sapiens GN=PCBP2 PE=1 SV=1	PCBP2_HUMAN	0	8
Pre-mRNA-splicing factor ISY1 homolog OS=Homo sapiens GN=ISY1	ISY1_HUMAN	0	3
Pre-mRNA-splicing factor SPF27 OS=Homo sapiens GN=BCAS2	SPF27_HUMAN	0	5
Probable ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase FAF-X OS=Homo	USP9X_HUMAN	0	27
Proliferating cell nuclear antigen OS=Homo sapiens GN=PCNA PE=1	PCNA_HUMAN	0	16
Prostaglandin E synthase 2 OS=Homo sapiens GN=PTGES2 PE=1	PGES2_HUMAN	0	4
Proteasomal ubiquitin receptor ADRM1 OS=Homo sapiens	ADRM1_HUMAN	0	10
Proteasome subunit alpha type-1 OS=Homo sapiens GN=PSMA1	PSA1_HUMAN	0	23
Proteasome subunit alpha type-2 OS=Homo sapiens GN=PSMA2	PSA2_HUMAN	0	29
Proteasome subunit alpha type-3 OS=Homo sapiens GN=PSMA3	PSA3_HUMAN	0	33
Proteasome subunit alpha type-5 OS=Homo sapiens GN=PSMA5	PSA5_HUMAN	0	16
Proteasome subunit alpha type-6 OS=Homo sapiens GN=PSMA6	PSA6_HUMAN	0	21
Proteasome subunit alpha type-7 OS=Homo sapiens GN=PSMA7	PSA7_HUMAN	0	22
Proteasome subunit beta type-1 OS=Homo sapiens GN=PSMB1 PE=1	PSB1_HUMAN	0	35
Proteasome subunit beta type-2 OS=Homo sapiens GN=PSMB2 PE=1	PSB2_HUMAN	0	9
Proteasome subunit beta type-3 OS=Homo sapiens GN=PSMB3 PE=1	PSB3_HUMAN	0	19
Proteasome subunit beta type-4 OS=Homo sapiens GN=PSMB4 PE=1	PSB4_HUMAN	0	16
Proteasome subunit beta type-5 OS=Homo sapiens GN=PSMB5 PE=1	PSB5_HUMAN	0	7
Proteasome subunit beta type-6 OS=Homo sapiens GN=PSMB6 PE=1	PSB6_HUMAN	0	8
Proteasome subunit beta type-7 OS=Homo sapiens GN=PSMB7 PE=1	PSB7_HUMAN	0	16
Proteasome-associated protein ECM29 homolog OS=Homo sapiens	ECM29_HUMAN	0	4
Protein arginine N-methyltransferase 1 OS=Homo sapiens GN=PRMT1	ANM1_HUMAN	0	10
Protein arginine N-methyltransferase 5 OS=Homo sapiens GN=PRMT5	ANM5_HUMAN	64	379
Protein BAT2-like 2 OS=Homo sapiens GN=BAT2L2 PE=1 SV=2	BA2L2_HUMAN	0	4
Protein C20orf11 OS=Homo sapiens GN=C20orf11 PE=1 SV=1	CT011_HUMAN	0	11
Protein CDV3 homolog OS=Homo sapiens GN=CDV3 PE=1 SV=1	CDV3_HUMAN	0	11
Protein diaphanous homolog 1 OS=Homo sapiens GN=DIAPH1 PE=1	DIAP1_HUMAN	0	53
Protein enabled homolog OS=Homo sapiens GN=ENAH PE=1 SV=2	ENAH_HUMAN	0	13
Protein FAM122A OS=Homo sapiens GN=FAM122A PE=1 SV=1	F122A_HUMAN	0	43
Protein flightless-1 homolog OS=Homo sapiens GN=FLII PE=1 SV=2	FLII_HUMAN	0	5
Protein Hook homolog 3 OS=Homo sapiens GN=HOOK3 PE=1 SV=2	HOOK3_HUMAN	0	7
Protein KIAA1967 OS=Homo sapiens GN=KIAA1967 PE=1 SV=2	K1967_HUMAN	14	88
Protein phosphatase 1A OS=Homo sapiens GN=PPM1A PE=1 SV=1	PPM1A_HUMAN	0	35
Protein phosphatase 1B OS=Homo sapiens GN=PPM1B PE=1 SV=1	PPM1B_HUMAN	0	19
Protein phosphatase methylesterase 1 OS=Homo sapiens GN=PPME1	PPME1_HUMAN	0	47
Protein quaking OS=Homo sapiens GN=QKI PE=1 SV=1	QKI_HUMAN	0	3
Protein SET OS=Homo sapiens GN=SET PE=1 SV=3	SET_HUMAN	0	22
Protein-L-isoaspartate(D-aspartate) O-methyltransferase OS=Homo	PIMT_HUMAN	0	3
Putative GTP-binding protein Parf OS=Homo sapiens GN=PARF PE=1	PARF_HUMAN	0	5
Putative protein FAM10A4 OS=Homo sapiens GN=FAM10A4 PE=5	F10A4_HUMAN	0	5
Pyrroline-5-carboxylate reductase 2 OS=Homo sapiens GN=PYCR2	P5CR2_HUMAN	0	11
Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form,	ODPA_HUMAN	0	4
Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial	ODPB_HUMAN	0	10
Rab3 GTPase-activating protein catalytic subunit OS=Homo sapiens	RB3GP_HUMAN	0	9
Rab3 GTPase-activating protein non-catalytic subunit OS=Homo	RBGPR_HUMAN	0	11
Radixin OS=Homo sapiens GN=RDY PE=1 SV=1	RADI_HUMAN	0	16
Ran GTPase-activating protein 1 OS=Homo sapiens GN=RANGAP1	RAGP1_HUMAN	0	6
Ran-specific GTPase-activating protein OS=Homo sapiens	RANG_HUMAN	0	10
Ras-related protein Rab-10 OS=Homo sapiens GN=RAB10 PE=1	RAB10_HUMAN	0	4
Ras-related protein Rab-11A OS=Homo sapiens GN=RAB11A PE=1	RB11A_HUMAN	0	6
Ras-related protein Rab-5A OS=Homo sapiens GN=RAB5A PE=1	RAB5A_HUMAN	0	6
Ras-related protein Rab-8A OS=Homo sapiens GN=RAB8A PE=1	RAB8A_HUMAN	0	3
Ras-related protein Ral-A OS=Homo sapiens GN=RALA PE=1 SV=1	RALA_HUMAN	0	7
Ras-related protein Rap-1b OS=Homo sapiens GN=RAP1B PE=1	RAP1B_HUMAN	0	4
RelA-associated inhibitor OS=Homo sapiens GN=PPP1R13L PE=1	IASPP_HUMAN	0	9
Replication factor C subunit 2 OS=Homo sapiens GN=RFC2 PE=1	RFC2_HUMAN	0	3

Reticulocalbin-2 OS=Homo sapiens GN=RCN2 PE=1 SV=1	RCN2_HUMAN	0	14
Rho-associated protein kinase 1 OS=Homo sapiens GN=ROCK1 PE=1	ROCK1_HUMAN	27	128
Ribose-phosphate pyrophosphokinase 1 OS=Homo sapiens	PRPS1_HUMAN	0	9
RNA 3'-terminal phosphate cyclase-like protein OS=Homo sapiens	RCL1_HUMAN	0	4
RNA-binding protein 14 OS=Homo sapiens GN=RBM14 PE=1 SV=2	RBM14_HUMAN	0	7
RNA-binding protein 4 OS=Homo sapiens GN=RBM4 PE=1 SV=1	RBM4_HUMAN	0	3
RNA-binding protein 7 OS=Homo sapiens GN=RBM7 PE=1 SV=1	RBM7_HUMAN	0	13
RNA-binding protein FUS OS=Homo sapiens GN=FUS PE=1 SV=1	FUS_HUMAN	0	3
RuvB-like 1 OS=Homo sapiens GN=RUVBL1 PE=1 SV=1	RUVB1_HUMAN	0	17
RuvB-like 2 OS=Homo sapiens GN=RUVBL2 PE=1 SV=3	RUVB2_HUMAN	0	14
Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2 OS=Homo	AT2A2_HUMAN	0	9
Schlafen family member 11 OS=Homo sapiens GN=SLFN11 PE=1	SLN11_HUMAN	0	22
Sec1 family domain-containing protein 1 OS=Homo sapiens	SCFD1_HUMAN	0	3
Septin-7 OS=Homo sapiens GN=SEPT7 PE=1 SV=2	SEPT7_HUMAN	0	3
Serine/threonine-protein kinase 38 OS=Homo sapiens GN=STK38	STK38_HUMAN	0	15
Serine/threonine-protein kinase RIO1 OS=Homo sapiens GN=RIOK1	RIOK1_HUMAN	0	8
Serine/threonine-protein kinase SIK2 OS=Homo sapiens GN=SIK2	SIK2_HUMAN	0	7
Serine/threonine-protein phosphatase 2A 55 kDa regulatory subunit B	2ABA_HUMAN	33	734
Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A	2AAA_HUMAN	68	1455
Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A	2AAB_HUMAN	0	464
Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit alpha	PP2AA_HUMAN	0	487
Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit beta isoform	PP2AB_HUMAN	43	454
Serine/threonine-protein phosphatase 4 catalytic subunit OS=Homo	PP4C_HUMAN	0	18
Serine/threonine-protein phosphatase 4 regulatory subunit 3A	P4R3A_HUMAN	0	13
Serine/threonine-protein phosphatase PGAM5, mitochondrial	PGAM5_HUMAN	0	4
Serine/threonine-protein phosphatase PP1-alpha catalytic subunit	PP1A_HUMAN	0	3
Sideroflexin-1 OS=Homo sapiens GN=SFXN1 PE=1 SV=4	SFXN1_HUMAN	0	5
Signal recognition particle 54 kDa protein OS=Homo sapiens	SRP54_HUMAN	0	3
Signal recognition particle 68 kDa protein OS=Homo sapiens	SRP68_HUMAN	0	5
Signal recognition particle 72 kDa protein OS=Homo sapiens	SRP72_HUMAN	0	6
SLAIN motif-containing protein 2 OS=Homo sapiens GN=SLAIN2	SLAI2_HUMAN	0	3
Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1 OS=Homo	AT1A1_HUMAN	0	14
Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-3 OS=Homo	AT1B3_HUMAN	0	6
Spindlin-1 OS=Homo sapiens GN=SPIN1 PE=1 SV=3	SPIN1_HUMAN	0	5
Splicing factor 3A subunit 2 OS=Homo sapiens GN=SF3A2 PE=1	SF3A2_HUMAN	0	3
Splicing factor 3B subunit 4 OS=Homo sapiens GN=SF3B4 PE=1	SF3B4_HUMAN	0	4
Squamous cell carcinoma antigen recognized by T-cells 3 OS=Homo	SART3_HUMAN	0	4
Sterol-4-alpha-carboxylate 3-dehydrogenase, decarboxylating	NSDHL_HUMAN	0	5
Stress-induced-phosphoprotein 1 OS=Homo sapiens GN=STIP1 PE=1	STIP1_HUMAN	0	27
Structural maintenance of chromosomes protein 2 OS=Homo sapiens	SMC2_HUMAN	0	24
Structural maintenance of chromosomes protein 4 OS=Homo sapiens	SMC4_HUMAN	0	26
Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit,	DHSA_HUMAN	0	4
Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit,	DHSB_HUMAN	0	7
Superkiller viralicidic activity 2-like 2 OS=Homo sapiens GN=SKIV2L2	SK2L2_HUMAN	0	23
Surfeit locus protein 4 OS=Homo sapiens GN=SURF4 PE=1 SV=3	SURF4_HUMAN	0	6
Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog OS=Homo sapiens	VAT1_HUMAN	0	4
Synaptosomal-associated protein 29 OS=Homo sapiens GN=SNAP29	SNP29_HUMAN	0	4
Syntaxin-4 OS=Homo sapiens GN=STX4 PE=1 SV=2	STX4_HUMAN	0	6
TAR DNA-binding protein 43 OS=Homo sapiens GN=TARDBP PE=1	TADBP_HUMAN	0	4
Tether containing UBX domain for GLUT4 OS=Homo sapiens	ASPC1_HUMAN	0	3
Tetratricopeptide repeat protein 35 OS=Homo sapiens GN=TTC35	TTC35_HUMAN	0	5
Tetratricopeptide repeat protein 7B OS=Homo sapiens GN=TTC7B	TTC7B_HUMAN	0	3
TGF-beta-activated kinase 1 and MAP3K7-binding protein 1 OS=Homo	TAB1_HUMAN	13	69
Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial OS=Homo	PRDX3_HUMAN	0	3
Thioredoxin-like protein 1 OS=Homo sapiens GN=TXNL1 PE=1 SV=3	TXNL1_HUMAN	0	7
THO complex subunit 3 OS=Homo sapiens GN=THOC3 PE=1 SV=1	THOC3_HUMAN	0	6

THO complex subunit 4 OS=Homo sapiens GN=THOC4 PE=1 SV=3	THOC4_HUMAN	0	10
Tight junction protein ZO-1 OS=Homo sapiens GN=TJP1 PE=1 SV=3	ZO1_HUMAN	0	3
Transcription elongation factor A protein 1 OS=Homo sapiens	TCEA1_HUMAN	0	6
Transcription intermediary factor 1-beta OS=Homo sapiens	TIF1B_HUMAN	0	6
Transferrin receptor protein 1 OS=Homo sapiens GN=TFRC PE=1	TFR1_HUMAN	0	4
Transforming acidic coiled-coil-containing protein 3 OS=Homo sapiens	TACC3_HUMAN	0	9
Translational activator GCN1 OS=Homo sapiens GN=GCN1L1 PE=1	GCN1L_HUMAN	0	10
Translocon-associated protein subunit alpha OS=Homo sapiens	SSRA_HUMAN	0	3
Transmembrane emp24 domain-containing protein 9 OS=Homo	TMED9_HUMAN	0	14
Trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial OS=Homo sapiens	ECHB_HUMAN	0	4
Tripeptidyl-peptidase 2 OS=Homo sapiens GN=TPP2 PE=1 SV=4	TPP2_HUMAN	0	64
Tropomodulin-2 OS=Homo sapiens GN=TMOD2 PE=1 SV=1	TMOD2_HUMAN	0	3
Tryptophanyl-tRNA synthetase, cytoplasmic OS=Homo sapiens	SYWC_HUMAN	0	9
Tubulin beta-4 chain OS=Homo sapiens GN=TUBB4 PE=1 SV=2	TBB4_HUMAN	0	136
Tubulin beta-6 chain OS=Homo sapiens GN=TUBB6 PE=1 SV=1	TBB6_HUMAN	0	81
Tumor protein D52 OS=Homo sapiens GN=TPD52 PE=1 SV=2	TPD52_HUMAN	0	5
Tumor protein D54 OS=Homo sapiens GN=TPD52L2 PE=1 SV=2	TPD54_HUMAN	0	4
U5 small nuclear ribonucleoprotein 40 kDa protein OS=Homo sapiens	SNR40_HUMAN	0	7
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 15 OS=Homo sapiens	UBP15_HUMAN	0	20
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 7 OS=Homo sapiens GN=USP7	UBP7_HUMAN	0	7
Ubiquitin fusion degradation protein 1 homolog OS=Homo sapiens	UFD1_HUMAN	0	3
Ubiquitin-60S ribosomal protein L40 OS=Homo sapiens GN=UBA52	RL40_HUMAN	0	82
UBX domain-containing protein 6 OS=Homo sapiens GN=UBXN6	UBXN6_HUMAN	0	4
Uncharacterized protein KIAA1143 OS=Homo sapiens GN=KIAA1143	K1143_HUMAN	0	15
UPF0498 protein KIAA1191 OS=Homo sapiens GN=KIAA1191 PE=1	K1191_HUMAN	0	53
Uracil-DNA glycosylase OS=Homo sapiens GN=UNG PE=1 SV=2	UNG_HUMAN	0	3
Valyl-tRNA synthetase OS=Homo sapiens GN=VARS PE=1 SV=4	SYVC_HUMAN	0	46
Vesicle-associated membrane protein-associated protein A OS=Homo	VAPA_HUMAN	0	5
Vesicle-associated membrane protein-associated protein B/C	VAPB_HUMAN	0	12
Vesicle-fusing ATPase OS=Homo sapiens GN=NSF PE=1 SV=3	NSF_HUMAN	0	9
Voltage-dependent anion-selective channel protein 1 OS=Homo	VDAC1_HUMAN	0	17
Voltage-dependent anion-selective channel protein 2 OS=Homo	VDAC2_HUMAN	0	12
Voltage-dependent anion-selective channel protein 3 OS=Homo	VDAC3_HUMAN	0	7
V-type proton ATPase catalytic subunit A OS=Homo sapiens	VATA_HUMAN	0	4
WASH complex subunit CCDC53 OS=Homo sapiens GN=CCDC53	CCD53_HUMAN	0	3
WD repeat-containing protein 17 OS=Homo sapiens GN=WDR17	WDR17_HUMAN	0	15
WD repeat-containing protein 26 OS=Homo sapiens GN=WDR26	WDR26_HUMAN	0	12
Zinc finger CCHC domain-containing protein 8 OS=Homo sapiens	ZCHC8_HUMAN	0	33

Literaturverzeichnis

- Ahle, S., and Ungewickell, E. (1990) Auxilin, a newly identified clathrin-associated protein in coated vesicles from bovine brain *J Cell Biol* **111**, 19-29
- Andrade, M. A., and Bork, P. (1995) HEAT repeats in the Huntington's disease protein *Nat Genet* **11**, 115-6
- Aridor, M., and Traub, L. M. (2002) Cargo selection in vesicular transport: the making and breaking of a coat *Traffic* **3**, 537-46
- Arroyo, J. D., and Hahn, W. C. (2005) Involvement of PP2A in viral and cellular transformation *Oncogene* **24**, 7746-55
- Baharians, Z., and Schonthal, A. H. (1998) Autoregulation of protein phosphatase type 2A expression *J Biol Chem* **273**, 19019-24
- Baysal, B. E., Farr, J. E., Goss, J. R., Devlin, B., and Richard, C. W., 3rd. (1998) Genomic organization and precise physical location of protein phosphatase 2A regulatory subunit A beta isoform gene on chromosome band 11q23 *Gene* **217**, 107-16
- Blondeau, F., Ritter, B., Allaire, P. D., Wasiak, S., Girard, M., Hussain, N. K., Angers, A., Legendre-Guillemain, V., Roy, L., Boismenu, D., Kearney, R. E., Bell, A. W., Bergeron, J. J., and McPherson, P. S. (2004) Tandem MS analysis of brain clathrin-coated vesicles reveals their critical involvement in synaptic vesicle recycling *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 3833-8
- Borner, G. H., Harbour, M., Hester, S., Lilley, K. S., and Robinson, M. S. (2006) Comparative proteomics of clathrin-coated vesicles *J Cell Biol* **175**, 571-8
- Burgos, P. V., Mardones, G. A., Rojas, A. L., daSilva, L. L., Prabhu, Y., Hurley, J. H., and Bonifacino, J. S. (2010) Sorting of the Alzheimer's disease amyloid precursor protein mediated by the AP-4 complex *Dev Cell* **18**, 425-36
- Calin, G. A., di Iasio, M. G., Caprini, E., Vorechovsky, I., Natali, P. G., Sozzi, G., Croce, C. M., Barbanti-Brodano, G., Russo, G., and Negrini, M. (2000) Low frequency of alterations of the alpha (PPP2R1A) and beta (PPP2R1B) isoforms of the subunit A of the serine-threonine phosphatase 2A in human neoplasms *Oncogene* **19**, 1191-5
- Chen, J., Martin, B. L., and Brautigan, D. L. (1992) Regulation of protein serine-threonine phosphatase type-2A by tyrosine phosphorylation *Science* **257**, 1261-4
- Chen, S., Li, B., Grundke-Iqbal, I., and Iqbal, K. (2008) I1PP2A affects tau phosphorylation via association with the catalytic subunit of protein phosphatase 2A *J Biol Chem* **283**, 10513-21

- Chen, W., Possemato, R., Campbell, K. T., Plattner, C. A., Pallas, D. C., and Hahn, W. C. (2004) Identification of specific PP2A complexes involved in human cell transformation *Cancer Cell* **5**, 127-36
- Cho, U. S., and Xu, W. (2007) Crystal structure of a protein phosphatase 2A heterotrimeric holoenzyme *Nature* **445**, 53-7
- Cohen, P. (1989) The structure and regulation of protein phosphatases *Annu Rev Biochem* **58**, 453-508
- Cohen, P. T., Brewis, N. D., Hughes, V., and Mann, D. J. (1990) Protein serine/threonine phosphatases; an expanding family *FEBS Lett* **268**, 355-9
- Conner, S. D., and Schmid, S. L. (2002) Identification of an adaptor-associated kinase, AAK1, as a regulator of clathrin-mediated endocytosis *J Cell Biol* **156**, 921-9
- Conner, S. D., Schroter, T., and Schmid, S. L. (2003) AAK1-mediated micro2 phosphorylation is stimulated by assembled clathrin *Traffic* **4**, 885-90
- Damuni, Z., Xiong, H., and Li, M. (1994) Autophosphorylation-activated protein kinase inactivates the protein tyrosine phosphatase activity of protein phosphatase 2A *FEBS Lett* **352**, 311-4
- De Baere, I., Derua, R., Janssens, V., Van Hoof, C., Waelkens, E., Merlevede, W., and Goris, J. (1999) Purification of porcine brain protein phosphatase 2A leucine carboxyl methyltransferase and cloning of the human homologue *Biochemistry* **38**, 16539-47
- Dell'Angelica, E. C., Ooi, C. E., and Bonifacino, J. S. (1997) Beta3A-adaptin, a subunit of the adaptor-like complex AP-3 *J Biol Chem* **272**, 15078-84
- Dell'Angelica, E. C., Mullins, C., and Bonifacino, J. S. (1999) AP-4, a novel protein complex related to clathrin adaptors *J Biol Chem* **274**, 7278-85
- Depaoli-Roach, A. A., Park, I. K., Cerovsky, V., Csontos, C., Durbin, S. D., Kuntz, M. J., Sitikov, A., Tang, P. M., Verin, A., and Zolnierowicz, S. (1994) Serine/threonine protein phosphatases in the control of cell function *Adv Enzyme Regul* **34**, 199-224
- Edeling, M. A., Mishra, S. K., Keyel, P. A., Steinhauser, A. L., Collins, B. M., Roth, R., Heuser, J. E., Owen, D. J., and Traub, L. M. (2006) Molecular switches involving the AP-2 beta2 appendage regulate endocytic cargo selection and clathrin coat assembly *Dev Cell* **10**, 329-42
- Ehrlich, M., Boll, W., Van Oijen, A., Hariharan, R., Chandran, K., Nibert, M. L., and Kirchhausen, T. (2004) Endocytosis by random initiation and stabilization of clathrin-coated pits *Cell* **118**, 591-605

- Fessart, D., Simaan, M., Zimmerman, B., Comeau, J., Hamdan, F. F., Wiseman, P. W., Bouvier, M., and Laporte, S. A. (2007) Src-dependent phosphorylation of beta2-adaptin dissociates the beta-arrestin-AP-2 complex *J Cell Sci* **120**, 1723-32
- Fingerhut, A., von Figura, K., and Honing, S. (2001) Binding of AP2 to sorting signals is modulated by AP2 phosphorylation *J Biol Chem* **276**, 5476-82
- Gentry, M. S., and Hallberg, R. L. (2002) Localization of *Saccharomyces cerevisiae* protein phosphatase 2A subunits throughout mitotic cell cycle *Mol Biol Cell* **13**, 3477-92
- Georgieva-Hanson, V., Schook, W. J., and Puszkin, S. (1988) Brain coated vesicle destabilization and phosphorylation of coat proteins *J Neurochem* **50**, 307-15
- Gergs, U., Boknik, P., Buchwalow, I., Fabritz, L., Matus, M., Justus, I., Hanske, G., Schmitz, W., and Neumann, J. (2004) Overexpression of the catalytic subunit of protein phosphatase 2A impairs cardiac function *J Biol Chem* **279**, 40827-34
- Ghosh, P., and Kornfeld, S. (2003) AP-1 binding to sorting signals and release from clathrin-coated vesicles is regulated by phosphorylation *J Cell Biol* **160**, 699-708
- Girard, M., Allaire, P. D., McPherson, P. S., and Blondeau, F. (2005) Non-stoichiometric relationship between clathrin heavy and light chains revealed by quantitative comparative proteomics of clathrin-coated vesicles from brain and liver *Mol Cell Proteomics* **4**, 1145-54
- Gonzalez-Gaitan, M., and Jackle, H. (1997) Role of *Drosophila* alpha-adaptin in presynaptic vesicle recycling *Cell* **88**, 767-76
- Gorman, C. M., Howard, B. H., and Reeves, R. (1983) Expression of recombinant plasmids in mammalian cells is enhanced by sodium butyrate *Nucleic Acids Res* **11**, 7631-48
- Gotz, J., Probst, A., Mistl, C., Nitsch, R. M., and Ehler, E. (2000) Distinct role of protein phosphatase 2A subunit Calpha in the regulation of E-cadherin and beta-catenin during development *Mech Dev* **93**, 83-93
- Groves, M. R., Hanlon, N., Turowski, P., Hemmings, B. A., and Barford, D. (1999) The structure of the protein phosphatase 2A PR65/A subunit reveals the conformation of its 15 tandemly repeated HEAT motifs *Cell* **96**, 99-110
- Guo, H., Reddy, S. A., and Damuni, Z. (1993) Purification and characterization of an autophosphorylation-activated protein serine threonine kinase that phosphorylates and inactivates protein phosphatase 2A *J Biol Chem* **268**, 11193-8
- Hannon, G. J. (2002) RNA interference *Nature* **418**, 244-51

- Hao, W., Tan, Z., Prasad, K., Reddy, K. K., Chen, J., Prestwich, G. D., Falck, J. R., Shears, S. B., and Lafer, E. M. (1997) Regulation of AP-3 function by inositides. Identification of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate as a potent ligand *J Biol Chem* **272**, 6393-8
- Hartl, F. U., Hlodan, R., and Langer, T. (1994) Molecular chaperones in protein folding: the art of avoiding sticky situations *Trends Biochem Sci* **19**, 20-5
- Heldwein, E. E., Macia, E., Wang, J., Yin, H. L., Kirchhausen, T., and Harrison, S. C. (2004) Crystal structure of the clathrin adaptor protein 1 core *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 14108-13
- Hemmings, B. A., Adams-Pearson, C., Maurer, F., Muller, P., Goris, J., Merlevede, W., Hofsteenge, J., and Stone, S. R. (1990) alpha- and beta-forms of the 65-kDa subunit of protein phosphatase 2A have a similar 39 amino acid repeating structure *Biochemistry* **29**, 3166-73
- Henderson, D. M., and Conner, S. D. (2007) A novel AAK1 splice variant functions at multiple steps of the endocytic pathway *Mol Biol Cell* **18**, 2698-706
- Hendrix, P., Turowski, P., Mayer-Jaekel, R. E., Goris, J., Hofsteenge, J., Merlevede, W., and Hemmings, B. A. (1993) Analysis of subunit isoforms in protein phosphatase 2A holoenzymes from rabbit and *Xenopus* *J Biol Chem* **268**, 7330-7
- Heuser, J., and Steer, C. J. (1989) Trimeric binding of the 70-kD uncoating ATPase to the vertices of clathrin triskelia: a candidate intermediate in the vesicle uncoating reaction *J Cell Biol* **109**, 1457-66
- Hirst, J., Bright, N. A., Rous, B., and Robinson, M. S. (1999) Characterization of a fourth adaptor-related protein complex *Mol Biol Cell* **10**, 2787-802
- Holstein, S. E., Ungewickell, H., and Ungewickell, E. (1996) Mechanism of clathrin basket dissociation: separate functions of protein domains of the DnaJ homologue auxilin *J Cell Biol* **135**, 925-37
- Honing, S., Ricotta, D., Krauss, M., Spate, K., Spolaore, B., Motley, A., Robinson, M., Robinson, C., Haucke, V., and Owen, D. J. (2005) Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate regulates sorting signal recognition by the clathrin-associated adaptor complex AP2 *Mol Cell* **18**, 519-31
- Ishihara, H., Martin, B. L., Brautigan, D. L., Karaki, H., Ozaki, H., Kato, Y., Fusetani, N., Watabe, S., Hashimoto, K., Uemura, D., and et al. (1989) Calyculin A and okadaic acid: inhibitors of protein phosphatase activity *Biochem Biophys Res Commun* **159**, 871-7
- Iwamoto, S., Burrows, R. C., Grossniklaus, H. E., Orcutt, J., Kalina, R. E., Boehm, M., Bothwell, M. A., and Schmidt, R. (2002) Immunophenotype of conjunctival

- melanomas: comparisons with uveal and cutaneous melanomas *Arch Ophthalmol* **120**, 1625-9
- Jackson, L. P., Kelly, B. T., McCoy, A. J., Gaffry, T., James, L. C., Collins, B. M., Honing, S., Evans, P. R., and Owen, D. J. (2010) A large-scale conformational change couples membrane recruitment to cargo binding in the AP2 clathrin adaptor complex *Cell* **141**, 1220-9
- Janssens, V., and Goris, J. (2001) Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling *Biochem J* **353**, 417-39
- Janssens, V., Goris, J., and Van Hoof, C. (2005) PP2A: the expected tumor suppressor *Curr Opin Genet Dev* **15**, 34-41
- Johnson, S. A., and Hunter, T. (2005) Kinomics: methods for deciphering the kinome *Nat Methods* **2**, 17-25
- Kamibayashi, C., Estes, R., Lickteig, R. L., Yang, S. I., Craft, C., and Mumby, M. C. (1994) Comparison of heterotrimeric protein phosphatase 2A containing different B subunits *J Biol Chem* **269**, 20139-48
- Kelly, B. T., McCoy, A. J., Spate, K., Miller, S. E., Evans, P. R., Honing, S., and Owen, D. J. (2008) A structural explanation for the binding of endocytic dileucine motifs by the AP2 complex *Nature* **456**, 976-79
- Khew-Goodall, Y., and Hemmings, B. A. (1988) Tissue-specific expression of mRNAs encoding alpha- and beta-catalytic subunits of protein phosphatase 2A *FEBS Lett* **238**, 265-8
- Khew-Goodall, Y., Mayer, R. E., Maurer, F., Stone, S. R., and Hemmings, B. A. (1991) Structure and transcriptional regulation of protein phosphatase 2A catalytic subunit genes *Biochemistry* **30**, 89-97
- Kim, T. S., Kim, H. D., Shin, H. S., and Kim, J. (2009) Phosphorylation status of nuclear ribosomal protein S3 is reciprocally regulated by protein kinase C $\{\delta\}$ and protein phosphatase 2A *J Biol Chem* **284**, 21201-8
- Kim, Y. M., and Benovic, J. L. (2002) Differential roles of arrestin-2 interaction with clathrin and adaptor protein 2 in G protein-coupled receptor trafficking *J Biol Chem* **277**, 30760-8
- Kirchhausen, T. (2000) Clathrin *Annu Rev Biochem* **69**, 699-727
- Kong, M., Fox, C. J., Mu, J., Solt, L., Xu, A., Cinalli, R. M., Birnbaum, M. J., Lindsten, T., and Thompson, C. B. (2004) The PP2A-associated protein alpha4 is an essential inhibitor of apoptosis *Science* **306**, 695-8
- Korolchuk, V. I., and Banting, G. (2002) CK2 and GAK/auxilin2 are major protein kinases in clathrin-coated vesicles *Traffic* **3**, 428-39

- Kremmer, E., Ohst, K., Kiefer, J., Brewis, N., and Walter, G. (1997) Separation of PP2A core enzyme and holoenzyme with monoclonal antibodies against the regulatory A subunit: abundant expression of both forms in cells *Mol Cell Biol* **17**, 1692-701
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 *Nature* **227**, 680-5
- Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., *et al.* (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome *Nature* **409**, 860-921
- Laporte, S. A., Oakley, R. H., Zhang, J., Holt, J. A., Ferguson, S. S., Caron, M. G., and Barak, L. S. (1999) The beta2-adrenergic receptor/betaarrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 3712-7
- Lee, D. W., Wu, X., Eisenberg, E., and Greene, L. E. (2006) Recruitment dynamics of GAK and auxilin to clathrin-coated pits during endocytosis *J Cell Sci* **119**, 3502-12
- Lee, T. Y., Lai, T. Y., Lin, S. C., Wu, C. W., Ni, I. F., Yang, Y. S., Hung, L. Y., Law, B. K., and Chiang, C. W. (2010) The B56gamma3 regulatory subunit of protein phosphatase 2A (PP2A) regulates S phase-specific nuclear accumulation of PP2A and the G1 to S transition *J Biol Chem* **285**, 21567-80
- Letourneux, C., Rocher, G., and Porteu, F. (2006) B56-containing PP2A dephosphorylate ERK and their activity is controlled by the early gene IEX-1 and ERK *Embo J* **25**, 727-38
- Li, M., Guo, H., and Damuni, Z. (1995) Purification and characterization of two potent heat-stable protein inhibitors of protein phosphatase 2A from bovine kidney *Biochemistry* **34**, 1988-96
- Li, W., Puertollano, R., Bonifacino, J. S., Overbeek, P. A., and Everett, E. T. (2010) EDITOR'S CHOICE: Disruption of the Murine Ap2beta1 Gene Causes Nonsyndromic Cleft Palate *Cleft Palate Craniofac J* **47**, 566-73
- Li, X., Scuderi, A., Letsou, A., and Virshup, D. M. (2002) B56-associated protein phosphatase 2A is required for survival and protects from apoptosis in *Drosophila melanogaster* *Mol Cell Biol* **22**, 3674-84
- Longin, S., Jordens, J., Martens, E., Stevens, I., Janssens, V., Rondelez, E., De Baere, I., Derua, R., Waelkens, E., Goris, J., and Van Hoof, C. (2004) An inactive protein phosphatase 2A population is associated with methylesterase and can be re-activated by the phosphotyrosyl phosphatase activator *Biochem J* **380**, 111-9

- Longin, S., Zwaenepoel, K., Louis, J. V., Dilworth, S., Goris, J., and Janssens, V. (2007) Selection of protein phosphatase 2A regulatory subunits is mediated by the C terminus of the catalytic Subunit *J Biol Chem* **282**, 26971-80
- Longin, S., Zwaenepoel, K., Martens, E., Louis, J. V., Rondelez, E., Goris, J., and Janssens, V. (2008) Spatial control of protein phosphatase 2A (de)methylation *Exp Cell Res* **314**, 68-81
- MacDougall, L. K., Jones, L. R., and Cohen, P. (1991) Identification of the major protein phosphatases in mammalian cardiac muscle which dephosphorylate phospholamban *Eur J Biochem* **196**, 725-34
- Manfredi, J. J., and Bazari, W. L. (1987) Purification and characterization of two distinct complexes of assembly polypeptides from calf brain coated vesicles that differ in their polypeptide composition and kinase activities *J Biol Chem* **262**, 12182-8
- Margolis, S. S., Perry, J. A., Forester, C. M., Nutt, L. K., Guo, Y., Jardim, M. J., Thomenius, M. J., Freel, C. D., Darbandi, R., Ahn, J. H., Arroyo, J. D., Wang, X. F., Shenolikar, S., Nairn, A. C., Dunphy, W. G., Hahn, W. C., Virshup, D. M., and Kornbluth, S. (2006) Role for the PP2A/B56delta phosphatase in regulating 14-3-3 release from Cdc25 to control mitosis *Cell* **127**, 759-73
- Matsuda, S., Miura, E., Matsuda, K., Kakegawa, W., Kohda, K., Watanabe, M., and Yuzaki, M. (2008) Accumulation of AMPA receptors in autophagosomes in neuronal axons lacking adaptor protein AP-4 *Neuron* **57**, 730-45
- Mercer, J., Schelhaas, M., and Helenius, A. (2010) Virus entry by endocytosis *Annu Rev Biochem* **79**, 803-33
- Mitsunari, T., Nakatsu, F., Shioda, N., Love, P. E., Grinberg, A., Bonifacino, J. S., and Ohno, H. (2005) Clathrin adaptor AP-2 is essential for early embryonal development *Mol Cell Biol* **25**, 9318-23
- Morgan, J. R., Prasad, K., Jin, S., Augustine, G. J., and Lafer, E. M. (2001) Uncoating of clathrin-coated vesicles in presynaptic terminals: roles for Hsc70 and auxilin *Neuron* **32**, 289-300
- Nogi, T., Shiba, Y., Kawasaki, M., Shiba, T., Matsugaki, N., Igarashi, N., Suzuki, M., Kato, R., Takatsu, H., Nakayama, K., and Wakatsuki, S. (2002) Structural basis for the accessory protein recruitment by the gamma-adaptin ear domain *Nat Struct Biol* **9**, 527-31
- Ogris, E., Du, X., Nelson, K. C., Mak, E. K., Yu, X. X., Lane, W. S., and Pallas, D. C. (1999) A protein phosphatase methylesterase (PME-1) is one of several novel proteins stably associating with two inactive mutants of protein phosphatase 2A *J Biol Chem* **274**, 14382-91

- Olsen, J. V., Blagoev, B., Gnad, F., Macek, B., Kumar, C., Mortensen, P., and Mann, M. (2006) Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks *Cell* **127**, 635-48
- Olusanya, O., Andrews, P. D., Swedlow, J. R., and Smythe, E. (2001) Phosphorylation of threonine 156 of the mu2 subunit of the AP2 complex is essential for endocytosis in vitro and in vivo *Curr Biol* **11**, 896-900
- Owen, D. J., and Evans, P. R. (1998) A structural explanation for the recognition of tyrosine-based endocytotic signals *Science* **282**, 1327-32
- Owen, D. J., Vallis, Y., Noble, M. E., Hunter, J. B., Dafforn, T. R., Evans, P. R., and McMahon, H. T. (1999) A structural explanation for the binding of multiple ligands by the alpha-adaptin appendage domain *Cell* **97**, 805-15
- Owen, D. J., Vallis, Y., Pearse, B. M., McMahon, H. T., and Evans, P. R. (2000) The structure and function of the beta 2-adaptin appendage domain *Embo J* **19**, 4216-27
- Owen, D. J. (2004) Linking endocytic cargo to clathrin: structural and functional insights into coated vesicle formation *Biochem Soc Trans* **32**, 1-14
- Paroni, G., Cernotta, N., Dello Russo, C., Gallinari, P., Pallaoro, M., Foti, C., Talamo, F., Orsatti, L., Steinkuhler, C., and Brancolini, C. (2008) PP2A regulates HDAC4 nuclear import *Mol Biol Cell* **19**, 655-67
- Pauloin, A., and Thuriéau, C. (1993) 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* **296 (Pt 2)**, 409-15
- Pearse, B. M., and Robinson, M. S. (1984) Purification and properties of 100-kd proteins from coated vesicles and their reconstitution with clathrin *Embo J* **3**, 1951-7
- Perrotti, D., and Neviani, P. (2006) ReSETting PP2A tumour suppressor activity in blast crisis and imatinib-resistant chronic myelogenous leukaemia *Br J Cancer* **95**, 775-81
- Qian, W., Shi, J., Yin, X., Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I., Gong, C. X., and Liu, F. (2009) PP2A Regulates Tau Phosphorylation Directly and also Indirectly via Activating GSK-3beta *J Alzheimers Dis*
- Rad, M. R., Phan, H. L., Kirchrath, L., Tan, P. K., Kirchner, T., Hollenberg, C. P., and Payne, G. S. (1995) *Saccharomyces cerevisiae* Apl2p, a homologue of the mammalian clathrin AP beta subunit, plays a role in clathrin-dependent Golgi functions *J Cell Sci* **108 (Pt 4)**, 1605-15

- Ricotta, D., Conner, S. D., Schmid, S. L., von Figura, K., and Honing, S. (2002) Phosphorylation of the AP2 mu subunit by AAK1 mediates high affinity binding to membrane protein sorting signals *J Cell Biol* **156**, 791-5
- Ricotta, D., Hansen, J., Preiss, C., Teichert, D., and Honing, S. (2008) Characterization of a protein phosphatase 2A holoenzyme that dephosphorylates the clathrin adaptors AP-1 and AP-2 *J Biol Chem* **283**, 5510-7
- Ruediger, R., Roeckel, D., Fait, J., Bergqvist, A., Magnusson, G., and Walter, G. (1992) Identification of binding sites on the regulatory A subunit of protein phosphatase 2A for the catalytic C subunit and for tumor antigens of simian virus 40 and polyomavirus *Mol Cell Biol* **12**, 4872-82
- Ruediger, R., Hentz, M., Fait, J., Mumby, M., and Walter, G. (1994) Molecular model of the A subunit of protein phosphatase 2A: interaction with other subunits and tumor antigens *J Virol* **68**, 123-9
- Saffarian, S., and Kirchhausen, T. (2008) Differential evanescence nanometry: live-cell fluorescence measurements with 10-nm axial resolution on the plasma membrane *Biophys J* **94**, 2333-42
- Sambrook, J. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* NY Cold Spring Harbor Laboratory Press **2. Auflage**
- Scheele, U., Kalthoff, C., and Ungewickell, E. (2001) Multiple interactions of auxilin 1 with clathrin and the AP-2 adaptor complex *J Biol Chem* **276**, 36131-8
- Schmidt, K., Kins, S., Schild, A., Nitsch, R. M., Hemmings, B. A., and Gotz, J. (2002) Diversity, developmental regulation and distribution of murine PR55/B subunits of protein phosphatase 2A *Eur J Neurosci* **16**, 2039-48
- Schmitz, M. H., Held, M., Janssens, V., Hutchins, J. R., Hudecz, O., Ivanova, E., Goris, J., Trinkle-Mulcahy, L., Lamond, A. I., Poser, I., Hyman, A. A., Mechtler, K., Peters, J. M., and Gerlich, D. W. (2010) Live-cell imaging RNAi screen identifies PP2A-B55alpha and importin-beta1 as key mitotic exit regulators in human cells *Nat Cell Biol* **12**, 886-93
- Shi, Y. (2009) Serine/threonine phosphatases: mechanism through structure *Cell* **139**, 468-84
- Shim, J., and Lee, J. (2000) Molecular genetic analysis of apm-2 and aps-2, genes encoding the medium and small chains of the AP-2 clathrin-associated protein complex in the nematode *Caenorhabditis elegans* *Mol Cells* **10**, 309-16
- Shim, J., Sternberg, P. W., and Lee, J. (2000) Distinct and redundant functions of mu1 medium chains of the AP-1 clathrin-associated protein complex in the nematode *Caenorhabditis elegans* *Mol Biol Cell* **11**, 2743-56

- Simpson, F., Peden, A. A., Christopoulou, L., and Robinson, M. S. (1997) Characterization of the adaptor-related protein complex, AP-3 *J Cell Biol* **137**, 835-45
- Smith, T. F., Gaitatzes, C., Saxena, K., and Neer, E. J. (1999) The WD repeat: a common architecture for diverse functions *Trends Biochem Sci* **24**, 181-5
- Sneddon, A. A., Cohen, P. T., and Stark, M. J. (1990) *Saccharomyces cerevisiae* protein phosphatase 2A performs an essential cellular function and is encoded by two genes *Embo J* **9**, 4339-46
- Sontag, E. (2001) Protein phosphatase 2A: the Trojan Horse of cellular signaling *Cell Signal* **13**, 7-16
- Sontag, E., Hladik, C., Montgomery, L., Luangpirom, A., Mudrak, I., Ogris, E., and White, C. L., 3rd. (2004) Downregulation of protein phosphatase 2A carboxyl methylation and methyltransferase may contribute to Alzheimer disease pathogenesis *J Neuropathol Exp Neurol* **63**, 1080-91
- Späte. (2007) Signalbindung und Membraninteraktion von heterotetrameren Adaptorprotein-Komplexen. in *Institut für Biochemie II*, Georg-August-Universität zu Göttingen, Göttingen
- Stoorvogel, W., Oorschot, V., and Geuze, H. J. (1996) A novel class of clathrin-coated vesicles budding from endosomes *J Cell Biol* **132**, 21-33
- Stoorvogel, W. (1998) Analysis of the endocytic system by using horseradish peroxidase *Trends Cell Biol* **8**, 503-5
- Takei, K., and Haucke, V. (2001) Clathrin-mediated endocytosis: membrane factors pull the trigger *Trends Cell Biol* **11**, 385-91
- Tanimukai, H., Grundke-Iqbal, I., and Iqbal, K. (2005) Up-regulation of inhibitors of protein phosphatase-2A in Alzheimer's disease *Am J Pathol* **166**, 1761-71
- ter Haar, E., Musacchio, A., Harrison, S. C., and Kirchhausen, T. (1998) Atomic structure of clathrin: a beta propeller terminal domain joins an alpha zigzag linker *Cell* **95**, 563-73
- Turowski, P., Myles, T., Hemmings, B. A., Fernandez, A., and Lamb, N. J. (1999) Vimentin dephosphorylation by protein phosphatase 2A is modulated by the targeting subunit B55 *Mol Biol Cell* **10**, 1997-2015
- Verkhusha, V. V., and Lukyanov, K. A. (2004) The molecular properties and applications of Anthozoa fluorescent proteins and chromoproteins *Nat Biotechnol* **22**, 289-96
- Wang, B., Zhang, P., and Wei, Q. (2008) Recent progress on the structure of Ser/Thr protein phosphatases *Sci China C Life Sci* **51**, 487-94

- Wang, S. S., Esplin, E. D., Li, J. L., Huang, L., Gazdar, A., Minna, J., and Evans, G. A. (1998) Alterations of the PPP2R1B gene in human lung and colon cancer *Science* **282**, 284-7
- Wang, Y. J., Wang, J., Sun, H. Q., Martinez, M., Sun, Y. X., Macia, E., Kirchhausen, T., Albanesi, J. P., Roth, M. G., and Yin, H. L. (2003) Phosphatidylinositol 4 phosphate regulates targeting of clathrin adaptor AP-1 complexes to the Golgi *Cell* **114**, 299-310
- Wei, H., Ashby, D. G., Moreno, C. S., Ogris, E., Yeong, F. M., Corbett, A. H., and Pallas, D. C. (2001) Carboxymethylation of the PP2A catalytic subunit in *Saccharomyces cerevisiae* is required for efficient interaction with the B-type subunits Cdc55p and Rts1p *J Biol Chem* **276**, 1570-7
- Wessel, D., and Flugge, U. I. (1984) A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids *Anal Biochem* **138**, 141-3
- Wilbanks, S. M., DeLuca-Flaherty, C., and McKay, D. B. (1994) Structural basis of the 70-kilodalton heat shock cognate protein ATP hydrolytic activity. I. Kinetic analyses of active site mutants *J Biol Chem* **269**, 12893-8
- Wilde, A., and Brodsky, F. M. (1996) In vivo phosphorylation of adaptors regulates their interaction with clathrin *J Cell Biol* **135**, 635-45
- Xing, Y., Xu, Y., Chen, Y., Jeffrey, P. D., Chao, Y., Lin, Z., Li, Z., Strack, S., Stock, J. B., and Shi, Y. (2006) Structure of protein phosphatase 2A core enzyme bound to tumor-inducing toxins *Cell* **127**, 341-53
- Xing, Y., Bocking, T., Wolf, M., Grigorieff, N., Kirchhausen, T., and Harrison, S. C. (2010) Structure of clathrin coat with bound Hsc70 and auxilin: mechanism of Hsc70-facilitated disassembly *Embo J* **29**, 655-65
- Xu, Y., Xing, Y., Chen, Y., Chao, Y., Lin, Z., Fan, E., Yu, J. W., Strack, S., Jeffrey, P. D., and Shi, Y. (2006) Structure of the protein phosphatase 2A holoenzyme *Cell* **127**, 1239-51
- Xu, Y., Chen, Y., Zhang, P., Jeffrey, P. D., and Shi, Y. (2008) Structure of a protein phosphatase 2A holoenzyme: insights into B55-mediated Tau dephosphorylation *Mol Cell* **31**, 873-85
- Yan, Z., Fedorov, S. A., Mumby, M. C., and Williams, R. S. (2000) PR48, a novel regulatory subunit of protein phosphatase 2A, interacts with Cdc6 and modulates DNA replication in human cells *Mol Cell Biol* **20**, 1021-9
- Yang, J., Roe, S. M., Prickett, T. D., Brautigan, D. L., and Barford, D. (2007) The structure of Tap42/alpha4 reveals a tetratricopeptide repeat-like fold and provides insights into PP2A regulation *Biochemistry* **46**, 8807-15

- Yu, X. X., Du, X., Moreno, C. S., Green, R. E., Ogris, E., Feng, Q., Chou, L., McQuoid, M. J., and Pallas, D. C. (2001) Methylation of the protein phosphatase 2A catalytic subunit is essential for association of Balpha regulatory subunit but not SG2NA, striatin, or polyomavirus middle tumor antigen *Mol Biol Cell* **12**, 185-99
- Zhang, W., Yang, J., Liu, Y., Chen, X., Yu, T., Jia, J., and Liu, C. (2009) PR55 alpha, a regulatory subunit of PP2A, specifically regulates PP2A-mediated beta-catenin dephosphorylation *J Biol Chem* **284**, 22649-56
- Zhou, J., Pham, H. T., Ruediger, R., and Walter, G. (2003) Characterization of the Aalpha and Abeta subunit isoforms of protein phosphatase 2A: differences in expression, subunit interaction, and evolution *Biochem J* **369**, 387-98
- Zizioli, D., Meyer, C., Guhde, G., Saftig, P., von Figura, K., and Schu, P. (1999) Early embryonic death of mice deficient in gamma-adaptin *J Biol Chem* **274**, 5385-90

Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde.

Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Stefan Höning und Prof. Dr. J. Dohmen betreut worden.

Teile meiner Arbeit sind wie folgt publiziert:

Ricotta, D., Hansen, J., Preiss, C., Teichert, D., and Honing, S. (2008) Characterization of a protein phosphatase 2A holoenzyme that dephosphorylates the clathrin adaptors AP-1 and AP-2 *J Biol Chem* **283**, 5510-7

Kongreßbeiträge

1. SFB 523 Symposium: Intracellular Transport & Trafficking. Göttingen, 2008
2. First Joint Congress of the Swiss and German Societies of Cell Biology (ZMG and DGZ). Konstanz, 2009

Köln, im Dezember 2010

Dominic Teichert

Curriculum vitae

Zur Person

Name	Dominic Teichert
Anschrift	Höninger Weg 286 50969 Köln
Geburtsdatum	20.09.1979
Geburtsort	Oberhausen
Nationalität	Deutsch
Familienstand	Ledig

Studium

10/07 - 02/11	Promotion bei Herrn Prof. Dr. Höning, Institut für Biochemie I der medizinischen Fakultät zu Köln
10/06 - 09/07	Diplomarbeit bei Herrn Prof. Dr. Höning, Institut für Biochemie I der medizinischen Fakultät zu Köln
WS 01 - SS 06	Diplomstudiengang der Biologie an der Universität zu Köln mit den Schwerpunkten: Genetik, Biochemie und Pharmakologie

Schulbildung

1990 - 2000	Konrad Adenauer Gymnasium in Langenfeld, Abschluss: Abitur
1986 - 1990	St. Martinus Grundschule in Langenfeld

Zivildienst

2000 – 2001	Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika Uniklinikum der H. Heine Universität Düsseldorf
-------------	---

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. S. Höning und Herrn Prof. Dr. J. Dohmen für die offizielle Betreuung und Begutachtung meiner Dissertation. Herrn Prof. Dr. S. Roth möchte ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes, PD. Dr. M. Plomann für die Übernahme des Beisitzes danken.

Ein ganz herzlichen Dank möchte ich an Herrn Prof. Dr. S. Höning für die hervorragende Betreuung und die freundschaftliche Unterstützung richten.

Für experimentelle Hilfestellungen durch den ein oder anderen wertvollen Tipp und die Hilfsbereitschaft von allen Mitgliedern des Traffic Seminars, insbesondere von Markus Plomann, Gerrit Praefcke, Dagmar Moersdorf, Sven Schellmann, Tanja Riyahi und Sylvia Schael bin ich ebenso dankbar.

Dani Mainz, „Prof.“ Kalle Strucksberg und Christoph Clemen danke ich für die Einführung in die Welt der Insektenzellkultur.

Den Prof. Dr. E. Ungewickell und Prof. Dr. Shi, die uns freundlicherweise Expressionsvektoren und Bakuloviren überlassen haben, gebührt ebenfalls mein Dank.

Den Mitarbeitern der zentralen Bioanalytik, insbesondere Ursula Cullmann, Dr. Stefan Müller und Andrea Grün danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und freundliche Zusammenarbeit.

Ohne die aktuellen und ehemaligen Mitarbeiter der AG Höning hätten die letzten Jahre nicht so viel Spaß gemacht! Deswegen danke ich (in der Reihenfolge ihres Erscheinens) der TA-Fraktion Andrea Rüger und Ireen Schaffrath, den Post-Docs Maarten, Anika, Anke, Jana und Thomas, unserem Küken Anne sowie den zahlreichen Praktikanten, besonders Biacore-Flo für die anregenden Diskussionen, Labortipps, „lustigen Aktionen“ und Bierabende mit und ohne Grill.

Darüber hinaus möchte ich mich bei allen Kollegen der Biochemie I und II für die tägliche Hilfsbereitschaft und die schöne Arbeitsatmosphäre bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie für deren kompromisslose Unterstützung, aufbauende Worte und mindestens ein offenes Ohr zu jeder Zeit.