

**Isolierung neuer PACSIN-Isoformen
und funktionale Charakterisierung
der Protein-Familie**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Brigitte Ritter
aus Aachen

Köln, 2001

Berichterstatter

Prof. Dr. Mats Paulsson
Priv.-Doz. Dr. Sabine Waffenschmidt
Prof. Dr. Reinhard Sterner

Tag der mündlichen Prüfung

19. Juni 2001

Inhalt

Abkürzungen.....	1
1 Einleitung.....	4
1.1 Biologische Membranen und ihre Transportwege	4
1.2 Lipid Rafts und Caveolae	6
1.3 Vesikel mit Protein-Hülle	7
1.3.1 Coatomer Protein II-umhüllte Vesikel	7
1.3.2 Coatomer Protein I-umhüllte Vesikel.....	8
1.3.3 Clathrin-umhüllte Vesikel	9
1.4 Endocytose und das Actin- und Tubulin-Cytoskelett	16
1.5 Regulation des intrazellulären Vesikeltransports	18
1.6 PACSIN 1.....	19
1.7 Zielsetzung der Arbeit	21
2 Material und Methoden.....	22
2.1 Material.....	22
2.1.1 Puffer und Lösungen	22
2.1.2 Enzyme.....	23
2.1.3 Biologisches Material.....	24
2.1.3.1 E. coli-Bakterien-Stämme.....	24
2.1.3.2 Hefen	24
2.1.3.3 Eukaryotische Zellen	24
2.1.3.4 Paraffinschnitte.....	24
2.1.4 Banken.....	25
2.1.5 Sonden.....	25
2.1.6 Antikörper	25
2.1.6.1 Erstantikörper	25
2.1.6.2 Zweitantikörper	26
2.1.6.3 Streptavidin-Konjugate.....	27
2.1.7 Vektoren.....	27
2.1.7.1 Klonierungsvektoren.....	27
2.1.7.2 Expressionsvektoren.....	27
2.1.8 Primer.....	28
2.1.8.1 Sequenzierungsprimer	28
2.1.8.2 Primer für gerichtete Mutagenesen.....	28
2.1.9 Verbrauchsmaterial	30
2.1.10 Geräte	30
2.1.11 EST-Klone.....	31
2.1.11.1 EST-Klone für PACSIN 2.....	31
2.1.11.2 EST-Klone für PACSIN 3	31
2.1.12 Zellkultur-Medien	32
2.2 Methoden.....	33
2.2.1 Computeranalyse.....	33
2.2.2 Sequenzierung	33

2.2.3	Sondensynthese	33
2.2.4	Durchmusterung einer embryonalen Maus-cDNA-Bank	33
2.2.5	RNA-Präparation.....	33
2.2.6	Northern Blot.....	34
2.2.7	Human RNA Master Blot.....	34
2.2.8	Gerichtete Einführung von Punktmutationen	34
2.2.9	Antisera und Affinitätsreinigung.....	36
2.2.10	Massenspektrometrie.....	37
2.2.11	Immunhistochemie (IH)	37
2.2.12	Affinitätspräzipitation	37
2.2.13	Enzym-gekoppelter Immunnachweis (ELISA)	38
2.2.14	Hefe Two-Hybrid System	38
2.2.15	Immunpräzipitation	39
2.2.16	in vitro-Phosphorylierung	39
2.2.17	Zellkultur.....	39
	2.2.17.1 Transfektionen.....	39
	2.2.17.2 Immunfluoreszenz	40
	2.2.17.3 <i>In vitro</i> -Differenzierung von C2-Myoblasten	40
	2.2.17.4 Endocytose-Assay	40
3	Ergebnisse.....	42
3.1	Isolierung neuer PACSIN-Isoformen	42
3.1.1	Sequenzanalyse der neuen PACSIN-Isoformen	43
3.1.2	Evolution der PACSINe	46
3.2	Herstellung von Antisera gegen PACSIN 2 und 3.....	48
3.3	Expression der PACSIN-Isoformen.....	49
3.3.1	Expression auf mRNA-Ebene	49
3.3.2	Expression auf Proteinebene	50
3.3.3	Endogene Expression in eukaryotischen Zellen.....	52
3.3.4	Immunhistochemische Analyse auf Hirnschnitten.....	54
3.4	Bindungspartner der PACSIN-Proteine	56
3.4.1	Isolierung neuer Bindungspartner mit dem Hefe Two-Hybrid System.....	56
3.4.2	Beteiligung der PACSINe an der Clathrin-vermittelten Endocytose	58
	3.4.2.1 Affinitätspräzipitation.....	58
	3.4.2.2 Intrazelluläre Colokalisation der Bindungspartner	61
	3.4.2.3 Endocytose Assay.....	64
3.4.3	Interaktion mit 14-3-3-Proteinen.....	67
3.5	Analyse der PACSIN 1-Phosphorylierung.....	68
3.5.1	<i>In vitro</i> -Phosphorylierung durch konventionelle PKCs	70
3.5.2	<i>In vitro</i> -Phosphorylierung durch PKC ζ	71
3.5.3	<i>In vitro</i> -Phosphorylierung durch CK2.....	72
3.5.4	Tyrosin-Phosphorylierung.....	73
3.6	Funktionale Analyse der potentiellen CDC15-NT-Domäne.....	73
3.6.1	Oligomerisierung der PACSINe.....	73
3.6.2	Mutationsanalyse der potentiellen CDC15-NT-Domäne	74
	3.6.2.1 Eigenschaften der PACSIN 3 CDC15-NT-Mutante	77
	3.6.2.2 Interaktionen mit Cytoskelett-Proteinen	80

3.7	Interaktion der PACSINe mit PAST-Proteinen	82
3.7.1	Die PAST-Proteine.....	82
3.7.2	Bindungsspezifität der PAST-Proteine an die PACSINe.....	83
	3.7.2.1 Colokalisationsanalyse der PAST- und PACSIN-Proteine.....	87
3.7.3	Bindung der PAST-Proteine an Clathrin.....	89
3.7.4	Funktionale Analyse der GTPase-Domäne	90
	3.7.4.1 Domänen-abhängige intrazelluläre Lokalisation der PAST-Proteine.....	92
	3.7.4.2 Lokalisation in endosomalen Strukturen	93
4	Diskussion	95
4.1	Expression der neuen PACSIN-Isoformen	95
4.1.1	Expression auf mRNA- und Protein-Ebene	96
4.1.2	Intrazelluläre Lokalisation.....	97
4.1.3	Expressionsmuster der PACSINe in Hirn	98
4.2	Bindungspartner und ihre funktionale Bedeutung	99
4.2.1	Endocytotische Proteine.....	99
	4.2.1.1 Einfluß der PACSINe auf die Endocytose.....	100
4.2.2	Weitere Bindungspartner.....	101
4.2.3	Transmembran-Proteine	104
4.2.4	14-3-3-Proteine.....	105
4.2.5	Bindungspartner mit Einfluß auf das Actin-Cytoskelett	105
4.3	Charakterisierung der potentiellen CDC15-NT-Domäne	107
4.3.1	Oligomerisierung der PACSINe.....	107
4.3.2	Effekte einer mutierten CDC15-NT-Domäne	108
4.3.3	Interaktion mit Actin und α -Tubulin.....	109
4.4	Interaktion mit den PAST-Proteinen	111
4.4.1	Bindungsspezifität der PACSIN- und PAST-Isoformen.....	111
4.4.2	Intrazelluläre Lokalisation der PAST-Proteine	112
4.5	Regulation der PACSINe.....	113
4.6	Potentielle Funktion der PACSINe.....	115
4.7	Ausblick.....	117
5	Zusammenfassung.....	119
6	Anhang.....	120
6.1	PACSIN 2 aus Maus und Mensch.....	121
6.2	PACSIN 3 aus Maus und Mensch.....	122
7	Literatur.....	123
8	Danke!	136
	Erklärung	
	Teilpublikationen	
	Kurzzusammenfassung	
	Abstract	
	Lebenslauf	

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
aff.	affinitätsgereinigt
AP	Adapter-Protein
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
BAR	Bin-Amphiphysin-RVS
β-Gal	β-Galaktosidase
NHS	N-Hydroxysuccinimidylester
bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
C	Celsius
CaMKII	Ca ²⁺ /Calmodulin-abhängige Kinase II
CC	coiled coil
CDC15-NT	CDC15-N-terminal
CGN	cis-Golgi-Netzwerk
CHAPS	(3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propan-sulfonat
CK2	Casein Kinase 2
COP	Coatomer-Protein
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
Dbl	Disabled
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
diff.	differenziert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPF	Asparaginsäure-Prolin-Phenylalanin
<i>E. coli</i>	<i>Echerichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor (epidermaler Wachstumsfaktor)
EGTA	Ethylenglykol-bis(β-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EH	Eps15 Homologie
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay (Enzym-gekoppelter Immunnachweis)
ENTH	Epsin N-terminale Homologie
ER	Endoplasmatisches Reticulum
EST	expressed sequence tag
EtBr	Ethidiumbromid
FACS	fluorescence activated cell sorting
FCH	FER-CIP4-Homologie
FCS	fetal calf serum (fötales Kälberserum)
FE	Fluoreszenz-Einheit(en)

FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
GED	GTPase-Effektor-Domäne
GEF	GDP/GTP exchange factor (GDP/GTP-Austausch-Faktor)
GIT	Guanidinthiocyanat
GPI	Glykosyl-Phosphatidylinositol
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
h	hour(s) (Stunde(n))
HA	Häm-Agglutinin
HBS	HEPES buffered saline
HEPES	(N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure])
HGMP	human genome mapping project
HRP	horseradish peroxidase (Meerrettich-Peroxidase)
Ig	Immunglobulin(e)
IH	Immunhistochemie
IP ₆	Inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisphosphat
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LDL	low-density-lipoprotein
LPAAT	Lysophosphatidylsäure-Acyltransferase
MALDI-MS	Matrix-unterstützte Laserdesorption/Ionisations-Massenspektrometrie
MAP	mitogen activated protein
min	Minute(n)
MTOC	microtubule organizing center (Mikrotubuli-Organisationszentrum)
MW	molecular weight (Molekulargewicht)
NPF	Asparagin-Prolin-Phenylalanin
nt	Nucleotid(e)
p.c.	post coitum
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
PD	Pull Down
PDGF	platelet-derived growth factor (Blutplättchen-Wachstumsfaktor)
PDZ	PSD-95/SAP90-DLG-ZO1
PH	Pleckstrin Homologie
PI(4,5)P ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKC	Protein Kinase C
PMA	Phorbol-12-myristyl-13-acetat
PRD	proline rich domain (Prolin-reiche Region)
PVDF	Polyvinylidendifluorid

RT	Raumtemperatur
RZPD	Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung
<i>S. pombe</i>	<i>Saccharomyces pombe</i>
Sac1	suppressor-of-actin 1
SDS	sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SH3	Src Homologie 3
SSC	standard saline citrat
SSPE	standard saline phosphate EDTA
Tab.	Tabelle
TBS	Tris buffered saline
TGN	trans-Golgi-Netzwerk
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyanat
U	unit (Einheit)
UTR	untranslatierte Region
v/v	Volumen pro Volumen
wt	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid
ZMMK	Zentrum für molekulare Medizin Köln

1 Einleitung

1.1 Biologische Membranen und ihre Transportwege

Damit in einem vielzelligen Organismus alle benötigten Aufgaben erfüllt werden können, werden Zellen auf die von ihnen auszuführende Funktion spezialisiert. Dies erfolgt nicht nur durch eine determinierte Genexpression, sondern auch durch eine den Aufgaben angepaßte Zusammensetzung der Zellmembranen. Durch Variationen im Gehalt an Lipiden, Proteinen und Kohlenhydraten werden die Membranen zu selektiv permeablen Barrieren, die für die Aufnahme der von der determinierten Zelle benötigten Stoffe optimiert sind. Die generelle Aufgabe der Plasmamembran ist es, die Aufnahme von Molekülen wie Glucose, Aminosäuren und Lipiden in die Zelle, das Verbleiben von Stoffwechselzwischenprodukten in der Zelle und die Sekretion von Endprodukten und anderen Molekülen aus der Zelle zu gewährleisten. Die Plasmamembran ermöglicht es der Zelle also, ein konstantes Milieu aufrecht zu erhalten, in dem geeignete Bedingungen für die im Cytosol ablaufenden Reaktionen vorherrschen. Schätzungsweise 90% des Gesamtmembrangehalts liegen innerhalb der Zelle vor, wo sie einzelne Kompartimente vom Cytosol abgrenzen. Die Organellen sind aufgrund ihrer Membranen und der darin befindlichen Proteine ihrerseits in der Lage, ein für sie spezifisches und in einigen Fällen vom cytosolischen Zustand stark abweichendes Milieu für spezifische Aufgaben und chemische Reaktionen zu schaffen (Lodish et al., 1995).

Die Aufnahme von Ionen und niedermolekularen Stoffen aus dem extrazellulären Raum in membranumgrenzte Kompartimente hängt von den chemischen Eigenschaften dieser Stoffe ab. Während Gase und kleine, relativ hydrophobe Moleküle wie Harnstoff und Alkohol frei entlang des Konzentrationsgefälles durch die Membran diffundieren können, kann Wasser nur bedingt durch die Membran gelangen, die für viele wasserlösliche Moleküle wie Glucose, Nucleotide, Aminosäuren und Ionen impermeabel ist. Die meisten dieser Stoffe gelangen über ATP-getriebene Pumpen, Ionenkanäle oder Transportproteine wie Uni-, Sym- und Antiporter in das Cytosol (Alberts et al., 1994).

Wesentlich komplexer sind die Abläufe bei der Aufnahme von Proteinen und Lipiden aus dem extrazellulären Raum (Endocytose), ihrem Transport innerhalb der Zelle zwischen den einzelnen Kompartimenten und ihrer Sekretion (Exocytose) aus der Zelle. Dabei wird zwischen konstitutiven und regulierten Vorgängen unterschieden, die sich durch ihre Geschwindigkeit und Selektivität auszeichnen. Die Vesikel bewegen sich innerhalb der Zelle in Sekunden von der Donor- zur Ziellmembran, wobei es abhängig vom Vesikeltyp nur bestimmten Proteinen und Lipiden möglich ist, in diese Vesikel zu gelangen. Diese Selektivität verhindert eine Homogenisierung aller Membranen, so daß spezialisierte Membranen ihre Funktion aufrecht erhalten können (Lodish et al., 1995).

Die verschiedenen zellulären Transportwege (Abb. 1) und die daran beteiligten Lipide und Proteine sollen im folgenden kurz dargestellt werden.

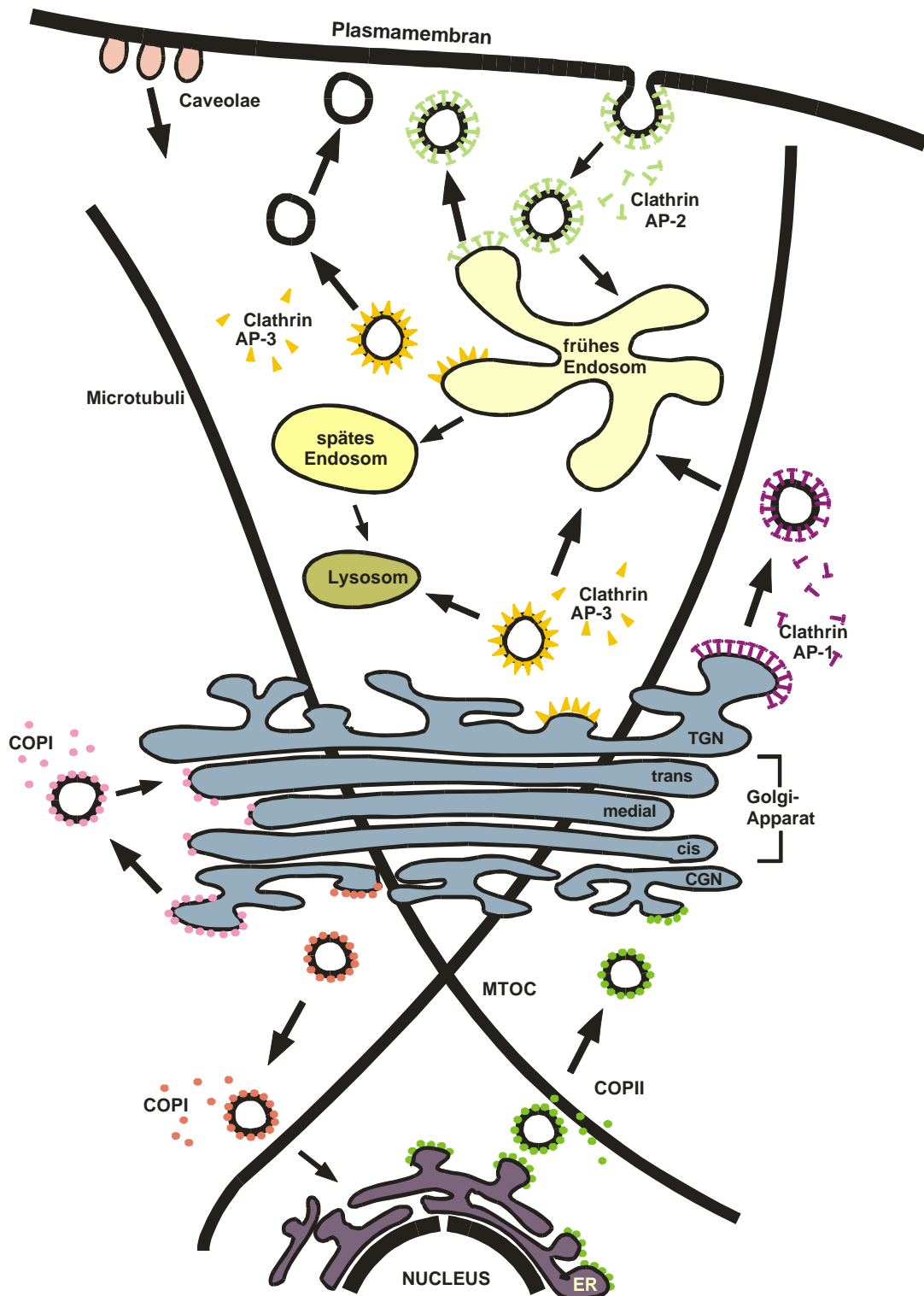


Abb. 1. Schematische Darstellung der intrazellulären Transportwege unter Angabe der bekannten Vesikeltypen. Nähere Erläuterungen zu den einzelnen Wege befinden sich im Text. ER, Endoplasmatisches Reticulum; COPI, Coatomer-Protein I; COPII, Coatomer-Protein II, MTOC, Mikrotubuli-Organisationszentrum; CGN, cis-Golgi-Netzwerk; TGN, trans-Golgi-Netzwerk; AP-1 bis 3, Adapter-Proteine 1 bis 3. Diese Abbildung wurde verändert aus Kreis und Vale (1999) übernommen.

1.2 Lipid Rafts und Caveolae

Man ging lange davon aus, daß Membranproteine lateral frei beweglich sind und sich gleichmäßig in der Plasmamembran verteilen (Lodish et al., 1996). Heutzutage gilt als gesichert, daß Lipidansammlungen (lipid rafts), aufgrund ihrer Größe von ca. 70 nm auch Mikrodomänen genannt (Kurzchalia und Parton, 1999), transiente, laterale Ansammlungen aus Glycosphingolipiden und Cholesterin mit GPI-verankerten Proteinen darstellen, die aufgrund der biophysikalischen und chemischen Eigenschaften der beteiligten Moleküle zustande kommen (Simons und Ikonen, 1997; Harder und Simons, 1997).

Caveolae stellen als kleine, flaschenförmige Einstülpungen in der Zellmembran eine Spezialform der ‚lipid rafts‘ dar, die häufig von Caveolin-1 umhüllt sind (Rothberg et al., 1992; Kurzchalia und Parton, 1999). In den im trans-Golgi-Netzwerk (TGN) gebildeten Lipidkern der Caveolae aus Glycosphingolipiden, Sphingomyelin und Cholesterin werden GPI-Proteine und Caveolin-1 aus dem ER eingebaut (Brown und Rose, 1992; Lisanti et al., 1993), woraufhin die Caveolae in die Membran exocytotischer Vesikel eingebettet und zur Zelloberfläche verschickt werden (Dupree et al., 1993). Mittlerweile geht man davon aus, daß Caveolae ein eigenständiges endocytotisches und exocytotisches Kompartiment an der Oberfläche der meisten Zellen bilden und fähig sind, Moleküle aufzunehmen und an ihre Zielorte in der Zelle zu bringen oder in den extrazellulären Raum abzugeben (Harder und Simons, 1997). Moleküle, die durch Caveolae aufgenommen werden, gelangen von der Zelloberfläche entweder ins Cytoplasma, ins ER, auf die andere Zellseite (Transcytose) oder in das aus Caveolae gebildete tubuläre/vesikuläre Kompartiment (Anderson, 1998). Da Caveolae nicht mit Endosomen-ähnlichen Zwischenstufen verschmelzen (Simionescu et al., 1973; Simionescu et al., 1975; Ghitescu und Bendayan, 1992), sondern ihre chemische Zusammensetzung und somit ihre Eigenschaften behalten, können sie auch der Exocytose der Moleküle zurück zur Plasmamembran dienen (Anderson, 1993).

Caveolae erfüllen in der Zelle eine Vielzahl von Funktionen. In polaren Zellen wie Endothelzellen ermöglichen sie durch Transcytose den Transport von Molekülen von einer Zellseite auf die andere (Simionescu, 1983). Generell ist eine der wichtigsten Funktionen der intrazelluläre Cholesterin-Transport, der durch Caveolin-1 vermittelt wird (Murata et al., 1995; Li et al., 1996).

Über Caveolin-1 werden viele Signalmoleküle (Src-Kinasen, NO-Synthase, der EGF-Rezeptor, der PDGF-Rezeptor, Phospholipase C γ , PKC α , PKC β , Ras, trimere G-Proteine und einige MAP-Kinasen (Okamoto et al., 1998; Schaul und Anderson, 1998)) in den Membranbereichen der Caveolae angereichert und reguliert, zusätzlich dienen Caveolae der Erzeugung von Ca²⁺-Signalen (Fujimoto et al., 1992; Fujimoto et al., 1993; Schaul et al., 1996). Sie stellen damit Regionen in der Zelle dar, wo die Signale vieler Signalwege aufeinandertreffen und durch gegenseitige Regulation integriert werden (Anderson, 1998; Simons und Toomre, 2000).

Desweiteren dienen Caveolae der Rezeptor-vermittelten Aufnahme von Folat (Potocytose) (Anderson et al., 1992). Potocytose und Clathrin-vermittelte Endocytose (s. 1.3.3) sind parallele, aber nicht redundante endocytotische Wege, da Caveolae und Clathrin-umhüllte Vesikel darauf spezialisiert sind, unterschiedliche Moleküle aufzunehmen.

1.3 Vesikel mit Protein-Hülle

Im Gegensatz zu den Caveolae durchläuft bei den bislang besser untersuchten Transportwegen innerhalb der Zelle die Vesikelbildung verschiedene Protein-abhängige Stufen, die reguliert nacheinander ablaufen müssen und sich durch das Vorhandensein einer definierten Vesikelhülle auszeichnen.

Der erste Schritt ist die Sortierung der Frachtmoleküle in den Bereich der sich formenden Vesikelhülle, deren Erweiterung zu einer Einbuchtung der in diesem Bereich befindlichen Membran führt. Nachdem die Hüllenbildung abgeschlossen ist, erfolgt das Abschnüren des tief eingestülpten Vesikels von der Donormembran, indem der verbindende Hals durchtrennt wird. Von dem freien Vesikel werden die Hüllenproteine entfernt, so daß eine Interaktion des Vesikels mit der Zielmembran möglich wird. Die Erkennung der Zielmembran erfolgt in zwei Schritten, wobei das Vesikel zunächst lose an die mögliche Zielmembran angelagert wird (tethering) und erst dann an diese bindet (docking). Beide Schritte werden von unterschiedlichen Proteinen ermöglicht und kontrolliert. Die hier nötigen Interaktionen sorgen für die Spezifität des Vesikeltransports, da sowohl Vesikel- als auch Membranproteine für die gegenseitige Erkennung nötig sind und so ein Verschmelzen des Vesikels mit der falschen Zielmembran ausgeschlossen wird. Die Fusion der Vesikels mit der Zielmembran führt zu einer Aufnahme in diese Membran, wodurch der Vesikelinhalt an das Lumen der Organelle oder den extrazellulären Raum abgegeben wird (Robinson und Martin, 1998; Waters und Pfeffer, 1999; Kirchhausen, 2000b).

Bei einem erfolgreichen Vesikeltransport kommt es also zu zwei Fusionsreaktionen von Membranen, einmal beim Abschnüren des Vesikels und ein weiteres mal bei der Aufnahme in die Zielmembran, wobei für beide Reaktionen unterschiedliche Proteine und Regulationen nötig sind. In dieser Arbeit sollen nur die Vorgänge bei der Vesikelbildung näher erläutert werden, da eine detaillierte Darstellung aller Ereignisse den Umfang sprengen würde.

1.3.1 Coatomer Protein II-umhüllte Vesikel

Der einfachste der bislang untersuchten Transportwege ist der konstitutive, Coatomer Protein II- (COPII-) vermittelte Transport neu synthetisierter Proteine vom ER zum Golgi-Apparat (Barlowe, 2000; Springer et al., 1999). Für die Bildung dieses Vesikeltyps sind fünf Proteine essentiell, wobei die genaue Anzahl und Funktion aller *in vivo* beteiligten Proteine und ihre funktionale Abfolge noch unbekannt sind.

Das an ER-Membranen gebundene Protein Sec12p überführt die GTPase Sar1p in die GTP-gebundene Form (Barlowe und Schekman, 1993), die daraufhin den Sec23p-Sec24p-Komplex dazu veranlaßt, an die Frachtmoleküle in der ER-Membran zu binden (Springer und Schekman, 1998; Peng et al., 2000). In einem weiteren Schritt lagert sich der Sec13p-Sec31p-Komplex an und führt zu der vesikelbildenden Deformation der Membran (Barlowe et al., 1994). Nach Abschnürung des Vesikels führt die Sec23p-gesteuerte Hydrolyse des Sar1p-gebundenen GTPs zur Ablösung der Hülle, so daß Sec23p eine Interaktion mit den SNARE-Proteinen der Zielmembran im Golgi-Apparat eingehen und das Vesikel mit der Zielmembran fusionieren kann (Kirchhausen, 2000b).

1.3.2 Coatomer Protein I-umhüllte Vesikel

Coatomer Protein I- (COPI-) Vesikel weisen bereits eine höhere Komplexität sowohl bei den beteiligten Proteinen und deren Regulation als auch bei den von ihnen vermittelten Transportwegen auf. Sie dienen hauptsächlich dem retrograden Transport von ER-Golgi-Intermediaten zum ER (Letourneur et al., 1994), sind aber auch am anterograden Transport durch die Cisternen des Golgi-Apparats beteiligt (Orci et al., 1997) und lokalisieren an endosomalen Strukturen (Whitney et al., 1995; Aniento et al., 1996).

Der auslösende Schritt für die Bildung eines COPI-Vesikels ist die GTP-abhängige Anlagerung von ARF1 über eine Myristoylgruppe an die Donormembran, wobei ARF1 abhängig vom Transportweg von unterschiedlichen GDP/GTP-Austausch-Faktoren (GEF) aktiviert zu werden scheint (Franco et al., 1998; Kirchhausen, 2000b). Für die Bildung der Vesikelhülle werden zwei Möglichkeiten diskutiert. Entweder lagert sich die aus sieben Proteinen (α -, β -, β' -, γ -, δ -, ϵ - und ζ -COP) bestehende Coatomer-Hülle der COPI-Vesikel an GTP-ARF1 an und rekrutiert die Frachtmoleküle (Orci et al., 1993), wobei die Erweiterung der Hülle zur Membrandeformation und Vesikelabschnürung führt (Zhao et al., 1997; 1999), oder ARF1 stimuliert die Aktivität der Phospholipase D, so daß der Coatomer-Komplex über Inositolpolyphosphate an die Membran binden kann. Diese Variante wird durch die Beobachtung wahrscheinlich, daß Coatomer in Abwesenheit von ARF1, aber bei hoher Phospholipase D-Aktivität ebenfalls Membran-assoziiert vorliegt (Ktistakis et al., 1996).

Die Transport-Richtung der Coatomer-umhüllten Vesikel scheint von den Untereinheiten abhängig zu sein, die an die Frachtmoleküle binden. Während α -, β' - und ϵ -COP ein Di-Lysin-Motiv (K(X)KKX) binden und entsprechende Proteine retrograd transportieren, erkennen die Untereinheiten β -, γ - und ζ -COP andere Erkennungssequenzen und vermitteln den anterograden Frachttransport (Harter et al., 1996). Durch Hydrolyse des von ARF1 gebundenen GTPs kann ARF1 aufgrund einer Konformationsänderung nicht mehr über seine Myristoylgruppe an die Membran binden und die Hülle löst sich vom Vesikel ab (Kirchhausen, 2000b).

1.3.3 Clathrin-umhüllte Vesikel

Clathrin-umhüllte Vesikel sind an den meisten Transportvorgängen der Zelle beteiligt. Die Clathrin-vermittelte Endocytose dient der Aufnahme von Rezeptoren und extrazellulären Liganden, dem Recycling von Plasmamembranbestandteilen und von Oberflächenproteinen, die für den Abbau bestimmt sind. Zusätzlich werden Clathrin-umhüllte Vesikel bei der Sekretion vom TGN in Richtung Endosomen beobachtet. In den postsynaptischen Membranen neuronaler Zellen dienen Clathrin-umhüllte Vesikel der Rezeptor-Aufnahme nach Neurotransmitter-Bindung. Im Gegensatz dazu ist die kompensatorische Clathrin-vermittelte Endocytose in präsynaptischen Membranen entscheidend für das Recycling synaptischer Vesikel nach Sekretion der Neurotransmitter (Kirchhausen, 2000b; Slepnev und De Camilli, 2000).

Die Bildung Clathrin-umhüllter Vesikel ist ein hochkomplexer Vorgang (Abb. 2), an dem eine Vielzahl von Proteinen, teils noch unbekannter Funktion, beteiligt sind. Je nach Fracht und Kompartiment, von dem sich das Vesikel abschnürt, sind unterschiedliche Adapter-Proteine (AP-Komplexe und Arrestine) einerseits für die Bindung an die Frachtmoleküle und andererseits für die Rekrutierung von Clathrin an die Membran verantwortlich. Durch die Anlagerung weiterer Clathrin-Moleküle an die bestehende Hülle wird die Membran soweit gekrümmt, daß nach Abschluß der Hüllenbildung ein tief eingeschnürtes, aber noch mit der Donormembran verbundenes Vesikel entstanden ist (Schmid, 1997; Kirchhausen, 2000b).

Für das Abschnüren des Vesikels von der Donormembran wird die GTPase Dynamin benötigt, wobei zur Zeit eine Beteiligung von Endophilin, Synaptojanin und Phospholipase D an diesem Vorgang diskutiert wird (Ringstad et al., 1999; Sever et al., 1999; Takei et al., 1999). Direkt nach der Freisetzung wird die Clathrin-Hülle vom abgeschnürten Vesikel entfernt, so daß das Vesikel Kontakt mit seiner Zielmembran aufnehmen und mit dieser fusionieren kann (Ungewickell et al., 1995; Umeda et al., 2000).

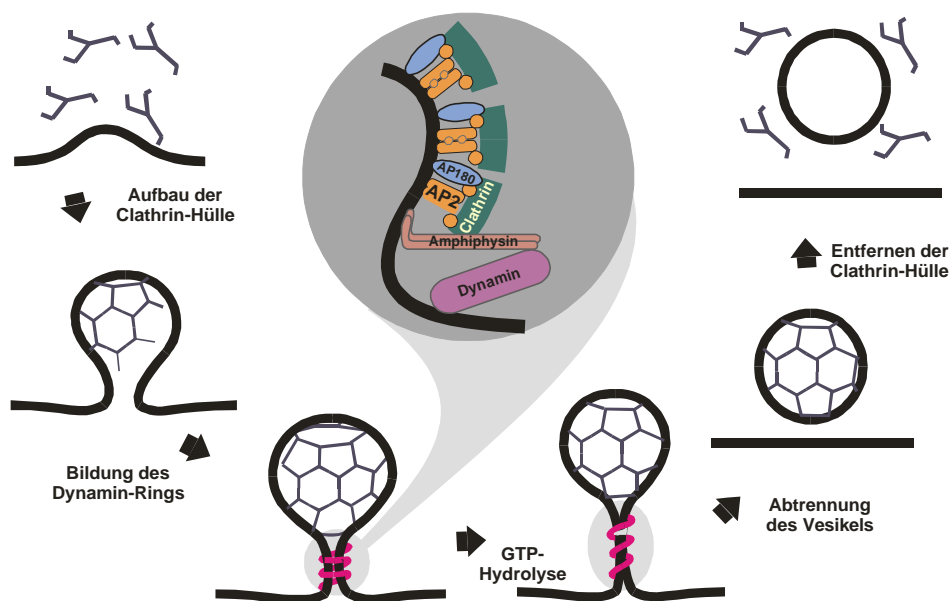


Abb. 2. Vereinfachte schematische Darstellung der verschiedenen Stufen der Clathrin-vermittelten Endocytose.

Die kompensatorische Endocytose synaptischer Vesikel ist einer der am besten untersuchten Wege der Clathrin-vermittelten Endocytose, obwohl er in einigen Punkten eine Spezialform darstellt. Viele der hier beteiligten Proteine besitzen besonders hohe neuronale Expressionsraten und/oder neuronale Spleißvarianten und Isoformen. Das Recycling synaptischer Vesikel erfolgt schneller als die Clathrin-vermittelte Endocytose in nicht-neuronalen Zellen, da der Weg der Vesikel über die Endosomen teilweise umgangen und der gesamte Prozeß damit abgekürzt wird (Murthy und Stevens, 1998). Präsynaptische Membranen werden nach der Sekretion von Neurotransmittern großflächig in die Zelle aufgenommen und die synaptischen Vesikel gleichzeitig von dort und von den Actin-reichen synaptischen Randbereichen, den sogenannten endocytotischen Zonen der Plasmamembran wieder aufgenommen (Takei et al., 1996).

Die bislang beschriebenen Vorgänge sind wesentlich komplizierter als bislang dargestellt, da sie durch eine Vielzahl von Protein-Interaktionen zustande kommen und reguliert werden (Abb. 3). Im Gegensatz zu Clathrin und den Adapter-Proteinen sind diese zusätzlichen Proteine nur kurzzeitig und wahrscheinlich nur zu bestimmten, ihrer Funktion entsprechenden Zeitpunkten mit dem Vesikel assoziiert, jedoch für den Prozeß unerlässlich. Die Interaktionen und Funktionen der beteiligten Proteine sollen, sofern bekannt, im folgenden kurz erläutert werden.

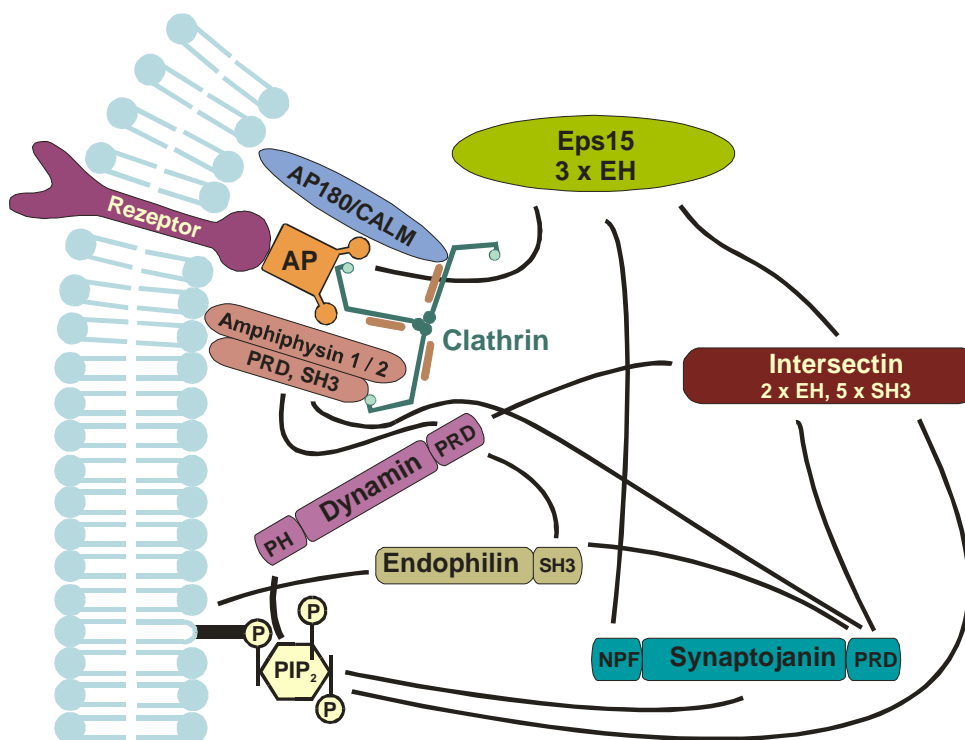


Abb. 3. Vereinfachte Darstellung der Interaktionen bei der Clathrin-vermittelten Endocytose. EH, Eps15 Homologie; AP, Adapter-Protein; PRD, Prolin-reiche Region; SH3, Src Homologie 3; PH, Pleckstrin Homologie; NPF, Asparagin-Prolin-Phenylalanin-Motiv.

Clathrin

Clathrin ist ein Oligomer aus drei leichten und drei schweren Ketten, die sich in der Form eines Triskelions zusammenlagern (Smith und Pearse, 1999, Abb. 4). Die außenliegenden N-terminalen Enden der drei Arme bilden eine siebenblättrige β -Propeller-Struktur (ter Haar et al., 1998), in der sich die Proteinbindungsstellen für die sogenannte Clathrin-Box befindet (Owen und Lutio, 2000), die als Bindungsmotiv sowohl in den Adapterproteinen als auch in weiteren Clathrin-bindenden Proteinen vorkommt. Bei der Hüllenbildung lagern sich die Clathrin-Oligomere zu fünf- und sechseckigen Strukturen zusammen, die eine gleichmäßige Krümmung der Membran herbeiführen. Die Kanten des Clathrin-Gitters werden von den restlichen Bereichen der Arme gebildet, die eine rechtsgängige Superhelix aus kurzen α -Helix-Haarnadelstrukturen ausbilden (Ybe et al., 1999).

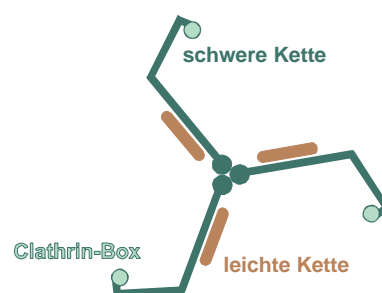


Abb. 4. Darstellung eines Clathrin-Triskelions, das durch Zusammenlagerung von je drei schweren (grün) und drei leichten Ketten gebildet wird (braun). Die Clathrin-Box an den N-terminalen Enden der schweren Ketten sind hellgrün hervorgehoben.

Adapter-Proteine (AP)

Abhängig von der Donormembran und den zu transportierenden Frachtmolekülen gibt es bei der Clathrin-vermittelten Endocytose unterschiedliche Adapter-Proteine. Die Aufnahme von G-Protein-gekoppelten Transmembran-Rezeptoren erfolgt durch Arrestine, die eine bislang weniger gut charakterisierte Gruppe von Adapter-Proteinen darstellen (Ferguson et al., 1996; Goodman et al., 1996). Besser untersucht sind die heterotetrameren AP-Komplexe, die sich zu einer kompakten Struktur mit zwei Ohr-ähnlich abstehenden Domänen zusammenlagern (Abb. 5). Mittlerweile sind vier AP-Komplexe (AP-1 bis 4) bekannt.

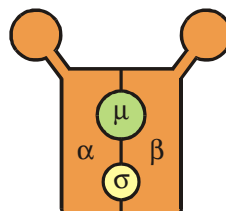


Abb. 5. Die heterotetrameren AP-Komplexe AP-1 bis 4 bestehen aus unterschiedlichen Isoformen der vier Proteine α , β , μ und σ .

AP-1 dient dem anterograden Transport vom TGN zu den Endosomen, während AP-2 den retrograden Transport von der Plasmamembran in Richtung der Endosomen ermöglicht und in Neuronen für die Bildung synaptischer Vesikel von der Plasmamembran gebraucht wird (Kirchhausen, 2000b). AP-3 übt seine Funktion einerseits bei der Proteinsortierung vom TGN zu Endo- und Lysosomen aus (Dell'Angelica et al., 1997; Simpson et al., 1997), andererseits ist es das wichtigste Adapter-Protein bei der Abschnürung synaptischer Vesikel beim Recycling von endosomalen Membranen (Faundez et al., 1998; Jackson, 1998). Alle drei Komplexe binden an Frachtmoleküle mit einem Di-Leucin- oder einem Tyrosin-Erkennungsmotiv YXXØ, wobei X beliebige und Ø hydrophobe Aminosäuren darstellen. Während AP-2 direkt an Plasmamembranproteine bindet, ist die Bindung von AP-1 und 3 abhängig von GTP-gebundenem und dadurch aktiviertem ARF1 (Stamnes und Rothman, 1993; Traub et al., 1993; Ooi et al., 1998). Über AP-4 ist bislang am wenigsten bekannt. Dieser Komplex scheint in der perinucleären Umgebung ebenfalls an der Sortierung von Frachtmolekülen beteiligt zu sein, bislang konnte aber keine Verbindung zum Clathrin-vermittelten Vesikeltransport festgestellt werden. Damit bildet AP-4 eine Ausnahme in der Familie der AP-Komplexe (Hirst et al., 1999).

Bei der kompensatorischen Endocytose an präsynaptischen Membranen bindet der Kernbereich von AP-2 sowohl an Membranproteine mit entsprechenden Bindungsmotiven als auch an Phospholipide der Membran (Arneson et al., 1999; Haucke und De Camilli, 1999). In anderen Zelltypen dient dieser Adapter auch der Aufnahme der Plasmamembran-Rezeptoren für LDL und Transferrin (Malorni et al., 1998; Kirchhausen, 2000b). Die Bindung an Clathrin erfolgt kooperativ über zwei getrennte Regionen, von denen sich eine innerhalb der Ohr-ähnlichen Domäne, die andere sich im Bereich zwischen Ohr-ähnlicher Domäne und Kernbereich befindet (Owen et al., 1999). Über AP-2 binden auch noch weitere Proteine an das sich bildende Vesikel, deren Funktionen für die Endocytose essentiell sind und im folgenden beschrieben werden.

AP180/CALM

AP180 ist ein hirnspezifisches, in Synapsen angereichertes Protein, das den Aufbau der Clathrin-Hülle fördert (Abb. 6). Dazu besitzt AP180 Bindungsstellen für AP-2 und Clathrin, wobei die gleichzeitige Interaktion der Proteine die Bindungen aneinander wesentlich verstärkt (Ahle und Ungewickell, 1986; Hao et al., 1999). Zusätzlich reguliert AP180 über eine Bindung an Phosphoinositide die Polymerisierungsaktivität von Clathrin und damit die Größe der gebildeten Hülle (Hao et al., 1997). In nicht-neuronalen Zellen übernimmt das verwandte, ubiquitär exprimierte CALM die Aufgaben von AP180 (Tebar et al., 1999).



Abb. 6. Domänenabfolge in AP180. Der N-terminalen ENTH- (Epsin N-terminale Homologie)-Domäne folgen Bindungsstellen für Clathrin und AP-2, die C-terminale Domäne vermittelt die Clathrin-Aggregation.

Dynamin

Dynamin besitzt eine der Schlüsselfunktionen bei der Abschnürung Clathrin-umhüllter und anderer Vesikel von der Donormembran (Abb. 7). Im GTP-gebundenen Zustand bilden sich aus den Dynamin-Tetrameren ringförmige Strukturen um den Hals des abzuschnürenden Vesikels. Die einfacheren Modelle gehen davon aus, daß sich die Konformation dieser ringförmigen Strukturen durch GTP-Hydrolyse wie eine Feder entspannt und das Vesikel so von der Donormembran abtrennt und freigesetzt wird. Neuerdings wird aber angenommen, daß Dynamin nicht als Mechanoenzym auf den Vesikelhals wirkt, sondern in Übereinstimmung mit der Funktion von GTPasen als molekulare Schalter im aktivierten Zustand auf andere Proteine wirkt, die daraufhin die Vesikelabtrennung vollziehen. Dafür spricht auch die Beobachtung, daß Dynamin nicht allein, sondern zusammen mit Amphiphysin und Endophilin in den ringförmigen Strukturen um den Vesikelhals gefunden wird. Die Dynamin-Aktivität wird über den Oligomerisierungsstatus, Phosphoinositide und weitere Protein-Bindungspartner wie Amphiphysin, Endophilin und Intersectin reguliert, die über ihre SH3-Domänen an die Prolin-reiche Region von Dynamin binden (Schmid et al., 1998; McNiven et al., 2000; Sever und Schmid, 2000).

Für die Abschnürung synaptischer Vesikel ist Dynamin 1 verantwortlich, während die weiteren Isoformen Dynamin 2 und 3 eine unterschiedliche Verteilung sowohl in Geweben als auch innerhalb der Zellen aufweisen. Desweiteren kommen alle Isoformen in unterschiedlichen Spleißvarianten vor (Schmid et al., 1998).

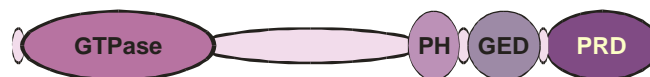


Abb. 7. Strukturelle Darstellung von Dynamin. Die Aktivität der N-terminalen GTPase-Domäne wird durch die GTPase-Effektor-Domäne (GED) reguliert, während die Pleckstrin Homologie- (PH-) Domäne und die Prolin-reiche Region (PRD) für die Wechselwirkungen mit verschiedenen Bindungspartner verantwortlich sind.

Synaptojanin

Synaptojanin ist eine Polyphosphoinositid-Phosphatase, die die Menge der an der Endocytose beteiligten Phosphoinositide reguliert. Dazu besitzt das Protein zwei Inositol-Phosphatase-Bereiche, die auf unterschiedliche Stellen des Inositolrings wirken, wodurch das Hauptsubstrat $PI(4,5)P_2$ zu Phosphatidylinositol abgebaut wird (McPherson et al., 1996; Guo et al., 1999). Da $PI(4,5)P_2$ positiv auf den Aufbau der Clathrin-Hülle und auf die Bildung von Actin-Filamenten wirkt (Arneson et al., 1999; Rohatgi et al., 1999), könnte Synaptojanin daher einerseits für eine Inhibition der Actin-Polymerisation in der Umgebung des Membranbereichs der Vesikelabschnürung verantwortlich sein, während es für das Ablösen der Clathrin-Hülle vom freigesetzten Vesikel essentiell ist (Cremona et al., 1999).

Es existieren zwei Isoformen, Synaptojanin 1 und 2, die beide in mehreren Spleißvarianten vorkommen. Die 145 kDa Isoform von Synaptojanin 1 (Abb. 8) und Synaptojanin 2B kommen hauptsächlich in Synapsen vor, während Synaptojanin 2A an der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert (Haffner et al., 1997; Nemoto und De Camilli, 1999; Slepnev und De Camilli, 2000). Synaptojanin bindet ebenso wie Dynamin sowohl an Amphiphysin 1 und 2 als auch an die Mitglieder der Endophilin-Familie (Cestra et al., 1999).



Abb. 8. Schematische Darstellung der 145 kDa-Variante von Synaptojanin. Auf die N-terminale suppressor-of-actin 1- (Sac1-) Homologie folgt eine 5'-Phosphatase-Domäne für den Abbau von $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ und eine Prolinreiche Region, die Wechselwirkungen mit anderen Proteinen vermittelt.

Synapsin

Synapsin ist für die Aufrechterhaltung des präsynaptischen Vesikelpools verantwortlich (Abb. 9). Bei Stimulierung des Neurons verschmilzt nur ein Teil der synaptischen Vesikel mit der Membran, die restlichen Vesikel werden als Reserve durch Synapsin an dem unterhalb der Synapse liegenden Actin-Cytoskelett verankert (Greengard et al., 1993). Durch den Ca^{2+} -Ionen-Einstrom, der für die Neurotransmitter-Abgabe verantwortlich ist, werden zusätzlich verschiedene Kinasen aktiviert. Eine davon ist CaMKII (Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Kinase II), deren Substrat Synapsin nach einer Phosphorylierung Vesikel aus dem Reservepool entläßt, die dann bei erneuter Stimulation mit der Membran verschmelzen können (Llinás et al., 1985; Torri Tarelli et al., 1992).



Abb. 9. Modulärer Aufbau von Synapsin. Sowohl die N-terminale (P1) als auch die C-terminale Domäne (P2) dienen der funktionalen Regulation über Phosphorylierung, während über den mittleren Proteinbereich die Bindung an Actin und die synaptischen Vesikel erfolgt.

Amphiphysin

Von Amphiphysin existieren zwei Isoformen, die hauptsächlich in Hirn exprimiert werden, aber in unterschiedlichen Spleißformen auch in den meisten anderen Geweben vorkommen (Wigge und McMahon, 1998). Heterodimeres Amphiphysin wird als multifunktionaler Adapter angesehen, der sowohl die Proteine der Vesikelhülle zur Membran als auch Dynamin und Synaptojanin zur Hülle bringt. Die BAR-Domäne ermöglicht einerseits Oligomerisierung, andererseits die Bindung an die Membran (Slepnev et al., 1998; Ramjaun et al., 1999; Takei et al., 1999). Der mittlere Teil des Proteins bindet Clathrin und AP-2 (Ramjaun und McPherson, 1998; Slepnev et al., 2000), die SH3-Domäne ermöglicht die Bindung an Synaptojanin und Dynamin (David et al., 1996, Abb. 10).

Amphiphysin kommt zusammen mit Dynamin in den ringförmigen Strukturen um den Vesikelhals vor und könnte den von Dynamin durch die GTP-Hydrolyse erzielten Effekt bei Vesikelabschnürung potenzieren (Takei et al., 1999). Zusätzlich gibt es Hinweise für eine regulatorische Funktion auf das Actin-Cytoskelett und auf eine Beteiligung an der Signaltransduktion (Wigge und McMahon, 1998).



Abb. 10. Modulärer Aufbau der Amphiphysine. Die N-terminale BIN-Amphiphysin-RVS- (BAR-) Domäne dient der Heterooligomerisierung, während die mittlere Region die Bindung an AP-2 und Clathrin und die C-terminale SH3-Domäne die Interaktionen mit anderen Bindungspartner vermittelt.

Endophilin

Endophilin 1, 2 und 3 binden über ihre C-terminale SH3-Domäne im Gegensatz zu den Amphiphysinen stärker an Synaptojanin als an Dynamin (Micheva et al., 1997). Die Endophilin/Dynamin-Interaktion beschleunigt die Abschnürung der Vesikel von der Donormembran (Ringstad et al., 1999; Schmidt et al., 1999), die Endophilin/Synaptojanin-Interaktion führt zu einer verstärkten Hydrolyse von PI(4,5)P₂ durch Synaptojanin (Gad et al., 2000). Der N-terminale Bereich bindet Lipide und besitzt Lysophosphatidylsäure-Acyltransferase- (LPAAT-) Aktivität, durch die aus Lysophosphatidylsäure Phosphatidylsäure gebildet und die Krümmung der Membran verändert wird, während die zentrale coiled coil-Region eine Dimerisierung ermöglicht (Schmidt et al., 1999, Abb. 11).



Abb. 11. Domänenstruktur der Endophiline. Die N-terminale Hälfte des Proteins besitzt LPAAT-Aktivität, während die mittlere coiled coil-Region eine Dimerisierung und die C-terminale SH3-Domäne die Interaktionen mit anderen Proteinen vermittelt.

Intersectin

Intersectin ist ein großes Strukturprotein mit zwei Epsin-bindenden EH-Domänen (Hussain et al., 1999; Sengar et al., 1999), einem coiled-coil Bereich, der Dimerisierung, Heterodimerisierung mit Eps15 und die Bindung an SNAP25 ermöglicht (Okamoto et al., 1999; Sengar et al., 1999), und fünf SH3-Domänen, über die die Bindung an Dynamin, Synaptojanin, Synapsin und mSos erfolgt (Roos und Kelly, 1998; Sengar et al., 1999; Tong et al., 2000b). Die Synapsen-spezifische Spleißvariante enthält im C-Terminus zusätzlich eine Dbl-Domäne, die die Actin-Polymerisation stimuliert, und eine Lipid-bindende PH-Domäne im C-Terminus (Hussain et al., 1999, Abb. 12).

Aufgrund seiner vielfältigen Interaktionen könnte Intersectin sowohl am Hüllenaufbau beteiligt sein und die Funktion der endocytotischen Proteine regulieren als auch Umstrukturierungen des Actin-Cytoskeletts und die Signaltransduktion koordinieren (Slepnev und De Camilli, 2000).



Abb. 12. Domänenstruktur von Intersectin. Die beiden N-terminalen EH-Domänen ermöglichen eine Bindung an Epsin, während der coiled coil-Bereich eine Dimerisierung bzw. Heterodimerisierung mit Eps15 vermittelt. Die fünf C-terminalen SH3-Domänen interagieren mit einer Vielzahl anderer Proteine. Die C-terminalen Dbl- und PH-Domänen kommen nur in der neuronalen Spleißvariante vor. Die Dbl-Domäne stimuliert die Actin-Polymerisation, während die PH-Domäne eine Bindung an Lipide ermöglicht.

Eps15

Eps15 bindet über seine C-terminalen DPF-Motive an die Ohr-ähnliche Domäne von AP-2 (Benmerah et al., 1996; Iannolo et al., 1997), lokalisiert an den Außenbereichen der sich bildenden Clathrin-Hülle (Tebar et al., 1996) und könnte daher AP-2 an die Membran rekrutieren. Als Substrat der EGF-Rezeptor-Tyrosin-Kinase könnte Eps15 zusätzlich als Adapter für die Rekrutierung von EGF-Rezeptoren in Vesikel dienen (Torrise et al., 1999). Das Protein bildet Dimere und Heterodimere mit Intersectin (Salcini et al., 1999; Sengar et al., 1999), während die drei N-terminalen EH-Domänen die Bindung an Epsin und die nicht-neuronalen Formen von Synaptojanin vermitteln (Haffner et al., 1997; Chen et al., 1998, Abb. 13).



Abb. 13. Modulärer Aufbau von Eps15. Die drei N-terminalen EH-Domänen binden Epsin und Synaptojanin, während die coiled coil-Region sowohl eine Homodimerisierung als auch eine Heterodimerisierung mit Intersectin ermöglicht. Über die C-terminalen DPF-Motive erfolgt die Bindung an AP-2.

1.4 Endocytose und das Actin- und Tubulin-Cytoskelett

Die Abschnürung eines Vesikels und das Entfernen seiner Proteinhülle ist nur der erste Schritt im komplexen Vorgang des Vesikel-Transports. Bevor Vesikel mit ihrer Zielmembran fusionieren können, müssen sie, manchmal sogar durch die gesamte Zelle, zu dieser transportiert werden. Für den Transport entlang der Mikrotubuli sind schon lange Motor-Proteine wie Dynein und Kinesin bekannt, der Transport entlang der Actin-Filamente erfolgt durch nicht-muskuläre Myosin-Isoformen (Langford, 1995; Allan und Schroer, 1999). Diese Transportwege können aber nur einen Teil des Wegs abdecken, da Mikrotubuli nicht bis zur Plasmamembran reichen und Actin-Filamente nur an spezifischen Strukturen, den Fokalkontakten, an die Plasmamembran binden.

Für eine Beteiligung des Actin-Cytoskeletts an den ersten Schritten des Vesikeltransports direkt nach der Abschnürung von der Plasmamembran gibt es zwei unterschiedliche Theorien. Zum einen könnte ein verknüpftes Actin-Netzwerk, das sich innerhalb der endocytotischen Zone bildet und in Richtung Cytoplasma treibt, die neu abgeschnürten Vesikel einfangen und so von der Plasmamembran weg transportieren. Für den alternativen Weg der Vesikelbewegung über sogenannte ‚actin comet tails‘ gibt es seit kurzer Zeit erste Beweise. Man geht davon aus, daß Actin am neu gebildeten Vesikel polymerisiert und dadurch dessen Transport in Richtung des Zellinneren antreibt (Merrifield et al., 1999), vergleichbar mit den Vorgängen, mit denen sich *Listeria* und *Shigella* bei einer Infektion durch eine Zelle bewegen. Diese Bakterien exprimieren auf ihrer Oberfläche Proteine, die die ‚actin nucleation factor‘ der Wirtszelle rekrutieren und so eine polarisierte Actin-Polymerisation an einer Seite des Bakteriums auslösen, aufgrund derer sie sich an der Spitze dieser ‚comet tail‘-genannten Struktur durch die Zelle bewegen (Machesky, 1999).

Vor kurzem konnte bei der Pinocytose in Mastzellen gezeigt werden, wie sich an den abgeschnürten Vesikeln ‚comet tails‘ gebildet und die Vesikel von der Plasmamembran weg angetrieben haben. Für die Bildung pinocytotischer Vesikel fusionieren Membranen in ‚membrane ruffle‘-Strukturen miteinander, wodurch ‚actin nucleation factor‘ an diesen Stellen konzentriert werden. An der Plasmamembran-nahen Seite der aufgenommenen Vesikel kommt es dann zu einer lokalen Actin-Polymerisation, die die Vesikel in das Zellinnere transportiert, von wo sie dann entlang der Mikrotubuli zu ihrem Zielort gelangen (Merrifield et al., 1999). Diese Vorgänge deuten zum ersten Mal darauf hin, daß *Listeria* und *Shigella* für ihre Fortbewegung Parasiten-typisch lediglich bereits in der Zelle etablierte Transportwege mißbrauchen und keine neuen erschaffen.

Die Bildung der ‚actin comet tails‘ bei Endo- und Lysosomen ist abhängig von N-WASP, einem Bindungspartner des die Actin-Polymerisation stimulierenden Arp2/3-Komplexes. In *Xenopus* Oocyten lokalisiert N-WASP an jedem über ‚comet tails‘ angetriebenen Vesikel, was eine Regulation des Prozesses über die N-WASP-aktivierende GTPase Cdc42 ermöglicht. Zusätzlich scheint dieser Transport PKC-abhängig zu sein. Diese Kinasen können ihrerseits durch Phospholipide, Diacylglycerol und/oder Ca^{2+} -Ionen aktiviert werden und eventuell für die Rekrutierung von N-WASP an das Vesikel verantwortlich sein. Für eine mögliche Regulation könnten aktivierte PKCs den GEF für Cdc42 phosphorylieren und somit aktivieren. Dieser würde Cdc42 in die GTP-gebundene aktive Form überführen, die wiederum N-WASP bindet und aktiviert. Nach dessen Lokalisation an die Vesikelmembran stimuliert N-WASP über den Arp2/3-Komplex die Actin-Polymerisation, über die sich das Vesikel in die Zelle bewegt (Taunton et al., 2000).

Dieser mögliche Transportweg scheint in der Zelle weit verbreitet zu sein. GTP-Cdc42 bindet an die γ -COP-Untereinheit von Coatomer und könnte so N-WASP für einen Actin ‚comet tail‘-abhängigen Transport von COPI-Vesikeln rekrutieren (Wu et al., 2000). Auch ein Transport der sich von ‚lipid rafts‘ abschnürenden Vesikel erfolgt durch ‚actin comet tails‘, Diese Vesikel enthalten hohe Konzentrationen der PI(4,5)P₂-bildenden Typ I-Phosphatidylinositol-Phosphat-5-Kinase und an Phosphotyrosin-Proteinen. Durch die

Bindung an die Phosphotyrosin-Proteine und PI(4,5)P₂ wird das zu N-WASP homologe WASP aktiviert und löst die Arp2/3-abhängige Actin-Polymerisation aus. ‚Actin comet tails‘ scheinen daher auch einen Weg für den ‚lipid raft‘-abhängigen Vesikel- und apikalen Membrantransport zu bieten (Rozelle et al., 2000).

Die Bewegung über ‚actin comet tails‘ könnte desweiteren die Effizienz des Vesikeltransports vor allem in großen, eher dreidimensionalen Zellen wie den *Xenopus* Oocyten erhöhen. Mikrotubuli vermitteln zwar den gerichteten Transport von Endo- und Lysosomen über weite Strecken, könnten aber in großen Zellen trotz ihrer hohen Dynamik nicht für eine vollständige Abdeckung aller Zellbereiche ausreichen. Der vielleicht als ATP-abhängige Diffusion zu betrachtende ungerichtete Vesikelantrieb über ‚actin comet tails‘ könnte daher mit den Mikrotubuli zusammenarbeiten, um Vesikel in alle Bereiche der Zelle zu transportieren (Taunton et al., 2000).

1.5 Regulation des intrazellulären Vesikeltransports

Aufgrund seiner Komplexität unterliegt jeder Schritt des intrazellulären Vesikeltransports zahlreichen Regulationsmechanismen. Wichtige Modulatoren sind dabei Lipide wie Phosphoinositide, deren Konzentration von Kinasen und Phosphatasen reguliert wird. Auch der Phosphorylierungszustand der beteiligten Proteine ist für den Ablauf und die Regulation des Vesikeltransports entscheidend. Die meisten der am Vesikeltransport beteiligten Proteine scheinen Phosphoproteine zu sein, wobei im Gegensatz zur phosphorylierungsabhängigen Aktivierung intrazellulärer Signaltransduktionswege die Dephosphorylierung dieser Proteine für die Auslösung der Endocytose nötig ist, obwohl beide Bereiche von Kinasen wie PKC, CK2 und CaMKII reguliert werden. Viele Schritte sind von GTPasen abhängig, deren Aktivität durch ihre GEFs und GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) reguliert wird (Linás et al., 1985; Robinson et al., 1998; Slepnev et al., 1998; Chen et al., 1999; Cotlin et al., 1999; Hannah et al., 1999; Turner et al., 1999; Takai et al., 2001).

Vor allem beim synaptischen Vesikeltransport besitzt die Ca²⁺-Konzentration einen großen Einfluß. Ca²⁺-Ionen strömen aufgrund eines Stimulus in die Nervenzelle ein, woraufhin die synaptischen Vesikel mit der Plasmamembran verschmelzen. Durch die Ca²⁺-Ionen wird die Phosphatase Calcineurin aktiviert, die daraufhin Dynamin, Synaptojanin und Amphiphysin dephosphoryliert. Dadurch werden die an der Endocytose beteiligten Proteine aktiviert und die kompensatorische Clathrin-vermittelte Endocytose ermöglicht (Robinson et al., 1994; Marks und McMahon, 1998; Slepnev et al., 1998; Chen et al., 1999). Zusätzlich scheint eine Ca²⁺-abhängige Interaktion von Dynamin mit dem Vesikelprotein Synaptophysin einen Clathrin-unabhängigen Weg der Vesikelaufnahme zu ermöglichen, bei dem sich ebenfalls Dynamin bei hohen Ca²⁺-Konzentrationen um den Vesikelhals windet. Sinkt die Ca²⁺-Konzentration, kann Dynamin das gebundene GTP hydrolysieren und die Vesikel werden abgetrennt (Daly et al., 2000).

Ein weiterer wichtiger Effektor ist PI(4,5)P₂, der unter anderem die Bildung der Clathrin-Hülle reguliert (Jost et al., 1998; Corvera et al., 1999) und die Organisation des Actin-Cytoskelett beeinflusst (Sakisaka et al., 1997). Da Synaptojanin die PI(4,5)P₂-Konzentration reguliert, wirkt es auch entscheidend auf die darüber vermittelten Vorgänge (McPherson et al., 1996; Guo et al., 1999).

Für die Verschmelzung synaptischer Vesikel mit präsynaptischen Membranen scheinen, neben Synapsin und PKC auch 14-3-3-Proteine essentiell zu sein (Broadie et al., 1997; Stevens und Sullivan, 1998). Die Identität der durch PKC phosphorylierten Proteine, die die Abgabe von Neurotransmittern regulieren, ist noch nicht geklärt, ihre Aktivität könnte aber über 14-3-3-Proteine reguliert werden, die ihrerseits Signalwege über die Bindung an Serin-phosphorylierte Proteine beeinflussen (Morgan und Burgoyne, 1992; Roth und Burgoyne, 1995).

Das wichtigste Ziel für das genaue Verständnis des Vesikeltransports ist neben der Identifikation aller beteiligten Faktoren die Aufklärung ihrer präzisen Funktionsweise, der Abfolge ihrer Aktionen innerhalb des Prozesses und ihrer gegenseitigen Regulation. Proteine, die entweder SH3- oder EH-Domänen und/oder NPF-Motive enthalten, sind potentielle Kandidaten bei der Suche nach Proteinen, die an endocytotischen Prozessen beteiligt sein könnten. Einige dieser Proteine sind sowohl an der Endocytose als auch an der Signalweiterleitung in der Zelle und der Regulation des Cytoskeletts beteiligt.

1.6 PACSIN 1

Nach einer Läsion des entorhinalen Cortex konnte aus einer subtraktiven Maus-cDNA-Bank das neurospezifische PACSIN 1 isoliert werden, dessen Expressionsrate während der Entwicklung korrelierend mit der neuronalen Differenzierung ansteigt und während Regenerationsprozessen drastisch reduziert wird. PACSIN 1 besitzt mehrere potentielle Phosphorylierungsstellen für PKC und CK2 (Abb. 14) und stellt ein *in vitro*-Substrat dieser Kinasen dar. Die zusätzlich nachgewiesene *in vivo*-Phosphorylierung läßt eine funktionale Regulation über den Phosphorylierungszustand des Proteins vermuten (Plomann et al., 1998).

PACSIN 1 besitzt einen modulären Aufbau mit einer N-terminalen potentiellen Cdc15p-N-terminalen- (CDC15-NT)-Domäne unbekannter Funktion (PROSITE Datenbank, Bucher und Bairoch, 1994), die zuerst im *S. pombe* Protein Cdc15p beschrieben wurde (Fankhauser et al., 1995) und laut den Coil- und Paircoil-Programmen einen potentiellen coiled-coil Bereich einschließt (Lupas et al., 1991; Berger et al., 1995). Den C-Terminus bildet eine Src Homologie 3- (SH3)-Domäne, die eine Bindung an Prolin-reiche Motive anderer Proteine ermöglicht (Cohen et al., 1995). In dem Bereich zwischen der CDC15-NT- und der SH3-Domäne befinden sich eine 14-3-3-Bindungsstelle, die eine phosphorylierungsabhängige Interaktion mit 14-3-3-Proteinen ermöglicht (Muslin et al., 1996), und zwei Asparagin-Prolin-Phenylalanin- (NPF)-Motive, die Bindungsmotive für Eps15-Homologie- (EH)-Domänen darstellen (Salcini et al, 1997, Abb. 14).

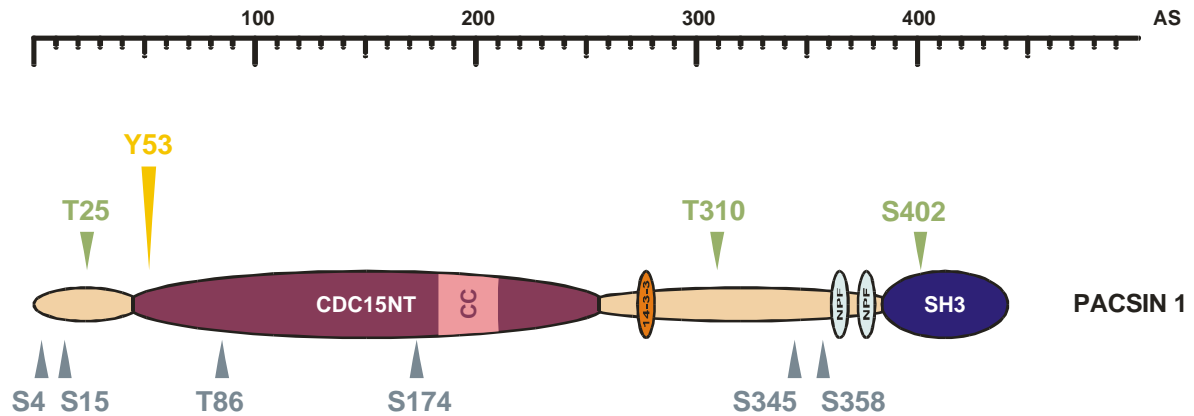


Abb. 14. Domänenstruktur von PACSIN 1. Die N-terminale CDC15-NT- und die C-terminale SH3-Domäne sind als abgegrenzte Bereiche dargestellt. Der Bereich der potentiellen coiled-coil Region (CC) innerhalb der CDC15-NT-Domäne ist hell hervorgehoben. In der zwischen den Domänen liegenden variablen Region sind die 14-3-3-Bindungsstelle und die NPF-Motive hervorgehoben. Die durch Computeranalyse gefundenen potentiellen Phosphorylierungsstellen sind mitsamt Aminosäureposition für CK2 (grau) unterhalb, für PKC (grün) und das potentiell phosphorylierte Tyrosin (gelb) oberhalb der Domänenstruktur angegeben.

Das später beschriebene Syndapin I ist das Ratten-Homolog von PACSIN 1 und interagiert in Synapsen sowohl mit Proteinen des Clathrin-vermittelten Vesikeltransports als auch mit N-WASP, dessen Aktivität das Actin-Cytoskelett reguliert. Aufgrund dieser Wechselwirkungen wird Syndapin I als Verbindung zwischen den Vorgängen der Endocytose und der Regulation des Actin-Cytoskeletts angesehen (Qualmann et al., 1999)

Desweiteren wurde in Huhn ein zu PACSIN 1 verwandtes Protein, FAP52, beschrieben, das zwar einen identischen modulären Aufbau besitzt, im Gegensatz zum neurospezifischen PACSIN 1 aber ubiquitär exprimiert wird (Meriläinen et al., 1997).

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte über verschiedene Ansätze versucht werden, die Funktion von PACSIN 1 sowie dessen Regulation zu charakterisieren.

Da die funktionale Regulation vieler Proteine über deren Phosphorylierungszustand erfolgt, kann eine Identifikation der beteiligten Kinasen Hinweise auf eine mögliche Funktion des Proteins geben. Die PACSIN 1-Sequenz enthält nicht nur mehrere potentielle Phosphorylierungsstellen, für das Protein konnte bereits eine *in vitro*- und *in vivo*-Phosphorylierung gezeigt werden (Plomann et al., 1998). Daher sollten *in vitro*-Phosphorylierungsstudien mit verschiedenen Kinasen einerseits die exakten Aminosäure-Positionen der Phosphorylierung ermitteln und andererseits die Spezifität verschiedener Kinasen für die einzelnen Positionen ermitteln.

Zusätzliche Informationen über die Funktion eines Proteins können häufig über die interagierenden Proteine ermittelt werden. PACSIN 1 besitzt sowohl zwei NPF-Motive, die eine Bindung an EH-Domänen-Proteine ermöglichen (Salcini et al., 1997), als auch eine CDC15-NT-Domäne, für die bislang noch keine Funktion bekannt ist. Eine Charakterisierung der Bindungsspezifitäten dieser Sequenzbereiche könnte daher weitere funktionale Daten über PACSIN 1 erbringen.

Für die in PACSIN 1 enthaltene potentielle 14-3-3-Protein-Bindungsstelle ist eine funktionale Regulation über Phosphorylierung bekannt (Muslin et al., 1996). Daher sollte eine mögliche Interaktion mit dieser Protein-Familie untersucht werden, um auf diesem Weg Hinweise auf eine phosphorylierungsabhängige funktionale Regulation von PACSIN 1 zu erhalten.

Die für Syndapin I beschriebene Verbindung zu Clathrin-vermittelten endocytotischen Prozessen wird über dessen SH3-Domäne vermittelt (Qualmann et al., 1999). Da PACSIN 1 und Syndapin I homologe Proteine in unterschiedlichen Spezies sind, sollte versucht werden, die für Syndapin I beschriebenen Interaktionen auf PACSIN 1 zu übertragen und so eine Funktion beim Clathrin-vermittelten Vesikeltransport nachzuweisen.

Das in Huhn ubiquitär exprimierte FAP52 (Meriläinen et al., 1997), das ein verwandtes Protein zu PACSIN 1 darstellt, weist auf die Existenz mindestens einer zusätzlichen PACSIN-Isoform mit unterschiedlichem Expressionsmuster hin. Daher sollte versucht werden, zusätzlich existierende PACSIN-Isoformen zu isolieren und ihre Expressionsmuster zu charakterisieren.

Die funktionale Analyse potentieller weiterer PACSIN-Isoformen sollte über eine Charakterisierung ihrer Bindungspartner und die Übertragung der für PACSIN 1 gefundenen Ergebnisse erfolgen, um sowohl Gemeinsamkeiten als auch Spezialisierungen der Isoformen auf bestimmte Funktionen zu ermitteln.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Chemikalien wurden, wenn nicht anders im Text vermerkt, von den Firmen Merck Eurolab GmbH (Lohmar, Deutschland), Serva Elektrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland), Fluka oder Sigma (beide Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) bezogen und besaßen den Reinheitsgrad ‚pro analysi‘.

Alle Lösungen und Reaktionen wurden mit Millipore-Wasser (Milli-Q PF Plus System, Millipore Corp., Bedford, MA, USA) angesetzt, sofern nichts anderes angegeben ist.

Falls nicht anders aufgeführt, beziehen sich alle Angaben auf Raumtemperatur (RT, 22-25°C).

2.1.1 Puffer und Lösungen

Biotin-X-NHS-Lösung	1 mg/ml in DMSO
50x Denhardt's Reagenz	5% (w/v) Ficoll (Typ 400, Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) 5% (w/v) Polyvinylpyrrolidon 5% (w/v) BSA
Formamid-Mix	50% (v/v) Formamid 5x SSPE 1,5% (w/v) SDS 5x Denhardt's Reagenz
GIT-Puffer	4 M Guanidinthiocyanat 25 mM Natriumcitrat (pH 7,0) 0,5% (w/v) N-Laurylsarcosin 100 mM β -Mercaptoethanol
HBS-Puffer (pH 7,4)	20 mM HEPES 150 mM NaCl
IH-Puffer (pH 7,6)	50 mM Tris 150 mM NaCl

10% (w/v) Paraformaldehyd-Stocklösung

10 g Paraformaldehyd werden mit PBS auf 90 ml aufgefüllt und die Suspension auf 60°C erwärmt. NaOH wird tropfenweise unter Rühren zugegeben, bis sich das Paraformaldehyd gelöst hat. Der pH-Wert wird auf 7,4 eingestellt, die Lösung mit PBS auf 100 ml aufgefüllt und bei 4°C gelagert.

PBS-Puffer (pH 7,4)	140 mM NaCl 10 mM KCl 8 mM Na ₂ HPO ₄ 2 mM KH ₂ PO ₄
PD-Puffer (pH 7,4)	10 mM HEPES 150 mM NaCl 1 mM EGTA 0,1 mM MgCl ₂
PKC(a, b, g)-Phosphorylierungsmix (pH 7,0)	12,5 mM HEPES 12,5 mM MgCl ₂ 0,75 mM CaCl ₂ 2,5 mg Phosphatidylserin pro µg Substrat 50 ng PMA pro µg Substrat 125 mM ATP-Mix mit 5,55 kBq [γ - ³² P]ATP
PKCz-Phosphorylierungsmix (pH 7,5)	50 mM Tris/HCl 12,5 mM MgCl ₂ 2 mM EGTA 125 mM ATP-Mix mit 5,55 kBq [γ - ³² P]ATP
20x SSC (pH 7,5)	3 M NaCl 0,3 M Trinatriumcitrat
20x SSPE (pH 7,5)	3 M NaCl 200 mM NaH ₂ PO ₄ 20 mM EDTA
TBS-Puffer (pH 7,4)	50 mM Tris-HCl 150 mM NaCl
Tetramethylbenzidin	20 mg/ml in DMSO

2.1.2 Enzyme

Alle Restriktions- und DNA-modifizierenden Enzyme wurden von der Firma New England Biolabs, Beverly, MA, USA bezogen und mit den mitgelieferten Puffern unter den vorgegebenen Bedingungen eingesetzt.

Die Enzyme für die Phosphorylierungsstudien wurden von Calbiochem (PKC ζ), Biomol (PKC α , β , γ) und New England Biolabs (CK2) bezogen. Für die Phosphorylierungsstudien mit CK2 wurde der mitgelieferte Puffer verwendet.

2.1.3 Biologisches Material

2.1.3.1 *E. coli*-Bakterien-Stämme

BMH 71-18 *mutS* (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA, USA)

thi-1, supE, $\Delta(\text{lac-proAB})$, $\text{mutS}::\text{Tn10}$, F' [proAB⁺, lacI^qZ Δ M15]

DH5a (Life Technologies GmbH, Karlsruhe, Deutschland)

F⁻ f80lacZDM15 D(lacZYA-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(rk⁻, mk⁺) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 tonA

BL21 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA, USA)

F⁻ ompT hsdSB (rB-mB⁻) gal dcm (DE3) pLysS (CamR)

BNN132 (Clontech)

endA1 gyr96 hsdR17 relA1 supE44 thi $\Delta(\text{lac-proAB})$ [F' traD36 proAB⁺ lacI^qZ Δ M15] λ KC (kan-cre)

DH10B (Life Technologies)

F⁻ mcrA $\Delta(\text{mrr-hsdRMS-mcrBC})$ ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ lacX74 deoR recA1 araD139 $\Delta(\text{ara, leu})$ 7697 galU galK λ^- rspL nupG

2.1.3.2 Hefen

Y187 (Clontech)

MAT α , ura 3-52, his 3-200, ade 2-101, trp 1-901, leu 2-3, 112, gal4 Δ , met⁻, gal80 Δ , URA3::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-lacZ

Y190 (Clontech)

MAT α , ura 3-52, his 3-200, lys 2-801, ade 2-101, trp 1-901, leu 2-3, 112, gal4 Δ , gal80 Δ , cyh^r2, LYS2::GAL1^{UAS}-HIS3_{TATA}-HIS3, URA3::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-lacZ

2.1.3.3 Eukaryotische Zellen

Primäre Neuronenkulturen

Primäre Hippocampus-Neuronen aus Ratte (embryonaler Tag 18)

Die in dieser Arbeit verwendeten Kulturen wurden von Frau Dr. B. Witter (Institut für Anatomie 2, Köln) zur Verfügung gestellt.

NIH 3T3

Embryonale Fibroblasten-Zelllinie aus Maus (Jainchill et al., 1969)

C2

Myoblasten-Zelllinie aus Maus (Blau et al., 1983)

2.1.3.4 Paraffinschnitte

Sagittale Schnitte von adulten Rattenhirnen mit einer Dicke von 10 μm wurden von Frau Priv.-Doz. Dr. A. Wevers (Institut für Anatomie 2, Köln) zur Verfügung gestellt.

2.1.4 Banken

Maus-Hirn MATCHMAKER cDNA-Bank (MH4008AH, Clontech)

Die zugrunde liegende RNA wurde aus männlichen BALB/c-Mäusen im Alter von 9 bis 12 Wochen isoliert und die cDNA mit einem poly(T)-Primer amplifiziert. Die cDNAs wurden 5' über einen EcoRI-Linker und 3' über eine im poly(T)-Primer enthaltene XhoI-Schnittstelle in den pACT2-Vektor kloniert. Die Vektoren sind in den *E. coli*-Stamm BNN132 transformiert.

Maus-cDNA-Bank aus Embryonen (Tag 9 p.c.) (Bank Nr. 599, RZPD)

Die Klone der Bank sind auf 4 Filtern als einzelne Punkte aufgetragen. Die zugrunde liegende RNA wurde aus ganzen Embryonen des Stammes C57B16 x DBA isoliert und mit einem oligo(dT)-Primer in cDNA umgeschrieben. Als positiv befundene Klone können vom RZPD geordert werden und sind NotI/SalI in den pSVSport1-Vektor kloniert. Die Vektoren sind in den *E. coli*-Stamm DH10B MaxEfficiency (Life Technologies) transformiert.

2.1.5 Sonden

PACSIN 1 aus Maus	nt 1-1666 der cDNA
PACSIN 2 aus Maus	nt 106-602 der cDNA
PACSIN 3 aus Maus	nt 128-1808 der cDNA
humanes PACSIN 2	nt 7-500 der cDNA
humanes PACSIN 3	nt 1-394 der cDNA
Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)	600 nt-Fragment aus Mensch

2.1.6 Antikörper

2.1.6.1 Erstantikörper

Antiseren gegen PACSIN-Isoformen

	Quelle	Wirt	Western Blot	Immun-fluoreszenz	Immun-histochemie
Antiserum gegen PACSIN 1	eigen [*]	Kaninchen	1:15000		
Antiserum gegen PACSIN 2	eigen [*]	Kaninchen	1:15000		
Antiserum gegen PACSIN 3	eigen [*]	Kaninchen	1:5000		
Antiserum gegen PACSIN 1 (aff.)	eigen [*]	Kaninchen	1:5000	1:100	1:25
Antiserum gegen PACSIN 2 (aff.)	eigen [*]	Kaninchen	1:5000	1:100	1:25
Antiserum gegen PACSIN 3 (aff.)	eigen [*]	Kaninchen	1:2000	1:100	1:25

Tab. 1. Tabellarische Auflistung der Antiseren gegen die PACSIN-Isoformen mit Angaben zu Wirtstieren und verwendeten Verdünnungen in den aufgeführten Anwendungen. Die Bezeichnung (aff.) bezeichnet die affinitätsgereinigten Antiseren gegen die PACSIN-Isoformen. ^{*} Die Angabe eigen bedeutet, daß die Antigene selbst hergestellt und die Immunisierungen durch die Firma Pineda, Berlin, durchgeführt wurden.

Weitere Antiseren und Antikörper

	Quelle	Wirt	Western Blot	Immunfluoreszenz
14-3-3 b	Santa Cruz ^a	Maus	1:1000	
Actin	Santa Cruz	Maus	1:100	
Actin	Sigma	Maus	1:200	
Clathrin	Transduction Laboratories ^b	Maus	1:1000	
Clathrin	Oncogene ^c	Maus		1:50
Dynamin	Transduction Laboratories	Maus	1:5000	1:50
HA	Roche ^d	Ratte		1:500
HA-HRP	Roche	Ratte	1:500	
mSos1	P. S. McPherson	Kaninchen	1:2000	
Myc 9E10	Santa Cruz	Maus	1:1000	1:100
Myc A-14	Santa Cruz	Kaninchen	1:3000	1:1000
N-WASP	H. Miki	Kaninchen	1:3000	1:250
Profilin I	W. Witke	Kaninchen	1:1000	
Profilin II	W. Witke	Kaninchen	1:1000	
PY20	Transduction Laboratories	Maus	1:1000	
Synaptojanin 1	P. S. McPherson	Kaninchen	1:1000	
α -Tubulin	Amersham ^e	Maus	1:1000	1:100

Tab. 2. Tabellarische Auflistung der zusätzlich verwendeten Antiseren und Antikörper mit Angaben zu Wirtstieren und verwendeten Verdünnungen in den aufgeführten Anwendungen. Das Antiserum gegen N-WASP wurde freundlicherweise von Dr. H. Miki (Tokyo, Japan), die Antiseren gegen Profilin I und II von Dr. W. Witke (Rom, Italien) und die Antiseren gegen mSos1 und Synaptojanin 1 von Dr. P. S. McPherson (Montreal, Kanada) zur Verfügung gestellt. ^a Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA, ^b Transduction Laboratories, Lexington, KY, USA, ^c Oncogene Research Products, Cambridge, MA, USA und ^d Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, ^e Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland.

2.1.6.2 Zweitantikörper

Quelle	Wirt	Antigen	Markierung	Western Blot	Immunfluoreszenz
DAKO ^a	Schwein	Kaninchen-Ig	HRP	1:3000	
DAKO	Kaninchen	Maus-Ig	HRP	1:3000	
Jackson ^b	Ziege	Kaninchen-Ig	Cy3		1:400
Jackson	Ratte	Maus-Ig	Cy3		1:400
Jackson	Ziege	Ratte-Ig	Cy3		1:200
Molecular Probes ^c	Ziege	Kaninchen-Ig	Alexa488		1:1000
Molecular Probes	Ziege	Maus-Ig	Alexa488		1:1000
Molecular Probes	Ziege	Ratte-Ig	Alexa488		1:1000

Tab. 3. Tabellarische Auflistung der verwendeten Zweitantikörper mit Angaben zu Wirtstieren, Spezifität, gekoppelten Enzymen bzw. Chromophoren und verwendeten Verdünnungen in den aufgeführten Anwendungen. ^a DAKO A/S, Glostrup, Dänemark, ^b Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA und ^c Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, USA.

2.1.6.3 Streptavidin-Konjugate

Quelle	Avidin-Art	Markierung	ELISA	Immunfluoreszenz
Amersham ^a	Streptavidin	HRP	1:1000	
Sigma	Extravidin	TRITC		1:200

Tab. 4. Tabellarische Auflistung der verwendeten Streptavidin-Konjugate zum Nachweis biotinylierter Proteine mit Angaben zur Avidin-Art, dem gekoppelten Enzym bzw. Chromophor und den verwendeten Verdünnungen in den aufgeführten Anwendungen. ^a Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland.

2.1.7 Vektoren

2.1.7.1 Klonierungsvektoren

- pBluescript KS (Stratagene GmbH, Heidelberg, Deutschland)
- pBluescript SK(-) (Stratagene)
- pT7T3D-Pac (M. B. Soares)
- Lafmid BA (M. B. Soares)
- pSVSport1 (Life Technologies)

2.1.7.2 Expressionsvektoren

- pAS2-1 (Clontech)
- pACT2 (Clontech)
- pcDNA3 (Invitrogen) (mit eingefügter Myc-Sequenz)
Nach der HindIII-Schnittstelle des Polylinkers wurde folgende Sequenz eingefügt
5' - GCC ACC ATG CCG GAG CAG AAG CTG ATA TCC GAG GAG GAC CTG GCC ATG G - 3'
3' - CGG TGG TAC GGC CTC GTC TTC GAC TAT AGG CTC CTC CTG GAC CGG TAC C - 5'
- pcDNA3 (Invitrogen) (mit eingefügter HA-Sequenz)
Nach der KpnI-Schnittstelle des Polylinkers wurde folgende Sequenz eingefügt
5' - GCC ACC ATG GCT TAC CCA TAC GAT GTT CCA GAT TAC GCT - 3'
3' - CGG TGG TAC CGA ATG GGT ATG CTA CAA GGT CTA ATG CGA - 5'
- pMyc-CMV (Clontech)
- pHA-CMV (Clontech)
- pDsRed1-N1 (Clontech)
- pGEX-2T (Pharmacia)
- pGEX-3X (Pharmacia)
- GFP-Endo (Clontech)

2.1.8 Primer

2.1.8.1 Sequenzierungsprimer

universelle Primer

- T3 5' – ATT AAC CCT CAC TAA AGG GA – 3'
- T7 5' – TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG – 3'
- Sp6 5' – GAT TTA GGT GAC ACT ATA G – 3'
- pcDNA3 5' – AGA GAA CCC ACT GCT TAC TG – 3'
- pGEX 5' – GGC CTG GCA AGC CAC GTT TGG TG – 3'
- pAS2-1 5' – TCA TCG GAA GAG AGT AG – 3'
- pACT2 5' – TAC CAC TAC AAT GGA TG – 3'
- pDsRed1-N 5' – GTA CTG GAA CTG GGG GGA CAG – 3'
- pCMV 5' – GAT CCG GTA CTA GAG GAA CTG AAA AAC – 3'

Dieser Primer wurde für die Sequenzierung von pMyc-CMV- und pHA-CMV-Konstrukten benutzt.

PACSIN 2-spezifische Primer

- P2s189 5' – GGT TTT ACA CAT CTG ACC CC – 3'
- P2as306 5' – CAG AAG CTG TCG CTG GAC AC – 3'
- P2s744 5' – AGG AGA AGC TGG CCA TCT CC – 3'
- P2s771 5' – TTG GAT CTG TCC AAT GTG GC – 3'
- P2s1044 5' – CCA TTT ACC GGG AGC TGG AG – 3'

PACSIN 3-spezifische Primer

- P3s70 5' – GGT CCT GGA AGT GAT CTG GA – 3'
- P3as148 5' – CCT CTG GAG CCA TGG TAT CC – 3'
- P3as393 5' – AGT GAA GAA GGC ATG CCA GG – 3'
- P3s398 5' – CTG AGA GGC TGA GCG AGC TG – 3'
- P3s796 5' – ATG GAG GAC ATG GAG CAG GC – 3'
- P3as881 5' – AGG GTG AGC AAG ACA TCC TT – 3'
- P3s1094 5' – CAG ATG AGG TTA CTC TGA CC – 3'
- P3as1120 5' – CAA TGC TGG TCA GAG TAA CC – 3'
- P3as1400 5' – ACA CAT TCT ACG TAA TTG GC – 3'

2.1.8.2 Primer für gerichtete Mutagenesen

Selektionsprimer

- TransSCA 5' – GTG ACT GGT GAG GCC TCA ACC AAG TC – 3'
- TransSCS 5' – CAC TGA CCA CTC CGG AGT TGG TTC AG – 3'
- SelecAflIII 5' – CAG GAA AGA AGA TCT GAG CAA AAG – 3'

Mutationsprimer

PACSIN 1

- PACSIN 1 N364D
5' - GAT GAG AGC GGG GAT CCC TTC GGG GGC - 3'
- PACSIN 1 N376D
5' - CCA ATG GTG GCG CGG ATC CCT TCG AGG - 3'
- PACSIN 1 T86A
3' - GGC GTG GGG GGC CAT GAT GGC CGA AGC AGA TA - 5'
- PACSIN 1 S174A
3' - CAT GAC CCG CGA GAT GAC CGC TAA GAC AGA G - 5'
- PACSIN 1 S345A
3' - GAC CGT GGC AGT GTT GCT AGC TAT GAC CGA GGC - 5'
- PACSIN 1 S358A
3' - ACA TAT GCC ACC GAA TGG GCA GAC GAT GAG AGC - 3'
- PACSIN 1 P434L
5' - GGC CTC TAT CTC GCG AAC TAC GTT G - 3'

PACSIN 2

- PACSIN 2 F364Y
5' - GCT ACA ACC CGT ACG AGG ACG AGG - 3'
- PACSIN 2 F407Y
5' - GTC TAA CAA CCC GTA CTC CTC CAC G - 3'
- PACSIN 2 N417D
5' - GGG GAT TCG GAT CCA TTT GAT GAG - 3'
- PACSIN 2 P478L
5' - GGC CTA TAC CTC GCG AAC TAT GTC G - 3'

PACSIN 3

- PACSIN 3 CDC15Y53A
5' - CAT TGA GAA GGC CGC GGC CCA GCA GCT G - 3'
- PACSIN 3 CDC15H95E
5' - GCT GAG CGA GCT CGA GTT GGA GGT GAG G - 3'
- PACSIN 3 CDC15Q184F
5' - CAT GTC CCA GGA ATT CCT TCG AAA ATT AC - 3'
- PACSIN 3 P415L
5' - ATT GGT CTG TAT CTT GCC AAT TAC - 3'

PAST1

- PAST1 GDP 5' - GAT GAA GGT GTT CTT GCC GGT - 3'
- PAST1 GTP 5' - GCC GGT GCT GAC CTG GCC GAC C - 3'

PAST2

- PAST2 GDP
5' - CTG ATG AAC GTG TTC TTG CCC GTG CTG TAC - 3'
- PAST2 GTP
5' - GTC TTG CCC GTG CTG ACC TGG CCC ACC AGC - 3'

2.1.9 Verbrauchsmaterial

Elektroporationsküvetten

Gene Pulser[®]/E. coli Pulser[™] Cuvette (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) mit 0,1 cm Elektrodenabstand

Kulturschalen

Mikrotiterplatten und Kulturschalen für eukaryotische Zellen wurden in allen Größen von Falcon[®], Becton Dickinson Labware, Plymouth, England bezogen.

Membranen

Immobilon P (PVDF-Membran, Millipore)

Hybond[™] XL (Amersham)

Mikrotiterplatten

96-Loch-Mikrotiterplatten MaxiSorb (Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland)

Kits

Für alle Anwendungen der Kits wurden die beiliegenden Protokolle befolgt und nur die zugehörigen Puffer, Hilfsmittel und Enzyme verwendet.

- ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, USA)
- TaKaRa Ladderman[™] Labeling Kit (TaKaRa Shuzo Co., Ltd., Japan)
- Oligotex-mRNA Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland)
- Transformer[™] Site-Directed Mutagenesis Kit (Clontech)
- MATCHMAKER Two-Hybrid System 2 (Clontech)
- NucleoBond[®] PC 100 (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland)
- QIAquick[™] Gel Extraction Kit (Qiagen)

2.1.10 Geräte

Konfokale Mikroskopie

Leica DM IBRE Mikroskop (Leica Mikroskopie & Systeme GmbH, Wetzlar, Deutschland) mit Leica TCS SP Multi Band Confocal Imaging Spectrophotometer und Argon-Laser für Anregung bei 488 nm, Krypton-Laser für Anregung bei 568 nm. Steuerung über Leica TCS NT Software, Version 1.6.551 (Leica Lasertechnik GmbH, Heidelberg, Deutschland)

DNA-Sequenzierung

ABI Prism 377 Automated Sequencer (Perkin Elmer Applied Biosystems)

Massenspektrometrie

Reflex III MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Inc., Billerica, MA, USA)

ELISA Reader

Multiskan MS (Labsystems, Finnland)

Sterilbank

LaminAir[®] HB 2448 (Heraeus Instruments GmbH, Düsseldorf, Deutschland)

Spannungsgeber für Elektroporation

Gene-Pulser[®] II (Bio-Rad)

Zellsortierung (FACS)

FACSCalibur[™] (Becton Dickinson)

Kühlzentrifugen und Rotoren

Zentrifugen J2-21 (Beckman RIIC LTD Glenrothes, Großbritannien)
J2-HS (Beckman)

Rotoren JA 20 (Beckman)
JS 13.1 (Beckman)

2.1.11 EST-Klone

2.1.11.1 EST-Klone für PACSIN 2

Maus

I.M.A.G.E. Klon-Nr. 373221 (Human Genome Mapping Project-Resource Center, UK HGMP Resource Center)
im pT7T3D-Pac-Vektor

Human

I.M.A.G.E. Klon-Nr. 220502 (Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH, RZPD)
im pT7T3D-Pac-Vektor
I.M.A.G.E. Klon-Nr. 50687 (RZPD)
im Lafmid BA-Vektor

2.1.11.2 EST-Klone für PACSIN 3

Maus

I.M.A.G.E. Klon-Nr. 354625 (UK HGMP Resource Center)
im pT7T3D-Pac-Vektor
I.M.A.G.E. Klon-Nr. 353910 (UK HGMP Resource Center)
im pT7T3D-Pac-Vektor

Human

I.M.A.G.E. Klon-Nr. 610357 (RZPD)
im pBluescript SK(-)-Vektor

2.1.12 Zellkultur-Medien

NIH 3T3 Fibroblasten

Dulbecco's Modified Eagle Mix (Life Technologies)

10% (v/v) FCS (Seromed, Biochrom AG, Berlin, Deutschland)

2% (v/v) Penicillin/Streptomycin (200 U/ml, 0,2 mg/ml, Life Technologies)

1% (v/v) Glutamin (2 mM, Life Technologies)

C2-Myoblasten (Standard-Kulturmedium)

Dulbecco's Modified Eagle Mix (Life Technologies)

20% (v/v) FCS (Seromed, Biochrom AG)

2% (v/v) Penicillin/Streptomycin (200 U/ml, 0,2 mg/ml, Life Technologies)

1% (v/v) Glutamin (2 mM, Life Technologies)

C2-Myoblasten (Differenzierungsmedium)

Dulbecco's Modified Eagle Mix (Life Technologies)

2% (v/v) Pferdeserum (Life Technologies)

2% (v/v) Penicillin/Streptomycin (200 U/ml, 0,2 mg/ml, Life Technologies)

1% (v/v) Glutamin (2 mM, Life Technologies)

2.2 Methoden

Allgemeine Methoden der Molekularbiologie und Proteinchemie wurden nach Standardprotokollen durchgeführt (Harlow und Lane, 1988; Sambrook et al., 1989). Kommerziell erhältliche Kits wurden nach Herstellerangaben unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel eingesetzt.

2.2.1 Computeranalyse

Die Analyse von DNA- und Proteinsequenzen erfolgte mit Hilfe der GCG Software (Genetics Computer Group Wisconsin Package). Sequenzvergleiche mit verschiedenen Datenbanken wurden mit dem BLAST Programm durchgeführt (Altschul et al, 1990, Altschul et al., 1997). Die Analyse der potentiellen Phosphorylierungsstellen erfolgte mit dem Pfscan Programm (ISREC Bioinformatics Group), potentielle coiled coil-Regionen wurden mit den Coil- und Paircoil-Programmen bestimmt (Lupas et al., 1991; Berger et al., 1995). Die Evolutionsanalyse wurde mit dem PHYLIP Software Paket durchgeführt (Felsenstein, 1996).

2.2.2 Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen wurden beim ZMMK-Servicelabor in Auftrag gegeben. Für Sequenzreaktionen wurden entweder universelle Plasmid- oder interne Insert-spezifische Primer in Kombination mit dem ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer Applied Biosystems) verwendet und die Reaktionsprodukte mit einem ABI Prism 377 Automated Sequencer (Perkin Elmer Applied Biosystems) aufgetrennt.

2.2.3 Sondensynthese

cDNA-Fragmente für spezifische Sonden wurden durch Restriktionsverdau isoliert und mit dem TaKaRa Ladderman™ Labelling Kit (TaKaRa Shuzo) unter Verwendung degenerierter Primer mit α -[³²P]-dCTP radioaktiv markiert.

2.2.4 Durchmusterung einer embryonalen Maus-cDNA-Bank

Eine embryonale Maus-cDNA-Bank (Tag 9 p.c.), deren Klone einzeln auf Membranen aufgetragen waren, wurde vom RZPD geordert. Die Hybridisierung erfolgte mit radioaktiv markierten Sonden in Formamid-Mix bei 42°C. Die Filter wurden abschließend 20 min bei 65°C mit 0,1x SSC und 0,1% SDS gewaschen, positive Klone durch Autoradiographie ermittelt und vom RZPD bezogen.

2.2.5 RNA-Präparation

Für die Isolation von Poly(A)⁺-RNA wurden frisch präparierte Gewebe in GIT-Puffer homogenisiert, die RNA mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) aufgereinigt und mit NaAc (pH 4,8) und Isopropanol gefällt. Aus dieser RNA wurde mit Hilfe des Oligotex-mRNA Kits (Qiagen) die mRNA isoliert.

2.2.6 Northern Blot

Pro Gewebe wurden 5 µg Poly(A)⁺-RNA auf einem 1% Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt und mittels Kapillartransfer auf Hybond XL-Membran (Amersham) transferiert. Die Umsetzung mit spezifischen, radioaktiv markierten Sonden erfolgte in Formamid-Mix bei 42°C. Als Kontrolle für die gleichmäßige Beladung des Gels wurde die RNA vor dem Transfer mit Ethidiumbromid gefärbt. Die Unversehrtheit der RNA wurde durch eine Kontroll-Umsetzung der Membran mit einer spezifischen Sonde für GAPDH überprüft.

2.2.7 Human RNA Master Blot

Der Human RNA Master Blot (Clontech) wurde nach Herstellerangaben mit spezifischen, radioaktiv markierten Sonden umgesetzt und die Signale durch Autoradiographie detektiert.

2.2.8 Gerichtete Einführung von Punktmutationen

Mit Hilfe des Transformer[™] Site-Directed Mutagenesis Kits (Clontech) werden *in vitro* gezielt Punktmutationen in eine bekannte Sequenz eingeführt (Abb. 15). Diese kann in jeden beliebigen doppelsträngigen Vektor inseriert sein, solange das Konstrukt eine singuläre Schnittstelle außerhalb der Insert-Sequenz besitzt.

Die Mutagenese wird mit einem Primerpaar aus einem Mutationsprimer und einem Selektionsprimer durchgeführt. Der Mutationsprimer führt die gewünschte Mutation in das Insert ein, der Selektionsprimer verändert die singuläre Schnittstelle des Vektors so, daß sie vom jeweiligen Restriktionsenzym nicht mehr geschnitten werden kann.

Nach Anlagerung der beiden Primer an die Einzelstränge der denaturierten Plasmide werden ausgehend von diesen Startpunkten die komplementären Stränge synthetisiert. Durch Restriktionsverdau mit dem Selektionsenzym werden alle Plasmide linearisiert, die nicht die Sequenz des Selektionsprimers enthalten, wodurch diese bei der nachfolgenden Transformation wesentlich schlechter aufgenommen werden. In diesem Schritt wird ein *mutS*-Bakterienstamm verwendet, da dieser nicht in der Lage ist, die durch die Primer eingeführten Fehlpaarungen zu reparieren.

Während der Replikation der Plasmide bei der Zellteilung der Bakterien entstehen Plasmide, die wieder die Ursprungssequenz enthalten, und Plasmide, in denen zumindest die Mutation der Schnittstelle in beiden Strängen vorliegt.

Nach der Isolation der Plasmide erhält man ein Gemisch beider Vektoren. Um gezielt die Plasmide zu vermehren, die die Mutation der Selektionsschnittstelle tragen, aber gleichzeitig eventuell während der Replikation auftretende Basenfehlpaarungen reparieren zu können, werden die Plasmide nach einem erneuten Verdau mit dem Selektionsenzym in den *E. coli*-Stamm DH5α transformiert, wobei auch hier die linearisierten Vektoren wesentlich schlechter aufgenommen werden. Nach dieser Transformation werden aus einzelnen Kolonien die Plasmid-DNA isoliert und anschließend zur Bestimmung der positiven Klone das Vorhandensein der gewünschten Mutation im Insert getestet.

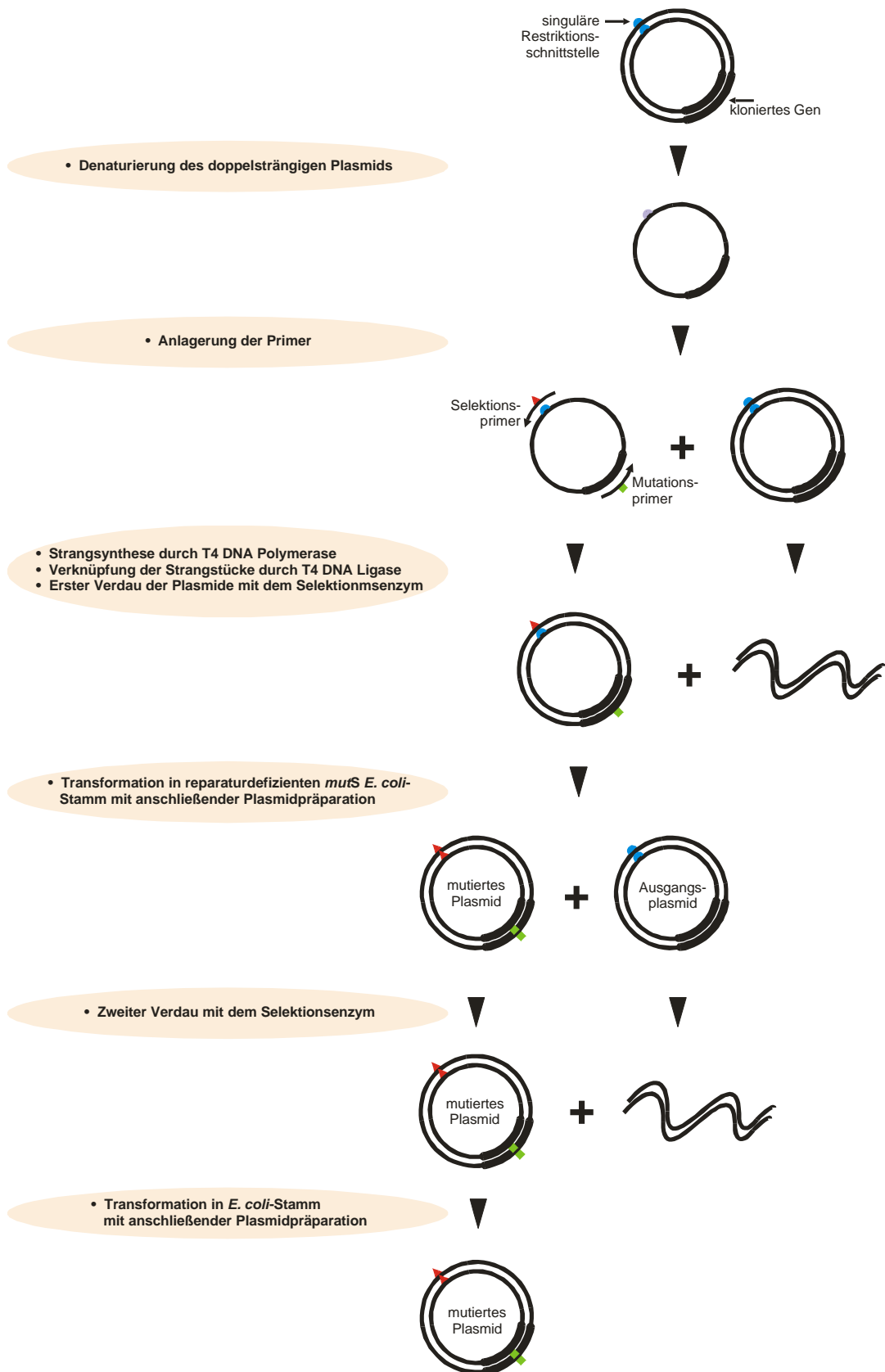


Abb. 15. Flußdiagramm zum Ablauf einer Mutagenese mit dem Transformer™ Site-Directed Mutagenesis Kit. Das Diagramm wurde abgeändert aus dem Katalog der Firma Clontech übernommen.

2.2.9 Antiseren und Affinitätsreinigung

Die codierenden Bereiche von Maus-PACSIN 2 und 3 wurden im durchgehenden Leseraster hinter GST in pGEX-Vektoren (Pharmacia, pGEX-2T für PACSIN 2 und pGEX-3X für PACSIN 3) kloniert, wodurch die bakterielle Expression von GST-PACSIN-Fusionsproteinen ermöglicht wurde. Die Fusionsproteine wurden nach Herstellerangaben aufgereinigt, je 500 µg für die Immunisierung von Kaninchen verwendet (Pineda) und die Antiseren nach 61 Tagen Immunisierungszeit entnommen.

Da die Antiseren im Western Blot eine Kreuzreaktivität gegen die anderen Isoformen der PACSIN-Proteinfamilie zeigten (Abb. 23), wurden die Antiseren affinitätsgereinigt. Dazu wurden GST-PACSIN-Fusionsproteine aller drei Isoformen bakteriell exprimiert und jeweils kovalent an BrCN-Sepharose gebunden. Über aus diesen Matrices gefertigte Affinitätssäulen wurden die einzelnen Antiseren aufgereinigt, indem zunächst aus jedem Antiserum die Antikörper, die auch die anderen Isoformen erkannten, auf Säulen für diese Isoformen abgereichert und die Isoform-spezifischen Antikörper aus dem Durchfluß an eine Affinitätssäule der jeweiligen Isoform gebunden wurden. Von diesen Säulen konnten die

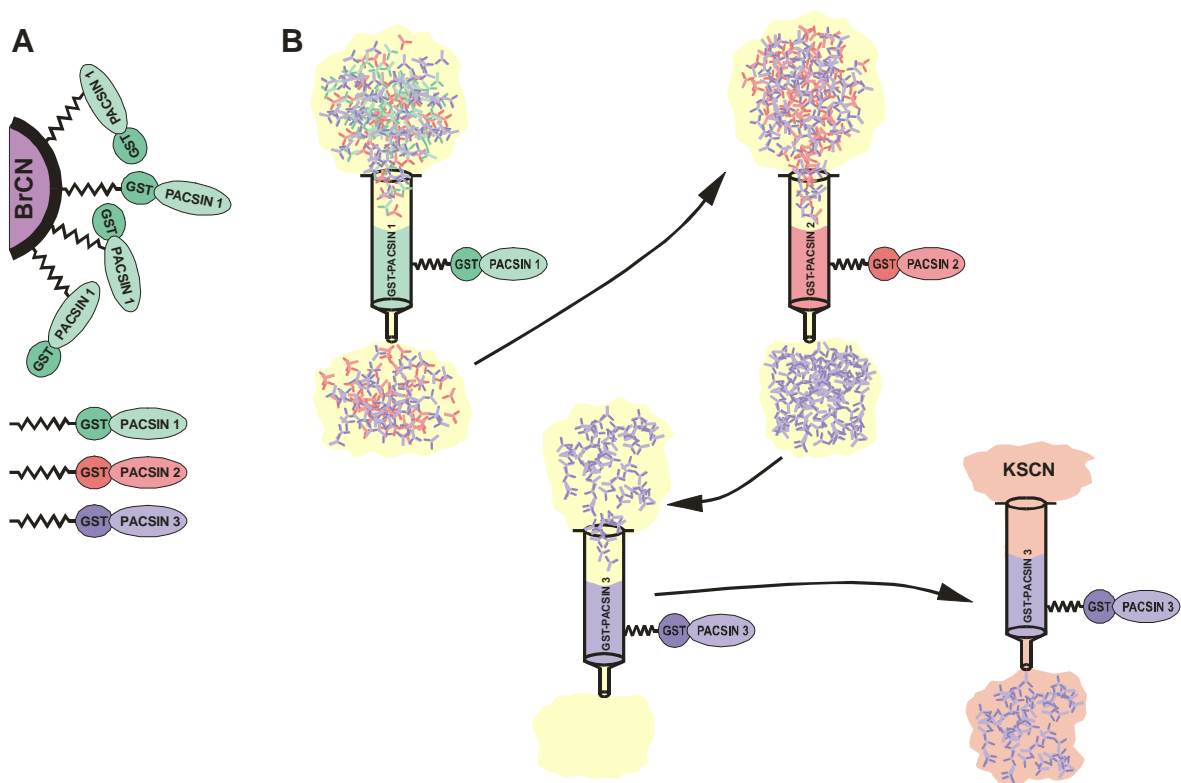


Abb. 16. (A) Schematische Darstellung des an BrCN-Sepharose kovalent gekoppelten GST-PACSIN 1 (grün). In parallelen Ansätzen wurden auch GST-PACSIN 2 (rot) und GST-PACSIN 3 (blau) an BrCN-Sepharose gekoppelt. (B) Schematische Darstellung der Affinitätsreinigung am Beispiel des Antiserums gegen PACSIN 3. Mit den an BrCN-Sepharose gekoppelten GST-PACSIN-Isoformen wurden Affinitätssäulen gegossen und mit der GST-PACSIN 1- (grün) und GST-PACSIN 2- (rot) Säule wurden aus dem ungereinigten Antiserum gegen GST-PACSIN 3 zunächst die Antikörper gegen diese beiden Isoformen abgereichert und die GST-PACSIN 3-spezifischen Antikörper (blau) an eine GST-PACSIN 3-Säule (blau) gebunden. Von dieser Säule wurden die GST-PACSIN 3-spezifischen Antikörper mit chaotropen Salz (KSCN) eluiert.

Isoform-spezifischen Antikörper durch chaotropes KSCN eluiert werden (Abb. 16). Zur längeren Aufbewahrung wurden die gereinigten Antiseren mit 50% Glycerol versetzt und bei -20°C gelagert.

2.2.10 Massenspektrometrie

Die MALDI-MS-Analysen wurden vom ZMMK-ServiceLabor durchgeführt. Jeweils 3 pmol Protein in 10 mM Glutathion und 50 mM Tris/HCl (pH 8,0) wurden mit BSA als externem Standard vermessen.

2.2.11 Immunhistochemie (IH)

Sagittale Paraffinschnitte von adultem Rattenhirn wurden mit Xylol entparaffiniert, nach einer absteigenden Isopropanolreihe (100-50%) in Wasser überführt und mit IH-Puffer gewaschen. Endogene Peroxidase wurde durch 20 min Inkubation mit 3% H_2O_2 inaktiviert und die Schnitte 20 min mit 30% FCS und 1% BSA in IH-Puffer blockiert. Die Antikörperinkubationen erfolgten in IH-Puffer mit 1% BSA in einer feuchten Kammer. Die Erstantikörper wurden über Nacht bei 4°C , der HRP-gekoppelte Zweitantikörper für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert, wobei die Inkubationen durch zwei 10 min Waschschrte in IH-Puffer getrennt waren. Gebundene Antikörper wurden mit DAB detektiert und nachfolgend die Zellkerne mit Hämalaun markiert. Abschließend wurden die Schnitte mit Glycerin-Gelatine eingedeckt.

2.2.12 Affinitätspräzipitation

Mit Hilfe immobilisierter Proteine werden deren Bindungspartner aus einem Proteingemisch isoliert und per Western Blot-Analyse identifiziert. Allen Protein-Präparationen wurden Protease-Inhibitoren zugegeben, präparative Arbeitsschritte wurden auf Eis und Inkubationen bei 4°C durchgeführt.

Bindungspartner wurden entweder aus transfizierten Zellen oder aus Geweben mittels Affinitätspräzipitation isoliert. Transfizierte Zellen wurden geerntet, in Pull Down (PD)-Puffer mit 0,1% (v/v) Triton X-100 resuspendiert und durch Ultraschall aufgeschlossen. Zellfragmente wurden durch 30 min Zentrifugation bei 4°C und 21000x g pelletiert und der Überstand für die Präzipitation verwendet. Gewebe wurden in PD-Puffer mit 1% (w/v) CHAPS mit einem Braun Homogenisator aufgeschlossen (2,5 ml Puffer/g Gewebe) und Gewebsfragmente durch 30 min Zentrifugation bei 4°C und 21000x g abgetrennt. Der Überstand wurde abgenommen und erneut zentrifugiert. Diesem Überstand wurde Triton X-100 bis zu einer Endkonzentration von 0,05% (v/v) zugegeben und die Lösung 24 h gegen PD-Puffer dialysiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand für die Präzipitation verwendet.

GST-Fusionsproteine sowie GST als Kontrolle wurden nach Herstellerprotokoll aufgereinigt und an der Glutathion-Sepharose 4B belassen. Diese Matrices wurden über Nacht mit den Protein-Präparationen rotierend inkubiert und nachfolgend ausgiebigst mit PD-Puffer mit

0,1% (v/v) Triton X-100 gewaschen. Anschließend wurden die Matrizes in 2x SDS-Probenpuffer aufgenommen, erhitzt und die Proteingemische durch SDS-PAGE in einem Acrylamidgel mit einem Gradienten von 10-15% aufgetrennt. Mittels Western Blot wurden die Proteine auf PVDF-Membran transferiert und die präzipitierten Proteine mit spezifischen Antikörpern und Chemielumineszenz nachgewiesen.

2.2.13 Enzym-gekoppelter Immunnachweis (ELISA)

Jeweils 200 µg GST und GST-PACSIN-Fusionsproteine wurden mit 10% (v/v) frisch angesetzter Biotin-X-NHS-Lösung 1 h inkubiert, die Biotinylierung durch Zugabe von Ammoniumchlorid bis zu einer Endkonzentration von 10 mM und 15 min Inkubation gestoppt und die biotinylierten Proteine 24 h gegen TBS dialysiert.

Alle Inkubationen erfolgten in einer feuchten Kammer, für alle Waschschritte wurde TBS und für alle Inkubationslösungen TBS mit 3% (w/v) BSA verwendet. 96-Loch-Mikrotiterplatten wurden zwei Stunden mit 100 µl/Loch der GST-PACSIN-Proteine (20 µg/ml in TBS) beschichtet und freie Bindungsstellen über Nacht mit 200 µl/Loch einer 3% (w/v) BSA-haltigen TBS-Lösung blockiert. Überschüssige Proteine wurden ausgewaschen und jeweils 100 µl/Loch der biotinylierten GST-Proteine mit 3, 5, bzw. 7 µg/ml für 1 h zugegeben. Nach erneutem Waschen wurden gebundene Proteine mit einem Streptavidin-Peroxidase-Komplex, der Tetramethylbenzidin umsetzt, nachgewiesen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 µl 20% (v/v) H₂SO₄ pro Loch gestoppt und die Extinktionen bei 450 nm in einem ELISA-Reader gemessen.

2.2.14 Hefe Two-Hybrid System

Zur Identifikation neuer Bindungspartner von PACSIN 2 und 3 wurde das Matchmaker 2 Two-Hybrid System (Clontech) verwendet. Es basiert auf der Eigenschaft des Gal4-Transkriptionsfaktors in Hefe auch dann die Transkription von Genen zu ermöglichen, wenn seine Aktivierungs- und DNA-bindende Domäne lediglich in räumliche Nähe zueinander kommen, ohne direkt miteinander verbunden zu sein. Der codierende cDNA-Bereich des Proteins, für das neue Bindungspartner gefunden werden sollen, in diesem Fall PACSIN 2 und 3, wird mit durchgehendem Leseraster hinter die DNA-Bindungsdomäne des Gal4-Transkriptionsfaktors in den pAS2-1-Vektor kloniert und in den Hefestamm Y190 transformiert. In diese Hefen werden anschließend die einzelnen Klone einer Maus-Hirn MATCHMAKER cDNA-Bank (Clontech) transformiert, die in den pACT2-Vektor mit durchgehendem Leseraster hinter die Aktivierungsdomäne des Gal4-Transkriptionsfaktors kloniert sind. Interagieren die beiden Fusionsproteine in der Zelle, wird der Gal4-Transkriptionsfaktor aktiv und ermöglicht die Transkription einiger Reportergene, mit deren Hilfe Cotransformanten mit interagierenden Proteinen auf Selektionsmedien isoliert und getestet werden können. Dies ist möglich, da im Genom des Hefestamms Y190 einige Gene verändert wurden. So fehlen die Gene für die Synthese der Aminosäuren Leucin und Tryptophan, die jeweils auf einem der Plasmide codiert werden und so die Isolation von

Cotransformanten auf Medien ohne diese Aminosäuren ermöglichen. Zusätzlich wurde im dem Hefe-Stamm die Histidinsynthese und die Expression des β -Galaktosidase (β -Gal)-Gens unter die Regulation des Gal4-Transkriptionsfaktors gestellt, so daß nur Hefen mit interagierenden Proteinen auf Medien ohne Histidin wachsen und X-Gal umsetzen können. Hefen mit potentiellen Bindungspartnern können so über das Wachstum auf Medien ohne Histidin sowie über eine Blaufärbung selektioniert werden. Aus positiven Klonen wurde die Plasmid-DNA isoliert und in elektrokompetente Bakterien transformiert, die nach erneuter DNA-Isolation den nötigen Reinheitsgrad für eine Sequenzanalyse besaß.

2.2.15 Immunpräzipitation

Transfizierte Zellen wurden in HBS-Puffer mit 0,1% Triton-X100 durch Ultraschall lysiert und Zellfragmente durch Zentrifugation entfernt. Der proteinhaltige Überstand wurde je Ansatz mit 1 μ g Antikörper und 10 μ l Protein G- oder Protein A-Agarose für vier Stunden bei 4°C inkubiert. Nach mehreren Waschschritten mit HBS-Puffer mit 0,1% Triton-X100 wurden die Präzipitate durch SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot analysiert.

2.2.16 in vitro-Phosphorylierung

GST-Fusionsproteine der verschiedenen PACSIN 1-Varianten sowie GST als Kontrolle wurden nach Herstellerangaben aufgereinigt. Pro Einzelansatz wurden 200 ng GST-Fusionsprotein und 0,5 μ l der Kinase verwendet. Alle Inkubation erfolgten bei 30°C für 30 min bei den konventionellen PKCs und CK2, bzw. für 10 min bei PKC ζ . Die Reaktionsansätze wurden nachfolgend durch SDS-PAGE aufgetrennt, das Acrylamidgel getrocknet und exponiert.

2.2.17 Zellkultur

Alle Arbeiten in der Zellkultur wurden unter einer Sterilbank durchgeführt. Glasgeräte wurden vor Gebrauch autoklaviert, Kunststoffmaterialien waren steril verpackt und wurden nach einmaligem Gebrauch entsorgt. Lösungen und Puffer wurden entweder durch Autoklavieren oder Filtrieren sterilisiert.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einer wassergesättigten Atmosphäre bei 37°C und 5% CO₂. Jede Zelllinie wurde in dem für sie idealen Medium mit Zusätzen in entsprechenden Konzentrationen kultiviert, für das Ablösen der Zellen wurde Trypsin/EDTA verwendet.

2.2.17.1 Transfektionen

Für die Transfektion in einer 6-Loch-Mikrotiterplatte wurden pro Loch 2 ml Kulturmedium, 2 μ g DNA und 6 μ l FuGENE 6 (Roche) verwendet, wobei das vom Hersteller angegebene Standardprotokoll befolgt wurde. Die Zellen besaßen zum Zeitpunkt der Transfektion eine Dichte von 40-80%.

2.2.17.2 Immunfluoreszenz

Für Immunfluoreszenz-Analysen wurden die Zellen auf runden Deckgläschen mit einem Durchmesser von 12 mm ausplattiert und gegebenenfalls transfiziert. Nach der gewünschten Inkubationszeit wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, 10 min mit 2% (w/v) Paraformaldehyd in PBS fixiert und 1 min mit 0,2% (v/v) Triton X-100 in PBS permeabilisiert. Alle Antikörper-Inkubationen und Waschschrte wurden mit 0,02% (v/v) Triton X-100 in PBS durchgeführt. Erstantikörper wurden in geeigneten Verdünnungen 1 Stunde inkubiert und die Zellen daraufhin dreimal 5 min gewaschen. Die einstündige Inkubation der Zweitantikörper und die drei nachfolgenden Waschschrte wurden aufgrund der lichtempfindlichen Fluoreszenz-Markierung der Antikörper im Dunkeln durchgeführt. Abschließend wurden die Zellen zweimal mit deionisiertem Wasser gewaschen und die Deckgläschen mit DAKO Mounting Medium eingedeckt. Die Analyse der Färbungen erfolgte mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie (Leica).

2.2.17.3 *In vitro*-Differenzierung von C2-Myoblasten

C2-Myoblasten wurden in Standard-Kulturmedium gehalten, wobei das Medium alle 24 h gewechselt und die Zellen alle 3-4 Tage paßagiert wurden. Für die Differenzierung zu Myotuben wurden die Zellen mit einer Dichte von ca. 20% ausplattiert und am darauffolgenden Tag das Medium durch Differenzierungsmedium ersetzt, das während der nächsten 3 Tage ebenfalls alle 24 h gewechselt wurde.

Sollten differenzierte C2-Myotuben für Immunfluoreszenz-Analysen verwendet werden, wurden Deckgläschen zunächst 2 h mit Laminin-1 aus Maus (20 µg/ml in PBS), dann 1,5 h mit 10% (v/v) FCS in PBS beschichtet und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Auf den so vorbehandelten Deckgläschen wurden die C2-Myoblasten in Standard-Kulturmedium ausplattiert und wie oben beschrieben differenziert.

2.2.17.4 Endocytose-Assay

Analyse mittels konfokaler Mikroskopie

Die auf Deckgläschen ausplattierten Zellen wurden 48 h nach Transfektion 20 min in serumfreiem Medium inkubiert, gefolgt von einer 30 min Inkubation in Medium mit 5% (v/v) FCS und 25 µg/ml Biotin-gekoppeltem Transferrin (Sigma). Anschließend wurden die Zellen dreimal mit HBS gewaschen, 15 min mit 3% (w/v) Paraformaldehyd in HBS fixiert und 1 min mit 0,2% (v/v) Triton X-100 in HBS permeabilisiert. Alle weiteren Schritte wurden in HBS durchgeführt. Die transfizierten Proteine wurden durch eine Kombination aus Erst- und fluoreszenzmarkiertem Zweitantikörper, das aufgenommene Transferrin durch fluoreszenzmarkiertes Extravidin (Sigma) nachgewiesen. Die Analyse der Färbungen erfolgte mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie, wobei jeweils acht Ebenen 8 x gescannt und die Einzelbilder im Extended Focus Mode übereinander gelegt wurden.

Analyse mittels FACS (Fluorescence Associated Cell Sorting)

Die transfizierten Zellen wurden wie oben beschrieben mit FITC-gekoppeltem Transferrin (Sigma) markiert, dreimal mit HBS gewaschen, trypsiniert und in HBS aufgenommen. Pro Messung wurden $5-10 \times 10^3$ Zellen verwendet und die Fluoreszenz mit einem FACSCalibur (Becton Dickinson) ausgewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Isolierung neuer PACSIN-Isoformen

Durch das ebenfalls neurospezifische Ratten-Homolog von PACSIN 1, Syndapin I, besteht für PACSIN 1 eine mögliche Verbindung zum Vesikeltransport. Für nahezu alle an der kompensatorischen, Clathrin-vermittelten Endocytose beteiligten Proteine gibt es entweder Spleißvarianten oder weitere Isoformen, die sich nicht auf eine neuronale Expression beschränken und vergleichbare Funktionen in nicht-neuronalen Zellen erfüllen. Um diese Möglichkeit auch für PACSIN 1 zu testen, sollte versucht werden, weitere PACSIN-Isoformen zu isolieren und gegebenenfalls zu charakterisieren.

Bei Sequenzvergleichen von PACSIN 1 gegen verschiedene Datenbanken zeigte sich, daß sowohl Maus- als auch humane EST-Klone existieren, die zwar eine hohe Homologie zu PACSIN 1 aufweisen, aufgrund der Abweichungen in der Sequenz aber nicht PACSIN 1 selbst sein können. Die Maus-EST-Klone dieser potentiellen neuen Isoformen wurden vom UK HGMP Resource Center, die humanen EST-Klone vom RZPD bezogen. Nach Sequenzanalyse konnten sowohl die Maus- als auch die humanen Klone zwei weiteren PACSIN-Isoformen, PACSIN 2 und 3, zugeordnet werden.

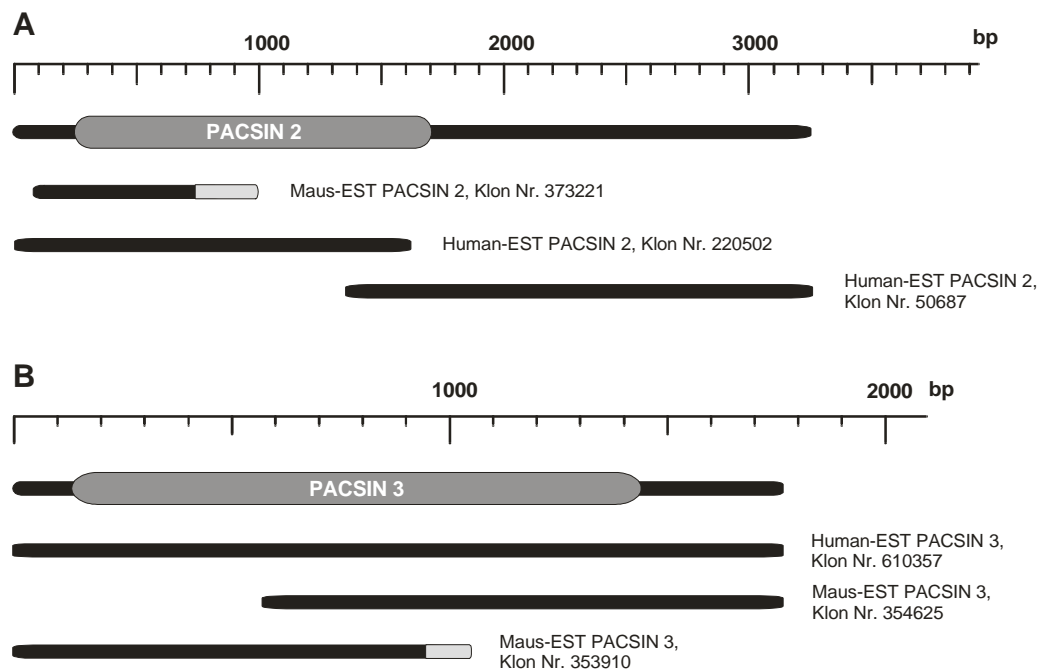


Abb. 17. Vergleich der EST-Klone aus Maus und Mensch für PACSIN 2 und 3 gegen die Gesamt-cDNAs. Die schematische Darstellung von PACSIN 2 und 3 repräsentiert sowohl die humane Isoform als auch die aus Maus, die offenen Leseraster sind grau hervorgehoben. Grau dargestellte Bereiche der Klone 373221 und 353910 verdeutlichen die Bereiche, in denen die PACSIN-spezifische Sequenz abbricht und keine Homologie zu den PACSIN-Isoformen mehr besteht.

Während beim humanen PACSIN 3 das gesamte offene Leseraster in einem EST-Klon (Klon Nr. 610357) vorhanden war, mußten die anderen Isoformen erst durch die Kombination verschiedener EST-Klone komplementiert werden. So wurden für Maus PACSIN 3 (Klone Nr. 354625 und 353910) und das humane PACSIN 2 (Klone Nr. 220502 und 50687) jeweils zwei EST-Klone kombiniert. Für PACSIN 2 aus Maus war nur ein EST-Klon (Klon Nr. 373221) zugänglich, der lediglich das 5'-Ende der PACSIN 2 cDNA enthielt (Abb. 17).

Aus diesem Grund wurde mit dem spezifischen cDNA-Fragment aus dem Maus-EST-Klon für PACSIN 2 eine vom RZPD bezogene cDNA-Bank aus Maus-Embryonen (Tag 9 p.c.) radioaktiv hybridisiert und die positiven Klone vom RZPD bezogen. Durch Sequenzanalyse dieser Klone konnte das gesamte offene Leseraster in einem Klon identifiziert werden, so daß keine weiteren Klonierungsschritte nötig waren.

3.1.1 Sequenzanalyse der neuen PACSIN-Isoformen

Analyse der cDNA-Sequenz

Eine Analyse der cDNA-Sequenzen zeigte, daß jeweils das erste ATG im durchgehenden Leseraster der neuen Isoformen den von Kozak (1991) definierten Ansprüchen an einen Translationsstartpunkt erfüllen. Ein weiteres Indiz für die Benutzung dieser Translationsstartpunkte sind die im gleichen Leseraster in der 5'-untranslatierten Region (UTR) lokalisierten Stop-Codons, wobei in den PACSIN 2-Isoformen jeweils zwei vorhanden sind, bei den PACSIN 3-Isoformen jeweils ein Stop-Codon vorkommt. Jedes Leseraster wird durch ein TGA-Stop-Codon terminiert, dem in der 3'-UTR mindestens ein potentielles Polyadenylierungssignal folgt. Ein Vergleich der genauen Sequenzpositionen der verschiedenen Isoformen ist in Tab. 5 zusammengefaßt, die vollständigen cDNA- und Proteinsequenzen der beiden neuen Isoformen in Maus und Mensch sind im Anhang enthalten.

	PACSIN 2		PACSIN 3	
	Maus	Human	Maus	Human
Länge cDNA (nt)	3217	3255	1767	1825
Position 5'-UTR Stop Codon (nt)	116-118 209-211	59-61 173-175	76-78	70-72
codierender Bereich (nt)	251-1711	209-1669	130-1404	152-1426
Länge des codierten Proteins (AS)	486		424	
potentielles Polyadenylierungssignal (nt)	3179-3184	3232-3237	1740-1745 1756-1761	1793-1798
Genbankeintrag unter	AF128535	AF128536	AF149824	AF149825

Tab. 5. Vergleich wichtiger Sequenzbereiche in den humanen und Maus-cDNAs für PACSIN 2 und 3. Zusätzlich sind die Identifikationsnummern angegeben, unter denen die Isoformen in der Genbank eingetragen sind.

Analyse der Protein-Sequenz

Eine Analyse der von diesen cDNAs abgeleiteten Proteinsequenzen der beiden neuen Isoformen zeigt, daß alle PACSINE eine identische Domänenstruktur besitzen (Abb. 18). Der N-terminale Bereich der Proteine besteht aus einer CDC15-NT-Domäne unbekannter Funktion (PROSITE Datenbank, Bucher und Bairoch, 1994), die laut Sequenzanalyse mit den Coil- und Paircoil-Programmen einen potentiellen coiled-coil Bereich einschließt (Lupas et al., 1991; Berger et al., 1995). Die C-terminale SH3-Domäne ist ebenso wie die CDC15-NT-Domäne in allen Isoformen hoch konserviert. In den weniger stark konservierten variablen Bereichen zwischen den beiden Domänen lassen sich bei den einzelnen Isoformen unterschiedliche Bindungsmotive lokalisieren. Spezifisch für PACSIN 1 befindet sich in diesem Bereich eine Bindungsstelle, die eine phosphorylierungsabhängige Interaktion mit 14-3-3-Proteinen ermöglicht (Muslin et al., 1996), zusätzlich codiert der Bereich zwei NPF-Motive, die Bindungsmotive für EH-Domänen darstellen (Salcini et al., 1997). Bei PACSIN 2 sind drei solcher Bindungsstellen vorhanden, wobei das im Vergleich zu PACSIN 1 zusätzlich vorhandene NPF-Motiv von einem zusätzlichen, PACSIN 2-spezifischen Exon codiert wird (M. Plomann, persönliche Mitteilung). PACSIN 3 enthält in diesem Bereich hingegen keine NPF-Motive, sondern ein Prolin-reiches Motiv, das eine Bindung anderer SH3-Domänen ermöglichen könnte (Cohen et al., 1995).

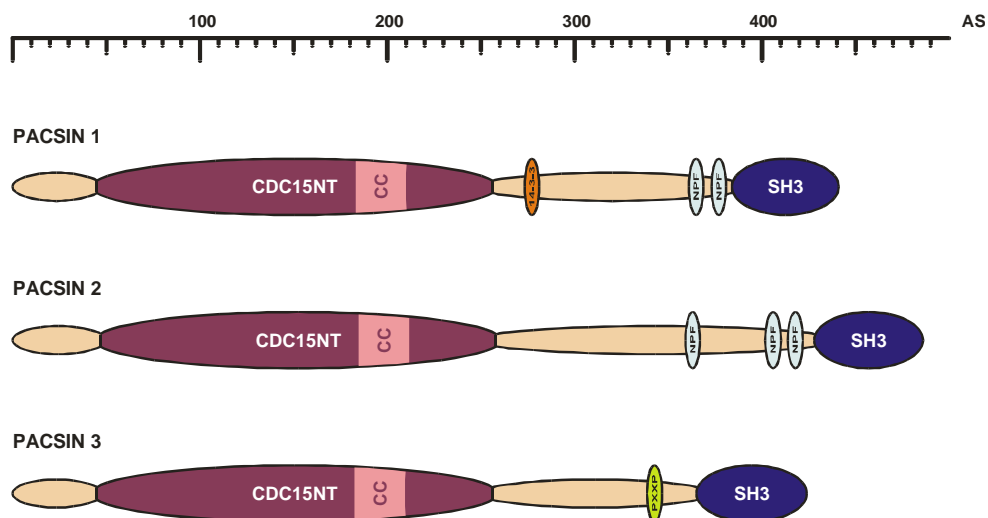


Abb. 18. Vergleich der Domänenstruktur der verschiedenen PACSIN-Isoformen. Die N-terminale CDC15-NT- und die C-terminale SH3-Domäne sind als abgegrenzte Bereiche dargestellt. Der Bereich der potentiellen coiled-coil Region (CC) innerhalb der CDC15-NT-Domäne ist hell hervorgehoben. In den zwischen den Domänen liegenden variablen Regionen sind sowohl die PACSIN 1-spezifische 14-3-3-Bindungsstelle, die NPF-Motive als auch das Prolin-reiche Motiv hervorgehoben.

Vergleicht man die Proteinsequenzen der Isoformen und Spezies miteinander, erkennt man auch dort die starke Konservierung zwischen den Proteinen in den Bereichen der CDC15-NT- und SH3-Domänen, während die variablen Bereiche zwischen diesen Domänen die stärkste Divergenz aufweisen (Abb. 19). Die für PACSIN 1 aufgeführte humane Sequenz wurde von Sumoy und Mitarbeitern (2001) veröffentlicht (Genbankeintrag AF 242529).

hPACSIN 1	1	MSSSYDEASLAPETTTDSFWEVGNKRTVVKRIDDGHRLCNDLMNCVQERAKIEKAYAQQLTD
mPACSIN 1	1	MSGSYDEAS...EELTDSFWEVGNKRTVVKRIDDGHRLCNDLMSCVQERAKIEKAYAQQLTD
hPACSIN 2	1	MSVTYDD.SVGVEVSSDSFWEVGNKRTVVKRIDDGHRLCSDLMNCLHERARIEKAYAQQLTE
mPACSIN 2	1	MSVTYDD.SVGVEVSSDSFWEVGNKRTVVKRIDDGHRLCGDLMNCLHERARIEKAYAQQLTE
hPACSIN 3	1	~~~MAPEEDAGGELGGSFWEAGNYRRTVQRVEDGHRLCGDLVSCFQERARIEKAYAQQLAD
mPACSIN 3	1	~~~MAPEEDAGGELGGSFWEAGNYRRTVQRVEDGHRLCGDLVSCFQERARIEKAYAQQLAD
hPACSIN 1	63	WAKRWRQLIEKGPQYGSLERAWGAIMTEADKVSLEHQEVKNNLLNEDLEKVKNWQKDAMHKQ
mPACSIN 1	60	WAKRWRQLIEKGPQYGSLERAWGAMMTEADKVSLEHQEVKNSLLNEDLEKVKNWQKDAMHKQ
hPACSIN 2	62	WARRWRQLVEKGPQYGTVEKAWMAFMSEAEVSELHLEVKASLMNDDFEKIKNWQKEAFHKQ
mPACSIN 2	62	WARRWRQLVEKGPQYGTVEKAWIAVMSEAEVSELHLEVKASLMNDDFEKIKNWQKEAFHKQ
hPACSIN 3	60	WARKWRGTVEKGPQYGTLEKAWHAFFTAERLSALHLEVREKLGQGDSEVRVRAWQRGAFHPR
mPACSIN 3	60	WARKWRGAVEKGPQYGTLEKAWHAFFTAERLSSELHLEVREKLGHPDSEVRVTWQRGAFHPR
hPACSIN 1	125	IMGGFKETKEAEDGFRKAQKPWAKMKLEAAKKAYHLACKEEKLAMTREMNSKTEQSVTPE
mPACSIN 1	122	IMGGFKETKEAEDGFRKAQKPWAKMKLEAAKKAYHLACKEERLAMTREMNSKTEQSVTPE
hPACSIN 2	124	MMGGFKETKEAEDGFRKAQKPWAKKLKEVEAAKKAHHAACKEEKLAI SREANSKADPSFNPE
mPACSIN 2	124	MMGGFKETKEAEDGFRKAQKPWAKKLKEVEAAKKAHHTACKEEKLAI SREANSKADPSLNPE
hPACSIN 3	122	VLGGFRE SRAAEDGFRKAQKPWLKRLKEVEASKKSYHAARKDEKTAQTRESHAKADSAVSQE
mPACSIN 3	122	VLGGFRE SRAAEDGFRKAQKPWLKRLKEVEASKKSYHTARKDEKTAQTRESHAKADSSMSQE
hPACSIN 1	187	QKKLQDKVDKCKQDVQKTQEKYEKVLLEDVGGKTTPOYMENMEQVFEQCQQFEKRLVFLKEV
mPACSIN 1	184	QKKLVDKVDKCRQDVQKTQEKYEKVLLEDVGGKTTPOYMEGMEQVFEQCQQFEKRLVFLKEV
hPACSIN 2	186	QLKKLQDKIEKCKQDVLKTKEKYEKSLKELDQGTPOYMENMEQVFEQCQQFEKRLRFREEV
mPACSIN 2	186	QLKKLQDKIEKCKQDVLKTKDKYEKSLKELDQTTPOYMENMEQVFEQCQQFEKRLRFREEV
hPACSIN 3	184	QLRKLQERVERCAKEAEKTKAQYEQTLAELHRYTPRYMEDMEQAFETCQAAERQLLFFKDM
mPACSIN 3	184	QLRKLQERVGRCTKEAEKMKTOYEQTLAELNRYTPRYMEDMEQAFESCQAAERQLLFFKDV
hPACSIN 1	249	LLDIKRHLNLAENSSYIHVYRELEQAIRGADAQEDLRWFRSTSGPGMPMNWPQFEENPDLIP
mPACSIN 1	246	LLDIKRHLNLAENSSYMHVYRELEQAIRGADAQEDLRWFRSTSGPGMPMNWPQFEENPDLIP
hPACSIN 2	248	LLEVQKHLNLSNVAGYKAIYHDLQSIRAADAVEDLRWFRANHGPGMAMNWPQFEESADLI
mPACSIN 2	248	LLEVQKHLNLSNVASYKTIYRELEQSIKAADAVEDLRWFRANHGPGMAMNWPQFEESADLN
hPACSIN 3	246	LLTLHQHLDLSSSEKFHELHRDLHQGLEAASDEEDLRWWRSTHGPGMAMNWPQFEESLDTQ
mPACSIN 3	246	LLTLHQHLDLSSSDKFHELHRDLQOSIEAASDEEDLRWWRSTHGPGMAMNWPQFEESLDTQ
hPACSIN 1	311	HTTKKEKQPKKAEQVALT...NATG.....AVESTSQAG.....DR
mPACSIN 1	308	HTTAKKEKQPKKAEQATLS...NATG.....AVESTSQAG.....DR
hPACSIN 2	310	RTL SRREKK.KATDGETLTGINQTGDQFLPSKPSSTLNVPSNPAQSAQSSYNPFEDDDT
mPACSIN 2	310	RTL SRREKK.KAVDGVTLTGINQTGDQSGQNKPGSNLSVPSNPAQSTQLQSSYNPFEDDDT
hPACSIN 3	308	RTISRKEKGGSPDEVTLTSLI.....VPTRDGTAPPQSPGSPGTGQDE.
mPACSIN 3	308	RAISRKEKGGSPDEVTLTSLI.....VPTRDGTAPPQSPSSPGSGQDE.
hPACSIN 1	345	GS.....VSSYDRGQPYATEWSSDES GNPF GGSETNGGANPFEDDSKG...VVRV
mPACSIN 1	342	GS.....VSSYDRGQTYATEWSSDES GNPF GGNEANGGANPFEDDAKG...VVRV
hPACSIN 2	371	GSTVSEKEDIKAKNVSSYEKTSYPTDWSDDESNNPFSSTDANGDSNPFDDATSGTEVVRV
mPACSIN 2	371	GSSISEKEDIKAKNVSSYEKTYPTDWSDDESNNPFSSTDANGDSNPFDEDTTSGTEVVRV
hPACSIN 3	352EWSDEES.....PRKAATCVRVR
mPACSIN 3	352DWSDEES.....PGKVAICVRVR
hPACSIN 1	392	ALYDYDGQEQDEL SFKAGDELTKLGEFEDEQGWCRGRLD SGQLGLYPANYVEAI*~~
mPACSIN 1	389	ALYDYDGQEQDEL SFKAGDELTKLGEFEDEQGWCRGRLD SGQLGLYPANYVEAI*~~
hPACSIN 2	433	ALYDYE GQEHDEL SFKAGDELTKMEDEDEQGWCKGRLDNGQVGLYPANYVEAIQ*~
mPACSIN 2	433	ALYDYE GQEHDEL SFKAGDELTKLEDEDEQGWCKGRLD SGQVGLYPANYVEAIQ*~
hPACSIN 3	370	ALYDYAGQEADEL SFRAGEELLKMSFEDEQGWCCGQLQSGRIGLYPANYVECVGA*
mPACSIN 3	370	ALYDYAGQEADEL SFRAGEELLKMSFEDEQGWCCGQLQSGRIGLYPANYVECVGA*

Abb. 19. Sequenzvergleich der PACSIN-Proteine in Mensch (hPACSIN 1, 2 und 3) und Maus (mPACSIN 1, 2 und 3). Konservierte Aminosäuren sind weiß auf schwarzem Hintergrund, ähnliche schwarz mit grauem Hintergrund dargestellt. Punkte in den Proteinsequenzen verdeutlichen Lücken, die für eine bessere Übereinstimmung eingeführt wurden. Die Zahlen links geben die Position der Aminosäuren an.

Identität zwischen verschiedenen PACSIN-Isoformen

Die prozentuale Identität auf DNA- und Proteinebene für die verschiedenen Isoformen untereinander ist der Übersichtlichkeit halber in Tab. 6 zusammengefaßt.

A	Identität der cDNA [der Proteine] in Maus	
	mPACSIN 2	mPACSIN 3
mPACSIN 1	73,1% [70,2%]	65,1% [53,4%]
mPACSIN 2	—	67,0% [59,8%]

B	Identität der cDNA [der Proteine] in Mensch	
	hPACSIN 2	hPACSIN 3
hPACSIN 1	75,4% [71,0%]	66,3% [54,9%]
hPACSIN 2	—	66,9% [58,6%]

C	Identität der cDNA [der Proteine] zwischen den Spezies	
PACSIN 1 (Maus/Mensch)	78,7%	[95,6%]
PACSIN 2 (Maus/Mensch)	79,8%	[93,2%]
PACSIN 3 (Maus/Mensch)	84,2%	[94,1%]

Tab. 6. Prozentualer Vergleich der Identitäten zwischen den PACSIN-Isoformen bei Maus und Mensch. Die Isoformen aus Maus werden in (A) auf cDNA- und Protein-Ebene miteinander verglichen. Entsprechend sind die Vergleiche der humanen Isoformen in (B) auf cDNA- und Protein-Ebene aufgeführt. Die prozentualen Identitäten zwischen den Spezies für die jeweiligen Homologe sind in (C) auf cDNA- und Protein-Ebene aufgelistet.

3.1.2 Evolution der PACSINe

Ein Vergleich der humanen und aus Maus isolierten Proteinsequenzen mit weiteren PACSIN-Homologen in Huhn (FAP52, Meriläinen et al., 1997) und Ratte (Syndapin I und II, Qualmann et al., 1999; Qualmann und Kelly, 2000) mit Hilfe der Programme des PHYLIP-Software-Pakets ermöglicht eine Anordnung dieser Sequenzen im Hinblick auf ihre evolutionäre Entwicklung (Abb. 20). Dazu wurden zunächst die Identitäten der Proteinsequenzen mit dem PILEUP-Programm (GCG Software) ermittelt und eine Protein-Distanz-Matrix erstellt, aus der mit Hilfe des Kitsch-Margoliash-Algorithmus des PHYLIP-Software-Pakets die evolutionären Abstände berechnet wurden (Felsenstein, 1996). Die Länge der horizontalen Linien in Abb. 20 ist proportional zu den evolutionären Abständen zwischen den Sequenzen.

Im Gegensatz zu den näher verwandten PACSIN 1- und PACSIN 2-Homologen haben sich die PACSIN 3-Homologe bereits früh in der Entwicklung der PACSINe abgezweigt. Die ausschließlich für das PACSIN 2-Homolog Syndapin II beschriebenen unterschiedlichen Spleißvarianten (Syndapin II-1 und Syndapin II-s, Qualmann und Kelly, 2000) haben sich, evolutionär betrachtet, erst vor kurzem entwickelt.

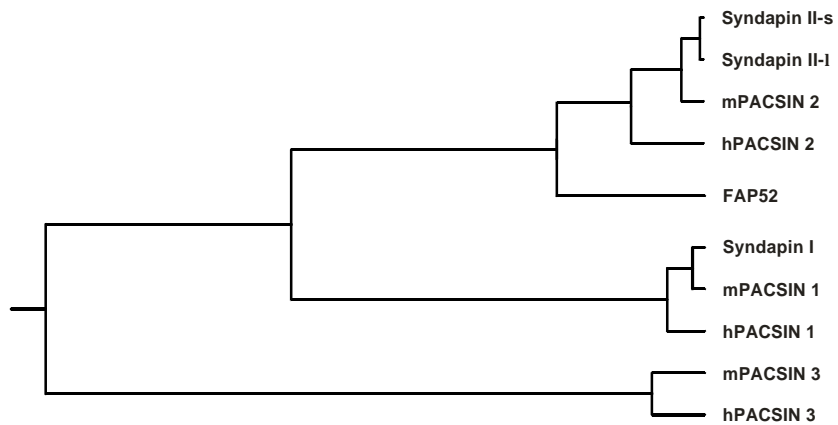


Abb. 20. Darstellung der evolutionären Entstehung der verschiedenen PACSIN-Isoformen unter Berücksichtigung weiterer homologer Proteine. Die PACSIN-Isoformen aus Maus (mPACSIN 1, 2 und 3) wurden mit den Homologen in Mensch (hPACSIN 1, 2 und 3), Huhn (FAP52) und Ratte (Syndapin I als Homolog zu PACSIN 1, Syndapin II mit seinen Spleißvarianten Syndapin II-I und Syndapin II-s als Homolog zu PACSIN 2) verglichen.

3.2 Herstellung von Antiseren gegen PACSIN 2 und 3

Da es für die neu isolierten Isoformen von PACSIN 2 und 3 keine spezifischen Antikörper gab, wurden für die Herstellung von Antiseren die codierenden Bereiche von Maus-PACSIN 2 und 3 mit durchgehendem Leseraster hinter die GST-Sequenz in pGEX-Vektoren (pGEX-2T für PACSIN 2 und pGEX-3X für PACSIN 3) kloniert und die GST-PACSIN-Fusionsproteine nach Herstellerangaben bakteriell exprimiert und aufgereinigt. Die beiden neuen Isoformen zeigen im Vergleich zu GST und GST-PACSIN 1 ein für sie typisches Laufverhalten (Abb. 21, siehe auch 3.3.2).

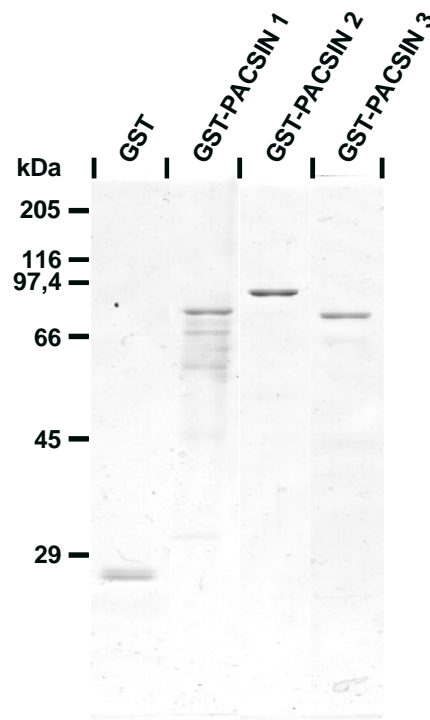


Abb. 21. Coomassie-gefärbtes Acrylamidgel nach Auftrennung der verschiedenen GST-PACSIN-Isoformen und GST allein durch SDS-PAGE. Bei GST-PACSIN 1 sind ebenfalls die charakteristischen Degradationsbanden zu erkennen. Die Zahlen links geben die Laufhöhe der Proteine des Größenstandards in kDa an.

Die Immunisierung von Kaninchen erfolgte durch die Firma Pineda (Berlin), wobei jeweils 500 µg Protein für die Immunisierung eines Kaninchen verwendet und die Antiseren nach 61 Tagen Immunisierungszeit entnommen wurden. Der Titer der Antiseren wurde mit einem Enzym-gekoppelten Immunnachweis (ELISA) bestimmt, wobei das jeweilige Antigen zur Beschichtung der Mikrotiterplatte verwendet wurde. Dabei ergab sich für beide Antiseren ein Titer von über 1:100000.

3.3 Expression der PACSIN-Isoformen

Bei Sequenzvergleichen in den Gendatenbanken werden für die PACSINe EST-Klone aus unterschiedlichen Geweben gefunden. Während PACSIN 1 neurospezifisch exprimiert wird (Plomann et al., 1998), sind EST-Klone für PACSIN 2 z. B. aus Hirn und Niere, für PACSIN 3 aus Hirn, Thymus, Magen und Leber aufgeführt. Zusätzlich werden für alle PACSINe EST-Klone aus sehr frühen Entwicklungsstadien gefunden wie z. B. für PACSIN 1 aus einem 12 Tage altem Maus-Embryo (Genbankeintrag AV160801), für PACSIN 2 aus einem Maus-Embryo im Zwei-Zell-Stadium (Genbankeintrag AU014698) und für PACSIN 3 aus einem acht Tage alten Maus-Embryo (Genbankeintrag AV301736).

3.3.1 Expression auf mRNA-Ebene

Um die genaue Gewebeverteilung der verschiedenen Isoformen zu bestimmen, wurde mit mRNA aus Geweben adulter Mäuse eine Northern Blot Analyse durchgeführt. Als spezifische Sonden wurden jeweils Fragmente aus den cDNAs der einzelnen Maus-PACSIN-Isoformen durch Restriktionsverdau isoliert und für die Hybridisierung radioaktiv markiert. Dabei zeigte sich für die einzelnen Isoformen jeweils nur eine spezifische Bande, die bei PACSIN 1 eine Größe von 4,4 kb, für PACSIN 2 von 3,5 kb und für PACSIN 3 von 2,0 kb aufweist. In der Gewebespezifität zeigen sich die Unterschiede, die durch die Datenbank-Analyse schon zu vermuten waren. PACSIN 1 ist die einzige neurospezifische Isoform, während PACSIN 2 und 3 zwar ebenfalls im Hirn, aber auch in anderen Geweben exprimiert werden. PACSIN 2 zeigt in den getesteten Geweben eine ubiquitäre Verteilung, PACSIN 3 wird besonders stark in Herz und Muskel und schwächer in Ovarien nachgewiesen (Abb. 22 A).

Als Kontrollen für den Northern Blot wurde einerseits die gleichmäßige Beladung des Gels vor dem Blot mit einer Ethidiumbromid-Färbung der RNA getestet und andererseits die Integrität der transferierten RNA durch Hybridisierung mit einer spezifischen Sonde für Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) nachgewiesen (Abb. 22 A). Daß das GAPDH-Signal in Testis ein anderes Laufverhalten als in den anderen Geweben aufweist, läßt sich dadurch erklären, daß in verschiedenen Geweben unterschiedliche Spleißformen von GAPDH exprimiert werden können, sie sich in ihrer Größe und damit in ihrem Laufverhalten in einem Agarosegel unterscheiden (Mezquita et al., 1998).

Die RNA-Expression der humanen Isoformen wurde durch Hybridisierung des Human RNA Master Blots (Clontech) mit spezifischen, radioaktiv markierten Sonden für humanes PACSIN 2 und 3 ermittelt. Auf diesem Blot sind RNAs sowohl aus fetalen als auch adulten Geweben in einzelnen Punkten aufgetragen, die eine genaue Zuordnung positiver Signale zu den entsprechenden Ausgangsgeweben ermöglichen. Für das humane PACSIN 2 bestätigt sich die ubiquitäre Expression. Humanes PACSIN 3 gibt ebenfalls starke Signale in Herz und Muskel, zusätzlich auch in Lunge. Interessant ist, daß beide Isoformen diese Expressionsmuster auch bereits in den fetalen Geweben aufweisen. (Abb. 22 B).

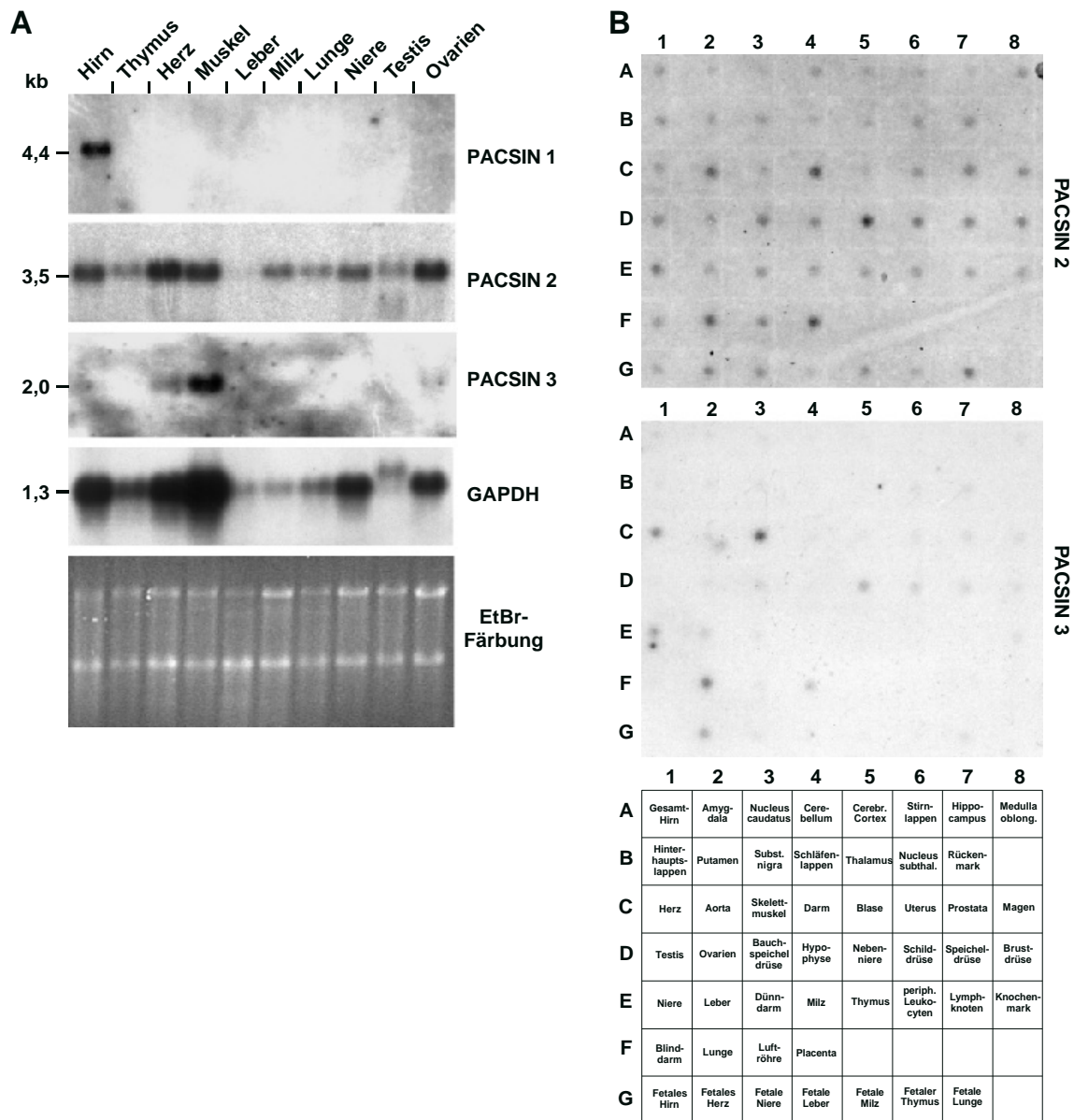


Abb. 22. (A) Northern Blot Analyse der PACSIN-Isoformen mit mRNA aus adulten Maus-Geweben. Die Zahlen links geben die Größe der Signale für die einzelnen Isoformen in kb an. Als Kontrollen sind eine Hybridisierung mit GAPDH und die Ethidiumbromid-Färbung (EtBr) der RNA vor dem Blot gezeigt. (B) Die RNA-Expression der humanen Isoformen von PACSIN 2 und 3 wurde im Human RNA Master Blot (Clontech) analysiert. Die obere Abbildung zeigt die positiven Signale für PACSIN 2, die mittlere die für PACSIN 3. Im unteren Rechteck ist der Ursprung der RNA für die einzelnen Areale schematisch angegeben.

3.3.2 Expression auf Proteinebene

Für die Expressionsanalyse der einzelnen PACSIN-Isoformen auf Proteinebene wurde Gesamtprotein aus adulten Mausgeweben extrahiert und im Western Blot analysiert. Hier bestätigt sich die für die Isoformen bereits im Northern und Human RNA Master Blot gefundene Gewebeverteilung der einzelnen Isoformen. PACSIN 1 (50 kDa) wird ausschließlich im Hirn exprimiert, PACSIN 2 (65 kDa) ist ubiquitär nachweisbar und PACSIN 3 (48 kDa) kommt stark in Herz, Lunge, und Muskel, schwach in Leber, Niere,

Uterus und Hirn vor (Abb. 23). In Hirn ist die mit dem PACSIN 3-Antiserum detektierte Doppelbande bei 50 kDa und 48 kDa auf eine Kreuzreaktion des PACSIN 3-Antiserums mit PACSIN 1 (50 kDa) zurückzuführen.

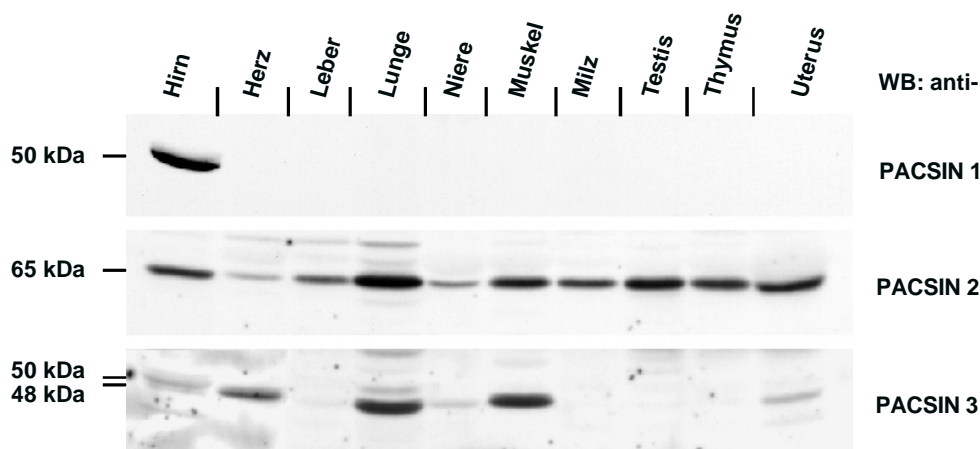


Abb. 23. Western Blot Analyse der Expression der PACSIN-Isoformen. Die Zahlen links geben die Laufhöhe der spezifischen Signale in kDa an. Die mit dem PACSIN 3-Antiserum detektierte 50 kDa-Bande in Hirn ist eine Kreuzreaktion mit PACSIN 1. Die Spezifität der affinitätsgereinigten Antikörper ist in Abb. 24 dargestellt.

Während in der Western Blot Analyse die Signale für PACSIN 1 und PACSIN 3 mit dem theoretisch bestimmten Molekulargewicht übereinstimmen, läuft PACSIN 2 hingegen in der SDS-PAGE ca. 10 kDa höher als theoretisch ermittelt, unabhängig davon, ob es sich um das endogene eukaryotische Protein oder das bakterielle GST-PACSIN 2-Fusionsprotein handelt. Um diese Abweichung zu erklären und das Molekulargewicht mit einer unabhängigen Methode zu bestimmen, wurden die Molekulargewichte von GST und GST-PACSIN 2 mittels Massenspektrometrie (MALDI-MS) bestimmt. Die daraus berechnete Differenz kommt dem theoretisch ermittelten Molekulargewicht von PACSIN 2 sehr nahe (Tab. 7), so daß das ungewöhnliche Laufverhalten wohl auf die Aminosäure-Zusammensetzung des Proteins zurückzuführen ist. Ein vergleichbares Laufverhalten in der SDS-PAGE wurde auch schon für das PACSIN 2-Homolog in Huhn, FAP52, beschrieben (Meriläinen et al, 1997), so daß dieses Laufverhalten Isoform-spezifisch zu sein scheint.

A	Western Blot	PACSIN 1	PACSIN 2	PACSIN 3
	theoretisches MW (kDa)	50,6	55,8	48,5
	apparentes MW (kDa)	50	65	48

B	MALDI-MS	GST	GST-PACSIN 2	Differenz für PACSIN 2
	theoretisches MW (kDa)	26,9	82,7	55,8
	apparentes MW (kDa)	27,8	83,4	55,7

Tab. 7. (A) Vergleich der theoretisch und durch Western Blot Analyse bestimmten Molekulargewichte (MW) für die PACSIN-Isoformen. (B) Vergleich der theoretisch und durch MALDI-MS-Analyse ermittelten MW für GST und GST-PACSIN 2. Aus diesen Werten wurde in der rechten Spalte das MW für PACSIN 2 errechnet.

3.3.3 Endogene Expression in eukaryotischen Zellen

Um in weiteren Analysen eine mögliche Kreuzreaktivität der Antiseren mit anderen Mitgliedern der PACSIN-Proteinfamilie ausschließen zu können, wurden in einer Affinitätsreinigung aus den einzelnen Antiseren zunächst die Antikörper abgereichert, die auch die anderen Isoformen erkennen, die Isoform-spezifischen Antikörper dann an eine Affinitätssäule gebunden und von dort mit KSCN eluiert (s. 2.2.9).

Um die Spezifität der affinitätsgereinigten Antiseren nachzuweisen, wurden Western Blot Analysen von Gesamtproteinlysaten durchgeführt. Das affinitätsgereinigte Antiserum gegen das neurospezifische PACSIN 1 wurde auf Maus-Hirn-Homogenat, die gereinigten Antiseren gegen PACSIN 2 und 3 auf endogen exprimierenden Zelllinien getestet. Jedes der gereinigten Antiseren detektiert nur eine Bande mit der spezifischen Laufhöhe der jeweiligen Isoform (Abb. 24 A), wobei PACSIN 1 in Hirn und PACSIN 2 und 3 von NIH 3T3 Fibroblasten exprimiert werden. Während PACSIN 2 unabhängig von deren Differenzierungsstadium ebenfalls in C2-Myoblasten detektiert werden kann, ist die endogene Expression von PACSIN 3 in C2-Myoblasten differenzierungsabhängig. C2-Myoblasten nehmen erst nach mehrtägiger Differenzierung einen Muskel-Phänotyp an (Yaffe und Saxel, 1977) und erst ab diesem Zeitpunkt läßt sich eine endogene PACSIN 3-Expression nachweisen.

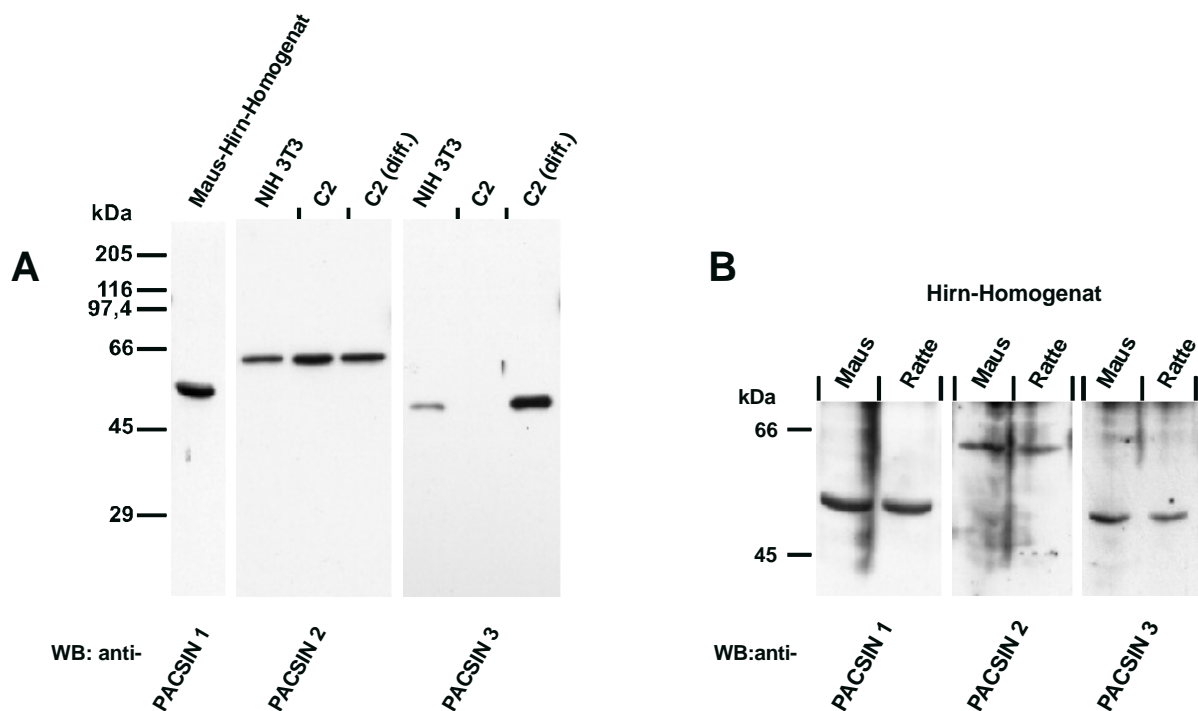


Abb. 24. Western Blot Analyse der Spezifität der affinitätsgereinigten Antiseren gegen die PACSIN-Isoformen. Endogen exprimiertes PACSIN 1 wurde in Maus-Hirn-Homogenat, PACSIN 2 und 3 in NIH 3T3 Fibroblasten und in undifferenzierten und differenzierten (diff.) C2-Myoblasten mit den jeweils Isoform-spezifischen affinitätsgereinigten Antiseren detektiert (A). Nachweis der Isoform-spezifischen Kreuzreaktion der affinitätsgereinigten Antiseren zwischen den Ratten- und Maus-Homologen der PACSINe in der Western Blot-Analyse von Hirn-Homogenaten (B). Die Zahlen links geben die Laufhöhe der Proteine des Größenstandards in kDa an.

Da es aufgrund der Größe leichter ist, primäre Neuronenkulturen aus definierten Bereichen von Ratten- anstelle von Maus-Hirnen anzulegen, wurden die affinitätsgereinigten Antiseren auf eine Kreuzreaktionen mit den entsprechenden Ratten-Homologen der PACSINe im Western Blot getestet. Jedes Antiserum ist in der Lage das entsprechende Homolog im Ratten-Hirn-Homogenat, dessen Laufhöhe der des korrespondierenden Maus-Homologs entspricht, zu detektieren (Abb. 24 B).

Die intrazelluläre Verteilung von PACSIN 1 konnte somit in primären Hippocampus-Neuronen aus Ratte, von PACSIN 2 und 3 in den oben beschriebenen Zelllinien durch konfokale Mikroskopie analysiert werden, wobei die endogen exprimierten PACSINe mit den affinitätsgereinigten Antikörpern detektiert wurden. Alle Isoformen zeigen eine cytosolische Verteilung, PACSIN 1 wird in primären Neuronen zusätzlich in den sogenannten Boutons detektiert, an denen die Synapsen mit anderen Neuronen in Kontakt treten (Abb. 25 A). Für PACSIN 2 und 3 kann zusätzlich eine diskontinuierliche Plasmamembran-Assoziation beobachtet werden, die bei PACSIN 2 in den NIH 3T3 Fibroblasten nur vereinzelt (Abb. 25 B), bei PACSIN 3 in differenzierten C2-Myotuben sehr häufig auftritt (Abb. 25 C, C'). Diese Lokalisation stimmt mit der in Muskelgewebe detektieren durchgehenden Plasmamembran-Assoziation von PACSIN 3 überein (M. Plomann, persönliche Mitteilung).

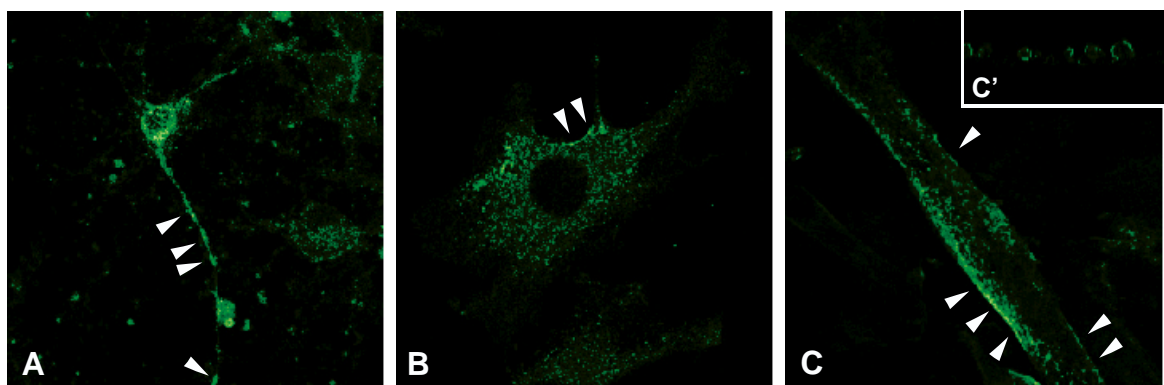


Abb. 25. Analyse der intrazellulären Verteilung der PACSINe mit Isoform-spezifischen Antikörpern durch konfokale Mikroskopie. (A) zeigt die endogene Expression von PACSIN 1 in primären Hippocampus-Neuronen aus Ratte, (B) die endogene PACSIN 2-Expression in NIH 3T3 Fibroblasten und (C) die endogene PACSIN 3-Expression in differenzierten C2-Myotuben. Die Pfeile weisen in (A) auf markierte Boutons in den Axonen und in (B, C) auf markierte Plasmamembranbereiche. In (C') ist die endogene PACSIN 3-Expression in weiteren differenzierten C2-Myotuben in vertikaler Aufnahmeebene dargestellt. Alle Aufnahmen entsprechen einer Zellebene und wurden 32x gescannt. Die Spezifität der affinitätsgereinigten Antikörper ist in Abb. 24 gezeigt.

3.3.4 Immunhistochemische Analyse auf Hirnschnitten

Da Hirn das einzige Gewebe ist, in dem sowohl auf RNA- als auch auf Protein-Ebene eine Expression aller PACSIN-Isoformen detektiert wurde, können hier die zellulären Expressionsmuster der PACSINe durch immunhistochemische Untersuchungen an Hirnschnitten verglichen werden. Dies sollte eine mögliche redundante oder komplementäre Expression der PACSINe in den verschiedenen Hirnregionen und zusätzlich eine potentielle Zelltyp-Spezifität der Isoformen klären.

Für diese Analyse wurde auf Rattengewebe gewechselt, da zum einen die affinitätsgereinigten Antiseren gegen die PACSIN-Isoformen für beide Spezies geeignet sind (Abb. 24) und zum anderen die Hirne bei Ratten größer als bei Mäusen sind, was die Anatomie der verschiedenen Hirnregionen besser erkennbar machen sollte. Desweiteren können aus Rattenhirnen, wie bereits oben erwähnt, leichter primäre Kulturen aus definierten Hirnbereichen anlegt werden.

Sagittale Paraffinschnitte von adultem Rattenhirn wurden mit den affinitätsgereinigten Antikörpern gegen die einzelnen PACSIN-Isoformen umgesetzt und die Expression durch DAB-Färbung detektiert. Aufgrund von starken Variationen in der Signalstärke auf Schnitten verschiedener Tiere und der aufgetretenen Hintergrundfärbung konnten die Expressionsmuster der verschiedenen PACSIN-Isoformen nicht in allen Hirnregionen analysiert werden. Jedoch zeigten einige Hirnregionen reproduzierbar ein auffälliges Verteilungsmuster für die PACSINe. Alle PACSIN-Isoformen werden von Neuronen des Cortex exprimiert und weisen demzufolge in dieser Hirnregion ein redundantes Expressionsmuster auf (Abb 26 A, B, C). In der darunterliegenden weißen Substanz können PACSIN 1 und 3 in Neuronen (Abb. 26 D, F), PACSIN 2 hingegen als einzige Isoform in Astrocyten nachgewiesen werden (Abb. 26 E).

Besonders auffällig sind die Expressionsunterschiede in den Regionen des Kleinhirns. PACSIN 1 wird besonders stark in einem Kerngebiet innerhalb des Kleinhirnstiels (Abb. 26 G), aber kaum im Kleinhirn selbst exprimiert (Abb. 26 J). PACSIN 2 kann hingegen in der Kernregion kaum (Abb. 26 H), dafür in den Purkinjezellen sehr stark nachgewiesen werden (Abb. 26 K). PACSIN3 wiederum wird in beiden Regionen in geringen Mengen exprimiert (Abb. 26 I, L).

Im Stammhirn existieren ebenfalls unterschiedliche Expressionsmuster, wobei PACSIN 1 stark in großen und kleinen Neuronen (Abb. 26 M), PACSIN2 nur sehr schwach in großen Neuronen (Abb. 26 N) und PACSIN 3 in kleinen Neuronen exprimiert wird (Abb. 26 O).

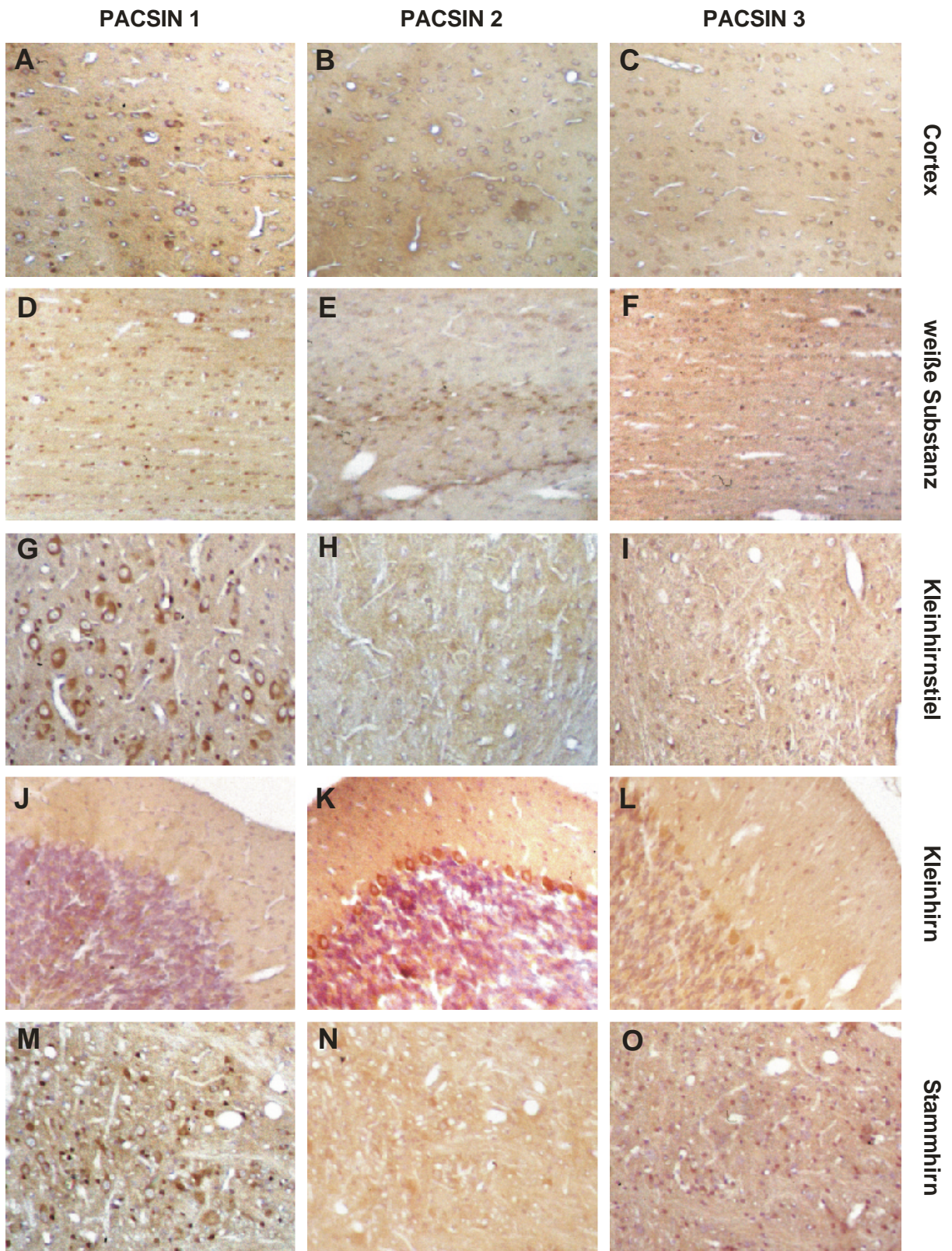


Abb. 26. Immunhistochemische Analyse der Expression der einzelnen PACSIN-Isoformen auf sagitalen Hirn-Schnitten adulter Ratten. Die Zellkerne wurden mit Hämalaun gefärbt. Die Spezifität der affinitätsgereinigten Antiseren gegen die PACSIN-Isoformen ist in Abb. 24 dargestellt. Die Beschreibung der einzelnen Bilder befindet sich im Text.

3.4 Bindungspartner der PACSIN-Proteine

3.4.1 Isolierung neuer Bindungspartner mit dem Hefe Two-Hybrid System

Eine Möglichkeit, Hinweise auf die Funktion von Proteinen zu bekommen, ist die Analyse ihrer Interaktionspartner. Da es bei der Suche nach bislang unbekanntem Bindungspartner sinnvoll ist, eine definierte Bank zu durchsuchen, bietet sich bei derartigen Ansätzen das Hefe Two-Hybrid System an. Da alle PACSIN-Isoformen im Hirn exprimiert werden, wurde für die Isolation neuer Bindungspartner eine Maus-Hirn MATCHMAKER cDNA-Bank (Clontech) benutzt, die schon für PACSIN 1 erfolgreich eingesetzt wurde (Modregger, 1997). In Tab. 8 ist die Anzahl der isolierten potentiellen Bindungspartner für PACSIN 2 und 3 nach den verschiedenen Schritten des Hefe Two-Hybrid Systems aufgeführt.

	PACSIN 2	PACSIN 3
Komplexität der Bank	1·10 ⁶ Klone	
getestete Klone	6,8·10 ⁵	9,8·10 ⁵
getesteter Anteil der Bank (%)	68	98
Klone nach 3 b-Gal-Tests	59	29
Klone nach Cycloheximid-Selektion	56	24
Klone nach ‚Yeast Mating‘	28	11
Klone nach Sequenzierung	10	8

Tab. 8. Übersicht über die Anzahl der mit Hilfe des Hefe Two-Hybrid Systems isolierten potentiellen Bindungspartner für PACSIN 2 und 3 nach den verschiedenen Stufen des Two-Hybrid Systems.

Die Sequenzanalysen der potentiellen Bindungspartner für PACSIN 2 und 3 nach dem ‚Yeast Mating‘ zeigte, daß einige der Klone zwar bekannte Proteine oder Domänen codieren, die cDNA aber in einem versetzten Leseraster in den pACT2-Vektor kloniert wurde, so daß das exprimierte Fusionsprotein nicht dem in Genbank-Analysen gefundenen Protein entspricht. Diese Klone wurden als falsch-positiv bewertet, so daß nach Sequenzanalyse schließlich zehn neue potentielle Bindungspartner für PACSIN 2 und acht für PACSIN 3 isoliert wurden. Einige dieser Proteine sind in der Genbank eingetragen, wobei Endophilin B1 und Cordon-Bleu für beide PACSIN-Isoformen, die α -Untereinheit der Na⁺/K⁺-ATPase für PACSIN 2 und PICK1, PACSIN 1 und TRAX nur für PACSIN 3 isoliert wurden (Tab. 9).

als potentielle Bindungspartner isolierte Klone (Proteinname laut Genbank)	PACSIN 2	PACSIN 3
	21-1	32-2 (Endophilin B1)
	21-7 (Endophilin B1)	32-12 (PICK1)
	21-8 (Cordon-Bleu)	32-15 (Cordon-Bleu)
	22-2 (α -Untereinheit der Na^+/K^+ -ATPase)	33-4 (PACSIN 1)
	22-8	33-13
	23-14	33-15 (TRAX)
	24-1	34-7
	24-10	34-8
	24-14	
24-18		

Tab. 9. Übersicht über die mit dem Two-Hybrid System isolierten neuen potentiellen Bindungspartner für PACSIN 2 und 3. Es sind die jeweiligen Klon-Nummern angegeben, unter denen die Proteine in den einzelnen Ansätzen des Hefe Two-Hybrid Systems isoliert wurden. Für die bereits in der Genbank eingetragenen Proteine sind die Namen in Klammern hinter dem entsprechenden Klon aufgeführt.

In den bisher in der Genbank unbekanntem Klonen konnten auch keine bekannten Bindungsmotive oder Domänen gefunden werden, so daß zur Zeit keine weiteren Aussagen über diese potentiellen Bindungspartner gemacht werden können. Bei den bereits bekannten potentiellen Bindungspartnern wurden teilweise die gesamten codierenden Bereiche, teilweise nur Fragmente der offenen Leseraster isoliert (Tab. 10).

	Gesamtlänge des Proteins (AS)	isolierter Bereich (AS) für PACSIN 2	isolierter Bereich (AS) für PACSIN 3
Endophilin B1	366	1-366	1-366
Cordon-Bleu	385	224-385	224-385
α -Untereinheit der Na^+/K^+ -ATPase	1023	423-1023	—
PICK1	417	—	314-417
PACSIN 1	441	—	195-441
TRAX	291	—	1-291

Tab. 10. Übersicht über die Länge der isolierten Bereiche der potentiellen Bindungspartner für PACSIN 2 und 3 mit Hilfe des Two-Hybrid Systems.

Sowohl für TRAX als auch für Endophilin B1, das bereits für PACSIN 1 gefunden wurde (Modregger, 1997), konnte der gesamte, bei PICK1, Cordon-Bleu und der α -Untereinheit der Na^+/K^+ -ATPase hingegen nur der den C-terminalen Anteil des Proteins codierende Bereich aus der Bank isoliert werden.

Interessant ist die Tatsache, daß mit PACSIN 3 auch PACSIN 1 aus der Bank isoliert werden konnte. Dies ist ein erster Hinweis, daß die PACSINe auch untereinander interagieren können, was eventuell über die zentrale coiled-coil Region (AS 183-213 bei PACSIN 1) möglich ist. Der größte Teil dieser Region ist N-terminal in dem PACSIN 1-Fragment enthalten, das mit PACSIN 3 aus der Bank isoliert wurde.

3.4.2 Beteiligung der PACSINe an der Clathrin-vermittelten Endocytose

3.4.2.1 Affinitätspräzipitation

Qualmann und Mitarbeiter (1999) beschreiben für das ebenfalls neurospezifische Rattenhomolog von PACSIN 1, Syndapin I, eine Bindung an Synaptojanin, Synapsin 1 und Dynamin 1, die an entscheidenden Schritten des synaptischen Clathrin-vermittelten Vesikeltransports beteiligt sind. Da N-WASP, das einen regulatorischen Einfluß auf das Actin-Cytoskelett hat, als weiterer Bindungspartner gefunden wurde, wird für Syndapin I eine Funktion als Bindeglied zwischen den Proteinen des Vesikeltransports und des Cytoskeletts angenommen.

Zusätzlich wird in Syndapin I die Bindungsregion für diese Bindungspartner auf die SH3-Domäne eingegrenzt, da ein Aminosäure-Austausch eines in SH3-Domänen konservierten Prolins gegen Leucin die Bindung der isolierten Syndapin I-SH3-Domäne an diese Proteine inhibiert (Qualmann et al., 1999).

Die hohe Homologie zwischen Syndapin I und den PACSIN-Isoformen, insbesondere auch im Bereich der SH3-Domänen, deutet darauf hin, daß alle PACSINe mit den für Syndapin I beschriebenen Bindungspartnern interagieren und somit auch an den Vorgängen des Clathrin-vermittelten Vesikeltransports beteiligt sein könnten. Um eine potentielle Interaktion auf die SH3-Domäne eingrenzen zu können, wurde in alle PACSIN-Isoformen ein Aminosäure-Austausch eines konservierten Prolins gegen Leucin eingeführt (PACSIN 1 P434L, PACSIN 2 P478L und PACSIN 3 P415L, Abb. 27), durch den die SH3-Domäne inaktiviert wird (Clark et al., 1992). Somit konnten mögliche Interaktionen jeweils mit den Vollängen-Proteinen und nicht nur mit isolierten Domänen getestet werden.

A	Wildtyp-Sequenz der PACSIN 1-cDNA von bp 1490-1514	5' - GGC CTC TAT CCT GCC AAC TAC GTT G - 3'
	Wildtyp-Sequenz des PACSIN 1-Proteins von AS 431-438	G L Y P A N Y V
		3' - CCG GAG ATA GGA CGG TTG ATG CAA C - 5'
	Sequenz des Mutationsprimers PACSIN 1-P434L	5' - GGC CTC TAT CTC GCG AAC TAC GTT G - 3'
	Sequenz der PACSIN 1-cDNA nach der Mutagenese	5' - GGC CTC TAT <u>CTC</u> <u>GCG</u> AAC TAC GTT G - 3'
	Sequenz des PACSIN 1-Proteins nach der Mutagenese	G L Y <u>L</u> A N Y V
		3' - CCG GAG ATA <u>GAG</u> <u>CGC</u> TTG ATG CAA C - 5'
		Nru I
B	Wildtyp-Sequenz der PACSIN 2-cDNA von bp 1673-1697	5' - GGC CTA TAC CCA GCC AAC TAT GTC G - 3'
	Wildtyp-Sequenz des PACSIN 2-Proteins von AS 475-482	G L Y P A N Y V
		3' - CCG GAT ATG GGT CGG TTG ATA CTG C - 5'
	Sequenz des Mutationsprimers PACSIN 2-P478L	5' - GGC CTA TAC CTC GCG AAC TAT GTC G - 3'
	Sequenz der PACSIN 2-cDNA nach der Mutagenese	5' - GGC CTA TAC <u>CTC</u> <u>GCG</u> AAC TAT GTC G - 3'
	Sequenz des PACSIN 2-Proteins nach der Mutagenese	G L Y <u>L</u> A N Y V
		3' - CCG GAT ATG <u>GAG</u> <u>CGC</u> TTG ATA CAG C - 5'
		Nru I
C	Wildtyp-Sequenz der PACSIN 3-cDNA von bp 1360-1383	5' - ATT GGT CTG <u>TAC</u> CCT GCC AAT TAC - 3'
	Wildtyp-Sequenz des PACSIN 3-Proteins von AS 411-418	I G L Y P A N Y
		3' - TAA CCA <u>GAT</u> <u>ATG</u> GGA CGG TTA ATG - 5'
	Sequenz des Mutationsprimers PACSIN 3-P415L	5' - ATT GGT CTG TAT CTT GCC AAT TAC - 3'
	Sequenz der PACSIN 3-cDNA nach der Mutagenese	5' - ATT GGT CTG TAT <u>CTT</u> GCC AAT TAC - 3'
	Sequenz des PACSIN 3-Proteins nach der Mutagenese	I G L Y <u>L</u> A N Y
		3' - TAA CCA GAT ATA <u>GAA</u> CGG TTA ATG - 5'
		Rsa I

Abb. 27. Darstellung der Wildtypsequenz, der verwendeten Primer und der resultierenden Mutationen in den SH3-Domänen für PACSIN 1 (A), 2 (B) und 3 (C). Die veränderten Basen und Aminosäuren sind grau unterlegt, eingeführte oder veränderte Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen und Restriktionsenzyme unterhalb der entsprechenden Sequenz angegeben.

Die durch die Mutagenesen erzeugten Varianten der PACSIN-Isoformen wurden ebenfalls in die pGEX-Vektoren kloniert (pGEX-3X für PACSIN 1 P434L und PACSIN 3 P415L, pGEX-2T für PACSIN 2 P478L) und bakteriell exprimierte GST-Fusionsproteine der Wildtyp- und der Varianten mit mutierter SH3-Domäne sowie GST als Kontrolle aufgereinigt. Trotz der eingeführten Mutationen in die hoch konservierten SH3-Domänen wurden alle Protein-Varianten im Vergleich zur Wildtyp-Form gleich gut exprimiert (Abb. 28), so daß auch die Vollängen-Proteine mit mutierter SH3-Domäne für eine Analyse möglicher Bindungspartner geeignet sind.

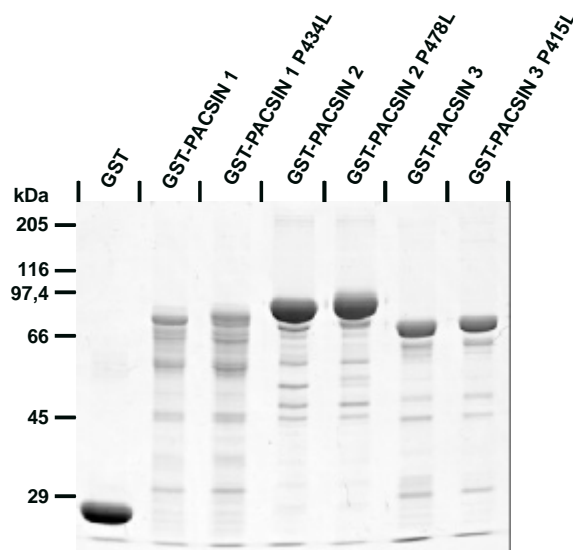


Abb. 28. Bakteriell exprimierte GST-Fusionsproteine der PACSIN-Wildtyp-Formen und der Varianten mit mutierter SH3-Domäne im Vergleich zu GST allein in einem Coomassie-gefärbten Acrylamidgel nach SDS-PAGE. Die verschiedenen Wildtyp- und SH3-mutierten Varianten der PACSIN-Isoformen zeigen ein unverändertes Isoformen-typisches Expressions- und Degradationsverhalten. Die Zahlen links geben die Laufhöhe der Proteine im Größenstandard in kDa an.

Die verschiedenen bakteriell exprimierten Proteine wurden nach der Aufreinigung an der Glutathion-Sepharose belassen und mit einem Protein-Homogenat aus Maus-Hirn inkubiert. Die über diese Affinitätspräzipitation isolierten Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot analysiert. Dabei zeigte sich, daß alle PACSIN-Isoformen in der Lage sind, an Dynamin, Synaptojanin 1 und N-WASP zu binden, während GST allein und die PACSIN-Varianten mit mutierter SH3-Domäne nicht zu diesen Interaktionen fähig sind (Abb. 29).

Aufgrund dieses Bindungsverhaltens könnten alle PACSIN-Isoformen an den für Syndapin I beschriebenen Vesikeltransportvorgängen beteiligt sein. Zusätzlich konnte eine SH3-Domänen-abhängige Bindung von mSos1 an die PACSINe nachgewiesen werden, wodurch neben N-WASP eine weitere Verbindung zur Regulation des Actin-Cytoskeletts besteht (Nimnual et al., 1998; Scita et al., 1999). Eine Bindung an Clathrin, einem wichtigen Protein der Vesikelhülle bei der synaptischen Endocytose (Kirchhausen, 2000a), konnte hingegen nicht detektiert werden (Abb. 29).

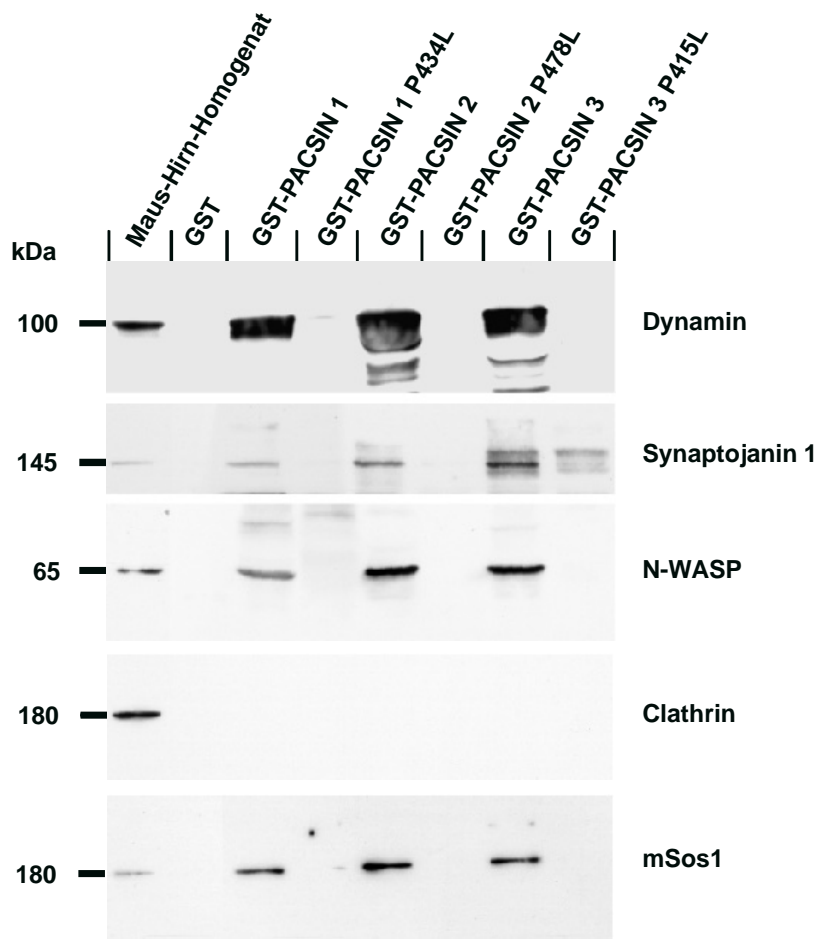
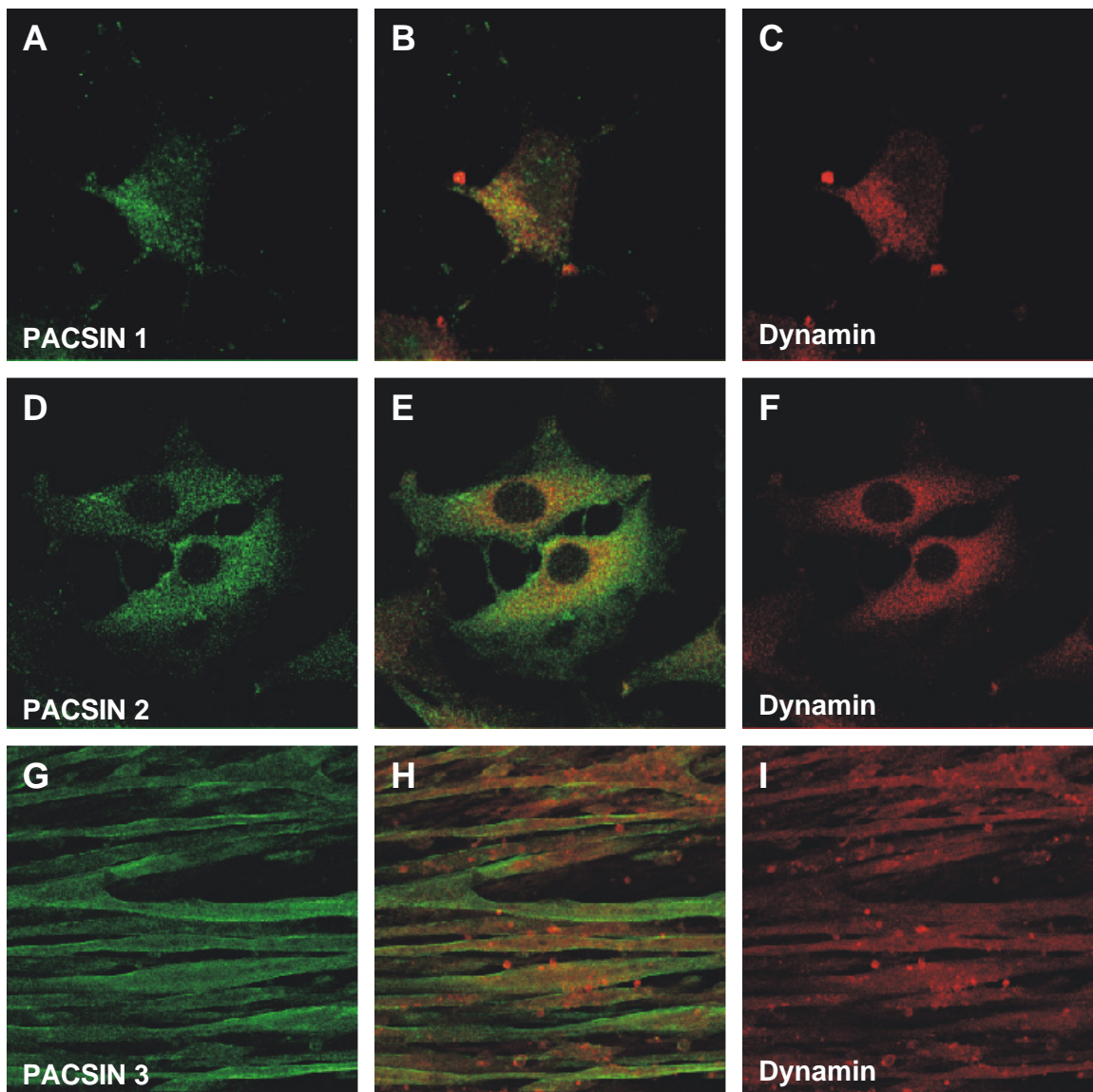


Abb. 29. Affinitätspräzipitation von PACSIN-Bindungspartnern. Sowohl immobilisierte GST-Fusionsproteine der Wildtyp-PACSINe und der Varianten mit mutierter SH3-Domäne (PACSIN 1 P434L, PACSIN 2 P478L und PACSIN 3 P415L) als auch GST allein wurden mit Maus-Hirn-Homogenat inkubiert und interagierende Proteine im Western Blot analysiert. Die Zahlen links geben die Laufhöhe der Signale in kDa an.

3.4.2.2 Intrazelluläre Colokalisation der Bindungspartner

Für eine Interaktion von Proteinen *in vivo* ist nicht nur deren Fähigkeit zur gegenseitigen Bindung nötig, sondern auch eine sich überschneidende Verteilung innerhalb der Zelle, so daß nicht nur biochemisch, sondern auch räumlich eine Interaktion der Proteine möglich ist. Nachdem *in vitro* eine Interaktion der PACSINe mit Dynamin, einem Schlüsselenzym der Vesikelbildung (Schmid et al., 1998), nachgewiesen wurde, sollte nun auch in Zellen überprüft werden, ob die Proteine, zumindest teilweise, colokalisiert sind. Dazu wurden die Expressionsmuster der Proteine durch konfokale Mikroskopie analysiert, wobei sich eine partielle Colokalisation aller PACSIN-Isoformen mit Dynamin zeigte (Abb. 30). Die PACSINe binden also nicht nur *in vitro* an Dynamin, sondern die Bindungspartner kommen in bestimmten Bereichen der Zellen auch in räumlicher Nähe vor, so daß eine Interaktion *in vivo* tatsächlich möglich wird. Dies ist ein weiterer wichtiger Hinweis auf eine mögliche Beteiligung der PACSINe beim intrazellulären Vesikeltransport.



bb. 30. Immunfluoreszenz-Analyse der endogenen Expressionsmuster der PACSINe im Vergleich zu Dynamin mittels konfokaler Mikroskopie. PACSIN 1 wurde in primären Hippocampus-Neuronen aus Ratte (A, B), PACSIN 2 in NIH 3T3 Fibroblasten (D, E) und PACSIN 3 in differenzierten C2-Myotuben (G, H) detektiert. Zum Vergleich wurde in den Zellen die endogene Dynamin-Verteilung (B, C, E, F, H, I) analysiert. Durch Überlagerung der beiden Signale (B, E, H) läßt sich eine Colokalisation der PACSINe mit Dynamin erkennen. Alle Bilder entsprechen einer Zellebene und wurden 32x gescannt. Die Spezifität der affinitätsgereinigten Antiseren gegen die PACSINe ist in Abb. 24 gezeigt.

Ein weiteres wichtiges Protein des Vesikeltransports ist Clathrin (Kirchhausen, 2000a), das bis zur Abschnürung des Vesikels gleichzeitig mit und in räumlicher Nähe zu Dynamin am Vesikel vorhanden ist. Jedoch konnte weder in der Affinitätspräzipitation eine Bindung an die PACSINe (Abb. 29), noch durch konfokale Mikroskopie (Abb. 31) eine deutliche Colokalisation nachgewiesen werden. Das in der Affinitätspräzipitation für Dynamin und Clathrin gefundene unterschiedliche Bindungsverhalten an die PACSINe läßt sich somit also auch durch die Immunfluoreszenz-Analyse bestätigen.

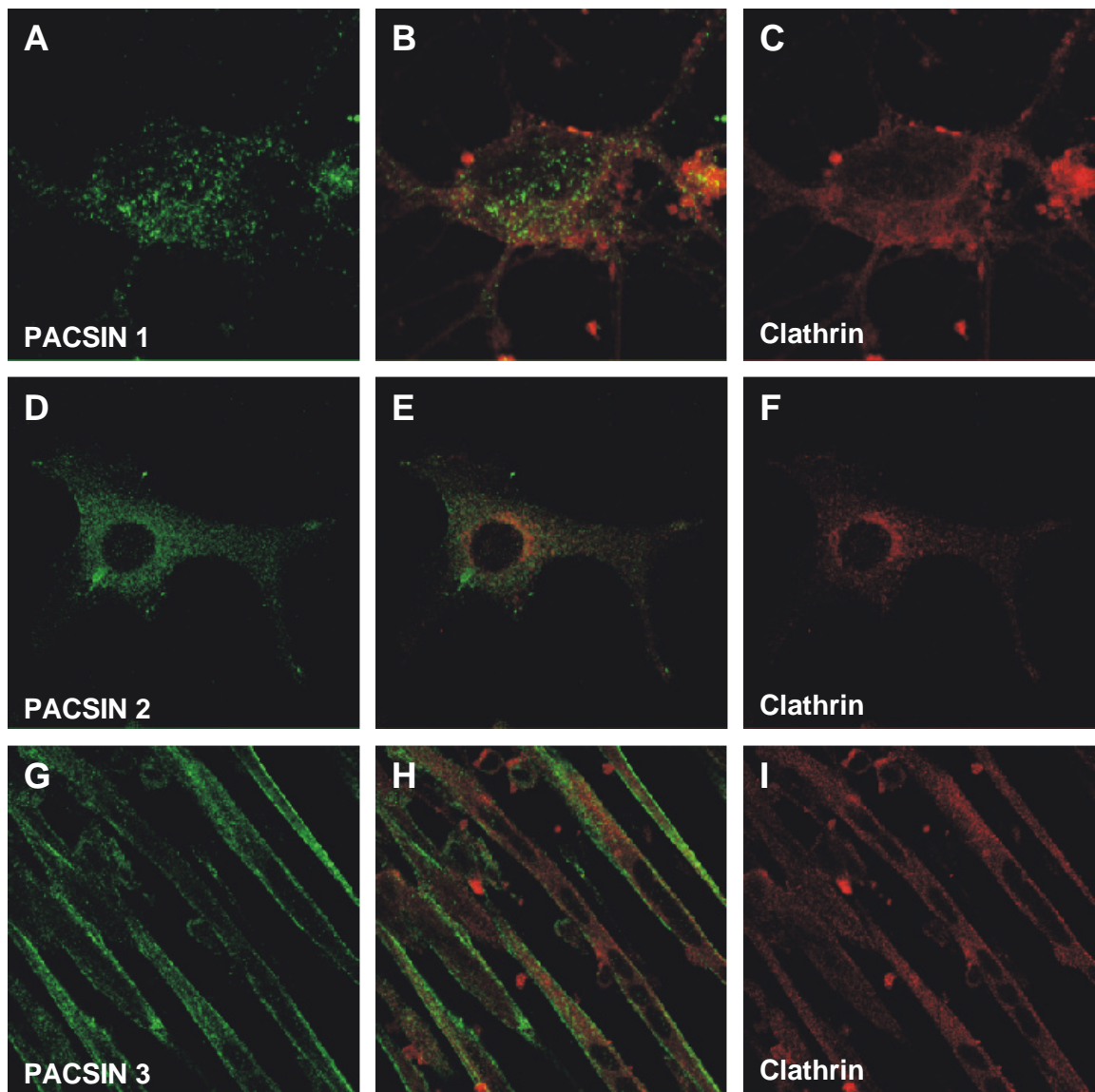


Abb. 31. Immunfluoreszenz-Analyse der endogenen Expressionsmuster der PACSINE im Vergleich zu Clathrin mittels konfokaler Mikroskopie. PACSIN 1 wurde in primären Hippocampus-Neuronen aus Ratte (A, B), PACSIN 2 in NIH 3T3 Fibroblasten (D, E) und PACSIN 3 in differenzierten C2-Myotuben (G, H) detektiert. Zum Vergleich wurde in den Zellen die endogene Clathrin-Verteilung (B, C, E, F, H, I) analysiert. Die Überlagerung der beiden Signale (B, E, H) läßt keine deutliche Colokalisation der PACSINE mit Clathrin erkennen. Alle Bilder entsprechen einer Zellebene und wurden 32x gescannt. Die Spezifität der affinitätsgereinigten Antiseren gegen die PACSINE ist in Abb. 24 gezeigt.

Eine Doppelfärbung der Zellen mit den anderen in der Affinitätspräzipitation ermittelten Bindungspartner war aufgrund der vorhandenen Erstantikörper nicht möglich, da bei einer Doppelfärbung die jeweiligen Antikörper aus unterschiedlichen Spezies stammen müssen.

3.4.2.3 Endocytose Assay

Wenn für eine Zellfunktion die zeitlich und konzentrationsabhängig regulierte Interaktion von Proteinen nötig ist, kann eine Überexpression eines der Partner diesen Prozeß stören. Durch Verschiebung des Bindungsgleichgewichts ist nicht mehr genug freies Protein vorhanden, um die Funktion unverändert ausüben zu können.

Simpson und Mitarbeiter (1999) zeigten für einige Proteine des Clathrin-vermittelten Vesikeltransports, die über ihre SH3-Domäne mit Dynamin interagieren, daß eine Überexpression ihrer SH3-Domänen den komplexen Vorgang der Vesikelabschnürung an unterschiedlichen und für das jeweilige Protein spezifischen Zwischenstufen stört. Eines der in dieser Arbeit untersuchten Proteine war Syndapin 1, das Rattenhomolog von PACSIN 1. Da die neuen PACSIN-Isoformen vergleichbare Bindungseigenschaften an die Proteine des Clathrin-vermittelten Vesikeltransports zeigen, sollte ein Endocytose Assay, der die Clathrin-vermittelte Aufnahme des Transferrin-Rezeptors analysiert, einen Einfluß von PACSIN 2 und 3 auf diesem Vorgang klären. Im Gegensatz zu der Studie von Simpson und Mitarbeitern wurden hier nicht die isolierten SH3-Domänen, sondern die Vollängen-Proteine und die Varianten mit mutierten SH3-Domänen untersucht, so daß bei einem möglichen Einfluß von PACSIN 2 und 3 auf die Transferrin-Aufnahme die SH3-Domäne als Interaktionsbereich analysiert werden kann.

Um in transfizierten Zellen nur die überexprimierten und nicht die endogenen Proteine zu detektieren, wurden sowohl Wildtyp-PACSIN 2 und 3 als auch die Varianten mit mutierten SH3-Domänen N-terminal mit einer Myc-Sequenz markiert (PACSIN 2 und PACSIN 2 P478L im pMyc-CMV, PACSIN 3 und PACSIN 3 P415L im pcDNA3 mit integrierter Myc-Sequenz). Diese PACSIN-Varianten wurden in NIH 3T3 Fibroblasten exprimiert und ein Einfluß auf die Clathrin-vermittelte Aufnahme des Transferrin-Rezeptors analysiert. Die Überexpression der Wildtyp-Proteine inhibiert die Endocytose mit einem Dosis-abhängigen Effekt, während eine vergleichbare Überexpression der mutierten Varianten keinen Einfluß auf diesen Vorgang hat (Abb. 32). Dies beweist nicht nur die Beteiligung der PACSIN-Isoformen am Clathrin-vermittelten Vesikeltransport, sondern grenzt zusätzlich die SH3-Domäne als alleinigen Interaktionsbereich für diesen Prozeß ein.

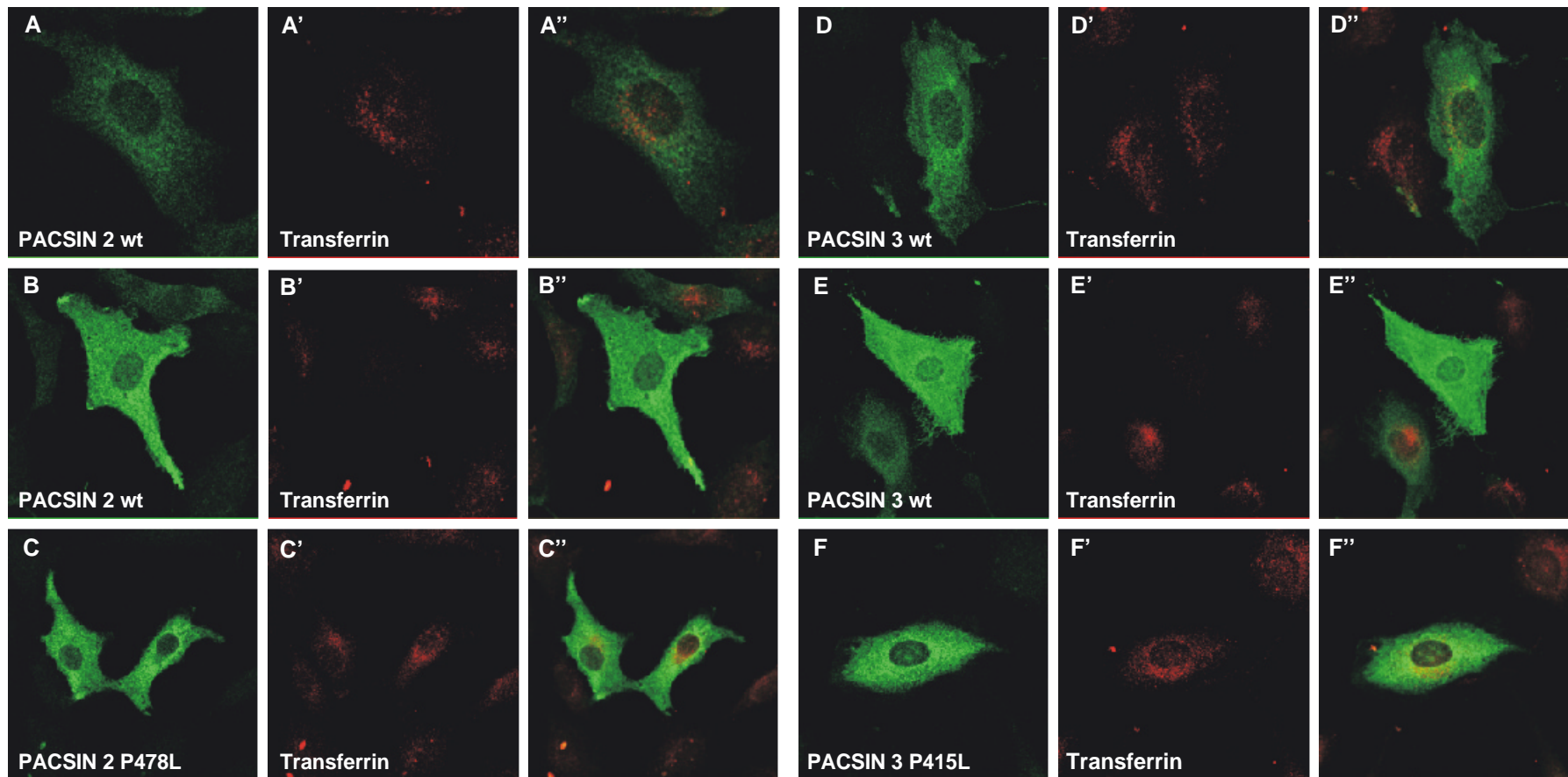


Abb. 32. Immunfluoreszenz-Analyse des Einflusses von Wildtyp-PACSIN 2 und 3 und der Varianten mit mutierten SH3-Domänen auf die Transferrin-Aufnahme. Eine Überexpression in NIH 3T3 der mit der Myc-Sequenz markierten PACSIN-Varianten zeigt einen dosisabhängigen Einfluß auf die Transferrin-Endocytose. Während bei geringer Expression von Wildtyp-PACSIN 2 (A, A'') und Wildtyp-PACSIN 3 (D, D'') Transferrin in die Zellen aufgenommen werden kann (A', A'', D', D''), blockiert eine hohe Expressionsrate der Wildtyp-PACSIN (B, B'' für PACSIN 2, E, E'' für PACSIN 3) die Transferrin-Endocytose (B', B'', E', E''). Eine vergleichbar starke Expression der PACSIN-Varianten mit mutierten SH3-Domänen (C, C'' für PACSIN 2 P478L, F, F'' für PACSIN 3 P415L) hingegen hat keinen erkennbaren Einfluß auf die Transferrin-Aufnahme (C', C'', F', F'').

Um die Dosisabhängigkeit des Effekts durch eine weitere Methode zu verifizieren, wurden von PACSIN 3 die Wildtyp- und die Variante mit mutierter SH3-Domäne (PACSIN 3 P415L) in den pDsRed1-N1-Vektor kloniert, so daß Fusionsproteine mit N-terminaler DsRed1-Markierung in NIH 3T3 Fibroblasten exprimiert werden konnten. Die Aufnahme des Transferrin-Rezeptors wurde durch FACS-Analyse quantitativ ausgewertet, wobei die Expression von DsRed1 allein als Negativkontrolle diente (Abb. 33). Auch hier beeinflussten geringe Mengen an PACSIN 3 die Transferrin-Endocytose kaum. Bei hohen Expressionsraten hingegen zeigten Zellen mit Wildtyp-PACSIN 3 im Gegensatz zu Zellen mit vergleichbaren Raten an PACSIN 3 mit mutierter SH3-Domäne (PACSIN 3 P415L) eine drastische Reduktion der Transferrin-Aufnahme.

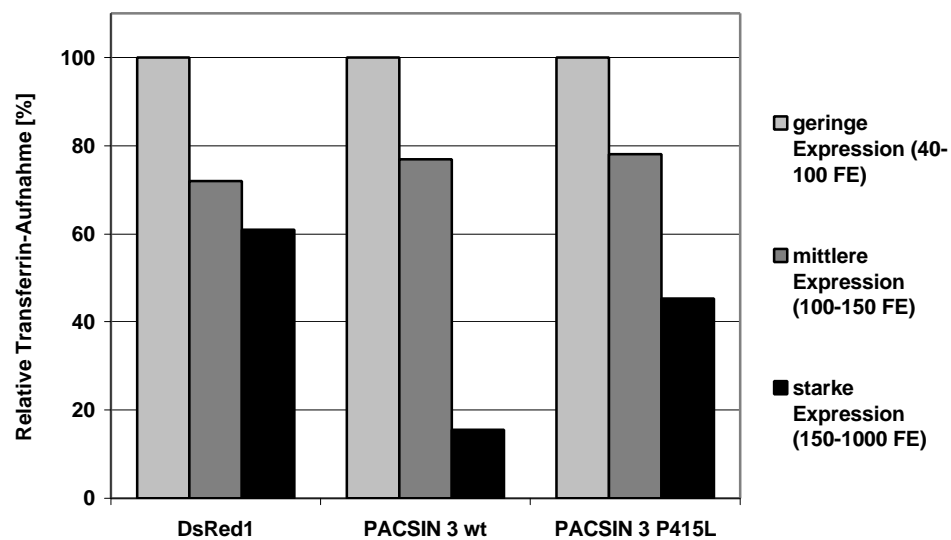


Abb. 33. FACS-Analyse des Einflusses von PACSIN 3 auf die Transferrin-Aufnahme. DsRed1-markiertes Wildtyp-PACSIN 3 (PACSIN 3 wt) und PACSIN 3 mit mutierter SH3-Domäne (PACSIN 3 P415L) sowie DsRed1 allein wurden in NIH 3T3 Fibroblasten exprimiert und die Transferrin-Aufnahme in Abhängigkeit von der Expressionsrate mittels FACS-Analyse ermittelt. Geringe (40-100 Fluoreszenz-Einheiten (FE)) und mittlere Expressionsraten (100-150 FE) der drei Proteine beeinflussen die Transferrin-Aufnahme nicht. Bei hohen Expressionsraten (150-1000 FE) ist nur Wildtyp-PACSIN 3 in der Lage, die Transferrin-Aufnahme drastisch zu reduzieren.

3.4.3 Interaktion mit 14-3-3-Proteinen

Beim Transport synaptischer Vesikel wird mittlerweile auch eine Regulation beteiligter Proteine über 14-3-3-Proteine diskutiert (Roth et al., 1999; Turner et al., 1999). Die Interaktion der 14-3-3-Proteine mit dem Bindungsmotiv (RSXSXP) in potentiellen Interaktionspartnern hängt von dessen Phosphorylierungszustand ab und erfolgt nur, wenn ein essentielles Serin phosphoryliert ist (Muslin et al., 1996). Da für das neurospezifische PACSIN 1 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine Phosphorylierung nachgewiesen werden konnte (Plomann et al., 1998), sollte durch Affinitätspräzipitation geklärt werden, ob die PACSINe mit 14-3-3-Proteinen interagieren. Dazu wurden GST allein sowie GST-Fusionsproteine von PACSIN 1, 2 und 3 aufgereinigt, an der Glutathion-Sepharose belassen und mit Maus-Hirn-Homogenat inkubiert. In einer Western Blot Analyse der in der Affinitätspräzipitation isolierten Bindungspartner konnte eine spezifische Bindung von 14-3-3-Proteinen an PACSIN 1, aber nicht an PACSIN 2 und 3 gezeigt werden (Abb. 34 A). Dies ist in Übereinstimmung mit Analysen der Proteinsequenzen der verschiedenen Isoformen, da die Consensus-Sequenz der 14-3-3-Protein-Bindungsstelle (Muslin et al., 1996) zwar in PACSIN 1, aber nicht in PACSIN 2 und 3 konserviert ist (Abb. 34 B), wobei in letzteren gerade das essentielle, phosphorylierbare Serin (in Abb. 34 B mit einem Stern markiert) durch Histidin ersetzt wurde.

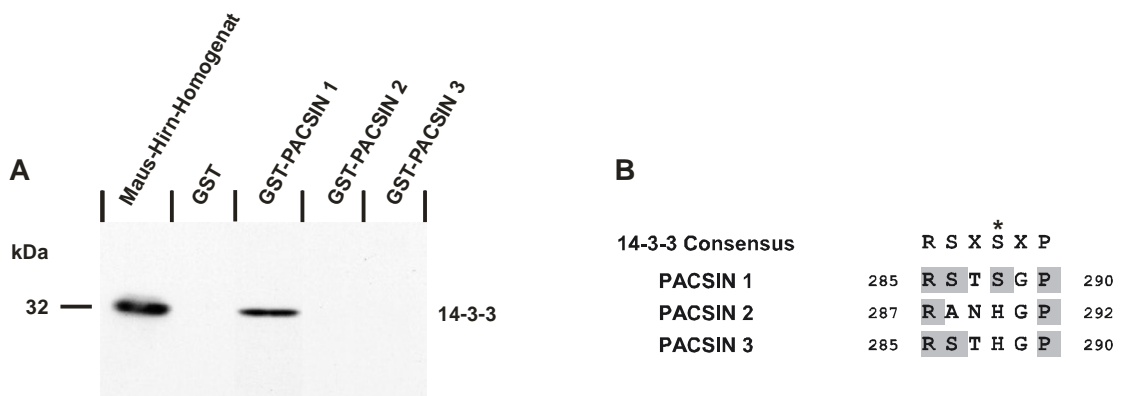


Abb. 34. PACSIN 1-spezifische Interaktion mit 14-3-3-Proteinen. (A) Nach Affinitätspräzipitation lassen sich im Western Blot 14-3-3-Proteine nur als Bindungspartner für PACSIN 1, nicht aber für PACSIN 2 und 3 nachweisen. Die Zahl links gibt die Laufhöhe des Proteins in kDa an. In (B) sind die Proteinsequenzen der PACSIN-Isoformen im Bereich der 14-3-3-Protein-Bindungsstelle im Vergleich zur Consensus-Sequenz dargestellt, das essentielle Serin ist mit einem Stern markiert. P, Prolin; R, Arginin; S, Serin; X, beliebige Aminosäure. Die Zahlen geben die Aminosäure-Positionen an.

3.5 Analyse der PACSIN 1-Phosphorylierung

Die exakten Regulationsmechanismen des Vesikeltransports sind bislang noch nicht geklärt, jedoch zeichnet sich gerade für den synaptischen Vesikeltransport eine Regulation über den Phosphorylierungszustand der beteiligten Proteine ab. Generell scheinen Kinasen wie PKC, CK2 und CaMKII an dieser Regulation beteiligt zu sein (Linás et al., 1985; Robinson et al., 1993; Cotlin et al., 1999; Turner et al., 1999). Für PACSIN 1, dem Maus-Homolog des an der Endocytose beteiligten Syndapin I aus Ratte, konnte bereits *in vivo* gezeigt werden, daß es sich um ein Phosphoprotein handelt (Plomann et al., 1998). Eine Computeranalyse der PACSIN 1-Proteinsequenz mit dem Pfskan-Programm (ISREC Bioinformatics Group) ergab drei potentielle Phosphorylierungsstellen für PKC an den Positionen T25, T310 und S402. Zusätzlich wurden ein potentiell phosphorylierbares Tyrosin (Y53) und sechs potentielle Phosphorylierungsstellen für CK2 (S4, S15, T86, S174, S345 und S358), jedoch keine Erkennungssequenz für CaMKII gefunden (Abb. 35).

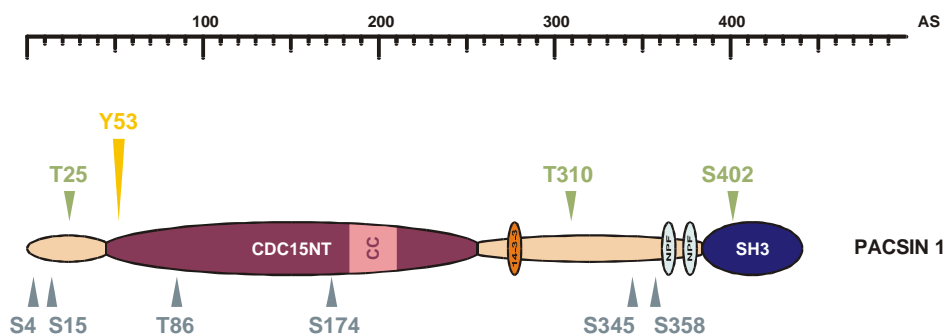


Abb. 35. Darstellung der für PACSIN 1 durch Computeranalyse gefundenen potentiellen Phosphorylierungsstellen. Die Erkennungsstellen mitsamt Aminosäureposition sind für CK2 (grau) unterhalb, für PKC (grün) und das potentiell phosphorylierte Tyrosin (gelb) oberhalb der Domänenstruktur von PACSIN 1 angegeben.

Vorabversuche mit Deletionsmutanten des PACSIN 1-Proteins ergaben, daß ein N-terminales Fragment von PACSIN 1 mit T25 durch PKC γ phosphoryliert wird, während der C-terminale Teil mit T310 und S402, aber nicht die SH3-Domäne mit S402 allein als *in vitro*-Substrat für PKC ζ dient. Mit den gleichen Fragmenten konnte eine Phosphorylierung von S4 und S15 durch CK2 ausgeschlossen werden, während der C-terminale Teil mit den verbleibenden vier Positionen ein *in vitro*-Substrat für CK2 darstellt (M. Plomann und M. Leitges, persönliche Mitteilung). Um im neurospezifischen PACSIN 1 die exakten Phosphorylierungsstellen durch *in vitro*-Experimente bestimmen zu können, wurden bereits früher die beiden potentiellen PKC-Phosphorylierungsstellen für PKC γ bei T25 und PKC ζ bei T310 durch gezielte Mutagenesen durch Alanine ersetzt (Ritter, 1997). Zusätzlich wurden nun die vier noch verbleibenden potentiellen Phosphorylierungsstellen für CK2 ebenfalls durch Mutagenesen in Alanine ausgetauscht (Abb. 36).

A	Wildtyp-Sequenz der PACSIN 1-cDNA von bp 436-467	5' - G GCG TGG GGC GCC ATG ATG ACA GAA GCA GAT A - 3'
	Wildtyp-Sequenz des PACSIN 1-Proteins von AS 80-89	A W G A M M T E A D
		3' - C CGC ACC CCG CGG TAC TAC TGT CTT CGT CTA T - 5'
	Sequenz des Mutationsprimers PACSIN 1 T86A	5' - G GCG TGG GGG GCC ATG ATG GCC GAA GCA GAT A - 3'
	Sequenz der PACSIN 1-cDNA nach der Mutagenese	5' - G GCG TGG GGG GCC ATG ATG GCC GAA GCA GAT A - 3'
	Sequenz des PACSIN 1-Proteins nach der Mutagenese	A W G A M M A E A D
		3' - C CGC ACC CCG CGG TAC TAC CGG GTT CGT CTA T - 5'
		Sfi I
B	Wildtyp-Sequenz der PACSIN 1-cDNA von bp 700-730	5' - C ATG ACC CGG GAG ATG AAC AGT AAG ACA GAG - 3'
	Wildtyp-Sequenz des PACSIN 1-Proteins von AS 168-177	M T R E M N S K T E
		3' - G TAC TGG GCC CTC TAC TTG TCA TTC TGT CTC - 5'
	Sequenz des Mutationsprimers PACSIN 1 S174A	5' - C ATG ACC CGC GAG ATG AAC GCT AAG ACA GAG - 3'
	Sequenz der PACSIN 1-cDNA nach der Mutagenese	5' - C ATG ACC CGC GAG ATG AAC GCT AAG ACA GAG - 3'
	Sequenz des PACSIN 1-Proteins nach der Mutagenese	M T R E M N A K T E
		3' - G TAC TGG GCG CTC TAC TTG CGA TTC TGT CTC - 5'
		Sma I
C	Wildtyp-Sequenz der PACSIN 1-cDNA von bp 1217-1249	5' - GAC CGT GGC AGT GTT AGC AGC TAT GAC CGA GGC - 3'
	Wildtyp-Sequenz des PACSIN 1-Proteins von AS 340-350	D R G S V S S Y D R G
		3' - CTG GCA CCG TCA CAA TCG TCG ATA CTG GCT CCG - 5'
	Sequenz des Mutationsprimers PACSIN 1 S345A	5' - GAC CGT GGC AGT GTT GCT AGC TAT GAC CGA GGC - 3'
	Sequenz der PACSIN 1-cDNA nach der Mutagenese	5' - GAC CGT GGC AGT GTT GCT AGC TAT GAC CGA GGC - 3'
	Sequenz des PACSIN 1-Proteins nach der Mutagenese	D R G S V A S Y D R G
		3' - CTG GCA CCG TCA CAA CGA TCG ATA CTG GCT CCG - 5'
		Nhe I
D	Wildtyp-Sequenz der PACSIN 1-cDNA von bp 1253-1285	5' - ACA TAT GCC ACC GAG TGG TCA GAC GAT GAG AGC - 3'
	Wildtyp-Sequenz des PACSIN 1-Proteins von AS 352-362	T Y A T E W S D D E S
		3' - TGT ATA CGG TGG CTC ACC AGT CTG CTA CTC TCG - 5'
	Sequenz des Mutationsprimers PACSIN 1 S358A	5' - ACA TAT GCC ACC GAA TGG GCA GAC GAT GAG AGC - 3'
	Sequenz der PACSIN 1-cDNA nach der Mutagenese	5' - ACA TAT GCC ACC GAA TGG GCA GAC GAT GAG AGC - 3'
	Sequenz des PACSIN 1-Proteins nach der Mutagenese	T Y A T E W A D D E S
		3' - TGT ATA CGG TGG CTT ACC CGT CTG CTA CTC TCG - 5'
		Dra III

Abb. 36. Darstellung der Wildtypsequenz, der verwendeten Primer und der resultierenden Mutationen in PACSIN 1 bei der Mutagenese der potentiellen Phosphorylierungsstellen für CK2. (A) zeigt den Austausch T86A, (B) den Austausch S174A, (C) den Austausch S345A und (D) den Austausch S358A. Die veränderten Basen und Aminosäuren sind grau unterlegt, eingeführte oder veränderte Restriktionschnittstellen sind unterstrichen und Restriktionsenzyme unterhalb der entsprechenden Sequenz angegeben.

Die verschiedenen PACSIN 1-Varianten wurden mit durchgehendem Leseraster in den pGEX-3X-Vektor hinter die GST-Sequenz kloniert und die bakteriell exprimierten Proteine nach Herstellerangaben aufgereinigt. Mit diesen Fusionsproteinen sowie GST als Kontrolle wurden *in vitro*-Phosphorylierungen mit CK2, PKC ζ und einem Gemisch der konventionellen PKCs (α , β und γ) durchgeführt.

3.5.1 *In vitro*-Phosphorylierung durch konventionelle PKCs

Die durch die Computeranalyse vorhergesagte Phosphorylierung von PACSIN 1 durch PKC an T25 konnte durch *in vitro*-Phosphorylierung mit einem Gemisch der konventionellen PKCs (α , β und γ) bestätigt werden. Zwar lassen sich die Signale für das phosphorylierte Vollängen-PACSIN 1-Protein und die autophosphorylierten PKCs aufgrund ihrer sehr ähnlichen Molekulargewichte nicht durch SDS-PAGE trennen, es gibt aber ein spezifisches Degradationsprodukt von GST-PACSIN 1, daß nur bei Wildtyp-PACSIN 1 und PACSIN 1 T310A (potentielle PKC ζ -Mutante) phosphoryliert wird, nicht aber, wenn T25 allein oder zusammen mit T310 zu Alanin mutiert ist (Abb. 37).

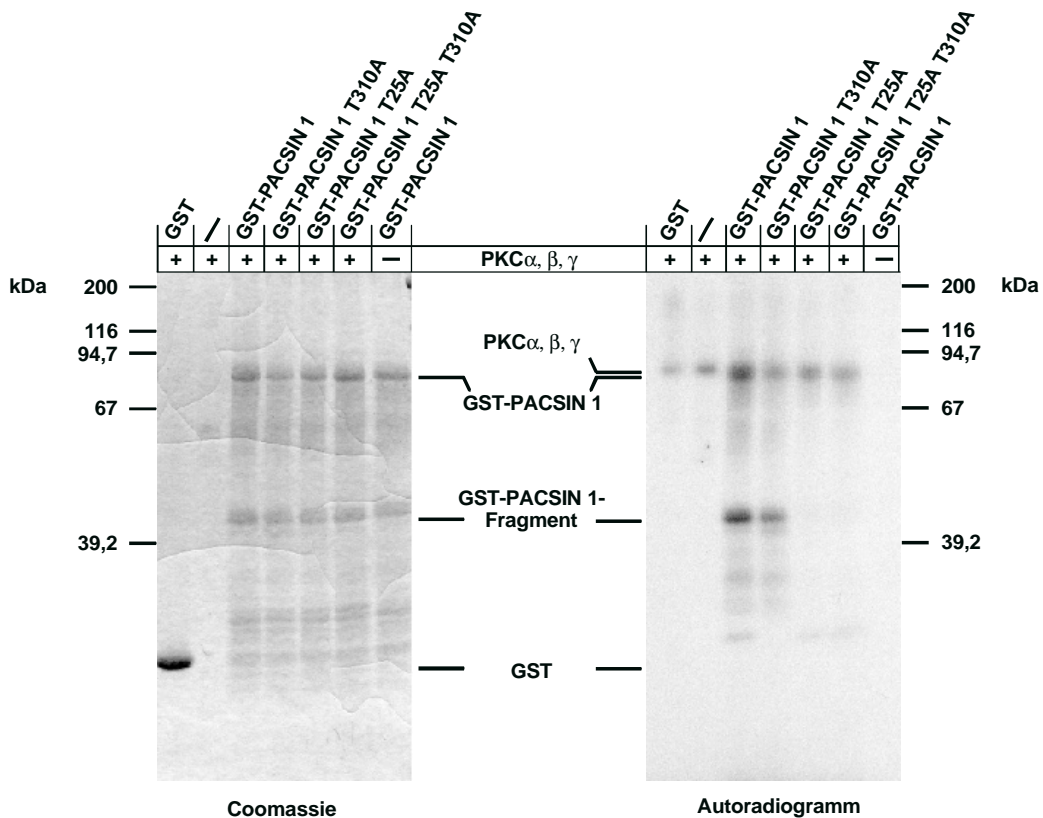


Abb. 37. *In vitro*-Phosphorylierung von GST-PACSIN 1 und verschiedenen Phosphorylierungsmutanten durch konventionelle PKCs (PKC α , β und γ). Der linke Teil der Abbildung zeigt das Coomassie-gefärbte Acrylamidgel, mit dem die Reaktionsansätze durch SDS-PAGE aufgetrennt wurden, der rechte Teil ist der entsprechende Bereich des Autoradiogramms. Die Zahlen rechts und links geben die Laufhöhe der Proteine im Größenstandard in kDa an, die Beschriftungen in der Mitte verweisen auf die Laufhöhen der angezeigten Proteine.

Da die Fusionsproteine über das N-terminale GST aufgereinigt wurden, ist es sehr wahrscheinlich, dass dieses Degradationsfragment GST und den N-terminalen Teil von PACSIN 1 beinhaltet, so daß auch die bei T25 sehr N-terminal gelegene PKC γ -Phosphorylierungsstelle in diesem Fragment enthalten ist. In den Kontrollen des Versuchs, einerseits GST allein mit den Kinasen, andererseits GST-PACSIN 1 ohne Kinasen, kommt es zu keiner unspezifischen Phosphorylierung (Abb. 37).

3.5.2 *In vitro*-Phosphorylierung durch PKC ζ

Bei der *in vitro*-Phosphorylierung von PACSIN 1 durch PKC ζ konnte eine Phosphorylierung des Vollängen-Proteins nachgewiesen werden. Allerdings müssen das durch Computeranalyse vorhergesagte T310 und das als PKC γ -Phosphorylierungsstelle identifizierte T25 als Phosphorylierungsstellen für PKC ζ ausgeschlossen werden, da keine der mutierten Varianten einen Unterschied im Vergleich zum phosphorylierten Wildtyp-PACSIN 1 zeigt. Eine unspezifische Phosphorylierung des Fusionsproteins über die GST-Markierung kann ebenfalls ausgeschlossen werden, da GST allein nicht phosphoryliert wird, ebenso zeigt GST-PACSIN 1 selbst keine Kinaseaktivität, die zu einem unspezifischen Signal führen könnte. Aufgrund der leicht unterschiedlichen Molekulargewichte konnten bei diesem Versuch die Signale durch die Autophosphorylierung der Kinase durch SDS-PAGE von den PACSIN 1-spezifischen Signalen getrennt werden (Abb. 38).

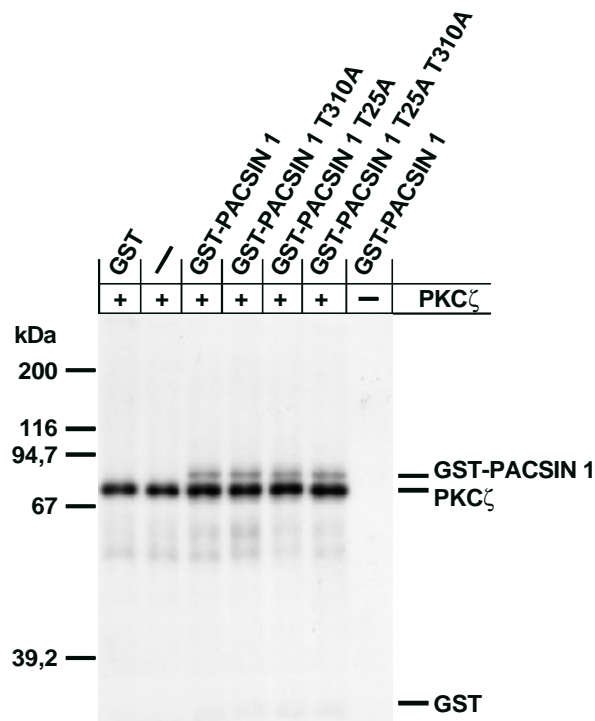


Abb. 38. Autoradiogramm der *in vitro*-Phosphorylierung von GST-PACSIN 1 und verschiedener Phosphorylierungsmutanten durch PKC ζ . Die Zahlen links geben die Laufhöhe der Proteine im Größenstandard in kDa an, die Beschriftungen rechts verweisen auf die Laufhöhen der angezeigten Proteine.

3.5.3 *In vitro*-Phosphorylierung durch CK2

PACSIN 1 wird *in vitro* ebenfalls durch CK2 phosphoryliert, wobei für die mutierten Protein-Varianten das durch die Phosphorylierung hervorgerufene Signal im Vergleich zu Wildtyp-PACSIN 1 reduziert ist (Abb. 39). Da dies bei allen vier Varianten der Fall ist, könnte dies bedeuten, daß PACSIN 1 an allen Stellen gleichzeitig phosphoryliert wird. Es muß von einer Phosphorylierung an mindestens zwei Stellen ausgegangen werden, da der Austausch einer einzelnen potentiellen Phosphorylierungsstelle die *in vitro*-Phosphorylierung durch CK2 nicht unterbindet. Für eine genaue Bestimmung aller genutzten Stellen müßten entsprechende Doppel- und Dreifach-Mutanten und die Vierfachmutante mit CK2 getestet werden. Auch bei diesem Versuchsansatz können unspezifische Signale durch eine Phosphorylierung von GST allein oder durch eine Kinaseaktivität von PACSIN 1 ausgeschlossen werden. Zusätzlich konnten hier die Signale durch die Autophosphorylierung der Kinase deutlich von den PACSIN 1-spezifischen Signalen durch SDS-PAGE getrennt werden (Abb. 39).

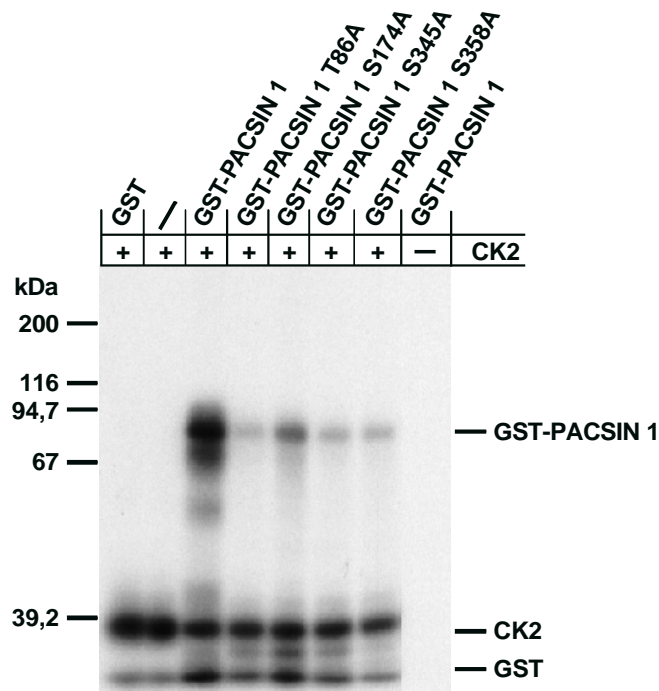


Abb. 39. Autoradiogramm der *in vitro*-Phosphorylierung von GST-PACSIN 1 und verschiedener Phosphorylierungsmutanten durch CK2. Die Zahlen links geben die Laufhöhe der Proteine im Größenstandard in kDa an, die Beschriftungen rechts verweisen auf die Laufhöhen der angezeigten Proteine.

3.5.4 Tyrosin-Phosphorylierung

Aufgrund des in der Computeranalyse als potentielle Phosphorylierungsstelle angegeben Y53 wurde versucht, eine Tyrosin-Phosphorylierung von PACSIN 1 durch anti-Phospho-Tyrosin-Antikörper (PY20) im Western Blot nachzuweisen. Aus dem Lysat PACSIN 1-exprimierender NIH 3T3 Fibroblasten erfolgte eine Immunpräzipitation von PACSIN 1 oder von Phospho-Tyrosin-Proteinen. Nach Auftrennung durch SDS-PAGE gelang im Western Blot bisher aber weder ein eindeutiger Nachweis von PACSIN 1 unter den präzipitierten Phospho-Tyrosin-Proteinen, noch konnte unzweifelhaft eine Tyrosin-Phosphorylierung des immunpräzipitierten PACSIN 1 detektiert werden. Obwohl in dem untersuchten System keine Tyrosin-Phosphorylierung nachgewiesen wurde, könnte diese durchaus in anderen Zellen (z.B. Neuronen) oder nur unter bestimmten Bedingungen wie z.B. Differenzierung vorhanden sein.

3.6 Funktionale Analyse der potentiellen CDC15-NT-Domäne

3.6.1 Oligomerisierung der PACSINe

Nahezu die gesamte N-terminale Hälfte der PACSINe wird von der sogenannten CDC15-NT-Domäne eingenommen, einer in der Genbank (PROSITE Datenbank, Bucher und Bairoch, 1994) beschriebenen Domäne, für die bisher keine Funktion bekannt ist. Eine Computeranalyse der verschiedenen PACSIN-Proteinsequenzen mit den Coil- und Paircoil-Programmen (Lupas et al., 1991; Berger et al., 1995) erkennt innerhalb der CDC15-NT-Domäne eine potentielle coiled-coil Region, über die Proteine häufig Homo- oder Heterooligomere bilden. Da mit Hilfe des Two-Hybrid Systems mit PACSIN 3 ein Fragment von PACSIN 1 aus der Hirn-Bank isoliert werden konnte, das den größten Teil dieses coiled coil-Bereichs enthält, war dies ein erster Hinweis für eine Oligomerisierung der PACSINe.

Um die Möglichkeit einer Oligomerisierung zu testen, wurden die PACSIN-Isoformen sowohl in den pAS2-1- als auch in den pACT2-Vektor des Hefe Two-Hybrid Systems kloniert und die Fusionsproteine gegeneinander getestet. In diesem Versuch zeigte sich, daß alle Isoformen sowohl mit sich selbst als auch untereinander interagieren können (Abb. 40 A).

Zur Verifizierung dieses Ergebnisses wurden die PACSIN-Isoformen als bakterielle GST-Fusionsproteine aufgereinigt und ein Teil dieser Proteine biotinyliert. Mit den nicht-markierten Proteinen wurde eine Mikrotiterplatte beschichtet und die biotinylierten Proteine als Liganden eingesetzt. Durch Nachweis der Biotin-Markierung mittels Streptavidin-gekoppelter Peroxidase konnte gezeigt werden, daß jedes PACSIN mit annähernd gleicher Affinität sowohl an sich selbst als auch an die jeweils anderen Isoformen binden kann (Abb. 40 B). Somit sind die PACSINe in der Lage, sowohl Homo- als auch Heterooligomere zu bilden, wobei eine Beteiligung des coiled coil-Bereichs sehr wahrscheinlich ist.

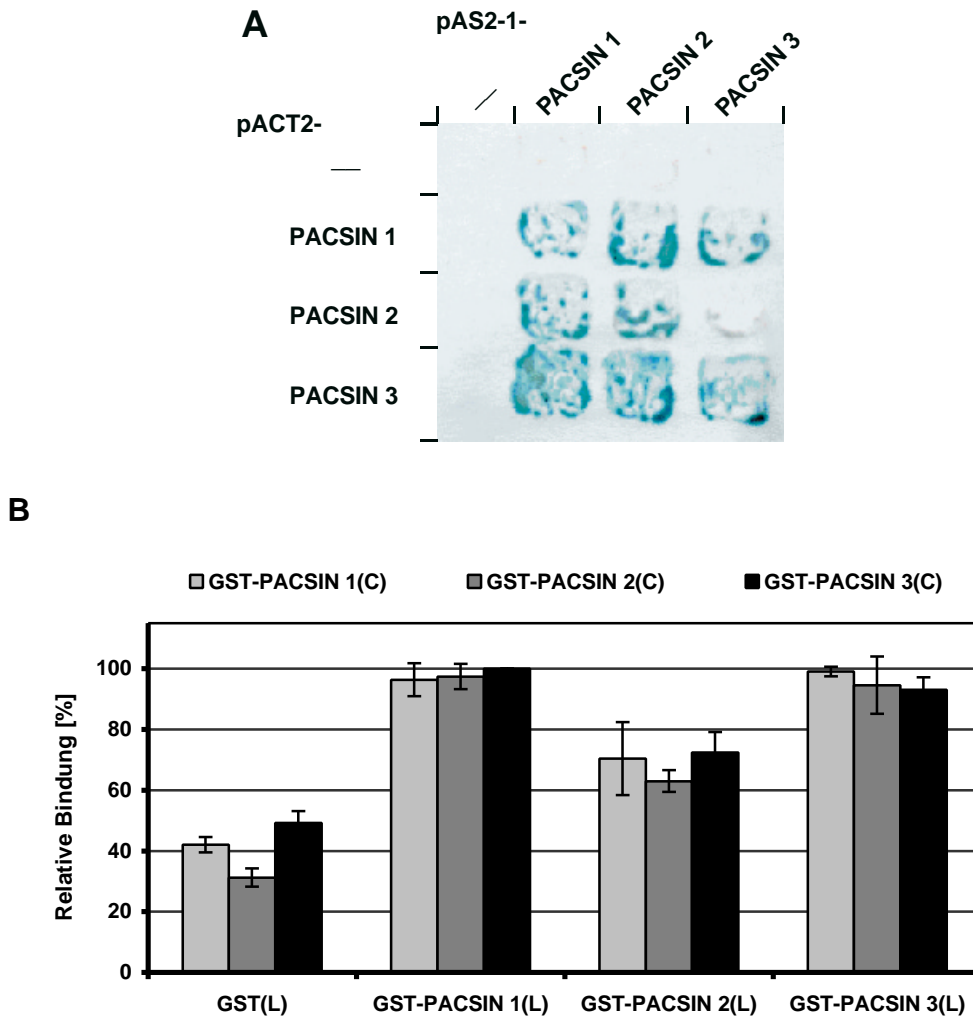


Abb. 40. Oligomerisierung der PACSINe. (A) Im Hefe Two-Hybrid System kann eine Interaktion der PACSIN-Isoformen durch einen β -Gal-Test gezeigt werden. (B) In einem Enzym-gekoppelten Immunnachweis (ELISA) binden die PACSINe mit annähernd gleicher Affinität sowohl an sich selbst als auch an die anderen Isoformen. Für diesen Versuch wurde eine Mikrotiterplatte mit GST-Fusionsproteinen von PACSIN 1, 2 und 3 beschichtet (GST-PACSIN 1(C), GST-PACSIN 2(C) und GST-PACSIN 3(C)) und die Bindung von biotinyliertem GST sowie der biotinylierten GST-PACSIN-Isoformen (GST(L), GST-PACSIN 1(L), GST-PACSIN 2(L) und GST-PACSIN 3(L)) detektiert.

3.6.2 Mutationsanalyse der potentiellen CDC15-NT-Domäne

Vergleicht man die CDC15-NT-Domänen der PACSINe untereinander und mit denen anderer Proteine, sind in diesem Bereich einige Aminosäuren in allen diesen Proteinen konserviert. Dies ist nicht nur bei verschiedensten PACSIN-Homologen aus unterschiedlichen Spezies wie Mensch, Maus, Ratte, Huhn, *Xenopus*, *Drosophila* und *Ecchinococcus* der Fall, sondern die Homologie umfaßt auch entfernt verwandte Proteine wie PSTPIP und PSTPIP2 aus Maus (Spencer et al., 1997; Wu et al., 1998) und deren humanes Homolog CD2BP1 (Li et al., 1998, Abb. 41).

hPAC SIN 3	45	ERARTEKAMAQQQLADWARKWRGTVKEKGPYGTLEKAWHAFFTAERLSALHLEVRKELQGDSESRVRAWQRGAFHRPVLG
mPAC SIN 3	45	ERARTEKAMAQQQLADWARKWRGAVEKGPYGTLEKAWHAFFTAERLSALHLEVRKELHGPDSERVRTWQRGAFHRPVLG
mPAC SIN 1	45	ERAKTEKAMAQQQLTDWAKRWRQLIEKGPYGSLEAWGAMMTEADKVSELHQEVKNSLNEDELEKVNWQKDAYHKQIMG
Syndap in I	45	ERAKTEKAMAQQQLTDWAKRWRQLIEKGPYGSLEAWGAMMTEADKVSELHQEVKNSLNEDELEKVNWQKDAYHKQIMG
hPAC SIN 1	38	ERAKTEKAMAQQQLTDWAKRWRQLIEKGPYGSLEAWGAIMTEADKVSELHQEVKNSLNEDELEKVNWQKDAYHKQIMG
Syndap in II	47	ERARTEKAMAQQQLTEWARRWRQLVEKGPYGTVEKAWMAVMSEAEKRVSELHLEVKASLMNEDFEKIKNWQKEAFHKQMMG
mPAC SIN 2	47	ERARTEKAMAQQQLTEWARRWRQLVEKGPYGTVEKAWIAVMSEAEKRVSELHLEVKASLMNEDFEKIKNWQKEAFHKQMMG
hPAC SIN 2	47	ERARTEKAMAQQQLTEWARRWRQLVEKGPYGTVEKAWMAFMSEAEKRVSELHLEVKASLMNDDFEKIKNWQKEAFHKQMMG
FAP52	47	ERARTEKAMAQQQLTEWAKRWRQLVEKGPYGTVERAWCAFMSAEKRVSELHLEVKASLMNEDFEKIKNWQKEAFHKQMMG
xPAC SIN	47	ERARTEKAMAQQQLTEWAKRWRQLVERGPYGTVEKAWHNLMTAEKRVSELHLEVKASLMNEDFEKIKNWQKEAFHKQMMG
dPAC SIN	424	BRADTEKMAKSLRSTWSKKWGLIEKGPYGTTEAAWKVLTSEKISDVHMKIKDNLCNDVNSQIKTWQKENYHHTLM
ePAC SIN	4	BRADTEKMAKSLRKFARLEMLFRGTVEYGTATNLLSGLAKEAEDNAELHNSIAAGLINPVQLGKKNWQRENPFHKSSIS
mPSTPIP2	44	ERASIEKVKGLDNLNLSRK...KPCGQSEINTLKRALVEFKQVDNVAQCHIQLAQLTLREEAR...MEEFREKQK.....
CD2BP1	45	QRAQAERMGKELVQIARK...AG.GQTEINSLRASFDLSLQKQMVNVSQSHIQLALTLREELRS...LEEFREKQK.....
mPSTPIP	45	QRAQAERMGKELVQIARK...AG.GQTEMNSLRSTFSDLSKQQTENVGSAHIQLALTLREELRS...LEEFREKQK.....
hPAC SIN 3	125	.GFRESRAEDGFRKAQKPWLKRLKEVEASKSYHAARKDEKTAQTRESHAKADSAVSQELKRLKQERVERCAKEAEKTK
mPAC SIN 3	125	.GFRESRAEDGFRKAQKPWLKRLKEVEASKSYHTARKDEKTAQTRESHAKADSSMSQELKRLKQERVRCTKEAEKMK
mPAC SIN 1	125	.GFKETKEAEDGFRKAQKPWAKKMKLEEAAKKAYHLACKEEERLAMTREMNKTEQSVTPPEQKRLVDKVDKCRQDVQKQTQ
Syndap in I	125	.GFKETKEAEDGFRKAQKPWAKKMKLEEAAKKAYHLACKEEERLAMTREMNKTEQSVTPPEQKRLVDKVDKCRQDVQKQTQ
hPAC SIN 1	118	.GFKETKEAEDGFRKAQKPWAKKMKLEEAAKKAYHLACKEEERLAMTREMNKTEQSVTPPEQKRLVDKVDKCKQDVQKQTQ
Syndap in II	127	.GFKETKEAEDGFRKAQKPWAKKLEVEAACKAHHTACKEEKLAISREANSKADPSLNPEQLKRLQDKIEKCKQDVQKTK
mPAC SIN 2	127	.GFKETKEAEDGFRKAQKPWAKKLEVEAACKAHHTACKEEKLAISREANSKADPSLNPEQLKRLQDKIEKCKQDVQKTK
hPAC SIN 2	127	.GFKETKEAEDGFRKAQKPWAKKLEVEAACKAHHTACKEEKLAISREANSKADPSLNPEQLKRLQDKIEKCKQDVQKTK
FAP52	127	.GFKETKEAEDGFRKAQKPWAKKLEVEAACKAHHTACKEEKLAISREANSKADPSLNPEQLKRLQDKIEKCKQDVQKTK
xPAC SIN	127	.GFKETKEAEDGFRKAQKPWAKKLEVEAACKAHHTACKEEKLAISREANSKADPSLNPEQLKRLQDKIEKCKQDVQKTK
dPAC SIN	503	.QIKERDLEDLFKKAQKPWAKKLAKEVAKADYHSACKTERSATNQERNANADSSLSQDQVKMMDHRVQKTKDQVQKCR
ePAC SIN	84	TSIKEVKNFDFSEFNAQKTFWYKHYKNVNCCKEYFHACKTVRSLQVQVQNAKNEPFPTEPKRLKIEDKLRKGMEEKTR
mPSTPIP2	114	...LQRKKTETIMDAAHKORNAQFKKAMDARKNYEQKCRDK...DDEAEQAVHRSANVANQRQKELFVKLATSKTAVEDSD
CD2BP1	114	...EQRKKEAVMDRVQKSKLSLYKKAMESKTYEQKCRDA...DDAEQAFERISANGHQKQVBSQNKARQCKDSATEAE
mPSTPIP	114	...EQRKKEAIDMDRVQKSKLSLYKKTMSKAYDQKCRDA...DDAEQAFERVSANGHQKQVBSQNKARQCKESATEAE
hPAC SIN 3	204	AQVEQTLAELHRYTPRYMEDMEQAFETCQAARQRLLFFKDMLLTLHQHLDLS
mPAC SIN 3	204	TQVEQTLAELNRYTPRYMEDMEQAFESCQAARQRLLFFKDVLLTLHQHLDLS
mPAC SIN 1	204	EKYEVLEEDVGKTPPYMEGMEQVFEQCQQFBEKRLVFLKEVLLD IKRHLNLA
Syndap in I	202	EKYEVLEEDVGKTPPYMEGMEQVFEQCQQFBEKRLVFLKEVLLD IKRHLNLA
hPAC SIN 1	197	EKYEVLEEDVGKTPPYMENMEQVFEQCQQFBEKRLVFLKEVLLD IKRHLNLA
Syndap in II	206	DKYEKALKELDQTPPYMENMEQVFEQCQQFBEKRLRFFREVLLVQKHLNLS
mPAC SIN 2	206	DKYEKSLKELDQTPPYMENMEQVFEQCQQFBEKRLRFFREVLLVQKHLNLS
hPAC SIN 2	206	EKYEKSLEKELDQTPPYMENMEQVFEQCQQFBEKRLRFFREVLLVQKHLNLS
FAP52	206	AKYEKSLKELDNATPYMENMEQVFEQCQQFBEKRLRFFREVLLVQKHLNLS
xPAC SIN	206	EKYEKSLEKLDLGGTPPYMENMEQVFEQCQQFBEKRLRFFREVLLVQKHLNLS
dPAC SIN	582	EKYEQAIAEITKYNVYIEDMTSVFEKCTPBEKTRLQFFKEILFNVHSCLDLT
ePAC SIN	164	KAYEALSSLSDVTPRYIEDMTQVFNKAQAFBRERILYFKEQALQMQEVLDIS
mPSTPIP2	189	KAYMLHINMLEKVRREDWQSEHIKACEVFEAQDCERINFFRNALWLHLNLSQ
CD2BP1	189	RVYRQSIQLEKVRAEWEQEHRTTCEAFQLEBFDRLTILRNALWVHNSQLSMQ
mPSTPIP	189	RVYRQNIQLELRRARTEWEQEHRTTCEAFQLEBFDRLTILRNALWVHCNLSMQ

Abb. 41. Vergleich der Aminosäuresequenzen im Bereich der CDC15-NT-Domäne für die PACSIN-Proteine aus Mensch (hPAC SIN 1, 2 und 3), Maus (mPAC SIN 1, 2 und 3), Ratte (Syndap in I, Homolog zu PACSIN 1; Syndap in II, Homolog zu PACSIN 2), Huhn (FAP52), *Xenopus* (xPAC SIN), *Drosophila melanogaster* (dPAC SIN) und *Echinococcus* (ePAC SIN) sowie entfernt verwandter Proteine aus Maus (mPSTPIP und mPSTPIP2) und Mensch (CD2BP1). Konservierte Aminosäuren aller Proteine sind weiß auf schwarzem Hintergrund dargestellt, Punkte in den Proteinsequenzen verdeutlichen Lücken, die für eine bessere Übereinstimmung eingeführt wurden. Die Zahlen links geben die Position der Aminosäuren an.

Um einen Hinweis auf die Funktion dieser Domäne zu erhalten, wurden drei dieser hochkonservierten Aminosäuren in PACSIN 3 aufgrund ihrer Lage und chemischen Eigenschaften ausgesucht und mutiert (Abb. 42). Zum einen wurde das Tyrosin an Position 53 gegen Alanin (Y53A) ausgetauscht, da es der für PACSIN 1 in der Computeranalyse gefundenen potentiellen Phosphorylierungsstellen entspricht. Desweiteren wurde das Histidin an Position 95 in Glutaminsäure (H95E) ausgetauscht, da Histidine aufgrund des pI-Werts ihrer Seitenkette häufig für enzymatische Reaktionen essentiell sind (Voet und Voet, 1995). Zusätzlich wurde das Glutamin an Position 184 in Phenylalanin (Q184F) ausgetauscht, da es am Anfang des potentiellen coiled coil-Bereichs liegt.

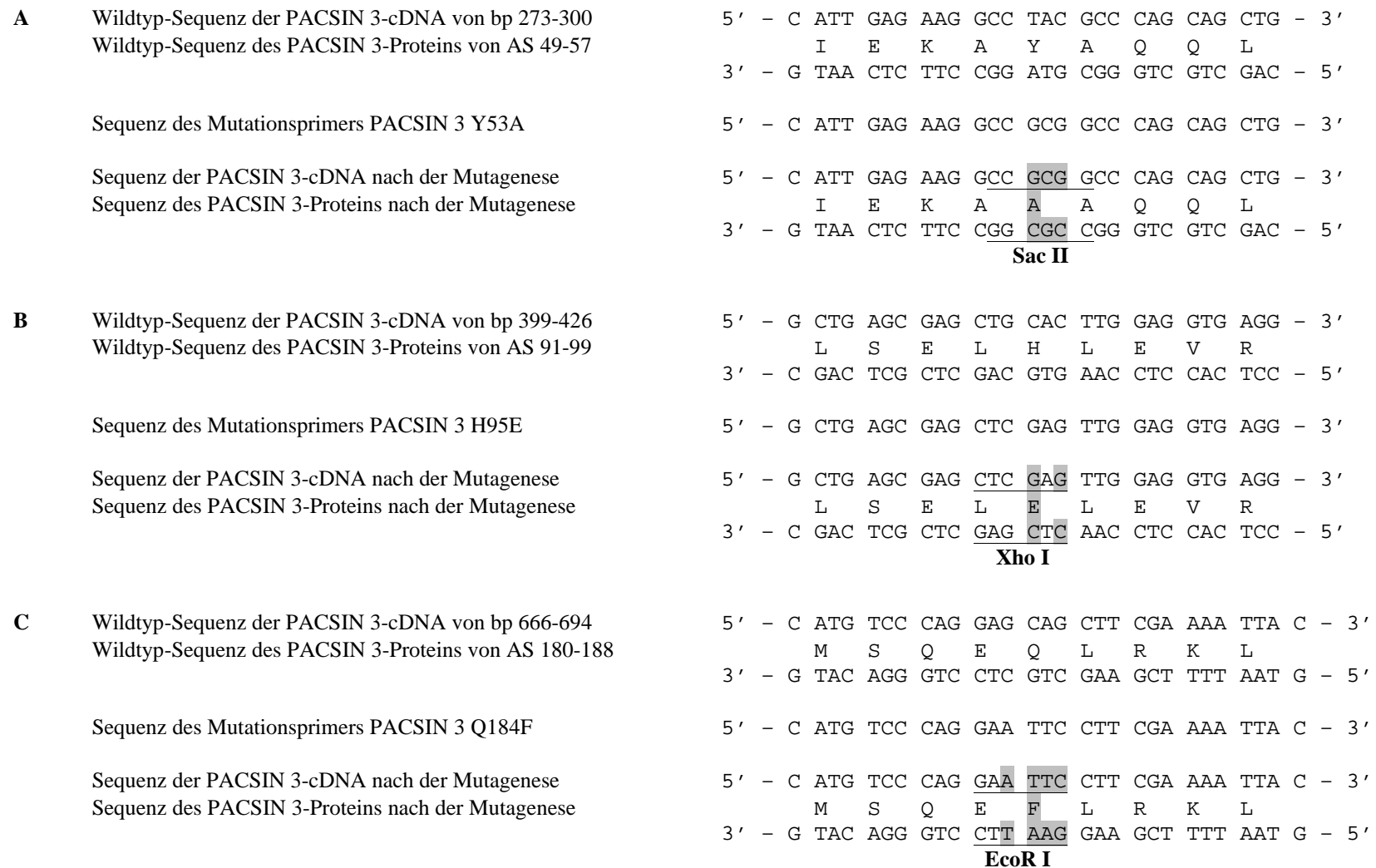


Abb. 42. Darstellung der Wildtypsequenz, der verwendeten Primer und der resultierenden Mutationen in der CDC15-NT-Domäne für PACSIN 3. (A) zeigt die Mutation Y53A, (B) die Mutation H95E und (C) die Mutation Q184F. Die veränderten Basen und Aminosäuren sind grau unterlegt, eingeführte oder veränderte Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen und Restriktionsenzyme unterhalb der entsprechenden Sequenz angegeben.

3.6.2.1 Eigenschaften der PACSIN 3 CDC15-NT-Mutante

Um einen möglichen Einfluß der eingeführten Mutationen auf die Lokalisation von PACSIN 3 in Zellen und mögliche Auswirkungen auf das Zellverhalten analysieren zu können, wurde die CDC15-NT-Mutante mit durchgehendem Leseraster in den pcDNA3-Vektor mit integrierter Myc-Sequenz kloniert und parallel mit einem entsprechenden PACSIN 3-Wildtyp-Konstrukt in NIH 3T3 Fibroblasten exprimiert. Für diesen Versuch wurden Fibroblasten benutzt, da diese aufgrund ihrer Größe und ihrer flachen Form bessere Aussagen über die Lokalisation innerhalb der Zelle zulassen. Außerdem sind NIH 3T3 ein für PACSIN 3 geeignetes Zellsystem, da im Western Blot eine endogene, wenn auch schwache PACSIN 3-Expression detektiert werden kann (Abb. 24).

PACSIN 3 mit mutierter CDC15-NT-Domäne lokalisiert in punktförmigen Strukturen innerhalb des Cytoplasmas und besitzt einen erheblichen Einfluß auf die Lebensdauer transfizierter NIH 3T3 Fibroblasten, da diese innerhalb von 24 Stunden nach Transfektion absterben (Abb. 43).

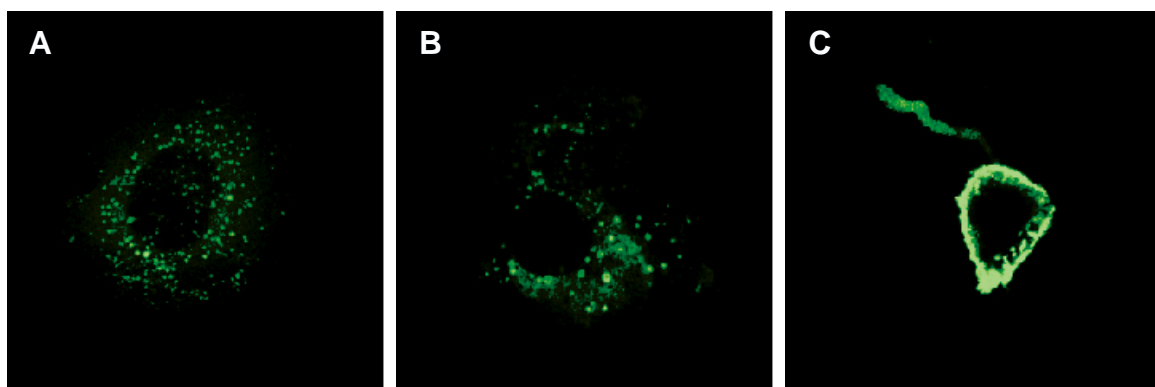


Abb. 43. Expressionskinetik von PACSIN 3 mit mutierter CDC15-NT-Domäne in NIH 3T3 Fibroblasten. Nach 12 Stunden (A) lokalisiert das Protein hauptsächlich in kleinen, punktförmigen Strukturen innerhalb des Cytoplasmas, die bei längerer Expressionsdauer (B, 16 Stunden) an Größe zunehmen. Noch längere Expressionszeiten (C, 22 Stunden) führen zu drastischen Veränderungen in der Zellform, nach 24 Stunden können keine transfizierten Zellen mehr nachgewiesen werden.

Die eingeführten Mutationen könnten entweder zu einer völligen Mißfaltung und somit Inaktivierung des Proteins führen, so daß die Zellen mit nicht funktionalem PACSIN 3 ‚verstopft‘ werden und deshalb zugrunde gehen. Die andere Möglichkeit wäre ein nur teilweise funktionales Protein, das zwar viele seiner spezifischen Interaktionen noch erfüllen kann, bei dem aber aufgrund der Mutationen bestimmte wichtige Funktionen oder Regulationen nicht mehr ausgeübt werden können, so daß die Zellen aufgrund einer Deregulation absterben.

Um die Möglichkeit eines völlig mißgefalteten Proteins ausschließen zu können, wurde die PACSIN 3-Variante mit mutierter CDC15-NT-Domäne mit durchgehendem Leseraster hinter die GST-Sequenz in den pGEX-3X-Vektor kloniert und das bakteriell exprimierte Fusionsprotein in eine Affinitätspräzipitation aus Maus-Hirn-Homogenat eingesetzt. Als

Kontrolle diente nicht nur GST allein, sondern auch das bereits analysierte Wildtyp-Protein und die Variante mit mutierter SH3-Domäne (P415L). In der Western Blot Analyse der präzipitierten Proteine zeigen sich keine Änderungen im Bindungsverhalten an die bereits untersuchten Bindungspartner Dynamin, N-WASP und Synaptojanin für Wildtyp-PACSIN 3 und die CDC15-NT-Mutante, während die SH3-Mutante (P415L), wie bereits gezeigt, nicht an diese Proteine bindet. Zusätzlich kann eine Interaktion aller PACSIN 3-Varianten mit beiden Profilin-Isoformen unabhängig sowohl von der Mutation der SH3- als auch der CDC15-NT-Domäne nachgewiesen werden (Abb. 44). Aufgrund dieses Ergebnisses kann man davon ausgehen, daß die CDC15-NT-Mutante zumindest einen Teil ihrer Interaktionen ebenso wie das Wildtyp-Protein ausüben kann und die Zellen daher wahrscheinlich aufgrund einer in der Mutante gestörten CDC15-NT-spezifischen Funktion absterben.

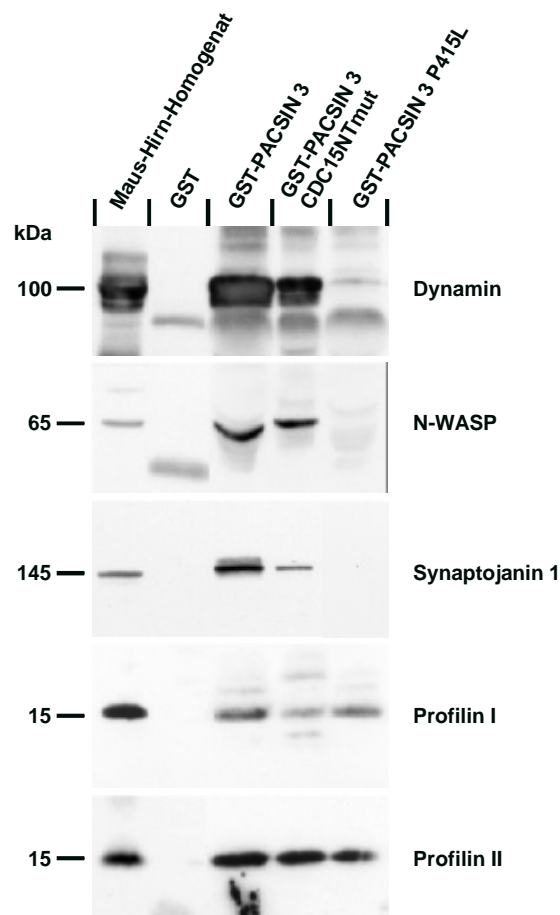


Abb. 44. Western Blot Analyse der durch Affinitätspräzipitation aus Maus-Hirn-Homogenat isolierten spezifischen Bindungspartner für Wildtyp-GST-PACSIN 3 und die PACSIN 3-Varianten mit mutierter CDC15-NT- (GST-PACSIN 3 CDC15-NT) und SH3-Domäne (GST-PACSIN 3 P415L). Die Zahlen links geben die Laufhöhe der jeweiligen Proteine in kDa an.

Eine Analyse der intrazellulären Verteilung der Interaktionspartner zeigt sowohl für N-WASP als auch für Dynamin eine ausgeprägten Translokation dieser endogen exprimierten Proteine in die spezifischen Strukturen der PACSIN 3-CDC15-NT-Mutante, während das Wildtyp-PACSIN 3-Protein eine fein strukturierte cytoplasmatische Verteilung mit partieller

Colokalisation mit N-WASP und Dynamin aufweist (Abb. 45). Dies ist ein weiterer Beweis dafür, daß die CDC15-NT-Mutante durchaus in der Lage ist, mit anderen Proteinen zu interagieren.

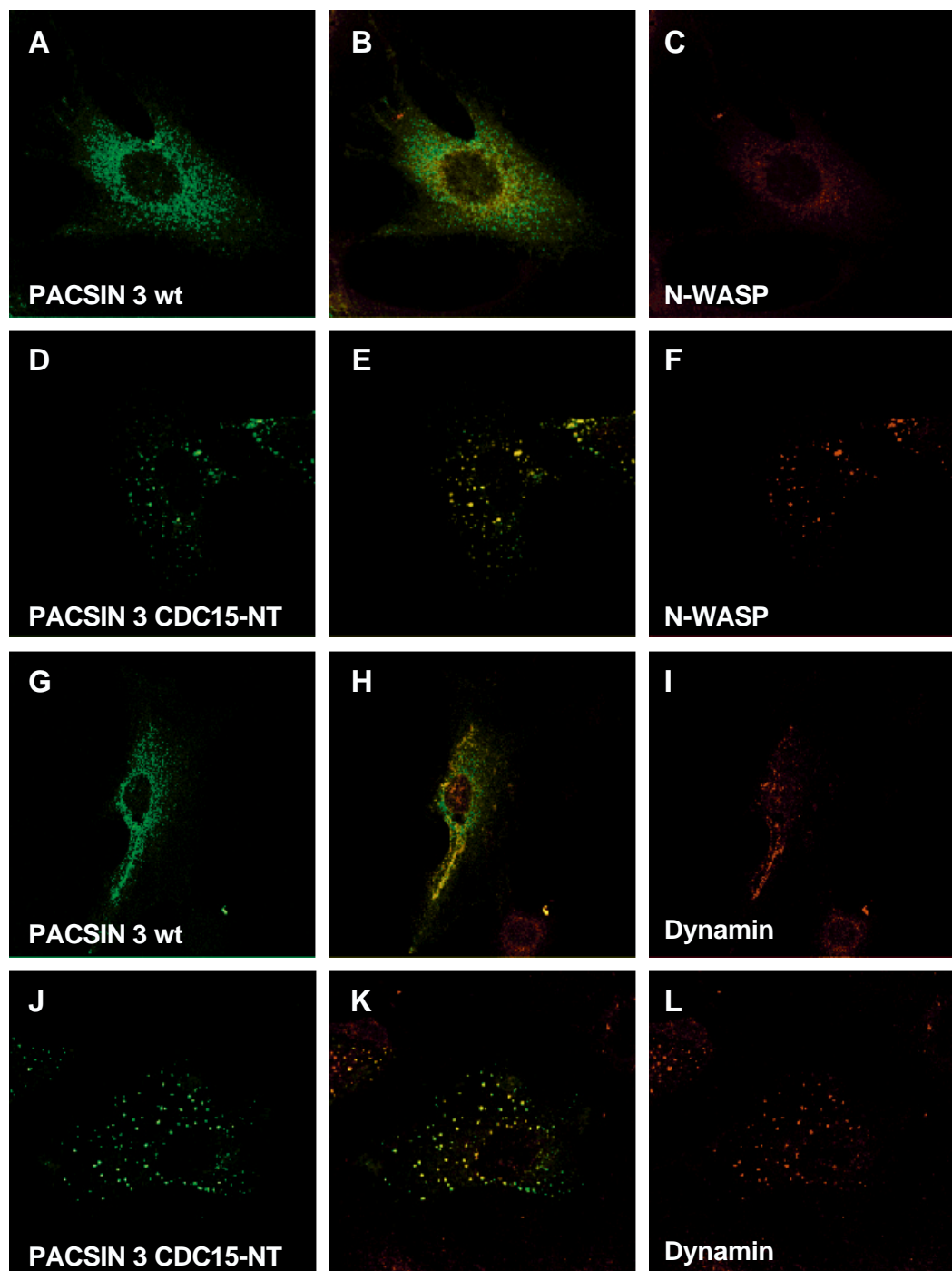


Abb. 45. Intrazelluläre Verteilung von N-WASP und Dynamin in Wildtyp-PACSIN 3- und PACSIN 3 mit mutierter CDC15-NT-Domäne-exprimierenden NIH 3T3 Fibroblasten. Während Wildtyp-PACSIN 3 eine fein strukturierte cytoplasmatische Verteilung (A, B, G, H) mit partieller Colokalisation mit N-WASP (B, C) und Dynamin (H, I) zeigt, lokalisiert die CDC15-NT-Mutante hauptsächlich in größeren punktförmigen Strukturen (D, E, J, K), in denen abhängig von der Expression der Mutante auch N-WASP (E, F) und Dynamin (K, L) akkumulieren.

3.6.2.2 Interaktionen mit Cytoskelett-Proteinen

Für einige Proteine mit CDC15-NT-Domäne ist ein Einfluß auf das Actin-Cytoskelett beschrieben worden, wobei diese Funktion bislang allerdings nicht auf die CDC15-NT-Domäne eingeschränkt wurde. So ist eine Mutante von *S. pombe*, bei der das für die Domäne namensgebende Cdc15p-Protein mutiert ist, bei der Zellteilung nicht mehr in der Lage, die Actin-Wand aufzubauen, mit der die beiden neu entstehenden Zellen vor Bildung der Zellwand voneinander getrennt werden. Da diese Actin-Wand für den Aufbau der Zellwand aber essentiell ist, bildet die Mutante große, vielkernige Zellen (Fankhauser et al., 1995). Die mit den PACSINen entfernt verwandten Proteine PSTPIP und PSTPIP2 aus Maus und das humane CD2BP1 stellen die Homologe von Cdc15p dar und besitzen vergleichbare Eigenschaften (Spencer et al., 1997; Wu et al., 1998; Li et al., 1998).

Ein weiterer Hinweis in Richtung Cytoskelett kommt durch das CIP4-Protein, das durch Interaktion mit Cdc42 und WASP Einfluß auf die Organisation des Cytoskeletts zu haben scheint (Aspenström, 1997), andererseits durch seine N-terminale FCH-Domäne an Mikrotubuli lokalisiert (Linder et al., 2000; Tian et al., 2000). Diese ca. 90 Aminosäuren lange Domäne ist bei den PACSINen im N-terminalen Teil der CDC15-NT-Domäne enthalten.

Aufgrund dieser Hinweise wurde durch Affinitätspräzipitation versucht, eine Interaktion der PACSINe mit Actin und Tubulin nachzuweisen. Die verschiedenen bakteriell exprimierten GST-Fusionsproteine der PACSIN-Varianten sowie GST als Kontrolle wurden mit Maus-Hirn-Homogenat inkubiert und eine mögliche Bindung von Actin und Tubulin in einer Western Blot Analyse untersucht. Für Actin war aufgrund von Schwierigkeiten mit den Antikörpern gegen Actin im Western Blot keine eindeutige Analyse der Bindung möglich.

Hingegen zeigten alle PACSINe eine Bindung an α -Tubulin, die weder durch Mutationen in der SH3-Domäne noch in der CDC15-NT-Domäne von PACSIN 3 inhibiert wird (Abb. 46). Dies könnte bedeuten, daß entweder die in den Bereich der CDC15-NT-Domäne eingeführten Mutationen Aminosäuren betreffen, die für die Interaktion mit α -Tubulin nicht essentiell sind oder daß die Tubulin-Bindung von anderen Bereichen des Proteins vermittelt wird.

In dem Proteinbereich zwischen FCH-Region und coiled coil-Bereich gibt es mehrere aufeinanderfolgende Aminosäuren, die Ähnlichkeiten zu den bekannten Tubulin-Bindungsmotiven KKEE und KKEVI aufweisen (Noble et al., 1989), diesen aber nicht völlig entsprechen. Welche Bereiche wirklich für die Bindung essentiell sind, müßte mit Hilfe von Deletions- und weiteren Punktmutanten genauer untersucht werden.

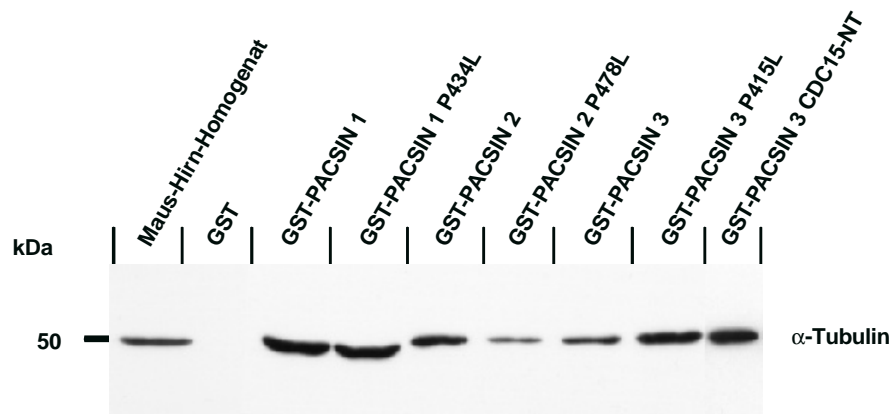


Abb. 46. Western Blot Analyse der Bindung von α -Tubulin an GST-Fusionsproteine der verschiedenen PACSIN-Varianten in einer Affinitätspräzipitation. Während keine unspezifische Bindung an GST allein erfolgt, interagiert jede PACSIN-Isoform mit α -Tubulin, unabhängig von der Mutation der SH3- oder CDC15-NT-Domäne.

Analyse der Interaktion mittels Immunfluoreszenz

Vergleicht man die intrazelluläre Verteilung von α -Tubulin mit Wildtyp-PACSIN 3 und der CDC15-NT-Mutante von PACSIN 3, zeigt sich beim Wildtyp in Übereinstimmung mit den Daten für PACSIN 2 (Ritter et al., 1999) eine geringfügige Colokalisation im Bereich des Mikrotubuli-Organisationszentrums (MTOC). Bei der CDC15-NT-Mutante lassen sich diese geringfügigen Übereinstimmungen nicht mehr feststellen (Abb. 47).

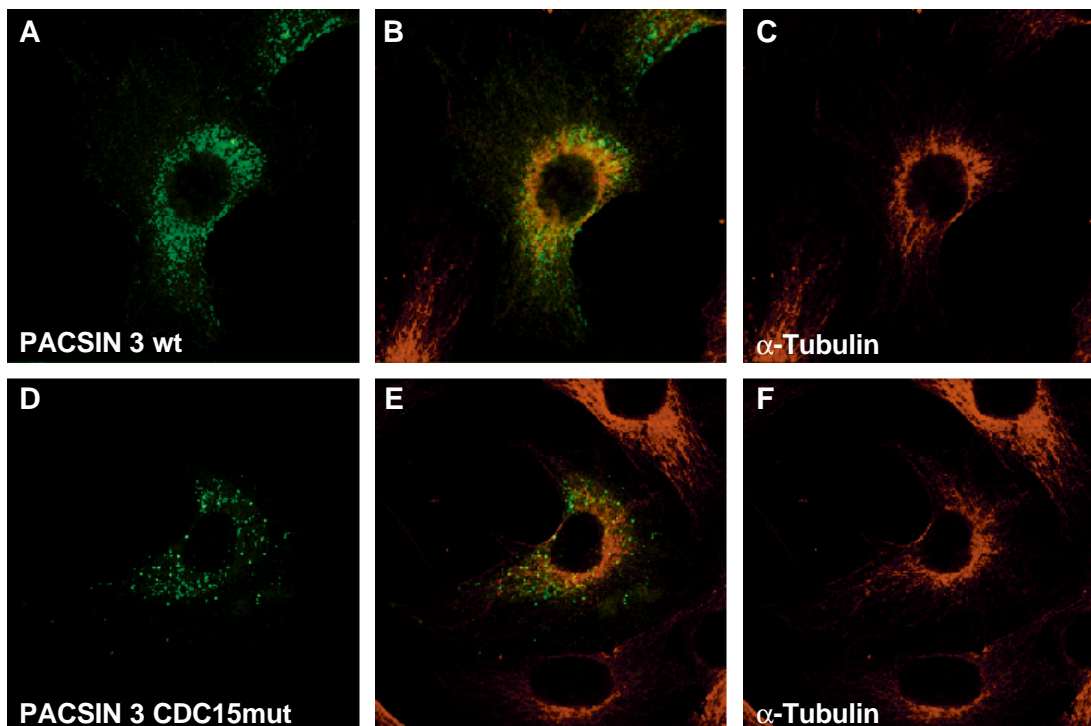


Abb 47. Analyse der intrazellulären Verteilung von Wildtyp-PACSIN 3 (A, B) und der Variante mit mutierter CDC15-NT-Domäne (D, E) im Vergleich zu α -Tubulin (B, C, E, F) in NIH 3T3 Fibroblasten. Jedes Bild zeigt eine Zellebene, die durch konfokale Mikroskopie 32x gescannt wurde.

Die hier durchgeführten Analysen erlauben zwar keinen Rückschluß auf eine spezifische Funktion der CDC15-NT-Domäne, jedoch weist der schnelle Tod der Zellen, die die mutierte Variante exprimieren, auf die Vermittlung einer (überlebens-)wichtigen Funktion oder Regulation hin.

3.7 Interaktion der PACSINe mit PAST-Proteinen

Innerhalb der variablen Region der PACSIN-Proteine zwischen der N-terminalen CDC15-NT- und der C-terminalen SH3-Domäne besitzen die verschiedenen Isoformen bekannte Bindungsmotive. In PACSIN 1 und 2 sind zwei, bzw. drei NPF-Motive vorhanden, die eine Bindung an EH-Domänen-Proteine vermitteln (Salcini et al., 1997), PACSIN 3 hingegen besitzt ein kurzes Prolin-reiches Motiv, das als Bindungsmotiv für SH3-Domänen dienen könnte (Cohen et al., 1995). Über solche Bindungsmotive werden häufig die spezifischen Interaktionen zwischen Proteinen des intrazellulären Vesikeltransports ermöglicht (Slepnev und De Camilli, 2000).

Bislang konnten für PACSIN 3 keine Bindungspartner isoliert werden, die über das Prolin-reiche Motiv interagieren. Ebenso konnte keine Bindung der bekannten endocytotischen EH-Domänen-Proteine Ese1, dem Intersectin-Homolog in Maus, und Eps15 an PACSIN 1 und 2 detektiert werden (Modregger et al., 2000). Mit Hilfe des Two-Hybrid Systems wurde aber das Fragment eines bis dahin unbekanntes Proteins mit Homologie zum PAST1-Protein aus *Drosophila melanogaster* isoliert, dessen aus der Hirn-Bank isolierter C-Terminus eine EH-Domäne besitzt (Modregger, 1997).

3.7.1 Die PAST-Proteine

Der gesamte codierende Bereich sowohl dieses PAST2 genannten Proteins als auch von PAST1 wurde innerhalb unserer Arbeitsgruppe von D. Behrendt aus EST-Klonen und Phagenbanken isoliert und für die Maus-Isoformen zu zwei durchgehenden Klonen komplementiert. Die Computeranalyse der abgeleiteten Proteinsequenzen ergibt für PAST1 eine Proteinlänge von 534 AS und ein Molekulargewicht von 60,6 kDa, für PAST2 541 AS und 61,5 kDa. Beide Proteine besitzen eine C-terminale EH-Domäne, über die eine Bindung an die PACSIN-Isoformen mit NPF-Motiven erfolgen könnte (Abb. 48). Den N-terminalen Teil des Proteins nimmt eine potentielle GTPase-Domäne ein, die in den funktional essentiellen Bereichen eine hohe Homologie zu den Consensus-Sequenzen von GTPasen aufweist (Bourne et al., 1991, Abb. 55). Zwischen der potentiellen GTPase- und der EH-Domäne befindet sich ein Bereich mit geringerer Homologie (Abb. 48).

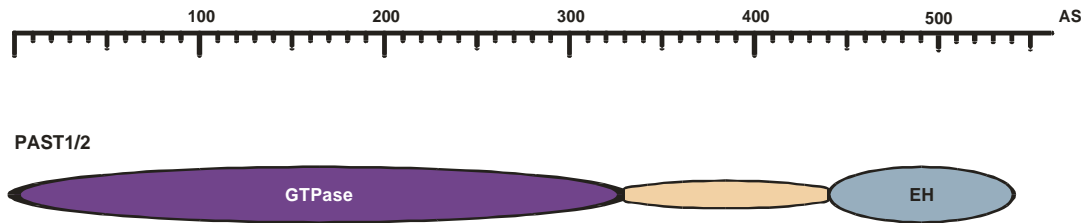
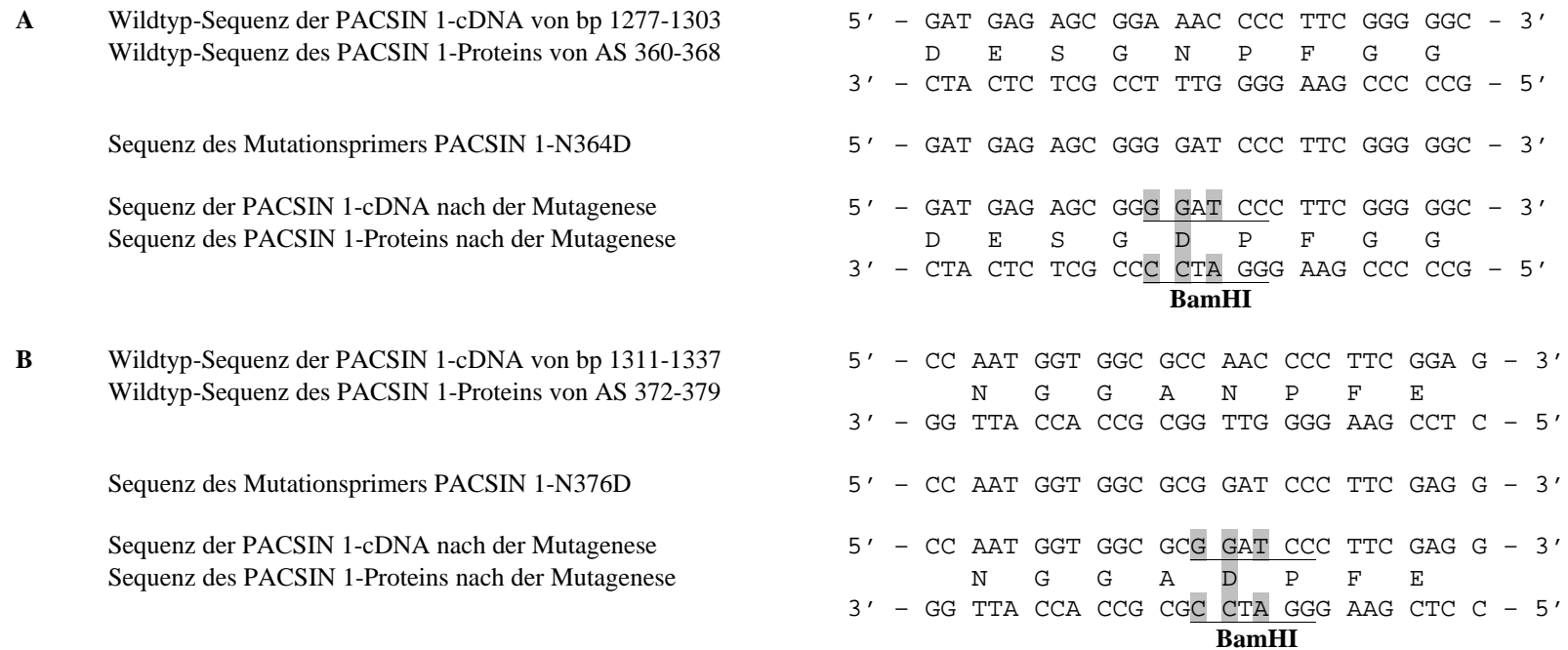


Abb. 48. Domänenstruktur der PAST-Proteine. Aufgrund der großen Ähnlichkeit ist nur ein Protein dargestellt. Die N-terminale potentielle GTPase-Domäne ist über einen variablen Bereich mit der C-terminalen EH-Domäne verbunden.

3.7.2 Bindungsspezifität der PAST-Proteine an die PACSINe

Die für PACSIN 1 und PAST2 im Two-Hybrid-System gefundene Interaktion sollte im Hinblick auf die mittlerweile bekannten verschiedenen PACSIN- und PAST-Isoformen genauer analysiert werden. Um auf Seite der PACSINe den interagierenden Bereich auf die NPF-Motive einschränken zu können, wurden Aminosäure-Austausche in die Vollängen-Proteine von PACSIN 1 und 2 eingeführt, die die NPF-Motive als Bindungsmotive der EH-Domänen inaktivieren (Salcini et al., 1997). Für PACSIN 1 wurden sowohl die beiden NPF-Motive einzeln als auch gemeinsam (Abb. 49), bei PACSIN 2 die drei NPF-Motive jeweils einzeln mutiert (Abb. 50).

Diese Varianten der PACSIN-Proteine wurden durch Klonierung in den pMyc-CMV-Vektor bzw. den pcDNA3-Vektor mit integrierter Myc-Sequenz C-terminal an Myc gekoppelt, so daß bei der Western Blot Analyse der Affinitätspräzipitation keine falsch-positiven Signale durch ebenfalls bindende endogen exprimierte PACSIN-Isoformen auftreten konnten. Die verschiedenen Varianten von PACSIN 1 und 2 als auch PACSIN 3 als Negativ-Kontrolle, das aufgrund der fehlenden NPF-Motive im variablen Bereich nicht an die EH-Domäne der PAST-Proteine binden können sollte, wurden in NIH 3T3 Fibroblasten exprimiert und aus diesen Zellen das Protein-Homogenat isoliert.



C Vergleich der cDNA- und Proteinsequenz von PACSIN 1 vor und nach Einführung der N364D N376D-Aminosäure-Austausche mit den unter (A) und (B) erläuterten Primern

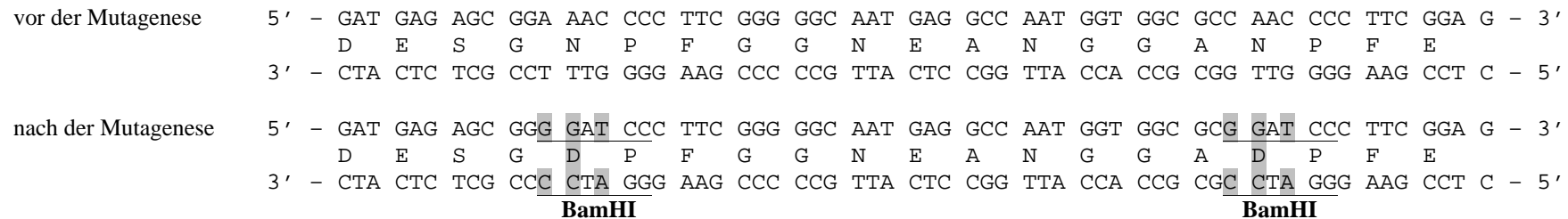


Abb. 49. Darstellung der verwendeten Primer und der eingeführten Mutationen bei den Mutagenesen der NPF-Motive in PACSIN 1. Die veränderten Basen und Aminosäuren sind grau unterlegt, eingeführte oder veränderte Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen und unterhalb der entsprechenden Sequenz angegeben. (A) zeigt die Mutation des ersten, (B) des zweiten NPF-Motivs in PACSIN 1 und (C) beider NPF-Motive gleichzeitig.

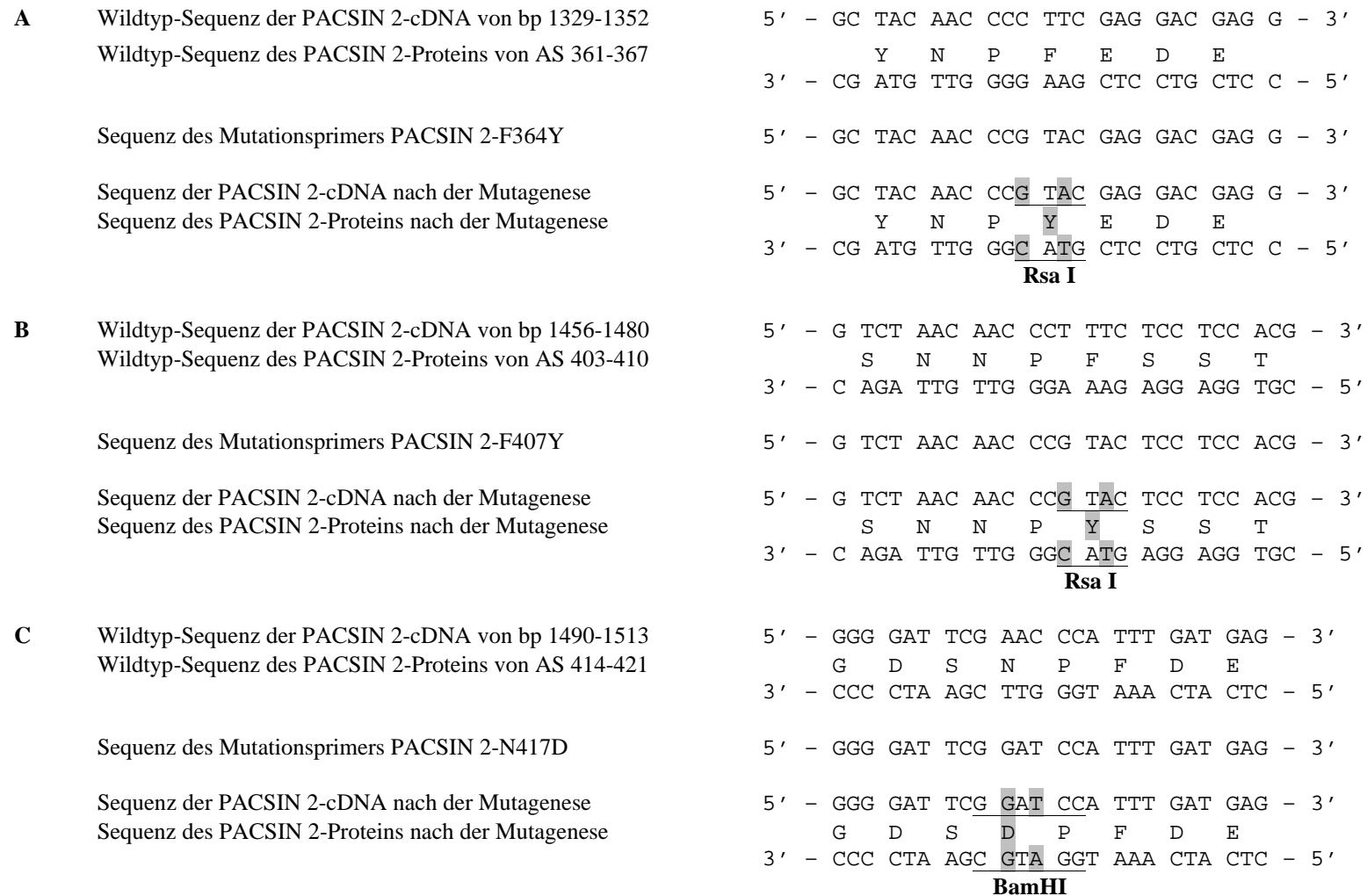


Abb. 50. Darstellung der verwendeten Primer und der eingeführten Mutationen bei den Mutagenesen der NPF-Motive in PACSIN 2. Die veränderten Basen und Aminosäuren sind grau unterlegt, eingeführte oder veränderte Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen und unterhalb der entsprechenden Sequenz angegeben. (A) zeigt die Mutation des ersten, (B) des zweiten und (C) des dritten NPF-Motivs in PACSIN 2.

GST-markierte Varianten von PAST1 und 2, kloniert von D. Behrendt, sowie GST als Kontrolle wurden als bakterielle Fusionsproteine aufgereinigt (Abb. 51). Da beide PAST-Proteine exprimiert werden konnten, scheint die potentielle GTPase-Aktivität zumindest in Bakterien keinen negativen Einfluß auf die Expressionsrate zu haben.

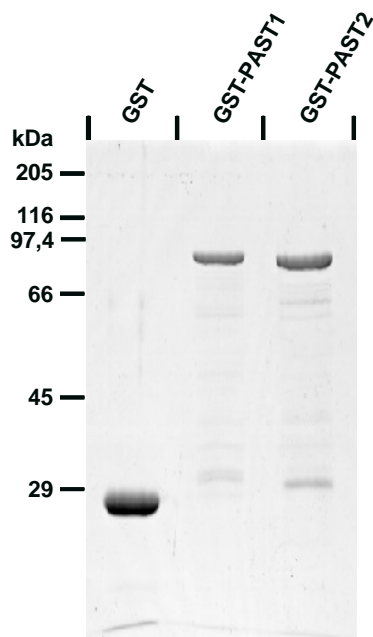


Abb. 51. Nachweis der bakteriell exprimierten GST-Fusionsproteine von PAST1 und 2 im Vergleich zu GST in einem Coomassie-gefärbten Acrylamidgel nach SDS-PAGE. Die Zahlen links geben die Laufhöhe der Proteine des Größenstandards in kDa an.

Für die Affinitätspräzipitation wurden die GST-PAST-Proteine an der Glutathion-Sepharose belassen und mit den Protein-Lysaten der Zellen inkubiert, in denen die verschiedenen PACSIN-Varianten exprimiert wurden. Eine mögliche Bindung der Myc-markierten PACSINe wurde in einer Western Blot Analyse durch einen Antikörper gegen Myc (A-14) detektiert. Die Wildtyp-Varianten von PACSIN 1 und 2 interagieren mit beiden PAST-Proteinen. Während bei PACSIN 1 schon die Mutation des ersten NPF-Motivs (N364D) allein ausreicht, um die Interaktion mit PAST2 zu unterbinden, binden beide PAST-Proteine nicht an die PACSIN 1-Variante, in der beide NPF-Motive mutiert sind (N364D N376D). Wie erwartet bindet PACSIN 3, das keine NPF-Motive besitzt, nicht an die PAST-Proteine (Abb. 52 A). Über die Bindungseigenschaften des zweiten NPF-Motivs von PACSIN 1 kann leider keine Aussage getroffen werden, da diese PACSIN-Variante (N376D) mehrfach in den Zellen nicht exprimiert werden konnte. Bei PACSIN 2 reicht generell die Mutation eines einzelnen NPF-Motivs (F364Y, F407Y oder N417D) nicht aus, um die Interaktion mit PAST1 und 2 zu inhibieren (Abb. 52 B). In allen Ansätzen gibt es keine unspezifische Bindung der PACSIN-Varianten an GST allein.

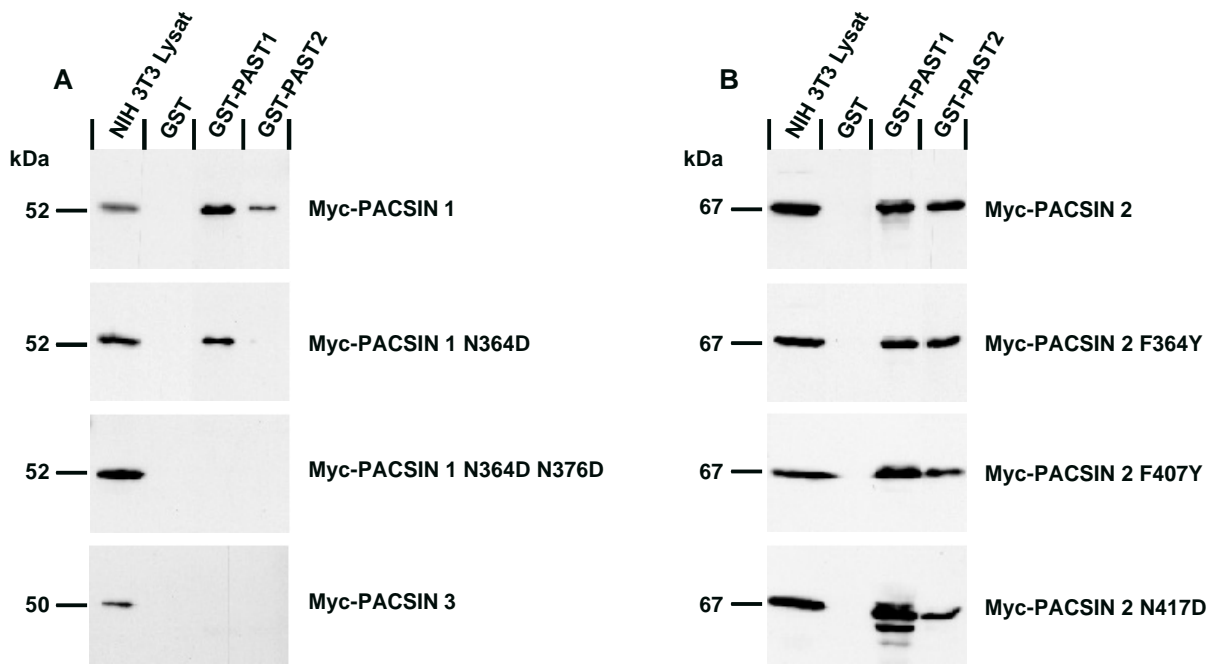


Abb. 52. Analyse des Bindungsverhalten der PACSIN-Isoformen an GST-PAST1 und 2 in Abhängigkeit von den NPF-Motiven. Die Zahlen links geben die Laufhöhe des jeweiligen Proteins in kDa an, die aufgrund der Myc-Markierung 2 kDa höher liegt als bei den endogen exprimierten Proteinen.

3.7.2.1 Colokalisationsanalyse der PAST- und PACSIN-Proteine

Für eine Nachweismöglichkeit der PAST-Proteine in eukaryotischen Zellen wurden beide Isoformen von D. Behrendt durch Klonierung in den pHA-CMV- bzw. den pcDNA3-Vektor mit integrierter HA-Sequenz durch ein HA-Peptid verländert. Nach Coexpression der HA-PAST-Proteine und der Myc-markierten Varianten von PACSIN 1 und 2 läßt sich in NIH 3T3 Fibroblasten eine geringe und lokal begrenzte Colokalisation der Proteine nachweisen, die bei PAST1 und PACSIN 1 eher im Bereich der Plasmamembran und bei PAST1 und PACSIN 2 sowie bei PAST2 unabhängig von der PACSIN-Isoform im Cytoplasma auftritt (Abb. 53).

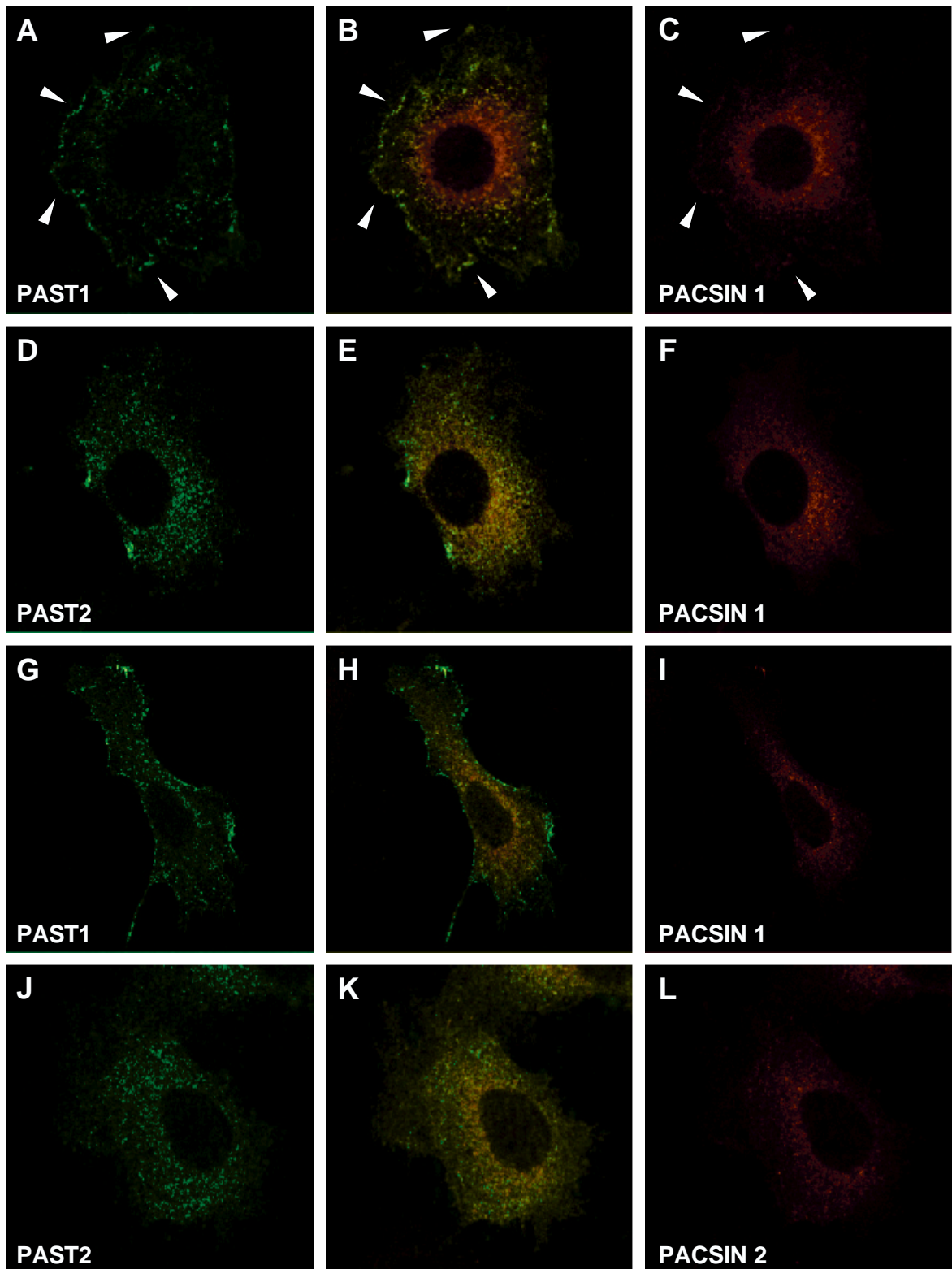


Abb 53. Immunfluoreszenz-Analyse der Colokalisation von PAST1 und 2 mit PACSIN 1 und 2 in NIH 3T3 Fibroblasten durch konfokale Mikroskopie. HA-PAST1 (A, B) colokalisiert mit Myc-PACSIN 1 (B, C) hauptsächlich an begrenzten Bereichen der Plasmamembran (Pfeile), während sowohl HA-PAST1 (G, H) und Myc-PACSIN 2 (H, I) als auch HA-PAST2 (D, E, J, K) und Myc-PACSIN 1 (E, F), bzw. Myc-PACSIN 2 (H, I) eine geringfügige Übereinstimmung in ihrer cytoplasmatischen Verteilung zeigen. Alle Aufnahmen repräsentieren eine Zellebene und wurden 32x gescannt.

3.7.3 Bindung der PAST-Proteine an Clathrin

Für eine Beteiligung der PAST-Proteine am Vesikeltransport spricht zum einen die Bindung an einige PACSIN-Isoformen, zum anderen besitzen beide Proteine in ihrer Aminosäuresequenz einige Bereiche, die Ähnlichkeiten zu Clathrin-Bindungsmotiven aufweisen (Dell'Angelica et al., 1998; Goodman et al., 1997). Desweiteren konnte durch Affinitätspräzipitation bereits eine Bindung von PAST2 an Clathrin gezeigt werden (A. Halbach, persönliche Mitteilung).

Mittels Immunfluoreszenz läßt sich für beide PAST-Proteine eine partielle Colokalisation mit Clathrin nachweisen, die aber abhängig von der PAST-Isoform in unterschiedlichen Bereichen der Zelle auftritt. Bei PAST1 kann eine Colokalisation der cytoplasmatischen punktförmigen Strukturen mit Clathrin detektiert werden, während sich für PAST2 der Bereich der partiellen Colokalisation auf die nähere Umgebung des Zellkerns beschränkt (Abb. 54).

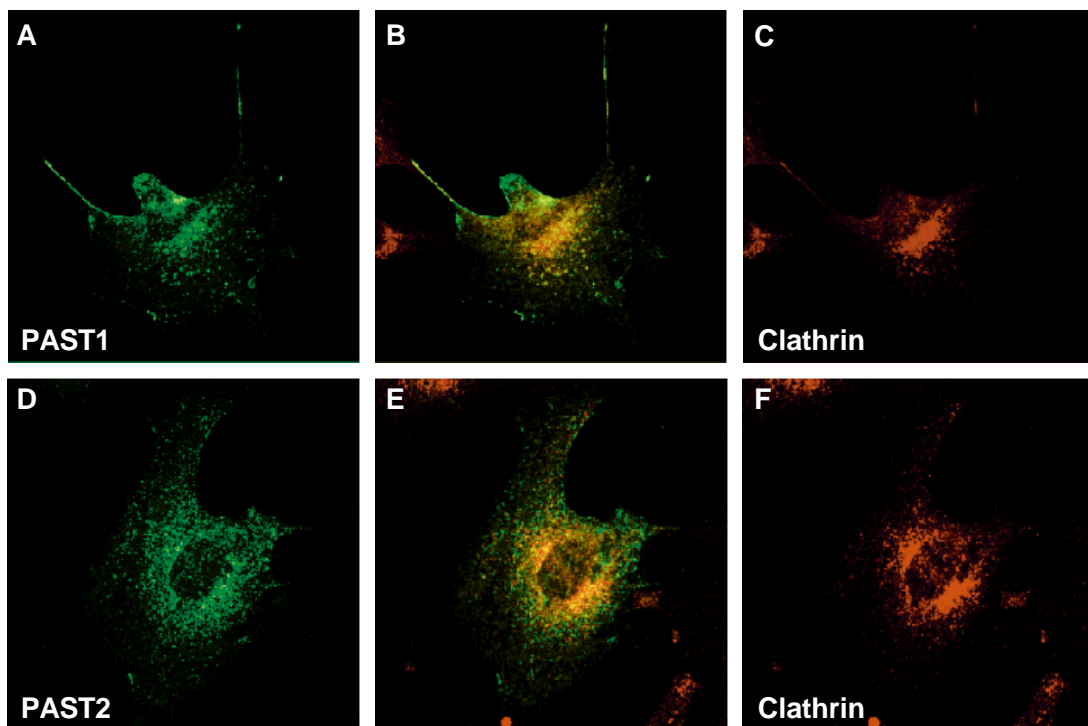


Abb. 54. Immunfluoreszenz-Analyse der intrazellulären Verteilung von HA-PAST1 (A, B) und HA-PAST2 (D, E) im Vergleich zum endogen exprimierten Clathrin (B, C, E, F) in NIH 3T3 Fibroblasten. Alle Bilder zeigen eine Zellebene und wurden 32x gescannt.

Trotz der Bindung an Clathrin und der partiellen Colokalisation hat eine Expression der HA-markierten PAST-Proteine in NIH 3T3 Fibroblasten keinen inhibitorischen Einfluß auf die Clathrin-vermittelte Transferrin-Endocytose. Da die Colokalisation der Proteine im Zellinneren auftritt, sind die PAST-Proteine wahrscheinlich eher am Vesikeltransport zwischen verschiedenen Organellen oder an sekretorischen Wegen beteiligt, so daß die Aufnahme des Transferrin-Rezeptors nicht beeinflusst wird.

3.7.4 Funktionale Analyse der GTPase-Domäne

Die PAST-Proteine besitzen in ihrem N-Terminus einen konservierten Bereich, der Homologien zu der Consensus-Sequenz von GTPasen aufweist (Bourne et al., 1991, Abb. 55).

Region	G1	G2	G3	G4
Consensus	$\Phi\Phi\Phi\Phi\text{G}_{xx}\text{G}_{x}\text{GKS}$	$\text{D}-(\text{X})_n-\text{T}$	$\Phi\Psi\Phi\Phi\text{D}_{x}\text{AG}\Psi$	$\Phi\Phi\Phi\Phi\text{NK}_{x}\text{D}$
PAST1	61 VLLVG qy stGKT 72	82 Dfpgmrigpe pT 93	149 ISIIDtpGi 157	215 rVVLNKaD 222
PAST2	64 ILLVG qy stGKT 75	85 Dfpgmrigpe pT 96	152 ISIIDtpGi 160	218 rVVLNKaD 225

Abb. 55. Vergleich der PAST-Proteine mit den für GTPasen essentiellen Consensus-Sequenzen. In den Consensus-Sequenzen steht Φ für hydrophobe und Ψ für hydrophile Aminosäuren. Blau markierte Aminosäuren innerhalb der Consensus- und den PAST-Sequenzen stehen für Aminosäuren, die in nahezu allen GTPasen konserviert sind, grün markierte Aminosäuren in den Proteinsequenzen der PAST-Proteine sind zusätzliche Aminosäuren, die zur Consensus-Sequenz passen, rot markierte Aminosäuren widersprechen der Consensus-Sequenz. Die Zahlen rechts und links geben die Aminosäure-Position an.

Um eine mögliche Bedeutung dieser GTPase-Region auf die Funktion und die intrazelluläre Verteilung der PAST-Proteine zu analysieren, wurden Mutationen entsprechend den Analysen anderer G-Proteine eingeführt, die die Proteine entweder in einen konstitutiv inaktiven (GDP-gebundenen) Zustand überführen, da die Affinität zu GTP gegenüber der zu GDP extrem reduziert ist (Feig und Cooper, 1988), oder in einen konstitutiv aktiven (GTP-gebundenen) Zustand überführen, der auf einer erhöhten Dissoziationsrate des gebundenen GDPs beruht (Kataoka et al., 1984; Toda et al., 1985; Gibbs et al., 1987, Abb. 56).

A	Wildtyp-Sequenz der PAST1-cDNA von bp 295-315 Wildtyp-Sequenz des PAST1-Proteins von AS 69-75	5' - ACC GGC AAG ACC ACC TTC ATC - 3' T G K T T F I 3' - TGG CCG TTC TGG TGG AAG TAG - 5'
	Sequenz des Mutationsprimers PAST1 GDP (antisense)	5' - GAT GAA GGT GTT CTT GCC GGT - 3'
	Sequenz der PAST1-cDNA nach der Mutagenese Sequenz des PAST1-Proteins nach der Mutagenese	5' - ACC GGC AAG AAC ACC TTC ATC - 3' T G K N T F I 3' - TGG CCG TTC TTG TGG AAG TAG - 5' Xmn I
B	Wildtyp-Sequenz der PAST1-cDNA von bp 279-300 Wildtyp-Sequenz des PAST1-Proteins von AS 64-70	5' - G GTC GGC CAG TAC AGC ACC GGC - 3' V G Q Y S T G 3' - C CAG CCG GTC ATG TCG TGG CCG - 5' Rsa I
	Sequenz des Mutationsprimers PAST1 GTP (antisense)	5' - GCC GGT GCT GAC CTG GCC GAC C - 3'
	Sequenz der PAST1-cDNA nach der Mutagenese Sequenz des PAST1-Proteins nach der Mutagenese	5' - G GTC GGC CAG GTC AGC ACC GGC - 3' V G Q V S T G 3' - C CAG CCG GTC CAG TCG TGG CCG - 5'
C	Wildtyp-Sequenz der PAST2-cDNA von bp 223-252 Wildtyp-Sequenz des PAST2-Proteins von AS 70-78	5' - G TAC AGC ACG GGC AAG ACC ACG TTC ATC AG - 3' Y S T G K T T F I 3' - C ATG TCG TGC CCG TTC TGG TGC AAG TAG TC - 5'
	Sequenz des Mutationsprimers PAST2 GDP	5' - G TAC AGC ACG GGC AAG AAC ACG TTC ATC AG - 3'
	Sequenz der PAST2-cDNA nach der Mutagenese Sequenz des PAST2-Proteins nach der Mutagenese	5' - G TAC AGC ACG GGC AAG AAC ACG TTC ATC AG - 3' Y S T G K N T F I 3' - C ATG TCG TGC CCG TTC TTG TGC AAG TAG TC - 5' Xmn I
D	Wildtyp-Sequenz der PAST2-cDNA von bp 211-240 Wildtyp-Sequenz des PAST2-Proteins von AS 66-74	5' - G CTG GTG GGC CAG TAC AGC ACG GGC AAG AC - 3' L V G Q Y S T G K 3' - C GAC CAC CCG GTC ATG TCG TGC CCG TTC TG - 5' Rsa I
	Sequenz des Mutationsprimers PAST2 GTP	5' - G CTG GTG GGC CAG GTC AGC ACG GGC AAG AC - 3'
	Sequenz der PAST2-cDNA nach der Mutagenese Sequenz des PAST2-Proteins nach der Mutagenese	5' - G CTG GTG GGC CAG GTC AGC ACG GGC AAG AC - 3' L V G Q V S T G K 3' - C GAC CAC CCG GTC CAG TCG TGC CCG TTC TG - 5'

Abb. 56. Darstellung der Wildtypsequenz, der verwendeten Primer und der resultierenden Mutationen in PAST1 und 2 bei der Mutagenese der potentiellen Nucleotid-Bindungsstelle innerhalb der GTPase-Domäne.

(A) zeigt die Mutagenese für die konstitutiv-inaktive, (B) die Mutagenese für die konstitutiv-aktive Variante von PAST1.

In (C) ist die Mutagenese für die konstitutiv-inaktive Variante, in (D) die Mutagenese für die konstitutiv-aktive Variante von PAST2 dargestellt.

Die veränderten Basen und Aminosäuren sind grau unterlegt, eingeführte oder veränderte Restriktionschnittstellen sind unterstrichen und unterhalb der entsprechenden Sequenz angegeben.

3.7.4.1 Domänen-abhängige intrazelluläre Lokalisation der PAST-Proteine

Die codierenden Bereiche der mutierten Varianten wurden mit durchgehendem Leseraster hinter die HA-Sequenz des pHA-CMV- oder des pcDNA3-Vektors mit integrierter HA-Sequenz kloniert, so daß sie parallel mit den Wildtyp-Proteinen und Deletionsmutanten, denen die C-terminale EH-Domäne fehlt (kloniert von D. Behrendt), in NIH 3T3 Fibroblasten exprimiert werden konnten. In der Immunfluoreszenz-Analyse zeigen beide PAST-Proteine eine durchgehende, fein punktierte cytoplasmatische Verteilung (Abb. 57). Zusätzlich lassen sich bei PAST1 innerhalb des Cytoplasmas die bekannten größeren punktförmigen Strukturen erkennen, während ein Teil des Proteins an der Plasmamembran lokalisiert.

Die Deletion der EH-Domäne führt bei beiden Isoformen zu einer Veränderung in der Lokalisation. PAST1 verliert nicht nur seine Plasmamembran-Assoziation, auch die größeren punktförmigen Strukturen innerhalb des Cytoplasmas sind nicht mehr vorhanden (Abb. 57 B). Bei PAST2 geht die cytoplasmatische Verteilung nahezu vollständig verloren und das Protein akkumuliert in kernnahen, großen Strukturen, die aufgrund ihrer Form dem Golgi-Apparat und ER ähneln (Abb. 57 E). Vergleiche mit der Lokalisation verschiedener Markerproteine für ER und Golgi-Apparat ergaben aber keine Colokalisation.

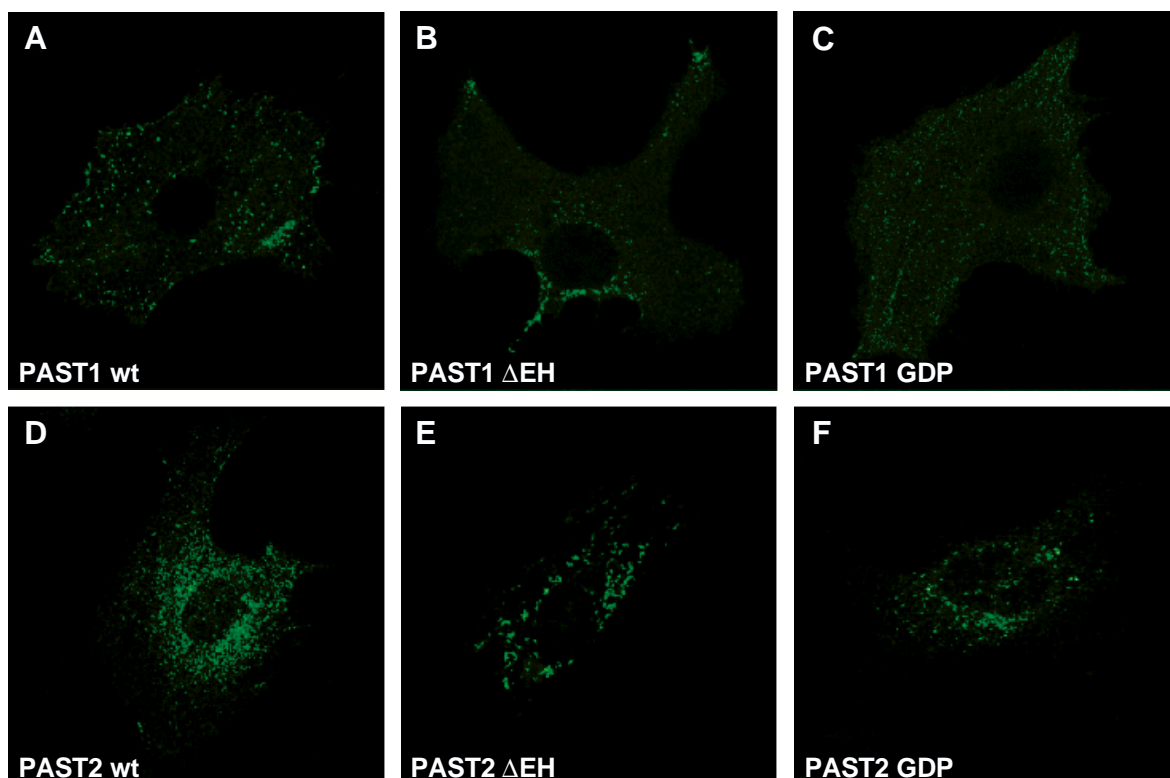


Abb. 57. Immunfluoreszenz-Analyse der intrazellulären Lokalisation verschiedener Varianten der PAST-Proteine. Für PAST1 ist in (A) das Wildtyp-Protein (wt), in (B) die Deletionsmutante ohne EH-Domäne (Δ EH) und in (C) die Variante mit konstitutiv-inaktiver GTPase-Domäne (GDP) gezeigt. Parallel ist in (D) Wildtyp-PAST2 (wt), in (E) PAST2 ohne EH-Domäne (Δ EH) und in (F) die Variante mit konstitutiv-inaktiver GTPase-Domäne (GDP) zu sehen.

Für eine GTPase-Aktivität der PAST-Proteine gibt es bislang keinen Beweis. Es konnte zwar schon eine GTP-Bindung gezeigt werden (A. Halbach, persönliche Mitteilung), der Nachweis der Hydrolyse gelang aber bisher noch nicht. Die Expression der in der GTPase-Domäne mutierten Protein-Varianten gibt aber einen Hinweis auf eine Funktion der PAST-Proteine als GTPasen. Die Expression der GDP-Variante führt bei PAST1 zu einer völlig homogenen, cytosolischen Verteilung (Abb. 57 C), die Verteilung der GDP-Variante von PAST2 reicht nicht mehr in die äußeren cytoplasmatischen Regionen (ABB. 57 F).

Wesentlich drastischer sind die Folgen einer Expression der konstitutiv-aktiven GTP-Varianten. Diese lassen sich bei beiden PAST-Proteinen in einer Expressionskinetik erstmals zwischen vier und sechs Stunden nach Transfektion mittels Immunfluoreszenz als extrem schwache Signale detektieren. Danach ist ein Nachweis exprimierender Zellen nicht mehr möglich, so daß man davon ausgehen kann, daß die konstitutiv-aktiven Formen der PAST-Proteine die exprimierenden Zellen schon in geringsten Mengen abtöten.

3.7.4.2 Lokalisation in endosomalen Strukturen

Um nähere Hinweise auf eine Funktion der PAST-Proteine zu bekommen, wurde versucht, über Colokalisationsanalysen die Verteilung der PAST-Proteine genauer einzuschränken. Dabei konnte mittels konfokaler Mikroskopie eine Colokalisation der größeren, punktförmigen Strukturen der Wildtyp-Variante von PAST1 mit einem GFP-markierten Endosomen-Marker, dem RhoB-Protein nachgewiesen werden (GFP-Endo, Clontech). Im Gegensatz dazu zeigen weder die Deletionsmutante der EH-Domäne bei PAST1 oder die Variante mit konstitutiv-inaktiver GTPase-Domäne noch PAST2 eine entsprechende Colokalisation mit diesem Marker (Abb. 58). Demzufolge ist die Lokalisation von PAST1 an Endosomen sowohl vom Vorhandensein der EH-Domäne als auch von einer funktionalen GTPase-Domäne abhängig, während für PAST2 keine Verbindung zu Endosomen festgestellt werden konnte.

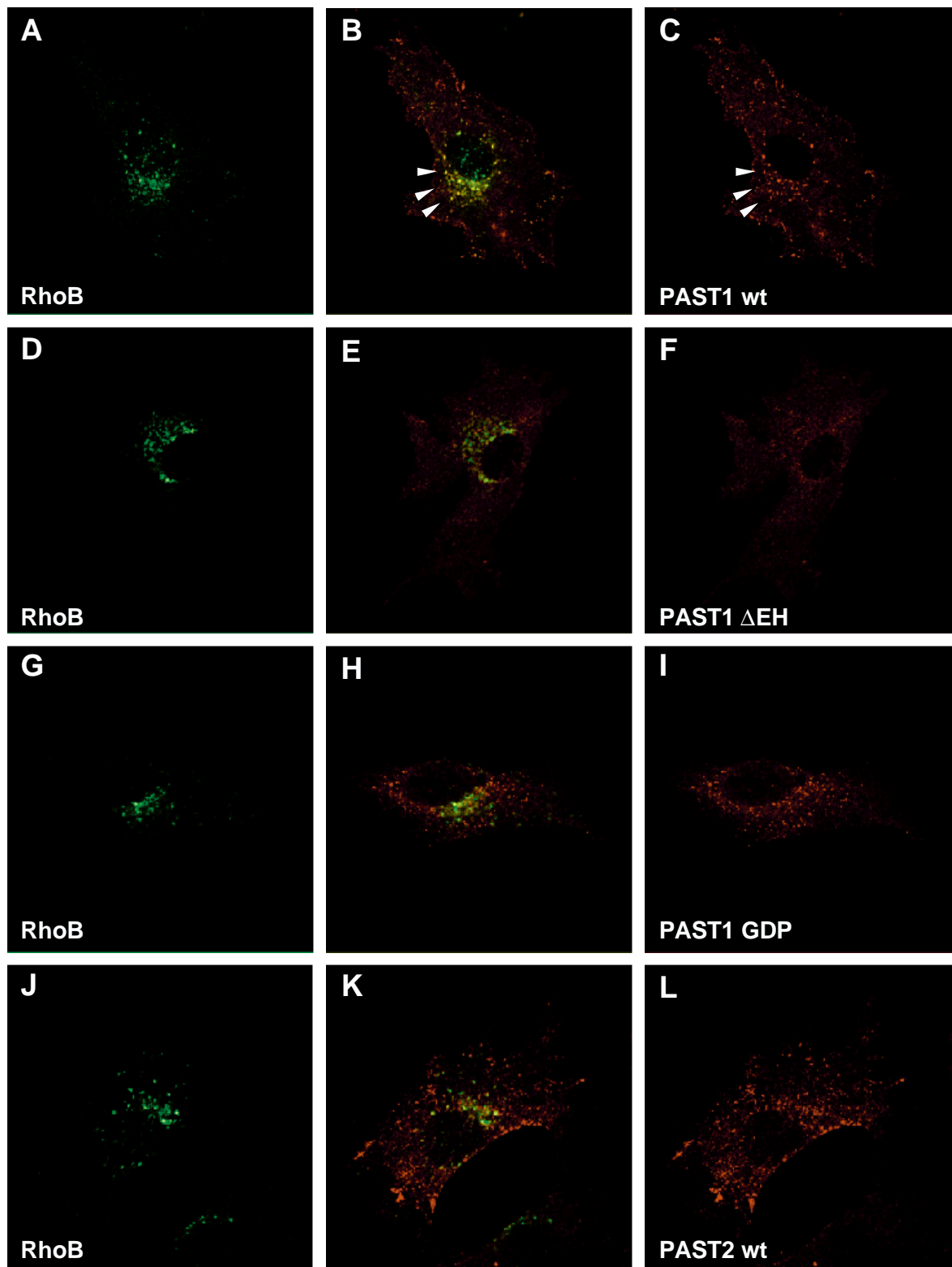


Abb. 58. Immunfluoreszenz-Analyse der Lokalisation der PAST-Proteine im Vergleich zu einem GFP-markierten Endosomen-Marker, dem RhoB-Protein. Während das Wildtyp-Protein von PAST1 (PAST1 wt, B, C) eine Colokalisation mit GFP-RhoB (A, B, D, E, G, H, J, K) durch konfokale Mikroskopie nachgewiesen werden kann (Pfeile), zeigen weder die PAST1-Variante mit fehlender EH-Domäne (PAST 1 Δ EH, E, F) noch die PAST1-Variante mit konstitutiv-inaktiver GTPase-Domäne (PAST 1 GDP, H, I) eine Übereinstimmung in der intrazellulären Verteilung. Für das Wildtyp-Protein von PAST2 (PAST2 wt, K, L) läßt sich ebenfalls keine Colokalisation detektieren.

4 Diskussion

Durch die Charakterisierung des Ratten-Homologs Syndapin I (Qualmann et al., 1999) wurde für PACSIN 1 eine Verbindung zur kompensatorischen Endocytose synaptischer Vesikel nach der Ausschüttung von Neurotransmittern hergestellt. Diese Form der Endocytose stellt in einigen Punkten eine Sonderform der Clathrin-vermittelten Endocytose dar. Zum einen kann hier für das Recycling der synaptischen Vesikel und der erneuten Befüllung mit Neurotransmittern der Weg über Endosomen umgangen werden, zum anderen erfolgt die Endocytose in zeitlicher und räumlicher Abhängigkeit von der Neurotransmitter-Abgabe.

Die für diese Aufgabe benötigten Proteine sind auf ihre Aufgabe in den Synapsen spezialisiert und entsprechend angepaßt. In nicht-neuronalen Zelltypen werden vergleichbare Funktionen meist von anderen Spleißvarianten oder Isoformen dieser Proteine übernommen. Da für das neurospezifische PACSIN 1 keine zusätzlichen Spleißvarianten detektiert werden konnten (Plomann et al., 1998), mußte eine mögliche generelle Beteiligung von PACSIN-Proteinen am Clathrin-vermittelten Vesikeltransport durch weitere, nicht-neuronale Isoformen erfolgen.

4.1 Expression der neuen PACSIN-Isoformen

Durch Kombination verschiedener EST-Klone und das Durchmestern einer cDNA-Bank konnten schließlich bei Maus und Mensch zwei neue PACSIN-Isoformen, PACSIN 2 und 3, isoliert werden. Durch Sequenzvergleiche mit der Human-Genom-Datenbank konnte eine Lokalisation von PACSIN 1 auf Chromosom 6, von PACSIN 2 auf Chromosom 22 und von PACSIN 3 auf Chromosom 11 festgestellt werden. Zusätzlich ergaben die Analysen keine Hinweise auf weitere Isoformen, so daß die humane PACSIN-Familie auf drei Mitglieder beschränkt ist. Alle PACSIN-Isoformen besitzen einen gemeinsamen modulären Aufbau mit einer N-terminalen potentielle CDC15-NT-Domäne, die eine potentielle coiled coil-Region umschließt, und einer C-terminale SH3-Domäne. Diese beiden konservierten Domänen sind über einen variablen Bereich miteinander verbunden, in dem jede Isoform kleine Eigenheiten aufweist.

Das neurospezifische PACSIN 1 besitzt neben zwei NPF-Motiven, die eine Bindung an EH-Domänen-Proteine vermitteln (Salcini et al., 1997), als einzige Isoform eine Bindungsstelle für die ebenfalls neurospezifisch exprimierten 14-3-3-Proteine (Muslin et al., 1996), was auf eine Adaptation dieser Interaktion an die synaptische Funktion hindeutet oder deren Regulation ermöglichen könnte. Das ubiquitär exprimierte PACSIN 2 enthält drei NPF-Motive, wobei das im Vergleich zu PACSIN 1 zusätzliche NPF-Motiv durch ein PACSIN 2-spezifisches Exon codiert wird (M. Plomann, persönliche Mitteilung). In der variablen Region des hauptsächlich muskulär exprimierten PACSIN 3 ist anstelle der NPF-Motive ein Prolinreiches Motiv enthalten, über das Interaktionen mit anderen SH3-Domänen-Proteinen eingegangen werden könnten (Cohen et al., 1995).

Aufgrund der Expressionsmuster läßt sich vermuten, daß das ubiquitär exprimierte PACSIN 2 für basale endocytotische Vorgänge jeder Zelle ausreichend ist, während in neuronalen und muskulären Geweben, deren Funktion mit der Ausschüttung von Transmittern korreliert, spezialisiertere Aufgaben durch die entsprechend angepaßten Isoformen PACSIN 1 und 3 erfüllt werden.

Diese mögliche Spezialisierung hat sich bereits zu Beginn der evolutionären Entwicklung der PACSINe ausgebildet, da PACSIN 3 schon früh von den näher verwandten Isoformen PACSIN 1 und 2 abzweigt. Die Gruppierung der verschiedenen Homologe nach Verwandtschaftsgrad ergibt die evolutionär zu erwartenden Anordnungen, bei denen die Homologe in Ratte (Syndapin) und Maus jeweils näher miteinander als mit dem humanen Homolog verwandt sind. Nichtsdestotrotz sind die Isoformen in Maus und Mensch auf Protein-Ebene mit Identitäten um die 95% sehr gut konserviert. Das in Huhn beschriebene Homolog zu PACSIN 2, FAP52 (Meriläinen et al., 1997), ist wie zu erwarten weiter von den anderen Homologen entfernt.

4.1.1 Expression auf mRNA- und Protein-Ebene

Die Expressionsmuster für PACSIN 2 und 3 in adulten Geweben können im Human RNA Master Blot (Clontech) ebenfalls in den fetalen Geweben detektiert werden. Zusätzlich sind für alle drei Isoformen Maus-EST-Klone aus frühen embryonalen Entwicklungsstufen in der Genbank eingetragen, der bei PACSIN 2 sogar aus dem Zwei-Zell-Stadium stammt (Genbankeintrag AU014698). Der frühe Expressionsbeginn während der Entwicklung sowie der hohe Grad an Konservierung zwischen den Spezies deuten somit auf eine essentielle Funktion der PACSINe hin.

Die aufgrund ihrer Kreuzreaktivität mit den anderen Isoformen der PACSIN-Protein-Familie gegen die verschiedenen PACSIN-Isoformen affinitätsgereinigten Antiseren detektieren in einer Western Blot Analyse verschiedener Zellysate und in Hirn-Homogenaten jeweils nur eine spezifische Bande, deren Laufhöhe bei PACSIN 1 und 3 mit dem theoretischen Molekulargewicht übereinstimmt, bei PACSIN 2 aber ca. 10 kDa höher liegt. Eine massenspektrometrische Analyse von PACSIN 2 bestätigte aber das theoretische Molekulargewicht, so daß das abnormale Laufverhalten auf die Aminosäure-Zusammensetzung des Proteins zurückzuführen sein muß. Da PACSIN 2 auf Protein-Ebene mit PACSIN 1 und 3 70%, bzw. 60% identisch ist und zusätzlich ein Isoformen-spezifisches Exon enthält, könnten diese Unterschiede zu dem unterschiedlichen Laufverhalten führen. Ein vergleichbares Verhalten für das Huhn-Homolog FAP52 und der langen Spleißvariante des Ratten-Homologs Syndapin II-l wurde ebenfalls beschrieben (Meriläinen et al., 1997; Qualmann und Kelly, 2000), so daß das Laufverhalten Isoformen-spezifisch zu sein scheint.

Die für Syndapin II beschriebenen Spleißvarianten besitzen in einer Western Blot Analyse mit affinitätsgereinigten Antikörpern ein unterschiedliches Laufverhalten, wobei die kurze Spleißvariante Syndapin II-s ein apparentes Molekulargewicht von 50 kDa besitzt und somit im Laufverhalten eher PACSIN 1 ähnelt, während die lange Variante Syndapin II-l das bereits für PACSIN 2 bekannte erhöhte apparente Molekulargewicht zeigt. Zusätzlich besitzen die

Spleißvarianten ein unterschiedliches Expressionsmuster, wobei die kurze Form Syndapin II-s in allen Geweben, die lange Variante Syndapin II-l aber nur in Herz und Testis detektiert wird (Qualmann und Kelly, 2000). Diese Daten konnten durch eine Western Blot Analyse mit den affinitätsgereinigten Antiseren gegen die verschiedenen PACSIN-Isoformen auf Maus- und Ratten-Hirn Homogenaten allerdings nicht bestätigt werden. Für jede PACSIN-Isoform wird nur einer Bande mit identischen Laufhöhen in beiden Spezies detektiert, wobei das Antiserum gegen PACSIN 2 auch im Ratten-Hirn-Homogenat nur eine Bande bei 65 kDa nachweist, deren Laufhöhe dem ubiquitär exprimierten Signal in anderen Geweben und Zelllinien entspricht.

Die unterschiedlichen Ergebnisse lassen sich vielleicht durch die Affinitätsreinigung der jeweiligen Antiseren erklären. Da bei einer Kreuzreaktivität gegen andere Mitglieder einer Protein-Familie die Antikörper aus dem Antiserum entfernt werden müssen, die auch die jeweils anderen Isoformen erkennen, werden Antikörper gegen gemeinsame Epitope angereichert. Die in den Antiseren verbleibenden, Isoform-spezifischen Antikörper besitzen möglicherweise eine geringe Affinität oder erkennen nur native Strukturen. Dies würde dazu führen, daß bestimmte Spleißvarianten nicht mehr detektiert werden können oder die Signale nur noch so schwach sind, daß die in der Western Blot Analyse analysierten Proteinmengen in einigen Geweben für einen Nachweis nicht mehr ausreichen und so das Signal für die lange Form von Syndapin II in den anderen Geweben verloren geht. Im Gegensatz zu Ratte scheint es in Maus keine zusätzlichen Spleißvarianten von PACSIN 2 zu geben, so daß hier ausschließlich die 65 kDa-Form detektiert wird. Da das Antiserum gegen PACSIN 3 im Ratten-Hirn-Homogenat ebenfalls eine Bande mit der PACSIN 3-typischen Laufhöhe detektiert, existiert auch in Ratte eine bislang nicht beschriebene, weitere Syndapin-Isoform.

4.1.2 Intrazelluläre Lokalisation

Da das affinitätsgereinigte Antiserum gegen PACSIN 1 sowohl in Maus- als auch in Ratten-Hirn-Homogenat jeweils eine Bande mit identischer Laufhöhe detektierte, wurde für die Analyse der intrazellulären Verteilung auf primäre Neuronen-Kulturen aus embryonalen Ratten-Hippocampi zurückgegriffen, da in Ratten aufgrund ihrer Größe leichter definierte Hirnbereiche entnommen werden können. PACSIN 1 kann in den primären Neuronen sowohl im Soma als auch in den Neuriten detektiert werden, wobei es verstärkt in den axonalen Boutons, den präsynaptischen Bereichen der Verbindungsstellen zu kontaktierenden Neuronen, vorkommt. Damit steht die beobachtete Verteilung durchaus mit einer Funktion bei der kompensatorischen Endocytose in Einklang. Da PACSIN 1 neben den Boutons auch in anderen Zellbereichen detektiert werden kann, existiert entweder eine Art intrazellulärer Reserve-Pool, der nur reguliert in die Boutons wandert, oder aber PACSIN 1 erfüllt neben der Aufgabe in den Boutons auch noch andere Funktionen.

Dieser Gedanke drängt sich besonders bei PACSIN 2 auf, da das endogene Protein in NIH 3T3 Fibroblasten nur selten und dann auch nur in kurzen Bereichen mit der Plasmamembran assoziiert, während sich im gesamten Cytoplasma eine fein strukturierte Verteilung erkennen läßt. Vielleicht kommt es in Fibroblasten nicht zu einer Akkumulation an

der Plasmamembran, da diese Zellen nicht in solch extremen Ausmaßen wie Neurone Endocytose betreiben und die PACSINe zusätzlich nur in einem zeitlich begrenzten Rahmen ihre Funktion an den Vesikeln erfüllen.

Sollte PACSIN 2 wirklich an den basalen Endocytose-Vorgängen in den Zellen beteiligt sein, müssen auch die Vesikelabschnürungen von Kompartimenten innerhalb der Zelle in Betracht gezogen werden. Obwohl die Donormembran in diesen Fällen nicht die Plasmamembran wäre, sind die generellen Schritte des Clathrin-vermittelten Vesikeltransports identisch, so daß PACSIN 2 auch den Vesikeltransport zwischen verschiedenen Kompartimenten vermitteln könnte und daher entsprechend eher im Zellinneren lokalisiert.

In Übereinstimmung mit einer Expression in Herz und Muskel läßt sich endogenes PACSIN 3 in C2-Myoblasten erst nachweisen, wenn die zuvor Fibroblasten-ähnlichen Zellen durch Stimulierung zu Myotuben differenziert wurden, wobei PACSIN 3 eine starke, wenn auch diskontinuierliche Plasmamembran-Assoziation aufweist. Dies steht im Einklang mit der beobachteten Plasmamembran-Lokalisation von PACSIN3 in Muskelgewebe (M. Plomann, persönliche Mitteilung). Da die Stimulierung der Muskeln über Nerven erfolgt, könnte PACSIN 3 eine Funktion bei der Liganden-induzierten Rezeptor-Aufnahme in der neuromuskulären Endplatte besitzen. Nicht-differenzierte C2-Myoblasten werden nicht auf diese Art reguliert, was erklären könnte, warum PACSIN 3 im undifferenzierten Zustand nicht exprimiert wird.

4.1.3 Expressionsmuster der PACSINe in Hirn

Alle PACSIN-Isoformen werden, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß in Hirn exprimiert, so daß durch eine immunhistochemische Analyse von Gewebeschnitten die Verteilungsmuster der PACSIN-Isoformen in Hirn geklärt werden sollten. Dabei wiesen einige Hirnareale wie Cortex eine Expression aller Isoformen auf, während in anderen Regionen nur einzelne Isoformen nachgewiesen werden konnten. Während PACSIN 1 und 3 ausschließlich von Neuronen exprimiert werden, konnte PACSIN 2 zusätzlich in Astrocyten detektiert werden.

Zwar gibt es keine Vergleichsdaten aus anderen Geweben, aber aufgrund der ubiquitären Expression wäre zu vermuten gewesen, daß PACSIN 2 an den endocytotischen Vorgängen in allen Zellen beteiligt ist, während PACSIN 1 auf die kompensatorische Endocytose in Neuronen und PACSIN 3 zusätzlich zu seiner neuronalen Funktion eventuell auf vergleichbare Vorgänge in Muskelzellen spezialisiert ist.

Die Ergebnisse der Immunhistochemie könnten bedeuten, daß doch nicht jede Zelle mindestens eine PACSIN-Isoformen exprimiert. Sollten die PACSINe allerdings wirklich für den Vesikeltransport unerläßlich sein, müßten weitere, bislang unbekannte Isoformen das Expressionsmuster komplementieren. Dies kann allerdings für die humanen Isoformen ausgeschlossen werden, da in der Datenbank des Humanen Genom Projekts nur drei PACSIN-Isoformen zu finden sind. Der hohe Verwandtschaftsgrad zwischen den Isoformen

aus Maus und Mensch macht eine Existenz weiterer Isoformen in Maus ebenfalls unwahrscheinlich.

Eine andere Erklärung wäre eine unzureichende Sensitivität der Immunhistochemie, um auch niedrige PACSIN-Mengen detektieren zu können. Dies könnte durch die aufgetretene Hintergrund-Färbung der Schnitte begünstigt worden sein, so daß schwache Signale als nicht spezifisch eingestuft worden sind. Zusätzlich haben die Antiseren vermutlich aufgrund der notwendigen Affinitätsreinigung an Sensitivität verloren, so daß bei der Detektion der Ratten-Homologe ähnliche Effekte wie bei der Western Blot Analyse die Ergebnisse beeinflussen. Zusätzlich können in den Schnitten die für die affinitätsgereinigten Antiseren spezifischen Epitope in den Zellen durch die Fixierung des Gewebes zerstört oder Bestandteile der Extrazellulären Matrix in Hirn maskiert sein, was ebenfalls zu einem falsch-negativen Ergebnis führen würde.

4.2 Bindungspartner und ihre funktionale Bedeutung

4.2.1 Endocytische Proteine

Für Syndapin I, das Ratten-Homolog von PACSIN 1, wurde eine SH3-Domänen-abhängige Bindung an verschiedene Proteine der Clathrin-vermittelten Endocytose beschrieben, wobei die isolierte SH3-Domäne für die Analysen verwendet wurde (Qualmann et al., 1999). Da bei den PACSINen besonders die SH3-Domänen zwischen den Spezies stark konserviert sind, konnte man vermuten, daß alle PACSINe am Clathrin-vermittelten Vesikeltransport beteiligt sind.

Da für die isolierte SH3-Domäne von Amphiphysin ein inhibitorischer Einfluß auf die Endocytose festgestellt wurde (Owen et al., 1998), der mit dem Vollängen-Protein nicht reproduziert werden konnte (Takei et al., 1999), wurden bei den PACSINen für die Analyse eines möglichen Einflusses auf die Endocytose entweder Vollängen-Wildtyp-Proteine oder Vollängen-Varianten verwendet, bei denen die SH3-Domäne durch eine Punktmutation inaktiviert wurde (Clark et al., 1992).

Generell zeigte sich bei allen nachgewiesenen Interaktionen eine SH3-Domänen-Abhängigkeit der Wechselwirkung, da die PACSIN-Varianten mit mutierter SH3-Domäne nicht zu den entsprechenden Interaktionen der Wildtyp-Proteine fähig waren. Der fehlende Nachweis der Bindungspartner bei den mutierten Varianten war auf eine spezifische Inhibition der Bindung zurückzuführen, da die für die Affinitätspräzipitation verwendeten GST-Fusionsproteine unabhängig von der eingeführten Mutation vergleichbar zu den Wildtyp-Proteinen in den Bakterien exprimiert werden konnten.

Während sich die frühen Stufen der Vesikelbildung hauptsächlich durch den Auf- und Ausbau der Clathrin-Hülle auszeichnen, werden spätere Stadien, in denen das bereits gebildete Vesikel bald von der Donormembran abgeschnürt wird, durch die Anwesenheit von Dynamin am Vesikelhals markiert (Simpson et al., 1999).

Die in der Affinitätspräzipitation gefundene, ausgeprägte Interaktion der PACSINe mit Dynamin weist demzufolge darauf hin, daß die PACSINe eher an den späteren Stufen der Vesikelabschnürung als an den frühen Stadien der Vesikelinitiation beteiligt sind. Diese Annahme wird durch die Tatsache gestützt, daß mit Clathrin keine Interaktion nachgewiesen werden konnte. Zusätzlich konnten diese Ergebnisse für beide Proteine auch durch konfokale Mikroskopie der endogenen Protein-Verteilung bestätigt werden. Während keine Übereinstimmung in der Verteilung der PACSINe mit Clathrin detektiert werden konnte, ließ sich für alle PACSINe eine partielle Colokalisation mit Dynamin nachweisen.

Auch die Interaktion der PACSINe mit Synaptojanin 1 deutet eher auf eine Beteiligung an den späten Schritten der Vesikelbildung hin, da Synaptojanin 1 über Endophilin und Dynamin an das Vesikel rekrutiert wird und das Ablösen der Clathrin-Hülle ermöglicht (Hill et al., 2001; Cremona et al., 1999), ein Schritt, der erst nach der Abschnürung des Vesikels erfolgt.

Diese Annahmen wurden von Simpson und Mitarbeitern (1999) für die isolierte SH3-Domäne des Ratten-Homologs von PACSIN 1, Syndapin I, bestätigt, die, in Übereinstimmung mit den SH3-Domänen anderer Dynamin-Interaktionspartner, die späten Schritte der Endocytose blockierte, in denen die Vesikel zwar noch mit der Donormembran verbunden, aber schon von der extrazellulären Umgebung abgeschlossen waren.

4.2.1.1 Einfluß der PACSINe auf die Endocytose

Nachdem diese Bindungspartner der Affinitätspräzipitation eine Beteiligung aller PACSIN-Isoformen an der Clathrin-vermittelten Endocytose vermuten lassen, sollte der Einfluß der neuen Isoformen PACSIN 2 und 3 auf die Clathrin-vermittelte Aufnahme des Transferrin-Rezeptors untersucht werden. Dabei wurden sowohl die Wildtyp-Proteine als auch die Varianten mit mutierter SH3-Domäne analysiert, da das unterschiedliche Bindungsverhalten in der Affinitätspräzipitation auch einen unterschiedlichen Einfluß auf die Endocytose vermuten läßt.

Die Wildtyp-Proteine von PACSIN 2 und 3 zeigen analog zu den Daten für die isolierte SH3-Domäne von Syndapin I (Simpson et al., 1999) eine konzentrationsabhängige Blockierung der Transferrin-Aufnahme. Eine Expression geringer Mengen an PACSIN 2 und 3 in NIH 3T3 Fibroblasten beeinflußt die Transferrin-Aufnahme nicht, während eine starke Expression der beiden Proteinen zu einer drastischen Reduzierung der Aufnahme führt. Hingegen zeigen Zellen, die vergleichbar hohe Mengen an PACSIN 2 und 3 mit inaktivierter SH3-Domäne exprimieren, keinen Einfluß der Expression auf die Transferrin-Aufnahme. Auch die Quantifizierung der Transferrin-Aufnahme mittels FACS-Analyse bestätigt für PACSIN 3 die konzentrationsabhängige Inhibition für das Wildtyp-Protein, während vergleichbare Mengen der Variante mit mutierter SH3-Domäne keine Auswirkung auf die Transferrin-Endocytose haben.

Eine Blockierung der Endocytose ist für viele Proteine beschrieben, die über ihre SH3-Domäne mit Dynamin interagieren, da durch das Überangebot des Bindungspartners Dynamin wahrscheinlich nahezu vollständig abgefangen und für seine eigentliche Funktion blockiert

wird (Simpson et al., 1999). Jedoch muß eine Inhibition durch Überexpression nicht zwangsläufig bedeuten, daß der Bindungspartner wirklich am Prozeß der Vesikel-Abschnürung beteiligt ist. Vielmehr kann er auch über Dynamin ans Vesikel gebracht werden, um sofort nach der Abschnürung für seine Funktion am freigesetzten Vesikel direkt vor Ort zu sein.

4.2.2 Weitere Bindungspartner

Um weitere Hinweise auf mögliche Funktionen der neuen PACSIN-Isoformen zu erhalten, wurden mit Hilfe des Two-Hybrid Systems potentielle Bindungspartner aus einer Maus-Hirn cDNA-Bank isoliert. Diese Bank wurde verwendet, da Hirn das einzige Gewebe ist, in dem alle PACSIN-Isoformen exprimiert werden und diese somit dort auch zu funktionalen Interaktionen fähig sein sollten.

Die nach Sequenzanalyse verbliebenen Klone enthielten einerseits potentielle Bindungspartner, die sowohl mit PACSIN 2 als auch PACSIN 3 interagierten und andererseits Klone, die im Two-Hybrid System für eine Isoform spezifisch waren.

Cordon-Bleu

Zu den für PACSIN 2 und 3 gemeinsamen potentiellen Bindungspartner gehört Cordon-Bleu, das durch eine Gene Trap-Analyse in Maus isoliert wurde und während der embryonalen Entwicklung in vergleichbaren Strukturen und zu vergleichbaren Zeiten wie Sonic Hedgehog exprimiert wird. Cordon-Bleu besitzt keine bekannten Domänen oder Homologien zu bekannten Proteinen, so daß basierend auf dem Expressionsmuster eine mögliche Beteiligung an der Regulation der Achsenbildung bei der embryonalen Entwicklung lediglich vermutet werden kann (Gasca et al., 1995).

Da für die PACSINe keine detaillierten Informationen über die embryonalen Expressionsmuster vorhanden sind, kann über diese Interaktion nur spekuliert werden. Zwar konnte bislang kein Zusammenhang mit der Achsendetermination festgestellt werden, aber da zumindest PACSIN 2 in der Entwicklung schon wesentlich früher exprimiert wird, kann eine Interaktion nicht ausgeschlossen werden. Um diese potentielle Interaktion weitergehend zu analysieren, sollten zunächst die embryonalen Expressionsmuster der PACSINe bestimmt werden, damit überprüft werden kann, ob die Proteine während der Entwicklung wirklich überlappende Expressionsmuster besitzen.

Endophilin B1

Der zweite potentielle Bindungspartner für PACSIN 2 und 3 ist Endophilin B1. Dieses Protein ist mit den bislang beschriebenen Mitgliedern der Endophilin-Familie (Endophilin A1 bis 3) verwandt, die durch ihre Lysophosphatidylsäure-Acyl-Transferase- (LPAAT-) Aktivität wahrscheinlich die Membrankrümmung im Bereich der Vesikelbildung verändern, indem sie aus Lysophosphatidylsäure durch Übertragung einer Fettsäure Phosphatidylsäure generieren (Schmidt et al., 1999).

Mit Hilfe des Two-Hybrid Systems konnte bereits ein identischer Endophilin B1-Klon als potentieller Bindungspartner für PACSIN 1 isoliert werden (Modregger, 1997), der den gesamten codierenden Bereich enthält. Weitere Untersuchungen haben den Interaktionsbereich des Gal4-Endophilin B1-Fusionsproteins mit PACSIN 1 auf ein Prolin-reiches Motiv eingegrenzt, daß sich in der 5'-UTR von Endophilin B1 kurz vor dem in anderen Endophilinen benutzten Startcodon befindet (Abb. 59). Da für Endophilin B1 keine Spleißvariante isoliert werden konnte, bei der auch der Bereich des Prolin-reichen Motivs translatiert wird, und zusätzlich die humane Endophilin B1-Sequenz in diesem Bereich Stop-Codons enthält, kann man davon ausgehen, daß dieser Sequenzbereich im Two-Hybrid System fälschlicherweise innerhalb des Fusionsproteins translatiert wird und Endophilin B1 demzufolge kein *in vivo*-Interaktionspartner von PACSIN 1 ist (Modregger, 2001).

Da mit den verschiedenen PACSIN-Isoformen identische Endophilin B1-Klone aus der cDNA-Bank isoliert wurden, kann man die Ergebnisse der Bindungsstudien zu PACSIN 1 wohl auf die anderen beiden PACSINe übertragen und Endophilin B1 generell als Bindungspartner der PACSINe ausschließen.



Abb. 59. Schematische Darstellung des mittels des Two-Hybrid Systems aus der cDNA-Bank isolierten Klons für Endophilin B1. Zwischen der Gal4-Aktivierungsdomäne (AD) und dem codierenden Bereich von Endophilin B1 befindet sich ein kurzes Stück der potentiellen 5'-UTR, so daß das Fusionsprotein ein darin enthaltenes Prolin-reiches Motiv besitzt (rot), das *in vivo* nicht translatiert wird und zu einer falsch-positiven Interaktion mit den PACSINen, wahrscheinlich über deren SH3-Domänen, führt.

TRAX

Das mit PACSIN 3 isolierte TRAX besitzt eine hohe Homologie zu Translin und bildet mit diesem Komplexe unbekannter Funktion, die über TRAX in den Kern transportiert werden und über Translin dort an DNA-Consensus Sequenzen binden. Da diese der Erkennung von DNA-Bruckstücken dienen, wird von einer Funktion bei der DNA-Reparatur ausgegangen (Aoki et al., 1995; Aoki et al., 1997; Kasai et al., 1997; Wu et al., 1997).

In Neuronen sind zusätzlich Ribonucleoproteinpartikel aus Translin, TRAX und nicht-codierender RNA beschrieben worden, die bei neuronaler Aktivität in die Dendriten transloziert werden und wahrscheinlich die für die Aufrechterhaltung und Modulation der synaptischen Aktivität essentielle lokale Translation in den Dendriten regulieren (Kobayashi et al., 1998; Muramatsu et al., 1998; Taira et al., 1998; Wu et al., 1999; Finkenstadt et al., 2000).

Ein Zusammenhang mit der DNA-Reparatur konnte für die PACSINe bislang nicht festgestellt werden, auch lassen Zellen in Immunfluoreszenz-Analysen keine Kernlokalisation der Proteine erkennen. Die für den Translin/TRAX-Komplex beschriebene Translokation aufgrund neuronaler Aktivität basiert hingegen auf intrazellulären Transportprozessen. Zwar konnte für die PACSINe bislang nur eine Beteiligung am Clathrin-vermittelten Vesikeltransport

gezeigt werden, dies muß eine Beteiligung an anderen Vorgängen und Wegen aber nicht ausschließen. Somit könnte das ebenfalls neuronal exprimierte PACSIN 3 über eine Interaktion mit TRAX die Translokation der Ribonucleoproteinpartikel ermöglichen oder regulieren.

PICK1

Das für PACSIN 3 isolierte PICK1 bindet über seine N-terminale PDZ-Domäne an PKC α und wird von dieser phosphoryliert (Staudinger et al., 1995). Da PICK1 über einen zentralen coiled coil-Bereich Homooligomere bilden kann, geht man davon aus, daß es über seine PDZ-Domäne einerseits PKC α zu bestimmten subzellulären Regionen transloziert (Staudinger et al., 1997) und andererseits für das phosphorylierungsabhängige ‚clustering‘ von Transmembran-Rezeptoren verantwortlich ist.

Postsynaptisch bindet PICK1 an die GluR3- und bestimmte Spleißvarianten der GluR2-Untereinheit der AMPA-Rezeptoren und führt so zu deren ‚clustering‘ (Dev et al., 1999; Xia et al., 1999), dem eine schnelle Internalisierung der auf der Zelloberfläche befindlichen Rezeptoren durch Clathrin-vermittelte Endocytose folgt (Xia et al., 2000). Auf diesem Weg wird die synaptische Plastizität über eine Anpassung der synaptischen Signalweiterleitung und Verteilung der AMPA-Rezeptoren in den Synapsen reguliert (Xia et al., 1999; Chung et al., 2000).

Auf präsynaptischer Seite bindet PICK1 an mGluR7, einen Glutamat-Rezeptor, der die Feedback-Inhibition des Synapsen nach Neurotransmitter-Ausschüttung vermittelt. Die Interaktion führt zum ‚clustering‘ des Rezeptors, so daß PICK1 wahrscheinlich zu der Maschinerie gehört, die die Ausschüttung der Neurotransmitter moduliert (Boudin et al., 2000; Dev et al., 2000; El Far et al., 2000).

Weitere Interaktionspartner der PDZ-Domäne in PICK1 sind die GTP-gebundenen Formen von ARF1 und ARF3 (Takeya et al., 2000), die hauptsächlich am Golgi-Apparat lokalisieren und den den retrograden Vesikeltransport zwischen Golgi-Apparat und dem ER vermitteln (Rothman, 1994; Hosaka et al., 1996; Cosson und Letourneur, 1997). Interessanterweise ist auch für PICK1 in COS-Zellen eine Lokalisation im Bereich des Golgi-Apparates beschrieben (Staudinger et al., 1995), so daß PICK1 mit den ARF-Proteinen den Vesikeltransport zwischen Golgi-Apparat und ER regulieren könnte.

Die für PACSIN 3 und PICK1 im Two-Hybrid System gefundene Interaktion konnte mittlerweile durch unabhängige Methoden bestätigt und auch auf die anderen PACSIN-Isoformen ausgeweitet werden (E. Wegener, persönliche Mitteilung). Die PACSIN-bindende Region in PICK1 konnte auf das C-terminale Ende eingeschränkt werden, für das bislang keine bekannten Domänen, Bindungspartner oder regulatorische Einflüsse beschrieben wurden.

Die für PICK1 beschriebenen Interaktionen an postsynaptischen Membranen erweitern die möglichen Funktionen der PACSINe über die Beteiligung an der kompensatorischen Endocytose hinaus. So könnten die PACSINe über die Bindung an PICK1 und die bereits

bekannte Interaktion mit Dynamin an der Clathrin-vermittelten Aufnahme der AMPA-Rezeptoren (Xia et al., 2000), und damit an der Modulation der synaptischen Plastizität beteiligt sein, indem sie die für die Clathrin-vermittelte Endocytose benötigten Proteinen an den Ort der bevorstehenden Vesikelbildung rekrutieren.

PACSIN 3 wird in muskulären Geweben wesentlich stärker als in Hirn exprimiert und zeigt dort eine kontinuierliche Membran-Assoziation (M. Plomann, persönliche Mitteilung). Die Rezeptor-Tyrosin-Kinase MuSK lokalisiert selektiv in den postsynaptischen Membranbereichen von Muskelzellen (Valenzuela et al., 1995) und dient dort der Bildung und Aufrechterhaltung der neuromuskulären Endplatte (DeChiara et al., 1996). Da MuSK ebenfalls an PICK1 bindet (Torres et al., 1998), könnte PACSIN 3 über die Interaktion mit PICK1 die Endocytose von MuSK und damit eine Modulation der Signalweiterleitung zwischen Motorneuronen und Muskelzellen ermöglichen.

Die Interaktion von PICK1 mit den GTPasen ARF1 und 3 eröffnet eine Verbindung der PACSINe zum Vesikeltransport zwischen Golgi-Apparat und ER, was im Einklang mit deren intrazellulären Verteilungsmustern stünde. Da die Clathrin-vermittelte Vesikelbildung nicht auf die Plasmamembran beschränkt ist, könnten die PACSINe vergleichbare Aufgaben auch bei der Vesikel-Abschnürung von intrazellulären Membranen besitzen.

Zusätzlich ist dies der erste Hinweis auf eine mögliche Beteiligung von PACSIN-Proteinen an Transportprozessen, die nicht über Clathrin vermittelt werden, da für ARF1 auch eine Funktion bei der Bildung Coatomer-umhüllter Vesikel bekannt ist (Kirchhausen, 2000b). Da Dynamin an diesen Prozessen nicht beteiligt ist, könnte eine Lokalisation der PACSINe an diese Vesikel über die Interaktion mit PICK1 erfolgen.

4.2.3 Transmembran-Proteine

Die Bindung der PACSINe an membranständige Proteine beschränkt sich allerdings nicht nur auf AMPA-Rezeptoren. Auch das Recycling des NMDA-Rezeptors in *Xenopus* Oocyten ist PACSIN 1-abhängig, wobei PACSIN 1 spezifisch an die NR3A-Untereinheit des Rezeptors bindet und sowohl PACSIN 1 als auch Dynamin für die Endocytose des Rezeptors unerlässlich sind (I. Pérez-Otaño und M. Plomann, persönliche Mitteilung).

Zusätzlich bindet PACSIN 3 an die cytoplasmatische Domäne der Proform von ADAM15 und könnte somit an der Sekretion des Proteins oder seiner intrazellulären Prozessierung beteiligt sein. Desweiteren kommt eine funktionale Regulation des Disintegrins über einen Einfluß auf dessen Reifung in Betracht (Howard et al., 1999).

PACSIN 2 aus *Xenopus* bindet hingegen an die cytoplasmatische Domäne von ADAM13. Beide Proteine colokalisieren in ‚membrane ruffles‘ und cytoplasmatischen Vesikeln, zusätzlich reguliert PACSIN 2 die Aktivität des membranständigen Rezeptors, indem es entweder dessen katalytische Aktivität oder die intrazelluläre Lokalisation beeinflusst (Cousin et al., 2000).

Weiterhin konnte durch das Two-Hybrid System auch die α -Untereinheit der Na^+/K^+ -ATPase als potentieller Bindungspartner für PACSIN 2 isoliert werden, wobei der Interaktionsbereich innerhalb der cytoplasmatischen Domäne liegt.

Die Interaktion der PACSINe mit diesen Membranproteinen könnte einerseits zu einer Regulation von deren Funktion führen, andererseits könnten die PACSINe an der durch Vesikeltransport vermittelten Sekretion der Proteine zur Plasmamembran beteiligt sein.

4.2.4 14-3-3-Proteine

Die Modulation der Neurotransmitter-Abgabe während langanhaltender Aktionspotentiale erfolgt durch PKC und 14-3-3-Proteine (Stevens und Sullivan, 1998), wobei die Substrate der Kinase noch nicht bekannt sind. Die hirnspezifischen 14-3-3-Proteine binden an Erkennungssequenzen mit phosphorylierten Serinen und regulieren die Exocytose synaptischer Vesikel (Jones et al., 1995), indem sie aus dem Reserve-Pool den Pool synaptischer Vesikel auffüllen, die bei Stimulierung mit der Membran verschmelzen können (Broadie et al., 1997). Dabei arbeiten 14-3-3-Proteine mit PKC zusammen, um die Reserve-Vesikel aus ihren Rückhaltearealen im Cytoskelett zu befreien (Morgan und Burgoyne, 1992; Roth und Burgoyne, 1995).

Das neurospezifische PACSIN 1 mit seiner Beteiligung an der kompensatorischen Clathrin-vermittelten Endocytose nach Ausschüttung von Neurotransmittern ist die einzige PACSIN-Isoform mit einer 14-3-3-Protein-Bindungsstelle, wobei die Interaktion und ihre Spezifität für PACSIN 1 mittels Affinitätschromatographie bestätigt werden konnte.

Somit wird PACSIN 1 an dem für die Bindung essentiellen Serin phosphoryliert und kann so mit 14-3-3-Proteinen interagieren. Für das Rattenhomolog Syndapin I ist eine Bindung an Synapsin I beschrieben, das den Reserve-Pool synaptischer Vesikel aufrechterhält. Daher könnte PACSIN 1 nach einer vermutlich PKC-vermittelten Phosphorylierung am essentiellen Serin durch die Interaktion mit 14-3-3-Proteinen in der Lage sein, die Rückhaltung der synaptischen Vesikel im Reserve-Pool durch einen Einfluß auf Synapsin aufzuheben und so das Auffüllen des membranständigen Vesikel-Pools ermöglichen. Damit wäre PACSIN 1 nicht nur an der kompensatorischen Endocytose synaptischer Vesikel nach der Ausschüttung von Neurotransmittern beteiligt, die zu einer Wiederbefüllung der Vesikel führt, sondern könnte auch das Auffüllen von Vesikel-Defiziten der präsynaptischen Membran aus dem Reserve-Pool vermitteln.

4.2.5 Bindungspartner mit Einfluß auf das Actin-Cytoskelett

Interessanterweise besitzen mehrere der PACSIN-Bindungspartner, Synaptojanin 1, N-WASP und mSos1, einen regulatorischen Einfluß auf das Actin-Cytoskelett. Da $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ neben dem Aufbau der Clathrin-Hülle auch die Polymerisation von Actin-Filamenten begünstigt, wirkt die Polyphosphoinositid-Phosphatase Synaptojanin, die $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ zu Phosphatidylinositol abbaut, als negativer Regulator der Actin-Polymerisation (Arneson et al., 1999; Rohatgi et al., 1999). Hingegen verfügt N-WASP, das durch $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ und GTP-gebundenes Cdc42 aktiviert

wird, sowohl über Actin-depolymerisierende Eigenschaften (Miki et al., 1996) als auch über die Fähigkeit, Actin-Polymerisation zu induzieren (Miki et al., 1998). Zusätzlich stimuliert es den Arp2/3-Komplex, der seinerseits die Bildung von Actin-Filamenten induziert (Machesky und Insall, 1998; Machesky et al., 1999).

mSos1 dient als GEF für Ras und Rac (Bowtell et al., 1992; Buday und Downward, 1993; Chardin et al., 1993; Egan et al., 1993; Whitehead et al., 1997; Das et al., 2000; Scita et al., 2000) und reguliert somit nicht nur über Ras die Signaltransduktion durch MAP-Kinasen, sondern über Rac auch das Actin-Cytoskelett. Durch EGF-Stimulation wird mSos zur Zellperipherie rekrutiert, wo es über eine Rac-Aktivierung die Wachstumsfaktoren-induzierte Bildung von ‚membrane ruffles‘ vermittelt (Nimnual et al., 1998; Scita et al., 1999).

mSos interagiert über seine Prolin-reiche Region, die mehrere Bindungsstellen für SH3-Domänen umfaßt, mit Amphiphysin II (Leprince et al., 1997) und Intersectin (Tong et al., 2000a; b), wobei diese Interaktionen mSos mit der Ras-Aktivierung während der Endocytose verbinden könnten (Di Guglielmo et al., 1994; Haugh et al., 1999).

In der Affinitätspräzipitation interagieren alle PACSIN-Isoformen mit mSos1, zusätzlich führt eine EGF-Stimulation von Zellen zu einer Translokation von PACSIN 1 und mSos1 aus dem Cytosol zu den induzierten Filopodien und ‚membrane ruffles‘ und zu einer Colokalisation der beiden Proteine in diesen Strukturen. Desweiteren lokalisieren sowohl PACSIN 1 als auch mSos1 in Spinalganglien (dorsal root ganglia) über die gesamte Länge der Filopodien mit den Actin-Filamenten an der Plasmamembran und werden ebenfalls zusammen in den Wachstumskegeln (growth cones) der Nervenzellen exprimiert (Wasiak et al., 2001).

Aufgrund dieser Daten könnte die Interaktion der PACSINe mit mSos1 die Wachstumsfaktor-induzierte Umstrukturierung des Actin-Cytoskeletts und die Bildung der Filopodien vermitteln. Dazu könnte einerseits mSos1 über die Aktivierung von Rac N-WASP aktivieren (Das et al., 2000; Scita et al., 1999; Lanzetti et al., 2000; Nimnual et al., 1998), wobei das durch mSos1 aktivierte Rac die Phosphatidylinositol-4-Phosphat-5-Kinase aktiviert, die daraufhin PI(4,5)P₂ synthetisiert (Tolias et al., 2000; Glogauer et al., 2000), das seinerseits zu einer Aktivierung von N-WASP beiträgt (Rohatgi und Kirschner, 2000; Prehoda et al., 2000). Zusätzlich könnten die PACSINe über ihre SH3-Domänen N-WASP durch eine Bindung an dessen Prolin-reiche Region aktivieren (Carlier et al., 2000), so daß die PACSINe und mSos1 an unterschiedlichen Stellen von N-WASP für dessen Aktivierung zusammenarbeiten.

Die ebenfalls durch EGF induzierte Phosphorylierung von mSos1 reduziert die Affinität zu PACSIN 1 (Wasiak et al., 2001). Demzufolge löst der Wachstumsfaktor nicht nur eine Umstrukturierung des Actin-Cytoskeletts über die Interaktion von mSos1 und PACSIN 1 aus, sondern vermittelt auch die Regulation dieses Vorgangs durch die Wachstumsfaktor-induzierte Phosphorylierung von mSos1, die die Interaktion mit PACSIN 1 abschwächt und so den für den Umbau des Actin-Cytoskeletts nötigen Komplex auflöst.

4.3 Charakterisierung der potentiellen CDC15-NT-Domäne

Die CDC15-NT-Domäne ist eine bislang nicht näher charakterisierte Domäne in der PROSITE Datenbank (Bucher und Bairoch, 1994) und basiert auf einer Homologie zu dem namensgebenden Protein Cdc15p in *S. pombe*. Dieses Protein besitzt in Hefen eine Schlüsselfunktion bei der Cytoskelett-Umstrukturierung für die Bildung der Actin-Scheidewand zwischen den sich teilenden Zellen während der Cytokinese (Fankhauser et al., 1995). In Säugern sind die Maus-Homologe PSTPIP (Spencer et al., 1997) und PSTPIP2 (Wu et al., 1998), auch MAYP genannt (Yeung et al., 1998), und CD2BP1 (Li et al., 1998) in Mensch bekannt.

Beschränkt man die CDC15-NT-Domäne auf die ca. 100 N-terminalen Aminosäuren, findet man in den Datenbanken weitere Proteine mit großer Homologie zu diesem Bereich, der als FCH-Domäne beschrieben ist. Eines dieser Proteine ist CIP4, das C-terminal ebenfalls eine SH3-Domäne besitzt und dessen Überexpression in Swiss 3T3 Fibroblasten zu einer Reduktion der Actin-Filamente führt (Aspenström, 1997). Desweiteren interagiert CIP4 über seine FCH-Domäne mit Mikrotubuli (Linder et al., 2000; Tian et al., 2000).

4.3.1 Oligomerisierung der PACSINe

Im C-terminalen Bereich der potentiellen CD15-NT-Domäne befindet sich ein potentieller coiled coil-Bereich, der mit großer Wahrscheinlichkeit die im Two-Hybrid System für PACSIN 3 gefundene Interaktion mit PACSIN 1 vermittelt, da in dem aus der cDNA-Bank isolierten PACSIN 1-Fragment der größte Teil dieser Region vorhanden ist.

Mit Hilfe des Two-Hybrid Systems und durch einen Enzym-gekoppelten Immunnachweis (ELISA) konnte eine Homo- und Heterooligomerisierung der PACSINe bestätigt werden, wobei alle möglichen Kombinationen der verschiedenen Isoformen mit nahezu gleicher Affinität gebildet werden. Für FAP52, dem PACSIN 2-Homolog aus Huhn, wurde ebenfalls die Möglichkeit einer Oligomerisierung diskutiert. Da in dem coiled coil-Bereich von FAP52 nicht nur die essentiellen Positionen der coiled coil-Wiederholungssequenz, sondern auch noch zusätzliche Aminosäuren konserviert sind, gehen Meriläinen und Mitarbeiter (1997) davon aus, daß FAP52 eher zur Bildung von Multimeren als zur Dimerisierung neigt.

Da für die PACSINe eine Vielzahl von Interaktionen mit endocytotischen Proteinen über die SH3-Domäne beschrieben sind, könnte eine Oligomerisierung der PACSINe mehrere dieser Bindungspartner in räumliche Nähe zueinander bringen und so ihre Funktion sowohl räumlich als auch zeitlich aufeinander abstimmen. Das Ratten-Homolog von PACSIN 1, Syndapin I, kann unter physiologischen Bedingungen in größeren Komplexen von über 350 kDa nachgewiesen werden und ist somit tatsächlich in größeren Proteinkomplexen zu finden (Qualmann et al., 1999).

4.3.2 Effekte einer mutierten CDC15-NT-Domäne

Um Hinweise auf die Funktion dieser potentiellen Domäne in den PACSINen zu erhalten, wurden in PACSIN 3 drei Aminosäuren mutiert, die sowohl in PACSIN-Isoformen verschiedenster Spezies als auch in den entfernter verwandten Proteinen konserviert sind. Das N-terminal in der Domäne liegende Tyrosin (Y53) entspricht der Position, die in PACSIN 1 durch die Computeranalyse als eine potentielle Phosphorylierungsstelle identifiziert wurde, so daß es gegen ein Alanin ausgetauscht wurde, um eine mögliche Phosphorylierung zu inhibieren. Das Histidin an Position 95, das ebenso wie das Tyrosin an Position 53 in dem als FCH-Domäne bezeichneten Bereich liegt, wurde ausgewählt, da Histidine aufgrund des pI-Werts ihrer Seitenkette, der in der Nähe des physiologischen pH-Werts liegt, bei Enzymen häufig in den katalytischen Zentren zu finden sind (Voet und Voet, 1995). Für die PACSINe ist bislang keine enzymatische Funktion bekannt, das Histidin könnte aufgrund seiner chemischen Eigenschaften aber für Wechselwirkungen mit anderen Proteinen essentiell sein, so daß es gegen ein negativ geladenes Glutamat ausgetauscht wurde. Die dritte Aminosäure ist das weiter C-terminal gelegene Glutamin an Position 184, das den Beginn des potentiellen coiled coil-Bereichs markiert und gegen ein aromatisches Phenylalanin ausgetauscht wurde.

Die Expression einer PACSIN 3-Variante, in deren CDC15-NT-Domäne die drei eingeführten Aminosäure-Austausche gemeinsam enthalten sind, hat einen drastischen Effekt auf NIH 3T3 Fibroblasten. Die Lokalisation des mutierten Proteins unterscheidet sich völlig von der des Wildtyp-Proteins. Während das Wildtyp-Protein eine fein strukturierte Verteilung durch das gesamte Cytoplasma und eine Assoziation mit der Plasmamembran zeigt, lokalisiert die Mutante nahezu ausschließlich in größeren, punktförmigen Strukturen innerhalb des Cytoplasmas. Zusätzlich führt die Expression der mutierten Protein-Variante innerhalb von 24 Stunden nach Transfektion zu einem Absterben der Zellen.

Für eine Erklärung dieses Effekts existieren zwei Möglichkeiten. Einerseits könnte die PACSIN 3-Variante durch die eingeführten Mutationen völlig mißgefaltet und somit inaktiviert sein, wodurch die Zellen aufgrund der Überexpression mit großen Mengen an nicht-funktionalem PACSIN 3 ‚verstopft‘ würden und absterben. Andererseits könnten die eingeführten Mutationen lediglich wie gewollt die CDC15-NT-Domäne inaktivieren, wodurch PACSIN 3 bislang unbekannte Funktionen oder Regulationen nicht mehr ausführen kann und die Zellen aufgrund dieses sekundären Effekts sterben.

Um die Möglichkeit einer völligen Mißfaltung der mutierten PACSIN 3-Variante auszuschließen, wurde in einer Affinitätspräzipitation das Bindungsverhalten der CDC15-NT-Mutante im Vergleich zu Wildtyp-PACSIN 3 und der bereits analysierten Variante mit mutierter SH3-Domäne (PACSIN 3 P415L) untersucht. Dabei zeigte sich, daß die CDC15-NT-Mutante zu den gleichen SH3-Domänen-abhängigen Interaktionen wie das Wildtyp-Protein fähig ist. Zusätzlich interagiert PACSIN 3 mit beiden in Säugern existierenden Profilin-Isoformen unabhängig von einer Mutation der SH3- oder der CDC15-NT-Domäne. Desweiteren führt die Expression der CDC15-NT-Mutante in NIH 3T3 Fibroblasten bei Dynamin und N-WASP zu einer Translokation dieser Proteine in die durch die Mutante hervorgerufenen Strukturen.

Da die CDC15-NT-Mutante in der Affinitätspräzipitation sowohl zu Interaktionen über die SH3-Domäne als auch zu SH3-Domänen-unabhängigen Wechselwirkungen mit anderen Proteinen fähig ist, kann eine völlige Mißfaltung des Proteins wohl ausgeschlossen werden. Desweiteren beeinflusst die CDC15-NT-Mutante *in vivo* die intrazelluläre Verteilung ihrer Interaktionspartner, wodurch einerseits die Fähigkeit zur Wechselwirkung trotz Mutationen und andererseits ein Einfluß der PACSINe auf die intrazelluläre Lokalisation der Bindungspartner bewiesen ist.

4.3.3 Interaktion mit Actin und α -Tubulin

Da es verschiedenste Hinweise für einen Einfluß von Proteinen mit CDC15-NT-Domäne auf das Actin-Cytoskelett gibt (Aspenström, 1997; Wu et al., 1998; Li et al., 1998; Spencer et al., 1999) und die darin enthaltene FCH-Domäne eine Interaktion mit Mikrotubuli vermittelt (Linder et al., 2000; Tian et al., 2000), wurde versucht, eine Interaktion der PACSINe mit Actin und Tubulin nachzuweisen.

Interaktion mit Actin

Die für PACSIN 3 detektierten Interaktion mit beiden Profilin-Isoformen stellen neben den Interaktionen mit mSos und N-WASP weitere indirekte Verbindungen zur Regulation des Actin-Cytoskeletts auf (Blanchoin et al., 2000; Witke et al., 2001). Eine direkte Interaktion mit Actin konnte jedoch bislang aufgrund von Problemen mit Antikörpern gegen Actin in der Affinitätspräzipitation nicht nachgewiesen werden, eine Far Western Blot Analyse (Overlay Assay), in der die PACSINe als Liganden an Actin binden sollten, ergab ebenfalls keine eindeutigen Ergebnisse. Dies könnte daran liegen, daß für die Interaktion dreidimensionale Strukturen von Actin erkannt werden, die nach Auftrennung durch SDS-PAGE und nach Transfer auf eine Membran nicht mehr erhalten sind. Auch der Einfluß von PACSIN auf die Actin-Polymerisation und die Bindung an Actin-Filamente konnte *in vitro* bislang nicht eindeutig geklärt werden (M. Plomann, persönliche Mitteilung).

Innerhalb der variablen Region der PACSINe befindet sich jedoch eine Aminosäurefolge (KKEK), die in dem entfernt verwandten Protein MAYP, auch PSTPIP2 genannt, für die Interaktion mit Actin-Filamenten essentiell ist (Friederich et al., 1992; Yeung et al., 1998). Dabei ist der Sequenzbereich in PACSIN 1 vollständig konserviert, in PACSIN 2 und 3 sind in einzelnen Positionen Aminosäuren mit verwandten chemischen Eigenschaften vorhanden. Dies ist zumindest ein weiterer Hinweis auf eine Interaktion mit Actin, wenn auch unabhängig von der CDC15-NT-Domäne.

Interaktion mit α -Tubulin

Hingegen konnte in der Affinitätspräzipitation für alle PACSIN-Isoformen und unabhängig von einer Mutation der SH3- oder CDC15-NT-Domäne eine Bindung an α -Tubulin nachgewiesen werden, das zusammen mit β -Tubulin zu den Mikrotubuli polymerisiert.

Innerhalb der CDC15-NT-Domäne gibt es zwischen dem als FCH-Domäne beschriebenen Bereich und der potentiellen coiled coil-Region einige Abfolgen von Aminosäuren, die bekannten Tubulin-Bindungsmotive ähneln (Noble et al., 1989), diesen aber nicht vollständig entsprechen. Daher wäre es möglich, daß die CDC15-NT-Domäne die Bindung an α -Tubulin vermittelt, die Interaktion durch die eingeführten Mutationen, die in anderen Bereichen der Domäne liegen, aber nicht beeinflußt wird, so daß die CDC15-NT-Mutante dasselbe Bindungsverhalten wie das Wildtyp-Protein besitzt.

Die Analyse der intrazellulären Verteilung von α -Tubulin im Vergleich zu Wildtyp-PACSIN 3 und der PACSIN 3-Variante mit mutierter CDC15-NT-Domäne zeigte analog zu den Ergebnissen für PACSIN 2 (Ritter et al., 1999) für Wildtyp-PACSIN 3 eine geringe Colokalisation mit α -Tubulin im Bereich des MTOCs. Bei der CDC15-NT-Mutante ist aufgrund ihrer völlig anderen intrazellulären Verteilung diese Übereinstimmung nicht vorhanden, auch kommt es zu keiner Translokation von α -Tubulin in die Mutantenspezifischen Strukturen.

Sollten die PACSINE mit α -Tubulin innerhalb von Mikrotubuli interagieren, könnte die Interaktion aufgrund von Regulationen extrem kurzfristig und die entsprechenden Komplexe in der Immunfluoreszenz daher so gut wie nicht zu detektieren sein. Bei einer Interaktion der PACSINE mit α -Tubulin-Monomeren oder nur sehr kurzen Polymeren könnten die bestehenden Komplexe wegen ihrer Größe mittels Immunfluoreszenz nicht nachzuweisen sein. Für eine genauere intrazelluläre Analyse der Interaktion wären daher EM-Aufnahmen aufgrund ihrer wesentlich höheren Auflösung hilfreich.

Die in bezug auf die CDC15-NT-Domäne durchgeführten Analysen haben bislang keinen Hinweis auf die Funktion dieser Domäne geliefert. Da die PACSIN 3-Variante mit mutierter CDC15-NT-Domäne durchaus zu Interaktionen mit anderen Proteinen fähig ist, andererseits aber die Zellen innerhalb von 24 Stunden nach Transfektion tötet, scheint eine bestimmte Funktion oder Regulation der PACSINE gestört zu sein, so daß die Zellen aufgrund von sekundären Effekten sterben.

Da die PACSINE am Clathrin-vermittelten Vesikeltransport beteiligt sind, könnte man aufgrund ihrer intrazellulären Lokalisation davon ausgehen, daß die CDC15-NT-Mutante zu keinem Clathrin-vermittelten Vesikeltransport mehr fähig ist. Dies kann aber nicht der alleinige Grund für das Zellsterben sein, da eine Expression der Wildtyp-PACSINE, die die Clathrin-vermittelte Endocytose inhibieren, die Zellen während einer Expressionsdauer von 48-72 Stunden nicht tötet.

Generell scheint der als CDC15-NT-Domäne bezeichnete Bereich in Wirklichkeit aus einer Aneinanderreihung verschiedener Domänen und Motive zu bestehen, die in mehreren Proteinen in konservierter Reihenfolge vorhanden sind und so den Eindruck eines zusammengehörenden Bereichs hervorrufen. Betrachtet man aber entfernter verwandte Proteine der PACSIN-Familie, bleibt in der N-terminalen Hälfte allein die FCH-Domäne als konservierter Bereich. Ein weiteres Gegenargument zu einer durchgehenden CDC15-NT-Domäne ist der integrierte potentielle coiled coil-Bereich, der mit großer Wahrscheinlichkeit

die Oligomerisierung der PACSINe vermittelt. Demzufolge scheint die N-terminale Hälfte der PACSINe aus einer FCH-Domäne, einem Bereich unbekannter Funktion, der eventuell die Bindung an α -Tubulin ermöglicht, und einer coiled coil-Region zu bestehen. Die dazwischenliegenden Bereiche könnten durchaus auch eine Zahl weiterer Interaktionen vermitteln, da z.B. der Interaktionsbereich für die Profiline, die unabhängig von einer Mutation der SH3-Domäne oder den in die CDC15-NT-Domäne eingeführten Mutationen an PACSIN 3 binden, noch völlig unbekannt ist.

4.4 Interaktion mit den PAST-Proteinen

Die PACSIN-Isoformen besitzen in ihren variablen Regionen zwischen CDC15-NT- und SH3-Domäne verschiedene Bindungsmotive für Domänen anderer Proteine. Jedoch konnte bislang weder ein Interaktionspartner für das Prolin-reiche Motiv in PACSIN 3, noch eine Bindung der in PACSIN 1 und 2 befindlichen NPF-Motive an die an der Endocytose beteiligten EH-Domänen-Proteine Ese1, dem Maus-Homolog zu Intersectin, und Eps15 nachgewiesen werden (Modregger et al., 2000).

Mit Hilfe des Two-Hybrid Systems konnte für PACSIN 1 ein bislang unbekanntes Protein mit Homologie zum PAST1-Protein aus *Drosophila melanogaster* isoliert werden (Modregger, 1997). Sowohl PAST1 als auch das neu isolierte PAST2 besitzen an ihrem C-Terminus eine EH-Domäne. Der N-Terminus enthält Sequenzbereiche, die nicht nur wie bereits für die humanen Homologe EHD1 bis 4 beschrieben einer Nucleotid-Bindungsstelle entsprechen (Mintz et al., 1999; Pohl et al., 2000), sondern auch zusätzliche Homologie zu den Consensus-Sequenzen von G-Proteinen aufweisen (Bourne et al., 1991). Daher könnte der N-Terminus eine potentielle GTPase-Domäne darstellen, die von der EH-Domäne durch einen variablen Bereich unbekannter Funktion getrennt wird.

4.4.1 Bindungsspezifität der PACSIN- und PAST-Isoformen

Um die Bindungsspezifität der beiden in Maus bekannten PAST-Proteine an die PACSINe näher zu untersuchen, wurden die NPF-Motive von PACSIN 1 und 2 durch Aminosäure-Austausche inaktiviert (Salcini et al., 1997) und die Bindungseigenschaften in einer Affinitätspräzipitation getestet.

Dabei zeigt sich wie erwartet eine Interaktion der beiden PAST-Proteine mit den Wildtyp-Proteinen von PACSIN 1 und 2, während PACSIN 3, das anstelle der NPF-Motive ein Prolin-reiches Motiv in seiner variablen Region enthält, nicht an die PAST-Proteine bindet. Hingegen besaßen die Mutationen der verschiedenen NPF-Motive unterschiedliche Auswirkungen auf die Bindung der beiden PAST-Isoformen. Bei PACSIN 1 reicht bereits die Mutation des ersten NPF-Motivs (N364D) aus, um die Bindung von PAST2 zu blockieren, während an die gleichzeitige Mutation beider NPF-Motive (N364D N376D) die Interaktion mit beiden PAST-Isoformen unterbindet. Über die Auswirkungen der Mutation des zweiten NPF-Motivs (N376D) kann leider keine Aussage getroffen werden, da diese PACSIN 1-

Variante in Zellen nicht exprimiert werden konnte. Bei PACSIN 2 hingegen reicht die Mutation eines einzelnen NPF-Motivs in keinem Fall aus, um die Bindung an die beiden PAST-Proteine zu inhibieren.

Aufgrund dieser Ergebnisse kann von einem unterschiedlichen Bindungsverhalten der PAST-Proteine an die beiden NPF-Motiv-haltigen PACSIN-Isoformen ausgegangen werden. Dies ist in sofern überraschend als die beiden hinteren NPF-Motive in PACSIN 2 den in PACSIN 1 enthaltenen NPF-Motiven entsprechen und das erste NPF-Motiv von PACSIN 2 durch das PACSIN 2-spezifische, zusätzliche Exon codiert wird.

Für die miteinander interagierenden Wildtyp-Formen konnte in einer Immunfluoreszenz-Analyse eine partielle Colokalisation festgestellt werden, wobei diese bei PACSIN 1 und PAST1 hauptsächlich im Bereich der Plasmamembran, bei den anderen Kombinationen eher im Zellinneren zu detektieren war. Da wahrscheinlich sowohl die PACSINe über Phosphorylierung als auch die PAST-Proteine über eine GTP-Bindung reguliert werden, ist die geringe Colokalisation wohl darauf zurückzuführen, daß die Proteine sowohl räumlich als auch zeitlich begrenzt miteinander interagieren. Die unterschiedlichen Bereiche, in denen die Proteine colokalisieren, scheint auf unterschiedliche Aufgaben oder auf die gleiche Aufgabe in unterschiedlichen Regionen der Zelle hinzuweisen.

4.4.2 Intrazelluläre Lokalisation der PAST-Proteine

Generell zeigen PAST1 und 2 ein unterschiedliches intrazelluläres Verteilungsmuster. Während PAST1 neben einer schwachen cytoplasmatischen Verteilung in punktförmigen Strukturen und an der Plasmamembran zu finden ist, besitzt PAST2 eine gröber strukturierte cytoplasmatische Verteilung, ohne besondere Strukturen hervorzuheben.

Die punktförmigen Strukturen in PAST1 zeigen teilweise eine Colokalisation mit Clathrin und konnten mit Hilfe des Markerproteins RhoB als Endosomen identifiziert werden. Dies erklärt die Colokalisation mit Clathrin, da Endosomen durch Clathrin-vermittelte Endocytose entstehen und über diesen Mechanismus auch Vesikel zu anderen Kompartimenten abschnüren. Die partielle Colokalisation der Endosomen mit Clathrin dürfte durch das schnell nach der Vesikelabschnürung erfolgende Ablösen der Clathrin-Hülle vom Vesikel begründet sein.

Da PAST2 ebenfalls eine partielle Colokalisation mit Clathrin, allerdings eher im Bereich des Golgi-Apparates, zeigt, könnten die verschiedenen PAST-Isoformen ihre unbekannt Funktion im intrazellulären Vesikeltransport an unterschiedlichen Kompartimenten erfüllen, womit auch für die PACSINe eine erneute Verbindung zum Vesikeltransport zwischen intrazellulären Kompartimenten bestünde.

Bei PAST1 ist für die Lokalisation in Endosomen sowohl das Vorhandensein der EH-Domäne als auch eine intakte potentielle GTPase-Domäne nötig, da weder die Deletionsmutante ohne EH-Domäne noch eine potentiell GDP-gebundene Variante in diesen Strukturen lokalisieren. Zusätzlich verlieren beide Varianten die für das Wildtyp-Protein typische Assoziation mit der Plasmamembran.

Auch bei PAST2 zeigen entsprechende Protein-Varianten eine drastische Veränderung in der intrazellulären Verteilung. Während die Deletionsmutante ohne EH-Domäne ausschließlich in groben Strukturen im Bereich des TGN/ER lokalisiert, ist die GDP-gebundene Variante im Vergleich zum Wildtyp-Protein auf die Umgebung des Zellkerns beschränkt. Somit scheinen beide Proteinregionen für die Lokalisation und damit auch für die Funktion der PAST-Proteine essentiell zu sein.

Einen Beweis für die GTPase-Aktivität der PAST-Proteine gibt es bislang nicht, die Bindung an Nucleotide konnte hingegen bereits nachgewiesen werden (A. Halbach, persönliche Mitteilung). Die Expression der potentiellen konstitutiv-aktiven, GTP-gebundenen Varianten der PAST-Proteine in NIH 3T3 Fibroblasten gibt aber einen deutlichen Hinweis auf eine GTPase-Funktion, da diese Protein-Varianten nicht in Zellen exprimiert werden können. Kurz nach Transfektion können kleinste Proteinmengen mittels Immunfluoreszenz in den Zellen detektiert werden, während in auch nur geringfügig länger transfizierten Ansätzen keine exprimierenden Zellen mehr nachgewiesen werden können. Somit scheinen die konstitutiv-aktiven Varianten der PAST-Proteine, die einer Regulation über GTP-Hydrolyse entzogen sind, die zellulären Funktionen so drastisch zu beeinflussen, daß selbst geringe Mengen für die Zellen letal sind.

4.5 Regulation der PASCINE

Der intrazelluläre Vesikeltransport ist durch die große Anzahl beteiligter Proteine äußerst komplex und unterliegt einer starken Regulation. Zum einen werden G-Proteine durch Überführung in den GTP-gebundenen Zustand aktiviert und sind wie Dynamin entweder direkt an der Endocytose beteiligt oder sie aktivieren andere Proteine wie z.B. N-WASP, das mit GTP-gebundenem Cdc42 interagiert (Prehoda et al., 2000; Rohatgi et al., 2000; Marks et al., 2001). Der Zeitraum und die Dauer der Aktivität der G-Proteine hängt einerseits von den GEFs, die den Austausch von gebundenen GDP gegen GTP auslösen, andererseits von den GAPs ab, die die GTP-Hydrolyse aktivieren und das G-Protein somit inaktivieren. Sowohl GEFs als auch GAPs unterliegen selbst zahlreichen Regulationen, die häufig über Phosphorylierung vermittelt werden.

Auch die endocytotischen Proteine selbst werden über ihren durch das Wechselspiel von Kinasen und Phosphatasen bestimmten Phosphorylierungszustand reguliert, wobei an der intrazellulären Signaltransduktion und dem Vesikeltransport teilweise dieselben Kinasen beteiligt sind (Linás et al., 1985; Robinson et al., 1993; Cotlin et al., 1999; Turner et al., 1999; Xia et al., 2000). Während aber bei der Signaltransduktion eine Aktivierung der Proteine durch ihre Phosphorylierung herbeigeführt wird, führt beim Vesikeltransport die Phosphorylierung eher zu einer Inaktivierung der Proteine, die durch die Aktivität einer Phosphatase aufgehoben werden muß (Slepnev et al., 1998).

Bei der kompensatorischen Endocytose synaptischer Vesikel ist dieses Wechselspiel im Phosphorylierungszustand der Proteine recht gut untersucht. Für die Dephosphorylierung und

damit Aktivierung der Proteine ist die Ca^{2+} -Ionen-abhängige Phosphatase Calcineurin verantwortlich, während die Proteine durch eine Phosphorylierung in den Ruhezustand versetzt werden (Hannah et al., 1999).

Die aufgrund der *in vivo*-Phosphorylierung des neurospezifischen PACSIN 1 (Plomann et al., 1998) durchgeführten *in vitro*-Analysen bestätigen die mittels Computeranalyse vermutete Phosphorylierung von PACSIN 1 durch PKC und CK2. Während für die Phosphorylierung durch PKC ζ die Phosphorylierungsstelle nicht exakt bestimmt werden konnte, wird PACSIN 1 durch PKC γ ausschließlich am Threonin 25 und von CK2 an mindestens zwei der potentiellen Phosphorylierungsstellen gleichzeitig phosphoryliert. Demzufolge paßt das Phosphorylierungsmuster von PACSIN 1 zu seiner Beteiligung an endocytotischen Prozessen, obwohl der Einfluß des Phosphorylierungszustands auf die Funktion erst noch analysiert werden muß.

Die Ergebnisse für PACSIN 1 sind mit großer Wahrscheinlichkeit auf die anderen PACSIN-Isoformen übertragbar, da die Phosphorylierungsstellen innerhalb der Isoformen konserviert sind. Eine Phosphoaminosäure-Analyse des PACSIN 2-Homologs in Huhn, FAP52, ergab zwar eine ausschließliche Phosphorylierung an Serinen (Meriläinen et al., 1997), allerdings sind die meisten der für PACSIN 1 diskutierten Phosphorylierungsstellen Threonine, die in den anderen Isoformen aber oft durch Serine ersetzt wurden, so daß sich diese Daten nicht zwangsläufig widersprechen.

Zwar ergaben weder die Phosphoaminosäure-Analyse bei FAP52 (Meriläinen et al., 1997) noch die bisher durchgeführten Untersuchungen bei PACSIN 1 einen eindeutigen Beweis einer Tyrosin-Phosphorylierung, es sprechen jedoch einige indirekte Hinweise dafür. Zum einen entspricht die Umgebung des Tyrosins am Anfang der CDC15-NT-Domäne vollständig der Consensus-Sequenz (Patschinsky et al., 1982, Hunter 1982, Cooper et al., 1984) und ist auch in weiter entfernten Proteinen konserviert. Zum anderen ist das entfernt mit den PACSINen verwandte Protein PSTPIP als Substrat einer Tyrosin-Phosphatase isoliert worden (Spencer et al., 1997). Zusätzlich wird die Interaktion zwischen WASP, einem homologen Protein des mit den PACSINen interagierenden N-WASP, und PSTPIP über die Tyrosin-Phosphorylierung von dessen SH3-Domäne reguliert (Wu et al., 1998). Durch Affinitätsparäzipitation konnten bereits unterschiedliche Bindungseigenschaften für mSos1 an PACSIN 1 in Abhängigkeit vom Phosphorylierungszustand des konservierten Tyrosins innerhalb der SH3-Domäne gezeigt werden (J. Modregger, persönliche Mitteilung). Diese Ergebnisse beweisen zwar keinen Einfluß einer Tyrosin-Phosphorylierung auf die Funktion der PACSINe, machen diesen Regulationsmechanismus aber sehr wahrscheinlich.

Die für PACSIN 1-spezifische Interaktion mit 14-3-3-Proteinen basiert auf einer vorausgehenden Phosphorylierung von PACSIN 1 am essentiellen Serin innerhalb der Bindungssequenz (Muslin et al., 1996). Obwohl die Funktion dieser Interaktion noch nicht geklärt ist, ist sie doch der erste Beweis einer funktionalen Regulation der PACSINe durch Phosphorylierung.

Mittlerweile haben Hilton und Mitarbeiter (2001) eine IP₆-abhängige Phosphorylierung von PACSIN 1 beschrieben. IP₆ unterliegt trotz seiner hohen intrazellulären Konzentration von 15-60 µM (Szwergold et al., 1987; Pittet et al., 1989) einem ständigen Kreislauf aus Dephosphorylierung und Phosphorylierung (Menniti et al., 1993; Stephens et al., 1993). Die Beteiligung von IP₆ am Vesikeltransport beschränkte sich bislang auf die Interaktion mit AP2 und 3, Arrestin und Synaptotagmin (Palczewski et al., 1992; Voglmaier et al., 1992; Ye et al., 1995; Gaidarov et al., 1999; Fuduka et al., 1994). Die nun beschriebene spezifische Phosphorylierung von PACSIN 1 durch eine IP₆-abhängige Kinase führt zu einer Verstärkung der Interaktion von PACSIN 1 mit Dynamin um einen Faktor größer als drei (Hilton et al., 2001).

Damit konnte nicht nur zum ersten Mal die Aktivierung einer Protein-Kinase durch IP₆ nachgewiesen werden, sondern durch die Phosphorylierung von PACSIN 1 als spezifischem Substrat dieser Kinase und der daraus resultierenden Modulation der PACSIN 1/Dynamin-Interaktion ebenfalls gezeigt werden, daß die IP₆-abhängige Phosphorylierung wahrscheinlich das Recycling synaptischer Vesikel beeinflusst. Da die Interaktion zwischen PACSIN 1 und Dynamin also nicht nur von der SH3-Domäne und der Prolin-reichen Region abhängen, sondern auch noch über diesen bislang unbekanntem Weg zusätzlich moduliert wird, scheint sie für den Vesikeltransport entscheidende Bedeutung zu haben.

4.6 Potentielle Funktion der PACSINE

Kombiniert man die über die PACSINE zusammengetragenen Wechselwirkungen, Eigenschaften und Regulationen, ergibt sich aus den nachfolgend aufgeführten Zusammenhängen als Hypothese für weiterführende Analysen eine Beteiligung der PACSINE an der über ‚actin comet tails‘-vermittelten Vesikelbewegung.

In *Xenopus* Oocyten konnte bereits gezeigt werden, daß N-WASP an allen sich über ‚actin comet tails‘ bewegendem Vesikeln vorhanden ist und durch Aktivierung des Arp2/3-Komplexes die Actin-Polymerisation induziert (Taunton et al., 2000). Die PACSINE werden über ihre SH3-Domänen-abhängige Interaktion mit Dynamin und Synaptojanin an den Hals des sich abschnürenden Vesikels rekrutiert. Da die PACSINE, wahrscheinlich über ihre coiled-coil-Region, in der Lage sind, Oligomere zu bilden, könnten sie dort über freie SH3-Domänen den bisher nicht geklärten Mechanismus der N-WASP-Rekrutierung an das Vesikel darstellen (Abb. 60).

Die gezeigte Interaktion der PACSINE mit α -Tubulin eröffnet mehrere Möglichkeiten. Sie könnte einerseits als Erkennungsstelle des sich fortbewegenden Vesikels für Mikrotubuli dienen, die den weiteren Transport des Vesikels innerhalb des Cytoplasmas übernehmen. Dagegen spricht aber, daß sich der Komplex an der ‚Rückseite‘ des Vesikels bilden würde und somit das Vesikel zwischen den Mikrotubuli und den PACSINen stünde.

Zusätzliche Interaktionspartner der PACSINE könnten durch gleichzeitige Interaktion mit dem Komplex die Bedingungen für eine durch N-WASP ausgelöste Actin-Polymerisation

optimieren. mSos1 löst über seine Bindungspartner eine PI(4,5)P₂-Produktion aus, das neben aktivem Cdc42 für eine Aktivierung von N-WASP benötigt wird. Zusätzlich könnte die Rekrutierung von Profilin in den Komplex die ablaufende Actin-Polymerisation mit den benötigten Actin-Monomeren beliefern und so den Vorgang beschleunigen (Holt und Koffer, 2001).

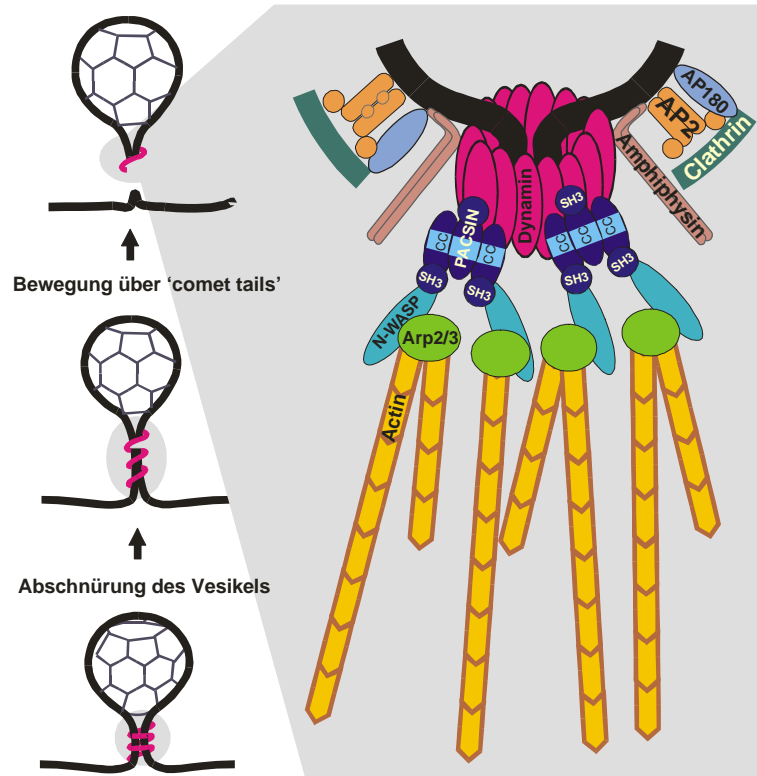


Abb. 60. Vereinfachte Darstellung der potentiellen Beteiligung der PACSINE am Vesikeltransport über ‚actin comet tails‘. Über ein PACSIN-Oligomer könnte N-WASP an den Hals des sich abschnürenden Vesikels rekrutiert werden, indem die PACSIN-Oligomere über ihre SH3-Domänen an die Prolin-reiche Regionen sowohl in N-WASP als auch in Dynamin binden. N-WASP könnte über eine Stimulation des Arp2/3-Komplexes die für den Antrieb benötigte Actin-Polymerisation auslösen. CC, coiled coil.

Eine andere Möglichkeit wäre die Initiation von ‚actin comet tails‘ an Vesikeln, die sich auf sekretorischen Wegen von den Enden der Mikrotubuli in Richtung Plasmamembran bewegen müssen. An diesen Vesikeln könnte die Rekrutierung der PACSIN-Oligomere zwar nicht über Dynamin vermittelt werden, da die Abschnürung des Vesikels bereits in anderen Bereichen der Zelle erfolgte, jedoch interagieren die PACSINE auch mit den cytoplasmatischen Domänen einiger transmembraner Proteine und könnten sich auf diesem Weg an das Vesikel anlagern.

Eine abgewandelte Version dieses Vorgangs wäre die von Taunton und Mitarbeitern (2000) diskutierte von Mikrotubuli ausgehende ‚actin comet tails‘-vermittelte ‚Diffusion‘ von Vesikeln, um so, besonders in großen Zellen wie den Oocyten, einen Transport in alle Zellbereiche nicht nur entlang der zwar sehr dynamischen, aber in ihrer Reichweite eingeschränkten Mikrotubuli zu ermöglichen.

4.7 Ausblick

Die große Anzahl der am Vesikeltransport beteiligten Proteine ermöglicht vielfältige Interaktionen und Regulationen und begründet die Komplexität der Prozesses. Für ein wirkliches Verständnis des Vesikeltransports müssen aber nicht nur die daran beteiligten Proteine bekannt sein, sondern sowohl die Hierarchie und Abfolge ihrer Wechselwirkungen und Funktionen als auch ihre exakte Funktion geklärt werden.

Zur Zeit stehen aber dem Gros der nicht oder nur ansatzweise charakterisierten Proteine eine kleine Zahl an Proteinen gegenüber, deren Funktion auf molekularer Ebene analysiert ist. Solange dies aber nicht für alle beteiligten Proteine der Fall ist, sind sämtliche funktionalen Rückschlüsse mehr oder weniger gut untermauerte Hypothesen, die noch durch Strukturanalysen bestätigt werden müssen.

Sollte sich für die Proteine der PACSIN-Familie die vermutete Funktion als Adapterprotein für die Initiation der ‚actin comet tails‘ bewahrheiten, wären die PACSINe für den Vesikeltransport unerlässlich. Umso wichtiger wäre die exakte Analyse ihrer Interaktionen und Regulation, die, basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit, mit verschiedenen Methoden angegangen werden sollte.

Eine ausführliche Analyse der vorhandenen Domänen und möglichen Bindungsmotive sollte eine Isolierung aller Bindungspartner ermöglichen, der durch Mutationsanalysen, wie bereits teilweise für die SH3-Domänen und die NPF-Motive durchgeführt, eine Eingrenzung des Interaktionsbereichs auf essentielle Aminosäuren folgen sollte.

Diese PACSIN-Varianten mit spezifisch inaktivierten Bindungsmotiven sollten im Vergleich zu den Wildtyp-Proteinen in Versuchsansätzen wie der Fluoreszenz-Mikroskopie lebender Zellen oder, wie schon für die SH3-Domänen-abhängige Inhibition der Transferrin-Aufnahme durchgeführt, in funktionalen Analysen verwendet werden. Der Einfluß der Domäne auf die intrazelluläre Lokalisation des Proteins und das Verhalten der Zelle könnte Rückschlüsse auf die Regulation zellulärer Funktionen ermöglichen. Vergleichbare Analysen mit z.B. Phosphorylierungsmutanten könnten Regulationsmechanismen im Zusammenhang mit bestimmten Kinasen erkennen lassen.

Sollten bestimmte Domänen oder Bindungsmotive der PACSINe einen entscheidenden Einfluß auf die Funktion haben, könnte durch Elektronenmikroskopie und/oder Röntgenstrukturanalyse die Interaktion des betreffenden Bereichs mit seinem Interaktionspartner in Abhängigkeit von den getesteten Mutationen untersucht werden. Ein Vergleich der so für das Wildtyp- und das mutierte Protein ermittelten Daten sollte ein Verständnis der Interaktion auf molekularer Basis ermöglichen und Erklärungsmöglichkeiten für die Ergebnisse der *in vitro*- und *in vivo*-Studien liefern.

Die Etablierung PACSIN-defizienter Mauslinien wäre ein weiterer Weg, um die *in vivo*-Funktion der PACSINe zu analysieren. Eine Inaktivierung des ubiquitär und schon im Zwei-Zell-Stadium exprimierten PACSIN 2 könnte zu einem sehr früh embryonal-letalen Phänotyp

führen, dessen Analyse daher sehr schwierig wäre. Bei einer Inaktivierung von PACSIN 1 oder 3 mit ihrem eingeschränkteren Expressionsmuster besteht hingegen die Gefahr einer funktionalen Kompensation der Defizienz durch die anderen PACSIN-Isoformen.

Hingegen könnte der Austausch des Sequenzbereichs für eine Domäne oder ein Bindungsmotiv gegen eine entsprechend mutierte Form innerhalb eines PACSIN-Gens die Etablierung einer transgenen Maus-Linie ermöglichen, in der die Auswirkungen der Mutation im lebenden Organismus untersucht werden können. Aufgrund der Langfristigkeit dieser Projekte sollten so nur Interaktionen analysiert werden, die durch oben beschriebene Methoden bereits gut charakterisiert sind.

5 Zusammenfassung

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente dienten der Isolierung und funktionalen Charakterisierung der PACSIN-Proteinfamilie basierend auf den Daten für das neurospezifische PACSIN 1 in Maus und dessen Homolog in Ratte, Syndapin I. Die erzielten Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- In Maus und Mensch konnten jeweils zwei weitere Mitglieder der PACSIN-Proteinfamilie, PACSIN 2 und 3, isoliert werden, die denselben modulären Aufbau wie PACSIN 1 mit einer N-terminalen potentiellen CDC15-NT- und einer C-terminalen SH3-Domäne aufweisen. Während PACSIN 1 und 2 in der dazwischenliegenden variablen Region zwei, bzw. drei NPF-Motive besitzen, enthält PACSIN 3 in diesem Sequenzbereich ein Prolin-reiches Motiv.
- Sowohl auf RNA- als auch auf Protein-Ebene wird PACSIN 2 ubiquitär und PACSIN 3 hauptsächlich in Muskelgewebe exprimiert. Alle PACSINe besitzen eine cytoplasmatische Verteilung, PACSIN 3 zeigt in Muskelzellen zusätzlich eine ausgeprägte Plasmamembran-Assoziation. In Hirnschnitten exprimieren Bereiche wie der Cortex alle drei Isoformen, während andere Areale hauptsächlich einzelne Isoformen exprimieren.
- Die für Syndapin I beschriebenen Interaktionen mit Proteinen des Clathrin-vermittelten Vesikeltransports konnten auf alle Mitglieder der PACSIN-Familie übertragen und zusätzlich durch Mutationsanalyse die Abhängigkeit dieses Prozesses von der C-terminalen SH3-Domäne nachgewiesen werden. Weitere potentielle Interaktionspartner der beiden neuen Isoformen wurden mit Hilfe des Two-Hybrid Systems isoliert.
- Alle PACSINe sind in der Lage Homo- und Heterooligomere zu bilden, wobei diese Interaktion wahrscheinlich auf der potentiellen coiled coil-Region innerhalb der CDC15-NT-Domäne beruht. Daher könnten die PACSINe als Adapter fungieren, die mehrere am Vesikeltransport beteiligte Proteine zu den sich bildenden Vesikeln rekrutieren.
- Das neurospezifische PACSIN 1 ist die einzige Isoform, die eine phosphorylierungsabhängige Bindung mit 14-3-3-Proteinen eingehen kann und wahrscheinlich auf diesem Weg funktional reguliert wird. Da für PACSIN 1 bereits eine *in vivo*-Phosphorylierung bekannt war, wurde durch *in vitro*-Phosphorylierungsstudien verschiedener Phosphorylierungsmutanten versucht, die exakten Aminosäure-Positionen und Spezifitäten einiger Kinasen zu bestimmen.
- Die Eigenschaften der N-terminalen potentiellen CDC15-NT-Domäne konnten durch Mutationsanalysen näher charakterisiert werden. Die eingeführten Mutationen zeigen drastische Effekte auf Zellen, so daß von einer entscheidenden Interaktion oder Regulation über diesen Bereich ausgegangen werden kann.
- PACSIN 1 und 2 interagieren über ihre NPF-Motive mit den potentiellen GTPasen PAST1 und 2. Durch Mutationsanalysen konnte eine EH- und GTPase-Domänen-abhängige Lokalisation von PAST1 in Endosomen nachgewiesen werden.

6 Anhang

Auf den nachfolgenden Seiten sind die Aminosäure- und Proteinsequenzen der PACSIN 2- (Abb. 61) und PACSIN 3-Isoformen (Abb. 62) in Maus und Mensch dargestellt.

Die Positionen der Aminosäuren sind jeweils links, die der Nucleotide rechts angegeben.

Sterne unterhalb der Nucleotidsequenz markieren die Position von Stop-Codons in der 5'-UTR, die sich im gleichen Leseraster wie das Protein befinden.

Fett markierte Nucleotide geben die Position der potentiellen Polyadenylierungssignale an.

Innerhalb der Proteinsequenz ist der Bereich der potentiellen CDC15-NT-Domäne grau unterlegt, die Aminosäuren der SH3-Domäne sind unterstrichen.

In den Aminosäuresequenzen für PACSIN 2 sind die NPF-Motive, in den Sequenzen für PACSIN 3 das Prolin-reiche Motiv fett hervorgehoben.

6.2 PACSIN 3 aus Maus und Mensch

A	GGCACGAGGGGGCCCTGAGAGGACACGACAGGCTCATAGTGGCA 45 GCTTGGAGACTTGGACACGGGCTCTGGAGTGAATCTGGAGACCCC 90	B	GGCACGAGGGCTGGCCGGACCCCCACCCCGGAGGGGCCAGGGA 45 GGACGCGAGTACCGTGGCAGCATTGAGAGTTGGACACCCGGGTC 90
	*		*
	AGCACACATCTGCCACCATTCCTGCTGCAGGGATACCATGGCT 135		CTTGAAGTATCTCTAGGCCCCAGCCCAAATCCGCCACCATTC 135
1	M A		GTGCTGCGGGGACACCATGGCTCCAGAAAGAGGACGCTGGAGGGA 180
	CCAGAGGAGGACCGCGAGGGAGTCTAGGGGGCAGTTTCTGG 180	1	M A P E E D A G G E
3	P E E D A G G E V L G G S F W		GGCCTTAGGGGCGATTTCTGGAGGCTGGCAACTACAGCGGCAC 225
	GAGGCTGGCAACTACAGCGGACGGTGCAGAGGGTTGAGGATGG 225	11	A L G G S F W E A G N Y R R T
18	E A G N Y R R T V Q R V E D G		GGTACAGCGGGTGGAGGACGGGACCGGCTGTGGGGGACCTGGT 270
	CACAGGCTGTGGGGACCTGGTTAGCTCTTCCAAGAACCTGCC 270	26	V Q R V E D G H R L C G D L V
33	H R L C G D L V S C F Q E R A		CAGCTGTCTCCAGGAGCGCGCCGATCGAGAGGCTTATGCCCA 315
	CGCATTTGAGAAGGCTACGCCAGAGCTGGCTGACTGGGCGCG 315	41	S C F Q E R A R I E K A Y A Q
48	R I E K A Y A Q Q L A D W A R		CGAGTTGGCTGACTGGGCCGAAAGTGGAGGGGGACCGTGGAGA 360
	AAGTGGAGGGTCTGTGGAGAAGGGCCACAGTACGGCACCTG 360	56	Q L A D W A R K W R G T V E K
63	K W R G A V E K G P Q Y G T L		GGGCCCCAGTATGGCACCTGGAGAAGGCTGGCATGCGCTTTT 405
	GAGAAGGCTGGCATGCTTCTTCACTGCGGCTGAGAGGCTGAGC 405	71	G P Q Y G T L E K A W H A F F
78	E K A W H A F F T A A E R L S		CACGGCGCTGAGCGCTGAGCCCTGACCTGGAGTGGCGGA 450
	GAGCTGCATTTGGAGGTGAGGAGAAGTTGCACGGTCCAGACAGC 450	86	T A A E R L S A L H L E V R E
93	E L H L E V R E K L H G P D S		GAAGCTGCAAGGGCAGGACAGTGGCGGTTGCGCCTGGCAGCG 495
	GAGGAGTGGGACCTGGCAGCGAGGGGCTTTCCACCGCGCAGTG 495	101	K L Q G Q D S E R V R A W Q
108	E R V R T W Q R G A F H R P V		GGGGGCTTTCCACCGGCTGTGCTGGCGGCTTCCGCGAGAGCGG 540
	CTGGGGGCTTTCGGGAAGCGGGCTGCAGAGGATGGTTTCCGT 540	116	G A F H R P V L G G F R E S R
123	L G G F R E S R A A E D G F R		GGCGCCGAGGACGGCTTCGCAAGGCCAGAAAGCTGGCTGAA 585
	AAAGCTCAGAAGCCCTGGCTAAAGAGGCTGAAGGAGGTTGAGGCT 585	131	A A E D G F R K A Q K P W L K
138	K A Q K P W L K R L K E V E A		GAGGCTGAAGGAGTTGAGGCTTCCAAGAAAGCTACCAACGAGC 630
	TCTAAGAAGAGCTACACACAGCCCGCAAGGATGAGAAGACAGCC 630	146	R L K E V E A A S K K S Y H A A
153	S K K S Y H T A R K D E K T A		CCGGAAGGATGAGAAGCCCGCCAGCGAGGAGGAGCCAGCAAA 675
	CAGACCCGGAGAGCCAGCGGAGGAGCAGCTCCATGTCCAG 675	161	R K D E K T A Q T R E S H A K
168	Q T R E S H A K A D S S M S Q		GGCAGACAGCCCGCTTCCAGGAGCAGCTGGCAGAACTGAGGA 720
	GAGCAGCTTCAAAATTAAGGAGCGGGTGGCGCTGCACCAAG 720	176	A D S A V S Q E Q L R K L Q E
183	E Q L R K L Q E R V G R C T K		ACGGTGGAAAGCTGTGCCAAGGGCCGAGAGACAAAGACTCA 765
	GAGCAGAGAGATGAAACCCAGTATGAGCAGCCCTGSCCGAG 765	191	R V E R C A K E A E K T K A Q
198	E A E K M K T Q Y E Q T L A E		GTATGAGCAGAGCTGGCAGAGCTGCATCGCTACACTCCAGCTA 810
	CTAAATCGCTACCCACCGTACATGGAGACATGGAGCAGGCT 810	206	Y E Q T L A A E G L L H R Y T P R Y
213	L N R Y T P R Y M E D M E Q A		CATGGAGACATGGAACCGCTTTGAGACTGGCAGGCGCCGGA 855
	TTTGAGAGCTGCCAGGCTGCTGAGCGCCAGCGGCTTCTTCTTC 855	221	M E D M E Q A F E T C Q A A E
228	F E S C Q A A E R Q R L L F F		GGCCAGCGGCTTCTTCTTCAAGGATATGCTGCTCACCTTACA 900
	AAGGATGCTTGTCTACCTGCATCAACCTCGACCTCTCCAGT 900	236	R Q R L L F F R K D M L L T L H
243	K D V L L T L H Q H L D L S S		CCAGCACCTGGACCTTCCAGCAGTGAAGAATTCATGAATCCA 945
	AGCACAAGTTCCATGAACCTCGACCTCGAGCAGAGCATT 945	251	Q H L D L S S S E K F H L H
258	S D K F H E L H R D L Q Q S I		CCGTGACTTGCACCGAGGCTTGGAGCAGCAGTGCAGGAAGG 990
	GAGGCTGCCAGTGAAGAGGATCTGCGCTGGTGGCGGAGCACA 990	266	R D L H Q G I E A A S D E E D
273	E A A S D E E D L R W W R S T		TCTGCGCTGGTGGCGAGCACCACCGGCGAGGATGGCCATGAA 1035
	CACGGGCTGGCATGGCCATGAACCTGGCCACAGTTTGAAGATGG 1035	281	L R W W R S T H G P G M A M N
288	H G P G M A M N W P Q F E E W		CTGGCCACAGTTTCGAGGAGTGGCTTGGACACAGAGGACAT 1080
	TCGTAGACACAGAGGACCTAGCCGCAAGGAGAAGGCTGGC 1080	296	W P Q F E E W S L D T Q R T I
303	S L D T Q R A I S R K E K G G		CAGCCGGAAGGAGAAGGGTGGCGGAGCCCTGATGAGTTACCT 1125
	CGAGCCAGATGAGGTTACTCTGACAGCATTGTACCGACAGA 1125	311	S R K E K G R S P D E V T L
318	R S P D E V T L T S I V P T R		GACCAGCATTGTGCTACAAGAGATGGCAGCCGACCCACCCCA 1170
	GATGGCACCCGACCCCCAGCTGCCATCGTCCCGGGGTAGC 1170	326	T S I V P T R D G T A P P P Q
333	D G T A P P P Q S P S S P G S		GTCCCGGGGTCACAGCAGGCGGATGAGGATGGTCAGA 1215
	GGGAGGACAGGACTGGTGCAGTGGAGAGTCCCGGGAAGTT 1215	341	S P G S P G T G Q D E E W S D
348	G Q D E D W S D E E S P G K V		TGAAGAGTCCCGGAGGCTGCCACCGGGTTCGGTGGAGGC 1260
	GCCACTGGGGTGAAGTACGGGCCCTTTATGACTATGCTGGCCAG 1260	356	E E S P R K A A T G V R V R A
363	A T G V R V R A L Y D Y A G Q		ACTCTATGACTACGCTGGCCAGGAGCTGATGAGCTGAGCTTCGG 1305
	GAGGCTGATGAGCTGAGCTTCCGAGCAGGGGAAGATTGCTGAAG 1305	371	L Y D Y A G Q E A D E L S F R
378	E A D E L S F R A G E E L L K		AGCAGGGAGGAGCTGTAAGATGAGTGGAGGACGAGCAGGG 1350
	ATGAGCAGGAGGATGAGCAGGGCTGGTCCAGGGCCAGCTGCAG 1350	386	A G E E L L K M S E E D E Q G
393	M S E E D E Q G W C Q G Q L Q		CTGGTCCAAAGCCAGTTGCAGAGTGGCCGATGGCCCTGTACCC 1395
	AGTGGCCGATGGTCTGACCTGCCAATTACGTAGAATGTGTG 1395	401	W C Q G Q L Q S G R I G L Y P
408	S G R I G L Y P A N Y V E C V		TGCCAACTACGTGGAGTGTGGCGGCTGAGTGTCTGACAGCC 1440
	GGCGCTGAGTGCCTGACAGCCCTACCAGGCGTCTCTCTGACC 1440	416	A N Y V E C V G A *
423	G A *		CTTCTGCAAGTTTACCCACCTTGGTTCAGAGCCAGCTTCTCT 1485
	TGGCCAGAGCTTAACCCCTTCCGACTGCTGGAACCTGAAGGCC 1485		GGAGAGCCGACCTCAGGGCCCTGAACCGTCTCTCTCTGGCTGC 1530
	TGAACCATGTGCTGCTGCTCTCTTTTCCACAGGAGGAGT 1530		TCCTCTGCTCTTGGAGGAGGAGTCTGGGACCCAGGAGGGGA 1575
	CTCAGGCCCATGAAGGCGAGGGCTGTGTCTAGATTTGAGG 1575		GGGGCTTTGTCTAGGGAAGGAGTGGTGGGAGGAGGAGGCT 1620
	TGGAATGATGGAGGGTCGAGAGGTGCCAGGCTCTCCGGGAACA 1620		AGGCTGAGGGCAAGATGGGAGGTCAGAGGTGACAGAAGCGTTCAG 1665
	TTTGGTTCATCCAGAGTGGAGGATCCAGCTCCTAAACTGTTTA 1665		GGGTGCTGGGCTCCCGAGGAGTGTGACTCAGTCTCTGACT 1710
	GGAGTCTGGGGTGGAGTTGGGAGAATGATTTGAGGCTGGC 1710		CTGCTTTGGGTTCTGGGTTGGCTGGGTTGGGTTGAGTGTATCTG 1755
	AGCACCTCTTTTGTGACTTGTAGTGTGATTAAATTGATTAAG 1755		GCCTAGCAGCACCCTTGTGGTGTGTTAGCGTGTATTAAAC 1800
	AAATAAAACCCC 1767		TTGACACACCCACACAAAAAC 1825

Abb. 62. Nucleotid- und Aminosäuresequenzen der PACSIN 3-Homologe aus Maus (A) und Mensch (B). Die Markierungen sind zwei Seiten zuvor erläutert, die Abbildung wurde aus Modregger et al. (2000) übernommen.

7 Literatur

- Ahle, S. und Ungewickell, E. (1986).** Purification and properties of a new clathrin assembly protein. *EMBO J* **5**: 3143-9.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. und Watson, J. D. (1994).** Molecular biology of the cell. Garland Publishing, Inc., New York.
- Allan, V. J. und Schroer, T. A. (1999).** Membrane motors. *Curr Opin Cell Biol* **11**: 476-82.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. und Lipman, D. J. (1990).** Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**: 403-10.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. und Lipman, D. J. (1997).** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**: 3389-402.
- Anderson, R. G. (1993).** Caveolae: where incoming and outgoing messengers meet. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 10909-13.
- Anderson, R. G. (1998).** The caveolae membrane system. *Annu Rev Biochem* **67**: 199-225.
- Anderson, R. G., Kamen, B. A., Rothberg, K. G. und Lacey, S. W. (1992).** Potocytosis: sequestration and transport of small molecules by caveolae. *Science* **255**: 410-1.
- Aniento, F., Gu, F., Parton, R. G. und Gruenberg, J. (1996).** An endosomal β COP is involved in the pH-dependent formation of transport vesicles destined for late endosomes. *J Cell Biol* **133**: 29-41.
- Aoki, K., Ishida, R. und Kasai, M. (1997).** Isolation and characterization of a cDNA encoding a Translin-like protein, TRAX. *FEBS Lett* **401**: 109-12.
- Aoki, K., Suzuki, K., Sugano, T., Tasaka, T., Nakahara, K., Kuge, O., Omori, A. und Kasai, M. (1995).** A novel gene, Translin, encodes a recombination hotspot binding protein associated with chromosomal translocations. *Nat Genet* **10**: 167-74.
- Arneson, L. S., Kunz, J., Anderson, R. A. und Traub, L. M. (1999).** Coupled inositide phosphorylation and phospholipase D activation initiates clathrin-coat assembly on lysosomes. *J Biol Chem* **274**: 17794-805.
- Aspenström, P. (1997).** A Cdc42 target protein with homology to the non-kinase domain of FER has a potential role in regulating the actin cytoskeleton. *Curr Biol* **7**: 479-87.
- Barlowe, C. (2000).** Traffic COPs of the early secretory pathway. *Traffic* **1**: 371-7.
- Barlowe, C., Orci, L., Yeung, T., Hosobuchi, M., Hamamoto, S., Salama, N., Rexach, M. F., Ravazzola, M., Amherdt, M. und Schekman, R. (1994).** COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell* **77**: 895-907.
- Barlowe, C. und Schekman, R. (1993).** SEC12 encodes a guanine-nucleotide-exchange factor essential for transport vesicle budding from the ER. *Nature* **365**: 347-9.
- Benmerah, A., Begue, B., Dautry-Varsat, A. und Cerf-Bensussan, N. (1996).** The ear of α -adaptin interacts with the COOH-terminal domain of the Eps 15 protein. *J Biol Chem* **271**: 12111-6.
- Berger, B., Wilson, D. B., Wolf, E., Tonchev, T., Milla, M. und Kim, P. S. (1995).** Predicting coiled coils by use of pairwise residue correlations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 8259-63.
- Blanchoin, L., Pollard, T. D. und Mullins, R. D. (2000).** Interactions of ADF/cofilin, Arp2/3 complex, capping protein and profilin in remodeling of branched actin filament networks. *Curr Biol* **10**: 1273-82.
- Blau, H. M., Chiu, C. P. und Webster, C. (1983).** Cytoplasmic activation of human nuclear genes in stable heterocaryons. *Cell* **32**: 1171-80.

- Boudin, H., Doan, A., Xia, J., Shigemoto, R., Haganir, R. L., Worley, P. und Craig, A. M. (2000).** Presynaptic clustering of mGluR7a requires the PICK1 PDZ domain binding site. *Neuron* **28**: 485-97.
- Bourne, H. R., Sanders, D. A. und McCormick, F. (1991).** The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* **349**: 117-27.
- Bowtell, D., Fu, P., Simon, M. und Senior, P. (1992).** Identification of murine homologues of the *Drosophila* son of sevenless gene: potential activators of ras. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 6511-5.
- Broadie, K., Rushton, E., Skoulakis, E. M. und Davis, R. L. (1997).** Leonardo, a *Drosophila* 14-3-3 protein involved in learning, regulates presynaptic function. *Neuron* **19**: 391-402.
- Brown, D. A. und Rose, J. K. (1992).** Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* **68**: 533-44.
- Bucher, P. und Bairoch, A. (1994).** A generalized profile syntax for biomolecular sequence motifs and its function in automatic sequence interpretation. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol* **2**: 53-61.
- Buday, L. und Downward, J. (1993).** Epidermal growth factor regulates p21^{ras} through the formation of a complex of receptor, Grb2 adapter protein, and Sos nucleotide exchange factor. *Cell* **73**: 611-20.
- Carlier, M. F., Nioche, P., Broutin-L'Hermite, I., Boujemaa, R., Le Clainche, C., Egile, C., Garbay, C., Ducruix, A., Sansonetti, P. und Pantaloni, D. (2000).** GRB2 links signaling to actin assembly by enhancing interaction of neural Wiskott-Aldrich syndrome protein (N-WASp) with actin-related protein (ARP2/3) complex. *J Biol Chem* **275**: 21946-52.
- Cestra, G., Castagnoli, L., Dente, L., Minenkova, O., Petrelli, A., Migone, N., Hoffmuller, U., Schneider-Mergener, J. und Cesareni, G. (1999).** The SH3 domains of endophilin and amphiphysin bind to the proline-rich region of synaptojanin 1 at distinct sites that display an unconventional binding specificity. *J Biol Chem* **274**: 32001-7.
- Chardin, P., Camonis, J. H., Gale, N. W., van Aelst, L., Schlessinger, J., Wigler, M. H. und Barsagi, D. (1993).** Human Sos1: a guanine nucleotide exchange factor for Ras that binds to GRB2. *Science* **260**: 1338-43.
- Chen, H., Fre, S., Slepnev, V. I., Capua, M. R., Takei, K., Butler, M. H., Di Fiore, P. P. und De Camilli, P. (1998).** Epsin is an EH-domain-binding protein implicated in clathrin-mediated endocytosis. *Nature* **394**: 793-7.
- Chen, H., Slepnev, V. I., Di Fiore, P. P. und De Camilli, P. (1999).** The interaction of epsin and Eps15 with the clathrin adaptor AP-2 is inhibited by mitotic phosphorylation and enhanced by stimulation-dependent dephosphorylation in nerve terminals. *J Biol Chem* **274**: 3257-60.
- Chung, H. J., Xia, J., Scannevin, R. H., Zhang, X. und Haganir, R. L. (2000).** Phosphorylation of the AMPA receptor subunit GluR2 differentially regulates its interaction with PDZ domain-containing proteins. *J Neurosci* **20**: 7258-67.
- Clark, S. G., Stern, M. J. und Horvitz, H. R. (1992).** *C. elegans* cell-signalling gene sem-5 encodes a protein with SH2 and SH3 domains. *Nature* **356**: 340-4.
- Cohen, G. B., Ren, R. und Baltimore, D. (1995).** Modular binding domains in signal transduction proteins. *Cell* **80**: 237-48.
- Corvera, S., D'Arrigo, A. und Stenmark, H. (1999).** Phosphoinositides in membrane traffic. *Curr Opin Cell Biol* **11**: 460-5.
- Cosson, P. und Letourneur, F. (1997).** Coatamer (COPI)-coated vesicles: role in intracellular transport and protein sorting. *Curr Opin Cell Biol* **9**: 484-7.
- Cotlin, L. F., Siddiqui, M. A., Simpson, F. und Collawn, J. F. (1999).** Casein kinase II activity is required for transferrin receptor endocytosis. *J Biol Chem* **274**: 30550-6.
- Cousin, H., Gaultier, A., Bleux, C., Darribere, T. und Alfandari, D. (2000).** PACSIN2 is a regulator of the metalloprotease/disintegrin ADAM13. *Dev Biol* **227**: 197-210.

- Cremona, O., Di Paolo, G., Wenk, M. R., Luthi, A., Kim, W. T., Takei, K., Daniell, L., Nemoto, Y., Shears, S. B., Flavell, R. A., McCormick, D. A. und De Camilli, P. (1999). Essential role of phosphoinositide metabolism in synaptic vesicle recycling. *Cell* **99**: 179-88.
- Daly, C., Sugimori, M., Moreira, J. E., Ziff, E. B. und Llinas, R. (2000). Synaptophysin regulates clathrin-independent endocytosis of synaptic vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 6120-5.
- Das, B., Shu, X., Day, G. J., Han, J., Krishna, U. M., Falck, J. R. und Broek, D. (2000). Control of intramolecular interactions between the pleckstrin homology and Dbl homology domains of Vav and Sos1 regulates Rac binding. *J Biol Chem* **275**: 15074-81.
- David, C., McPherson, P. S., Mundigl, O. und de Camilli, P. (1996). A role of amphiphysin in synaptic vesicle endocytosis suggested by its binding to dynamin in nerve terminals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 331-5.
- DeChiara, T. M., Bowen, D. C., Valenzuela, D. M., Simmons, M. V., Poueymirou, W. T., Thomas, S., Kinetz, E., Compton, D. L., Rojas, E., Park, J. S., Smith, C., DiStefano, P. S., Glass, D. J., Burden, S. J. und Yancopoulos, G. D. (1996). The receptor tyrosine kinase MuSK is required for neuromuscular junction formation in vivo. *Cell* **85**: 501-12.
- Dell'Angelica, E. C., Klumperman, J., Stoorvogel, W. und Bonifacino, J. S. (1998). Association of the AP-3 adaptor complex with clathrin. *Science* **280**: 431-4.
- Dell'Angelica, E. C., Ohno, H., Ooi, C. E., Rabinovich, E., Roche, K. W. und Bonifacino, J. S. (1997). AP-3: an adaptor-like protein complex with ubiquitous expression. *EMBO J* **16**: 917-28.
- Dev, K. K., Nakajima, Y., Kitano, J., Braithwaite, S. P., Henley, J. M. und Nakanishi, S. (2000). PICK1 interacts with and regulates PKC phosphorylation of mGLUR7. *J Neurosci* **20**: 7252-7.
- Dev, K. K., Nishimune, A., Henley, J. M. und Nakanishi, S. (1999). The protein kinase C α binding protein PICK1 interacts with short but not long form alternative splice variants of AMPA receptor subunits. *Neuropharmacology* **38**: 635-44.
- Di Guglielmo, G. M., Baass, P. C., Ou, W. J., Posner, B. I. und Bergeron, J. J. (1994). Compartmentalization of SHC, GRB2 and mSOS, and hyperphosphorylation of Raf-1 by EGF but not insulin in liver parenchyma. *EMBO J* **13**: 4269-77.
- Dupree, P., Parton, R. G., Raposo, G., Kurzchalia, T. V. und Simons, K. (1993). Caveolae and sorting in the trans-Golgi network of epithelial cells. *EMBO J* **12**: 1597-605.
- Egan, S. E., Giddings, B. W., Brooks, M. W., Buday, L., Sizeland, A. M. und Weinberg, R. A. (1993). Association of Sos Ras exchange protein with Grb2 is implicated in tyrosine kinase signal transduction and transformation. *Nature* **363**: 45-51.
- El Far, O., Airas, J., Wischmeyer, E., Nehring, R. B., Karschin, A. und Betz, H. (2000). Interaction of the C-terminal tail region of the metabotropic glutamate receptor 7 with the protein kinase C substrate PICK1. *Eur J Neurosci* **12**: 4215-21.
- Fankhauser, C., Reymond, A., Cerutti, L., Utzig, S., Hofmann, K. und Simanis, V. (1995). The *S. pombe* *cdc15* gene is a key element in the reorganization of F-actin at mitosis. *Cell* **82**: 435-44.
- Faundez, V., Horng, J. T. und Kelly, R. B. (1998). A function for the AP3 coat complex in synaptic vesicle formation from endosomes. *Cell* **93**: 423-32.
- Feig, L. A. und Cooper, G. M. (1988). Inhibition of NIH 3T3 cell proliferation by a mutant ras protein with preferential affinity for GDP. *Mol Cell Biol* **8**: 3235-43.
- Felsenstein, J. (1996). Inferring phylogenies from protein sequences by parsimony, distance, and likelihood methods. *Methods Enzymol* **266**: 418-27.
- Ferguson, S. S., Downey, W. E., 3rd, Colapietro, A. M., Barak, L. S., Menard, L. und Caron, M. G. (1996). Role of β -arrestin in mediating agonist-promoted G protein-coupled receptor internalization. *Science* **271**: 363-6.
- Finkenstadt, P. M., Kang, W. S., Jeon, M., Taira, E., Tang, W. und Baraban, J. M. (2000). Somatodendritic localization of Translin, a component of the Translin/Trax RNA binding complex. *J Neurochem* **75**: 1754-62.

- Franco, M., Boretto, J., Robineau, S., Monier, S., Goud, B., Chardin, P. und Chavrier, P. (1998).** ARNO3, a Sec7-domain guanine nucleotide exchange factor for ADP ribosylation factor 1, is involved in the control of Golgi structure and function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 9926-31.
- Friederich, E., Vancompernelle, K., Huet, C., Goethals, M., Finidori, J., Vandekerckhove, J. und Louvard, D. (1992).** An actin-binding site containing a conserved motif of charged amino acid residues is essential for the morphogenic effect of villin. *Cell* **70**: 81-92.
- Fujimoto, T. (1993).** Calcium pump of the plasma membrane is localized in caveolae. *J Cell Biol* **120**: 1147-57.
- Fujimoto, T., Nakade, S., Miyawaki, A., Mikoshiba, K. und Ogawa, K. (1992).** Localization of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-like protein in plasmalemmal caveolae. *J Cell Biol* **119**: 1507-13.
- Fukuda, M., Aruga, J., Niinobe, M., Aimoto, S. und Mikoshiba, K. (1994).** Inositol-1,3,4,5-tetrakisphosphate binding to C2B domain of IP4BP/synaptotagmin II. *J Biol Chem* **269**: 29206-11.
- Gad, H., Ringstad, N., Low, P., Kjaerulff, O., Gustafsson, J., Wenk, M., Di Paolo, G., Nemoto, Y., Crun, J., Ellisman, M. H., De Camilli, P., Shupliakov, O. und Brodin, L. (2000).** Fission and uncoating of synaptic clathrin-coated vesicles are perturbed by disruption of interactions with the SH3 domain of endophilin. *Neuron* **27**: 301-12.
- Gaidarov, I., Krupnick, J. G., Falck, J. R., Benovic, J. L. und Keen, J. H. (1999).** Arrestin function in G protein-coupled receptor endocytosis requires phosphoinositide binding. *EMBO J* **18**: 871-81.
- Gasca, S., Hill, D. P., Klingensmith, J. und Rossant, J. (1995).** Characterization of a gene trap insertion into a novel gene, cordon-bleu, expressed in axial structures of the gastrulating mouse embryo. *Dev Genet* **17**: 141-54.
- Ghitescu, L. und Bendayan, M. (1992).** Transendothelial transport of serum albumin: a quantitative immunocytochemical study. *J Cell Biol* **117**: 745-55.
- Gibbs, J. B., Schaber, M. D., Marshall, M. S., Scolnick, E. M. und Sigal, I. S. (1987).** Identification of guanine nucleotides bound to ras-encoded proteins in growing yeast cells. *J Biol Chem* **262**: 10426-9.
- Glogauer, M., Hartwig, J. und Stossel, T. (2000).** Two pathways through Cdc42 couple the N-formyl receptor to actin nucleation in permeabilized human neutrophils. *J Cell Biol* **150**: 785-96.
- Goodman, O. B., Jr., Krupnick, J. G., Gurevich, V. V., Benovic, J. L. und Keen, J. H. (1997).** Arrestin/clathrin interaction. Localization of the arrestin binding locus to the clathrin terminal domain. *J Biol Chem* **272**: 15017-22.
- Goodman, O. B., Jr., Krupnick, J. G., Santini, F., Gurevich, V. V., Penn, R. B., Gagnon, A. W., Keen, J. H. und Benovic, J. L. (1996).** β -arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the β 2-adrenergic receptor. *Nature* **383**: 447-50.
- Greengard, P., Valtorta, F., Czernik, A. J. und Benfenati, F. (1993).** Synaptic vesicle phosphoproteins and regulation of synaptic function. *Science* **259**: 780-5.
- Guo, S., Stolz, L. E., Lemrow, S. M. und York, J. D. (1999).** SAC1-like domains of yeast SAC1, INP52, and INP53 and of human synaptojanin encode polyphosphoinositide phosphatases. *J Biol Chem* **274**: 12990-5.
- Haffner, C., Takei, K., Chen, H., Ringstad, N., Hudson, A., Butler, M. H., Salcini, A. E., Di Fiore, P. P. und De Camilli, P. (1997).** Synaptojanin 1: localization on coated endocytic intermediates in nerve terminals and interaction of its 170 kDa isoform with Eps15. *FEBS Lett* **419**: 175-80.
- Hannah, M. J., Schmidt, A. A. und Huttner, W. B. (1999).** Synaptic vesicle biogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**: 733-98.
- Hao, W., Luo, Z., Zheng, L., Prasad, K. und Lafer, E. M. (1999).** AP180 and AP-2 interact directly in a complex that cooperatively assembles clathrin. *J Biol Chem* **274**: 22785-94.

- Hao, W., Tan, Z., Prasad, K., Reddy, K. K., Chen, J., Prestwich, G. D., Falck, J. R., Shears, S. B. und 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.
- Harder, T. und Simons, K. (1997).** Caveolae, DIGs, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains. *Curr Opin Cell Biol* **9**: 534-42.
- Harlow, E. und Lane, D. (1988).** *Antibodies: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Harter, C., Pavel, J., Coccia, F., Draken, E., Wegehangel, S., Tschochner, H. und Wieland, F. (1996).** Nonclathrin coat protein gamma, a subunit of coatomer, binds to the cytoplasmic dilysine motif of membrane proteins of the early secretory pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 1902-6.
- Haucke, V. und De Camilli, P. (1999).** AP-2 recruitment to synaptotagmin stimulated by tyrosine-based endocytic motifs. *Science* **285**: 1268-71.
- Haugh, J. M., Huang, A. C., Wiley, H. S., Wells, A. und Lauffenburger, D. A. (1999).** Internalized epidermal growth factor receptors participate in the activation of p21(ras) in fibroblasts. *J Biol Chem* **274**: 34350-60.
- Hill, E., van Der Kaay, J., Downes, C. P. und Smythe, E. (2001).** The role of dynamin and its binding partners in coated pit invagination and scission. *J Cell Biol* **152**: 309-24.
- Hilton, J. M., Plomann, M., Ritter, B., Modregger, J., Freeman, H. N., Falck, J. R., Krishna, U. M. und Tobin, A. B. (2001).** Phosphorylation of a synaptic vesicle-associated protein by an inositol hexakisphosphate-regulated protein kinase. *J Biol Chem*, In Druck.
- Hirst, J., Bright, N. A., Rous, B. und Robinson, M. S. (1999).** Characterization of a fourth adaptor-related protein complex. *Mol Biol Cell* **10**: 2787-802.
- Holt, M. R. und Koffer, A. (2001).** Cell motility: proline-rich proteins promote protrusions. *Trends Cell Biol* **11**: 38-46
- Hosaka, M., Toda, K., Takatsu, H., Torii, S., Murakami, K. und Nakayama, K. (1996).** Structure and intracellular localization of mouse ADP-ribosylation factors type 1 to type 6 (ARF1-ARF6). *J Biochem (Tokyo)* **120**: 813-9.
- Howard, L., Nelson, K. K., Maciewicz, R. A. und Blobel, C. P. (1999).** Interaction of the metalloprotease disintegrins MDC9 and MDC15 with two SH3 domain-containing proteins, endophilin I and SH3PX1. *J Biol Chem* **274**: 31693-9.
- Hussain, N. K., Yamabhai, M., Ramjaun, A. R., Guy, A. M., Baranes, D., O'Bryan, J. P., Der, C. J., Kay, B. K. und McPherson, P. S. (1999).** Splice variants of intersectin are components of the endocytic machinery in neurons and nonneuronal cells. *J Biol Chem* **274**: 15671-7.
- Iannolo, G., Salcini, A. E., Gaidarov, I., Goodman, O. B., Jr., Baulida, J., Carpenter, G., Pelicci, P. G., Di Fiore, P. P. und Keen, J. H. (1997).** Mapping of the molecular determinants involved in the interaction between eps15 and AP-2. *Cancer Res* **57**: 240-5.
- Jackson, T. (1998).** Transport vesicles: coats of many colours. *Curr Biol* **8**: R609-12.
- Jainchill, J. L., Aaronson, S. A. und Todaro, G. J. (1969).** Murine sarcoma and leukemia viruses: assay using clonal lines of contact-inhibited mouse cells. *J Virol* **4**: 549-53.
- Jones, D. H., Ley, S. und Aitken, A. (1995).** Isoforms of 14-3-3 protein can form homo- and heterodimers in vivo and in vitro: implications for function as adapter proteins. *FEBS Lett* **368**: 55-8.
- Jost, M., Simpson, F., Kavran, J. M., Lemmon, M. A. und Schmid, S. L. (1998).** Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate is required for endocytic coated vesicle formation. *Curr Biol* **8**: 1399-402.
- Kataoka, T., Powers, S., McGill, C., Fasano, O., Strathern, J., Broach, J. und Wigler, M. (1984).** Genetic analysis of yeast RAS1 and RAS2 genes. *Cell* **37**: 437-45.
- Kirchhausen, T. (2000a).** Clathrin. *Annu Rev Biochem* **69**: 699-727.
- Kirchhausen, T. (2000b).** Three ways to make a vesicle. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**: 187-98.

- Kobayashi, S., Takashima, A. und Anzai, K. (1998).** The dendritic translocation of translin protein in the form of BC1 RNA protein particles in developing rat hippocampal neurons in primary culture. *Biochem Biophys Res Commun* **253**: 448-53.
- Kreis, T. und Vale, R. (1999).** Guidebook to the cytoskeletal and motor proteins. Oxford University Press, Oxford.
- Ktistakis, N. T., Brown, H. A., Waters, M. G., Sternweis, P. C. und Roth, M. G. (1996).** Evidence that phospholipase D mediates ADP ribosylation factor-dependent formation of Golgi coated vesicles. *J Cell Biol* **134**: 295-306.
- Kurzchalia, T. V. und Parton, R. G. (1999).** Membrane microdomains and caveolae. *Curr Opin Cell Biol* **11**: 424-31.
- Langford, G. M. (1995).** Actin- and microtubule-dependent organelle motors: interrelationships between the two motility systems. *Curr Opin Cell Biol* **7**: 82-8.
- Lanzetti, L., Rybin, V., Malabarba, M. G., Christoforidis, S., Scita, G., Zerial, M. und Di Fiore, P. P. (2000).** The Eps8 protein coordinates EGF receptor signalling through Rac and trafficking through Rab5. *Nature* **408**: 374-7.
- Leprince, C., Romero, F., Cussac, D., Vayssiere, B., Berger, R., Tavitian, A. und Camonis, J. H. (1997).** A new member of the amphiphysin family connecting endocytosis and signal transduction pathways. *J Biol Chem* **272**: 15101-5.
- Letourneur, F., Gaynor, E. C., Hennecke, S., Demolliere, C., Duden, R., Emr, S. D., Riezman, H. und Cosson, P. (1994).** Coatamer is essential for retrieval of dilysine-tagged proteins to the endoplasmic reticulum. *Cell* **79**: 1199-207.
- Li, J., Nishizawa, K., An, W., Hussey, R. E., Lialios, F. E., Salgia, R., Sunder-Plassmann, R. und Reinherz, E. L. (1998).** A cdc15-like adaptor protein (CD2BP1) interacts with the CD2 cytoplasmic domain and regulates CD2-triggered adhesion. *EMBO J* **17**: 7320-36.
- Li, S., Song, K. S. und Lisanti, M. P. (1996).** Expression and characterization of recombinant caveolin. Purification by polyhistidine tagging and cholesterol-dependent incorporation into defined lipid membranes. *J Biol Chem* **271**: 568-73.
- Linder, S., Hufner, K., Wintergerst, U. und Aepfelbacher, M. (2000).** Microtubule-dependent formation of podosomal adhesion structures in primary human macrophages. *J Cell Sci* **113**: 4165-76.
- Lisanti, M. P., Tang, Z. L. und Sargiacomo, M. (1993).** Caveolin forms a hetero-oligomeric protein complex that interacts with an apical GPI-linked protein: implications for the biogenesis of caveolae. *J Cell Biol* **123**: 595-604.
- Llinás, R., McGuinness, T. L., Leonard, C. S., Sugimori, M. und Greengard, P. (1985).** Intraterminal injection of synapsin I or calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alters neurotransmitter release at the squid giant synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**: 3035-9.
- Lodish, H., Baltimore, D., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P. und Darnell, J. (1995).** Molecular cell biology. Scientific American Books, Inc., New York.
- Lupas, A., Van Dyke, M. und Stock, J. (1991).** Predicting coiled coils from protein sequences. *Science* **252**: 1162-4.
- Machesky, L. M. (1999).** Rocket-based motility: a universal mechanism? *Nat Cell Biol* **1**: E29-31.
- Machesky, L. M. und Insall, R. H. (1998).** Scar1 and the related Wiskott-Aldrich syndrome protein, WASP, regulate the actin cytoskeleton through the Arp2/3 complex. *Curr Biol* **8**: 1347-56.
- Machesky, L. M., Mullins, R. D., Higgs, H. N., Kaiser, D. A., Blanchoin, L., May, R. C., Hall, M. E. und Pollard, T. D. (1999).** Scar, a WASP-related protein, activates nucleation of actin filaments by the Arp2/3 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 3739-44.
- Malorni, W., Testa, U., Rainaldi, G., Tritarelli, E. und Peschle, C. (1998).** Oxidative stress leads to a rapid alteration of transferrin receptor intravesicular trafficking. *Exp Cell Res* **241**: 102-16.
- Marks, B. und McMahon, H. T. (1998).** Calcium triggers calcineurin-dependent synaptic vesicle recycling in mammalian nerve terminals. *Curr Biol* **8**: 740-9.

- Marks, B., Stowell, M. H., Vallis, Y., Mills, I. G., Gibson, A., Hopkins, C. R. und McMahon, H. T. (2001).** GTPase activity of dynamin and resulting conformation change are essential for endocytosis. *Nature* **410**: 231-5.
- McNiven, M. A., Cao, H., Pitts, K. R. und Yoon, Y. (2000).** The dynamin family of mechanoenzymes: pinching in new places. *Trends Biochem Sci* **25**: 115-20.
- McPherson, P. S., Garcia, E. P., Slepnev, V. I., David, C., Zhang, X., Grabs, D., Sossin, W. S., Bauerfeind, R., Nemoto, Y. und De Camilli, P. (1996).** A presynaptic inositol-5-phosphatase. *Nature* **379**: 353-7.
- Menniti, F. S., Oliver, K. G., Putney, J. W., Jr. und Shears, S. B. (1993).** Inositol phosphates and cell signaling: new views of InsP5 and InsP6. *Trends Biochem Sci* **18**: 53-6.
- Meriläinen, J., Lehto, V. P. und Wasenius, V. M. (1997).** FAP52, a novel, SH3 domain-containing focal adhesion protein. *J Biol Chem* **272**: 23278-84.
- Merrifield, C. J., Moss, S. E., Ballestrem, C., Imhof, B. A., Giese, G., Wunderlich, I. und Almers, W. (1999).** Endocytic vesicles move at the tips of actin tails in cultured mast cells. *Nat Cell Biol* **1**: 72-4.
- Mezquita, J., Pau, M. und Mezquita, C. (1998).** Several novel transcripts of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase expressed in adult chicken testis. *J Cell Biochem* **71**: 127-39.
- Micheva, K. D., Kay, B. K. und McPherson, P. S. (1997).** Synaptojanin forms two separate complexes in the nerve terminal. Interactions with endophilin and amphiphysin. *J Biol Chem* **272**: 27239-45.
- Miki, H., Miura, K. und Takenawa, T. (1996).** N-WASP, a novel actin-depolymerizing protein, regulates the cortical cytoskeletal rearrangement in a PIP2-dependent manner downstream of tyrosine kinases. *EMBO J* **15**: 5326-35.
- Miki, H., Sasaki, T., Takai, Y. und Takenawa, T. (1998).** Induction of filopodium formation by a WASP-related actin-depolymerizing protein N-WASP. *Nature* **391**: 93-6.
- Mintz, L., Galperin, E., Pasmanik-Chor, M., Tulzinsky, S., Bromberg, Y., Kozak, C. A., Joyner, A., Fein, A. und Horowitz, M. (1999).** EHD1-an EH-domain-containing protein with a specific expression pattern. *Genomics* **59**: 66-76.
- Modregger, J. (1997).** Isolierung und Charakterisierung von Proteinen, die mit PACSIN wechselwirken. Diplomarbeit, Universität zu Köln.
- Modregger, J., Ritter, B., Witter, B., Paulsson, M. und Plomann, M. (2000).** All three PACSIN isoforms bind to endocytic proteins and inhibit endocytosis. *J Cell Sci* **113**: 4511-21.
- Modregger, J. (2001).** PACSIN und seine SH3-Bindungspartner: Wechselwirkungen und Funktionen. Dissertation, Universität zu Köln.
- Morgan, A. und Burgoyne, R. D. (1992).** Interaction between protein kinase C and Exo1 (14-3-3 protein) and its relevance to exocytosis in permeabilized adrenal chromaffin cells. *Biochem J* **286**: 807-11.
- Muramatsu, T., Ohmae, A. und Anzai, K. (1998).** BC1 RNA protein particles in mouse brain contain two γ -h-element-binding proteins, translin and a 37 kDa protein. *Biochem Biophys Res Commun* **247**: 7-11.
- Murata, M., Peranen, J., Schreiner, R., Wieland, F., Kurzchalia, T. V. und Simons, K. (1995).** VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 10339-43.
- Murthy, V. N. und Stevens, C. F. (1998).** Synaptic vesicles retain their identity through the endocytic cycle. *Nature* **392**: 497-501.
- Muslin, A. J., Tanner, J. W., Allen, P. M. und Shaw, A. S. (1996).** Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. *Cell* **84**: 889-97.
- Nemoto, Y. und De Camilli, P. (1999).** Recruitment of an alternatively spliced form of synaptojanin 2 to mitochondria by the interaction with the PDZ domain of a mitochondrial outer membrane protein. *EMBO J* **18**: 2991-3006.

- Nimnual, A. S., Yatsula, B. A. und Bar-Sagi, D. (1998).** Coupling of Ras and Rac guanosine triphosphatases through the Ras exchanger Sos. *Science* **279**: 560-3.
- Noble, M., Lewis, S. A. und Cowan, N. J. (1989).** The microtubule binding domain of microtubule-associated protein MAP1B contains a repeated sequence motif unrelated to that of MAP2 and tau. *J Cell Biol* **109**: 3367-76.
- Okamoto, M., Schoch, S. und Südhof, T. C. (1999).** EHS1/intersectin, a protein that contains EH and SH3 domains and binds to dynamin and SNAP-25. A protein connection between exocytosis and endocytosis? *J Biol Chem* **274**: 18446-54.
- Okamoto, T., Schlegel, A., Scherer, P. E. und Lisanti, M. P. (1998).** Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane. *J Biol Chem* **273**: 5419-22.
- Ooi, C. E., Dell'Angelica, E. C. und Bonifacino, J. S. (1998).** ADP-Ribosylation factor 1 (ARF1) regulates recruitment of the AP-3 adaptor complex to membranes. *J Cell Biol* **142**: 391-402.
- Orci, L., Perrelet, A., Ravazzola, M., Wieland, F. T., Schekman, R. und Rothman, J. E. (1993).** "BFA bodies": a subcompartment of the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 11089-93.
- Orci, L., Starnes, M., Ravazzola, M., Amherdt, M., Perrelet, A., Sollner, T. H. und Rothman, J. E. (1997).** Bidirectional transport by distinct populations of COPI-coated vesicles. *Cell* **90**: 335-49.
- Owen, D. J. und Luzio, J. P. (2000).** Structural insights into clathrin-mediated endocytosis. *Curr Opin Cell Biol* **12**: 467-74.
- Owen, D. J., Vallis, Y., Noble, M. E., Hunter, J. B., Dafforn, T. R., Evans, P. R. und McMahon, H. T. (1999).** A structural explanation for the binding of multiple ligands by the α -adaptin appendage domain. *Cell* **97**: 805-15.
- Owen, D. J., Wigge, P., Vallis, Y., Moore, J. D., Evans, P. R. und McMahon, H. T. (1998).** Crystal structure of the amphiphysin-2 SH3 domain and its role in the prevention of dynamin ring formation. *EMBO J* **17**: 5273-85.
- Palczewski, K., Rispoli, G. und Detwiler, P. B. (1992).** The influence of arrestin (48K protein) and rhodopsin kinase on visual transduction. *Neuron* **8**: 117-26.
- Patschinsky, T., Hunter, T., Esch, F. S., Cooper, J. A. und Sefton, B. M. (1982).** Analysis of the sequence of amino acids surrounding sites of tyrosine phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**: 973-7.
- Peng, R., De Antoni, A. und Gallwitz, D. (2000).** Evidence for overlapping and distinct functions in protein transport of coat protein Sec24p family members. *J Biol Chem* **275**: 11521-8.
- Pittet, D., Schlegel, W., Lew, D. P., Monod, A. und Mayr, G. W. (1989).** Mass changes in inositol tetrakis- and pentakisphosphate isomers induced by chemotactic peptide stimulation in HL-60 cells. *J Biol Chem* **264**: 18489-93.
- Plomann, M., Lange, R., Vopper, G., Cremer, H., Heinlein, U. A., Scheff, S., Baldwin, S. A., Leitges, M., Cramer, M., Paulsson, M. und Barthels, D. (1998).** PACSIN, a brain protein that is upregulated upon differentiation into neuronal cells. *Eur J Biochem* **256**: 201-11.
- Pohl, U., Smith, J. S., Tachibana, I., Ueki, K., Lee, H. K., Ramaswamy, S., Wu, Q., Mohrenweiser, H. W., Jenkins, R. B. und Louis, D. N. (2000).** EHD2, EHD3, and EHD4 encode novel members of a highly conserved family of EH domain-containing proteins. *Genomics* **63**: 255-62.
- Prehoda, K. E., Scott, J. A., Dyche Mullins, R. und Lim, W. A. (2000).** Integration of multiple signals through cooperative regulation of the N- WASP-Arp2/3 complex. *Science* **290**: 801-6.
- Qualmann, B. und Kelly, R. B. (2000).** Syndapin isoforms participate in receptor-mediated endocytosis and actin organization. *J Cell Biol* **148**: 1047-62.

- Qualmann, B., Roos, J., DiGregorio, P. J. und Kelly, R. B. (1999).** Syndapin I, a synaptic dynamin-binding protein that associates with the neural Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Mol Biol Cell* **10**: 501-13.
- Ramjaun, A. R. und McPherson, P. S. (1998).** Multiple amphiphysin II splice variants display differential clathrin binding: identification of two distinct clathrin-binding sites. *J Neurochem* **70**: 2369-76.
- Ramjaun, A. R., Philie, J., de Heuvel, E. und McPherson, P. S. (1999).** The N-terminus of amphiphysin II mediates dimerization and plasma membrane targeting. *J Biol Chem* **274**: 19785-91.
- Ringstad, N., Gad, H., Low, P., Di Paolo, G., Brodin, L., Shupliakov, O. und De Camilli, P. (1999).** Endophilin/SH3p4 is required for the transition from early to late stages in clathrin-mediated synaptic vesicle endocytosis. *Neuron* **24**: 143-54.
- Ritter, B. (1997).** Molekular- und zellbiologische Analyse der PACSIN-Expression. Diplomarbeit, Universität zu Köln.
- Ritter, B., Modregger, J., Paulsson, M. und Plomann, M. (1999).** PACSIN 2, a novel member of the PACSIN family of cytoplasmic adapter proteins. *FEBS Lett* **454**: 356-62.
- Robinson, L. J. und Martin, T. F. (1998).** Docking and fusion in neurosecretion. *Curr Opin Cell Biol* **10**: 483-92.
- Robinson, P. J., Liu, J. P., Powell, K. A., Fykse, E. M. und Südhof, T. C. (1994).** Phosphorylation of dynamin I and synaptic-vesicle recycling. *Trends Neurosci* **17**: 348-53.
- Robinson, P. J., Sontag, J. M., Liu, J. P., Fykse, E. M., Slaughter, C., McMahon, H. und Südhof, T. C. (1993).** Dynamin GTPase regulated by protein kinase C phosphorylation in nerve terminals. *Nature* **365**: 163-6.
- Rohatgi, R., Ho, H. Y. und Kirschner, M. W. (2000).** Mechanism of N-WASP activation by CDC42 and phosphatidylinositol 4, 5- bisphosphate. *J Cell Biol* **150**: 1299-310.
- Rohatgi, R., Ma, L., Miki, H., Lopez, M., Kirchhausen, T., Takenawa, T. und Kirschner, M. W. (1999).** The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. *Cell* **97**: 221-31.
- Roos, J. und Kelly, R. B. (1998).** Dap160, a neural-specific Eps15 homology and multiple SH3 domain- containing protein that interacts with Drosophila dynamin. *J Biol Chem* **273**: 19108-19.
- Roth, D. und Burgoyne, R. D. (1995).** Stimulation of catecholamine secretion from adrenal chromaffin cells by 14-3-3 proteins is due to reorganisation of the cortical actin network. *FEBS Lett* **374**: 77-81.
- Rothberg, K. G., Heuser, J. E., Donzell, W. C., Ying, Y. S., Glenney, J. R. und Anderson, R. G. (1992).** Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* **68**: 673-82.
- Rothman, J. E. (1994).** Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature* **372**: 55-63.
- Rozelle, A. L., Machesky, L. M., Yamamoto, M., Driessens, M. H., Insall, R. H., Roth, M. G., Luby-Phelps, K., Marriott, G., Hall, A. und Yin, H. L. (2000).** Phosphatidylinositol 4,5- bisphosphate induces actin-based movement of raft-enriched vesicles through WASP-Arp2/3. *Curr Biol* **10**: 311-20.
- Sakisaka, T., Itoh, T., Miura, K. und Takenawa, T. (1997).** Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphatase regulates the rearrangement of actin filaments. *Mol Cell Biol* **17**: 3841-9.
- Salcini, A. E., Chen, H., Iannolo, G., De Camilli, P. und Di Fiore, P. P. (1999).** Epidermal growth factor pathway substrate 15, Eps15. *Int J Biochem Cell Biol* **31**: 805-9.
- Salcini, A. E., Confalonieri, S., Doria, M., Santolini, E., Tassi, E., Minenkova, O., Cesareni, G., Pelicci, P. G. und Di Fiore, P. P. (1997).** Binding specificity and in vivo targets of the EH domain, a novel protein-protein interaction module. *Genes Dev* **11**: 2239-49.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989).** Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.

- Schmid, S. L. (1997).** Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: an integrated process. *Annu Rev Biochem* **66**: 511-48.
- Schmid, S. L. (1999).** SH3-domain-containing proteins function at distinct steps in clathrin-coated vesicle formation. *Nat Cell Biol* **1**: 119-24.
- Schmid, S. L., McNiven, M. A. und De Camilli, P. (1998).** Dynamin and its partners: a progress report. *Curr Opin Cell Biol* **10**: 504-12.
- Schmidt, A., Wolde, M., Thiele, C., Fest, W., Kratzin, H., Podtelejnikov, A. V., Witke, W., Huttner, W. B. und Soling, H. D. (1999).** Endophilin I mediates synaptic vesicle formation by transfer of arachidonate to lysophosphatidic acid. *Nature* **401**: 133-41.
- Scita, G., Nordstrom, J., Carbone, R., Tenca, P., Giardina, G., Gutkind, S., Bjarnegard, M., Betsholtz, C. und Di Fiore, P. P. (1999).** EPS8 and E3B1 transduce signals from Ras to Rac. *Nature* **401**: 290-3.
- Scita, G., Tenca, P., Frittoli, E., Tocchetti, A., Innocenti, M., Giardina, G. und Di Fiore, P. P. (2000).** Signaling from Ras to Rac and beyond: not just a matter of GEFs. *EMBO J* **19**: 2393-8.
- Sengar, A. S., Wang, W., Bishay, J., Cohen, S. und Egan, S. E. (1999).** The EH and SH3 domain Eps proteins regulate endocytosis by linking to dynamin and Eps15. *EMBO J* **18**: 1159-71.
- Sever, S., Damke, H. und Schmid, S. L. (2000).** Garrotes, springs, ratchets, and whips: putting dynamin models to the test. *Traffic* **1**: 385-92.
- Sever, S., Muhlberg, A. B. und Schmid, S. L. (1999).** Impairment of dynamin's GAP domain stimulates receptor-mediated endocytosis. *Nature* **398**: 481-6.
- Shaul, P. W. und Anderson, R. G. (1998).** Role of plasmalemmal caveolae in signal transduction. *Am J Physiol* **275**: L843-51.
- Shaul, P. W., Smart, E. J., Robinson, L. J., German, Z., Yuhanna, I. S., Ying, Y., Anderson, R. G. und Michel, T. (1996).** Acylation targets endothelial nitric-oxide synthase to plasmalemmal caveolae. *J Biol Chem* **271**: 6518-22.
- Simionescu, N., Lupu, F. und Simionescu, M. (1983).** Rings of membrane sterols surround the openings of vesicles and fenestrae, in capillary endothelium. *J Cell Biol* **97**: 1592-600.
- Simionescu, N., Simionescu, M. und Palade, G. E. (1975).** Permeability of muscle capillaries to small heme-peptides. Evidence for the existence of patent transendothelial channels. *J Cell Biol* **64**: 586-607.
- Simionescu, N., Simionescu, M. und Palade, G. E. (1973).** Permeability of muscle capillaries to exogenous myoglobin. *J Cell Biol* **57**: 424-52.
- Simons, K. und Ikonen, E. (1997).** Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**: 569-72.
- Simons, K. und Toomre, D. (2000).** Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**: 31-9.
- Simpson, F., Hussain, N. K., Qualmann, B., Kelly, R. B., Kay, B. K., McPherson, P. S. und Simpson, F., Peden, A. A., Christopoulou, L. und Robinson, M. S. (1997).** Characterization of the adaptor-related protein complex, AP-3. *J Cell Biol* **137**: 835-45.
- Slepnev, V. I. und De Camilli, P. (2000).** Accessory factors in clathrin-dependent synaptic vesicle endocytosis. *Nat Rev Neurosci* **1**: 161-72.
- Slepnev, V. I., Ochoa, G. C., Butler, M. H. und De Camilli, P. (2000).** Tandem arrangement of the clathrin and AP-2 binding domains in amphiphysin 1 and disruption of clathrin coat function by amphiphysin fragments comprising these sites. *J Biol Chem* **275**: 17583-9.
- Slepnev, V. I., Ochoa, G. C., Butler, M. H., Grabs, D. und Camilli, P. D. (1998).** Role of phosphorylation in regulation of the assembly of endocytic coat complexes. *Science* **281**: 821-4.
- Smith, C. J. und Pearse, B. M. (1999).** Clathrin: anatomy of a coat protein. *Trends Cell Biol* **9**: 335-8.
- Spencer, S., Dowbenko, D., Cheng, J., Li, W., Brush, J., Utzig, S., Simanis, V. und Lasky, L. A. (1997).** PSTPIP: a tyrosine phosphorylated cleavage furrow-associated protein that is a substrate for a PEST tyrosine phosphatase. *J Cell Biol* **138**: 845-60.

- Springer, S. und Schekman, R. (1998).** Nucleation of COPII vesicular coat complex by endoplasmic reticulum to Golgi vesicle SNAREs. *Science* **281**: 698-700.
- Springer, S., Spang, A. und Schekman, R. (1999).** A primer on vesicle budding. *Cell* **97**: 145-8.
- Stamnes, M. A. und Rothman, J. E. (1993).** The binding of AP-1 clathrin adaptor particles to Golgi membranes requires ADP-ribosylation factor, a small GTP-binding protein. *Cell* **73**: 999-1005.
- Staudinger, J., Lu, J. und Olson, E. N. (1997).** Specific interaction of the PDZ domain protein PICK1 with the COOH terminus of protein kinase C- α . *J Biol Chem* **272**: 32019-24.
- Staudinger, J., Zhou, J., Burgess, R., Elledge, S. J. und Olson, E. N. (1995).** PICK1: a perinuclear binding protein and substrate for protein kinase C isolated by the yeast two-hybrid system. *J Cell Biol* **128**: 263-71.
- Stephens, L., Radenberg, T., Thiel, U., Vogel, G., Khoo, K. H., Dell, A., Jackson, T. R., Hawkins, P. T. und Mayr, G. W. (1993).** The detection, purification, structural characterization, and metabolism of diphosphoinositol pentakisphosphate(s) and bisdiphosphoinositol tetrakisphosphate(s). *J Biol Chem* **268**: 4009-15.
- Stevens, C. F. und Sullivan, J. M. (1998).** Regulation of the readily releasable vesicle pool by protein kinase C. *Neuron* **21**: 885-93.
- Sumoy, L., Pluvinet, R., Andreu, N., Estivill, X. und Escarceller, M. (2001).** PACSIN 3 is a novel SH3 domain cytoplasmic adapter protein of the pacsin-syndapin-FAP52 gene family. *Gene* **262**: 199-205.
- Szwergold, B. S., Graham, R. A. und Brown, T. R. (1987).** Observation of inositol pentakis- and hexakis-phosphates in mammalian tissues by ^{31}P NMR. *Biochem Biophys Res Commun* **149**: 874-81.
- Taira, E., Finkenstadt, P. M. und Baraban, J. M. (1998).** Identification of translin and trax as components of the GS1 strand-specific DNA binding complex enriched in brain. *J Neurochem* **71**: 471-7.
- Takei, K., Mundigl, O., Daniell, L. und De Camilli, P. (1996).** The synaptic vesicle cycle: a single vesicle budding step involving clathrin and dynamin. *J Cell Biol* **133**: 1237-50.
- Takei, K., Slepnev, V. I. und De Camilli, P. (2001).** Interactions of dynamin and amphiphysin with liposomes. *Methods Enzymol* **329**: 478-86.
- Takei, K., Slepnev, V. I., Haucke, V. und De Camilli, P. (1999).** Functional partnership between amphiphysin and dynamin in clathrin-mediated endocytosis. *Nat Cell Biol* **1**: 33-9.
- Takeya, R., Takeshige, K. und Sumimoto, H. (2000).** Interaction of the PDZ domain of human PICK1 with class I ADP-ribosylation factors. *Biochem Biophys Res Commun* **267**: 149-55.
- Taunton, J., Rowning, B. A., Coughlin, M. L., Wu, M., Moon, R. T., Mitchison, T. J. und Larabell, C. A. (2000).** Actin-dependent propulsion of endosomes and lysosomes by recruitment of N-WASP. *J Cell Biol* **148**: 519-30.
- Tebar, F., Bohlander, S. K. und Sorkin, A. (1999).** Clathrin assembly lymphoid myeloid leukemia (CALM) protein: localization in endocytic-coated pits, interactions with clathrin, and the impact of overexpression on clathrin-mediated traffic. *Mol Biol Cell* **10**: 2687-702.
- Tebar, F., Sorkina, T., Sorkin, A., Ericsson, M. und Kirchhausen, T. (1996).** Eps15 is a component of clathrin-coated pits and vesicles and is located at the rim of coated pits. *J Biol Chem* **271**: 28727-30.
- ter Haar, E., Musacchio, A., Harrison, S. C. und Kirchhausen, T. (1998).** Atomic structure of clathrin: a β propeller terminal domain joins an alpha zigzag linker. *Cell* **95**: 563-73.
- Tian, L., Nelson, D. L. und Stewart, D. M. (2000).** Cdc42-interacting protein 4 mediates binding of the Wiskott-Aldrich syndrome protein to microtubules. *J Biol Chem* **275**: 7854-61.
- Toda, T., Uno, I., Ishikawa, T., Powers, S., Kataoka, T., Broek, D., Cameron, S., Broach, J., Matsumoto, K. und Wigler, M. (1985).** In yeast, RAS proteins are controlling elements of adenylate cyclase. *Cell* **40**: 27-36.

- Tolias, K. F., Hartwig, J. H., Ishihara, H., Shibasaki, Y., Cantley, L. C. und Carpenter, C. L. (2000).** Type I alpha phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase mediates Rac-dependent actin assembly. *Curr Biol* **10**: 153-6.
- Tong, X. K., Hussain, N. K., Adams, A. G., O'Bryan, J. P. und McPherson, P. S. (2000a).** Intersectin can regulate the Ras/MAP kinase pathway independent of its role in endocytosis. *J Biol Chem* **275**: 29894-9.
- Tong, X. K., Hussain, N. K., de Heuvel, E., Kurakin, A., Abi-Jaoude, E., Quinn, C. C., Olson, M. F., Marais, R., Baranes, D., Kay, B. K. und McPherson, P. S. (2000b).** The endocytic protein intersectin is a major binding partner for the Ras exchange factor mSos1 in rat brain. *EMBO J* **19**: 1263-71.
- Torres, R., Firestein, B. L., Dong, H., Staudinger, J., Olson, E. N., Huganir, R. L., Bredt, D. S., Gale, N. W. und Yancopoulos, G. D. (1998).** PDZ proteins bind, cluster, and synaptically colocalize with Eph receptors and their ephrin ligands. *Neuron* **21**: 1453-63.
- Torri Tarelli, F., Bossi, M., Fesce, R., Greengard, P. und Valtorta, F. (1992).** Synapsin I partially dissociates from synaptic vesicles during exocytosis induced by electrical stimulation. *Neuron* **9**: 1143-53.
- Torrizi, M. R., Lotti, L. V., Belleudi, F., Gradini, R., Salcini, A. E., Confalonieri, S., Pelicci, P. G. und Di Fiore, P. P. (1999).** Eps15 is recruited to the plasma membrane upon epidermal growth factor receptor activation and localizes to components of the endocytic pathway during receptor internalization. *Mol Biol Cell* **10**: 417-34.
- Traub, L. M., Ostrom, J. A. und Kornfeld, S. (1993).** Biochemical dissection of AP-1 recruitment onto Golgi membranes. *J Cell Biol* **123**: 561-73.
- Turner, K. M., Burgoyne, R. D. und Morgan, A. (1999).** Protein phosphorylation and the regulation of synaptic membrane traffic. *Trends Neurosci* **22**: 459-64.
- Umeda, A., Meyerholz, A. und Ungewickell, E. (2000).** Identification of the universal cofactor (auxilin 2) in clathrin coat dissociation. *Eur J Cell Biol* **79**: 336-42.
- Ungewickell, E., Ungewickell, H., Holstein, S. E., Lindner, R., Prasad, K., Barouch, W., Martin, B., Greene, L. E. und Eisenberg, E. (1995).** Role of auxilin in uncoating clathrin-coated vesicles. *Nature* **378**: 632-5.
- Valenzuela, D. M., Stitt, T. N., DiStefano, P. S., Rojas, E., Mattsson, K., Compton, D. L., Nunez, L., Park, J. S., Stark, J. L., Gies, D. R. und et al. (1995).** Receptor tyrosine kinase specific for the skeletal muscle lineage: expression in embryonic muscle, at the neuromuscular junction, and after injury. *Neuron* **15**: 573-84.
- Voet, D. und Voet, J. G. (1995).** *Biochemistry*. John Wiley&Sons, Inc., Somerset.
- Voglmaier, S. M., Keen, J. H., Murphy, J. E., Ferris, C. D., Prestwich, G. D., Snyder, S. H. und Theibert, A. B. (1992).** Inositol hexakisphosphate receptor identified as the clathrin assembly protein AP-2. *Biochem Biophys Res Commun* **187**: 158-63.
- Wasiak, S., Quinn, C.C., Ritter, B., de Heuvel, E., Baranes, D., Plomann, M. und McPherson, P. S. (2001).** The Ras/Rac guanine nucleotide exchange factor mSos interacts with PACSIN1/Syndapin I, a regulator of endocytosis and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem*, In Revision.
- Waters, M. G. und Pfeffer, S. R. (1999).** Membrane tethering in intracellular transport. *Curr Opin Cell Biol* **11**: 453-9.
- Whitehead, I. P., Campbell, S., Rossman, K. L. und Der, C. J. (1997).** Dbl family proteins. *Biochim Biophys Acta* **1332**: F1-23.
- Whitney, J. A., Gomez, M., Sheff, D., Kreis, T. E. und Mellman, I. (1995).** Cytoplasmic coat proteins involved in endosome function. *Cell* **83**: 703-13.
- Wigge, P. und McMahon, H. T. (1998).** The amphiphysin family of proteins and their role in endocytosis at the synapse. *Trends Neurosci* **21**: 339-44.

- Witke, W., Sutherland, J. D., Sharpe, A., Arai, M. und Kwiatkowski, D. J. (2001).** Profilin I is essential for cell survival and cell division in early mouse development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 3832-6.
- Wu, W. J., Erickson, J. W., Lin, R. und Cerione, R. A. (2000).** The γ -subunit of the coatamer complex binds Cdc42 to mediate transformation. *Nature* **405**: 800-4.
- Wu, X. Q., Gu, W., Meng, X. und Hecht, N. B. (1997).** The RNA-binding protein, TB-RBP, is the mouse homologue of translin, a recombination protein associated with chromosomal translocations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 5640-5.
- Wu, X. Q., Lefrancois, S., Morales, C. R. und Hecht, N. B. (1999).** Protein-protein interactions between the testis brain RNA-binding protein and the transitional endoplasmic reticulum ATPase, a cytoskeletal γ -actin and Trax in male germ cells and the brain. *Biochemistry* **38**: 11261-70.
- Wu, Y., Dowbenko, D. und Lasky, L. A. (1998).** PSTPIP 2, a second tyrosine phosphorylated, cytoskeletal-associated protein that binds a PEST-type protein-tyrosine phosphatase. *J Biol Chem* **273**: 30487-96.
- Xia, J., Chung, H. J., Wihler, C., Huganir, R. L. und Linden, D. J. (2000).** Cerebellar long-term depression requires PKC-regulated interactions between GluR2/3 and PDZ domain-containing proteins. *Neuron* **28**: 499-510.
- Xia, J., Zhang, X., Staudinger, J. und Huganir, R. L. (1999).** Clustering of AMPA receptors by the synaptic PDZ domain-containing protein PICK1. *Neuron* **22**: 179-87.
- Yaffe, D. und Saxel, O. (1977).** Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature* **270**: 725-7.
- Ybe, J. A., Brodsky, F. M., Hofmann, K., Lin, K., Liu, S. H., Chen, L., Earnest, T. N., Fletterick, R. J. und Hwang, P. K. (1999).** Clathrin self-assembly is mediated by a tandemly repeated superhelix. *Nature* **399**: 371-5.
- Ye, W., Ali, N., Bembenek, M. E., Shears, S. B. und Lafer, E. M. (1995).** Inhibition of clathrin assembly by high affinity binding of specific inositol polyphosphates to the synapse-specific clathrin assembly protein AP-3. *J Biol Chem* **270**: 1564-8.
- Yeung, Y. G., Soldera, S. und Stanley, E. R. (1998).** A novel macrophage actin-associated protein (MAYP) is tyrosine-phosphorylated following colony stimulating factor-1 stimulation. *J Biol Chem* **273**: 30638-42.
- Zhao, L., Helms, J. B., Brugger, B., Harter, C., Martoglio, B., Graf, R., Brunner, J. und Wieland, F. T. (1997).** Direct and GTP-dependent interaction of ADP ribosylation factor 1 with coatamer subunit β . *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 4418-23.
- Zhao, L., Helms, J. B., Brunner, J. und Wieland, F. T. (1999).** GTP-dependent binding of ADP-ribosylation factor to coatamer in close proximity to the binding site for dilysine retrieval motifs and p23. *J Biol Chem* **274**: 14198-203.

8 Danke!

Meinen Eltern gilt mein Dank für ihre Hilfe und Liebe und die Gewissenheit, daß sie mich stets bei allen meinen Vorhaben unterstützen.

Herrn Prof. Dr. Mats Paulsson danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit in seinem Institut unter solch guter Betreuung und hervorragenden Arbeitsbedingungen durchführen zu können. Schade, daß es nicht viel mehr Chefs wie Dich gibt.

Frau Priv.-Doz. Dr. Sabine Waffenschmidt und Herrn Prof. Sterner möchte ich für die Begutachtung dieser Arbeit und ihre stets freundliche und unkomplizierte Art danken.

Herrn Prof. Dr. Thomas Langer danke ich für die spontane Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Bei Frau Priv.-Doz. Dr. Andrea Wevers möchte ich mich für die Ratten-Hirn-Schnitte und die Möglichkeit bedanken, in der Anatomie 2 meine immunhistochemischen Analysen durchführen zu können. Frau Sigrun Kuhlage danke ich für die freundliche Einführung in die Technik. Bei Frau Dr. Witter bedanke ich mich für die primären Neuronen-Kulturen. An alle Mitarbeiter der Anatomie 2 geht ein herzlicher Dank für die freundliche Aufnahme des ‚Gastforschers‘ und die ständige Hilfsbereitschaft.

Ich bedanke mich bei Herrn Dr. Raimund Wagener für Hilfe bei der Evolutionsanalyse.

Herrn Dr. Hiroaki Miki, Herrn Dr. Walter Witke und Herrn Dr. Peter S. McPherson danke ich für die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper.

Frau Dr. Beate Eckes und Frau Renate Knap gilt mein Dank für die Hilfe bei der Durchführung der FACS-Analysen.

Bei Dr. Frank Zauke möchte ich mich herzlich für die kritische und äußerst konstruktive Durchsicht dieser Arbeit bedanken.

Den Mitarbeitern in der Biochemie II gilt mein Dank für das angenehme und entspannte Arbeitsklima. Besonderer Dank gilt allen ‚Smyth’s‘ und ‚Plomännern‘, die mit mir zu nachtschlafender Zeit das Freitagseminar durchlitten und es dadurch erträglich gemacht haben.

Herrn Jan Modregger danke ich herzlich für die hervorragende Zusammenarbeit, die Diskussionen, die ständige Hilfsbereitschaft, die tatkräftige Unterstützung beim Kampf gegen Computer-Probleme jeglicher Art und vor allem für den Spaß und die gute Laune im Labor.

Ich möchte auch den beiden stets hilfreichen guten Geistern unseres Instituts danken. Frau Nevres Ercan versorgte uns stets verlässlich mit den großen und kleinen Dingen des Laboralltags und erleichterte damit einiges. Besonderer Dank gilt Frau Getrud Pelzer, die für jedes Problem ein offenes Ohr hat und tatkräftig zu dessen Lösung beiträgt.

Nun bleibt mir zum Schluß nur noch, mich bei Herrn Dr. Markus Plomann zu bedanken. Eigentlich kann ich der Danksagung in meiner Diplomarbeit nicht viel neues hinzufügen. Du besitzt immer noch eine unerschöpfliche Hilfsbereitschaft und Geduld und Du siehst die Dinge immer noch positiver als ich, was vieles wieder erträglich machte. Abgesehen von den ganzen wissenschaftlichen und nicht-wissenschaftlichen Dingen, die Du mir beigebracht hast, wirst Du mir stets ein Vorbild sein, sollte ich irgendwann selbst eine Arbeitsgruppe leiten. Tausend Dank!

Der Mensch ist eigentlich ein komisches Wesen. Da tut man alles, um diese Arbeit zu beenden, nur damit man einen Ort verlassen kann, von dem man eigentlich gar nicht weg will. Nochmals dank an alle, die zu dieser Einstellung beigetragen haben.

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 beantragten Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht ist sowie, daß ich eine Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde.

Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Mats Paulsson betreut worden.

Köln, den 18.04.2001

Teilpublikationen

Ritter, B., Modregger, J., Paulsson, M. und Plomann, M. (1999). PACSIN 2, a novel member of the PACSIN family of cytoplasmic adapter proteins. *FEBS Lett* **454**: 356-62.

Modregger, J., Ritter, B., Witter, B., Paulsson, M. und Plomann, M. (2000). All three PACSIN isoforms bind to endocytic proteins and inhibit endocytosis. *J Cell Sci* **113**: 4511-21.

Hilton, J. M., Plomann, M., Ritter, B., Modregger, J., Freeman, H. N., Falck, J. R., Krishna, U. M. und Tobin, A. B. (2001). Phosphorylation of a synaptic vesicle-associated protein by an inositol Hexakisphosphate-regulated protein kinase. *J Biol Chem* **276**: 16341-47.

Wasiak, S., Quinn, C. C., Ritter, B., de Heuvel, E., Baranes, D., Plomann, M. und McPherson, P.S. (2001). The Ras/Rac guanine nucleotide exchange factor mSos interacts with PACSIN1/Syndapin I, a regulator of endocytosis and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* **276**: 26622-28.

Kurzzusammenfassung

Die PACSIN-Proteinfamilie konnte in Maus und Mensch jeweils um die beiden neuen Isoformen PACSIN 2 und 3 erweitert werden. Im Gegensatz zum ubiquitären PACSIN 2 wird PACSIN 1 neurospezifisch und PACSIN 3 hauptsächlich in Muskel exprimiert. Alle Isoformen besitzen einen identischen modulären Aufbau mit einer N-terminalen CDC15-NT-Domäne, die durch einen variablen Bereich von der C-terminalen SH3-Domäne getrennt wird. Die Funktion der CDC15-NT-Domäne konnte bislang nicht geklärt werden, sie scheint aber eine wichtige Interaktion oder Regulation der PACSINe zu ermöglichen, da Mutationen konservierter Aminosäuren dieses Bereichs zu einem frühen Sterben der Zellen führen. Die phosphorylierungsabhängige Interaktion von PACSIN 1 mit 14-3-3-Proteinen und die *in vitro*-Phosphorylierungsstudien von PACSIN 1 als Substrat verschiedener Kinasen weist auf eine funktionale Regulation der PACSINe durch Phosphorylierung hin. PACSIN 1 und 2 interagieren über ihre NPF-Motive innerhalb der variablen Region mit den potentiellen GTPasen PAST1 und 2. Für PAST1 konnte eine Lokalisation an Endosomen identifiziert werden. Die SH3-Domäne vermittelt einerseits die Beteiligung aller Isoformen am Clathrin-vermittelten Vesikeltransport und interagiert zusätzlich mit regulatorischen Proteinen des Actin-Cytoskeletts. Da die PACSINe in der Lage sind, Oligomere zu bilden, könnten sie die Verbindung zwischen den Vorgängen der Vesikelbildung und den für den Transport nötigen Umstrukturierungen des Actin-Cytoskeletts sein.

Abstract

The PACSIN protein family was extended by the isolation of PACSIN 2 and 3 in mouse and man. In contrast to the ubiquitously expressed PACSIN 2, PACSIN 1 displays a neurospecific and PACSIN 3 a predominantly muscle-specific expression pattern. All isoforms contain the same domain structure comprising an N-terminal CDC15-NT domain separated from the C-terminal SH3 domain by a variable region. The function of the CDC15-NT domain is unknown, but mutations of conserved amino acids in this region lead to early cell death. The phosphorylation-mediated interaction of PACSIN 1 with 14-3-3 proteins in addition to the *in vitro* phosphorylation studies of PACSIN 1 as being a substrate of several kinases point to a functional regulation of these proteins by phosphorylation. PACSIN 1 and 2 interact via their NPF motifs within their variable regions with the potential GTPases PAST1 and 2. In addition, some PAST1 localizes to endosomes. On one hand the SH3 domain mediates the participation of all PACSIN isoforms in the clathrin-mediated vesicle transport, on the other hand it additionally interacts with proteins regulating the actin cytoskeleton. As the PACSINs are able to form oligomers they could link the formation of vesicles to rearrangements of the actin cytoskeleton necessary for vesicle transport.

Lebenslauf

Name: Ritter
Vorname: Brigitte Michaela
Geburtsdatum: 10. Juni 1972
Geburtsort: Aachen
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Ausbildung: 1978-1982
Grundschule Eintrachtstraße, Aachen
1982-1991
Geschwister Scholl-Gymnasium, Aachen
mit Erwerb der allgemeinen Hochschulreife
Oktober 1992 bis Oktober 1997
Diplom-Biologie-Studium, Universität zu Köln
seit Oktober 1997
Promotionsstudium im Institut für Biochemie II
der Medizinischen Fakultät
Universität zu Köln

berufliche Tätigkeit: März 1992 bis Oktober 1995 und Februar 1996 bis
Dezember 1996 Nebentätigkeit als Laborhilfe bei
Caro Biotechnik GmbH, Aachen
November 1995 bis Januar 1996 Anstellung als studentische
Hilfskraft im Institut für Biochemie der Mathematisch-
Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln
Januar 1997 bis 20. Oktober 1997 Anstellung als studentische
Hilfskraft im Institut für Biochemie II der Medizinischen
Fakultät der Universität zu Köln
seit dem 20. Oktober 1997 Anstellung im Institut für
Biochemie II der Medizinischen Fakultät der
Universität zu Köln im Rahmen der Promotionsarbeit