

**Proteinbiochemische
Charakterisierung von
PACSIN1
und seines Bindungspartners
PAST2**

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

vorgelegt von
Arndt Halbach
aus Remscheid-Lennep

Köln, 2003

Berichterstatter: Prof. Dr. Matz Paulsson
Prof. Dr. Sigrun Korsching
Prüfungsvorsitzender: Prof. Dr. H. W. Klein
Tag der mündlichen Prüfung: 13. 01. 2004

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungen	1
1	Einleitung	4
1. 1	Biologische Membranen, ihre Funktionen und Rollen beim Stofftransport	4
1. 2	Caveolae und Lipid Rafts	7
1. 3	Vesikel mit Proteinhülle	8
1. 3. 1	COPII-umhüllte Vesikel	8
1. 3. 2	COPI-umhüllte Vesikel	9
1. 3. 3	Clathrin-umhüllte Vesikel	10
1. 3. 3. 1	Neuronale Clathrin-umhüllte Vesikel	12
1. 4	Proteinkomponenten des Vesikeltransportes	13
1. 4. 1	Clathrin	13
1. 4. 2	Adapter-Proteine 2 (AP-2)	15
1. 4. 3	AP180/CALM	16
1. 4. 4	Synaptojanin	17
1. 4. 5	Synapsin	17
1. 4. 6	Amphiphysin	18
1. 4. 7	Endophilin	20
1. 4. 8	Dynamin	21
1. 4. 9	EPS15	22
1. 4. 10	PACSIN1	23
1. 4. 11	mPAST1 und mPAST2	27
1. 5	Aufgabenstellung	28
2	Ergebnisse	29
2.1	Klonierung, eukaryontische Expression und Aufreinigung von PACSIN1	29
2. 1. 1	PACSIN1 mit N-terminalem Strep-tag	29
2. 1. 2	PACSIN1 mit C-terminalem Strep-tag	33
2. 2	Größenbestimmung des PACSIN1-Komplexes	37

2. 2. 1	Quervernetzungen von PACSIN1	37
2. 2. 1. 1	Quervernetzung mit DSS	38
2. 2. 1. 2	Quervernetzung mit Sulfo-EGS	39
2. 2. 1. 3	Quervernetzung mit BS ³	41
2. 2. 1. 4	Quervernetzung durch Disulfidbrücken nach oxidativer Lagerung	43
2. 2. 2	Größenbestimmung des PACSIN1-Komplexes über Gelfiltration	45
2. 2. 2. 1	Größenbestimmung des nativen PACSIN1-Komplexes über Gelfiltration	45
2. 3. 2. 2	Größenbestimmung des BS ³ -quervernetzten PACSIN1-Komplexes über Gelfiltration	48
2. 2. 3	Größenbestimmung des PACSIN1 Komplexes über Elektronenmikroskopie	50
2. 3	Konformationsbestimmung des PACSIN1-Komplexes über native Polyacrylamid-Gelelektrophorese	53
2. 4	Strukturbestimmung des PACSIN1 Komplexes über CD-Spektroskopie	53
2. 5	Klonierung, prokaryontische Expression und Aufreinigung von GST-PAST2	57
2. 6	Gewebeverteilung von PAST1 und PAST2	58
2. 7	Klonierung und Aufreinigung von eukaryontischem PAST2	60
2. 8	Proteininteraktionen des PAST2 Proteins	63
2. 8. 1	Affinitätspräzipitation mit eukaryontisch exprimiertem PAST2 nach Inkubation mit einem Maushirnproteinextrakt	64
2. 8. 2	Affinitätskoppräzipitation mit eukaryontisch exprimiertem PAST2 aus HEK-293 Zellen	65
2. 8. 3	Affinitätspräzipitation mit bakteriell exprimiertem GST-PAST2 nach Inkubation mit einem Maushirn Proteinextrakt	66
2. 8. 4	Kofraktionierung der beiden PAST Proteine und ihrer Bindungspartner	67
2. 9	Nukleotid-Bindung und Hydrolyse-Aktivität der PAST-Proteine	69
2. 9. 1	Nukleotid-Bindung von PAST1	69
2. 9. 2	GTP/ATPase Aktivität von PAST2	71
2. 10	Glykosylierung von PACSIN1	77
2. 10. 1	Charakterisierung des an PACSIN1 gebundenen Zuckerrests	81

3	Diskussion der Ergebnisse	83
3. 1	Eukaryontische Expression und Aufreinigung von PACSIN1	82
3. 2	Größenbestimmung des PACSIN1-Komplexes	83
3. 3	Strukturbestimmung des PACSIN1-Komplexes über CD-Spektroskopie	88
3. 4	Expression, Aufreinigung und Charakterisierung von PAST2	88
3. 4. 1	PAST2 Proteininteraktionen	90
3. 4. 2	Nukleotidbindung von PAST1	91
3. 4. 3	GTP/ATPase Aktivität von PAST2	92
3. 5	Glykosylierung von PACSIN1	93
4	Zusammenfassung und Ausblick	95
5	Material und Methoden	97
5. 1	Material	97
5. 1. 2	Puffer und Lösungen	100
5. 1. 3	Enzyme	101
5. 1. 4	Biologisches Material	101
5. 1. 4. 1	E. coli-Bakterien-Stämme	101
5. 1. 4. 2	Eukaryontische Zellen	101
5. 1. 5	Antikörper	102
5. 1. 5. 1	Antiseren gegen PACSIN-Isoformen	102
5. 1. 5. 2	Weitere Antiseren und Antikörper	102
5. 1. 5. 3	Zweitantikörper	103
5. 1.3	Vektoren	103
5. 2	Methoden	104
5. 2. 1	Computeranalysen	104
5. 2. 2	PCR	104
5. 2. 3	Klonierungen von PACSIN1 und PAST2	105
5. 2. 3. 1	Klonierung von PACSIN1 C/N Strep-tag II und PAST2 C-Strep-tag II	105
5. 2. 3. 2	Klonierung von GST-PAST2	106
5. 2. 4	DNA-Sequenzierung	106

5. 2. 5	Massenspektrometrie	106
5. 2. 6.	Zellkultur	107
5. 2. 6. 1	Transfektionen	108
5. 2. 6. 2	Allgemeine Zellkultur	108
5. 2. 7	Proteinchemie	110
5. 2. 7. 1	Aufreinigung von Proteinen mit dem Strep-tag-II Bindungsmodul	110
5. 2. 7. 2	Gelfiltration	110
5. 2. 7. 3	Bestimmung der Proteinkonzentration	111
5. 2. 7. 4	Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese	111
5. 2. 7. 5	CD-Spektroskopie	111
5. 2. 7. 6	Quervernetzung (Cross-Linking)	111
5. 2. 7. 7	Proteinpräparation aus Geweben	111
5. 2. 7. 8	Proteinpräparation aus Zellen	112
5. 2. 7. 9	Diskontinuierlichen Dichtegradientenzentrifugation	112
5. 2. 7. 10	Affinitätspräzipitation	112
5. 2. 7. 11	Nukleotidbindung von PAST1	114
5. 2. 7. 12	GTP-/ATPase-Aktivitätstest	114
5. 2. 7. 13	Digoxigenin-Markierung von PACSIN1	115
5. 2. 7. 14	Radioaktiver N-Acetylglucosamin-Nachweis auf PACSIN1	116
6	Anhang	117
6. 1	Aminosäuresequenzen von PACSIN1 und PAST2	117
7	Literatur	118
8	Danke	139

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
aff.	Affinitätsgereinigt
AMP	Adenosinmonophosphat
AP	Adapterprotein
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
BAR	Bin-Amphiphysin-RVS
bp	Basenpaare
BS ³	Bis[Sulfosuccinimidyl]suberat
BSA	Rinderserumalbumin (<i>Bovine serum albumin</i>)
BSP	Bone-Sialo-Protein
CaMKII	Ca ²⁺ /Calmodulin-abhängige Kinase II
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CC	Coiled-coil
CD	Circular Dichroismus
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
CGN	Cis-Golgi-Netzwerk
Chaps	(3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propan-sulfonat
COP	Coatomer-Protein
DLL	Asparaginsäure-Leucin-Leucin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOC	Deoxycholat
DPF	Asparaginsäure-Prolin-Phenylalanin
DSP	Dithiobis(succinimidylpropionat)
DSS	Disuccinimidylsuberate
DTT	Dithiothreitol

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EH	Eps15 Homologie
ELISA	Enzym-gekoppelter Immunnachweis (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
EM	Elektronenmikroskopie
ENTH	Epsin N-terminale Homologie
ER	Endoplasmatisches Reticulum
FCH	FER-CIP4-Homologie
FCS	fötales Kälberserum (<i>Fetal calf serum</i>)
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
GDP	Guanosindiphosphat
GED	GTPase-Effektor-Domäne
GMP	Guanosinmonophosphat
<u>GPI</u>	Glykosyl-Phosphatidylinositol
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
HA	Häm-Agglutinin
HC	leichte Kette (<i>Heavy Chain</i>)
HEK	Humane-embryonale-Nierenzellen
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
IEP	Isoelektrischer Punkt
LC	leichte Kette (<i>Light Chain</i>)
LPAAT	Lysophosphatidylsäure-Acyltransferase
MALDI MS	Matrix-unterstützte Laserdesorptions/Ionisations-Massenspektrometrie
MAP	Mitogen aktiviertes Protein (<i>mitogen activated protein</i>)
MTOC	Mikrotubuli-Organisationzentrum
N-PAGE	Native-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
NPF	Asparagin-Prolin-Phenylalanin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-Kochsalz-Puffer (<i>Phosphat- buffered-saline</i>)
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)

PD	Affinitätspräzipitation (<i>Pull-Down</i>)
PEI	Polyethylenimin
PH	Pleckstrin Homologie
PI(4,5)P ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKC	Protein Kinase C
PRD	Prolin-reiche Region (<i>proline rich domain</i>)
PVDF	Polyvinylidendifluorid
R _f	Retentionsfaktor
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SH3	Src Homologie 3
Sulfo-EGS	Ethylenglycolbis(succinimidylsuccinat)
Tab.	Tabelle
TBS	Tris Kochsalzpuffer (<i>Tris-Buffered-Saline</i>)
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
UDP	Uridindiphosphat
UV	Ultraviolett
v / v	Volumen pro Volumen
w / v	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp
ZMMK	Zentrum für molekulare Medizin Köln

1 Einleitung

1.1 Biologische Membranen, ihre Funktionen und Rollen beim Stofftransport

Membranen sind für die Funktion einer Zelle von entscheidender Bedeutung. Sie dienen neben der Abgrenzung des Zytosols vom extrazellulären Raum auch innerhalb der Zelle zur Trennung verschiedener, diskreter Kompartimente mit unterschiedlichem chemischen Milieu und individuellen Aufgaben. Die biologischen Aktivitäten von Membranen ergeben sich hierbei aus ihren besonderen physikalischen Eigenschaften. So sind Membranen widerstandsfähig, aber flexibel, selbstdichtend und permeabel für unpolare, hydrophobe und kleine Moleküle wie z. B. Sauerstoff und Stickstoff. Die Permeabilität der Membran für polare Moleküle ergibt sich aus der Größe und den chemischen Eigenschaften, so können kleine polare Moleküle wie z. B. Wasser, Harnstoff und Alkohol die Lipid-Doppelschicht entlang eines Konzentrationsgradienten noch recht schnell passieren. Die Diffusion von Glycerin erfolgt hingegen etwas langsamer. Für große polare Moleküle wie z. B. Glukose oder Saccharose sind Membranen genauso wie für Ionen impermeabel. Der Transport nicht membrangängiger Stoffe durch zelluläre Membranen muß demzufolge durch spezielle Transportsysteme, wie z. B. ATP-getriebene Pumpen, Ionenkanäle oder Transportproteine wie Uni-, Sym- und Anti-porter erfolgen (Alberts *et al.*, 1994).

Diese Eigenschaften, insbesondere die Flexibilität der Plasmamembran im speziellen gestatten der Zelle Formveränderungen, die mit Zellwachstum oder Bewegung einhergehen. Weiterhin ermöglicht die selbstdichtende Eigenschaft einer Membran, zeitweilige Brüche in ihrer Kontinuität zu verschließen, so dass die Spaltung eines membranumhüllten Kompartiments in zwei Kompartimente, wie z. B. bei der Endozytose oder Zellteilung, genauso möglich ist wie die Verschmelzung zweier Membranen bei der Exozytose (Lehninger *et al.* 1994). Diese für die Plasmamembran beschriebenen vesikulären Abschnürungs- und Fusions-Prozesse finden zusätzlich auch intrazellulär zwischen den verschiedenen Zellorganellen wie z. B. dem Endoplasmatischen Reticulum und dem Golgi-Apparat, sowie zwischen diesen und weiteren Organellen statt (Kreis und Vale, 1999).

Die Lipid- und Protein-Zusammensetzung beeinflussen hierbei die physikalischen und biochemischen Eigenschaften einer Membran, z. B. der Fluidität und Permeabilität für bestimmte Stoffe. Diese Eigenschaften sind den Aufgaben der jeweiligen Membran angepasst. So sorgen z. B. in der Plasmamembran spezifische Transportproteine und Kanäle/Poren sowohl für den selektiven, kontrollierten Einstrom von Ionen, Glukose, Aminosäuren und Lipiden in die Zelle als auch für die Sekretion von Stoffwechselendprodukten aus der Zelle in den extrazellulären Raum.

Im Gegensatz zu diesen Prozessen, die durch membranintegrierte Transportsysteme vermittelt werden, ist der vesikuläre Transport aus mehreren Gründen komplizierter. Dabei muß zwischen dem regulierten und konstitutiven Vesikeltransport unterschieden werden. Die regulierte Vesikelfusion erfolgt erst aufgrund eines stimulierenden Signals wie z. B. bei der Ausschüttung von Neurotransmittern in den synaptischen Spalt, dieses Signal ist beim konstitutiven Weg nicht nötig (Alberts). In beiden Fällen müssen die bei den Fusions- und Abschnürung- Prozessen auftretenden Energiebarrieren, die sich dabei durch die Deformierung der Membran ergeben, durch den Einsatz von „Helferproteinen“ überwunden werden. Zusätzlich müssen sowohl auf der Oberfläche der Zielorganelle als auch auf der Oberfläche des Transportvesikels „Schlüssel-Schloß“ ähnliche Signalmoleküle befinden, damit eine ein zielgerichtete Vesikelfusion möglich ist (Delcomyn, 1997). Der vesikuläre Transport erfolgt außerdem nicht nur über freie Diffusion der Transportvesikel, sondern ist über Motorproteine an Mikrotubuli und Aktinfilamente (Kreis und Vale ,1999; Hicks *et al.*, 1996) gekoppelt. Zudem wird in neueren Modellen des Vesikeltransportes die Bewegung der Vesikel durch Mikrotubuli-unabhängige Aktinpolymerisierung allgemein akzeptiert (Merrifield *et al.*, 1999).

Im Folgenden werden die verschiedenen intrazellulären Transportwege (Abb. 1) unter Beteiligung der verschiedenen Hüllproteine dargestellt.

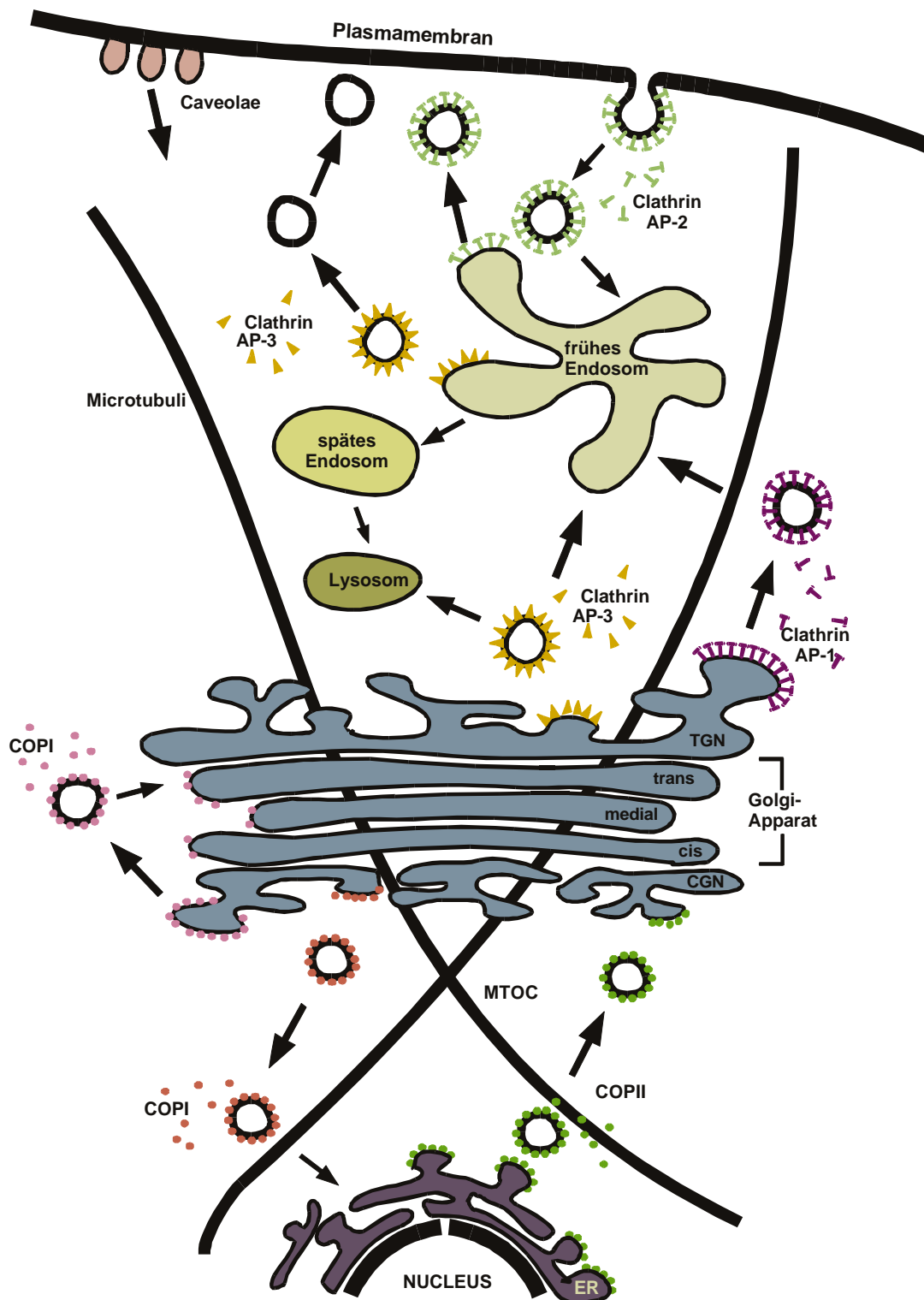


Abb. 1: Schematische Darstellung des intrazellulären Vesikeltransportes unter Verwendung verschiedener Hüllproteine. MTOC: Mikrotubuli-Organisationzentrum, COPI: Coatomer-Protein I, COPII: Coatomer-Protein II, AP-1-3: Adapterproteine 1 bis 3, TGN: Trans-Golgi-Netzwerk, CGN: Cis-Golgi-Netzwerk, ER: Endoplasmatisches Reticulum. Diese Abbildung wurde verändert aus Kreis und Vale (1999) entnommen. Nähere Erläuterungen zu den einzelnen Transportwegen finden sich im Text (s.u.).

Die einzelnen, biochemisch unterschiedlichen Varianten des Vesikeltransportes sollen im Folgenden vorgestellt werden. Hierbei lassen sich zwei grundsätzliche Typen der Vesikelabschnürung unterscheiden, zum einen Vesikel, bei denen die Vesikelabschnürung durch Hüllproteine (COPI, COPII oder Clathrin-umhüllte Vesikel) unterstützt wird, und Vesikel, bei denen eine stabilisierende Hülle fehlt (Caveolae).

1. 2 Caveolae und Lipid Rafts

Das ursprüngliche Modell der Plasmamembran, bei dem davon ausgegangen wurde, dass die membranaufbauenden Lipide und Proteine innerhalb der Membran homogen verteilt sind, wurde in den letzten Jahren modifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass sich innerhalb der Membran vorübergehend Bereiche ausbilden können, in denen aufgrund eines höheren Anteils von Glykosphingolipiden, GPI-verankerten Proteinen und Cholesterin eine verringerte Fluidität vorherrscht (Simons und Ikonen, 1997; Harder und Simons, 1997). Aufgrund der eingeschränkten lateralen Beweglichkeit innerhalb dieser Mikrodomänen werden sie als „Lipid Rafts“ bezeichnet (Kurzchalia und Parton, 1999).

Als Caveolae werden nicht Clathrin-assoziierte, flaschenförmige Einstülpungen in der Plasmamembran bezeichnet, die in verschiedenen Säuger-Zelltypen zu finden sind. Hierbei handelt es sich um eine Spezialform der „Lipid Rafts“, bei der das Protein Caveolin „Haarnadel-artig“ in der Membran integriert vorliegt und die Hauptprotein-komponente der Caveolae darstellt. Die Synthese und Integration von Caveolin in Membranen erfolgt am ER, die Oligomerisierung des Proteins in große Homo-Oligomere wird durch Cholesterin stimuliert und durch Palmitoylierung, auf dem Weg zur Plasmamembran, innerhalb des Golgi-Komplexes stabilisiert (Kreis und Vale, 1999). Zusätzlich zum Einbau von Cholesterin in die „Lipid rafts“ erfolgt im Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) die Anreicherung des Lipidkerns mit Glykosphingolipiden, Sphingomyelin und GPI-Proteinen (Brown und Rose, 1992, Lisanti *et al.*, 1993). Der Transport der „Lipid rafts“ zur Plasmamembran erfolgt nach Einbau in die Membran exozytotischer Vesikel (Dupree *et al.*, 1993). Die Rolle der „Lipid rafts“-haltigen Transportkompartimente ist vielfältig, so geht man davon aus, dass sie als

exozytotisches und endocytotisches Kompartiment, sowohl Moleküle an der Zelloberfläche aufnehmen und weiter an ihre Zielorte in der Zelle transportieren, als auch den Transport in den extrazellulären Raum vermitteln (Harder und Simons, 1997). So sind Caveolae unter anderem an der Ausschleusung von Cholesterin aus der Zelle beteiligt (Li *et al.*, 1996; Kreis und Vale, 1999; Murata *et al.*, 1995). Zusätzlich sind sie in polaren Zellen am Prozeß der Transzytose involviert, bei der Substanzen von einer Seite einer polarisierten Zelle auf die andere Seite transportiert werden (Simionescu, 1983).

1.3 Vesikel mit Proteinhülle

1.3.1 COPII-umhüllte Vesikel

Die einfachste Form der mit Proteinhüllen gebildeten Vesikel stellen die Coatomer Protein II (COPII) umhüllten Vesikel dar, welche für den konstitutiven Transport neu synthetisierter Proteine vom Endoplasmatischen Retikulum zum Cis-Golgi-Netzwerk verwendet werden (Barlowe *et al.*, 1994; Barlowe *et al.*, 2000; Springer *et al.* 1999). Die codierenden Gene des COPII-Komplexes wurden zunächst bei einem genetischen Screen nach Sekretions-defizienten Zellen in *Saccharomyces cerevisiae* identifiziert (Kaiser und Schekmann 1990). Die Proteine Sar1p, Sec13p, Sec23p, Sec24p und Sec31p konnten später ebenfalls in Säugerzellen als notwendige Komponenten der Vesikelabschnürung am Endoplasmatischen Retikulum nachgewiesen werden (Schekmann und Orci, 1996). Obwohl die genaue Anzahl der *in vivo* verwendeten beteiligten Proteine noch unbekannt ist, gelang *in vitro* mit Hilfe der fünf gereinigten Proteine und Liposomen die Herstellung COPII-umhüllter Vesikel (Matsuoka *et al.*, 1998). Für die Erkennung der zu transportierenden Komponenten ist vermutlich der Sec23p-Sec24p-Komplex verantwortlich (Springer und Schekmann, 1998; Peng *et al.*, 2000), der zusammen mit der kleinen GTPase Sar1p (GTP) und Sec12p als Guanin-Nucleotid-Austauschfaktor (GEF; Barlowe und Schekman, 1993) den Sec13p-Sec31p-Komplex rekrutiert (Barlowe *et al.*, 1994), der dann die vesikelbildende Deformation der Membran auslöst. Die Ablösung der Proteinhülle vom Vesikel wird vermutlich durch die Sec23p-vermittelte GTP-Hydrolyse und der Freisetzung von Sar1p (GDP) stimuliert (Kirchhausen, 2000).

1. 3. 2. COPI-umhüllte Vesikel

COPI-umhüllte Vesikel werden wie die COPII-umhüllten Vesikel für den intrazellulären Transport eingesetzt. Im Gegensatz zu letzteren lösen sich COPI-Vesikel unter Verwendung einer komplexeren Proteinmaschinerie von den Donormembranen ab und vermitteln mehrere unterschiedliche Transportwege (Lippincott-Schwartz *et al.*, 1998; Kirchhausen 2000). Neben ihrer hauptsächlichsten Verwendung beim retrograden Membrantransport von ER-Golgi-Intermediaten zurück zum Endoplasmatischen Retikulum (Leteneur *et al.*, 1994) sind sie außerdem an anterograden Transportprozessen zwischen den Cisternen des Golgi-Apparates beteiligt (Orci *et al.*, 1997). Zusätzlich konnten COPI-Vesikel an endosomalen Strukturen nachgewiesen werden (Aniento *et al.*, 1996; Whitney *et al.*, 1995).

Die Bildung der aus sieben Proteinen bestehenden COPI-Coatomer-Hülle (α -, β -, β' -, γ -, δ -, ϵ - und ζ -COP) erfolgt nach der GTP-abhängigen Anlagerung von ARF1 über eine Myristoylgruppe an die Donormembran. Die Aktivierung von ARF1 wird hierbei in Abhängigkeit vom Transportweg durch verschiedene GEFs (Kirchhausen 2000; Franco *et al.*, 1998) vermittelt.

Für die nachfolgenden Ereignisse bei der Bildung der COPI Hülle werden zwei alternative Möglichkeiten diskutiert. Entweder lagern sich die sieben Hüllproteine an GTP-ARF1 an (Orci *et al.*, 1993), oder durch ARF1 wird die Aktivität der Phospholipase D erhöht, so dass der Coatomer Komplex über Inositolpolyphosphate an die Membran bindet. Diese Möglichkeit wird dadurch gestützt, dass die Coatomer-Hülle auch dann gebildet wird, wenn ARF1 nicht vorhanden ist, Phospholipase D aber in einer hohen Konzentration vorliegt (Ksitakis *et al.*, 1998). Die Ablösung der COPI-Coatomer Hülle erfolgt nach Hydrolyse des an ARF1 gebundenen GTPs, da aufgrund der dadurch resultierenden Konformationsänderung die Bindung von ARF1 über seine Myristoylgruppe an die Membran nicht mehr möglich ist.

Die Festlegung der Transportrichtung scheint durch zytoplasmatische Erkennungssequenzen integraler Membranproteine der zu transportierenden Membran geregelt zu werden. So wird der retrograde Transport durch Bindung von α -, β' - und ϵ -COP an Di-Lysin-Motive ($K(X)_nKKX$), der anterograde Transport hingegen durch

die Bindung an β -, γ - und ζ -COP an andere Erkennungssequenzen vermittelt (Harter *et al.*, 1996).

1. 3. 3 Clathrin-umhüllte Vesikel

Die Bildung Clathrin-umhüllter Vesikel ist die komplexeste Form der Vesikelabschnürung, da hierfür mehr Proteinkomponenten verwendet werden, als bei den bisher beschriebenen Clathrin-unabhängigen Mechanismen. Zusätzlich ist die clathrin-vermittelte Vesikelbildung an mehreren intrazellulären Transportwegen mit unterschiedlichen Donor- und Akzeptormembranen beteiligt. So konnte diese Art der Vesikelbildung insbesondere bei der Rezeptor-vermittelten Endozytose, sowie der Abschnürung von Transportvesikeln vom Trans-Golgi-Netzwerk zu lysosomalen und endosomalen Kompartimenten nachgewiesen werden. Neben diesen Funktionen beim Proteintransport und Recycling von ligandengebundenen Rezeptoren der Plasma- und postsynaptischen Membran, erfolgt das nach Neurotransmittersekretion notwendige kompensatorische „Lipid-Recycling“ an präsynaptischen Membranen ebenfalls durch clathrin-vermittelte Endozytose (Kirchhausen, 2000; Slepnev und De Camilli, 2000).

Die Bildung der Clathrin-Hülle setzt zunächst an die Donormembran gebundene Adaptermoleküle (AP-Komplexe, AP180) voraus, die in Abhängigkeit vom vermittelten Transportweg variieren. Diese Adapterproteine vermitteln zum einen die Bindung an die Oberfläche der Vesikel als auch die Bindung von Clathrin. Mit der Anlagerung von Clathrin an diese Adapterproteine ist eine fortschreitende Krümmung der Donormembran verbunden (Abb. 2), die durch membranverändernde Proteine wie z. B. Endophilinen unterstützt wird. Vor der Abtrennung des Clathrin-umhüllten Vesikels ist dieser nur noch über eine enge flaschenhalsartige Struktur mit der Donormembran verbunden (Schmid, 1997; Kirchhausen, 2000).

Die Abtrennung des Vesikels aus dieser Struktur erfordert das Lösen und die Neubildung von Bindungen, die innerhalb der Lipiddoppelschicht wirken. Dieser energetisch aufwendige Vorgang wird durch den Einsatz einer Reihe von Proteinen erleichtert. So polymerisiert zunächst die GTPase Dynamin ringförmig um die entstandene flaschenhalsartige Struktur. Die nachfolgende GTP-Hydrolyse von

Dynamin ist mit einer Konformationsänderung des Proteins verbunden, welche eine Vergrößerung des Abstandes zwischen den Dynaminringen zur Folge hat. Dieser Prozess, der mit der Entspannung einer Feder zu vergleichen ist, führt zur Ablösung des Vesikels von der Donormembran. Neben der Beteiligung von Dynamin an diesem Prozess wird außerdem eine Beteiligung weiterer Proteine wie z. B. Synaptojanin, Endophilin und Phospholipase D diskutiert (Sever *et al.*, 1999; Ringstad *et al.*, 1999; Takei *et al.*, 1999). Die Entfernung der Clathrin-Hülle vom soeben gebildeten Vesikel erfolgt unmittelbar im Anschluß, so dass weitere Proteininteraktionen, die für den Transport des Vesikels oder die anschließende Fusion mit der Zielmembran nötig sind (Ungewickell *et al.*, 1995; Umeda *et al.*, 2000), an der Oberfläche des Vesikels ungehindert stattfinden können.

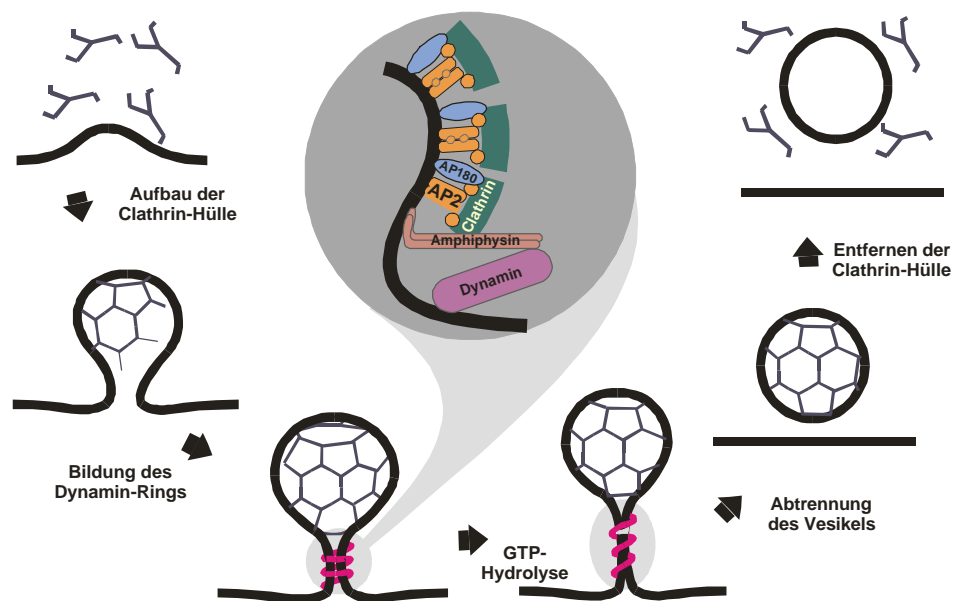


Abb. 2: Schematische Darstellung der Abschnürung eines Vesikels von einer der Donormembran (Ritter, 2001). Durch die Anlagerung der Clathrin-Oligomere an die Donormembran wird zunächst eine kugelförmige Ausbuchtung der Membran stabilisiert. Die Abschnürung des noch Clathrin-umhüllten Vesikels erfolgt durch Unterstützung weiterer Proteine, abschließend wird die Clathrin-Hülle entfernt.

1. 3. 3. 1 Neuronale Clathrin-umhüllte Vesikel

Im Gegensatz zur Clathrin-vermittelten Endozytose bei nicht neuronalen Zellen oder an postsynaptischen Membranen, bei der Liganden-blockierte Rezeptoren oder andere Stoffe in die Zelle aufgenommen werden, dient die Clathrin-vermittelte Endozytose in präsynaptischen Neuronen primär dem Lipid-Recycling, und somit der Bereitstellung neuer Vesikel für die Neurotransmitter Befüllung.

Die Fusionen der Neurotransmitter-gefüllten Vesikel mit der präsynaptischen Membran in einem aktiviertem Neuron, hätten eine Volumenvergrößerung der Synapse und ein Mangel an Lipiden in der Zelle zur Folge, wenn es nicht einen retrograden Transport der Lipide von der Membran zurück in das Neuron gäbe. Da in aktivierten Synapsen viele Neurotransmitter-gefüllte Vesikel mit der präsynaptischen Membran fusionieren, erhöht sich nachfolgend die Zahl der Clathrin-umhüllten Vesikel in den aktinreichen, endozytotischen Zonen im Randbereich der aktiven Zone (Takei *et al.*, 1996). Umgekehrt lassen sich in ruhenden Synapsen kaum Clathrin-umhüllte Vesikel nachweisen.

Viele, der in diesen neuronalen Prozessen involvierten Proteine sind neuronale Spleißvarianten oder spezielle Isoformen mit einer höheren Expressionsrate. Das Membran-Recycling synaptischer Vesikel erfolgt außerdem schneller als bei nicht neuronalen Endozytoseprozessen. Dies wird dadurch ermöglicht, dass im Gegensatz zum nicht-neuronalen Rezeptor-Recycling oft der Weg endozytierter Vesikel über Endosomen ausgelassen wird (Murthy und Stevens, 1996).

Die bisher beschriebenen, vereinfachten Vorgänge sind bis heute einschließlich der dabei mitwirkenden Proteine noch nicht bis ins Detail geklärt, da insbesondere die Ereignisse unmittelbar vor der Abtrennung des Clathrin-umhüllten Vesikels von der Donormembran bzw. der flaschenhalsartigen Struktur sehr schnell, auf einem eng begrenzten Raum stattfinden (Abb. 3). Im Folgenden sollen die bisher bekannten, an diesem Prozeß beteiligten Proteine vorgestellt werden.

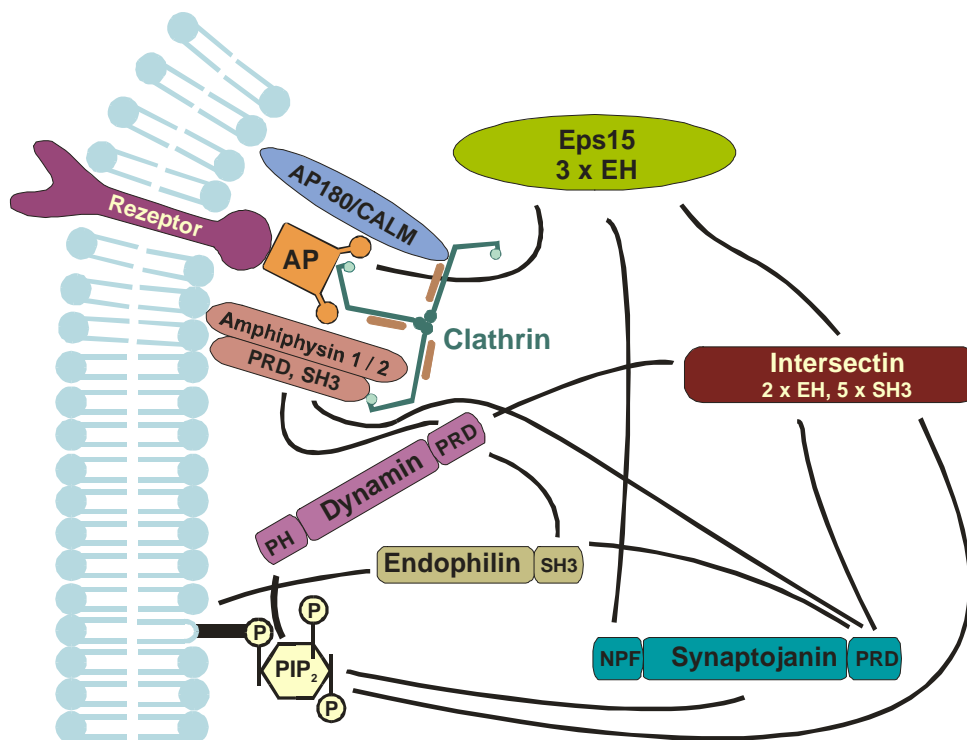


Abb. 3: Vereinfachte Darstellung der Situation am abzuschneidenden Vesikelhals. Die Bildung der Clathrin-Hülle erfolgt durch Bindung von Clathrin an die Adapterproteine AP180/Calm, Amphiphysin und den Adapter-Proteinkomplex AP. Das Protein Endophilin sorgt für eine Modifikation des Membranlipides PI(4,5)P₂ zu Phosphatidylinositol. Durch die GTPase Dynamin erfolgt die finale Abtrennung des Vesikels. EH, Eps15 Homologie; SH3, Src Homologie 3; PRD, Prolin-reiche Domäne; PH, Pleckstrin Homologie; NPF, Asparagin-Prolin-Phenylalanin-Motiv.

1.4 Proteinkomponenten des Vesikeltransportes

1.4.1 Clathrin

Das Protein Clathrin (Pearse, 1975) ist ein Hetero-Hexamer und besteht aus drei schweren und drei leichten Untereinheiten, die aneinander gebunden die Form eines Triskelions bilden (Smith und Pearse, 1999). Innerhalb dieses Komplexes binden jeweils drei schwere Ketten C-terminal aneinander (Liu *et al.*, 1995), wobei jede der schweren Ketten mit einer leichten Kette assoziiert vorliegen kann (Abb. 4). An den außenliegenden, globulären N-terminalen Enden der schweren Ketten befinden sich die Protein-Protein Interaktionsdomänen, die durch eine siebenblättrige β -Propeller-Struktur (ter Haar *et al.*, 1998) gebildet werden. Innerhalb dieser Domäne befindet sich

die Bindungsstelle für Proteine, die das Clathrin-Box-Motiv (Owen und Lutio, 2000) besitzen. Dieses Bindungsmotiv findet sich sowohl in den Adapterproteinen, als auch in anderen Clathrin-bindenden Proteinen. Die schwere (Brodsky, 1997) und leichte Kette von Clathrin werden in Säugern ubiquitär exprimiert (Kreis und Vale, 1999). Von der leichten Kette sind zwei Isoformen LCa und LCb (Ponnambalam *et al.*, 1994) bekannt, welche zusätzlich neuronale Spleissvarianten besitzen. Auf der schweren Kette konnte bisher eine Tyrosin-Phosphorylierungsstelle nachgewiesen werden (Wilde und Brodsky, 1996), die leichten Ketten besitzen Bindungsstellen für Kalzium, LCb besitzt zusätzlich eine Phosphorylierungsstelle für Caseinkinase II (Wilde und Brodsky, 1996). Wie in *in vitro* Experimenten gezeigt werden konnte, scheint die Bindung von Kalzium die Bildung eines Clathrin-Netzwerkes zu beschleunigen (Ungewickell und Ungewickell, 1991; Nähtke *et al.*, 1990). Bei der Bildung des Clathrin-Coats während der Vesikelabschnürung lagern sich die Clathrinmoleküle so an die Membran an, dass sich eine aus polyhedrale, kugelartige Hülle aus fünf und sechseckigen Strukturen ergibt. Neben diesen bisher ausführlich charakterisierten Formen der leichten und schweren Kette von Clathrin wurde vor kurzem eine neue Isoform der schweren Kette mit großer Sequenzhomologie zur bisher bekannten beschrieben. Diese besitzt eine hohe Expressionsrate in muskulären Zellen und eine geringere in anderen Zelltypen. Im Gegensatz zu der bisher bekannten Isoform interagiert sie nicht mit den leichten Ketten und ist nicht mit dem AP-2-Komplex, sondern nur mit den AP-3 und AP-4- Komplexen an Aktin-Myosin-Zytoskelett des Trans-Golgi-Netzwerk assoziiert (Liu *et al.*, 2001).

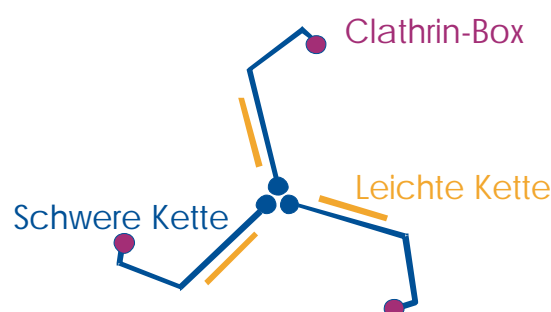


Abb. 4: Darstellung eines hexameren Clathrin-Triskelions. Das Hexamer wird durch Oligomerisierung von drei schweren Ketten (blau) mit drei leichten Ketten (gelb) gebildet. Das Clathrin-Box-Motiv (violett) an den N-terminalen Enden der schweren Ketten dient der Bindung Clathrin-assoziiierender Proteine.

1. 4. 2 Adapter-Proteine 2 (AP-2)

Die Bindung der Clathrin-Hülle an die Donormembran erfolgt über Adapter-Proteine. In Abhängigkeit von der Donormembran und dem Transportweg werden bei der Clathrin-vermittelten Vesikelabschnürungen dazu verschiedene Adaptermoleküle verwendet. Die Bindung von Clathrin an die Donormembran beim endozytotischen Membran-Recycling synaptischer Vesikel erfolgt über den AP-2-Komplex. Dieser ist wie die Homologen AP-1, AP-3 und AP-4-Komplexe, die für andere Transportwege innerhalb der Zelle benutzt werden, ein aus vier Untereinheiten bestehendes Tetramer (Hirst und Robinson, 1998; Hirst *et al.*, 1999) und setzt sich aus den Untereinheiten α -Adaptin, β 2-Adaptin, μ 2-Adaptin und σ 2-Adaptin kompakt zusammen, wobei die α - und β 2-Untereinheiten abstehende „Ohr-ähnliche“ Strukturen bilden (Abb. 5). Die Bindung des AP-2-Komplexes an die Donormembran erfolgt zum Teil direkt über Membranlipide wie Phosphoinositole und saure Phospholipide aber auch mit Hilfe seiner Kernregion an integrale Membranproteine wie z. B. Synaptotagmin (Haucke und de Camilli, 1999). Die Interaktion des AP-2-Komplexes an Clathrin dagegen erfolgt kooperativ über zwei weitere Bindungsstellen mit sogenannten „clathrin-box“-Motiv innerhalb des β 2-Adaptins (Owen *et al.*, 2000). Eine dieser Bindungsstellen wird durch die exponierte „Ohr-ähnliche“-Struktur gebildet, die zweite Bindungsstelle für Clathrin befindet sich in der Verbindungsregion zwischen der Ohr-Domäne und dem Kernbereich (Owen *et al.*, 1999). Neben der Bindung an Clathrin interagiert der AP-2-Komplex über die „Ohr-Domänen“ der α - und β 2-Untereinheiten durch hydrophobe Wechselwirkungen mit weiteren an der Endozytose beteiligten Proteinen (Owen *et al.*, 1999; Traub *et al.*, 1999), die im Folgenden vorgestellt werden.

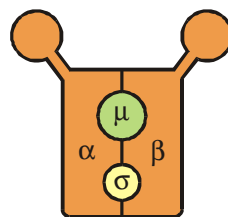


Abb. 5: Die Membran- und Protein-bindenden Adapterproteine AP-1-4 bestehen aus je vier Adaptinen α , β , σ und μ . Im Falle des am Membranrecycling in Synapsen involvierten AP-2-Komplexes handelt es sich um die je 100 kDa schweren α und β 2-Untereinheiten sowie einer 50 kDa μ 2 und 19 kDa schweren σ 2-Untereinheit.

1. 4. 3 AP180/CALM

Bei AP180 handelt es sich um die hirnspezifische Variante des ubiquitär exprimierten verwandten Proteins CALM (clathrin assembly lymphoid myeloid leukaemia protein; Tebar *et al.*, 1999). Beide Proteine erfüllen die gleiche Funktion, indem sie den Aufbau der Clathrin-Hülle bei vesikulären Abschnürungsprozessen fördern. AP180 verstärkt zum einen durch Bindungsstellen für den AP-2-Komplex und Clathrin die Assoziation dieser beiden Proteine untereinander (Ahle und Ungewickell, 1986; Hao *et al.*, 1999), zum anderen bindet AP180 über Phosphoinositide an die Membran und reguliert zusätzlich die Größe der Clathrin-Hülle (Hao *et al.*, 1997). Die Interaktion von AP180 mit dem AP-2-Komplex erfolgt über die Ohr-Domänen des AP-2-Komplexes (Traub *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1995). Die Bindung von AP180 an Clathrin erfolgt nicht über das in AP180 enthaltene Amino-terminale „Clathrin-box“-Motiv, sondern über sich wiederholende Asp-Leu-Leu (DLL)-Motive im Carboxyterminus (Abb. 6; Morgan *et al.*, 2000).

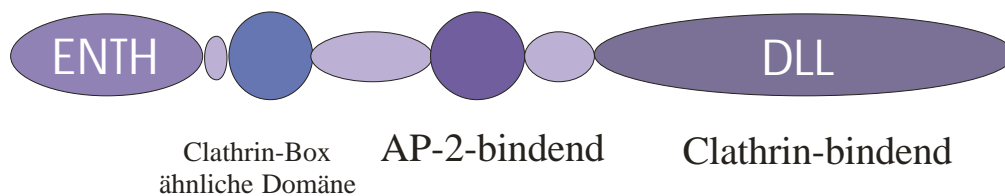


Abb. 6: Das 85 kDa schwere Adapterprotein AP-180 mit einem apparenten Molekulargewicht von 180 kDa in der SDS-PAGE besitzt Bindungsstellen für den AP-2-Komplex und Clathrin. Das im Molekül enthaltene Clathrin-Box ähnliche Motiv wird für die Bindung des Proteins nicht verwendet, die Clathrin-Bindung erfolgt an der C-terminalen DLL-Motive enthaltende Domäne.

1. 4. 4 Synaptojanin

Das in zwei Isoformen mit mehreren Spleißvarianten (Haffner *et al.*, 1997; Nemoto und De Camilli, 1999; Slepnev und De Camilli, 2000) vorkommende Protein Synaptojanin ist eine Polyphosphoinositid-Phosphatase, die die Phosphoinositid-Menge (der Membran) bei endozytotischen Prozessen reguliert. Das modular aufgebaute Protein (Abb. 7) enthält zwei Inositol-Phosphatase-Bereiche, sowie eine

carboxyterminale prolinreiche Domäne, die eine Bindung an SH3-Domänen enthaltende endozytotische Proteine wie Amphiphysin 1 und 2, Dynamin und Mitglieder der Endophilin-Familie ermöglicht (Mc Pherson *et al.*, 1996; Cestra *et al.*, 1999). Mit Hilfe der zwei Inositol-Phosphatase-Bereiche, erfolgt an unterschiedlichen Stellen des Inositolringes der Abbau von PI(4,5)P₂ zu Phosphatidylinositol (Guo *et al.*, 1999; McPherson *et al.*, 1996). Für die Entfernung der Clathrin-Hülle des freigesetzten Vesikels ist Synaptojanin essentiell, so konnte in Synaptojanin-1 defizienten Mäusen eine Erhöhung des PI(4,5)P₂-Spiegels zusammen mit einer Anreicherung Clathrin-umhüllter Vesikel im Bereich der Synapsen festgestellt werden (Cremona *et al.*, 1999). Da die Polymerisierung von Aktinmonomeren durch PI(4,5)P₂ positiv beeinflusst wird (Arneson *et al.*, 1999; Rohatgi *et al.*, 1999), könnte Synaptojanin zusätzlich an der Inhibierung der Aktinpolymerisation im Bereich des Vesikelhalses beteiligt sein (Cremona *et al.*, 1999).

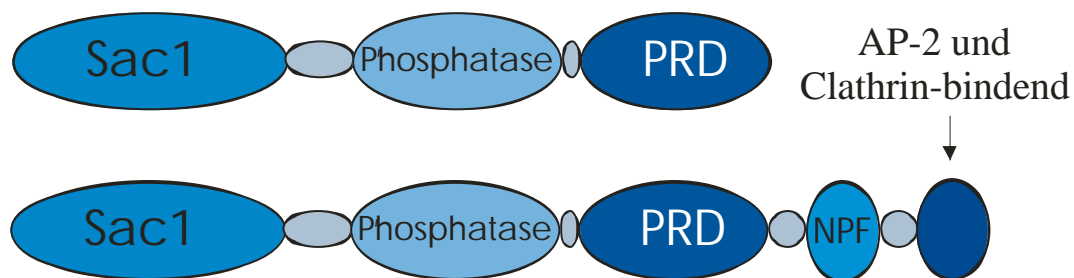


Abb. 7: Die zwei Isoformen des Proteins Synaptojanin besitzen eine zentrale katalytische 5' Phosphatase-Domäne sowie eine zur Bindung von SH3-Domänen fähige, prolinreiche (PRD) Domäne. Die neuronale Isoform besitzt zusätzlich eines zur Bindung an EH-Domänen fähiges NPF-Motiv. C-terminal findet sich in dieser Isoform ein AP-2- Komplex und Clathrin-bindender Bereich.

1. 4. 5 Synapsin

Von Synapsin (Abb. 8) existieren drei Isoformen mit mehreren Spleißvarianten. Synapsine finden sich im präsynaptischen Bereich aller Synapsen und sind dort zytosolisch mit der Oberfläche sekretorischer, mit Neurotransmittern gefüllter Vesikel assoziiert (Südhof *et al.*, 1989; Valtora *et al.*, 1992; Greengard *et al.*, 1993). Durch

Synapsin wird ein Teil der sekretorischen Vesikel am Aktin-Zytoskelett verankert, damit bei Stimulation des Neurons nur ein Teil der sekretorischen Vesikel mit der Membran der Synapse fusioniert (Greengard *et al.*, 1993). Synapsin repräsentieren einen Punkt regulatorischer Konvergenz, so konnten auf Synapsin I bis heute sieben verschiedene, physiologisch wirksame Phosphorylierungsstellen nachgewiesen werden (Greengard *et al.*, 1993; Jovanovic *et al.*, Matsubara *et al.*, 1996). Die Lösung der Vesikel aus dem Aktin-gebundenen Reservepool erfolgt nach Kalzium-Ionen Einstrom in die Zelle. Durch diesen wird die CaMKII (Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Kinase II) aktiviert. Die nachfolgende Phosphorylierung von Synapsin führt zu einer Entlassung dieser Synapsin-assoziierten Vesikel aus dem aktin gebundenen Reservepool. Bei erneuter Stimulation verschmelzen diese Vesikel mit der präsynaptischen Membran (Llinás *et al.*, 1985; Torri Tarelli *et al.*, 1992).



Abb. 8: Der moduläre Aufbau von Synapsin. Neben mehreren, der Regulation dienenden Phosphorylierungsstellen im C- und N-terminalen Bereich (P1, P2), besitzt das Protein im zentralen Bereich Bindungsstellen für Vesikel und Aktin.

1. 4. 6 Amphiphysin

Vom multifunktionalen Adapter-Protein Amphiphysin existieren zwei Isoformen mit mehreren Spleißvarianten. Die zwei Isoformen Amphiphysin 1 und 2 werden primär im Hirn exprimiert, kommen aber zusammen mit ihren Spleißvarianten auch in den meisten anderen Geweben vor (Wigge und McMahon, 1998). Intrazellulär findet sich Amphiphysin sowohl zytosolisch als auch assoziiert an der äußeren Oberfläche synaptischer Vesikel. Das Adapterprotein rekrutiert vermutlich mehrere Proteine, die an der Endozytose beteiligt sind, zur Membran (Wigge und McMahon, 1998). So ermöglicht die N-terminale BAR- (Bin-Amphiphysin-Rvs-) Domäne (Abb. 9; Elliot *et al.*, 1999) zum einen die Oligomerisierung und Heterooligomerisierung der Amphiphysine, zum anderen wird sie zur Bindung des Proteins an saure

Membranlipide benötigt (Ramjaun *et al.*, 1999; Slepnev *et al.*, 1998; Takei *et al.*, 1999). Im mittleren Teil von Amphiphysin erfolgt die Bindung an die schwere Kette von Clathrin und an die „Ohr-ähnlichen“ Domäne der α -Adaptin-Untereinheit des AP-2 Komplexes (Ramjaun und McPherson, 1998; Slepnev *et al.*, 2000). An der C-terminalen SH3-Domäne werden die Proteine Dynamin und Synaptojanin über ihre prolinreichen Domänen gebunden (David *et al.*, 1996; Takei *et al.*, 1999; Mc Pherson *et al.*, 1996). Es wird vermutet, dass die durch Dynamin verursachte GTP-Hydrolyse durch Amphiphysin potenziert wird, da es mit Dynamin am Vesikelhals kolokalisiert ist (Takei *et al.*, 1999). In diesem Zusammenhang konnte in *in vitro* Experimenten gezeigt werden, dass die Ringformation von Dynamin durch die isolierte SH3-Domäne von Amphiphysin unterdrückt wird. Dies gelang jedoch nicht mit dem Volllängen Protein Amphiphysin (Owen *et al.*, 1998; Takei *et al.*, 1999). Amphiphysin 1 defiziente Mäuse besitzen Lerndefizite. Das nicht-Vorhandensein von Amphiphysin 1 in diesen Mäusen führte in Maushirn-Proteinextrakten zur einer dramatischen Reduktion der nachweisbaren Menge des Bindungspartners Amphiphysin 2. Aus diesem Grunde wird von einer Stabilisierung von Amphiphysin 2 durch Amphiphysin 1 im heterodimeren Komplex ausgegangen. Eine Reduktion des Expressionslevels anderer endozytotischer Proteine wie Dynamin, Clathrin, Synaptojanin oder des Clathrin Adapters AP-2 konnte im Gegensatz dazu nicht festgestellt werden. Aufgrund der Tatsache, dass die Bindung von Synaptojanin 1, Clathrin und dem AP-2-Komplex an Liposomen unter Verwendung des Proteinextraktes der Nullmutante stark reduziert war, wird von einer Beteiligung der Amphiphysine als multifunktionaler Adapter bei der Bildung des endozytotischen Proteinkomplexes an der Donormembran ausgegangen (Di Paolo *et al.*, 2002).

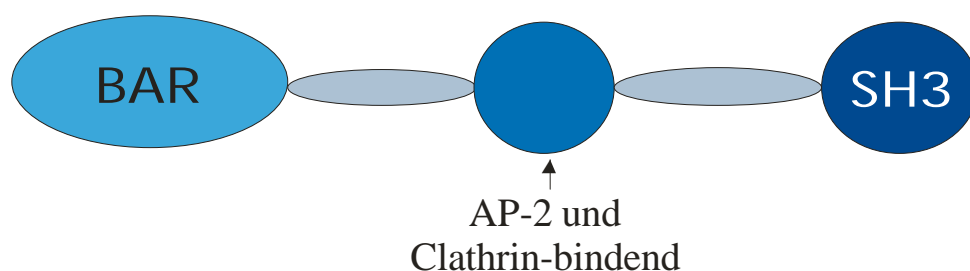


Abb. 9: Modularer Aufbau des Adapterproteins Amphiphysin. Die N-terminale BAR-Domäne dient der Lipidbindung, der zentrale Bereich der Bindung an Clathrin und den AP-2- Komplex. Über die C-terminale SH3-Domäne erfolgt z. B. die Bindung an die prolinreiche Region von Dynamin.

1. 4. 7 Endophilin

Von den Endophilinen existieren zwei Untergruppen A und B mit gleicher Domänenstruktur sowie mehreren Isoformen und Splicevarianten. Die Proteine besitzen N-terminalen eine katalytische, Lipid-bindenden-Domäne sowie einem zentralen coiled-coil Bereich und eine C-terminale SH3-Domäne (Abb. 10). Die Endophiline A1 und A3 binden Synaptojanin 1, die Amphiphysine 1 und 2, Dynamin und Synapsin (Modregger *et al.*, 2003) und sind essentiell für die Endozytose synaptischer Vesikel (Guichet *et al.*, 2002). Im Gegensatz dazu bindet Endophilin B1 nicht an Synaptojanin 1, Synapsin 1 und vermittelt Prozesse an intrazellulären Membranen (Modregger *et al.*, 2003). Die N-terminale, Lipid-bindende Domäne der Proteinfamilie besitzt Lysophosphatidylsäure-Acyltransferase- (LPAAT-) Aktivität und modifiziert die Lipide innerhalb Donormembran bei vesikulären Abschnürungsprozessen. Durch diese Domäne wird die Übertragung von aktivierten Fettsäuren auf Lysophosphatidylsäure katalysiert. Die dabei gebildete Phosphatidylsäure besitzt durch den zusätzlich gebundenen, ungesättigten Fettsäurerest eine vergrößerte räumliche Ausdehnung. Da die Modifikation der Lipiddoppelschicht nur auf der zytosolischen Seite der Membran erfolgt, resultiert durch die Volumenvergrößerung eine Krümmung der Membran, die durch die kugelförmige Hüllenbildung von Clathrin synergistisch stabilisiert wird. Die zentrale coiled-coil Region ermöglicht die Dimerisierung des Proteins (Schmidt *et al.*, 1999). Durch die C-terminale SH3-Domäne wird die Interaktion mit Dynamin, stärker jedoch mit Synaptojanin vermittelt (Ringstad *et al.*, 1997; Micheva *et al.*, 1997). Die Wechselwirkung mit Synaptojanin hat eine Beschleunigung der Hydrolyse von $PI(4,5)P_2$ zu Phosphatidylinositol durch Synaptojanin zur Folge (Gad *et al.*, 2000). Der Effekt der Interaktion von Endophilin mit Dynamin ist eine beschleunigte Abschnürung der Vesikel von der Donormembran (Ringstad *et al.*, 1999; Schmidt *et al.*, 1999).

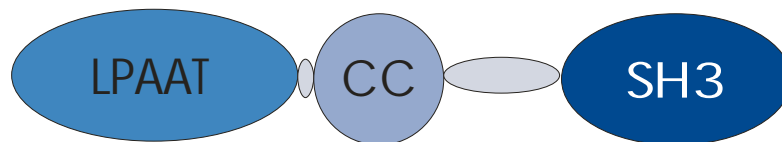


Abb. 10: Der modulare Aufbau des Proteins Endophilin. Durch den N-terminalen, katalytischen Bereich erfolgt die Modifikation von Membranlipiden. Über den zentralen coiled-coil Bereich erfolgt die Dimerisierung des Proteins. Die C-terminale SH3 Domäne vermittelt die Bindung an prolinreiche Sequenzen von Dynamin und Synaptojanin.

1. 4. 8 Dynamin

Die GTPase Dynamin erfüllt eine wesentliche Funktion bei der Abschnürung Clathrin-umhüllter-Vesikel von Donormembranen (Schmidt *et al.*, 1998). Bei Dynamin 1 handelt es sich um das neurospezifische Mitglied der Dynamin-Proteinfamilie zu der auch die Isoformen Dynamin 2 und 3 gehören, ausserdem besitzt jedes dieser Isoformen zusätzliche Spleißvarianten mit unterschiedlicher Gewebespezifität (Schmid *et al.*, 1998) und verschiedener intrazellulärer Verteilung (Cao *et al.*, 1998; McNiven *et al.*, 2000). Das modular aufgebaute Protein (Abb. 11) besteht N-terminal aus der eigentlichen GTPase Domäne, in der C-terminalen Hälfte findet sich eine Pleckstrin ähnliche Domäne (PH-Domäne), über die Interaktion mit Membranlipiden erfolgt (Salim *et al.*, 1996). Die nachfolgende GED-Domäne (GTPase-Effektor-domäne) verursacht nach der Oligomerisierung des Proteins durch direkte Interaktion mit der GTPase Domäne, eine Erhöhung der GTPase Aktivität (Muhlberg *et al.*, 1997). Durch C-terminale prolinreiche Domäne wird die Bindung zu Proteinen mit SH3-Domänen vermittelt (Okamoto *et al.*, 1997).

Die Funktion von Dynamin bei vesikulären Abschnürungsprozessen ist essentiell, aber bis heute nicht eindeutig geklärt. So ging man in einfacheren Modellen davon aus, dass die in Lösung vorliegenden GTP-gebundenen Dynamin-Tetramere (Hinshaw und Schmid 1995, Muhlberg *et al.*, 1997) zunächst spiralförmig um die flaschenhalsartige Struktur des abzuschnürenden Vesikels polymerisieren. Die nachfolgende GTP-Hydrolyse von Dynamin ist mit einer Konformationsänderung des Proteins verbunden, welche eine Vergrößerung des Abstandes zwischen den Dynaminringen zur Folge hat.

Dieser Prozess, der mit der Entspannung einer Feder zu vergleichen ist, führt zur Ablösung des Vesikels von der Donormembran. Damit konnten einige experimentelle Befunde in Einklang gebracht werden, die ihrerseits aber keinen Beweis für dieses Modell darstellten. So konnte durch elektronenmikroskopische Untersuchungen einer temperatursensitiven Mutante des Dynamin-Gens gezeigt werden, dass die Endozytose im Stadium vor der eigentlichen Vesikelabschnürung blockiert war. Die Donormembran war tief invaginiert und mit einem elektronendichten Ring um den Vesikelhals versehen (Kosaka und Ikeda, 1983 a, b; Koenig und Ikeda, 1989). Zusätzlich führte die Überexpression eines konstitutiv GTPase-defizienten Dynamins in Säugerzellen zur Inhibierung der Rezeptor-vermittelten Endozytose (Warnock und Schmid, 1996; Urrutia *et al.*, 1997; Liu und Robinson, 1995). In neueren Modellen wird hingegen angenommen, dass Dynamin als molekularer Schalter auf andere Proteine wirkt und nicht als Mechanoenzym den Vesikelhals selbst durchtrennt (Takei *et al.*, 1999). Im Einklang mit diesem Modell steht zumindestens die Tatsache, dass sich Dynamin am Vesikelhals nicht alleine befindet, sondern auch andere Proteine wie z. B. Amphiphysin und Endophilin dort lokalisiert sind.

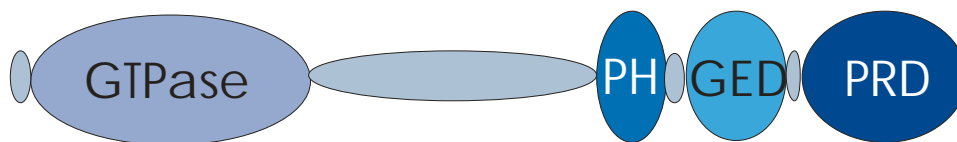


Abb. 11 : Domänenaufbau von Dynamin. Die enzymatische Aktivität der N-terminalen GTPase-Domäne wird durch die weiter C-terminale gelegene GED-Domäne beeinflusst, die PH-Domäne dient der Interaktion mit $\text{Pi}(4,5)\text{P}_2$ und die prolinreiche Domäne (PRD) der Protein-Protein Interaktion.

1. 4. 9 EPS15

Beim Protein EPS15 handelt es sich ebenfalls um ein zytosolisches Adapterprotein, dass in Clathrin-vermittelten, endozytotischen Prozessen involviert ist (Tebar *et al.*, 1996). Das Protein enthält mehrere verschiedene zur Protein-Protein Interaktionen fähige Domänen (Abb. 12). So enthält EPS15 N-terminal drei aufeinander folgende EH-Domänen, die durch eine coiled-coil Domäne im mittleren Bereich des Proteins

mit der C-terminalen Domäne verbunden sind. Der C-terminale AP-2-bindende Bereich enthält mehrere Asp-Pro-Phe-Motive (DPF-Motive) sowie prolinreiche Sequenzen (Salcini *et al.*, 1999).

Mit Hilfe der drei N-terminalen EH-Domänen erfolgt die Bindung des Proteins an Epsin, an eine Spleißvariante von Synaptojanin, sowie an die Proteine Numb und Rab (Mayer, 1999; Haffner *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1998). Die Bildung von Homo- und Heterodimeren mit Intersectin wird durch die zentral im Protein enthaltene coiled-coil Domäne ermöglicht (Salcini *et al.*, 1999; Sengar *et al.*, 1999). Durch die C-terminalen, DPF-Motive wird die Bindung von EPS15 an die „Ohr-ähnliche“ Domäne des AP-2 Komplexes vermittelt (Benmerah *et al.*, 1996; Iannolo *et al.*, 1997). Mit den außerdem in dieser Domäne enthaltenen prolinreichen Sequenzen erfolgt die Bindung an die Tyrosinkinase Crk (Benmerah *et al.*, 1996; Schumacher *et al.*, 1995). Da das Protein an den Außenbereichen der sich bildenden Clathrin-hülle lokalisiert ist (Tebar *et al.*, 1996), könnte seine Funktion darin bestehen den AP-2-Komplex zur Membran zu rekrutieren.

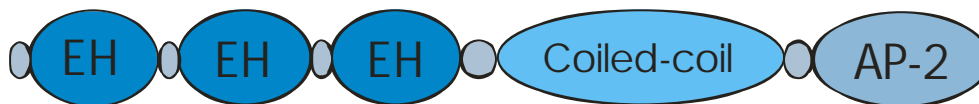


Abb. 12: Domänenstruktur von EPS15. Die N-terminalen EH-Domänen vermitteln die Bindung an Synaptojanin und Epsin. Die zentrale coiled-coil Domäne dient der Homo- und Heterodimerisierung mit Intersectin. Die C-terminalen DPF-Motive binden den AP-2-Komplex.

1. 4. 10 PACSIN1

PACSIN1 ist die hirnspezifische Isoform der PACSIN-Proteinfamilie, der zusätzlich PACSIN2 und 3 angehören. PACSIN 2 besitzt ein ubiquitäres, PACSIN3 ein auf die Gewebe aus Hirn, Herz, Muskel und Lunge beschränktes Expressionsmuster (Plomann *et al.*, 1998; Ritter *et al.*, 1999; Modregger *et al.*, 2000). Bei dem später beschriebenen Protein Syndapin handelt es sich um das zu PACSIN1 homologe Protein aus Ratte (Qualmann *et al.*, 1999). Das zu PACSIN 2 homologe Protein FAP52 aus Huhn besitzt einen homologen modularen Aufbau, und wird wie PACSIN2 ubiquitär exprimiert

(Meriläinen *et al.*, 1997). PACSIN1 wurde erstmalig aus einer subtraktiven cDNA Bank, vor und nach enthorinaler Cortex-Läsion, als ein nach Läsion herunter reguliertes Gen/Protein isoliert. Das zytoplasmatische Adapterprotein ist, wie auch die bisher beschriebenen Proteine, modular aufgebaut (Abb. 13) und enthält in der N-terminalen Hälfte eine zu CDC15p aus *S. pombe* homologe Region mit bisher unbekannter Funktion (Fankhauser *et al.*, 1995). Innerhalb dieser Domäne befindet sich nach Computeranalyse eine potentielle coiled-coil Domäne (Berger *et al.*, 1995; Lupas *et al.*, 1991), welche für eine Oligomerisierung des Proteins verantwortlich sein könnte. Neben diesem Bereich befindet sich C-terminal eine SH3-Domäne, welche ebenfalls zur Protein-Protein Interaktion verwendet wird. Hier konnte bisher eine Bindung an die prolinreichen Sequenzen von Dynamamin, Synaptojanin, Synapsin, dem neuronalen Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein (N-WASP), Huntingtin, mSOS, CD95L/FasL und mehreren Mitgliedern der ADAM Metalloprotease-Familie nachgewiesen werden (Modregger *et al.*, 2000; Qualmann *et al.*, 1999; Modregger *et al.*, 2002; Wasiak *et al.*, 2001; Ghadimi *et al.*, 2002; Cousin *et al.*, 2001; Mori *et al.*, 2003). Da ein großer Teil dieser Proteine sowohl an der Regulierung des Aktin-Zytoskeletts als auch an der Endozytose synaptischer Vesikel partizipieren, wird auch für PACSIN1 eine Beteiligung an diesen Prozessen angenommen (Qualmann *et al.*, 1999; Modregger *et al.*, 2000). Neben den bisher beschriebenen, größeren Protein-Protein-Interaktions Bereichen finden sich zwischen der CDC15 N-terminalen Domäne und der C-terminalen SH3-Domäne drei weitere, kleinere zur Protein-Protein Interaktion fähige Motive. Dabei handelt es sich um ein 14-3-3 Bindungsmotiv, welches im Serin-phosphoryliertem Zustand Proteine der 14-3-3 Familie binden kann (Muslin *et al.*, 1996). Weiter C-terminal befinden sich zwei NPF-Motive, die zur Bindung an EH-Domänen verwendet werden (Salcini *et al.*, 1997). Neben den bisher beschriebenen Domänen besitzt PACSIN1 zusätzlich mehrere potentielle Phosphorylierungsstellen für PKC (Proteinkinase C) und CKII (Caseinkinase II). Deren Verwendung konnte *in vivo* und *in vitro* nachgewiesen werden (Plomann *et al.*, 1998; Ritter 2001), so dass eine Regulation des Adapterproteins über verschiedene Phosphorylierungszustände angenommen werden kann.

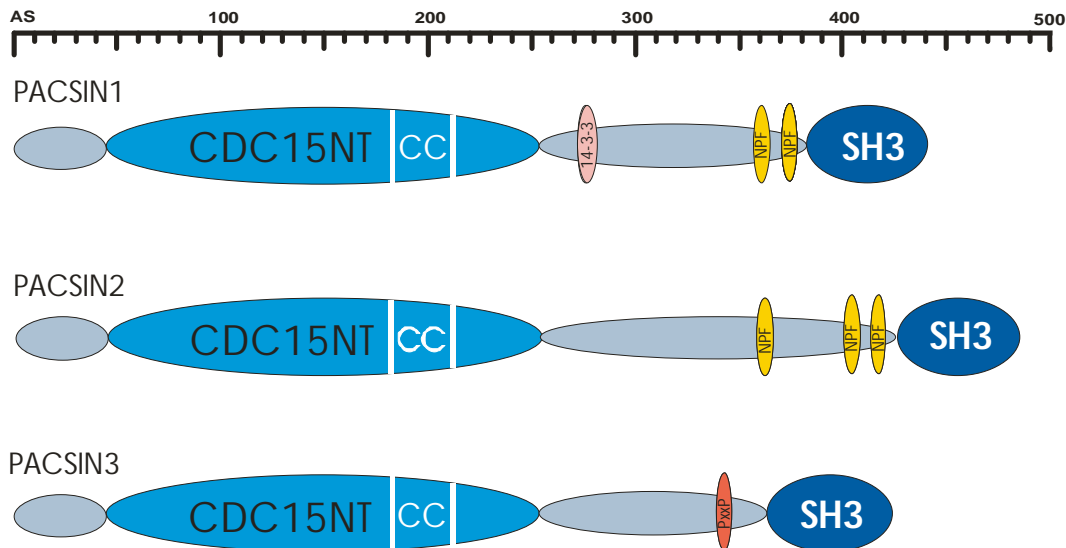


Abb. 13: Domänenstruktur der PACSIN-Proteine. Den Proteinen ist eine N-terminale CDC15-NT-Domäne unbekannter Funktion und eine der Proteinbindung dienende C-terminale SH3-Domäne gemeinsam. Innerhalb der CDC15-NT-Domäne befindet sich ein potentieller coiled-coil Bereich. Die Proteine unterscheiden sich im Linker-Bereich zwischen dem coiled-coil-Bereich und SH3-Domäne durch Bindungsmotive für weitere Proteine. In PACSIN1 finden sich hier ein Bindungsmotiv für Proteine der 14-3-3 Familie, sowie weiter C-terminal die NPF-Motive, die der Bindung an PAST-Proteine dienen. In PACSIN2 finden sich hier nur NPF-Motive, das PxxP-Motiv in PACSIN3 könnte der Bindung von SH3-Domänen dienen.

Neben der oben erwähnten Funktion der PACSINe bei endozytotischen Prozessen ergaben sich aufgrund der Interaktionen von PACSIN2 und PACSIN3 mit den extrazellulär wirkenden Metalloproteasen der ADAM-Familie zusätzlich Hinweise, dass die PACSINe auch an der Exozytose von Vesikeln beteiligt sein könnten, da diese Proteasen mit Hilfe von Transportvesikeln zur Plasmamembran transportiert werden. Die Beteiligung der PACSINe an der Exozytose wird zur Zeit noch diskutiert (Cousin *et al.*, 2001).

Die Rolle der PACSINe bei der Endozytose und ihre Beteiligung an der Aktinpolymerisation sind keine unabhängigen, sondern aufeinander folgende Prozesse (Abb. 14). So wird in aktuellen Modellen der Clathrin-vermittelten Endozytose davon ausgegangen, dass zunächst die Abschnürung der Vesikel von der Donormembran erfolgt, der weitere Transport der Vesikel durch die Zelle kann dann mit Hilfe der Motorproteine der Dynein- und Kinesin-Proteinfamilie Mikrotubuli-abhängig erfolgen (Kreis und Vale, 1999). Da sich das Mikrotubuli-Gerüst jedoch nicht bis zur

Plasmamembran erstreckt, müssen die Vesikel über den Mikrotubuli-freien Raum transportiert werden. Damit die Vesikel diese Strecke nicht durch langsame Diffusion zurücklegen müssen, existieren hier weitere Möglichkeiten des beschleunigten, Transportes. In Bereichen, in denen Aktinfilamente vorhanden sind, kann der Transport der Vesikel Myosin-abhängig erfolgen (Langford, 1995; Allan und Schroer, 1999). Eine Überbrückung der Bereiche, in denen weder Aktinfilamente noch Mikrotubuli vorhanden sind kann durch Bewegung, die durch einseitige Aktinpolymerisierung an den Vesikeln über sogenannte „actin comet tails“ erzeugt wird, erfolgen (Merrifield *et al.*, 1999; Ritter 2001; Rickheit, 2002). Die einseitige Aktinpolymerisierung an den Vesikeln erzeugt hierbei eine rückstoßende Kraft, die zu einer Bewegung des Vesikels führt.

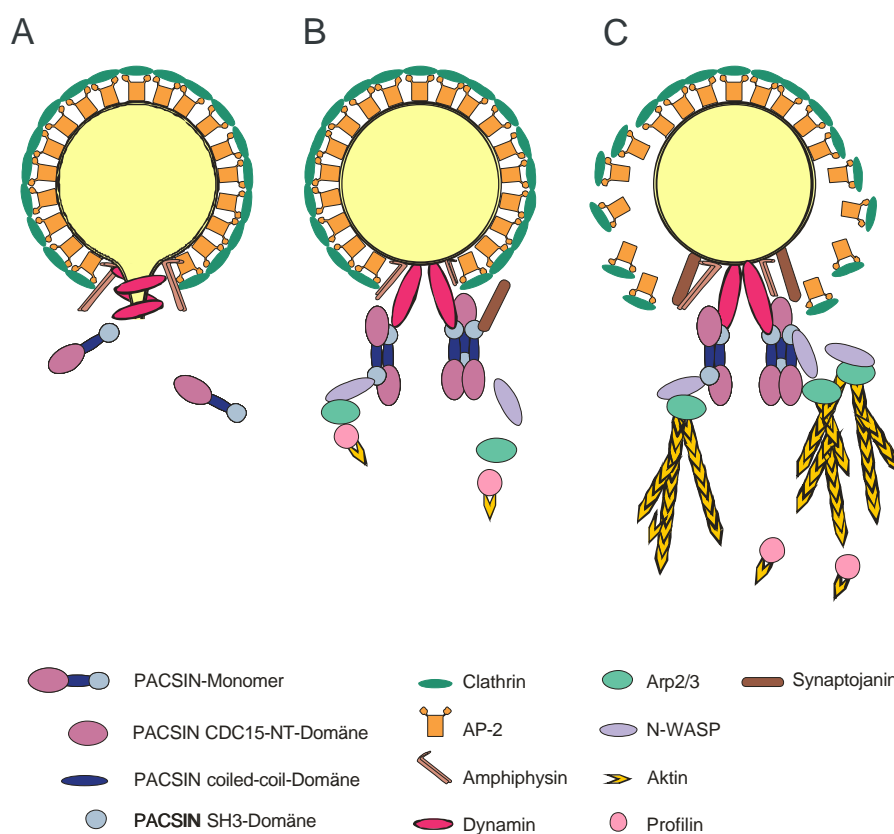


Abb. 14: Bisheriges Modell der Rolle von PACSIN beim Vesikeltransport durch „actin comet tails“. A: Stabilisierung des abzuschneidenden Vesikels durch Adapterproteine (AP-2) und Clathrin. B: Nach Lösen des Vesikels von der Donormembran durch die Entspannung der Dynaminspirale bindet das Adapterprotein PACSIN an Dynamamin und N-WASP. Über den Arp2/3 Komplex wird nachfolgend der Profilin/Aktin Komplex an N-WASP- gebunden. Bei gleichzeitiger Entfernung der Clathrin-Hülle durch Synaptojanin erfolgt die Bildung der Aktin-Polymeren. C: Die einseitige Aktin-Polymerisation (actin comet tails) erzeugt eine rücktreibende Kraft, welche den Vesikel von der Membran entfernt.

1. 4. 11 mPAST1 und mPAST2

Bei diesen Proteinen handelt es sich um zwei, der aus insgesamt vier Homologen bestehenden Familie der murinen PAST-Proteinfamilie (M. Plomann pers. Mitteilung). Neben den bisher beschriebenen murinen Formen EHD1 (Galperin *et al.*, 2002) und Pincher (mPAST2; Shao *et al.*, 2002) sind bisher auch die humanen Isoformen (EHD1-4; Haider *et al.*, 1999; Pohl *et al.*, 2000), sowie die Isoformen aus *c. elegans* (RME1; Grant *et al.*, 2001) und *P. falciparum* (McDaniel *et al.*, 1999) beschrieben worden. Die modular aufgebauten Homologen bestehen aus einer potentiellen N-terminalen GTPase-Domäne, einer potentiellen, zentralen coiled-coil-Domäne und einer C-terminalen NPF-Motiv-bindenden EH-Domäne (Abb. 15). Die Funktionalität der innerhalb der EH-Domäne liegenden EF-Hand konnte noch nicht gezeigt werden. Das Expressionsmuster der verschiedenen EHD-Isoformen variiert je nach Zelltyp, mindestens eine der vier Isoformen wird jedoch in jedem der bisher getesteten Zelltypen exprimiert (Pohl *et al.*, 2000; Grant *et al.*, 2001). Die Funktion der EHD-Proteine ist noch nicht eindeutig geklärt. Im Falle des EHD1 Proteins wurde sowohl von einer Beteiligung an Clathrin-vermittelten Endozytoseprozessen (Grant *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 2001 Rotem-Yehudar *et al.*, 2001), als auch an ARF-6-vermittelten Transportprozessen (Caplan *et al.*, 2002) berichtet. Für das PAST2/EHD4 homologe Protein Pincher (aus PC-12 Zellen; Ratte), welches an der Internalisierung des NGF-Rezeptors TrkA involviert ist, konnte bis heute nur eine Beteiligung an einem Clathrin-unabhängigen Prozess nachgewiesen werden. Zwischen den Proteinen PAST1/PAST2 und dem ebenfalls bei vesikulären Transportprozessen beteiligten PACSIN1 konnte über ein Two-Hybrid-Experiment eine direkte Interaktion ermittelt werden (Modregger, 1997; Ritter 2001).

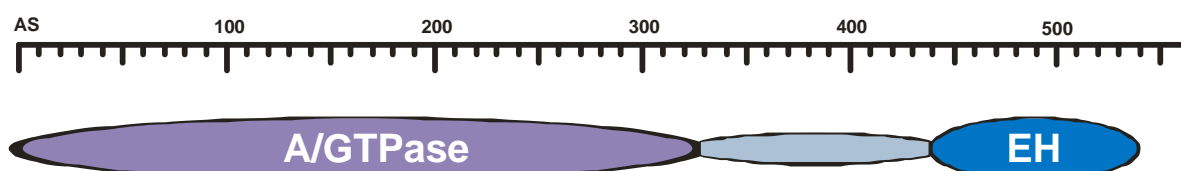


Abb. 15: Domänenstruktur der Proteine Past1 und 2. Aufgrund der geringen Unterschiede zwischen PAST1 (534 AS, 60,6 kDa) und PAST2 (541 AS, 61,5 kDa) ist nur eine Struktur angegeben. Die N-terminale A/GTPase Domäne ist über einen potentiellen coiled coil Bereich mit der C-terminalen EH-Domäne verknüpft.

1. 5 Aufgabenstellung

Zu Beginn dieser Arbeit stand die Funktion des PACSIN1 Proteins noch nicht fest. Die Ermittlung zytosolischer Bindungspartner durch Two-Hybrid-Untersuchungen deutete aber auf eine Involvierung des Proteins als Adapterprotein bei vesikulären Abschnürungsprozessen hin. Zeitgleich wurde das Rattenhomologe Protein Synapin I als Bindungspartner der bei vesikulären Abschnürungsprozessen mitwirkenden Proteine Dynamin und N-WASP charakterisiert.

Zielsetzung dieser Arbeit war die Charakterisierung des Adapterproteins PACSIN1 und seines Bindungspartners PAST2. Dazu sollten beide Proteine eukaryontisch exprimiert und gereinigt werden. Im Falle des PAST2 Proteins sollte zusätzlich ein spezifisches Antiserum hergestellt werden. Von eukaryontisch exprimiertem und gereinigtem PACSIN1 sollte der Oligomerisierungsgrad mit Hilfe verschiedener Techniken bestimmt werden. Dadurch kann die Funktion von PACSIN1 als Adapterprotein und somit die die Anzahl der gebundenen Bindungspartner genauer beschrieben werden. Da aufgrund von Sequenzvergleichen innerhalb des Proteins potentielle Glykosilierungsstellen für N-Acetylglukosamin festgestellt wurden, sollte am eukaryontisch exprimierten Protein überprüft werden, ob diese tatsächlich verwendet werden.

Mit Hilfe eines spezifischen PAST2 Antiserums sollte die Gewebeverteilung des PACSIN1-bindenden Proteins ermittelt werden. Die Interaktion des PAST2 Proteins mit PACSIN1 sowie neuer unbekannter Bindungspartner sollte mit Hilfe verschiedener Methoden mit eukaryontisch rekombinantem Protein weiter manifestiert werden. Da aufgrund von Sequenzvergleichen eine potentielle NTPase Domäne innerhalb der PAST1 und PAST2 Proteine festgestellt wurde, sollte die Nukleotid-Bindung und NTPase Aktivität dieser Proteine überprüft werden.

2 Ergebnisse

2.1 Klonierung, eukaryontische Expression und Aufreinigung von PACSIN1

Von den PACSIN Proteinen wird vermutet, dass sie als Adapter endozytotische und Zytoskelettproteine in einem Komplex binden (Ritter *et al.* 1999, Qualmann *et al.* 1999, Qualmann *et al.* 2000). Da viele der bisher bekannten Interaktionen über die SH3-Domäne erfolgen, können PACSINe diese Funktion nur ausüben, wenn sie in der Lage sind zu oligomerisieren. Diese Fähigkeit konnte bereits für alle drei PACSIN Isoformen nachgewiesen werden (Modregger *et al.* 2000). Die Ermittlung des Oligomerisierungsgrades sowie weitere Charakterisierungen von PACSIN1 sollten mit Hilfe von eukaryontisch exprimierten PACSIN1 durchgeführt werden. Um den Einfluß des zur Aufreinigung verwendeten Tags auf die Experimente möglichst gering zu halten, wurde dazu das aus acht Aminosäuren bestehende Strep-tag II Bindungsmodul verwendet. Zunächst wurde die PACSIN1 kodierende Sequenz in einen eukaryontischen Expressionsvektor kloniert, danach erfolgte die Expression in HEK-293-EBNA-Zellen. Die abschließende Proteinaufreinigung des C- oder N-terminal modifizierten Fusionsproteins wurde aus dem zytosolischen Gesamtproteinextrakt dieser Zellen durchgeführt.

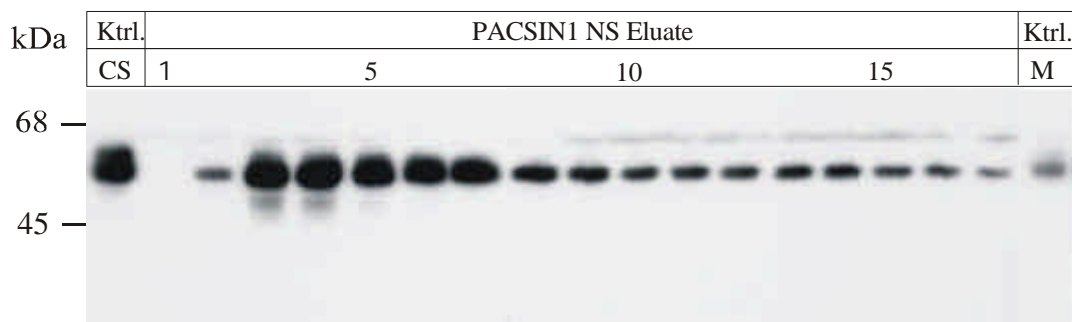
2.1.1 PACSIN1 mit N-terminalem Strep-tag

Die kodierende murine PACSIN1 cDNA lag im Vektor pBluescript vor. Für die Klonierung in den eukaryontischen Expressionsvektor pCEP-4 N-Strep tag II wurde per PCR am 5'-Ende eine Xba I am 3'-Ende eine Not I Schnittstelle angefügt. Das PCR-Produkt wurde in den Vektor pCR II subkloniert, in Bakterien in größeren Mengen hergestellt und die Sequenz überprüft. Abschließend wurde die kodierende PACSIN1 Sequenz unter Verwendung der eingefügten Schnittstellen Xba I und Not I in den mit Nhe I/Not I geschnittenen Vektor pCEP-4 N-Strep-tag II ligiert und der korrekte Einbau wiederum per Sequenzierung verifiziert.

Mit den Expressionsvektoren wurden dann HEK-293-EBNA-Zellen transfiziert und

diese über einen Zeitraum von vier Wochen unter Verwendung eines Hygromycin-haltigen Zellkulturmediums selektioniert. Nach der Selektionsphase wurde die Expression des Proteins im Totallysate der Zellen mit Hilfe eines Western-Blots unter Verwendung spezifischer Antikörper gegen das Protein oder den angefügten Tag nachgewiesen.

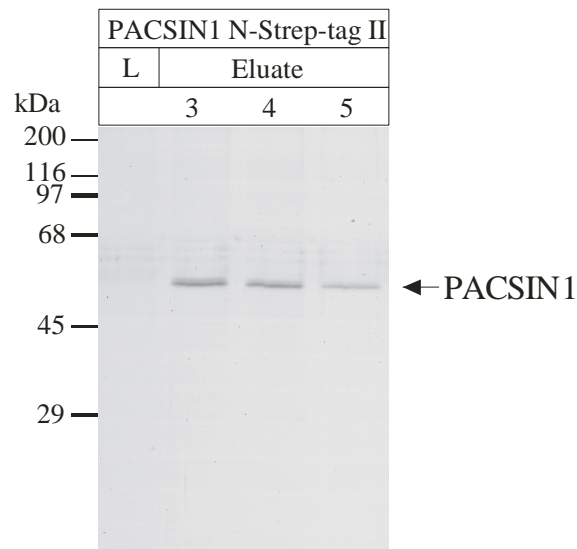
Die Aufreinigung des überexprimierten zytosolischen Proteins erfolgte affinitätschromatographisch aus dem zytosolischen Proteinextrakt der Zellen. Die Verwendung des Strep-tag II Bindungsmoduls ermöglichte eine Einstufenreinigung des Proteins. Dazu wurde der Proteinextrakt über eine mit Strep-Tactin Sepharose gefüllte Säule gepumpt, von der das Fusionsprotein nach intensivem Waschen mit Desthiobiotin eluiert wurde (Abb. 16).



Ktrl. = Kontrollen
 CS = PACSIN1 C-Strep-tag II
 M = Strep-Tactinmatrix nach Elution

Abb. 16: Elutionsprofil von PACSIN1 N-Strep-tag II nach affinitätschromatischer Aufreinigung.

PACSIN1 N-Strep-tag II wurde in EBNA HEK-293 Zellen überexprimiert, die Zellen lysiert und das Proteinlysate mit Strep-Tactin Sepharose inkubiert. Nach intensivem Waschen wurde das Protein mit 2,5 mM Desthiobiotin eluiert (Spuren: 1-17) und die einzelnen Fraktionen im Western-Blot mit einem spezifischen Antiserum analysiert. Im Gegensatz zu PACSIN1 C-Strep-tag II (Spur: CS) wurde das Protein hier als einfache Bande nachgewiesen. Das Protein ließ sich fast vollständig von der Matrix eluieren (Spur: M=Matrix nach Elution des Proteins).



L = Nur Laemmli Probenpuffer

Abb. 17: Reinheitsanalyse der PACSIN1 N-Strep-tag II Eluate.

Nach Elution des Proteins von der Strep-Tactin Sepharose wurden die Fraktionen zur Entfernung des Elutionsmittels Desthiobiotin gegen PBS pH 7,4 dialysiert. Die Reinheit des eluierten Proteins wurde mit Hilfe eines Coomassie-gefärbten SDS-Gels überprüft.

Abschließend erfolgte ein Pufferwechsel gegen PBS pH 7,4 und die Entfernung des Elutionsmittels und gleichzeitige Konzentration der Probe durch die Verwendung von Centricon-10 Ultrakonzentratoren. Mit Hilfe des Bradford-Assays wurde nach abgeschlossener Reinigung die Menge des gereinigten Proteins aus 50 g Zellen zu 100 µg ermittelt.

Die Reinheit des Proteins wurde zusätzlich zur SDS-Gel Analyse (Abb. 17) massenspektrometrisch überprüft und auch hier ließen sich keine weiteren Verunreinigungen nachweisen (Abb. 18).

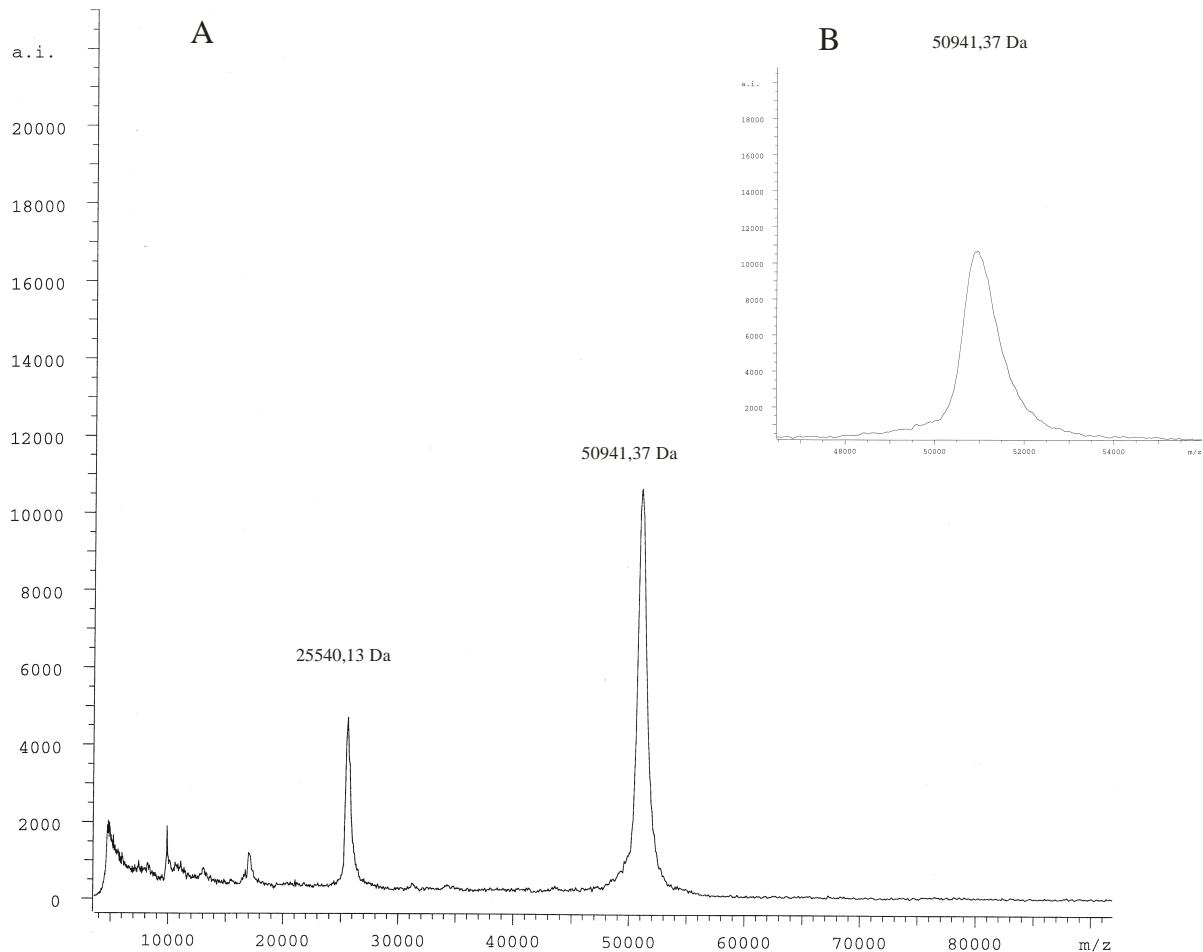


Abb. 18: MALDI-Massenspektrum von gereinigtem PACSIN1 N-Strep-tag II.

Die Reinheit des Proteins wurde per MALDI-TOF massenspektrometrisch überprüft (A: Gesamtspektrum, B: Ausschnitt des Moleküions M^+). Signifikante Verunreinigungen konnten wie bei der SDS-Gel Analyse nicht detektiert werden. Bei dem bei 25540 kDa detektierten Signal handelt es sich um das zweifach geladene Molekülon M^{2+} .

2. 1. 2 PACSIN1 mit C-terminalem Strep-tag

Die Klonierung und Aufreinigung des C-terminal getaggten PACSIN Proteins erfolgte im Wesentlichen analog zur zuvor beschriebenen Aufreinigung von PACSIN1 N-Strep-tag II (siehe Seite 26). Anders als zuvor wurden hier für die Klonierung in den eukaryontischen Expressionsvektor pCEP-Pu C-Strep-tag II per PCR am 5'-Ende eine Hind III Schnittstelle angefügt und die natürliche Kozak-Sequenz optimiert. Am 3'-Ende wurde das in der kodierenden Sequenz vorhandene Stoppcodon zerstört und nachfolgend eine Not I Schnittstelle angefügt. Nach Subklonierung des PCR-Produktes über den Vektor pCR II wurde die kodierende PACSIN1 Sequenz unter Verwendung der eingefügten Schnittstellen Hind III und Not I in den entsprechend aufgeschnittenen Vektor pCEP-Pu C-Strep-tag II ligiert und der korrekte Einbau per Sequenzierung bestätigt.

Die Expression und Aufreinigung erfolgte analog zu dem unter a) beschriebenen Verfahren, der Selektionsdruck erfolgte jedoch im Gegensatz zum dort verwendeten Hygromycin hier durch Puromycin (Abb. 19).

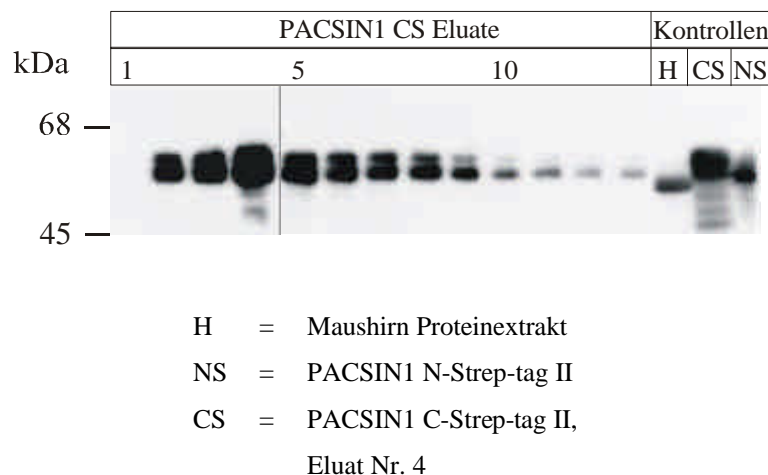


Abb. 19: Elutionsprofil von PACSIN1 C-Strep-tag II nach affinitätschromatischer Aufreinigung.

PACSIN1 C-Strep-tag II wurde in EBNA HEK-293 Zellen überexprimiert, die Zellen lysiert und das Proteinlysate mit Strep-Tactin Sepharose inkubiert. Nach intensivem Waschen wurde das Protein mit 2,5 mM Desthiobiotin eluiert (Spuren: 1-13) und die einzelnen Fraktionen im Western-Blot mit spezifischen Antikörpern analysiert. Im Gegensatz zu PACSIN1 aus Maushirn (Spur: H) oder PACSIN1 N-Strep-tag II (Spur: NS) wurde das Protein hier als doppelte Bande mit einer Gewichtsunterschied von ca. 3 kDa nachgewiesen.

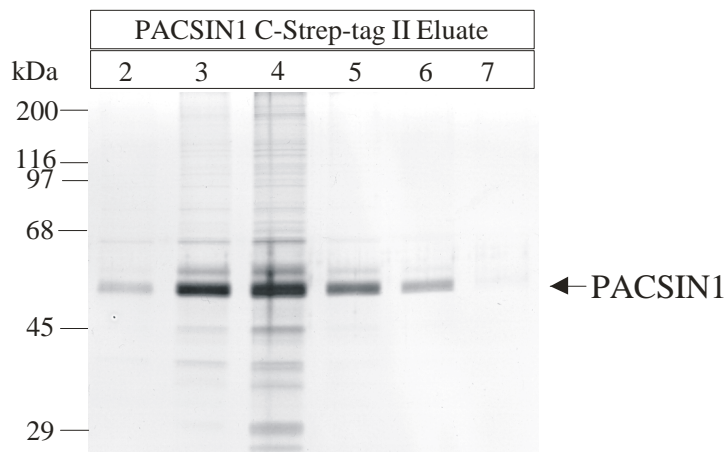


Abb. 20: Reinheitsanalyse der PACSIN1 C-Strep-tag II Eluate.

Die Reinheit des eluierten Proteins wurde mit Hilfe eines Silber gefärbten SDS-Gels überprüft, neben dem gewünschten Protein zeigen sich hier insbesondere in der Hauptfraktion 4 noch Verunreinigungen.

Die in den Eluaten noch vorhandenen, vermutlich Membran-gebundenen Verunreinigungen (Abb. 20) ließen sich durch erneute Ultrazentrifugation der vereinigten Fraktionen vollständig beseitigen (Abb. 21). Abschließend erfolgte ein Pufferwechsel und Entfernung des Elutionsmittels sowie Konzentration der Probe durch die Verwendung von Centricon 10 Ultrakonzentratoren (Abb. 21).

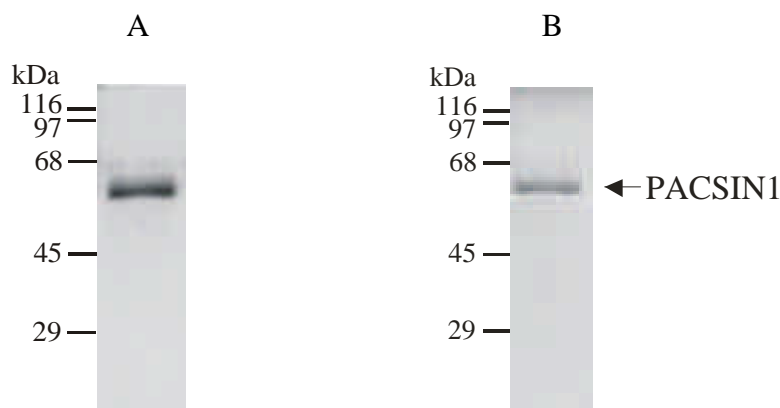


Abb. 21: Reinheitsanalyse der vereinigten PACSIN1 C-Strep-tag II Eluate nach abgeschlossener Reinigung. Nach Elution des Proteins von der Strep-Tactin Sepharose wurden die Fraktionen 2-6 ultrazentrifugiert, das Volumen in Centricon-10 Ultrakonzentratoren reduziert und dabei das Elutionsmittel Desthiobiotin durch wiederholtes Einengen entfernt. Gleichzeitig erfolgte dabei der für spätere Experimente notwendige Pufferwechsel von 100 mM Tris/HCl, pH 8 nach PBS, pH 7,4. Abschließend wurden die eingengten Proben erneut ultrazentrifugiert und mit Hilfe eines Silber- (A) bzw. Coomassie-gefärbten (B) SDS-Gels analysiert. Die nach affinitätschromatischer Aufreinigung noch vorhandenen Verunreinigungen ließen sich so vollständig entfernen.

Mit Hilfe des Bradford-Assays wurde nach abgeschlossener Reinigung die Menge des gereinigten Proteins aus 50 g Zellen zu 400 µg ermittelt.

Die Reinheit des Proteins wurde zusätzlich zur SDS-Gel Analyse massenspektrometrisch überprüft und auch hier ließen sich keine weiteren Verunreinigungen nachweisen (Abb. 22). Zusätzlich war von Interesse, ob sich die im Western-Blot nachgewiesene zweite ca. 3 kDa Bande, ebenfalls mit dieser Analyse Methode nachweisen lässt, jedoch konnte diese nicht detektiert werden.

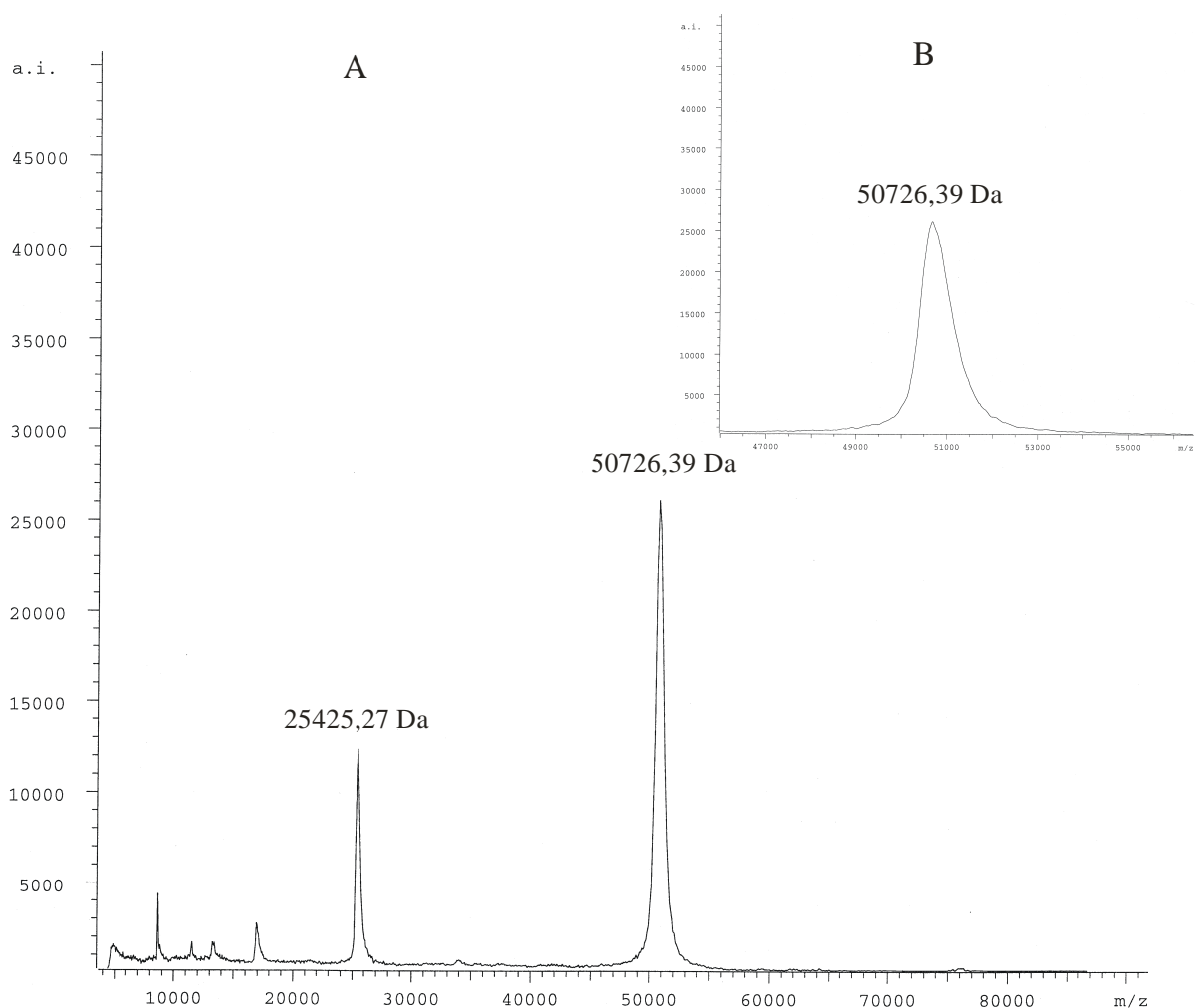


Abb. 22: MALDI-Massenspektrum von gereinigtem PACSIN1 C-Strep-tag II.

Die Reinheit des Proteins wurde massenspektrometrisch überprüft. Bei dem bei 25425 kDa detektierten Signal handelt es sich um das zweifach geladene Molekülion. Im Gegensatz zur Western-Blot und SDS-PAGE Analyse konnte massenspektrometrisch keine zweite ca. 3 kDa schwerere Modifikation des Proteins nachgewiesen werden (Spektrum A). Auch in der Ausschnittsvergrößerung des Hauptpeaks (Spektrum B) konnte kein ca. 3 kDa schwereres Produkt nachgewiesen werden.

Um zu klären, ob die im SDS-Gel auftretende Doppelbande durch unterschiedliche Phosphorylierungen hervorgerufen wird, erfolgte eine Umsetzung des Western-Blots mit aufgetrenntem PACSIN1 C-Strep tag II mit spezifischen Antikörpern gegen phosphorylierte Tyrosine bzw. gegen eine 14-3-3 Bindungsstelle (Abb. 23), die ein phosphoryliertes Serin voraussetzt (Muslin *et al.*, 1996).

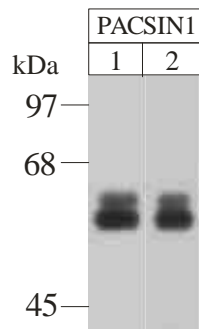


Abb. 23: Überprüfung der Phosphorylierung von PACSIN1.

Gereinigtes PACSIN1 C-Strep tag II wurde nach Western-Blot mit spezifischen Antikörpern gegen phosphorylierte Tyrosine (Spur: 1) und gegen die auf PACSIN1 vorhandene Bindungsstelle für Proteine der 14-3-3 Proteinfamilie (Spur: 2) umgesetzt. Die zwei durch PACSIN1 verursachten Banden sind nicht auf eine unterschiedliche Phosphorylierung dieser Phosphorylierungsstellen zurückzuführen.

Die durch PACSIN1 verursachte Doppelbande wird nicht durch eine unterschiedliche Phosphorylierung der 14-3-3 Bindungsstelle oder eines Tyrosins verursacht (Abb. 23).

2. 2 Größenbestimmung des PACSIN1-Komplexes

2. 2. 1 Quervernetzungen von PACSIN1

Zur Bestimmung des Oligomerisierungsgrades von PACSIN1 wurde eukaryontisch exprimiertes und gereinigtes PACSIN1 C-strep-tag II mit verschiedenen Cross-Linkern quervernetzt. Die hier verwendeten Cross-Linker sollten im Falle einer Selbstinteraktion des Proteins und spezifischer Quervernetzung schon bei geringen Konzentrationen des Cross-Linkers höhere Aggregate des Proteins stabilisieren. Die Quervernetzung erfolgte hier bei allen eingesetzten Cross-Linkern über die freien Amin-Gruppen, der über das Protein regelmäßig verteilten Lysine. Neben der Länge der eingesetzten quervernetzenden Agenzien (10-16 Å) unterschieden sich diese weiter durch ihre Wasserlöslichkeit, so dass einige Experimente in zehnprozentigen DMSO-haltigen Lösungen durchgeführt wurden. Neben der SDS-Gel Analyse zur Ermittlung der Komplexgröße wurden die quervernetzten Proteine auch per MALDI-TOF analysiert.

2. 2. 1. 1 Quervernetzung mit DSS

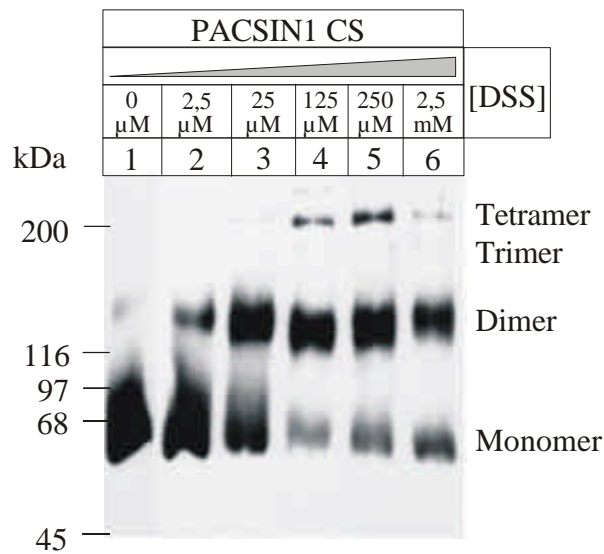


Abb. 24: Nachweis der PACSIN1 C-Strep-tagII Oligomerisierung mittels Quervernetzung mit DSS.

PACSIN1 C-Strep-tag II mit einer Konzentration von 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ wurde mit steigenden Mengen des Crosslinkers DSS inkubiert. Dieser besitzt eine Länge von 11,4 Å und bindet an Lysine. Aufgrund der geringen Wasserlöslichkeit des Cross-Linkers erfolgt die Quervernetzung in Anwesenheit von 10% DMSO. Nach Western-Blot wurde PACSIN1 mit einem spezifischen Antiserum nachgewiesen. Mit von links nach rechts zunehmender DSS-Konzentration wurden vermehrt höhere Komplexe stabilisiert (Spuren: 1-6). Tetrameres PACSIN1 läßt sich ab einer Cross-Linker Konzentration von 25 μM nachweisen. Trimeres PACSIN1 hingegen wird unabhängig von der Cross-Linker-Konzentration kaum detektiert.

Bei der Quervernetzung mit DSS wurden schon bei geringen DSS-Konzentrationen von 2,5 μM dimeres, bei 25 μM tetrameres PACSIN nachgewiesen (Abb. 24). Trimeres PACSIN1 hingegen lässt sich kaum nachweisen. Der massenspektrometrische Nachweis dieser Aggregate gelang nicht.

Massenspektrometrisch ließ sich per MALDI-TOF dimeres PACSIN1 nachweisen, höhere Komplexe wurden nicht ionisiert (Abb. 26).

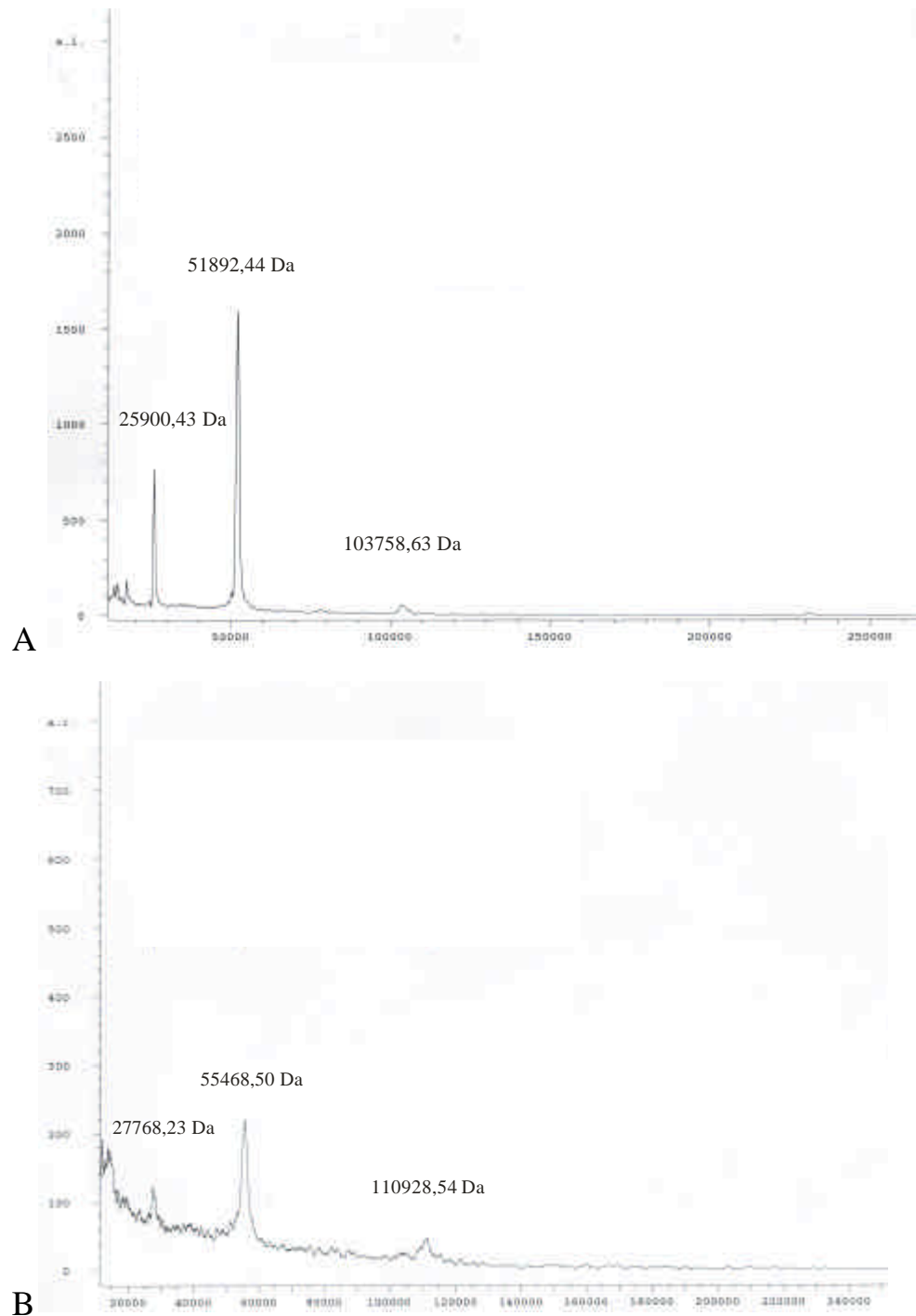


Abb. 26: MALDI-TOF Spektren von Sulfo-EGS quervernetztem PACSIN1.

PACSIN1 C-Strep-tag II mit einer Konzentration von 20 µg/mL wurde mit zwei unterschiedlichen Mengen des Cross-Linkers Sulfo-EGS quervernetzt (A: 25 µM; B: 2,5 mM) und die Massen per MALDI-TOF analysiert. Die unterschiedlichen Massen vergleichbarer Signale in den Spektren A, B sind auf unterschiedliche Mengen des gebundenen Cross-Linkers zurückzuführen. In beiden Proben sind monomere und dimere PACSINe nachweisbar, Trimere und Tetramere hingegen nicht.

2. 2. 1. 3 Quervernetzung mit BS³

Da ein massenspektrometrischer Nachweis des im SDS-Gel nachgewiesenen tetrameren PACSIN1 mit den bisher verwendeten Cross-Linkern nicht gelang, wurde in einem weiteren Experiment ein kürzerer (11,4 Å) wasserlöslicher Cross-Linker verwendet. Zusätzlich wurde die Quervernetzung bei zwei unterschiedlichen Proteinkonzentrationen (A: 50 µg/mL, B: 200 µg/mL) durchgeführt. Die Gesamtmenge des eingesetzten Proteins wurde außerdem auf 50 µg erhöht, um die Wahrscheinlichkeit eines massenspektrometrischen Nachweises zu vergrößern. Zusätzlich wurde mit der quervernetzten Probe (Abb. 27A, 1 mM BS³, Spur: 5) ein Gelfiltrationsexperiment durchgeführt (Abb. 33).

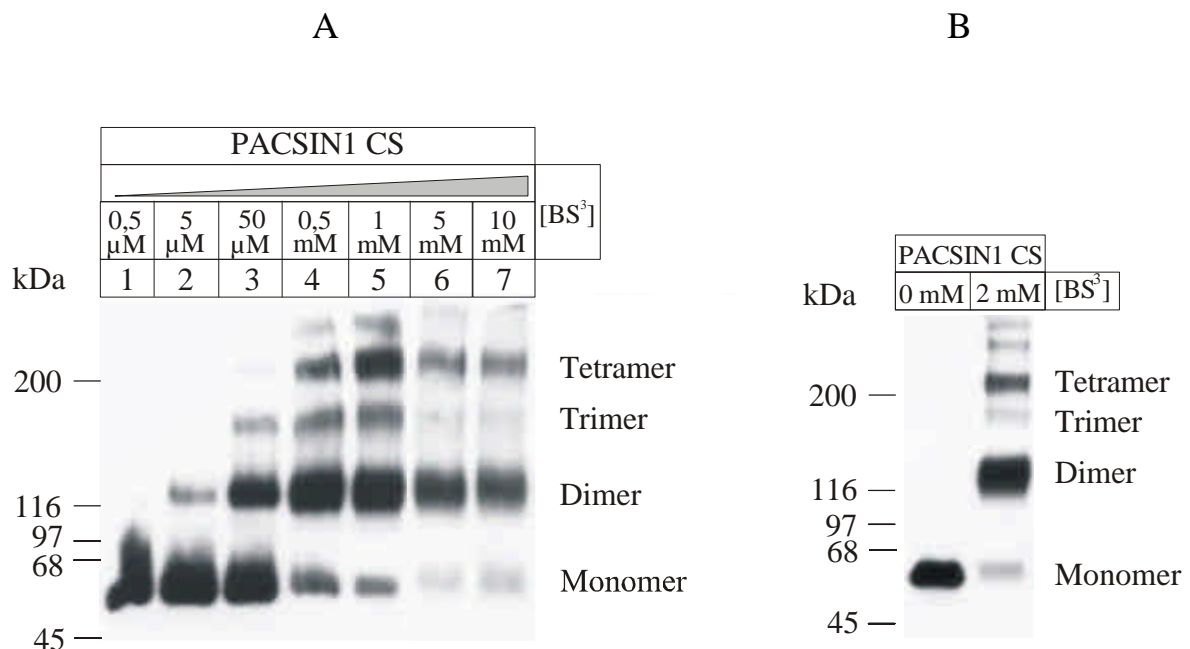


Abb. 27: Nachweis der Oligomerisierung von PACSIN1 mittels Quervernetzung mit BS³.

A: PACSIN1 C-Strep-tag II mit einer Konzentration von 50 µg/mL wurde mit steigenden Mengen des wasserlöslichen Cross-Linkers BS³ inkubiert. Dieser besitzt eine Länge von 11,4 Å und bindet an Lysine. Nach Western-Blot wurde PACSIN1 mit einem spezifischen Antiserum nachgewiesen. Mit von links nach rechts zunehmender BS³-Konzentration wurden vermehrt höhere Komplexe stabilisiert (Spuren: 1-7). Den Ansätzen mit 5 und 10 mM BS³ (Spuren: 6, 7) wurde der Cross-Linker im Gegensatz zu den geringer konzentrierteren Lösungen (Spuren: 1-5) als Festkörper zugesetzt.

B: Im Gegensatz zu A wurde die Quervernetzung hier mit einer höheren Proteinkonzentration von 200 µg/mL durchgeführt. Auch bei dieser Proteinkonzentration sind dimere und tetramere Komplexe deutlich nachzuweisen.

Schon bei geringen Konzentrationen von 50 μM des quervernetzenden Agens ließen sich tetramere Komplexe nachweisen (Abb. 27A, Spur: 4). Auffällig ist hier vor allem die bevorzugte Bildung von tetrameren vor trimeren Komplexen.

Ein massenspektrometrischer Nachweis der quervernetzten höheren Oligomere gelang auch nicht durch die Erhöhung der eingesetzten Proteinmenge. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die quervernetzte Probe (Abb. 27A, 1 mM BS³, Spur: 5) in der Gelfiltration (Abb. 33) das gleiche Laufverhalten besitzt wie eine nicht quervernetzte Probe. Das Molekulargewicht des PACSIN1-Komplexes ergab sich dort zu 240 kDa.

2. 2. 1. 4 Quervernetzung durch Disulfidbrücken nach oxidativer Lagerung

Als zusätzlicher Hinweis für die Oligomerisierung von PACSIN1 wird die Tatsache gewertet, daß das gereinigte Protein dazu neigt nach einigen Wochen nicht reduzierter Lagerung bei -20°C Disulfid-verknüpfte Oligomere zu bilden. Diese lassen sich nach Coomassie Färbung (Abb. 28) bis zum Trimer deutlich nachweisen, im Western-Blot lässt sich zusätzlich eine vierte Bande detektieren (Abb. 56A, Spur: 3).

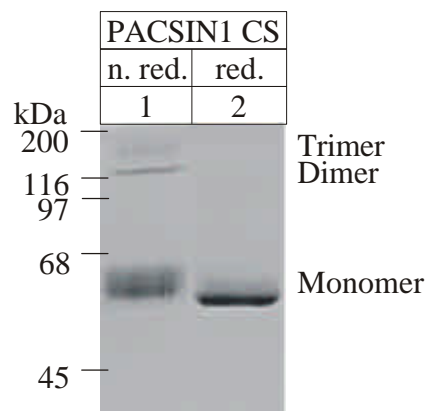
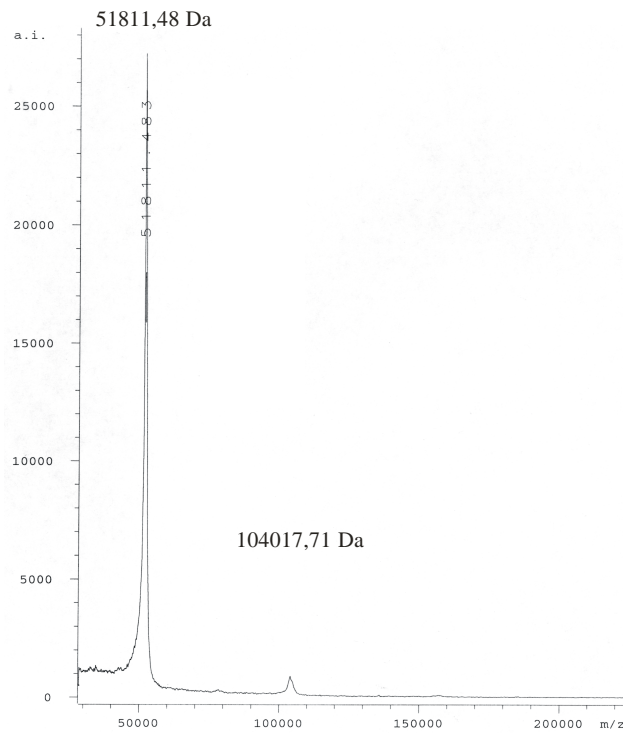


Abb. 28: Quervernetzung von PACSIN1 nach oxidativer Lagerung

Nach mehrmonatiger Lagerung des Proteins bei -20°C und wiederholtem Auftauen und Einfrieren lassen sich Disulfid-verbrückte Oligomere bis zum Trimer nach elektrophoretischer Auftrennung in einem Coomassie gefärbten reduzierten SDS-Gel nachweisen (Spur: 1). Bei reduzierter SDS-Gel Analyse zerfallen diese in das Monomer (Spur: 2).

Massenspektrometrisch ließen sich per MALDI-TOF so Monomere, Dimere und Trimere nachweisen (Abb. 29).

A



B

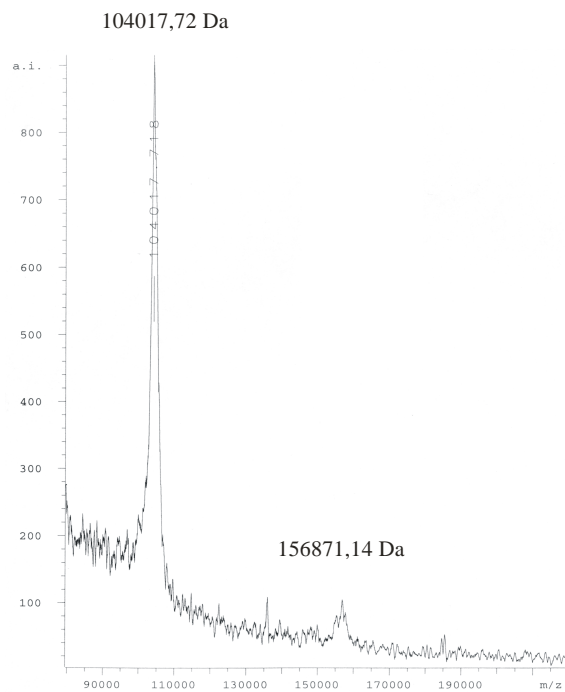


Abb. 29: MALDI-TOF Analyse disulfidverbrückter PACSIN1 Oligomere. PACSIN1 C-Strep-tag II, das nach mehrmonatiger Lagerung bei -20°C Disulfid-verbrückte Oligomere gebildet hatte, wurde massenspektrometrisch analysiert. Es lassen sich Monomere und Dimere (Spektrum A) sowie Trimere (Spektrum B) nachweisen.

2. 2. 2 Größenbestimmung des PACSIN1-Komplexes über Gelfiltration

2. 2. 2. 1 Größenbestimmung des nativen PACSIN1-Komplexes über Gelfiltration

Da es aus früheren Arbeiten Hinweise gab, dass PACSINe die Fähigkeit besitzen Homo- und Heterooligomere zu bilden (Modregger *et al.* 2000), sollte die Oligomerisierung mit Hilfe des eukaryontisch hergestellten und gereinigten PACSIN1 Proteins näher charakterisiert werden.

Die Größenbestimmung des PACSIN1 Komplexes erfolgte unter anderem mit Hilfe eines Gelfiltrationsexperimentes. Eukaryontisch exprimierte und gereinigte PACSIN1 C-Strep-tag II wurde dazu mit Hilfe des Pharmacia Smart Systems auf Supradex 200 analysiert. Der Proteinkomplex eluierte bei einem Volumen von 1,286 mL in einem Kaliumchloridpuffer mit zytosolischer Ionenstärke zwischen den als Größenmarker verwendeten globulären Proteinen Aldolase (158 kDa) und Ferritin (440 kDa) (Abb. 30).

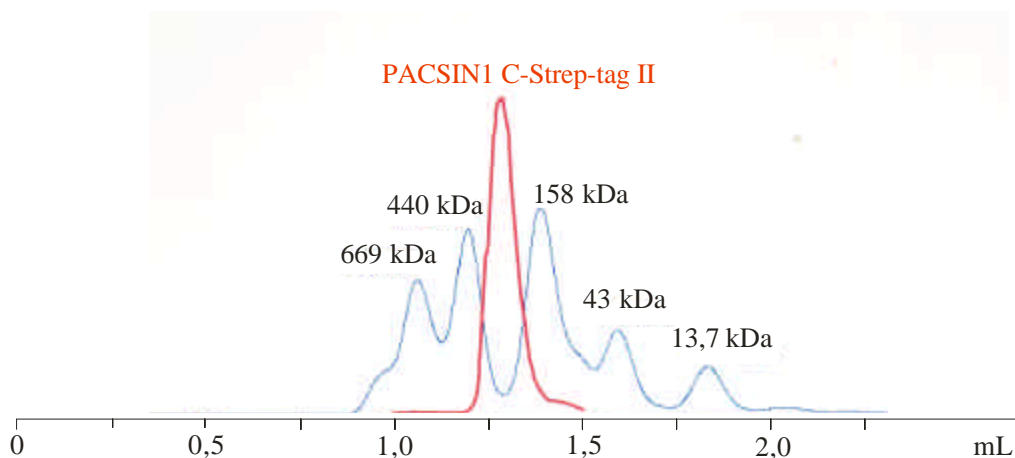


Abb. 30: Größenbestimmung des PACSIN1-Komplexes über Gelfiltration.

Eukaryontisch rekombinant exprimierte PACSIN1 C-Strep-tag II wurde in einem Gelfiltrationsexperiment mit Hilfe des Pharmacia Smart-Systems auf Supradex 200 analysiert. PACSIN1 eluierte bei einem Volumen von 1,286 mL. Die Bestimmung der Elutionsvolumina erfolgt photometrisch bei 280 nm.

Zusätzlich zur photometrischen Elutionsvolumenbestimmung (Abb. 30) wurden die gesammelten Fraktionen mit Hilfe eines Western-Blots und spezifischer PACSIN1 Antikörper analysiert (Abb. 31).

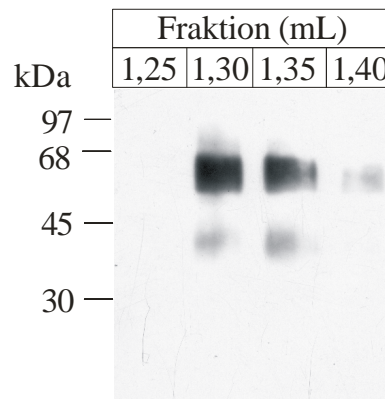


Abb. 31: PACSIN1-Nachweis in den eluierten Fraktionen.

Die nach der Gelfiltration gesammelten Fraktionen wurden per Immunoblot mit einem PACSIN1 spezifischen Antiserum analysiert.

Für die exakte mathematische Kalkulation der Komplexgröße wurden neben den Elutionsvolumina V_e einiger Standardproteine (Tab. 1) das Gesamtvolumen V_t und Ausschlußvolumen V_o der Säule als weitere Parameter benötigt. Die Bestimmung des Ausschlußvolumens V_o erfolgte mit Blue Dextran:

	Mr [kDa]	V_e [mL]
Blue Dextran	2000	1,058

Die Bestimmung des Gesamtvolumens der Säule V_t erfolgte konduktometrisch mit einer 400 mM Kochsalzlösung gegen eine 150 mM Kochsalzlösung:

	Mr [kDa]	V_e [mL]
400 mM NaCl		2,131

Die K_{av} -Werte der als Größenmarker verwendeten Standardproteine wurden mit Hilfe der Parametern V_o , V_t , sowie der Elutionsvolumina V_e der Standardproteine und des PACSIN1-Komplexes mit Hilfe folgender Formel berechnet:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

Proteine	Mr [kDa]	V _e [mL]	K _{av}	lg M _r
Thyreoglobulin	669	1,090	0,02982	5,8250
Ferritin	440	1,228	0,15840	5,6435
Aldolase	158	1,410	0,32800	5,1990
Ovalbumin	43	1,610	0,51440	4,6330
Ribonuclease A	13,7	1,870	0,75670	4,1370
PACSIN1 CS	233,9	1,286	0,2124	5,36

Tab. 1: Bestimmung der K_{av}-Werte der Markerproteine und des zu analysierenden nativen PACSIN1 C-Strep-tag II.

Die Ermittlung des Molekulargewichts des PACSIN1-Komplexes erfolgte nach linearer Regression der K_{av}-Werte der Standardproteine gegen den Logarithmus ihres Molekulargewichtes (Abb. 32). Aus diesen Werten der Standardproteine ergab sich folgende Geradengleichung:

$$Y=A+BX$$

A = 5,88760
B = - 2,4404
R = - 0,99708

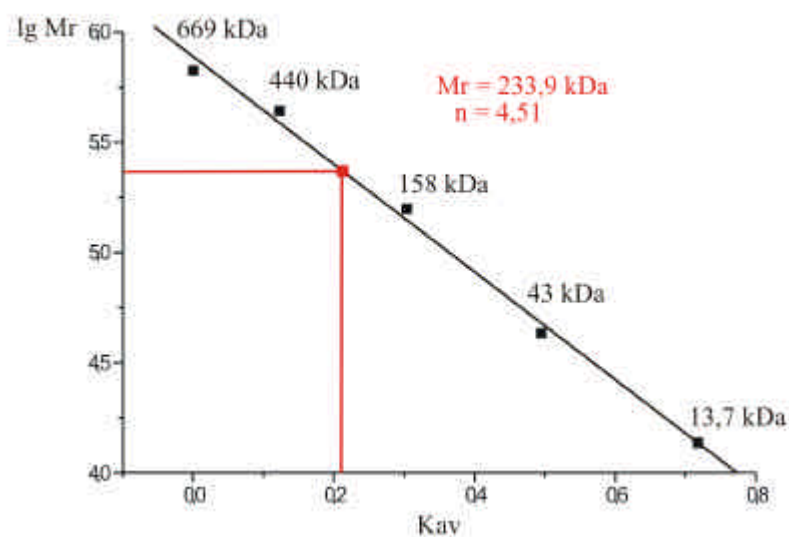


Abb. 32: Kalkulation des Molekulargewichts von nativem PACSIN1 C-Strep-tag II:

Nach linearer Regression und halblogarithmischer Auftragung der K_{av}-Werte wurde die Komplexgröße zu ca. 234 kDa berechnet, der Oligomerisierungsgrad beträgt somit 4,5.

Das Molekulargewicht des nativen PACSIN1-Komplexes berechnet sich zu 233,9 kDa der Oligomerisierungsgrad entsprechend zu 4,5. Aufgrund der später bei elektronenmikroskopischen Aufnahmen des Komplexes festgestellten Hohlräume innerhalb des Komplexes (Abb. 34) und der dadurch resultierenden Vergrößerung des Stokes` s Radius ist von einem tetrameren Komplex auszugehen.

2. 3. 2. 2 Größenbestimmung des BS³-quervernetzten PACSIN1-Komplexes über Gelfiltration

Da die Ermittlung der PACSIN1-Komplexgröße in späteren Experimenten auch mit BS³-quervernetztem PACSIN1 erfolgen sollte (Abb. 27A), wurde in diesem Experiment zunächst sichergestellt, daß quervernetztes PACSIN1 in der Gelfiltration ein mit der nicht quervernetzten Probe vergleichbares Laufverhalten zeigt. Um eine veränderte Trenneigenschaft der Säule nach deren Regeneration auszuschließen, wurde das Laufverhalten der Standardproteine erneut bestimmt. Da sich das Molekulargewicht des nicht quervernetzten PACSIN1 zu 233 kDa ergab wurde hier Katalase mit einem Molekulargewicht von 232 kDa als zusätzlicher Größenmarker verwendet. Die Auswertung der Messdaten erfolgte wie bei der nicht quervernetzten Probe (s.o.).

Proteine	Mr [kDa]	V _e [mL]	K _{av}	lg M _r
Thyreoglobulin	669	1,090	0,02982	5,8250
Ferritin	440	1,228	0,15840	5,6435
Katalase	232	1,367	0,28790	5,3655
Aldolase	158	1,410	0,32800	5,1990
BSA	68	1,523	0,43330	4,8325
Ovalbumin	43	1,610	0,51440	4,6330
Ribonuclease A	13,7	1,870	0,75670	4,1370
PACSIN1 CS (BS³ quervernetzt)	240	1,32	0,2441	5,3807

Tab. 2: Bestimmung der K_{av}-Werte der Markerproteine und des zu analysierenden BS³-quervernetzten PACSIN1 C-Strep-tag II.

Die Ermittlung des Molekulargewichtes des PACSIN1-Komplexes erfolgte nach linearer Regression der K_{av} -Werte der Standardproteine gegen den Logarithmus ihres Molekulargewichtes (Abb. 33). Aus diesen Werten der Standardproteine ergab sich folgende Geradengleichung:

$$Y=A+BX \quad A = 5,9832$$

$$B = - 2,47023$$

$$R = - 0,9911$$

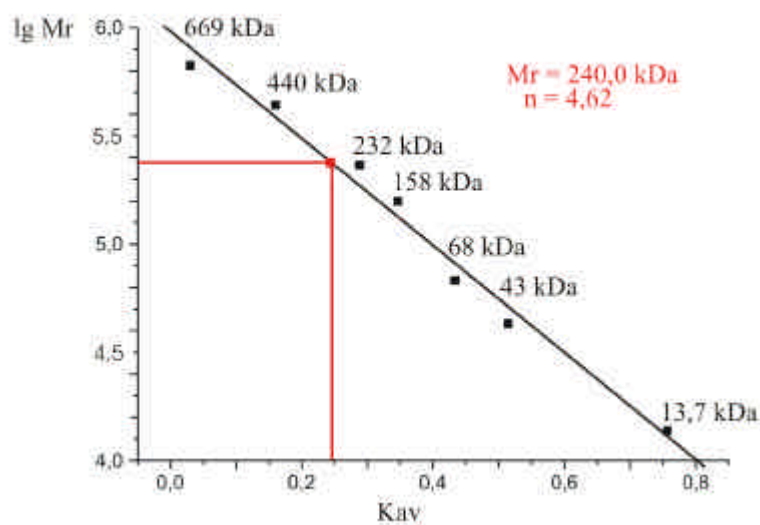


Abb. 33: Kalkulation des Molekulargewichtes des mit BS³-quervernetzten PACSIN1 C-Strep-tag II. Nach linearer Regression und halblogarithmischer Auftragung der K_{av} -Werte wurde die Komplexgröße zu 240 kDa berechnet, der Oligomerisierungsgrad beträgt somit 4,62.

Das Molekulargewicht des BS³-quervernetztem PACSIN1-Komplexes berechnet sich somit zu 240,0 kDa der Oligomerisierungsgrad entsprechend zu 4,6. Das Laufverhalten entspricht somit dem der nicht quervernetzten Probe. Aufgrund der bei den elektronenmikroskopischen Untersuchungen des Komplexes festgestellten Hohlräume innerhalb des Komplexes (Abb. 34) ist auch hier von einem tetrameren Komplex auszugehen.

2. 2. 3 Größenbestimmung des PACSIN1 Komplexes über Elektronenmikroskopie

Zur weiteren Analyse des PACSIN1 Oligomerisierungszustandes wurde gereinigtes PACSIN1 C-Strep-tag II nach Negativkontrastierung im Transmissionselektronenmikroskop untersucht (Experiment von Patric Nitsche, Lundt durchgeführt) Die Aufnahme (Abb. 34A, Ausschnitt aus der Gesamtaufnahme) zeigt im Wesentlichen drei verschiedene sich wiederholende Strukturen unterschiedlicher Größe und Form, denen Monomere, Dimere und Tetramere zugeordnet werden (Abb. 34B-D). Das Erscheinen aller drei Oligomerisierungszustände wird auf die Tatsache zurückgeführt, dass bei der Fixierung der Proben der isoelektrische Punkt von PACSIN1 ($IP_{\text{theo}}=5,19$) unterschritten wurde, was zu einer partiellen Dissoziation des ursprünglichen Komplexes führen konnte. Abbildung 34B zeigt globuläre, leicht gebogene Strukturen, denen der monomere Zustand zugeordnet wird. Abbildung 34C zeigt die parallele oder antiparallele Assoziation zweier monomerer Strukturen, denen der dimere Zustand zugeordnet werden kann. Den Strukturen unter 34D wird der tetramere Zustand zugewiesen. Hier sind im Gegensatz zu 34B und 34C die Proteinkomplexe in verschiedenen Orientierungen zu sehen. Diese Zuordnungen decken sich mit der mathematischen Kalkulation des Molekulargewichts, das sich aus den Volumina der beobachteten Strukturen für globuläre Proteine ergibt (Paulsson *et al.* 1986; Abb. 35).

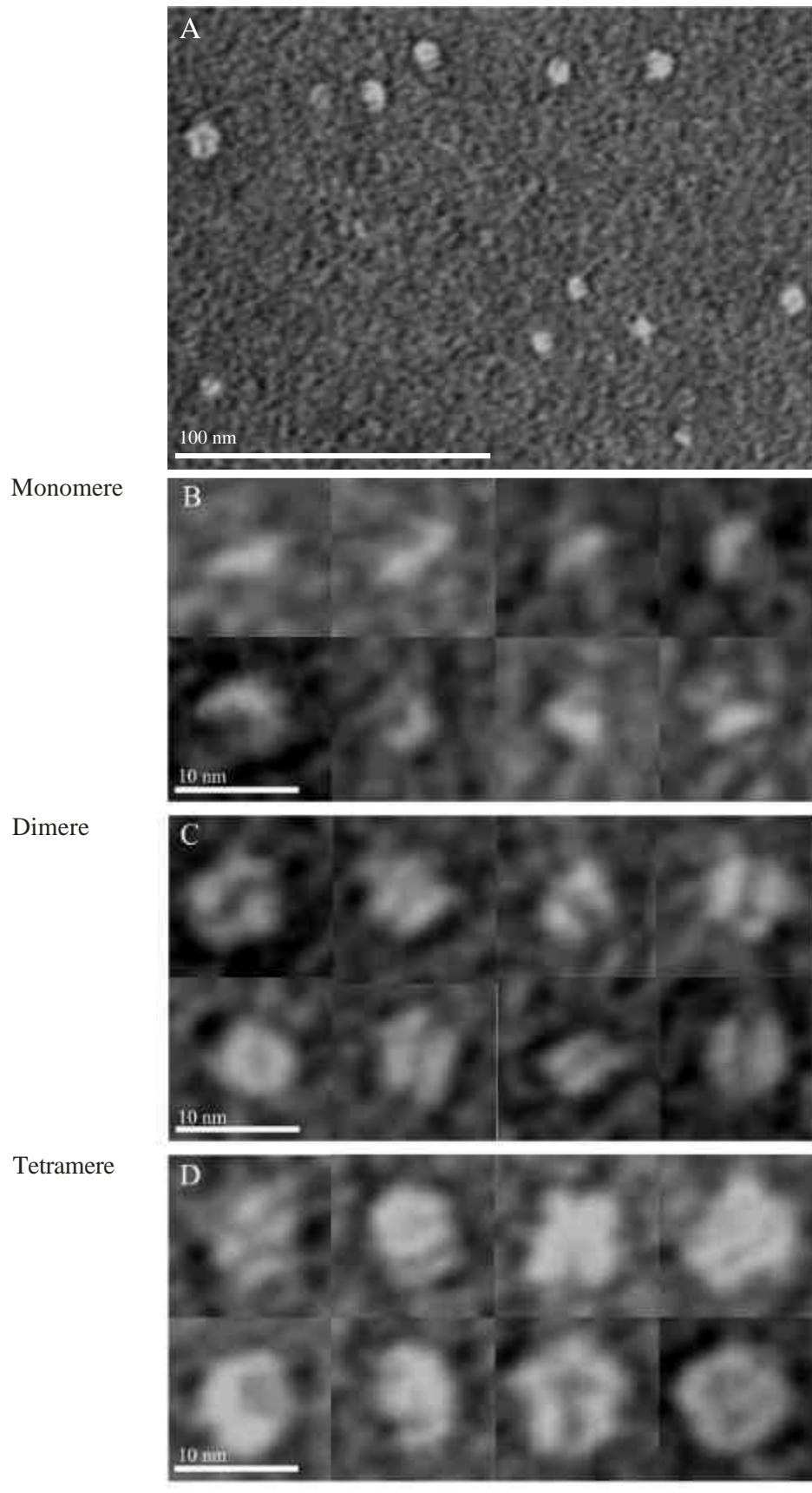
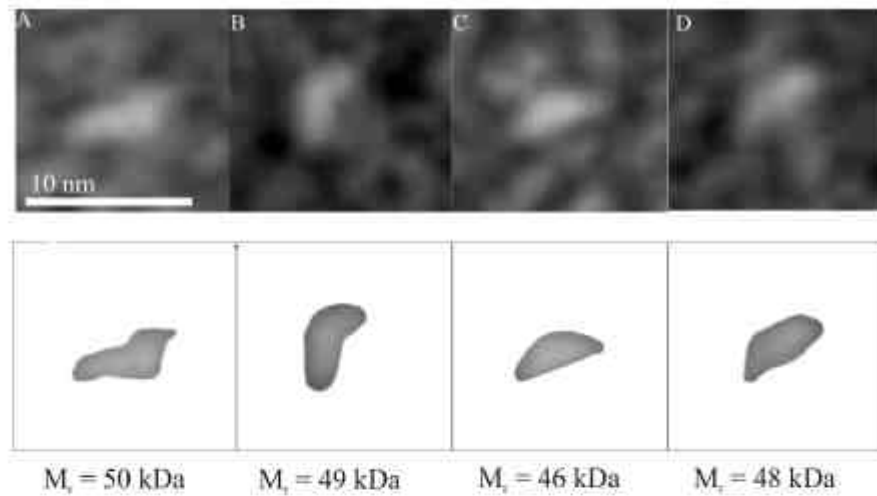


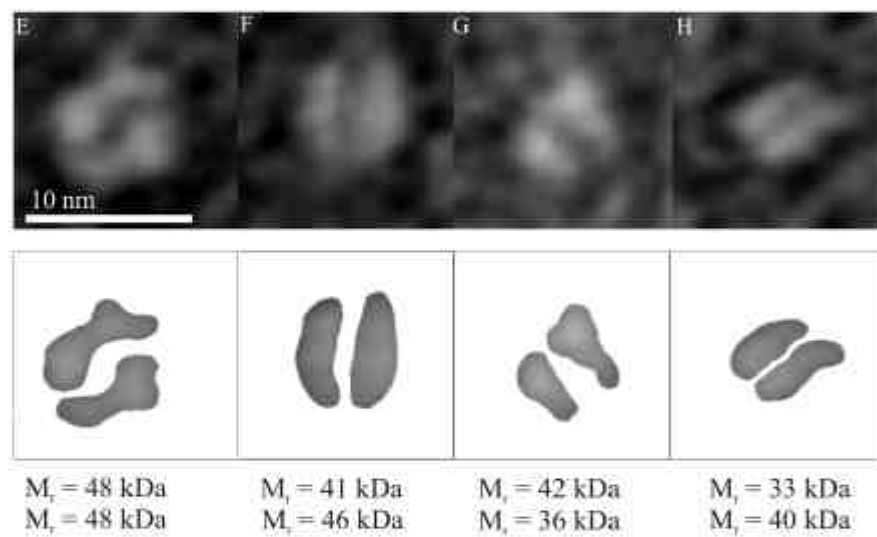
Abb. 34: Elektronenmikroskopische Charakterisierung von eukaryontisch rekombinantem PACSIN1. PACSIN1 C-Strep-tag II wurde nach Negativkontrastierung im Transmissionselektronenmikroskop untersucht. A: Ausschnitt aus der Gesamtaufnahme mit Molekülen unterschiedlichen Oligomerisierungsgrades. B, C, D: Ausgewählte Strukturen denen monomere, dimere und tetramere Komplexe zugeordnet wurden.

An folgenden Strukturen wurde das Molekulargewicht aus den EM-Bildern abgeleitet:

Monomere



Dimere



Tetramere

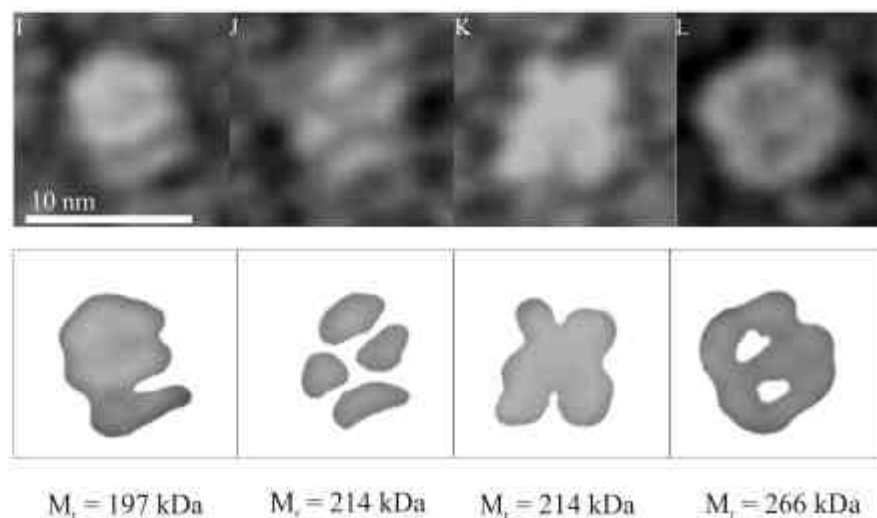


Abb. 35: Ermittlung der Molekulargewichte der PACSIN1 Komplexe aus EM-Bildern

Die Berechnung der Molekulargewichte erfolgte für stäbchenförmige Domänen (A-D, E-H) mit $M_r = 648d^2L$ (d=Durchmesser / nm, L=Länge / nm), für globuläre Domänen (E, I-L) mit $M_r=432d^3$.

2.3 Konformationsbestimmung des PACSIN1-Komplexes über native Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der nativen Gelelektrophorese (Abb. 36) sollte überprüft werden, ob das gereinigte eukaryontisch exprimierte PACSIN1 C-Strep-tag II in mehreren Banden läuft. Die Elektrophorese wurde bei pH 8,0 durchgeführt, da der theoretische isoelektrische Punkt von PACSIN1 bei pH=5,19 liegt.



Abb. 36: Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese von gereinigtem PACSIN1.

Das PACSIN1 C-Strep-tag II Protein zeigt bei pH 8,0 ein gleiches Laufverhalten wie bei der SDS-Gelelektrophorese in Form zweier Banden.

Das Protein zeigt ein zur SDS-Gelelektrophorese identisches Laufverhalten (vgl. Abb. 36, Abb. 19).

2.4 Strukturbestimmung des PACSIN1 Komplexes über CD-Spektroskopie

Vom gereinigten PACSIN1 C-Strep-tag II wurden bei verschiedenen Temperaturen CD-Spektren aufgenommen, um zum einen zu zeigen, daß das Protein eine native Struktur besitzt, die sich durch Hitze zerstören lässt, und zum anderen, um die prozentuale Anteile der Sekundärstruktur zu bestimmen (Abb. 37).

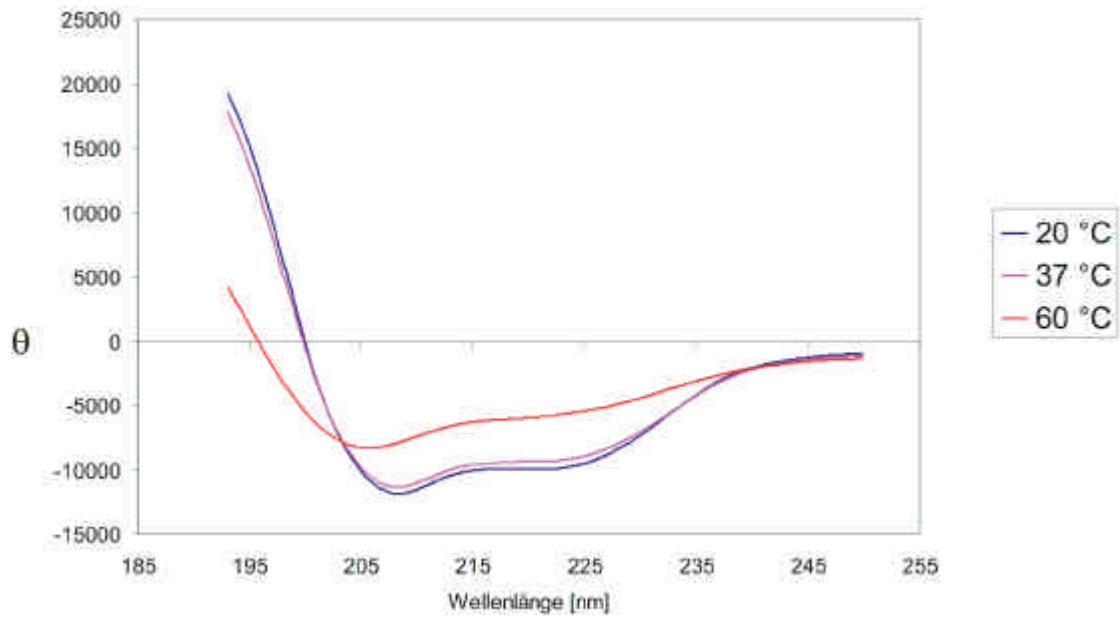


Abb. 37: CD-Spektren von gereinigtem PACSIN1 bei verschiedenen Temperaturen.

Das rekombinante PACSIN1 C-Strep tag II Protein wurde mit einer Konzentration von 100 $\mu\text{g/mL}$ in 5 mM Tris/HCl pH 7,4 vermessen. Deutlich zeigt sich der Verlust der nativen Sekundärstruktur bei 60°C.

Mit Hilfe der Programme CONTINNL, SELCON3 und CDSSTR wurde aus den Messdaten die Berechnung der Sekundärstrukturanteile bei drei verschiedenen Temperaturen durchgeführt. Hier zeigte sich ein hoher Anteil an α -Helix und β -Schleife (Tab. 3).

Vergleichsdatensatz	Temperatur [°C]	α -Helix [%]	β -Faltblatt [%]	β -Schleife [%]	ungeordnet [%]
CONTINNL	20	34,3	14,1	22,5	29,0
SELCON3	20	33,7	14,6	23,0	28,6
CDSSTR	20	37,9	15,3	19,4	26,8
CONTINNL	37	34,3	14,1	22,5	29,0
SELCON3	37	33,7	14,6	23,0	28,6
CDSSTR	37	37,8	15,1	19,4	26,9
CONTINNL	60	18,8	29,4	22,6	29,1
SELCON3	60	17,6	29,7	21,8	28,9
CDSSTR	60	18,3	27,0	22,6	31,6

Tab. 3: Sekundärstrukturanteile von PACSIN1 bei verschiedenen Temperaturen.

Die Ermittlung der Sekundärstrukturanteile erfolgte mit Hilfe der Analyseprogramme CONTINNL, SELCON3 und CDSSTR. Die Sekundärstrukturanteile der bei 20 und 37°C gemessenen Proben von PACSIN1 C-Strep-tag II sind nahezu identisch. Im Gegensatz dazu ist der α -Helixanteil der bei 60°C gemessenen Probe im Mittel um 17% herabgesetzt, gleichzeitig steigt hier der β -Faltblattanteil im Mittel um den gleichen Betrag. Der Anteil ungeordneter Strukturen (60°C) ändert sich, verglichen mit den tieferen Temperaturen, im Mittel nur um 1%.

Die Denaturierung des α -Helixanteils führte nicht zu einer Erhöhung des Anteils ungeordneter Strukturen, sondern zur Vergrößerung des β -Faltblattanteils.

Die genaue Bestimmung der Denaturierungstemperatur erfolgte durch eine temperaturabhängige Messung bei 221 nm und wurde zu 44°C ermittelt (Abb. 38).

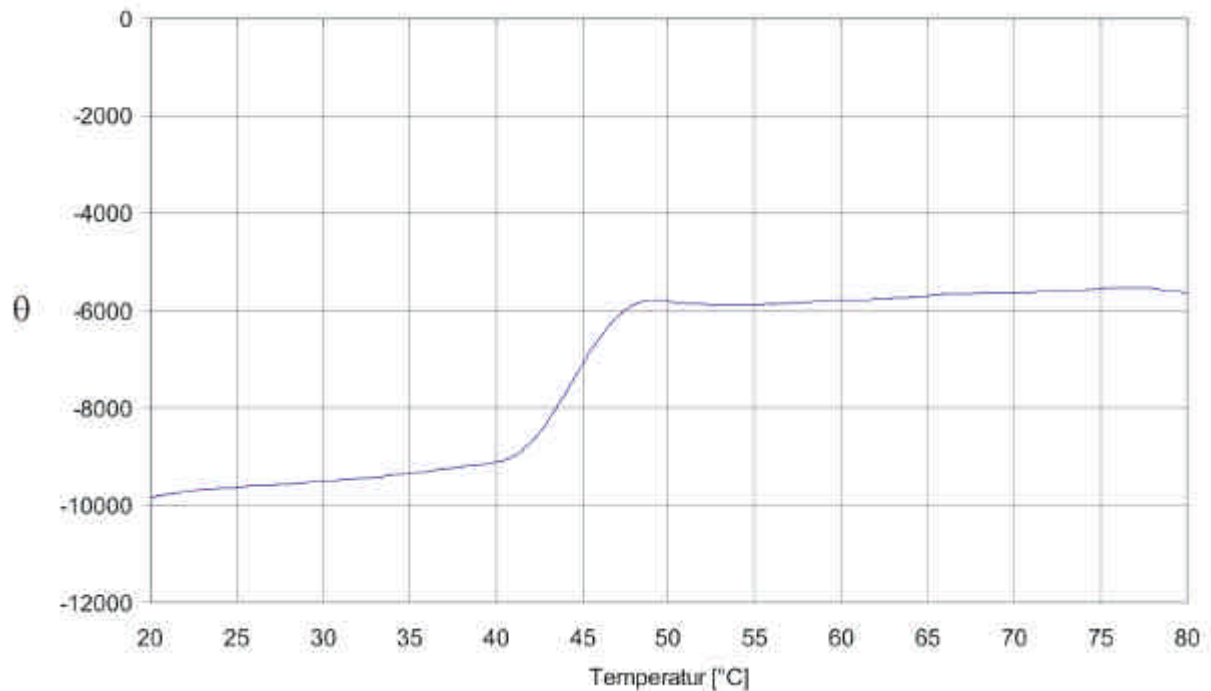


Abb. 38: Bestimmung der Denaturierungstemperatur von PACSIN1. Gereinigtes eukaryontisch rekombinantes PACSIN1 C-Strep-tag II wurde bei 221 nm in Abhängigkeit von der Temperatur photometrisch vermessen und eine Denaturierungstemperatur von 44°C ermittelt.

Eine Renaturierung des Proteins nach Durchlaufen einer entsprechenden Abkühlungskurve gelang nicht (ohne Abbildung).

2.5 Klonierung, prokaryontische Expression und Aufreinigung von GST-PAST2

Zusätzlich zur Untersuchung der PACSIN-Oligomerisierung sollte die Bindung weiterer Proteine an das zytosolische Adapter-Protein PACSIN 1 überprüft werden. Aufgrund der Ergebnisse früherer Two-Hybrid Untersuchungen bei denen unter anderem die Proteine der PAST-Familie als Bindungspartner von PACSIN1 verifiziert wurden, sollte nun die Interaktion von PAST2 mit PACSIN1 durch weitere Experimente untermauert werden. Die Generierung polyklonaler Antikörper gegen PAST2, sowie ein Teil der Interaktionsstudien des Proteins sollten mit bakteriell exprimiertem GST-PAST2 durchgeführt werden, spätere Experimente wurden mit eukaryontisch exprimiertem PAST2 durchgeführt. Für die bakterielle Expression wurde zunächst die im Vektor pBluescript vorliegende kodierende murine PAST2 cDNA unter Verwendung der Schnittstellen für Eco RI, ungerichtet in den bakteriellen Expressionsvektor pGEX-3X kloniert. Abschließend wurde der korrekte Einbau der PAST2-Sequenz per PCR verifiziert. Nach Transformation der Expressionsvektoren in den *E. coli* Stamm BL-21 wurden die Bakterien mit ampicillinhaltigem LB-Medium über Nacht bei 37°C selektioniert und die Proteinexpression durch IPTG für fünf Stunden stimuliert. Die Aufreinigung des GST-Fusionsproteins erfolgte affinitätschromatografisch mit Glutathion-Sepharose aus dem zytosolischen Proteinextrakt der Bakterien. Abschließend wurde das aufgereinigte Protein per SDS-PAGE analysiert (Abb. 39).

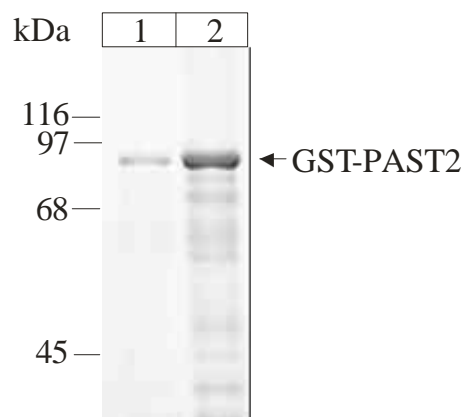


Abb. 39: Reinheitsanalyse von bakteriell exprimiertem GST-PAST2.

Die Reinheit des eluierten Proteins wurde mit Hilfe eines Coomassie-gefärbten SDS-Gels überprüft. Eluat (Spur: 1), Glutathion-Sepharose nach Elution (Spur: 2). Die Elution des gereinigten Proteins erfolgte unvollständig, der größte Teil des Proteins ließ sich nicht mit Glutathion von der Sepharose eluieren (Spur: 2).

Aufgrund des geringen Anteils des eluierbaren Proteins wurde das Gesamtvolumen der Bakterienkultur auf 20 Liter erhöht. Die Gesamtmenge des so aufgereinigten Proteins betrug 600 µg.

Das gereinigte Protein wurde im Folgenden für Kopräzipitations-Experimente und zur Immunisierung eines Kaninchens verwendet. Aufgrund der Titer-Bestimmung des so erhaltenen PAST2-Antiserums, wurden die polyklonalen Antikörper im Western-Blot mit einer Verdünnung von 1/10000 eingesetzt (Abb. 41).

2. 6 Gewebeverteilung von PAST1 und PAST2

Im folgendem wurde die Gewebeverteilung von PAST1 mit Hilfe eines spezifischen Antiserums (freundlicherweise von M. Robinson zur Verfügung gestellt) im Western-Blot ermittelt.

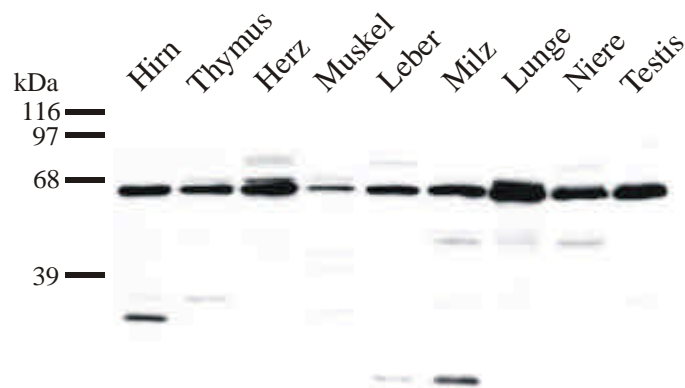


Abb. 40: Gewebeverteilung von PAST1.

Jeweils 50 µg von Proteinextrakten der angegebenen Gewebe wurden per SDS-PAGE aufgetrennt und die Expressionsverteilung von PAST1 mit einem spezifischen Antiserum im Western-Blot überprüft. Das 62 kDa Protein PAST1 zeigte eine ubiquitäre Verteilung.

Das Protein PAST1 konnte, wie bereits von anderen Gruppen gezeigt (Pohl *et al.*, 2000; Haider *et al.*, 1999) in allen getesteten Geweben nachgewiesen werden.

Für die Ermittlung der Gewebeverteilung von PAST2 wurde das gegen GST-PAST2 generierte Antiserum im Western-Blot verwendet (Abb. 41).

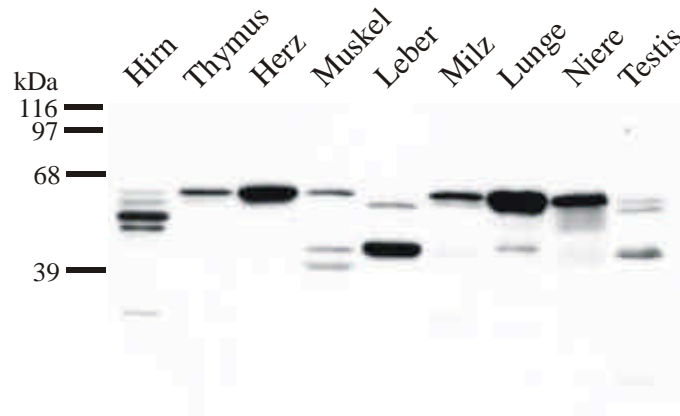


Abb. 41: Gewebeverteilung von PAST2.

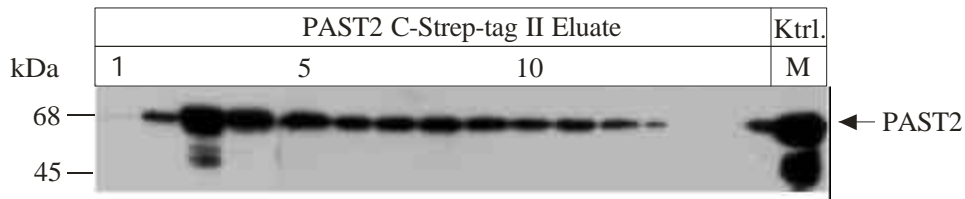
Jeweils 50 µg von Proteinextrakten der angegebenen Gewebe wurden per SDS-PAGE aufgetrennt und die Expressionsverteilung von PAST2 mit einem spezifischen Antiserum überprüft. In fast allen untersuchten Geweben wird bei 62 kDa ein Signal variierender Intensität detektiert. Die Analyse der Proteine aus Hirn, Leber und Testis weicht von den Ergebnissen der anderen untersuchten Gewebe ab. Hier wird ein entsprechendes 62 kDa Signal, trotz des Einsatzes vielfältiger Proteaseinhibitoren, nur sehr schwach (Hirn und Testis) oder gar nicht (Leber) detektiert, stärkere Banden finden sich hier im Bereich von 45-50 kDa.

Die Gewebeverteilung von PAST2 deckte sich im Wesentlichen mit der von PAST1, auch hier handelt es sich um ein ubiquitär exprimiertes Protein. Unterschiede wurden lediglich in den Geweben aus Hirn, Leber und Testis festgestellt. Hier konnten im Gegensatz zu PAST1 leichtere Proteine detektiert werden, die alternative Spleissprodukte darstellen könnten, wie sie für die PAST Proteinfamilie bereits beschrieben wurden (Pohl *et al.* 2000).

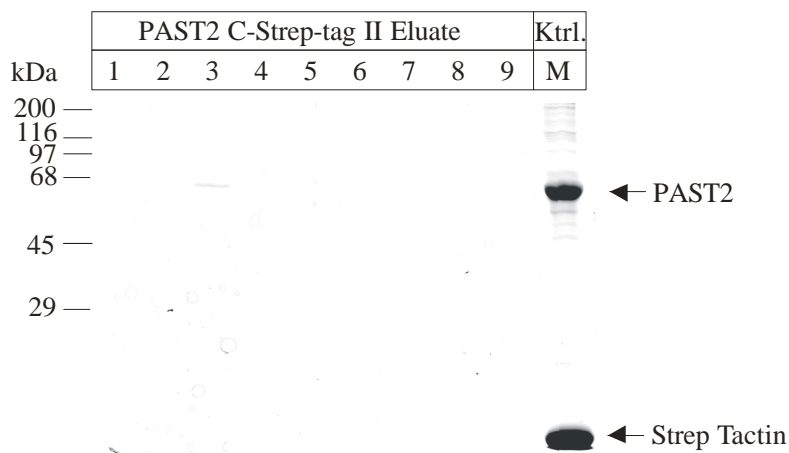
2. 7 Klonierung und Aufreinigung von eukaryontischem PAST2

Die kodierende murine PAST2 cDNA lag im Vektor pBluescript vor. Für die Klonierung in den eukaryontischen Expressionsvektor pCEP-Pu C-Strep tag II wurde per PCR am 5'-Ende eine Bcl I Schnittstelle angefügt und die natürliche Kozak-Sequenz optimiert. Am 3'-Ende wurde durch die Wahl entsprechender Primer das in der kodierenden Sequenz vorhandene Stoppcodon zerstört und nachfolgend eine Not I Schnittstelle angefügt. Nach Subklonierung des PCR-Produkts in den Vektor pCR II wurde die kodierende PAST2 Sequenz unter Verwendung der im pCR II-Vektor vorhandenen Kpn I und eingefügten Not I Schnittstelle in den entsprechend aufgeschnittenen Vektor pCEP-Pu C-Strep-tag II ligiert und der korrekte Einbau per Sequenzierung verifiziert. Wie zuvor beschrieben (siehe Seite 26) wurde auch für die PAST2 Aufreinigung der Expressionsvektor in HEK-293 EBNA Zellen transfiziert und stabile Zellklone über acht Wochen selektioniert. Die Aufreinigung des überexprimierten zytosolischen Proteins erfolgte affinitätschromatographisch aus dem zytosolischen Zelllysate der Zellen. Dazu wurde das Lysat über eine mit Strep-Tactin Sepharose gefüllte Säule gepumpt. Die Herstellung des zytosolischen Proteinextraktes, das Waschen der Säule und die Elution des Proteins mit Desthiobiotin erfolgten aufgrund der geringen Löslichkeit des Proteins unter Verwendung eines Puffers mit 1% Triton X-100. Die Analyse des Elutionsprofils zeigte deutlich, dass das Protein unter diesen Bedingungen an die Säulenmatrix bindet und außerdem eine ausreichende Aufreinigung möglich ist (Abb. 42A). Die Elution des Proteins mit Desthiobiotin erfolgt jedoch sehr unvollständig, so ist nach der Elution der Hauptteil des Proteins noch an der Sepharose gebunden (Abb. 42B).

A



B



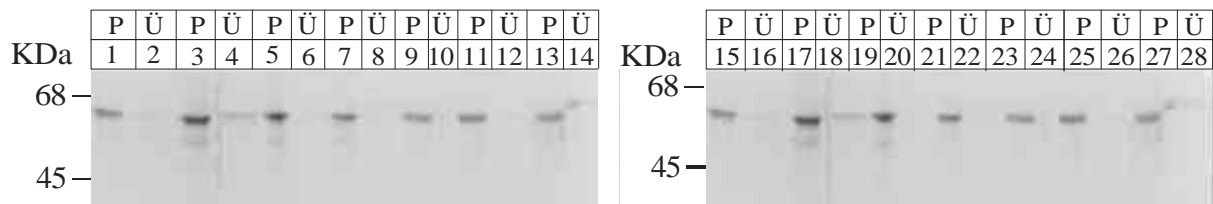
M = Strep-Tactin Sepharose nach Elution

Ktrl. = Kontrolle

Abb. 42: Elutionsprofil von PAST2 C-Strep-tag II nach affinitätschromatografischer Reinigung

PAST2 C-Strep-tag II wurde in EBNA HEK-293 Zellen überexprimiert, die Zellen lysiert und das Proteinlysate mit Strep-Tactin Sepharose inkubiert. Nach intensivem Waschen wurde das Protein mit 2,5 mM Desthiobiotin eluiert (Spuren: 1-15) und die einzelnen Fraktionen im Western-Blot mit einem spezifischen Antiserum nachgewiesen (A) bzw. nach Coomassie-Färbung des Proteingels (B) analysiert. Die Elution des Proteins erfolgte unvollständig, ein großer Anteil des gereinigten Proteins befand sich nach der Elution noch an der Strep-Tactin Matrix (A, Spur: M). Das Coomassie-gefärbte SDS-Gel zeigt deutlich das schlechte Lösungsverhalten des Proteins. Das Protein ließ sich, bis auf einen sehr geringen Anteil, nicht von der Strep-Tactin Sepharose eluieren (B).

Das Protein ließ sich unter Verwendung des Standardelutionspuffers (100mM Tris pH 8,0; 2,5 mM Desthiobiotin) nicht von der Sepharose eluieren. Daher wurden weitere Elutionsversuche mit alternativen Desthiobiotin-haltigen Puffern unternommen. Zu diesen Puffern gehörten solche mit saurem pH-Wert oder hohem Kochsalzgehalt sowie EDTA-, Nukleotid- und Detergenz-haltige Puffer. Zusätzlich wurde in einem weiteren Experiment die Konzentration des Elutionsmittels Desthiobiotin auf 25 mM erhöht (Abb. 43).



Spur:	Elutionsmittel
1, 2	: 100 mM Acetat, pH 4,0
3, 4	: 100 mM Tris/HCl, pH 8,0; 1M NaCl
5, 6	: 100 mM Tris/HCl, pH 8,0; 10 mM EDTA
7, 8	: 100 mM Tris/HCl, pH 8,0; 10 mM Kalzium
9, 10	: PBS pH 7,4; 10 mM GTP; 10 mM MgCl ₂
11, 12	: PBS pH 7,4; 10 mM GDP; 10 mM MgCl ₂
13, 14	: 100 mM Tris/HCl, pH 8,0; 1% CHAPS
15, 16	: PBS pH 7,4; 10 mM ATP; 10 mM
17, 18	: PBS pH 7,4; 10 mM ADP; 10 mM MgCl ₂
19, 20	: PBS pH 7,4; 10 mM GTP ^γ S; 10 mM MgCl ₂ , RT
21, 22	: PBS pH 7,4; 10 mM GTP ^γ S; 10 mM MgCl ₂ , 4°C
23, 24	: 100 mM Tris/HCl, pH 8,0; 1% DOC
25, 26	: 100 mM Tris/HCl, pH 8,0; 1% SDS
27, 28	: 100 mM Tris/HCl, pH 8,0; 25 mM Desthiobiotin

Abb. 43: Optimierung der Elution von PAST2 mit verschiedenen Puffersystemen

Zur Optimierung der Elution wurden verschiedene Desthiobiotin-haltige Puffer verwendet. Nach zweistündiger Inkubation des an Strep-Tactin Sepharose gebundenen PAST2 C-Strep-tag II bei Raumtemperatur (Ausnahme Spuren: 21, 22; 4°C) wurde das Eluat entfernt und die Sepharose ausführlich gewaschen. Das Eluat und die Sepharose wurden anschließend in einem Coomassie gefärbtem SDS-Gel analysiert. Das nachgewiesene Protein in den Überständen der Kochsalz- und GTP^γS-haltigen Puffer (Spuren: 4, 22) wurde auf eine Kontamination des Überstands mit der Sepharose zurückgeführt (ohne Abb.). Lediglich unter Verwendung Detergenz-haltiger Puffer (SDS, Deoxycholat) ließ sich eine geringe Optimierung der Elution erreichen (Spuren: 24, 26).

Eine geringe Verbesserung der Elution ist nur mit den Detergentien SDS und DOC

(Abb. 43, Spuren: 24, 26) möglich.

2. 8 Proteininteraktionen des PAST2 Proteins

2. 8. 1 Affinitätspräzipitation mit eukaryontisch exprimiertem PAST2 nach Inkubation mit einem Maushirnproteinextrakt

Zur Überprüfung der PAST2/PACSIN1 Interaktion wurde zunächst PAST2 C-Strep-tag II in EBNA-HEK-293 Zellen überexprimiert und mit Strep-Tactin Sepharose affinitätschromatographisch gereinigt (Abb. 44, Spur: 1). Als spätere Negativkontrolle diente Strep-Tactin Sepharose, die zuvor mit dem entsprechenden WT-Zellysat inkubiert wurde (Abb. 44, Spur: 2).

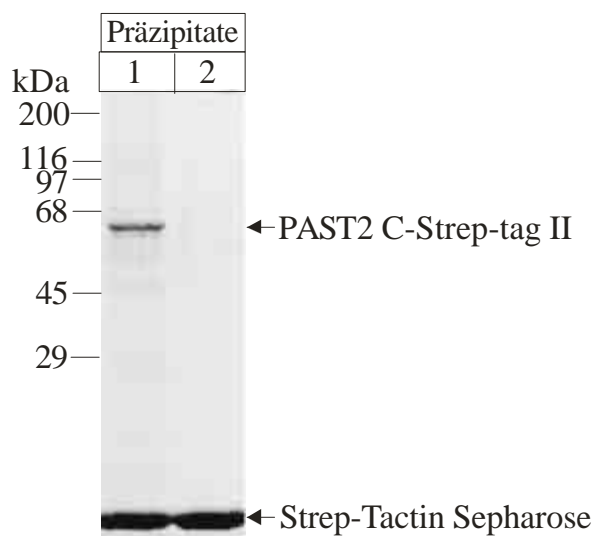
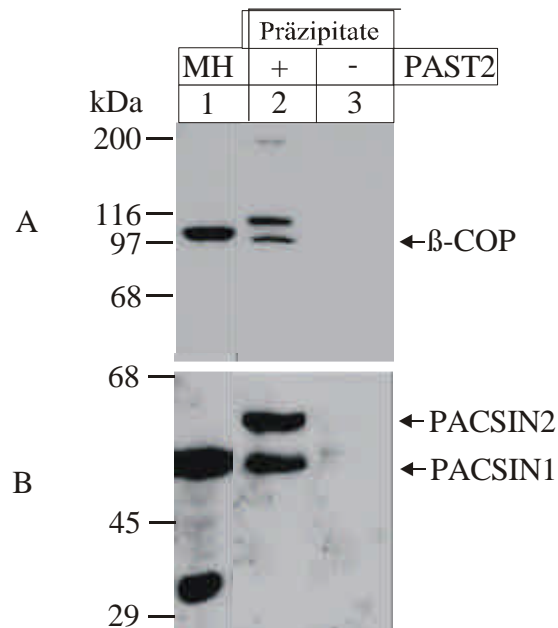


Abb. 44: Expressionskontrolle des Proteins PAST2 C-Strep-tag II.

Für die folgende Kopräzipitation wurden äquivalente Mengen Strep-Tactin Sepharose mit EBNA-HEK-293 Zellysat von PAST2 C-Strep-tag II überexprimierenden (Spur: 1) oder WT-Zellen (Spur: 2) inkubiert und gewaschen. Die Präzipitate wurden per SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung des Gels analysiert.

Da PACSIN1 als hirnspezifisches Protein in diesem Zelltyp normalerweise nicht exprimiert wird, wurden die Präzipitate der Positiv- und Negativkontrolle nachfolgend mit einem Maushirn Proteinextrakt (Abb. 45, Spuren: 2, 3) inkubiert und entsprechend gewaschen. Die Präzipitate wurden mit Hilfe von Western-Blots unter Verwendung spezifischer Antikörper analysiert (Abb. 45).



MH = Maushirn Proteinextrakt

Abb. 45: Kopräzipitation von PACSIN1 mit PAST2.

Der Nachweis der Interaktion zwischen PAST2 und PACSIN1 kann nicht durch direkte Kopräzipitation aus einem EBNA-HEK-293 Zellextrakt erfolgen, da PACSIN1 in diesen Zellen nicht exprimiert wird. Daher wurde eukaryontisch exprimiertes PAST2 C-Strep-tag II aus dem entsprechenden Zellysat präzipitiert und anschließend mit einem Maushirn-Proteinextrakt (MH, Spur: 1) reinkubiert (Spur: 2). Als Negativkontrolle diente Strep-Tactin Sepharose, die zuvor mit dem WT-Proteinextrakt inkubiert wurde (Spur: 3). Der Nachweis der Proteinbindungspartner β -COP (A) und PACSIN1 (B) erfolgte durch verwenden spezifischer Antikörper im Western-Blot.

Die Analyse der Präzipitate zeigte deutlich eine Interaktion von PAST2 mit PACSIN1 und PACSIN2 (Abb. 45B, Spur: 2). PACSIN1 aus dem Maushirn Proteinextrakt band an eukaryontisch exprimiertes PAST2. Weiter wurde in der Positivkontrolle PACSIN2 detektiert, dieses stammte zumindestens zu einem Teil aus dem EBNA-HEK-293 Lysat der überexprimierenden Zellen, da es schon dort als Bindungspartner kopräzipitiert wurde (Abb. 46A, Spur: 3). Die Negativkontrollen (Abb. 45B, Spur: 3) waren in beiden Fällen frei von entsprechenden Signalen. Zusätzlich zu PACSIN1 und PACSIN2 wurde das Protein β -COP im Kopräzipitat nachgewiesen (Abb. 45A, Spur:3).

2. 8. 2 Affinitätskoppräzipitation mit eukaryontisch exprimiertem PAST2 aus HEK-293 Zellen

Die Proteine PACSIN2, β -COP und Clathrin HC wurden als direkte oder indirekte Proteinbindungspartner von eukaryontisch exprimiertem PAST2 C-Strep-tag II durch Koppräzipitation nachgewiesen. Als Positivkontrolle wurde Strep-Tactin Sepharose mit den PAST2 überexprimierenden EBNA-HEK-293 Zellen inkubiert und entsprechend gewaschen (Abb.46A-C, Spur: 3). Als Negativkontrolle diente Strep-Tactin Sepharose, die mit dem entsprechenden WT-Zellysat inkubiert wurde (Abb. 46A-C, Spur: 4).

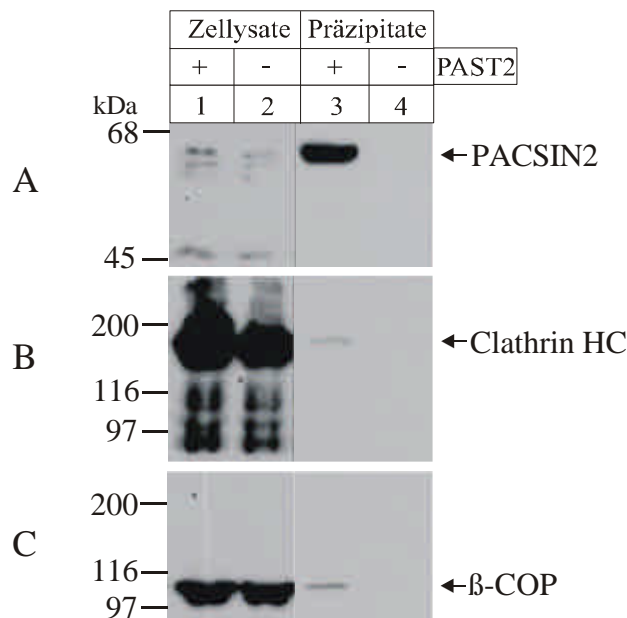


Abb. 46: Ermittlung von PAST2-Proteinbindungspartnern über Affinitätspräzipitation:

Nach Kopplung von PAST2 C-Strep-tag II an Strep-Tactin Sepharose und entsprechender Reinigung wurden die koppräzipitierten Proteine (Spur: 3) mit denen der Negativkontrolle (Spur: 4) durch die Verwendung spezifischer Antikörper im Western-Blot verglichen. Als Proteinbindungspartner ließen sich PACSIN2 (A), Clathrin HC (B) und β -COP (C) nachweisen (Spur: 3).

Im Falle der PAST2/PACSIN2 Interaktion war die Bindung zwischen den Proteinen so stark, dass sich PACSIN2 sogar mit dem PACSIN1 Antiserum nachweisen ließ, welches eine schwache PACSIN2 Kreuzreaktivität besitzt (ohne Abb.). Der PACSIN2 Nachweis erfolgte zusätzlich mit einem spezifischen affinitätsgereinigten PACSIN2

Antiserum (Abb. 46A; Spur: 3), hier zeigte sich eine starke Anreicherung von PACSIN2 im Kopräzipitat verglichen mit den Zellysaten (Abb. 46 A, Spuren: 1, 2). Als weitere Bindungspartner konnten zusätzlich die Proteine Clathrin HC und β -COP ermittelt werden (Abb. 46B, C; Spur: 3). Die Negativkontrollen waren in allen Fällen frei von entsprechenden Signalen.

2. 8. 3 Affinitätspräzipitation mit bakteriell exprimiertem GST-PAST2 nach Inkubation mit einem Maushirn Proteinextrakt

Um die bisher gefundenen Interaktionen mit einem weiteren Experiment zu bestätigen, wurde PAST2 als bakteriell rekombinantes GST-Fusionsprotein exprimiert und mit einem Maushirn Proteinextrakt inkubiert. Für die Negativkontrolle wurde an Glutathion-Sepharose gekoppeltes GST verwendet. Die Verwendung äquivalenter Mengen der Proteine wurde mit folgendem Coomassie gefärbtem SDS-Gel überprüft (Abb. 47).

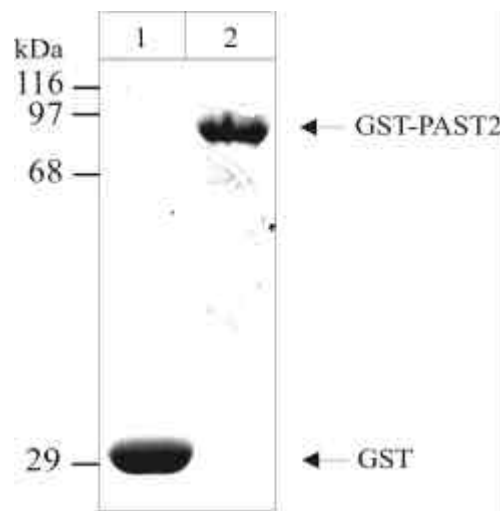
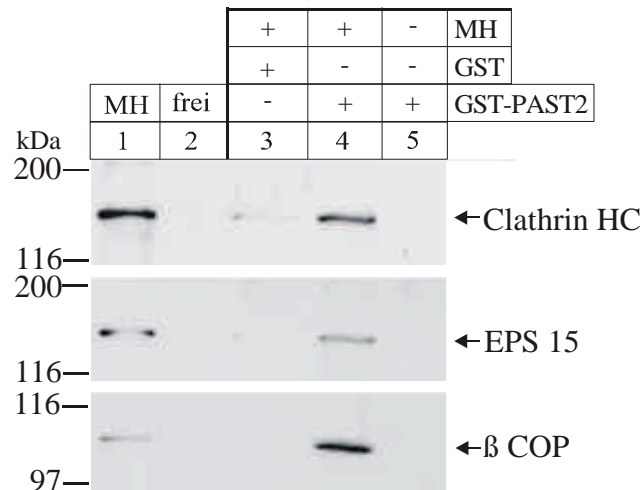


Abb. 47: Expressionskontrolle der Proteine GST und GST-PAST2:

Bakteriell rekombinant exprimiertes GST (Spur: 1) und GST-PAST2 (Spur: 2) wurden per SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung des Gels analysiert.

Die Präzipitation (Abb. 48) erfolgte durch Reinkubation der gereinigten, an Glutathion-Sepharose gebundenen rekombinanten Proteine mit einem Maushirn

Proteinextrakt. Die Interaktionen von PAST2 an β -COP und Clathrin HC wurde im folgendem mit bakteriell exprimiertem GST-PAST2 bestätigt. Zusätzlich konnte das kopräzipitierte Protein EPS 15 als direkter oder indirekter Proteinbindungspartner von PAST2 nachgewiesen werden .



ME = Maushirn-Proteinextrakt

Abb. 48: Ermittlung von PAST2-Proteinbindungspartnern über Affinitätspräzipitation.

Nach Kopplung von GST und GST-PAST2 an Glutathion-Sepharose und entsprechender Reinigung wurden diese mit einem Maushirn-Proteinextrakt (MH; Spur: 1) inkubiert. Das Präzipitat der Negativkontrolle (Spur: 3) und das Präzipitat mit PAST2 (Spur: 4) wurden entsprechend gewaschen und im Western-Blot mit spezifischen Antikörpern gegen die Proteinbindungspartner (Clathrin HC, EPS15 und β -COP) analysiert (Spur: 4). Die Negativkontrolle (Spur: 3) ist frei von entsprechenden Signalen, die Bindungspartner stammen aus dem Maushirn-Proteinextrakt und nicht aus dem Bakterienpräzipitat (Spur: 5).

Mit Hilfe des rekombinanten GST-PAST2 wurden die Proteine EPS 15, β -COP sowie die schwere Kette von Clathrin als Proteinbindungspartner in gemeinsamen Komplexen ermittelt (Abb. 48, Spur: 4). Die entsprechenden Negativkontrollen (Abb.48, Spur: 3) sind frei von Signalen.

2. 8. 4 Kofraktionierung der beiden PAST Proteine und ihrer Bindungspartner

Die PAST Proteine und ihre Bindungspartner sollten zumindest partiell in den gleichen Fraktionen einer diskontinuierlichen Dichtegradientenzentrifugation nachweisbar sein. Aus diesem Grund wurde ein Maushirn Homogenat über eine Saccharose Dichtegradientenzentrifugation auf mehrere Fraktionen verteilt und die Proteine nach Western-Blot mit spezifischen Antikörpern in den einzelnen Fraktionen nachgewiesen (Abb. 49). Die Bindungspartner Clathrin und β -COP wurden gleichzeitig als Markerproteine für hauptsächlich membranassoziierte Proteine und 14-3-3 als Marker für hauptsächlich zytosolisch vorkommende Proteine verwendet.

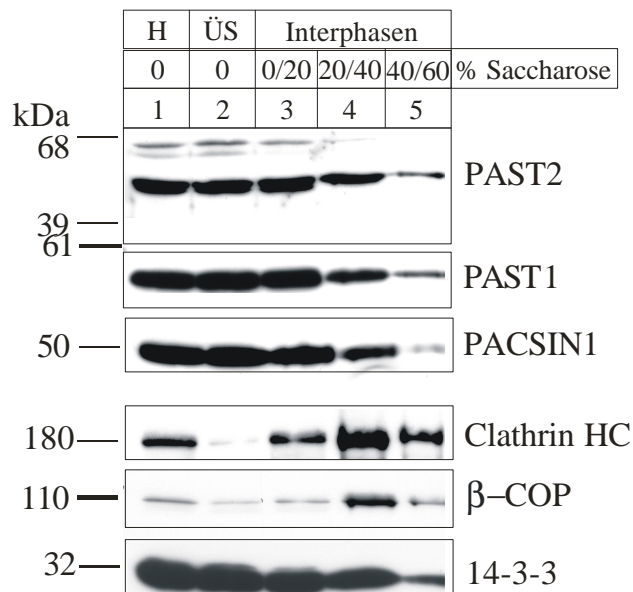


Abb. 49: Kofraktionierung von PAST1 und PAST2 mit Bindungspartnern über eine Saccharose-Dichtezentrifugation.

Saccharoselösungen mit einem Gehalt von 60, 40 und 20% Saccharose wurden mit einem Maushirnhomogenat überschichtet und bei 180.000 x g 2h zentrifugiert. Die Interphasen wurden anschließend in einem SDS-Gel aufgetrennt, geblottet und die Verteilung der Proteine mit verschiedenen Antikörpern analysiert. Maushirn Homogenat vor Zentrifugation (Spur: 1), Überstand nach Zentrifugation (Spur: 2), Interphasen nach Zentrifugation (Spuren: 3-5). Insbesondere in der zytosolischen Fraktion und den Fraktionen mit Vesikeln geringer Dichte zeigt sich eine Kofraktionierung der Proteinbindungspartner mit dem zytosolischen Protein 14-3-3 (Spuren: 2-4). Außerdem lässt sich eine Kofraktionierung mit hauptsächlich membranassoziierten Proteinen wie Clathrin und β -COP (Spur: 4) feststellen.

Es zeigt sich eine Kofraktionierung der PAST Proteine mit PACSIN1 vor allem in der zytosolischen Fraktion, sowie der Fraktion mit Vesikeln geringer Dichte (Abb. 49, Spuren: 2 und 3), wohingegen nur ein kleiner PAST-Anteil mit der Fraktion umhüllter Vesikel (Abb. 49, Spur: 4) kofraktioniert.

2.9 Nukleotid-Bindung und G/ATPase-Aktivität der PAST Proteine

2.9.1 Nukleotid-Bindung von PAST1

Da in den Proteinen PAST1 und PAST2 durch Sequenzvergleich konservierte Nukleotidbindungsstellen sowie entsprechende Switch-Regionen ermittelt wurden (Tab. 4), war es von Interesse die Nukleotidbindungsfähigkeit der Proteine zu überprüfen.

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 VLLV G qy stGKT 72 82	Dfpgmrigpep T 93	149 ISIIDtp Gi 157	215 r VVLNKaD 222
PAST2	64 ILLV G qy stGKT 75 85	Dfpgmrigpep T 96	152 ISIIDtp Gi 160	218 r VVLNKaD 225

Tab. 4: 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 (nach M. Plomann).

Die Nukleotid-Bindung des Proteins HA-PAST1 sollte durch Bindung des Proteins an GTP-Agarose und späterer Elution nachgewiesen werden. Das analoge Experiment konnte mit HA-PAST2 nicht durchgeführt werden, da PAST2 unspezifisch an Agarose bindet und sich somit später auch nicht mit Nukleotiden eluieren ließ. GTP-Agarose wurde mit dem zytosolischen Zellextrakt von HA-PAST1 transient überexprimierenden NIH-3T3 Fibroblasten inkubiert und gewaschen. Die Bindung des

Proteins an die GTP-Agarose wurde anschließend im Western-Blot überprüft (Abb. 50).

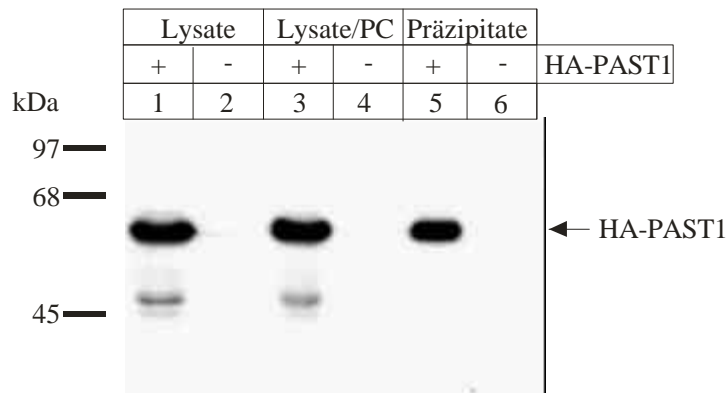


Abb. 50: Nachweis der Bindung von HA-PAST1 an GTP-Agarose

HA-PAST1 wurde in NIH 3T3 Fibroblasten überexprimiert und die Lysate dieser Zellen (+ HA-PAST1) sowie Lysate nicht transfizierter Kontrollzellen (- HA-PAST1) mit GTP-Agarose inkubiert. Die Präzipitate sowie die Ausgangslysate wurden per SDS-PAGE und Western-Blot analysiert und PAST1 mit einem anti HA-Antikörper nachgewiesen. Zur Negativkontrolle wurde das entsprechende Wildtyplysate mit GTP-Agarose inkubiert. Lysate der transfizierten und Wildtypzellen (Spuren: 1, 2). Lysate nach Preclearing über Agarose (Spuren: 3, 4). GTP-Präzipitate aus transfizierten und Wildtypzellen (Spuren: 5, 6).

Das an GTP-Agarose gebundene HA-PAST1 wurde im Weiteren mit verschiedenen Nukleotid- oder EDTA-haltigen Lösungen als Elutionsmittel inkubiert und die GTP-Agarose abschließend im Western-Blot mit spezifischen anti HA-Antikörpern untersucht (Abb. 51).

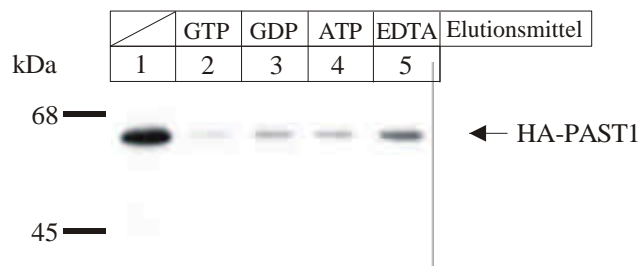


Abb. 51: Spezifität der PAST1 GTP-Bindung. An GTP-Agarose gebundenes HA-PAST1 wurde mit verschiedenen Nukleotiden (50 mM) eluiert (Spuren: 2-4). Das nach Elution an der Agarose verbliebene Protein wurde durch Kochen mit Lämmli-Probenpuffer von der Agarose gelöst und im Western-Blot mit anti HA-Antikörpern nachgewiesen. Verglichen mit der Negativkontrolle (Spur: 1, kein Elutionsmittel) wird der stärkste Elutionseffekt durch GTP verursacht. Das Protein läßt sich zusätzlich auch durch die Verwendung von GDP oder ATP-haltigen Lösungen eluieren. Die Verwendung einer 5 mM EDTA Lösung (Spur: 5) führte, jedoch in deutlich geringem Maße, ebenfalls zur Elution des Proteins.

Sowohl GTP als auch GDP und ATP waren in der Lage an GTP-Agarose gebundenes PAST1 zu eluieren, was darauf schließen lässt, dass PAST Proteine zumindest *in vitro* sowohl GTP als auch ATP als Substrate nutzen können.

2. 9. 2 GTP/ATPase Aktivität von PAST2

Da die Proteine der PAST-Familie nach Sequenzvergleich konservierte GTPase Domänen besitzen (Tab. 4), und am Beispiel von PAST1 die ATP/GTP-Bindung gezeigt werden konnte (Abb. 50), wurde eine mögliche GTP/ATPase Aktivität von eukaryontisch exprimiertem und gereinigtem PAST2 C-Strep tag II untersucht. Da sich das Protein jedoch nach der Aufreinigung nicht mehr von der Sepharose eluieren ließ, wurde es für die folgenden Experimente an dieser belassen. Als Negativkontrolle wurde Strep-Tactin Sepharose benutzt, die stattdessen mit dem WT-Zellysat inkubiert wurde. Die Reinigung der PAST2-Sepharose und der Sepharose der Negativkontrolle erfolgte parallel und identisch. Im eigentlichen GTP/ATPase Experiment wurden diese Sepharosen mit α -³²P markiertem ATP oder GTP inkubiert und zusätzlich verschiedene potentielle Effektoren den Reaktionsansätzen zugefügt. Die Hydrolyseprodukte der radioaktiven Nukleotide wurden abschließend mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt und deren Retentionsfaktoren bestimmt (Abb. 53, 54; Kamimoto, *et al.*, 1998).

Zunächst wurden die Retentionsfaktoren verschiedener nicht radioaktiver Nucleotide bestimmt, um anhand dieser die entsprechenden Nucleotide zuordnen zu können. Deren Position wurde durch UV-Fluoreszenz ermittelt (Abb.52).

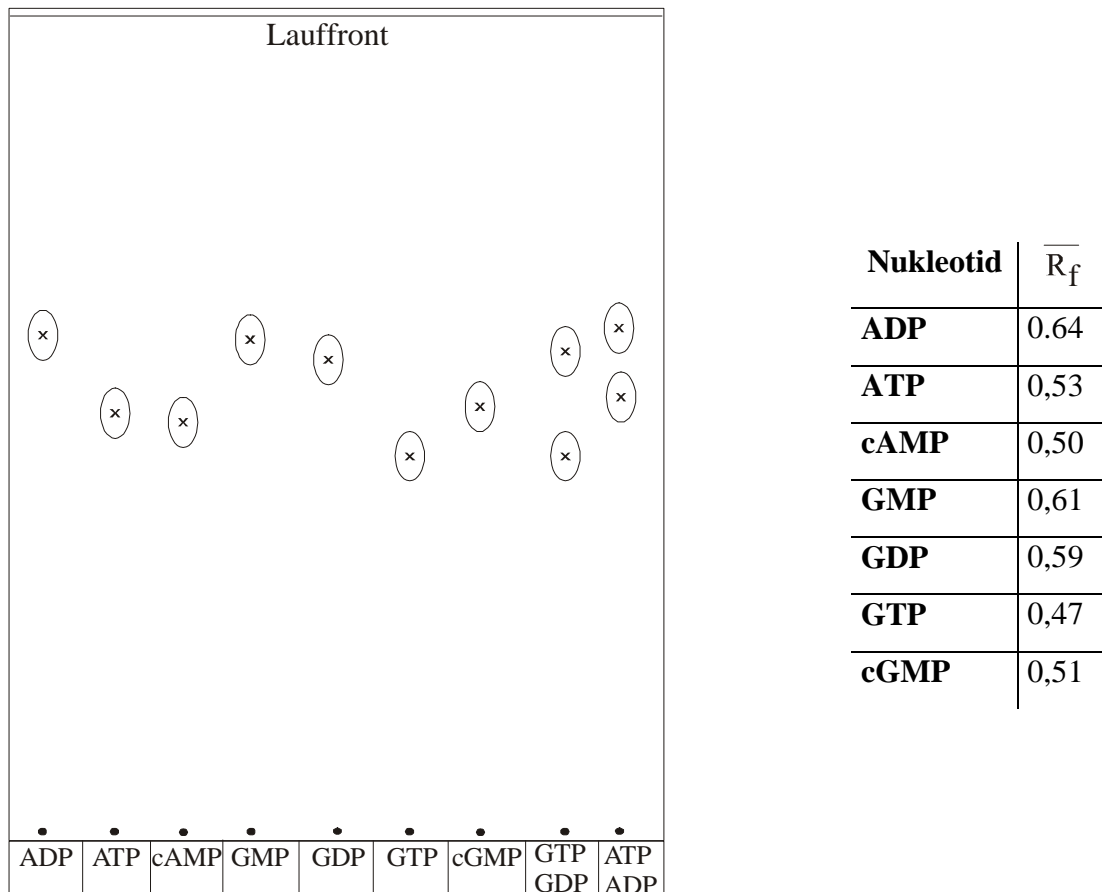


Abb. 52: Bestimmung der Retentionsfaktoren R_f verschiedener Nucleotide. Nach Dünnschichtchromatographie auf PEI-Cellulose und 4M LiCl als Laufmittel wurde die Position der Nucleotide durch UV-Fluoreszenz ermittelt.

$\overline{R_f}$ = gemittelte Retentionsfaktoren über drei Messungen.

ATPase Aktivität von PAST2.

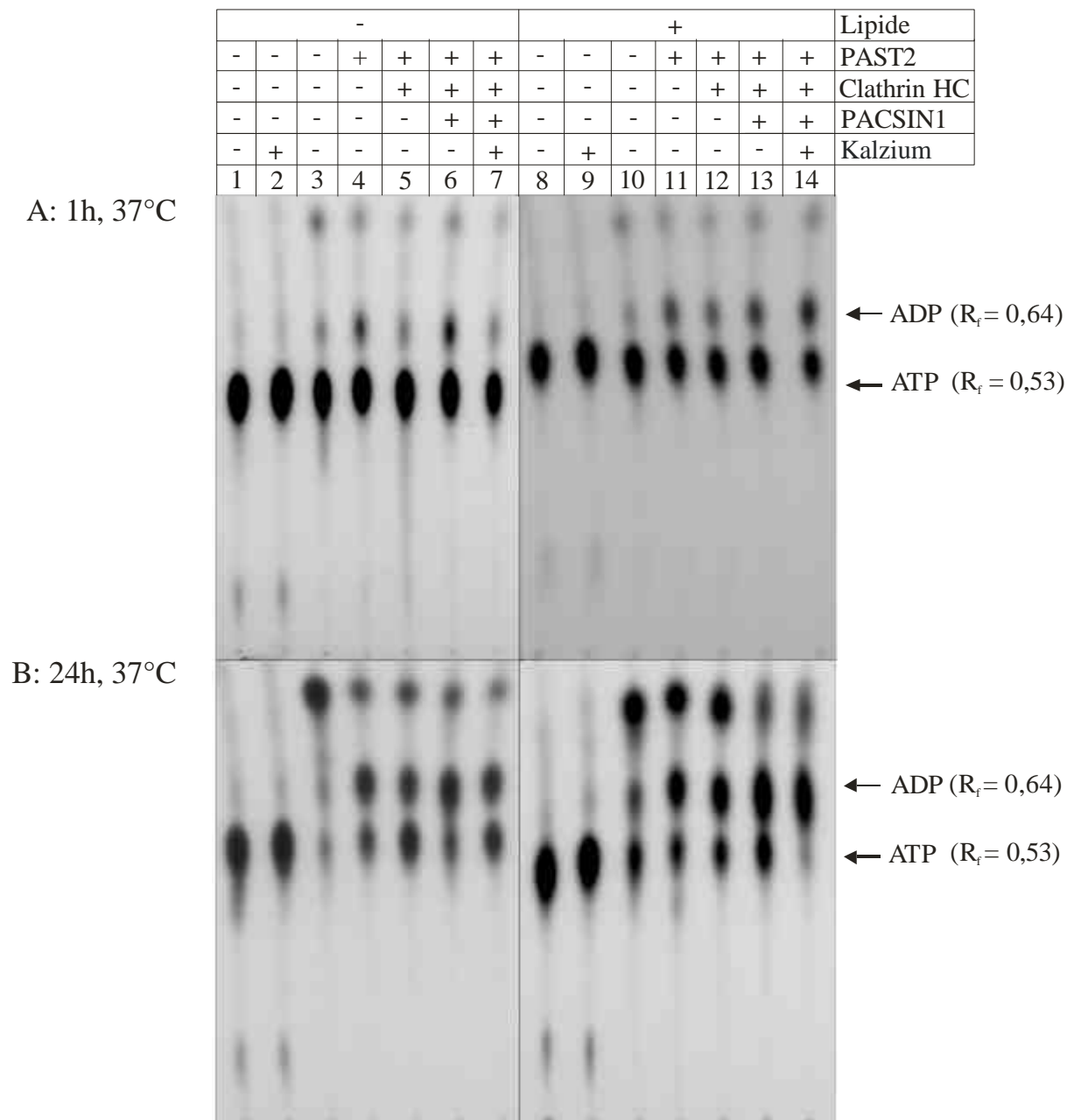


Abb. 53: PAST2 ATPase Aktivitätstest

Zur Überprüfung der ATPase-Aktivität von eukaryontisch exprimiertem PAST2 C-Strep tag II wurde das an Strep-Tactin Sepharose gekoppelte Protein mit α - ^{32}P markiertem ATP bei 37°C für 1 (A) bzw. 24 (B) Stunden inkubiert. Als Negativkontrolle dienten Strep-Tactin Sepharose, die mit dem WT-Zellysate inkubiert wurde (Spuren: 3, 10) und Strep-Tactin Sepharose ohne gebundene Proteine (Spuren: 1, 2; 8, 9). Die entstandenen Hydrolyseprodukte wurden anschließend mittels Dünnschichtchromatographie auf PEI-Zellulose aufgetrennt. Zusätzlich wurde der Einfluß von Lipiden, Kalzium und rekombinant exprimierten und aufgereinigten Proteinbindungspartnern (GST-Clathrin HC und PACSIN1 C-Strep-tag II) untersucht.

Die Inkubation der Proteine mit dem α - ^{32}P markiertem ATP erfolgte bei 37°C für 1 (A) bzw. 24 (B) Stunden mit oder ohne (+/-) Lipid-Zusatz (Abb. 53). Aufgrund der ermittelten Retentionsfaktoren wurde das entstandene Hydrolyseprodukt ADP zugeordnet. Zunächst wurde eine deutliche ATPase-Aktivität aller PAST2-haltiger Reaktionsansätze (Spuren: 4-7, 11-14), verglichen mit den Negativkontrollen (Spuren: 1-3, 8-10), festgestellt. Dies wurde insbesondere nach der 24-stündigen (B) Inkubationszeit deutlich. Die Hydrolyse erfolgte durch Zusatz von Lipiden schneller als ohne Lipide. Dies zeigte sich vor allem bei den einstündigen, kürzeren Inkubationszeiten (Abb. 53A, vgl. +/- Lipide). Eine Beeinflussung der Hydrolyseaktivität durch Proteinbindungspartner wurde nur deutlich bei der einstündigen Inkubation ohne Lipidzusatz (Abb. 53A, -), da in den anderen Fällen die Hydrolyserate, entweder durch den Lipidzusatz, oder durch die längere Inkubationszeit insgesamt erhöht war. Hier kam es durch Clathrin HC zu einem die Hydrolyse inhibierenden Effekt.

Da sich im Nukleotid-Bindungsexperiment von PAST1 (Abb. 52) das Protein nicht nur durch ATP, sondern am effektivsten durch GTP eluieren ließ, wurde im folgendem ein GTPase Aktivitätstest mit eukaryontisch exprimiertem PAST2 durchgeführt.

GTPase Aktivität von PAST2.

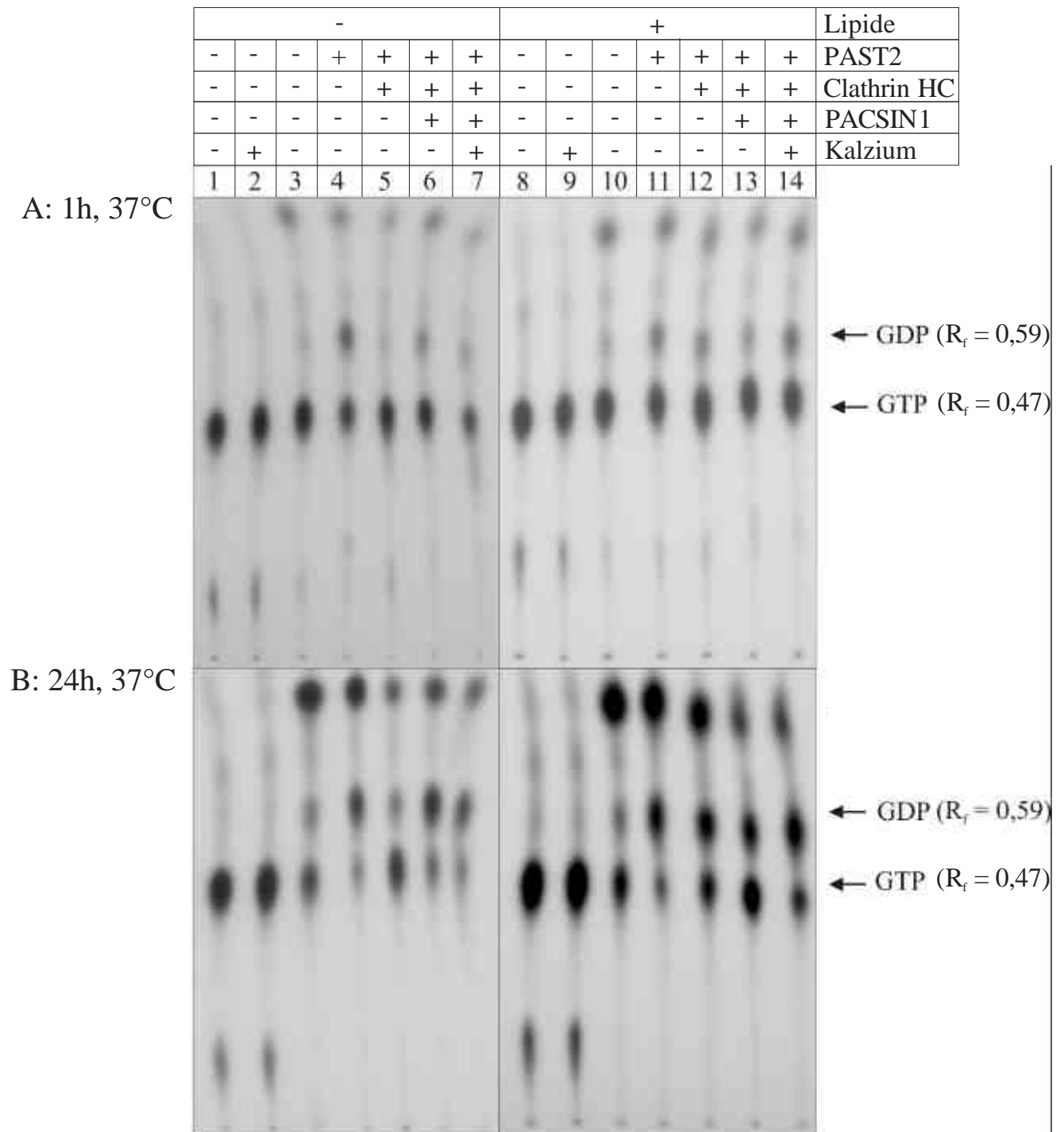


Abb. 54: PAST2 GTPase Aktivitätstest

Zur Überprüfung der GTPase-Aktivität von eukaryontisch exprimiertem PAST2 C-Strep tag II wurde das an Strep-Tactin Sepharose gekoppelte Protein mit α - ^{32}P markiertem GTP bei 37°C für 1 (A) bzw. 24 (B) Stunden inkubiert (Spuren: 4-7, 11-14). Als Negativkontrolle diente Strep-Tactin Sepharose, die mit dem WT-Zellysat inkubiert wurde (Spuren: 3, 10) und Strep-Tactin Sepharose ohne gebundene Proteine (Spuren: 1, 2; 8, 9). Die entstandenen Hydrolyseprodukte wurden anschließend mittels Dünnschichtchromatographie auf PEI-Zellulose aufgetrennt. Zusätzlich wurde der Einfluß von Lipiden, Kalzium und rekombinant exprimierten und aufgereinigten Proteinbindungspartnern (GST-Clathrin HC und PACSIN1 C-Strep-tag II) untersucht.

Die Inkubation der Proteine mit dem α -³²P markiertem GTP erfolgte bei 37°C für 1 (A) bzw. 24 (B) Stunden mit oder ohne (+/-) Lipid-Zusatz (Abb. 54). Aufgrund der ermittelten Retentionsfaktoren wurde das entstandene Hydrolyseprodukt GDP zugeordnet. Zunächst wurde eine deutliche GTPase-Aktivität aller PAST2- und Lipidhaltiger Reaktionsansätze (Spuren: 11-14), verglichen mit den Negativkontrollen (Spuren: 8-10), festgestellt. Dies wurde insbesondere nach der 24-stündigen (B) Inkubationszeit deutlich. Die Hydrolyse erfolgte durch Zusatz von Lipiden schneller als ohne Lipide. Dies zeigte sich auch hier vor allem bei den einstündigen, kürzeren Inkubationszeiten (Abb. 54A, vgl. +/- Lipide). Im Gegensatz zum ATP Hydrolyse-Experiment wurde die geringere Hydrolyseaktivität ohne Lipide auch durch eine längere Inkubationszeit nicht in allen Fällen vollständig ausgeglichen. Eine Beeinflussung der Hydrolyseaktivität durch Proteinbindungspartner wurde hier im Gegensatz zum ATPase Experiment nicht nur bei der einstündigen Inkubation, sondern auch bei der 24-stündigen Inkubation ohne Lipidzusatz (Abb. 54A, -) deutlich. Hier kam es wie auch beim ATPase-Experiment durch Clathrin HC zu einem inhibierenden Effekt.

2. 10 Glykosylierung von PACSIN1

In den letzten Jahren wurden auch für zytosolische, insbesondere für Phosphoproteine in signalverarbeitenden Prozessen, postranslationale Modifikationen mit N-Acetylglucosamin beschrieben. PACSIN1 besitzt an mehreren Stellen Sequenzhomologien zu solchen Glykosylierungsstellen in entsprechend modifizierten anderen Proteinen, deshalb sollte hier festgestellt werden, ob eukaryontisch exprimiertes PACSIN1 glykosyliert wird. Dazu wurden diese Zuckerreste, sofern sie auf dem Protein vorhanden sind, zunächst mittels Periodat zum Aldehyd oxidiert. Der Aldehyd wurde nachfolgend mit Digoxigenin markiert und abschließend mit anti-Digoxigenin-Antikörpern im Western-Blot nachgewiesen. Die Periodatoxidation und Digoxigenin-Markierung kann entweder in Lösung oder auf der Membran erfolgen. Beide Methoden wurden hier durchgeführt. Als Negativkontrolle dienten bakteriell exprimierte Proteine. Hier wurde dazu bei der Markierung auf der Membran bakteriell exprimiertes GST-Clathrin HC (Abb. 56), bei der Markierung in Lösung bakteriell exprimiertes GST-PACSIN1 verwendet (Abb. 55).

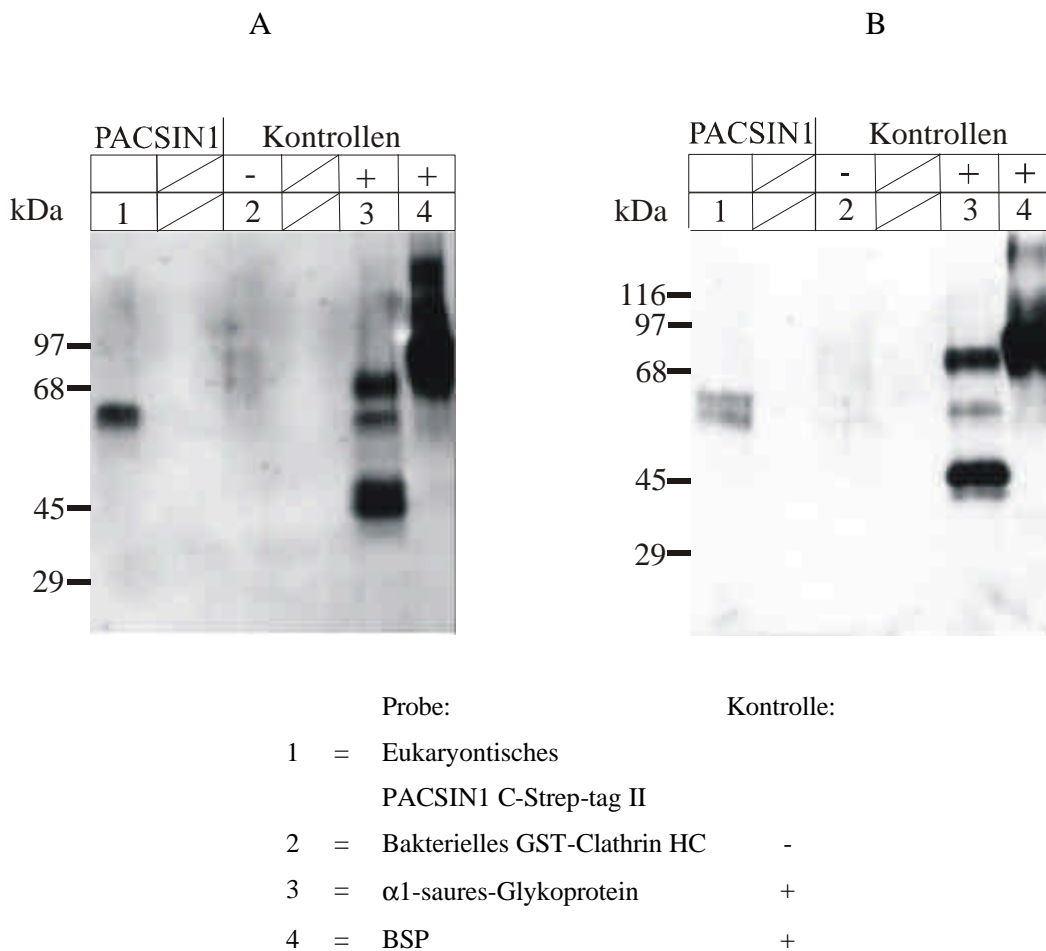
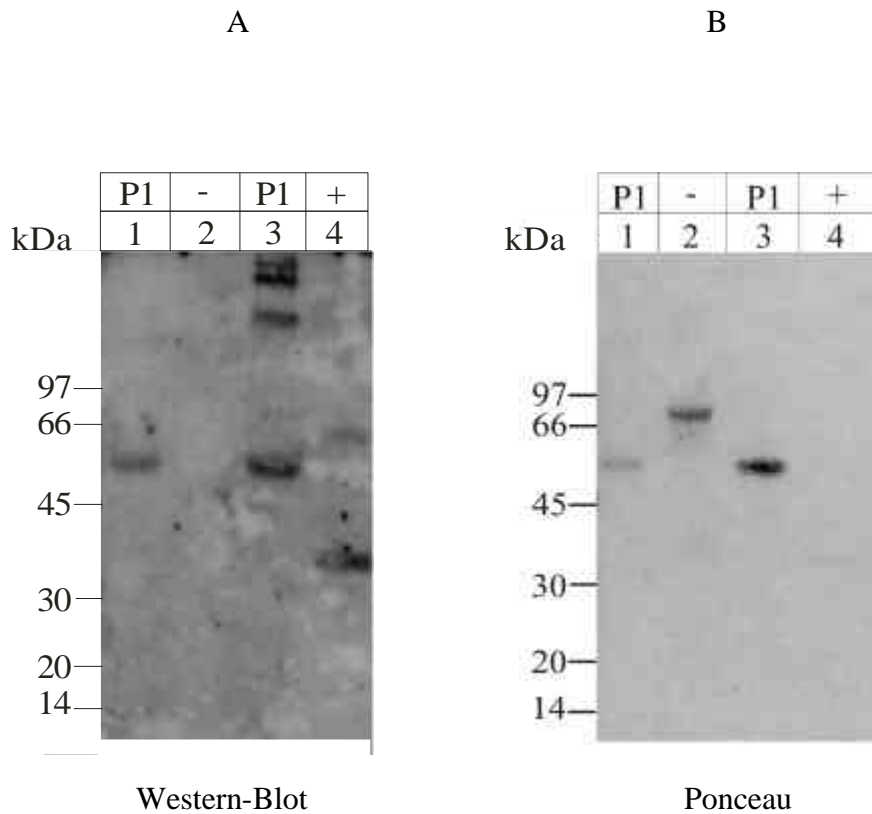


Abb. 55: Digoxigenin-Markierung von Glykoproteinen in Lösung

Je 2 μ g der Glykoproteine bzw. der Negativkontrolle wurden mittels Periodatspaltung zum Aldehyd oxidiert und dieser anschließend mit Digoxigenin markiert. Die so markierten Proteine wurden im nicht reduzierten (A) und reduzierten (B) SDS-Gel aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und abschließend mit einem Peroxidase gekoppelten anti-Digoxigenin-Antikörper nachgewiesen.

Auf PACSIN1 wurde ein Aldehyd nach Periodatoxidation in Lösung nachgewiesen (Abb. 55, Spur: 1). Die Negativkontrolle, bakteriell exprimiertes GST Clathrin HC, erschien negativ (Abb. 55, Spur: 2). Die als Positivkontrolle verwendeten Glykoproteine wurden wie eukaryontisch exprimiertes PACSIN1 positiv detektiert (Abb. 55, Spuren: 3, 4)



Proben:

- 1 = Eukaryontisches
PACSIN1 C-Strep-tag II
- 2 = Bakterielles GST-PACSIN1 (Negativkontrolle)
- 3 = Eukaryontisches
PACSIN1 C-Strep-tag II,
nicht reduzierte Langzeit- Lagerung (-20°C)
- 4 = a1-saures-Glykoprotein (Positivkontrolle)

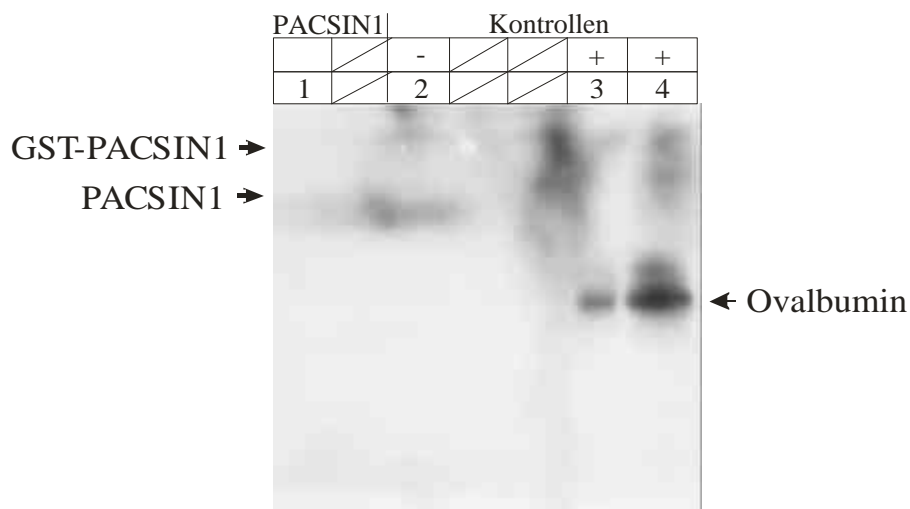
Abb. 56: Digoxigenin-Markierung von Glykoproteinen nach Transfer auf eine Membran

Je 2µg der Glykoproteine bzw. der Negativkontrolle wurden im nicht reduzierten SDS-Gel aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert, mittels Periodat zum Aldehyd oxidiert und mit Digoxigenin markiert. Abschließend wurden Digoxigenin markierte Proteine mit einem Peroxidase-gekoppelten anti-Digoxigenin-Antikörper nachgewiesen. Gezeigt ist der umgesetzte Western-Blot (A) und die dazu gehörige Ponceau-S-Färbung derselben Membran. Auf PACSIN1 (Spuren: 1, 3) kann wie auf der Positivkontrolle (Spur: 4) ein Aldehyd nachgewiesen werden. Als Negativkontrolle (Spur: 2) diente hier bakteriell exprimiertes GST-PACSIN1. Bei dem in Spur: 3 verwendeten PACSIN1 ist ein Teil der Proteine über Disulfidbrücken verknüpft (siehe Abb.: A, Spur: 3), auch in diesen Oligomeren ließen sich Aldehyde nachweisen.

Auch nach Periodatoxidation auf der Membran wird auf eukaryontisch exprimiertem monomerem PACSIN1 mindestens ein Aldehyd detektiert (Abb. 56, Spuren: 1, 3). Gleichmaßen werden auch in Disulfid-verbrückten oligomeren Formen von PACSIN1 (siehe Seite 40) potentiell glykosylierte Varianten nachgewiesen (Abb. 56, Spur: 3).

2. 10. 1 Charakterisierung des an PACSIN1 gebundenen Zuckerrests

Aufgrund des positiven Aldehydnachweises auf eukaryontisch rekombinantem PACSIN1 C-Strep-tag II nach Periodatoxidation sollte der verantwortliche Zucker näher charakterisiert werden. Da in der Literatur im Wesentlichen nur N-Acetylglucosamin als intrazelluläre posttranslationale Glykosylierung beschrieben ist, wurde versucht mit einem spezifischen Nachweis diesen Zuckerrest auf PACSIN1 zu verifizieren. Dazu wurde das Protein bzw entsprechende Kontrollen mit ^{14}C -UDP-Galactose und der spezifischen N-Acetylglucosamin β 1-4 Galactosyltransferase inkubiert. Im Falle eines auf PACSIN1 vorhandenen N-Acetylglucosaminrestes sollte sich das Protein als radioaktive Bande nach SDS-Gel Analyse nachweisen lassen (Abb. 57).



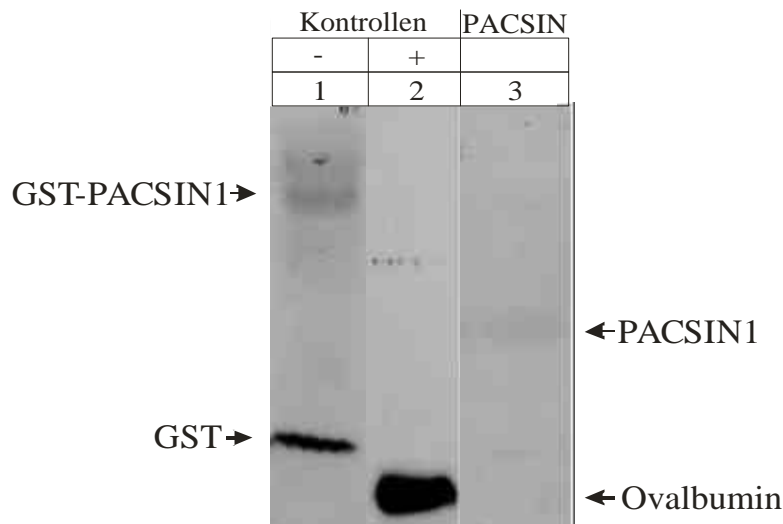
Spur:	Proteine:	
1	= Eukaryontisches. PACSIN1C-Strep tag II	
2	= Bakteriell GST-PACSIN1	(Negativkontrolle)
3	= Ovalbumin aus Ei	(Positivkontrolle)
4	= Ovalbumin aus Ei	(Positivkontrolle)

Abb. 57: Radioaktiver N-Acetylglucosamin-Nachweis von PACSIN1

Eukaryontisch rekombinantes PACSIN1 C-Strep-tag II (Spur: 1), bakteriell rekombinantes GST-PACSIN1 (Spur: 2) als Negativkontrolle sowie Ovalbumin als Positivkontrolle (Spuren: 3, 4) wurden mit 0,4 mM ^{14}C -UDP-Galactose, 3,4 mU N-Acetylglucosamin β 1-4 Galactosyltransferase in 25mM Tris/HCl; 10 mM MnCl_2 ; 0,1 % Triton X-100 für sechs Stunden bei 37°C inkubiert. Die Proteine wurden danach mittels SDS-PAGE aufgetrennt, das Gel nach Inkubation mit einer Enhancer-Lösung für schwach radioaktive Strahler getrocknet und über Autoradiografie analysiert. N-Acetylglucosamin ließ sich auf eukaryontisch rekombinantem PACSIN1, wie auch auf dem bakteriell exprimierten GST-PACSIN1 im Gegensatz zu dem als Positivkontrolle verwendeten

Ovalbumin nicht nachweisen.

Da sich N-Acetylglucosamin mit Hilfe dieses Experiments auf eukaryontisch rekombinantes PACSIN1 nicht nachweisen ließ, wurde zusätzlich versucht den Zucker mit Hilfe eines für O-glykosidisch gebundene N-Acetylglucosaminreste spezifischen Antikörpers nachzuweisen (Abb. 58).



Spur:	Protein:	Kontrolle:
1	= Bakteriell exprimiertes GST-PACSIN1	-
2	= Ovalbumin aus Ei	+
3	= PACSIN1C-Strep-tag II	

Abb. 58: Negativer N-Acetylglucosamin-Nachweis von PACSIN1

Eukaryontisch rekombinantes PACSIN1 C-Strep-tag II (Spur: 3), bakteriell rekombinantes GST-PACSIN1 als Negativkontrolle (Spur: 1) sowie Ovalbumin als Positivkontrolle (Spur: 2). Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot mittels eines N-Acetylglucosamin spezifischen Antikörpers analysiert. N-Acetylglucosamin konnte auf eukaryontisch exprimiertem PACSIN1 nicht nachgewiesen werden (Spur: 3).

Auch durch Einsatz eines spezifischen Antikörpers konnte auf PACSIN1, im Gegensatz zu der Positivkontrolle Ovalbumin kein N-Acetylglucosamin nachgewiesen werden. Der Antikörper zeigte jedoch ein unspezifische Kreuzreaktion, da bakteriell exprimiertes GST-PACSIN schwach und die entsprechende GST-Bande derselben Probe stark detektiert wurde.

3 Diskussion der Ergebnisse

3.1 Eukaryontische Expression und Aufreinigung von PACSIN1

Nach Klonierung der murinen PACSIN1 cDNA in eukaryontische Expressionsvektoren ließen sich sowohl N-terminal wie C-terminal getaggte Fusionsproteine in einer Einstufenreinigung isolieren (Abb.17, 21). Zwischen den beiden PACSIN1-Konstrukten zeigten sich folgende Unterschiede. Die Ausbeute des gereinigten Proteins war im Falle des C-terminal Strep-tag II Fusionsproteins um den Faktor vier höher als bei dem N-terminalen.

Zusätzlich ließ sich nach Aufreinigung des C-terminalen Strep-tag II PACSINs im Gegensatz zum N-terminalen mit Hilfe eines spezifischen Antiserums nach Western-Blot Analyse eine zweite Bande mit geringerer Intensität, ca. 3 kDa schwerer, nachweisen. Im Gegensatz zur SDS-Gelanalyse konnte dieses 3 kDa schwerere Protein massenspektrometrisch nicht nachgewiesen werden. Da es sich bei PACSIN1 um ein Phosphoprotein handelt (Plomann *et al.*, 1998) und sich ein unterschiedliches SDS-Gel-Laufverhalten auf unterschiedliche Phosphorylierung des Proteins hinweisen könnte, erfolgte mit Hilfe spezifischer Antikörper ein Nachweis phosphorylierter Tyrosine sowie einer Serin-phosphorylierten 14-3-3 Bindungsstelle (Yaffe *et al.* 1997, Muslin *et al.* 1996). Mit beiden Antikörpern wurden sowohl die schwerere als auch die leichtere Bande nachgewiesen, so dass unterschiedliche Phosphorylierung an den analysierten Phosphorylierungsstellen nicht die Ursache für die zweite Bande sein kann. Da sich nach Sequenzvergleich auf dem Protein nur eine potentielle Bindungsstelle für Proteine der 14-3-3 Familie befindet, scheidet eine Beteiligung des Serin 288 aus. Als mögliche Ursache ist aber eine oder mehrere Phosphorylierungen an anderen Serinen oder Threoninen nicht auszuschließen, falls das atypische Laufverhalten auf Phosphorylierung zurückzuführen ist. Von PACSIN1 ist bekannt, dass es an verschiedenen Stellen von unterschiedlichen Kinasen phosphoryliert werden kann (Plomann *et al.*, 1998; Hilton *et al.*, 2001; Ritter, 2001).

3. 2 Größenbestimmung des PACSIN1-Komplexes

Aufgrund der für PACSIN1 postulierten Funktion als cytosolisches Adapterprotein bei endocytotischen Prozessen, sollte geklärt werden bis zu welchem Ausmaß eine Eigenassoziation des Proteins erfolgt. Mit Hilfe von Two-Hybrid Untersuchungen konnte in der Vergangenheit eine Homooligomerisierung nachgewiesen werden (Modregger *et al.* 2000). Weiter war bekannt, dass das zu PACSIN1 rattenhomologe Protein Syndapin I in einem zytosolischen Proteinkomplex mit einem Molekulargewicht bis zu 440 kDa nachgewiesen werden konnte (Qualmann *et al.* 1999). Die Bestimmung der Komplexgröße erfolgte mit Hilfe von Quervernetzungs-experimenten, Gelfiltrationen und Elektronenmikroskopie. Die Quervernetzungen wurden mit verschiedenen quervernetzenden Reagentien DSS, BS³ und Sulfo-EGS unterschiedlicher Länge (10-16 Å) und Löslichkeit (Wasser, 10% DMSO) durchgeführt. Bei allen Experimenten ließ sich nach SDS-Gelanalyse bei sehr geringen Konzentrationen der verwendeten Cross-Linker ein Dimer, bei etwas höheren Konzentrationen ein Tetramer nachweisen. Trimere wurden hingegen nicht oder in sehr geringer Konzentration nachgewiesen. Unspezifisches „Crosslinking“ konnte aus zwei Gründen ausgeschlossen werden. Erstens erfolgte der Nachweis der PACSIN-Oligomere bei geringen, „spezifischen“ Konzentrationen der verwendeten quervernetzenden Reagentien (Tab. 5).

Cross-Linker	Nachweis des Dimers	Nachweis des Tetramers
DSS	2,5 µM	125 µM
Sulfo-EGS	25 µM	250 µM
BS ³	5 µM	500 µM

Tab. 5: Minimale Cross-Linker Konzentrationen für quervernetzte PACSIN-Oligomere

Zweitens diente bei diesen Experimenten das nicht oder kaum nachweisbare Trimer als interne Kontrolle für unspezifische Quervernetzung. Bei unspezifischem Cross-Linking normalerweise nicht interagierender Proteine lassen sich mit steigender Cross-Linker Konzentration zunächst Monomere später Dimere, Trimere usw. nachweisen.

Dies war hier nicht der Fall. Das Trimer ließ sich in Proben, in denen das Tetramer als intensive Bande nachweisbar war, nicht oder nur in sehr geringer Konzentration nachweisen. Das quervernetzte PACSIN1-Tetramer lässt sich unter diesem Aspekt als spezifisch quervernetzt bezeichnen, da unspezifische Quervernetzung zweier Dimere zum Tetramer durch die folgenden Ergebnisse widerlegt werden konnte:

- Sowohl quervernetztes PACSIN1 mit im SDS-Gel nachweisbarer Bande des Tetramers, als auch nicht quervernetztes PACSIN1 zeigen in der Gelfiltration ein identisches Elutionsverhalten in Form eines einzigen Peaks bei annähernd gleichem Elutionsvolumen. Der Größenvergleich nach linearer Regression mit entsprechenden Markerproteinen führt bei beiden Proben zu einem Oligomerisierungsgrad von 4,5 bzw. 4,6 bei der quervernetzten Probe. Die geringe Differenz von 0,1 lässt sich durch das Volumen des gekoppelten Cross-Linkers begründen. Der ungerade Oligomerisierungsgrad von 4,5 kann dadurch erklärt, dass die Trennung der verschiedenen Proteine bei der Gelfiltration nicht nach der Masse, sondern aufgrund unterschiedlicher Stokes-Radien erfolgt, so führen Hohlräume zwischen den einzelnen Proteinketten innerhalb eines Oligomeres zur Vergrößerung des Stokes-Radius des Gesamtkomplexes. Diese Hohlräume lassen sich bei den elektronenmikroskopischen Aufnahmen des PACSIN1-Komplexes deutlich erkennen.

- Die Interpretation der elektronenmikroskopischen Aufnahmen des gereinigten PACSIN1 lässt ebenfalls auf einen tetrameren Komplex schließen. Zusätzlich zum tetrameren Komplex lassen sich hier jedoch auch monomere und dimere Strukturen erkennen. Deren Vorhandensein wird auf eine Dissoziation des tetrameren Komplexes während der Präparation der Proben zurückgeführt, da bei der Fixierung der isoelektrische Punkt des Proteins unterschritten wurde. Zusätzlich zur Bestimmung der Komplexgröße des PACSIN1-Komplexes ließen diese Aufnahmen einer Interpretation der räumlichen Anordnung der vier Proteinketten innerhalb des Komplexes zu.

Das monomere Protein besitzt eine leicht gebogene Struktur mit einem globulären und einem mehr keulenförmigen Anteil, daher besitzt eines der beiden Enden einen größeren Durchmesser als das andere Ende. Hier wird vermutet, dass das globulärere Ende der N-terminalen CDC-15 Domäne, das fibrillärere der C-terminalen SH3-Domäne entspricht. Innerhalb der Vielzahl der auf der Gesamtaufnahme vorhandenen dimeren Strukturen lässt sich nur einer Struktur eine antiparallele Anordnung der zwei

Proteinketten zuordnen (Abb. 35E), alle anderen dimeren Strukturen der Aufnahme besitzen eine parallele Orientierung der zwei Proteinketten. Der Kontaktpunkt der zwei Ketten befindet sich nicht zentral im Molekül sondern ist eher am globulären Ende des Moleküls lokalisiert (Abb. 35G, H). Die Analyse der tetrameren Strukturen (Abb. 35I-L) zeigt ebenfalls eine parallele Anordnung aller vier Ketten, so dass sich insgesamt eine „fassartige“ Struktur ergibt. Abbildung 35I entspricht einer Seitenansicht auf diese Struktur, bei der die Gesamtlänge der monomeren Einheiten über ihre Gesamtlänge zu erkennen ist. Bei den Abbildungen 35J, K handelt es sich um eine Aufsicht auf den Deckel bzw. den Boden dieser fassartigen Struktur. Ebenfalls ist bei diesen beiden Abbildungen die parallele Anordnung der vier Ketten zu erkennen. Der Abstand zwischen den raumerfüllenden globulären Enden der Ketten ist sehr gering (Abb. 35K). Auf der entsprechenden Gegenseite ist der Abstand zwischen den fibrillären Enden deutlich größer (Abb. 35J). Die Auswertung der Gesamtheit aller molekularen Strukturen der elektronenmikroskopischen Aufnahme führt zu folgendem Modell des tetrameren Komplexes:

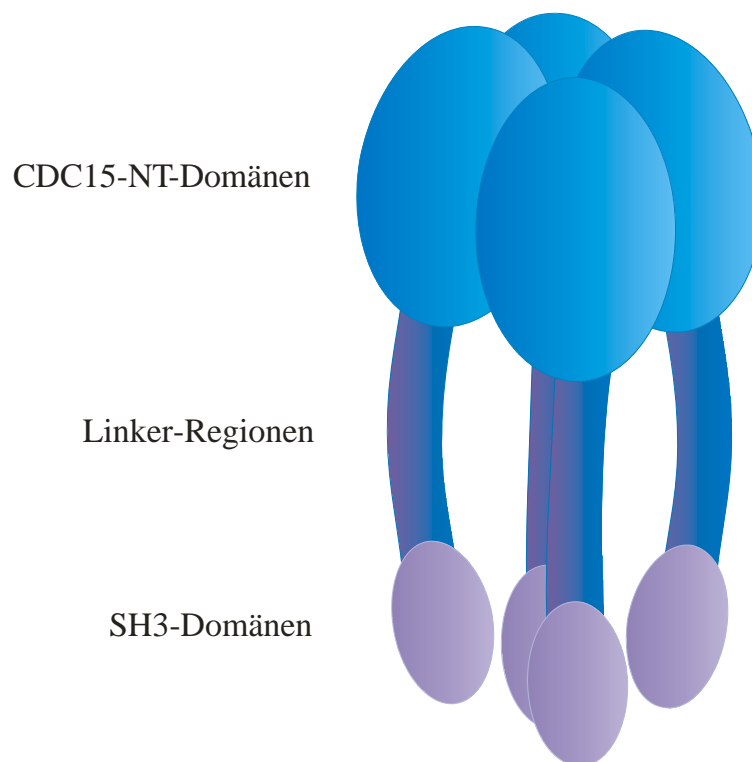


Abb. 59: Tetrameres Modell von PACSIN1

Aufgrund dieser Daten ist das bisherige Modell (Abb. 14) bezüglich der Anordnung der Proteinketten von PACSIN1 und des Oligomerisierungsgrades bei der Bildung der comet tails zu aktualisieren. PACSIN1 liegt in Lösungen cytosolischer Ionenstärke als Tetramer mit paralleler Anordnung der Proteinketten vor. Deshalb ergibt sich bei der Abschnürung von Clathrin-umhüllten Vesikeln nun folgendes korrigiertes Modell (Abb. 60).

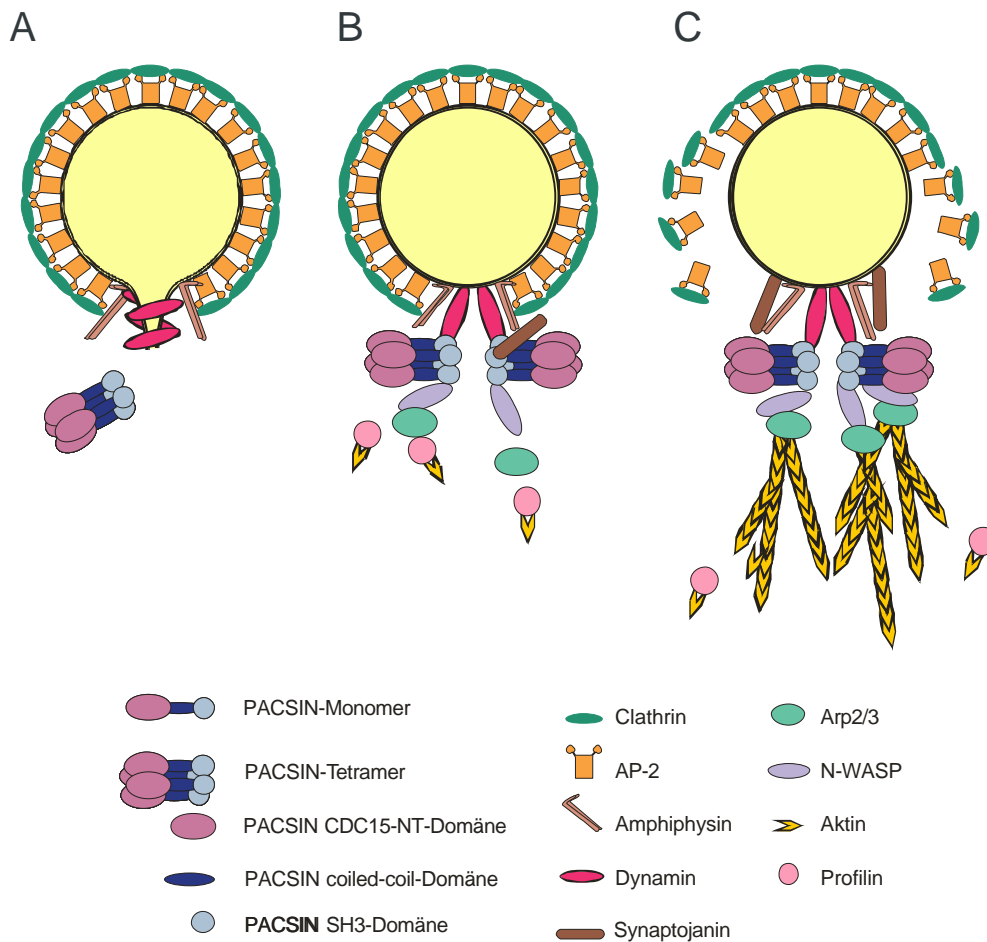


Abb. 60: Korrigiertes Modell der Rolle von PACSIN beim Vesikeltransport durch „actin comet tails“.

A: Stabilisierung des abzuschnürenden Vesikels durch Adapterproteine (AP-2) und Clathrin. Das Adapterprotein PACSIN1 liegt in Lösung als tetrameres Molekül mit paralleler Anordnung der Proteinketten vor. B: Nach Lösen des Vesikels von der Donormembran durch die Entspannung der Dynaminspirale bindet das Adapterprotein PACSIN an Dynamin und N-WASP. Über den Arp2/3 Komplex wird nachfolgend der Profilin/Aktin Komplex an N-WASP- gebunden. Bei gleichzeitiger Entfernung der Clathrin-Hülle durch Synaptojanin erfolgt die Bildung der Aktin-Polymere. C: Die einseitige Aktin-Polymerisation („actin comet tails“) erzeugt eine rücktreibende Kraft, welche den Vesikel von der Membran entfernt.

Die Frage nach den genauen Kontaktpunkten der PACSINe im tetrameren Komplex bleibt zunächst noch unbeantwortet. Eine Oligomerisierung über die SH3-Domäne kann nicht erfolgen, da auf dem Protein entsprechende prolinreiche PXXP-Motive fehlen. Das Protein besitzt aber weitere Domänen, die die Tetramerisierung vermitteln können. Dazu zählen insbesondere die CDC15-NT Domäne, deren Funktion bis heute unklar ist, sowie der innerhalb dieser Domäne befindliche potentielle coiled-coil Bereich. Für das Protein PSTPIP, welches dem PACSIN1 in seinem modularen Aufbau ähnelt bzw. größtenteils aus den gleichen Domänen besteht, konnte ebenfalls eine Oligomerisierung gezeigt werden (Wu *et al.* 1998). Die Verwendung der potentiellen coiled-coil Domäne wurde hier aber auch nicht bewiesen. Hingegen konnte mit Hilfe von bakteriell exprimiertem FAP52, dem homologen Protein zu PACSIN2 aus Huhn, der zur Homooligomerisierung notwendige Bereich durch Biacore-Messungen der entsprechenden Deletionsmutanten auf die Aminosäuren 145-280 eingeschränkt werden (Nikki *et al.*, 2002). Der potentielle coiled-coil Bereich des homologen PACSIN1 befindet sich an einer äquivalenten Position. Die für bakteriell rekombinant exprimiertes FAP52 postulierte Trimerisierung kann für rekombinant eukaryontisch exprimiertes PACSIN1 jedoch nicht gezeigt werden, hier weisen Quervernetzungs-, Gelfiltrations- und EM-Daten im Rahmen dieser Arbeit auf ein tetrameres Homooligomer hin.

Aufgrund der Gelfiltrationsdaten und Quervernetzungsdate ist von einem tetrameren PACSIN Oligomer in Lösung auszugehen,

3.3 Strukturbestimmung des PACSIN1-Komplexes über CD-Spektroskopie

Mit Hilfe der CD-Spektroskopie sollten die Sekundärstrukturanteile sowie die Denaturierungstemperatur bestimmt werden. Zusätzlich sollte mit Hilfe der nativen Gelelektrophorese gezeigt werden, dass das gereinigte Protein einheitlich nativ gefaltet vorliegt. Die Bestimmung der Sekundärstrukturanteile wurde mit Hilfe dreier Analyseprogramme durchgeführt, die Differenzen der Sekundärstrukturanteile zwischen den verschiedenen Programmen sind minimal. Im Mittel ergab sich der α -helikale Anteil zu 35,3%, der Anteil β -Schleife zu 21,6% und der β -Faltblatt-Anteil zu 14,7%. Die Denaturierungstemperatur betrug 44°C. Interessanterweise führte die Denaturierung des Proteins nicht zu einer Erhöhung der ungeordneten Sekundärstrukturanteile. Tatsächlich hatte der Verlust α -helikaler Strukturen bei 44°C um 17% eine entsprechende Erhöhung des β -Faltblatt-Anteils zur Folge.

Die Auswertung der nativen Gelelektrophorese zeigte wie bei der SDS-Gelanalyse eine weniger intensive und eine dominante Bande, so dass von einer einheitlichen Faltung des gereinigten Proteins auszugehen war.

3.4 Expression, Aufreinigung und Charakterisierung von PAST2

Neben der Charakterisierung des Adapterproteins PACSIN1 sollte auch PAST2 als ein PACSIN1 bindendes Protein näher beschrieben werden. Die Expression des PAST2 Proteins erfolgte dazu bakteriell als GST- und eukaryontisch als Strep-tag II-Fusionsprotein. Die Aufreinigungen beider Fusionsproteine wurden durch eine geringe Löslichkeit des PAST2 Proteins erschwert. Durch das wasserlösliche 26 kDa GST-Protein wurde die Löslichkeit des Proteins erhöht, so dass es durch entsprechend große Kulturansätze letztlich möglich war, eine genügende Menge des gereinigten Proteins für die nachfolgende Immunisierung zur Erzeugung polyklonaler Antikörper zu gewinnen. Der größte Teil des gereinigten Proteins ließ sich jedoch nicht mehr von der Glutathion-Sepharose eluieren. Im Gegensatz dazu war die Löslichkeit des eukaryontisch exprimierten C-Strep-tag II Fusionsproteins so gering, dass eine Elution

des gereinigten Proteins von der Strep-Tactin-Sepharose unter milden Bedingungen nicht mehr möglich war. Eine geringe Optimierung der Elution ließ sich nur mit Hilfe der Detergentien SDS und Deoxycholat erreichen. Ursache für die deutlich geringere Löslichkeit des eukaryontischen Fusionsproteins scheint hier im Gegensatz zum GST-Fusionsprotein das aus lediglich acht Aminosäuren bestehende, kleinere Strep-tag II Bindungsmodul zu sein. Das schlechte Elutionverhalten kann durch eine hohe lokale Konzentration des Proteins mit nachfolgender Polymerisation auf den Agarose-beads erklärt werden. Zusätzlich kann die Bindung eines Lipid bindenden Proteins an die Oberfläche der Agarose-beads durch die Herstellung Beads erklärt werden. Da bei deren Herstellung eine Agarose-Lösung durch eine Düse in Öl gespritzt wird, könnten die entstandenen Beads oberflächlich lipophil sein (M. Paulsson pers. Mitteilung). Vom homologen EHD1 Protein ist bekannt, dass es zytosolisch sowohl gelöst, als auch membrangebunden in HeLa nachgewiesen wurde (Caplan *et al.* 2002). So führte ein Aminosäureaustausch von Glycin 65 gegen Arginin (Grant *et al.* 2001; Lin *et al.* 2001) oder Lysin 220 gegen Asparagin (Caplan *et al.* 2002) in den für die Nukleotidbindung verantwortlichen Regionen zu einer anderen zytosolischen Verteilung. Während das WT-Protein an tubuläre Strukturen assoziiert, sind die entsprechend mutierten Proteine rein zytosolisch.

Die gegen GST-PAST2 erzeugten polyklonalen Antikörper wurden zur Analyse der Gewebeverteilung des Proteins benutzt. Hier zeigte sich, wie im Falle des PAST1 Proteins, eine breite Verteilung des Proteins. In den Proteinextrakten aus Hirn, Leber und Testis zeigten sich jedoch Unterschiede zum PAST1 Protein. In diesen Geweben wird ein 62 kDa Protein kaum bzw. nur mit sehr geringer Intensität nachgewiesen. Mit Hilfe des polyklonalen Serums gegen PAST2 werden in diesen drei Geweben jedoch leichtere Proteine detektiert. Da aufgrund des massiven Einsatzes von Proteaseinhibitoren und schneller, kalter Proteinpräparation eine Degradation des Proteins während der Präparation unwahrscheinlich ist, wird die Existenz dieser leichteren Proteine durch Degradation in der lebenden Zelle, oder durch alternatives Spleißen erklärt. Alternatives Spleißen konnte für PAST2 (EHD4) gezeigt werden, so ließen sich nach Northern Blot-Analyse Transkripte der Größe 2,0; 2,7; 3,2 und 3,6 kB in Pancreas sowie 2 Signale bei 2,7 und 3,6 kB in Herz spezifisch nachweisen (Pohl *et al.* 2000).

3. 4. 1 PAST2 Proteininteraktionen

Zur Bestätigung der schon bekannten PACSIN1/PAST2 Interaktion (Modregger, 1997) wurden mit Hilfe des eukaryontisch exprimierten und gereinigten PAST2 Proteins Kopräzipitationsstudien durchgeführt. Hier wurden nach Reinkubation des an Strep-Tactin Sepharose gebundenen Proteins mit einem Maushirn-Proteinextrakt PACSIN1 und PACSIN2 im Kopräzipitat nachgewiesen. Da sich PACSIN2 schon nach der Reinigung des PAST2 Proteins aus den HEK-293-EBNA Zellen ohne Reinkubation der Matrix als an PAST2 gebunden nachweisen ließ, bleibt hier offen, ob es sich bei der PACSIN1-Interaktion um eine PAST2/PACSIN1 oder die schon beschriebene PACSIN1/PACSIN 2- Interaktion handelt. Hingegen wurde mit diesem Experiment die PAST2/PACSIN2-Interaktion sicher nachgewiesen. Hier kam es während der Präzipitation zu einer deutlichen Anreicherung des PACSIN2-Proteins, verglichen mit dem Protein-Totallysat. Neben PACSIN1 und 2 wurden weiter die schwere Kette von Clathrin und das Protein β -COP im Kopräzipitat nachgewiesen. Da die Signalintensitäten dieser beiden Proteine, verglichen mit der Intensität der kopräzipitierten PACSINe deutlich schwächer waren, wurde zur Bestätigung des Ergebnisses eine weitere Kopräzipitation mit bakteriell exprimiertem GST-PAST2 durchgeführt. Hier konnten nach Reinkubation mit einem Maushirn-Proteinextrakt ebenfalls beide Proteine und zusätzlich EPS 15 deutlich im Kopräzipitat nachgewiesen werden. Aufgrund der im PAST2 Protein vorhandenen Sequenzhomologien zu Clathrin-bindenden Proteinen kann eine direkte Interaktion angenommen werden, mit Hilfe des durchgeführten Experimentes lässt sich diese Interaktion aber auch als eine indirekte Interaktion in einem größerem Proteinkomplex interpretieren.

Zusätzlich zu diesen Kopräzipitationen konnte gezeigt werden, dass die Proteine PAST1 und PAST2 mit ihren potentiellen Bindungspartnern PACSIN1, Clathrin HC, und β -COP in einer diskontinuierlichen Dichtezentrifugation kofraktionieren, was ebenfalls auf ein gemeinsames Vorkommen in bestimmten Zellkompartimenten hinweist. Im Gegensatz zu den hauptsächlich Membran-assoziierten Proteinen Clathrin HC und β -COP existieren sind die Proteine PAST1 und 2 sowie PACSIN1 sowohl eine zytosolisch als auch membranassoziiert.

Für PAST 1 konnte bisher eine Beteiligung an Clathrin- (Rotem-Yehudar *et al.* 2001)

und nicht Clathrin-vermittelter Endozytose (Caplan *et al.* 2002) nachgewiesen werden. Für PAST 2 hingegen wurde bisher nur eine Beteiligung an der nicht-Clathrin vermittelten Endozytose des MHC-Rezeptors gezeigt (Shao *et al.* 2002). Two-Hybrid Untersuchungen zeigen eine Bindung aller vier PAST-Proteine (EHD1-4) an die schwere Kette von Clathrin (J. Blume, pers. Mitteilung). Die Tatsache, dass durch eukaryontisch und bakteriell exprimiertes PAST2 sowohl die Proteine β -COP als auch Clathrin kopräzipitiert werden konnten (Abb. 45, 46, 48) legt auch für PAST2, wie vorher für PAST1 gezeigt, eine Beteiligung an Prozessen, die sowohl Clathrin- als auch nicht Clathrin-vermittelt sind nahe. Da das Protein β -COP als Bestandteil des COP-I Komplexes seine Funktion bei Transportprozessen innerhalb der Golgi-Zisternen und vom Golgi zum ER erfüllt (Kreis und Vale, 1999), muß zusätzlich zu den bisher beschriebenen Funktionen von PAST2 bei der Endozytose auch von einer Beteiligung des Proteins an diesen Transportprozessen ausgegangen werden. Neben Clathrin wurde mit PAST2 auch das Protein EPS15 kopräzipitiert, da es sich bei EPS15 um ein den AP-2 Komplex bindendes Protein handelt (Salcini *et al.*, 1999), welcher für die Clathrin vermittelte Endozytose benötigt wird, handelt es sich hier um einen Hinweis darauf, dass PAST2 auch bei der Clathrin vermittelten Endozytose eine Funktion erfüllen könnte. Diese Befunde weisen insgesamt auf eine späte Beteiligung des PAST2-Proteins nach Clathrin- oder COP-I-vermittelter Abschnürung eines Transportvesikels hin. Die bisherigen Ergebnisse bezüglich der Funktion der PACSINe als Bindungspartner der PAST-Proteine zeigen ebenfalls eine Funktion zu einem späteren Zeitpunkt, nach Abschnürung des Vesikels, da PACSINe unter anderem das Protein N-WASP binden, welches die Aktinpolymerisation reguliert (Qualmann *et al.* 1999).

3. 4. 2 Nukleotidbindung von PAST1

Aufgrund der in den Proteinen PAST1 und PAST2 vorhandenen konservierten Nukleotidbindungsstellen sowie entsprechender Switch-Regionen sollte die Nukleotidbindungsfähigkeit beider Proteine mit Hilfe von GTP-Agarose und eukaryontischem HA-PAST1 und Myc-PAST2 überprüft werden. Aufgrund der hohen

Affinität von PAST2 an polymere Zucker (vgl. eukaryontische und bakterielle PAST2 Expression und Aufreinigung; Abb. 42, 39) war das Experiment mit dem PAST2-Protein im Gegensatz zu PAST1 auch unter Zuhilfenahme entsprechender Detergentien nicht möglich. Für das homologe PAST1-Protein konnte hingegen eine Nukleotidbindung gezeigt werden (Abb. 51). So ließ sich das Protein aus einem cytosolischen Proteinextrakt PAST1-überexprimierender Fibroblasten an GTP-Agarose binden und später mit Nukleotiden spezifisch eluieren. Der effektivste Elutionseffekt konnte mit GTP erzielt werden, mit abnehmender Elutionsfähigkeit war dies aber auch mit ATP, ADP und EDTA möglich. Aufgrund dieser Ergebnisse ist die Nukleotidbindungsfähigkeit von PAST1 bewiesen, die *in vivo* Interaktion mit GTP ist als die wahrscheinlichste anzunehmen, da dieses Nukleotid im Experiment die deutlichste Elutionsfähigkeit zeigte.

3. 4. 3 GTP/ATPase Aktivität von PAST2

Im Gegensatz zur Überprüfung der Nukleotidbindung war es bei den Experimenten zur Überprüfung der Hydrolysefähigkeit von PAST2 nicht unbedingt nötig das Protein von der Matrix zu eluieren (Abb. 53, 54). So wurden diese Versuche mit an Strep-Tactin-Sepharose gekoppeltem PAST2 und entsprechenden Kontrollen durchgeführt. Da beim homologen PAST1 die Bindung an GTP-Agarose sowohl mit GTP als auch mit ATP reversibel war, wurde die Hydrolyseaktivität von PAST2 mit beiden Nukleotiden bestimmt. Zusätzlich wurde der Einfluß von Lipiden, Kalzium und der Proteinbindungspartner Clathrin HC und PACSIN1 untersucht. In nur PAST2-haltigen Reaktionsansätzen konnte sowohl im ATPase- als auch GTPase- Assay eine deutliche Hydrolyseaktivität festgestellt werden. Signifikante Unterschiede bezüglich des Hydrolyseverhaltens von ATP bzw. GTP zeigten sich nicht. Hier wäre im Hinblick auf das Nukleotidbindungsexperiment von PAST1 eine deutlichere Hydrolyse von GTP verglichen mit ATP zu erwarten gewesen. In beiden Fällen kam es zu einer Steigerung der Hydrolyse, wenn den Ansätzen zuvor ein Lipidgemisch zugesetzt wurde, wobei das Lipidgemisch selbst nachweislich keine Hydrolyseaktivität besaß. Bei den Reaktionsansätzen mit Lipidzusatz zeigte sich bei beiden Nukleotiden kein

nennenswerter Hydrolyse-Unterschied bei Anwesenheit der rekombinanten Proteinbindungspartner. Dagegen führte deren Addition bei beiden Nukleotiden zu einer Veränderung der Hydrolyseaktivität, wenn keine Lipide im Reaktionsansatz vorhanden waren. So führte der Zusatz rekombinanten GST-Clathrin HC zu einer deutlichen Reduktion der Hydrolyseaktivität von ATP und GTP. Interessanterweise konnte die durch GST-Clathrin HC hervorgerufene Inhibierung beider Nukleotide durch Zusatz von rekombinanten GST-PACSIN wieder aufgehoben werden. Bei diesem Telexperiment zeigten sich zudem Unterschiede bezüglich der Hydrolysegeschwindigkeit zwischen beiden Nukleotiden, so ließ sich die durch Clathrin hervorgerufene ATPase-Inhibierung im Gegensatz zur GTPase Inhibierung nach einer langen Reaktionszeit von 24 Stunden nicht mehr feststellen. Insgesamt ließ sich feststellen, dass die Hydrolyse der Nukleotide langsam und unvollständig erfolgte (Kamimoto, *et al.*, 1998), so ließen sich auch nach 24 Stunden Inkubationszeit noch nicht umgesetzte Triphosphate nachweisen. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Hydrolyse beschleunigende Komponenten nicht im Versuchsansatz enthalten waren. Die Hydrolyse-inhibierende Wirkung von Clathrin konnte deutlich gezeigt werden, übertragen auf *in vivo* Bedingungen mag dies bedeuten, dass eine durch PAST2 hervorgerufene ATP/GTP-Hydrolyse erst erfolgen soll, wenn Clathrin nicht an PAST gebunden vorliegt und der Clathrin-Mantel des zu transportierenden Vesikels zuvor entfernt wurde. Dies deutet genauso wie die Bindung an die PACSINe auf eine späte Involvierung des Proteins bei Transportprozessen hin.

3. 5 Glykosylierung von PACSIN1

Aufgrund der im PACSIN1 Protein vorhandenen Sequenzhomologien zu intrazellulären Proteinen mit Glykosylierungsstellen für N-Acetylglucosamin (<http://www.cbs.dtu.dk/services/YinOYang>) wurden mehrere Experimente durchgeführt, um diesen Zucker auf eukaryontisch exprimiertem PACSIN1 nachzuweisen. Die zunächst durchgeführte Periodatoxidation mit anschließender Digoxigenin-Markierung zeigte bei dem in mehreren Varianten durchgeführten Experiment positive Ergebnisse (Abb. 55, 56). Da diese Versuche jedoch nur Zucker bzw. Aldehyde nachweisen, jedoch keine Aussage über die Art des Zuckers erlauben, wurde in für N-

Acetylglucosamin spezifischen Folgeexperimenten versucht diesen Zucker spezifisch nachzuweisen. Die hier durchgeführte radioaktive Markierung mittels ^{14}C -UDP-Galactose und der spezifischen N-Acetylglucosamin β 1-4 Galactosyltransferase führte jedoch zu einem negativen Ergebnis (Abb. 57). Auch die Markierung des Proteins mittels eines für N-Acetylglucosamin spezifischen Antikörpers führte nicht zur Detektion dieses Zuckers (Abb. 58). Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, dass PACSIN1 glykosiliert sein könnte, es sich bei einem potentiell gebundenen Zucker aber nicht um N-Acetylglucosamin handelt.

4 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnten die zwei Teilkomponenten PACSIN1 und PAST2 intrazellulärer Transportsysteme, nach deren Klonierung, eukaryontischer Expression und Aufreinigung näher charakterisiert werden. Daraus ergeben sich folgende Schlüsse und neue Fragestellungen.

- Das Adapterprotein PACSIN 1 bildet ohne Beteiligung weiterer Proteine nachweisbare, stabile Tetramere. Da die Oligomerisierung nicht über die C-terminalen SH3-Domänen erfolgt, stehen diese Domänen Interaktionen von maximal vier weiteren, gegebenenfalls verschiedenen Bindungspartnern zur Verfügung. Hier sollte in Zukunft geklärt werden, welche der bisher bekannten Bindungspartner wann mit dem Protein interagieren.
- Als wahrscheinlichster Bereich der Oligomerisierung erscheint der in der CDC15-NT Domäne enthaltene, potentielle coiled-coil Bereich, der in verwandten Proteinen bereits als wichtige Region identifiziert worden war. Die genaue Funktion der CDC15-NT Domäne ist bis heute sowohl für diese Proteine als auch für die PACSINe unbekannt. Deshalb und aufgrund der Tatsache, dass ca. 50% der Masse der PACSINe aus dieser bisher kaum beschriebenen Domäne bestehen, ist eine nähere Charakterisierung und funktionale Analyse dieses Bereichs geboten.
- Auf eukaryontisch exprimiertem PACSIN1 konnte im Rahmen dieser Arbeit ein Aldehyd nachgewiesen werden, es gelang jedoch nicht einen definierten Zuckerrest zu identifizieren. Hier ist es von Interesse den gebundenen Zucker und seine Position näher zu charakterisieren, da diese Modifikation neben den verwendeten Phosphorylierungsstellen ebenfalls eine Rolle bei der Signalverarbeitung des Proteins spielen könnte.

- In den PACSINen finden sich weitere zur Proteininteraktion fähige Motive z. B. die NPF-Motive, die eine Interaktion mit den PAST-Proteinen vermitteln. Im Rahmen dieser Arbeit konnte die über Two-Hybrid Untersuchungen bereits festgestellte Interaktion zwischen PACSIN1/ 2 und der GTPase PAST2 durch Präzipitations-Experimente bestätigt werden. Die exakte Rolle der einzelnen PAST-Proteine und deren Zusammenwirken mit den PACSINen muss noch geklärt werden.
- Mit Hilfe des im Rahmen dieser Arbeit eukaryontisch exprimierten und gereinigten PAST2-Proteins konnte neben PACSIN1 auch PACSIN2 kopräzipitiert werden. Neben diesen Proteinen konnten ebenfalls die Proteine Clathrin, β -COP und Eps 15 im gemeinsamen Präzipitat nachgewiesen werden. Dies deutet auf eine Beteiligung des PAST2-Proteins an mindestens zwei unabhängigen vesikulären Transportprozessen hin.
- Mit Hilfe des eukaryontisch exprimierten PAST1-Proteins konnte eine Nukleotid-Bindung und im Falle des eukaryontisch exprimierten PAST2-Proteins eine Hydrolyse-Aktivität nachgewiesen werden. Aufgrund der vermuteten Neigung des PAST2 Proteins zur Polymerisation und der Ähnlichkeit zu Dynamin sollte eine mögliche Rolle des PAST2-Proteins an vesikelabschnürenden oder vesikelformenden Prozessen als Mechano-Enzym näher untersucht werden.

5 Material und Methoden

5.1 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).

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.

Geräte

Gelfiltration: Pharmacia Smart-System, Superdex 200 (Pharmacia Biotech)

ELISA Reader Multiskan MS (Labsystems, Finnland)

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

DNA-Sequenzierung: ABI Prism 377 Automated Sequencer (Perkin Elmer Applied Biosystems)

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

Spannungsgeber für

Elektroporation: Gene-Pulser[®] II (Bio-Rad)

Gelkammern: Mighty Small SE 245, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, CA, USA

Stromquelle: PS 500 XT DC Power-Supply, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, CA, USA

Peristaltic Pumpe: Perpex Jubile, Zürich, Schweiz

Geltrockner: Slab Gel Dryer Model SE 1160, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, CA, USA

Inkubator: New Brunswick Scientific, Co. Inc., N J USA

Tischzentrifuge: Sigma Modell 2-15, Osterode, Deutschland

Ultrazentrifuge: Model L7-55, Beckman Instruments, Palo Alto, CA, USA

Kühlzentrifugen : J2-21, J2-HS (Beckman, Palo Alto, CA, USA)

Rotoren: SW 41, JA 20; JS 13.1 (Beckman, Palo Alto, CA, USA)

Waage: PM 4800 Delta Range, Mettler-Toledo AG, Greifensee, Schweiz

Feinwaage: AG 245, Mettler-Toledo AG, Greifensee, Schweiz

Magnetrührer: MR 3000, Heidolph-Elektro, Kelheim, Deutschland

Leuchttisch: Biotec-Fischer GmbH, Reiskirchen, Deutschland

Photometer: Model V-530, JASCO, Tokyo, Japan

Naß-Blot-Kammer: TE series Transphor Electrophoresis Unit, Model No. 42 / Transphor Power Lid TE 50X, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, CA, USA

Schüttler: Vortex Genie-2, Scientific Industries Inc., Bohemia, NY, USA

5. 1. 2 Puffer und Lösungen

PBS-Puffer (pH 7,4)	140	mM NaCl
	10	mM KCl
	8	mM NaH ₂ PO 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

TBS-Puffer (pH 7,4)	50	mM Tris
	150	mM NaCl

Ponceau S: Boehringer Ingelheim (0,2% in TCA)

HMW-Marker: Boehringer Mannheim, bestehend aus:
Myosin (200 kDa), β -Galaktosidase (116 kDa), Phosphorylase B (97,4 kDa), BSA (66,2 kDa) und Aldolase (39,2 kDa)

LMW-Marker: Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden, bestehend aus:
Phosphorylase B (94 kDa), Albumin (67 kDa), Ovalbumin (43 kDa), Carboanhydrase (30 kDa), Trypsin Inhibitor (20,1 kDa) und Lactalbumin (14,4 kDa)

5. 1. 3 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.

5. 1. 4 Biologisches Material

5. 1. 4. 1 *E. coli*-Bakterien-Stämme

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)

5. 1. 4. 2 Eukaryontische Zellen

NIH 3T3

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

HEK 293-EBNA

Humane embryonale Nierenzellen (Invitrogen).

5. 1. 5 Antikörper

5. 1. 5. 1 Antiseren gegen PACSIN-Isoformen

	Quelle	Wirt	Western Blot
Antiserum gegen PACSIN 1	eigen*	Kaninchen	1:15000
Antiserum gegen PACSIN 2	eigen*	Kaninchen	1:15000
Antiserum gegen PACSIN 1 (aff.)	eigen*	Kaninchen	1:5000

Tab. 6: 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.

5. 1. 5. 2 Weitere Antiseren und Antikörper

	Quelle	Wirt	Western Blot
14-3-3 b	A	Maus	1:1000
Clathrin	B	Maus	1:1000
HA-HRP	C	Ratte	1:500
β-COP	D	Kaninchen	1:1000
Eps15	A	Kaninchen	1:1000
Phosphotyrosin	E	Maus	1:1000
O-GlcNac	F	Maus	1:1000

Tab. 7: Tabellarische Auflistung der zusätzlich verwendeten Antiseren und Antikörper mit Angaben zu Wirtstieren und verwendeten Verdünnungen in den aufgeführten Anwendungen. ^ASanta Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA; ^BTransduction Laboratories, Lexington, KY, USA; ^CRoche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland; ^DOncogene Research Products; ^EBiomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg, Deutschland. *Convance, BabCO, Richmond, CA, USA.

5. 1. 5. 3 Zweitantikörper

Quelle	Wirt	Antigen	Markierung	Western Blot
DAKO ^a	Schwein	Kaninchen-Ig	HRP	1:3000
DAKO ^a	Kaninchen	Maus-Ig	HRP	1:3000

Tab. 8: Tabellarische Auflistung der verwendeten Zweitantikörper mit Angaben zu Wirtstieren, Spezifität, gekoppelten Enzymen und verwendeten Verdünnungen im Western-Blot. ^a DAKO A/S, Glostrup, Dänemark.

5. 1. 3 Vektoren

a) Klonierungsvektoren

- pBluescript SK(-) (Stratagene GmbH, Heidelberg, Deutschland)
- pCR II (Invitrogen)

b) Expressionsvektoren

- pHA-CMV (Clontech)
- pGEX-3X (Pharmacia)
- pCEP-4 (Invitrogen)
- pCEP-Pu (pCEP-4 modifiziert durch Kohfeldt *et al.*, 1997)

5. 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.

5. 2. 1 Computeranalysen

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).

5. 2. 2 PCR

Reaktionszyklen:

Reaktionsansatz:

Zyklen:	Temperatur:	3	µL	cDNA Matrize	(5 pM)
1x	94°C / 2 min	1	µL	dNTP-Lösung	(25 mM)
30x	94°C / 1min	2,5	µL	sense Primer	(10 pM)
	55°C / 1min	2,5	µL	antisense Primer	(10 pM)
	72°C / 3min	5	µL	Taq-Polymerase-Puffer	(10x)
1x	72°C / 10min	1	U	Taq-Polymerase	(Roche)
Pause	4°C	36	µL	Wasser	(bidest.)

5. 2. 3 Klonierungen von PACSIN1 und PAST2

5. 2. 3. 1 Klonierung von PACSIN1 C/N Strep-tag II und PAST2 C-Strep-tag II

Für die spätere eukaryontische Expression mussten die kodierenden Sequenzen von PACSIN1 und PAST2 in die entsprechenden Expressionsvektoren kloniert werden. Da die Sequenz für das Strep-tag II-Bindungsmodul schon in den modifizierten Expressionsvektoren pCEP-Pu und pCEP-4 enthalten war, wurden über PCR und entsprechende Primer nur die benötigten Schnittstellen an die kodierende Sequenz angefügt. Im Falle der Proteine mit dem späteren C-terminalen Bindungsmodul musste das in der cDNA enthaltene Stop-Codon durch die Wahl geeigneter Primer zerstört werden. Nach PCR wurde die erhaltenen DNA in den Vektor pCR II subkloniert, amplifiziert und die Sequenz überprüft. Abschließend erfolgte mit Hilfe der eingefügten Schnittstellen die Klonierung in die Expressionsvektoren.

PACSIN1 N-Strep-tag II, sense Primer:

5` G CTA GCC ATG TCT GGC TCC TAC GAT `3
Nhe I PACSIN1

PACSIN1 N-Strep-tag II, antisense Primer:

5` GC GGC CGC CTA TAT AGC CTC AAC GTA GTT GG `3
Not I PACSIN1

PACSIN1 C-Strep-tag II, sense Primer:

5` AAG CTT GCC ACC ATG TCT GGC TCC TAC GAT GAG GCC `3
Hind III PACSIN1

PACSIN1 C-Strep-tag II, antisense Primer:

5` GC GGC CGC TAT AGC CTC AAC GTA GTT GG `3
Not I PACSIN1

PAST2 C-Strep-tag II, sense Primer:

5` TGA TCA GCC ACC ATG TTC AGC TGG ATG GGG CG `3
Bcl I PAST2

PAST2 C-Strep-tag II, antisense Primer:

5` GC GGC CGC GTC AGC CTT TGG CAG GGA `3
Not I PAST2

5. 2. 3. 2 Klonierung von GST-PAST2

Die im Vektor pBluescript vorliegende kodierende murine PAST2 cDNA wurde unter Verwendung der Schnittstellen für Eco RI, ungerichtet in den bakteriellen Expressionsvektor pGEX-3X kloniert. Abschließend wurde der korrekte Einbau der PAST2-Sequenz per PCR verifiziert.

5. 2. 4 DNA-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.

5. 2. 5 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.

5. 2. 6 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.

5. 2. 6. 1 Transfektionen

a) Fugene

Die Transfektion von NIH 3T3 Fibroblasten zur transienten Expression von HA-PAST2 erfolgte in einer 6-Loch-Mikrotiterplatte wurden pro Loch 2 ml Kulturmedium, 2 µg DNA und 6 µl FuGENE 6 (Roche) verwendet, wobei das vom Hersteller angegebene Standardprotokoll befolgt wurde. Die Zellen besaßen zum Zeitpunkt der Transfektion eine Dichte von 40-80%.

b) Elektroporation

Die Transfektion der HEK-293-EBNA-Zellen, zur späteren Überexpression von PAST2 und PACSIN1 mit dem Strep-tag II Bindungsmodul, erfolgte durch Elektroporation in 0,4 cm Küvetten (Biorad) bei 230 V und 500 µF. Dazu wurden 5×10^5 293 EBNA-Zellen in 800 µL Medium und 10 µg des entsprechenden Plasmids verwendet. Nach 24 Stunden wurde mit der Selektion begonnen.

5. 2. 6. 2 Allgemeine Zellkultur

a) Zellkultur-Medien

NIH 3T3 Fibroblasten:

- 500 mL Dulbeccos` s modified Eagle Mix (Gibco BRL, Eggenstein)
- 50 mL FCS (Gibco BRL, Eggenstein)
- 10 mL Streptomycin/Penicillin (10 mg / mL, Gibco BRL, Eggenstein)
- 5 mL 100x L-Glutamin (200 mM, Gibco BRL, Eggenstein)

HEK-EBNA-293-Zellen :

- 500 mL DMEM Nut Mix F-12 (Gibco BRL, Eggenstein)
- 50 mL FCS (Gibco BRL, Eggenstein)
- 10 mL Streptomycin/Penicillin (10 mg / mL, Gibco BRL, Eggenstein)
- 5 mL 100x L-Glutamin (200 mM, Gibco BRL, Eggenstein)
- 3,5 mL G 418 (50 mg / mL, Gibco BRL, Eggenstein)

Nach Transfektion der Zellen wurde G418, je nach Plasmid durch Puromycin (2 µg / mL) oder Hygromycin B (0,5 µg / mL, Calbiochem) im Nährmedium ersetzt.

b) Selektion und Kultivierung transfizierter HEK-293-EBNA-Zellen

Die Selektion erfolgte bei den PACSIN1 überexprimierenden Zellen über 4, im Falle der PAST2 überexprimierenden Zellen über 8 Wochen. Dazu wurde das Selektionsmedium alle zwei Tage gewechselt. Im Falle der pCEP-Pu Plasmide (PACSIN1 C-Strep-tag II, PAST2 C-Strep-tag II) erfolgte die Selektion durch Puromycin. Bei Verwendung der im Vektor pCEP-4 enthaltenen Sequenz (PACSIN1 N-Strep-tag II) wurde der Selektionsdruck durch Hygromycin B erzeugt.

c) Auftauen der Zellen

Für eine neue Kultur einer Zelllinie wird ein tiefgefrorenes Aliquot möglichst schnell in einem 37°C-Wasserbad aufgetaut. Die Zellen werden in 10 ml Medium aufgenommen und zur Entfernung des beim Einfrieren der Zellen benutzten DMSOs durch Zentrifugation mit 180 x g bei RT für 5 min pelletiert. Der Überstand wird schnell und möglichst vollständig entfernt, die Zellen in 10 ml 37°C Medium resuspendiert und anschließend in eine Kulturschale überführt.

d) Einfrieren und Lagerung von Zellen

Nährmedium mit 10% FCS und 10% DMSO wird auf 4°C vorgekühlt. Die Zellen werden durch Zentrifugation mit 180 x g bei RT für 5 min aus der Zellsuspension pelletiert. Der Überstand wird entfernt, das Pellet in 1 ml der vorgekühlten Lösung resuspendiert und in ein Einfrierröhrchen pipettiert. Das Röhrchen wird in ein Styroporgefäß verpackt und auf - 85°C abgekühlt. Für eine längere Lagerung werden die Zellen nach einigen Tagen in flüssigen Stickstoff überführt.

e) Ernten von Zellen für eine spätere Proteinextraktion

Eine konfluente Kulturschale mit Zellen wird zweimal mit PBS gewaschen, mit 2 ml Trypsinlösung versetzt, 1 min bei 37°C inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 2 ml Nährmedium gestoppt. Die Zellsuspension wird mit 10.000 x g 5 min bei 4°C zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Pellet zur Entfernung des Trypsins dreimal mit 50 mL PBS gewaschen. Das Zellpellet wird bis zur weiteren Verwendung bei Extraktion der Proteine bei - 80°C gelagert.

5. 2. 7 Proteinchemie

Arbeiten mit Proteinen wurden sofern nicht anders beschrieben im Kühlraum bei 4°C durchgeführt oder erfolgten unter Eiskühlung, Proteinlösungen wurden bei -20°C gelagert.

5. 2. 7. 1 Aufreinigung von Proteinen mit dem Strep-tag-II Bindungsmodul

5 g gefrorenen PACSIN1 überexprimierende Zellen werden unter Eiskühlung aufgetaut und in 50 ml PBS pH 7,5; 0,25 mM Saccharose; 1mM PMSF resuspendiert. Im Falle der PAST2 überexprimierenden Zellen wurden zusätzlich Triton X-100 bis zu einer finalen Konzentration von 1% (v/v) hinzugefügt und zusätzlich auf EDTA-haltige Lösungen während der folgenden Arbeiten verzichtet. Unter Eiskühlung werden die Zellen der Suspensionen mit einer Intervallschaltung (1 s Ultraschallstoß / 1 s Pause) dreimal für 15 s mit Ultraschall behandelt. Die Lysate werden mit 20.000 x g für 15 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und abschließend 2 Stunden bei 180.000 x g ultrazentrifugiert. Die Beladung einer mit StrepTactin-Matrix (IBA; 5 mL Bettvolumen) gefüllten Säule mit dem Proteinextrakt erfolgte mit einem Fluß von 0,5 mL / min. Nach Waschen der Säule mit dem zehnfachen Bettvolumen 100 mM Tris, pH 8,0; 1 mM EDTA, 1 mM PMSF erfolgte die Elution unter Verwendung des vierfachen Bettvolumens 100 mM Tris pH 8,0; 1 mM EDTA; 2,5 mM Desthiobiotin.

5. 2. 7. 2 Gelfiltration

Gelfiltrationen wurden mit Hilfe des Pharmacia Smart Systems (Superdex 200) unter Verwendung eines Puffers mit zytosolischer Ionenstärke (KCl-Puffer, pH 7,4) durchgeführt. Der Fluß betrug hierbei 10 μ L / min.

KCl Puffer (pH 7,4)	10	mM Pipes
	100	mM KCl
	3	mM NaCl
	3,5	mM MgCl ₂

5. 2. 7. 3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit dem BCA Protein Assay Kit (Pierce).

5. 2. 7. 4 Native Polyacrylamid -Gelelektrophorese

Die native Polyacrylamid-Gelelektrophorese erfolgte nach der Methode von Daniel Safer (1998)

5. 2. 7. 5 CD-Spektroskopie

Die Messungen erfolgten in 5 mM HEPES, pH 7,4 und einer Konzentration von 0,1 mg / mL. Die Spektren wurden über einen Wellenlängenbereich von 190-250 nm aufgenommen. Für die Auswertung wurden die Programme CONTINNL, SELCON3 und CDSSTR verwendet

5. 2. 7. 6 Quervernetzung (Cross-Linking)

Die Quervernetzungen erfolgten in einem Reaktionsvolumen von 50 μ L unter Verwendung einer Proteinkonzentration von 40 μ g / mL mit Hilfe von DSS, Sulfo-EGS oder BS³ (Pierce). Die Reaktion erfolgte, entsprechend den Herstellerangaben unter Eiskühlung in PBS pH 7,4 und wurde nach einer einstündigen Reaktionszeit durch Zugabe von 10 μ L 1M Tris pH 8,0 abgestoppt.

5. 2. 7. 7 Proteinpräparation aus Geweben

Ein Gramm Gewebe werden in 5mL PBS, pH 7,5 und dem gewünschten Detergenz, Chaps oder Triton X-100 bis zu einer finalen Konzentration von 1% (v/v) aufgenommen und in einem Braun-Homogenisator zerkleinert. Die erhaltene Suspension wird bei 20.000 x g für 20 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und gegebenenfalls mit PBS, pH 7,5 verdünnt.

5. 2. 7. 8 Proteinpräparation aus Zellen:

Die gefrorenen Zellen werden unter Eiskühlung aufgetaut und in 1 ml PBS, pH 7,5 resuspendiert. Je nach späterer Verwendung wird dem Puffer zuvor Chaps oder Triton X-100 bis zu einer Endkonzentration von 1% (v/v) zugegeben. Unter Eiskühlung werden die Zellen der Suspensionen mit einer Intervallschaltung (1 s Ultraschallstoß / 1 s Pause) dreimal für 15 s mit Ultraschall behandelt. Die Lysate werden mit 20.000 x g für 15 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und der Proteingehalt bestimmt.

5. 2. 7. 9 Diskontinuierlichen Dichtegradientenzentrifugation

Mit Hilfe der Zentrifugation in einem Dichtegradienten lassen sich die verschiedenen Organellen einer Zelle auftrennen (Yu *et al.*, 1992). Nacheinander werden mit Hilfe einer Schlauchpumpe je:

- 2 ml einer 60% igen ($\delta = 1,79$ g/ml)
- 2 ml einer 40% igen ($\delta = 1,43$ g/ml)
- 3 ml einer 20% igen ($\delta = 1,17$ g/ml)

Saccharose / PMEE pH 7,4 / Proteaseinhibitor Lösung in ein Ultrazentrifugationsröhrchen gepumpt und die Phasengrenzen am Gefäßrand markiert. Abschließend wird der Saccharose Gradient mit der Proteinlösung überschichtet. Die Zentrifugation erfolgt in einem Beckman SW-41 Rotor bei 38.000 rpm und 4°C für mindestens zwei Stunden.

Abschließend werden die Interphasen mit Hilfe einer Schlauchpumpe entnommen und

per SDS-PAGE analysiert.

PMEE (pH 7,4)	35	mM K-Pipes
	5	mM MgCl ₂
	1	mM EGTA
	0,5	mM EDTA

5. 2. 7. 10 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 21000 x 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 Gewebefragmente durch 30 min Zentrifugation bei 4°C und 21000 x 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. Bei Verwendung von Proteinen mit dem Strep-tag II Bindungsmodul wurde diese entsprechend aus dem Totallysat der überexprimierenden Zellen an die StrepTactin Matrix (IBA GmbH, Göttingen, Deutschland) gebunden. Zur Negativkontrolle wurde die Matrix mit einem Wildtyp-Totallysat inkubiert. Diese Matrizes 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.

5. 2. 7. 11 Nukleotidbindung von PAST1

Die Nukleotidbindungsfähigkeit von PAST1 wurde durch Bindung an GTP-Agarose (Sigma) überprüft. Dazu wurde NIH 3T3 Fibroblasten transient mit HA-PAST1 transfiziert (Fugene). Nach 24 Stunden der Überexpression wurde aus diesen Zellen, sowie aus nicht transfizierten Kontrollzellen ein Proteinextrakt in PBS, pH 7,4; 5 mM EDTA gewonnen. Nach zweistündiger Inkubation wurde den Extrakten Magnesiumchlorid zugegeben, so dass sich eine 10 mM finale Konzentration ergab. 1 mL des Extraktes mit einer Proteinkonzentration von 1mg / mL wurden dann mit 10 µL (Bettvolumen) GTP-Agarose (Sigma) für zwei Stunden rotierend inkubiert. Die Spezifität der Nukleotidbindung wurde nach sechsmaligem Waschen der Agarosen mit dem gleichen Puffer durch Zugabe von 0,5 mL 5 mM GTP-, GDP-, ATP- oder EDTA-haltigen PBS und weiterer zweistündiger Inkubation überprüft. Abschließend wurden die Agarosen ausgiebig mit PBS gewaschen, in SDS-Probenpuffer aufgekocht und nach SDS-PAGE und Western-Blot mit spezifischen anti HA-Antikörpern untersucht.

5. 2. 7. 12 GTP-/ATPase-Aktivitätstest

Zur Charakterisierung der potentiellen N-terminalen NTPase-Domäne des PAST2 Proteins wurde ein GTP-/ATPase-Experiment nach Kamimoto *et al.*, 1997 durchgeführt. Die Arbeiten erfolgten nach den Strahlenschutzbestimmungen im Radioaktivlabor.

Je 1 µg des an die StrepTactin-Matrix gebundenen PAST2 Proteins wurden in:

50 mM Tris / HCl, pH 8,0

5 mM MgCl₂

0,1 mM DTT

130 µM GTP oder ATP

13 nM α-[³²P] GTP oder ATP

Für 1 und 24 Stunden bei 37°C schüttelnd inkubiert. Als Negativkontrollen dienten zum einen der Reaktionsansatz ohne StrepTactin-Matrix, der Reaktionsansatz mit StrepTactin-Matrix sowie der Reaktionsansatz mit StrepTactin Matrix, die zuvor mit dem WT-Zellextrakt, analog zur PAST2 Aufreinigung, der Zellen inkubiert und gereinigt wurde. Zusätzlich wurde der Einfluß potentieller Effektoren untersucht, diesen Reaktionsansätzen wurden je 1 µg des bakteriell exprimierten GST-PACSIN1 bzw. GST-Clathrin HC oder ein Lipidextrakt aus Rinderhirn (Sigma) zugefügt. Nach der Reaktion wurden je 1 µL der Reaktionsansätze auf eine Polyethylenimin-Cellulose Platte aufgetragen und die Hydrolyseprodukte durch Dünnschichtchromatografie in 1,6 M Lithiumchlorid aufgetrennt. Mit den getrockneten DC-Platten wurde abschließend ein Röntgenfilm belichtet, die Retentionsfaktoren der Hydrolyseprodukte bestimmt und durch Vergleich mit den Retentionsfaktoren der nicht radioaktiven Nukleotide, die zuvor durch UV-Fluoreszenz bestimmt wurden verglichen und zugeordnet.

5. 2. 7. 13 Digoxigenin-Markierung von PACSIN1

Die Periodatoxidation und nachfolgende Digoxigenin-Markierung von eukaryontisch exprimiertem PACSIN1 C-Strep-tag II erfolgte gemäß den Herstellerangaben (Roche). Die Digoxigenin-Markierung wurde sowohl auf der Membran als auch in Lösung durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde sowohl bakteriell exprimiertes GST-PACSIN1 als auch GST-Clathrin HC verwendet. Als Positivkontrolle diente Ovalbumin (Fluka).

5. 2. 7. 14 Radioaktiver N-Acetylglucosamin-Nachweis auf PACSIN1

Der potentiell an PACSIN1 gebundene N-Acetylglucosaminrest sollte durch Kopplung von ^{14}C -UDP-Galactose durch N-Acetylglucosamin β 1-4 Galactosyltransferase verifiziert werden. Dazu wurden 3 μg PACSIN1 C-Strep-tag II sowie Ovalbumin als Positiv- und GST-PACSIN1 als Negativkontrolle in je 20 μL Puffer:

25 mM Tris / HCl pH 7,4

10 mM	MnCl ₂
0,1 %	Triton X-100
3,4 mU (350 ng)	N-Acetylglucosamin β 1-4 Galactosyltransferase (aus Rind, Fluka)

Für sechs Stunden bei 37°C zur Reaktion gebracht. Abschließend wurden die Proteine per SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel vor dem Trocknen mit einer Enhancer-Lösung (Amersham) für schwach radioaktive Strahler inkubiert. Abschließend wurde mit dem getrockneten, radioaktivem Gel ein Röntgenfilm belichtet.

6 Anhang

6.1 Aminosäuresequenzen von PACSIN1 und PAST2

Nachfolgend sind die Aminosäuresequenzen der eukaryontisch rekombinant exprimierten Proteine PACSIN1 und PAST2 dargestellt.

PACSIN1 N-terminal Strep-tag II:

1	MAWSHPQFEK	ALAMSGSYDE	ASEEITDSFW	EVGNYKRTVK	RIDDGHRLCN
51	DLMSCVQERA	KIEKAYAQQL	TDWAKRWRQL	IEKGPQYGSL	ERAWGAMMTE
101	ADKVSELHQE	VKNSLLNEDL	EKVKNWQKDA	YHKQIMGGFK	ETKEAEDGFR
151	KAQKPWAKKM	KELEAAKKAY	HLACKEERLA	MTREMNSKTE	QSVTPEQQKK
201	LVDKVDKCRQ	DVQKTQEKEYE	KVLEDVGKTT	PQYMEGMEQV	FEQCQQFE EK
251	RLVFLKEVLL	DIKRHLNLAE	NSSYMHVYRE	LEQAIRGADA	QEDLRWFRST
301	SGPGMPMNWP	QFEAWNPDLP	HTTAKKEKQP	KKAEGATLSN	ATGAVESTSQ
351	AGDRGSVSSY	DRGQTYATEW	SDDESGNPFQ	GNEANGGANP	FEDDAKGVRV
401	RALYDYDGQE	QDELSFKAGD	ELTKLGEED E	QGWCRGRLDS	GQLGLYPANY
451	VEAI				

PACSIN1 C-terminal Strep-tag II:

1	MSGSYDEASE	EITDSFWEVG	NYKRTVKRID	DGHRLCNDLM	SCVQERAKIE
51	KAYAQQLTDW	AKRWRQLIEK	GPQYGLSERA	WGAMMTEADK	VSELHQEVKN
101	SLLNEDLEKV	KNWQKDAYHK	QIMGGFKETK	EAEDGFRKAQ	KPWAKKMKEL
151	EAAKKAYHLA	CKEERLAMTR	EMNSKTEQSV	TPEQQKKLVD	KVDKCRQDVQ
201	KTQEKEYEVL	EDVGKTPQY	MEGMEQVFEQ	CQQFEKRLV	FLKEVLLDIK
251	RHLNLAENSS	YMHVYRELEQ	AIRGADAQED	LRWFRSTSGP	GMPMNWPQFE
301	EWNPDLPHTT	AKKEKQPKKA	EGATLSNATG	AVESTSQAGD	RGSVSSYDRG
351	QTYATEWSDD	ESGNPFGGNE	ANGGANPFED	DAKGVRVRAL	YDYDGQEQDE
401	LSFKAGDEL T	KLGEED EQGW	CRGRLDSGQL	GLYPANYVEA	IAAAWSHPQF
451	EK				

PAST2 C-Strep-tag II:

1	MFSWMGRQAG	GRERSGGMDA	VQTVTGG LRS	LYQRKVLPLE	EAYRFHEFH S
51	PALEDAD FEN	KPMILLVGQY	STGKTT F IRY	LLEQDFPGMR	IGPEPTTDSF
101	IAVMYGETEG	STPGNALVVD	PKKPF RKLSR	FGNAFLNRFM	CSQLPNQVLK
151	SISIIDSPGI	LSG EKQRISR	GYDFCQVLQW	FAERVDRIIL	LFDAHKLDIS
201	DEFSEAIKAF	RGQDDKIRVV	LNKADQVDTQ	QLMRVYGALM	WSLGKVINTP
251	EVLRVYIGSF	WAQPLQNTDN	RRLFEAEAQD	LFRDIQSLPQ	KA AVRKLNDL
301	IKRARLAKVH	AYIISYLKKE	MPNMF GKENK	KRELIYRLPE	IYVQLQREYQ
351	ISAGDFPEVK	AMQEQLENYD	FTKFHSLKPK	LIEAVDNMLT	NKISSLMGLI
401	SQEEMNMPTQ	MVQGGAFDGT	TEGPFNQGYG	EGAKEGADEE	EWVVAKD KPV
451	YDEL FYTLSP	INGKISGVNA	KKEMVTSKLP	NSVLGKIWKL	ADCDCDGMLD
501	EEEFALAKHL	IKIKLDGYEL	PNSLPPHLVP	PSHRKSLPKA	DAAAWSHPQF
551	EK				

7 Literatur

Ahle, S. und Ungewickell, E. (1986). Purification and properties of a new clathrin assembly protein. *EMBO J* **5**, 3143-3149.

Alibert, C. und Parham, P. (1994). Chromosomal location and some structural features of human clathrin light-chain genes (CLTA and CLTB). *Genomics* **24**, 440-444.

Allan, V. J. und Schroer, T. A. (1999). Membrane motors. *Curr Opin Cell Biol* **11**, 476-482.

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**, 17794-17805.

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. und Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**, 403-410.

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**, 3389-3402.

Barlowe, C. (2000). Traffic COPs of the early secretory pathway. *Traffic* **1**, 371-377.

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.

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**, 12111-12116.

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**, 8259-8263.

Bourne, H. R., Sanders, D. A. und McCormick, F. (1991). The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* **349**, 117-127.

Brodsky, F. M. (1997). Tropomyosin-like properties of clathrin light chain allow a rapid, high yield purification. *Trends Cell Biol* **7**, 175-179.

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**, 533-544.

Cao, H., Garcia, F. und McNiven, M. A. (1998). Differential distribution of dynamin isoforms in mammalian cells. *Mol Biol Cell* **9**, 2595-2609.

Caplan, S., Naslavsky, N., Hartnell, L. M., Lodge, R., Polishchuk, S., Donaldson J. G. und Bonifacino, J. S. (2002). A tubular EHD-1 containing compartment involved in the recycling of major histocompatibility complex class I molecules to the plasma membrane. *EMBO J* **21**, 2557-2567.

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**, 32001-32007.

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**, 793-797.

Cousin, H., Gaultier, A., Bleux, C., Darribere, T. Und Alfandari, D., (2001). PACSIN2 is a regulator of the metalloprotease/Disintegrin ADAM 13. *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**, 179-188.

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**, 331-335.

Delcomyn, F. (1997). *Foundations of Neurobiology*. W. H. Freeman and Company, New York.

Di Paolo, G., Sankaranarayanan, S., Wenk, M. R., Daniell, L., Perucco, E., Caldarone, B. J., Flavell, R., Picciotto, M. R., Ryan, T. A., Cremona, O. und De Camilli, P. (2002). Decreased synaptic vesicle recycling efficiency and cognitive deficits in Amphiphysin 1 knockout mice. *Neuron* **33**, 789-804.

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**, 1597-1605.

Elliot, K., Sakamuro, D., Basu, A., Du, W., Wunner, W., Staller, P., Gaubatz, S., Zhang, H., Prochownik, E., Eilers, M. und Prendergast, G. C. (1999). BIN functionally interacts with Myc and inhibits cell proliferation via multiple mechanisms. *Oncogene* **18**, 3564-3573.

Kaiser, C. A. und Schekmann, R. (1990). Distinct sets of SEC genes govern transport vesicle formation and fusion in the secretory pathway. *Cell* **61**, 723-733.

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**, 435-444.

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**, 9926-9931.

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**, 301-312.

Galperin, E., Benjamin, S., Rapaport, D., Rotem-Yehudar, R., Tolchinsky, S. und Horowitz, M. (2002). EHD3: a protein that resides in recycling tubular and vesicular membrane structures and interacts with EHD1. *Traffic* **3**, 575-589

Ghadimi, M., Sanzenbacher, R., Thiede, B., Wenzel, J., Jing, Q., Plomann, M., Borkhardt, A., Kabelitz, D. und Jansen, O. (2002). Identification of interaction partners of the cytosolic polyproline region of CD95 ligand (CD 178). *FEBS Lett* **519**, 50-58.

Giachino, C., Lantelme, E., Lanzetti, L., Saccone, S., Bella Valle, G. und Migone, N. (1997). A novel SH3-containing human gene family preferentially expressed in the central nervous system. *Genomics* **41**, 427-434.

Grant, B., Zhang, Y., Paupard, M. C., Lin, S. X., Hall, D. H. und Hirsh, D. (2001). Evidence that RME-1, a conserved *C. elegans* EH-domain protein, functions in endocytic recycling. *Nature Cell Biol* **3**, 573-579.

Greengard, P., Valtora, F., Czernik, A. J. und Benfenati, F. (1993). Synaptic vesicle phosphoproteins and regulation of synaptic function. *Science* **259**, 780-785.

Guichet, A., Wucherpfennig, T., Dudu, V., Etter, S., Witsch-Bräuniger, M., Hellwig, A., Gonzales-Gaitan, M., Huttner, W. B. und Schmidt, A. A. (2002). Essential role of endophilin A in synaptic vesicle budding at the *Drosophila* neuromuscular junction. *EMBO J* **21**, 1661-1672.

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**, 12990-12995.

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**, 175-180.

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**, 175-180.

Haider, N. B., Searby, C., Galperin, E., Mintz, L., Horowitz, M., Stone, E. M. und Sheffield, V.C. (1999). Evaluation and molecular characterization of EHD1, a candidate gene Bardet-Biedl Syndrome 1 (BBS1). *Gene* **240**, 227-232.

Harlow, E. und Lane, D. (1988). Antibodies: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.

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**, 6393-6398.

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**, 22785-22794.

Harder, T. und Simons, K. (1997). Caveolae, DIGs, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains. *Curr Opin Cell Biol* **9**, 534-542.

Harter, C., Pavel, J., Coccia, F., Draken, E., Wegehingel, S., Tschochner, H. und Wieland, F. (1996). Nonclathrin coat protein gamma, a subunit of coatamer, binds to the cytoplasmic dilysine motif of membrane proteins of the early secretory pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 1902-1906.

Haucke, V. und De Camilli, P. (1999). AP-2 recruitment to synaptotagmin stimulated by tyrosine-based endocytic motifs. *Science* **285**, 1268-71.

Hicks J. L., Liu, X. und Williams, D. S. (1996). Role of the ninaC proteins in photoreceptor cell structure: ultrastructure of ninaC deletion mutants and binding to actin filaments. *Cell Motil Cytoskel* **35**, 367-379.

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**, 16341-16347.

Hinshaw, J. E. und Schmid, S. L. (1995). Dynamin self-assembles into rings suggesting a mechanism for coated vesicle budding. *Nature* **384**, 190-192.

Hirst, J. und Robinson, M. S. (1998). Clathrin and adaptors. *Biochim Biophys acta* **1404**, 173-193.

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.

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**, 15671-15677.

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**, 240-245.

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**, 549-553.

Kamimoto, T., Nagai Y., Onogi, H., Muro, Y., Wakabayashi, T. und Hagiwara, M. (1998). Dymple, a novel dynamin-like high molecular weight GTPase lacking proline-rich carboxy-terminal domain in mammalian cells. *J Biol Chem* **273**, 1044-1051.

Kirchhausen, T. (2000). Three ways to make a vesicle. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**, 187-198.

Koenig, J. H., und Ikeda, K. (1989). Disappearance and reformation of synaptic vesicle membrane upon transmitter release observed under reversible blockage of membrane retrieval. *J Neurosci* **9**, 3844-3860.

Kohfeldt, E., Maurer, P., Vannahme, C. und Timple, R. (1997). Properties of extracellular calcium binding module of the proteoglycan testican. *FEBS Lett.* **414**, 557-561.

Kosaka, T. und Ikeda, K. (1983 a). Possible temperature-dependent blockage of synaptic vesicle recycling induced by a single gene mutation in *Drosophila*. *J Neurobiol* **14**, 207-225.

Kosaka, T. und Ikeda, K. (1983 b). Reversible blockage of membrane retrieval and endocytosis in the garland cell of the temperature-sensitive mutant of *Drosophila melanogaster*, *shibire ts1*. *J Cell Biol* **97**, 499-507.

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**, 424-431.

Langford, G. M. (1995). Actin- and microtubule-dependent organelle motors: interrelationships between the two motility systems. *Curr Opin Cell Biol* **7**, 82-88.

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**, 568-573.

Lin, S. X., Grant, B., Hirsh, D. und Maxfield, F. R. (2001). Rme-1 regulates the distribution and function of the endocytic recycling compartment in mammalian cells. *Nature Cell Biol* **3**, 567-562.

Lippincott-Schwartz, J., Cole, N. B. und Donaldson, J. G. (1998). Building a secretory apparatus: role of ARF1/COPI in Golgi biogenesis and maintenance. *Histochem Cell Biol* **109**,449-462.

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.

Liu, J.-P. und Robinson, P. J. (1995). Dynamin and endocytosis. *Endocrine Rev.* **16**, 590-607.

Liu, S.-H., Towler, M. C., Chen, E., Chen, C.-Y., Song, W., Apodaca, G. und Brodsky, F. M. (2001). A novel Clathrin homolog that codistributes with cytoskeletal components functions in the trans-Golgi network. *EMBO J* **20**, 272-284.

Liu, S.-H., Wong, M. L. , Craik, C. S. und Brodsky, F. M. (1995). Regulation of clathrin assembly and trimerization defined using recombinant triskelion hubs. *Cell* **83**, 257-267.

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**, 3035-3039.

Lupas, A., Van Dyke, M. und Stock, J. (1991). Predicting coiled coils from protein sequences. *Science* **252**, 1162-1164.

Matsubara, M., Kusubata, K., Uchida, T., Titani, K. und Taniguchi, H. (1996). J Site-specific phosphorylation of synapsin I by mitogen-activated protein kinase and Cdk5 and its effects on physiological functions. *J Biol Chem* **271**, 21108-21113.

Matsuoka, K., Orci, L., Arnherdt, M. und Bednarek, S. Y. (1998). COPII-coated vesicle formation reconstituted with purified coat proteins and chemically defined liposomes. *Cell* **93**, 263-275.

Mayer, B. J. (1999). Endocytosis: EH domains lend a hand. *Curr Biol* **9**, 70-73.

McDaniel, J. P., Syin, C., Lin, D. T., Joshi, M. B., Li, S. und Goldmann, N. D. (1999). Expression and characterisation of a *Plasmodium falciparum* protein, containing domains homologous to sarcalumenin and a tyrosine kinase substrate, eps 15. *Int J Parasitol* **29**, 723-730.

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**, 115-120.

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**, 353-357.

Meriläinen, J., Lehto, V. P. und Wasenius, V. M. (1997). FAP52, a novel, SH3 domain-containing focal adhesion protein. *J Biol Chem* **272**, 23278-23284.

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**, 72-74.

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**, 27239-27245.

Modregger, J. (1997). Isolierung und Charakterisierung von Proteinen, die mit PACSIN wechselwirken. Diplomarbeit, Universität zu Köln.

Modregger, J. (2001). PACSIN und seine SH3-Bindungspartner: Wechselwirkungen und Funktionen. Dissertation, Universität zu Köln.

Modregger, J., DiProspero, N., Charles, V., Tagle, D. A und Plomann, M. (2002). PACSIN1 interacts with huntingtin and is absent from synaptic varicosities in presymptomatic Huntington's disease brains. *Hum Mol Gen* **11**, 2547-2558.

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**, 4511-4521.

Modregger, J., Schmidt, A., Ritter, B., Huttner, W. und Plomann, M. (2003). Characterization of Endophilin B1b, a brain specific membrane associated Lysophosphatidic acid acyl transferase with properties distinct from Endophilin A1. *J Biol Chem* **278**, 4160-4167.

Morgan, J. R., Prasad, K., Hao, W., Augustine, G. J. und Lafer, E. M. (2000). A conserved clathrin assembly motif essential for synaptic vesicle endocytosis. *J Neurosci* **20**, 8667-8676.

Mori, S., Tanaka, M., Nanba, D., Nishiwaki, E., Ishiguro, H., Higashiyama, S. und Matsuura, N. (). PACSIN3 binds ADAM12/Meltrin α and upregulates ectodomain shedding of Heparin-binding EGF-like growth factor. *J Biol Chem* im Druck.

Muhlberg, A. B., Warnock, D. E. und Schmid, S. L. (1997). Domain structure and intramolecular regulation of dynamin GTPase. *EMBO J* **16**, 6676-6683.

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**, 10339-10343.

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**, 889-897.

Nähtke, I., Hill, B. L., Parham, P. und Brodsky, F. M. (1990). The calcium-binding site of clathrin light chains. *J Biol Chem* **265**, 18621-18627.

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.

Nikki, M., Meriläinen, J. und Lehto, V. (2002). Focal adhesion protein FAP52 self-associates through a sequence conserved among the members of the PCH family proteins. *Biochemistry* **41**, 6320-6329.

Okamoto, M., Schoch, S. und Südhof, T. C. (1999). ESH1/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**, 18446-18454.

Okamoto, P. M., Herskovits, J. S. und Vallee, R. B. (1997). Role of the basic, proline-rich region of dynamin in Src homology 3 domain binding and endocytosis. *J Biol Chem* **272**, 11629-11635.

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**, 11089-11093.

Owen, D. J. und Luzio, J. P. (2000). Structural insights into clathrin-mediated endocytosis. *Curr Opin Cell Biol* **12**, 467-474.

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**, 805-815.

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**, 5273-5285.

Paulsson, M., Deutzmann, R., Dziadek, M., Nowack, H., Timpl, R., Weber, S. und Engel, J. (1986). Purification and structural characterisation of intact and fragmented nidogen obtained from a tumor basement membrane. *Eur J Biochem* **156**, 467-478.

Pearse, B. M. F. (1975). Coated vesicles from pig brain: purification and biochemical characterisation. *J Mol Biol* **97**, 93-98.

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**, 11521-11528.

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**, 201-211.

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**, 255-262.

Pohl, U., Smith, J. S., Tachibani, I., Ueki, K., Lee, H. K., Shivaprija, R., Qiang, W., 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* **65**, 255-262.

Ponnambalam, S., Jackson, A. P., LeBeau, M. M., Pravtcheva, D., Ruddle, F. H., Alibert, C. und Parham, P. (1994). Chromosomal location and some structural features of human clathrin light-chain genes (CLTA and CLTB). *Genomics* **24**, 440-444.

Qualmann, B., Roos, J., Di Gregorio, 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**, 501-513.

Qualmann, B., und Kelly R. B. (2000). Syndapin isoforms participate in receptor-mediated endocytosis and actin organization. *J Cell Biol* **148**, 1047-1062.

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**, 2369-2376.

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**, 19785-19791.

Rickheit, G. (2002). Funktionale Charakterisierung der N-terminalen PACSIN3 Region. Diplomarbeit, Universität zu Köln.

Ringstad, N., Gad, H., Löw, 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**, 143-154.

Ringstad, N., Nemoto, Y. und DeCamilli, P. (1997). The SH3P4/SH3P8/SH3P13 protein family: binding partners for synaptojanin and dynamin via Grb2-like Src homology 3 domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 8569-8574.

Ritter, B. (2001). Isolierung neuer PACSIN-Isoformen und funktionale Charakterisierung der Protein-Familie. Dissertation, 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**, 356-362.

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**, 221-231.

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**, 19108-19119.

Rotem-Yehudar, R., Galperin, E. und Horowitz, M. (2001). Association of Insulin-like growth factor 1 receptor with EHD1 and SNAP29. *J Biol Chem* **276**, 33054-

33060.

Safer, D. (1998). Nondenaturing polyacrylamid gel elektrophoresis as a method for studying protein interactions. *Cell Biology: A laboratory Handbook*, **4**.

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**, 2239-2249.

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**, 805-809.

Salim, K., Bottomley, M. J., Svelebil, M. J. und et al (1996). Distinct specificity in the recognition of phosphoinositides by the pleckstrin homology domains of dynamin and Bruton's tyrosine kinase. *EMBO J* **15**, 6241-6250.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.

Schekman, R. und Orci, L. (1996). Coat proteins and vesicle budding. *Science* **271**, 1526-1533.

Schmid, S. L. (1997). Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: an integrated process. *Annu Rev Biochem* **66**, 511-548.

Schmid, S. L., McNiven, M. A. und De Camilli, P. (1998). Dynamin and its partners: a progress report. *Curr Opin Cell Biol* **10**, 504-512.

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**, 133-141.

Schumacher, C., Knudsen, B. S., Ohuchi, T., Di Fiore, P. P., Glassman, R. H. und Hanafusa, H. (1995). The SH3 domain of Crk binds specifically to a conserved proline-rich motif in EPS15 and EPS15R. *J Biol Chem* **270**, 15341-15347.

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**, 1159-11571.

Sever, S., Muhlberg, A. B. und Schmid, S. L. (1999). Impairment of dynamin's GAP domain stimulates receptor-mediated endocytosis. *Nature* **398**, 481-486.

Shao, Y., Akmentin, W., Toledo-Aral, J. J., Rosenbaum, J., Valdez, G., Cabot, J. B., Hilbush, B. S. und Haleboua, S. (2002). Pincher, a pinocytic chaperone for nerve growth factor TrkA signaling endosomes. *J Cell Biol* **157**, 679-691.

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**, 1592-1600.

Simons, K. und Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**, 569-572.

Slepnev, V. I. und De Camilli, P. (2000). Accessory factors in clathrin-dependent synaptic vesicle endocytosis. *Nat Rev Neurosci* **1**, 161-172.

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**, 17583-17589.

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**, 821-824.

Smith, C. J. und Pearse, B. M. (1999). Clathrin: anatomy of a coat protein. *Trends Cell Biol* **9**, 335-338.

Sparks, A. B. , Hoffmann, N. G., McConnel, S. J., Fowlkes, D. M. und Kay, B. K. (1996). Cloning of ligand targets: systematic isolation of SH3 domain-containing proteins. *Nat Biotechnol* **14**, 741-744.

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**, 145-148.

Südhof, T. C. Czernik, A. J., Kao, H.-T., Takei, K., Johnston, P. A. und Horiuchi, A. (1989). Synapsins: mosaics of shared and individual domains in a family of synaptic vesicle phosphoproteins. *Science* **245**, 1474-1480.

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**, 33-39.

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**, 2687-2702.

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**, 28727-28730.

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**, 563-573.

Tong, X. K., Hussain, N. K., Adams, A. G., O'Bryan, J. P. und McPherson, P. S. (2000). Intersectin can regulate the Ras/MAP kinase pathway independent of its role in endocytosis. *J Biol Chem* **275**, 29894-29899.

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**, 1143-1153.

Traub, L. M., Downs, M. A., Westrich, J. L. und Fremont, D. H. (1999). Crystal structure of the alpha appendage of AP-2 reveals a recruitment platform for clathrin coat assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 8907-8912.

Umeda, A., Meyerholz, A. und Ungewickell, E. (2000). Identification of the universal cofactor (auxilin 2) in clathrin coat dissociation. *Eur J Cell Biol* **79**, 336-342.

Ungewickell, E. und Ungewickell, H. (1991). Bovine brain clathrin light chains impede heavy chain assembly *in vitro*. *J Biol Chem* **266**, 12710-12714.

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**, 632-635.

Urrutia, R., Henley, J. R., Cook, T. und McNiven, M. A. (1997). The dynamins: redundant or distinct functions for an expanding family of related GTPases? *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 377-384.

Valtorta, F., Benfenati, F. und Greengard, P. (1992). Structure and function of the synapsins. *J Biol Chem* **267**, 7195-7198.

Wang, L. H., Südhof, T. C. und Anderson, R. G. (1995). The appendage domain of alpha adaptin is a High affinity binding site for dynamin. *J Biol Chem* **270**, 10079-10083.

Warnock, D. E. und Schmid, S. L. (1996). Dynamin GTPase, a force-generating molecular switch. *BioEssays* **18**, 885- 893.

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**, 26622-26628.

Wigge, P. und McMahon, H. T. (1998). The amphiphysin family of proteins and their role in endocytosis at the synapse. *Trends Neurosci* **21**, 339-344.

Wilde, A. und Brodsky, F. M. (1996). *In vivo* phosphorylation of adaptors regulates their interaction with clathrin. *J Cell Biol* **135**, 635-645.

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**, 30487-30496.

Wu, Y., Spencer, S. D und Lasky L. A. (1998). Tyrosine phosphorylation regulates the SH3-mediated binding of the Wiskott-Aldrich syndrome protein to PSTPIP, a cytoskeletal-associated protein. *J Biol Chem* **273**, 5765-5770.

Yaffe, M. B., Rittinger, K., Volinia, S., Caron, P. R., Aitken, A., Leffers, H., Gamblin, J., Smerdon S. J. und Lewis, C. C. (1997). The structural basis for 14-3-3 Phosphopeptide binding specificity. *Cell* **91**, 961-971.

Yu, H., Toyoshima, I., Steuer, E. R. und Sheetz, M. P. (1992). Kinesin and cytoplasmic dynein binding to brain microsomes. *J. Biol. Chem.* **267**, 20457-20464

8 Danke

Bedanken möchte ich mich bei all denjenigen, die mich in den letzten Jahren unterstützt haben und zur Seite standen. Insbesondere bedanke ich mich bei meinen Eltern, meiner Familie und Freunden.

Herrn Prof. Dr. Mats Paulsson danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit in seinem Institut unter sehr guter, kompetenter und menschlicher Betreuung sowie hervorragenden Arbeitsbedingungen durchführen zu können.

Bei Prof. Dr. Korsching bedanke ich mich für die Begutachtung dieser Arbeit.

Herrn Dr. Markus Plomann danke ich für die Bereitstellung dieses Themas und eine sehr gute Betreuung in seiner Arbeitsgruppe.

Den Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe Jessika Blume, Yeliz Koc, Mark Milbrand und Gesa Rickheit bedanke ich mich für Arbeitsbedingungen, wie ich sie mir auch für die Zukunft wünsche. Danke Mark für viel spontane Hilfe und schnellen Lösungen bei Computerproblemen. Danke Jessika für Deine Anwesenheit und die PAST-Gespräche mit Dir.

Bedanken möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Hauses für die gute Zusammenarbeit, für viele konstruktive Gespräche und die angenehme Arbeitsatmosphäre. In diesem Sinne bedanke ich mich vor allem bei Dr. Stefan Müller aus dem ZMMK-Servicelabor.

Danke auch an unser Nachbarlabor und die Mitglieder der Prof. Hanisch-Gruppe für viel gegenseitige Hilfe, viele nette Gespräche und Zigarettenpausen.

Danke an Dr. Neil Smith und die Mitglieder seiner Arbeitsgruppe.

Kurzzusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit konnten die zwei Teilkomponenten PACSIN1 und PAST2 intrazellulärer Transportsysteme nach deren Klonierung, eukaryontischer Expression und Aufreinigung näher charakterisiert werden. Mit Hilfe der gegen PAST2 generierten polyklonalen Antikörper wurde die über Two-Hybrid Untersuchungen festgestellte Interaktion der Bindungspartner durch Affinitätspräzipitationen bestätigt. Die durch diese Experimente zusätzlich festgestellte Interaktion mit Proteinen verschiedener intrazellulärer Transportwege legt eine Beteiligung des PAST2 Proteins an mehreren, unabhängigen intrazellulären Transportwegen nahe. In diesem Zusammenhang wurde eine breite Gewebeverteilung mit Hilfe der gegen PAST2 generierten Antikörper festgestellt. Zusätzlich konnte die durch Sequenzhomologien vermutete Funktion des PAST2 Proteins als G/ATPase durch entsprechende Experimente mit dem gereinigten Protein bestätigt werden.

Vom Adapterprotein PACSIN1 war durch Two-Hybrid Untersuchungen und Experimente mit dem bakteriellen GST-Fusionsprotein eine Oligomerisierung bekannt. Mit dem eukaryontisch expremierten und gereinigtem Protein konnte hier durch verschiedene Techniken ein stabiles Tetramer nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde nach Periodatoxidation ein Aldehyd auf dem Phosphoprotein identifiziert werden, was auf eine Glykolysierung des Proteins schließen lässt.

Abstract

The focus of this work was the characterization of the PACSIN1 and PAST2 proteins after their cloning, eucaryotic expression and purification. The proteins are known to participate in intracellular transport-systems. Polyclonal antibodies against the PAST2 protein were generated and used to confirm the PACSIN1 / PAST2 interaction, that had been earlier detected in two hybrid assays and by affinity precipitation. In pull-down assays additional binding partners, involved in different intracellular transport pathways were identified. A broad tissue distribution for PAST2 was shown by immunochemical methods. Additionally, A/GTPase activity could be predicted from the sequence and was confirmed by using recombinantly expressed and purified protein in A/GTPase assays.

An oligomerisation of the PACSIN1 adapter protein had been detected in two-hybrid screens and in assays using the GST-PACSIN1 expressed in bacteria. This homo-oligomerisation was know characterised using the PACSIN1 expressed in mammalian cells. By severall different methods the protein was shown to form stable tetramers in solution. Additionally, it was possible to verify the presence of aldehyd groups on the protein after periodate-oxidation, indicating glycosylation of PACSIN1.

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 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 22. 10. 2003

Lebenslauf

Name: **Arndt Halbach**
Wohnort: Iltistr. 13
50825 Köln
Geburtsdatum: 31.1.1968
Geburtsort Ort: Remscheid-Lennep
Beruf: Diplom-Chemiker
Eltern: Dieter und Renate Halbach
Geschwister: Martin Halbach
Familienstand: ledig

Schulbildung:

1974 - 1978 Grundschule Skt. Maternus, Kleinenbroich
1978 - 1985 Gymnasium Korschenbroich
1985 - 1986 Math. Nat. Gymnasium, Mönchengladbach
1986 - 1988 Gymnasium Köln-Pesch, Abitur

Hochschulausbildung:

1989 - 1998 Studium der Chemie an der Universität zu Köln
1998 - 1998 Diplomarbeit am Institut für Biochemie II
Medizinische Fakultät der Universität zu Köln
1999 - 2003 Dissertation am Institut für Biochemie II
Medizinische Fakultät der Universität zu Köln

Schul- / Studienbegleitende Tätigkeiten:

1988 - 1995 Tätigkeit als Schreiner, Firma „Elebau“, Köln
Frühjahr 2001 Ausbildung zum Divemaster
Frühjahr 2001 - 2003 Tätigkeit bei der Kölner Tauchschule „Unger-Wasser“ .
Frühjahr 2002 Schulung zum Erste-Hilfe-Ausbilder
Frühjahr 2002 Ausbildung zum Tauchlehrer

