

Funktionale Analyse der EHD-Proteine bei tubulären Transportprozessen

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

vorgelegt von
Jessica Blume
aus Georgsmarienhütte

Köln, Mai 2006

I

Die vorliegende Arbeit wurde an der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln
im Institut für Biochemie II (Direktor: Prof. Dr. Mats Paulsson) angefertigt.



Berichterstatter:

Prof. Dr. Mats Paulsson

Prof. Dr. Helmut W. Klein

Prüfungsvorsitzender:

Prof. Dr. Jürgen Dohmen

Tag der Disputation:

11. Juli 2006

Abstract

The intracellular transport of molecules is not only dependent on vesicular systems but also on tubular transport structures. Tubular protrusions of compartment membranes play a role at secretory compartments like the ER and the Golgi, but are also responsible for the endocytosis of GPI-anchored proteins or the MHC1. The tubular structures are used for the transport of large cargo molecules and for the reorganization of large membrane-microdomain surfaces. Tubular endocytosis of MHC1 depends on ARF-6 and EHD1, one of four members of the EHD protein family, which is associated with tubular membranes. All EHD proteins have a common domain structure, with highest conservation observed for the N-terminal G domain and the C-terminal EH domain.

Aims of this thesis were i) to test EHD oligomerization, ii) to prove the involvement of EHD proteins in the formation of tubular structures and iii) to analyze the influence of the EH domains on targeting and release from compartment membranes. Previous studies had shown that all members of the EHD family were able to associate with tubular structures. The GTPase and ATPase activity could be confirmed for EHD1 and was significantly reduced using the P-loop mutant T72N. The ability of EHD proteins to bind to phosphoinositide-enriched liposomes depends on an intact G-domain, which was confirmed by deletion and point mutants of EHD1. Furthermore, EHD1 was able to tubulate liposomes *in vitro*. Also the oligomerization was found to be nucleotide-dependent, which has recently also been demonstrated by other groups.

The involvement of EHD proteins in transport regulation was studied on EHD4 in Huh-7 cells, which colocalizes with GPI-GFP-carrying tubular structures. The EHD P-loop mutant T72/75N incapable of binding to lipids does not colocalize with any membranes, but rather shows a broad cytosolic distribution. Deletion of the EH domain in EHD4 leads to an accumulation of this mutant at the ER resulting in a total block of secretion and disruption of the Golgi apparatus.

Zusammenfassung

Der intrazelluläre Transport von Molekülen wird nicht nur über vesikuläre Systeme, sondern auch über tubuläre Transportstrukturen gesteuert. Tubuläre Abschnürungen von Kompartimentmembranen spielen einerseits bei den sekretorischen Organellen, wie ER und Golgi-Apparat eine Rolle, sind andererseits auch für die endocytotische Aufnahme von GPI-verankerten Proteinen oder den MHC1 verantwortlich. Die tubulären Strukturen dienen zum Transport von großen Frachtmolekülen oder zur Reorganisation großer Flächen von Membran-Mikrodomänen. Für die tubuläre Endocytose des MHC1 wurde ein Arf-6-induzierter Weg beschrieben, für den auch die Beteiligung des Proteins EHD1 essentiell ist. EHD1 gehört zu einer Proteinfamilie, die aus vier Mitgliedern besteht und assoziiert endogen und nach Überexpression an den Membranen der tubulären Transporter. Alle EHD-Proteine weisen den gleichen Domänenaufbau auf, wobei die beiden Hauptdomänen, die N-terminale G-Domäne und die C-terminale EH-Domäne bei allen Familienmitgliedern hoch-konserviert sind. Ziel dieser Arbeit war eine allgemeine Hypothese zur Funktion der EHD-Proteinfamilie zu überprüfen, wonach sie über die G-Domäne Nukleotid-abhängig an den Membranen von Transportstrukturen oligomerisieren bzw. die Bildung der tubulären Strukturen auslösen und daß die Interaktion über ihre EH-Domäne mit den NPF-Motifen der Bindungspartner das Andocken oder Ablösen der Transport-Carrier an ein oder von einem Kompartiment ermöglicht. Zunächst wurde ein Vergleich der Expression und intrazellulären Lokalisation der EHD-Proteine vorgenommen, wonach alle vier Familienmitglieder an tubulären Transportern assoziieren. Unter Verwendung von Punktmutanten der Nukleotid-Bindungsdomäne und Wildtyp EHD1 konnte eine enzymatische Aktivität gezeigt werden, die bei der Punktmutante EHD1 T72N herabgesetzt ist, welche den konstitutiv-inaktiven, GDP-bindenden Zustand der GTPase widerspiegeln soll. Des Weiteren zeigten alle vier EHD-Proteine *in vitro* eine direkte Bindung an mit Phosphoinositiden-angereicherten Liposomen, wobei die Bindung durch Deletion der G-Domäne oder Verwendung der Punktmutante EHD1 T72N verhindert wird. GST-EHD1 hat außerdem eine membran-modulierende Funktion, da es *in vitro* Liposomen tubulieren kann. Eine Nukleotid-abhängige Oligomerisierung der EHD-Proteine wurde während der Durchführung dieser Arbeit von Lee et al. (2005) und Naslavsky et al. (2006) publiziert und wurde deshalb hier mit den eigenen Daten zur Oligomerisierung verglichen.

Die Transport-Funktion der EHD-Proteine wurde exemplarisch an EHD4 in humanen Hepatoma Zellen (Huh-7) untersucht. EHD4 wt zeigte eine Assoziation an tubuläre Strukturen, über die spezifisch ein GPI-GFP-Konstrukt transportiert wird. Das EHD4-Äquivalent zur *in vitro* Lipidbindungs-defizienten EHD1-Punktmutante, EHD4 T75N zeigte nach Überexpression keine Assoziation mehr an Membranen. Die Deletion der C-terminalen EH-Domäne führt nach Überexpression zu einer Akkumulation am ER, wodurch der Transport von verschiedenen getesteten Frachtmolekülen von den sekretorischen Ausgangsstellen des ER inhibiert wird. Dies führt zu einer Zerstörung des Golgi-Apparates und schließlich zur kompletten Blockade der Sekretion.

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG	4
1.1	REGULATION DES INTRAZELLULÄREN TRANSPORTES VON MOLEKÜLEN ÜBER VESIKULÄRE UND TUBULÄRE MECHANISMEN	4
1.2	ENDOCYTOSE.....	6
1.2.1	<i>Clathrin</i>	9
1.2.2	<i>Caveolae</i>	12
1.3	SEKRETION.....	13
1.3.1	<i>Transport von den ER exit sites (ERES) und Sekretorische Marker</i>	13
1.3.2	<i>Post-Golgi-Carrier</i>	15
1.4	GTPASEN IN VESIKULÄREN UND TUBULÄREN TRANSPORT-MECHANISMEN	16
1.4.1	<i>Strukturvergleich von GTPasen und ATPasen</i>	16
1.4.2	<i>Kleine, monomere GTPasen im Gegensatz zu Mechanoenzymen</i>	17
1.5	ZUSAMMENSETZUNG BIOLOGISCHER MEMBRANEN UND LIPID-BINDUNGSDOMÄNEN VON PROTEINEN	19
1.5.1	<i>Phosphoinositide markieren Membranen</i>	19
1.5.2	<i>Lipidbindungsdomänen</i>	21
1.6	EHD-PROTEINE	23
1.6.1	<i>Modularer Aufbau und Rolle im Vesikeltransport</i>	23
1.6.2	<i>Bindungspartner</i>	25
1.7	AUFGABENSTELLUNG	27
2.	ERGEBNISSE	29
2.1	EXPRESSION DER EINZELNEN EHD-PROTEINE.....	29
2.1.1	<i>Gewebeverteilung und intrazelluläre Lokalisation auf Proteinebene</i>	29
2.1.2	<i>Intrazelluläre Lokalisation der EHD Proteine in Zelllinien</i>	32
2.2	FUNKTIONALE ANALYSE DER PROTEINDOMÄNEN DER EHD-FAMILIE	35
2.2.1	<i>Die G-Domäne</i>	36
2.2.1.1	<i>Domänenstruktur und Aufbau der EHD-Isoformen</i>	36
2.2.1.2	<i>Aufreinigung und CD-Spektroskopie von EHD1wt, T72N und Y67V</i>	37
	<i>CD-Spektroskopie</i>	39
2.2.1.3	<i>Enzymatische Aktivität von EHD1 wt, T72N und Y67V</i>	41
2.2.2	<i>Lipidbindung der EHD-Proteine</i>	43
2.2.2.1	<i>Lipidbindung und Phosphoinositid-Spezifität der EHD-Proteine</i>	43
2.2.2.2	<i>Identifizierung der Lipidbindungsdomäne</i>	45
	<i>Herstellung und Aufreinigung von EHD1 Deletionsmutanten</i>	45
	<i>CD-Messung der EHD1-Deletionsmutanten</i>	47
	<i>Liposomen-Sedimentationsassay der Deletionsmutanten</i>	50

2.2.3	<i>EHD-Proteine können Liposomen tubulieren</i>	52
2.2.4	<i>Oligomerisierung der EHD-Proteine</i>	53
2.2.4.1	<i>EHD-Proteine dimerisieren und die Dimerisierung ist dabei von einer funktionalen G-Domäne abhängig</i>	53
	<i>Crosslinking der EHD1-Deletionsmutanten</i>	55
2.2.5	<i>Auswirkung der Mutationen beider Hauptdomänen auf die intrazelluläre Lokalisation der einzelnen EHD-Proteine</i>	56
2.3	<i>EHD4-ABHÄNGIGER TRANSPORTWEG IN HUH-7 ZELLEN</i>	60
2.3.1	<i>Auswahl der Zelllinie und Vergleich verschiedener Expressionsvektoren</i>	60
2.3.2	<i>Identifizierung des EHD4 ΔEH-positiven Kompartiments</i>	63
2.3.2.1	<i>Analysen zur Colokalisation mit verschiedenen Kompartimentmarkern</i>	63
	<i>Die ΔEH-positiven Strukturen überlappen nicht mit Endosomen oder dem Golgi- Apparat und sind resistent gegen Brefeldin A</i>	63
	<i>Die ΔEH-positiven Strukturen überlappen im späten Phänotyp mit sekretorischen Ausgangsstellen (ERES) der ER-Membran</i>	66
2.3.3	<i>Inhibition der korrekten Strukturausbildung des Golgi-Apparates durch die Überexpression von EHD4 ΔEH</i>	67
2.3.3.1	<i>Nachweis der Golgi-Zerstörung durch eine subzelluläre Fraktionierung von Lysaten transfizierter NIH 3T3 Fibroblasten</i>	69
2.3.4	<i>Charakterisierung des EHD4-Transportweges in Huh-7 Zellen unter Verwendung von sekretorischen Markern</i>	70
2.3.4.1	<i>Sekretorische Marker für bestimmte ER-Golgi-Transportwege</i>	70
2.3.4.2	<i>Inhibition der Sekretion ausgehend von den ERES nach Überexpression von EHD4 ΔEH</i>	72
2.3.4.3	<i>Einfluß der Überexpression von HA-EHD wt und HA-EHD4 T75N auf die Sekretion der Marker</i>	74
2.3.4.4	<i>Einfluß des EHD4-Bindungspartners PACSIN 2 auf den EHD4-Transportweg in den Huh-7 Zellen</i>	76
3.	<i>DISKUSSION</i>	79
3.1	<i>EXPRESSION DER EINZELNEN EHD-PROTEINE</i>	79
3.2	<i>FUNKTIONALE ANALYSE DER HAUPTDOMÄNEN DER EHD-PROTEINE</i>	81
3.2.1	<i>Die G-Domäne</i>	81
3.2.1.1	<i>Enzymatische Aktivität von EHD1</i>	83
3.2.1.2	<i>Lipidbindung</i>	84
	<i>Abhängigkeit der Lipidbindung von der G-Domäne</i>	86
3.2.1.3	<i>EHD-Proteine tubulieren Liposomen</i>	88
3.2.1.4	<i>Oligomerisierung der EHD-Proteine</i>	88
3.2.1.5	<i>Vergleich der EHD-Proteine mit den GTPasen der Dynamin Superfamilie</i>	90
3.2.2	<i>Auswirkungen von Mutationen der beiden Hauptdomänen auf die intrazelluläre Lokalisation der einzelnen EHD-Proteine</i>	92

	<i>Punktmutationen in der G-Domäne inhibieren die Membranassoziation</i>	92
	<i>Die Deletion der EH-Domäne führt zur Akkumulierung in intrazellulären Kompartimenten</i>	93
3.3	IDENTIFIZIERUNG DES EHD4-TRANSPORTWEGES IN HUH-7 ZELLEN	94
3.3.1	<i>Identifizierung des ΔEH-positiven Kompartiments: Colokalisation mit Sec13-positiven ERES</i>	94
3.3.2	<i>Blockade der Sekretion vom ER führt zur Zerstörung der intakten Golgi-Struktur</i>	95
3.3.3	<i>GPI-Linker-GFP als Frachtmolekül für den EHD4-Transportweg</i>	96
3.3.4	<i>Welcher EH-Bindungspartner könnte beim ER-Austritt eine Rolle spielen? (Zusammenspiel mit Rab-Effektoren)</i>	97
3.4	ZUSAMMENFASSENDES MODELL DER EHD-FUNKTION	99
4.	MATERIAL UND METHODEN	102
4.1	MATERIAL	102
4.1.1	<i>Biologisches Material</i>	102
4.1.2	<i>Zellkulturmaterial und Zubehör</i>	103
4.1.3	<i>Antikörper</i>	103
4.2	METHODEN.....	106
4.2.1	<i>Molekularbiologische Methoden</i>	106
4.2.2	<i>Zellkultur</i>	108
4.2.3	<i>Proteinchemische Methoden</i>	110
5.	LITERATURVERZEICHNIS	116
A.	ANHANG	128
A.1	ABKÜRZUNGEN	128
A.2	PRIMER UND OLIGONUKLEOTIDE.....	130
A.3	VEKTOREN UND KONSTRUKTE	132
A.5	TEILPUBLIKATIONEN	137
A.6	ERKLÄRUNG	139
A.7	LEBENS LAUF.....	141

1. Einleitung

1.1 Regulation des intrazellulären Transportes von Molekülen über vesikuläre und tubuläre Mechanismen

Eukaryotische Zellen sind aus räumlich voneinander getrennten Funktionseinheiten aufgebaut, wobei die Kompartimentierung über das Umschließen eines Organells durch Doppellipid-Membranen erfolgt. Durch diese Trennung eines Organells von seiner Umgebung kann eine spezifische Proteinzusammensetzung im Kompartiment gewährleistet werden, so daß die Funktionalität aufrechterhalten wird (Alberts, 2001). Die Funktionen der Organellmembran liegen darin, Nährstoffe durch die Membran hinein und Abfallprodukte heraus zu schleusen, das Organell an das Wachstum der Zelle bzw. an die Zellzyklusphasen anzupassen oder durch Proteinkomplexe auf der Membranoberfläche mit anderen Organellen der Zelle zu kommunizieren.

Die Doppellipid-Membran ist aufgrund ihrer Hydrophobizität für alle Ionen und größere oder polare Moleküle undurchlässig (vgl. Abschnitt 1.5). Kleine lipophile, also unpolare Moleküle wie Sauerstoff oder Kohlendioxid, können durch Diffusion die Lipid-Doppelschicht überwinden (Alberts, 2001; Streyer, 1996). Membrantransportproteine ermöglichen den gesteuerten Transport von Ionen (z. B. Na^+/K^+ -Pumpe), Nukleotiden, Kohlenhydraten oder Aminosäuren (Carrierproteine). Der Transport ist entweder aktiv, d.h. durch eine Energiequelle angetrieben oder passiv, bei dem ein ungeladener Stoff seinem Konzentrationsgefälle folgt und ein Ion entsprechend seinem elektrochemischen Gradienten nach wandert (Lehninger, 1987).

Der intrazelluläre Transport zwischen den einzelnen Kompartimenten, die Aufnahme von *Cargo*-Molekülen, wie Proteinen oder Lipiden aus dem extrazellulären Raum (Endocytose), und die Sekretion aus der Zelle (Exocytose) erfolgt in Form von vesikulären und tubulären Strukturen.

Die Transportmechanismen über vesikuläre bzw. tubuläre Strukturen sind dabei noch nicht vollständig geklärt. Am besten untersucht ist der Export aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) über den COPII-Transportkomplexe (*coat protein complex II*) in Hefen und die Rolle von Clathrin in der Endocytose (vgl. Abschnitte 1.2, 1.3.1). Die annähernd geklärten Transportmechanismen laufen nach den gleichen Prinzipien ab: 1. In der Initiationsphase erfolgt als erstes die Aktivierung und

Membranbindung einer kleinen, monomeren GTPase (Arf), die zur Rekrutierung von den *Cargo*-erkennenden Adapterproteinen (APs, GGAs usw.) führt (Hirst *et al.*, 1999, Dell'Angelica *et al.*, 2000). Eine Ausnahme ist dabei die Clathrin-abhängige Endocytose, bei der die Rekrutierung der Adapterproteine über eine direkte Bindung an das Membran-Phosphoinositid PI(4,5)P₂ erfolgt (McMahon und Mills, 2004). 2. Die Ausbildung der Hülle über die Polymerisierung der Hüll-Moleküle (Clathrin, COPI oder COPII) und die Konzentrierung von *Cargos* an der Membran-Mikrodomäne sind voneinander abhängig und erfolgen zeitgleich (Ford *et al.*, 2002). 3. Die Krümmung der Donormembran-Mikrodomäne in das Cytoplasma erfolgt einerseits durch die Ausbildung der Hülle, und andererseits durch Rekrutierung von Proteinen, die die Membrankrümmung verstärken (Amphiphysin, Endophilin, Epsin, Sec23/24p-Komplex; Farsad *et al.*, 2001, Peter, *et al.*, 2004).

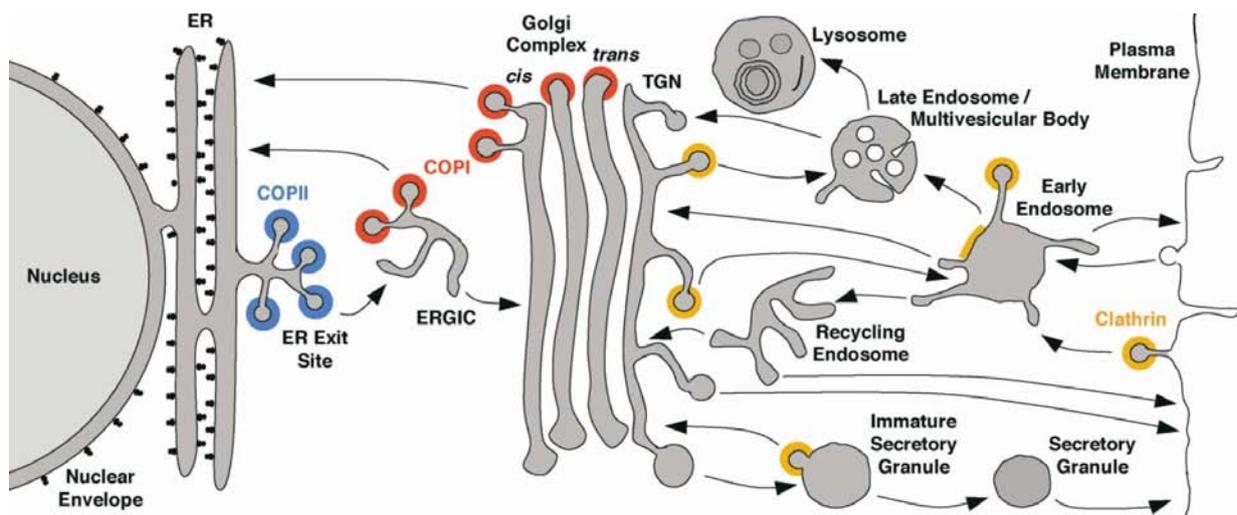


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der intrazellulären Transportwege. Das Schema stellt die Kompartimente des sekretorischen, lysosomalen/vakuolären und des endocytotischen Transportweges dar, wobei die einzelnen Schritte durch Pfeile markiert sind. Die nachgewiesene oder vermutete Lokalisation von COPII (blau), COPI (rot) und Clathrin (orange) ist farblich markiert, dabei ist nur die Funktion von COPII beim ER Export und die Funktion von Clathrin in der Endocytose genauer geklärt. Es existieren weitere Transportwege, diese sind hier aber nicht aufgeführt. (**COP**: coat protein complex; **ERGIC**: ER-Golgi intermediate compartment; Übernommen aus Bonifacino und Glick, 2004.)

4. Die Abschnürung der Transportstrukturen erfolgt in vielen Fällen über die Aktivität der GTPase Dynamin (vgl. Abschnitt 1.4.2). 5. Die Hülle der Transportstrukturen wird bei den Clathrin-umhüllten Vesikeln durch die Aktivität der PI(4,5)P₂-Phosphatase Synaptojanin entfernt, die die Lipide auf dem Vesikel dephosphoryliert und somit die Membranbindung von AP-2 aufhebt (Gad *et al.*, 2000, Jha *et al.*, 2004). Bei COP-umhüllten Vesikeln erfolgt die Aufhebung der Membranbindung über einen ArfGAP (*GTPase activating protein*; Bigay *et al.*, 2003). 6. Über kurze Aktinfilamente durch Aktinpolymerisierung oder mittels Motorproteine entlang der Mikrotubuli werden die Transportstrukturen zu den Akzeptor-Membranen transportiert. 7. Die Erkennung der Akzeptor-Membranen wird in zwei Schritten erreicht; im ersten wird die Transportstruktur zunächst locker an die Membran angelagert (*tethering*), woraufhin es im zweiten Schritt durch die Interaktion mit bestimmten Proteinen an die Membran bindet (*docking*). Durch Fusion der Vesikelmembran mit der Akzeptor-Membran kann eine Ausschüttung des Vesikelinhaltes in das Akzeptorkompartiment stattfinden (Chen und Scheller, 2001). Meist sind die unterschiedlichen Transportmechanismen für einen Transportweg spezifisch. Die gut untersuchten, intrazellulären Transportwege sind in Abb. 1.1 dargestellt, wobei jedoch weitere, nur teilweise geklärte Transportwege existieren.

1.2 Endocytose

Die Endocytose ist der molekulare Mechanismus der Aufnahme von Membranproteinen und –Lipiden oder extrazellulären Liganden von der Zelloberfläche in das Zellinnere. Dies ist für verschiedene zellphysiologische Prozesse relevant, wie z.B. der Nahrungsaufnahme, dem *Recycling* von synaptischen Vesikeln, der Regulation der Präsenz von Signal-Rezeptoren an der Zelloberfläche, der Umgestaltung der Plasmamembran und der Generierung der Zell-Polarität (Nichols und Lippincott-Schwartz, 2001). Um diese Prozesse steuern zu können, bedarf es eines vielseitigen regulatorischen Systems, das sich den physiologischen Prozessen anpassen kann. Aufgrund der hohen Divergenz an aufzunehmenden *Cargo*-Molekülen verfügt die Zelle über mehrere endocytotische Mechanismen, die oft über ihre Selektivität für ein *Cargo*-Molekül oder über Strukturkomponenten entdeckt und charakterisiert worden sind (Kirkham und Parton,

1. Einleitung

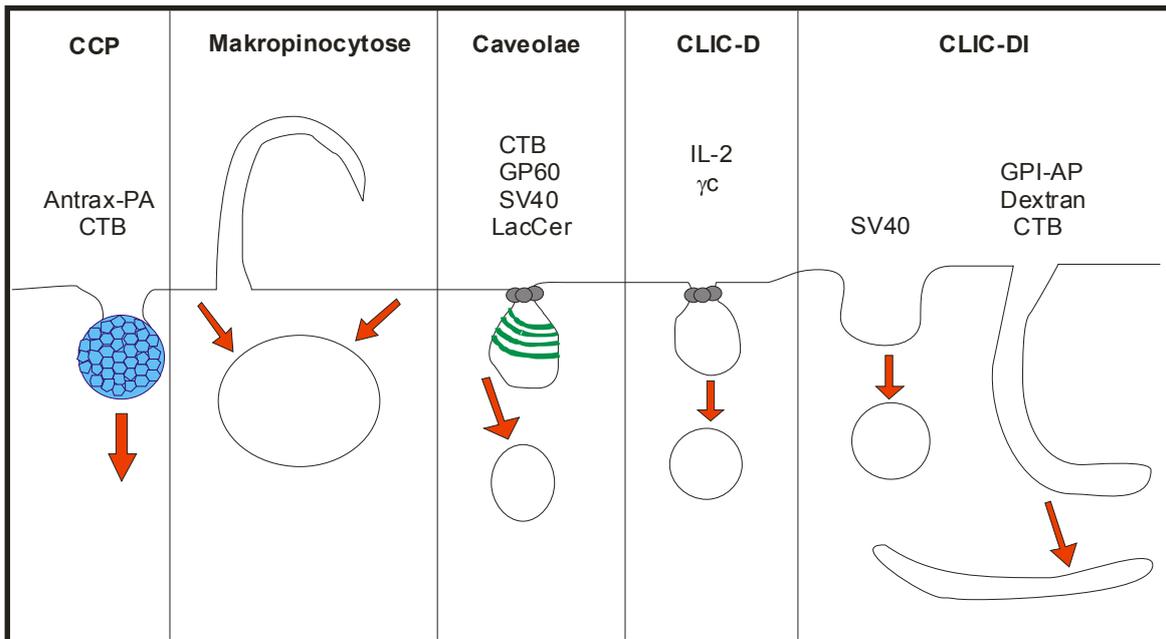
2005). Bislang wurden fünf verschiedene Mechanismen zur Endocytose anhand ihrer *Cargos* identifiziert, wobei weitere existieren können. Abbildung 1.2 stellt die fünf Mechanismen (Clathrin-abhängige Carrier (CCP); Makropinocytose; Caveolae; Dynamin-abhängige, Clathrin-unabhängige Carrier (CLIC-D); Dynamin-unabhängige, Clathrin-unabhängige Carrier (CLIC-DI)) graphisch dar und fasst die beteiligten Komponenten in der Tabelle zusammen.

Alle Mechanismen sind abhängig von einer intakten Membranstruktur und damit sensitiv gegenüber der Zerstörung von Cholesterin (Subtil *et al.*, 1999, Orlandi *et al.*, 1998, Lamaze *et al.*, 2001, Grimmer *et al.*, 2002, Kirkham *et al.*, 2005). Auch eine Abhängigkeit vom Aktincytoskelett oder von der Aktivität bestimmter Kinasen besteht bei fast allen endocytotischen Vorgängen (Pelkmans *et al.*, 2002, Damm *et al.*, 2005, Tanabe *et al.*, 2005).

Makropinocytose entsteht, wenn sich große Mengen Flüssigkeit in irregulären Einstülpungen der Membran sammeln und die umgebenden Plasmamembranbereiche schließlich fusionieren. Die Bildung der Makropinosomen ist unabhängig von Clathrin oder Dynamin, jedoch stark von Cytoskelett-Komponenten abhängig (Grimmer *et al.*, 2002), und die Strukturen werden über einen ARF6-gesteuerten Weg recycled (Radhakrishna *et al.*, 1997, Franco *et al.*, 1999).

Durch Analysen zur Endocytose der β -Untereinheit des Interleukin-2 Rezeptors und des γ_c Cytokin-Rezeptors konnte ein Clathrin-unabhängiger, aber Dynamin-abhängiger Weg identifiziert werden (Lamaze *et al.*, 2001, Sauvonnnet *et al.*, 2005), der neben Dynamin auch eine Beteiligung der Proteine EPS15 und Epsin aufweist, deren Hauptfunktion bislang in der Clathrin-abhängigen Endocytose vermutet wurde (Sigismund *et al.*, 2005).

Das Vorkommen von Dynamin- und Clathrin-unabhängigen Transportern wurde bei der Endocytose von GPI-verankerten Proteinen nachgewiesen (Sabharanjak *et al.*, 2002), die über tubuläre Strukturen aufgenommen werden. Die tubulären Strukturen weisen keine Beteiligung von Proteinen aus der Clathrin-abhängigen Endocytose auf, fusionieren aber mit endosomalen Strukturen in denen auch Clathrin-spezifische *Cargos* gefunden werden können (Sabharanjak *et al.*, 2002). Für diesen Transportweg konnte ebenfalls eine Abhängigkeit von ARF6 und dem Phosphatidylinositolphosphat PI(4,5)P₂ nachgewiesen werden (Naslavsky *et al.*, 2004).



	CCP	Makro- pinocytose	Caveolae	CLIC-D	CLIC-DI
sensitiv gegenüber Cholesterolverstörung	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
Aktin abhängig	Ja	Ja	Ja	Ja	möglich
Clathrin abhängig	Ja	Nein	Nein	Nein	Nein
Dynamin abhängig	Ja	Nein	Ja	Ja	Nein
GTPase der Rho-Familie	Rac1, RhoA Cdc42 (indirekt)	Rac1, Cdc42	keine direkte Beteiligung	RhoA	Cdc42
Tyrosin-Kinase abhängig	Src-Kinasen	Src-Kinasen	Src-Kinasen	-	Ja, Kinasen unbekannt
andere beteiligte Komponenten	PKC, Cortactin, Intersectin, ARF6, EPS15/ Epsin	PAK1, PKC, ARF6	G β γ -Dimer, PKC, Intersectin	Cortactin, EPS15/ Epsin	ARF6

Vorherige Seite:

Abbildung 1.2 und Tabelle 1.1: Alternative endocytotische Transportwege (Grafik) und die beteiligten Komponenten (Tabelle). Viele Komponenten sind Bestandteile von mehreren verschiedenen Transportwegen. Abkürzungen: **CTB**, *Cholera Toxin subunit B*; **Anthrax-PA**, *Anthrax protective antigen*; **LacCer**, *Lactosylceramid*; **IL-2**, *Interleukin 2*; **GPI-AP**, *Glycosylphosphatidylinositol anchor proteins*; **SV40**, *semian virus 40*; **CCP**, *clathrin coated pit*; **CLIC-D**, *Dynamamin-abhängige, Clathrin-unabhängige Carrier*; **CLIC-DI**, *Dynamamin-unabhängige, Clathrin-unabhängige Carrier* (modifiziert übernommen aus Kirkham und Parton, 2005).

Die beiden am besten charakterisierten Formen der Endocytose, die Clathrin-abhängige Endocytose und die Endocytose über Caveolae werden in den nachfolgenden Abschnitten beschrieben.

1.2.1 Clathrin

Die Hauptkomponente der Clathrin-abhängigen Endocytose ist das Hüllprotein Clathrin, welches die Funktion der mechanischen Bildung einer Gerüststruktur hat, jedoch weder direkt an die Membran noch an die zu transportierende Fracht bindet (McMahon und Mills, 2004). Die Spezifität für Frachten oder *Cargos* erfolgt über die Erkennungssequenzen der Adapterproteine (APs), wobei durch die Interaktion mit weiteren Proteinen, das Repertoire der zu erkennenden Frachtmoleküle erweitert werden kann (Arrestine, Dab2, GGAs, Hrs; McMahon und Mills, 2004). Die Clathrin-Polymerisierung zur Ausbildung der Vesikelhülle kann durch die zeitgleiche Konzentrierung von weiteren Faktoren, wie Epsin an der Clathrin-angereicherten Membran-Mulde (*clathrin coated pit*) verstärkt werden (Ford *et al.*, 2002).

Clathrin ist als Oligomer aus drei leichten und drei schweren Ketten aufgebaut, die sich zu einem Triskelion zusammenlagern (Smith und Pearse, 1999). Die schweren Ketten (190 kDa) sind über ihr C-terminales Ende zu Trimeren verbunden. Am N-terminalen Ende befinden sich die Bindungsmotive für die Interaktionen mit Adapterproteinen (APs) oder Proteinen, die die Montage oder Demontage der Hülle regulieren (Epsin, AP180 oder Auxilin). Diese Proteine besitzen als Bindungsmotiv eine Clathrin-Box (Aminosäuren: LLDLD) (Owen und Luzio, 2000, Drake *et al.*, 2000). Die drei leichten Ketten (ca. 30 kDa) sind über ihre coiled-coil Region mit den Beinen der schweren Ketten verknüpft (Brodsky *et al.*, 2001) und besitzen ebenfalls

Bindungsmotive für Interaktionen mit anderen Proteinen. Die Triskelia lagern sich bei der Hüllbildung zu hexa- und pentagonalen Strukturen zusammen, wodurch ein runder, Fußball-ähnlicher Käfig um das Vesikel entsteht (Abb. 1.3).

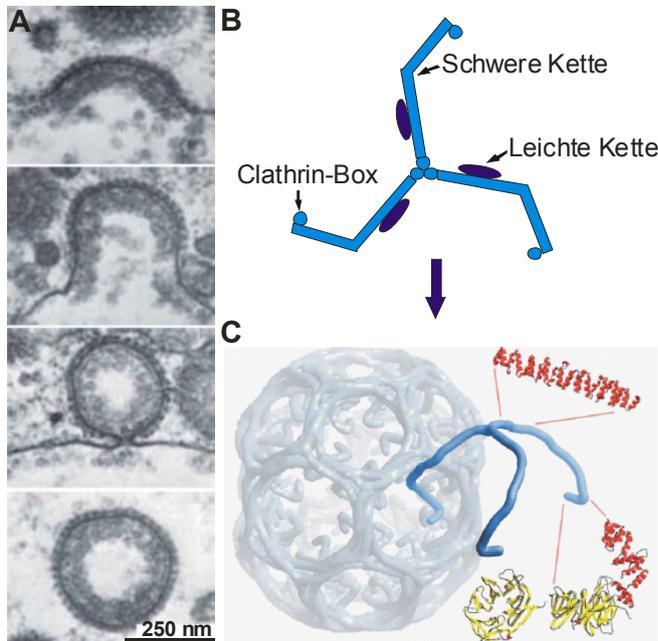


Abbildung 1.3: Bildung und strukturelle Zusammensetzung eines Clathrin-umhüllten Vesikels (CCV). Elektronen-mikroskopische Aufnahme der Vesikelbildung um Yolk Protein in Oocyten ((A) aus McMahon und Gallop, 2005), struktureller Aufbau des Clathrin-Triskelions (B) und Modell der fußball-ähnlichen Hülle um die Vesikel mit den Kristallstrukturen der Leichten Kette und der Clathrin-Box ((C) aus Kirchhausen, 2000).

Der Transportmechanismus der Clathrin-abhängigen Endocytose ist eher ein kontinuierlicher als ein stufenweiser Prozess, wobei die beteiligten Proteine über weitere Faktoren, wie Phosphorylierung, Monoubiquitinierung oder Dimerisierung reguliert werden (DiFiore *et al.*, 2003, Sigismund *et al.*, 2005). Abbildung 1.4 zeigt eine Übersicht der bislang identifizierten beteiligten Proteine und deren Interaktionen untereinander. Die braun markierten Proteine sind die Proteine, die die *Cargo*-Spezifität des Adapterproteins AP-2 erweitern, wodurch eine höhere Variabilität der transportierten Moleküle entsteht (Goodman *et al.*, 1996, Mishra *et al.*, 2002, Traub, 2003). Die Clathrin-abhängige Endocytose ist somit der Weg, über den die meisten *Cargo*-Moleküle transportiert werden.

Die Verknüpfung der Clathrin-umhüllten Vesikel mit dem Aktin-Cytoskelett erfolgt u.a. über die Proteinkomplexe *Dynamin-Profilin-Aktin*, bzw. *Dynamin-PACSIN-N-Wasp-Aktin* (Kessels und Qualmann, 2004). (Das in der Grafik aufgeführte Syndapin ist das Ratten-Homolog für PACSIN).

1.2.2 Caveolae

Während Clathrin ubiquitär in allen Zelllinien exprimiert wird und deshalb eine generelle Rolle in der Endocytose übernimmt, wurden Caveolae bislang nur in Adipocyten, Endothel-Zellen, Glatten Muskelzellen und Fibroblasten gefunden (Fra *et al.*, 2000). Die Formierung von Caveolae ist dabei abhängig von der Expression von Caveolin-1 (Caveolin-3 in Muskelzellen), welches ein integrales Membranprotein ist und direkt mit dem Cholesterin der Plasmamembran interagiert (Dupree *et al.*, 1993, Thiele *et al.*, 2000, Abb. 1.5). Die Plasmamembran-Mikrodomänen, an denen sich Caveolae formieren, sind ähnlich anderer *Lipid Rafts* stark angereichert an Glykosphingolipiden und Cholesterin und werden durch eine Verankerung des Aktincytoskeletts in der Membran immobilisiert (Thomsen *et al.*, 2002). An diesen Mikrodomänen kommt es zu einer Anhäufung von verschiedenen Rezeptoren, wodurch die Signaltransduktion in die Zelle gesteuert werden kann (Isshiki und Anderson, 1999, Drab *et al.*, 2001). Die endocytotische Rolle von Caveolae wird im Moment heftig diskutiert, da vermeintliche Marker für den caveolaren Aufnahmeweg, wie der SV40 oder Cholera Toxin in Zellen ohne Caveolae über andere Endocytose-Wege schneller endocytiert werden, als in Zellen mit Caveolae (Torgersen *et al.*, 2001, Kirkham *et al.*, 2005, Damm *et al.*, 2005). Es wird deshalb angenommen, daß Caveolae im Vergleich zu der Clathrin-abhängigen Endocytose quantitativ keine Rolle spielen, jedoch an der kurzweiligen Reorganisation der Plasmamembran beteiligt sind (Hommelgaard *et al.*, 2005).

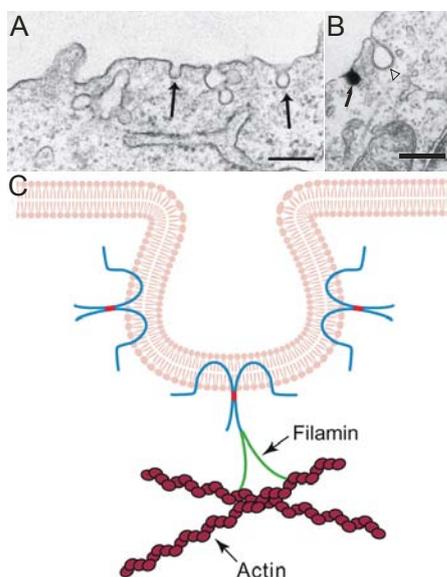


Abbildung 1.5: Auftreten von Caveolae und schematischer Aufbau. Caveolae werden an den Membranen von Adipocyten (A), Endothel-Zellen, Glatten Muskelzellen und Fibroblasten gefunden und sind über das Aktincytoskelett in der Plasmamembran verankert (C). Caveolae (schwarzen Pfeile) sind im Vergleich zu CCV (*clathrin coated vesicles*, offenes Dreieck) kleiner, beide Systeme kommen parallel in Zellen vor (B). Die Skalierungsbalken entsprechen 200 nm. (Modifiziert übernommen aus van Deurs *et al.*, 2003).

1.3 Sekretion

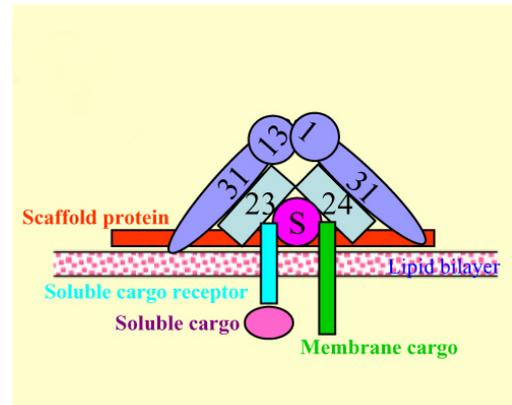
Der sekretorische oder biosynthetische Weg dient u.a. zum Transport von extrazellulären Proteinen und Plasmamembranbestandteilen, wobei die sekretierten Moleküle eine festgelegte Reihenfolge an Kompartimenten passieren müssen, in denen sie chemisch modifiziert werden (Alberts, 2001). Im ER werden die Proteine über ihre Disulfidbrücken miteinander verknüpft und außerdem glykosyliert. Auch eine Zusammenlagerung von einzelnen Proteinuntereinheiten zu einem Oligomer findet bei den meisten Proteinen bereits im ER statt. Vor dem ER-Austritt werden die Proteine auf ihre richtige Faltung überprüft und an den sekretorischen Ausgangsstellen (*ER exit sites*, ERES) in entsprechende Transportstrukturen verpackt und zum Golgi-Apparat geschleust. In den einzelnen Cisternen des Golgi wird die Glykosylierung der Moleküle abgeschlossen und die Proteine je nach Bestimmungsort sortiert. Die Verschmelzung der Transportstruktur mit der Plasmamembran und der damit verbundenen Freisetzung des Inhaltes der Transportstruktur bezeichnet man als Exocytose.

1.3.1 Transport von den *ER exit sites* (ERES) und Sekretorische Marker

Der in Hefen gefundene Transportweg neu synthetisierter Proteine vom ER zum Golgi-Apparat erfolgt über COPII-umhüllte Vesikel, die einen Durchmesser von ca. 60 nm aufweisen (Tang *et al.*, 2005). In *in vitro*-Studien konnten fünf Hauptkomponenten identifiziert werden, die für den Mechanismus essentiell sind (graphisch dargestellt in Abb. 1.6; Barlowe *et al.*, 1994). Die Initiation erfolgt durch die Rekrutierung der Ras-verwandten GTPase Sar1p in ihrer inaktiven GDP-gebundenen Form. Durch den GEF (*guanine nucleotide exchange factor*) Sec12p wird die GTPase aktiviert, wodurch die Anlagerung des Sec23p-Sec24p-Komplexes erfolgt und die Erkennung der zu transportierenden Frachtmoleküle eingeleitet wird (Kuehn *et al.*, 1998, Peng *et al.*, 2000). Die Krümmung der ER-Membran erfolgt durch die Anlagerung des cytosolischen Sec13p-Sec31p-Komplexes direkt an die Membran und an den gebundenen Sec23p-Sec24p-Komplex. Das COPII-umhüllte Vesikel kann durch die intrinsische Aktivität der beteiligten Proteine von der ER-Membran losgelöst werden. Die Inaktivierung, also die GTP-Hydrolyse der Sar1p-

GTPase durch die GAP-Domäne des Sec23p-Proteins löst die Ablösung der Hüllproteine aus (Antonny *et al.*, 2001), ermöglicht aber auch die Interaktion von Sec23p mit den SNARE-Molekülen an der Akzeptormembran am Golgi (Kirchhausen, 2000).

Abbildung 1.6: Schematischer Aufbau des COPII-Komplexes. Die Initiations-GTPase Sar1p ist verantwortlich für die Rekrutierung und spätere Loslösung des Hüllkomplexes von der ER-Membran (Übernommen aus Tang *et al.*, 2005).



Der ER-Export an den sekretorischen Ausgangsstellen (ERES) ist temperaturabhängig und kann deshalb bei Temperaturen unter 15°C blockiert werden, was mit GFP-fusiunierten Strukturkomponenten (Sec13-GFP) oder Frachtmoleküle (GFP-VSV-G, *vesicular stomatitis virus-G-protein*; GFP-PCI, *Procollagen I*) als Marker visualisiert werden kann. Da COPII-umhüllte Vesikel nur einen Durchmesser von 60 nm aufweisen, scheint dieser Transportmechanismus für große Makromoleküle, wie das trimere Procollagen I (PCI) mit einer Länge von über 300 nm nicht geeignet zu sein (Bonfanti *et al.*, 1998, Stephens und Pepperkok, 2002, Fromme und Schekman, 2005). Durch Verwendung von CLEM und CVEM (*correlative light/video electron microscopy*) konnten Mironov *et al.* (2003) für VSV-G und PCI verschiedene Stadien im ER-Golgi-Transport identifizieren. VSV-G colokalisiert im ersten Schritt mit den COPII-positiven ERES, die nachfolgenden teilweise tubulären Transportstrukturen weisen jedoch keine COPII-Hülle auf. Für die Sekretion von Procollagen I aus dem ER konnte keine Überlappung der Ausgangsstellen mit den COPII-ERES gezeigt werden, sie liegen zwar in räumlicher Nähe, sind aber klar voneinander getrennt. Auch PCI wird teilweise über tubuläre Transportstrukturen transportiert, die eine Ausdehnung von 400 nm aufweisen können (Palmer und Stephens, 2004). Abbildung 1.7 zeigt die daraus entwickelten ER-Export-Modelle.

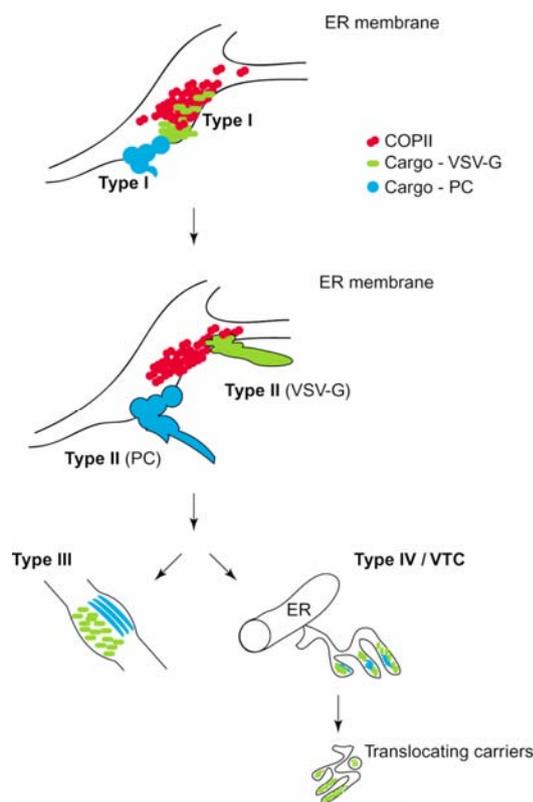


Abbildung 1.7: Neue Modelle für den ER-Export von Cargos (Frachtmolekülen). Modelle basieren auf den Ergebnissen der CLEM- und CVEM-Studien (*correlative light/video electron microscopy*) von Mironov *et al.* (2003), wonach COPII-positive ERES mit VSV-G als *Cargo* und COPII-negative ERES mit PCI als *Cargo* existieren (Typ I). Diese resultieren in der Heranreifung von teilweise tubulären Transportern (Typ II). Der anschließende Transport zum Golgi erfolgt über neu identifizierte, COPII-/ COPI-negative tubuläre Strukturen (Typ III) oder über ERGICs entlang der Mikrotubuli (*ER-Golgi-intermediate-compartment*, auch VTC (*vesicular-tubular carriers*) genannt, Typ IV). Weitere Abkürzungen: **COP**: *coat protein complex*; **ERES**: *ER exit sites*; **PC**: *Procollagen*; **VSV-G**: *vesicular stomatitis virus-G-protein*. (Übernommen aus Palmer und Stephens, 2004).

Auch für die Sekretion von Lipoproteinen, wie ApoB-48 über große *Chylomikronen* ist ein COPII-unabhängiger Mechanismus identifiziert worden (Siddiqi *et al.*, 2003, Fromme und Schekman, 2005), was auf eine weitere Variabilität des ER-Exportes hindeutet.

1.3.2 Post-Golgi-Carrier

Im Golgi-Apparat werden die zu sekretierenden Frachtmolekülen final glykosyliert und im *Trans-Golgi-Network* (TGN) nach ihrem Bestimmungsort (Plasmamembran, Endosomales/ Lysosomales System) sortiert (Polishchuk und Mironov, 2004). Dazu werden sie in vesikuläre oder tubuläre *Post-Golgi-Carrier* verpackt, wobei die Sortierung der *Cargos* von Signalen wie Glykosylierung, GPI- oder Transmembran-Ankern und Aminosäure-Motifen abhängt (Hirshberg *et al.*, 1998, Kreitzer *et al.*, 2003). Der Transport zur Plasmamembran ist abhängig von einem intakten Mikrotubuli-Netzwerk (Toomre *et al.*, 1999). Zur Identifizierung der verschiedenen Transportwege in polarisierten Epithelzellen oder migrierenden Fibroblasten

verwendeten Kreitzer *et al.* (2003) und Schmoranzer *et al.* (2003) GFP-Fusionsproteine, die entweder zur apikalen Plasmamembran (p75-GFP; GPI verankerte Proteine (Nichols *et al.*, 2001)) oder zur basolateralen Plasmamembran (LDLR-GFP; VSV-G (Polishchuk *et al.*, 2000)) sortiert wurden.

In nicht polarisierten Zellen konnten kleine Moleküle, wie VSV-G in tubulären Post-Golgi Transportstrukturen gefunden werden, die jedoch heterogen in ihrer Form sein können (Polishchuk *et al.*, 2000 und 2003). Große *Cargos*, wie das trimere PCI werden über die gleichen Transportstrukturen an die Plasmamembran transportiert (Canty und Kadler, 2005).

1.4 GTPasen in vesikulären und tubulären Transportmechanismen

1.4.1 Strukturvergleich von GTPasen und ATPasen

Sowohl GTPasen, als auch ATPasen spielen bei intrazellulären Transportmechanismen eine regulierende Rolle. Beispiele für den Einfluß von kleinen GTPasen sind Arfs und Rabs oder das Mechanoenzym Dynamin als große GTPasen. ATPasen, wie Hsc70 aktivieren die Loslösung der Clathrin-Hülle in der Clathrin-abhängigen Endocytose und lösen die Bildung des Mikrotubuli-Netzwerkes aus. Strukturell unterscheiden sich beide Enzym-Klassen in der Aminosäurezusammensetzung ihrer Nukleotid-bindenden Domänen (Sablin und Fletterick, 2001, Vetter und Wittinghofer, 2001). Für die Bindung des α - und β -Phosphates des Nukleotides (GTP/ATP) ist die G1-Box (WalkerA-Motif, p-loop: *phosphate binding loop*) verantwortlich, die *switch Regionen* G2 und G3 koordinieren die Bindung des γ -Phosphates, wobei die Aminosäuren in Wechselwirkung mit einem Magnesium-Ion (Mg^{2+}) treten (Bourne *et al.*, 1990). Die Spezifität von GTP/ATPasen für ein Nukleotid wird durch die Aminosäuren der G4-Box reguliert, so entsteht die Spezifität bei GTPasen für Guanin über die Seitenkette des Aspartates, das eine Wasserstoffbrückenbindung mit der Base eingeht. Tabelle 1.2 zeigt einen Vergleich der Consensus-Sequenzen von GTPasen und ATPasen der einzelnen Strukturelemente.

1. Einleitung

Region	G1 P-loop	G2 switch region I	G3 switch region II	G4 Nukleotid-spezifisch
GTPasen	GxxGxGKS/T	D – (x) _n - T	DxxG	NKxD
ATPasen	GxxGxGKS/T	NxxSSR	DxxG	RxRP /NP

Tabelle 1.2: Vergleich der Consensus-Sequenzen von GTPasen und ATPasen. Die Spezifität der Enzyme entsteht durch die Interaktion der Aminosäuren der G4-Box mit den jeweiligen Nukleotiden (nach Bourne *et al.*, 1990).

1.4.2 Kleine, monomere GTPasen im Gegensatz zu Mechanoenzymen

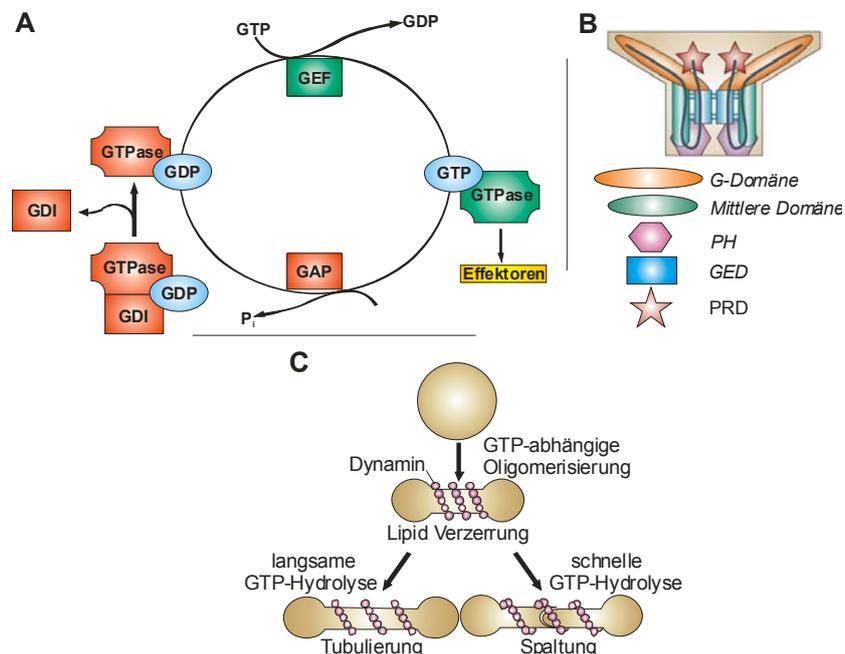
Kleine, monomere GTPasen (z.B. Ras, Rab, Arf) durchlaufen in ihrer Nukleotidbindung einen funktionalen Zyklus, wobei die GDP-Bindung den inaktiven und die GTP-Bindung den aktiven Zustand des Enzyms widerspiegelt (Hall, 2001, Abb. 1.8 (A)). In der Konformation der aktiven Form tritt die GTPase mit den Effektoren in Wechselwirkung, die durch die bei der GTP-Hydrolyse entstehende Energie "aktiviert" werden. Bei Ras-GTPasen müssen beide funktionalen Zustände aufgrund der hohen Affinitäten zu GTP und GDP durch weitere Proteine reguliert werden: die GTP-Hydrolyse wird durch die eigene (intrinsische) GTPase-Aktivität oder durch Mithilfe eines GAP (*GTPase-activating protein*) ausgelöst (Krauss, 1997).

GEFs (*guanine nucleotide exchange factor*) tauschen das an der Nucleotid-Bindungsstelle gebundene GDP gegen ein GTP aus, was zu der Konformationsänderung und Aktivierung der GTPase führt (Kosloff und Selinger, 2001). Die Aktivierung wiederum wird durch einen GDI (*GDP dissociation inhibitor*) reguliert, an den die GTPase in der inaktiven GDP-gebundenen Form assoziiert ist und der die GTPase in einer Art Wartezustand hält, bis sie in der aktiven Form benötigt wird (Krauss, 1997).

Bei großen GTPasen reguliert die Nukleotidbindung die eigene Konformation, so daß sie als Mechanoenzyme wirken können. Dazu müssen sie mindestens als Dimer vorliegen, so daß sich die einzelnen Monomere durch GTP-Hydrolyse als Effektoren autoaktivieren können. Ein Beispiel für die Funktion eines solchen Mechanoenzym im intrazellulären Vesikeltransport ist die GTPase Dynamin.

Dynamin

Die Dynamin Superfamilie ist nicht nur durch ihre größere G-Domäne im Vergleich zu Ras-GTPasen charakterisiert, ihre GTPase-Aktivität ist auch abhängig von ihrer Oligomerisierung (Praefcke und McMahon, 2004). Außerdem haben Dynamine eine schwache Affinität zu GTP und noch schwächere Affinität zu GDP, wobei sie unter den physiologischen Bedingungen in der Zelle konstitutiv GTP gebunden haben (Krishnan *et al.*, 2001). Elektronen-mikroskopische Aufnahmen und biochemische Analysen zeigen, daß die GED-Domäne (*GTPase effector domain*) mit der G-Domäne in Wechselwirkung tritt und somit die GTP-Hydrolyse beeinflusst wird (Muhlberg *et al.*, 1997, Smirnova *et al.*, 1999, Okamoto *et al.*, 1999, Zhang und Hinshaw, 2001). Die Oligomerisierung von Dynamin wird durch die Rekrutierung an Membranen über die Dynamin-PH-Domäne (PH: *pleckstrin homology*) reguliert (Klein *et al.*, 1998, Lemmon und Furguson, 2000). Zusammengefasst lässt sich die molekulare Dynaminfunktion als "Oligomerisierungs-abhängige GTPase Aktivität nach Membranbindung" bezeichnen (Praefcke und McMahon, 2004). Die physiologische Funktion der Dynamin Superfamilie liegt in der Abschnürung von Membranausstülpungen, wie Vesikeln oder sich teilenden Organellen, wie Mitochondrien. Eine schnelle GTP-Hydrolyse führt *in vitro* zum Abschneiden der Membranausstülpungen, eine langsame Hydrolyse zu einer Tubulierung der Lipidmembran (Praefcke und McMahon, 2004). Abbildung 1.8 zeigt den Domänenaufbau von Dynamin (**B**) und ein Modell der Funktion (**C**).



1. Einleitung

Vorherige Seite:

Abbildung 1.8: Funktionaler Zyklus von kleinen, monomeren GTPasen, Domänenaufbau von Dynamin und Modell der Dynamin-Funktion. (A) Kleine, monomere GTPasen wechseln zwischen dem inaktiven GDP-gebundenen und dem aktiven GTP-gebundenen Zustand. Reguliert werden sie dabei durch GAPs, GEFs und GDIs. (B) Schematische Darstellung der Zusammenlagerung von Dynamin zu einem Dimer, wodurch die G-Domäne und die GED in räumliche Nähe zueinander gelangen. (C) Auswirkungen der GTPase Aktivität *in vitro* auf Lipidmembranen. Nach Bindung an ein Liposom bildet Dynamin eine Helix, was zu einer Tubulierung der Lipidmembran führt. Die durch GTP-Hydrolyse ausgelöste Konformationsänderung führt zu einer Verlängerung der tubulären Struktur und anschließend zur Spaltung. Abkürzungen: **GAP**: *GTPase activating protein*; **GEF**: *guanine nucleotide exchange factor*; **GDI**: *GDP dissociation inhibitor*; **PH**: *pleckstrin homology*; **GED**: *GTPase effector domain*; **PRD**: *proline rich region*. ((A) übernommen aus Bernards und Settleman, 2004, (B, C) modifiziert übernommen aus Praefcke und McMahon, 2004).

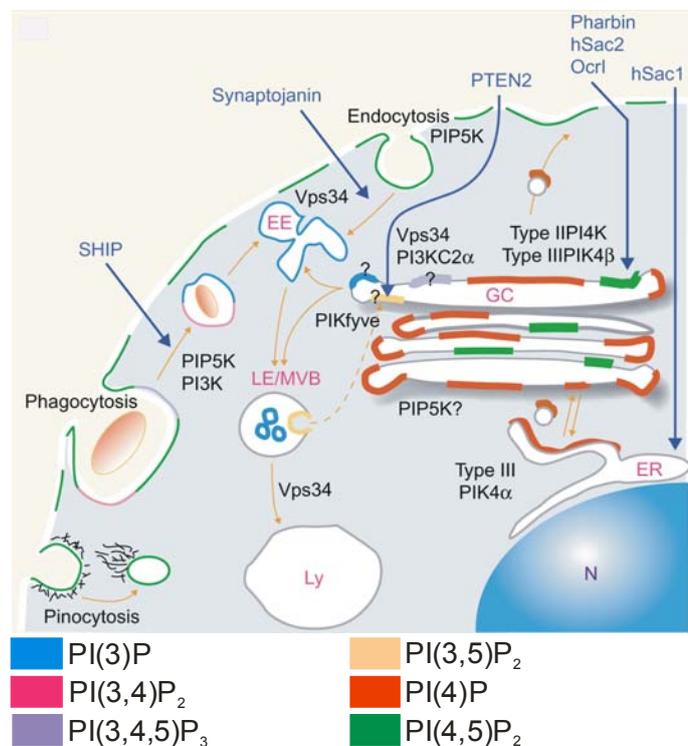
1.5 Zusammensetzung biologischer Membranen und Lipidbindungsdomänen von Proteinen

1.5.1 Phosphoinositide markieren Membranen

Die amphiphatischen Doppellipid-Membranen bestehen aus jeweils zwei hydrophilen "Köpfen" und hydrophoben "Schwänzen", wobei die Köpfe dem umgebenden wässrigen Medium zugewandt sind. Die Membranen sind in der Zusammensetzung der hydrophilen Lipidkomponenten asymmetrisch aufgebaut, man findet an dem cytosolischen Teil der Membran überwiegend Phosphatidylserin, Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylinositole (Phosphoinositide). Der dem extrazellulären Raum zugewandte Teil der Membran ist angereichert an Phosphatidylcholin, Sphingomyelin und Glykolipiden (Cho und Stahelin, 2005). Die Fluidität der Doppellipid-Membran ist abhängig von ihrer Phospholipidzusammensetzung und dem Sättigungsgrad der Kohlenwasserstoffketten im hydrophoben "Schwanz"-Teil der Membran. Je "gesättigter", also je stärker die Ketten der Moleküle untereinander verknüpft sind, desto geringer ist die Fluidität. Das Sterol Cholesterin beeinflusst ebenfalls die Fluidität und somit Permeabilität der Membran in tierischen Zellen, da es sich zwischen die ungesättigten Kohlenwasserstoffketten einlagert und die Membran an den Stellen "versteift" (Alberts, 2001).

Proteine erkennen Membranen über deren Phosphoinositid-Zusammensetzung auf der cytosolischen Seite. Sie besitzen spezifische Lipidbindungsdomänen, die eine Rekrutierung an die entsprechende Organell-Membran ermöglichen. Die Anreicherung von Phosphoinositiden an den Organell-Membranen wird durch dort lokalisierte Phosphatidylinositol-Kinasen und –Phosphatasen bestimmt. Abbildung 1.9 zeigt die subzelluläre Verteilung der einzelnen Phosphoinositide in eukaryotischen Zellen. Das Monophosphat PI(3)P ist an endosomalen Membranen lokalisiert (Gillooly *et al.*, 2000 und 2003, Lemmon, 2003), das Monophosphat PI(4)P ist überwiegend an den Membranen der sekretorischen Organellen angereichert (Audhya *et al.*, 2000, Foti *et al.*, 2001). Das Diphosphat PI(4,5)P₂ reguliert endocytotische Vorgänge bzw. die Verknüpfung mit dem Actin-Cytoskelett und ist deshalb überwiegend an der Plasmamembran zu finden. Es ist jedoch auch an Transportvorgängen am Golgi-Apparat beteiligt (Godi *et al.*, 2004). Die unterschiedlichen Lipidbindungsdomänen, die zur Membran-Rekrutierung von Proteinen oder zur Membran-Modulation dienen, werden im nachfolgenden Abschnitt beschrieben.

Abbildung 1.9: Subzelluläre Lokalisation der Phosphoinositide bedingt durch Kinasen (schwarz) und Phosphatasen (blau). Das Monophosphat PI(4)P ist überwiegend an den sekretorischen Organellmembranen zu finden, das Diphosphat PI(4,5)P₂ sitzt an Teilen der Golgi-Membran, ist jedoch überwiegend an der Plasmamembran zu finden. Abkürzungen: **EE:** early endosomes; **LE:** late endosomes; **Ly:** lysosomes; **MVB:** multivesicular bodies; **GC:** Golgi complex; **ER:** endoplasmic reticulum; **N:** nucleus (Übernommen aus De Matteis *et al.*, 2002).



1.5.2 Lipidbindungsdomänen

Proteine können verschiedene Interaktionsmodule aufweisen, die einerseits zur spezifischen Rekrutierung des Proteins über die Bindung an Phosphoinositide der Membran führen und/oder andererseits eine aktive Modulierung der Membran auslösen können (Lemmon, 2003). Die einfachsten Interaktionsmodule sind dabei Palmitoyl- oder Myristoylanker, wie bei den monomeren GTPasen der Arf-Familie. Komplexer sind die Module zur spezifischen Bindung an Phosphoinositide: Strukturvergleiche zeigten, daß eine hohe Spezifität und Affinität für ein Phosphoinositid durch die Bildung einer "Bindungstasche" entsteht, wobei mehrere Aminosäuren mit den Phosphaten in Wechselwirkung treten können (*PH*-Domäne mit Spezifität für $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$; Klarlund *et al.*, 1997, Kojima *et al.*, 1997). Flachere "Bindungsmulden" können durch Dimerisierung der Domäne stabilisiert werden (*FYVE*, *PX*; Lawe *et al.*, 2000, Dumas *et al.*, 2001) und erlangen ihre Spezifität durch eine Interaktion mit einer festgelegten Anzahl an Phosphaten (Monophosphat $\text{PI}(3)\text{P}$; Lemmon, 2003). Superhelikale Bindungsstrukturen ohne Ausbildung einer Mulde oder Tasche, wie die *ANTH*-Domäne von AP180 oder die AP-2 α -Untereinheit binden nur mit einer geringen Affinität an $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ (Collins *et al.*, 2002, Ford *et al.*, 2001). Bei der struktur-ähnlichen *ENTH*-Domäne von Epsin wird nach $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ -Bindung eine amphiphatische Helix in die Membran eingeschoben (Penetration), was zu einer aktiven Membrankrümmung führt (Ford *et al.*, 2002). Eine N-terminale amphiphatische Helix konnte auch bei *N-BAR* Proteinen (Amphiphysin, Endophilin) nachgewiesen werden, die ebenfalls zu einer Penetration der Membran führt (Peter *et al.*, 2004). Die eigentliche Bindung an die Lipidmembran entsteht durch die α -helikale, Bananen-Struktur der *BAR*-Domäne, die von der Dimersierung der Domäne abhängt und mit hoher Affinität an bereits gekrümmte Membranen bindet (McMahon und Gallop, 2005). Eine Bindungstasche oder -Mulde für ein Phosphoinositid existiert für diese superhelikalen Lipidbindungsdomänen nicht.

Die einzelnen Lipidbindungsdomänen können in ihrer Spezifität für Phosphoinositide eine hohe Variabilität aufweisen, wofür die *PH*-Domäne von Dynamin 2 ein Beispiel ist. Da Dynamin 2 am Golgi-Apparat die Transportstrukturen für verschiedene Wege "abschneidet", bindet die *PH*-Domäne an alle dort vorkommenden Phosphoinositide mit Ausnahme an das sekretorische $\text{PI}(4)\text{P}$ (De Matteis *et al.*, 2002).

Domäne	Protein	Spezifität	Lokalisation	Bindungsmechanismus	Tubulierung	Funktion
PH	Dynamamin 2	PI(4,5)P ₂ , PI(3,4)P ₂ , PI(3,4,5)P ₃	Trans-Golgi- Netzwerk	zunächst nicht-spezifische elektrostatische Wechselwirkungen, gefolgt von spezifischer Bindung mit hoher Affinität an Phosphoinositide; keine Penetration	ja	"Oligomerisierungs-abhängige GTPase Aktivität nach Membranbindung"
FYVE	Rabenosyn-5	PI(3)P	(Golgi-)Endosomen- Transport	spezifische Bindung an PI(3)P über Taschenform der Bindungsdomäne, stabilisiert durch Proteindimerisierung; schwache Penetration der Membran	nein	Rekrutierung des Rab5-Effektor an Membranen, (EHD1-Bindungspartner)
PX	Sorting Nexin 3	PI(3)P	PI(3)P-bindende: Frühe Endosomen, PS-reiche Membranen	ähnlich wie bei FYVE-Domänen: spezifische Bindung an Phosphoinositid mit verbundener schwacher Penetration der Membran (möglich: Stabilisierung durch Dimerisierung)	-	Rekrutierung an die Membran
ENTH	Epsin	PI(4,5)P ₂	Plasmamembran	nach Bindung des Phosphoinositids in der PI(4,5)P ₂ -Bindungsfurche kommt es zur Konformationsänderung, so daß eine amphiphatische Helix die Membran penetriert	ja	Membrankrümmung
ANTH	AP180	PI(4,5)P ₂	Plasmamembran	PI(4,5)P ₂ -Bindung wirkt als Brücke zwischen Protein und Membran, keine Tasche oder Furche; keine Penetration	nein	Stabilisierung der Membrankrümmung (?)
BAR	Amphiphysin	"gekrümmte Membranen"	Plasmamembran	Dimerisierungs-abhängige Ausbildung der BAR-Domäne, Kationen-Gruppen binden an Anionen der Membranen; zusätzlich: N-terminale, amphiphatische Helix, die zur Penetration der Membran führt	ja	Stabilisierung der Membrankrümmung, Membrankrümmung durch amphiphatische Helix

1. Einleitung

Vorherige Seite:

Tabelle 1.3: Zusammenfassung der relevanten Lipidbindungsdomänen im intrazellulären Vesikeltransport. Aufgelistet sind die verschiedenen Lipidbindungsdomänen mit jeweiligem Proteinbeispiel, deren Spezifität für Phosphoinositide und die daraus resultierende Lokalisation. Außerdem wird der Bindungsmechanismus, die Fähigkeit *in vitro* Liposomen zu tubulieren und die Funktion der Lipidbindung aufgeführt. (-: nicht getestet)

Eine Membran-modulierende Funktion kann eher den superhelikalen Bindungsdomänen mit verbundener Penetration der Membran z.B. durch amphiphatische Helices zugesprochen werden, während Bindungstaschen oder –mulden zur Rekrutierung von Proteinen an Phosphoinositid-angereicherte Membranen dienen. Ein Indiz für eine Membran-modulierende Funktion eines Proteins ist die Fähigkeit, *in vitro* Liposomen zu tubulieren, was auf der durch das Protein ausgelösten Membrankrümmung beruht.

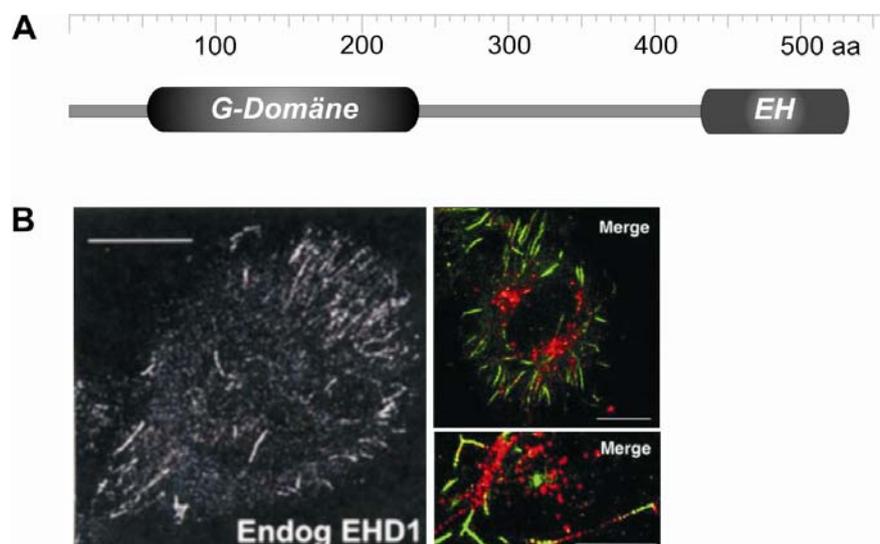
1.6 EHD-Proteine

1.6.1 Modularer Aufbau und Rolle im Vesikeltransport

Die EH-Domäne (*Eps15-homology-domain*) ist ein aus ca. 100 Aminosäuren bestehendes Interaktionsmodul zur Interaktion mit NPF-Motifen (Asparagin-Prolin-Phenylalanin) anderer Proteine und wurde zuerst für das Protein Eps15 beschrieben, das den EGF-R (*epidermal growth factor-receptor*) an die *Recycling*-Maschinerie der Clathrin-abhängigen Endocytose koppelt (Wong *et al.*, 1995). EH-Domäne weisen dabei einen hohen Homologie-Grad zueinander auf und beinhaltet zwei Helix-Loop-Helix-Motive, die ein Calcium-Ion binden können (EF-Hand; Confalonieri und Paolo Di Fiore, 2001). Alle bislang publizierten Proteine mit EH-Domänen sind am intrazellulären Vesikeltransport beteiligt (Confalonieri und Paolo Di Fiore, 2001) und weisen neben der EH-Domäne, Module zur Oligomerisierung (Eps15, Rabenosyn-5, Intersectin1) und/ oder zur Interaktion mit anderen Proteinen (SH3, Intersectin 1; PRD, Synaptojanin) und/ oder zur Lipidbindung auf (Intersectin 1; Montesinos *et al.*, 2005).

Die EHD-Proteinfamilie (*EH domain containing proteins*) besitzt neben ihrer C-terminalen EH-Domäne eine N-terminale Dynamin N-ähnliche G-Domäne (*Pfam*, *InterPro*) mit Anschluss eines hydrophoben Bereiches, der von verschiedenen Gruppen als coiled-coil-Domäne bezeichnet wird (Caplan *et al.*, 2002, Galperin *et al.*, 2002, Lee *et al.*, 2005; Abb. 1.10 (A)). Obwohl Datenbanken die G-Domäne der EHD-Proteine der Dynamin-Superfamilie zuordnen und Vergleiche mit den Consensus-Sequenzen von ATPasen und GTPasen diese klar als GTPase ausweisen (Naslavsky und Caplan, 2005, Montesinos *et al.*, 2005, eigene Daten), wurde eine ATP-Bindung und -Hydrolyse publiziert (Lee *et al.*, 2005). Mutationen in der EHD1-Nukleotidbindungsstelle führen zu einer feinen cytosolischen Verteilung des Proteins und verhindert die Assoziation an Membranen (Lin *et al.*, 2001, Caplan *et al.*, 2002). Gleichzeitig wird die Fähigkeit zur Homo-Oligomerisierung von EHD1 (Lee *et al.*, 2005) und zur Hetero-Oligomerisierung zwischen EHD1 und EHD3 herabgesetzt (Naslavsky *et al.*, 2006).

Endogenes und überexprimiertes EHD1 lokalisiert an tubulären Transportstrukturen und ist in den Transport von verschiedenen Rezeptoren vom ERC (*endocytic recycling compartment*) zurück an die Plasmamembran involviert, wie z. B. die Rezeptoren Transferrin (Grant *et al.*, 2001, Lin *et al.*, 2001), GLUT4 (*Insulin-responsive glucose transporter 4*; Guilherme *et al.*, 2004) und MHCI (*Major histocompatibility complex class I*; Caplan *et al.*, 2002; Abb. 1.10 (B)). Auch für die anderen Isoformen wurde eine Beteiligung an der Endocytose von Rezeptoren beschrieben, so reguliert EHD4 den endocytotischen Transport von NGF (*nerve growth factor*) und seinen Rezeptor (TrkA) in PC12-Zellen (Shao *et al.*, 2002).



1. Einleitung

Vorherige Seite:

Abbildung 1.10: Modularer Domänenaufbau der EHD-Proteine (A) und Beteiligung von EHD1 am Rezeptor-Recycling. Alle EHD-Proteine haben einen vergleichbaren modularen Domänenaufbau: eine N-terminale G-Domäne und eine C-terminale EH-Domäne (A). Sowohl endogenes (B, links), als auch überexprimiertes EHD1 (GFP-EHD1, grün, rechts) ist an tubulären Transportstrukturen assoziiert, die partiell z. B. den MHC1 beinhalten (rot, rechts). ((B) übernommen aus Naslavsky *et al.*, 2006 und Caplan *et al.*, 2001)

1.6.2 Bindungspartner

Für die EHD-Proteine sind verschiedene direkte und indirekte Interaktionspartner beschrieben worden, die meisten Wechselwirkungen erfolgen über die C-terminale EH-Domäne mit den NPF-Motifen von den Interaktionspartnern. Alle Interaktionspartner haben eine Funktion in endocytotischen Mechanismen, die sowohl Clathrin-abhängig, als auch -unabhängig sind, oder in der Kopplung der endocytotischen Maschinerie an das Aktin-Cytoskelett (Naslavsky und Caplan, 2005). Manche Interaktionspartner weisen mehrere NPF-Motife auf, wie der Rab4/Rab5-Effektor Rabenosyn-5, der über die zwei ersten NPF-Motife mit den EHD-Proteinen interagiert (Naslavsky *et al.*, 2004). Das Adapterprotein Numb hat nur ein einziges NPF-Motif, womit es mit EHD4 interagiert (Smith *et al.*, 2004).

EHD2 ist über die Interaktion mit EHBP1 (*EH binding protein 1*) in Adipocyten an das Aktin-Cytoskelett gekoppelt., Die Überexpression eines der beiden Proteine führt zu einer umfassenden Reorganisation von Aktin und einer Herabsetzung der Internalisierung von Transferrin (Guilherme *et al.*, 2004).

Die Interaktion zwischen den EHD-Proteinen und Rab11-FIP2 oder PACSIN/Syndapin scheint von der Nukleotidbindung abhängig zu sein, da Mutanten in der Nukleotidbindungsstelle (EHD1/ EHD3 G65R) die Interaktion negativ beeinträchtigen (Braun *et al.*, 2005, Naslavsky *et al.*, 2006). Die herabgesetzte Bindung zwischen den EHD1 und EHD3 G65R-Mutanten und Rab11-FIP2 in einem Hefe-Two-Hybrid-Experiment beruht wahrscheinlich auf der inhibierten EHD-Oligomerisierung (Naslavsky *et al.*, 2006). Tabelle 1.4 zeigt eine Übersicht der Interaktionspartner der einzelnen Isoformen.

Die Deletion oder Mutation der EH-Domäne von EHD1 resultiert in einer Arretierung von verschiedenen Rezeptoren, wie Transferrin und MHC1 in den Strukturen des *Recycling* Kompartimentes (Grant *et al.*, 2001, Lin *et al.*, 2001, Caplan *et al.*, 2002)

und hält sie vom Rücktransport zur Plasmamembran ab. Gleichzeitig ist EHD1 nicht länger an tubulären Strukturen assoziiert.

Die allgemeine Hypothese zur Funktion der EHD-Proteine ist deshalb, daß sie Nukleotid-abhängig an Transportstrukturen assoziiert sind bzw. die Bildung von Transportstrukturen auslösen und daß die Interaktion mit den NPF-Motifen der Bindungspartner das Andocken oder Ablösen der Transport-Carrier an ein oder von einem Kompartiment ermöglicht. Im Falle von EHD1 handelt es sich dabei um das ERC (Naslavsky und Caplan, 2005).

Isoform	Interaktionspartner	Interaktionsdomäne	Referenz
EHD1/ Rme-1/ δ EHD1	IGF-R1	-	Rotem-Yehudar <i>et al.</i> , 2001
	SNAP29/GS32	EH-Domäne	" ; Xu <i>et al.</i> , 2004
	AP-2 α -Adaptin	-	Rotem-Yehudar <i>et al.</i> , 2001
	Clathrin heavy chain	-	"
	PACSIN/ Syndapin I/ II	EH-Domäne	Xu, <i>et al.</i> , 2004; Braun <i>et al.</i> , 2005
	Rabenosyn-5	EH-Domäne	Naslavsky <i>et al.</i> , 2004
	Epsin	EH-Domäne	Naslavsky und Caplan, 2005
	Stonin2	EH-Domäne	Naslavsky und Caplan, 2005
EHD2	Numb	EH-Domäne	Smith <i>et al.</i> , 2004
	Rab11-FIP2	EH-Domäne	Naslavsky <i>et al.</i> , 2006
	GLUT4	-	Park <i>et al.</i> , 2004
	AP-1 μ 1	-	"
	AP-2 μ 2	-	"
	CALM	-	"
	EHBP1	EH-Domäne	Guilherme <i>et al.</i> , 2004a
Arp2/3	saurer Teil vor EH	Guilherme <i>et al.</i> , 2004b	
EHD3	Rabenosyn-5	EH-Domäne	Naslavsky <i>et al.</i> , 2004
	PACSIN/ Syndapin I/ II	EH-Domäne	Braun <i>et al.</i> , 2004
	Rab11-FIP2	EH-Domäne	Naslavsky <i>et al.</i> , 2006
EHD4	Numb	EH-Domäne	Smith <i>et al.</i> , 2004
	PACSIN/ Syndapin I/ II	EH-Domäne	Braun <i>et al.</i> , 2005

Tabelle 1.4: Übersicht der Interaktionspartner der EHD-Isoformen. Die meisten identifizierten EHD-Interaktionspartner interagieren über ihre NPF-Motife mit der EH-Domäne der EHD-Isoformen und haben ihre Funktion in der Endocytose oder der Kopplung der Endocytose an das Aktin-Cytoskelett.

1. Einleitung

1.7 Aufgabenstellung

Da bisher nur einzelne Aspekte der verschiedenen EHD-Proteine untersucht wurden, sollten zunächst durch Verwendung spezifischer Antikörper die Unterschiede und Gemeinsamkeiten der Familienmitglieder auf Gewebeverteilung und intrazellulärer Lokalisation analysiert werden.

Die funktionale Charakterisierung sollte exemplarisch anhand von EHD1 vorgenommen werden: Zur Überprüfung der enzymatischen Aktivität sollten Punktmutationen in der Nukleotidbindungstelle hergestellt und ein vergleichendes Experiment zur ATP- bzw. GTP-Hydrolyse durchgeführt werden. Der hohe Homologiegrad der G-Domäne zu den G-Domänen der Dynamin-Superfamilie ließ wie bei Dynamin eine "Oligomerisierungs-abhängige GTPase-Aktivität nach Membranbindung" vermuten, wozu zunächst die direkte Membranbindung der EHD-Proteine und die Oligomerisierung nachgewiesen werden sollte. Eine Nukleotid-abhängige Oligomerisierung wurde während der Durchführung der Experimente von zwei Gruppen publiziert (Lee *et al.*, 2005, Naslavsky *et al.*, 2006), weshalb der Schwerpunkt auf dem Nachweis der direkten Lipidbindung und dem Lipid-Bindungsmechanismus liegen sollte.

Die Mutation bzw. Deletion der EH-Domäne von EHD1 resultiert in der Arretierung von Rezeptoren im ERC (Grant *et al.*, 2001, Lin *et al.*, 2001, Caplan *et al.*, 2002), weshalb Deletionsmutanten der EH-Domäne auch für die anderen EHD-Proteine hergestellt und ihre Beteiligung an dem Rezeptor-*Recycling* untersucht werden sollten.

EHD4 ist an der ARF-6-abhängigen Makropinocytose des TrkA in PC12 Zellen beteiligt und bindet an das ARF-6 Adapterprotein Numb (Shao *et al.*, 2002, Smith *et al.*, 2004, Valdez *et al.* 2005), der Effekt einer Δ EH-Deletionsmutante wurde bislang nicht identifiziert. Endogenes EHD4 assoziiert in Huh-7 (Humane Hepatoma) Zellen endogen an großen tubulären Strukturen, weshalb in diesen Zellen die Funktion von EHD4 untersucht werden sollte. Durch Verwendung verschiedener Marker sollte zunächst das EHD4 Δ EH-positive Kompartiment identifiziert werden und gleichzeitig nach Frachtmolekülen oder *Cargos* für den EHD4-Transportweg gesucht werden.

2. Ergebnisse

Zur genaueren Charakterisierung der EHD-Proteinfamilie wurden mehrere Methoden herangezogen. Da die Proteinfamilie aus vier verschiedenen Mitgliedern besteht, sollten zunächst die Unterschiede der einzelnen Proteine durch die Erstellung eines Expressionsprofils deutlich gemacht werden. Des Weiteren sollte die endogene intrazelluläre Lokalisation von EHD1 – 4 geklärt werden.

Allen EHD-Proteine ist der stark konservierte Aufbau in der Domänenstruktur gemeinsam: eine weitgehend N-terminale G-Domäne, die C-terminale EH-Domäne und ein konservierter, hydrophober Bereich nach der G-Domäne. Die funktionale Analyse dieser einzelnen Proteindomänen wurde aufgrund des hohen Konservierungsgrades der Isoformen untereinander exemplarisch an EHD1 vorgenommen. Dazu wurden Deletions- und Punktmutationen der Proteindomänen von EHD1 hergestellt und für die verschiedenen funktionalen Experimente herangezogen. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die Punktmutation in der G-Domäne (T72/75N) und die Deletion der EH-Domäne für alle Isoformen vorgenommen und der Effekt auf die intrazelluläre Lokalisation der Proteine nach Überexpression in Fibroblasten untersucht.

Anhand von EHD4 wurde anschließend der Effekt dieser beiden Mutationen in humanen Hepatoma Zellen (Huh-7) auf die Sekretion von unterschiedlichen GFP-markierten Markern untersucht und versucht, den genauen Transportweg von EHD4 zu klären.

2.1 Expression der einzelnen EHD-Proteine

2.1.1 Gewebeverteilung und intrazelluläre Lokalisation auf Proteinebene

Die Gewebeverteilung der EHDs auf Proteinebene wurde bereits in Blume (2002) und Halbach (2003) beschrieben und ist hier nur für den weiteren Vergleich der Isoformen untereinander herangezogen worden (Abb. 2.1.1 (A)). Es zeigte sich auf Proteinebene eine ubiquitäre Verteilung für EHD1 in allen getesteten Geweben, EHD2 wird in Thymus, Herz, Muskel, Lunge, Niere und Testis stark und schwach in

Leber und Milz exprimiert. Die Expression von EHD3 konnte in Hirn, Leber und Niere nachgewiesen werden. Schwache Banden zeigten sich auch in Milz und Lunge. Für EHD4 konnte eine starke Expression des Vollängen-Proteins in Herz, Milz, Lunge und Niere und eine schwächere Expression in Thymus und Muskel gezeigt werden. Für EHD4 wurden auf mRNA-Ebene in Hirn, Herz, Leber, Lunge und Niere zwei Expressionsbanden in der Höhe von 2,7 kb und 3,6 kb detektiert (Pohl *et al.*, 2000, Shao *et al.*, 2002), weshalb die Autoren von alternativem *Splicing* ausgehen. Die genomische Organisation des murinen EHD4 Genes zeigt, daß die *Splice*-Donorstellen von Exon 5 und Exon 6 eine identische Codonphase aufweisen, was eine kleinere EHD4-Variante ohne Exon 5 in Hirn erklären würde. Allerdings konnten per RT-PCR aus Maus-Hirn-RNA keine EHD4-Transkripte mit Deletion von Exon 5 identifiziert werden (M. Plomann, persönliche Mitteilung). Da außerdem keine alternativen ATG-Startstellen für EHD4 gefunden werden konnten, wird nun eine vermutet, daß die EHD4-Deletion auf Protein-Ebene durch eine spezifische Protease-Schnittstelle entstanden ist.

Die Western-Blot-Ergebnisse entsprechen weitgehend den veröffentlichten Northern-Blot-Daten (Mintz *et al.*, 1999, Pohl *et al.*, 2000, Shao *et al.*, 2002).

Da bei den EHD Proteine eine Überlappung der Expression in verschiedenen Gewebetypen (u.a. in Hirn) gezeigt werden konnte und ebenso eine Interaktion von EHD1 mit EHD3 beschrieben wurde (Galperin *et al.*, 2002, Naslavsky *et al.*, 2005), sollte die genaue intrazelluläre Lokalisation der Isoformen bestimmt werden (Abb. 2.1.1 (B) und 2.1.2). Dazu wurde zunächst eine subzelluläre Fraktionierung von einem Maus-Hirn Lysat vorgenommen, da bis auf EHD2 alle anderen Familienmitglieder in Hirn exprimiert werden. Die über differentielle Zentrifugationsschritte gewonnenen Fraktionen setzten sich folgendermaßen zusammen: ein grobes Zellkernpellet, welches auch caveoläre Membranfragmente beinhaltete (P1), ein grobes synaptosomales, mitochondriales, Plasmamembran-fragment-beinhaltenes Pellet (P2), ein mikrosomales Pellet, das interne Membranen des ER und Golgi beinhaltete (P3) und das Cytosol (S3) (Protokoll aus dem Labor von P.S. McPherson, McGill University, Canada; Huttner *et al.*, 1983, McPherson *et al.*, 1994). Die Auftrennung der einzelnen Fraktionen konnten durch die verwendeten Marker bestätigt werden.

2. Ergebnisse

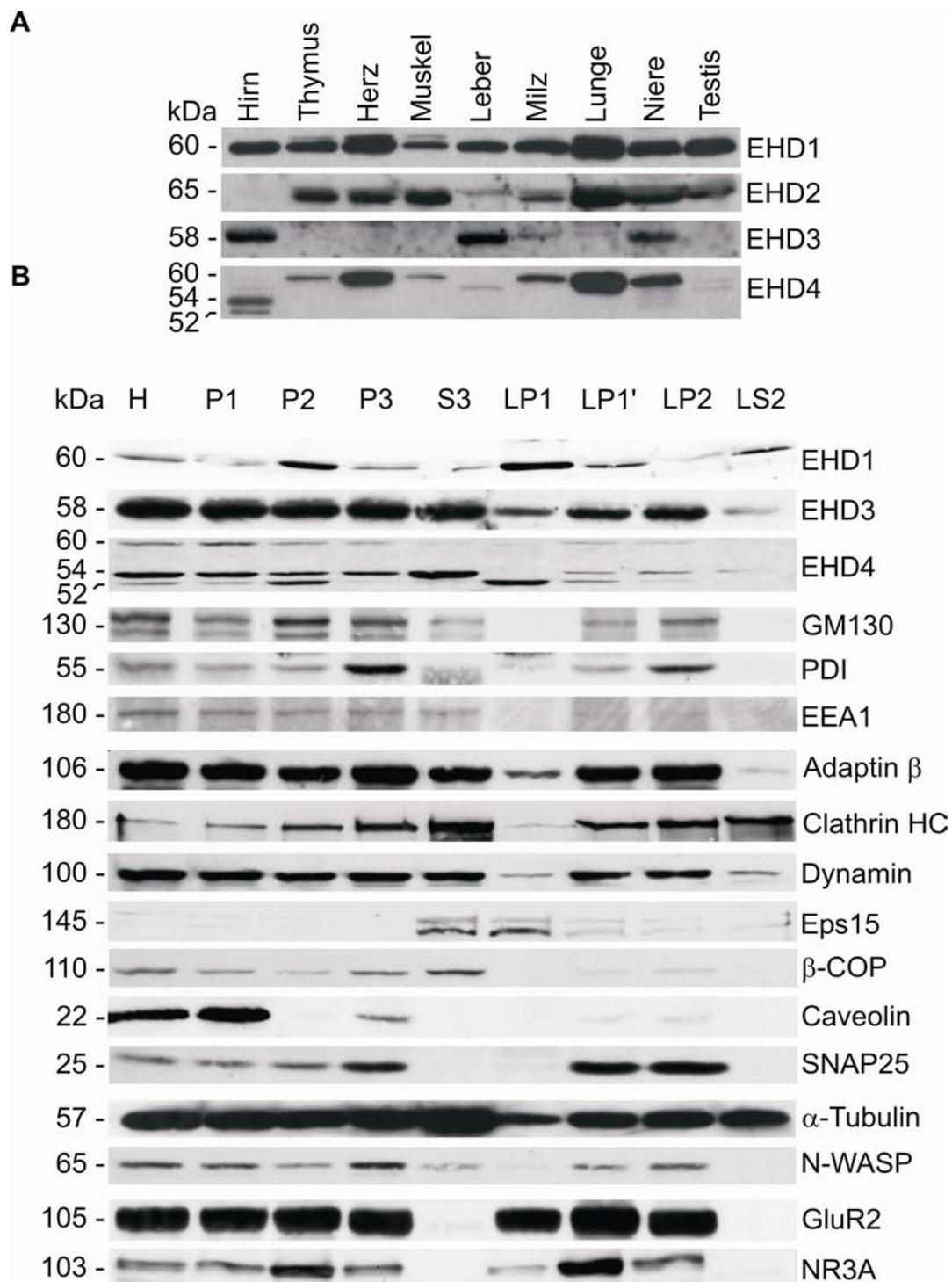


Abbildung 2.1.1: Verteilung der einzelnen EHD-Proteine in verschiedenen Geweben und intrazelluläre Lokalisation in Hirnzellen. Die einzelnen EHD Proteine zeigen ein unterschiedliches und spezifisches Expressionsmuster in den getesteten Geweben (**A**) (Die Expressionsmuster von EHD1 und 4 wurden von A. Halbach (2003) zum Vergleich übernommen). Die drei in Hirn vorkommenden EHD-Varianten zeigen in einer subzellulären Fraktionierung ebenso eine unterschiedliche intrazelluläre Lokalisation (**B**).

Außer EHD3, was in allen membran-haltigen Fraktionen stark und im Cytosol etwas schwächer detektiert werden konnte, zeigen EHD1 und 4 eine spezifische Anreicherung in einzelnen Fraktionen: Der größte Anteil von EHD1 wurde in der Fraktion P2 gefunden, wohingegen das Volllängenprotein (62 kDa) von EHD4 nur schwach in allen Pelletfraktionen gefunden wurde, die 54 kDa Form von EHD4 jedoch ein starkes Signal in der Cytosol-Fraktion zeigte. Außerdem konnte eine dritte EHD4-positive Bande (52 kDa) überwiegend in der P2 Fraktion detektiert werden.

Das Pellet 2 wurde zur weiteren Aufreinigung und Fraktionierung resuspendiert und erneut zentrifugiert, wodurch die synaptischen Membranfraktionen LP1 und LP1' und der lösliche Überstand LS1 entstanden. LP1 beinhaltet dabei die größeren Vesikel und stärker sedimentierenden Organellen und LP1' die kleineren Vesikel und schwächer sedimentierenden Organellen (Protokoll aus dem Labor von P.S. McPherson, McGill University, Canada; Huttner *et al.*, 1983, McPherson *et al.*, 1994). Der Überstand LS2 wurde erneut zentrifugiert, wodurch das Pellet LP2, welches die synaptische Membranen enthält und der Überstand LS2, der aus dem Cytosol der Synapsen-Endknöpfe besteht, entstanden. EHD1 konnte in einem höheren Anteil in der Fraktion (LP1) mit den größeren Vesikeln und stärker sedimentierenden Organellen und nur schwach in den Fraktionen LP1', LP2 oder LS2 nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu steht das Verteilungsmuster von EHD3, da EHD3 in den Fraktionen LP1' und LP2 stärker angereichert ist, als in der LP1 Fraktion. EHD1 und 3 sind also in ähnlichen Fraktionen zu finden, jedoch ist nur EHD3 in den Fraktionen angereichert, die synaptische Membranen oder das Cytosol der Synapsen beinhalten. Die 52 kDa Variante von EHD4 wurde überwiegend in der LP1 Fraktion und nur schwach in allen anderen Fraktionen gefunden. Die Proteinzusammensetzung der einzelnen Fraktionen wurde durch die Verwendung von Markern für spezifische Membranen oder Cytoskelett Bestandteile verifiziert.

2.1.2 Intrazelluläre Lokalisation der EHD Proteine in Zelllinien

Zur genaueren Analyse der intrazellulären Lokalisation der einzelnen Familienmitglieder sollten die endogenen Proteine mit Hilfe von spezifischen Antikörpern in Zellen nachgewiesen und durch Immunofluoreszenz Mikroskopie aufgenommen werden. Eine Detektion aller EHD-Proteine in einer Zelllinie war nicht möglich, da

2. Ergebnisse

keine der verfügbaren Zelllinien alle Proteine exprimiert. Zur Analyse wurden deshalb murine NIH3T3 Fibroblasten, humane Hepatoma Zellen (Huh-7) und primäre Ratten-Hippocampus-Neurone herangezogen, wobei durch Western-Blotting zunächst die Expression der einzelnen EHD-Proteine bestimmt wurde.

Bis auf EHD1 werden alle anderen EHDs spezifisch in einer Zelllinie exprimiert, so daß für EHD1 und EHD2 NIH 3T3 Fibroblasten, für EHD3 primäre Hippocampus Neurone und für EHD4 Huh-7 Hepatoma Zellen verwendet wurden. EHD1 und EHD4 zeigten eine irreguläre punktförmige cytoplasmatische Verteilung in der perinukleären Region (Abb. 2.1.2, **A** und **D**), sind aber außerdem an tubulären Strukturen von unterschiedlicher Länge zu finden, die im Cytoplasma und an der Plasmamembran lokalisiert sind (Abb. 2.1.2 **A'** und **D'**). Im Gegensatz dazu konnte EHD2 stark am inneren Teil der Plasmamembran detektiert werden, assoziierte jedoch auch an kleineren intrazellulären tubulären Strukturen (Abb. 2.1.2, **B** und **B'**). In den primären Hippocampus Neuronen konnte für EHD3 eine punktuelle Verteilung in der gesamten Zelle sowohl im Zellkörper, als auch in den Fortsätzen gezeigt werden (Abb. 2.1.2, **C**). In den Dendriten assoziierte EHD3 mit punktförmigen Strukturen (**C¹**, **C²** und **C³**), wurde aber auch an intrazellulären vesikulären Membranen detektiert (**C²**).

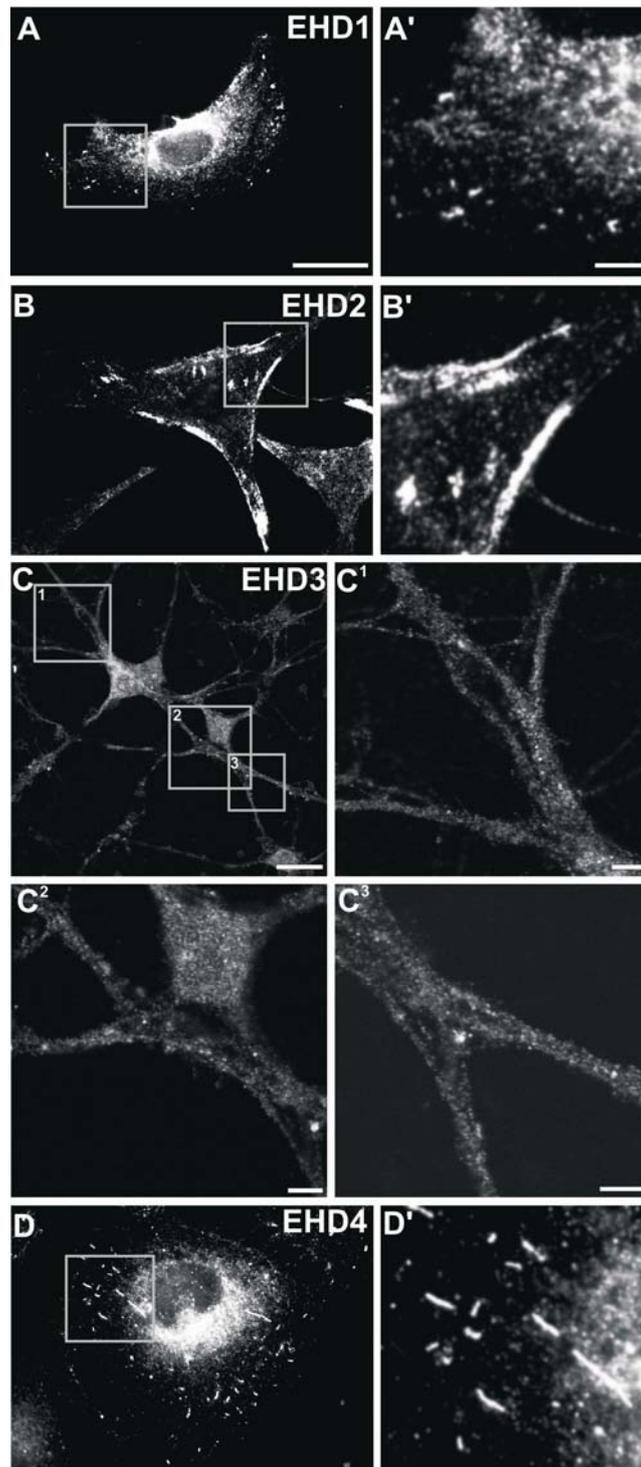


Abbildung 2.1.2: Unterschiedliche intrazelluläre Lokalisation der einzelnen EHD-Proteine in verschiedenen Zelllinien. Die Lokalisationen von EHD1 und EHD2 wurden in NIH3T3 Fibroblasten analysiert (**A**, **B**), EHD3 in primären Hippocampus Neuronen (**C**) und EHD4 in humanen Hepatoma Zellen (Huh-7, **D**) untersucht. Für alle Proteine konnte eine Assoziation an Membran-Strukturen gezeigt werden. Die Skalierungsbalken in den Übersichtsaufnahmen entsprechen jeweils 25 µm und in den Vergrößerungen 5 µm. Für die Aufnahmen der EHD3-Färbung wurde das konfokale, für die anderen Aufnahmen das Axiophot-Floureszenz-Mirkoskop verwendet.

2. Ergebnisse

2.2 Funktionale Analyse der Proteindomänen der EHD-Familie

Der Heterogenität in der Gewebeexpression und intrazellulären Verteilung der EHD-Proteine steht ihre Ähnlichkeit im modularen Aufbau der Proteindomänen gegenüber.

Ein Aminosäuresequenz-Vergleich der murinen EHD Proteine untereinander ergab den höchsten Homologiegrad zwischen den Isoformen mEHD1 und mEHD3 (86%) und den niedrigsten zwischen mEHD2 und mEHD4 (67,5%). mEHD2 weist von den Familienmitgliedern die größte Heterogenität in der Aminosäuresequenz auf (Montesinos *et al.*, 2005). Der hohe Homologiegrad der EHDs zueinander ist auf die hohe Konservierung in den beiden Hauptdomänen, der N-terminalen G-Domäne und der C-terminalen EH-Domäne zurückzuführen (Abb. 2.2.1 (A)). Während die EH-Domäne dabei noch einige Unterschiede in der Sequenz aufzeigt, was die Spezifität für unterschiedliche Bindungspartner erklären könnte, sind sowohl die G-Domäne, als auch der hydrophobe Bereich im Anschluß an die G-Domäne in allen Isoformen hoch konserviert. Die genaue Funktion dieser Domänen wurde daher exemplarisch an EHD1 analysiert.

2.2.1 Die G-Domäne

2.2.1.1 Domänenstruktur und Aufbau der EHD-Isoformen

Neben der EH-Domäne ist die G-Domäne im modularen Aufbau der Proteindomänen am auffälligsten. Die von Lee *et al.* (2005) beschriebene ATP-Bindung und ATP-Hydrolyse-Aktivität von EHD1 über die Nukleotidbindungsstelle, steht im Gegensatz zu vorgenommenen Sequenzvergleichen (Montesinos *et al.*, 2005, Naslavsky und Caplan, 2005, eigene Daten). So setzt sich die G-Domäne aus den typischen Motiven zur Bindung und Stabilisierung des Nukleotids GTP zusammen (Saraste *et al.*, 1990, Abb. 2.2.1 (B)): 1. Die Nukleotidbindungsstelle (auch G1-Box oder Walker A Motiv genannt (GxxxxGK(S/T)), die die α -, β - und γ -Phosphat-bindende Stelle von ATP und GTP darstellt, 2. die G2-Box zur Stabilisierung der Phosphatbindung, 3. die

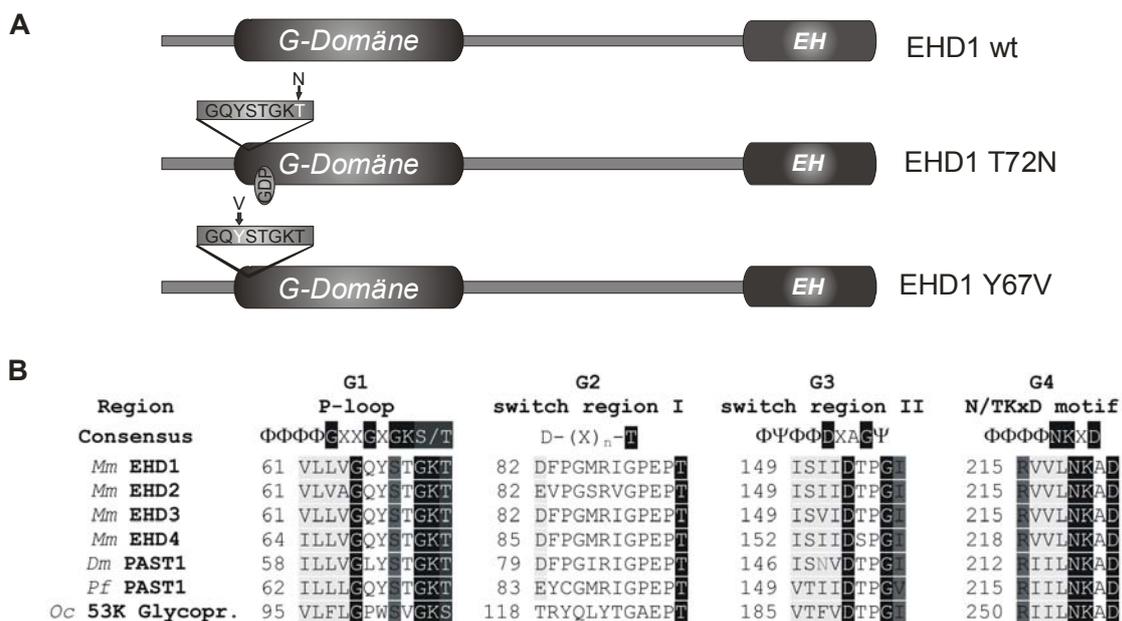


Abbildung 2.2.1: Domänenstruktur der EHD Proteine. Alle EHD Proteine zeigen die gleiche typische Domänenstruktur: Eine N-terminale G-Domäne und eine C-terminale EH-Domäne, die mit den Datenbanken *InterPro* und *Pfam* überprüft wurden (A). Ein Sequenzvergleich der EHD-G-Domäne mit der Consensus-Sequenz von G-Domänen zeigt eine deutliche Überlappung, so daß die Domäne als G-Domäne identifiziert werden konnte (B).

G3-Box (oder Walker B Motif (DxxG)), die an der Magnesium-Bindung (Mg^{2+}) beteiligt ist und 4. die G4-Box (NKxD), die für die spezifische Bindung an die Base Guanin steht (Leipe *et al.*, 2002, Bourne *et al.*, 1990).

Für die Analyse der enzymatischen Aktivität der G-Domäne wurden zwei Punktmutationen im Bereich der Nukleotidbindungsstelle (GQYSTGKT) eingefügt. Dazu wurde entweder die Aminosäure Threonin an der Position 72 gegen Asparagin (T72N), oder die Aminosäure Tyrosin an der Position 67 gegen Valin (Y67V) ausgetauscht (Abb. 2.2.1 (A)). Der Austausch der Aminosäure Threonin soll dabei den GDP-gebundenen Zustand der G-Domäne widerspiegeln, da über diese Aminosäure, eine Wechselwirkung mit Mg^{2+} und somit die Stabilisierung des γ -Phosphates ausgeht (Saraste *et al.*, 1990, Bourne *et al.*, 1990, Foster *et al.*, 1996).

Für monomere GTPasen der Ras-Familie, wie hRas, RhoA, Rac1 und Cdc42 wurde eine weitere Punktmutation in der Nukleotidbindungsstelle als konstitutiv-aktivierend beschrieben: Dazu wurde die dritte Aminosäure (GxGxxGK(S/T)), in diesem Falle ein Glycin gegen ein Valin ausgetauscht, so daß das γ -Phosphat nicht mehr hydrolysiert werden kann (Hall, 2001). Im Falle der EHD-Proteine liegt in der Nukleotidbindungsstelle an dieser Position ein Tyrosin vor, so daß nach Aminosäureaustausch zu einem Valin aufgrund des Aufbaus der Aminosäuren nicht von einer Hydrolyse-defizienten Mutante ausgegangen werden kann. Diese Mutante wurde jedoch als Kontrolle für die verschiedenen Experimente eingesetzt.

2.2.1.2 Aufreinigung und CD-Spektroskopie von EHD1wt, T72N und Y67V

Aufreinigung

Die Punktmutationen wurden von B. Ritter in einen eukaryotischen Expressionsvektor (pcDNA-HA) kloniert (Ritter, 2001) und wurden für die nachfolgenden Experimente in einen bakteriellen Expressionsvektor mit einer Schnittstelle für die PreScission® Protease (pGex-6P3) umklont. Die rekombinanten Proteine wurden unter Verwendung eines modifizierten Herstellerprotokolls (Pharmacia Amersham) aufgereinigt und mit der Protease von der Sepharose geschnitten. Zur Kontrolle wurden sowohl jeweils ein Aliquot des Matrix-Materials, als auch das geschnittene Protein im Überstand auf ein 10%iges SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen und das Gel anschließend Coomassie Brilliant

Blue® gefärbt. Dabei zeigte sich, daß ca. 40 % des geschnittenen EHD Proteins aufgrund seiner hohen Hydrophobizität an der Matrix kleben blieb (Abb. 2.2.2). Ebenso deutlich wird die schwächere Expression der Mutante T72N, die während der Expression in den Bakterien abgebaut zu werden scheint.

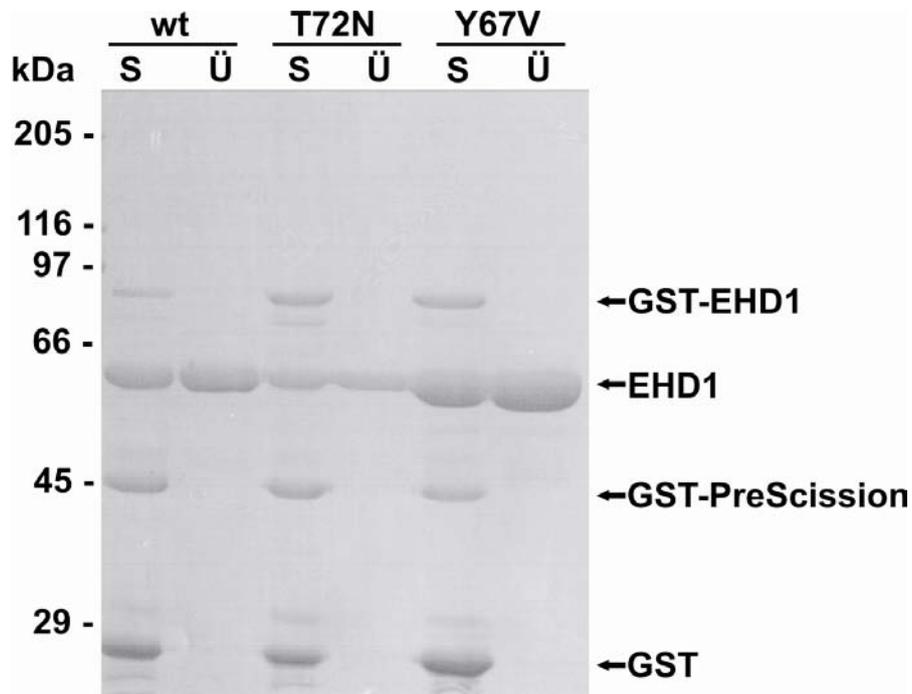


Abbildung 2.2.2: Aufreinigung des rekombinanten EHD1 wt und mutierten Volllängen-Proteins. Sowohl ein Aliquot der Säulen-Matrix (S) und des geschnittenen Proteins (Ü) wurden auf ein 10%iges SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen und dieses anschließend Coomassie Brilliant Blue® gefärbt. An der Säulenmatrix ist neben dem noch ungeschnittenen GST-EHD1, der GST- PreScission® Protease und dem abgeschnittenen GST-tag auch geschnittenes EHD-Protein gebunden.

Während weiterer Aufreinigungsschritte, wie zum Beispiel Dialyse-Schritte wurde die hohe Neigung der Proteine zur Aggregation deutlich (50% Verlust der Proteinkonzentration nach Dialyse über Nacht). Generell ließ sich feststellen, daß die EHD Proteine nur in Puffern mit einem hohen Salzgehalt (300 mM) oder nach Zugabe von 0,5 % Detergenzien länger als 36 Stunden stabil waren. Die Lagerung erfolgte bei 4°C, da die EHD Proteine nach dem Einfrieren/ Auftauen ebenfalls ausfielen.

2. Ergebnisse

Für die meisten vorgenommenen Experimente mußte jedoch sowohl eine hohe Salzkonzentration, als auch die Verwendung von Detergenzien ausgeschlossen werden, so daß für alle Experimente einheitlich ein Puffer mit 150 mM NaCl und 2 mM MgCl₂ als Grundgerüst eingesetzt wurde und die Experimente nach frischer Aufreinigung in einem Zeitfenster von 36 Stunden durchgeführt wurden.

CD-Spektroskopie

Nach Dialyse gegen einen Tris-Puffer (5 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂) sollte zunächst untersucht werden, ob die rekombinanten Proteine in Lösung eine Faltung und damit eine Sekundärstruktur aufweisen. Die Proteine zeigten Spektren mit zwei Minima bei ca. 209 nm und einem geringen Signal bei 219 nm (Abb. 2.2.3). Mit Hilfe des Programms CONTIN (Greenfield, 1996) wurden aus den Messdaten der CD-Spektren theoretische Berechnungen der Sekundärstruktur durchgeführt (Tab. 2.2.1). Dabei zeigte sich sowohl für das rekombinante wt Protein, als auch für die beiden Punktmutationen ein hoher Anteil an α -Helix und nur ein geringer Anteil an β -Faltblatt. Außerdem auffallend war ein hoher Anteil an β -Schleifen in der Sekundärstruktur.

Protein	α -Helix	β -Faltblatt	β -Schleife	ungeordnet
EHD1 wt	17,2 %	9,7 %	21 %	32 %
EHD1 wt + 4 mM EDTA	18,1 %	10,2 %	22 %	24,1 %
EHD1 T72N	18,5 %	10,1 %	24,3 %	22,4 %
EHD1 Y67V	20,4 %	8,6 %	14,5 %	35,8 %

Tabelle 2.2.1: Anteile einzelner Sekundärstrukturelemente an der Proteinstruktur des rekombinanten wt und mutierten EHD1. Die Anteile wurden mit dem Programm CONTIN aus den CD-Spektren der Proteine berechnet und sind hier in Prozent im Bezug auf die Gesamtproteinstruktur angegeben.

Bei einem Vergleich des Kurvenverlaufs für EHD1 wt und T72N kann kaum eine Abweichung festgestellt werden, was auf eine hohe Konformität der Sekundärstruktur hindeutet. Der Kurvenverlauf der Mutante Y67V scheint von den über das CONTIN Programm ermittelten Werten abzuweichen, was allerdings auf den Umrechnungen der Werte auf die Einheit der molaren Eliptizität beruht. Dies erfolgte, um die

gemessenen Daten der drei Proteine untereinander vergleichen zu können. Die für Y67V gemessene Abweichung in der Amplitude der molaren Elliptizität deutet auf eine partielle Denaturierung der Mutante hin. Der Kurvenverlauf wies jedoch die gleichen Minima, wie der wt und die T72N Mutante auf. Die Y67V-Mutante wurde in den nachfolgenden Experimenten dennoch als "Kontrolle" verwendet, um eine zweite Punktmutante in der Nukleotidbindungsstelle untersuchen zu können. Bei der Interpretation der Ergebnissen der nachfolgenden Experimente wurde die wahrscheinlich nur partielle Faltung der Y67V-Mutante berücksichtigt. Zur Überprüfung einer Änderung der Sekundärstruktur durch die Induktion von zweiwertigen Kationen, wie das Mg^{2+} in der G-Domäne und das Ca^{2+} in der EH-Domäne wurden CD-Spektren in Anwesenheit von 4 mM EDTA gemessen. Dabei zeigte sich für wt EHD1 eine sehr leichte Veränderung in der Amplitude der molaren Elliptizität (Abb.2.2.3, Tab. 2.2.1).

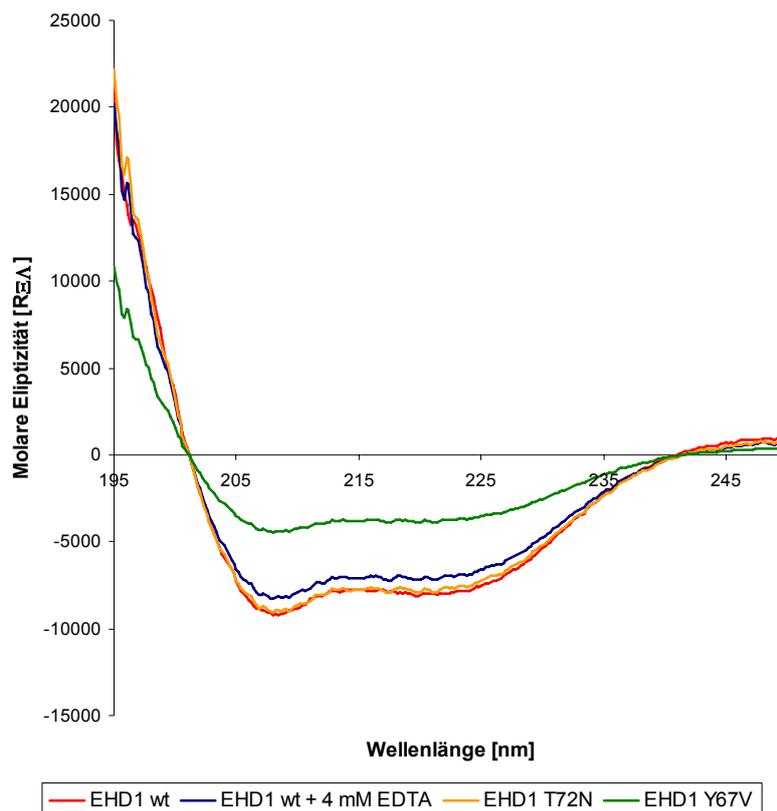


Abbildung 2.2.3: CD-Spektren des rekombinanten wt und mutierten EHD1. Die rekombinanten Proteine wurden bei unterschiedlichen Konzentration in 5mM Tris pH 7.4; 150 mM NaCl und 2 mM $MgCl_2$ gemessen. Die Veränderung des Kurvenverlaufs von EHD1wt (rot, ohne Zugabe) nach Zugabe von 4 mM EDTA ist hier blau dargestellt, der Kurvenverlauf der Punktmutante T72N in orange und die Punktmutante Y67V ist in grün dargestellt.

2. Ergebnisse

2.2.1.3 Enzymatische Aktivität von EHD1 wt, T72N und Y67V

Die von Lee *et al.* (2005) beschriebene ATP-Bindung und Hydrolyse-Aktivität der EHD-Proteine steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von Aminosäuresequenzvergleichen (Montesinos *et al.*, 2005, Naslavsky und Caplan, 2005, eigene Daten) und eigenen Vorarbeiten in der Arbeitsgruppe. Diese zeigten eine Bindung von HA-EHD1 an GTP-Agarose, die durch Verwendung von verschiedenen Elutionsmitteln, wie 5 mM EDTA, ATP, GDP und GTP aufgehoben werden konnte (Halbach, 2004). Der größte Anteil des Proteins ging nach Zugabe von GTP wieder in Lösung, so daß aufgrund dessen und der Aminosäuresequenzvergleiche im Folgenden von einem Protein mit einer Spezifität für GTP ausgegangen wird (Halbach, 2004).

Für die G-Domäne der GTPase Dynamin, die die stärkste Homologie zu der G-Domäne der EHD Proteine aufweist (Proteindatenbank *Pfam*), wurde eine sehr schwache hydrolytische Aktivität beschrieben (Praefcke und McMahon, 2004). Die Messung der enzymatischen Aktivität von GST-EHD1 wt, T72N und Y67V wurde deshalb über einen Zeitraum von mehreren Stunden verfolgt. Für den Nachweis der enzymatischen Aktivität wurde aufgrund der Aufreinigungsschwierigkeiten der EHD-Proteine ein Verfahren gewählt, für das nur geringe Mengen des rekombinanten Proteins benötigt wurde. Des Weiteren haben Vorexperimente gezeigt, daß die Verwendung von Detergenzien, hohen Salzkonzentrationen oder die Zugabe von Aminosäuren, wie 50 mM Arginin/ Glutamat, um die EHD-Proteine länger in Lösung stabil zu halten, die hydrolytische Aktivität inhibiert. Die Proteine wurden deshalb gegen einen Tris-Puffer dialysiert, und nach Zugabe von unmarkiertem GTP oder ATP und α -[32 P] dGTP oder ATP bei 37°C inkubiert. Nach 5, 10, 15, 30 min und 1, 2, 3, 5 und 7 Stunden wurden die Ansätze abgestoppt, auf Polyethylenimin-Cellulose-Platten aufgetragen und diese über einen Phospho-Imager gescannt. Die Quantifizierung erfolgte durch die Verwendung des Programms ImageQuant 5.0. Als Negativ-Kontrolle diente jeweils fünf Minuten gekochtes GST-EHD1 wt.

Es konnte bei diesem Verfahren jedoch keine klärende Aussage zur enzymatischen Aktivität gezeigt werden: Für GST-EHD1 wt konnte eine schwache GTP-Hydrolyse nachgewiesen werden, die bei der Negativ-Kontrolle bis auf den Hintergrundzerfall des markierten GTP inhibiert wurde (Abb. 2.2.4). Die beiden Punktmutationen (T72N, Y67V) in der Nukleotidbindungsstelle zeigten beide, wie erwartet, eine stark herabgesetzte Hydrolyserate, wobei der Effekt bei der Y67V-Mutante auf ihrer

partiellen Faltung beruhen kann. Zum Vergleich wurde ebenso die ATP-Hydrolyserate der Proteine bestimmt, wobei beide Punktmutanten eine stärkere ATP-Hydrolyse zeigten, als EHD1 wt (Abb. 2.2.4). Da jedoch bei der T72N-Punktmutante die Stabilisierung des γ -Phosphates eines Tri-Nukleotides inhibiert wird und die Bindung eines Tri-Nukleotides nicht mehr möglich ist, könnte man auf eine Verunreinigung durch eine bakterielle ATPase (z.B. Chaperone) spekulieren. Zur finalen Klärung der enzymatischen Aktivität sollten weitere Messverfahren, wie z.B. fluoremetrische Verfahren oder *reverse-phase* HPLC herangezogen werden. Dies soll in Colaboration mit O. Daumke (MRC, Cambridge) erfolgen.

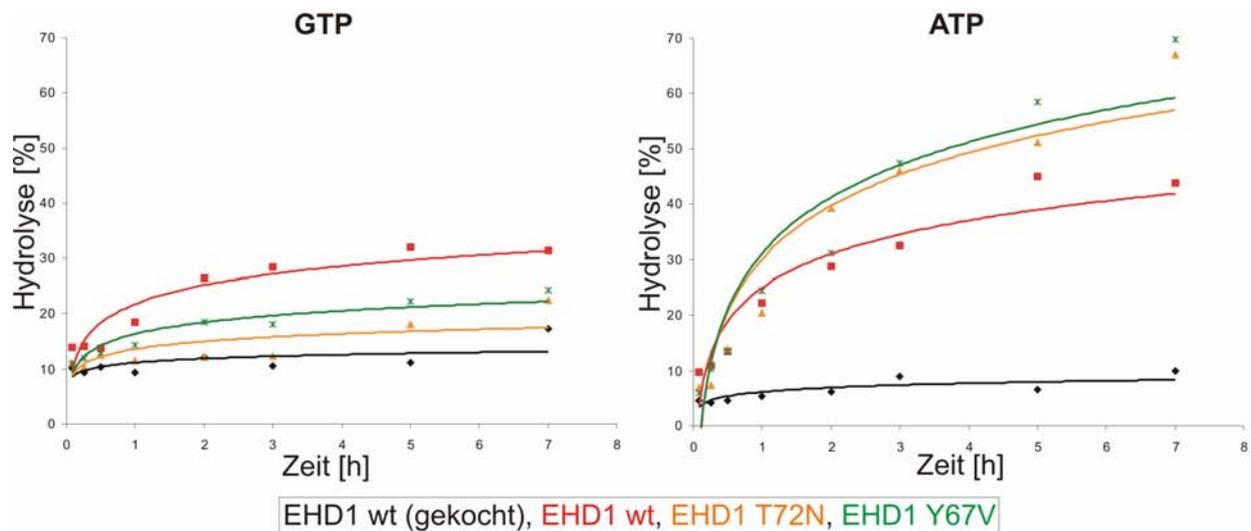


Abbildung 2.2.4: Enzymatische Aktivität von GST-EHD1 wt, T72N und Y67V. Die Kurven zeigen die gemessenen Hydrolyseraten ([%]) für GTP (links) und ATP (rechts) von der Negativkontrolle (schwarz), GST-EHD1 wt (rot), GST-EHD1 T72N (orange) und GST-EHD1 Y67V (grün). Die beiden Punktmutanten zeigen eine deutlich schwächere GTP-Hydrolyse, als EHD1 wt, jedoch eine stärkere ATP-Hydrolyse.

2.2.2 Lipidbindung der EHD-Proteine

Für die EHD-Proteine wurde bereits mehrfach eine Anreicherung in membranhaltigen Fraktionen (u.a. Guilherme *et al.*, März und September 2004, Park *et al.*, 2004) und nach Überexpression in Zellen eine Assoziation an verschiedene Lipidmembranen beschrieben (u.a. Caplan *et al.*, 2002, Galperin *et al.*, 2002, Shao *et al.*, 2002). Eine direkte Bindung an Lipidmembranen auf Proteinebene wurde bislang nicht nachgewiesen. Ebenso verfügen die EHD-Proteine nicht über eine der bekannten Lipidbindedomänen, wie z.B. eine PH-, PX- oder BAR-Domäne (*Pfam*-, *InterPro*-Datenbanken). Im Folgenden sollte geklärt werden, ob die EHD-Proteine direkt an Lipidmembranen binden, ob sie eine Spezifität für bestimmte Phosphoinositide aufweisen und ob der hydrophobe Bereich direkt im Anschluß der G-Domäne an der hypothetischen Bindung an Lipide beteiligt ist.

2.2.2.1 Lipidbindung und Phosphoinositid-Spezifität der EHD-Proteine

Der Nachweis zur Bestimmung der Lipidbindung bzw. der spezifischen Bindung der einzelnen EHD-Proteine an Phosphoinositid-angereicherte Lipidmembranen *in vitro* erfolgte über einen Liposomen-Sedimentationsassay. Dazu wurden Liposomen mit einem Grundgerüst aus 35% Phosphatidylethanolamin (PE), 35% Phosphatidylcholin (PC), 10% Phosphatidylserin und 10% Cholesterin hergestellt. Jeweils 10% verschiedener Phosphoinositide wurden zugegeben und die hergestellten Liposomen mit den aufgereinigten GST-EHDs inkubiert. Die an die Liposomen gebundenen Proteine wurden durch Zentrifugation pelletiert und der Überstand mit den nicht-gebundenen Proteinen schnell von den Pellets getrennt. Die einzelnen Fraktionen wurden durch SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese aufgetrennt und die Gele anschließend Coomassie Brilliant Blue® gefärbt. Die Quantifizierung der Sedimentation erfolgte erneut unter Verwendung des Programms ImageQuant 5.0. Aufgrund der hohen Tendenz der EHD-Proteine zur Aggregation wurde jeweils eine Kontrolle ohne Liposomen angesetzt, um den prozentualen Grad der Eigensedimentation zu bestimmen. Es zeigte sich, daß die einzelnen Isoformen nicht nur direkt an Liposomen binden, sondern auch eine Spezifität für bestimmte Lipidmembranen besitzen (Abb. 2.2.5).

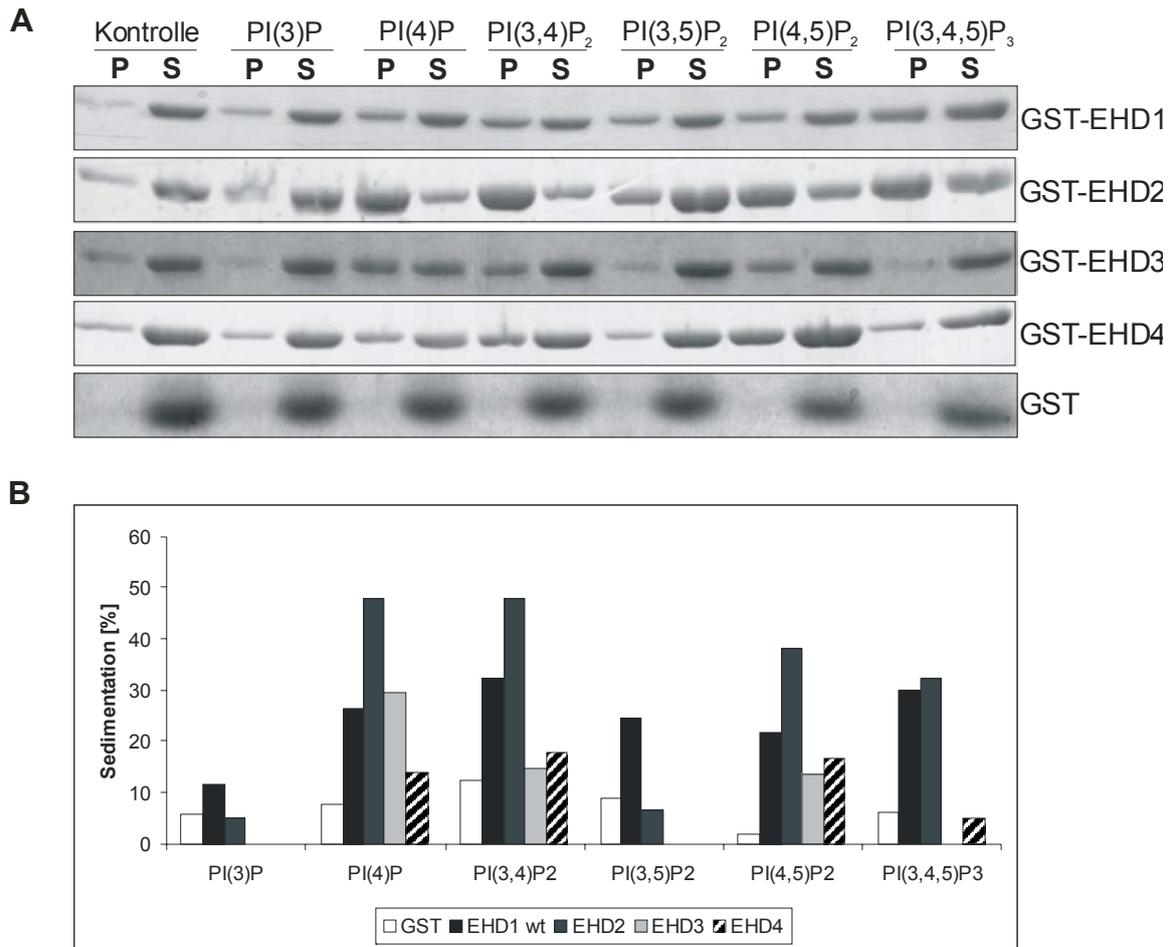


Abbildung 2.2.5: Bindung der einzelnen EHD-Proteine an mit spezifischen Phosphoinositid-angereicherten Liposomen. Die GST-EHD-Proteine sedimentieren aufgrund ihrer Bindung an spezifische Phosphoinositide unterschiedlich stark nach Zentrifugation (**A**). Jeweils das Liposomenhaltige Pellet (P) mit den gebundenen Proteinen und der nicht-gebundene Überstand (S) wurden auf ein SDS-Polyarylamidgel aufgetragen und dieses anschließend Coomassie Brilliant Blue® gefärbt. Zur Bestimmung der Eigensedimentation diente ein Ansatz ohne Liposomen (Kontrolle). Ebenso wurde die Nicht-Bindung von GST an die Liposomen gemessen. (**B**) Zur Quantifizierung wurden die Banden gescannt und der Grad der Sedimentation nach Abzug der prozentualen Eigensedimentation dargestellt.

Demnach binden GST-EHD2 und GST-EHD4 an Liposomen, die mit dem Mono-Phosphat 4 und den Di-Phosphaten 3,4 und 4,5 angereichert sind. Neben GST-EHD2, bindet auch GST-EHD1 an Liposomen mit dem Tri-Phosphat 3,4,5. GST-EHD3 bindet ebenfalls stark an PI(4)P und schwächer an PI(3,4)P₂ und PI(4,5)P₂. Nur GST-EHD1 zeigt ein etwas anderes Bindungsverhalten, da es zusätzlich an das

Di-Phosphat 3,5 zu binden scheint. Als Kontrolle, daß die Bindung der GST-Fusionsproteine nicht auf den GST-tag beruht, wurde ebenso GST alleine gemessen, was keine Bindung an die Liposomen zeigte.

2.2.2.2 Identifizierung der Lipidbindungsdomäne

Punktmutationen in der Nukleotidbindungsstelle von murinem EHD1 (EHD1 G65R) oder dem *C. elegans* EHD1-Homolog Rme-1 (Rme-1 G81R) führen nach Überexpression in Zellen zu einer feinen cytosolischen Verteilung und zeigen keine Membranen-Assoziation mehr (u.a. Lin *et al.*, 2001, Caplan *et al.*, 2002, Naslavsky *et al.*, 2006). Die Membranbindung der EHD-Proteine scheint also von der G-Domäne abhängig zu sein, weshalb sowohl Punktmutanten der Nukleotidbindungsstelle als auch Deletionsmutanten von EHD1 auf direkte Bindung an die mit Phosphoinositiden angereicherten Liposomen untersucht werden sollten.

Dazu wurden basierend auf den Informationen der Datenbanken *Pfam* und *InterPro* über den modularen Aufbau der Proteindomänen exemplarisch Deletionsmutanten für EHD1 hergestellt und aufgereinigt.

Herstellung und Aufreinigung von EHD1 Deletionsmutanten

Die Datenbanken (*Pfam*, *InterPro*) beschreiben die G-Domäne von EHD1 als eine Domäne beginnend mit der Aminosäure Valin an Position 61 und endend mit der Aminosäure Asparaginsäure an Position 222. Da die beiden Aminosäuren Lysin (58) und Prolin (59) zwischen den einzelnen EHD-Proteinen ebenso hoch konserviert sind, die Aminosäuren davor aber voneinander abweichen, wurde eine Deletionsmutante bis zu dem Lysin hergestellt (EHD1 Δ 1-57). Außerdem wurde eine Deletionsmutante gewählt, der der gesamte N-terminale Bereich inklusive der G-Domäne fehlt, die aber den konservierten hydrophoben Teil im Anschluß an die G-Domäne enthält (EHD1 Δ 1-222). Die EH-Domäne von EHD1 beginnt mit Glutaminsäure an Position 439 und umfasst den restlichen C-terminalen Bereich. Außer einer Deletionsmutante ohne EH-Domäne (EHD1 Δ EH) wurde die einzelne

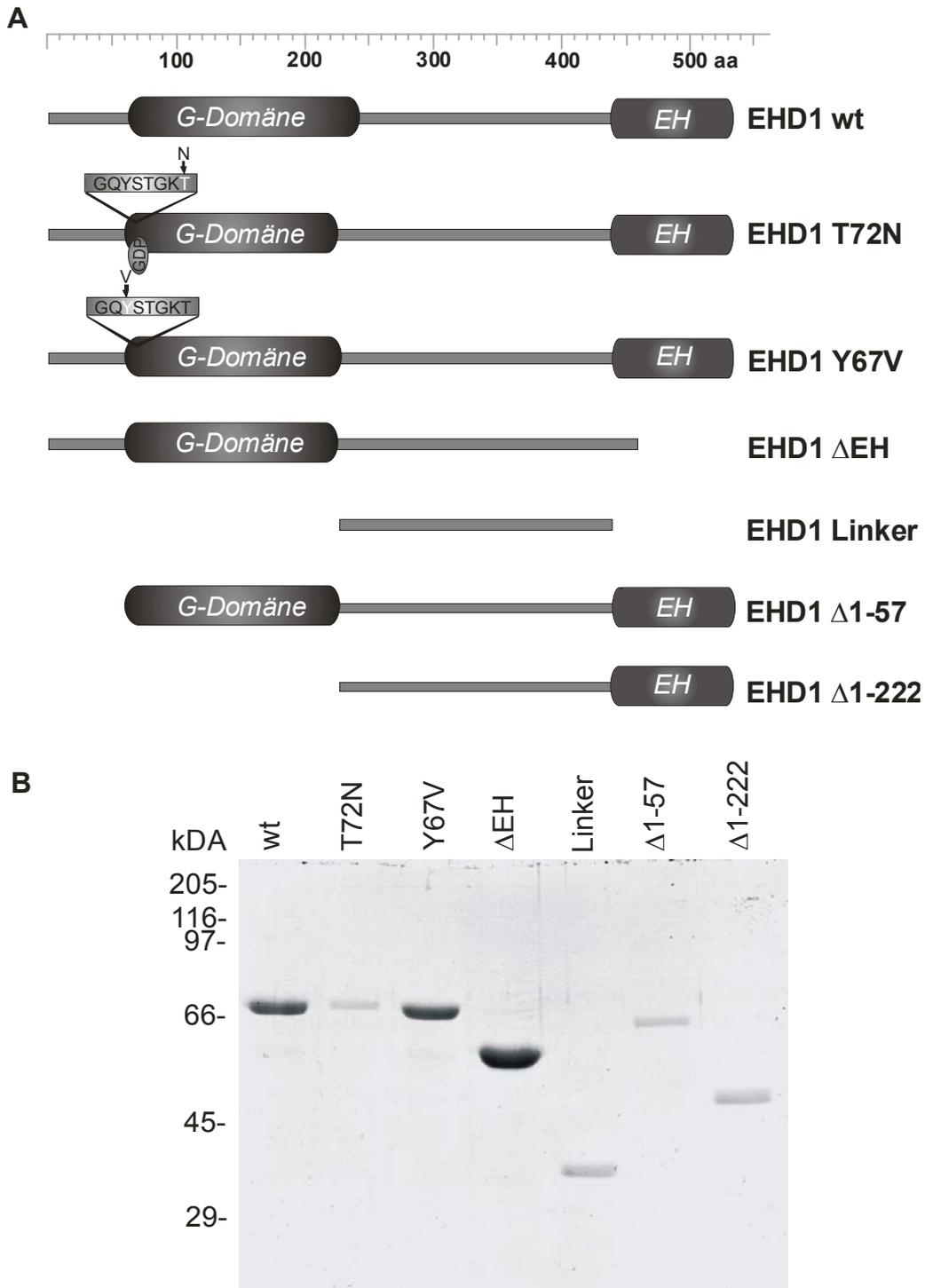


Abbildung 2.2.6: Generierung und Aufreinigung von EHD1-Deletionsmutanten. Neben EHD1 wt und den beiden Punktmutanten in der Nukleotidbindungsstelle wurden basierend auf der Domänenstruktur nach den Datenbanken *Pfam* und *InterPro* weitere Deletionsmutanten für EHD1 hergestellt, bei denen nicht nur die beiden Hauptdomänen sondern auch nicht konservierte Bereiche deletiert wurden (**A**). Alle Deletionsmutanten wurden rekombinant in Bakterien exprimiert und nach Aufreinigung auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. (**B**) Mit Coomassie Brilliant Blue® gefärbtes Gel.

2. Ergebnisse

EH-Domäne von EHD1 (EH1) verwendet (freundlicherweise von S. Rosenbaum zur Verfügung gestellt). Schließlich wurde der Teil zwischen der G- und der EH-Domäne als Deletionsmutante gewählt, der sowohl den konserviert hydrophoben Bereich und einen weniger stark konservierten Bereich enthält (EHD1 Linker; Abb. 2.2.6 (A)). Alle Mutanten wurden in einen bakteriellen Expressionsvektor mit Schnittstelle für die PreScission® Protease kloniert und die Proteine nach dem modifizierten Herstellerprotokoll aufgereinigt. Die geschnittenen Proteine wurden auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und das Gel Coomassie Brilliant Blue® gefärbt. Dabei zeigte sich für die Mutanten EHD1 Δ EH und EH1 eine starke, für die beiden Mutanten ohne G-Domäne (EHD1 Linker, EHD1 Δ 1-222) eine mäßige und für EHD1 Δ 1-57 eine schwache Expression (Abb. 2.2.6 (B)).

CD-Messung der EHD1-Deletionsmutanten

Von den aufgereinigten Deletionsmutanten wurden CD-Spektren aufgenommen, um zu überprüfen, ob die Proteine eine Faltung und somit Sekundärstruktur aufweisen. Aus den Messdaten der CD-Spektren wurden erneut mit Hilfe des Programms CONTIN (Greenfield, 1996) theoretische Berechnungen der Sekundärstruktur durchgeführt (Tab.2.2.2).

Die Deletionsmutanten zeigten bei der CD-Messung verschiedene Spektren: EHD1 Δ EH und Δ 1-222 zeigen ähnlich wie EHD1 wt einen Kurvenverlauf für Proteine mit einem α -helikalen Anteil mit zwei Minima bei ca. 209 nm und einem geringeren Signal bei 219 nm (Abb. 2.2.7). Das Spektrum für die EH-Domäne von EHD1 wurde von S. Rosenbaum in Abhängigkeit von der Induktion von zweiwertigen Kationen aufgenommen und zeigte ebenso ein Spektrum für ein α -helikales Protein. Nach Zugabe von 2 mM EDTA konnte eine Konformationsänderung aufgrund einer Destabilisierung ohne das Calcium im Zentrum der EF-Hand der EH-Domäne nachgewiesen werden (S. Rosenbaum, persönliche Mitteilung).

Protein	α -Helix	β -Faltblatt	β -Schleife	ungeordnet
EHD1 wt	17,2 %	9,7 %	21 %	32 %
EHD1 Δ EH	18,5%	18,6%	11,4%	35,7%
EHD1 Δ EH + 4 mM EDTA	15,1%	18,1%	14%	34,4%
EHD1 Linker	9,5%	20,2%	21%	31%
EHD1 Δ 1-56	8,7%	22,9%	20,7%	29,9%
EHD1 Δ 1-222	10,2%	14,5%	22,8%	31,2%
EHD1 EH	29,3%	6,8%	15,2%	24,1%

Tabelle 2.2.2: Anteile einzelner Sekundärstrukturelemente an der Proteinstruktur der rekombinanten EHD1 Deletionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp. Die Anteile wurden mit dem Programm CONTIN aus den CD-Spektren der Proteine berechnet und sind hier in Prozent im Bezug auf die Gesamtproteinstruktur angegeben. Die Ergebnisse für EHD1 EH wurden von S. Rosenbaum berechnet und für den Vergleich hier freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Wie nach den Expressionsergebnissen erwartet, zeigte sich für die Mutante Δ 1-57 eine starke Änderung in der theoretischen Sekundärstruktur im Vergleich zu EHD1 wt. Der prozentuale Anteil an α -Helix ist bei der Mutante halbiert, der prozentuale Anteil an β -Faltblatt verdoppelt sich. Die ersten 57 Aminosäuren vor der G-Domäne scheinen diese zu stabilisieren, Deletion führt zu erhöhter Aggregation oder einen verstärkten Abbau in den Bakterien. Auch für die Deletionsmutante EHD1 Linker zeigte sich ein veränderter Kurvenverlauf des Spektrums, der jedoch nicht ganz so stark ausgeprägt ist, wie bei Δ 1-57. Für die nachfolgenden Experimente wurde die Deletionsmutante Δ 1-57 aufgrund der starken Aggregation und ihrer Instabilität nicht eingesetzt.

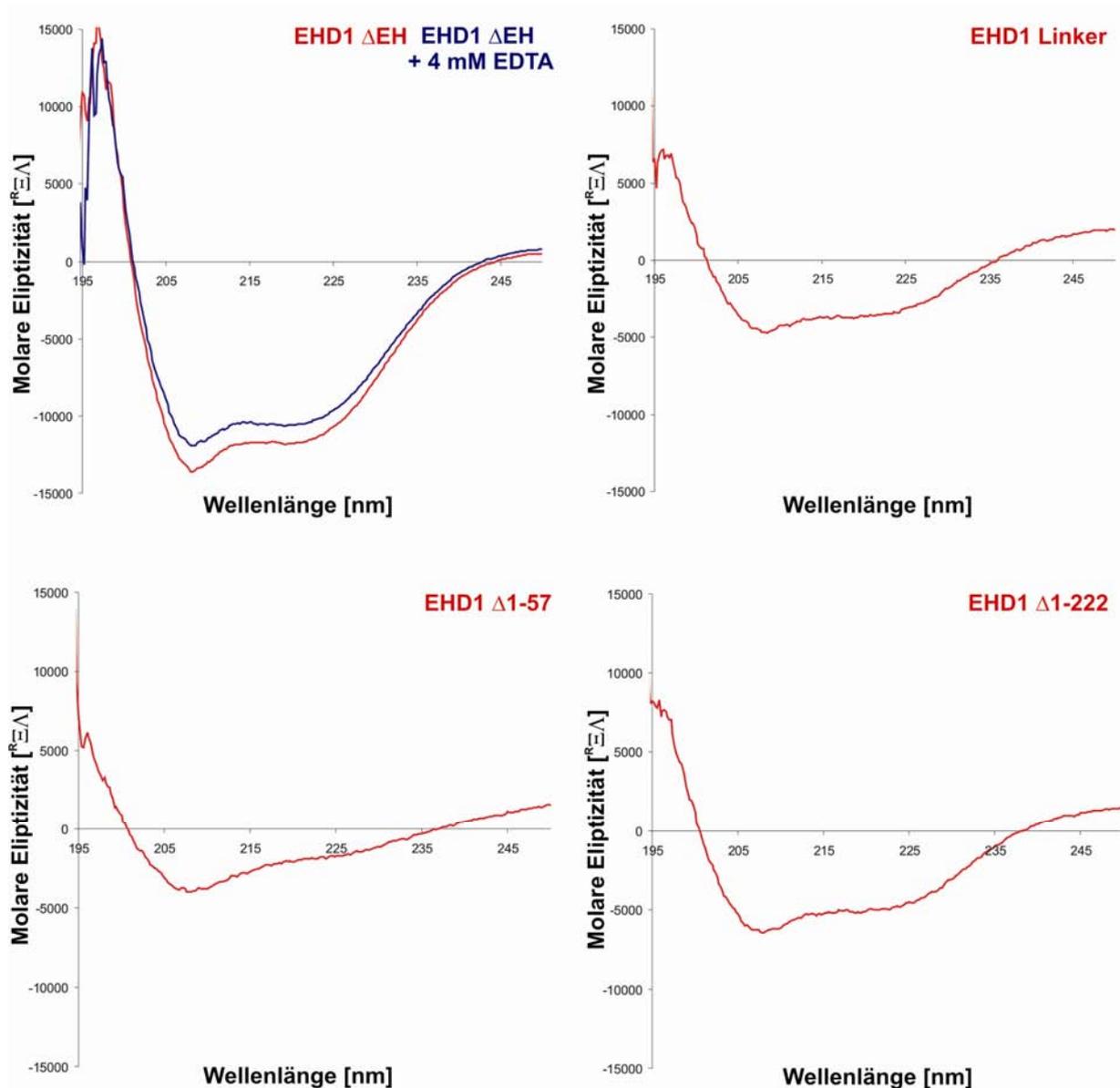


Abbildung 2.2.7: CD-Spektren der Deletionsmutanten. Die rekombinanten Proteine wurden bei unterschiedlichen Konzentration in 5 mM Tris/HCl pH 7,4; 150 mM NaCl und 2 mM MgCl₂ gemessen. Die Veränderung des Kurvenverlaufs von EHD1 Δ EH (rot, ohne Zugabe) nach Zugabe von 4 mM EDTA ist hier blau dargestellt, der Kurvenverlauf der anderen Mutanten ist jeweils in rot dargestellt. Der veränderte Kurvenverlauf für EHD1 Δ 1-57 wird im Vergleich zu den anderen Mutanten deutlich.

Liposomen-Sedimentationsassay der Deletionsmutanten

Zur Identifizierung der Lipidbindedomäne sollten die aufgereinigten EHD1-Deletionsmutanten ebenfalls im Sedimentationsexperiment verwendet werden. Nach dem vorbereitenden Zentrifugationsschritt der EHD1-Proteine in der Ultrazentrifuge zeigte sich, daß die Deletionsmutante EHD1 Linker unter den Assaybedingungen eine so starke Eigensedimentation aufwies, daß 90% der Proteine bereits sedimentierten. Eine Verwendung der Mutante für dieses Experiment wurde deshalb ausgeschlossen.

Die Mutanten wurden aufgrund der Größe des GST-tags und der dadurch möglichen Inhibition der Lipidbindung diesmal nicht als GST-Fusionsproteine, sondern als tag-freie Proteine analysiert. Gemessen wurde die Bindung an die Phosphoinositide PI(4)P, PI(3,4)P₂, PI(4,5)P₂ und PI(3,4,5)P₃, da der Wildtyp von EHD1 an diesen Phosphoinositiden die stärkste Bindung zeigte. Für die Liposomen wurde ein Grundgerüst aus 45% Phosphatidylethanolamin und 45% Phosphatidylcholin verwendet, um die Hintergrundbindung an Cholesterol und Phosphatidylserin auszuschließen. Die Coomassie Brilliant Blue® gefärbten Proteingele wurden erneut gescannt und die prozentuale Sedimentation nach Abzug der Eigensedimentation mit dem Programm ImageQuant 5.0 quantifiziert (Abb. 2.2.8 (B)).

Sowohl die Punktmutante Y67V und die Deletionsmutante ΔEH zeigten ebenso wie der Wildtyp eine Bindung an Liposomen, wobei die stärkste Bindung an PI(4)P gezeigt werden konnte. Die Punktmutante T72N, die den konstitutiv-inaktiven GDP-gebundenen Zustand von EHD1 darstellen soll, zeigte keine Spezifität für eines der Phosphoinositide. Das konnte auch für die Deletionsmutante Δ1-222 gezeigt werden, bei der die N-terminale G-Domäne deletiert wurde (Abb. 2.2.8). Die einzelne EH-Domäne bindet ebenfalls nicht an Liposomen.

Die Ergebnisse dieses ersten, vorläufigen Experiments zeigen, daß die direkte Lipidbindung von EHD1 wahrscheinlich nicht über eine Lipidbindungsdomäne im C-terminalen Teil des Proteins erfolgt, sondern von dem Vorhandensein der G-Domäne bzw. speziell von der Nukleotidbindung abhängig sein könnte. Weitere Experimente sollten jedoch zur Bestätigung der Daten durchgeführt werden.

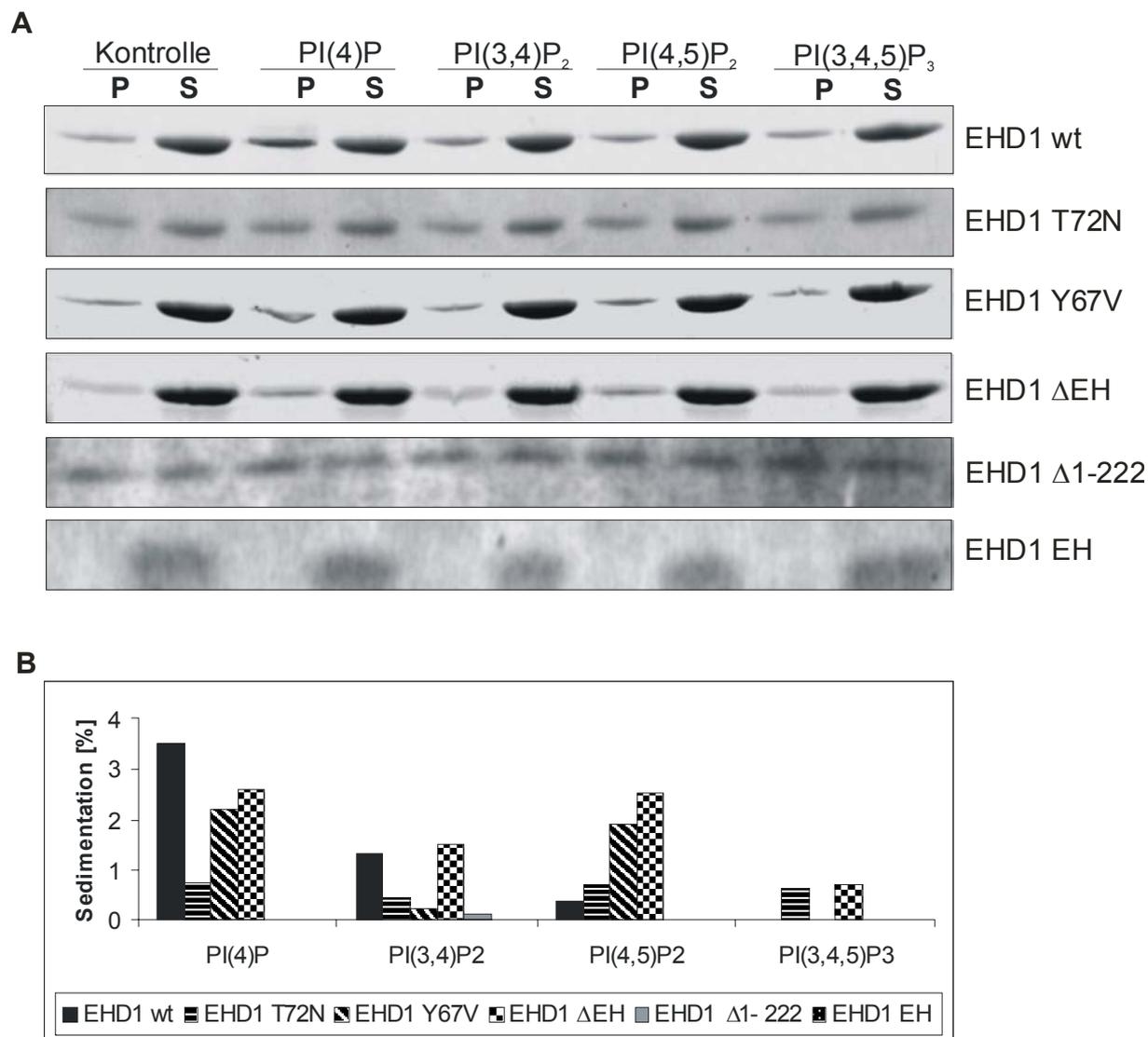


Abbildung 2.2.8: Bindung der EHD1-Deletionsmutanten an mit spezifischen Phosphoinositid-angereicherten Liposomen. Die Mutanten sedimentieren aufgrund ihrer Bindung an spezifische Phosphoinositide unterschiedlich stark nach Zentrifugation (**A**). Jeweils das Liposomen-haltige Pellet (P) mit den gebundenen Proteinen und der nicht-gebundene Überstand (S) wurden auf ein SDS-Polyarylamidgel aufgetragen und Coomassie Brilliant Blue® gefärbt. Zur Bestimmung der Eigensedimentation diente ein Ansatz ohne Liposomen (Kontrolle). (**B**) Zur Quantifizierung wurden die Banden gescannt und der Grad der Sedimentation nach Abzug der prozentualen Eigensedimentation dargestellt.

2.2.3 EHD-Proteine können Liposomen tubulieren

Für mehrere Proteine dient die Interaktion mit Phosphoinositiden über ihre Lipidbindungsdomänen nicht nur der Rekrutierung an bestimmte Organell-Membranen, sondern auch Strukturen zur Penetration oder aktiven Modulierung der Lipidmembran auf (vgl. Abschnitt 1.5.2). Epsin kann eine amphiphatische Helix in die Membran einlagern, was zur Krümmung führt (Ford *et al.*, 2002). Eine amphiphatische Helix führt bei N-BAR-Proteinen wie Amphiphysin ebenfalls zu einer Membran-modulierenden Funktion (Peter *et al.*, 2004). Die GTPase Dynamin moduliert Lipidmembranen in einem Nukleotid-abhängigen Schritt (Hinshaw und Schmid, 1995, Sweitzer und Hinshaw, 1998). *In vitro* lässt sich die Membran-modulierende Funktion eines Proteins durch die Fähigkeit, Liposomen tubulieren zu können, nachweisen.

GST-EHD1 wurde zusammen mit Liposomen inkubiert, auf den Trägerfilm aufgetragen und mit 2 %igem Uranylacetat gefärbt. Bei dieser Negativ-Färbung werden die Liposomen als helle, runde Flecken dargestellt. Nach Zugabe von GST-EHD1 wt können neben den Liposomen tubuläre Strukturen beobachtet werden.

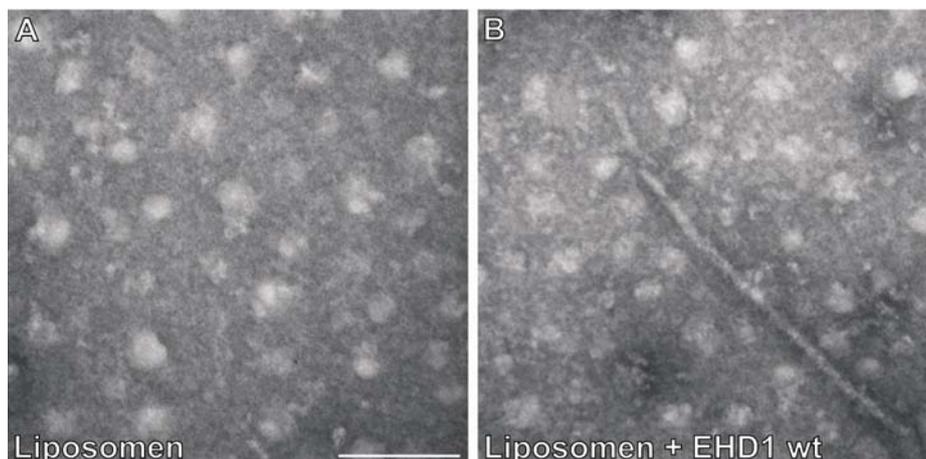


Abbildung 2.2.9: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Liposomen und deren Tubulierung durch Zugabe von GST-EHD1 wt. Das Färbemittel lagert sich dunkel um das so hell kontrastierte biologische Material. Die Liposomen sind als runde Flecken dargestellt. Durch Zugabe von GST-EHD1 können tubuläre Strukturen nachgewiesen werden. Der Skalierungsbalken entspricht 150 nm.

2.2.4 Oligomerisierung der EHD-Proteine

Für viele Lipidbindungsdomänen wurde eine Abhängigkeit bzw. Stabilisierung der Lipidbindung von einer Dimerisierung der Proteindomänen beschrieben (vgl. Abschnitt 1.5.2). Bei Proteinen mit einer BAR-Domäne (u.a. Amphiphysin oder Arfaptin (Peter *et al.*, 2004)) ist eine Dimerisierung zur Entstehung von drei helikalen hydrophoben Bereichen (Bananenform) notwendig, die die Interaktion mit den Lipiden gewährleisten.

Für EHD1 sollte über Crosslinking-Experimente festgestellt werden, ob das Protein dimerisiert bzw. oligomerisiert. Desweiteren sollte die Oligomerisierungsdomäne mit Hilfe der Deletionsmutanten identifiziert werden und geklärt werden, ob die mögliche Oligomerisierung von der Nukleotidbindung abhängig ist.

Während der Durchführung der Experimente wurden Daten zur P-Loop-abhängigen Oligomerisierung der EHD-Proteine veröffentlicht (Lee *et al.*, 2005, Naslavsky *et al.*, 2006). Die Autoren verwendeten dabei das Hefe-Two-Hybrid-System und konnten zeigen, daß eine Punktmutation in der Nukleotidbindungsstelle von EHD1 (Rme-1 G81R, EHD1 und EHD3 G65R) und eine Deletion der G-Domäne (Rme-1 Δ P-Loop), eine Interaktion mit EHD1 wt bzw. der Mutanten untereinander verhindert. Eine Hetero-Oligomerisierung von EHD1 und EHD3 konnte bei Verwendung der Mutanten ebenfalls nicht erfolgen.

Eigene Daten zur Oligomerisierung der EHD-Proteine beschränken sich hier nur auf die durchgeführten Crosslinking-Experimente, da dabei rekombinantes Protein ohne *tag* verwendet wurde.

2.2.4.1 *EHD-Proteine dimerisieren und die Dimerisierung ist dabei von einer funktionalen G-Domäne abhängig*

Aufgereinigtes rekombinantes EHD1 wt wurde zum einen bei gleich bleibender Proteinkonzentration (0,75 μ M) mit steigenden Konzentrationen des Crosslinkers BS³ und zum anderen bei unterschiedlichen Proteinkonzentrationen mit 125 μ M BS³ inkubiert. Neben der Monomerbande konnten wie erwartet auch höhere Oligomere nachgewiesen werden, wobei eine deutliche Dimer-Bande und etwas schwächere Trimer-Bande beobachtet werden konnte (Abb. 2.2.10 (A)).

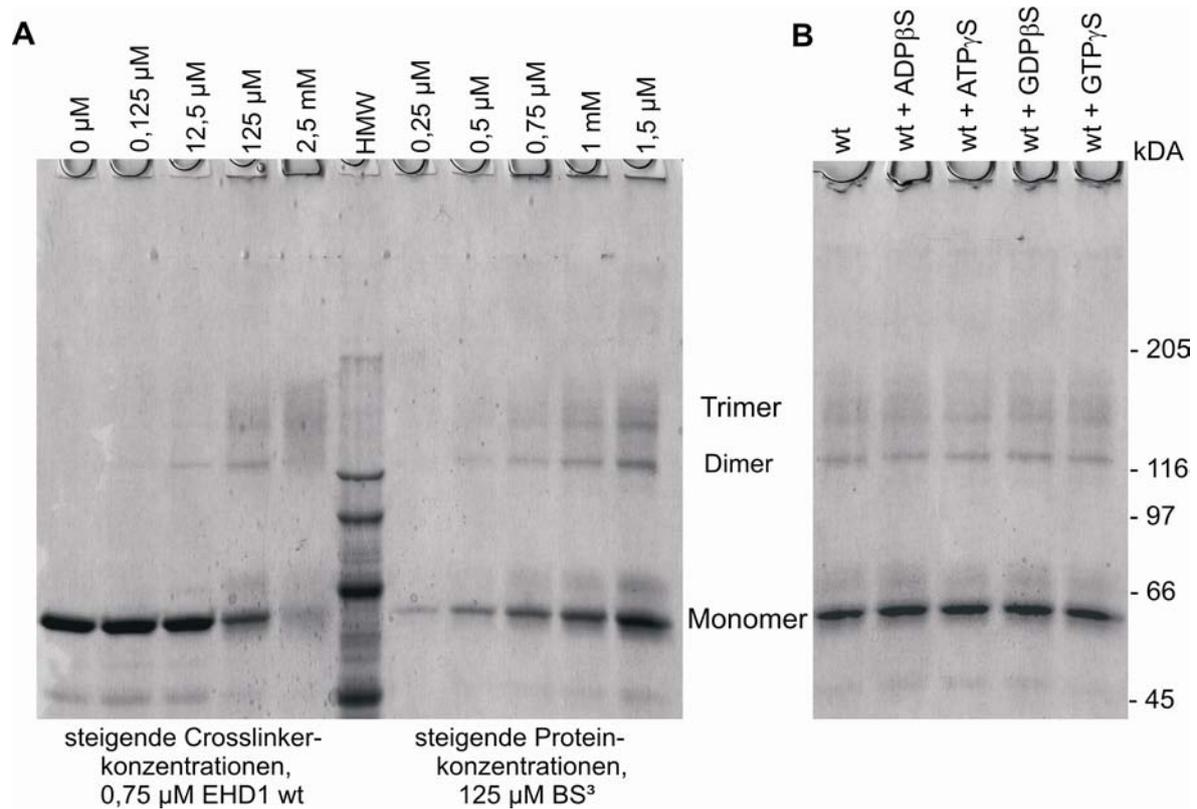


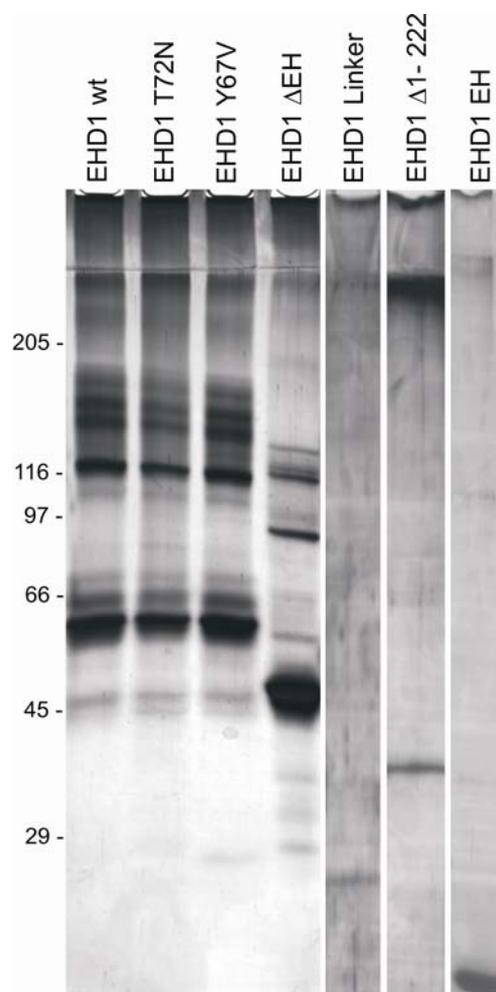
Abbildung 2.2.10: Crosslinking von EHD1 wt mit BS³ und Einfluß verschiedener Nukleotide auf die Dimerisierung. Die Proteinkonzentration (0,75 μ M) wurde konstant gehalten und mit einer zunehmenden Menge an Crosslinker (0-2,5 mM) inkubiert. Mit steigender Crosslinker Konzentration zeigt EHD1 ein verändertes Laufverhalten, wobei ein Dimer und Trimer zu sehen sind, die auch bei Verdoppelung der Proteinkonzentration konstant bleiben (**A**). Unterschiedliche Nukleotide scheinen keinen Einfluß auf die Oligomerisierung zu haben, denn die Intensität der Dimer-Bande bleibt in allen getesteten Fällen gleich (**B**).

Eine Abhängigkeit der Dimerisierung von der Bindung eines spezifischen Nukleotides konnte unter diesen Versuchsbedingungen nicht nachgewiesen werden. EHD1 wt wurde dazu vor Zugabe des Crosslinkers mit einem 100-fachen Überschuß der Nukleotide für 30 min inkubiert (Abb. 2.2.10 (**B**)).

Crosslinking der EHD1-Deletionsmutanten

Mit den für EHD1 generierten Deletionsmutanten sollte die Abhängigkeit der Dimerisierung von einer intakten bzw. funktionalen G-Domäne bestätigt werden. Jeweils 0,75 μM der rekombinanten Proteine wurde mit 125 μM Crosslinker inkubiert und das Gel aufgrund der geringen Proteinmenge einiger Mutanten Silber gefärbt (Abb. 2.2.11). Die Varianten EHD1 Linker, EHD1 $\Delta 1-222$ und die EH-Domäne von EHD1 dimerisierten nicht, wohingegen der Wildtyp, die Punktmutanten T72N und Y67V und die Variante ohne EH-Domäne Dimere und höhere Oligomere bildeten.

Abbildung 2.2.11: Crosslinking der EHD1 Deletionsmutanten. Silber-gefärbte SDS-Polyacrylamid-Gradientengele zum Nachweis der Oligomerisierung der einzelnen EHD1-Deletionsmutanten. Die Mutanten EHD1 Linker, EHD1 $\Delta 1-222$ und die EH-Domäne von EHD1 dimerisierten im Gegensatz zu EHD1 wt, den Punktmutanten T72N und Y67V und EHD1 ΔEH nicht. Die eingesetzte Proteinkonzentration betrug 0,75 μM bei einer verwendeten Crosslinker-Konzentration von 125 μM BS³.



Die Punktmutante T72N dimerisiert ebenfalls. Die Einführung der Punktmutation scheint die Konformation des Proteins im Bezug auf freie Lysinreste nicht zu beeinträchtigen, so daß sie für die Vernetzung mittels Crosslinker zur Verfügung stehen.

2.2.5 Auswirkung der Mutationen beider Hauptdomänen auf die intrazelluläre Lokalisation der einzelnen EHD-Proteine

Für EHD1 wurde bereits beschrieben (Caplan *et al.*, 2002), daß nach Überexpression in Zellen eine Punktmutation in der Nukleotidbindungsstelle oder im Bereich der G4-Box zu einer cytosolisch-verteilten Variante führt. Dies kann durch die mangelnde Fähigkeit erklärt werden, di- oder oligomerisieren zu können und dadurch an Lipidmembranen binden zu können (eigene Daten). Eine Inhibition der Bindung an NPF-Motive in Bindungspartnern durch eine Punktmutation in der EH-Domäne führt zu einem Defekt im *Recycling* von Rezeptoren zurück an die Plasmamembran (Grant *et al.*, 2001, Lin *et al.*, 2001, Caplan *et al.*, 2002).

Um zu überprüfen, ob die Einführung der Punktmutation T72/75N in der Nukleotidbindungsstelle bei allen EHD-Proteinen den gleichen Effekt auf die intrazelluläre Verteilung hat, wurde für alle EHDs diese Punktmutante generiert. Ebenso sollte die EH-Domäne für aller Familienmitglieder deletiert werden, um festzustellen, ob für jedes der EHD-Proteine eine Beteiligung an dem *Recycling* von Rezeptoren postuliert werden kann.

Dazu wurden die generierten Mutanten zusammen mit den Wildtyp Varianten als Fusionsproteine mit einem Hämagglutinin-Peptid (HA-) in NIH3T3 Zellen überexprimiert und mit dem Fluoreszenz-Mikroskop aufgenommen (Abb. 2.1.12).

Die Verteilung der EHD1-Varianten entspricht dabei der publizierten Lokalisation (Grant *et al.*, 2001, Lin *et al.*, 2001, Caplan *et al.*, 2002) und bestätigt außerdem Daten über die Lokalisation des endogenen EHD1 in NIH3T3 Fibroblasten (Abb. 2.1.2). Demnach ist EHD1 wt an kleinen tubulären "*Cargo*-Strukturen" (Caplan *et al.*, 2002) assoziiert, die sowohl im Cytoplasma, als auch an der Plasmamembran gefunden werden können (Abb. 2.2.12 (A)). Die Deletion der EH-Domäne von EHD1 führte wie beschrieben zu einer punktförmigen Verteilung ohne tubuläre Strukturen (B). Die konstitutiv-inaktive Variante T72N von EHD1 zeigte wie erwartet die feine cytosolische Verteilung (C), die inaktiven Varianten der anderen Isoformen resultierten in dem gleichen Phänotyp (F, I und L). Eine Ausnahme dabei ist die Punktmutante EHD4 T75N, die in 25% der transfizierten NIH3T3 Zellen in unbekanntem Strukturen akkumuliert (L).

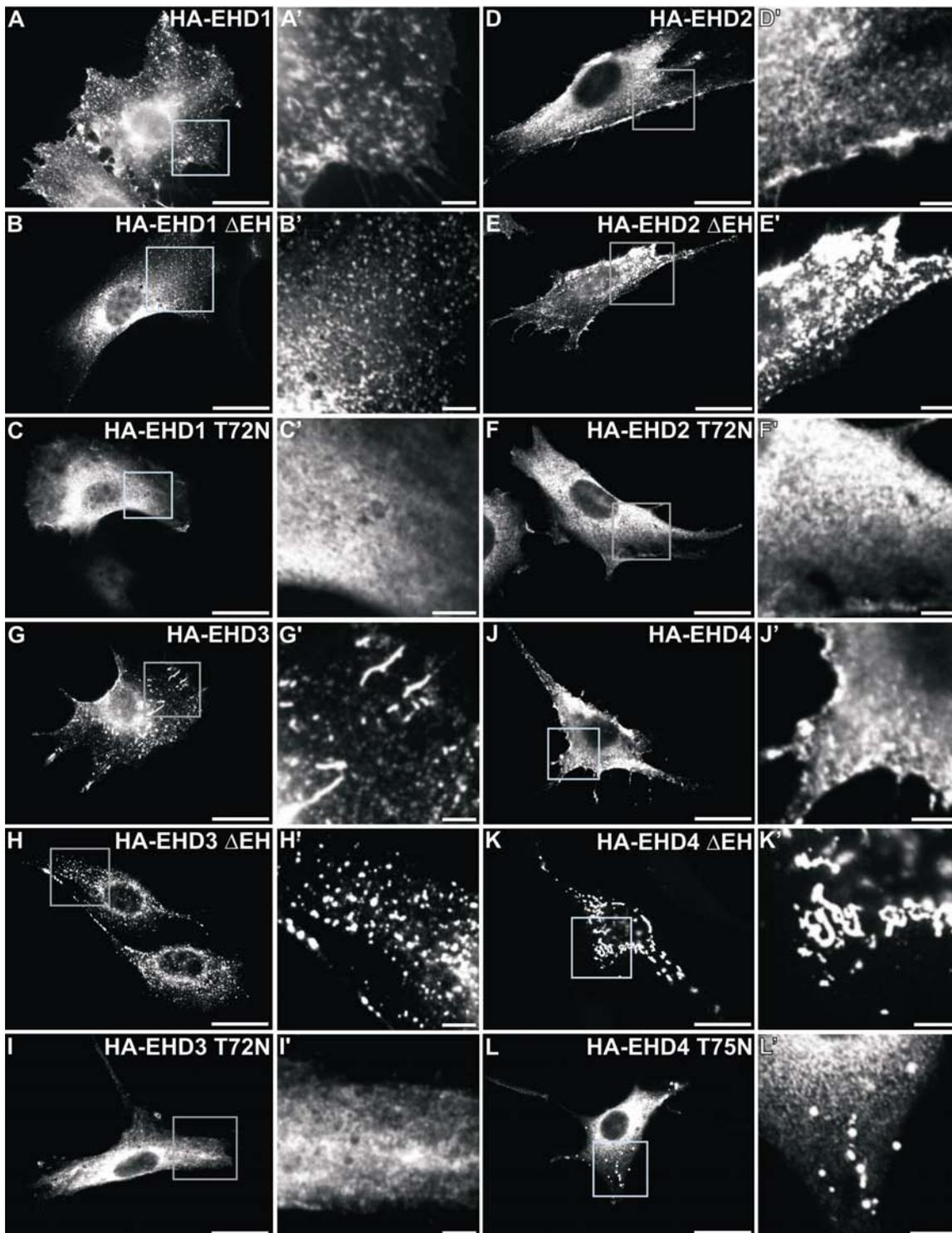


Abbildung 2.2.12: Rolle der G- und EH-Domäne im *Targeting* der EHD-Proteine. NIH 3T3 Zellen wurden transient mit HA-getagten EHD-Konstrukten transfiziert, den Wildtypen HA-EHD1 (A), HA-EHD2 (D), HA-EHD3 (G) und HA-EHD4 (J), den Mutanten mit Deletion der EH-Domäne HA-EHD1 Δ EH (B), HA-EHD2 Δ EH (E), HA-EHD3 Δ EH (H) und HA-EHD4 Δ EH (K) und den Punktmutanten HA-EHD1 T72N (C), HA-EHD2 T72N (F), HA-EHD3 T72N (I), und HA-EHD T75N (L). Alle Bilder wurden über Fluoreszenz-Mikroskopie aufgenommen. Die Skalierungsbalken in den Übersichtsaufnahmen entsprechen 25 μ m und in den Vergrößerungen 5 μ m.

Ähnliche Unterschiede konnten für die anderen EHD-Proteine gezeigt werden: Im Gegensatz zu der Assoziation an tubulären Strukturen und der Plasmamembran der Wildtyp EHD Proteine (Abb.2.2.12: EHD1 (**A**), EHD2 (**D**), EHD3 (**G**) und EHD4 (**J**)), beeinflusst die Deletion der EH-Domäne das Targeting der EHD-Proteine und führt zu einer Akkumulierung in bestimmten, aber bislang unbekanntem Strukturen (Abb.2.2.12: EHD1 Δ EH (**B**), EHD2 Δ EH (**E**), EHD3 Δ EH (**H**) und EHD4 Δ EH (**K**)).

Für die Punktmutante kurz vor der EH-Domäne (Rme-1 G429R) von EHD1 wurde eine Assoziation an Strukturen beschrieben, die an dem Rezeptor-*Recycling* beteiligt sind. Dies wurde deshalb für die anderen Isoformen ebenfalls überprüft, indem die Wildtyp und die Varianten ohne EH-Domäne zusammen mit einem GFP-Rab11-Konstrukt in NIH 3T3 Fibroblasten überexprimiert wurden (Abb. 2.2.13). Sowohl für EHD1 wt, als auch für EHD3 wt konnte eine partielle, jedoch klare Colokalisation der tubulären, teilweise vom *Recycling* Endosom ausgehenden Strukturen mit GFP-Rab11 gezeigt werden, was die Rolle dieser Proteine am *Recycling* von Plasmamembran-Strukturen bestätigt (**A**, **A'**, **E**, **E'**). Die Deletion der EH-Domäne verhindert bei beiden Proteinen die Bildung von tubulären Transportstrukturen, die punktförmigen Strukturen überlappen dennoch mit GFP-Rab11 und dem *Recycling* Endosom (**B**, **B'**, **F**, **F'**). Für EHD2 wt konnte keine Beteiligung der wt-positiven Strukturen an dem *Recycling* von Plasmamembranbestandteilen gezeigt werden (**C**, **C'**). Auch für die Δ EH-Mutante konnte nur eine partielle Überlappung mit GFP-Rab11 markierten Strukturen am *Recycling* Endosom gezeigt werden (**D**, **D'**). Für die Isoform EHD4 assoziierte weder der Wildtyp, noch die Δ EH-Mutante an GFP-Rab11-positiven Strukturen, so daß eine Beteiligung von EHD4 an einem anderen Transportweg vermutet werden kann (**G**, **G'**, **H**, **H'**).

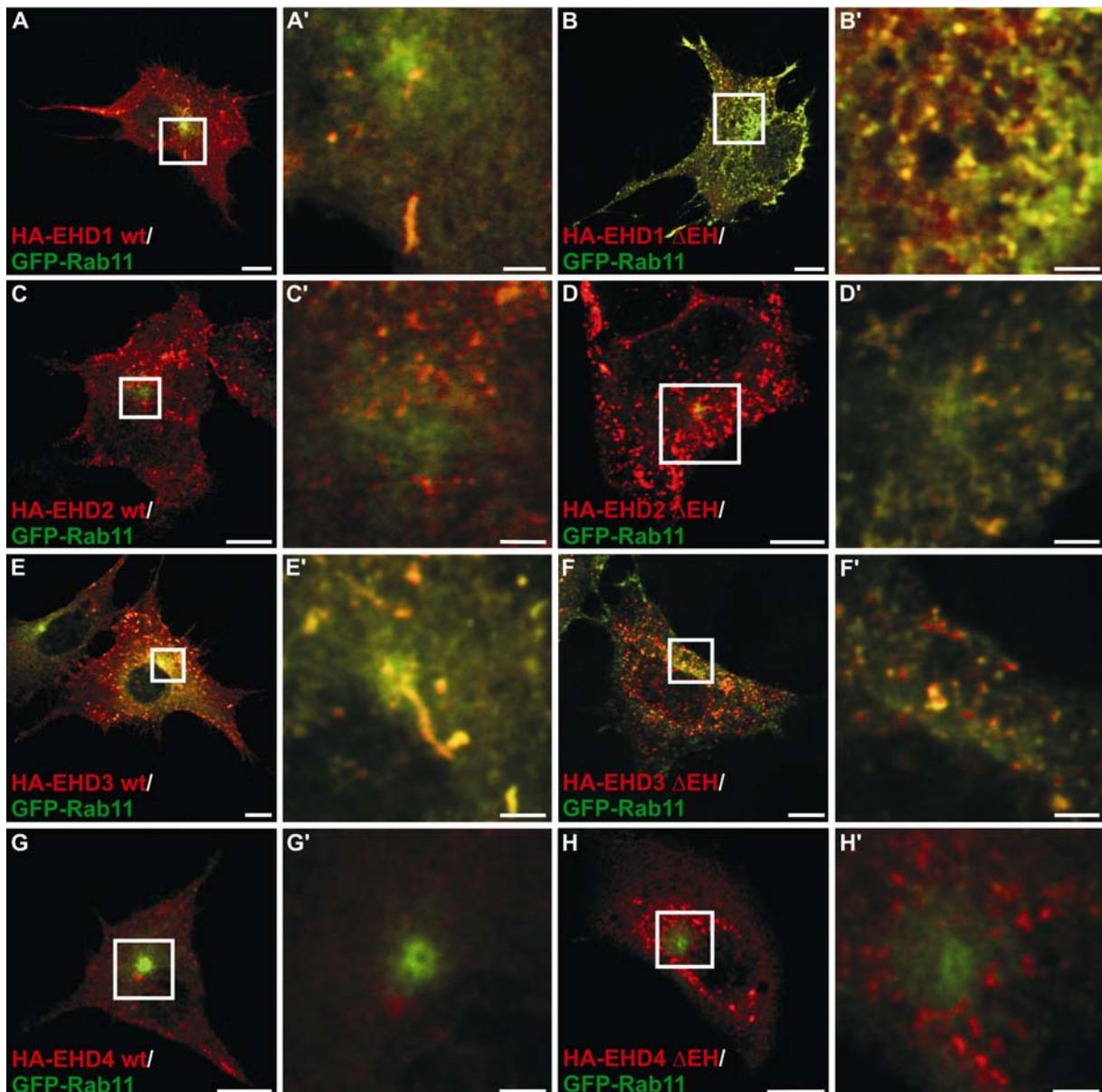


Abbildung 2.2.13: Analyse der Colokalisationen von HA-EHD wt und Δ EH Varianten mit Strukturen des Rezeptor-Recycling-Weges. Dabei zeigen sowohl die Wildtypen, als auch die Deletionsmutanten Δ EH der Isoformen EHD1 und 3 eine klare Colokalisation mit GFP-Rab11-markierten *Recycling* Strukturen (**A**, **B**, **E**, **F**). Für die Deletionsmutante Δ EH der Isoform EHD2 konnte eine partielle Überlappung mit GFP-Rab11 an dem *Recycling* Endosom gezeigt werden (**D**), für EHD2 wt, EHD4 wt und der Deletionsmutante konnte keine Überlappung mit GFP-Rab11-positiven Strukturen gezeigt werden (**C**, **G**, **H**). Alle Aufnahmen wurden mittels konfokaler Mikroskopie erstellt, die Skalierungsbalken in den Übersichtsaufnahmen entsprechen 8 μ m und in den Vergrößerungen 2 μ m.

2.3 EHD4-abhängiger Transportweg in Huh-7 Zellen

Die Funktion der G-Domäne der EHD-Proteine liegt also scheinbar in der Dimerisierung und einer damit verbundenen Membranassoziation. Eine Deletion der EH-Domäne führt bei allen Isoformen zu einer Akkumulierung in Membran-haltigen Strukturen, die bei EHD1 und 3 deutlich, bei EHD2 teilweise mit dem *Recycling* Endosom überlappen. Die Strukturen der EHD4 Δ EH-positiven Akkumulierungen sollten im Folgenden identifiziert werden und deren Auswirkung genauer untersucht werden.

2.3.1 Auswahl der Zelllinie und Vergleich verschiedener Expressionsvektoren

Endogenes EHD4 wird in NIH3T3 Fibroblasten und Huh-7 humanen Hepatoma Zellen exprimiert, aber nur in den Huh-7 Zellen konnte eine Assoziation des endogenen Proteins an tubuläre Strukturen gezeigt werden (Abb.2.3.1 (B)). Für EHD1 konnten die tubulären Strukturen als Transportstrukturen für den MHC1 identifiziert werden (Caplan *et al.*, 2002), woraufhin auch für die anderen Isoformen eine ähnliche Funktion vermutet wird. Die meisten der an den Transportprozessen beteiligten Proteine werden in den humanen Huh-7 Zellen endogen exprimiert, nur Caveolin wird in diesen Zellen nicht exprimiert (Abb. 2.3.1 (A)).

Um ausschließen zu können, daß der nach Überexpression der EHD4-Konstrukte gezeigte Phänotyp auf Wechselwirkungen des *tags* beruhen, wurden sowohl *ungetagte* Varianten (Abb. 2.3.2 (B – D)), als auch Varianten mit verschiedenen *tag*-Längen und Positionen in Huh-7 Zellen transfiziert. Der kurze N-terminale Hämagglutinin-*tag* beeinflusst dabei die Lokalisation der Konstrukte nicht, die Phänotypen entsprechen den *ungetagten* Varianten (E – G). Konstrukte mit einem großen dsRed-*tag* am N-terminalen Bereich vor der G-Domäne zeigen eine veränderte Lokalisation, so inhibiert der *tag* im Falle von nRed-EHD4 Δ EH die Aktivität der G-Domäne und führt zu einer cytosolischen Verteilung (J). Auch der so *getagte* Wildtyp und die Punktmutante T72N zeigen eine veränderte Lokalisation und neigen zur Aggregatbildung in den Zellen (I, K). Die Konstrukte mit einem C-terminalen dsRed-*tag* zeigen Ähnlichkeit mit den *ungetagten* Varianten, neigen aber aufgrund der Eigenschaften des *tags* ebenfalls zu einer Akkumulierung in den Zellen,

weshalb in den nachfolgenden Experimenten immer die Konstrukte mit den kurzen N-terminalen HA-tags benutzt wurden.

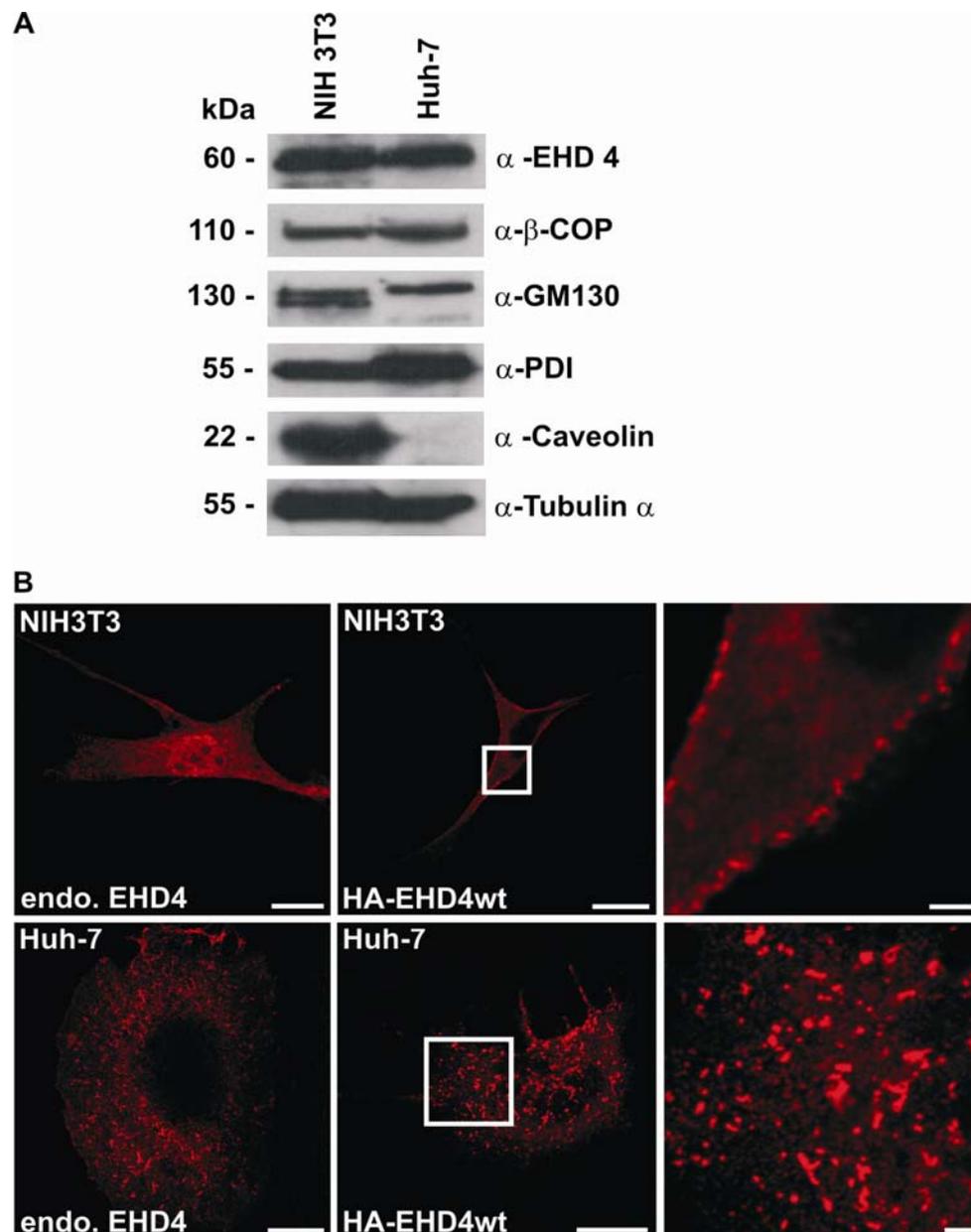
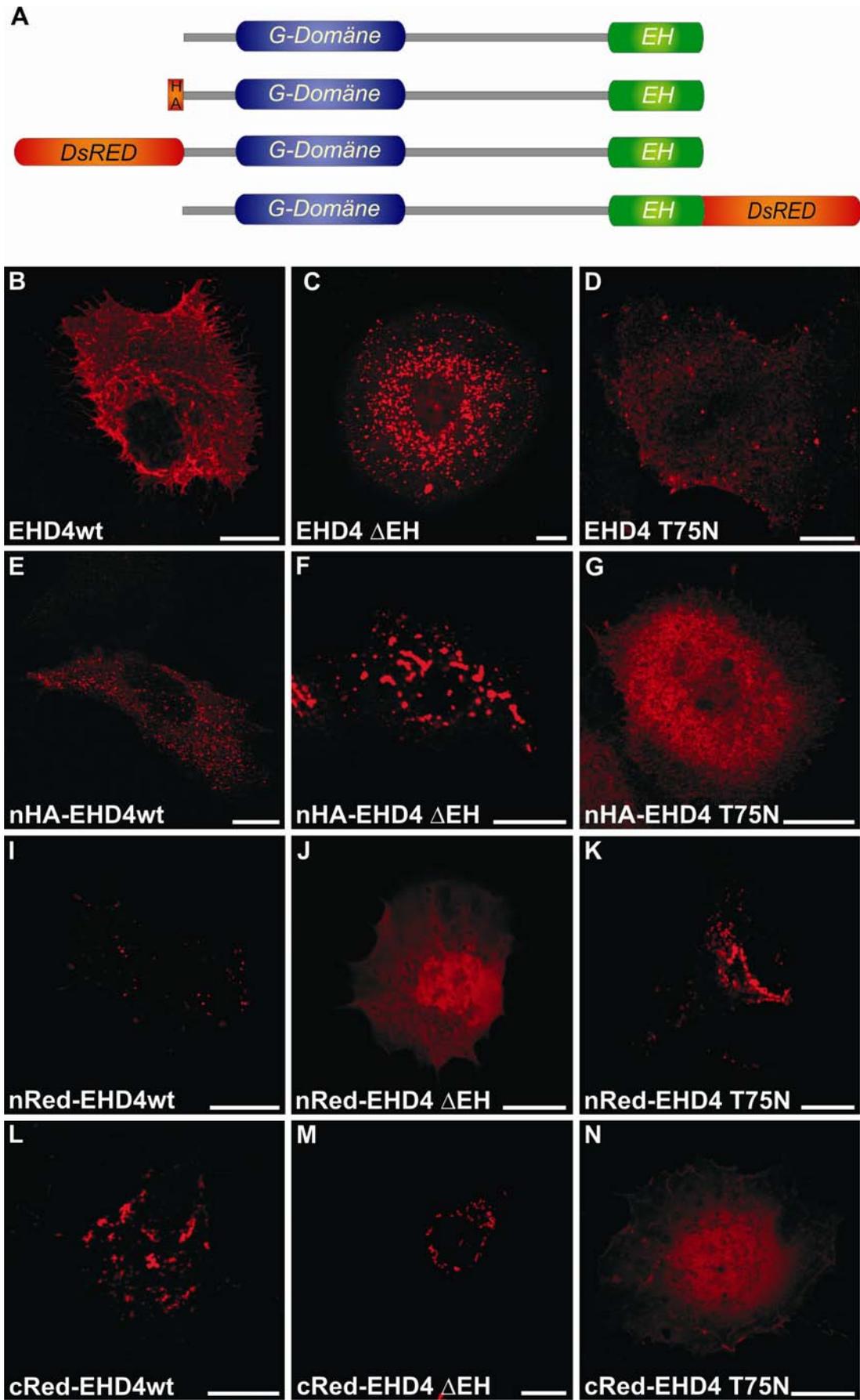


Abbildung 2.3.1: Expressionsprofil von NIH3T3 Fibroblasten und Huh-7 Humanen Hepatoma Zellen. Vergleich der Proteinexpression über Western Blotting (**A**) und Vergleich der Lokalisation des endogenen mit überexprimiertem EHD4-Proteins in beiden Linien (**B**). Beide Linien zeigen ein deutliches Expressionssignal für EHD4, aber nur in Huh-7 Zellen ist eine Assoziation an tubuläre Strukturen zu sehen. Alle Bilder wurden mit dem konfokalen Mikroskop aufgenommen, die Skalierungsbalken in den Übersichtsaufnahmen entsprechen 20 μ m, in den Vergrößerungen 2 μ m.



Vorherige Seite:

Abbildung 2.3.2: Abhängigkeit der EHD4 wt und Mutanten Lokalisation von der tag-Länge und –Position nach Überexpression in Huh-7 Zellen. (A) Domänenstruktur von EHD4. Die *ungetagten* EHD4-Konstrukte (B – D) zeigen eine typische Lokalisation, die durch die Verwendung von dem zu großen N-terminalen dsRed-tag verändert wird (nRed, I – K). Die N-terminalen Hämagglutinin-getagten Varianten (nHA, E – G) entsprechen den Phänotypen der *ungetagten* Konstrukten, die C-terminal dsRed-getagten Konstrukten (cRed, L – N) ähneln nach Überexpression dem Phänotyp der *ungetagten* Konstrukten, neigen jedoch aufgrund der dsRed-Eigenschaften zur Akkumulierung. Alle Bilder wurden am konfokalen Mikroskop aufgenommen, die Skalierungsbalken entsprechen 16 µm.

2.3.2 Identifizierung des EHD4 Δ EH-positiven Kompartiments

2.3.2.1 Analysen zur Colokalisation mit verschiedenen Kompartimentmarkern

Die Δ EH-positiven Strukturen überlappen nicht mit Endosomen oder dem Golgi-Apparat und sind resistent gegen Brefeldin A

Die EHD4 Δ EH-positiven Strukturen zeigten eine zeitabhängige Vergrößerung der Strukturen nach Überexpression in Zellen (Abb. 2.3.3 (D)). Die Vergrößerung kann dabei auf einer Verschmelzung der Δ EH-positiven Strukturen oder einer negativen Auswirkung auf den Vesikeltransport ausgehend von dem Δ EH-positiven Kompartiment beruhen.

Zur Identifizierung des Δ EH-positiven Kompartimentes wurden Marker für das Frühe Endosom, *Recycling* Endosom, Golgi und ER verwendet. Es konnte dabei keine Colokalisation mit den Markern GFP-Rab5 und EEA1 für das Frühe Endosom gezeigt werden (Abb. 2.3.3 (B, C)), auch konnte keine Überlappung der Δ EH-Strukturen mit dem *Recycling* Endosom, markiert durch GFP-Rab11, in Huh-7 Zellen verifiziert werden (A). Ebenso konnte eine Colokalisation mit Markern für den Golgi-Apparat (GM130, β -COP) weder zu einem frühen (14 h), noch zu dem späteren Expressionszeitpunkt (20 h) nach Transfektion von EHD4 Δ EH gezeigt werden (Abb. 2.3.3 (F und G)).

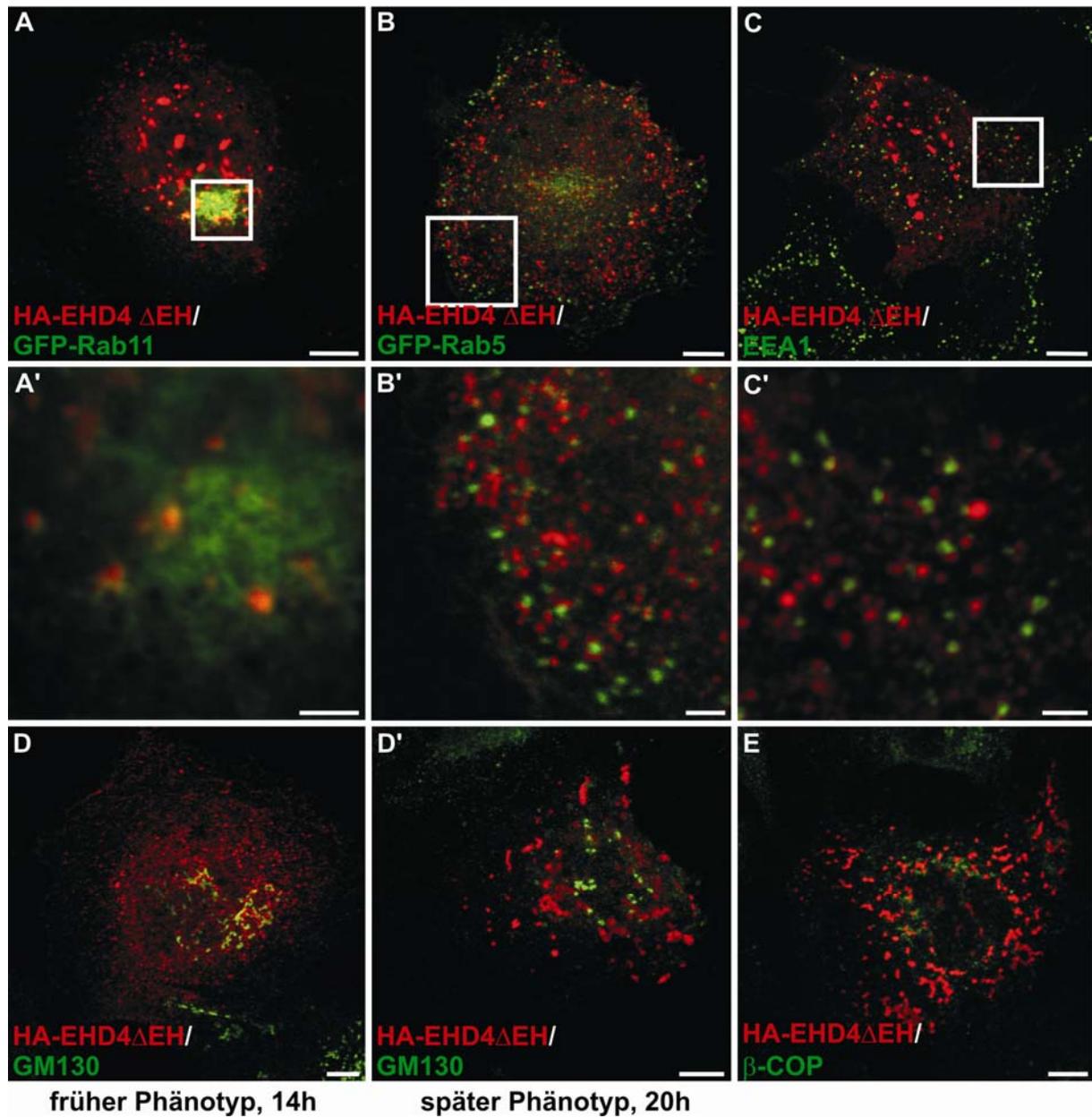
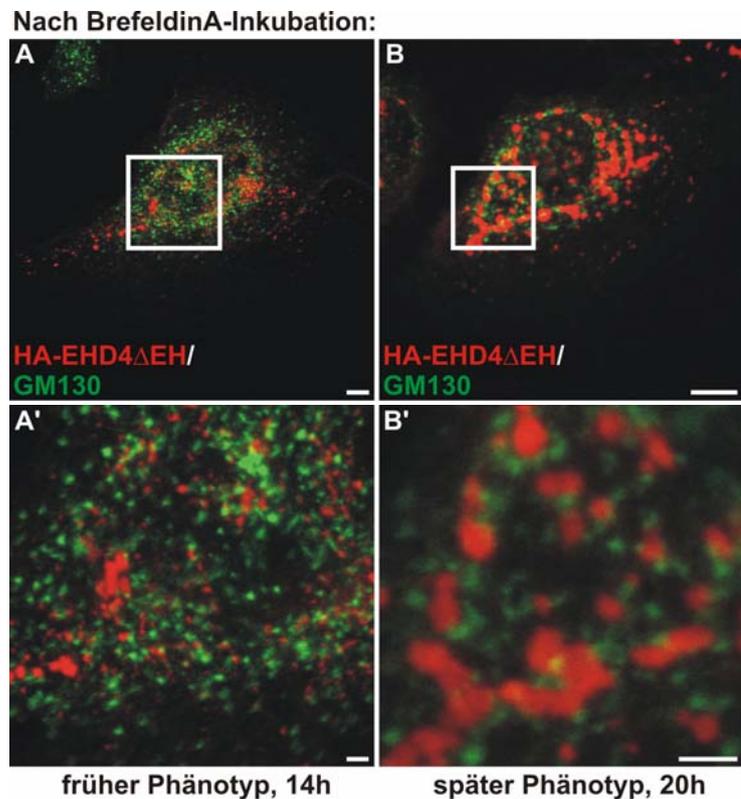


Abbildung 2.3.3: Identifizierung des EHD4 Δ EH-positiven Kompartiments. Die Δ EH-positiven Strukturen zeigen keine Colokalisationen mit endosomalen Markern, wie GFP-Rab5 und EEA1 für das Frühe Endosom und GFP-Rab11 für das *Recycling* Endosom (**A – C**). Ebenso wurden keine Colokalisationen mit den Golgi-Markern GM130 und β -COP (**D - E**) festgestellt. Alle Aufnahmen wurden mit dem konfokalen Mikroskop erstellt, die Skalierungsbalken in den Übersichtsaufnahmen entsprechen 8 μ m und in den Vergrößerungen 2 μ m.

Zur Identifizierung von vom Golgi ausgehenden Strukturen wird häufig die Substanz Brefeldin A benutzt, die die Initiator-GTPase des Golgi-internen COPII-Transportes inhibiert und somit zu einer Fragmentierung des Golgi und der vom Golgi-Apparat ausgehenden Strukturen führt (Hendricks *et al.*, 1992, Wood und Brown, 1992). Die EHD4 Δ EH-positiven Strukturen sind jedoch sowohl zu einem frühen Expressionszeitpunkt (14 h), als auch zu einem späteren Expressionszeitpunkt (20 h) resistent gegen eine Behandlung mit Brefeldin A, wohingegen die Golgi-Strukturen (markiert durch GM130) zerstört sind (Abb. 2.3.4).

Abb. 2.3.4: Resistenz der Δ EH-positiven Strukturen gegen Brefeldin A-Behandlung. Sowohl die Δ EH-positiven Strukturen des frühen (A), als auch des späten Phänotyps (B) können nicht durch Behandlung mit Brefeldin A zerstört werden. Die Bilder wurden mit konfokaler Mikroskopie aufgenommen, die Skalierungsbalken in den Übersichtsaufnahmen entsprechen 8 μ m und in den Vergrößerungen 2 μ m.



Die Δ EH-positiven Strukturen überlappen im späten Phänotyp mit sekretorischen Ausgangsstellen (ERES) der ER-Membran

Der frühe Phänotyp der Δ EH-Strukturen (14 Stunden nach Transfektion, Abb. 2.3.5 (A)) zeigte keine Überlappung mit dem ER-Marker PDI, 20 Stunden nach Transfektion jedoch konnte eine deutliche, aber partielle Colokalisation mit PDI nachgewiesen werden (B). Dabei zeigte sich, daß in den transfizierten Zellen jeweils Δ EH-Strukturen ohne Colokalisation mit PDI existieren und ebenso ER-Strukturen, die nicht Δ EH-positiv sind, implizierend, daß es sich bei den überlappenden Strukturen um ganz bestimmte ER-Strukturen handelt. Durch Verwendung eines Markers für die sekretorischen Ausgangsstellen (ERES, *ER exit sites*) auf der ER-Membran (GFP-Sec13, Bonifacino und Glick, 2004) konnte in NIH3T3 Fibroblasten eine partielle Colokalisation gezeigt werden. Eine Verwendung des GFP-Konstruktes in den humanen Huh-7 Zellen konnte nicht erfolgen, da es in diesen Zellen nur eine feine cytosolische Verteilung ohne Assoziation an Membranen zeigte. Die EHD4-Variante mit Deletion der kompletten EH-Domäne sitzt also an den sekretorischen Ausgangsstellen der ER-Membranen und scheint diese, abhängig von der Expressionsdauer zu vergrößern.

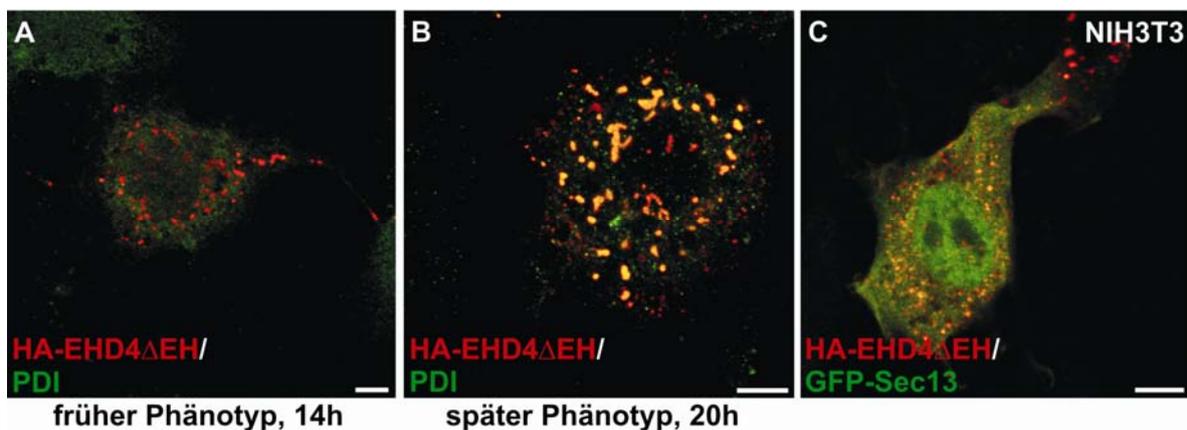


Abbildung 2.3.5: Colokalisation der EHD4 Δ EH-positiven Strukturen mit den sekretorischen Ausgangsstellen (*ER exit sites*) der ER-Membran. Der frühe Phänotyp der EHD4 Δ EH-positiven Strukturen zeigt noch keine Überlappung mit dem ER-Marker PDI (A), es ist jedoch eine deutliche Colokalisation mit PDI beim späten Phänotyp zu erkennen (B). In NIH3T3 konnte eine partielle Colokalisation mit dem Marker für ERES (GFP-Sec13) gezeigt werden (C). Die Aufnahmen wurden mit konfokaler Mikroskopie aufgenommen, die Skalierungsbalken entsprechen 8 μ m.

2. Ergebnisse

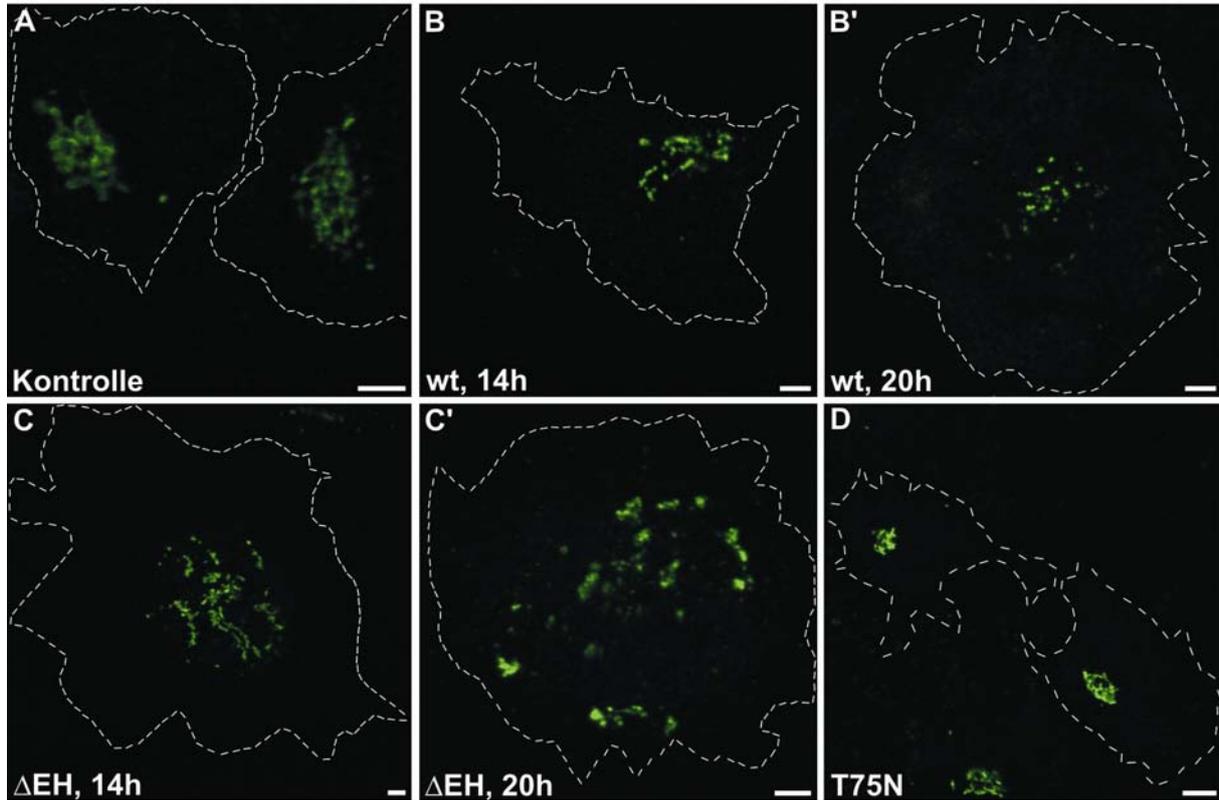
2.3.3 Inhibition der korrekten Strukturausbildung des Golgi-Apparates durch die Überexpression von EHD4 Δ EH

Die Vergrößerung der ERES durch die Expression der Δ EH-Variante von EHD4 könnte auf einer Blockade der Sekretion vom ER zum Golgi-Apparat beruhen. Deshalb wurde die Bildung des Golgi unter Verwendung des Antikörpers gegen GM130 zur Markierung der Golgi-Membranen genauer analysiert. Da der Golgi-Apparat zu verschiedenen Zeitpunkten des Zellzyklus fragmentiert wird und eine vesikuläre Verteilung aufweist, wurde die Struktur des Golgi nach Überexpression der EHD4 Δ EH-Variante mit den Golgi-Strukturen in untransfizierten Zellen und nach Transfektion von EHD4 wt und EHD4 T75N verglichen (Abb. 2.3.6). Dazu wurde eine feste Anzahl an transfizierten und untransfizierten Zellen auf die Struktur des Golgi untersucht und die Ergebnisse statistisch zusammengefasst (Abb. 2.3.6 **(E)**).

Es zeigte sich eine deutliche Fragmentierung des Golgi-Apparates bei ca. 80% der gezählten Zellen des späten Δ EH-Phänotyps. Die Fragmentierung ist dabei ebenfalls von der Expressionsdauer der Δ EH-Mutante abhängig, dennoch ist auch im frühen Phänotyp bei 43% der gezählten Zellen der Golgi zerstört (**C**, **C'**). Die Überexpression von EHD4 wt hat zu einem frühen Expressionszeitpunkt nur einen geringfügigen Einfluß auf die Struktur des Golgi (**B**), führt jedoch nach längerer Expression ebenfalls in 30% der gezählten Zellen zu einer veränderten Golgi-Struktur (**B'**). Die Punktmutante T75N hat auch nach längerer Expression keinen Einfluß auf die Golgi-Struktur (**D**). In den Kontrollzellen konnte eine Fragmentierung bei 4% der gezählten Zellen aufgrund der verschiedenen Zellzyklusstadien festgestellt werden (**A**).

Bei der Durchführung des Experimentes wurden zum einen der HA-Antikörper gegen die transfizierten EHD4-Konstrukte und der GM130-Antikörper gegen den Golgi verwendet, für die Abbildung wurden zur besseren Visualisierung nur die jeweiligen Golgi-Färbungen benutzt. Eine Verwendung eines DAPI-Markers zur Färbung des Zellkerns war aufgrund der Beschaffenheit des konfokalen Mikroskops ohne Laser für ultraviolette Färbungen nicht möglich. Ebenso kann keine Messung des Abstandes zwischen Zellkern und "Golgi-Mitte" erfolgen, da bei einem fragmentierten Golgi eine "Mitte" nicht bestimmt werden kann.

Golgi-Färbung mit GM130:



E

Fragmentierung des Golgi in Prozent

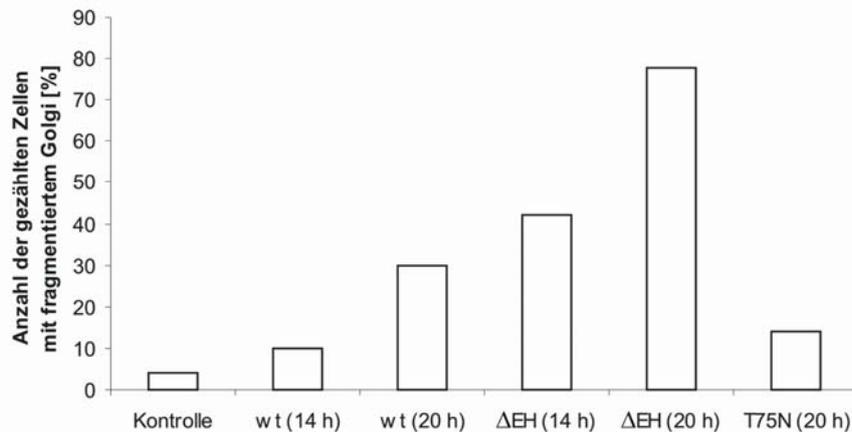


Abbildung 2.3.6: Einfluß der Überexpression der EHD4-Konstrukte auf die Bildung des Golgi.

Die Visualisierung der Golgi-Strukturen erfolgte über Verwendung des Markers GM130, (A) untransfizierte Zellen, (B) EHD4 wt, früher Phänotyp, (B') EHD4 wt, später Phänotyp, (C) EHD4 Δ EH, früher Phänotyp, (C') EHD4 Δ EH, später Phänotyp, (D) EHD4 T75N, (gestrichelte Linien markieren jeweils die Plasmamembran der Zellen). (E) Statistische Auswertung der Golgi-Zerstörung, prozentuale Angaben beziehen sich dabei auf eine feste Anzahl an gezählten Zellen. Die Aufnahme der Zellen erfolgte über konfokale Mikroskopie, die Skalierungsbalken entsprechen 4 μ m.

2. Ergebnisse

2.3.3.1 Nachweis der Golgi-Zerstörung durch eine subzelluläre Fraktionierung von Lysaten transfizierter NIH 3T3 Fibroblasten

Die Zerstörung des Golgi-Apparates durch die Überexpression von HA-EHD4 Δ EH in Zellen sollte durch eine subzelluläre Fraktionierung bestätigt werden. Da die Huh-7 Zellen sehr klein sind, wurden NIH3T3 Fibroblasten mit EHD4 Δ EH und EHD4 T75N als Negativkontrolle transfiziert. Beide Konstrukte zeigen in den Fibroblasten den gleichen Phänotyp, wie in Huh-7 Zellen: Δ EH überlappt auch in diesen Zellen partiell mit dem ER-Marker PDI, aber nicht mit dem Golgi-Marker GM130. T75N ist fein cytosolisch verteilt und überlappt weder mit PDI, noch mit Markern des Golgi-Apparates. Bei den EHD4 T75N transfizierten Zellen zeigte sich eine klare Trennung von Golgi (GM130, Fraktionen 8 - 11) und ER (PDI, Fraktionen 12 - 16), wobei T75N mit den Fraktionen größerer Dichte eluiert (Abb. 2.3.7). Bei den EHD4 Δ EH transfizierten Zellen zeigte sich eine Überlappung der fragmentierten Golgi-Strukturen mit dem ER in den Fraktionen 10 – 13, die eine teilweise Anreicherung von EHD4 Δ EH zeigen.

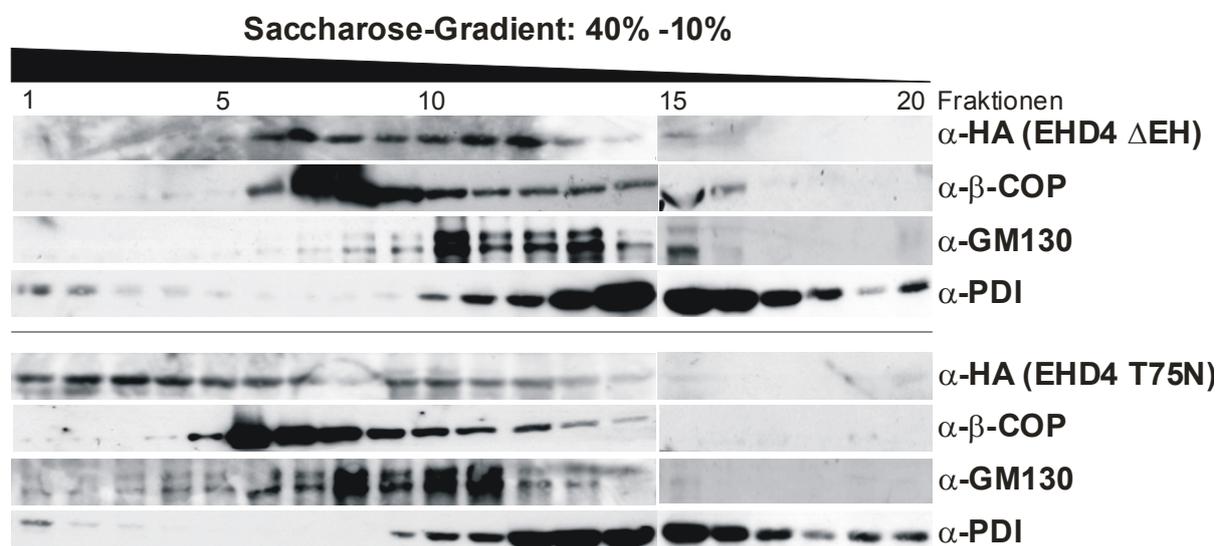


Abbildung 2.3.7: Subzelluläre Fraktionierung der HA-EHD4 Δ EH und T75N transfizierten NIH3T3 Fibroblasten. Bei den T75N transfizierten Zellen zeigte sich eine klare Trennung von Golgi- und ER-Strukturen. Bei den Δ EH transfizierten Zellen überlappen die für Golgi- und PDI-positiven Fraktionen, in denen teilweise Δ EH angereichert ist.

2.3.4 Charakterisierung des EHD4-Transportweges in Huh-7 Zellen unter Verwendung von sekretorischen Markern

2.3.4.1 Sekretorische Marker für bestimmte ER-Golgi-Transportwege

Große (trimeres Procollagen I, PCI) und kleine (VSV-G) Moleküle werden über unterschiedliche ERES für den Transport zum Golgi sortiert (vgl. Abschnitt 1.3.1), können aber über die gleichen tubulären Strukturen transportiert werden (Mironov *et al.*, 2003). Die EHD4 Δ EH-positiven ERES überlappten partiell mit dem COPII-Strukturprotein Sec13-GFP, so daß EHD4 sowohl an dem COPII-abhängigen Transport kleiner Moleküle, als auch an dem COPII-unabhängigen Transport großer Moleküle beteiligt sein könnte. Eine Unterscheidung der ERES sollte durch die Verwendung von PCI-GFP und VSV-G-GFP erfolgen, beide Konstrukte zeigten jedoch keine Expression in Huh-7 Zellen. Als sekretorische Marker wurden deshalb verschiedene GFP-Fusionsproteine verwendet, die in Molekülgröße und ihrem Sortierungsort an der Plasmamembran variieren:

- der Rezeptor LDLRwt-GFP, der auch endogen in den Huh-7 Zellen exprimiert wird und über einen Clathrin-abhängigen Mechanismus endocytiert wird (Kreitzer *et al.*, 2003, Polishchuk *et al.*, 2000),
- eine *recycling*-defiziente Mutante von dem Rezeptor (GFP-LDLR Y18A), die nur in sekretorischen Organellen und an der Plasmamembran lokalisiert sein kann (Kreitzer *et al.*, 2003),
- ein GPI-Linker-GFP-Konstrukt, das den sekretorischen Weg von GPI-verankerten Proteinen markieren soll (Nichols *et al.*, 2001) und über einen Clathrin/Dynamamin-unabhängigen Weg über tubuläre Strukturen endocytiert wird (Kirkham und Parton, 2005),
- ein p75-GFP -Konstrukt, das in polarisierten Zellen zur apikalen Membran sortiert wird (Kreitzer *et al.*, 2003).

Alle Marker wurden in Huh-7 Zellen transfiziert und wiesen dabei eine normale Sekretion zur Plasmamembran auf (Abb. 2.3.8 (A – D)), wobei ein Großteil der Proteine auch im Golgi lokalisiert ist. Bei einer Doppelfärbung mit dem Golgi-Marker GM130 konnte eine Colokalisation der Marker in spezifischen Golgi-Zisternen beobachtet werden, so daß man von einer funktionellen Sortierung im ER und am Golgi ausgehen kann (Abb. 2.3.8 (A', A'' – D', D'')).

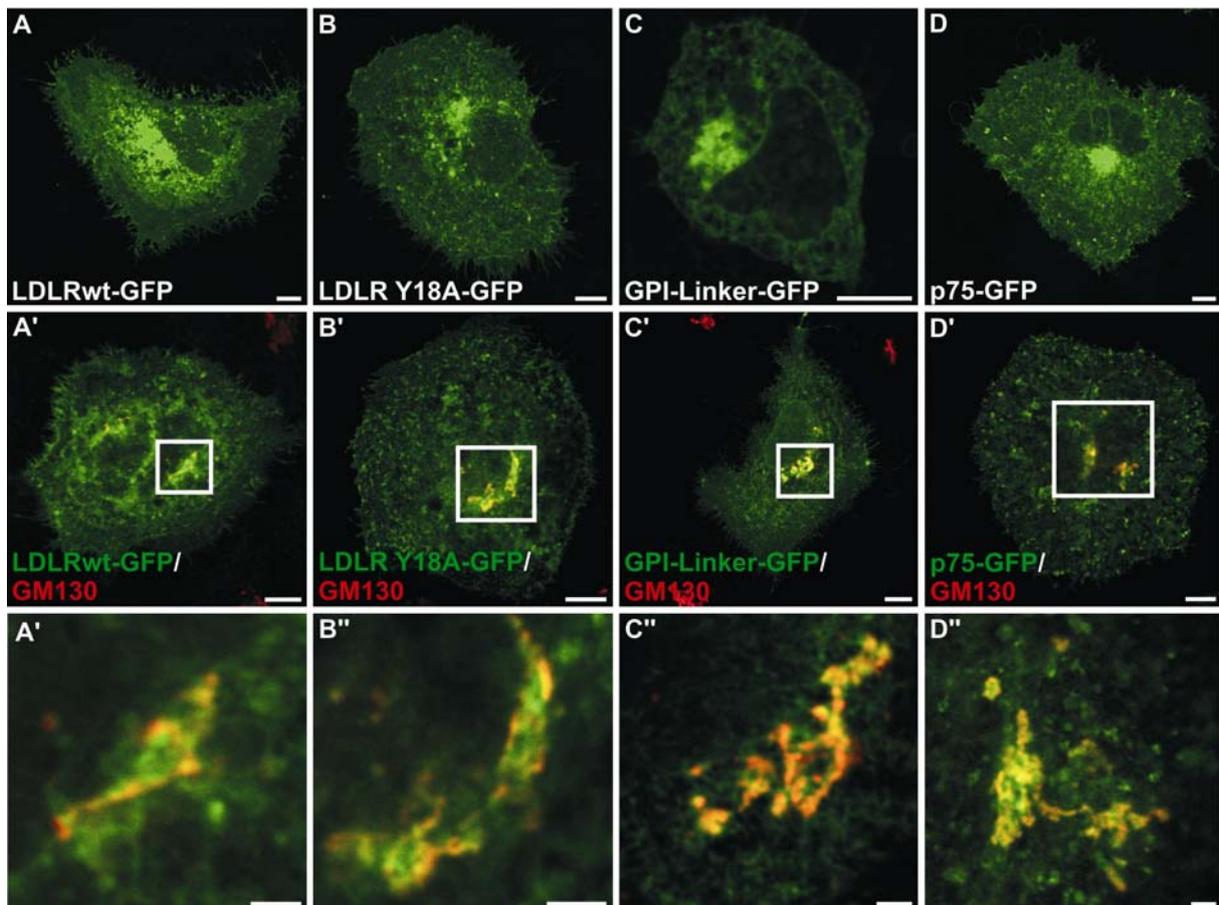


Abbildung 2.3.8: Lokalisation sekretorischer Marker nach Überexpression in Huh-7 Zellen. Alle GFP-getagten Marker zeigen eine deutliche Sekretion zur Plasmamembran (A – D), sind aber auch in spezifischen Golgi-Zisternen lokalisiert (A', A'' – D', D''). Die Aufnahmen wurden mit dem konfokalen Mikroskop gemacht, die Skalierungsbalken in den Übersichtsaufnahmen entsprechen 8 μm und in den Vergrößerungen 2 μm .

2.3.4.2 Inhibition der Sekretion ausgehend von den ERES nach Überexpression von EHD4 Δ EH

Huh-7 Zellen wurden mit den vier sekretorischen Markern und dem EHD4 Δ EH-Konstrukt transfiziert und die Überlappung mit den EHD4 Δ EH-positiven ERES sowie die Sekretion der Marker nach der Δ EH-abhängigen Golgi-Zerstörung analysiert (Abb. 2.3.9).

14 Stunden nach Transfektion der Konstrukte ließ sich noch eine Sekretion der Marker an die Plasmamembran und eine Lokalisation in Golgi-Zisternen nachweisen (Abb. 2.3.9, **A – D**, **A' – D'**) und es konnte bereits eine partielle Colokalisation mit den Δ EH-positiven ERES für alle Marker gezeigt werden (**A'' – D''**). Dabei konnte die stärkste Überlappung der Δ EH-positiven ERES mit GPI-Linker-GFP besonders in der Peripherie der Zellen beobachtet werden (Abb. 2.3.9 (**C''**)).

20 Stunden nach Transfektion akkumulierten alle vier sekretorischen Marker stark in den Δ EH-positiven ERES (Abb. 2.3.9 (**E – H**)). Dabei kommt es besonders in den großen Δ EH-Strukturen zu einer Anhäufung der GFP-Konstrukte, was auf eine Verschmelzung der unterschiedlichen ERES an der ER-Membran hinweist. Die Inhibition der Sekretion der Marker beruht also nicht nur auf der Zerstörung der Golgi-Strukturen, sondern auch auf einer Deformierung der ER-Membran.

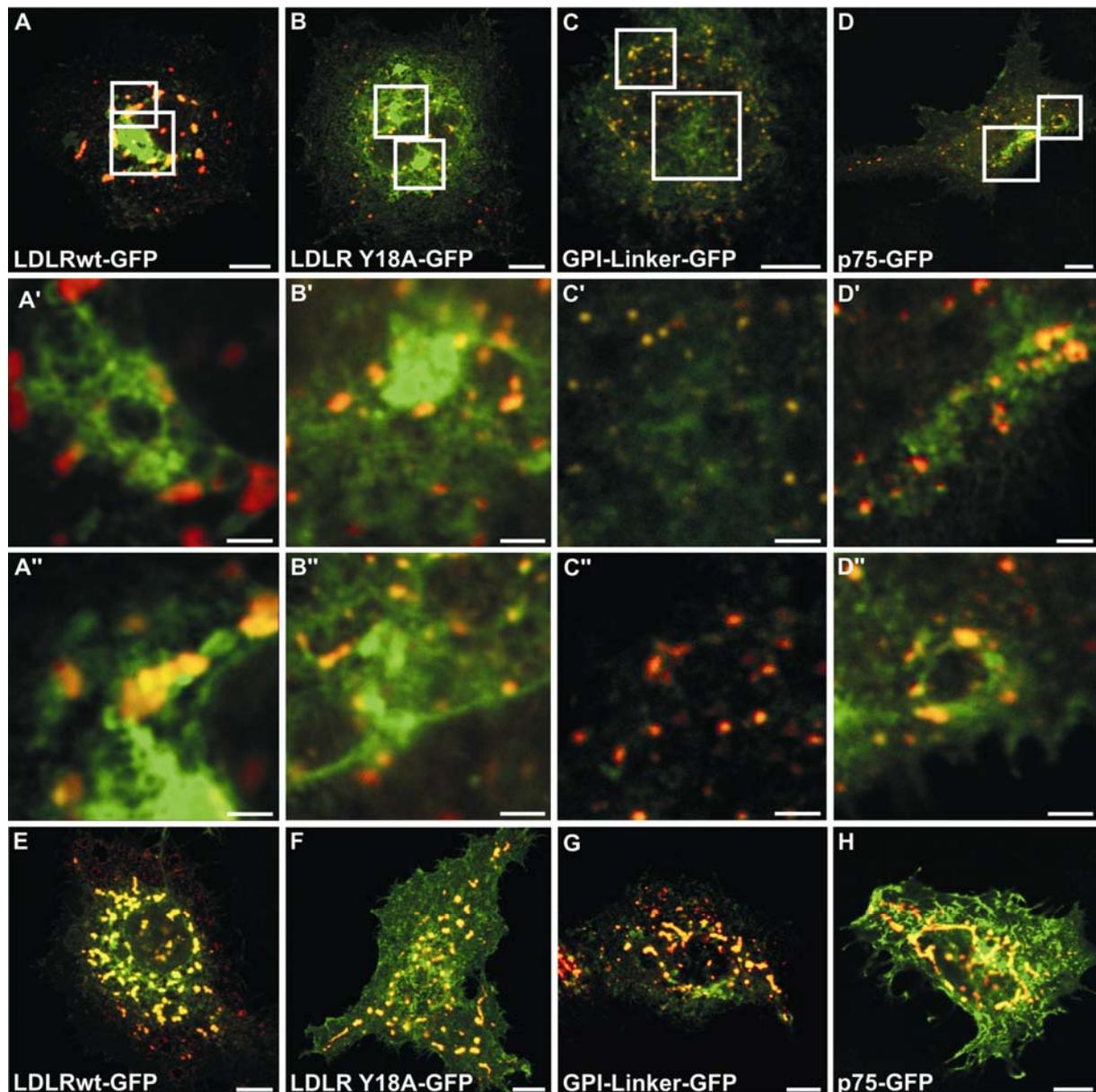


Abbildung 2.3.9: Einfluß der Überexpression von HA-EHD4 Δ EH auf die Lokalisation der sekretorischen Marker. Zu dem frühen Expressionszeitpunkt (14 h) von EHD4 Δ EH (rote Färbung) sekretieren die GFP-Konstrukte (grün) über den Golgi als Zwischenstation normal zur Plasmamembran (**A – D**) und zeigen nur eine partielle Colokalisation mit den Δ EH-positiven ERES (**A'**, **A'' – D'**, **D''**). Zu dem späteren Expressionszeitpunkt (20 h) akkumulieren alle getesteten Marker in den verschmolzenen ERES-Strukturen (**E – H**). Die Aufnahmen wurden mit dem konfokalen Mikroskop erstellt, die Skalierungsbalken in den Übersichtsaufnahmen entsprechen 8 μ m und in den Vergrößerungen 2 μ m.

2.3.4.3 Einfluß der Überexpression von HA-EHD4 wt und HA-EHD4 T75N auf die Sekretion der Marker

Um zu überprüfen, ob der Wildtyp von EHD4 bzw. die Punktmutante in der Nucleotidbindungsstelle EHD4 T75N die Sekretion der Marker ebenfalls beeinflussen, wurden auch mit diesen Konstrukten zusammen mit den Markern Huh-7 Zellen transfiziert. Bei einer direkten Abhängigkeit der Sekretion eines der Marker von dem EHD4-Transportweg sollte eine Assoziation der Markermoleküle mit den tubulären EHD4 wt-positiven Transportstrukturen nachgewiesen werden können. Gleichzeitig könnte die Sekretion durch Verwendung der T75N-Mutante, die aufgrund ihrer Hydrolyse-, Dimerisierungs- und damit Membranbindungs-Defizienz keine Transportstrukturen bilden oder nicht an diesen assoziiert sein kann, herabgesetzt sein.

Alle Marker zeigten bei Co-Überexpression von EHD4 wt eine Sekretion an die Plasmamembran mit dem Golgi als Zwischenstation (Abb. 2.3.10 (**A, A', A'', B, B', B'', C, C', C'', D, D', D''**)). Für die Konstrukte LDLR wt-GFP, LDLR Y18A-GFP und p75-GFP konnte keine Assoziation an den tubulären, EHD4 wt-positiven Transportstrukturen gezeigt werden (**A, B, D**), die Sekretion dieser Konstrukte ist also nicht vom EHD4-Transportweg abhängig. Im Gegensatz dazu assoziierte das GPI-Linker-GFP -Konstrukt deutlich mit den EHD4 wt-positiven Transportstrukturen (Abb. 2.3.10 (**C**)) und ist somit ein direktes *Cargo*-Molekül für den EHD4-Transportweg.

Eine verminderte Sekretion der Marker LDLR wt-GFP, LDLR Y18A-GFP und p75-GFP, nach Transfektion der konstitutiv-inaktiven Mutante konnte nicht gezeigt werden, was auf der Expression des endogenen EHD4 in den Huh-7 Zellen beruhen kann (Abb. 2.3.10 (**E, F, H**)). Das GPI-Linker-GFP-Konstrukt hingegen scheint nach Überexpression zusammen mit EHD4 T75N überwiegend im perinuklearen Golgi zu lokalisieren und kaum zur Plasmamembran sekretiert zu werden (**G**), dies sollte jedoch noch durch weitere Experimente verifiziert werden.

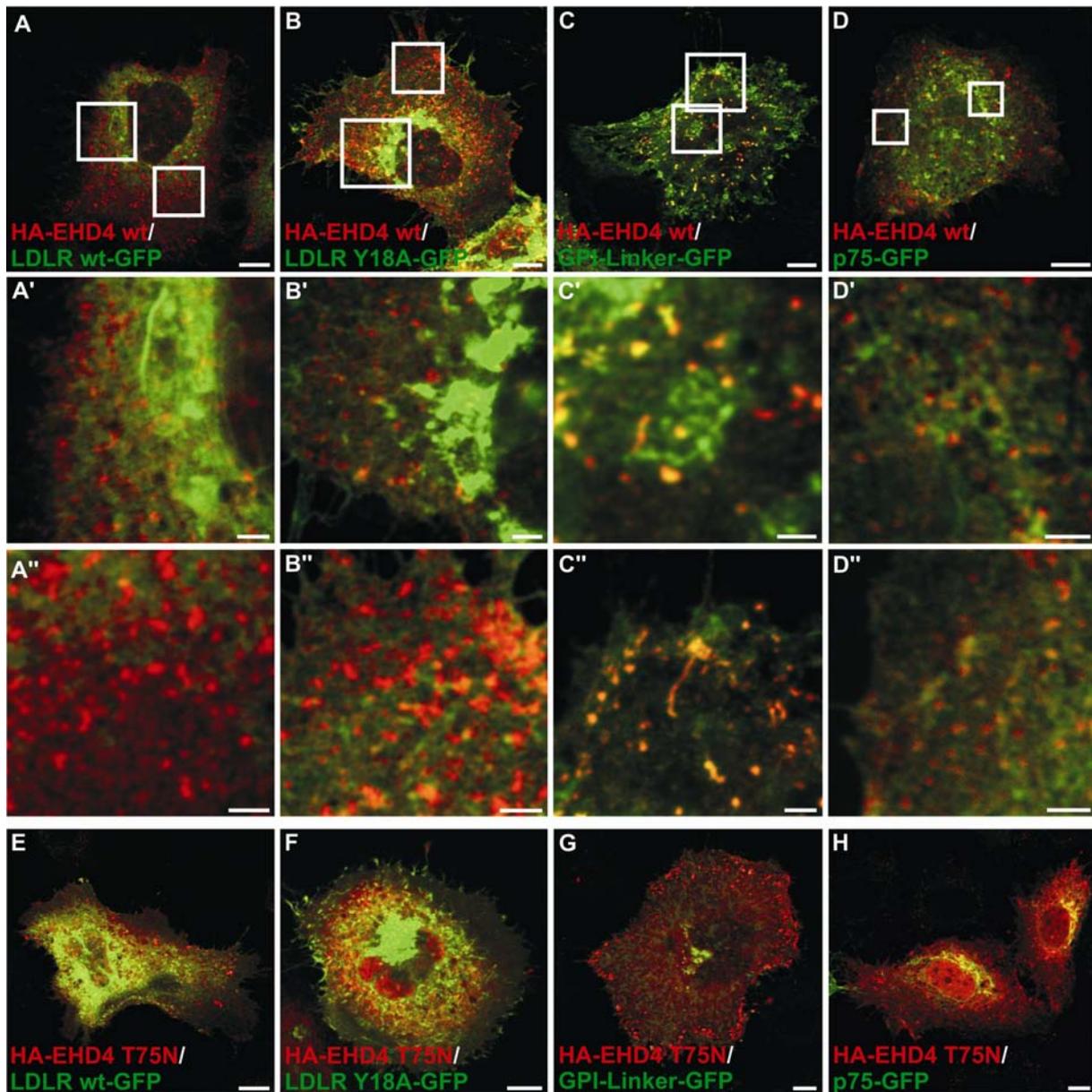


Abbildung 2.3.10: Einfluß der Überexpression von HA-EHD4 wt und HA-EHD4 T75N auf die Sekretion der verschiedenen Marker. Die GFP-Konstrukte LDLR wt-GFP, LDLR Y18A-GFP und p75-GFP zeigen keine Assoziation mit den EHD4 wt-positiven Transportstrukturen und werden damit unabhängig vom EHD4-Weg transportiert (**A, B, D**), die Überexpression von EHD4 T75N scheint die Sekretion dieser Marker aufgrund der Aktivität des endogenen EHD4 Proteins nicht zu beeinflussen (**E – H**). GPI-Linker-GFP hingegen ist ein *Cargo*-Molekül des EHD4-Transportweges und assoziiert deutlich in den tubulären Transportstrukturen (**C, C''**). Auch scheint GPI-Linker-GFP nach Cotransfektion von EHD4 T75N überwiegend im perinukleären Golgi lokalisiert zu sein (**G**), was auf eine verminderte Sekretion dieses Konstruktes hindeuten kann. Die Aufnahmen wurden mit dem konfokalen Mikroskop vorgenommen, die Skalierungsbalken in den Übersichtsaufnahmen entsprechen 8 µm und in den Vergrößerungen 2 µm.

2.3.4.4 Einfluß des EHD4-Bindungspartners PACSIN 2 auf den EHD4-Transportweg in den Huh-7 Zellen

Der für die EHD-Proteine publizierte Bindungspartner PACSIN 2 (Xu *et al.*, 2004, Braun *et al.*, 2005) sollte auf Colokalisation und damit möglichen Einfluß auf den EHD4-Transportweg in den Huh-7 Zellen untersucht werden.

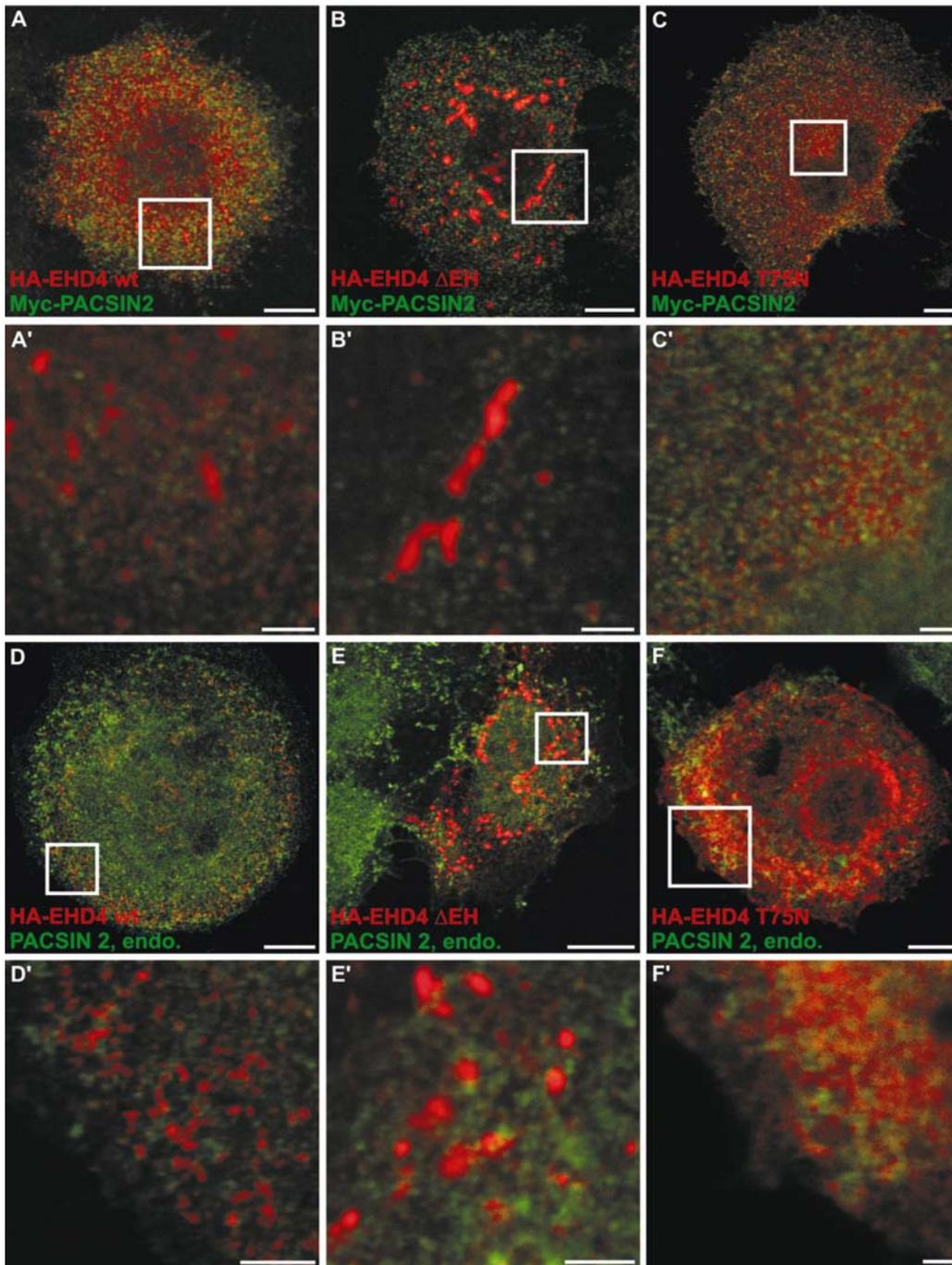
Es konnte jedoch nach Überexpression von Myc-PACSIN 2 zusammen mit den EHD4-Konstrukten keine Colokalisation festgestellt werden (Abb. 2.3.11 (A, A' – C, C')). Der Bindungspartner ist weder an den EHD4 wt-positiven tubulären Transportstrukturen, noch an der Plasmamembran oder intrazellulären Strukturen gemeinsam mit EHD4 zu finden (A, A'). Eine Colokalisation mit EHD4 Δ EH wurde aufgrund des fehlenden Bindungsmotivs ohnehin nicht erwartet, eine Überexpression des Δ EH-Konstruktes führte aber auch nicht zu einer Veränderung der vesikulären Verteilung von Myc-PACSIN 2 (B, B'). Auch für die Punktmutante T75N konnte keine Colokalisation zwischen Mutante und dem potentiellen Bindungspartner nachgewiesen werden (C, C').

Auch eine Doppelfärbung mit einem Antikörper gegen das endogene PACSIN 2 zeigte keine Colokalisation mit den EHD4-Konstrukten.

Es ist also davon auszugehen, daß der Bindungspartner PACSIN 2 bei dem EHD4-Transportweg in den Huh-7 Zellen keine Rolle spielt, oder der Einfluß bei den gewählten Versuchsbedingungen nicht nachgewiesen werden konnte.

Nächste Seite:

Abbildung 2.3.11: Der EHD4-Bindungspartner PACSIN 2 zeigt keine Colokalisation mit den EHD4-Konstrukten in Huh-7 Zellen. Es konnte keine Überlappung zwischen Myc-getagtem PACSIN2 und den HA-getagten EHD4-Konstrukten nach Überexpression in Huh-7 Zellen gezeigt werden (A, A' – C, C'). Es existiert ebenfalls keine Colokalisation zwischen den EHD4-Konstrukten und dem endogenen PACSIN 2 (D – F). Die Aufnahmen wurden mit dem konfokalen Mikroskop erstellt, die Skalierungsbalken in den Übersichtsaufnahmen entsprechen 8 μ m und in den Vergrößerungen 2 μ m.



3. Diskussion

Der intrazelluläre Transport von Molekülen wird nicht nur über vesikuläre Systeme, sondern auch über tubuläre Transportstrukturen gesteuert. Tubuläre Abschnürungen von Kompartimentmembranen wurden zunächst für die sekretorischen Organellen, wie dem ER und dem Golgi-Apparat beschrieben (Kreis, 1992), sind aber auch für die endocytotische Aufnahme von GPI-verankerten Proteinen (Polishchuk *et al.*, 2004) oder dem MHCII (Massol *et al.*, 2005) verantwortlich. Ein wichtiges Argument für die Bedeutung von Transportmechanismen über tubuläre Strukturen liegt in der Größe der zu transportierenden *Cargos*, da die vesikulären Systeme aufgrund der Struktur der Hüllprotein-Komplexe nur einen Durchmesser von 60 nm (COPII, Clathrin an Plasmamembran) oder maximal 100 nm (Clathrin am TGN) aufweisen können. Extrazelluläre Matrixkomponenten, wie das trimere Procollagen I sind zu groß (300 nm), um über vesikuläre Systeme sekretiert werden zu können (Canty und Kadler, 2005). Auch Proteinkomplexe des Lipoprotein-Stoffwechsels erreichen eine Größe (bis zu 400 nm), die nicht über kleine vesikuläre Systeme transportiert werden kann (Fromme und Schekman, 2005). Bei endocytotischen Vorgängen kann es zur Bildung von tubulären Transportstrukturen kommen, da die Rezeptoren in Plasmamembran-Mikrodomänen angereichert sind und durch tubuläre Einstülpungen größere Flächen der Plasmamembran in die Zelle aufgenommen werden können (Danielsen und Hansen, 2003, Hansen *et al.*, 2003). Für die tubuläre Endocytose des MHCII wurde ein ARF-6-induzierter Weg beschrieben, für den eine Beteiligung von EHD1 essentiell ist (Caplan *et al.*, 2002, Massol *et al.*, 2005). Ob die anderen Familienmitglieder der EHD-Proteine ebenfalls als Marker für den tubulären Transport verwendet werden können und ihre molekulare Funktion in tubulären Transportsystemen sollte in dieser Arbeit geklärt werden.

3.1 Expression der einzelnen EHD-Proteine

Die EHD-Familie besteht aus vier Proteinen, die einen hohen Homologiegrad zueinander aufweisen (Montesinos *et al.*, 2005, Naslavsky und Caplan, 2005). Für alle EHD-Proteine wurde eine Beteiligung an der Endocytose von Rezeptoren

beschrieben, EHD1 und EHD3 regulieren den Rücktransport über tubuläre Systeme ausgehend vom Frühen Endosom über das *Recycling* Kompartiment (ERC) zurück an die Plasmamembran (Caplan *et al.*, 2002, Naslavsky *et al.*, 2004 und 2006).

Die einzelnen EHD-Proteine zeigen ein spezifisches Expressionsmuster in den getesteten Geweben, wobei nur EHD1 ubiquitär exprimiert wird. Drei der EHD-Proteine werden in Hirn exprimiert, weshalb eine subzelluläre Fraktionierung aus dieser Gewebelysate Aufschluss auf die genaue intrazelluläre Lokalisation von EHD1, 3 und 4 geben sollte. Alle EHD-Proteine konnten überwiegend in den membran-haltigen Fraktionen gefunden werden, EHD1 zeigte im Gegensatz zu EHD3 eine spezifische Anreicherung in synaptischen Fraktionen. Von den drei in Hirn detektierten Banden für EHD4 gab die 54 kDa Bande das stärkste Signal in allen Fraktionen und ist besonders in der cytosolischen Fraktion S3 angereichert. Die 52 kDa Bande zeigt hingegen ein starkes Signal in den synaptischen Fraktionen. Bei beiden Varianten könnte es sich um proteolytisch geschnittene oder anders posttranslational modifizierte Formen von EHD4 handeln, da RT-PCR Analysen des offenen Leserasters keinen Hinweis auf alternative Spleißformen ergaben.

Alle EHD-Proteine assoziieren mit tubulären Transportstrukturen, die je nach getesteter Zelllinie und Familienmitglied an Größe und Position in der Zelle variieren können (Caplan und Naslavsky, 2005). EHD1 ist endogen und nach Überexpression in NIH3T3 Fibroblasten mit kürzeren tubulären Strukturen assoziiert, als in HeLa Zellen (eigene Daten, Naslavsky *et al.*, 2006). EHD3 zeigt nach Überexpression in NIH3T3 Zellen eine Assoziation mit langen tubulären Strukturen, endogenes EHD3 in primären Hippocampus Neuronen ist nur an relativ kurzen Strukturen zu finden. Das Gegenteil zeigt sich bei EHD4, das nach Überexpression in Fibroblasten eher an der Plasmamembran und an kurzen Strukturen assoziiert, endogen in Huh-7 Hepatoma Zellen jedoch an langen tubulären Strukturen lokalisiert. EHD2 zeigt in allen bislang getesteten Zelllinien eine starke Assoziation mit der Plasmamembran und kurzen tubulären Strukturen (Guilherme *et al.*, 2004), es ist jedoch möglich, daß auch dieses EHD-Protein in einer bestimmten Zelllinie an längeren Strukturen lokalisiert ist.

Diese Divergenz in der Länge der tubulären Strukturen scheint in den verschiedenen Zelllinien auf einer angepassten Verwendung der tubulären Transporter zu beruhen. In kleinen primären Neuronen ist eine Reorganisation großer Membranflächen der Plasmamembran oder verschiedener Kompartimente nicht möglich, so daß die

3. Diskussion

Beteiligung von EHD1 am LTP-abhängigen *Recycling* des AMPA-Rezeptors (*long term potentiation*, Park *et al.*, 2004) bzw. die von EHD4 am *Recycling* des TrkA-Rezeptors über kürzere tubuläre Transporter erfolgt (Shao *et al.*, 2002, Valdez *et al.*, 2005). Sekretierende Adipocyten oder extrazelluläre Matrix ausbildende Zellen (NIH3T3 Fibroblasten) benötigen größere tubuläre Transportsysteme zum Transport von PCI und Proteinkomplexen des Lipoprotein-Stoffwechsels (Fromme und Schekman, 2005).

Die für EHD1 und EHD3 beschriebene Hetero-Oligomerisierung während der Regulation des Rezeptor-*Recycling* vom Frühen Endosom zum ERC, ist von dem Expressionsverhalten und der subzellulären Lokalisation beider Proteine möglich. Beide EHDs konnten bei der subzellulären Fraktionierung aus Hirn in überlappenden Fraktionen detektiert werden und zeigen beide auch in gleichen Gewebetypen eine Expression. EHD2 und EHD4 unterscheiden sich von ihrem Expressionsprofil und ihrer intrazellulären Lokalisation deutlich von EHD1 und 3, so daß von einer Beteiligung an unterschiedlichen Transportwegen ausgegangen werden kann (vgl. nachfolgende Abschnitte 3.2.2 und 3.3).

3.2 Funktionale Analyse der Hauptdomänen der EHD-Proteine

3.2.1 Die G-Domäne

Alle EHD-Proteine weisen den gleichen Domänenaufbau auf, wobei die beiden Hauptdomänen die N-terminale G-Domäne und die C-terminale EH-Domäne bei allen Familienmitgliedern hoch-konserviert sind. Die allgemeine Hypothese zur Funktion der EHD-Proteine durch ihre beiden Hauptdomänen ist, daß sie über die G-Domäne Nukleotid-abhängig an Membranen von Transportstrukturen oligomerisieren bzw. die Bildung der tubulären Strukturen auslösen und daß die Interaktion über ihre EH-Domänen mit den NPF-Motiven der Bindungspartner das Andocken oder Ablösen der Transport-Carrier an ein oder von einem Kompartiment ermöglicht. Zur Charakterisierung der G-Domäne wurde zunächst ein Sequenzvergleich mit den Nukleotid-bindenden Domänen von GTPasen und ATPasen vorgenommen, wobei der N-terminale Bereich der EHD-Proteine die typischen Motive mit Spezifität für das Nukleotid GTP in der G4-Box (NKxD) von G-Domänen aufweist. Die für die ATP-Spezifität nötige Consensus-Sequenz (RxRP/ NP) konnte in der EHD-Sequenz nicht

gefunden werden. Vorarbeiten in der Arbeitsgruppe zeigten eine Bindung von HA-EHD1 an GTP-Agarose, die durch die Verwendung von verschiedenen Elutionsmitteln aufgehoben werden konnte, wobei der größte Anteil des EHD1 nach Zugabe von GTP wieder in Lösung ging (Halbach, 2004), weshalb von einer GTPase-Funktion der EHD-Proteine ausgegangen wurde. Die von Lee *et al.* (2005) publizierten Daten zur enzymatischen Aktivität von EHD1 werden im nachfolgendem Abschnitt 3.2.1.1 diskutiert.

Für verschiedene GTPasen wurden Punktmutationen in der Nukleotidbindungsstelle beschrieben, die zu konstitutiv-inaktiven oder konstitutiv-aktiven Formen führen. Eine der verbreitetsten Punktmutationen ist der Austausch der Aminosäure Threonin in der Nukleotidbindungsstelle (GQYSTGKT) zu einem Asparagin, was den GDP-gebundenen Zustand der GTPase widerspiegeln soll, da die Stabilisierung des γ -Phosphates über die Wechselwirkung mit Mg^{2+} aufgehoben wird (Bourne *et al.*, 1990, Foster *et al.*, 1996). Des Weiteren wurde für monomere GTPasen der Ras-Familie (RhoA, Rac1, Cdc42) eine konstitutiv-aktivierende Punktmutante beschrieben, bei der die dritte Aminosäure in der Nukleotidbindungsstelle, in diesem Falle ein Glycin gegen ein Valin ausgetauscht wurde. Diese Mutante zeigte eine direkte Wechselwirkung des Valins mit dem γ -Phosphat des GTP und damit eine Hydrolyse-Defizienz (Hall, 2001).

Diese Punktmutationen in der Nukleotidbindungsstelle (T72N und Y67V) wurden zunächst exemplarisch für EHD1 vorgenommen und beide zusammen mit Wildtyp EHD1 aufgereinigt. Alle drei Proteine konnten in einem bakteriellen Expressionssystem hergestellt werden, zeigten aber eine hohe Neigung zur Aggregation, wobei die Punktmutante T72N am wenigsten stabil war. Die Faltung und Sekundärstruktur der Proteine wurde durch CD-Spektroskopie nachgewiesen und die theoretischen prozentualen Anteile der Sekundärstrukturen mit dem Programm CONTIN bestimmt. Durch die Einführung der Punktmutation T72N konnte keine starke Änderung der Sekundärstruktur des Gesamtproteines festgestellt werden, da die Kurvenverläufe von wt und T72N kaum voneinander abweichen. Sehr wahrscheinlich führt diese Punktmutante zu lokalen Strukturveränderungen in der G-Domäne, die die enzymatische Aktivität des Proteins beeinflussen könnten, dabei jedoch in der CD-Spektroskopie nicht messbar sind. Die Punktmutante Y67V zeigte sowohl eine Veränderung im Kurvenverlauf, als auch eine prozentuale Zunahme des α -helikalen, verbunden mit einer prozentualen Abnahme des β -Schleifen Anteils der

3. Diskussion

Sekundärstrukturelemente im Gesamtprotein. Dies kann auf eine veränderte Faltung der Mutante hindeuten, weshalb die Y67V-Mutante in allen Experimenten als eine Art "Kontrolle" eingesetzt wurde, um den Effekt einer zweiten Punktmutante der Nukleotidbindungsstelle untersuchen zu können. Bei der Interpretation der Ergebnisse wurde die veränderte Faltung der Mutante berücksichtigt.

3.2.1.1 Enzymatische Aktivität von EHD1

Zur Analyse der enzymatischen Aktivität der EHD-Proteine wurde ein in der Durchführung relativ einfaches Verfahren verwendet, bei dem nur geringe Konzentrationen der rekombinanten Proteine benötigt wurden. Dazu wurden EHD1 wt, T72N und Y67V als GST-Fusionsproteine aufgereinigt, mit radioaktiv-markiertem GTP bzw. ATP inkubiert und die Hydrolyserate über einen Zeitraum von 7 Stunden verfolgt. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz mit EHD1 wt, der zuvor fünf Minuten aufgeköcht wurde, so daß das Protein zu Beginn des Assays denaturiert wurde. GST-EHD1 wt zeigte eine langsame Hydrolyserate für GTP und ATP mit Erreichen einer schnellen Sättigung im Kurvenverlauf. Die prozentuale ATP-Hydrolyserate lag dabei ca. 10 % höher als die von GTP. Beide Punktmutanten zeigten im Vergleich zum Wildtyp eine herabgesetzte GTP-, aber eine deutlich stärkere ATP-Hydrolyserate. Die Punktmutante T72N sollte den konstitutiv-inaktiven Zustand von EHD1 darstellen, indem die Stabilisierung des γ -Phosphates aufgehoben wird und die Affinität zu GTP herabgesetzt wird. Daß von der T72N-Mutante trotzdem GTP gebunden und hydrolysiert werden kann, hängt wahrscheinlich mit dem im Experiment eingesetzten hohen Überschuß an GTP zusammen. Zur Steigerung der GTP-Hydrolyserate von GTPasen mit geringer Affinität zu GTP sollte man mit einem hohen Substrat-Überschuß arbeiten, um eine meßbare Hydrolyse erreichen zu können (Krauss, 1997). Auch die zweite Punktmutante in der Nukleotidbindungsstelle (Y67V) beeinflusst die Fähigkeit zur Hydrolyse. Dieser Effekt ist wohl auf die in der CD-Messung nachgewiesene, nur partielle Faltung der Mutante zurückzuführen. Falls jedoch diese Mutation ähnlich wie bei den GTPasen der Ras-Familie zu einer konstitutiven Aktivierung von EHD1 geführt hätte, würde durch das Valin eine Stabilisierung in der Bindung des γ -Phosphates ausgelöst werden, so daß es nicht hydrolysiert werden kann.

Die Punktmutante T72N hat keinen Einfluß auf die Basen-Spezifität der Nukleotide, sondern destabilisiert die Bindung des γ -Phosphates eines Tri-Nukleotides. Das müsste auch die ATP-Hydrolyse beeinflussen, weshalb auf eine Verunreinigung der Proben mit bakteriellen Chaperonen oder anderen ATPasen spekuliert werden könnte. Gerade bei der Expression und Aufreinigung von GTPasen in Bakterien ist eine Verunreinigung durch Chaperone ein bekanntes Problem (O. Daumke, persönliche Mitteilung) und da Chaperone außerdem eine hohe ATP-Hydrolyse-Effizienz zeigen, könnte schon eine geringe Verunreinigung zu einer positiven ATP-Hydrolyse der gemessenen Proteine führen. Dennoch wurde die ATP-Bindung und -Hydrolyse von Lee *et al.* (2005) mit verschiedenen Verfahren verifiziert. Zwar wurden in den veröffentlichten Experimenten Detergenz-haltige Proben verwendet und alle Messungen nur über den kurzen Zeitraum von 35 Minuten verfolgt, mit dem Ergebnis des in dieser Arbeit durchgeführten Experiments kann die ATP-Bindung oder -Hydrolyse der EHD-Proteine jedoch nicht ausgeschlossen werden. Für die zukünftige Charakterisierung der EHD-Proteinfamilie ist die Klärung der Nukleotid-Affinität bzw. die Nukleotid-Spezifität der EHDs ein zentraler Punkt und sollte durch andere Experimente vertiefend analysiert werden, wobei die Stabilität der EHD-Proteine während der Aufreinigung und Durchführung der Experimente der limitierende Faktor sein wird. Dies erfolgt in Colaboration mit O. Daumke (MRC, Cambridge), was bis zu dem Abgabetermin dieser Arbeit bislang kein eindeutiges Ergebnis gebracht hat.

3.2.1.2 Lipidbindung

Durch Aminosäure-Sequenzvergleiche der EHD-Proteinsequenz mit verschiedenen Proteindatenbanken konnte keine der bekannten Lipidbindungsdomänen identifiziert werden. Trotzdem sind die EHD-Proteine mit intrazellulären Kompartimenten bzw. Strukturen assoziiert, weshalb zunächst eine direkte Bindung an Lipidmembranen über die Interaktion mit Phosphoinositiden nachgewiesen werden sollte.

Dazu wurden *in vitro* Liposomen mit einem Grundgerüst aus 35 % Phosphatidylethanolamin, 35 % Phosphatidylcholin, 10 % Phosphatidylserin und 10 % Cholesterin hergestellt, wobei die restlichen 10 % jeweils mit einem bestimmten Phosphoinositid angereichert wurden. Die EHD-Proteine wurden als GST-Fusionsproteine mit den

Liposomen inkubiert und über Ultrazentrifugation sedimentiert. Bei Bindung an ein Phosphoinositid sedimentieren Proteine mit den Liposomen ins Pellet, ohne Bindung sollte das Protein im Überstand bleiben. Keines der EHD-Proteine zeigte eine Bindung an das Monophosphat PI(3)P der Membranen des Frühen Endosomes. Unterschiedlich stark sedimentierten alle EHD-Proteine mit den Liposomen, die mit dem Monophosphat PI(4)P, den Di-Phosphaten PI(3,4)P₂ und PI(4,5)P₂ angereichert wurden. EHD1 und EHD2 zeigten außerdem eine Bindung an Liposomen mit einer Anreicherung des Tri-Phosphat PI(3,4,5)P₃.

Eine Membran-Bindung eines Proteins kann aus zwei Gründen erfolgen: 1. Die Rekrutierung an eine bestimmte Organell-Membran, um dort seine Funktion zu erfüllen oder 2. eine Membran-modulierende Funktion, wie z. B. die Membran-Krümmung bei der Vesikelabschnürung. Die Rekrutierung des Proteins über eine Phosphoinositid-Bindung an eine bestimmte Membran kann durch eine hohe Spezifität bzw. hohe Affinität der Lipidbindungsdomäne zu einem Phosphoinositid erfolgen. Ein Beispiel dafür ist die FYVE-Domäne von Proteinen, die spezifisch an das Monophosphat PI(3)P der Membranen des Frühen Endosoms bindet und somit zu einer Anreicherung der FYVE-Proteine an der Organell-Membran führt (Dumas *et al.*, 2001, Lemmon, 2003). Im Gegensatz dazu steht die Dynamin 2 PH-Domäne, die ebenfalls zur Rekrutierung des Proteins an die Golgi-Membran dient. Dabei zeigt die PH-Domäne eine Spezifität für drei verschiedene Phosphoinositide (PI(4,5)P₂, PI(3,4)P₂, PI(3,4,5)P₃), die alle an den Golgi-Membranen angereichert sind (De Matteis *et al.*, 2002).

Eine Membran-modulierende Funktion der Lipidbindung eines Proteins kann durch eine Einlagerung von Proteinkomponenten in die Membran erfolgen (Penetration), wie durch amphiphatische Helices der ENTH-Domäne von Epsin oder der N-BAR-Domäne von Amphiphysin (Ford *et al.*, 2001, Peter *et al.*, 2004).

Die EHD-Proteine zeigen keine hohe Spezifität für ein bestimmtes Phosphoinositid, sondern weisen ähnlich wie Dynamin 2 eine Bindung an mehrere Phosphoinositide auf, die sowohl an den sekretorischen Organellen (wie PI(4)P, PI(3,4)P₂ und PI(3,4,5)P₃ der Membranen des ER und Golgi) angereichert sind, als auch das stark an der Plasmamembran lokalisierte PI(4,5)P₂. Für die EHD-Proteine wurde eine Beteiligung an verschiedenen Transportwegen beschrieben, wofür eine Rekrutierung an unterschiedlichen Organell-Membranen essentiell ist.

Abhängigkeit der Lipidbindung von der G-Domäne

Durch die Einführung von Punktmutationen in der Nukleotidbindungsstelle wurde eine fehlende Assoziation an Membranen nach Überexpression in Zellen beschrieben (u.a. Lin *et al.*, 2001, Caplan *et al.*, 2002, Naslavsky *et al.*, 2006). Alle bislang getesteten Punktmutationen der Nukleotidbindungsstelle führten in Zellen zu der gleichen feinen cytosolischen Verteilung. Der genaue Mechanismus der Abhängigkeit der Membranbindung von der G-Domäne sollte durch die Verwendung von Punkt- und Deletionsmutanten von EHD1 geklärt werden. Basierend auf den Informationen durch die Proteindatenbanken *Pfam* und *InterPro* wurden folgende Deletionsmutanten kloniert, in einem bakteriellen Expressionssystem hergestellt und aufgereinigt: EHD1 Δ 1-57, bei der die ersten 57 Aminosäuren deletiert wurden, die aber eine intakte G-Domäne aufweist und Deletionsmutanten, bei denen die G-Domäne und weitere, unterschiedliche Teile des N-Terminus deletiert wurden (EHD1 Δ 1-222, EHD1 Linker und EH1). Des Weiteren wurde eine Deletionsmutante mit Deletion der EH-Domäne hergestellt.

Die Faltung bzw. Sekundärstruktur der rekombinanten Proteine wurde durch CD-Messung überprüft, wobei die während der Expression und Aufreinigung stark degradierende EHD1 Δ 1-57 Mutante eine veränderte Faltung aufwies, weshalb sie für die nachfolgenden Experimente nicht verwendet wurde. Alle anderen Mutanten zeigten eine Faltung und eine Sekundärstruktur mit einem hohen α -helikalen Anteil.

Zur Verifizierung der Abhängigkeit der Membranbindung von der G-Domäne wurden die Punkt- und Deletionsmutanten in einem ersten Liposomen-Sedimentationsexperiment getestet. In dem vorbereitenden Zentrifugationsschritt zeigte EHD1 Linker eine so starke Eigensedimentation, daß 90 % des Proteins sedimentierten und eine Durchführung des Experimentes mit der Mutante nicht möglich war. Aufgrund der Größe des GST-tags im Vergleich zur Größe der Mutanten wurden die Mutanten ohne tag für den Assay verwendet, um eine durch den tag-veränderte Faltung ausschließen zu können. Des Weiteren wurden Liposomen ohne Cholesterin und Phosphatidylserin hergestellt, da für mehrere Proteine eine Hintergrundbindung an beide Lipide bekannt ist.

Es konnte für EHD1 wt, der Punktmutante Y67V und der Deletionsmutante Δ EH eine Bindung an das Monophosphat PI(4)P und schwächer an die Di-Phosphate PI(3,4)P₂ und PI(4,5)P₂ gezeigt werden. Die vorher gezeigte Bindung an das Tri-Phosphat

3. Diskussion

PI(3,4,5)P₃ konnte in diesem Experiment nicht verifiziert werden, was auf der Zusammensetzung der Liposomen beruhen kann. Die Punktmutante EHD1 T72N, die den konstitutiv-inaktiven, GDP-gebundenen Zustand der GTPase widerspiegeln soll und die Deletionsmutante EHD1 Δ 1-222 ohne G-Domäne zeigten nach Abzug der prozentualen Eigensedimentation keine Spezifität mehr für eines der Phosphoinositide. Auch die einzelne EH-Domäne zeigte keine Bindung an die Liposomen. Die Bindung der EHD-Proteine an Lipidmembranen kann also nur mit einer intakten G-Domäne erfolgen und ist abhängig von der Nukleotidbindung des Proteins.

Alle getesteten Proteine zeigten eine schwächere Sedimentation und Bindung an die Liposomen ohne Cholesterin und Phosphatidylserin, als EHD1 wt in dem vorherigen Experiment. Diese Unterschiede lassen sich durch verschiedene elektrostatische Ladungen an den Liposomenoberflächen erklären. Viele Lipidbindungsdomänen binden zunächst unspezifisch über elektrostatische Wechselwirkungen an die negativ-geladene "Kopfgruppe" des Phosphatidylserin und gelangen dann durch lokale Diffusion zu den Phosphoinositiden, an die sie spezifisch binden (Alberts, 2001, Cho und Stahelin, 2005). Die elektrostatischen Wechselwirkungen können ebenso weniger spezifische Bindungen stabilisieren, was die herabgesetzte Bindungsintensität von EHD1 wt an das Tri-Phosphat PI(3,4,5)P₃ bei den Liposomen ohne Cholesterin und Phosphatidylserin erklärt.

Eine Wiederholung des Liposomen-Sedimentationsexperimentes unter Verwendung von Liposomen, die Cholesterin und Phosphatidylserin beinhalten, sollte das Bindungsverhalten der rekombinanten EHD-Proteine verstärken, konnte jedoch aufgrund der begrenzten Zeit nicht mehr vorgenommen werden. Des Weiteren könnte die Abhängigkeit der Lipidbindung von der Nukleotidbindung durch die Zugabe von Nukleotiden genauer analysiert werden.

3.2.1.3 *EHD-Proteine tubulieren Liposomen*

Die Nukleotid-abhängige Bindung der EHD-Proteine an Liposomen dient nicht nur zur Rekrutierung an bestimmte Organell-Membranen, denn *in vitro* zeigte EHD1 wt auch eine Membran-modulierende Funktion. Durch elektronen-mikroskopische Aufnahmen konnte eine Tubulierung von Liposomen durch Zugabe von GST-EHD1 wt nachgewiesen werden. Die Tubulierung könnte dabei ähnlich wie bei Epsin oder dem N-BAR Protein Amphiphysin auf einer Penetration der Lipidmembran beruhen. Die Lipidbindungsdomänen beider Proteine werden den superhelikalen Bindungs-domänen zugeordnet, wobei kürzere amphiphatische helikale Strukturen die Membran penetrieren und somit eine Krümmung auslösen können (McMahon und Gallop, 2005). Die Aminosäure-Sequenz von EHD1 zwischen den Aminosäuren 285 und 400 weist einen hohen Anteil an hydrophoben Aminosäuren auf und auch in der CD-Messung konnte dieser Teil als ein Bereich mit einem hohen α -helikalen Anteil identifiziert werden.

Die GTPasen der Dynamin Superfamilie tubulieren Liposomen in einem Nukleotid-abhängigen Prozess (Hinshaw und Schmid, 1995, Sweitzer und Hinshaw, 1998), ein genauer Vergleich mit der Funktion von Dynamin erfolgt im nachfolgenden Abschnitt 3.2.1.5.

3.2.1.4 *Oligomerisierung der EHD-Proteine*

Die publizierten Ergebnisse der Hefe-Two-Hybrid-Experimente von Lee *et al.* (2005) und Naslavsky *et al.* (2006) zeigen, daß dieselben Punktmutationen in der Nukleotid-bindungsstelle (GQYSTGKT) des *C. elegans* EHD1-Homologs Rme-1 und des murinen EHD1 bzw. EHD3 (Rme-1 G81R, EHD1 G65R) nicht nur die Assoziation an Membranen inhibieren, sondern auch eine Oligomerisierung mit EHD1 wt bzw. EHD3 wt verhindern. Des Weiteren führt eine Deletion der ersten 80 Aminosäuren des N-terminalen Teil von murinem EHD1 ebenso zu einer Inhibition der Selbst-Interaktion.

Die Abhängigkeit der Oligomerisierung von einer intakten G-Domäne konnte in den Crosslinking-Experimenten bestätigt werden. EHD1 wt zeigte neben einer deutlichen Dimer-Bande auch eine Bildung von höheren Komplexen. Die Zugabe von

verschiedenen Nukleotiden in einem 100-fachen Überschuß beeinflusste die Dimerisierung von EHD1 wt unter diesen Versuchsbedingungen jedoch nicht. Von den getesteten EHD1 Punkt- und Deletionsmutanten zeigten die Mutanten mit einer Deletion der G-Domäne (EHD1 Linker, EHD1 Δ 1-222 und EH1) keine Di- oder Oligomerisierung. Beide Punktmutanten der Nukleotidbindungsstelle zeigten jedoch ähnlich wie EHD1 wt eine Dimerisierung und Bildung höherer Komplexe. Dies scheint im Widerspruch zu den publizierten Daten zu stehen, könnte jedoch auf den durchgeführten Versuchsbedingungen beruhen. Die *Spacer*armlänge des Crosslinkers BS³ beträgt 11,4 Å über den die freien Lysine verknüpft werden können. Die Einführung der Punktmutationen in der Nukleotidbindungsstelle oder die Verwendung von verschiedenen Nukleotiden scheint die Konformation der G-Domäne im Bezug auf die Position der freien Lysine nicht so stark zu verändern, daß dadurch ein größerer Abstand zwischen den Lysinien entsteht. Weitere Experimente, wie Hefe-Two-Hybrid-Versuche oder Co-Immunopräzipitationen könnten eine inhibierte Dimerisierung der T72N-Mutante nachweisen, wurden aufgrund der beschränkten Zeit der Doktorarbeit und der bereits publizierten Daten zur EHD-Oligomerisierung jedoch nicht durchgeführt. *In vivo* könnte eine Dimerisierung des EHD-Proteins durch die Punktmutation T72N dennoch inhibiert werden, so daß die Mutante ähnlich der publizierten Punktmutanten nach Überexpression in Zellen deshalb nicht an Membranen lokalisiert (vgl. Abschnitt 3.2.2).

3.2.1.5 Vergleich der EHD-Proteine mit den GTPasen der Dynamin Superfamilie

Die G-Domäne der EHD-Proteine wird über die Datenbanken *Pfam* und *InterPro* als eine DynaminN-Domäne beschrieben. Alle Proteine der Dynamin Superfamilie weisen im Vergleich zu den monomeren Ras-GTPasen eine ausgedehnte G-Domäne mit größeren Abständen zwischen den einzelnen Consensus-Boxen auf. Allgemein wird die Funktion der Dynamin Superfamilienmitglieder als eine "*Oligomerisierungs-abhängige GTPase Aktivität nach Membranbindung*" zusammengefasst (Praefcke und McMahon, 2004). Ein Vergleich der EHD-Proteine mit der Funktion der GTPasen der Dynamin Superfamilie zeigt Ähnlichkeiten, aber auch Unterschiede auf:

1. Abhängigkeit der GTPase-Aktivität von der Oligomerisierung:

An der Dynamin-Oligomerisierung sind die GED (GTPase effector domain), die Mitteldomäne und die G-Domäne der einzelnen Dynamin-Moleküle beteiligt, die inter- und intramolekulare Wechselwirkungen eingehen (Smirnova *et al.*, 1999). Punktmutationen in der GED von Mitgliedern der Dynamin Superfamilie führen ebenso zu einer Hydrolyse-Defizienz, wie Punktmutationen in der G-Domäne (Schumacher und Staeheli, 1998). Dynamin ist somit sein eigenes GAP (GTPase activating protein). Da bislang kein Interaktionspartner identifiziert werden konnte, der spezifisch an die GTP-gebundene Form von Dynamin bindet, auch sein eigener Effektor (Praefcke und McMahon, 2004). Auch die GTPase-Aktivität der EHD-Proteine ist abhängig von der Oligomerisierung: alle Pufferbedingungen, bei denen EHD1 wt gut "löslich" ist, wie die Verwendung von Detergenzien, hohen Salzkonzentrationen oder die Zugabe der Aminosäuren Glutamat und Arginin verhindern die GTP-Hydrolyse. Die Punktmutante EHD1 T72N zeigte eine herabgesetzte GTP-Hydrolyse. EHD1 Deletionsmutanten ohne G-Domäne ($\Delta 1-222$, Linker und EH1) zeigten keine Selbst-Interaktion mehr und auch publizierte Punktmutationen in der Nukleotidbindungsstelle verhinderten eine Homo- bzw. Hetero-Oligomerisierung (Lee *et al.*, 2005, Naslavsky *et al.*, 2006). Bei den EHD-Proteinen muß der Mechanismus zur GTP-Hydrolyse im Vergleich zu Dynamin jedoch einfacher ablaufen, da über Aminosäure-Sequenzvergleiche bei den EHD-Proteinen keine GED entdeckt werden konnte. Daß die Oligomerisierung der EHD-Proteine direkt über die G-Domäne erfolgt, konnte durch die Kristallisation von EHD2 bestätigt werden, wonach ein EHD2-Dimer über zwei α -Helices der G-Domänen der

beiden Monomere verknüpft ist (O. Daumke, persönliche Mitteilung). Der Nachweis der "Oligomersierungs-abhängigen GTPase-Aktivität" der EHD-Proteine bedarf dabei noch weiterer Experimente, so sollten über andere Messverfahren die Nukleotid-Affinitäten von EHD1 wt im Vergleich zu Punktmutanten in der Nukleotid-bindungsstelle bestimmt werden. Des Weiteren wäre interessant, die enzymatische Aktivität bei Punktmutanten jener α -Helix der G-Domäne zu messen, über die die Oligomerisierung erfolgt. Außerdem sollte eine Kristallisation einer Hydrolyse-defizienten Punktmutante nur Monomere nachweisen.

2. Membran-Bindung, die der Oligomerisierungs-abhängigen GTPase-Aktivität vorausgeht:

Über die PH-Domäne bindet Dynamin an die negativ-geladenen Kopfgruppen von Phosphoinositiden und wird so an die Membran rekrutiert. Die Affinität einer einzelnen PH-Domäne an Phosphoinositide ist relativ schwach, wird jedoch nach Oligomerisierung des vollständigen Proteins verstärkt (Klein *et al.*, 1998, Lee *et al.*, 1999). Eine Punktmutation in der PH-Domäne inhibiert die GTPase-Aktivität und hat einen dominant-negativen Effekt auf die Endocytose (Vallis *et al.*, 1999, Achiriloaie *et al.*, 1999). Die Oligomerisierung von Dynamin nach Bindung an negativ-geladene Lipid-Membranen resultiert *in vitro* in einer Tubulierung von Liposomen. Dabei lagern sich die Dynamin Oligomere bei niedrigen Ionen-Konditionen und in Gegenwart von GTP als Ringe bzw. Ringstapel um die Lipide herum, was die Tubulierung auslöst bzw. stabilisiert (Praefcke und McMahon, 2004). Auch die EHD-Proteine binden direkt an Lipidmembranen, allerdings besitzen sie keine bekannte Domäne zur Interaktion mit Phosphoinositiden. Die Bindung ist dabei von der G-Domäne und dem Nukleotidbindungszustand abhängig, da weder die Punktmutante EHD1 T72N, noch Deletionsmutanten der G-Domäne eine Spezifität für Phosphoinositide zeigen. Die EHD-Proteine scheinen also zunächst dimer- oder oligomerisieren zu müssen, bevor sie stabil an Membranen binden können. Die Kristallisation von EHD2 bestätigte diese Vermutung, da nur durch die Dimerisierung eine Struktur entsteht, die eine Ähnlichkeit zu Lipidbindungsdomänen aufweist (O. Daumke, persönliche Mitteilung). Auch GST-EHD1 wt tubuliert *in vitro* Liposomen. Dies kann zum einen auf der schon erwähnten Penetration der Membran durch eine amphiphatische Helix beruhen, die EHD-Proteine könnten zum anderen aber auch ähnlich wie Dynamin um die Lipide oligomerisieren und dadurch die Tubulierung stabilisieren. Bislang sind die EHD-

Proteine die einzige Proteinfamilie, für die nicht nur *in vitro* eine Tubulierung von Liposomen oder nach Überexpression in Zellen eine Assoziation an tubulären Strukturen gezeigt werden konnte, sie lokalisieren auch endogen an tubulären Transportern (Caplan *et al.*, 2002, Naslavsky *et al.*, 2006). Zusammengefasst deutet dies auf eine *"Bildung oder Stabilisierung von tubulären Transportern durch die Nukleotid-abhängige Oligomerisierung der EHD-Proteine an Lipidmembranen"* hin.

3.2.2 Auswirkungen von Mutationen der beiden Hauptdomänen auf die intrazelluläre Lokalisation der einzelnen EHD-Proteine

Punktmutationen in der G-Domäne inhibieren die Membranassoziation

Die Punktmutation in der Nukleotidbindungsstelle EHD1 T72N führt *in vitro* zu einer herabgesetzten GTP-Hydrolyserate und einer inhibierten spezifischen Bindung an Phosphoinositide. In dem durchgeführten Crosslinking-Experiment konnte für die Punktmutante trotzdem eine Fähigkeit zur Dimerisierung gezeigt werden, was auf der Art des Experimentes beruhen kann. Für verschiedene EHD-Punktmutanten der Nukleotidbindungsdomäne konnte nach Überexpression in Zellen eine feine cytosolische Verteilung gezeigt werden (u.a. Lin *et al.*, 2001, Caplan *et al.*, 2002, Naslavsky *et al.*, 2006). Die EHD1 T72N Punktmutante und Äquivalente der gleichen Punktmutation für die anderen EHD-Proteine wurden in Zellen überexprimiert und mit der Lokalisation der wt EHD-Proteine verglichen. Die Punktmutation hat bei allen Familienmitgliedern den gleichen Effekt: Sie resultiert in einer feinen cytosolischen Verteilung ohne Assoziation an Membranen oder tubulären Transportern. Die einzige Ausnahme konnte für EHD4 T75N beobachtet werden, die nach Überexpression in NIH3T3 Fibroblasten neben der cytosolischen Verteilung bei 25% der transfizierten Zellen auch in unbekanntem Strukturen akkumuliert.

Die Deletion der EH-Domäne führt zur Akkumulierung in intrazellulären Kompartimenten

Die Deletion der EH-Domäne von EHD1 inhibiert ebenso wie eine Punktmutation in der Nukleotidbindungsstelle die Assoziation an tubuläre Strukturen (Caplan *et al.*, 2002), die EHD1 Δ EH-Mutante kann jedoch weiterhin *in vitro* an Lipide binden. Nach Überexpression in Zellen zeigte die EHD1 Δ EH-Mutante eine Akkumulierung an den Membranen von perinukleären Strukturen, die zum ERC (*endocytic recycling compartment*) gehören und von denen der Rücktransport verschiedener Rezeptoren an die Plasmamembran durch EHD1 Δ EH inhibiert wurde (Lin *et al.*, 2001, Caplan *et al.*, 2002, Naslavsky *et al.*, 2004 und 2006). Die Deletion der EH-Domänen der anderen EHD-Proteine führt ebenfalls zu einer Akkumulierung an unbekanntem Strukturen, die sich in Größe und Position in der Zelle unterscheiden. Zur Analyse der Beteiligung der einzelnen EHD-Proteine an dem für EHD1 und EHD3 beschriebenen tubulären Transportweg von Rezeptoren vom Frühen Endosom über das ERC zurück an die Plasmamembran wurden die Wildtyp und Δ EH-Proteine zusammen mit einem GFP-Rab11-Konstrukt in NIH3T3 Fibroblasten überexprimiert. Die kleine monomere GTPase Rab11 steuert den gesamten Transport vom Frühen Endosom über das ERC zur Plasmamembran und lokalisiert nach Überexpression überwiegend am ERC. Wie erwartet zeigten sowohl die Wildtypen von EHD1 und EHD3, als auch deren Δ EH-Deletionsmutanten eine klare Colokalisation mit Rab11-positiven Strukturen, wobei Rab11 auch mit den tubulären EHD-Transportern in der Nähe des ERC colokalisierte. Für EHD2 und EHD4 konnte keine Beteiligung an diesem Transportweg gezeigt werden, da beide Δ EH-positiven Strukturen keine überzeugende Colokalisation mit Rab11 zeigten.

3.3 Identifizierung des EHD4-Transportweges in Huh-7 Zellen

3.3.1 Identifizierung des Δ EH-positiven Kompartiments: Colokalisation mit Sec13-positiven ERES

Für die Familienmitglieder EHD1 und EHD3 ist eine Beteiligung am *Recycling* von Rezeptoren über tubuläre Transportsysteme zurück an die Plasmamembran nachgewiesen worden (Caplan *et al.*, 2002, Naslavsky *et al.*, 2004 und 2006). Auch EHD2 ist in Adipocyten an der Endocytose des GLUT4 über eine Reorganisation des Aktincytoskeletts involviert (Caplan und Naslavsky, 2005). EHD4 stimuliert nach Überexpression die ARF-6-abhängige Makropinocytose des TrkA (*nerve growth factor receptor*) in PC12 Zellen und bindet an das Adapterprotein Numb, das an ARF-6-abhängigen Wegen beteiligt ist (Shao *et al.*, 2002, Valdez *et al.*, 2005, Smith *et al.*, 2004). In den bisherigen Veröffentlichungen wurde jedoch der Effekt einer EHD4 Δ EH-Deletionsmutante und dessen Akkumulierung an Membran-haltigen Strukturen nicht untersucht. Da die Δ EH-Deletionsmutanten von EHD1 und EHD3 an Organellen wie dem Frühen Endosom oder dem ERC arretieren, sollte durch verschiedene Marker zunächst das EHD4 Δ EH-positive Kompartiment identifiziert werden. Als Zellmodell wurde dazu eine Humane Hepatoma Zelllinie (Huh-7) verwendet, da endogenes EHD4 in diesen Zellen mit langen tubulären Strukturen assoziiert, was auf eine generelle Verwendung der endogenen EHD4-Transporter in diesen Zellen hinweist. Bei der Wahl des *tags* wurden verschiedene *tag*-Längen und -Positionen ausprobiert, wobei ein kurzer, N-terminaler HA-*tag* (Hämagglutinin-*tag*) die Lokalisation der EHD4-Konstrukte nicht beeinflusst. Endogenes, "*ungetaggetes*" oder HA-EHD4 wt lokalisiert an tubulären Strukturen, die Δ EH-Deletionsmutante akkumuliert abhängig von der Expressionsdauer in großen Membran-haltigen Strukturen und die Punktmutation T75N, die die konstitutiv-inaktive, GDP-gebundene Variante widerspiegelt zeigt, eine feine cytosolische Verteilung.

Die EHD4 Δ EH-positiven Strukturen zeigen keine Überlappung mit Organellen, wie Endosomen (Frühe oder ERC) oder dem Golgi-Apparat. Auch handelt es sich nicht um *Post-Golgi-Carrier* oder andere vom Golgi-ausgehende Transportstrukturen, da die Akkumulierungen nach Behandlung mit Brefeldin A nicht wie der Golgi-Apparat fragmentiert werden, sondern resistent sind. Der Metabolit des Pilzes *Eupenicillium brefeldianum* inhibiert dabei die Initiator-GTPase (ARF-1) des COP-Transportes, so

daß weder ein Transport vom ER zum Golgi, noch der interne Golgi-Transport erfolgen kann. Es entstehen dadurch vesikuläre und tubuläre Golgi-Fragmente, die durch Golgi-Marker, wie GM130 sichtbar gemacht werden können.

Zu einem frühen Expressionszeitpunkt zeigen die EHD4 Δ EH-positiven Strukturen keine Überlappung mit dem ER-Marker PDI, 20 Stunden nach Transfektion colokalisiert der ER-Marker PDI deutlich mit den Δ EH-Strukturen. Die Überlappung ist dabei partiell, d. h. die Δ EH-positiven Strukturen scheinen an ganz bestimmten ER-Strukturen zu assoziieren. Bei diesen Strukturen, die sich außerdem nach längerer Expressionsdauer vergrößern, handelt es sich um sekretorische Ausgangsstellen oder *ER exit sites* (ERES), was durch eine Colokalisation mit dem Marker Sec13-GFP des COPII-Transportweges gezeigt werden konnte.

3.3.2 Blockade der Sekretion vom ER führt zur Zerstörung der intakten Golgi-Struktur

Der ER-Export beruht nach neueren Erkenntnissen nicht nur auf dem vesikulären COPII-abhängigen Transportweg, es konnten auch alternative tubuläre Transportsysteme identifiziert werden, an denen keine COPII-Proteinkomplexe assoziiert sind (Palmer und Stephens, 2004). Der COPII-unabhängige Transport von den ERES konnte z.B. für das trimere ProcollagenI beschrieben werden, das im ER zu 300 nm langen Strukturen zusammengelagert wird (Mironov *et al.*, 2003). Auch Proteine, die zunächst über COPII-abhängige ERES exportiert werden, können über tubuläre Systeme transportiert werden (Mironov *et al.*, 2003, Watson und Stephens, 2005).

Die Deletion der EH-Domäne von EHD4 führt nach Überexpression zu einer Akkumulation der Mutante an ER-Strukturen, die partiell mit den COPII-abhängigen ERES überlappen. Mit fortschreitender Expressionsdauer der Mutante kommt es zu einem Block der Sekretion ausgehend vom ER, was zu einer Auflösung der korrekten Golgi-Struktur führt. Bei über 80% der EHD4 Δ EH exprimierenden Zellen konnte 20 Stunden nach Transfektion eine Zerstörung des Golgi beobachtet werden, was zu einer vesikulären Verteilung der fragmentierten Golgi-Strukturen führte. Über eine subzellulären Fraktionierung konnten ER- und Golgi-Membranen von EHD4 T75N transfizierten Zellen klar getrennt werden, nicht jedoch bei EHD4 Δ EH transfizierten Zellen. Die EHD4 Δ EH-abhängige Blockade der Sekretion ausgehend von den ERES

wurde durch die Verwendung von verschiedenen sekretorischen Markern visualisiert. Eine Unterscheidung von COPII-abhängigen und –unabhängigen ERES durch die Verwendung von PCI-GFP und VSV-G-GFP konnte in den humanen Hepatoma Zellen nicht erfolgen, da beide Konstrukte in diesen Zellen nicht exprimiert wurden. Es wurden deshalb Marker (LDLR-GFP wt, LDLR Y18A-GFP, GPI-Linker-GFP und p75-GFP) gewählt, die sich in der Molekülgröße und ihrem Sortierungsort an der Plasmamembran unterscheiden. Bis auf das GPI-Linker-GFP-Konstrukt überlappen die Marker zunächst nur partiell mit den Δ EH-positiven ERES und weisen eine noch funktionierende Sekretion zum Golgi und der Plasmamembran auf. Zu dem späteren Expressionszeitpunkt akkumulieren alle getesteten Marker in den EHD4 Δ EH-positiven ERES.

Die zeitabhängige Vergrößerung der EHD4 Δ EH-positiven ERES und damit verbundene Akkumulation aller getesteten Marker könnte auf der Oligomerisierung von EHD4 beruhen. EHD4 Δ EH wird spezifisch an die Membranen der ERES rekrutiert, oligomerisiert dort und kann jedoch durch die mangelnde Interaktion mit einem unbekanntem EH-Bindungspartner keine tubulären Transporter ausbilden. Der ER Export wird unter anderem über das Monophosphat PI(4)P gesteuert und eine gestörte Regulation der Anzahl an PI(4)P-Molekülen an der ER-Membran durch die Inhibition der Sac1-Phosphatase in Δ sac1-Hefen verhindert die Sekretion. Dies beruht auf der Akkumulation von PI(4)P-Molekülen spezifisch an den ERES (Nemoto *et al.*, 2000, Schorr *et al.*, 2001). EHD4 Δ EH könnte also durch die Bindung an PI(4)P an die ERES rekrutiert werden und dort über seine Oligomerisierung die vorhandenen PI(4)P-Moleküle "*clustern*", so daß nach 20 Stunden Überexpression von EHD4 Δ EH auch EHD4-unabhängige ER-Exportwege betroffen wären. Eine Überexpression der PI(4)P-Phosphatase Sac1 in EHD4 Δ EH-exprimierenden Zellen müßte demnach die Rekrutierung der Mutante an die ER-Membran inhibieren können.

3.3.3 GPI-Linker-GFP als Frachtmolekül für den EHD4-Transportweg

Falls die EHD4 Δ EH-induzierte Blockade des ER Exportes aller vier Marker auf eine direkte Abhängigkeit vom EHD4-Transportweg zurückzuführen ist, sollte auch die Überexpression von EHD4 wt und der Punktmutante T75N einen Effekt auf die

Sekretion der Marker haben. Die Marker sollten dafür als Frachtmoleküle in den tubulären EHD4-Transportern lokalisiert sein und ihre Sekretion an die Plasmamembran könnte durch die Expression der konstitutiv-inaktiven T75N Mutante herabgesetzt sein. Es konnte jedoch nur für GPI-Linker-GFP eine Lokalisation an den tubulären EHD4-Transportern gezeigt werden. Für GPI-Fusionsproteine mit fluoreszierenden *tags* wurde ein Dynamin- und Clathrin-unabhängiger Endocytosemechanismus über tubuläre Strukturen beschrieben (CLIC-DI), der eine Abhängigkeit von der GTPase ARF-6 aufweist (Sabharanjak *et al.*, 2002, Naslavsky *et al.*, 2004). Auch die Sekretion vom Golgi an die Plasmamembran erfolgt über tubuläre Transporter (Nichols *et al.*, 2001, Polishchuk *et al.*, 2004). In Hefen wurde außerdem ein COPII-unabhängiger ER Export für GPI-verankerte Proteine beschrieben (Morsomme *et al.*, 2003). Hier lässt sich eine Verbindung erkennen, da ebenfalls eine Beteiligung von ARF-6 für die EHD4-abhängige Makropinocytose des TrkA und eine Bindung von EHD4 an den ARF-6 Adapter Numb beschrieben wurde (Shao *et al.*, 2002, Valdez *et al.*, 2005, Smith *et al.*, 2004). GPI-verankerte Proteine werden also spezifisch über tubuläre Transporter endocytiert und sekretiert, an deren Formierung und Bildung EHD4 und ARF-6 beteiligt sein können.

Die Überexpression von EHD4 T75N zeigte keinen offensichtlichen Effekt auf die Sekretion der Marker LDLR-GFP wt, LDLR Y18A-GFP und p75-GFP. Das GPI-Linker-GFP-Konstrukt scheint in EHD4 T75N transfezierten Zellen überwiegend an den Strukturen des perinukleären Golgi lokalisiert zu sein, was auf eine verminderte Sekretion hindeuten kann. Der Einfluss von EHD4 auf den Transport von GPI-verankerten Proteinen sollte durch ein gezieltes Ausschalten der EHD4-Proteinexpression in Huh-7 Zellen verifiziert werden, was über die Verwendung von EHD4 *siRNA targets* erfolgen könnte.

3.3.4 Welcher EH-Bindungspartner könnte beim ER-Austritt eine Rolle spielen? (Zusammenspiel mit Rab-Effektoren)

Die Deletion der EH-Domäne der EHD-Proteine führt also zu einer Akkumulierung an bestimmten Kompartimenten (EHD1 Δ EH am ERC, EHD3 Δ EH möglicherweise an Frühen Endosomen und am ERC, EHD4 Δ EH an den ERES), wodurch der weitere Transport verschiedener Moleküle ausgehend von diesen Kompartimenten inhibiert

wird (Naslavsky und Caplan, 2005). Durch die Deletion wird die Interaktion mit den NPF-Motifen von Bindungspartnern unterbunden, wobei der Bindungspartner scheinbar den EHD-Proteinen das Signal zur Bildung oder zur Loslösung der tubulären Transportstrukturen von den Kompartimentmembranen geben muß. Wie kann ein solches Signal aussehen und welche Eigenschaften müsste ein solcher Bindungspartner außerdem haben?

EHD1 und EHD3 binden mit ihrer EH-Domäne an die NPF-Motife der Rab-Effektoren Rabenosyn-5 und Rab11 FIP2 (Naslavsky *et al.*, 2004 und 2006). Rab-Effektoren können am Frühen Endosom große Proteinkomplexe bilden, über die eine Verbindung der Transportwege und somit eine Weiterleitung der zu transportierenden Mikrodomänen erfolgen kann (De Renzis *et al.*, 2002, Deneka und van der Sluijs, 2002). GPI-verankerte Proteine werden in Hefen separat von anderen Molekülen vom ER zum Golgi transportiert. Die Sortierung erfolgt dabei in den ERES und ist abhängig von der Rab-GTPase Ypt1p (Rab1-Homolog in Hefen) und dem *tethering*-Faktor Uso1p (p115-Homolog in Hefen, Morsomme *et al.*, 2003). Dieser Rab1 Bindungspartner besitzt ein NPF-Motif im N-terminalem Teil des Proteins, eine Bindung an EHD4 wurde bislang jedoch nicht untersucht. Das Signal zur Bildung von tubulären EHD-Transportern kann durchaus über die gleichen Netzwerke erfolgen, wie für den vesikulären Transport, es ist jedoch erstaunlich, daß die Deletion der EH-Domäne bei mehreren EHD-Proteinen zu einer Akkumulierung in bestimmten Kompartimenten führt, die Netzwerke der Proteinkomplexe jedoch jeweils spezifisch auf ein Kompartiment beschränkt sind und bislang nur am Frühen Endosom identifiziert wurden. Die Δ EH-abhängige Akkumulierung wäre einfacher zu erklären, wenn man von einem "generellen" Bindungspartner ausgehen würde, der an allen Kompartimenten die Bildung von tubulären Strukturen auslösen könnte.

Die PACSIN/Syndapin-Familie spielt eine Rolle in der Verknüpfung von Dynamin-abhängigen Transportmechanismen mit dem Aktin-Cytoskelett (Kessels und Qualmann, 2004) und zeigt ebenfalls eine Bindung ihrer NPF-Motife an die EH-Domänen der EHD-Proteine (Xu *et al.*, 2004, Braun *et al.*, 2005). In dem EHD4-abhängigen Transportweg in Huh-7 Zellen konnte jedoch keine Kolo-kalisation an EHD4-positiven Strukturen gezeigt werden, weshalb auch die Proteine dieser Familie nicht die Funktion des gesuchten "generellen" Bindungspartner erfüllen.

3. Diskussion

3.4 Zusammenfassendes Modell der EHD-Funktion

Dennoch lassen sich folgende Punkte zur Funktion der EHD-Proteine festhalten:

- Sie können *in vitro* die Bildung von tubulären Strukturen auslösen, was auf der Oligomerisierung über die G-Domäne der EHD-Proteine durch ihre direkte Bindung an den Lipidmembranen beruhen kann (Abb. 3.1). Die Oligomerisierung über die G-Domäne könnte dabei von der Nukleotidbindung abhängig sein, was in dieser Arbeit nach Durchführung von Crosslinking-Experimenten jedoch nicht bestätigt werden konnte.

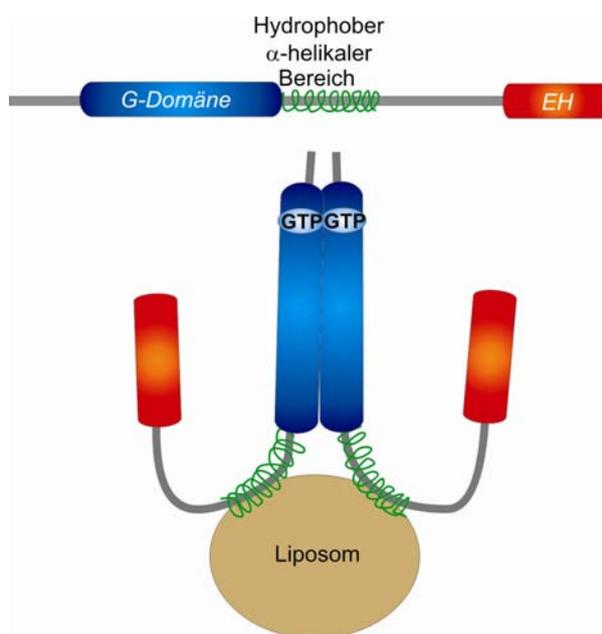


Abbildung 3.1: Hypothetisches Modell zur Oligomerisierungs-abhängigen Membranbindung der EHD-Proteine.

EHD-Dimere bilden sich über die Interaktion der G-Domänen, so daß die hydrophoben α -Helices im Anschluss der G-Domäne an Lipidmembranen binden können.

- *In vivo* sind sie an dem Transport von verschiedenen Molekülen über tubuläre Transporter beteiligt, wobei sie nach Einführung von Punktmutationen in der Nukleotidbindungsstelle nicht mehr an die Membranen der tubulären Strukturen binden und wahrscheinlich auch nicht oligomerisieren können. Die Deletion der EH-Domänen resultiert in der Akkumulierung in einem bestimmten Kompartiment, bei EHD4 handelt es sich dabei um die ERES, was zu einer Blockade der gesamten Sekretion und einer Zerstörung des Golgi-Apparates führt (Abb. 3.2). GPI-verankerte Proteine werden über tubuläre EHD4-Transporter endocytisiert oder sekretiert.

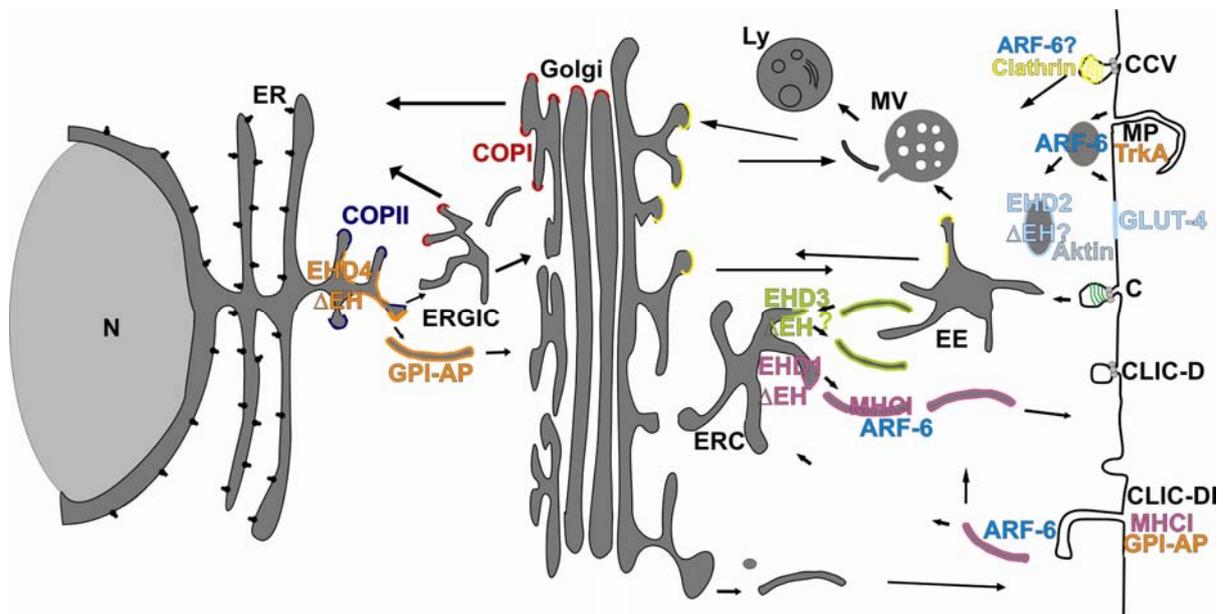


Abbildung 3.2: Zusammenfassendes Modell der Beteiligung von EHD-Proteinen an der tubulären Endocytose und Sekretion. EHD1 und EHD3 und deren Δ EH-Deletionsmutanten lokalisieren an den Strukturen des ERC. EHD4 Δ EH zeigte eine Assoziation mit ERES, was zur Blockade der Sekretion führt. GPI-verankerte Proteine sind Frachtmoleküle des EHD4-Transportweges, wobei nicht nur die Sekretion, sondern möglicherweise auch die Endocytose von GPI-verankerten Proteinen über einen EHD4/ARF-6-abhängigen Weg abläuft. Abkürzungen: **N:** nucleus; **ER:** endoplasmic reticulum; **ERGIC:** ER-Golgi intermediate compartment; **EE:** early endosomes; **ERC:** endocytic recycling compartment; **Ly:** lysosomes; **MV:** multivesicular bodies; **COP:** coat protein complex; **CCV:** clathrin coated vesicles; **MP:** Macropinocytose; **C:** Caveolae; **CLIC-D:** Dynamin-abhängige, Clathrin-unabhängige Carrier; **CLIC-DI:** Dynamin-unabhängige, Clathrin-unabhängige Carrier; **GPI-AP:** Glycosylphosphatidylinositol anchored proteins; **MHCI:** Major histocompatibility complex class 1; **ARF-6:** ADP-ribosylating factor-6; **GLUT4:** Insulin-responsive glucose transporter 4

3. Diskussion

4. Material und Methoden

Alle nicht aufgeführten Standardmethoden, Lösungen und Puffer wurden aus Sambrook *et al.* (1989), Ausubel *et al.* (2002), Bonifacino *et al.* (2002) bzw. aus Coligan *et al.* (2002) entnommen.

4.1 Material

4.1.1 Biologisches Material

***E. coli* Bakterienstämme**

DH5 α (Life Technologies GmbH)

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

BL21 (Invitrogen)

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

Eukaryotische Zellen

Primäre Neuronenkulturen

Primäre Hippocampus-Neuronen aus Ratte (embryonaler Tag 16)

Die in dieser Arbeit verwendeten Kulturen wurden von Frau Natasha Moser (Institut für Anatomie 2, Universitätsklinikum Köln) zur Verfügung gestellt.

NIH 3T3

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

Huh-7

Die Humane Hepatoma-Zelllinie (Nakabayashi *et al.*, 1982) wurde von Frau Dr. M. Odenthal (Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Köln) zu Verfügung gestellt.

4.1.2 Zellkulturmaterial und Zubehör

NIH 3T3 Fibroblasten, Huh-7 (humane Hepatoma-Zellen)

- Dulbecco's Modified Eagle Mix (Invitrogen)
- 10% (v/v) FCS (fetal calf serum, Seromed)
- 2% (v/v) Penicillin/Streptomycin (einer 0,2 mg/ml Stocklösung, Invitrogen)
- 1% (v/v) Glutamin (einer 2 mM Stocklösung, Invitrogen)

Transfektionsreagenzien

Alle Transfektionen von cDNA-Konstrukten wurden mit FuGene 6 (Roche) nach Herstellerangaben durchgeführt.

4.1.2 Antikörper

Erstantikörper

	Quelle	Wirt	WB-Verdünnung	IF-Verdünnung
EHD1	eigen*	Kaninchen	1: 5000	1: 1000
EHD2	eigen*	Kaninchen	1: 5000	1: 1000
EHD3	eigen*	Kaninchen	1: 5000	1: 1000
EHD4	eigen*	Kaninchen	1: 5000	1: 500 - 1000

Tab. 2.1: Tabellarische Auflistung der Antiseren gegen die EHD-Proteine mit Angaben zu Wirtstieren und verwendeten Verdünnungen in den aufgeführten Anwendungen (WB = Western-Blot, IF = Immunfluoreszenz). * Die Angabe eigen bedeutet, daß die Antigene selbst hergestellt und die Immunisierungen durch die Firma Pineda, Berlin, durchgeführt wurden.

Weitere Antikörper

	Quelle	Wirt	WB-Verdünnung	IF-Verdünnung
Adaptin β	Transduction Laboratories	Maus IgG1	1: 1000	1: 50
β -COP	Oncogene	Kaninchen	1: 1000	1: 200
Caveolin	Transduction Laboratories	Kaninchen	1: 5000	1: 100
Clathrin HC	Transduction Laboratories	Maus IgG1	1: 1000	1: 50
Dynamin	Transduction Laboratories	Maus IgG1	1: 1000	1: 50
EEA1	Transduction Laboratories	Maus IgG1	1: 250	1: 50
Eps15	Santa Cruz	Kaninchen	1: 250	-
GluR2 (N-19)	Santa Cruz	Ziege	1: 500	-
GM130	Transduction Laboratories	Maus IgG1	1: 250	1: 50
HA "3F10"	Roche	Ratte	1: 500	1: 200
cMyc "A14"	Santa Cruz	Kaninchen	1: 1000	1: 1000
NMDA-NR3	I. Perez-Otano	Maus IgG1	1: 20	-
N-WASP	H. Yamaguchi	Kaninchen	1: 1000	1: 100
PDI	Stressgene	Kaninchen	1: 1000	1: 200
hPACSIN 2	Mark Milbrandt	Kaninchen	-	1:500
SNAP25	Transduction Laboratories	Maus IgG1	1: 1000	-
α -Tubulin	Oncogene ^c	Maus IgG1k	1: 1000	1: 200

Tab. 2.2: Tabellarische Auflistung der zusätzlich verwendeten Antikörper mit Angaben zu Wirtstieren und verwendeten Verdünnungen in den aufgeführten Anwendungen. (-) keine Angabe des Herstellers über eine Verdünnung in Immunfluoreszenz.

4. Material und Methoden

Zweitantikörper

Quelle	Wirt	Antigen	Markierung	WB- Verdünnung	IF- Verdünnung
DAKO	Schwein	Kaninchen IgG	HRP	1: 3000	-
DAKO	Kaninchen	Maus IgG	HRP	1: 3000	-
DAKO	Kaninchen	Ziege IgG	HRP	1: 3000	-
Molecular Probes	Ziege	Ratte IgG	Alexa Fluor 546	-	1: 1000
Molecular Probes	Ziege	Ratte IgG	Alexa Fluor 488	-	1: 1000
Molecular Probes	Ziege	Maus IgG	Alexa Fluor 488	-	1: 1000
Molecular Probes	Ziege	Kaninchen IgG	Alexa Fluor 488	-	1: 1000
Molecular Probes	Ziege	Kaninchen IgG	Alexa Fluor 546	-	1: 1000

Tab. 2.3: Tabellarische Auflistung der verwendeten Zweitantikörper mit Angaben zu Wirtstieren, Spezifität, gekoppelten Enzymen bzw. Chromophoren und verwendeten Verdünnungen in den aufgeführten Anwendungen. HRP: Meerrettich-Peroxidase.

4.2 Methoden

4.2.1 Molekularbiologische Methoden

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Standard-PCR-Reaktionen bei anschließender Klonierung wurden mit *Taq*-DNA-Polymerase (Roche) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Reaktionsansatz (50 µl):

cDNA-Matrize (ca. 5 pM)	1 µl
10x PCR Reaktionspuffer	5 µl
sense Primer (10 pM)	2,5 µl
antisense Primer (10 pM)	2,5 µl
dNTPs (25 mM)	0,5 µl
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	1 U
ddH ₂ O	37,5 µl

Die Hintereinanderschaltung der einzelnen Synthesezyklen wurde durch die Verwendung des Thermocyclers der Firma Biometra automatisiert.

Dabei wurde ein "touch-down" PCR-Programm verwendet:

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	95	3 min	1 x
Denaturierung	95	30 s	10 x
Primer-Annealing	62 – 57(-0,5/Z.)	1 min	
Primer-Extension/ DNA-Elongation	72	2 min	
Denaturierung	95	1 min	25 x
Primer-Annealing	57	30 s	
Primer-Extension/ DNA-Elongation	72	2 min (+ 10 s/Z.)	
Finale Elongation	72	10 min	1 x

Der amplifizierte PCR-Ansatz wurde zur Kontrolle und Aufreinigung auf einem Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Elution des amplifizierten Fragmentes wurde ein Elutionskit der Firma QIAGEN benutzt.

Gerichtete Einführung von Punktmutationen

Die gezielte Einführung von Punktmutationen erfolgte mit dem QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) nach Angaben des Herstellers. Dabei wurden die Mutagenese-Primer (siehe Anhang) so gewählt, daß jeweils die Aminosäure Threonin an der Position 72 bei EHD2 und EHD3 gegen ein Asparagin ausgetauscht wurde. Zur Einführung der Punktmutationen wurde die *PfuTurbo*-DNA-Polymerase verwendet.

Transformation

Die Transformation sowie Herstellung kompetenter *E.coli* Bakterien (DH5 α) erfolgte nach der Methode von Chung et al. (1989).

Isolierung von Plasmiden aus Bakterien

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus geringeren Volumina an Bakterien-Kulturen wurde das Protokoll von Birnboim übernommen (Birnboim et al., 1979; Birnboim, 1983), während zur Isolierung von Plasmid-DNA aus größeren Volumina an Bakterien-Kulturen ein Kit der Firma Macherey & Nagel verwendet wurde.

Sequenzierungen

Die Sequenzierungen wurden vom ZMMK-Service-Labor durchgeführt. Dazu wurden jeweils 500 ng DNA mit 1 μ l Sequenzierungsprimer (10 pmol) versetzt und das Gesamtvolumen auf 6 μ l aufgefüllt.

4.2.2 Zellkultur

Zur Durchführung verschiedener Experimente mit der embryonalen Fibroblasten-Zelllinie aus Maus (NIH 3T3) oder der humanen Hepatoma-Zelllinie (Huh-7) wurde unter sterilen Bedingungen gearbeitet.

Beide Zelllinien wurden in begasteten Brutschränken mit maximaler Luftfeuchtigkeit, 37°C Umgebungstemperatur und 5%iger CO₂-Atmosphäre kultiviert. Als Nährmedium wurde serumfreies DMEM („Dulbecco's Modified Eagle Medium“) verwendet, dem 10% fötales Kälberserum (Invitrogen), zur Verhinderung von Kontaminationen ein Gemisch aus 2% (v/v) Penicillin und Streptomycin und die bei längerer Lagerung zerfallende Aminosäure Glutamin 1% (v/v) zugegeben wurde.

Transfektion von Zellen

Zur Identifizierung der intrazellulären Lokalisationen von überexprimierten wt bzw. mutanten Proteinen wurden transiente Transfektionen mit eukaryotischen Expressionsvektoren durchgeführt, die eine „getaggte“ cDNA der zu untersuchenden Proteine enthalten.

Die Transfektion wurde bei konfluenter Zelldichte und mit dem Transfektionsreagenz FuGene 6 (Roche) nach Herstellerangaben durchgeführt.

Präparation von Proteinen aus Zellen

Zur Analyse von endogenen oder überexprimierten Proteinen werden die Zellen lysiert, indem sie durch Zugabe von Trypsin-Lösung (Invitrogen) vom Boden gelöst, mit Medium versetzt und in ein 15 ml Falconröhrchen überführt wurden. Nach anschließender Zentrifugation (5 min bei 500 xg) und Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen mit 10 ml PBS-Puffer gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in je nach Versuch entsprechend vorgekühltem Puffer resuspendiert und mit Proteaseinhibitoren (Sigma) versetzt. Durch anschließende Ultraschallbehandlung und Hinzufügen von 1% Triton (Endkonzentration) wurden die Zellmembranen zerstört. Nach 30 min Rotation im Kühlraum wurden die Zellbruchstücke abzentrifugiert (30 min, 10000 xg und 4°C). Der Protein-haltige Überstand wurde bei 4°C oder -20°C verwahrt.

Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Für Immunfluoreszenz-Analysen wurden die Zellen auf runden Deckgläschen mit einem Durchmesser von 12 mm ausplattiert und gegebenenfalls transfiziert. Nach der gewünschten Inkubationszeit wurden die Zellen mit PBS gewaschen, 10 min mit 2% (w/v) Paraformaldehyd in PBS fixiert und 1 min mit 0,2% (v/v) Triton X-100 in PBS permeabilisiert. Alle Antikörper-Inkubationen und Waschschrte wurden mit 0,02% (v/v) Triton X-100 in PBS durchgeführt. Erstantikörper wurden in geeigneten Verdünnungen 1 Stunde inkubiert und die Zellen daraufhin dreimal 5 min gewaschen. Die einstündige Inkubation der Zweitantikörper und die drei nachfolgenden Waschschrte wurden aufgrund der lichtempfindlichen Fluoreszenz-Markierung der Antikörper im Dunkeln durchgeführt. Abschließend wurden die Zellen zweimal mit deionisiertem Wasser gewaschen und die Deckgläschen mit DAKO Mounting Medium eingedeckt. Die primären Neuronen wurden vor der Erstantikörperinkubation mit 10% BSA in PBS blockiert und der Antikörper in 1% NGS (normal goat serum), 1% BSA/ PBS angesetzt und über Nacht inkubiert. Vor der Zweitantikörperinkubation wurde erneut mit 5% NGS/ 1% BSA/PBS für 30 min blockiert.

Die Analyse der Färbungen erfolgte entweder mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie (Leica), wobei eine Kombination aus Lichtmikroskopie, Laser- und Computertechnologie verwendet wurde, die von dem Leica TCS Confocal Systems User Manual-Programm (Version 2.1, 2001) vorgegeben war oder mit dem Axiophot-Floureszenzmikroskop (Zeiss) unter Verwendung der digitalen Kamera *Spot RT Slider* und der Software *Metamorph* (Version 4.6, 2003).

Brefeldin A-Behandlung

Zur Identifizierung der EHD4 DEH-positiven Strukturen wurden die transfizierten Zellen mit dem Pilz-Metabolit von *E. brefeldianum* Brefeldin A behandelt. Dazu wurden die Zellen für eine Stunde mit einer 1:1000-Verdünnung der 50 µg/ml enthaltenden Stocklösung bei 37 °C inkubiert und anschließend nach dem obigen Protokoll gefärbt.

Subzelluläre Fraktionierung transfizierter Zellen

Um die intrazelluläre Lokalisation der transient transfizierten EHD4-Konstrukte mit einer biochemischen Methode zu analysieren, wurde eine subzelluläre Fraktionierung über einen kontinuierlichen Zucker-Gradienten durchgeführt. Dazu wurden die gewaschenen Zellpellets von drei Zellkulturschalen (Durchmesser 10 cm) pro Konstrukt in 1ml Homogenisationspuffer (50 mM Tris/HCl, pH 7,4; 250 mM Saccharose; 25 mM KCl; 5 mM MgCl₂; 3 mM Imidazol und Protease Inhibitor Cocktail (Sigma)) aufgenommen und in einem Braun-Homogenisator durch 20 Stöße mechanisch aufgeschlossen. Die größeren Zellfragmente wie Plasmamembran und Zellkerne wurden durch 10 min Zentrifugation bei 1000 x g und 4 °C entfernt. Der proteinhaltige Überstand wurde auf einen 10 – 40%igen, in dem Homogenisationspuffer angesetzten Saccharosegradienten aufgetragen und die Zellorganellen durch eine isopyknische Zentrifugation (16h, 38000 U/min, 4°C, Rotor: SW41TI, Zentrifuge: L7-55, Beckman) im Gradienten aufgetrennt.

Zur Gewinnung der einzelnen Fraktionen aus dem Gradienten wurden die Zentrifugenröhrchen bei -80°C gefroren, die Plastikhülle nach leichtem Antauen auseinandergesägt und der Saccharosegradient anschließend mit dem Skalpell in jeweils 0,5 cm dicke Scheiben geschnitten. Die Proteine aus den einzelnen Fraktionen wurden im Anschluß mit TCA (Trichloressigsäure) gefällt, über SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und durch Immundetektion analysiert.

4.2.3 Proteinchemische Methoden

Die Proteinaufreinigungen wurden auf Eis bzw. im Kühlraum (6 °C) mit vorgekühlten Puffern durchgeführt. Weitere Arbeiten erfolgten, wenn nicht anders erwähnt, auf Eis und die Proteine wurden bei 4°C gelagert.

Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Zur Gewinnung der einzelnen EHD-Isoformen und Mutanten als GST-Fusionsproteine wurde ein Protokoll des Herstellers Amersham Biosciences modifiziert. Nach Transformation der bakterielle Expressionsvektoren mit den Konstrukte (pGEX-4T1, -3X, -6P1, -6P2, -6P3) in *E. coli*-BL21-Bakterien wurden 10 ml-Übernachtskulturen (LB/Ampicillin) angesetzt. Die 10 ml Kulturen wurden zum Animpfen von 3 – 4 l LB/Ampicillin-Kultur verwendet und im Schüttler bei 37°C bis zu

einer Dichte von OD_{600} 0,5 herangezogen. Durch Zugabe von 0,25 mM IPTG (Endkonzentration) wurde die Proteinexpression induziert und die Kulturen über Nacht bei RT im Schüttler inkubiert. Durch Zentrifugation (15 min bei 5000 xg) wurden die Bakterien pelletiert und die Überstände verworfen. Nachfolgende Volumina beziehen sich immer auf 1 Liter Bakterienkultur. Die Pellets wurden in 50 ml PBS resuspendiert und nach Zugabe von 1,25 ml Lysozym (20 mg/ml) und 150 μ l eines Proteaseinhibitorgemisches (Sigma) für 20 min auf Eis inkubiert. Durch eine Ultraschallbehandlung (dreimal je 5 min, 70% Amplitude, kontinuierliche Beschallung bei Einstellung 1) und Zugabe von 1,25 ml PBS mit 20% Triton X-100 wurden die Zellmembranen aufgeschlossen. Nach einem darauf folgenden Inkubationsschritt rollend für 30 min und bei 4°C, wurden die Zelltrümmer bei 5000 xg entfernt. Zur Isolierung der GST-Proteine aus dem Proteingemisch des Bakterienlysates wurden pro Ansatz 300 μ l gewaschene Glutathion-Sepharose zu den Proteingemischen gegeben und zur Kopplung der GST-Fusionsproteine an die Glutathion-Sepharose für mindestens vier Stunden rotierend im Kühlraum inkubiert. Im Anschluß wurden die Proben 5 min bei 500 xg und 4°C zentrifugiert und fünfmal mit 50 ml PBS gewaschen. Die GST-Fusionsproteine wurden nach Herstellerangaben entweder mit reduziertem Glutathion eluiert oder mit PreScission-Protease® über Nacht und bei 4°C geschnitten.

Proteinpräparation aus Maus-Geweben

Schockgefrorene und bei -80°C gelagerte Mausgewebe wurden mit 2 ml HBS-Puffer (20 mM HEPES/ NaOH, pH7,4; 150 mM NaCl; 2 mM $MgCl_2$; 1 mM DTT) und einer 1:50-Verdünnung eines Proteaseinhibitorgemisches (Sigma) in einem Braun-Homogenisator homogenisiert, bis die Lösung als gleichmäßige Suspension erschien. Nach Zugabe von 1% TritonX-100 als Endkonzentration wurden die Suspensionen 30 min bei 4°C rollend inkubiert. Zur Entfernung der Zelltrümmer erfolgte ein Zentrifugationsschritt 15 min bei 12000 xg und 4°C.

TCA(Trichloressigsäure)-Fällung

Nach der Zugabe von 125 μ l 50% TCA und 5 μ l 10% Triton X 100 zu 0,5 ml Proteingemisch wurden die Proben für 30 min auf Eis inkubiert. Im Anschluß wurde bei 15000 rpm, 15 min und 4°C zentrifugiert und das Pellet mit 1 ml eiskaltem Aceton gewaschen, an der Luft getrocknet, bevor es in PBS aufgenommen wurde.

Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen erfolgte mit dem BCA Protein Assay Kit (Pierce).

CD-Spektroskopie

Die Messungen erfolgten in 5 mM Tris/ HCl, pH 7,4; 150 mM NaCl und 2 mM MgCl₂ und einer Konzentration von mindestens 0,1 mg/ml. Die Spektren wurden bei 20°C über einen Wellenlängenbereich von 190 bis 250 nm aufgenommen. Für die Auswertung wurde das Programm CONTIN verwendet.

Crosslinking

Das Crosslinking von Proteinen erfolgte in HBS-Puffer in Anwesenheit von 2 mM MgCl₂. Die Reaktion wurde in einem Endvolumen von 80 - 160 µl durchgeführt. Anschließend erfolgte die Zugabe des Crosslinkers (Pierce; (Bis[Sulfosuccinimidyl]suberate)) welcher in dem gleichem HBS-Puffer gelöst wurde. Der Reaktionsansatz wurde für 1 h auf Eis inkubiert, bevor die Reaktion durch Zugabe von 20 µl 0,5 M Tris/ HCl, pH 7,4 abgestoppt wurde. Die Inkubation von EHD1 wt mit verschiedenen Nukleotiden erfolgte in einem 100-fachen Überschuß des jeweiligen Nukleotids für 30 min auf Eis.

Subzelluläre Fraktionierung

Für die subzelluläre Fraktionierung wurde ein Protokoll aus dem Labor von P. McPherson (McGill University, Montreal, Canada, Huttner *et al.*, 1983, McPherson *et al.*, 1994) verwendet. Für die Analyse der intrazellulären Lokalisation der drei in Hirn vorkommenden EHD Isoformen wurden Maus-Hirne (20 g) in einem HEPES-Puffer (10 mM HEPES/ NaOH, pH 7,4; 0,33 M Saccharose; Protease Inhibitoren (Cocktail P-8340, Sigma)) homogenisiert und für 10 min bei 800 x g zentrifugiert, wodurch die Fraktionen (Abb. 2.1) Pellet 1 (P1) und Überstand 1 (S1) entstanden. S1 wurde daraufhin für 15 min bei 12000 x g zentrifugiert, resultierend in Pellet P2 und Überstand S2, welcher wiederum für 2 h bei 206000 x g zentrifugiert wurde und dadurch die Fraktionen Pellet P3 und Überstand S3 entstanden. Das Pellet P2 wurde im Homogenisationspuffer resuspendiert, für 15 min bei 14500 x g zentrifugiert, resultierend in Pellet P2', welches aus einem dunkel-braunen Pellet am Boden des Zentrifugen-Röhrchen und einem daraufsitzenden helleren beigen Pellet bestand.

Von Interesse dabei ist das helle, Synaptosomen-haltige Pellet, was nun in 1:10 in Wasser resuspendiert und homogenisiert wurde. Durch die Verwendung von Wasser sollten die Synaptosomen durch den osmotischen Stress lysiert werden. Die weitere Zentrifugation für 20 min bei 32500 x g führte zu dem Erhalt eines dunkleren beigen Pellets LP1 und eines helleren beigen Pellets LP1' obenauf und des Überstandes LS1. Dieser wurde erneut für 2 h bei 206000 x g zentrifugiert, resultierend in Pellet LP2 und dem finalen Überstand LS2. Alle Pellets wurden in dem Homogenisationpuffer resuspendiert and homogenisiert, die Proteinkonzentration per BCA-Assay bestimmt und jeweils gleiche Mengen des Gesamtprotein-Lysates durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt, per Western-Blotting analysiert.

Herstellung von Liposomen und Sedimentationsassay

Zur Herstellung und Lagerung der Phosphoinositide wurden 1,8 ml Glasfläschchen mit Teflon-Kappen verwendet. Alle Lipide wurden in einem 3:1 Chloroform- Methanol-Gemisch gelöst und gelagert. Alle Lipide (Cholesterin (C3045), L- α -phosphatidylcholin (PC; P6638), L- α -phosphatidylethanolamin (PE; P9137), L- α -phosphatidyl-L-serin (PS; P5660), L- α -phosphatidyl-D-myo-inositol 3-monophosphat (PI(3)P;P3953), L- α -phosphatidylinositol 4-monophosphat (PI(4)P; P9638), L- α -phosphatidylinositol 4,5-diphosphat (PI(4,5)P₂; P9763), L- α -phosphatidyl-D-myo-inositol 3,5-diphosphat (PI(3,5)P₂; P5713), 1,2-dipalmitoylphosphatidylinositol 3,4-diphosphat (PI(3,4)P₂;P6990) and 1,2-dipalmitoylphosphatidylinositol 3,4,5-triphosphat (PI(3,4,5)P₃;P4240) wurden von Sigma bezogen. Zur Herstellung und Durchführung des Sedimentationsassays wurde ein Protokoll aus Dr. Harvey T. McMahons Labor benutzt

(http://www2.mrc-mb.cam.ac.uk/NB/McMahon_H/group/techniqs/Liposome.htm). Die Lipide bestehend aus 10% Cholesterin, 35% PC, 35% PE, 10% PS und 10% der jeweiligen protonierten Phosphoinositide wurden in einer 1,8 ml Glasflasche in 3:1 Chloroform-Methanol gemischt. Unter kontinuierlichem Zufluß von Stickstoff wurden die beiden flüchtigen Lösungsmittel verdrängt, so daß sich ein Lipidfilm an der Glasflaschenwand bildete. Nach 30 min Inkubation in einem Vakuum Desiccator wurden zur Hydratation des Lipid-Filmes 0,5 ml des HBS-Puffers (20 mM Hepes/ NaOH, pH 7,4 bzw. 6,8; 150 mM NaCl; 2 mM MgCl₂; 1 mM DTT) zu den Lipiden gegeben, so daß die Endkonzentration der Lipide bei 1 mg/ml lag. Zur Bildung von Lipsomen wurde das Gemisch für 5 min in einem Wasserbad-

Sonifiziergerät inkubiert und anschließend weiteren internen Ultraschallimpulsen ausgesetzt, bis keine größeren Lipidpartikel mehr sichtbar sind. Für den Interaktionsnachweis zwischen den EHD-Proteinen und den mit Phosphoinositid-angereicherten Liposomen wurden jeweils 3 – 5 µg Protein mit 50 µl der Liposomen für 15 min bei RT inkubiert und anschließend für 25 min bei 100000 x g und 4°C in der Ultrazentrifuge (TLA-55, Optima MAX, Beckman Coulter) zentrifugiert. Die Proteine wurden zunächst ohne Liposomen unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert, um Aggregate soweit wie möglich aus der Proteinlösung zu entfernen. Überstände und Liposomenpellets (+ gebundene Proteine) wurden schnell voneinander getrennt, die Pellets bei RT getrocknet und in 80 µl des HBS-Puffers resuspendiert. Sowohl die Pellet-, als auch die Überstand-Fractionen wurden mit 4-fachem Probenpuffer versetzt und per SDS-Gelelektrophorese und anschließender Coomassie Brilliant Blue ®-Färbung analysiert. Eine Quantifizierung der Sedimentation erfolgte mit dem Programm ImageQuant 5.0.

Negativfärbung

Zur Negativfärbung der Protein-Lipid-Komplexe wurde ebenfalls ein Protokoll aus dem Labor von Dr. Harvey T. McMahon benutzt (http://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/NB/McMahon_H/group/techniqs/Negative%20stain%20protocol.htm). Die mit Kollodium-Kohle beschichteten Trägerfilme (*grids*) wurden freundlicherweise von H.T. McMahon (MRC Lab of Molecular Biology, Cambridge, UK) zur Verfügung gestellt. Die Metallionen des Färbemittels Uranylacetat (2 %ig) lagern sich um die eigentlichen Strukturen herum, so daß das biologische Material mit Schwermetall umlagert wird und im Elektronenmikroskop hell erscheint. Für die Färbung wurden 2 Tropfen pro Probe des Färbemittels auf Parafilm und die Protein-Lipid-Komplexe auf den Trägerfilm aufgetragen. Nach einer Adsorptionszeit von 20 – 40 s wurde die Suspension mit Filterpapier weggesaugt und der Trägerfilm nacheinander auf die beiden Tropfen der Färbelösung gehalten. Das Präparat wurde an der Luft getrocknet und mit einem Transmissions-Elektronenmikroskop (Leo 902, Zeiss) aufgenommen.

GTP-/ATPase-Aktivitätstest

Zur Charakterisierung der N-terminalen Nukleotid-Bindungsdomäne wurde ein GTP/ATPase-Assay nach Kamimoto et al., 1997 durchgeführt. Da dabei mit

radioaktiv-markiertem GTP oder ATP gearbeitet wurde, wurden die Arbeitsschritte im Radioaktivlabor und nach den Strahlenschutzbestimmungen durchgeführt.

3 µg der eluierten GST-Fusionsproteine wurden mit einem Reaktionsmix aus 50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 5 mM MgCl₂; 0,1 mM DTT; 130 µM unmarkiertem GTP oder ATP und 13 nM α-[³²P] dGTP oder ATP bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle diente dabei ein Reaktionsansatz mit vorher für 5 min aufgekochtem EHD1 wt. Nach 5, 10, 15, 30 min und 1, 2, 3, 5 und 7 Stunden wurden die Reaktionen durch Einfrieren abgestoppt. Von dem Reaktionsansatz wurde jeweils 1 µl auf eine Polyethylenimin-Cellulose-Platte aufgetragen und diese in eine Chromatographie-Laufkammer mit 1,6 M Lithiumchlorid als Laufmittel gestellt. Nach ca. 1 Stunde Laufzeit wurde die Platte für zwei Stunden in eine Film-Kassette gelegt und autoradiografiert. Die Quantifizierung erfolgte über einen Phosphoimager und der Software ImageQuant 5,0.

5. Literaturverzeichnis

- Achiriloaie, M., B. Barylko and J. P. Albanesi (1999). **"Essential role of the dynamin pleckstrin homology domain in receptor-mediated endocytosis."** *Mol Cell Biol* 19(2): 1410-5.
- Alberts, B., D. Bray, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter (2001). **"Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie."** 2., korrigierte Auflage. Wiley-VCH
- Antonny, B. and R. Schekman (2001). **"ER export: public transportation by the COPII coach."** *Curr Opin Cell Biol* 13(4): 438-43.
- Audhya, A., M. Foti and S. D. Emr (2000). **"Distinct roles for the yeast phosphatidylinositol 4-kinases, Stt4p and Pik1p, in secretion, cell growth, and organelle membrane dynamics."** *Mol Biol Cell* 11(8): 2673-89.
- Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, K. Struhl. (2002). **"Short Protocols in Molecular Biology"**, 5. Auflage, Wiley-VCH
- Barlowe, C., L. Orci, T. Yeung, M. Hosobuchi, S. Hamamoto, N. Salama, M. F. Rexach, M. Ravazzola, M. Amherdt and R. Schekman (1994). **"COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum."** *Cell* 77(6): 895-907.
- Bernards, A. and J. Settleman (2004). **"GAP control: regulating the regulators of small GTPases."** *Trends Cell Biol* 14(7): 377-85.
- Bigay, J., P. Gounon, S. Robineau and B. Antonny (2003). **"Lipid packing sensed by ArfGAP1 couples COPI coat disassembly to membrane bilayer curvature."** *Nature* 426(6966): 563-6.
- Birnboim, H. C. and J. Doly (1979). **"A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA."** *Nucleic Acids Res* 7(6): 1513-23.
- Birnboim, H. C. (1983). **"A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA."** *Methods Enzymol* 100: 243-55.
- Blume, J. (2002). **"Klonierung der EHD-Isoformen 2 und 3 und funktionale Charakterisierung der Protein-Familie."** Diplomarbeit. Universität zu Köln
- Bonfanti, L., A. A. Mironov, Jr., J. A. Martinez-Menarguez, O. Martella, A. Fusella, M. Baldassarre, R. Buccione, H. J. Geuze, A. A. Mironov and A. Luini (1998). **"Procollagen traverses the Golgi stack without leaving the lumen of cisternae: evidence for cisternal maturation."** *Cell* 95(7): 993-1003.
- Bonifacino, J. S., M. Dasso, J. B. Harford, J. Lippincott-Schwartz, K. M. Yamada (2004). **"Short Protocols in Cell Biology."** Wiley-VCH
- Bonifacino, J. S. and B. S. Glick (2004). **"The mechanisms of vesicle budding and fusion."** *Cell* 116(2): 153-66.

- Bourne, H. R., D. A. Sanders and F. McCormick (1990). **"The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions."** *Nature* 348(6297): 125-32.
- Braun, A., R. Pinyol, R. Dahlhaus, D. Koch, P. Fonarev, B. D. Grant, M. M. Kessels and B. Qualmann (2005). **"EHD proteins associate with syndapin I and II and such interactions play a crucial role in endosomal recycling."** *Mol Biol Cell* 16(8): 3642-58.
- Brodsky, S. V., O. Gealekman, J. Chen, F. Zhang, N. Togashi, M. Crabtree, S. S. Gross, A. Nasjletti and M. S. Goligorsky (2004). **"Prevention and reversal of premature endothelial cell senescence and vasculopathy in obesity-induced diabetes by ebselen."** *Circ Res* 94(3): 377-84.
- Canty, E. G. and K. E. Kadler (2005). **"Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis."** *J Cell Sci* 118(Pt 7): 1341-53.
- Caplan, S., N. Naslavsky, L. M. Hartnell, R. Lodge, R. S. Polishchuk, J. G. Donaldson and J. S. Bonifacino (2002). **"A tubular EHD1-containing compartment involved in the recycling of major histocompatibility complex class I molecules to the plasma membrane."** *Embo J* 21(11): 2557-67.
- Chen, Y. A. and R. H. Scheller (2001). **"SNARE-mediated membrane fusion."** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(2): 98-106.
- Cho, W. and R. V. Stahelin (2005). **"Membrane-protein interactions in cell signaling and membrane trafficking."** *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 34: 119-51.
- Chung, C. T. and R. H. Miller (1988). **"A rapid and convenient method for the preparation and storage of competent bacterial cells."** *Nucleic Acids Res* 16(8): 3580.
- Coligan J. E., B. M. Dunn, D. W. Speicher, P. T. Wingfield (2003). **"Short Protocols in Protein Science"**. Wiley-VCH
- Collins, B. M., A. J. McCoy, H. M. Kent, P. R. Evans and D. J. Owen (2002). **"Molecular architecture and functional model of the endocytic AP2 complex."** *Cell* 109(4): 523-35.
- Confalonieri, S. and P. P. Di Fiore (2002). **"The Eps15 homology (EH) domain."** *FEBS Lett* 513(1): 24-9.
- Damm, E. M., L. Pelkmans, J. Kartenbeck, A. Mezzacasa, T. Kurzchalia and A. Helenius (2005). **"Clathrin- and caveolin-1-independent endocytosis: entry of simian virus 40 into cells devoid of caveolae."** *J Cell Biol* 168(3): 477-88.
- Danielsen, E. M. and G. H. Hansen (2003). **"Lipid rafts in epithelial brush borders: atypical membrane microdomains with specialized functions."** *Biochim Biophys Acta* 1617(1-2): 1-9.
- De Matteis, M., A. Godi and D. Corda (2002). **"Phosphoinositides and the golgi complex."** *Curr Opin Cell Biol* 14(4): 434-47.
- de Renzis, S., B. Sonnichsen and M. Zerial (2002). **"Divalent Rab effectors regulate the sub-compartmental organization and sorting of early endosomes."** *Nat Cell Biol* 4(2): 124-33.

- Dell'Angelica, E. C., R. Puertollano, C. Mullins, R. C. Aguilar, J. D. Vargas, L. M. Hartnell and J. S. Bonifacino (2000). **"GGAs: a family of ADP ribosylation factor-binding proteins related to adaptors and associated with the Golgi complex."** *J Cell Biol* 149(1): 81-94.
- Deneka, M. and P. van der Sluijs (2002). **"Rab'ing up endosomal membrane transport."** *Nat Cell Biol* 4(2): E33-5.
- Drab, M., P. Verkade, M. Elger, M. Kasper, M. Lohn, B. Lauterbach, J. Menne, C. Lindschau, F. Mende, F. C. Luft, A. Schedl, H. Haller and T. V. Kurzchalia (2001). **"Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice."** *Science* 293(5539): 2449-52.
- Drake, M. T., M. A. Downs and L. M. Traub (2000). **"Epsin binds to clathrin by associating directly with the clathrin-terminal domain. Evidence for cooperative binding through two discrete sites."** *J Biol Chem* 275(9): 6479-89.
- Dumas, J. J., E. Merithew, E. Sudharshan, D. Rajamani, S. Hayes, D. Lawe, S. Corvera and D. G. Lambright (2001). **"Multivalent endosome targeting by homodimeric EEA1."** *Mol Cell* 8(5): 947-58.
- Dupree, P., R. G. Parton, G. Raposo, T. V. Kurzchalia and K. Simons (1993). **"Caveolae and sorting in the trans-Golgi network of epithelial cells."** *Embo J* 12(4): 1597-605.
- Edeling, M. A., C. Smith and D. Owen (2006). **"Life of a clathrin coat: insights from clathrin and AP structures."** *Nat Rev Mol Cell Biol* 7(1): 32-44.
- Farsad, K., N. Ringstad, K. Takei, S. R. Floyd, K. Rose and P. De Camilli (2001). **"Generation of high curvature membranes mediated by direct endophilin bilayer interactions."** *J Cell Biol* 155(2): 193-200.
- Ford, M. G., B. M. Pearse, M. K. Higgins, Y. Vallis, D. J. Owen, A. Gibson, C. R. Hopkins, P. R. Evans and H. T. McMahon (2001). **"Simultaneous binding of PtdIns(4,5)P₂ and clathrin by AP180 in the nucleation of clathrin lattices on membranes."** *Science* 291(5506): 1051-5.
- Ford, M. G., I. G. Mills, B. J. Peter, Y. Vallis, G. J. Praefcke, P. R. Evans and H. T. McMahon (2002). **"Curvature of clathrin-coated pits driven by epsin."** *Nature* 419(6905): 361-6.
- Foster, R., K. Q. Hu, Y. Lu, K. M. Nolan, J. Thissen and J. Settleman (1996). **"Identification of a novel human Rho protein with unusual properties: GTPase deficiency and in vivo farnesylation."** *Mol Cell Biol* 16(6): 2689-99.
- Foti, M., A. Audhya and S. D. Emr (2001). **"Sac1 lipid phosphatase and Stt4 phosphatidylinositol 4-kinase regulate a pool of phosphatidylinositol 4-phosphate that functions in the control of the actin cytoskeleton and vacuole morphology."** *Mol Biol Cell* 12(8): 2396-411.
- Fra, A. M., E. Pasqualetto, M. Mancini and R. Sitia (2000). **"Genomic organization and transcriptional analysis of the human genes coding for caveolin-1 and caveolin-2."** *Gene* 243(1-2): 75-83.

- Franco, M., P. J. Peters, J. Boretto, E. van Donselaar, A. Neri, C. D'Souza-Schorey and P. Chavrier (1999). **"EFA6, a sec7 domain-containing exchange factor for ARF6, coordinates membrane recycling and actin cytoskeleton organization."** *Embo J* 18(6): 1480-91.
- Fromme, J. C. and R. Schekman (2005). **"COPII-coated vesicles: flexible enough for large cargo?"** *Curr Opin Cell Biol* 17(4): 345-52.
- Gad, H., N. Ringstad, P. Low, O. Kjaerulff, J. Gustafsson, M. Wenk, G. Di Paolo, Y. Nemoto, J. Crun, M. H. Ellisman, P. De Camilli, O. Shupliakov and L. Brodin (2000). **"Fission and uncoating of synaptic clathrin-coated vesicles are perturbed by disruption of interactions with the SH3 domain of endophilin."** *Neuron* 27(2): 301-12.
- Galperin, E., S. Benjamin, D. Rapaport, R. Rotem-Yehudar, S. Tolchinsky and M. Horowitz (2002). **"EHD3: a protein that resides in recycling tubular and vesicular membrane structures and interacts with EHD1."** *Traffic* 3(8): 575-89.
- Gillooly, D. J., I. C. Morrow, M. Lindsay, R. Gould, N. J. Bryant, J. M. Gaullier, R. G. Parton and H. Stenmark (2000). **"Localization of phosphatidylinositol 3-phosphate in yeast and mammalian cells."** *Embo J* 19(17): 4577-88.
- Gillooly, D. J., C. Raiborg and H. Stenmark (2003). **"Phosphatidylinositol 3-phosphate is found in microdomains of early endosomes."** *Histochem Cell Biol* 120(6): 445-53.
- Godi, A., A. Di Campli, A. Konstantakopoulos, G. Di Tullio, D. R. Alessi, G. S. Kular, T. Daniele, P. Marra, J. M. Lucocq and M. A. De Matteis (2004). **"FAPPs control Golgi-to-cell-surface membrane traffic by binding to ARF and PtdIns(4)P."** *Nat Cell Biol* 6(5): 393-404.
- Grant, B., Y. Zhang, M. C. Paupard, S. X. Lin, D. H. Hall and D. Hirsh (2001). **"Evidence that RME-1, a conserved C. elegans EH-domain protein, functions in endocytic recycling."** *Nat Cell Biol* 3(6): 573-9.
- Greenfield, N. J. (1996). **"Methods to estimate the conformation of proteins and polypeptides from circular dichroism data."** *Anal Biochem* 235(1): 1-10.
- Grimmer, S., B. van Deurs and K. Sandvig (2002). **"Membrane ruffling and macropinocytosis in A431 cells require cholesterol."** *J Cell Sci* 115(Pt 14): 2953-62.
- Guilherme, A., N. A. Soriano, P. S. Furcinitti and M. P. Czech (2004). **"Role of EHD1 and EHBP1 in perinuclear sorting and insulin-regulated GLUT4 recycling in 3T3-L1 adipocytes."** *J Biol Chem* 279(38): 40062-75.
- Guilherme, A., N. A. Soriano, S. Bose, J. Holik, A. Bose, D. P. Pomerleau, P. Furcinitti, J. Leszyk, S. Corvera and M. P. Czech (2004). **"EHD2 and the novel EH domain binding protein EHBP1 couple endocytosis to the actin cytoskeleton."** *J Biol Chem* 279(11): 10593-605.
- Halbach, A. (2004). **"Proteinbiochemische Charakterisierung von PACSIN1 und seines Bindungspartners PAST2"** Dissertation. Universität zu Köln
- Hall, A. (1998). **"GTPases."** *Oxford University Press*.

- Hansen, G. H., J. Pedersen, L. L. Niels-Christiansen, L. Immerdal and E. M. Danielsen (2003). **"Deep-apical tubules: dynamic lipid-raft microdomains in the brush-border region of enterocytes."** *Biochem J* 373(Pt 1): 125-32.
- Hendricks, L. C., S. L. McClanahan, M. McCaffery, G. E. Palade and M. G. Farquhar (1992). **"Golgi proteins persist in the tubulovesicular remnants found in brefeldin A-treated pancreatic acinar cells."** *Eur J Cell Biol* 58(2): 202-13.
- Hinshaw, J. E. and S. L. Schmid (1995). **"Dynamain self-assembles into rings suggesting a mechanism for coated vesicle budding."** *Nature* 374(6518): 190-2.
- Hirshberg, M., K. Henrick, L. L. Haire, N. Vasisht, M. Brune, J. E. Corrie and M. R. Webb (1998). **"Crystal structure of phosphate binding protein labeled with a coumarin fluorophore, a probe for inorganic phosphate."** *Biochemistry* 37(29): 10381-5.
- Hirst, J., N. A. Bright, B. Rous and M. S. Robinson (1999). **"Characterization of a fourth adaptor-related protein complex."** *Mol Biol Cell* 10(8): 2787-802.
- Hommelgaard, A. M., K. Roepstorff, F. Vilhardt, M. L. Torgersen, K. Sandvig and B. van Deurs (2005). **"Caveolae: stable membrane domains with a potential for internalization."** *Traffic* 6(9): 720-4.
- Huttner, W. B., W. Schiebler, P. Greengard and P. De Camilli (1983). **"Synapsin I (protein I), a nerve terminal-specific phosphoprotein. III. Its association with synaptic vesicles studied in a highly purified synaptic vesicle preparation."** *J Cell Biol* 96(5):1374-88.
- Isshiki, M. and R. G. Anderson (1999). **"Calcium signal transduction from caveolae."** *Cell Calcium* 26(5): 201-8.
- Jainchill, J. L., S. A. Aaronson and G. J. Todaro (1969). **"Murine sarcoma and leukemia viruses: assay using clonal lines of contact-inhibited mouse cells."** *J Virol* 4(5): 549-53.
- Jha, A., N. R. Agostinelli, S. K. Mishra, P. A. Keyel, M. J. Hawryluk and L. M. Traub (2004). **"A novel AP-2 adaptor interaction motif initially identified in the long-splice isoform of synaptojanin 1, SJ170."** *J Biol Chem* 279(3): 2281-90.
- Kamimoto, T., Y. Nagai, H. Onogi, Y. Muro, T. Wakabayashi and M. Hagiwara (1998). **"Dymple, a novel dynamain-like high molecular weight GTPase lacking a proline-rich carboxyl-terminal domain in mammalian cells."** *J Biol Chem* 273(2): 1044-51.
- Kessels, M. M. and B. Qualmann (2004). **"The syndapin protein family: linking membrane trafficking with the cytoskeleton."** *J Cell Sci* 117(Pt 15): 3077-86.
- Kirchhausen, T. (2000). **"Three ways to make a vesicle."** *Nat Rev Mol Cell Biol* 1(3): 187-98.
- Kirkham, M. and R. G. Parton (2005). **"Clathrin-independent endocytosis: new insights into caveolae and non-caveolar lipid raft carriers."** *Biochim Biophys Acta* 1745(3): 273-86.
- Kirkham, M., A. Fujita, R. Chadda, S. J. Nixon, T. V. Kurzchalia, D. K. Sharma, R. E. Pagano, J. F. Hancock, S. Mayor and R. G. Parton (2005). **"Ultrastructural identification of uncoated caveolin-independent early endocytic vehicles."** *J Cell Biol* 168(3): 465-76.

- Klarlund, J. K., A. Guilherme, J. J. Holik, J. V. Virbasius, A. Chawla and M. P. Czech (1997). **"Signaling by phosphoinositide-3,4,5-trisphosphate through proteins containing pleckstrin and Sec7 homology domains."** *Science* 275(5308): 1927-30.
- Klein, D. E., A. Lee, D. W. Frank, M. S. Marks and M. A. Lemmon (1998). **"The pleckstrin homology domains of dynamin isoforms require oligomerization for high affinity phosphoinositide binding."** *J Biol Chem* 273(42): 27725-33.
- Koenig, J. H. and K. Ikeda (1989). **"Disappearance and reformation of synaptic vesicle membrane upon transmitter release observed under reversible blockage of membrane retrieval."** *J Neurosci* 9(11): 3844-60.
- Kojima, T., M. Fukuda, Y. Watanabe, F. Hamazato and K. Mikoshiba (1997). **"Characterization of the pleckstrin homology domain of Btk as an inositol polyphosphate and phosphoinositide binding domain."** *Biochem Biophys Res Commun* 236(2): 333-9.
- Kosloff, M. and Z. Selinger (2001). **"Substrate assisted catalysis -- application to G proteins."** *Trends Biochem Sci* 26(3): 161-6.
- Krauss, A. (1997). **"Biochemistry of Signal Transduction and Regulation."** 1. Auflage. Wiley-VCH.
- Kreis, T. E. (1992). **"Regulation of vesicular and tubular membrane traffic of the Golgi complex by coat proteins."** *Curr Opin Cell Biol* 4(4): 609-15.
- Kreitzer, G., J. Schmoranzler, S. H. Low, X. Li, Y. Gan, T. Weimbs, S. M. Simon and E. Rodriguez-Boulan (2003). **"Three-dimensional analysis of post-Golgi carrier exocytosis in epithelial cells."** *Nat Cell Biol* 5(2): 126-36.
- Krishnan, K. S., R. Rikhy, S. Rao, M. Shivalkar, M. Mosko, R. Narayanan, P. Etter, P. S. Estes and M. Ramaswami (2001). **"Nucleoside diphosphate kinase, a source of GTP, is required for dynamin-dependent synaptic vesicle recycling."** *Neuron* 30(1): 197-210.
- Kuehn, M., M. Hausner, H. J. Bungartz, M. Wagner, P. A. Wilderer and S. Wuertz (1998). **"Automated confocal laser scanning microscopy and semiautomated image processing for analysis of biofilms."** *Appl Environ Microbiol* 64(11): 4115-27.
- Kuehn, M. J., J. M. Herrmann and R. Schekman (1998). **"COPII-cargo interactions direct protein sorting into ER-derived transport vesicles."** *Nature* 391(6663): 187-90.
- Lamaze, C., A. Dujeancourt, T. Baba, C. G. Lo, A. Benmerah and A. Dautry-Varsat (2001). **"Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway."** *Mol Cell* 7(3): 661-71.
- Lawe, D.C., V. Patki, R. Heller-Harrison, D. Lambright, and S. Corvera, (2000). **"The FYVE domain of early endosome antigen 1 is required for both phosphatidylinositol 3-phosphate and Rab5 binding. Critical role of this dual interaction for endosomal localization."** *J Biol Chem* 275(5): 3699-705.

- Lee, D. W., X. Zhao, S. Scarselletta, P. J. Schweinsberg, E. Eisenberg, B. D. Grant and L. E. Greene (2005). **"ATP binding regulates oligomerization and endosome association of RME-1 family proteins."** *J Biol Chem* 280(17): 17213-20.
- Lehninger. (1987). **"Prinzipien der Biochemie."** 1. Auflage. Springer Verlag.
- Leipe, D. D., Y. I. Wolf, E. V. Koonin and L. Aravind (2002). **"Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases."** *J Mol Biol* 317(1): 41-72.
- Lemmon, M. A. and K. M. Ferguson (2000). **"Signal-dependent membrane targeting by pleckstrin homology (PH) domains."** *Biochem J* 350 Pt 1: 1-18.
- Lemmon, M. A. (2003). **"Phosphoinositide recognition domains."** *Traffic* 4(4): 201-13.
- Lin, S. X., B. Grant, D. Hirsh and F. R. Maxfield (2001). **"Rme-1 regulates the distribution and function of the endocytic recycling compartment in mammalian cells."** *Nat Cell Biol* 3(6): 567-72.
- Macchia, M., S. Barontini, A. Martinelli, E. Menchini, S. Nencetti, E. Orlandini and F. Romagnoli (1998). **"Synthesis and aldose reductase inhibitory activity of new N-(benzyloxy) glycine derivatives."** *Farmaco* 53(5): 369-73.
- Martini, M., L. Formigli, P. Tonelli, M. Giannelli, F. Amunni, D. Naldi, M. L. Brandi, S. Zecchi Orlandini and G. E. Orlandini (1998). **"Effects of ipriflavone on perialveolar bone formation."** *Calcif Tissue Int* 63(4): 312-9.
- Massol, R. H., J. E. Larsen and T. Kirchhausen (2005). **"Possible role of deep tubular invaginations of the plasma membrane in MHC-I trafficking."** *Exp Cell Res* 306(1): 142-9.
- McMahon, H. T. and I. G. Mills (2004). **"COP and clathrin-coated vesicle budding: different pathways, common approaches."** *Curr Opin Cell Biol* 16(4): 379-91.
- McMahon, H. T. and J. L. Gallop (2005). **"Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling."** *Nature* 438(7068): 590-6.
- McPherson, P. S., K. Takai, S. L. Schmid and P. DeCamilli (1994). **"p145, a major Grb2-binding protein in brain, is co-localized with dynamin in nerve terminals where it undergoes activity-dependent dephosphorylation."** *J Biol Chem* 269(48):30132-9
- Mironov, A. A., A. A. Mironov, Jr., G. V. Beznoussenko, A. Trucco, P. Lupetti, J. D. Smith, W. J. Geerts, A. J. Koster, K. N. Burger, M. E. Martone, T. J. Deerinck, M. H. Ellisman and A. Luini (2003). **"ER-to-Golgi carriers arise through direct en bloc protrusion and multistage maturation of specialized ER exit domains."** *Dev Cell* 5(4): 583-94.
- Montesinos, M. L., M. Castellano-Munoz, P. Garcia-Junco-Clemente and R. Fernandez-Chacon (2005). **"Recycling and EH domain proteins at the synapse."** *Brain Res Brain Res Rev* 49(2): 416-28.

- Morsomme, P., C. Prescianotto-Baschong and H. Riezman (2003). **"The ER v-SNAREs are required for GPI-anchored protein sorting from other secretory proteins upon exit from the ER."** *J Cell Biol* 162(3): 403-12.
- Muhlberg, A. B., D. E. Warnock and S. L. Schmid (1997). **"Domain structure and intramolecular regulation of dynamin GTPase."** *Embo J* 16(22): 6676-83.
- Naslavsky, N., M. Boehm, P. S. Backlund, Jr. and S. Caplan (2004). **"Rabenosyn-5 and EHD1 interact and sequentially regulate protein recycling to the plasma membrane."** *Mol Biol Cell* 15(5): 2410-22.
- Naslavsky, N., R. Weigert and J. G. Donaldson (2004). **"Characterization of a nonclathrin endocytic pathway: membrane cargo and lipid requirements."** *Mol Biol Cell* 15(8): 3542-52.
- Naslavsky, N. and S. Caplan (2005). **"C-terminal EH-domain-containing proteins: consensus for a role in endocytic trafficking, EH?"** *J Cell Sci* 118(Pt 18): 4093-101.
- Naslavsky, N., J. Rahajeng, M. Sharma, M. Jovic and S. Caplan (2006). **"Interactions between EHD proteins and Rab11-FIP2: a role for EHD3 in early endosomal transport."** *Mol Biol Cell* 17(1): 163-77.
- Nemoto, Y., B. G. Kearns, M. R. Wenk, H. Chen, K. Mori, J. G. Alb, Jr., P. De Camilli and V. A. Bankaitis (2000). **"Functional characterization of a mammalian Sac1 and mutants exhibiting substrate-specific defects in phosphoinositide phosphatase activity."** *J Biol Chem* 275(44): 34293-305.
- Nichols, B. J., A. K. Kenworthy, R. S. Polishchuk, R. Lodge, T. H. Roberts, K. Hirschberg, R. D. Phair and J. Lippincott-Schwartz (2001). **"Rapid cycling of lipid raft markers between the cell surface and Golgi complex."** *J Cell Biol* 153(3): 529-41.
- Nichols, B. J. and J. Lippincott-Schwartz (2001). **"Endocytosis without clathrin coats."** *Trends Cell Biol* 11(10): 406-12.
- Okamoto, P. M., B. Tripet, J. Litowski, R. S. Hodges and R. B. Vallee (1999). **"Multiple distinct coiled-coils are involved in dynamin self-assembly."** *J Biol Chem* 274(15): 10277-86.
- Orlandi, P. A. and P. H. Fishman (1998). **"Filipin-dependent inhibition of cholera toxin: evidence for toxin internalization and activation through caveolae-like domains."** *J Cell Biol* 141(4): 905-15.
- Owen, D. J. and J. P. Luzio (2000). **"Structural insights into clathrin-mediated endocytosis."** *Curr Opin Cell Biol* 12(4): 467-74.
- Palmer, K. J. and D. J. Stephens (2004). **"Biogenesis of ER-to-Golgi transport carriers: complex roles of COPII in ER export."** *Trends Cell Biol* 14(2): 57-61.
- Park, S. Y., B. G. Ha, G. H. Choi, J. Ryu, B. Kim, C. Y. Jung and W. Lee (2004). **"EHD2 interacts with the insulin-responsive glucose transporter (GLUT4) in rat adipocytes and may participate in insulin-induced GLUT4 recruitment."** *Biochemistry* 43(23): 7552-62.

- Park, M., E. C. Penick, J. G. Edwards, J. A. Kauer and M. D. Ehlers (2004). **"Recycling endosomes supply AMPA receptors for LTP."** *Science* 305(5692): 1972-5.
- Pelkmans, L. and A. Helenius (2002). **"Endocytosis via caveolae."** *Traffic* 3(5): 311-20.
- Peng, R., A. De Antoni and D. Gallwitz (2000). **"Evidence for overlapping and distinct functions in protein transport of coat protein Sec24p family members."** *J Biol Chem* 275(15): 11521-8.
- Peter, B. J., H. M. Kent, I. G. Mills, Y. Vallis, P. J. Butler, P. R. Evans and H. T. McMahon (2004). **"BAR domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin BAR structure."** *Science* 303(5657): 495-9.
- Polishchuk, R. S., E. V. Polishchuk, P. Marra, S. Alberti, R. Buccione, A. Luini and A. A. Mironov (2000). **"Correlative light-electron microscopy reveals the tubular-saccular ultrastructure of carriers operating between Golgi apparatus and plasma membrane."** *J Cell Biol* 148(1): 45-58.
- Polishchuk, E. V., A. Di Pentima, A. Luini and R. S. Polishchuk (2003). **"Mechanism of constitutive export from the golgi: bulk flow via the formation, protrusion, and en bloc cleavage of large trans-golgi network tubular domains."** *Mol Biol Cell* 14(11): 4470-85.
- Polishchuk, R., A. Di Pentima and J. Lippincott-Schwartz (2004). **"Delivery of raft-associated, GPI-anchored proteins to the apical surface of polarized MDCK cells by a transcytotic pathway."** *Nat Cell Biol* 6(4): 297-307.
- Polishchuk, R. S. and A. A. Mironov (2004). **"Structural aspects of Golgi function."** *Cell Mol Life Sci* 61(2): 146-58.
- Praefcke, G. J. and H. T. McMahon (2004). **"The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules?"** *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(2): 133-47.
- Puertollano, R. (2004). **"Clathrin-mediated transport: assembly required. Workshop on Molecular Mechanisms of Vesicle Selectivity."** *EMBO Rep* 5(10): 942-6.
- Radhakrishna, H. and J. G. Donaldson (1997). **"ADP-ribosylation factor 6 regulates a novel plasma membrane recycling pathway."** *J Cell Biol* 139(1): 49-61.
- Ritter, B. (2001). **"Isolierung neuer PACSIN-Isoformen aund funktionale Charakterisierung der Protein-Familie."** Dissertation. Universität zu Köln
- Robinson, M. S. (2004). **"Adaptable adaptors for coated vesicles."** *Trends Cell Biol* 14(4): 167-74.
- Rotem-Yehudar, R., E. Galperin and M. Horowitz (2001). **"Association of insulin-like growth factor 1 receptor with EHD1 and SNAP29."** *J Biol Chem* 276(35): 33054-60.
- Sabharanjak, S., P. Sharma, R. G. Parton and S. Mayor (2002). **"GPI-anchored proteins are delivered to recycling endosomes via a distinct cdc42-regulated, clathrin-independent pinocytic pathway."** *Dev Cell* 2(4): 411-23.
- Sablin, E. P. and R. J. Fletterick (2001). **"Nucleotide switches in molecular motors: structural analysis of kinesins and myosins."** *Curr Opin Struct Biol* 11(6): 716-24.

- Sambrook, J., and Gething, M. J. (1989). **"Protein structure. Chaperones, paperones."** *Nature* 342, 224-225
- Saraste, M., P. R. Sibbald and A. Wittinghofer (1990). **"The P-loop--a common motif in ATP- and GTP-binding proteins."** *Trends Biochem Sci* 15(11): 430-4.
- Sauvonnet, N., A. Dujeancourt and A. Dautry-Varsat (2005). **"Cortactin and dynamin are required for the clathrin-independent endocytosis of gammac cytokine receptor."** *J Cell Biol* 168(1): 155-63.
- Schmoranzner, J., G. Kreitzer and S. M. Simon (2003). **"Migrating fibroblasts perform polarized, microtubule-dependent exocytosis towards the leading edge."** *J Cell Sci* 116(Pt 22): 4513-9.
- Schorr, M., A. Then, S. Tahirovic, N. Hug and P. Mayinger (2001). **"The phosphoinositide phosphatase Sac1p controls trafficking of the yeast Chs3p chitin synthase."** *Curr Biol* 11(18): 1421-6.
- Schumacher, B. and P. Staeheli (1998). **"Domains mediating intramolecular folding and oligomerization of MxA GTPase."** *J Biol Chem* 273(43): 28365-70.
- Shao, Y., W. Akmentin, J. J. Toledo-Aral, J. Rosenbaum, G. Valdez, J. B. Cabot, B. S. Hilbush and S. Halegoua (2002). **"Pincher, a pinocytic chaperone for nerve growth factor/TrkA signaling endosomes."** *J Cell Biol* 157(4): 679-91.
- Shupliakov, O., O. Bloom, J. S. Gustafsson, O. Kjaerulf, P. Low, N. Tomilin, V. A. Pieribone, P. Greengard and L. Brodin (2002). **"Impaired recycling of synaptic vesicles after acute perturbation of the presynaptic actin cytoskeleton."** *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(22): 14476-81.
- Siddiqi, S. A., F. S. Gorelick, J. T. Mahan and C. M. Mansbach, 2nd (2003). **"COPII proteins are required for Golgi fusion but not for endoplasmic reticulum budding of the pre-chylomicron transport vesicle."** *J Cell Sci* 116(Pt 2): 415-27.
- Sigismund, S., T. Woelk, C. Puri, E. Maspero, C. Tacchetti, P. Transidico, P. P. Di Fiore and S. Polo (2005). **"Clathrin-independent endocytosis of ubiquitinated cargos."** *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(8): 2760-5.
- Smirnova, E., D. L. Shurland, E. D. Newman-Smith, B. Pishvae and A. M. van der Blik (1999). **"A model for dynamin self-assembly based on binding between three different protein domains."** *J Biol Chem* 274(21): 14942-7.
- Smith, C. J. and B. M. Pearse (1999). **"Clathrin: anatomy of a coat protein."** *Trends Cell Biol* 9(9): 335-8.
- Smith, C. A., S. E. Dho, J. Donaldson, U. Tepass and C. J. McGlade (2004). **"The cell fate determinant numb interacts with EHD/Rme-1 family proteins and has a role in endocytic recycling."** *Mol Biol Cell* 15(8): 3698-708.
- Stephens, D. J. and R. Pepperkok (2002). **"Imaging of procollagen transport reveals COPI-dependent cargo sorting during ER-to-Golgi transport in mammalian cells."** *J Cell Sci* 115(Pt 6): 1149-60.

- Streyer, L. (1996). **"Biochemie."** 4. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag.
- Subtil, A., I. Gaidarov, K. Kobylarz, M. A. Lampson, J. H. Keen and T. E. McGraw (1999). **"Acute cholesterol depletion inhibits clathrin-coated pit budding."** *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(12): 6775-80.
- Sweitzer, S. M. and J. E. Hinshaw (1998). **"Dynamain undergoes a GTP-dependent conformational change causing vesiculation."** *Cell* 93(6): 1021-9.
- Tanabe, K., T. Torii, W. Natsume, S. Braesch-Andersen, T. Watanabe and M. Satake (2005). **"A novel GTPase-activating protein for ARF6 directly interacts with clathrin and regulates clathrin-dependent endocytosis."** *Mol Biol Cell* 16(4): 1617-28.
- Tang, B. L., Y. Wang, Y. S. Ong and W. Hong (2005). **"COPII and exit from the endoplasmic reticulum."** *Biochim Biophys Acta* 1744(3): 293-303.
- Thiele, C., M. J. Hannah, F. Fahrenholz and W. B. Huttner (2000). **"Cholesterol binds to synaptophysin and is required for biogenesis of synaptic vesicles."** *Nat Cell Biol* 2(1): 42-9.
- Thomsen, P., K. Roepstorff, M. Stahlhut and B. van Deurs (2002). **"Caveolae are highly immobile plasma membrane microdomains, which are not involved in constitutive endocytic trafficking."** *Mol Biol Cell* 13(1): 238-50.
- Toomre, D., P. Keller, J. White, J. C. Olivo and K. Simons (1999). **"Dual-color visualization of trans-Golgi network to plasma membrane traffic along microtubules in living cells."** *J Cell Sci* 112 (Pt 1): 21-33.
- Torgersen, M. L., G. Skretting, B. van Deurs and K. Sandvig (2001). **"Internalization of cholera toxin by different endocytic mechanisms."** *J Cell Sci* 114(Pt 20): 3737-47.
- Traub, L. M. (2003). **"Sorting it out: AP-2 and alternate clathrin adaptors in endocytic cargo selection."** *J Cell Biol* 163(2): 203-8.
- Tuma, P. L. and C. A. Collins (1995). **"Dynamain forms polymeric complexes in the presence of lipid vesicles. Characterization of chemically cross-linked dynamain molecules."** *J Biol Chem* 270(44): 26707-14.
- Valdez, G., W. Akmentin, P. Philippidou, R. Kuruvilla, D. D. Ginty and S. Halegoua (2005). **"Pincher-mediated macroendocytosis underlies retrograde signaling by neurotrophin receptors."** *J Neurosci* 25(21): 5236-47.
- Vallis, Y., P. Wigge, B. Marks, P. R. Evans and H. T. McMahon (1999). **"Importance of the pleckstrin homology domain of dynamain in clathrin-mediated endocytosis."** *Curr Biol* 9(5): 257-60.
- van Deurs, B., K. Roepstorff, A. M. Hommelgaard and K. Sandvig (2003). **"Caveolae: anchored, multifunctional platforms in the lipid ocean."** *Trends Cell Biol* 13(2): 92-100.
- Vetter, I. R. and A. Wittinghofer (2001). **"The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions."** *Science* 294(5545): 1299-304.

- Watson, P. and D. J. Stephens (2005). **"ER-to-Golgi transport: form and formation of vesicular and tubular carriers."** *Biochim Biophys Acta* 1744(3): 304-15.
- Wood, S. A. and W. J. Brown (1992). **"The morphology but not the function of endosomes and lysosomes is altered by brefeldin A."** *J Cell Biol* 119(2): 273-85.
- Xu, Y., H. Shi, S. Wei, S. H. Wong and W. Hong (2004). **"Mutually exclusive interactions of EHD1 with GS32 and syndapin II."** *Mol Membr Biol* 21(4): 269-77.
- Zhang, P. and J. E. Hinshaw (2001). **"Three-dimensional reconstruction of dynamin in the constricted state."** *Nat Cell Biol* 3(10): 922-6.

A. Anhang

A.1 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
aa	amino acid
ADP	Adenosindiphosphat
Anthrax-PA	<i>Anthrax protective antigen</i>
ANTH	AP180 N-terminale Homologie
AP	Adapter-Protein
Arf	<i>ADP-ribosylation factor</i>
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
BAR	<i>Bin/ Amphiphysin/ Rvs domain</i>
bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumin
C	Celsius
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CC	coiled coil
CCP	Clathrin-abhängige Carrier, <i>clathrin coated pit</i>
CCV	<i>clathrin coated vesicles</i>
CGN	cis-Golgi-Netzwerk
CLIC-D	Dynamamin-abhängige, Clathrin-unabhängige Carrier
CLIC-DI	Dynamamin-unabhängige, Clathrin-unabhängige Carrier
CLEM	<i>correlative light electron microscopy</i>
COP	<i>coat protein complex (I/II)</i>
CTB	<i>Cholera Toxin subunit B</i>
CVEM	<i>correlative video electron microscopy</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EE	Early endosomes
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGTA	Ethylenglykol-bis(β -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EH	Eps15 Homologie
EHD	<i>EH domain containig proteins</i>
EHBP1	<i>EH binding protein 1</i>
ENTH	Epsin N-terminale Homologie
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ERC	<i>endocytic recycling compartment</i>
ERGIC	ER-Golgi-Intermediär Kompartiment

FCS	<i>fetal calf serum</i>
FYVE	<i>FYVE</i>
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
GC	Golgi complex
GDF	<i>GDI displacement factor</i>
GDP	Guanosindiphosphat
GED	GTPase-Effektor-Domäne
GEF	<i>GDP/GTP exchange factor</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GGA	<i>Golgi-localized, γ-ear-containing, ARF-binding proteins</i>
GLUT4	<i>Insulin-responsive glucose transporter 4</i>
GPI	Glykosyl-Phosphatidylinositol
GPI-AP	<i>Glycosylphosphatidylinositol anchored proteins</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
HA	Hämagglutinin
HC	schwere Kette von Clathrin
HEPES	(N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure])
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
Ig	Immunglobulin(e)
IH	Immunhistochemie
IL-2	Interleukin 2
kDa	Kilodalton
LacCer	Lactosylceramid
LE	<i>late endosomes</i>
LDLR	<i>low density lipoprotein receptor</i>
Ly	<i>lysosomes</i>
MHC-1	<u><i>Major histocompatibility complex class 1</i></u>
min	Minute(n)
MVB	<i>multi vesicular bodies</i>
MW	<i>molecular weight</i>
N	Nucleus
N-BAR	BAR-Domäne mit N-terminaler amphiphatischer Helix
NPF	Asparagin-Prolin-Phenylalanin
N-WASP	neurales Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PC	L- α -phosphatidylcholin
PCI	<i>Procollagen I</i>
PE	L- α -phosphatidylethanolamin
PH	Pleckstrin Homologie

PI(3)P	L- α -phosphatidyl-D-myo-inositol 3-monophosphat
PI(4)P	L- α -phosphatidylinositol 4-monophosphat
PI(3,4)P ₂	,2-dipalmitoylphosphatidylinositol 3,4-diphosphat
PI(3,5)P ₂	L- α -phosphatidyl-D-myo-inositol 3,5-diphosphat
PI(4,5)P ₂	L- α -phosphatidylinositol 4,5-diphosphat
PI(3,4,5)P ₃	1,2-dipalmitoylphosphatidylinositol 3,4,5-triphosphat
PKC γ , α	Protein Kinase C
PRD	<i>proline rich domain</i>
PS	L- α -phosphatidyl-L-serin
PVDF	Polyvinylidendifluorid
PX	Phox Domäne
RT	Raumtemperatur
RZPD	Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SH3	Src Homologie 3
SV40	<i>semian virus 40</i>
Tab.	Tabelle
TBS	Tris buffered saline
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGN	trans-Golgi-Netzwerk
U	unit (Einheit)
u.a.	unter anderem
VSV-G	<i>vesicular stomatitis virus-G-protein</i>
wt	Wildtyp
ZMMK	Zentrum für molekulare Medizin Köln

A.2 Primer und Oligonukleotide

Sequenzierungsprimer

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

PCR-Primer für Deletionsmutanten und eukaryotische Expressionsvektoren

Primer	Sequenz
EHD1-ATG-s	5'-CT TCG AAT TCT ATG TTC AGC TGG GTG AGC AAG-3'
EHD1 Δ 1-56s	5'-CCG GAA TTC CCG AAG CCG ATG TGT CTC CTG-3'
EHD1 Δ 1-222s	5'-CCG GAA TTC CCG CAG ATC GAG ACG CAG CAG-3'
EHD1 Δ EHXhoas	5'-TAT ACT CGA GTT ACT CAA CAT CAT CAA TGC CCT C-3'
EHD1-Stop-as	5'-TAA CTC GAG TCA CTC GTG CCT CCG TTT GG-3'
EHD2-ATG-s	5'-AAT ATT GTC GAC ATG TCA CTG CTG AGA AGG-3'
EHD2-DEH-as	5'-AAT TAC TCG AGT TAG GCA TCA TCT TCT GAG CCC TCC-3'
EHD3-ATG-s	5'-CCT CTT GAA TTC CGA TGT TCA GCT GGC TGG GTA CGG-3'
EHD3- Δ EH-as	5'-ATT ATT GTC GAC GCT TAA GCA TCA TCG ATA CCT CTC C-3'
EHD4Eco-ds-s	5'-CTT CGA ATT CTA TGT TCA GCT GGA TGG GG-3'
EHD4Sal-ds-as	5'-GAC GGT TTC CGA CTG ACT CGT CAG CTG CCA TG-3'
NTred-s	5'-GGG TCT AGA TTA CAG GAA CAG GTG GTG GCG GC-3'
NTred-as	5'-CCG CTC GAG ATG GCC TCC TCC GAG AAC GTC-3'
redEHD4-s	5'-CTC GAA TTC GCC GCC ATG TTC AGC TGG ATG GGG-3'
redEHD4wtas	5'-CTG CTC GAG GTC AGC CTT TGG CAG GGA CTT C-3'
redEHD4 Δ EHas	5'-CTG CTC GAG TTC CTC ATC GGC CCC CTC CTT G-3'

PCR-Primer für Punkt-Mutationen

Primer	Sequenz
EHD2-T72Ns	5'-GTA TAG CAG CGG CAA GAA TTC CTT CAT CCA GTA CC-3'
EHD2-T72Nas	5'-GGT ACT GGA TGA AGG AAT TCT TGC CGG TGC TAT AC-3'
EHD3-T72Ns	5'-CAC TGG GAA GAA CAC CTT CAT C-3'
EHD3-T72Nas	5'-GAT GAA GGT GTT CTT CCC AGT G-3'

A.3 Vektoren und Konstrukte

Klonierungsvektoren

- pBluescript KS (Stratagene)
- pBluescript SK(-) (Stratagene)
- pSVSport1 (Invitrogen)
- pCRII (Invitrogen)

Expressionsvektoren

- pcDNA3 (Invitrogen) (mit eingefügter HA-Sequenz)

Nach der KpnI-Schnittstelle des Polylinkers wurde folgende Sequenz eingefügt

```
5' - GCC ACC ATG GCT TAC CCA TAC GAT GTT CCA GAT TAC GCT - 3'
3' - CGG TGG TAC CGA ATG GGT ATG CTA CAA GGT CTA ATG CGA - 5'
```

- pHA-CMV (Clontech)
- pDsRed2-C1 (Clontech)
- pcDNA3 (Invitrogen) (mit eingefügter C-terminaler DsRed-Sequenz)
Zwischen den Schnittstellen XhoI und Xba wurde die aus dem pDsRed2-C1 Vektor amplifizierte DsRed-Sequenz eingefügt
- pGEX-4T1, -3X, -6P1, -6P2, -6P3 (Amersham Biosciences)

GFP-Konstrukte

p75-GFP: Die cDNA von Neurotrophin Rezeptor p75 mit N-terminalem GFP-*tag* kloniert in pEGFP-N1 Vektor wurde freundlicherweise von E. Rodriguez-Boulan (Cornell, New York, USA) zur Verfügung gestellt.

VSV-G-GFP: Die cDNA von vesicular stomatitis virus-G-protein mit C-terminalem GFP-*tag* kloniert in den pEGFP-C1 Vektor wurde freundlicherweise von Jennifer Lippencott-Schwartz (NIH, Bethesda, USA) zur Verfügung gestellt.

LDLR Y18A-GFP: Die cDNA des *recycling*-defekten humanem LDLR Y18A-Konstruktes kloniert in den pRK5-Vektor mit C-terminalem GFP-*tag* wurde freundlicherweise von Jan Schmoranz (Columbia University, New York, USA) zur Verfügung gestellt.

LDLR wt-GFP: Die cDNA von humanem LDLR kloniert in den pRK5-Vektor mit C-terminalem GFP-*tag* wurde freundlicherweise von Ira Mellman (Yale University School of Medicine, New Haven, USA) zur Verfügung gestellt.

GPI-Linker-GFP: Die cDNA des Glykosylphosphatidylinositol-Anker kloniert in den pEGFP-C1 Vektor wurde freundlicherweise von Jennifer Lippencott-Schwartz (NIH, Bethesda, USA) zur Verfügung gestellt.

Sec13-GFP: Die cDNA für humanes Sec13 kloniert in den pcDNA Vektor mit C-terminalem GFP-*tag* wurde freundlicherweise von Benjamin Glick (University of Chicago, Chicago, USA) zur Verfügung gestellt.

PCI-GFP: Die cDNA von humanem ProcollagenI (alpha 2 chain) kloniert in den pEGFP-C3 Vektor wurde freundlicherweise von Alberto Luini (Consorzio Mario Negri Sud, S. Maria Imbaro, Italien) zur Verfügung gestellt.

A.4 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Mats Paulsson danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit in seinem Institut bei guter Betreuung und unter hervorragenden Arbeitsbedingungen durchführen zu können. Deine vielen guten Ratschläge im Freitagseminar haben mir geholfen, wie "ein echter Biochemiker zu denken"!

Herrn Prof. Dr. Klein möchte ich für die bereitwillige Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit und Herrn Prof. Dr. Dohmen für die spontane Übernahme des Prüfungsvorsitzes der Disputation danken. Gerrit Praefcke danke ich für die wirklich kurzfristige Bereiterklärung als Beisitzer in der Prüfung zu wirken.

Dr. Markus Plomann danke ich für die Bereitstellung dieses Themas und eine sehr gute Betreuung in seiner Arbeitsgruppe. Vielen Dank auch für die stetige, schnelle "Organisation" diverser GFP-Konstrukte.

Ein besonderer Dank gilt auch der Arbeitsgruppe von Harvey T. McMahon (MRC, Cambridge, UK), die mir die Techniken zur Untersuchung der Lipidbindung von Proteinen beigebracht haben. Brian Peter danke ich für die EM-Grids und seine fröhliche Betreuung während meines Aufenthaltes in Cambridge. Oliver Daumke danke ich für die guten Diskussionen über die Funktion der EHDs und die Bestätigung, daß nicht nur ich Probleme mit der Aufreinigung der EHDs hatte! Danke auch für die Erlaubnis, Daten der Kristallisation verwenden zu können.

Der grösste Dank gilt meiner Arbeitsgruppe: dem "*Fels in der Brandung*"-Mille, danke für alle sehr kompetenten Ratschläge im Bereich Computer, Mathematik, Statistik und DNA-Sequenzanalysen. Danke für "*Et hät noch imer jot jejang*" und "*Et küt, wi et küt*", für die viele gute Musik, den Spaß und die Gespräche; der "*Pechmarie*" Yeliz, hoffentlich wirst Du von nun an immer nur noch Glück haben, denn Du hast es Dir verdient! Auch Dir danke für all die guten Gespräche; den "*Zwischendurch*"-Diplomanden: Eva, *Weltenbummler*-Stefan, Sascha, Sabsi, Sylvie und *Geschichten*-Philipp danke ich für den neuen Enthusiasmus und besonders Sabsi dafür, daß sie zu meiner EHD-Leidensgenossin geworden ist. Barbara danke ich für ihre

Ausgeglichenheit, Fröhlichkeit und Anwesenheit auch schon in den frühen Morgenstunden.

Was wäre nur das Freitagseminar ohne die Anwesenheit der *Schmitzens*? Danke Susan für alles innerhalb und noch viel mehr für alles außerhalb des Instituts, Du bist und bleibst die Beste! Kerstin und Sebastian, danke für die Ablenkungen beim Mittagessen, besonders Sebastian danke für die manchmal seltsamen Beiträge, wie das "*Rosa Spaghettimonster*"! Lars, Matthew, Christian und Exil-Arndt danke für alle gemeinsamen Unternehmungen unserer Arbeitsgruppen!

Bei dem Rest der *Instituts'ler* möchte ich mich für das allgemeine Klima und die Stimmung im Institut bedanken. Beeker, danke für die vielen Besuche und die Hilfe beim EM.

Nevres und Colomba, danke für die ca. 1000 Liter LB-Medium und die ca. 500 gespülten und autoklavierten Kolben, die ich während meiner Arbeit brauchte!

Gerda, danke für die tatkräftige Unterstützung bei allen "kleinen" Dingen!

Zuletzt möchte ich meiner Familie danken, die mich mental, geistig und auch finanziell während meiner gesamten Ausbildung unterstützt hat. Danke Soraya, für die "*sonnige*" Seite des Lebens!

Danke Marcel für die "*mögliche Alternative*" und einfach ALLES in der Vergangenheit und in der Zukunft (Jack Johnson (2005) "**In between dreams**", *UMG Recordings INC*: Lied 1; Red Hot Chilli Peppers (2006) "**Stadium Acadium, Mars**", *Warner Bros. Records INC*: Lied 3).

A.5 Teilpublikationen

Zeitschriftenbeiträge: Blume, J., Halbach, A., Behrendt, D., Paulsson, M. und Plomann, M. (2006?) **"EHD proteins are associated with tubular and vesicular compartments and interact with specific phospholipids"** *Exp Cell Res*, im review-Prozess

Poster: Blume, J., Plomann, M. (Dezember 2005) **"Role of EHD proteins in the secretory pathway"** *45th Annual Meeting of the American Society For Cell Biology*, San Francisco, USA

Blume, J., Ritter, B., Halbach, A., Plomann, M. (Oktober 2004) **"Characterization of the EHD proteins: A transport-tubule forming G-protein family"** *EURESCO-Conference: Frontiers of Cellular Microbiology and Cell Biology "Spatial and Temporal Dynamics of the Endomembrane System"*, San Feliu de Guixols, Spanien

Blume, J., Milbrandt, M., Plomann, M. (Oktober 2004) **"Regulation of receptor transport by PACSIN 2 and EHD4"** *Protein and Membrane Transport in the Secretory Pathway*, Göttingen, Deutschland

Blume, J., Ritter, B., Halbach, A., Plomann, M. (März 2003) **"Characterization of the PAST/EHD proteins, a G-protein family participating in clathrin-coat assembly"** *jährl. Tagung der DGZ*, Bonn, Deutschland

Blume, J., Ritter, B., Halbach, A., Plomann, M. (Dezember 2002) **"PACSINs interact with PAST/EHD proteins, a G-protein family participating in clathrin-coat assembly"** *Protein and Membrane Transport in the Secretory Pathway*, Göttingen, Deutschland

A.6 Erklärung

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

Köln, d.

Jessica Blume

A.7 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Jessica Blume
Geburtsdatum/-Ort	14.08.1977 in Georgsmarienhütte
Familienstand	ledig

Schulbildung

August 1983 – Juli 1987	Grundschule der Grund- und Hauptschule in Hunteburg
August 1987 – Juli 1989	Orientierungsstufe in Bohmte
August 1989 – Oktober 1992	Gymnasium in Damme
Oktober 1992 – Juli 1994	Realschule in Bohmte
August 1994 – Juli 1997	Gymnasium in Damme

Hochschulbildung

Oktober 1997 – März 2000	Studium der Diplom-Biologie, Universität Osnabrück
Oktober 1999	Vordiplom der Biologie
April 2000 – August 2002	Studium der Diplom-Biologie, Universität zu Köln
Januar 2002 – Oktober 2002	Diplomarbeit am Zentrum für Biochemie der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln bei Prof. Dr. Mats Paulsson, Thema: "Klonierung der EHD-Isoformen 2 und 3 und funktionale Charakterisierung der Proteinfamilie"
Oktober 2002	Diplom der Biologie

Doktorarbeit

Oktober 2002 - dato	Promotion an der Mathematisch- Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln im Fach "Physiologische Chemie" am Zentrum für Biochemie der Medizinischen Fakultät bei Prof. Dr. Mats Paulsson
---------------------	---