

**Funktionelle Regulation des  
Clathrin Adaptor Komplexes 2 (AP2)**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur

Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität zu Köln



vorgelegt von  
Thomas Gaffry  
aus Leverkusen

Berichtersteller: Prof. Dr. Stefan Höning  
(Gutachter)

Prof. Dr. Jürgen Dohmen

Tag der mündlichen Prüfung: 12.10.2010



<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
---------------------------------	----------

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>VI</b>
------------------------------------	-----------

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
----------------------------	----------

1.1. Vesikulärer Transport.....	1
1.2. Clathrin umhüllte Vesikel.....	3
1.2.1. Clathrin.....	3
1.2.2. Clathrin-Adaptoren .....	4
1.2.3. Monomere Adaptoren .....	6
1.2.4. Heterotetramere Adaptorkomplexe (APs) .....	7
1.3. AP2 .....	10
1.3.1. Bindung von AP2 an Clathrin .....	12
1.3.2. Bindung von AP2 an akzessorische Proteine .....	12
1.3.3. Bindung von AP2 an die Plasmamembran.....	14
1.3.4. Erkennung von Sortierungsmotiven durch AP2 .....	15
1.3.5. Phosphorylierung von AP2.....	18
1.4. Einführung in die funktionelle Regulation von AP2 .....	22
1.5. Zielsetzung / Fragestellung .....	24

<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>25</b>
---------------------------------------	-----------

2.1. Materialien .....	25
2.1.1. Geräte .....	25
2.1.2. Verbrauchsmaterialien .....	27
2.1.3. Chemikalien .....	28
2.1.4. Molekularbiologische Materialien .....	30
2.1.4.1. Reagenzien und Fertiglösungen .....	30
2.1.4.2. Antibiotika .....	30
2.1.4.3. Bakterien.....	31
2.1.4.4. Enzyme .....	31
2.1.4.5. Kits .....	31
2.1.4.6. Nukleotide/ Oligonukleotide .....	32

2.1.4.7. Plasmide .....	34
2.1.4.8. AP2-Mutanten .....	35
2.1.5. Biochemische Materialien .....	36
2.1.5.1. Säulen.....	36
2.1.5.2. Reagenzien und Fertiglösungen .....	36
2.1.5.3. Standard-Puffer.....	36
2.1.5.4. Radioaktive Substanzen .....	37
2.1.5.5. Lipide .....	37
2.1.5.6. Peptide.....	37
2.1.5.7. Proteine .....	38
2.1.6. Antikörper.....	39
2.1.7. Zellbiologische Materialien .....	41
2.1.7.1. Reagenzien und Fertiglösungen .....	41
2.1.7.2. Medien und Zusätze .....	41
2.1.7.3. Zelllinien.....	41
2.1.8. EDV.....	42
2.2. Molekularbiologische Methoden.....	42
2.2.1. Kultivierung von <i>E. coli</i> .....	42
2.2.2. Herstellung kompetenter Zellen .....	43
2.2.3. Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid DNA .....	44
2.2.4. Isolierung von Plasmid DNA aus <i>E. coli</i> .....	45
2.2.5. Anlegen einer Glycerinkultur .....	45
2.2.6. Konzentrationsbestimmung von DNA .....	46
2.2.7. Agarosegelelektrophorese .....	46
2.2.8. DNA Extraktion aus Agarosegelen.....	47
2.2.9. Hydrolyse von DNA mit Restriktionsenzymen .....	47
2.2.10. Hybridisierung von Oligonukleotiden.....	47
2.2.11. Ligation von DNA-Fragmenten.....	48
2.2.12. Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	49
2.2.13. Gezielte Mutagenese .....	50
2.2.14. Gewinnung von RNA und m-RNA aus <i>HeLa</i> -Zellen.....	51
2.2.15. Reverse Transkription .....	51
2.2.16. Reinigung von DNA-Fragmenten .....	51
2.2.17. DNA Sequenzierung .....	51

2.3. Biochemische Methoden.....	52
2.3.1. Aufschluss von Zellen bzw. Gewebe.....	52
2.3.2. Bestimmung der Proteinkonzentration .....	53
2.3.3. Fällung von Proteinen .....	54
2.3.4. SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	54
2.3.5. Harnstoff-SDS-PAGE.....	56
2.3.6. Coomassiefärbung von Proteinen.....	57
2.3.7. Western-Blot und Immundetektion.....	58
2.3.8. Ponceaufärbung von Proteinen.....	58
2.3.9. Immunpräzipitation.....	59
2.3.10. Präparation von AP1 und AP2 aus Schweinehirn .....	59
2.3.11. Erhöhung der Konzentration von Proteinlösungen.....	63
2.3.12. Dialyse .....	63
2.3.13. Expression und Reinigung von 6xHis-Arf6-GDP und 6xHis-Arf6-GTP63	
2.3.14. Expression und Reinigung von GST-VHS, GST-VHS-GAT und GST- GAT-Domänen.....	65
2.3.15. Phosphorylierung von AP2.....	66
2.3.16. Verdau von AP2.....	67
2.3.17. Massenspektrometrie.....	68
2.3.18. Liposomenpräparation .....	68
2.3.19. Kopplung von Peptiden an MPB-PE .....	70
2.3.20. Messung von Proteininteraktionen am Biacore Biosensor (SPR) .....	71
2.3.21. Kinetik und Auswertung von Biacore Daten .....	75
2.4. Zellbiologische Methoden .....	76
2.4.1. Kultivierung von Zellen.....	76
2.4.2. Einfrieren von Zellen .....	76
2.4.3. Revitalisieren von Zellen .....	77
2.4.4. Bestimmung der Zellzahl.....	77
2.4.5. Transfektion mit Plasmid DNA .....	77
2.4.6. Transfektion mit RNA Oligonukleotiden .....	78
2.4.7. Immunfluoreszenz.....	79

<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>81</b>
3.1. Die Struktur von AP2 in Dileucin-gebundener Form .....	81
3.2. Die Struktur von AP2 in Dileucin- und Tyrosin-gebundener Form.....	82
3.3. Funktionelle Untersuchung der Membran- und Signalbindung von AP2 .....	86
3.3.1. Biacore-basierter <i>in vitro</i> Assay.....	87
3.3.2. Auswahl der Liposomen.....	87
3.3.3. Reinheit der rekombinanten AP2-Komplexe .....	87
3.3.4. Bindung von AP2 an Ptlns(4,5)P <sub>2</sub> .....	88
3.3.4.1. AP2 bindet an Sortierungssignale nur in Anwesenheit von Ptlns(4,5)P <sub>2</sub> .....	88
3.3.4.2. Charakterisierung der Ptlns(4,5)P <sub>2</sub> -Bindungsstellen in AP2 .....	90
3.3.5. Signalbindung von AP2.....	93
3.3.5.1. Die offene Konformation von AP2 wird durch die Bindung von Sortierungssignalen stabilisiert .....	93
3.3.5.2. AP2-Bindung an kombinierte Signalsequenzen .....	95
3.3.5.3. AP2 kann <i>in vitro</i> YxxΦ- und [ED]xxxL[LI]-Signale einer einzigen Polypeptidkette binden.....	96
3.3.6. Relevanz der geschlossenen Konformation von AP2 .....	99
3.4. Die Regulation des AP2-Komplexes kann durch weitere Faktoren moduliert werden .....	101
3.4.1. Generation verschiedener α- und β2-Konstrukte zur Expression in eukaryotischen Zellen .....	102
3.4.1.1. Expression rekombinanter AP2 α- und β2-Untereinheiten.....	103
3.4.1.2. Die rekombinanten Untereinheiten werden in den endogenen AP2-Komplex eingebaut .....	105
3.5. Die α-Ear-Domäne bindet an den AP2-Core.....	107
3.6. Die β2-Ear-Domäne bindet nicht an den AP2-Core .....	110
3.7. Der AP2-Komplex wird durch Phosphorylierung reguliert .....	113
3.7.1. Phosphorylierungsstatus von AP2 in Zellen und CCVs.....	113
3.7.2. Limitierte Proteolyse als Ausgangspunkt für die Eingrenzung der Phosphorylierungsstellen in α- und β2-Adaptin.....	115
3.7.3. Limitierte Proteolyse von AP2 .....	116

3.7.4. Phosphorylierungsmuster von AP2-Untereinheiten nach limitierten tryptischen Verdau .....	117
3.7.5. Validierung der $\alpha$ -Adaptin Phosphorylierung.....	119
3.7.6. Validierung der $\beta$ 2-Adaptin Phosphorylierung .....	120
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>123</b>
4.1. AP2-Membran- und Signalbindung .....	123
4.1.1. Die offene Konformation wird durch die Phosphorylierung in $\mu$ 2 stabilisiert und damit die Bindung an Yxx $\Phi$ -Signale erhöht.....	124
4.1.2. Problem der räumlichen Anordnung von Sortierungssignalen .....	126
4.1.3. Die Bedeutung der geschlossenen und offenen Konformation von AP2 .....	128
4.2. Einfluss von Arf6 auf die Membranbindung von AP2 .....	128
4.3. Expression rekombinanter AP2-Untereinheiten in Zellkultur .....	130
4.4. Die $\alpha$ -Ear-Domäne, aber nicht die $\beta$ 2-Ear-Domäne bindet an den AP2-Core .....	131
4.5. Nachweis von Phosphorylierungsstellen in $\alpha$ - und $\beta$ 2-Adaptin .....	134
4.5.1. $\alpha$ - und $\beta$ 2-Adaptin werden in den Hinge/Ear-Bereichen phosphoryliert .....	135
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>139</b>
<b>6. Summary .....</b>	<b>140</b>
<b>7. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>141</b>
<b>Erklärung.....</b>	<b>150</b>
<b>Lebenslauf.....</b>	<b>151</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>152</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Å	Angström
AAK	Adaptor-assoziierte Kinase
Abb.	Abbildung
A. bidest	Aqua bidestillata
ADP	Adenosindiphosphat
AP1/2/3/4	Heterotetramerer Adaptorprotein-Komplex 1/2/3/4
AP-180	Adaptor-Protein 180
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARF	ADP-Ribosylierungsfaktor
AS	Aminosäure
AT1R	Angiotensin-2-Typ-1-Rezeptors
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	( <i>bovine serum albumin</i> ) Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
CCV	<i>Clathrin-coated vesicle</i>
CD-MPR	<i>Cation-dependent mannose-6-phosphate receptor</i>
cDNA	Komplementäre DNA
CHC	<i>Clathrin heavy chain</i>
CLC	<i>Clathrin light chain</i>
CVAK104	<i>Clathrin-coated-vesicle-associated kinase, 104 kDa</i>
Da	Dalton
DMPC	Dimyristoylphosphatidylcholin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethyl-amino-propyl)-carbodiimid- hydrochlorid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDV	Elektronische Datenverarbeitung
EE	<i>Early endosome</i>

# Abkürzungsverzeichnis

---

EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
<i>et. al.</i>	<i>(et altera)</i> und andere
FCS	<i>fetal calf serum</i>
g	<i>(gravity)</i> Erdbeschleunigung
GAP	<i>GTPase activating protein</i>
GDI	<i>GDP dissociation inhibitor</i>
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	<i>GTP exchange factor</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GGA	<i>Golgi-localized, -γ-ear-containing, -ARF-binding protein</i>
GPCR	<i>G-Protein coupled receptor</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
IF	Immunfluoreszenz
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
KD	<i>knock-down</i>
K <sub>D</sub>	Dissoziationsgleichgewichtskonstante
kDa	Kilodalton
LAMP	<i>Lysosomal associated membrane protein</i>
LB	Luria Bertani Bakterien-Medium
LE	<i>Late Endosome</i>
LUV	<i>large unilamellar vesicles</i>
m	Milli (10 <sup>-3</sup> )
M	Molar (mol/l)
Min	Minute
MLV	<i>large multilamellar vesicles</i>
MPR	Mannose-6-Phosphat-Rezeptor
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MVB	<i>multivesicular bodies</i>
n	Nano (10 <sup>-9</sup> )

# Abkürzungsverzeichnis

---

NHS	N-Hydroxysuccinimid
Ni-NTA	Nickel-Nitril-Tri-Essigsäure
OD	Optische Dichte
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PC	Phosphatidylcholin
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PE	Phosphatidylethanolamin
PM	Plasmamembran
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNS	<i>Post nuclear supernatant</i>
PtdIns(3)P <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol(3)phosphat
PtdIns(4)P <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol(4) phosphat
PtdIns(3,5)P <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol(3,5)bisphosphat
PtdIns(4,5)P <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol(4,5)bisphosphat
PtdIns(3,4,5)P <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol(3,4,5)triphosphat
Rab	<i>Ras-like protein from rat brain</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
RU	Resonanzeinheiten
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SPR	<i>Surface Plasmon Resonance</i>
SUV	<i>Small Unilamellar Vesicles</i>
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	Thermophilus aquaticus
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Tfn	Transferrin
TfnR	Transferrinrezeptor
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u.a.	unter anderem

# Abkürzungsverzeichnis

---

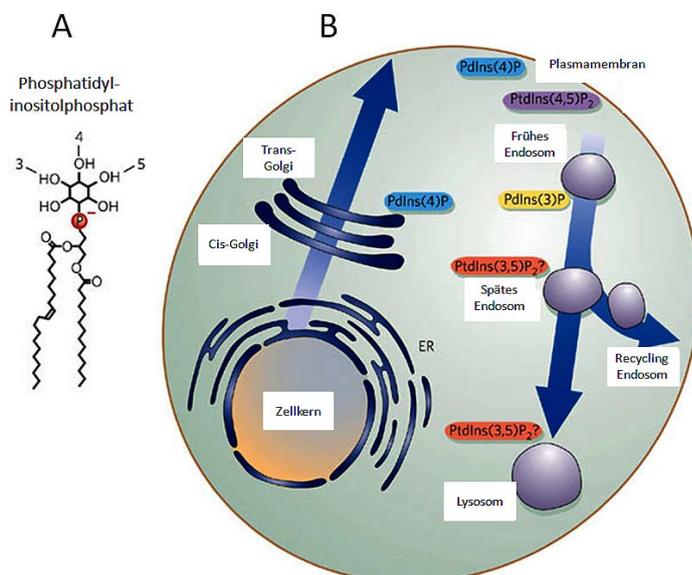
U	<i>Units</i>
μ	mikro ( $10^{-6}$ )
UV	Ultraviolett
ü.N.	über Nacht
VHS	Vps27p, Hrs und STAM Domäne
UTR	<i>Untranslated Region</i>
z.B.	zum Beispiel

## 1. Einleitung

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die funktionelle Regulation des Clathrin Adaptor Komplexes 2 (AP2), einem Proteinkomplex, welcher bei der Endozytose durch Clathrin-umhüllte Vesikel (CCVs) von der Plasmamembran in das Zellinnere eine zentrale Rolle spielt.

### 1.1. Vesikulärer Transport

Der vesikuläre Transport ist eine Möglichkeit, Membranproteine, Lipide und luminalen Moleküle zwischen Kompartimenten auszutauschen. Im Transportgeschehen einer tierischen Zelle kann vereinfacht zwischen zwei wesentlichen Richtungen unterschieden werden: dem „Biosyntheseweg“, den die meisten cytosolischen Proteine und viele Membranproteine nach ihrer Synthese am rauen ER nehmen und der weiter über den Golgi-Apparat zur Zelloberfläche führt und zum anderen dem Endozytoseweg, über den Material über die Plasmamembran aufgenommen und in Richtung der Lysosomen weiter transportiert wird (Abb.1.1.). Darüber hinaus verfügen Zellen über ein weit verzweigtes Netzwerk zusätzlicher Transportrouten, die Endozytose- und Biosynthesewege miteinander verbinden (Owen, 2004). Die einzelnen Kompartimente unterscheiden sich in ihrer Protein- und Membranlipidzusammensetzung, die einem ständigen Umbau unterliegt. So werden z.B. Phosphatidylinositolphosphate durch spezifische Kinasen und Phosphatasen, beim vesikulären Transport zwischen den einzelnen Subkompartimenten umgebaut.

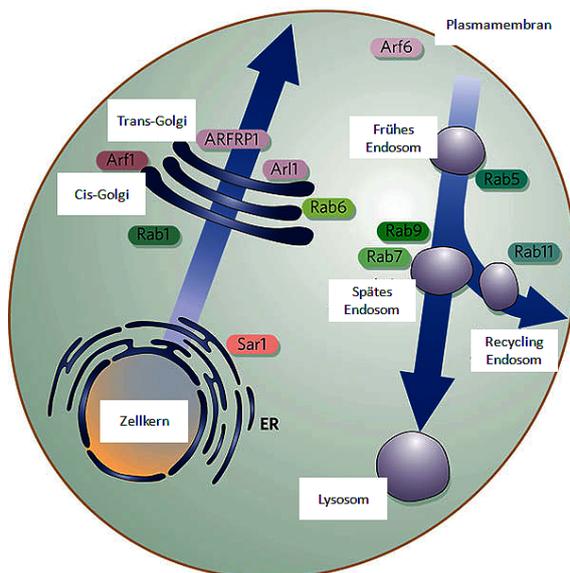


**Abb.1.1.: Struktur und Verteilung verschiedener Phosphatidylinositolphosphate im Endomembransystem.**

**A:** Phosphatidylinositolphosphate entstehen durch die Phosphorylierung von Phosphatidylinositol an Position 3, 4 oder 5. Alle 7 möglichen Kombinationen existieren *in vivo*. **B:** Intrazelluläre Verteilung verschiedener Phosphatidylinositol-phosphate in einer eukaryotischen Zelle. (abgewandelt nach Behnia and Munro, 2005)

Die Konzentration der Phosphatidylinositolphosphate im Endomembransystem ist also räumlich und zeitlich reguliert (Abb.1.1.).

Nicht nur die Membranlipid-, sondern auch die Proteinzusammensetzung des Endomembransystems unterliegt einem ständigen Umbau. Einige dieser Membranproteine, wie z.B. die kleinen GTPasen aus der Rab- und Arf-Familie, spielen eine Rolle bei der intrazellulären Vesikelsortierung und können den einzelnen Organellen des Endomembransystems zugeordnet werden (Zerial and McBride, 2001) (Abb.1.2.). Die Regulation dieser GTPasen erfolgt durch GEFs (*GTP exchange factors*) und GAPs (*GTPase activating proteins*). Das an der Plasmamembran lokalisierte kleine G-Protein ARF6 (*ADP-ribosylation factor 6*) ist ein diskutierter Rekrutierungsfaktor für den AP2-Komplex (Donaldson, 2003). So konnte gezeigt werden, dass ARF6 über eine Aktivierung der PI4P-5-Kinase die PtdIns(4,5)<sub>2</sub>-Konzentration beeinflusst und damit indirekt Einfluss auf die Rekrutierung endozytotischer Proteine hat (Zheng and Bobich, 2004). Auch wurde eine Rekrutierung von AP2 durch direkte Interaktion mit ARF6-GTP beschrieben (Paleotti et al., 2005), allerdings konnte eine ARF6- Bindungsstelle in AP2 bisher nicht identifiziert werden.



**Abb.1.2.: Beispiele der Lokalisation kleiner Arf- und Rab-GTPasen.** Stark vereinfachtes Schema einer eukaryotischen Zelle mit den wesentlichen Organellen im Biosynthese- und Endozytoseweg sowie der kompartiment-spezifischen Lokalisation ausgewählter Arf- (in pink) und Rab-GTPasen (in grün) (abgewandelt nach Behnia and Munro, 2005).

Bei der Regulation des Transports zwischen den Kompartimenten des Endomembransystems übernehmen auch cytosolische Proteine eine wesentliche Rolle. Sie interagieren mit der Ursprungsmembran, erkennen und binden spezifisch die zu sortierenden Moleküle und leiten die Einstülpung der Membran und die Abschnürung des Vesikels ein. Viele der Vesikel erhalten so durch

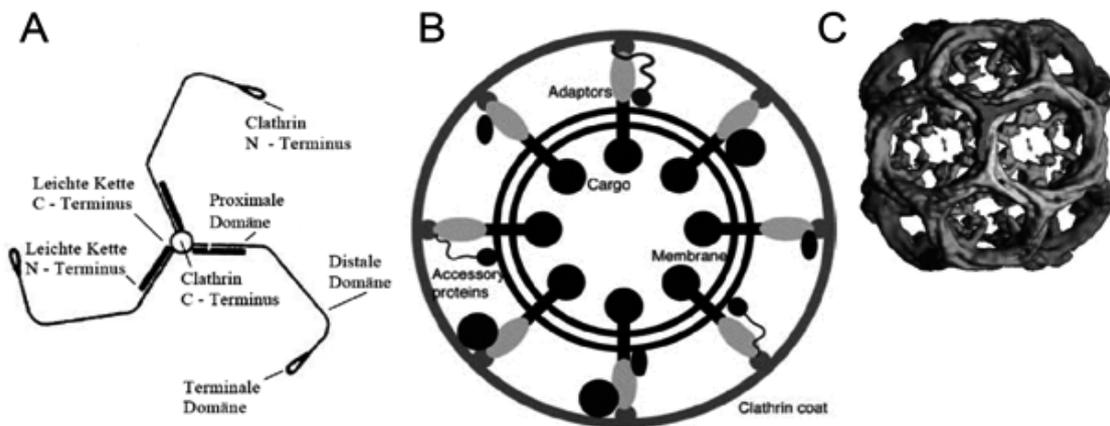
Proteinanlagerung eine spezifische Hülle und werden daher als umhüllte Vesikel (*coated vesicles*) bezeichnet. Zellen besitzen verschiedene Typen umhüllter Vesikel, die für Transportrouten zwischen einzelnen Organellen des Endomembransystems spezifisch sind. Dazu zählen COPI- und COPII-Vesikel, die den antero- und retrograden Transport zwischen Endoplasmatisches Retikulum (ER) und Golgi-Komplex vermitteln (Kirchhausen, 2000a; McMahon and Mills, 2004). Eine weitere Gruppe sind die mit dem Protein Clathrin umhüllten Vesikel (*clathrin coated vesicles* oder CCVs), deren Biogenese und Funktion am besten charakterisiert ist.

## 1.2. Clathrin umhüllte Vesikel

1975 gelang es Barbara Pearse mittels Dichtegradientenzentrifugation umhüllte Vesikel aus Schweinehirn zu isolieren, deren Hüllprotein sie 1976 charakterisierte und Clathrin nannte (Pearse, 1975, 1976).

### 1.2.1. Clathrin

Jedes Clathrinmolekül besteht aus 3 schweren Ketten mit einem Molekulargewicht von 192kDa und drei leichten Ketten von ~30kDa (Ungewickell and Branton, 1981). Die 6 Ketten bilden zusammen ein dreibeiniges Hexamer, das sogenannte Triskelion, (Abb.1.3.A) in dessen Zentrum die schweren Ketten mit ihren C-terminalen Anteilen zu liegen kommen. Dieser Bereich bildet die proximale Domäne, nach außen hin folgen die distalen- und terminalen Anteile. Die leichten Ketten assoziieren mit den schweren Ketten im Bereich der proximalen Domäne. Durch die Zusammenlagerung von ~60 Clathrinmolekülen, die sich zu Pentagonen, Hexagonen und Heptagonen um das Vesikel anordnen (Cheng et al., 2007), entsteht der für Clathrin-umhüllte Vesikel typische Clathrinmantel mit einem Durchmesser von etwa 100nm. Clathrin selbst bindet nicht an Membranen. Die Rekrutierung und Polymerisierung des Clathringerüsts wird durch Adaptorproteine unterstützt, welche simultan an Clathrin, Membranlipide und/oder Transportproteine binden (Abb.1.3.B). Unter schwach sauren Bedingungen (pH ~ 6,0-6,5) und begünstigt durch die Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ - oder  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen können die Clathrintriskelien *in vitro* spontan zu polyedrischen, geschlossenen Strukturen, den Clathrinkäfigen polymerisieren (Abb.1.3.C) (Crowther and Pearse, 1981). Diese Polymerisation kann ebenfalls, allein durch die Zugabe von AP2-Komplexen, *in vitro* induziert werden (Kirchhausen and Harrison, 1981).

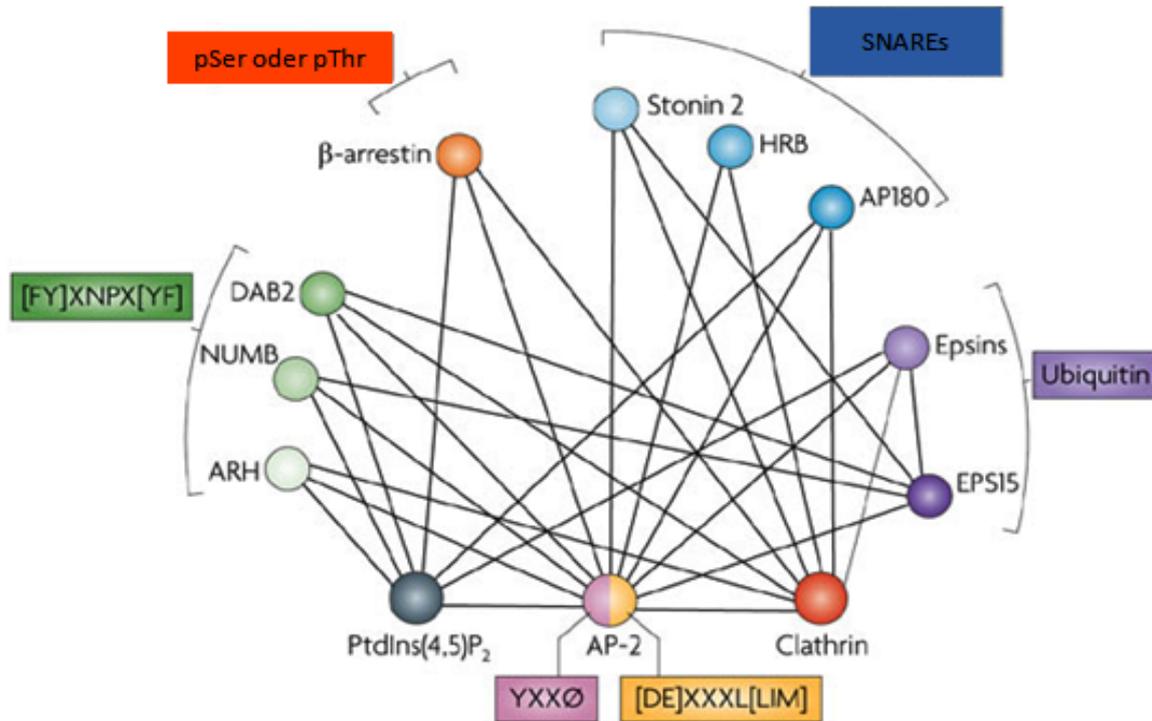


**Abb.1.3.: Struktur eines Clathrin-Triskelions, Aufbau eines Clathrin-umhüllten Vesikels und eines Clathrinkäfigs.** **A:** Segmentierung des Clathrin-Triskelions aus 3 schweren und 3 leichten Ketten (modifiziert nach Musacchio et al., 1999). **B:** Schematische Darstellung des Querschnitts eines CCVs mit Adaptorproteinen als Bindeglied zwischen Membran und Clathrinhülle. **C:** 3-dimensionale Rekonstruktion eines Clathrinkäfiges aus Hexagonen (entnommen aus Kirchhausen, 2000b).

## 1.2.2. Clathrin-Adaptoren

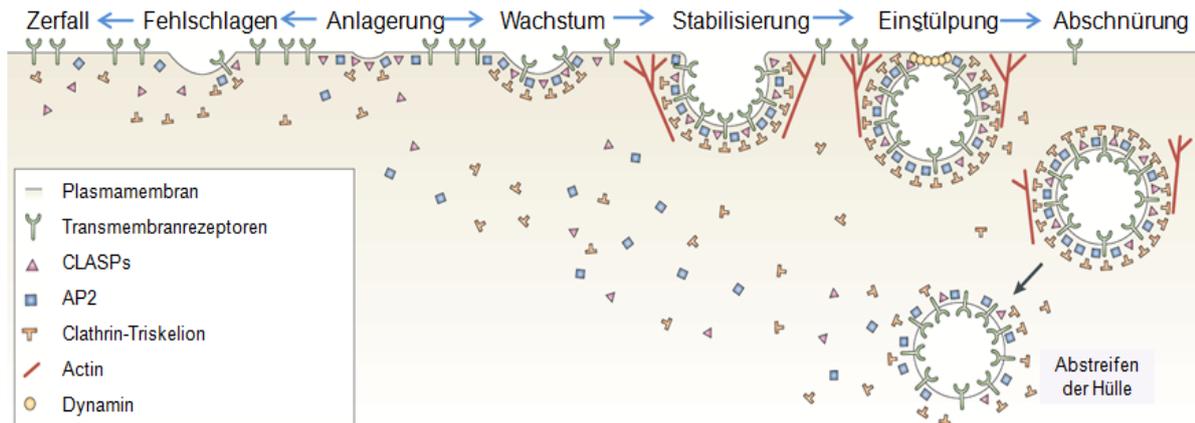
Clathrin-Adaptoren sind essentielle Faktoren im vesikulären Transport durch Clathrin-umhüllte Vesikel. Unter anderem binden sie zelluläre Membranen und Transportmoleküle und fördern die Clathrin-Assemblierung (Abb.1.3.B). Meist vermittelt eine Strukturdomäne (ANTH-, ENTH- oder BAR-Domäne) oder ein Bereich stark positiv geladener Aminosäurereste an der Oberfläche dieser Proteine, die Membranbindung über Phosphatidylinositolphosphate (Stahelin et al., 2003; Owen, 2004; Peter et al., 2004; Itoh and De Camilli, 2006). Die Bindung der Adaptoren an Clathrin geschieht über kurze Peptidsequenzen, sogenannte Clathrin-Box-Sequenzen, die mit der schweren Kette von Clathrin interagieren (Näheres siehe 1.3.1.). Die Transportmolekülbindung der Adaptorproteine sowie der sogenannten CLASPs (*clathrin-associated-sorting-proteins*) erfolgt über kurze, lineare, meist unstrukturierte Peptidmotive, die als Sortierungssignale bezeichnet werden (Owen et al., 2004; Schmid and McMahon, 2007). Andere Signalsequenzen enthalten durch Phosphorylierung oder Monoubiquitinierung modifizierte Aminosäuren (Abb1.4.). Außerdem binden Adaptorproteine und CLASPs miteinander und interagieren z.B. mit weiteren Rekrutierungsfaktoren, SNARE-Proteinen oder Dynamin. Durch die zentrale Position, die die Membran, Clathrin und die Clathrin-Adaptoren in diesem Netzwerk aus Protein-Protein- und Protein-Lipid-Interaktionen einnehmen, werden

diese auch als „Hubs“ bezeichnet. In Abbildung 1.4. ist exemplarisch und stark vereinfacht das Netzwerk einiger ausgewählter Adaptorproteine und CLASPs bei der CCV-Bildung an der Plasmamembran dargestellt, wie es durch die Bindung von Adaptorproteinen und CLASPs an ihre Transportproteine (über entsprechende Sortierungsmotive), die Plasmamembran, das Clathringerüst, sowie der Interaktion untereinander entsteht.



**Abb.1.4.:** Vereinfachte Darstellung eines Netzwerkes von Protein- und Membraninteraktionen, die im Rahmen der Clathrin-vermittelten Endozytose ausgebildet werden (modifiziert nach Traub, 2009).

Dieses Netzwerk spielt eine wichtige Rolle bei der Bildung von CCVs und der räumlichen sowie zeitlichen Kontrolle, z.B. bei der Rekrutierung von Adaptoren an die Membran, der Membranverformung, dem Abschnüren des CCVs, dem Abstreifen der Vesikelhülle oder dem Verschmelzen von Vesikeln. Die wichtigsten Phasen der CCV-Bildung sowie deren zeitlicher Ablauf können der Abbildung 1.5. entnommen werden.



**Abb.1.5.: Die Phasen der CCV-Bildung:** An der mit  $\text{PtIns}(4,5)\text{P}_2$ -angereicherten Plasmamembran lagern sich AP2, CLASPs und Clathrin an und wölben die Membran. Durch weitere CCV-bildende und stabilisierende Faktoren wird das gereifte CCV eingestülpt, mittels Dynamin abgeschnürt und in das Cytosol entlassen. Dort wird der Clathrinmantel enzymatisch depolymerisiert und das „nackte“ Vesikel kann seine Transportroute einschlagen.

Die Mehrzahl der Adaptorproteine existiert als hetero-oligomere Komplexe, obwohl auch monomere Adaptoren bekannt sind. Dennoch sind alle Adaptoren ähnlich aufgebaut. Sie bestehen aus einer oder mehreren gefalteten Domänen, die mit einem unstrukturierten, flexiblen Hinge verbunden sind. Die Bindung von Clathrin erfolgt meist über diesen Hinge, dessen Flexibilität die Polymerisation des gebundenen Triskelions mit anderen Clathrin-Molekülen zu einem CCV begünstigt.

Gegenstand dieser Arbeit ist die funktionelle Regulation des heterotetrameren Adaptor Komplexes 2 (AP2). Für die funktionelle Untersuchung des Komplexes wurde auch das monomere Adaptor-Protein GGA (*Golgi-localized,  $\gamma$ -ear-containing, -ARF-binding proteins*) genutzt. Im Folgenden soll deswegen auf die monomeren und heterotetrameren Adaptor-Komplexe näher eingegangen werden sowie der heterotetramere Adaptor Komplex 2 ausführlich beschrieben werden.

### 1.2.3. Monomere Adaptoren

Zu den monomeren Adaptor-Proteinen gehört die Klasse der ubiquitär exprimierten GGA-Proteine (*Golgi-localized- $\gamma$ -ear-containing, -ARF-binding proteins*) (Bonifacino and Traub, 2003). Säugetierzellen exprimieren drei Isoformen, während in der Bäckerhefe (*S. cerevisiae*) zwei Isoformen vorkommen. Sie vermitteln den Transport von Proteinen zwischen dem Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) und den Endosomen

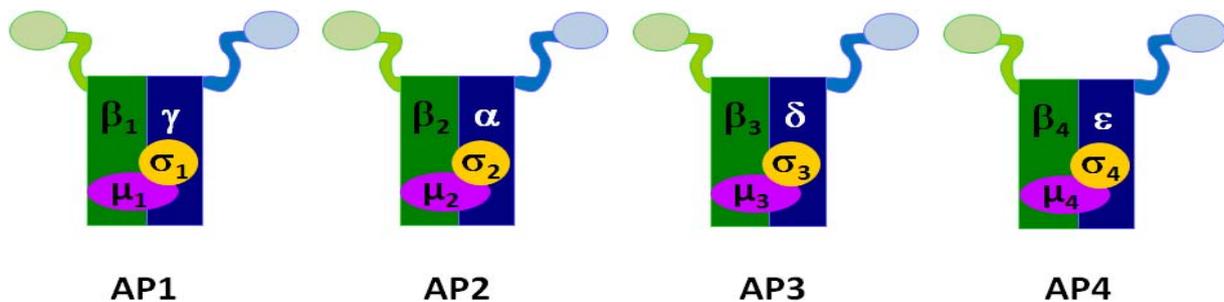
(Hirst et al., 2000). GGAs haben einen dreigliedrigen Aufbau mit einer N-terminalen VHS-Domäne (abgeleitet von ihrem Vorkommen in Vps27p/Hrs/STAM), die durch einen kurzen, unstrukturierten Linker mit der GAT-Domäne (GGA and Iom1) verbunden ist. Eine zweite, längere und ebenfalls unstrukturierte Hinge-Sequenz verbindet die GAT-Domäne mit der  $\gamma$ -Ear-Domäne. Cargo-Membranproteine, wie Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren (MPRs) (Puertollano et al., 2001) und Sortilin (Nielsen et al., 2001) binden über Dileucinsignale (DxxLL) an die VHS-Domäne. Hier soll angemerkt werden, dass sich diese Dileucinsignale (DxxLL) von den sauren Dileucinsignalen ([ED]xxxL[LI]) unterscheiden, an die AP2 bindet (siehe Kapitel 1.3.4.). Im Rahmen der Rekrutierung an die Membran binden GGAs über die GAT-Domäne an Arf1 in GTP gebundener Form (Collins et al., 2003; Shiba et al., 2003). Über die  $\gamma$ -ear Domäne von GGA binden andere Proteine, die an der Vesikelbildung am Golgi beteiligt sind, wie z. B. EpsinR, Eps15 und  $\gamma$ -Synergine mit der Erkennungssequenz [DE] $n\Phi$ G[PDE] $\Phi$  (Kent et al., 2002; Hirst et al., 2003).

## 1.2.4. Heterotetramere Adaptorkomplexe (APs)

Bis dato konnten vier heterotetramere Adaptorkomplexe identifiziert werden. Bereits 1984 konnten durch die Arbeit von Pearse und Robinson AP1 und AP2 aus Rinderhirn aufgereinigt und identifiziert werden (Pearse and Robinson, 1984). Die Identifizierung von AP3 (Dell'Angelica et al., 1997; Simpson et al., 1997) und AP4 (Dell'Angelica et al., 1999; Hirst et al., 1999) gelang 1997 bzw. 1999. Alle 4 Adaptorkomplexe kommen in Säugetieren vor und werden ubiquitär exprimiert. Die Adaptorkomplexe AP1-3 werden in allen eukaryotischen Zellen exprimiert, während AP4 in *S. cerevisiae*, *D. melanogaster*, *C. elegans* und *S. pombe* nicht vorkommt (Boehm and Bonifacino, 2001). AP4 besitzt als einziger Vertreter der heterotetrameren Adaptorkomplexe keine typische Clathrin-Box-Sequenz (1.3.1.), weshalb die Beteiligung von AP4 an der Bildung von CCVs umstritten ist. Die genaue Lokalisation der Adaptorkomplexe, d.h. die Membran, an die sie binden, sowie die Transportroute an der sie beteiligt sind, konnte bislang nur für AP2 eindeutig geklärt werden. AP2 bindet an die Plasmamembran und vermittelt dort die Internalisierung von Membranproteinen. Für AP1, AP3 und AP4 konnten ähnliche Transport- und Sortierungsfunktion am TGN und/oder den Endosomen gezeigt werden (Tab.1.1.). Der Nachweis solcher interner Transportrouten ist aber, bedingt durch die Vielzahl

verschiedener und alternativer Transportwege und der Varianz im Transport verschiedener Zelltypen, wesentlich schwieriger.

Die vier Adaptorkomplexe weisen eine homologe Grundstruktur auf. Sie setzen sich aus zwei großen (~110kDa), einer mittleren (~50kDa) und einer kleinen (15–20kDa) Untereinheit zusammen. Ihrer Homologie von 40-85% entsprechend wurden die konservierten Untereinheiten mit  $\beta$ 1-4 (110 kDa),  $\mu$ 1-4 (50 kDa) und  $\sigma$ 1-4 (15-20 kDa) benannt. Die zweite große Untereinheit weist den geringsten Homologiegrad (~25%) auf (Edeling et al., 2006a) und wird aus historischen Gründen entsprechend in der Reihenfolge ihrer Entdeckung als  $\gamma$  (AP1),  $\alpha$  (AP2),  $\delta$  (AP3) und  $\varepsilon$  (AP4) bezeichnet (Abb.1.6.).



**Abb.1.6.: Struktur der AP-Komplexe.** Schematischer Aufbau und Bezeichnung aller Untereinheiten der 4 Mitglieder der Familie der heterotetrameren AP-Komplexe.

Neben den vier ubiquitär exprimierten Adaptorkomplexen gibt es noch zwei weitere gewebespezifisch exprimierte Varianten (Tab.1.1.): AP1B in Epithelzellen (Fölsch et al., 2001) und AP3B in neuronalen Zellen (Faundez et al., 1998).

Außerdem wurden mehrere Isoformen sowie Splicevarianten von Adaptor-Untereinheiten identifiziert, deren Funktion derzeit größtenteils unbekannt ist (Boehm and Bonifacino, 2001). Beispielsweise sind für die  $\alpha$ -Untereinheit von AP2 in der Maus (*Mus musculus*) zwei Isoformen beschrieben  $\alpha$ -A und  $\alpha$ -C, von denen die  $\alpha$ -C-Variante vorwiegend im Hirn exprimiert wird (Ball et al., 1995). Für das humane Homolog dieser  $\alpha$ -Variante konnte dies jedoch noch nicht gezeigt werden.

**Tabelle 1.1. Heterotetramere Adaptorkomplexe.** E: Endosom, EE: frühes Endosom, LRO: Lysosomen verwandtes Organell, PM: Plasmamembran, TGN: Trans-Golgi-Netzwerk

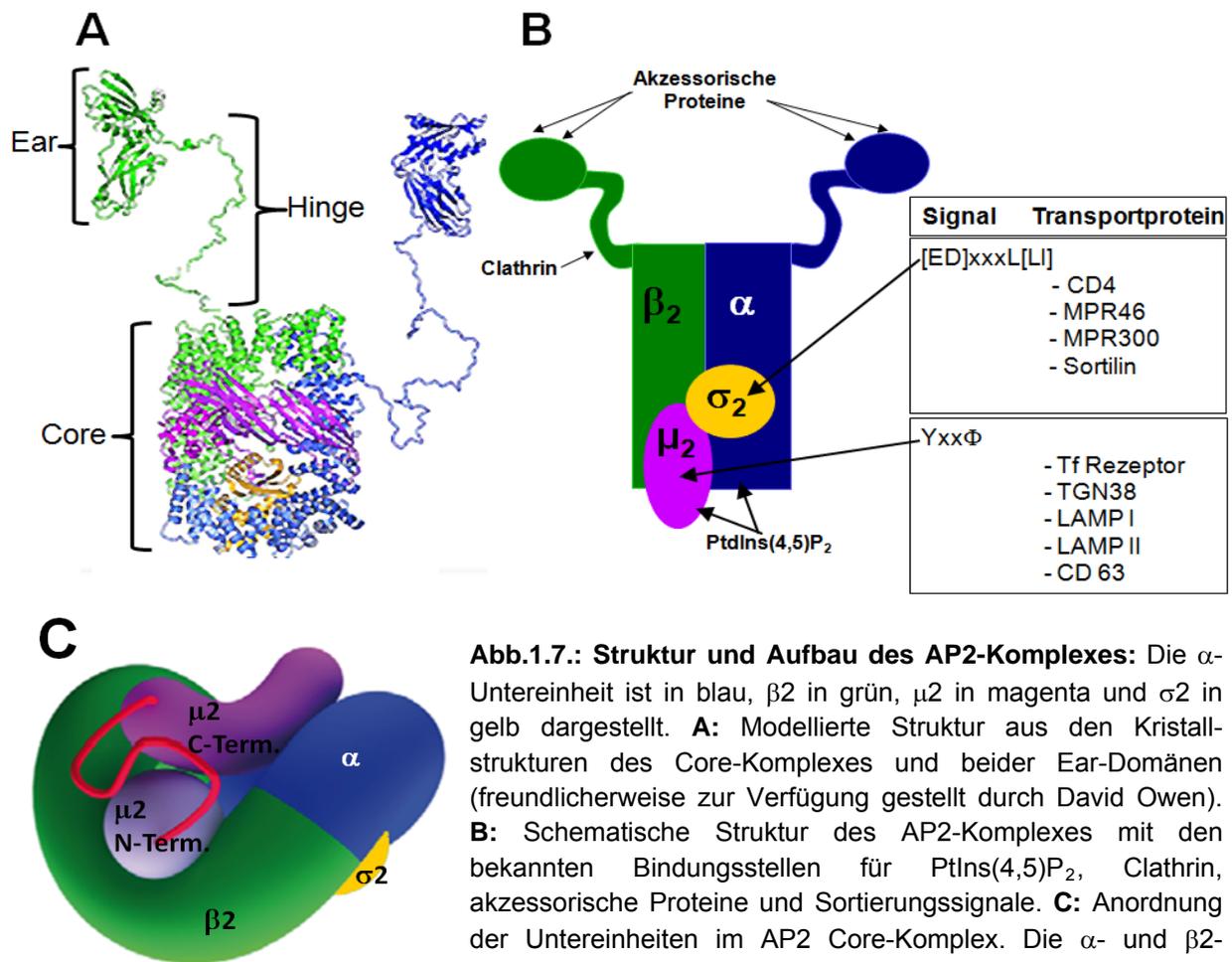
	AP1		AP2	AP3		AP4
	Isoform A	Isoform B		Isoform A	Isoform B	
Untereinheiten:						
klein	$\sigma 1$	$\sigma 1$	$\sigma 2$	$\sigma 3$	$\sigma 3$	$\sigma 4$
mittel	$\mu 1A$	$\mu 1B$	$\mu 2$	$\mu 3A$	$\mu 3B$	$\mu 4$
groß konserviert	$\beta 1$	$\beta 1$	$\beta 2$	$\beta 3A$	$\beta 3B$	$\beta 4$
groß variabel	$\gamma$	$\gamma$	$\alpha$	$\delta$	$\delta$	$\epsilon$
Lokalisation:	TGN/E	E	PM	TGN/E	E	TGN
postulierter Transport:	TGN $\rightarrow$ EE EE $\rightarrow$ TGN	basolaterale Sortierung in Epithelzellen	Endozytose	TGN $\rightarrow$ EE EE $\rightarrow$ LE TGN/E $\rightarrow$ LRO	Bildung synaptischer Vesikel	basolaterale Sortierung in Epithelzellen
Clathrinbindung:	+	+	+	+	?	-

Das Fehlen einzelner Untereinheiten von APs hat je nach Organismus weitreichende Konsequenzen. Der *knock-out* einzelner Untereinheiten von AP1, AP2 oder AP4 in der Maus ist letal (AP1: (Zizioli et al., 1999; Meyer et al., 2000), AP2: (Mitsunari et al., 2005), AP4: mündliche Mitteilung J.S. Bonifacino). In *S. cerevisiae* konnten trotz des *knock-outs* aller bekannten Adaptor-Untereinheiten weiterhin CCVs gebildet werden, obwohl die Vitalität dieser Zellen stark beeinflusst war (Huang et al., 1999). Das lässt sich möglicherweise auf die große Anzahl verschiedener Clathrin-Adaptoren zurückführen. Anders als bei den höheren Eukaryoten mit höchst differenzierten Geweben und gewebespezifischen Transportprozessen könnte der Verlust einzelner heterotetramerer Adaptorkomplexe in diesem einzelligen Organismus zumindest teilweise durch andere Clathrin-Adaptoren kompensiert werden. Von allen Adaptorkomplexen haben in AP3 der Verlust einzelner Untereinheiten sowie natürliche Mutationen die geringste Auswirkung auf die Vitalität der Taufliege (Ooi et al., 1997; Sevrioukov et al., 1999) und der Maus (Kantheti et al., 1998; Feng et al., 1999; Zhen et al., 1999). Mutationen in der  $\beta$ -Untereinheit des AP3-Komplexes manifestieren sich beim Menschen in einer Triade von Symptomen wie oculocutaner Hypopigmentierung, hämorrhagische Diathese und Lungenfibrose und kennzeichnen das Krankheitsbild des hereditären, autosomal-rezessiven Hermansky-Pudlak-Syndrom Typ 2 (HPS-2) (Huizing et al., 2000).

## 1.3. AP2

Bedingt durch die Verschiedenheit der zu internalisierenden löslichen Frachtmoleküle und Membranproteine existiert auch eine Vielfalt an Aufnahmemechanismen in die Zelle wie z.B. Phagozytose, Pinozytose, Caveolin-vermittelte Endozytose, Clathrin-vermittelte Endozytose oder Clathrin-unabhängige Endozytose (zusammengefasst in Doherty and McMahon, 2009). Der Clathrin-vermittelten Endozytose fällt bei der Internalisierung von Membranproteinen eine zentrale Rolle zu. Sie findet konstitutiv in allen Säugetierzellen statt und ermöglicht den Transport einer Vielzahl von Rezeptoren wie z.B. Transferrin-, LDL- (*low density lipoprotein*) und EGF- (*epidermal growth factor*) Rezeptoren in das endosomale System. Bei der Erkennung und Rekrutierung dieser Frachtproteine an der Plasmamembran ist AP2 beteiligt (Seaman et al., 1993; Schmid, 1997). Als Mitglied der Familie der heterotetrameren Adaptorkomplexe besteht AP2 aus zwei großen Untereinheiten ( $\alpha$  und  $\beta_2$ ; ~110kDa), einer mittleren  $\mu_2$ -Untereinheit (50kDa) und einer kleinen  $\sigma_2$ -Untereinheit (~17kDa). Beide großen Untereinheiten können in eine C-terminale Ear-Domäne (~30kDa), eine flexible, unstrukturierte, Proteolyse-sensitive Hinge-Region (~10kDa) und einen N-terminalen Core (~60kDa) (Zaremba and Keen, 1985; Schroder and Ungewickell, 1991) unterteilt werden. Die Struktur der  $\alpha$ -Ear-Domäne (Owen et al., 1999), der  $\beta_2$ -Ear-Domäne (Owen et al., 2000), sowie des Core-Komplexes (Collins et al., 2002) waren zu Beginn dieser Arbeit bekannt. Der Core-Komplex hat eine Größe von 100x80 Å und bildet einen Ring aus den Core-Domänen der beiden großen Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta_2$  in dessen Zentrum die  $\mu_2$  und  $\sigma_2$  Untereinheiten liegen (Collins et al., 2002) (Abb.1.7. A und C).

Die Kristallisation eines vollständigen AP2-Komplexes ist bislang unmöglich, da die Hinge-Regionen der großen Untereinheiten, besonders der  $\alpha$ -Hinge, sehr anfällig gegenüber Proteasen sind und bereits während der Expression in Bakterien proteolytisch angegriffen werden. Die in Abbildung 1.7.A gezeigte Struktur ist aus den Einzelstrukturen der  $\alpha$ - und  $\beta_2$ -Ear-Domänen sowie des Core-Komplexes am Computer zusammengefügt worden, wobei die Lage und Struktur der  $\alpha$ - und  $\beta_2$ -Hinge-Regionen „gemodelled“ wurden



**Abb.1.7.: Struktur und Aufbau des AP2-Komplexes:** Die  $\alpha$ -Untereinheit ist in blau,  $\beta_2$  in grün,  $\mu_2$  in magenta und  $\sigma_2$  in gelb dargestellt. **A:** Modellierter Struktur aus den Kristallstrukturen des Core-Komplexes und beider Ear-Domänen (freundlicherweise zur Verfügung gestellt durch David Owen). **B:** Schematische Struktur des AP2-Komplexes mit den bekannten Bindungsstellen für  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ , Clathrin, akzessorische Proteine und Sortierungssignale. **C:** Anordnung der Untereinheiten im AP2 Core-Komplex. Die  $\alpha$ - und  $\beta_2$ -Untereinheiten bilden eine Schale, in deren Zentrum der N-Terminus von  $\mu_2$  sitzt. Dieser ist mittels eines unstrukturierten

Hinges (in rot) mit dem aus  $\beta$ -Faltblättern aufgebauten, bananenförmigen C-Terminus von  $\mu_2$  verbunden (modifiziert nach Jackson *et al.*, 2010).

Als Adaptor stellt AP2 das Bindeglied zwischen dem Clathringerüst und der Membran dar. Dafür muss er mit verschiedenen Molekülen interagieren (Abb.1.7.B):

- 1.: AP2 bindet Clathrin durch einen Sequenzbereich im  $\beta_2$ -Hinge.
- 2.: AP2 bildet ein Netzwerk akzessorischer- und CCV-regulierender Proteine mittels der  $\alpha$ - und  $\beta_2$ -Ear-Regionen aus.
- 3.: AP2 bindet selektiv an die Plasmamembran.
- 4.: AP2 bindet Sortierungsmotive von Membranproteinen.

Auf die genannten Interaktionen soll in den folgenden Kapiteln 1.3.1-1.3.4 eingegangen werden.

## 1.3.1. Bindung von AP2 an Clathrin

Die Bindung von AP2 an Clathrin geschieht durch eine Konsensussequenz, der sogenannten Clathrin-Box (Abb.1.7.B) (L[LI][DEN][LF][DE]), innerhalb der Hinge-Region von  $\beta 2$  (Kirchhausen, 2000b). Diese Sequenz findet sich auch in den  $\beta$ -Hinge-Regionen von AP1 und AP3, nicht aber in AP4. Die Clathrin-Box bindet den N-Terminus der schweren Kette von Clathrin, der einen 7-flügeligen Propeller bildet, ähnlich einer WD-40 Domäne für Protein-Protein-Interaktionen (ter Haar et al., 2000). Da AP4 kein Clathrinbindungsmotiv besitzt, führte dies zu der Annahme, dass dieser Komplex an Clathrin-unabhängigen Transporten beteiligt ist. Da Adaptoren aber mit einer Vielzahl von akzessorischen Proteinen interagieren, die selbst Clathrin-bindende Motive enthalten, muss dem nicht so sein. Zusätzlich kann der AP2-Komplex Clathrin über die Sandwich-Subdomäne des  $\beta 2$ -Ears binden, das im Folgenden näher erläutert wird.

## 1.3.2. Bindung von AP2 an akzessorische Proteine

Die Bindung von AP2 an andere Proteine erfolgt im Wesentlichen über die Ear-Domänen der  $\alpha$ - und  $\beta 2$ -Untereinheiten. Da die Bindungspartner ihrerseits untereinander Protein-Protein- bzw. Protein-Lipid-Interaktionen ausbilden können, entsteht ein Netzwerk, der Eingangs beschriebene „Hub“. Die  $\alpha$ - und  $\beta 2$ -Ear-Domänen des AP-2-Komplexes bestehen jeweils aus einer N-terminalen Immunglobulin-ähnlichen Sandwich-Subdomäne, die starr mit einer C-terminalen Plattform-Subdomäne verbunden ist (Owen et al., 2004; Schmid and McMahon, 2007). Da jede dieser Subdomänen eine unabhängige Interaktionsfläche bildet, stehen AP2 durch die Ear-Regionen 4 räumlich voneinander getrennte Interaktionsflächen zur Verfügung (Abb.1.8.). Die Bindung an diese Kontaktbereiche wird über kurze aromatische Sequenz-Motive vermittelt. Die Sandwich-Subdomäne der  $\alpha$ -Untereinheit bindet WXX[FW]X[DE]<sub>n</sub>-Konsensus-Sequenzen. Diese sind z.B. in Stonin 2, AP180 und Synaptojanin 1 zu finden (Owen et al., 2004; Traub, 2009).



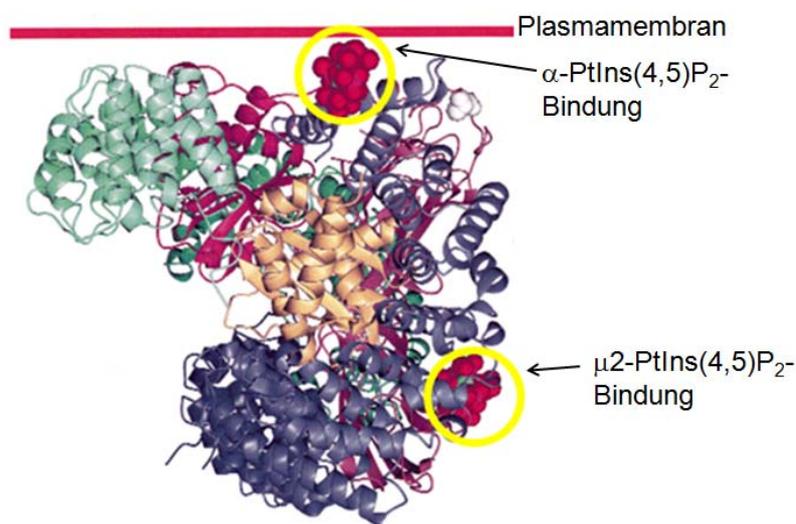
### 1.3.3. Bindung von AP2 an die Plasmamembran

Wie einleitend erwähnt bindet der AP2-Komplex ausschließlich an die Plasmamembran. Als Faktoren, welche AP2 an die Membran rekrutieren können, werden PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> und die kleine GTPase Arf6 diskutiert, die wichtige Determinanten der Membranidentität des Endomembransystems darstellen (Abb.1.1. und 1.2.) (Owen et al., 2004; Behnia and Munro, 2005).

Das an der Plasmamembran lokalisierte kleine G-Protein ARF6 (*ADP-ribosylation factor 6*) ist ein diskutierter Rekrutierungsfaktor für den bei der Rezeptor vermittelten Endozytose beteiligten AP2-Komplex (Donaldson, 2003). So konnte bereits gezeigt werden, dass ARF6 über eine Aktivierung der PI4P-5-Kinase die PtdIns(4,5)<sub>2</sub>-Konzentration beeinflusst und damit indirekt Einfluss auf die Rekrutierung endozytotischer Proteine hat. Auch wurde eine Rekrutierung von AP2 durch direkte Interaktion mit ARF6 in GTP-gebundener Form gezeigt (Paleotti et al., 2005), allerdings konnte eine ARF6 Bindungsstelle bisher nicht identifiziert werden.

Die Selektivität des AP2-Komplexes für die Plasmamembran lässt sich auch durch die Konzentrierung bestimmter Phosphatidylinositolphosphate in Membranen erklären (Abb.1.1.). Das am stärksten vertretene Phosphatidylinositolphosphat der Plasmamembran ist Phosphatidylinositol(4,5)bisphosphat (PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>) (Watt et al., 2002). AP2 bindet PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-reiche Regionen der Plasmamembran über den N-Terminus der  $\alpha$ - und den C-terminalen Bereich der  $\mu$ 2-Untereinheiten (Gaidarov and Keen, 1999; Rohde et al., 2002). Die Details dieser Interaktion sind durch die Strukturaufklärung des Core-Komplexes in Anwesenheit von Inositol-(1,2,3,4,5,6)-hexakisphosphat (InsP<sub>6</sub>, einen PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-Analogon) auf molekularer Ebene verstanden (Collins et al., 2002). Die Bindung wird durch die Wechselwirkungen zwischen den Phosphatgruppen von PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> und den basischen Aminosäureseitenketten der beiden Untereinheiten vermittelt und erfolgt hierbei nicht durch eine Tasche, sondern über die geladenen Aminosäureseitenketten, wie bei einem Ball, der auf den Fingerspitzen einer halbgeschlossenen Hand balanciert wird (Collins et al., 2002). Obwohl beide PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-Bindungsstellen durch *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen bestätigt werden konnten (Rohde et al., 2002; Honing et al., 2005), konnte die  $\mu$ 2-Bindungsstelle auf molekularer Ebene nur durch die Kristallisation einer freien, nicht komplexgebundenen C- $\mu$ 2-Kette gezeigt werden (Abb.1.10.). In der Kristallisation des AP2-Komplexes war diese  $\mu$ 2-PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-Bindungsstelle durch Teile der  $\beta$ 2-Untereinheit verdeckt (Collins et al., 2002).

Außerdem stehen die  $\alpha$ - und  $\mu 2$ -PtIns(4,5) $P_2$ -Bindungsstellen in der ermittelten Kristallstruktur im rechten Winkel zueinander, so dass  $\mu 2$  in dieser Konformation nicht an die Membran binden kann (Abb.1.9.). Allerdings zeigte die Mutation von Aminosäuren in der  $\mu 2$ -PtIns(4,5) $P_2$ -Bindungsstelle eine verminderte Rekrutierung von AP2 an die Membran und in CCVs (Rohde et al., 2002). Dies ließ die Schlussfolgerung zu, dass bei der Membranbindung durch die  $\mu 2$ -Region eine Konformationsänderung in AP2 stattfinden muss. Dieses Modell wird in den folgenden Abschnitten diskutiert.



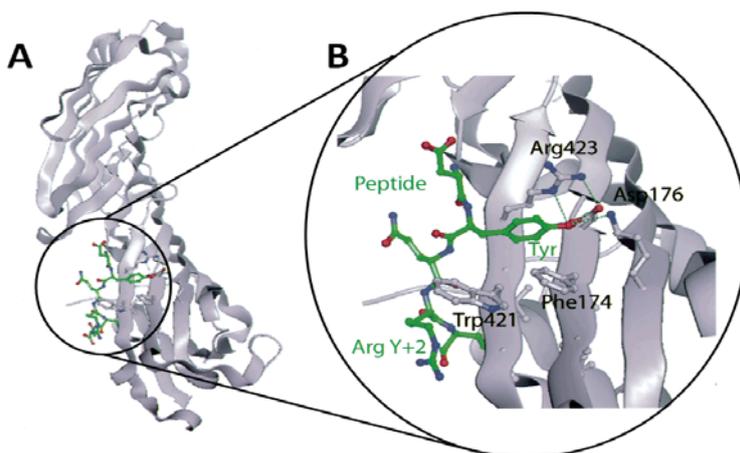
**Abb.1.9.: Bindungsstellen für PtIns(4,5) $P_2$  in der Kristallstruktur des AP2-Komplexes:** Das Modell verdeutlicht die Lage der  $\alpha$ - und  $\mu 2$ - PtIns(4,5) $P_2$ -Bindungsstellen (gelb umrandet) durch Ins $P_6$  (in rot). Die Bindungsstellen liegen im rechten Winkel zueinander, etwa 60-70Å voneinander entfernt. Teile der  $\mu 2$ - PtIns(4,5) $P_2$ -Bindungsstelle sind zudem durch Bereiche von  $\beta 2$  (blau) verdeckt (modifiziert nach Owen, 2004)

### 1.3.4. Erkennung von Sortierungsmotiven durch AP2

Die Mehrzahl aller Membranproteine besitzen in ihren cytosolischen Sequenzabschnitten kurze Sequenzmotive, die als Sortierungssignal fungieren und von Adaptoren gebunden werden können. Am weitesten verbreitet sind Tyrosin-Motive ( $Yxx\Phi$ , wobei  $\Phi$  für eine große, hydrophobe Aminosäure steht), saure Dileucin-Motive ( $[DE]xxxL[LI]$ ), das sogenannte NPxY-Motiv ( $[FY]xNPx[YF]$ ) oder saure *Cluster*. Auch Phosphatgruppen oder monoubiquitinierte Aminosäuren können durch Adaptoren erkannt werden (zusammengefasst in Traub, 2009). Die Bindung von AP2 an Membranproteine kann über  $Yxx\Phi$ - und  $[ED]xxxL[LI]$ - Sortierungsmotive erfolgen (Owen and Evans, 1998; Kelly et al., 2008).

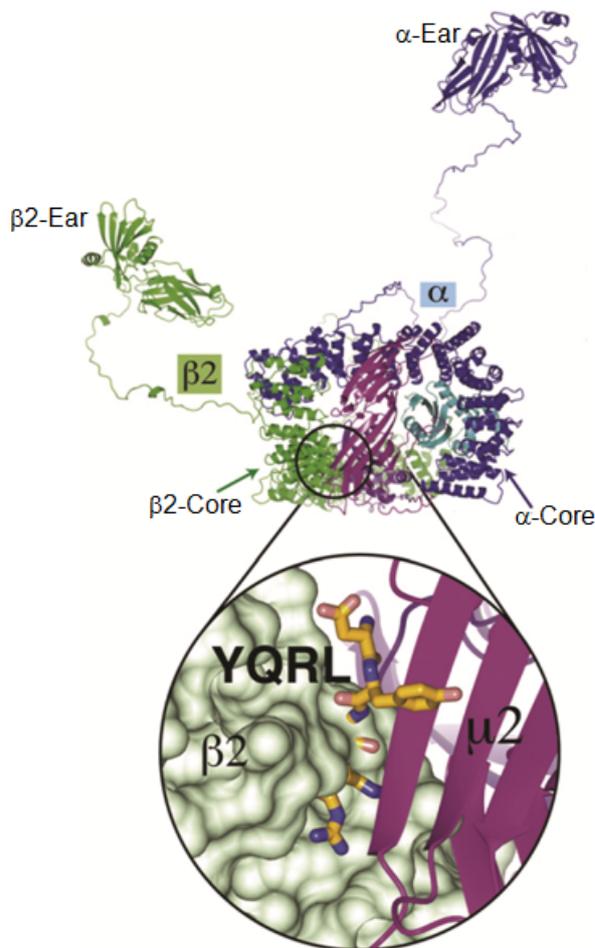
## Tyrosinsignalbindung durch AP2

Die Erkennung von Membranproteinen mit einem Tyrosin-haltigen Sortierungsmotiv (YxxΦ) erfolgt über die  $\mu$ 2-Untereinheit von AP2 (Ohno et al., 1995). Dabei sind der Tyrosinrest und die große hydrophobe Aminosäure essentiell für eine effektive Bindung (Ohno et al., 1995; Ohno et al., 1996). Die  $\mu$ 2-Untereinheit kann unterteilt werden in eine N-terminale Domäne, die mittels eines unstrukturierten Hinges mit der C-terminalen Domäne verbunden ist (Abb.1.7.C). In Kristallisationsstudien des C-terminalen Teils von  $\mu$ 2 (C- $\mu$ 2) in Anwesenheit eines Peptids mit dem Tyrosin-Motiv des TGN38-Proteins oder des EGF-Rezeptors konnte gezeigt werden, dass das Tyrosin-Motiv dieser Peptide an der Oberfläche der bananenförmigen C- $\mu$ 2-Untereinheit bindet, wobei das Tyrosin und die große hydrophobe Aminosäure (Φ) des Signalpeptids in je eine hydrophobe Tasche der  $\mu$ 2-Untereinheit ausgerichtet und gebunden wird (Owen and Evans, 1998). Der hydrophobe Ring des zentralen Tyrosinrests ist in hydrophobe Wechselwirkungen mit Phe174 und Trp421 der  $\mu$ 2-Untereinheit involviert sowie in  $\pi$ -Wechselwirkungen mit der Guanidinium-Gruppe von Arg423. Zusätzlich bildet die phenolische Hydroxylgruppe des Tyrosinrests mit Asp176 der  $\mu$ 2-Untereinheit Wasserstoffbrückenbindungen aus (Abb.1.10.). Die multivalente Koordination des Tyrosinrestes ist derart spezifisch, dass auch die sehr ähnliche Phenylalanin-Gruppe sie nicht substituieren kann (Ohno et al., 1996). Zusätzlich ist die Bindungsstelle so gestaltet, dass eine große geladene Gruppe, wie die eines phosphorylierten Tyrosins, nicht gebunden werden kann. Damit erklärt sich auf atomarer Ebene die Beobachtung, dass die Phosphorylierung des Tyrosinrests im Signal des co-stimulatorischen T-Zell Rezeptors (CTLA-4) zur Inhibition der Bindung an AP2 führt (Chuang et al., 1997; Shiratori et al., 1997; Zhang and Allison, 1997). Folglich ist die Phosphorylierung des Tyrosins ein negativer Regulator der Signalbindung.



**Abb.1.10.: YxxΦ-Bindung durch die  $\mu$ 2-Untereinheit:** **A:** Bindung eines Tyrosinmotiv-haltigen Peptids an den aus  $\beta$ -Faltblättern aufgebauten, bananenförmigen C-Terminus von  $\mu$ 2 (AS 157-434). **B:** Orientierung des zentralen Tyrosins in der hydrophoben Bindungstasche von C- $\mu$ 2 (aus Owen et al., 2004).

C- $\mu$ 2 lokalisiert in der in 2002 kristallisierten Struktur in einer Grube an der Außenseite von AP2. Die Yxx $\Phi$ -Bindungsstelle (Abb.1.11.) sowie die PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-Bindungsstelle sind von Teilen der  $\beta$ 2-Untereinheit verdeckt und ~60-70 Å von der postulierten Plasmamembraninteraktionsfläche entfernt (Abb.1.9), was ebenso für eine notwendige Konformationsänderung des Komplexes spricht, damit eine Bindung an PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> und für Tyrosinsignal möglich wird. Deswegen wird diese Konformation im Folgenden als geschlossen (*closed*) bezeichnet.



**Abb.1.11.: Struktur von AP2 in der geschlossenen Konformation:** Die Tyrosinbindungstasche (Peptid YQRL in gelb) von C- $\mu$ 2 (magenta) ist durch Teile der  $\beta$ 2-Untereinheit (grüne Oberfläche) blockiert. Da in dieser Konformation der AP2-Komplex keine Tyrosin-Motive binden kann, wird für die Signalbindung eine notwendige Konformationsänderung angenommen. Der AP2-Komplex ist aus der 2002 kristallisierten Struktur so modelliert worden, dass die potentielle Lage Hinge und Ear-Domänen mit angezeigt werden kann (modifiziert nach Jackson et al., 2010).

## Dileucinsignalbindung durch AP2

Neben Tyrosin-haltigen Sequenzmotiven bindet AP2 an saure Dileucin-Motive der Konsensussequenz [DE]xxxL[LI]. Die Bindung von AP2 an saure Dileucin-Motive konnte *in vitro* mehrfach nachgewiesen werden (Heilker et al., 1996; Höning et al., 1998; Rodionov and Bakke, 1998). Das saure Dileucin-Motiv unterscheidet sich in Ladung und Eigenschaft der Aminosäuren von einem Yxx $\Phi$ -Motiv und konkurriert nicht mit Yxx $\Phi$ -haltigen Motiven um die Bindung an AP2 und demzufolge auch nicht

um die Internalisierung in Clathrin-umhüllte Vesikel (Marks et al., 1996). Wichtig für die Bindung sind die zwei aufeinanderfolgenden Leucinreste. Das zweite Leucin kann bei einigen Signalen durch eine strukturell ähnliche Aminosäure wie Isoleucin, Methionin oder Valin ersetzt sein (Letourneur and Klausner, 1992; Sandoval and Bakke, 1994). Außerdem befinden sich meist in Position -4 oder -5 proximal vom ersten Leucin hydrophobe oder saure Reste. Eine aktivierbare Sonderform der sauren Dileucin-Motive findet man in der  $\gamma$ -Kette von CD3 und in CD4, die beide ein Serin in Position -5 proximal vom ersten Leucin enthalten. Erst die Phosphorylierung des Serins führt zu der Aktivierung des Signals, die die Endozytose des betreffenden Proteins einleitet (Dietrich et al., 1994; Dietrich et al., 1996; Pitcher et al., 1999). Ursprünglich wurde angenommen, dass die Interaktion von AP2 mit Dileucin-Motiven über die  $\beta$ - oder  $\mu$ -Untereinheiten stattfindet, was durch *Yeast-Two-Hybrid* Experimente für AP2 und den strukturell eng verwandten AP1-Komplex ermittelt werden konnte (Rapoport et al., 1998; Schmidt et al., 2006). Später wurden diese Ergebnisse jedoch durch *Yeast-Three-Hybrid* und *pull-down*-Experimente widerlegt, in denen Bereiche eines Hemikomplexes aus den  $\alpha$ - und  $\sigma 2$ -Untereinheiten für die Bindung an Dileucin-Signale identifiziert werden konnten (Doray et al., 2007; Lindwasser et al., 2008; Chaudhuri et al., 2009).

### 1.3.5. Phosphorylierung von AP2

Die vielseitigen Funktionen des AP2-Komplexes bedürfen einer genauen zeitlichen und räumlichen Regulation innerhalb der Zelle. Hierbei muss z.B. sichergestellt werden, dass die Bindung und Polymerisation von Clathrin an der Membran und nicht im Cytosol stattfindet. Auch sollten nur Membranproteine von AP2 erkannt werden, nicht aber cytosolische Proteine, die zufällig ähnliche Sequenzmotive (Yxx $\Phi$  oder [DE]xxxL[LI]) besitzen.

Solch eine räumlich und zeitlich differenzierte Funktion von AP2 könnte durch eine posttranslationale Modifikation reguliert werden wie z.B. durch eine Phosphorylierung, denn AP2 wird in 3 seiner 4 Untereinheiten phosphoryliert: in beiden großen Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta 2$  und in der mittleren Untereinheit  $\mu 2$  (Wilde and Brodsky, 1996; Fingerhut et al., 2001; Ricotta et al., 2002; Hansen, 2007). Im Folgenden soll auf die Funktionsregulation von AP2 durch Phosphorylierung eingegangen werden.

## Phosphorylierung von $\mu 2$

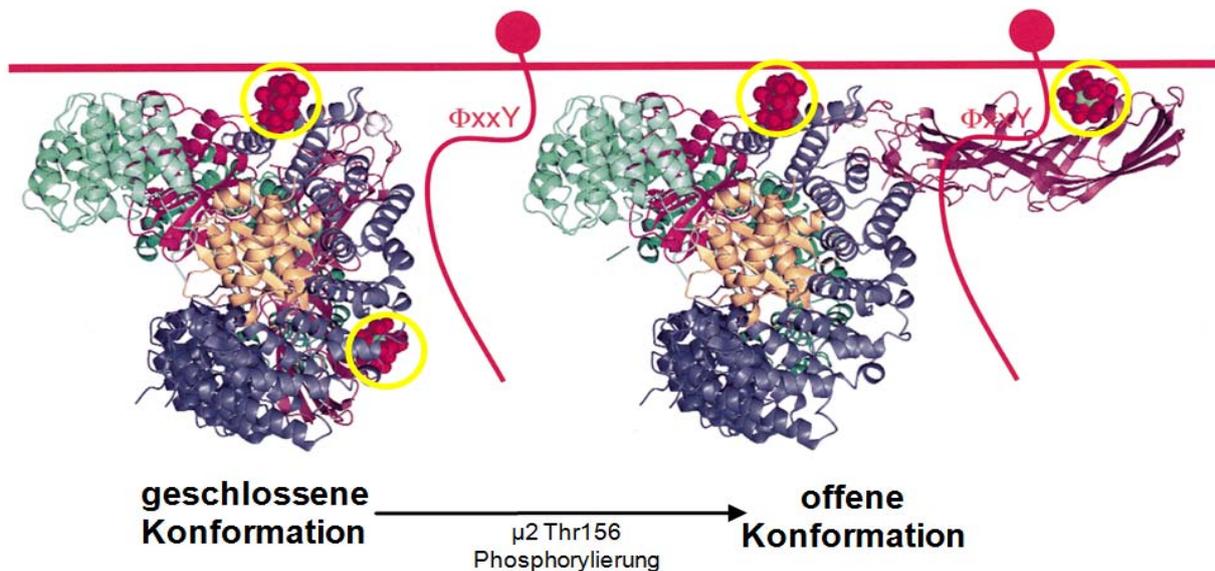
Die Phosphorylierung der mittleren Untereinheit  $\mu 2$  des AP2-Komplexes erfolgt an Thr156 (Pauloin and Thuriéau, 1993; Olusanya et al., 2001). Der Aminosäurerest befindet sich am C-terminalen Ende der unstrukturierten Hinge-Region, zwischen der N- und C-terminalen Domäne von  $\mu 2$ , und wird durch die Serin/Threonin-Kinase AAK1 (*Adaptor Associated Kinase 1*) phosphoryliert (Conner and Schmid, 2002; Ricotta et al., 2002). Diese Kinase kann wie der Name andeutet, in Assoziation mit dem AP2-Komplex aufgereinigt werden und bindet über ein DP[FW]- oder ein NP[FW]-Motiv an die Plattform-Subdomäne des  $\alpha$ -Ears von AP2. Als dephosphorylierendes Enzym konnte PP2A (*Protein Phosphatase 2 A*) identifiziert werden (Ricotta et al., 2008).

*In vitro* wurde gezeigt, dass die Phosphorylierung von  $\mu 2$  die Affinität des AP2-Komplexes zu Yxx $\Phi$ -Motiven um das bis zu 20fache erhöht (Fingerhut et al., 2001; Ricotta et al., 2002; Höning et al., 2005). Dies wurde durch *in vivo* Experimente, durch die Überexpression von  $\mu 2$ -Varianten, in denen das Thr156 zu Alanin mutiert wurde, gestützt. In diesen Zellen war die Endozytose des Tyrosinmotiv-enthaltenden Transferrinrezeptors signifikant reduziert.

Die Kollokalisierung von AAK1 mit AP2 in CCVs sowie die Stimulation von AAK1 durch assembliertes Clathrin lassen vermuten, dass die Phosphorylierung von  $\mu 2$  erst nach/oder im Rahmen der Membranrekrutierung erfolgt, nicht aber im Cytosol (Conner and Schmid, 2002; Conner et al., 2003; Jackson et al., 2003). Dies und die Tatsache, dass in der motivfreien Konformation des AP2-Komplexes, sowohl die Tyrosinsignalbindungsstelle, als auch die PI(4,5)P<sub>2</sub>-Bindungsstelle durch Bereiche der  $\beta 2$ -Untereinheit blockiert sind, führten zu folgendem Modell, dass von einer phosphorylierungsabhängigen Konformationsänderung des AP2-Komplexes ausgeht:

Zunächst wird AP2 durch die PtdIns(4,5P)<sub>2</sub>-Bindung der  $\alpha$ -Untereinheit an endozytotisch aktive Plasmamembranbereiche rekrutiert und dort durch AAK1 an Thr156 der  $\mu 2$ -Untereinheit phosphoryliert. Durch eine Konformationsänderung wird nun die PtdIns(4,5P)<sub>2</sub>-Bindungsstelle in  $\mu 2$  an die Membran und die Bindungsstelle für das Tyrosin-Sortierungssignal in die für eine Bindung erforderliche Orientierung gebracht. Dies ermöglicht eine stärkere Bindung an die Membran und die Interaktion mit dem zu internalisierenden Protein (Abb.1.12). Im Gegensatz dazu begünstigt die Umwandlung von PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> zu Diacylglycerin und PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> sowie die

gleichzeitige Dephosphorylierung von Thr156 durch PP2A die Dissoziation des AP2-Komplexes vom Sortierungssignal und das Ablösen von der Plasmamembran.



**Abb.1.12: Modell zur Konformationsänderung von  $\mu 2$  an der Plasmamembran.** In der geschlossenen Konformation bindet AP2 über die  $\alpha$ -Untereinheit an  $PtIns(4,5)P_2$  der Plasmamembran (in gelb markiert). Die Phosphorylierung von Thr156 durch AAK1 geht einher mit einer Konformationsänderung. Der C-terminale Bereich von  $\mu 2$  klappt von dem AP2-Komplex weg. Dadurch werden die inneren Kontaktflächen dieser Domäne, an denen die  $PtIns(4,5)P_2$ - und  $Yxx\Phi$ -Interaktionsflächen liegen, zur Membranseite orientiert. Die  $\mu 2$ -  $PtIns(4,5)P_2$ -Bindungsstelle (in gelb) sowie die  $Yxx\Phi$ -Bindungsstelle liegen nun nahe der Membranoberfläche und können nun an  $Yxx\Phi$ -Motive in der Membrenumgebung binden. (modifiziert nach: Owen et al., 2004)

## Phosphorylierung von $\alpha$ und $\beta 2$

Die Phosphorylierung der großen Untereinheiten von AP2 ( $\alpha$  und  $\beta 2$ ) wurde schon vor über 30 Jahren beschrieben (Manfredi and Bazari, 1987; Georgieva-Hanson et al., 1988). Dennoch ist über die genauen Phosphorylierungsstellen sowie deren Funktion nur wenig bekannt. Als Regionen, in denen die Phosphorylierungen stattfinden, wurden aufgrund von Fragmentierungsstudien radioaktiv phosphorylierter und immunisolierter AP2-Komplexe die Hinge-Regionen beider großer Untereinheiten vermutet sowie mittels Dünnschichtchromatographie Serine als putativ phosphorylierte Aminosäuren ermittelt (Wilde and Brodsky, 1996).

Obwohl eine basale Phosphorylierung der großen Untereinheiten in verschiedenen Zelltypen beobachtet werden kann (Wilde and Brodsky, 1996; Huang et al., 2003; Fessart et al., 2007; Hansen, 2007; Fingerhut, 2000), wurden auch

Phosphorylierungen von  $\beta 2$  nach Stimulation spezifischer Rezeptoren in Zellkulturen beschrieben.

In der  $\beta 2$ -Untereinheit konnte die Phosphorylierung eines N-terminalen Tyrosins (Tyr6) nach der Stimulation des EGF-Rezeptors gezeigt werden (Huang et al., 2003). Durch die Mutation des EGF-Rezeptor-Dileucinsignals (Leu1010 und Leu1011) zu Alanin konnte zum einen eine starke Reduktion der Tyr6-Phosphorylierung beobachtet werden, zum anderen eine verminderte lysosomale Degradation des Rezeptors. Die Autoren folgerten daraus, dass die Interaktion des EGF-Rezeptors mit AP2 über die Dileucinsignale in einem direkten Zusammenhang mit der Phosphorylierung von Tyr6 in  $\beta 2$  steht.

Nach Stimulation des Angiotensin-2-Typ-1-Rezeptors (AT1R) konnte eine Phosphorylierung des Tyr737 in  $\beta 2$  nachgewiesen werden (Fessart et al., 2007). Die Autoren zeigten weiter, dass die Phosphorylierung des  $\beta 2$  Tyr737 einen direkten Einfluss auf die Dissoziation des AP2- $\beta$ -Arrestin-Komplexes hat, welcher bei der Internalisierung G-Protein gekoppelter Rezeptoren (GPCRs) eine wichtige Rolle spielt (Laporte et al., 1999; Kim and Benovic, 2002). Das Tyr737 liegt innerhalb der Plattform-Domäne des  $\beta 2$ -Ears und erlaubt die Interaktion mit  $[DE]_n X_1-2 FXX[FL]XXXR$ -Sequenzen im Kontext einer  $\alpha$ -Helix über die  $\beta$ -Arrestin 1-3, ARH und Epsine verfügen (Edeling et al., 2006b; Schmid et al., 2006) (Abb.1.8.). Folglich wäre der Einfluss einer Phosphorylierung innerhalb dieser Region auf die AP2- $\beta$ -Arrestin-Interaktion denkbar.

In aufgereinigten CCVs konnte in *in vitro* Phosphorylierungsexperimenten, nach Stimulation mit Poly-L-Lysin, eine Erhöhung der  $\beta 2$ -Phosphorylierung beobachtet werden, für die CVAK104 (*c*oated *v*esicle *a*ssociated *K*inase of *104* kDa) als verantwortliche Kinase identifiziert werden konnte (Conner and Schmid, 2005). Allerdings fehlen diesem Enzym mehrere für die Kinasefunktion entscheidende Reste im katalytischen Zentrum (Manning et al., 2002). Daher ist fraglich, ob die Phosphorylierung tatsächlich auf CVAK104 oder eine unbekannte Kontaminante zurückzuführen ist.

Über die Phosphorylierungsstellen innerhalb der  $\alpha$ -Untereinheit von AP2 sowie deren Funktion ist bis dato nichts bekannt.

## 1.4. Einführung in die funktionelle Regulation von AP2

In der 2002 ermittelten Struktur ist die Bindungstasche für Tyrosin-haltige Motive durch Teile der  $\beta$ 2-Untereinheit blockiert (Abb.1.11) (Collins et al., 2002). Eine gleichzeitige Bindung der beiden bekannten PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-Interaktionsflächen in  $\alpha$  und  $\mu$ 2 an die Plasmamembran ist unmöglich, da die Interaktionsflächen in einem 90° Winkel zueinander stehen (Abb.1.12) (Collins et al., 2002; Kelly et al., 2008). Deshalb wurde für die Tyrosinmotiv-Bindung von AP2 bereits in 2002 eine Konformationsänderung postuliert (Collins et al., 2002). *In vitro* Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass die Phosphorylierung von Thr156 in  $\mu$ 2 die Affinität von AP2 gegenüber Tyrosin-haltigen Signalen bis zu 20fach erhöht (Fingerhut et al., 2001; Ricotta et al., 2002), was auch durch andere Arbeitsgruppen *in vivo* bestätigt werden konnte (Olusanya et al., 2001; Conner and Schmid, 2002). Das ließ die Möglichkeit einer durch  $\mu$ 2-Phosphorylierung induzierten Konformationsänderung zu (Abb.1.12). Die Kollokalisierung der  $\mu$ 2 phosphorylierenden Kinase AAK1 mit AP2 in CCVs (Conner and Schmid, 2002), wie auch deren Stimulation durch assembliertes Clathrin (Conner and Schmid, 2002; Conner et al., 2003; Jackson et al., 2003), ließen jedoch eine Phosphorylierung von bereits an die Membran gebundenem AP2 vermuten.

Als Faktoren der Membranrekrutierung von AP2 werden PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> und kleine GTPasen diskutiert, die beide wichtige Determinanten der Membranidentität im Endomembransystem darstellen (Abb.1.1. und 1.2.) (Owen et al., 2004; Behnia and Munro, 2005). PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>, das an der Plasmamembran am stärksten vertretene Phosphatidylinositolphosphat (Owen et al., 2004), ist durch die Interaktion mit einer Vielzahl von endozytotischen Proteinen wie z.B. Epsin, AP180/CALM, Dab2 und Dynamin an der Clathrin-vermittelten Endozytose beteiligt (Owen et al., 2004)(1.2.2.). PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> interagiert mit der  $\alpha$ - und der  $\mu$ 2-Untereinheit von AP2 und spielt eine Rolle bei der Lokalisation von AP2 an der Plasmamembran (Gaidarov and Keen, 1999; Collins et al., 2002; Rohde et al., 2002). Das an der Plasmamembran lokalisierte kleine G-Protein ARF6 (*ADP-ribosylation factor 6*) ist ebenfalls ein diskutierter Rekrutierungsfaktor für den AP2-Komplex (Donaldson, 2003), allerdings konnte eine ARF6 Bindungsstelle in AP2 bisher nicht identifiziert werden.

Die Bindung von AP2 an saure Dileucin-Motive konnte mehrfach *in vitro* bestätigt werden (Heilker et al., 1996; Höning et al., 1998; Rodionov and Bakke, 1998). Das

saure Dileucin-Motiv unterscheidet sich in Ladung und Eigenschaft der Aminosäuren von einem YxxΦ-Motiv und konkurriert nicht mit YxxΦ-haltigen Motiven um die Bindung an AP2. Auf molekularer Ebene konnte die Bindung von AP2 an saure Dileucin-Motive jedoch noch nicht gezeigt werden.

Der Einfluss der Phosphorylierung von Thr156 in  $\mu 2$  auf die funktionelle Regulation von AP2 konnte wie Anfangs erwähnt bedingt geklärt werden, die strukturelle Grundlagen dieser Phosphorylierung jedoch noch nicht.

Auch ein möglicher Einfluss der basalen Phosphorylierung beider großen Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta 2$  auf die Funktion von AP2 ist nicht geklärt.

## 1.5. Zielsetzung / Fragestellung

Die bisherigen biochemischen Analysen zur Funktion von AP2, zu der zahlreiche Arbeitsgruppen beigetragen haben, belegen dass  $\text{Ptlns}(4,5)\text{P}_2$  eine wichtige Bedeutung bei der Membranrekrutierung hat. Die Arbeiten zeigen außerdem, dass die Phosphorylierung von Thr156 in der  $\mu$ 2-Untereinheit die Erkennung von Sortierungssignalen des Yxx $\Phi$ -Typs stark moduliert. Zusätzlich wurde aus der Strukturanalyse von AP2 deutlich, dass eine erhebliche Konformationsänderung erforderlich sein muss, um das Membranbindungsverhalten von AP2 erklären zu können.

Im ersten Teil dieser Arbeit sollten neue Strukturdaten über AP2 im Hinblick auf ihre funktionelle Relevanz überprüft werden. Im Mittelpunkt stand dabei die Umlagerung im AP2-Komplex und die Auswirkung auf die Bindung von  $\text{Ptlns}(4,5)\text{P}_2$  und die Sortierungssignale von Membranproteinen.

Der zweite Teil betrifft die Anteile der beiden großen AP2-Untereinheiten, die nicht Teil des Core-Komplexes sind, also die Hinge/Ear-Regionen von  $\alpha$ - und  $\beta$ 2-Adaptin. Es sollte versucht werden, mögliche Phosphorylierungsstellen in diesen Regionen einzugrenzen und zu identifizieren. Außerdem sollte analysiert werden, ob die Hinge/Ear-Bereiche mit der Core-Einheit von AP2 interagieren.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Materialien

#### 2.1.1. Geräte

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

Reinstwasseranlage	Optilab®	MembraPure
Sicherheits-Werkbank	HeraGuard	Heraeus
SPR basiertes Biosensorsystem	Biacore®3000	GE Healthcare
	Biacore®100	GE Healthcare
Rotoren		
Kühlzentrifuge	JA-10	Beckman
	JA-20	Beckman
	SS-34	Sorvall
Ultrazentrifuge	TI-45	Beckmann
	TLA-100.3	Beckman
	TLA-55	Beckman
Schüttelinkubator	Innova™4230	NewBrunswickScientific
Schüttelplattform	KS 260 basic	IKA
Spannungsgerät		Bio-Rad
Spektralphotometer	SmartSpec™3000	Bio-Rad
Stickstofftank für Zellagerung	Locator4Plus	LabTrader™
Thermoschüttler	Thermomixer5436	Eppendorf
Transilluminator	Model TFM-20	UVP
Ultraschallgeräte	Sonifier 450	Branson
	Transsonic 570	Elma
	UP200S	Dr.Hielscher GmbH
Vortex	Genie2	Bender&Hobein AG
Waage	BP610	Sartorius
Wasserbad	MP	Julabo
Wipptisch	PlatformRockerStr6	Stuart
Zellaufschlußgerät	Emulsiflex C3	Avestin
Zentrifugen		
Kühlzentrifugen	Biofuge fresco	Heraeus
	Megafuge 1.0 R	Heraeus
	RC5Cplus	Sorvall
Tischzentrifuge	5415D	Eppendorf
Ultrazentrifugen	Optima™L-70K	Beckman
	Optima™TLX	Beckman

## 2.1.2. Verbrauchsmaterialien

Alluminiumfolie		Roth
Cellophanfolie		Pütz Folien
Dialyseschläuche (MWCO 8-10 kDa)	Spectra/Por <sup>®</sup>	Labomatic AG
Einfrierröhrchen	CryoTube <sup>™</sup> Vials	Nunc
Einmalspritzen	Discardit <sup>™</sup> II	Beckton Dickinson
Einwegkanülen	Sterican	Braun
Elektroporationsküvette		Molecular BioProducts
ELISA-Platten, 96 Loch	PS Microplatte	Greiner Bio-one
Extruder-Membranen, 100 nm	PC Membrane	Avestin
Gewebekulturschalen	15cm	Nunc
Gewebekulturflaschen	75cm <sup>3</sup>	Nunc
Glasröhrchen	klein, 1ml	Fisherbrand
	Groß, 10ml	Corning
Konzentratoren (MWCO 10 kDa)	Amicon <sup>®</sup> Ultra	Millipore
Küvetten	PS 1,5 ml halbmikro	Plastibrand <sup>®</sup>
Magnetrührgerät	MR 3001	Heidolph
Nitrozellulose-Membran (0,1 µm Protran)		Schleicher & Schuell
Objektträger und Deckgläschen		Thermo Scientific
Parafilm <sup>®</sup>		AmericanNationalCan <sup>™</sup>
Pasteur-Pipetten		Roth
PCR-Reaktionsgefäße 0,2 ml		Sarstedt
Petrischalen		Sarstedt
Pipettenspitzen 10+1000 µl	Diamond D10+1000	Gilson
Pipettenspitzen 200 µl		Sarstedt
Pipettierhilfen-Filtereinsatz, 0,45 µm		Integra Biosciences
Reaktionsgefäße 0,5+1,5+2 ml		Sarstedt
Sensorchips		
für das Biacore <sup>®</sup> 3000:	L1	GE Healthcare
für das Biacore <sup>®</sup> T100:	L1	GE Healthcare
Skalpelle, steril		Braun
Sterilfilter:		
<i>Bottle-top</i> -Filter, 0,2 µm		Sarstedt
Pufferfilter, 0,2 µm		Millipore

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

### 2.1.3. Chemikalien

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

Acetonitril	Roth
Adenosindiphosphat	Sigma
Adenosintriphosphat	Sigma
Agar	Roth
Agarose	Roth
Albumin aus Rinderserum	Roth
Albumin aus Rinderserum, Fettsäurefrei	Sigma
Ammoniumperoxodisulfat	Roth
β-Mercaptoethanol	Sigma
Bromphenolblau	Bio-Rad
Butanol	Roth
Calyculin A	Calbiochem
Cantharidin	Calbiochem
Calciumchlorid	Roth
CHAPS	Roth
Chloroform	Roth
Coomassie Blau R 250	Serva
Dimethylformamid	Roth
Dimethylsulfoxid	Sigma
DTT	Roth
EDC	Biacore

EDTA	Roth
Epoxomicin	Calbiochem
Essigsäure	Roth
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	Roth
Ficoll ®400	Amersham
Glutaraldehyd	Roth
Glycerin	Roth
Glycin	Roth
Guanosindiphosphat	Sigma
Guanosintriphosphat	Sigma
Hefe-Extrakt	Roth
HEPES	Roth
HPLC-Wasser	J.T.Baker
Imidazol	Roth
IPTG	Roth
Isopropanol	Roth
Kaliumacetat	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth
Kaliumchlorid	Roth
Kaliumhydroxid	Roth
Kupfer-II-sulfat-Pentahydrat	Roth
Lactacystin	Calbiochem
L-Arginin	Roth
L-Cystein	Roth
Lysozym	Merck
Magnesiumchlorid	Roth
Methanol	Roth
MOPS	Roth
Natriumacetat	Roth
Natriumborat	Roth
Natriumcacodylat	Roth
Natriumchlorid	Roth
Natriumdihydrogenphosphat	Roth

Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Natriumformiat	Roth
Natriumhydrogencarbonat	Roth
Natriumhydroxid	Roth
Natriumsulfat	Roth
NHS	Biacore
N-Hexan	Roth
Okadasäure	Calbiochem
Ortho-Phosphorsäure	Roth
Paraformaldehyd	Merck
PMSF	Sigma
Saccharose	Roth
Salzsäure	Roth
Saponin	Roth
Stickstoff, flüssig	Messer Griesheim
Stickstoff, gasförmig	Linde Gas
Sulforhodamin B	Sigma
TEMED	Serva
Trichloressigsäure	Roth
Trifluoressigsäure	Fluka
Tris	Roth
Trypsin (sequence grade)	Promega
Tryptan-Blau	Sigma
Trypton	Roth
Tween 20	Sigma

## **2.1.4. Molekularbiologische Materialien**

### **2.1.4.1. Reagenzien und Fertiglösungen**

DNA-Größenstandard	Invitrogen, Fermentas
--------------------	-----------------------

### **2.1.4.2. Antibiotika**

Kanamycin	Sigma
Ampicillin	Serva

### 2.1.4.3. Bakterien

Als Bakterienstämme wurden die *E. coli* Stämme *DH5α*, *JM-110*, *XL-1 Blue* und *BL21 DH3* kultiviert.

### 2.1.4.4. Enzyme

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

Tabelle 2.1.: Liste der verwendeten Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonuklease	Erkennungssequenz	Herkunft
ApoI	R_AATTY	NEB
BamHI	G_GATCC	Jena Bioscience
Bsu36I	CC_TNAGG	NEB
EcoRI	G_GATCC	Jena Bioscience
KpnI	GGTAC_C	Jena Bioscience
NotI	GC_GGCCGC	Jena Bioscience
Sall	G_TCGAC	Jena Bioscience

T4-DNA-Ligase	NEB
Proof start DNA Polymerase	Qiagen
Reverse Transkriptase	Qiagen

### 2.1.4.5. Kits

Direct m-RNA Kit	Qiagen
Omniscript-Reverse Transkriptase Kit	Qiagen
ProofStart DNA Polymerase Kit	Qiagen
QIA-Plasmid MaxiKit	Qiagen
QIA-Plasmid Midi Kit	Qiagen
QIA-Plasmid Mini Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
Quick Change Site Directed Mutagenesis Kit	StrataGen
RNeasy Kit	Qiagen

## 2.1.4.6. Nukleotide/ Oligonukleotide

dNTPs	Promega
siRNAs	Ambion
Oligo-dt-Primer	Qiagen
Primer	Metabion

Tabelle 2.2.: Sequenzierprimer

Name	DNA_ Position (bp)	Orientierung	Sequenz (5'-3')
SH354	AP2B1_350	5'	ACAGAATATCTCTGTGAGCCGCTCC
SH355	AP2B1_400	3'	GATCCTCATCCTTCAAGCACTTGC
SH356	AP2B1_950	5'	CTTGAAGCAGGAAATCAAAGTCTTC
SH357	AP2B1_1000	3'	CCTGAGCAATGTTGGCTTGAGAT
SH358	AP2B1_1450	5'	CTGCTTACTGCCATAGTGAAGCTG
SH359	AP2B1_1600	3'	CTGTAACAGGGTCAGTTGAGAGAAGGC
SH360	AP2B1_2150	5'	GCACCTGGTGGATATGTGGCTCC
SH361	AP2B1_2400	3'	TCACAGCCACCTGGAGGTTATTCAG
SH362	AP2B1_2600	5'	GCTGACACTGTTTCCAGCAAGTTGC
SH399	AP2A1_600	5'	ATGGGTGTGGTCACG
SH400	AP2A1_1100	5'	GACGCACATTGACACC
SH401	AP2A1_1600	5'	GCAGCGTGGCCACGC
SH402	AP2A1_2000	5'	GCTTCTGCAGGAGCAG
T3-Primer	T3-Promoter		ATTAACCCTCACTAAAGGGA
T7-Primer	T3-Promoter		TAATACGACTCACTATAGGG
SP6-Primer	SP6-Promoter		CACAGGAAACAGCTATGACC

Tabelle 2.3.: Primer

Primer	Orientierung	Sequenz (5'-3')	Beschreibung
SH346	5'	ACAGCGGCCGCATGACTGACTCCAA GTATTTACA	AP2B1 mit NotI
SH347	3'	GTCGACGTTTTTCAAATGCTGTCGT AGAC	AP2B1 mit Sall
SH348	5'	TCGACTATCCATATGATGTTCCAGAT TATGCATAAGGTAC	AP2B1 Sall, HA, Stop und KpnI
SH349	3'	CTTATGCATAATCTGGAACATCATAT GGATAG	AP2B1 Sall, HA, Stop und KpnI
SH479	5'	AATTGAAAACCTCTACTTCCAGAGTG C	AP2B1 TEV für Apol

## Material und Methoden

SH480	3'	AATTGCACTCTGGAAGTAGAGGTTTT C	AP2B1 TEV für Apol
SH393	3'	GACAGCCTTAGGAGCCACCTGAGGC TGTTCCAGGTTTCG	AP2B1 Δ686-721
SH394	3'	GACAGCCTTAGGAGCCACCATGGAG GACACCTGTGG	AP2B1 Δ655-721
SH396	3'	GACAGCCTTAGGAGCCACTGGGATG AAGGATTGTCCCAC	AP2B1 Δ624-721
SH397	5'	GTGGCTCCTAAGGCTGTCTGGCTAC CTGCAGTAAAGGC	AP2B1 Überhang -721
SH395	3'	GGGATGAAGGATTGTCCCACCAGAC TATCTAGTCCTCCTCC	AP2B1 Δ664-677
SH398	5'	GTGGGACAATCCTTCATCCCATCATC GGTCCCTG	AP2B1 Überhang -677
SH386	5'	CCGCCCCGGTCCCCGCTTGCCA	5'UTR_AP2A1
SH387	5'	CGCTCCTCCGCCCCGGGTCCG	5'UTR_AP2A2
SH388	5'	ATGCCGGCCGTGTCCAAGGG	5' TR_AP2A1/2
SH389	3'	TCAGAACTGCTGTGCCAGCA	3' TR_AP2A1
SH390	3'	CTAAAACCTGCGCTGAGAGCA	3' TR_AP2A2
SH391	3'	CATCCCAGGCATCCCCCAAAC	3'UTR_AP2A1
SH392	3'	CACAGACGAAGACAACACAAGACAC A	3'UTR_AP2A2
SH517	5'	CAGCACTGTGGCGGCGCCCGCGCC TCCGC	AP2A1 S652A, T653A, S655A
SH518	3'	GCGGAGGGCGCGGGCGCCGCCACA GTGCT	AP2A1 S652A, T653A, S655A
SH481	5'	TGATGAAAACCTCTACTTCCAGGGAG T	AP2A1 TEV für Bsu36I
SH 482	3'	TCAACTCCCTGGAAGTAGAGGTTTTTC	AP2A1 TEV für Bsu36I
SH432	3'	ACTCTGGAAGTAGAGGTTTTCTCCA GCACCGTGGCCA	AP2A1_N-terminal Hinge TEV
SH433	5'	GAAAACCTCTACTTCCAGAGTGAGAT GCCGCCCTT	AP2A1_N-terminal Hinge TEV
SH436	5'	AGCAGCAACGACATCAACGGGTTTG TGTGTAAGAACAACGGGGT	AP2A1 Δ643-723
SH437	3'	ACCCCGTTGTTCTTACACACAAACCC GTTGATGTCGTTGCTGCT	AP2A1 Δ643-723

Tabelle 2.4.: siRNAs

Name	Protein	Bindungsstelle	sense Sequenz (5'-3')
AP2B1_1	AP2B1	3'UTR	CTACAAAGGAGAAAGATAA
AP2B1_2	AP2B1	3'UTR	GCTTAGAGATGTTGCAAAT
AP2B1_3	AP2B1	3'UTR	GGATACAAGTAGTGCAGAA
AP2A1_1	AP2A1	3'UTR	AGAGAAGACACCAGGGUUUUU
AP2A1_2	AP2A1	3'UTR	GAGCGAAUAAACAGAGAGAUU
AP2G1_A	AP2G1	Translationsregion	UAUCCGAGGCAUGAUGAAAtt
AP2G1_B	AP2G1	Translationsregion	GGAUUUUCCUUAAAGUUACUtt
TIP47-1	TIP47	Translationsregion	CAGAGCUACUUCGUACGUctt

### 2.1.4.7. Plasmide

Folgende Plasmide mit enthaltender cDNA wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt:

pOTB7-AP2B1	RZPD
pGEX4T2-GST-VHS	Dr. D. J. Owen
pGEX4T2-GST-VHS-GAT	Dr. D. J. Owen
pGEX4T2-GST-GAT	Dr. D. J. Owen
pMWHis6-Arf6 $\Delta$ 1-13(Q67L) dominant negativ	Dr. D. J. Owen
pMWHis6-Arf6 $\Delta$ 1-13(T27N) dominant aktiv	Dr. D. J. Owen

Die in dieser Arbeit genutzte  $\alpha$ -Adaptin c-DNA, wurde durch RT-PCR aus der mRNA von *HeLa*-Zellen gewonnen und zunächst in den pCR4-Topo-Vector (Invitrogen) ligiert. Für die Klonierungen aller weiteren  $\alpha$ -Adaptin-Konstrukte (AP2A1) wurde das Plasmid pCDNA3 (Invitrogen) und für die Klonierungen aller  $\beta$ 2-Adaptin-Konstrukte (AP2B1) das Plasmid pCMV-Script (Stratagene) genutzt (Abb.2.1.)

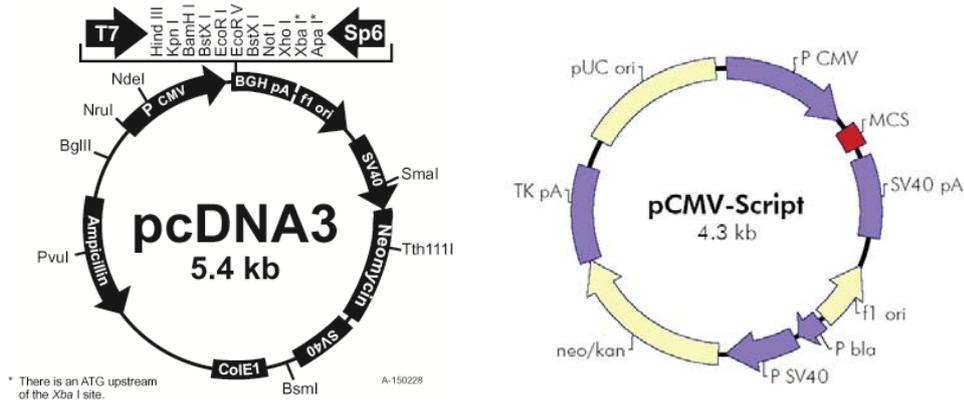


Abb.2.1.: Vektorkarten von pcDNA3 und pCMV-Script

### 2.1.4.8. AP2-Mutanten

Während dieser Arbeit wurden verschiedene Mutanten von  $\alpha$ - und  $\beta$ 2-Adaptin generiert. Das angegebene  $\alpha$ -Konstrukt mit HA-Tag wurde in den pcDNA3-Vektor mittels BamHI und EcoRI ligiert. Das angegebene  $\beta$ 2-Konstrukt ohne Tag mittels NotI und Sall. Über Sall und KpnI wurde anschließend ein HA-Tag inseriert. Diese Konstrukte dienten als Vorlage für Mutationen die mittels *overlap-extension PCR*, *site-directed mutagenesis*, oder durch Insertion hybridisierter Oligonukleotide durchgeführt wurden. Eine Liste der so generierten Mutanten ist in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle 2.5.: Liste der in dieser Arbeit generierten AP2-Mutanten

Konstrukt	Beschreibung
AP2A1_HA	$\alpha$ -Adaptin HA-getagged
AP2A1_Δ643-723_HA	Deletionsmutante
AP2A1_N-TEV_HA	TEV-Schnittstelle eingefügt nach AS600
AP2A1_Bsu-TEV_HA	TEV-Schnittstelle eingefügt über Bsu361 (nach AS 710)
AP2A1_S652A_T653A_S655A_HA	Alaninmutanten der putativen Phosphorylierungsstellen
AP2A1_S655A_HA	Alaninmutanten der putativen Phosphorylierungsstellen
AP2B1_HA	$\beta$ 2-Adaptin HA-getagged
AP2B1_Δ624-721_HA	Deletionsmutante
AP2B1_Δ655-721_HA	Deletionsmutante
AP2B1_Δ686-721_HA	Deletionsmutante
AP2B1_ApoI-TEV_HA	TEV-Schnittstelle eingefügt über ApoI-Schnittstelle (nach AS 588)
AP2B1_Δ686-721_ApoI-TEV_HA	TEV-Schnittstelle eingefügt über ApoI in Deletionsmutante
AP2B1_Δ664-677_HA	Deletion zur 14 AS verkürzten $\beta$ 2-Splice-Variante

## 2.1.5. Biochemische Materialien

### 2.1.5.1. Säulen

Hydroxyapatit Typ II 20µm	Bio-Rad
Profinia IMAC	Bio-Rad
Profinia P6 Entsalzungssäule	Bio-Rad
Superose 6	GE Healthcare

### 2.1.5.2. Reagenzien und Fertiglösungen

Acrylamid-Lösung, Rotiphorese®Gel30	Roth
Anti-HA-Sepharose	Sigma
Biacore <i>Maintenance Kit, type 2</i>	GE Healthcare
BIA <i>desinfectant solution</i>	GE Healthcare
BIA <i>desorb solution 1</i>	GE Healthcare
BIA <i>desorb solution 2</i>	GE Healthcare
Bradford-Reagenz	Bio-Rad
DC Protein-Assay	Bio-Rad
Chemilumineszenz Reagens ( <i>Super Signal®West Dura Reagens</i> )	Pierce
Glutathion Sepharose	GE Healthcare
Ni-NTA-Agarose	Qiagen
Phosphatase Inhibitor Cocktail	
I	Sigma
II	Sigma
III	Calbiochem
Protease Inhibitor Cocktail (für bakterielle und Säugerzellen)	Sigma
Protein-A-Agarose fast flow	Sigma
Protein-Größenstandard (Precision Plus Protein™ Standard)	Bio-Rad

### 2.1.5.3. Standard-Puffer

Hepes-Puffer: 20 mM Hepes; 150 mM NaCl	pH 7,2
PBS: 140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8,1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 1,5mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	pH 7,4

MES-Puffer: 0,1M MES, 1mM EGTA, 0,5 mM MgCl<sub>2</sub> pH 6,5

Biacore-Puffer:

Core-Puffer: 10 mM Tris, 250 mM NaCl pH 8,7

μ-Puffer (niedrig Salz): 10 mM Hepes, 250 mM NaCl pH 7,4

μ-Puffer (hoch Salz): 10 mM Hepes, 500 mM NaCl pH 7,4

HBS-N Puffer (Biacore): 10 mM Hepes, 150 mM NaCl pH 7,5

### 2.1.5.4. Radioaktive Substanzen

[ <sup>33</sup> P]-γ-ATP	Hartmann Analytik
[ <sup>33</sup> P]-Orthophosphat	Hartmann Analytik
[ <sup>32</sup> P]-γ-ATP	Hartmann Analytik
[ <sup>32</sup> P]-Orthophosphat	Hartmann Analytik

### 2.1.5.5. Lipide

MPB-PE	Avanti
Ni-NTA-Lipid (DOGS-NTA-Ni)	Avanti
Phosphatidylcholin	Sigma
Phosphatidylethanolamin	Sigma
PtdIns4,5P <sub>2</sub> (aus Schweinehirn)	Avanti

### 2.1.5.6. Peptide

#### Synthetische Peptide

Die Peptide wurden von Jerini synthetisiert, mit einem Reinheitsgrad von >95%.

Tabelle 2.6.: Liste der verwendeten synthetischen Peptide (\* p=Phosphorylierung)

Peptid	Spezies	Sequenz	(g/mol)
TGN38	Ratte	CKVTRRPKASDYQRL	1819,96
TGN38 (kurz)	Ratte	DYQRLN	807,80
CD-4	Human	CHRRRQAERM <b>SQIKRLLSEK</b>	2604,32
pCD-4	Human	CHRRRQAERM <b>p</b> <b>SQIKRLLSEK</b>	2604,40

## Rekombinante Peptide

Folgende Peptide, die wegen ihrer Größe nicht synthetisch hergestellt werden konnten, wurden von Dr. David Owen (Cambridge, UK) rekombinant exprimiert, gereinigt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Tabelle 2.7.: Liste der verwendeten rekombinanten Peptide

Peptid	Sequenz	(g/mol)
WT (YxxΦ + ExxxLL)	MHHHHHMHHHHHHSKVTRRPKASDY <b>QRL</b> NAATSTPATQGSSAGGA GSLASNPTAASAGGPASE <b>EIKRLL</b> SEGSGSYPYDVPDYA	8745,50
YxxΦ + ExxxAA	MHHHHHMHHHHHHSKVTRRPKASDY <b>QRL</b> NAATSTPATQGSSAGGA GSLASNPTAASAGGPASE <b>EIKRAA</b> SEGSGSYPYDVPDYA	8661,34
AxxA + ExxxLL	MHHHHHMHHHHHHSKVTRRPKASD <b>AQR</b> ANAATSTPATQGSSAGGA GSLASNPTAASAGGPASE <b>EIKRLL</b> SEGSGSYPYDVPDYA	8611,32
AxxA + ExxxAA	MHHHHHMHHHHHHSKVTRRPKASD <b>AQR</b> ANAATSTPATQGSSAGGA GSLASNPTAASAGGPASE <b>EIKRAA</b> SEGSGSYPYDVPDYA	8527,12
W15	MHHHHHMHHHHHHSKVTRRPKASDY <b>QRL</b> NAATSTPASAGGPASE <b>EIKRLL</b> SEGSGSYPYDVPDYA	7295,88
W25	MHHHHHMHHHHHHSKVTRRPKASDY <b>QRL</b> NAATSTPATQGSSNPTA ASAGGPASE <b>EIKRLL</b> SEGSGSYPYDVPDYA	8210,80
W45	MHHHHHMHHHHHHSKVTRRPKASDY <b>QRL</b> NAATSTPATQGSSNPTA ASGTNGGSLGSGSLASNPTAASAGGPASE <b>EIKRLL</b> SEGSGSYPYDVPD YA	9898,52

### 2.1.5.7. Proteine

Folgende rekombinante „heterotetramere“ Adaptorkomplexe, aus den unten angegebenen Untereinheiten, wurden von Dr. David Owen (Cambridge, UK) exprimiert, gereinigt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt:

AP2 core:

α-GST (1-621)	Maus
6xHis-β2 (1-591)	Human
μ2 (interner Myc-tag)	Ratte
σ2	Maus

AP2-core ohne His (wie AP2 core, β2 ohne His)

AP2 beta full (wie AP2 core, β2 mit “Hinge” und “Ear” )

$\beta$ 2-PIP- core (wie AP2 core, Lys5,12,26,27,29,36 → Glu5,12,26,27,29,36)

$\mu$ 2(1) 5K>E- core (wie AP2 core, Lys 330,334,350,352,354,356,365,367,368,373 → Glu350,352,354,367,368,373)

$\mu$ 2(2) KRR>E- core (wie AP2 core, Lys167,Arg169,170,Lys421 → Glu167,169,170)

$\mu$ 2 PIP- core (wie AP2 core,  $\mu$ 2(1) +  $\mu$ 2(2))

Folgendes rekombinante Protein wurden von Kira Späte kloniert (Späte, 2007) und von Dominic Teichert (Universität zu Köln) exprimiert, gereinigt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt:

Lösliches  $\mu$ 2-Fragment mit N-terminalem His-Tag (His- $\mu$ 2: AS 158-435)

Folgendes rekombinante Protein wurden von David Owen (Cambridge, UK) exprimiert, gereinigt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt:

$\mu$ 2-Kette ohne His-Tag (AS 158-435)

## 2.1.6. Antikörper

Tabelle 2.8.: Liste der verwendeten Primärantikörper

Name	Antigen	Verdünnung		Immunisierte Spezies	Herkunft
		WB	IF		
$\alpha$ -AP	AS 38-215 von $\alpha$ <sub>A</sub> -Adaptin, mouse	1 :2000	1 :100	Maus Monoklonal	Transduction
AP6	$\alpha$ -Adaptin „ear“-Domäne	-	1 :20	Maus Monoklonal	F. M. Brodsky
$\beta$ <sub>1/2</sub> -AP	AS 75-245 von $\beta$ -Adaptin, human	1 : 2000	1 :100	Maus Monoklonal	Transduction
$\beta$ <sub>2</sub> -AP	AS 588-606 von $\beta$ <sub>2</sub> -Adaptin, human	1 :500	1 :50	Kaninchen Polyklonal	ABR
$\gamma$ -AP	AS 642-821 von $\gamma$ -Adaptin, mouse	1 :2000	1 :100	Maus Monoklonal	Transduction
FLAG	Flag-Peptid	1 :1000	1 :200	Maus Monoklonal	GenSkript
GAPDH	aufgereinigtes GAPDH, Kaninchen	1 :25000	-	Maus Monoklonal	Chemicon

## Material und Methoden

à-HA	HA-Peptid	1 :500	1 :50	Ratte Monoklonal	Roche
à-HA	HA-Peptid	1 :1000	1 :100	Maus Monoklonal	Covance
à-HA	HA-Peptid	1 :250	1 :200	Kaninchen Polyklonal	Zymed
à-μ <sub>2</sub> -AP	Aufgereinigtes μ <sub>2</sub> , Schweinehirn	1 :500	-	Kaninchen Polyklonal	AG Höning
à-TfR	Transferrinrezeptor, N-terminus, human	1 :10000	1 :500	Maus Monoklonal	Invitrogen
à-TIP47	Rekombinantes His- TIP47, human	1 :5000	1 :1000	Kaninchen Polyclonal	AG Höning

Tabelle 2.9.: Liste der Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenz

Name	Verdünnung in IF	Herkunft
Ziege- à –Maus-Alexa488	1:400	Invitrogen
Ziege- à –Maus-Alexa546	1:400	Invitrogen
Ziege- à –Kaninchen-Alexa488	1:400	Invitrogen
Ziege- à –Kaninchen-Alexa546	1:400	Invitrogen

Tabelle 2.10.: Liste der Sekundärantikörper für den Western-Blot

Name	Verdünnung in WB	Herkunft
Ziege- à –Maus- HRP	1:2000	Dianova
Ziege- à –Kaninchen- HRP	1:2000	Dianova
Ziege- à –Ratte- HRP	1:2000	Dianova

## 2.1.7. Zellbiologische Materialien

### 2.1.7.1. Reagenzien und Fertiglösungen

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

### 2.1.7.2. Medien und Zusätze

DMEM ( <i>Dulbecco modified eagle medium, high Glucose</i> )	Gibco
DMEM ohne Phosphat, ohne Pyruvat	Gibco
DMEM ohne Phosphat, ohne Glucose	Gibco
PBS	Gibco
Optimem	PAA
FCS	PAA
Trypsin/EDTA 1x	Gibco
Penicillin/Streptomycin (100x = 10.000U/ml)	Gibco
G418 (Geneticindisulfat)	PAA

### Standardmedium

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

### 2.1.7.3. Zelllinien

**HeLa**-Zellen (ATTC: CCL 2) sind menschliche epithelartige Zellen. Sie wurden aus einem Zervix-Karzinom, später als Adenokarzinom diagnostiziert, isoliert. Die Bezeichnung der Zellen geht auf den Namen der Patientin, **Henrietta Lacks**, zurück.

**HEK 293**-Zellen (ATTC: CRL-1573) sind das Transformationsprodukt menschlicher Nierenzellen mit Teilen des menschlichen Adenovirus 5. Der Name steht für „**H**uman **E**mbryonic **K**idney“. Die Epithelzellen wachsen adhärent.

## 2.1.8. EDV

Adobe Photoshop CS3	Adobe Systems Inc.
Adobe Reader 7.0	Adobe Systems Inc.
AIDA Image Analyzer	Raytest
ÄKTA-Unicorn	GE Healthcare
AlphaEase FC	Alpha Innotech
Biacore 3000 BIAevaluation 4.1	GE Healthcare
Biacore 3000 Control Software 4.1	GE Healthcare
Biacore T100 Control Software	GE Healthcare
Biacore T100 Evaluation Software	GE Healthcare
Endnote	Thomson
LAS AF Lite	Leica
Magellan2	Tecan
Vector NTI	Invitrogen
Office 2003	Microsoft
Windows XP	Microsoft

## 2.2. Molekularbiologische Methoden

### 2.2.1. Kultivierung von *E. coli*

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

LB-Agarplatten:

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

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

## 2.2.2. Herstellung kompetenter Zellen

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

### Herstellung elektrokompetenter *E. coli* Zellen

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

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

## Herstellung chemokompetenter *E. coli* Zellen (CaCl<sub>2</sub>-Methode)

Puffer I:

- 100 mM RbCl
- 50 mM KCl
- 30 mM KAc
- 15 % (v/v) Glycerin
- pH 5,8 mit Essigsäure einstellen

Puffer II:

- 10 mM MOPS; pH 7
- 10 mM RbCl
- 75 mM CaCl<sub>2</sub>
- 15 % (v/v) Glycerin

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

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

### 2.2.3. Transformation von *E. coli* mit Plasmid DNA

SOC-Medium:

- 2 g Trypton
- 0,5 g Hefe Extrakt
- 60 µg NaCl
- 19 mg KCl
- 0,2 g MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O
- add 100 ml A. bidest
- autoklavieren

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

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

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

### **Transformation in chemokompetente *E. coli* Zellen**

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

### **2.2.4. Isolierung von Plasmid DNA aus *E. coli***

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

### **2.2.5. Anlegen einer Glycerinkultur**

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



Puffer. Der im Gel enthaltene, fluoreszierende Farbstoff Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und markiert dadurch die DNA-Banden im Gel. Diese wurden auf einem UV-Transilluminator, durch die Fluoreszenzanregung von Ethidiumbromid mit UV-Licht ( $\lambda=366$  nm), sichtbar gemacht und photographisch dokumentiert.

### **2.2.8. DNA Extraktion aus Agarosegelen**

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

### **2.2.9. Hydrolyse von DNA mit Restriktionsenzymen**

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

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

### **2.2.10. Hybridisierung von Oligonukleotiden**

Die Hybridisierung von Oligonucleotiden ermöglicht die Generierung kurzer doppelsträngiger DNA-Fragmente aus einsträngigen Oligonukleotiden. Diese können Anschließend z.B. einen geschnittenen Vektor ligiert werden. Durch das Fehlen des PCR-Schrittes verringert sich das Risiko von Mutationen maßgeblich. Zur Hybridisierung wurden beide Oligonukleotide in gleicher Molarität in Oligonukleotid-Hybridisierungspuffer (50 mM Hepes, 100 mM NaCl pH 7,2) eingesetzt. Der Ansatz wurde für 3 Minuten im Heizblock auf 95°C erhitzt. Im Anschluss wurde der

Heizblock abgeschaltet und der Ansatz langsam auf  $<30^{\circ}\text{C}$  abgekühlt. Die Hybridisierung der Oligonukleotide konnte im Anschluss mittels eines 12%igen Acrylamidgels kontrolliert werden. Hierfür wurde ein Aliquot des Ansatzes in DNA-Probenpuffer (2.2.7.) aufgenommen, auf das Acrylamidgel aufgetragen und dieses in einer SDS-Gelkammer in 0,5xTBE-Puffer bei einer Spannung von 180V laufen gelassen. Nach Beendigung der Auftrennung wurde das Gel in eine wässrige Lösung von Ethidiumbromid (Endkonzentration von  $0,5\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) gegeben. Die Entfernung von überschüssigem Ethidiumbromid erfolgte im Wasserbad. Durch die Einlagerung des Ethidiumbromids in die große Furche der Doppelhelix konnte die DNA auf einem UV-Transilluminator, durch die Fluoreszenzanregung von Ethidiumbromid mit UV-Licht ( $\lambda=366\ \text{nm}$ ), sichtbar gemacht werden.

12%iges Acrylamid-Gel	1,5 ml Acrylamid-Lösung, Rotiphorese®Gel30
	2,75 ml H <sub>2</sub> O
	500 $\mu\text{l}$ 5xTBE-Puffer
	50 $\mu\text{l}$ APS
	5 $\mu\text{l}$ TEMED
5xTBE-Puffer:	445 mM Tris Base pH 8
	445 mM Borsäure
	10 mM EDTA-Na <sub>2</sub>

### 2.2.11. Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation ermöglicht die Verknüpfung ursprünglich getrennter, linearer DNA-Fragmente durch das Enzym DNA-Ligase. DNA-Ligasen wie die T<sub>4</sub>-DNA-Ligase des Bakteriophagen T<sub>4</sub> von *E. coli* katalysieren die Veresterung von 5'-Phosphat-Enden und 3'-Hydroxyl-Enden der DNA in Anwesenheit von ATP als Kofaktor. Dabei benötigt die Ligation von glatten DNA-Enden eine höhere Enzymkonzentration als die Ligation überhängender DNA-Enden. Zur Herstellung der Expressionsvektoren enthielt der Reaktionsansatz geschnittenen Vektor und Insert im molaren Verhältnis von 1:5 und T<sub>4</sub>-DNA-Ligase nach Angaben des Herstellers mit dem entsprechenden Puffer. Ligierte wurde der Ansatz für mindestens eine Stunde bei RT.

## 2.2.12. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mittels PCR kann man spezifische DNA-Fragmente *in vitro* amplifizieren. Die Methode basiert auf der enzymatischen Vermehrung eines DNA-Abschnittes zwischen zwei Oligonukleotid-Primern, die gegenläufig an komplementäre DNA-Stränge gebunden sind. Die Amplifikation erfolgte mit Hilfe von thermostabilen DNA-Polymerasen z.B. der *Taq*-Polymerase des thermophilen Bakteriums *Thermophilus aquaticus*. Für eine exponentielle Vermehrung der DNA-Matrize müssen folgende Schritte wiederholt durchgeführt werden:

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

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

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

Ein PCR-Ansatz enthielt:

- 5 µl 10x PCR-Puffer
- 1 µl PCR-dNTP-Mix (je 200 µM)
- 10 pmol Primer 1
- 10 pmol Primer 2
- 1-10 ng Ausgangs-DNA
- 1 µl ProofStart™DNA Polymerase

und wurde mit sterilem A. bidest auf 50 µl aufgefüllt.

Bsp. eines PCR-Programms:

95°C 5min Aktivierung der Polymerase

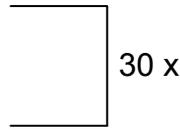
95°C 30 sek (Denaturierung)

58°C 30 sek (Annealing)

72°C 1min (Elongation)

72°C 10 min (Termination)

4°C Pause



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

## 2.2.13. Gezielte Mutagenese

Bei der gezielten Mutagenese wird mit Hilfe von rekombinanter DNA eine gezielte Veränderung der DNA ermöglicht.

### ***Site-directed-mutagenesis***

Durch die Methode der *site-directed-mutagenesis* können durch die Nutzung spezifischer Primer mit hoher Schmelztemperatur, mittels PCR gezielt Basen auf der DNA ausgetauscht, deletiert oder inseriert werden. Hierzu wurde das Quick Change Site Directed Mutagenesis Kit von Stratagene nach Angaben des Herstellers genutzt und die entsprechenden Primer auf der Herstellerseite online erstellt.

### ***Overlap-extension-PCR***

Die Methode der *Overlap-extension-PCR* wurde zuerst durch Sambrook *et al.* beschrieben (Sambrook, 1989). Sie beinhaltet die Entwicklung zweier mutagenen Primer. Beide Primer enthalten eine, die Mutation flankierende Region, den Überhang, in der Sie vollständig komplementär zueinander sind und eine Region mit der gewünschten Mutation. Der Überhang sollte 15-25 Basenpaare umfassen. Beide Primer werden zunächst in einer separaten PCR-Reaktion eingesetzt in der sie doppelsträngige DNA-Stücke erzeugen jeweils in 5' Richtung oder 3' Richtung von der gewünschten Mutation plus dem Überhang. Im Anschluß werden nun beide Ansätze vereinigt und ein Aliquot davon in einer weiteren PCR-Reaktion eingesetzt. Hierbei dienen die entstandenen Doppelstränge, die im Überhang komplementär zueinander

sind als Template und Primer der Reaktion, welche das mutierte vollständige Produkt aus beiden Teilen erzeugt. Das PCR-Produkt wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese (2.2.7.) analysiert. Die Reinigung erfolgte durch Extraktion aus dem Agarose-Gel mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kits von Qiagen (2.2.8.).

### **2.2.14. Gewinnung von RNA und m-RNA aus *HeLa*-Zellen**

Die Gewinnung von RNA und m-RNA aus *HeLa*-Zellen erfolgte mit Hilfe des RNeasy und Direct m-RNA Kits von Qiagen nach Angaben des Herstellers.

### **2.2.15. Reverse Transkription**

Die Reverse Transkriptase ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die an einer RNA-Matrize eine komplementäre DNA (cDNA) herstellt. Dabei wurde ein Oligo-dT-Primer verwendet, der mit dem poly(A)-Schwanz am 3`-Ende der mRNA hybridisiert. Zur cDNA-Synthese wurden 2µg Gesamt-RNA oder m-RNA aus *HeLa*-Zellen (2.2.14.) eingesetzt, die mit 2µl 10xRT-Puffer, 2 µldNTP Mix (je 5 mM), 1µl Reverse Transkriptase (4U), 2µl Oligo-dt-Primer (1:100, Endkonzentration 1µM) versetzt und anschließend mit RNase freiem A. bidest auf ein Volumen von 20µl aufgefüllt wurden. Der Ansatz musste für 60min bei 37°C inkubiert und für 5min bei 95°C inaktiviert werden.

### **2.2.16. Reinigung von DNA-Fragmenten**

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

### **2.2.17. DNA Sequenzierung**

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

## 2.3. Biochemische Methoden

### 2.3.1. Aufschluss von Zellen bzw. Gewebe

#### **Ernte von Zellen**

Bei der Ernte von Zellen, wurden diese zuerst 2x mit PBS gewaschen und anschließend für 3-5min mit Trypsin inkubiert, oder mit einem Zellschaber in PBS abgeschabt. Die Trypsin-Reaktion wurde mit serumhaltigen Medium abgestoppt und die Zellen für 5min bei 400xg und einer Temperatur von 4°C sedimentiert. Anschließend wurden die Zellen noch 2x mit kaltem PBS gewaschen. Alle Schritte danach erfolgten auf Eis oder bei 4°C.

#### **Herstellung eines Zellhomogenats**

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

#### **Herstellung eines *post-nuclear supernatant* (PNS)**

Hierfür wurden die Zellen gewaschen, sedimentiert und in einem entsprechenden Volumen Puffer resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen, durch 10 Passagen einer 24G-Kanüle, aufgeschlossen und bei 500xg 5min zentrifugiert, um nicht aufgeschlossene Zellen und die Kernfraktion zu sedimentieren. Der Überstand wurde abgenommen und als PNS weiterverwendet. Der Zellaufschluss wurde mikroskopisch mit Hilfe von Tryptan-Blau analysiert.

#### **Herstellung von cytosolischen Extrakten und Membranfraktionen**

Die Zellen auf den Zellkulturplatten wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und dann in PBS + Proteaseinhibitoren (1:500) abgeschabt und bei 400xg für 5min sedimentiert. Die Zellen konnten nun in einer der gewünschten Proteinkonzentration entsprechenden Menge PBS + Proteaseinhibitoren (PI)(1:500) aufgenommen und mit einer Kanüle (24G) homogenisiert werden. Zur Generierung eines PNS wurde das Homogenat ebenfalls bei 400xg 5min zentrifugiert. Die Trennung der Cytosolischen Zellanteile von den Membranen erfolgte Anschließend durch eine

Zentrifugation bei 100.000xg für 30min. Das Cytosol befand sich danach im Überstand, während das Sediment zelluläre Membranen enthielt.

### **Zell-Lyse durch Detergenzien**

Bei der Lyse mit Detergenzien kam Triton X-100 (0,1-1%) zum Einsatz. Entweder wurde es dem PBS oder entsprechender Lysispuffer nach dem ersten Zentrifugationsschritt zugegeben, um Membranproteine zu extrahieren. In diesem Fall entfiel der Zellaufschluss mit Hilfe einer Spritze, oder detergentzhaltiger Puffer wurde dem Sediment der Ultrazentrifugation zugegeben. In beiden Fällen diente es der Zerstörung der zellulären Membranen.

### **2.3.2. Bestimmung der Proteinkonzentration**

#### **Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Assay**

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

#### **Proteinbestimmung mittels DC-Assay bei Einsatz von Detergenzien**

Der Bio-Rad DC Protein Assay ermöglicht die Proteinbestimmung in Detergenzhaltigen Lösungen. 1ml Reagenz A und 20µl Reagenz S wurden gemischt um Reagenz A' zu erhalten. In einer Mikrotiterplatte wurde anschließend zur Erstellung einer Eichgerade BSA (2, 4, 8, 12, 16 µg) vorgelegt. Außerdem wurden 1 – 8µl der zu bestimmenden Proben auf die Platte gegeben. Nun folgte die Zugabe von 25µl

Reagenz A' und 200µl Reagenz B zu allen Proben. Außerdem wurde ein Leerwert für die Standardreihe benötigt, der nur aus der Mischung der Reagenzien A' und B bestand. Die Ermittlung der Proteinkonzentration erfolgte im ELISA-Reader bei  $\lambda = 750\text{nm}$ . Dem gemessenen Farbumschlag liegt eine Kupfer-Protein-Reaktion in basischen Medium und einer Reaktion des Kupfer-vorbehandelten Proteins mit Folin-Reagenz zugrunde. Die Farbentwicklung entsteht durch die Reduktion von Aminosäuren durch das Folin-Reagenz, hauptsächlich von Tryptophan und Tyrosin.

### **2.3.3. Fällung von Proteinen**

Um ein Protein aus einem großen Puffervolumen in eine geringe Menge Probenpuffer aufnehmen zu können, bedient man sich der Fällung mit Trichloressigsäure (TCA). Dabei wurde der zu fällenden Lösung 10% (v/v) TCA zugesetzt, diese Mischung Anschließend für 2h oder ü.N. auf Eis inkubiert und dann 10min bei 16.000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen, das Sediment mit Natriumacetat (2% NaAc in EtOH) versetzt, welches sofort wieder abgesaugt wurde. Dadurch wurde das TCA vollständig entfernt. Nach dem Trocknen des Sediments an der Luft wurden die Proteine in 10-80µl 2x Proteinprobenpuffer aufgenommen.

### **2.3.4. SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die diskontinuierliche, denaturierende SDS-PAGE nach Laemmli dient zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht (Laemmli, 1970). SDS (Sodiumdodecylsulfat) ist ein anionisches denaturierendes Detergenz, das an hydrophobe Bereiche der Proteinmoleküle bindet (alle 2-3 Aminosäuren) und den Proteinen so eine negative Ladung proportional zum Molekulargewicht verleiht, die auch die Eigenladung des Proteins überlagert. Die meisten Proteine binden etwa 1,4g SDS pro Gramm Protein. Auf der Oberfläche der gebildeten SDS-Protein-Komplexe findet man die negativ geladenen Sulfatgruppen des SDS. Dadurch werden alle Proteine über ein konstantes Ladung/Masse-Verhältnis vergleichbar. Im elektrischen Feld kommt es zur Auftrennung des Proteingemisches. Dabei trennt der Molekularsiebeffekt einer porösen Polyacrylamidmatrix die SDS-Protein-Komplexe nach ihrem Stokes-Radius und damit nach ihrer Molekularen Masse auf. Durch Zugabe von  $\beta$ -Mercaptoethanol werden zusätzlich eventuell vorhandene

Disulfidbrücken reduziert. Es wurde ein diskontinuierliches System verwendet, in dem Proben zuerst in ein nicht-restriktives Sammelgel einlaufen und dann in einem Trenngel aufgetrennt werden. Je nach Größe des nachzuweisenden Proteins wurden Trenngele mit verschiedenen Acrylamidkonzentrationen verwendet. So wurden 12,5%-ige Trenngele für Proteine mit einer Molekularen Masse zwischen 20 und 60kDa, 10%-ige Trenngele für Proteine mit einer Molekularen Masse zwischen 30 und 120kDa und für Proteine mit einer Molekularen Masse über 100kDa wurden 7,5%-ige Trenngele verwendet.

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

Tabelle 2.11.: Pipettierschema für jeweils 2 kleine SDS-Gele.

für 2 Minigele:	Trenngel				Sammelgel
	7,5 %	10 %	12,5 %	15 %	4,5 %
Acrylamidlösung Rotiphorese®Gel30	2 ml	2,67 ml	3,33 ml	4 ml	0,45 ml
1,5 M Tris 0,4 % SDS	2 ml				-
0,5 M Tris 0,4 % SDS	-				0,45 ml
H <sub>2</sub> O	3,9 ml	3,3 ml	2,62 ml	1,95 ml	2 ml
TEMED	8 µl				4 µl
10 % APS	80 µl				40 µl

Es wurden zwischen 10 und 45µg Protein mit Probenpuffer 5min bei 95°C inkubiert, abzentrifugiert und der Überstand auf ein Acrylamidgel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte für 15min bei 50mA, dann bei 100mA bis die Laufmittelfront das Ende des Gels erreicht hatte.

### 2.3.5. Harnstoff-SDS-PAGE

Durch das nahezu gleiche Molekulargewicht von etwa 110kDa lassen sich die  $\alpha$ - und  $\beta$ - Untereinheiten von AP2 nicht gut durch SDS-Page separieren. Um sie dennoch getrennt voneinander darstellen zu können, wurden 8-Molare Harnstoffgele verwendet, welche das Laufverhalten dieser Untereinheiten beeinflussen (Ahle and Ungewickell, 1986) und somit für eine deutliche Trennung dieser Untereinheiten sorgten. Die  $\beta$ - Untereinheit lief in diesen Gelen bei etwa 85kDa und die  $\alpha$ - Untereinheit bei etwa 75kDa. Die  $\mu$ 2 Untereinheit von AP2 die ein Molekulargewicht von 50kDa aufweist, lief in diesen Gelen im Bereich von etwa 35kDa, wies jedoch keine scharfe Bande auf.

Pipettierschema für ein grosses 7,5%iges Harnstoffgel:

#### Trenngel 7,5%

1,5 M Tris, 0,4 % SDS	6 ml
Acrylamidlösung	6 ml
Wasser	5,5 ml
Harnstoff	8,55 g

In 50ml Falcon-Tube im Wasserbad (37°C) zugeben, zwischenzeitlich vorsichtig vortexen. Nachdem sich der Harnstoff gelöst hat TEMED und APS zugeben und das Gel zügig gießen.

TEMED	24 µl
APS	240 µl

### Sammelgel

0,5 M Tris, 0,4 % SDS	1,35 ml
Acrylamidlösung	1,35 ml
Wasser	2 ml
Harnstoff	3,3 g

In 50ml Falcon-Tube im Wasserbad (37°C) zugeben, zwischenzeitlich vorsichtig vortexen. Nachdem sich der Harnstoff gelöst hat TEMED und APS zugeben und das Gel zügig gießen.

TEMED	12 µl
APS	120 µl

### **2.3.6. Coomassiefärbung von Proteinen**

Nach einer Gelelektrophorese wurden die Proteinbanden durch Färben des Polyacrylamidgels mit *Coomassie Brilliant Blue R250* Protein-Färbelösung für mindestens 45min bei RT unter leichtem Schütteln sichtbar gemacht. Zum Entfärben und Fixieren der Proteine wurde das Gel mehrmals für etwa 10min in der Entfärbelösung geschwenkt, wobei diese jeweils gewechselt wurde.

Coomassie-Färbelösung:	0,25 % (w/v) Coomassie Blau R 250
	45 % (v/v) Ethanol
	10 % (v/v) Essigsäure
	45 % (v/v) A. bidest
Coomassie-Entfärbelösung:	50 % (v/v) Methanol
	10 % (v/v) Essigsäure
	40 % (v/v) A. bidest

### **2.3.7. Western-Blot und Immundetektion**

Nach einer Gelelektrophorese konnten die im Gel enthaltenen Proteine durch Transfer auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen werden, um diese mit Antikörpern zu identifizieren. Die Membran bindet die Proteine durch hydrophobe Wechselwirkungen. Die Proteinbindungsstellen der negativ geladenen Nitrozellulosemembran werden aktiviert, indem dem Transferpuffer 10 - 20% Methanol zugesetzt wird. Die Membran besitzt eine hohe Proteinbindekapazität und eignet sich für Proteinfärbung und Immunfärbung. Der Proteintransfer erfolgte für 1h bei einer Stromspannung von 100V in Transferpuffer (25mM Tris, 20mM Glycin, 20% MeOH). Danach wurde der Erfolg des Transfers durch Färben der Membran mit Ponceaurot überprüft (2.3.8.). Es folgte eine Inkubation ü.N. bei 4°C in Blockierungslösung (5% Milchpulver in PBS + 0,02% Tween), um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Die Membran wurde am Folgetag 3x mit PBS + 0,02% Tween gewaschen und dann 1h bei RT mit dem primären Antikörper in PBS + 0,02% Tween inkubiert. Durch 3x 5min Waschen mit PBS + 0,02% Tween wurden nicht-gebundene Antikörper entfernt. Die Detektion des gebundenen primären Antikörpers auf der Membran erfolgte mit einem in PBS + 0,02% Tween 1:2000 verdünnten HRP-konjugiertem sekundären Antikörper, der für 1h bei RT inkubiert wurde. Ungebundener Zweitantikörper wurde nach 3x Waschen mit PBS entfernt. Mit einem Chemilumineszenz-Reagenz wurde der Zweitantikörper sichtbar gemacht und die Membran mit dem FluorChem™SP CCD-Kamerasystem von Alpha Innotech entwickelt.

### **2.3.8. Ponceaufärbung von Proteinen**

Die Ponceaufärbung dient der Detektion von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen, sofern die Proteinmenge >50ng/Bande beträgt. Die Membran wurde für 1-2min in Ponceaurot (2% in 3%-iger Trichloressigsäure) inkubiert, die überschüssige Farbe dann mit A. bidest abgewaschen. Proteine waren als rote Banden zu erkennen. Mit Hilfe der Ponceaufärbung wurde eine gleichmäßige Übertragung der Proteine auf die Membran kontrolliert.

### **2.3.9. Immunpräzipitation**

Die Immunpräzipitation ist ein Standardverfahren zur Aufreinigung von Proteinen aus Zellextrakten. Alle Versuchsschritte fanden auf Eis oder bei 4°C statt, die Inkubationen auf einem Drehrad. Nach dem Aufschluss der Zellen (2.2.2.6) wurden die Proben mit Maus oder Kaninchen IgG und Protein-A-Agarose für 2h inkubiert um unspezifisch bindende Proteine über den Maus Antikörper und das Protein-A an die Agarose zu koppeln. Das Präzipitat wurde durch eine Zentrifugation bei 2300xg für 5min pelletiert und der Überstand abgenommen. Dem Überstand wurde dann für mindestens 2h, meist aber über Nacht ein Antikörper zugegeben, der das Zielprotein direkt oder an ein spezielles Peptid (Tag) bindet. Abhängig von der Konzentration der Antikörper wurde dieser (bei geringen Konzentrationen) entweder vor dem Versuch an Protein-A-Agarose gekoppelt oder nach einer 2-stündigen Inkubation mit dem Zellextrakt über Nacht, mit Protein-A-Agarose inkubiert. Es wurden ca. 5µg Antikörper pro Immunpräzipitation eingesetzt. In dieser Arbeit wurde auch eine HA-Sepharose verwendet, an die der HA-Antikörper kovalent gebunden ist.

Durch Zentrifugation bei 2300xg für 5min wurde die Agarose mit dem gekoppelten Immunpräzipitat pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment mit verschiedenen Puffern gewaschen, um Verunreinigungen zu entfernen. Je nach Fragestellung wurden dafür mehr oder weniger stringente Puffer eingesetzt, die in der Salzkonzentration oder dem Detergenzgehalt variierten (stringend= PBS + 1M NaCl + 0,2% Chaps).

Das Sediment konnte nun entweder tryptisch verdaut werden, oder durch die Zugabe von Proteinprobenpuffer denaturiert und Anschließend per SDS-Page und Western-Blot analysiert werden.

### **2.3.10. Präparation von AP1 und AP2 aus Schweinehirn**

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



über Nacht bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert. Im Anschluss wurde 30min bei 100.000xg (TLA-55 Rotor) zentrifugiert. Der Überstand (Tris-Extrakt), der die abgelösten Adaptoren und Clathrin-Triskelions enthält, wurde abgenommen und konnte nun zur weiteren Aufreinigung mittels Gelfiltrationschromatographie über eine *Fast-Protein-Liquid-Chromatography*-Anlage (ÄKTAexplorer™) genutzt werden.

### **Gelfiltration**

Die Gelfiltration dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe, abhängig von den verwendeten Säulen und eingesetzten Puffern. Gelfiltrationsmaterialien, bestehend aus hydrophilen natürlichen oder synthetischen, möglichst druckunempfindlichen Polymeren von homogener, ungeladener Gestalt, wirken wie ein Molekularsieb. Große Moleküle werden im Ausschlussvolumen eluiert, während kleinere Moleküle in die Poren des Füllmaterials eindringen können und aufgrund des länger zurückzulegenden Weges später eluiert werden. Die Größe der Poren ist dabei für den Bereich der optimalen Auftrennung verantwortlich (Größenausschluss-Chromatographie).

### **Gelfiltration des Tris-Extraktes über Superose 6**

Für die Auftrennung von Tris-Extrakte wurde eine Superose 6 Säule verwendet. Diese analytische Säule, mit einem Durchmesser von 26mm und einer Länge von 960mm, bewirkt eine optimale Auftrennung für Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen  $5 \times 10^3$  und  $5 \times 10^6$  Da. Der Trennpuffer wurde vor Gebrauch durch einen 0,2µm *Bottle-top*-Filter sterilfiltriert und anschließend über eine Wasserstrahlpumpe entgast. Die Superose 6 Säule wurde in Trennpuffer äquilibriert, bis sich eine stabile Basislinie einstellte. Anschließend wurde der oben beschriebene Tris-Extrakt mit einer Proteinkonzentration von 10mg/ml auf die Gelfiltrationssäule injiziert. Bei einer Flussrate von 1ml/min wurden Fraktionen mit einem Volumen von 1,5ml gebildet. Anhand von Coomassie-gefärbten SDS-PAGEs wurden die AP1 und AP2 enthaltenden Fraktionen ermittelt. Diese Fraktionen wurden vereint und über eine Hydroxyapatit-Säule weiter aufgereinigt.

Trennpuffer:

0,5 M Tris/HCl pH 7,0



wurden die jeweiligen AP1 und AP2-Fraktion ermittelt und die entsprechenden Fraktionen vereint. Diese Pools konnten nun für verschiedene Experimente noch weiter ankonzentriert (2.3.11.) oder mittels Dialyse (2.3.12) umgepuffert werden.

### **2.3.11. Erhöhung der Konzentration von Proteinlösungen**

Um die Konzentration von Proteinlösungen zu erhöhen, wurden Amicon® Ultra Zentrifugenfilter-Gefäße verwendet. Die Ausschlussgröße des Filters betrug 10kDa, so dass beim Zentrifugieren das Protein zurückgehalten und das Probenvolumen eingeeengt wurde. Vor Gebrauch wurden die Filter dreimal mit Puffer gewaschen, um noch enthaltenes Triethylenglycol zu entfernen. Die zu konzentrierende Proteinlösung wurde bei 4.000xg und 4°C solange zentrifugiert, bis das gewünschte Probenvolumen erreicht war.

### **2.3.12. Dialyse**

Die Dialyse dient zur Veränderung der Pufferzusammensetzung einer Proteinlösung. Dabei passieren Pufferbestandteile frei die Dialysemembran, wohingegen das Protein im Dialyseschlauch verbleibt (Ausschlussgröße: 12-14 kDa). Der Dialyseschlauch wurde vor Gebrauch für einige Minuten in dem jeweiligen Dialysepuffer „gewässert“ und dann an einer Seite mit einer Dialyseklammer verschlossen. Nach dem Einfüllen der zu dialysierenden Proteinlösung wurde der Schlauch an der anderen Seite ebenfalls verschlossen. Die Dialyse erfolgte bei 4°C unter Rühren gegen das 100fache Volumen der Probe für mindestens 3h. Der Dialysepuffer wurde dabei stündlich gewechselt. Nach beendeter Dialyse wurde die Proteinlösung aus dem Schlauch entnommen und bei 13.000xg und 4°C für 10min zentrifugiert, um denaturierte Proteine und große Aggregate zu entfernen.

### **2.3.13. Expression und Reinigung von 6xHis-Arf6-GDP und 6xHis-Arf6-GTP**

Je 10 ml LB Medium wurden mit 100µg/ml Ampicillin versetzt, mit dem jeweiligen Expressionsvektortragenden Bakterienklon aus einer Glycerinkultur angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator wachsen gelassen. Mit 5ml dieser über Nacht-Kultur wurden 200ml LB + 100µg/m Ampicillin angeimpft und bei 37°C

wachsen gelassen. Bei einer  $OD_{600}$  von 0,8 wurden die Kulturen auf 22°C herabgekühlt. Anschließend erfolgte, durch Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 0,2mM, die Induktion der Proteinexpression ü.N. Am darauffolgenden Morgen wurden die Bakterien 15min bei 5000xg (SLA-3000 Rotor) pelletiert. Alle weiteren Schritte erfolgten auf Eis, oder bei 4°C. Das Sediment wurde in 20ml Reinigungspuffer resuspendiert und mit Protease Inhibitor Cocktail (100µl/2g Bakterienpellet) versetzt. Anschließend wurden die Zellen mit dem EmulsiFlex C3 nach Angaben des Herstellers aufgeschlossen und durch 5 minütige Zentrifugation bei 5000xg (SLA-3000 Rotor) von Zellresten befreit. Das Zellysate wurde mit 5M Imidazol auf eine Endkonzentration von 20mM eingestellt und im Falle der ARF6-GDP Reinigung des Weiteren 10% Glycerin zugesetzt. Die weitere Aufreinigung der 6xHis-Proteine erfolgte über Profinia IMAC-Säulen (Bio-Rad) mit anschließender Entsalzung mittels Profinia P6 Entsalzungssäule (Bio-Rad). Zunächst wurde die Ni-NTA-Säule und Entsalzungssäule mit 7 Säulenvolumina Laufpuffer äquilibriert, dann die Probe (ca. 22ml) aufgetragen und ungebundene Proteine 2x mit 6 Säulenvolumen Laufpuffer ausgewaschen. Danach erfolgte 2x die Elution der zu reinigenden Proteine mit insgesamt 10 Säulenvolumen Elutionspuffer auf die Entsalzungssäule und von dort die Elution in einem Gesamtvolumen von 5ml mit Entsalzungspuffer.

Allgemeine Lösungen:

IPTG:                    500 mM IPTG  
                              in A. bidest  
                              steril filtrieren

Imidazol:                5 M Imidazol pH 7,5  
                              in A. bidest  
                              steril filtrieren

Tabelle 2.12.: Reinigung von 6xHis-Arf6-in GDP oder GTP gebundener Form.

	<b>6xHis-Arf6<math>\Delta</math>1-13(T27N) GTP-Form</b>	<b>6xHis-Arf6<math>\Delta</math>1-13(Q67L) GDP-Form</b>
Reinigungspuffer	50 mM Tris pH8,0 1 mM MgCl <sub>2</sub> 1 mM DTT 0,25 mM PMSF	50 mM HEPES pH7,5 100 mM KCl 1 mM MgCl <sub>2</sub> 1 mM DTT 5 $\mu$ M GDP
Zusatz vor Ni-NTA-Lauf	+ 20 mM Imidazol	+ 20 mM Imidazol + 10 % Glycerin
Ni-NTA Laufpuffer	Reinigungspuffer + 10 mM Imidazol steril filtriert, entgast	Reinigungspuffer + 10 mM Imidazol steril filtriert, entgast
Ni-NTA Elutionspuffer	Reinigungspuffer + 200 mM Imidazol + 10 % Glycerin steril filtriert, entgast	Reinigungspuffer + 400 mM Imidazol + 10 % Glycerin steril filtriert, entgast
Ensalzungspuffer	Reinigungspuffer steril filtriert, entgast	Reinigungspuffer steril filtriert, entgast

### 2.3.14. Expression und Reinigung von GST-VHS, GST-VHS-GAT und GST-GAT-Domänen

Die Expression und Reinigung der rekombinanten GST-Proteine erfolgte nach folgendem Standardprotokoll:

Je 10 ml LB Medium wurden mit 100 $\mu$ g/ml Ampicillin versetzt, mit dem jeweiligen Expressionsvektortragenden Bakterienklon aus einer Glycerinkultur angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator wachsen gelassen. Mit 5ml dieser ü.N.-Kultur wurden 500ml LB-Medium + 100 $\mu$ g/ml Ampicillin angeimpft und bei 37°C wachsen gelassen. Bei einer OD<sub>600</sub> von 0,8 wurden die Kulturen auf 22°C abgekühlt. Anschließend erfolgte durch Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 0,2mM die Induktion der Proteinexpression über Nacht. Am darauffolgenden Morgen wurden die Bakterien 15 min bei 5000xg (SLA-3000 Rotor) pelletiert. Das Sediment wurde in 20ml GST-Reinigungspuffer resuspendiert und mit Protease Inhibitor Cocktail (100  $\mu$ l/ 2 g Bakterienpellet) versetzt. Alle weiteren Schritte erfolgten auf Eis, oder bei 4°C. Anschließend wurden die Zellen mit dem EmulsiFlex C3 nach Angaben des

Herstellers aufgeschlossen, mit Triton X-100 in einer Endkonzentration von 1% versetzt und für 20min auf dem Drehrad im Kühlraum inkubiert. Durch 5 minütige Zentrifugation bei 5000xg (SLA-3000 Rotor) wurde das Lysat von Zellresten getrennt und der Überstand weiterverwendet. Der Überstand wurde mit je 500µl Glutathion-Sepharose-Matrix (GE Healthcare, 4 Fast Flow) versetzt, welche zuvor 3x mit 45ml PBS gewaschen wurde und für 4h auf dem Drehrad bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Sepharose abzentrifugiert, 2x mit 50ml PBS gewaschen, in ein 2ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und noch weitere 5x mit 1,5 ml PBS gewaschen, bevor jedes Konstrukt 3x mit je 1ml Elutionspuffer versetzt wurde, um das GST-Protein mittels Glutathion von der Matrix zu eluieren. Zur Kontrolle der Aufreinigung wurde je 15µl Probe entnommen und mittels Coomassie-gefärbten 12,5%igen SDS-Gel dokumentiert.

GST-Reinigungspuffer:            20 mM Tris pH 7,5  
    100 mM NaCl  
    1 mM DTT  
    1 mM PMSF (frisch zusetzen)

GST-Elutionspuffer:            50 mM Tris pH 8,3  
    150 mM NaCl  
    10 mM Glutathion

### **2.3.15. Phosphorylierung von AP2**

Um Informationen über den Phosphorylierungsstatus von AP2, insbesondere der großen Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta 2$ , zu erlangen wurden in dieser Arbeit verschiedene Phosphorylierungsansätze genutzt.

#### **Phosphorylierung von CCVs, Tris-Extrakten oder gereinigten AP2 *in vitro***

Als Ausgangspuffer für die *in vitro* Phosphorylierung wurde 50 mM Tris/HCl pH7,4 verwendet. Diesem Ansatz wurde, je nach Fragestellung, bei variierenden Proteinkonzentrationen zwischen 1 und 50µg, noch folgende Komponenten in den aufgeführten Endkonzentrationen zugesetzt:

MgCl <sub>2</sub>	5 mM
Poly-L-Lysin	50 µg/ml
NaCl	150 mM
ATP	1 µM
[ <sup>32</sup> P] bzw. [ <sup>33</sup> P]-γ-ATP	0,5 µCi

### **Phosphorylierung von AP2 *in vivo***

Um den AP2-Komplex unter *in vivo* Bedingungen zu phosphorylieren wurden *HeLa* oder *HEK293*-Zellen 2x vorsichtig mit phosphatfreien Hepes-Puffer (20mM Hepes, 150 mM NaCl pH 7,4) gewaschen und für 1h in Mangelmedium (DMEM – Phosphat, -Pyruvat, -Glukose, -FCS) unter Zellkulturbedingungen „hungern“ gelassen. Anschließend wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit Phosphat- und Pyruvat-freiem DMEM versetzt, dem zuvor 5% FCS und 1mCi [<sup>33</sup>P]-Orthophosphat/10ml Medium oder 1mCi [<sup>32</sup>P]-Orthophosphat/10 ml Medium zugesetzt wurde, und für 5-7h inkubiert. Je nach Fragestellung wurden in den letzten 10min die membrangängigen Serin/Threonin-Phosphataseinhibitoren Okadasäure und Calyculin A mit einer Konzentration von 100nM zugesetzt. Alle folgenden Schritte erfolgten auf Eis, oder bei 4°C. Die Zellen wurden auf Eis gestellt und sofort 2x mit PBS [+ Protease-Inhibitor Cocktail (1/1000), +Phosphatase-Inhibitor Cocktail I, II und III (1/1000), + Okadasäure/Calyculin (100nM)] gewaschen und mit 2x750µl abgeschabt (*HeLa*) oder ab gespült (HEK). Die Zellen wurden für 5min bei 400xg sedimentiert, erneut gewaschen und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde anschließend in je 1,8ml 20mM Tris, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 0,5% TX-100 pH 7,4 [+ Protease-Inhibitor Cocktail (1/500), + Phosphatase-Inhibitor Cocktail I, II und III (1/200), + Okadasäure/Calyculin (100nM)] gelöst und für 20min auf dem Drehrad bei 4°C inkubiert. Das Homogenat wurde nun für 30min bei 16000xg zentrifugiert und der Überstand für Immunpräzipitation verwendet (2.3.9.).

### **2.3.16. Verdau von AP2**

Um den AP2-Komplex auf Phosphorylierungsregionen zu untersuchen, wurde dieser limitiert verdaut. 20µg gereinigtes AP2 aus Schweinehirn (in PBS oder in 100mM Tris, pH 7,0) wurde mit 0,2µg Trypsin versetzt und für 0,1,5 und 20 Minuten inkubiert. Der Verdau konnte anschließend im Coomassie-Gel oder Western-Blot analysiert werden. Die Proteinkonzentration des AP2s, welches aus Zellen immunisoliert

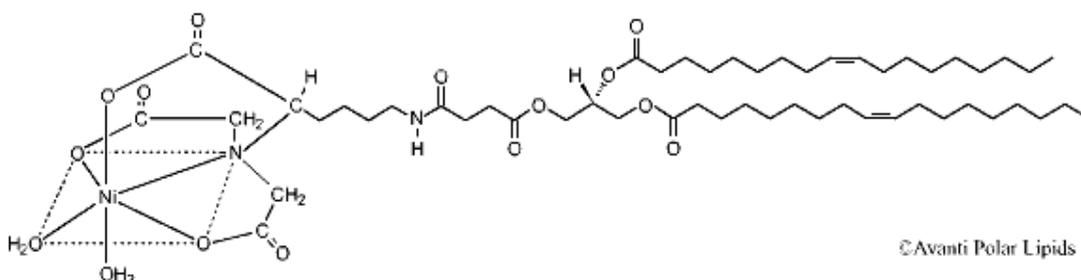
wurde, konnte durch das Protein A und den Antikörper im Reaktionsansatz nicht bestimmt werden. Die Menge des eingesetzten Immunpräzipitats und des Trypsins für den limitierten Verdau bzw. einer TEV-Protease für einen gerichteten Verdau wurden deshalb durch Erfahrungswerte bestimmt und individuell in den einzelnen Versuchen beschrieben.

## 2.3.17. Massenspektrometrie

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

## 2.3.18. Liposomenpräparation

Um die Interaktion zwischen Proteinen und Lipiden sowie zwischen Proteinen und Peptiden in Membranumgebung mit Hilfe eines Biacore Biosensors (siehe 2.3.20.) messen zu können, wurden Liposomen mit unterschiedlicher Lipidzusammensetzung präpariert. Für die Präparation wurde pro Ansatz 1 mg Gesamt-Lipid verwendet. Alle Liposomen enthielten 20% PE. Weitere, je nach Experiment eingesetzte Lipide, waren 3-10% Phosphatidylinositole (PI), 1-10% Ni-NTA-Lipid (Abb.2.2) sowie 0,5-10% Peptido-Lipide (2.3.19.). Die restlichen 50-80% Lipid bestanden aus Phosphatidylcholin (PC).



**Abb.2.2.: Ni-NTA-Lipid (DOGS-NTA-Ni).** Durch die Integration des Nickel-beladenen NTA-Lipids in Liposomen wird die Bindung von His-modifizierten Proteinen oder Peptiden an diese Liposomen ermöglicht.

Die Lipide wurden zunächst in Chloroform/Methanol (2:1) aufgenommen und mit Hilfe einer Hamilton-Spritze in den benötigten Mengen in ein Reagenzglas überführt. Das Lipidgemisch wurde unter leichter Stickstoffbegasung zu einem dünnen, gleichmässigen Film an der Glaswand des Reagenzgefäßes eingetrocknet, indem das Reagenzglas langsam gedreht wurde. Die Hydratisierung des Lipidfilms erfolgte ebenfalls unter langsamen Drehbewegungen in 150 µl Saccharose-Lösung. Für die Liposomenbildung musste die Lösung 1h bei Raumtemperatur inkubiert und währenddessen mehrmals schwach gevortext werden. Anschließend wurden 850µl A. bidest hinzugegeben und 1h in der Ultrazentrifuge mit 17500xg bei 4°C zentrifugiert. Die pelletierten, fertigen Liposomen, sogenannte *large multilamellar vesicles* (MLV), wurden in 500µl HEPES-Puffer aufgenommen und 15x durch einen Extruder gegeben. Die verwendete Porengrösse der Membran betrug 100nm. Dadurch erhielten die Liposomen einen durchschnittlichen Durchmesser von 90-120nm (avanti polar lipids [www.avantilipids.com](http://www.avantilipids.com)) und wurden in *large unilamellar vesicles* (LUV) umgewandelt (Abb.2.3). Die Liposomenlösung hatte eine Konzentration von 1mg Lipid/ml. Die Lagerung erfolgte bei 4°C für 7-10 Tage.

Saccharose-Lösung:

0,3 M Saccharose

In A. bidest

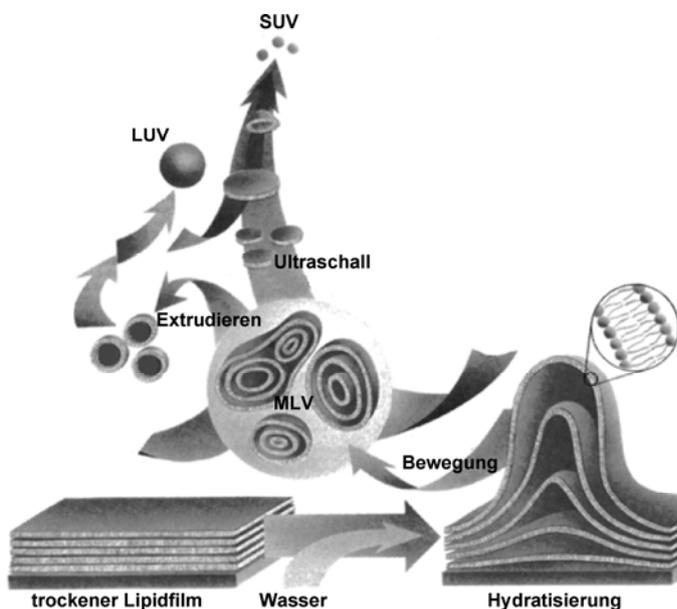
Steril filtrieren

HEPES-Puffer:

20 mM HEPES pH 7,4

In A. bidest

Steril filtrieren



**Abb.2.3.: Liposomenbildung durch Hydratisierung eines Lipidfilms.**

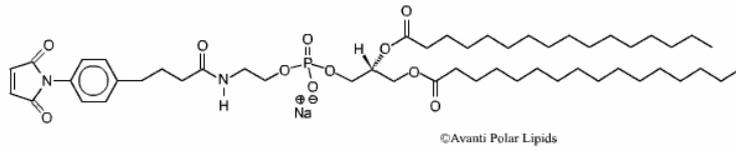
Liposomen vor dem Extrudieren haben oft mehrschichtige Membranen (MLV *large multilamellar vesicles*). Durch das Extrudieren mit einem 100nm Filter entstehen LUV *large unilamellar vesicles* mit einer durchschnittlichen Größe von 120-140nm. Wenn frisch präparierte Liposomen mit Ultraschall behandelt werden, entstehen kleinere Liposomen (30-100nm) - SUV *small unilamellar vesicles* (Verändert nach Lasic, 1997).

### 2.3.19. Kopplung von Peptiden an MPB-PE

Um synthetische Peptide von einer Länge von 10-20 Aminosäuren in Liposomen zu integrieren, wurden diese durch eine Maleimidkopplung kovalent an entsprechend modifizierte Lipide gekoppelt. Alle zu koppelnden Peptide verfügten N-terminal über ein Cystein. Das verwendete Lipid MPB-PE (1,2-Dipalmitoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphoethanolamine-N-[4-(*p*-maleimidophenyl)butyramide]) enthält an seiner polaren Kopfgruppe eine Maleimidgruppe, die unter Ausbildung einer Thioetherbindung mit der Thiolgruppe des Cysteins der Peptide reagieren kann (siehe Abb.2.2). Entscheidend für die Reaktion ist der pH-Wert der Lösung. Liegt der pH-Wert zwischen 6,5 und 7,5 reagiert die Maleimidgruppe spezifisch mit den Sulfhydrylgruppen der Peptide, bei einem pH-Wert über 8,5 läuft die Kopplungsreaktion jedoch mit primären Aminen ab.

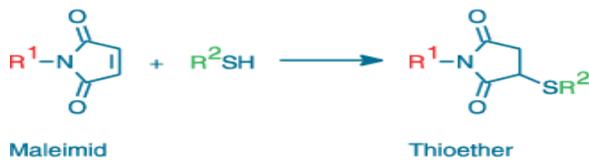
Für die Kopplung wurde 1ml Peptidlösung mit 1ml MPB-PE (5mg/ml in Chloroform = 5,2mM) versetzt und für 2h bei Raumtemperatur auf dem Drehrad inkubiert. Anschließend wurde die Lösung auf 10mM  $\beta$ -Mercaptoethanol eingestellt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, um das ungekoppelte Lipid zu blockieren. Zur Trennung der Lipide von ungebundenem Peptid diente eine Chloroform-Methanol-Extraktion. Dazu wurden 2ml Chloroform und 1ml Methanol zur Lipidlösung pipettiert, kurz gevortext und 15min bei 5000xg zentrifugiert. Die untere, organische Phase wurde vorsichtig mit einer Pasteurpipette entnommen. Zur oberen Phase wurde 1 ml Chloroform pipettiert, wiederum gevortext und 15min bei 5000xg zentrifugiert. Die nun entstandene untere, organische Phase wurde ebenfalls vorsichtig mit einer Pasteurpipette entnommen und mit der vorherigen vereinigt. Dieser Schritt wurde noch zweimal wiederholt. Die gepoolten organischen Phasen wurden unter einem Stickstoffstrom getrocknet und in 1ml Chloroform/Methanol (2+1) resuspendiert. Unter der Annahme einer vollständigen Kopplung konnte so 1ml Peptido-Lipid mit einer Konzentration von 5mg/ml hergestellt werden. Das Peptido-Lipid wurde mit Stickstoff überschichtet und bei -20°C gelagert.

A)



**Abb.2.4.: A) Strukturformel des MPB-PE.** Durch die Maleimidgruppe auf der polaren Seite des MBP-PE besteht die Möglichkeit zur Kopplung eines Peptides an dieses Lipid. **B) Maleimid-Kopplungsreaktion.** Die Kopplung der Maleimidgruppe des Lipids mit dem Cystein des Peptids erfolgt bei einem pH-Wert zwischen 6,5 und 7,5. Weitere Erklärungen siehe Text.

B)



Lösungen:

Peptidlösung:

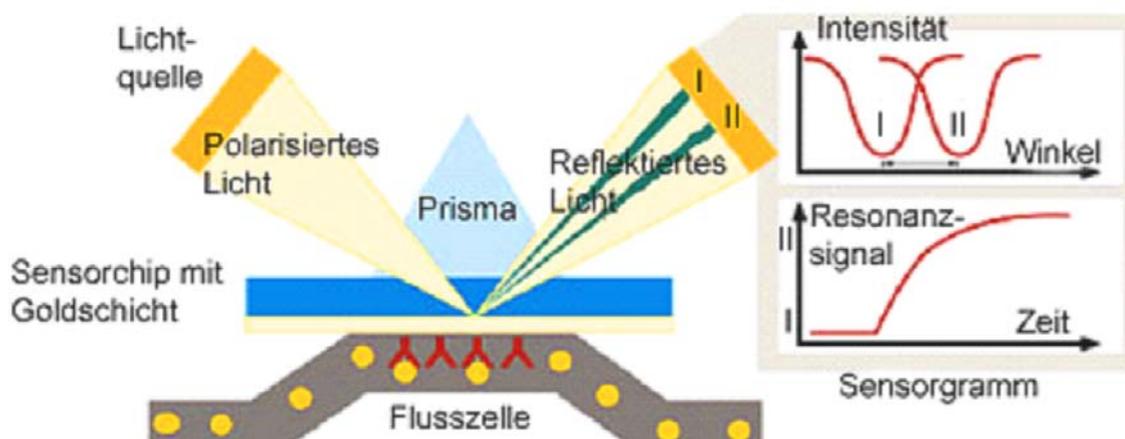
- 5 mM Peptid
- 10 mM MOPS-KOH pH 7,5
- 50 % DMF

## 2.3.20. Messung von Proteininteraktionen am Biacore Biosensor (SPR)

In der vorliegenden Arbeit wurde die Interaktion zwischen Proteinen mit Hilfe eines Biacore 3000 und Biacore T100 Biosensors gemessen. Mit dem Biosensor, der das Prinzip der Oberflächen-Plasmon-Resonanz (SPR) nutzt, ist es möglich die Interaktion zwischen Molekülen nachzuweisen und die Bindungsparameter der Interaktion zu bestimmen. Dabei erfolgt die Messung in Echtzeit und ohne spezielle Markierung der Interaktionspartner. Hierfür wird ein Interaktionspartner, der sogenannte Ligand, an die Oberfläche eines Sensorchips gekoppelt. Der Chip besteht aus Glas als Trägermaterial, welches mit einer Goldschicht überzogen ist. Darauf befindet sich in der Regel Dextran als Oberflächenmatrix. Je nach Art des Chips ist diese Matrix unterschiedlich derivatisiert, um verschiedene Möglichkeiten der Ligandenkopplung zu ermöglichen. In dieser Arbeit wurde der Ligand allerdings nicht direkt an die Oberfläche des Chips gebunden, sondern indirekt über Liposomen in einem „Sandwichverfahren“. Der AP2-Komplex bindet die weit verbreiteten Tyrosin- (YxxΦ) und Dileucin-haltigen Sortierungssignale

([D/E]xxxL[L/I]) von Transmembranproteinen an der Plasmamembran. Um zu untersuchen inwieweit die Zusammensetzung der Membran die Sortierungssignalbindung beeinflusst, wurden Liposomen mittels hydrophober Wechselwirkungen an die Oberfläche eines L1-Chips gekoppelt an die anschließend der AP2-Komplex als Ligand gebunden wurde. Durch die Herstellung verschieden komponierter Liposomen (2.3.18. und 2.3.19.) konnte so die *in vivo* Situation simuliert werden.

Das Prinzip der Messung beruht auf dem optischen Phänomen der *Surface Plasmon Resonanz* (SPR). Hierbei trifft Licht einer Laserquelle in einem definierten Winkel durch ein Prisma auf die Grenzfläche zur Glasoberfläche (Abb.2.5.).

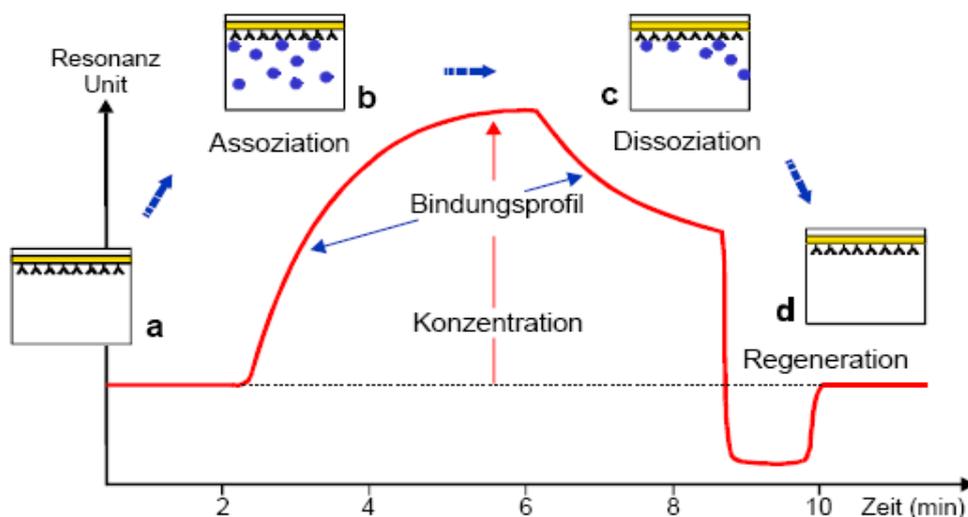


**Abb.2.5.: Messprinzip des Biosensors.** Durch die Oberflächen Plasmon Resonanz entsteht ein Intensitätsabfall im reflektierten Licht. Bindet ein Analyt an einen immobilisierten Liganden, ändert sich der Brechungsindex an der Chipoberfläche und der Schatten im reflektierten Licht verändert seine Position. Die Winkeländerung des Schattens wird im Sensorgramm als Resonanzsignal dargestellt (Abb. aus BIAcore Handbuch).

Während der Hauptanteil des Lichtes total reflektiert wird kann der elektromagnetische Anteil mit den freien Elektronen in der Goldschicht in Wechselwirkung treten. Unter geeigneten Resonanzbedingungen entsteht dann eine evaneszente Feldkomponente, die die Sensoroberfläche penetriert. Das Phänomen äußert sich bei der Messung des reflektierten Lichts in einer Abschwächung, die unter einem bestimmten Winkel detektiert werden kann. Der Biosensor ist nun so aufgebaut, dass alle Parameter so eingestellt sind, dass die durch SPR hervorgerufene Winkeländerung nur noch durch die Veränderung der Grenzfläche beeinflusst wird. Binden oder dissoziieren hier Moleküle, so wird die Interaktion nun

direkt messbar. Vereinfacht gesagt ist das SPR-Signal (eine Winkeländerung) nur noch abhängig von der Massenzu- oder abnahme auf der Chipoberfläche. Die Änderung des Resonanzwinkels wird in einem Sensorgramm als Resonanzeinheitenveränderung angegeben und gegen die Zeit aufgetragen. Ein Zuwachs von 1000 Resonanzeinheiten (RU) entspricht im Durchschnitt einer Zunahme von 1ng Protein pro Quadratmillimeter Chipoberfläche.

Eine Interaktionsmessung besteht aus mehreren Phasen (Abb.2.6). Wenn gerade keine Interaktion gemessen wird, fließt Laufpuffer über die Oberfläche (a).



**Abb.2.6.: Phasen eines Sensorgramms:** a) Vor der Interaktion wird Laufpuffer über die an der Chipoberfläche gebundenen Liganden gespült. Das Sensorgramm zeigt eine stabile Basislinie. b) Während der Assoziationsphase wird der Analyt in kontinuierlichem Fluss über die Oberfläche geleitet. Erfolgt eine Bindung an den Liganden steigt das Resonanzsignal. c) Mit dem Beenden der Analytinjektion beginnt die Dissoziationsphase, in der Laufpuffer über die Chipoberfläche fließt. Der Komplex dissoziiert und das Resonanzsignal fällt. d) Um die Ausgangsbasislinie wieder zu erreichen, wird eine Regenerationslösung injiziert. Alle Bindungsstellen des Liganden sollten nach beendeter Regeneration wieder frei und aktiv vorliegen.

Die Assoziationsphase (b) beginnt mit der Injektion eines definierten Volumens von Analyt. Dieser bindet an den immobilisierten Liganden und dissoziiert auch wieder. Durch den kontinuierlichen Fluss über die Oberfläche bleibt die Analytkonzentration während der Assoziationsphase konstant. Durch Beenden der Injektion des Analyten beginnt die Dissoziationsphase (c). Es wird nur noch Laufpuffer über die Oberfläche geleitet. Der noch gebundene Analyt dissoziiert vom Liganden und wird vom kontinuierlichen Laufpufferfluss über der Oberfläche weggespült. Im Idealfall sollten

nach der Interaktion wieder alle Liganden unbesetzt und aktiv vorliegen. Bei einer kleinen Dissoziationsrate kann dies mehrere Stunden dauern. Auch durch unerwünschte Effekte, wie z.B. unspezifische Bindung an die Oberfläche oder *rebinding* kann eine unvollständige Dissoziation auftreten. Daher wird eine geeignete Regenerationslösung (50mM NaOH) über die Oberfläche geleitet, um am Ende der Interaktion die Basislinie, die vor der Messung vorlag, wieder zu erreichen (d).

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Biacore 3000 sowie ein Biacore T100 verwendet. Beide Geräte verfügen über ein integriertes Flusssystem mit vier seriellen Flusszellen. Jede Flusszelle ist einzeln anwählbar, der Fluss kann aber auch nacheinander durch die Flusszellen geleitet werden. Das bedeutet, dass es möglich ist, vier verschiedene Liganden auf die verschiedenen Oberflächen zu koppeln und alle Liganden durch eine einmalige Injektion von Analytlösung zu erreichen. Für die Messungen von AP2-Konstrukten auf Liposomen wurde das System mit Core-Puffer (10mM Tris, 250mM NaCl, 1mM DTT, pH 8,7) äquilibriert und die Oberfläche durch 2 Pulsinjektionen von je 1 Minute mit 20mM Chaps (Fluss: 10  $\mu$ l/min) aktiviert. Anschließend wurden die 4 Flusszellen mit verschiedenen Liposomen (0,25 mM Endkonzentration) für 4 Minuten bei einer Flussrate von 5 $\mu$ l/min beladen. Durch die Injektion von 50mM NaOH für 20 Sekunden, bei einer Flussrate von 30 $\mu$ l/min, wurden nicht vollständig gebundene Liposomen abgewaschen. Dies resultierte in einem Anstieg um ~9000 Resonanzeinheiten (RUs). Die Varianz in der Beladung der einzelnen Flusszellen sollte dabei 4% nicht überschreiten. Nach Immobilisierung der Liposomen wurden die AP2-Varianten in Konzentrationen von 50nM bis 20 $\mu$ M auf die Flusszellen injiziert (30 $\mu$ l/min). Die Injektionsdauer betrug 1 Minute, in der AP2 an die Liposomen assoziieren konnte, gefolgt von einer Dissoziationsphase von 2-4 Minuten. Noch nicht vollständig abdissoziiertes Protein wurde durch Pulsinjektionen mit 50mM NaOH (20s bei 30 $\mu$ l/min) von der Oberfläche der Liposomen entfernt, bis die Basislinie erreicht wurde. Für Interaktionsstudien der  $\mu$ 2-Kette mit Liposomen wurde das System, nach Immobilisierung der Liposomen, in  $\mu$ 2-Puffer (10mM HEPES, 250mM NaCl, pH7,4) äquilibriert und die Messungen in diesem Puffer durchgeführt.

### 2.3.21. Kinetik und Auswertung von Biacore Daten

Die Bindung des Analyten (**A**) an den Ligand (**B**), die im einfachsten Fall in einem Verhältnis von 1:1 stattfindet (Gleichung 1),



kann unter konstantem Analytstrom als eine Reaktion pseudo-erster Ordnung angenommen werden angenommen, da die Konzentration des Analyten, der in der Assoziationsphase im kontinuierlichem Fluss über die Oberfläche strömt, als konstant angesehen werden kann **C**. Die Interaktion des Analyten **A** mit dem Liganden **B** kann durch folgende Gleichung (Gleichung 2) beschrieben werden:

$$\mathbf{d[AB] / dt = k_a [A] [B] - k_d [AB]} \quad (2)$$

Die Assoziationsrate (**k<sub>a</sub>**) und Dissoziationsrate (**k<sub>d</sub>**) kann somit durch Messung verschiedener Konzentrationen **C** des Analyten ermittelt werden.

Durch die Messung der Bindungsrate **dR/dt** als Funktion des SPR-Signals **R** kann folgende Gleichung (Gleichung 3) formuliert werden:

$$\mathbf{dR / dt = k_a C R_{max} - (k_a C + k_d) R} \quad (3)$$

**R<sub>max</sub>** beschreibt das maximale Signal der Analyt-Bindung.

Die Auftragung von **dR / dt** gegen **R** liefert für eine Reihe von Analytkonzentrationen die Steigung **k<sub>a</sub> C + k<sub>d</sub>**, die als **k<sub>s</sub>**-Wert bezeichnet wird. Auftragung des **k<sub>s</sub>**-wertes gegen die Konzentration **C** liefert eine Gerade, deren Steigung dem **k<sub>a</sub>**-Wert entspricht. Der **K<sub>D</sub>**-Wert kann durch eine Gleichung (Gleichung 4), welche die Dissoziationsphase umschreibt, ermittelt werden:

$$\mathbf{\ln(R_0 / R_t) = k_d [A] [B]} \quad (4)$$

**R<sub>t</sub>** ist das Signal zur Zeit **t**, **R<sub>0</sub>** das Startsignal zur Zeit **t<sub>0</sub>**. Durch Auftragung von **ln(R<sub>0</sub> / R<sub>t</sub>)** gegen **(t - t<sub>0</sub>)** wird eine Gerade mit der Steigung **k<sub>d</sub>** erhalten. Die Gleichgewichtskonstanten der Assoziation und Dissoziation ergeben sich als Quotienten der Reaktionsraten

$$K_A = k_a/k_d = [AB] / [A] [B] \quad \text{bzw.} \quad K_D = k_d/k_a = [A] [B] / [AB] = 1/K_A$$

Die Auswertung der Daten erfolgte durch die vom Hersteller mitgelieferte Evaluierungssoftware Biacore 3000 BIAevaluation 4.1 nach Angaben des Herstellers.

## 2.4. Zellbiologische Methoden

### 2.4.1. Kultivierung von Zellen

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

Zellen, die stabil mit einem Neomycin Resistenzgen enthaltenden Plasmid transfiziert waren, wurden in DMEM + 500µg/ml Geneticin (G418) kultiviert.

### 2.4.2. Einfrieren von Zellen

Für die langfristige Lagerung wurden Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Zellen wurden nach dem Trypsinieren abzentrifugiert, in Einfriermedium (DMEM + 20% FCS + 10% DMSO) aufgenommen und dann in 1ml Kryoröhrchen eingefroren. Zum Auftauen wurden die Zellen im Wasserbad auf 37°C erwärmt und mit einer größeren Menge Medium in Kultur gebracht, um toxische Effekte des DMSO zu vermeiden.

### 2.4.3. Revitalisieren von Zellen

Zum Auftauen der Zellen wurden die Kryoröhrchen aus dem Stickstofftank entnommen, mit 70% Ethanol desinfiziert und im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, bis nur noch ein kleiner Eiskern zu sehen war. Um toxische Effekte des DMSO zu vermeiden, wurde der Ansatz mit einer großen Menge Medium versetzt und in Kultur gebracht.

### 2.4.4. Bestimmung der Zellzahl

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

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

mit

n = Mittelwert der Zellen aus den 4 ausgezählten Quadranten

### 2.4.5. Transfektion mit Plasmid DNA

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

#### Transiente Transfektion

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

Pro Ansatz wurden  $4 \times 10^4$  Zellen einen Tag vor der Transfektion in 3cm Zellkultur-Platten mit 2 ml Medium ausplattiert und im Brutschrank inkubiert. 400ng DNA wurden mit EC-Puffer auf 100µl aufgefüllt, kurz gevortext, dann für 5min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 10µl Effectene Transfecten Reagenz zugegeben und

nach vortexen für weitere 10min bei RT inkubiert. Während dessen wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 700µl Medium versetzt. Der Mix nach der Inkubationszeit mit 900µl Medium versetzt und dann auf die Zellen geträufelt. Nach 24h wurde das Medium gewechselt, um das Transfektionsreagenz zu entfernen. Nach 48h wurden die Zellen geerntet.

### **Stabile Transfektion**

Um Zellen stabil zu transfizieren wurde zunächst die Methode der transienten Transfektion angewendet. 24h nach der Transfektion wurden die Zellen selektiert, indem dem Medium das Aminoglykosid G418 (500-1000µg/ml) zugesetzt wurden.

Die verwendeten DNA-Plasmide besaßen ein Neomycinresistenzgen, so dass alle nicht transfizierten Zellen aufgrund der fehlenden Resistenz abstarben. Es wurden keine einzelnen Kolonien isoliert und getrennt weiterkultiviert, sondern mit Mischkolonien weitergearbeitet. Diese konnten später per Immundetektion mit einem spezifischen Antikörper auf das Expressionsniveau rekombinanten Proteins untersucht werden.

### **2.4.6. Transfektion mit RNA Oligonukleotiden**

Die Transfektion der Zellen mit doppelsträngiger RNA diente der Supprimierung von Proteinen über RNA Interferenz (RNAi). RNAi ist ein Prozess, der die Genexpression in Eukaryoten auf dem prä- und posttranskriptionalen Level moduliert (Hannon, 2002). Dazu wird doppelsträngige RNA, die eine ca. 19bp lange Sequenz besitzt und an deren 3'-Enden jeweils 2 ungepaarte Nukleotide sind, in die Zelle transfiziert. In der Zelle wird die RNA von RISC, einem Ribonukleoprotein-Komplex mit Nuklease-Aktivität gebunden. Dieser entwindet den Doppelstrang und assoziiert den Strang, der am 5'-Ende weniger GC bp enthält. Dieser Strang ist komplementär zur Ziel mRNA und bewirkt, dass eine Endonuklease des RISC diese schneidet, so dass keine Translation mehr stattfinden kann. Für die Supprimierung der Proteine wurden zwei siRNAs mit je 30nM verwendet. Je nach Anzahl der benötigten Zellen wurde diese am Vortag auf 3, 6 oder 10cm Schalen ausplattiert. Für eine 3cm Schale wurden  $2 \cdot 10^5$  HeLa-Zellen am Vortag ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag wurden pro Ansatz 2 Eppis vorbereitet, eines mit 250µl Optimem und mit der gewünschten Menge siRNA versetzt und das andere mit 250µl Optimem plus 2,5µl Lipofektamin. Nach 15-minütiger Inkubation bei RT wurden die

Lösungen vereint und weitere 15min bei RT inkubiert. Bevor die RNA-haltige Lösung auf die Zellen getropft wurde, wurden diese mit PBS gewaschen und in DMEM ohne Penicillin/Streptomycin inkubiert. Eine Wiederholung der Behandlung mit siRNA am Folgetag verstärkte den *knock-down*-Effekt. 48h nach der letzten RNAi Behandlung wurden die Zellen für die jeweiligen Versuche verwendet. Die Effizienz der RNAi wurde nach SDS-PAGE mittels Western-Blot nachgewiesen.

### **2.4.7. Immunfluoreszenz**

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

#### **Fixierung der Zellen**

Die Fixierung der Zellen ist erforderlich um die Morphologie und die subzelluläre Verteilung und die Konformation der Proteine zu konservieren. Dazu wurden die Zellen nach dreimaligem Waschen mit PBS für 20min bei RT mit 4%-igem Paraformaldehyd in PBS inkubiert.

Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, dann zum Absättigen freier Aldehydgruppen 10min bei RT mit 50mM Ammoniumchlorid inkubiert, dann wieder zweimal mit PBS gewaschen.

#### **Immunfluoreszenzfärbung**

Mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbung kann die subzelluläre Lokalisierung von Zielmolekülen in Zellen sichtbar gemacht werden. Dabei binden die spezifischen Antikörper an ihre jeweiligen Antigene. Ungebundene oder unspezifisch gebundene Antikörper können durch mehrmaliges Waschen entfernt werden. Die spezifisch gebundenen Antikörper können durch verschiedene Verfahren sichtbar gemacht werden. Bei der direkten Immunfluoreszenz ist der Antikörper mit einem Farbstoffmolekül konjugiert. Häufig wird jedoch die indirekte Immunfluoreszenz angewendet, bei der ein sekundärer, fluoreszierender Antikörper spezifisch den für das Zielprotein spezifischen primären Antikörper bindet. Die Farbmoleküle werden durch Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt und so sichtbar. Selektive Filter im Fluoreszenzmikroskop ermöglichen eine Trennung von verschiedenen Farbstoffen, so dass mehrerer Zielmoleküle gleichzeitig und/oder Strukturen in der Zelle mit unterschiedlichen Fluoreszenzen sichtbar gemacht werden können.

In dieser Arbeit wurde ausschließlich die indirekte Immunfluoreszenz verwendet.

Nach Fixierung wurden die Zellen zur Permeabilisierung 10min mit 0,5%-igem Saponin in PBS, dann zweimal mit 0,1%-igem Saponin in PBS gewaschen. Dann wurden die primären Antikörper in PBS+0,1% Saponin zugegeben und 1h bei 37°C inkubiert. Nach zwei Waschschritten mit PBS+Saponin folgte die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen für die Sekundärantikörper durch eine 15-minütige Inkubation mit 200µl Ziegenserum (10% in PBS). Das Serum wurde durch zwei erneute Waschschrritte mit PBS+Saponin entfernt, dann der sekundäre Antikörper in PBS+Saponin zugegeben und für 30min bei 37°C inkubiert. Es folgten je drei Waschschrritte mit PBS und H<sub>2</sub>O.

### **Färbung der DNA mit dem Hoechst-Farbstoff**

Dem Ansatz mit dem sekundären Antikörper wurde Hoechst-Farbstoff (Bis-Benzimid, Hoechst Nr. 33258, 25µg/ml) zugesetzt und ebenfalls für 30min bei RT inkubiert, dreimal in Waschpuffer und zweimal mit PBS und H<sub>2</sub>O gewaschen.

### **Einbetten der Deckgläschen**

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

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

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

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

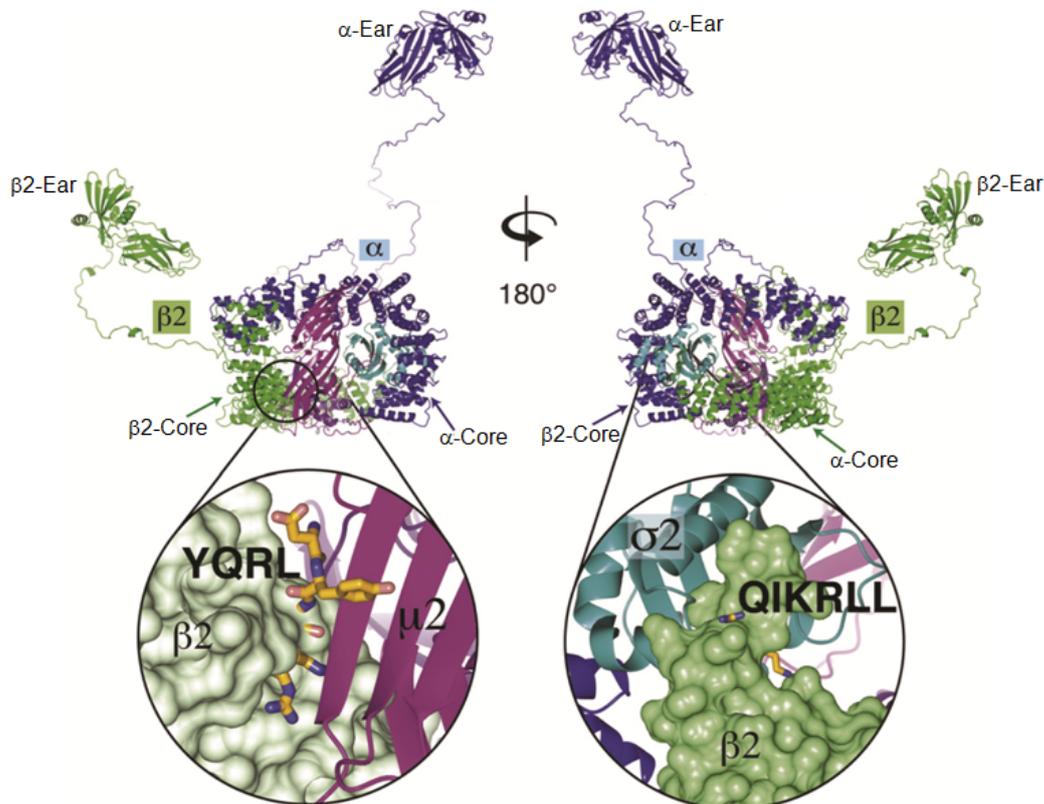
## 3. Ergebnisse

Unsere Arbeitsgruppe arbeitet bereits seit 2003 intensiv mit der Arbeitsgruppe von Dr. David Owen aus Cambridge (UK) zusammen, um AP2 strukturell und funktionell zu untersuchen. Die Struktur und Funktion des AP2-Komplexes in der Dileucinpeptid-gebundenen Konformation konnte kurz nach Beginn dieser Arbeit aufgeklärt werden (Kelly et al., 2008). Im Verlauf dieser Arbeit konnte zudem die Struktur von AP2 in Komplex mit Peptiden beider Sortierungs-Motive kristallisiert werden. Für das Verständnis meiner funktionellen Analyse ist die Kenntnis der Strukturdaten von AP2 wichtig, welche ich im Folgenden vorstellen möchte. Die Daten sind aus gemeinsamen Publikationen unserer beiden Arbeitsgruppen entnommen (Höning et al., 2005; Kelly et al., 2008; Jackson et al., 2010).

### 3.1. Die Struktur von AP2 in Dileucin-gebundener Form

Diese Struktur konnte durch die Kristallisation von AP2 in Gegenwart von einem pCD4-Peptid (RMp**SQIKRLLSE**), welches ein Dileucin-Motiv enthält, gewonnen werden (Kelly et al., 2008). Die Bindung des Dileucinpeptid-Motivs geschieht über zwei hydrophobe Taschen in der  $\sigma 2$ -Untereinheit an der Grenzfläche zur  $\alpha$ -Untereinheit und wird auch durch Aminosäurereste der  $\alpha$ -Untereinheit stabilisiert. Für die Signalbindung von AP2, insbesondere für die Tyrosinbindung, wurde eine große Konformationsänderung vorhergesagt, die in der Konformation mit gebundenem Dileucin-Peptid nicht gezeigt werden konnte. Lediglich der N-Terminus der  $\beta 2$ -Untereinheit ist etwas versetzt bzw. „entrückt“, was zu der Freisetzung der Dileucin-Bindungstasche in  $\sigma 2$  führt und so die Bindung des Dileucin-Motivs ermöglicht (Abb.3.3.). Dieser Zustand soll deshalb im Folgenden als „entrückte“ oder „ausgeklinte“ Konformation bezeichnet werden. Die Bindungstasche für Tyrosin-Motive ist weiterhin durch Teile der  $\beta 2$ -Untereinheit besetzt. Die Informationen, die durch die „ausgeklinte“ Konformation über die Lage der Dileucin-Bindungstasche gewonnen wurden konnten deutlich machen, dass in der geschlossenen Konformation beide Bindungstaschen für Sortierungs-Motive durch Teile der  $\beta 2$ -Untereinheit blockiert sind (Abb.3.1.). Die Mutation einzelner Aminosäuren im Bereich der Dileucinbindungstasche von AP2 zeigte eine Inhibition der Dileucin-

Signalbindung, aber keinen Einfluss auf die Bindung von Tyrosin-Signalen (Kelly et al., 2008). Das führte zu der Schlussfolgerung, dass die Bindung von Tyrosin-Signalen unabhängig von der Bindung von Dileucin-Signalen ablaufen kann.

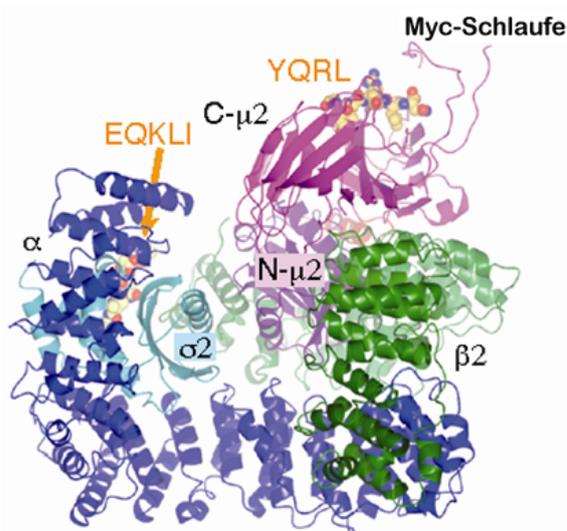


**Abb.3.1.: Details der geschlossenen Konformation von AP2.** Links: Die Tyrosinbindungstasche (Peptid YQRL in gelb) von C-μ2 (magenta) ist durch Teile der β2-Untereinheit (grüne Oberfläche) blockiert. Rechts: Durch die Strukturaufklärung des AP2-Komplexes in Dileucin-gebundener Konformation zeigt sich, dass die Bindungstasche für Dileucin-Motive in σ2 (blau) in der geschlossenen Konformation ebenfalls durch Teile der β2-Untereinheit (grüne Oberfläche) blockiert ist. Der AP2-Komplex ist aus der 2002 kristallisierten Struktur so modelliert worden, dass die potentielle Lage der Hinge und Ear-Domänen mit angezeigt werden kann (modifiziert nach Jackson et al., 2010).

## 3.2. Die Struktur von AP2 in Dileucin- und Tyrosin-gebundener Form

Die Struktur des AP2-Komplexes in Peptid-freier (geschlossener) und Dileucin-gebundener (ausgeklinkter) Konformation konnte die Bindung an Tyrosin-Signale nicht erklären. Deshalb sollte im Folgenden die Konformation des AP2-Komplexes mit Tyrosin-gebundenem Peptid ermittelt werden.

Um diese Konformation zu erreichen wurde der AP2 Core-Komplex (Abb.1.7.C) in Gegenwart von Tyrosin-haltigen TGN38-Peptid (DYQRLN) kristallisiert. Es zeigte sich schnell, dass für diese Tyrosin-gebundene Form eine enorme Konformationsänderung stattgefunden haben musste. Erstaunlicherweise wies diese Struktur aber eine Elektronendichte an der schon in 2008 aufgeklärten [ED]xxxL[LI] Motivbindungstasche auf. Obwohl diesem Kristallisationsansatz kein entsprechendes Peptid zugesetzt wurde, deutete dies auf ein Dileucin-Peptid hin. Es stellte sich heraus, dass ein Myc-Tag aus einem benachbarten AP2-Komplex, der in einer Schlaufe an der Oberfläche der  $\mu$ 2-Untereinheit eingebracht wurde (AS 218-252), in diesem Kristall so orientiert war, dass dessen „Phantom-Dileucinsequenz“ (MEQKLI) durch den anderen AP2-Komplex erkannt und gebunden werden konnte (Abb.3.2.). Diese Struktur soll im Folgenden als „offene“ Konformation bezeichnet werden.

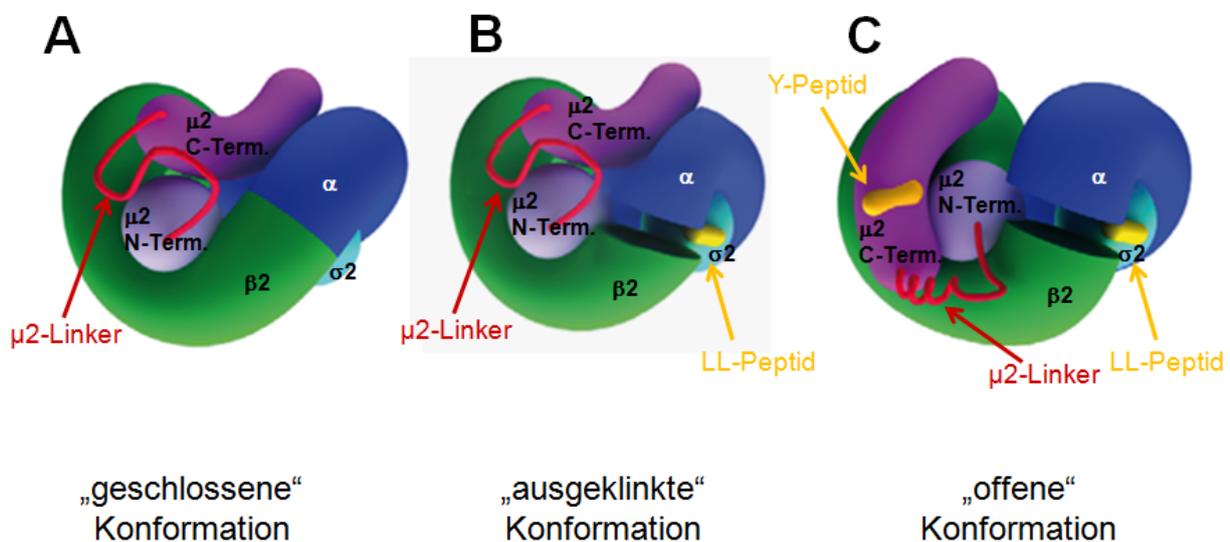


**Abb.3.2.: Struktur der „offenen“ Konformation von AP2.** Die  $\alpha$ -Untereinheit ist in blau,  $\beta$ 2 in grün, die N-terminale Domäne von  $\mu$ 2 in violett, die C-terminale Domäne von  $\mu$ 2 in magenta und  $\sigma$ 2 in cyan dargestellt. C- $\mu$ 2 liegt nicht mehr im Zentrum des Core-Komplexes, sondern an der Außenseite der  $\beta$ 2-Untereinheit und hat das Yxx $\Phi$ -Motiv (in gold) gebunden. Der Myc-Tag, innerhalb der C- $\mu$ 2-Schlaufe reicht in diesem Kristall in die Dileucin-Bindungstasche eines benachbarten Moleküls. Der Übersicht halber wird das Molekül nicht gezeigt. Die

Bindung dieses „Phantom-Motivs“ in die Dileucin-Bindungstasche in  $\sigma$ 2 ist daher in diesem Molekül dargestellt (EQKLI in Gold) (aus Jackson et al., 2010).

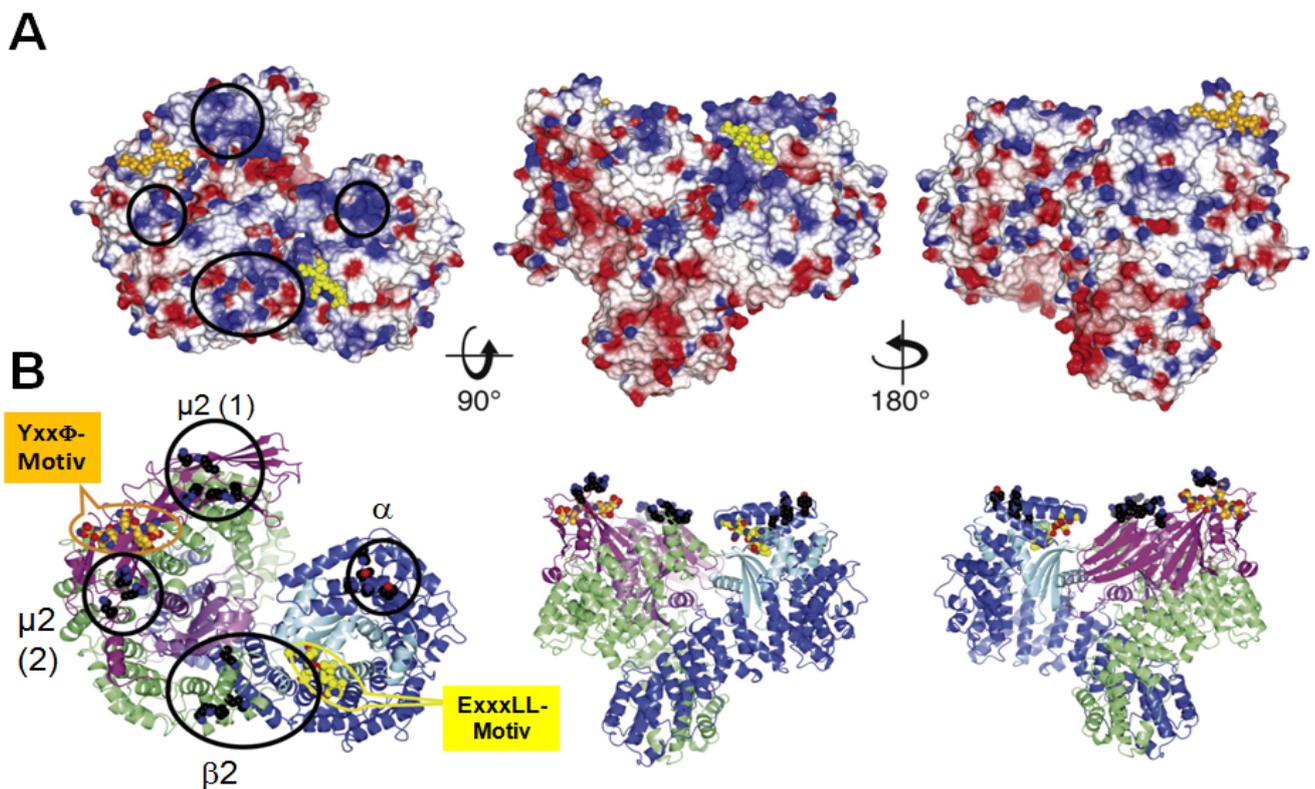
Die beiden großen Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$ 2 bilden im Core-Komplex eine Schale (1.3.). Im Zentrum dieser Schale sitzt der N-Terminus von  $\mu$ 2, der mit dem C-Terminus über einen unstrukturierten Hinge verbunden ist, sowie die  $\sigma$ 2-Untereinheit (Abb.3.3.A). In der geschlossenen Konformation, wie sie 2002 kristallisiert wurde, ist weder die Tyrosin- noch die Dileucin-Bindungstasche zugänglich, sondern von Aminosäure-Seitenketten der  $\beta$ 2-Untereinheit verdeckt. In der ausgeklügelten Konformation mit gebundenem Dileucinpeptid, wie sie 2008 kristallisiert wurde, ist

der N-terminale Teil der  $\beta 2$ -Untereinheit etwas „entrückt“. Dadurch wird die Bindungstasche für das Dileucin-Motiv in  $\sigma 2$  zugänglich (Abb.3.3.B). Die Bindungstasche für das Tyrosin-Motiv ist in dieser Konformation allerdings weiterhin durch die Aminosäure-Seitenketten der  $\beta 2$ -Untereinheit verdeckt. Im Übergang von der „geschlossenen“ oder der „ausgeklinkten“ in die „offene Konformation“ kommt es zu einer großen Umlagerung der Untereinheiten. Die Schale aus  $\alpha$  und  $\beta 2$  kollabiert nach innen, wodurch sie an den  $\alpha$ - und  $\beta 2$ -Termini stark entrückt wird. Dieser Kollaps wird durch 3 Rotationen innerhalb der großen Untereinheiten ausgelöst. Die spektakulärste Umlagerung vollzieht sich aber in der  $\mu 2$ -Untereinheit, die eine  $129^\circ$  Drehung um ihre eigene Achse und einen Versatz von  $39 \text{ \AA}$  gegenüber der N- $\mu 2$ -Domäne erfährt. Dadurch wird die vormals innenliegende Fläche der C- $\mu 2$ -Domäne nach außen gekehrt. Diese Drehung bewirkt zusätzlich, dass sich im zuvor unstrukturierten Linker zwischen den beiden  $\mu 2$ -Domänen eine 4fach gewundene Helix ausbildet (Abb.3.3.C). Als Resultat dieser Konformationsänderung sind nun beide Signalbindungsstellen zugänglich.



**Abb.3.3.: Konformationszustände von AP2.** Die  $\alpha$ -Untereinheit ist in blau,  $\beta 2$  in grün, die N-terminale Domäne von  $\mu 2$  in violett, die C-terminale Domäne von  $\mu 2$  in magenta und  $\sigma 2$  in cyan dargestellt. **A:** In der geschlossenen, Motiv-freien Konformation liegt C- $\mu 2$  im Zentrum des Core-Komplexes. **B:** Bei LL-Peptidbindung werden die  $\alpha$ - und  $\beta 2$ -Termini etwas voneinander entrückt, so dass die Dileucin-Bindungstasche freiliegt. Die Tyrosin-Bindungstasche ist immer noch durch Aminosäure-Seitenketten von  $\beta 2$  blockiert. **C:** In der offenen Konformation ist durch die Bindung beider Peptide der Core nach innen eingefallen. Nach Drehung um die eigene Achse liegt C- $\mu 2$  nun an der Außenseite der  $\beta 2$ -Untereinheit und hat das Yxx $\Phi$ -Motiv (in gold) gebunden. Der zuvor unstrukturierte  $\mu 2$ -Linker bildet nun eine 4fach gewundene Helix (modifiziert nach Jackson et al., 2010).

Die Umlagerung der  $\mu 2$ -Untereinheit hat noch weiter reichende Konsequenzen für den AP2-Komplex. In der offenen Konformation liegen nun die bekannten, durch biochemische Analysen bestätigten, Bindungsstellen ( $\alpha$ -PtIns(4,5) $P_2$ ,  $\mu 2$ -PtIns(4,5) $P_2$ , Yxx $\Phi$  und [ED]xxxL[LI]) co-planar in einer Ebene an der Oberfläche des AP2-Komplexes, demnach so orientiert, dass die einzelnen Bereiche mit der Plasmamembran interagieren können (Abb.3.4.A). Außerdem erscheinen in dieser Konformation an der Oberfläche von AP2 noch zwei zusätzliche Bereiche, die sich wie die  $\alpha$ -PtIns(4,5) $P_2$ - und  $\mu 2$ -PtIns(4,5) $P_2$ -Bindungsstellen, durch positiv geladene Aminosäurereste auszeichnen, eine in  $\beta 2$  und eine weitere in C- $\mu 2$  (Abb.3.4.B). Bei diesen Bereichen, die zuvor noch nicht beschrieben wurden, könnte es sich somit um zwei weitere PtIns(4,5) $P_2$ -Bindungsstellen in AP2 handeln. Die Interaktion mit der Plasmamembran könnte demnach über diese vier Bereiche in den drei Untereinheiten ( $\alpha$ ,  $\beta 2$  und  $\mu 2$ ) von AP2 erfolgen.



**Abb.3.4.: Orientierung der Signal- und PtIns(4,5) $P_2$ -Bindungsstellen von AP2 in der offenen Konformation.** **A:** Drei verschiedene Perspektiven des AP2-Komplexes in der offenen Konformation. Die Oberfläche ist nach dem elektrostatischen Potential (von -0,5V [rot] bis +0,5V [blau]) eingefärbt. Die gebundenen Signalpeptide sind farbig dargestellt (Yxx $\Phi$  [gold] und ExxxLL [gelb]), sowie die putativen PtIns(4,5) $P_2$ -Bindungsstellen schwarz eingekreist. Links: Aufsicht auf die positiv geladenen Interaktionsflächen. Mitte und Rechts: vordere und hintere Seitenansicht. **B:** Entsprechende Bänder-Darstellung, mit den zu Asparat mutierten Lysinen und Argininen, die an der Membranbindung beteiligt sein sollten (in schwarz) (aus Jackson et al., 2010).

### 3.3. Funktionelle Untersuchung der Membran- und Signalbindung von AP2

Um zu untersuchen, ob es sich bei den zuvor identifizierten Bereichen tatsächlich um Ptlns(4,5)P<sub>2</sub>-Interaktionsflächen handelt, wurden Mutanten generiert, in denen die positiv geladenen Aminosäuren dieser Bereiche ganz oder teilweise zu der negativ geladenen Aminosäure Glutamat mutiert wurden (Tab.3.1.), um die Interaktion von AP2 mit den negativ geladenen Phosphatidylinositolphosphaten der Plasmamembran in diesen Kontaktbereichen vollständig zu unterbinden. Diese Mutanten sollten von mir funktionell auf Membran und Signalbindung untersucht werden, was im Folgenden näher erläutert wird.

Tabelle 3.1.: Liste der verwendeten Ptlns(4,5)P<sub>2</sub>-Bindungsmutanten

Bezeichnung	Positiv geladener Aminosäuren → Mutation zu Glutamat
α-(PIP-Core)	Arg11, Gly12, Asn39, Lys43, Tyr53, Lys57, Tyr58, Lys61 → Glu11, 12, 39, 43, 53, 57, 58, 61
β2-(PIP-Core)	Lys5, 12, 26, 27, 29, 36 → Glu5, 12, 26, 27, 29, 36
μ2(1)	Lys330, 334, 350, 352, 354, 356, 365, 367, 368, 373 → Glu350, 352, 367, 368, 373
μ2(2)	Lys167, Arg169, 170, Lys421 → Glu 167,169, 170
μ2(PIP-Core)	μ2(1) + μ2(2) → Glu

Aus der Struktur von AP2 in der offenen Konformation ergeben sich Konsequenzen für die Funktion von AP2, die ich in dieser Arbeit überprüft habe. Hierzu sollte die Bindung von AP2 an die Plasmamembran in An- oder Abwesenheit von Sortierungssignalen unter *in vitro* Bedingungen rekonstruiert werden. Dafür wurde ein Biosensor-basierter *in vitro* Assay genutzt, bei dem die Bindung von AP2 an Liposomen unterschiedlicher Komposition in Echtzeit verfolgt und quantifiziert werden kann.

Ein großer Teil der unter den Punkten 3.3. und 3.4. dargestellten Ergebnisse ist publiziert in:

Jackson LP, Kelly BT, McCoy AJ, Gaffry T, James LC, Collins BM, Höning S, Evans PR, Owen DJ (2010) A large-scale conformational change couples membrane recruitment to cargo binding in the AP2 clathrin adaptor complex. *Cell* 141:1220-1229.

### 3.3.1. Biacore-basierter *in vitro* Assay

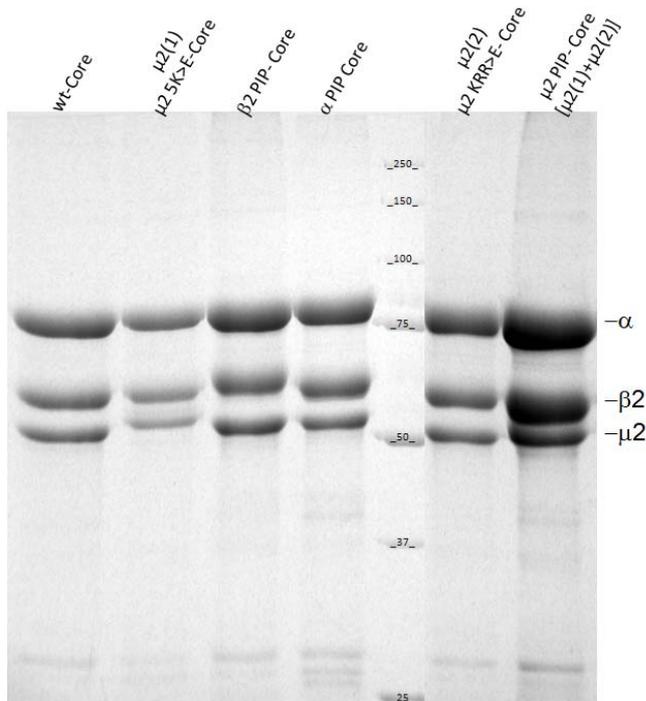
Im Rahmen dieses Assays wurden Liposomen verwendet, deren Ptlns(4,5)P<sub>2</sub>-Gehalt variiert wurde und die Lipid-verknüpfte, Sortierungssignal-haltige Peptide enthielten (2.3.19.). Die Liposomen wurden auf der Oberfläche eines L1-Sensorchips eines Biacore 3000 SPR-Biosensors immobilisiert, gefolgt von der Bestimmung der AP2-Interaktion mit den Liposomen.

### 3.3.2. Auswahl der Liposomen

Die einfachsten Liposomen bestanden aus den Phospholipiden Phosphatidylethanolamin (PE; 20%) und Phosphatidylcholin (PC; 80%) und wurden als Kontrolloberfläche für eine unspezifische Membranbindung genutzt. Für die Präparation von komplexeren Liposomen (2.3.18.) dienten diese PC/PE-Liposomen als Grundgerüst. Jeweils entsprechende Massenprozentage Phosphatidylcholin wurden gegen Ptlns(4,5)P<sub>2</sub> und/oder Lipid-verknüpftes Peptidsignal (2.3.19.) ersetzt.

### 3.3.3. Reinheit der rekombinanten AP2-Komplexe

Voraussetzung für die Interaktionsmessung an einem Biosensor ist eine hohe Reinheit der zu testenden Moleküle. Die Nutzung rekombinanter Proteine ermöglicht eine wesentlich höhere Sauberkeit der Proben, als die Nutzung aus Geweben aufgereinigter Proteine. Ein weiterer Vorteil liegt in der Möglichkeit, Mutationen in mögliche Signal- oder Membran-Interaktionsbereiche einfügen zu können, so dass gezielte strukturelle Funktionsanalysen durchgeführt werden können. Die Reinheit der verwendeten rekombinanten AP2-Varianten (Tab.3.1.) wurde mittels SDS-PAGE kontrolliert. In dem SDS-Gel (Abb.3.5.) laufen die zwei großen Untereinheiten ohne die Hinge/Ear-Domäne  $\alpha$  (~75kDa),  $\beta$ 2 (~55kDa) (Abb.1.7.) und die mittlere Untereinheit  $\mu$ 2 (~50kDa) entsprechend der zu erwarteten Molekulargewichte. Aufgrund der Trenneigenschaften eines 10%igen Gels läuft die  $\sigma$ 2-Untereinheit (~17kDa) in diesem Gel in der Laufmittelfront und ist daher nicht sichtbar. Sie konnte aber in 15%igen Gelen (nicht gezeigt) nachgewiesen werden. Das Gel weist die hohe Reinheit der gereinigten Komplexe nach. Die 3 Untereinheiten zeigen die erwarteten Molekulargewichte und auch das Mengenverhältnis der 3 gezeigten Untereinheiten innerhalb der Varianten ist stöchiometrisch.



**Abb.3.5.: SDS-PAGE einiger rekombinanter AP2-Komplexe.** Jeweils  $\sim 10\mu\text{g}$  Protein wurden in einem 10%igen SDS-Gel aufgetrennt und Coomassie-gefärbt. Die Position der einzelnen AP2-Untereinheiten ( $\alpha$  und  $\beta 2$  ohne Hinge/Ear-Domäne und  $\mu 2$ ) ist angegeben. Die kleine Untereinheit  $\sigma 2$  kann in diesem Gel nicht dargestellt werden.

### 3.3.4. Bindung von AP2 an $\text{Ptlns}(4,5)\text{P}_2$

Zunächst sollte die Bindung des AP2-Komplexes an Liposomen in An- und Abwesenheit „eingebetteter“ Sortierungssignale sowie in An- und Abwesenheit von  $\text{Ptlns}(4,5)\text{P}_2$  charakterisiert werden. Die Immobilisierung der Liposomen erfolgte wie unter 2.3.20 beschrieben. Nach Immobilisierung und einer Pulsinjektion von NaOH, um lose gebundene Liposomen zu entfernen, erfolgte die Interaktionsmessung mit AP2 (oder im Folgenden auch der AP2-Mutanten) in Konzentrationen von 50nM bis 10 $\mu\text{M}$ . Die Injektionsdauer betrug 1 Minute (Assoziation), gefolgt von einer Dissoziationsphase von 2-4 Minuten, in der nur Puffer über die Liposomenoberfläche floss. Bevor ein weiteres Experiment folgen konnte, wurde noch verbliebenes AP2 durch eine 20 sekundige Pulsinjektion mit NaOH entfernt.

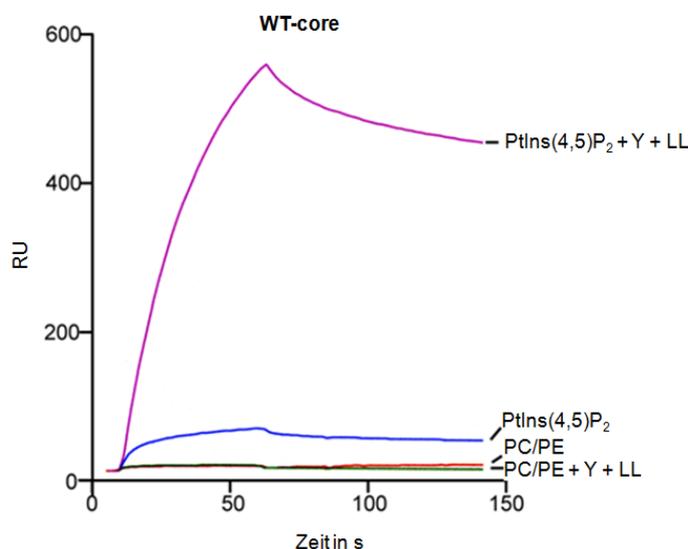
#### 3.3.4.1. AP2 bindet an Sortierungssignale nur in Anwesenheit von $\text{Ptlns}(4,5)\text{P}_2$

Ob  $\text{Ptlns}(4,5)\text{P}_2$  als Rekrutierungsfaktor für AP2 an die Plasmamembran wirken könnte, sollte in diesen Versuchen durch die Bindung von AP2 an Sortierungsmotive in An- oder Abwesenheit von  $\text{Ptlns}(4,5)\text{P}_2$  untersucht werden. 4 verschiedene Liposomen wurden wie oben beschrieben auf den 4 Flusszellen immobilisiert. PC/PE-Liposomen dienten als Referenzoberfläche. Auf eine zweite Flusszelle

wurden PC/PE-Liposomen, in die zusätzlich 1% TGN-Peptid (Y) und 1% pCD4-Peptid (LL) eingebracht waren (2.3.19), immobilisiert. Auf die dritte Flusszelle wurden PC/PE-Liposomen, welche 10% Ptlns(4,5)P<sub>2</sub> enthielten, immobilisiert und auf die vierte Flusszelle Liposomen mit PC/PE, 10% Ptlns(4,5)P<sub>2</sub>, 1% TGN-Peptid und 1% pCD4-Peptid.

Abbildung 3.6. zeigt die Bindung des AP2-Core-Komplexes an Sortierungssignale in Abhängigkeit von Ptlns(4,5)P<sub>2</sub>. Eine Bindung von AP2 an PC/PE-Liposomen ist kaum nachweisbar (rote Kurve). Ähnlich verhält es sich, wenn die benannten Sortierungssignale, an die AP2 binden kann (Y=TGN38; LL=pCD4), in PC/PE-Liposomen eingebettet sind (grüne Kurve). Auch hier ist eine Interaktion praktisch nicht nachweisbar. Eine signifikante Bindung an die Liposomen erfolgt erst dann, wenn diese Ptlns(4,5)P<sub>2</sub> enthalten (blaue Kurve). Unter den gewählten Bedingungen lag die Affinität in einem Bereich von 7µM. Die Affinität stieg um das 70fache auf 0,09µM, wenn Ptlns(4,5)P<sub>2</sub>-haltige Liposomen noch zusätzlich Tyrosin und Dileucin-Signale enthielten (violette Kurve).

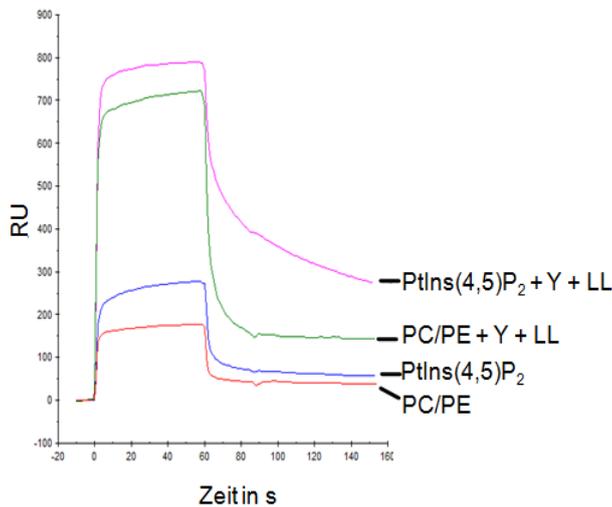
Die Bindung von AP2 an Sortierungssignale wird durch die Anwesenheit von Ptlns(4,5)P<sub>2</sub> um den Faktor 70 erhöht.



**Abb.3.6.: Bedeutung von Ptlns(4,5)P<sub>2</sub> für die Bindung von AP2 an Sortierungssignale.** Die Bindung von AP2-Core an Tyrosin- und Dileucin-haltige Liposomen findet nur in Anwesenheit von Ptlns(4,5)P<sub>2</sub> statt. Die Bindung an PC/PE-Liposomen, mit und ohne Sortierungssignal, ist nicht messbar. In Abwesenheit von Signal ist auch die Bindung von AP2-Core an Ptlns(4,5)P<sub>2</sub>-haltige Liposomen etwa 70fach geringer (modifiziert nach Jackson et al., 2010).

Um zu zeigen, dass die Affinitätssteigerung auf die Rolle von Ptlns(4,5)P<sub>2</sub> zurückzuführen ist und nicht durch eine mögliche Heterogenität der Liposomen hervorgerufen wird, sollte die Bindung einer „freien“ C-µ2-Domäne (His-µ2: AS 158-435) überprüft werden. In C-µ2 ist die Bindungstasche für Tyrosinsignale jederzeit zugänglich (Abb.1.10.). Zusätzlich kann diese Domäne über positiv geladene

Aminosäurereste (Abb.1.7.B) mit  $\text{Ptlns(4,5)P}_2$  interagieren. Die Experimente erfolgten mit der identischen, zuvor beschriebenen Liposomenbelegung. Es erfolgte lediglich eine Umpufferung (2.1.5.3.). Die gemessene Bindung von C- $\mu$ 2 ist in Abbildung 3.7. dargestellt.



**Abb.3.7.: Sensorgramm der Bindung von C- $\mu$ 2 an Liposomen.** Die Bindung von  $\mu$ 2 an Tyrosin-haltige Liposomen ist im Gegensatz zu AP2 von  $\text{Ptlns(4,5)P}_2$  unabhängig. Auch ist eine leichte Interaktion von C- $\mu$ 2 mit  $\text{Ptlns(4,5)P}_2$  nachweisbar, die sich in einer langsameren Dissoziation ausdrückt (violetter versus grüner Kurvenverlauf).

Im Gegensatz zu dem AP2-Core bindet  $\mu$ 2 auch an Tyrosinsignale, wenn diese ohne  $\text{Ptlns(4,5)P}_2$  in einer PC/PE-Umgebung vorliegen (grüne Kurve). Die Bindung ist in Gegenwart von  $\text{Ptlns(4,5)P}_2$  geringfügig stärker (violette Kurve). Dies lässt sich durch die im C- $\mu$ 2-Fragment vorhandene  $\mu$ 2- $\text{Ptlns(4,5)P}_2$ -Interaktionsfläche erklären (Rohde et al., 2002), die in der freien Domäne mit der Oberfläche interagieren kann. Auch zeigt sich dies darin, dass C- $\mu$ 2 stärker an die  $\text{Ptlns(4,5)P}_2$ -Oberfläche bindet (blaue Kurve) als an PC/PE (rote Kurve). Während die Bindung der löslichen C- $\mu$ 2-Untereinheit an ein Yxx $\Phi$ -Signal also weitgehend unabhängig von  $\text{Ptlns(4,5)P}_2$  erfolgt, ist die hochaffine Bindung des AP2-Komplexes nur in Gegenwart von  $\text{Ptlns(4,5)P}_2$  nachweisbar. Somit ist die Sortierungssignalbindung von AP2 abhängig von der Komposition der Membran.

### 3.3.4.2. Charakterisierung der $\text{Ptlns(4,5)P}_2$ -Bindungsstellen in AP2

Die zuvor gezeigten Daten verdeutlichen die Bedeutung von  $\text{Ptlns(4,5)P}_2$  für die Erkennung von Sortierungssignalen durch AP2. In AP2 wurden bislang zwei Bindungsstellen für  $\text{Ptlns(4,5)P}_2$  identifiziert, eine in der Nähe des N-Terminus der  $\alpha$ -Untereinheit, die andere in C- $\mu$ 2. Beide Bindungsstellen involvieren positiv geladene

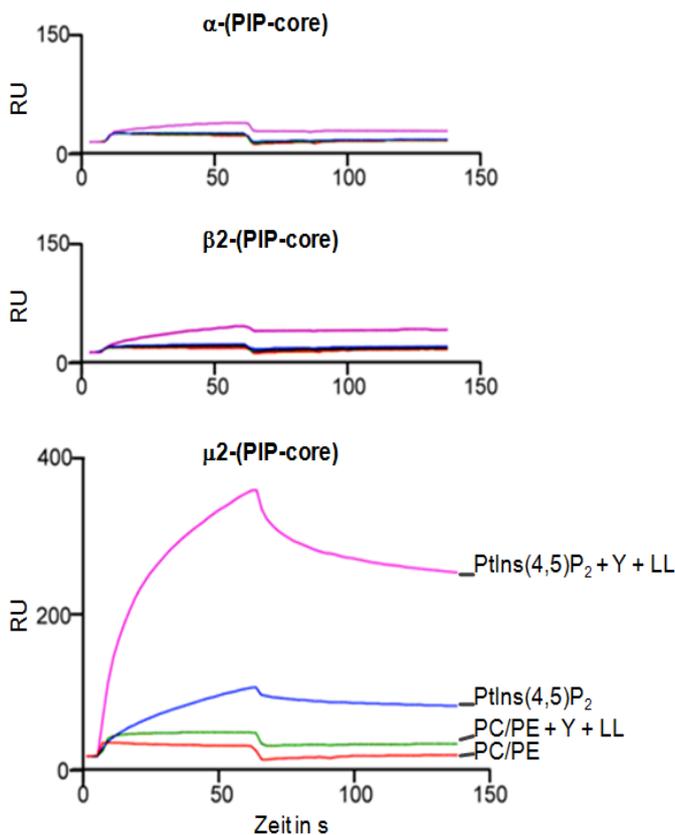
Aminosäure-Seitenketten, die mit den Phosphatgruppen von Ptlns(4,5)P<sub>2</sub> wechselwirken (1.3.3.).

In der „offenen“ Konformation von AP2 waren weitere positiv geladene und an der Oberfläche des Komplexes gelegene Reste auffällig (Abb.3.4.). Die Analyse von AP2-Varianten, in denen diese positiv geladenen Seitenketten zu negativ geladenen Glutamat-Resten mutiert waren (Tab. 3.1.) sollte zeigen, ob diese Bereiche ebenfalls zur Ptlns(4,5)P<sub>2</sub>-Bindung beitragen.

Hierfür wurde der oben beschriebene Versuchsaufbau genutzt und die Bindung der mutierten AP2-Varianten (Tabelle 3.1.) an die oben beschriebenen Liposomen untersucht.

Abbildung 3.8. zeigt die Bindung der Ptlns(4,5)P<sub>2</sub>-Bindungs-Mutanten an Liposomen. Die Mutation der Lysinreste in der bereits charakterisierten  $\alpha$ -Ptlns(4,5)P<sub>2</sub>-Bindungsstelle führte erwartungsgemäß zu einem Totalverlust der Bindung an Ptlns(4,5)P<sub>2</sub>-haltige Liposomen (Abb.3.8. oben). Auch die Bindung an Liposomen mit Ptlns(4,5)P<sub>2</sub> plus Tyrosin- und Dileucin-Signal ist sehr schwach (K<sub>D</sub>: >30 $\mu$ M siehe Tab. 3.2.). Die AP2-Variante, in der die an der Komplexoberfläche gelegenen Aminosäure-Seitenketten der  $\beta$ 2-Untereinheit gegen Glutamate ausgetauscht waren, zeigte ein vergleichbares Bindungsverhalten. Sowohl die Bindung an Ptlns(4,5)P<sub>2</sub>-Liposomen wie auch die Bindung an Signal-haltige Ptlns(4,5)P<sub>2</sub>-Liposomen war weitgehend aufgehoben (Abb. 3.8. mitte und Tab. 3.2.). Somit zeigen diese Experimente die Existenz einer weiteren wichtigen Ptlns(4,5)P<sub>2</sub>-Bindungsstelle in AP2.

In der offenen Konformation konnten an der Oberfläche von AP2, innerhalb der C- $\mu$ 2-Untereinheit, 2 Bereiche positiv geladener Aminosäurereste nachgewiesen werden (Abb. 3.4.). Die Mutation der Aminosäurereste des ersten Bereichs [ $\mu$ 2(1)] und des zweiten Bereichs [ $\mu$ 2(2)] zu negativ geladenen Aminosäuren zeigte kaum Unterschiede zur Bindung des WT-Cores an die Ptlns(4,5)P<sub>2</sub>-Liposomen (nicht gezeigt). Die K<sub>D</sub>-Werte der Bindungen betragen 11 $\mu$ M für  $\mu$ 2(1) und 7,5 $\mu$ M für  $\mu$ 2(2) (Tabelle 3.2.). Erst die Kombination beider Mutationen [ $\mu$ 2(PIP)-Core=  $\mu$ 2(1)+  $\mu$ 2(2)] resultierte in einer um den Faktor 4 verringerten Bindung an Ptlns(4,5)P<sub>2</sub>-Liposomen (Abb.3.8. unten und Tab.3.2.).



**Abb.3.8.: Charakterisierung putativer PtIns(4,5)P<sub>2</sub>-Bindungsstellen in AP2.** Die Bindung der AP2-Mutanten an Tyrosin- und Dileucin-haltige Liposomen findet nur in Anwesenheit von PtIns(4,5)P<sub>2</sub> statt. Die Bindung an basale PC/PE-Liposomen mit und ohne integriertes Signal ist nicht messbar. Die Mutationen der PtIns(4,5)P<sub>2</sub>-Interaktionsflächen in  $\alpha$  und  $\beta 2$  zeigen einen vollständigen Verlust der PtIns(4,5)P<sub>2</sub>-Bindung. Die Anwesenheit von Sortierungssignal in diesen Liposomen führt zu einer schwachen Bindung der Mutanten. Die Mutation beider PtIns(4,5)P<sub>2</sub>-Interaktionsflächen in  $\mu 2$  zeigt eine um den Faktor 4 verringerte Inhibition der PtIns(4,5)P<sub>2</sub>- und PtIns(4,5)P<sub>2</sub>/Signal-Bindung (modifiziert nach Jackson et al., 2010).

Wir interpretieren die Daten dahingehend, dass die initiale Rekrutierung von AP2 an die Membran über die positiv geladenen Bereiche in den  $\alpha$ - und  $\beta 2$ -Untereinheiten vollzogen wird. Die beiden positiv geladenen Bereiche von  $\mu 2$  spielen bei der Membranrekrutierung eine untergeordnete Rolle.

Tabelle 3.2.: Liste der K<sub>D</sub>-Werte für die Bindung von AP2-Core und PtIns(4,5)P<sub>2</sub>-Bindungsmutanten an Liposomen mit je 1% TGN38 oder pCD4-Signal sowie 0,5% TGN38 + 0,5% pCD4-Signal (modifiziert nach Jackson et al., 2010).

	10% PtIns(4,5)P <sub>2</sub>	10% PtIns(4,5)P <sub>2</sub> + 1% TGN38 (Y)	10% PtIns(4,5)P <sub>2</sub> + 1% pCD4 (LL)	10% PtIns(4,5)P <sub>2</sub> + 0,5% pCD4 (LL) + 0,5% TGN38 (Y)
	K <sub>D</sub> (μM)	K <sub>D</sub> (μM)	K <sub>D</sub> (μM)	K <sub>D</sub> (μM)
WT- Core	7,0	0,32	0,82	0,09
$\alpha$ -(PIP-Core)	-/-	>30	-/-	>30
$\beta 2$ -(PIP-Core)	-/-	20	-/-	>30
$\mu 2(1)$	11	0,52	0,95	Nicht bestimmt
$\mu 2(2)$	7,5	0,33	0,85	Nicht bestimmt
$\mu 2$ (PIP-Core)	30	6,2	2,5	0,28

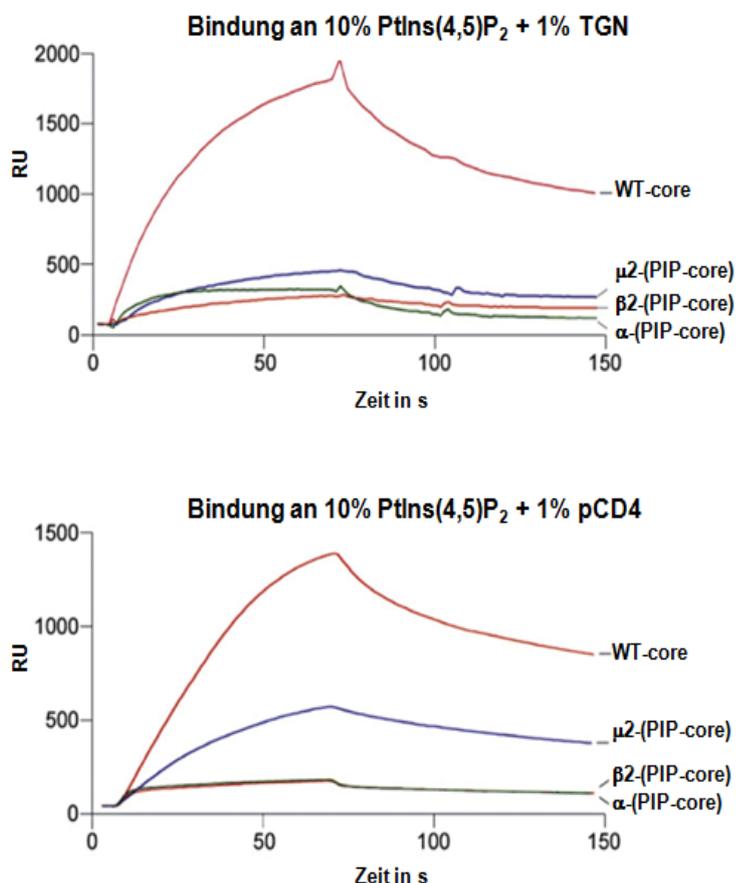
### 3.3.5. Signalbindung von AP2

Als nächstes sollte die Frage geklärt werden, ob sich die oben beschriebenen Mutanten von AP2 in ihrer Membranbindung unterscheiden, wenn entweder ein Tyrosin- oder ein Dileucin-Motiv zusammen mit  $\text{Ptlns}(4,5)\text{P}_2$  präsentiert wird.

#### 3.3.5.1. Die offene Konformation von AP2 wird durch die Bindung von Sortierungssignalen stabilisiert

Zunächst wurde die Bindung der AP2-Varianten an Liposomen untersucht, die jeweils entweder 1% TGN- oder 1% pCD4-Signal zusammen mit 10%  $\text{Ptlns}(4,5)\text{P}_2$  enthielten. Abbildung 3.9. zeigt die Bindung der AP2-Varianten an die oben genannten Liposomen. Die ermittelten  $K_D$ -Werte können der Tabelle 3.2. entnommen werden.

Die  $\alpha$ - und  $\beta 2$ -(PIP-Core)-Mutanten zeigten beide eine starke Inhibition sowohl in der Tyrosin-, als auch in der Dileucinbindung, was für eine Rekrutierung des AP2-Komplexes an die Plasmamembran über die positiv geladenen Bereiche innerhalb der  $\alpha$ - und  $\beta 2$ -Untereinheit spricht (Abb.3.9. oben und unten; rote und grüne Kurve)



**Abb. 3.9.: Sensorgramm zum Vergleich der Bindung von  $\alpha$ -,  $\beta 2$ - und  $\mu 2$ -(PIP-Core)-Mutanten an Liposomen mit entweder 1%TGN (Y) oder 1% pCD4-Peptid (LL).** Dargestellt ist die Bindung von jeweils 200nM der AP2-Varianten an eine Oberfläche mit 10%  $\text{Ptlns}(4,5)\text{P}_2$  + 1% TGN- (oben) oder 1% pCD4-Peptid (unten). Die Bindung wurde um die unspezifische Bindung an eine PC/PE-Oberfläche korrigiert. Die  $\alpha$ - und  $\beta 2$ -(PIP-Core)-Mutanten zeigen eine starke Inhibition beider Signalbindungen im Vergleich zum Wildtyp-Core. Die  $\mu 2$ -(PIP-Core)-Mutante zeigt eine starke Inhibition der Tyrosinsignalbindung, aber eine deutlich schwächere Inhibition der Dileucinsignalbindung (modifiziert nach Jackson et al., 2010)

Die Membranbindung über die  $\alpha$ - und  $\beta$ 2-Untereinheit sollte demnach die Konformationsänderung in AP2 zu der „offenen“ Konformation einleiten. Erst in dieser Form liegen dann, vor allem durch die Umlagerung von C- $\mu$ 2, die Ptlns(4,5)P<sub>2</sub>- sowie beide Signal-Bindungsstellen in AP2 frei zugänglich in einer Ebene an der Membrankontaktfläche des Komplexes.

Die  $\mu$ 2-(PIP-Core)-Mutante zeigte ein etwas anderes Verhalten: Während die Affinität an die Tyrosinsignal-haltigen Ptlns(4,5)P<sub>2</sub>-Liposomen um das 20fache sank (6,2 $\mu$ M versus 320nM; Abb.3.9. oben; blaue Kurve), war die Bindung an Dileucin-haltige Ptlns(4,5)P<sub>2</sub>-Liposomen deutlich stabiler (2,5 $\mu$ M versus 820nM; Abb.3.9. unten; blaue Kurve). Das zeigt, dass die Bindung von AP2 an Dileucinsignale weitgehend unabhängig von Konformationsänderungen in  $\mu$ 2 erfolgen kann. Für die Interaktion von AP2 mit Dileucinsignalen ist die vollständige Umlagerung des AP2-Komplexes in die offene Konformation, mit der daraus resultierenden Zugänglichkeit aller Ptlns(4,5)P<sub>2</sub>-Interaktionsflächen nicht notwendig. Dieser Zustand wird repräsentiert durch die Struktur der „ausgeklinkten Konformation“ (Abb.3.3.B), in der eine „Entrückung“ des  $\beta$ 2-N-Terminus lediglich zur Freigabe der [ED]xxxL[LI]-Bindungstasche in  $\sigma$ 2 führt.

Für die Bindung von Tyrosinsignalen bedarf es jedoch einer größeren strukturellen Umlagerung, bei der die  $\mu$ 2-Untereinheit involviert ist, wie sie die Struktur der „offenen Konformation“ repräsentiert (Abb.3.3.B).

Der WT-Core zeigte im Vergleich zu der Bindung an Liposomen, die nur Ptlns(4,5)P<sub>2</sub> enthielten, eine deutlich höhere Affinität zu Liposomen in denen Ptlns(4,5)P<sub>2</sub> zusammen mit 1% Sortierungssignal präsentiert wurde. Die Bindung von AP2 an Liposomen mit Dileucinsignal war im Vergleich zu der ohne Signal erhöht ( $K_D$ : 0,8 $\mu$ M versus 7 $\mu$ M), die Affinität zu Liposomen mit Tyrosinsignal wesentlich höher ( $K_D$ : 0,32 $\mu$ M versus 7 $\mu$ M).

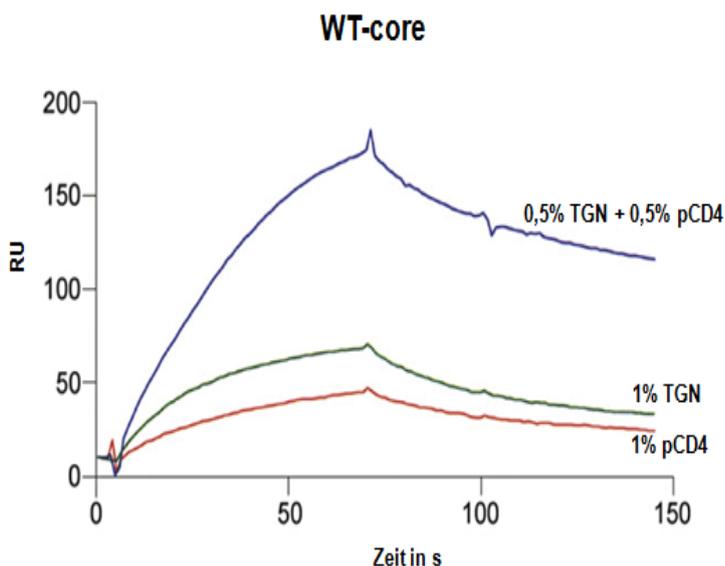
Dies zeigt, dass die Membranrekrutierung und Initiierung der Konformationsänderung von AP2 über die Ptlns(4,5)P<sub>2</sub>-Bindung in den  $\alpha$ - und  $\beta$ 2-Untereinheiten eingeleitet, über die Ptlns(4,5)P<sub>2</sub>-Bindung in C- $\mu$ 2 vollendet und durch Signalbindung weiter stabilisiert wird. Für die Bindung von Dileucinsignalen ist ein „Übergangszustand“, in dem der N-Terminus der  $\beta$ 2-Untereinheit von der Dileucin-Bindungstasche in  $\sigma$ 2 „entrückt“ wird, ausreichend. Für die Bindung von Tyrosinsignalen ist eine vollständige Umlagerung in die „offene“ Konformation notwendig. Dies führt zu der Präsentation aller vier Ptlns(4,5)P<sub>2</sub>-Bindungsstellen und

beider Signalbindungstaschen. In Gegenwart von  $\text{Ptlns}(4,5)\text{P}_2$  resultiert das in einer stärkeren Bindung an Tyrosinsignale, als an Dileucinsignale.

### 3.3.5.2. AP2-Bindung an kombinierte Signalsequenzen

Die bisher vorgestellten Daten unterstützen unser Modell, demzufolge AP2 an  $\text{Ptlns}(4,5)\text{P}_2$ -haltige Membranen (Plasmamembran) durch Wechselwirkungen mit den  $\alpha$ - und  $\beta 2$ -Untereinheiten rekrutiert wird. Die damit einhergehende Konformationsänderung in die offene Form erlaubt dann die Bindung von Sortierungssignalen von Membranproteinen. Dies geschieht über die  $\text{Yxx}\Phi$ -Bindungstasche in  $\mu 2$  und die  $[\text{ED}]\text{xxxL}[\text{LI}]$ -Bindungstasche in  $\sigma 2$ , die in der offenen Konformation in einer Ebene mit den  $\text{Ptlns}(4,5)\text{P}_2$ -Interaktionsregionen zu liegen kommen (Abb.3.4.B). Prinzipiell kann AP2 also gleichzeitig ein  $\text{Yxx}\Phi$ - und ein  $[\text{ED}]\text{xxxL}[\text{LI}]$ -Signal binden. Experimentell sollte es in solch einem Fall aufgrund der Avidität – hier einer divalenten Bindung – zu einem deutlichen Anstieg der Affinität kommen. Um dies zu überprüfen, wurden Liposomen mit 10%  $\text{Ptlns}(4,5)\text{P}_2$  sowie Liposomen, in die zusätzlich entweder 1%TGN-, oder 1%pCD4-, bzw. 0,5%TGN-zusammen mit 0,5%pCD4-Signal eingebracht wurden immobilisiert und die Bindung von AP2-Core an diese Oberflächen gemessen.

Abbildung 3.10. zeigt die Bindung von AP2 an jeweils 1% Gesamtsignal, nach Abzug der Werte für die  $\text{Ptlns}(4,5)\text{P}_2$ -Bindung. Die Dissoziationskonstante für die Bindung an Tyrosinsignale lag bei 320nM, die für die Bindung an Dileucinsignale bei 820nM. Die Bindung an Liposomen, in denen beide Signaltypen zu gleichen Anteilen vorhanden waren, war auf 90nM erhöht.



**Abb.3.10.: Aviditätseffekt der simultanen Bindung von  $\text{Yxx}\Phi$ - und  $[\text{ED}]\text{xxxL}[\text{LI}]$ -Signal.** Bindung von 200nM WT-Core an Liposomen mit 10%  $\text{Ptlns}(4,5)\text{P}_2$ -Liposomen in die zusätzlich entweder 1%TGN-, oder 1%pCD4-, bzw. 0,5%TGN- zusammen mit 0,5%pCD4-Signal eingebracht wurden. Die Bindung wurde um die Bindung an 10%  $\text{Ptlns}(4,5)\text{P}_2$ -Liposomen korrigiert (modifiziert nach Jackson et al., 2010).

Das lässt die Schlussfolgerung zu, dass sich die erhöhte Affinität von AP2 auf Aviditätseffekte zurückführen lässt. Durch die Bindung eines zweiten Signales wird die Affinität des AP2-Komplexes zur Oberfläche verstärkt, die offene Konformation weiter stabilisiert.

### **3.3.5.3. AP2 kann *in vitro* YxxΦ- und [ED]xxxL[LI]-Signale einer einzigen Polypeptidkette binden**

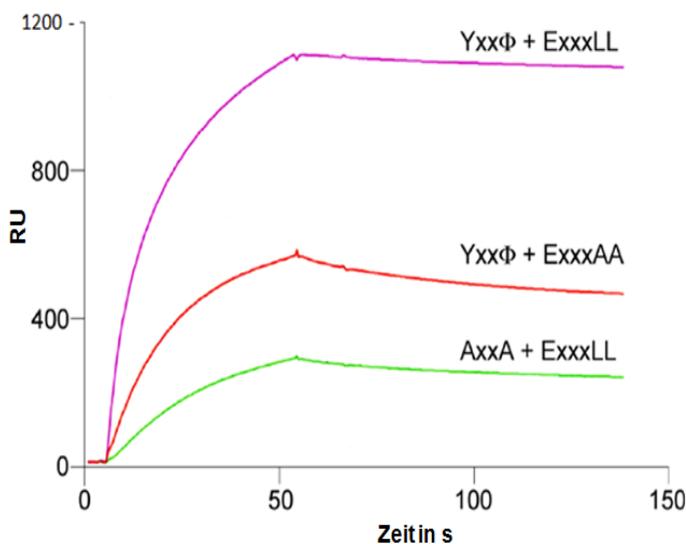
Die Bindung von AP2 an YxxΦ- und [ED]xxxL[LI]-Signale in PtdIns(4,5P)<sub>2</sub>-Liposomen, wie sie in 3.2.6. beschrieben wurde, eröffnet die Möglichkeit für eine Bindung von AP2 an zwei Transportproteine mit entsprechend unterschiedlichen Sortierungssignalen. Der Abstand zwischen den beiden Motiv-Bindungstaschen beträgt in der offenen Konformation von AP2 ca. 65-70Å, was in etwa einer Kette von 25-30 Aminosäureresten entspricht. Da Cargo-Proteine aber meist Membranproteine mit ausladenden extrazellulären Domänen sind, erscheint es uns unwahrscheinlich, dass sich zwei dieser Transportproteine in der Membran so nahe kommen, dass ein einziger AP2-Komplex die Signale beider Transportproteine binden kann, wie es in dieser *in vitro*-Situation durch die gleichmäßige Verteilung Lipid-verankerter, kurzer Sortierungsmotive in den Liposomen simuliert wurde.

Als weitere Möglichkeit erscheint die Präsentation eines Tyrosin- und eines Dileucin-Motivs in einer einzigen Polypeptidkette mit geeignetem Abstand zueinander. Voraussetzung dafür wäre, dass im unstrukturierten cytoplasmatischen Bereich des Transportproteins die beiden Sortierungssignale mindestens 25-30 Aminosäuren (~65-70 Å) voneinander entfernt liegen.

Um dies zu testen, wurden „Superpeptide“ (Tab. 2.7.) mit einer Länge von 83 Aminosäuren von der Arbeitsgruppe Owen zur Verfügung gestellt. Ein Peptid enthielt beide Sortierungssignale, die durch 35 Aminosäuren voneinander getrennt waren. In anderen „Superpeptiden“ waren die relevanten Aminosäuren des Tyrosin- oder Dileucin-Motivs, sowie beider Motive zu Alanin mutiert worden. Alle Peptide enthielten einen 6xHis-Tag über den sie mittels Lipid-verankertem Nickel-NTA (2.3.18.) an die Oberfläche der Liposomen gekoppelt werden konnten. Um die Interaktion von AP2 mit den „Superpeptiden“ messen zu können, wurde in diesen Versuchen ein AP2-Core genutzt, der keinen His-Tag enthielt, folglich nicht selbst an freies Ni-NTA binden sollte. Dieser wurde freundlicherweise von David Owen zur Verfügung gestellt.

Um zu testen, ob AP2 an zwei verschiedene Sortierungssignale eines Transportproteins binden kann, wurden Liposomen (60% PC, 20% PE, 10% PtdIns(4,5P)<sub>2</sub>, und 10% Ni-NTA-DOGS) auf allen 4 Flusszellen immobilisiert. Die „Superpeptide“ wurden auf eine Endkonzentration von 10µM eingestellt und jede der Flusszellen mit einem anderen „Superpeptid“ über die Bindung an Ni-NTA beladen, bis alle Flusszellen mit 1000 Resonanzeinheiten (RU) Peptid versehen waren. Anschließend wurde die Bindung von „AP2-Core ohne His“ an diese Peptide gemessen.

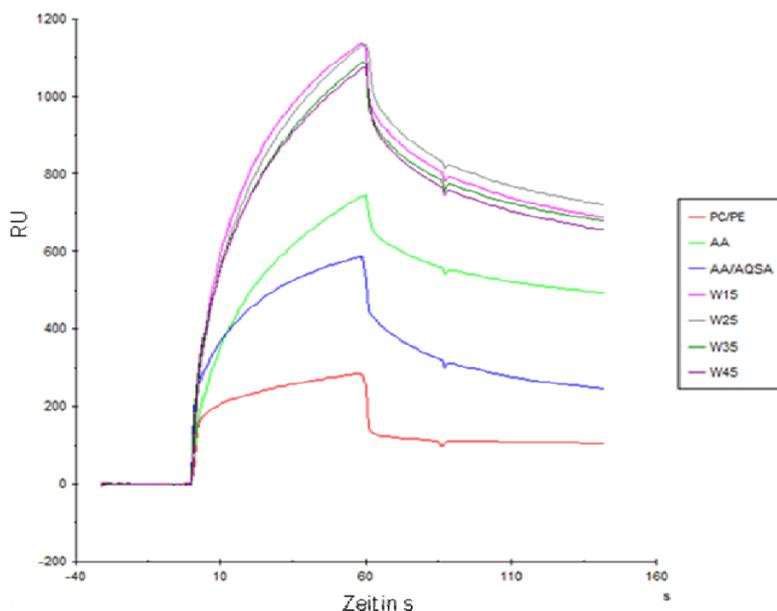
Abbildung 3.11. zeigt die Bindung des „AP2-Cores ohne His“ an die „Superpeptide“. Die Bindung von AP2 an das „Superpeptid“, welches beide Signale trägt, ist 3-4mal höher als die Bindung an „Superpeptide“, die nur eines der Signale tragen. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass AP2 zumindest *in vitro* mit höherer Affinität an Transportmoleküle binden kann, die beide Sortierungssignale besitzen. Auf die mögliche biologische Relevanz dieser Ergebnisse wird in der Diskussion eingegangen.



**Abb.3.11.: Bindung von „AP2-Core ohne His“ an die Superpeptide.** Dargestellt ist die Bindung von 1 µM „AP2 ohne His“ an die je 83 Aminosäuren langen „Superpeptide“. Das Wildtyp-Peptid enthält ein YxxΦ- und ein ExxxLL-Signal im Abstand von 35 Aminosäuren. In den entsprechenden Kontrollen wurde je eines oder beide Signale mutiert. Die unspezifische Bindung des AP2-Cores an die Peptide wurde um die Bindung an die Doppelmutante korrigiert.

Im Folgenden sollte geklärt werden, welcher Abstand zwischen den beiden Sortierungs-Motiven notwendig ist, damit beide Signale gleichzeitig gebunden werden können. Dafür wurden Peptide generiert, die beide Motive enthielten, sich aber im Abstand der Motive voneinander unterschieden. So sollte die Bindung von Peptiden mit „Spacer“ von 15, 25 und 45 Aminosäuren mit der Bindung des Wildtyp-Peptids und den Kontrollen gemessen werden. Um die Aviditätseffekte besser charakterisieren zu können, wurde die Signaldichte in den Liposomen reduziert (74%

PC, 20% PE, 3% PtdIns(4,5P)<sub>2</sub>, und 3% Ni-NTA DOGS). Die Peptide wurden wie zuvor beschrieben auf den Flusszellen immobilisiert, bis jede Flusszelle mit 400 RU (+/- einer Abweichung von maximal 30 RUs) Peptid beladen war und die Bindung von „AP2-Core ohne His“ an diese Peptide gemessen. Abbildung 3.12. zeigt, dass der AP2-Core unspezifisch an die PC/PE-Oberfläche (rot) bindet und am schlechtesten an die Negativkontrolle, in der beide Sortierungssignale mutiert wurden (blau), gefolgt von dem Peptid in dem das Dileucinsignal mutiert wurde (hellgrün). Die Bindung des AP2-Cores an die Wildtyp-Peptide mit 15, 25, 35 und 45 Aminosäuren „Spacern“ ist annähernd gleich wie auch die Dissoziation des AP2-Cores von den Liposomen.

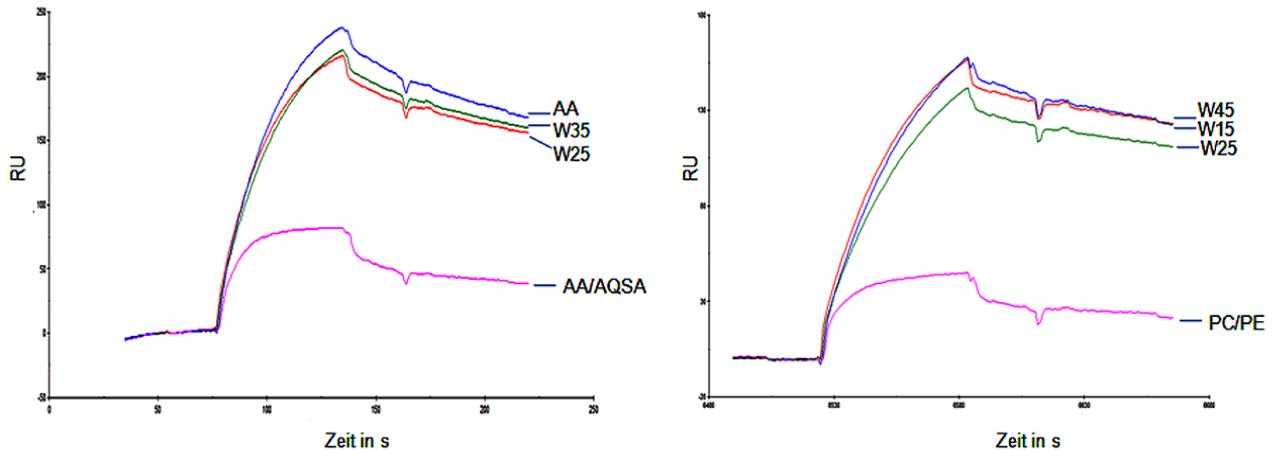


**Abb.3.12.: Bindung von „AP2-Core ohne His“ an Superpeptide verschiedener Länge.** Dargestellt ist die Bindung von 10 µM „AP2 ohne His“ an verschiedene „Superpeptide“. Das Wildtyp-Peptid enthält ein YxxΦ- und ein ExxxLL-Signal im Abstand von 35 Aminosäuren. In den entsprechenden Kontrollen wurde eines oder beide Signale mutiert. Zusätzlich wurden Peptide gemessen deren Sortierungssignale durch „Abstandshalter“ von 15, 25 und 45 Aminosäuren voneinander getrennt sind.

Dies würde bedeuten, dass ein Abstand von 15 Aminosäuren genügen würde, damit AP2 das Tyrosin- und Dileucin-Motiv eines Transportproteins gleichzeitig binden kann. Dieses Resultat wird in der Diskussion eingehend besprochen.

In Kontrolllexperimenten konnte ich sicherstellen, dass die Sensoroberflächen für die zuvor dargestellten Experimente die gleiche Signaldichte aufwiesen. Wenn das lösliche C-µ2-Fragment (hier ein Fragment ohne His-Tag) injiziert wurde, war die maximale gemessene Signalstärke in allen Flusszellen nahezu identisch. Nur auf der Oberfläche, die das Superpeptid enthielt, in der beide Signale mutiert waren zeigte C-µ2 lediglich eine „Background“-Bindung vergleichbar mit der Bindung von C-µ2 an die PC/PE-Oberfläche (Abb. 3.13 links und rechts; violette Kurven)

Dies bedeutet, dass gleich viel (Tyrosin-)Signal in diesen Liposomen präsentiert, also auch gleich viel Peptid geladen wurde.

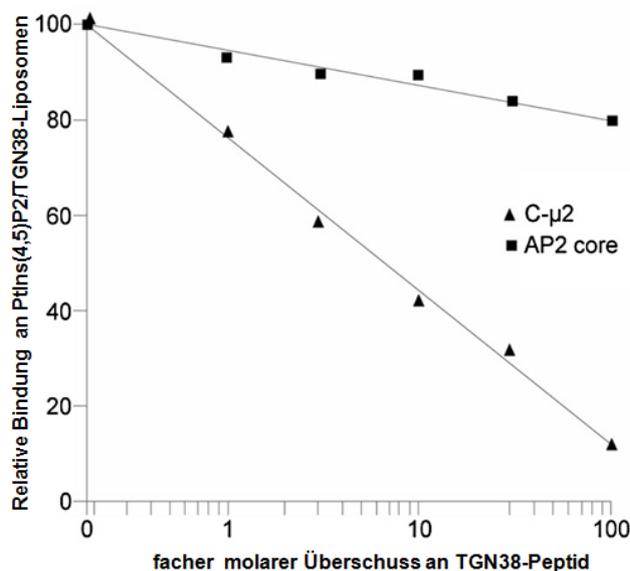


**Abb.3.13.: Bindung von „ $\mu$ 2 ohne His“ an Superpeptide verschiedener Länge.** Dargestellt ist die Bindung von 500 nM „ $\mu$ 2 ohne His“ an verschieden lange „Superpeptide“. Das Wildtyp-Peptid (W35) enthält ein Yxx $\Phi$ - und ein ExxxLL-Signal im Abstand von 35 Aminosäuren. In den entsprechenden Kontrollen wurden eines oder beide Signale mutiert. Zusätzlich wurde die Bindung an Peptide gemessen, deren beide Sortierungssignale durch Platzhalter von 15, 25 und 45 Aminosäuren voneinander getrennt sind.

### 3.3.6. Relevanz der geschlossenen Konformation von AP2

Wie besprochen konnte AP2 in zwei Konformationsvarianten kristallisiert werden, der offenen und der geschlossenen Variante. Die zuvor dargestellten Experimente zur Bindung von AP2 an Modellmembranen belegen die Relevanz der offenen Konformation von AP2, lassen aber keine Aussage über die Signifikanz der geschlossenen Konformation zu. An dieser Stelle sei daran erinnert, dass in der geschlossenen Konformation die Bindungsstellen für Yxx $\Phi$ - und [ED]xxxL[LI]-Signale blockiert, also unzugänglich sind. Somit sollte ein AP2-Komplex in Lösung nicht in der Lage sein, ein Sortierungs-haltiges Peptid zu binden. Anders beim löslichen Fragment von  $\mu$ 2; hier ist die Yxx $\Phi$ -Bindungsstelle frei zugänglich. Der AP2-Core und C- $\mu$ 2 sollten sich also in ihrem Peptidbindungsverhalten in Lösung stark unterscheiden.

In diesen Versuchen wurden AP2-Core oder C- $\mu$ 2 mit steigenden molaren Überschüssen TGN38-Peptid für 15 Minuten bei RT vorinkubiert. Die Protein/Peptid-Lösungen wurden anschließend auf Liposomen injiziert (60%PC, 20% PE, 10% Ptlns(4,5)P<sub>2</sub>, 10% TGN38-Peptid (Yxx $\Phi$ )) und deren Bindung an die Liposomen über 2 Minuten gemessen. Die Bindung der Proteine, die nicht mit Peptid inkubiert wurden, wurde auf 100% gesetzt und die relative Bindung der Proteine an die Ptlns(4,5)P<sub>2</sub>/TGN38-Liposomen gegen den x-fachen molaren Überschuss an vorinkubierten TGN38-Peptid aufgetragen (Abb.3.14).



**Abb.3.14.: Einfluss löslicher Peptide auf die Membranbindung von AP2 und C- $\mu$ 2.** Die Vorinkubation des AP2-Cores mit steigendem molarem Überschuss an Yxx $\Phi$ -Peptid hat keinen Einfluss auf die Bindung an Ptlns(4,5)P<sub>2</sub>/TGN38-Liposomen. Die entsprechende Vorinkubation von C- $\mu$ 2 führt zu einer annähernd Inhibition der Bindung (modifiziert nach Jackson et al., 2010).

Die Bindung der  $\mu$ 2-Kette an Tyrosinsignal-haltige Liposomen lässt sich durch die Vorinkubation mit Yxx $\Phi$ -Peptid inhibieren. Bei einer Vorinkubation mit 100fach molarem Überschuss Yxx $\Phi$ -Peptid zeigt C- $\mu$ 2 nur noch 10% Bindung an Tyrosinsignal-haltige Liposomen. Der AP2-Komplex, zeigt bei gleicher Vorinkubation kaum Inhibition der Signalbindung. Bei 100fachem Überschuss an Yxx $\Phi$ -Peptid weist dieser noch über 90% der Bindung an Tyrosinsignal-haltige Liposomen auf. Dass die Bindung doch etwas geschwächt wird, lässt sich durch die hohe Peptidkonzentration in der Lösung erklären (bis zu 20 $\mu$ M), die die Wechselwirkung von AP2 mit der Oberfläche stören kann.

Dass die Bindung von AP2 an Tyrosin-haltige Liposomen nicht durch die Vorinkubation mit Tyrosin-haltigen Peptid inhibiert werden kann, spricht dafür, dass AP2 in Lösung in der geschlossenen Konformation vorliegt. In dieser Konformation ist die Tyrosin-Bindungstasche nicht zugänglich. Im Gegensatz dazu lässt sich die

Bindung von C- $\mu$ 2 mit der frei zugänglichen Tyrosin-Bindungstasche (Abb.1.10.) durch Vorinkubation mit TGN38-peptid nahezu vollständig inhibieren.

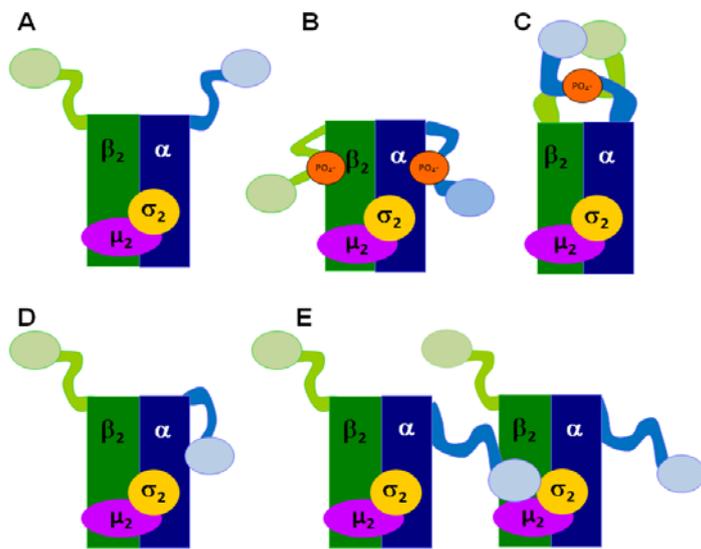
Die geschlossene Konformation ist folglich die Konformation von AP2 in Lösung

### **3.4. Die Regulation des AP2-Komplexes kann durch weitere Faktoren moduliert werden**

Die Struktur des AP2-Komplexes konnte bis dato nur anhand des Core-Komplexes (ohne Hinge und Ear-Domänen) sowie der einzelnen Ear-Domänen aufgeklärt werden, da die Hinge-Regionen beider großen Untereinheiten bei der bakteriellen Expression proteolytisch angegriffen wurden. Diese Strukturen und Konstrukte führten zur Aufklärung der Membran- und Signalbindung, für die der Core-Komplex hinreichend genügte, und zur Aufklärung der Bindung assoziierter und CCV-regulierender Proteine, bei der meist die Ear-Domänen von AP2 beteiligt waren. Über die Funktion und Lage der Hinge-Regionen sowie die Lage der Ear-Domänen ist kaum etwas bekannt. Bis heute konnte dem  $\beta$ 2-Hinge lediglich die Funktion der Clathrinbindung über seine Clathrin-box nachgewiesen werden. Auch die Lage der Hinges ist unbekannt. Obwohl sie in höheren Eukaryoten höchst konserviert sind (~60% Homologie) weisen sie keine strukturgebenden Sequenzen auf und wurden somit als flexible unstrukturierte Ketten dargestellt, mit den Ear-Regionen distal des Cores (Schematisch dargestellt in Abb. 3.15.A). Als unstrukturierte Polypeptidketten könnten die Hinge-Regionen mit ihrer Länge von etwa 120 Aminosäuren eine Distanz von mindestens 250Å überspannen. Im Vergleich dazu hat der AP2-Core ein Ausmaß von etwa 80x100Å.

Es ist denkbar, dass aufgrund der Flexibilität und Länge der Hinge-Regionen, sie selbst oder die distalen Ear-Regionen an der funktionellen Regulation des AP2-Komplexes beteiligt sind. So könnten die Hinge-Regionen, wie in Abbildung 3.15. B und C dargestellt, an den jeweiligen Core-Bereich oder sich gegenseitig binden, um z.B. die Interaktion von AP2 mit CLASPs (*Clathrin associated sorting proteins*) oder Clathrin zu regulieren. Als Auslöser für die Bindung wäre eine Phosphorylierung denkbar. Auch könnte eine Ear-Region einer großen Untereinheit an den Core-Bereich desselben (Abb. 3.15. D) oder eines benachbarten AP2-Komplexes binden (Abb. 3.15. E), um z.B. die offene oder geschlossene Konformation zu stabilisieren

oder bei der Assemblierung von AP2-Komplexen an dem Ort der CCV-Bildung mitzuwirken.

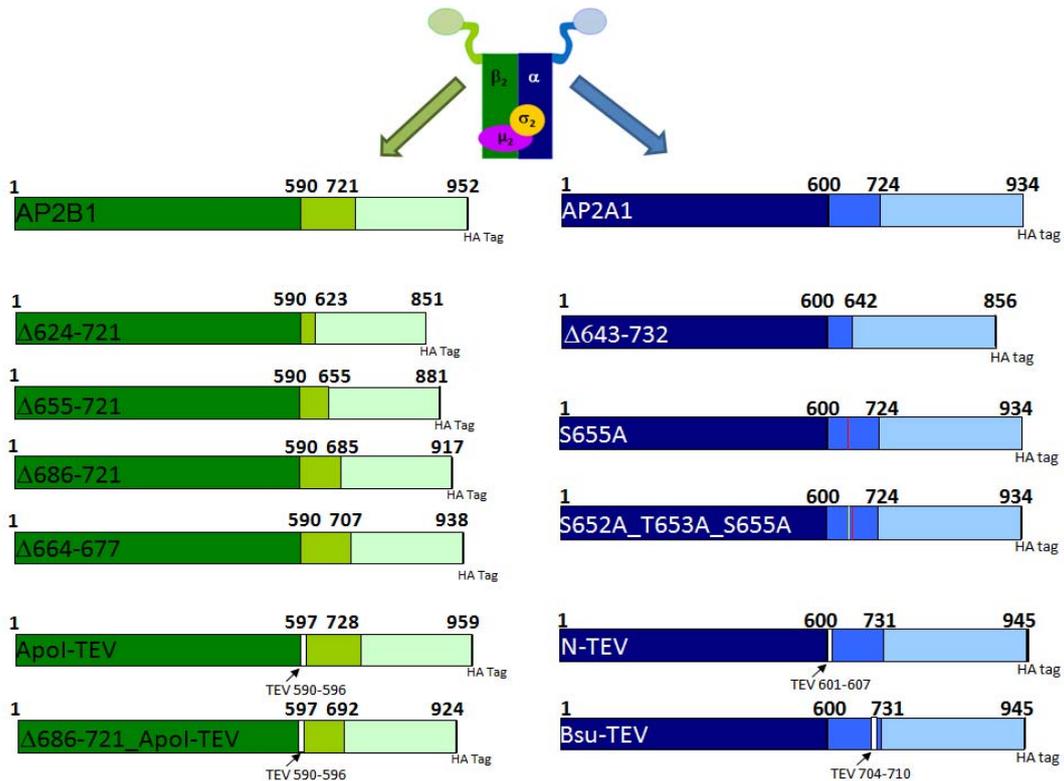


**Abb.3.15.: Modelle weiterer Regulationsmöglichkeiten des AP2-Komplexes unter Einbezug der Hinge- und Ear-Domänen.** Dargestellt sind verschiedene denkbare Konformationen des AP2-Komplexes. Durch die Flexibilität der Hinge-Regionen könnte AP2 durch die Bindung verschiedener Domänen an sich selbst, oder andere AP2-Komplexe binden

Damit diese Möglichkeiten näher untersucht werden können, wurden im Folgenden verschiedene  $\alpha$ - und  $\beta_2$ -Konstrukte für eine Expression in eukaryotischen Zellen, generiert.

### 3.4.1. Generation verschiedener $\alpha$ - und $\beta_2$ -Konstrukte zur Expression in eukaryotischen Zellen

Um ein Wildtyp-Konstrukt zu erhalten, das als Vorlage für alle weiteren Klonierungen dienen sollte, wurde cDNA von  $\alpha$ -Adaptin mittels RT-PCR aus *HeLa*-Zellen kloniert (2.1.4.8.). Von diesem Konstrukt wurden bislang 2 Isoformen beschrieben, Isoform 1 und Isoform 2. Von Isoform 1 gibt es eine Splicevariante, in der 22 Aminosäuren innerhalb des Hinges deletiert sind. Über die Expression dieser Isoformen ist nicht viel bekannt. Es konnte in der Maus gezeigt werden, dass die Isoform 2 von  $\alpha$ -Adaptin verstärkt im Hirn exprimiert wird (Ball et al., 1995). Über die Expression im Menschen ist diesbezüglich nichts bekannt. Mittels RT-PCR von m-RNA aus *HeLa*-Zellen mit Gen-spezifischen Primern für beide Isoformen konnte nur die Isoform 1 von  $\alpha$ -Adaptin in der verkürzten Splicevariante gewonnen werden. Diese Variante entspricht dem Klon NM\_130787 (AP2A1) der Gendatenbank. Als Vorlage für das Wildtyp-Konstrukt von  $\beta_2$ -Adaptin diente der RZPD-Klon BC\_006201 (AP2B1). Beide Wildtyp-Konstrukte wurden mit einem C-terminalen HA-Tag versehen und dienten als Ausgangskonstrukte für die in Abbildung 3.16. dargestellten Mutanten.



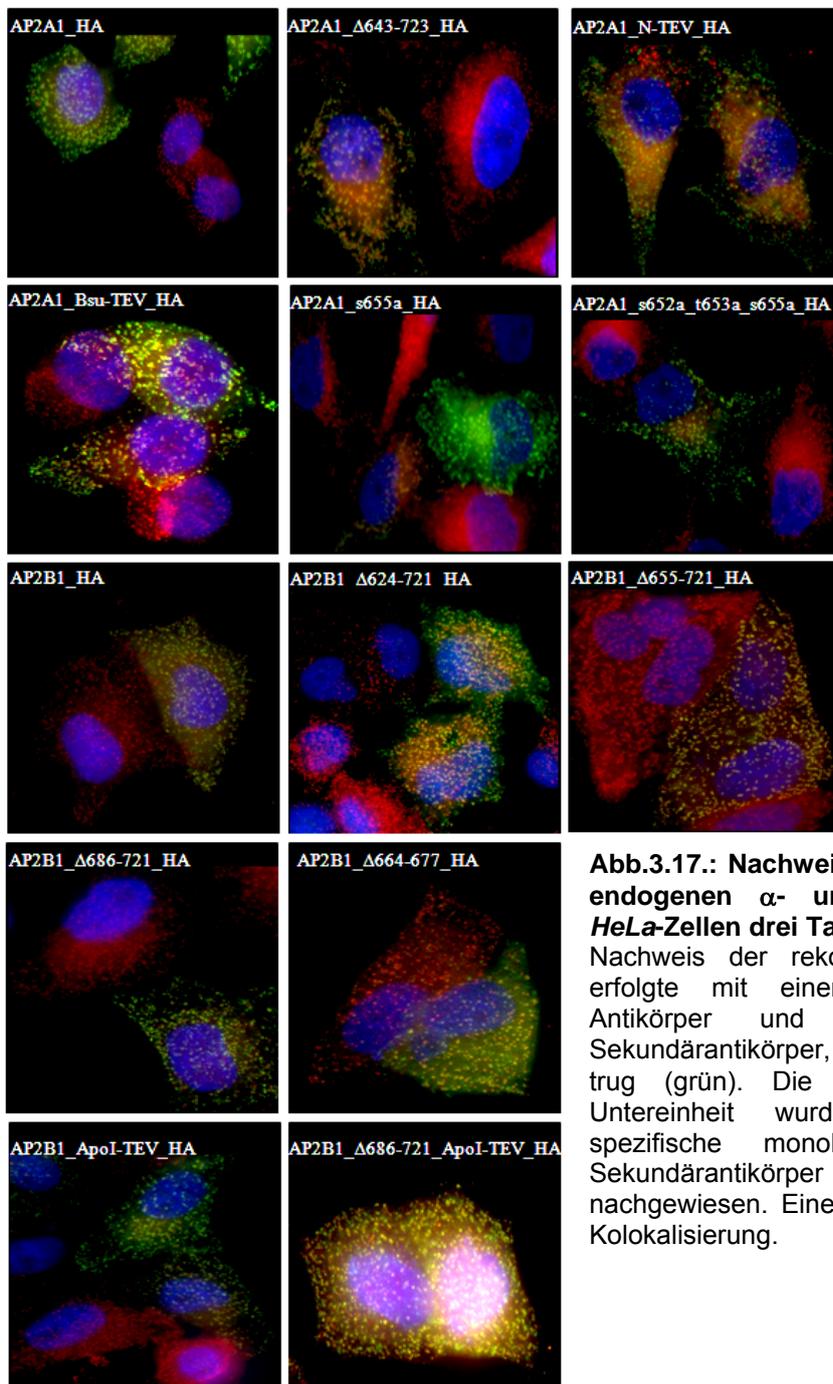
**Abb.3.16.: Schematische Darstellung der  $\alpha$ - (AP2A1) und  $\beta$ 2- (AP2B1) Konstrukte.** Aus den Wildtyp-Konstrukten mit C-terminalem HA-Tag (oben grün und blau) wurden Mutanten entsprechend der Abbildung kloniert und in *HeLa* oder *HEK293*-Zellen exprimiert.

Mittels *overlap-extension PCR* (2.2.13.) wurden Deletionsmutanten mit verkürzten Hinge Regionen kloniert. Die Expression von  $\alpha$ - und  $\beta$ 2-Varianten ohne Hinge-Region war erfolglos, da diese Konstrukte zwar exprimiert, aber sofort proteasomal degradiert wurden (nicht gezeigt). Durch die Insertion hybridisierter Oligonukleotide (2.2.10.) wurden TEV-Schnittstellen N- oder C-Terminal der Hinge-Regionen eingebracht und mittels *site-directed mutagenesis* (2.2.13.) potentielle Phosphorylierungsstellen zu Alanin mutiert.

### 3.4.1.1. Expression rekombinanter AP2 $\alpha$ - und $\beta$ 2-Untereinheiten

Die rekombinanten Untereinheiten wurden transient in *HeLa*- oder *HEK293*-Zellen transfiziert (2.4.5.). Es zeigte sich, dass die rekombinanten Untereinheiten erst 2-3 Tage nach Transfektion in den endogenen Komplex eingebaut wurden. Dies ließ die Vermutung zu, dass die Halbwertszeit dieses Komplexes mehrere Tage beträgt, was sich auch anhand von si-RNA Experimenten bestätigen ließ, in denen die Expression der großen Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$ 2 mittels RNAi gegen die 3'UTR-Sequenzen der entsprechenden m-RNA herab reguliert wurden. Die Expressionen der großen Untereinheiten des AP2-Komplexes ließen sich erst nach mehreren Tagen

wiederholter si-RNA-Behandlung auf unter 30% Proteingehalt senken. Erst dann zeigte der *knock-down* einer Untereinheit auch eine Reduktion des Proteingehalts der anderen Untereinheiten des AP2-Komplexes. Deswegen wurden Zellen erst 3 Tage nach transienter Transfektion für Versuche genutzt. Da die Transfektionsrate in *HeLa* Zellen deutlich unter 30% lag und die Proteinexpression 3 Tage nach Transfektion zudem schon stark vermindert war, wurden stabile Mischklone aller in Abbildung 3.16. dargestellten Mutanten in *HEK293*-Zellen generiert. Abbildung 3.17. zeigt die Expression der in Abbildung 3.16. beschriebenen Mutanten in *HeLa*-Zellen.

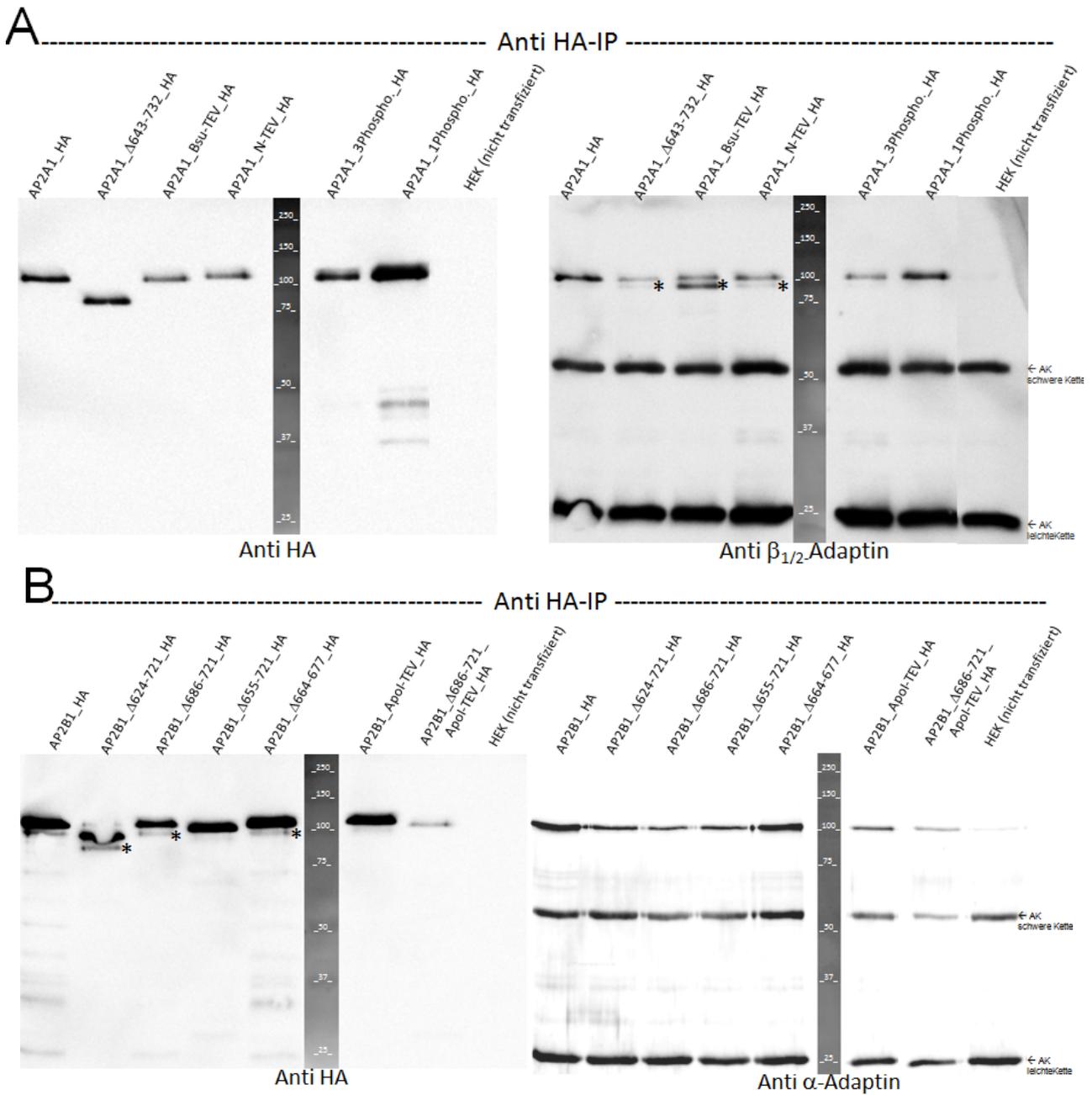


**Abb.3.17.: Nachweis der rekombinanten und endogenen  $\alpha$ - und  $\beta$ 2-Untereinheiten in *HeLa*-Zellen drei Tage nach Transfektion.** Der Nachweis der rekombinanten Untereinheiten erfolgte mit einem polyklonalen anti-HA-Antikörper und einem entsprechenden Sekundärantikörper, der als Farbstoff Alexa 488 trug (grün). Die endogene  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ 2-Untereinheit wurde durch entsprechende spezifische monoklonale Antikörper und Sekundärantikörper mit Alexa 546 (rot) nachgewiesen. Eine gelbe Färbung signalisiert Kolkalisierung.

Alle Konstrukte konnten mittels IF nachgewiesen werden und zeigen die typische Färbung und Verteilung in CCPs an der Plasmamembran. Die rekombinanten großen Untereinheiten (grün) kolokalisieren (gelb) mit der jeweils anderen großen Untereinheit (rot) des endogenen AP2-Komplexes.

### **3.4.1.2. Die rekombinanten Untereinheiten werden in den endogenen AP2-Komplex eingebaut**

Abbildung 3.17 zeigt die Kolokalisation der rekombinanten Untereinheiten mit endogenen Untereinheiten des AP2-Komplexes in der Immunfluoreszenz. Als alternativer Nachweis eines Einbaus der rekombinanten Untereinheiten in einen funktionellen AP2-Komplex erfolgte eine Immunisolierung aller  $\alpha$ - und  $\beta$ 2-Konstrukte mittels eines HA-Antikörpers. Das Präzipitat wurde stringent gewaschen (2.3.9.), geteilt und auf zwei 10%ige SDS-Gele aufgetragen. Die Proteine wurden anschließend durch Western-Blot auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Der Nachweis des chimären AP2-Komplexes erfolgte durch Antikörperfärbung. Um den Einbau der rekombinanten  $\alpha$ -Varianten zu zeigen, wurden diese auf einer Nitrozellulose-Membran durch einen HA-Antikörper nachgewiesen (Abb.3.18.A links). Die co-immunisierte, endogene  $\beta$ 2-Untereinheit wurde auf einer zweiten Membran mit einem  $\beta_{1/2}$ -Adaptin-Antikörper nachgewiesen (Abb.3.18.A rechts). Der Nachweis der rekombinanten  $\beta$ 2-Varianten erfolgte mit einem HA-Antikörper (Abb.3.18.B links) sowie der co-immunisierten endogenen  $\alpha$ -Untereinheit entsprechend mit einem  $\alpha$ -Adaptin-Antikörper (Abb.3.18.B rechts). Die rekombinanten Konstrukte wurden alle in *HEK293*-Zellen exprimiert und konnten in den erwarteten Molekulargrößen nachgewiesen werden. Alle Konstrukte wurden in einen funktionellen Adaptorkomplex eingebaut, da die entsprechend komplementären großen Untereinheiten des AP2-Komplexes co-immunisiert werden konnten. Eine leichte Degradation konnte sowohl in der endogenen, als auch in der rekombinanten  $\beta$ 2-Untereinheit beobachtet werden.



**Abb.3.18.: Einbau der rekombinanten  $\alpha$  und  $\beta_2$ -Untereinheiten in den endogenen AP2-Komplex.**

Rekombinante  $\alpha$ - und  $\beta_2$ -Konstrukte wurden aus stabil exprimierenden *HEK293*-Zellen über einen HA-Tag immunisoliert. **A:** Nachweis aller  $\alpha$ -Varianten nach HA-IP über einen HA-Antikörper (links) sowie der co-immunisierten, endogenen  $\beta_2$ -Untereinheiten über einen  $\beta_{1/2}$ -Adaptin-Antikörper (rechts). **B:** Nachweis aller  $\beta_2$ -Mutanten nach HA-IP über einen HA-Antikörper (links), sowie der co-immunisierten endogenen  $\alpha$ -Untereinheiten über einen  $\alpha$ -Adaptin-Antikörper (rechts).

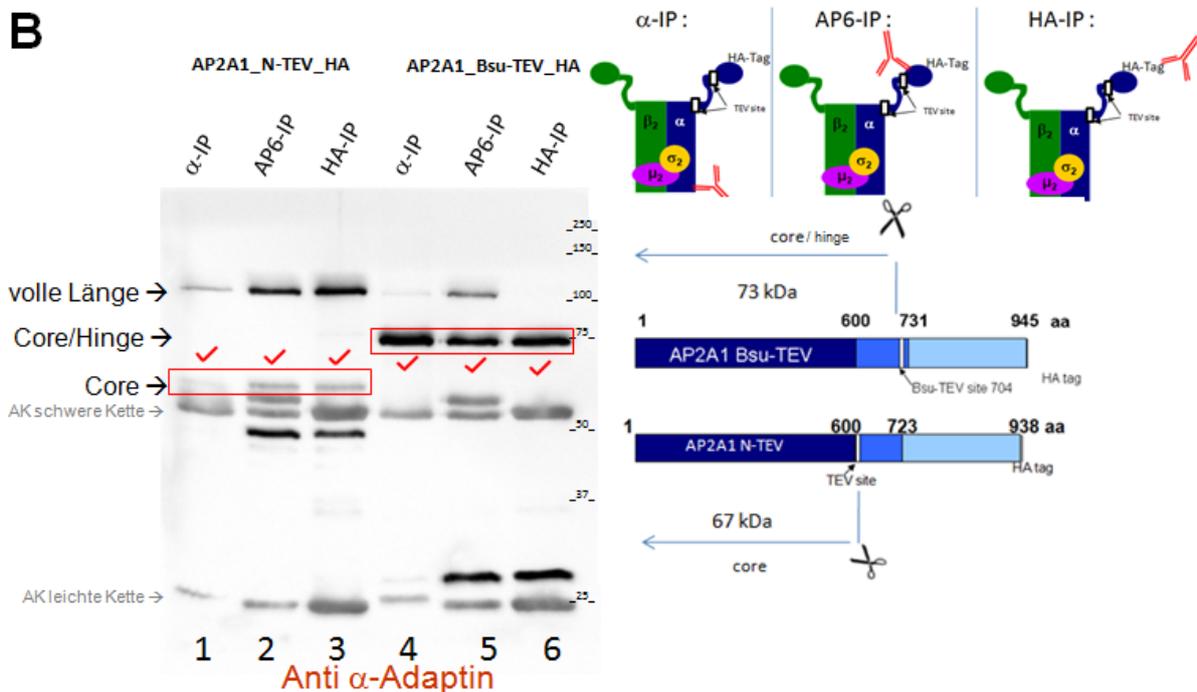
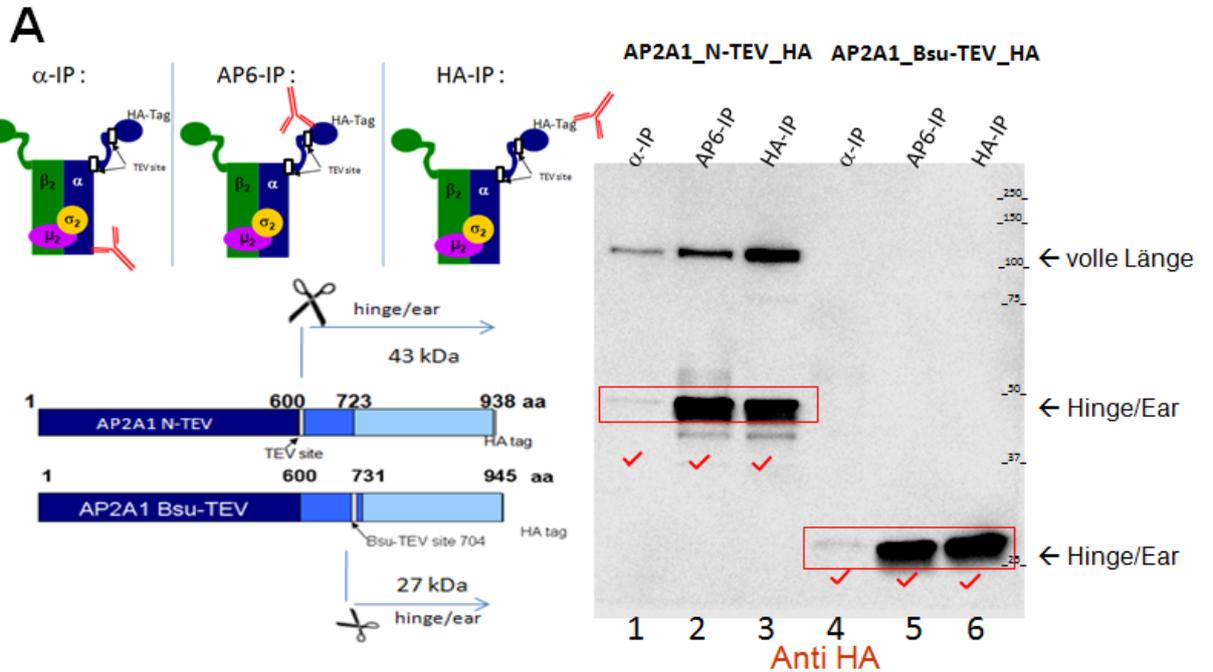
Alle Konstrukte, sowie endogenen Untereinheiten weisen im Western-Blot die erwartete Größe auf. In den Antikörper-Färbungen der rekombinanten, sowie endogenen  $\beta_2$ -Untereinheiten lassen sich leichte Degradationen dieser Untereinheit erkennen (\*).

## 3.5. Die $\alpha$ -Ear-Domäne bindet an den AP2-Core

Aus dem Strukturmodell von AP2 (Abb.1.7.A), das aus den einzelnen Kristallstrukturen des Core-Komplexes und der beiden Ear-Domänen ohne Hinges modelliert wurde, geht nicht hervor, ob die Ear-Domänen mit dem Core-Komplex interagieren. Da die Ear-Domänen beider großen Untereinheiten über unstrukturierte, flexible Hinges mit dem Core verbunden sind, wäre dies möglich und könnte einen Einfluss auf die Regulation des AP2-Komplexes haben. Um herauszufinden, ob das  $\alpha$ -Ear an den AP2-Core binden kann, wurden  $\alpha$ -Konstrukte genutzt, in die entweder im Übergang zwischen Core- und Hinge-Region (N-TEV; AS 601-607) oder am C-terminalen Bereich des Hinges, kurz vor Übergang zur Ear-Domäne (Bsu-TEV; AS 704-710), eine TEV-Schnittstelle eingebracht wurde. Diese Erkennungssequenz erlaubt die Generierung spezifischer Fragmente. Es entstehen jeweils zwei Fragmente (Abb.3.19.A und B): Im Fall von AP2A1\_N-TEV\_HA sollte ein ~43kDa Hinge/Ear-Fragment sowie ein ~57kDa Core-Fragment entstehen und im Fall von AP2A1\_Bsu-TEV\_HA ist ein ~27kDa Hinge/Ear-Fragment sowie ein ~73kDa Hinge/Core-Fragment zu erwarten. Die Untereinheiten wurden in *HEK293*-Zellen transient exprimiert und nach 3 Tagen mittels Immunpräzipitation über drei verschiedene Antikörper gewonnen, die gegen die Ear- oder Core-Region von  $\alpha$ -Adaptin gerichtet sind. Der HA-Antikörper erkennt den HA-Tag am C-Terminus der Ear-Region, das Antigen des AP6-Antikörpers liegt im Bereich des  $\alpha$ -Ears und das Antigen des  $\alpha$ -Adaptin-Antikörpers im N-terminalen Core-Bereich der  $\alpha$ -Untereinheit (Abb.3.19.A links oben). Die Immunpräzipitate wurden stringent gewaschen und mit TEV-Protease fragmentiert. Danach wurde das Präzipitat mehrfach gründlich gewaschen, um nicht gebundene Fragmente auszuwaschen, bevor das Material über SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert wurde. Danach erfolgte zunächst der Nachweis des C-terminalen HA-Tags in den rekombinanten  $\alpha$ -Untereinheiten mittels HA-Antikörper (Abb.3.19.A) und im Anschluss daran der Nachweis des N-terminalen Cores mittels  $\alpha$ -Adaptin-Antikörper.

Abbildung 3.19.A zeigt den Nachweis der Ear-Domäne der rekombinanten  $\alpha$ -Adaptin-TEV-Konstrukte nach Immunisolierung und anschließendem TEV-Verdau. Nach Immunisolierung von AP2A1\_N-TEV\_HA mit einem  $\alpha$ -Adaptin-Antikörper, der gegen den Core von  $\alpha$ -Adaptin gerichtet ist (und deswegen auch endogenes  $\alpha$ -

Adaptin immunisoliert), zeigt der Nachweis des HA-Tags eine schwache Bande auf Höhe des nicht verdauten Proteins bei ~100kDa und eine schwache Bande bei 43kDa, was dem zu erwarteten Molekulargewicht des Hinge/Ear-Fragments entspricht (Spur1).



**Abb.3.19.: Nachweis der  $\alpha$ -Ear-Core-Bindung von AP2 mittels IP und Western-Blot. A:** Nachweis der  $\alpha$ -Adaptin-Hinge/Ear-Domäne mittels HA-Antikörper nach Immunisolierung mit Antikörpern gegen die Ear- oder Core-Region und TEV-Verdau. Die IP wurde nach TEV-Verdau mehrfach gewaschen, um ungebundene Fragmente auszuwaschen und die HA-getagten Ear-Fragmente über Western-Blot nachgewiesen. **B:** Nachweis der  $\alpha$ -Adaptin-Core- bzw Core/Hinge-Domäne mittels  $\alpha$ -Adaptin Antikörper nach einer Immunisolierung mit spezifischen Antikörpern gegen die Ear- oder Core-Region und TEV-Verdau. Die IP wurde nach TEV-Verdau mehrfach gewaschen, um ungebundene Fragmente auszuwaschen, und die Core-Fragmente über Western-Blot nachgewiesen.

Erfolgt der HA-Nachweis nach IP mit Antikörpern gegen die Ear-Domäne (Anti-HA oder AP6), so sind ebenfalls sowohl die nicht geschnittenen Proteine wie auch das Hinge/Ear-Fragment deutlich sichtbar (Spur 2 und 3).

Dies zeigt, dass die rekombinante Untereinheit nicht vollständig durch die TEV-Protease geschnitten wurde, da mit dem HA-Antikörper nur rekombinantes Protein erkannt wird und dass bei der IP mit dem gegen den Core gerichteten,  $\alpha$ -Adaptin-Antikörper, auch das HA-Ear/Hinge-Fragment nachgewiesen werden kann. Das HA-Ear/Hinge-Fragment scheint an den Core zu binden. Das schwache Signal in der  $\alpha$ -Adaptin-IP lässt sich dadurch erklären, dass zum einen der  $\alpha$ -Adaptin Antikörper in der IP nicht so gut immunisoliert wie der HA- oder AP6-Antikörper und zum anderen mit diesem Antikörper auch endogenes  $\alpha$ -Adaptin isoliert wurde, welches in der HA-Färbung nicht zu detektieren ist.

In der Immunisolierung von AP2A1\_Bsu-TEV\_HA mit dem  $\alpha$ -Adaptin-Antikörper, der gegen den Core von  $\alpha$ -Adaptin gerichtet ist, und den HA- und AP6-Antikörpern, die beide gegen das Ear-Fragment gerichtet sind, erkennt man keine Bande auf der vollen Länge der Untereinheit. Die rekombinante  $\alpha$ -Untereinheit wurde durch die TEV-Protease quantitativ geschnitten. In allen IPs zeigt der Nachweis des HA-Tags eine Bande auf Höhe des theoretischen Molekulargewichtes des Ear-Konstrukts (mit 19 Aminosäuren des C-terminalen Hinges) (Spur 4-6), wobei diese aus o. g. Gründen, bei der  $\alpha$ -Adaptin-IP deutlich schwächer ist (Spur 4). Auch dieses Ear-Fragment bindet somit an den AP2-Core und lässt sich co-immunisolieren.

Abbildung 3.19.B zeigt den Nachweis der Core-Domäne der rekombinanten  $\alpha$ -Adaptin-TEV-Konstrukte nach Immunisolierung und TEV-Verdau. Nach Immunisolierung von AP2A1\_N-TEV\_HA mit dem  $\alpha$ -Adaptin-Antikörper kann man ein schwaches Signal auf Höhe des theoretischen Molekulargewichtes des Core-Konstrukts (57kDa) und auf Höhe des ungeschnittenen  $\alpha$ -Adaptins (100kDa) erkennen (Spur 1). Bei den AP6- und HA-IPs erkennt man deutliche Banden auf Höhe beider Molekulargewichte (Spur 2 und 3). Bei allen Immunisolierungen von AP2A1\_Bsu-TEV-HA lassen sich deutlich Banden auf Höhe des Core/Hinge-Fragmentes (67kDa) erkennen (Spur 4-6). Bei der Immunisolierung mit  $\alpha$ - und AP6-Antikörper, welche auch das endogene  $\alpha$ -Adaptin binden, können auch Banden auf Höhe des Volllängen-Konstrukts (100kDa) detektiert werden (Spur 4 und 5).

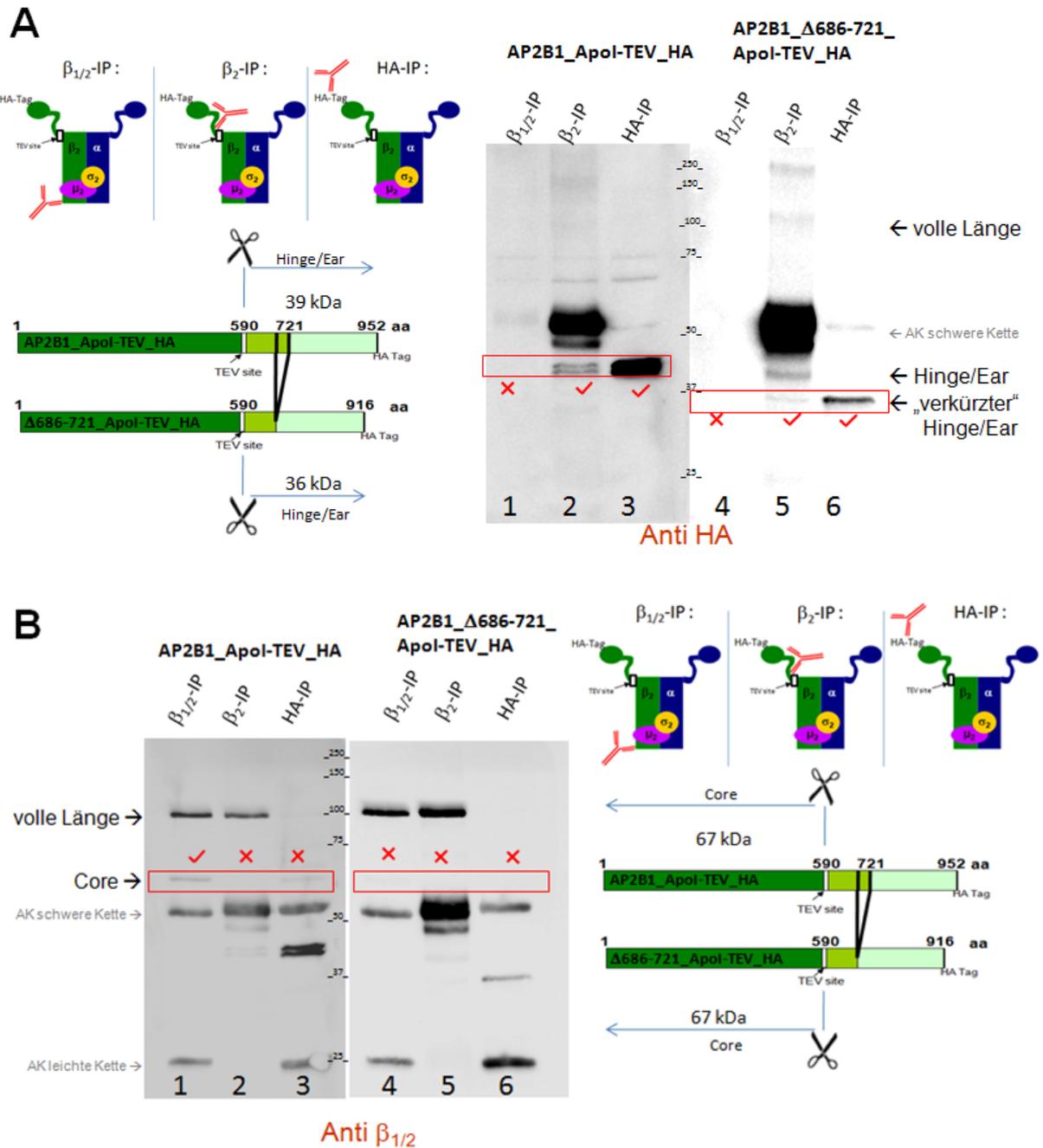
Dies zeigt, dass bei der Immunisolierung mit Antikörpern, die sowohl gegen die Ear- als auch gegen die Core-Domäne gerichtet sind, nach gezielter Fragmentierung mit TEV-Protease und gründlichen Waschens des Präzipitats das entsprechend andere Fragment co-immunisiert werden kann. Diese Bindung der Fragmente aneinander ist sehr stark. In IPs mit AP6-Antikörper konnten die Core-Fragmente beider  $\alpha$ -TEV-Konstrukte selbst dann noch nachgewiesen werden, wenn das Präzipitat mehrfach äußerst stringent mit PBS unter Zusatz von 1M NaCl und 0,1% Tween gewaschen wurde (nicht gezeigt), also schwach ionische und hydrophobe Wechselwirkungen unterbunden wurden.

Sowohl das Ear/Hinge-Fragment (43kDa) als auch das verkürzte Ear/Hinge-Fragment, in dem lediglich 20 Aminosäuren des C-terminalen Hinges vorhanden sind (27kDa), ist in der Lage an den Core zu binden. Dies deutet darauf hin, dass diese Bindung über Bereiche in den Ear-Domänen und nicht über die Hinge-Region ausgebildet wird.

### **3.6. Die $\beta$ 2-Ear-Domäne bindet nicht an den AP2-Core**

Da in den vorangegangenen Versuchen gezeigt werden konnte, dass das  $\alpha$ -Ear an den AP2-Core rückbinden kann, sollte im folgenden Versuch die Bindung des  $\beta$ 2-Ears an den AP2-Core untersucht werden. Dafür wurden zwei Varianten generiert (AP2B1\_ApoI-TEV\_HA und AP2B1\_Δ686-721\_ApoI-TEV\_HA), die eine TEV-Schnittstelle am Übergang vom Core zur Hinge-Region besitzen. Beide Konstrukte sind C-terminal mit einem HA-Tag versehen, unterscheiden sich aber in der Hinge-Sequenz, die bei AP2B1\_Δ686-721\_ApoI-TEV\_HA um die C-terminalen 36 Aminosäuren verkürzt ist. Auch diese Konstrukte wurden, wie in 3.5. beschrieben, exprimiert, geerntet und mit folgenden Antikörpern immunisiert. Wie in Abbildung 3.20. (links oben) gezeigt bindet der  $\beta_{1/2}$ -Antikörper die N-terminale Core-Region der  $\beta$ 2-Untereinheit, der  $\beta$ 2-Antikörper eine Region am N-terminalen Hinge und der HA-Antikörper den HA-Tag an der C-terminalen Ear-Domäne der rekombinanten Konstrukte. Im Anschluss an die IPs folgte der Verdau mit TEV-Protease und ausgiebiges Waschen der Matrix, bevor das Material in SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen wurde. Danach erfolgte der Nachweis der  $\beta$ 2-Ear-Fragmente (Abb.3.20.A) und anschließend der  $\beta$ 2-Core-Fragmente (Abb.3.20.B) der einzelnen IPs auf derselben Membran. Der Verdau mittels TEV sollte zwei Fragmente liefern, ein ~67kDa Core-Fragment (N-terminaler Anteil von

$\beta_2$ ) und das distale C-terminale Hinge/Ear-Fragment von ~39kDa. Letzteres fällt im Falle von AP2B1\_Δ686-721\_ApoI-TEV\_HA mit zu erwartenden 36kDa etwas kleiner aus. Genau diese Ear-Fragmente waren beim Nachweis mit HA-Antikörpern erkennbar (Abb.3.20.A Spuren 2 und 3 bzw. 5 und 6).



**Abb.3.20.: Nachweis der  $\beta_2$ -Ear-Core-Bindung von AP2 mittels IP und Western-Blot. A:** Nachweis der  $\beta_2$ -Adaptin-Hinge/Ear-Domäne mittels HA-Antikörpern. Immunisolierung mit Antikörpern gegen die Ear- oder Core-Region und TEV-Verdau. Die IP wurde nach TEV-Verdau mehrfach gewaschen, um ungebundene Fragmente auszuwaschen, und die HA-getagten Ear-Fragmente über Western-Blot nachgewiesen. **B:** Nachweis der  $\beta_2$ -Adaptin-Core-Domäne mittels  $\beta_{1/2}$ -Adaptin Antikörpern nach einer Immunisolierung mit spezifischen Antikörpern gegen die Ear- oder Core-Region und TEV-Verdau. Die IP wurde nach TEV-Verdau mehrfach gewaschen, um ungebundene Fragmente auszuwaschen und die Core-Fragmente über Western-Blot nachgewiesen.

Die Signale waren am stärksten, wenn für die Immunisolierung der monoklonale Antikörper gegen den HA-Tag verwendet wurde (Spur 3 und 6), und deutlich schwächer im Falle des polyklonalen  $\beta 2$ -Antikörpers (Spur 2 und 5).

Nach IP mit dem  $\beta_{1/2}$ -Antikörper war keines der Hinge/Ear-Fragmente nachweisbar, was zu erwarten war, da der Antikörper nur den Core-Anteil von  $\beta$ -Adaptin erkennt. Die einfachste Erklärung für das schwache Signal nach IP mit dem  $\beta_2$ -Antikörper ist der Umstand, dass mit diesem Antikörper neben der rekombinanten Untereinheit insbesondere die deutlich häufigere endogene  $\beta 2$ -Untereinheit „gefischt“ wird.

Beim Nachweis der Core-Fragmente von  $\beta 2$ -Adaptin (Abb.3.20.B) fällt der Nachweis der ungeschnittenen  $\beta 2$ -Untereinheiten auf (Bande bei 100kDa, Spur 1,2,4 und 5). Diese Banden waren zu erwarten, denn sie repräsentieren die Fraktion des endogenen  $\beta 2$ -Adaptins, die natürlich nicht TEV-sensitiv ist. Nach IP mit dem HA-Antikörper ist weder ungeschnittenes  $\beta 2$  noch ein Core-Fragment zu detektieren (Spur 3 und 6), was zeigt, dass der TEV-Verdau die rekombinante Untereinheit stöchiometrisch umgesetzt hat. Allerdings muss erwähnt werden, dass nach IP mittels des Core-spezifischen  $\beta_{1/2}$ -Adaptin-Antikörpers, der auch rekombinantes  $\beta 2$ -Adaptin erkennen sollte, nur im Fall von AP2B1\_ApoI-TEV\_HA ein Signal für das Core-Fragment zu detektieren war (Spur 1), während der Nachweis für das Core-Fragment der Mutante mit der verkürzten Hinge/Ear-Region negativ ausfiel (Spur 4). Es ist wahrscheinlich, dass vorwiegend endogenes  $\beta 2$ -Adaptin immunisoliert wurde, so dass die Konzentration der deutlich geringer vorhandenen Core-Fragmente der rekombinanten  $\beta 2$ -Untereinheiten unter der Nachweisgrenze lag. Es bleibt also festzuhalten, dass die Hinge/Ear-Anteile von  $\alpha$ - und  $\beta 2$ -Adaptin eine stark unterschiedliche Beweglichkeit besitzen, denn die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen erstmals, dass der durch Protease freigesetzte C-terminale Hinge/Ear-Anteil von  $\alpha$ -Adaptin an den Core des AP2-Komplexes zurückbinden kann, während dies für  $\beta 2$  nicht nachweisbar ist. Auf die Signifikanz dieser Befunde soll in der Diskussion näher eingegangen werden.

### 3.7. Der AP2-Komplex wird durch Phosphorylierung reguliert

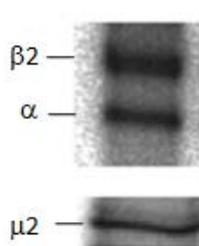
Wie bereits in der Einleitung erwähnt wird der AP2-Komplex in 3 seiner 4 Untereinheiten ( $\alpha$ ,  $\beta 2$  und  $\mu 2$ ) phosphoryliert.

Die Modifikation von  $\mu 2$  und deren Bedeutung für die Stabilisierung des AP2-Komplexes konnte im Laufe dieser Arbeit durch die Struktur des AP2-Komplexes in der offenen Konformation auf molekularer Ebene erklärt werden, was in der Diskussion näher erläutert werden soll.

Arbeiten anderer Arbeitsgruppen haben für  $\beta 2$ -Adaptin die Phosphorylierung von Tyr6 und Tyr737 beschrieben, jedoch nur nach einer Stimulation spezifischer EGF- und AT1R-Rezeptoren (Huang et al., 2003; Fessart et al., 2007)(1.3.5.).

Über die Phosphorylierungsstelle(n) in  $\alpha$ -Adaptin ist bis dato noch nichts bekannt.

Eine relativ schwache, basale Phosphorylierung der  $\alpha$ - und  $\beta 2$ -Untereinheiten kann in Zellen auch ohne Stimulation von Rezeptoren nachgewiesen werden (Abb. 3.21 sowie (Ricotta et al., 2002)). Der mögliche Einfluss dieser basalen Phosphorylierungen, sowie zunächst die Lokalisierung dieser Phosphorylierungen der großen Untereinheiten von AP2 und die Eingrenzung der Phosphorylierungsstellen war Gegenstand der folgenden Experimente.

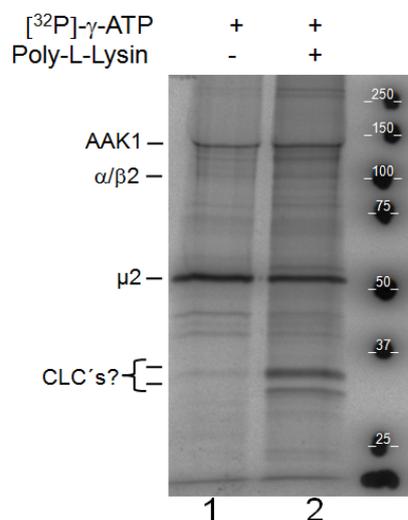


**Abb.3.21.: Phosphorylierung von AP2 unter *steady-state* Bedingungen.** Die Abbildung zeigt die phosphorylierten AP2-Untereinheiten nach Immunisolierung aus *HeLa*-Zellen, die für 6h mit [ $^{32}$ P]-Orthophosphat markiert wurden. Es ist kein durchgängiger Gelstreifen gezeigt, da die großen Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta 2$  über ein 7,5%iges, 8M Harnstoffgel voneinander getrennt wurden und der Nachweis der  $\mu 2$ -Untereinheit über eine konventionelle SDS-Page erfolgte.

#### 3.7.1. Phosphorylierungsstatus von AP2 in Zellen und CCVs

Vorarbeiten von Jens Hansen aus unserer Arbeitsgruppe hatten gezeigt, dass nach IP von AP2 aus Phosphat-markierten Zellen nur ein Bruchteil in der phosphorylierten Form vorliegt (Abb.3.21.). Im Rahmen dieser Arbeit zeigte sich darüber hinaus, dass die Phosphorylierung der drei Untereinheiten stark vom verwendeten Zelltyp abhing, wobei die Stärke der Phosphorylierung der großen Untereinheiten die größten Schwankungen aufwies (nicht gezeigt). Somit erschien es aussichtslos endogenes AP2 aus Zellkulturen für die weitere Identifizierung der Phosphorylierungsstellen in AP2 zu verwenden. Als Alternative wurden daher CCVs

aus Schweinehirn in Betracht gezogen. Aus 600g Schweinehirn können etwa 10-15mg CCVs gereinigt und aus 10mg CCVs ca. 250µg gereinigtes AP2 gewonnen werden (nicht gezeigt). Wenn dieser Pool von AP2 *in vitro* mit [<sup>33</sup>P]-γ-ATP inkubiert wird, kommt es zu einer starken Markierung von μ2 (Abb.3.22. Spur1 und Spur2). Eine Phosphorylierung der großen AP2-Untereinheiten ist nicht offensichtlich. μ2 wird durch AAK1 phosphoryliert, da die Kinase eng an AP2 gebunden und daher mit aufgereinigt wird (Hansen, 2007; Ricotta et al., 2008). Leider ließ sich unter unseren Versuchsbedingungen die in der Literatur beschriebene Erhöhung der β2-Phosphorylierung durch Poly-L-Lysin, das zur Stimulierung der putativen Kinase CVAK104 (*coated vesicle associated Kinase of 104kDa*) führen sollte (Conner and Schmid, 2005) (1.3.5.), nicht reproduzieren (Abb.3.22. Spur 2). Der Zugabe von Poly-L-Lysin führte unter unseren Versuchsbedingungen zu einer Markierung von Proteinen, die bei einem Molekulargewicht von etwa 33 und 35 kDa nachgewiesen werden konnten (Abb.3.22. Spur 2). Die beiden Banden könnten die zwei Isoformen der leichten Kette von Clathrin (CLCa und CLCb) repräsentieren, da in der Literatur ebenfalls die Phosphorylierungen der leichten Ketten von Clathrin (MW ~29-35kDa), von denen mehrere Splice-Versionen existieren, durch eine mit Poly-L-Lysin stimulierbare Kinase aus CCVs beschrieben wurde (Schook and Puszkin, 1985; Hanson et al., 1990). Durch die Stimulation mit Poly-L-Lysin konnte in diesem Versuch die Phosphorylierung keiner Untereinheit von AP2 stimuliert werden, sehr wohl aber die Phosphorylierung von zwei Proteinen mit einem Molekulargewicht von 33-35kDa, die zwei Isoformen der leichten Ketten von Clathrin entsprechen könnten. Somit war auch das aus Geweben aufgereinigte AP2 als Ausgangsmaterial für die Identifizierung von Phosphorylierungsstellen wenig geeignet.



**Abb.3.22.: Autoradiogramm der Phosphorylierung von Proteinen aus CCVs mit [<sup>33</sup>P]-γ-ATP nach Stimulation mit Poly-L-Lysin.**

### 3.7.2. Limitierte Proteolyse als Ausgangspunkt für die Eingrenzung der Phosphorylierungsstellen in $\alpha$ - und $\beta$ 2-Adaptin

Um die oben genannte Problematik zu umgehen und um dennoch eine grobe Einschätzung über den Ort der Phosphorylierung in einer der beiden großen Untereinheiten zu erhalten, sollte radioaktiv markiertes AP2 nach limitierter Proteolyse analysiert werden. Eine zeitlich begrenzte Proteolyse sollte Fragmente generieren, deren Identität mittels Western-Blot nachgewiesen wurden. Die Analyse eines Aliquots desselben Materials kann für die Autoradiographie verwendet werden, um den Einbau von radioaktivem Phosphat nachzuweisen. Alternativ war auch ein direkter Nachweis von Phosphorylierungen als posttranslationelle Modifikation in der Massenspektrometrie gedacht.

In diesem Zusammenhang ist interessant, dass alleine die Hinge-Regionen der beiden großen Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$ 2 16 bzw. 26 potentielle Phosphorylierungsstellen aufweisen. Lediglich bei einer dieser potentiellen Phosphorylierungsstellen handelt es sich um einen Tyrosin-Rest ( $\beta$ 2-Hinge C-terminal letzte Aminosäure), bei allen anderen putativen Phosphorylierungsstellen um Ser/Thr-Reste (Abb. 3.23).

#### $\alpha$ -Adaptin hinge (AS 600-723)

EMPPFPERESSILAKLKRKKGPGAGSALDDGRRDPSSNDINGGMEPTPSTVSTPSP  
 SADLLGLRAAPPPAAPPASAGAGNLLVDVFDGPAAPQSLGPTPEEAFLSPGPEDIGP  
 PIPEADELLNK → 16 putative Phosphorylierungsstellen

#### $\beta$ 2-Adaptin hinge (AS 590-721):

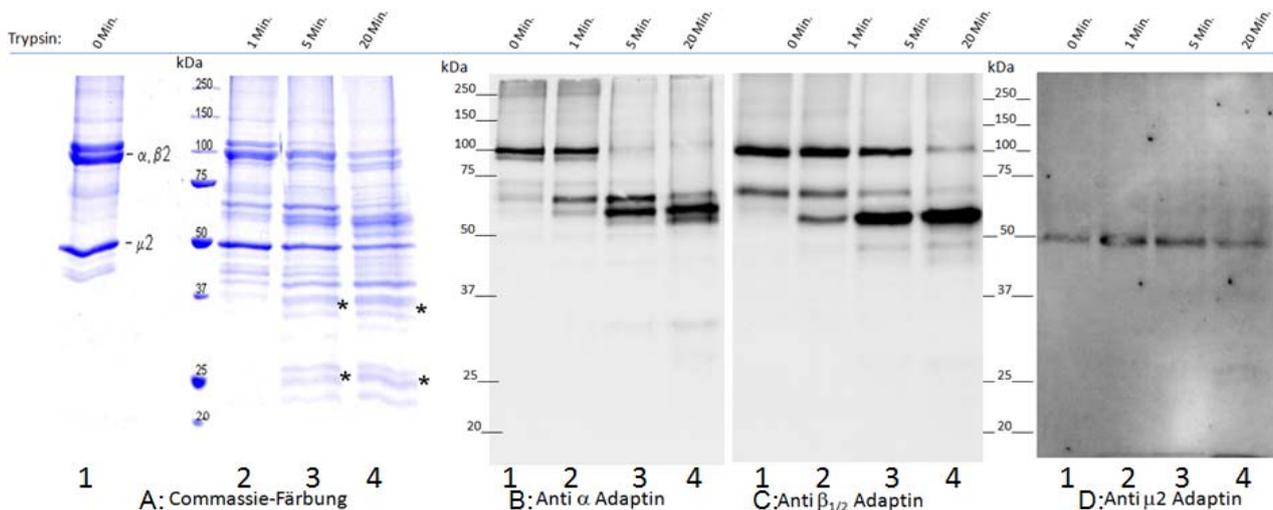
KHLPIHHGSTDAGDSPVGTATTATNLEQPQVIPSQGDLLGDLLNLDLGPVNVVPQVSS  
 MQMGAVDLLGGGLDSSLGSDLGGGIGGSPAVGQSFIPSSVPATFAPSPTPAVVSSGL  
 NDLFELSTGIFELSTGIGMAPGGY → 26 putative Phosphorylierungsstellen

**Abb.3.23.: Putative Phosphorylierungsstellen (in rot) in den Hinge-Regionen der  $\alpha$ - (oben) und  $\beta$ 2- (unten) Untereinheit.** Jede 7. Aminosäure im  $\alpha$ -Hinge und jede 5. Aminosäure im  $\beta$ 2-Hinge sind theoretisch Substrate für eine Phosphorylierung.

Nach allen bisherigen Erkenntnissen sind die Hinge-Regionen unstrukturiert und würden damit wie die meisten bekannten Substrate den Zugang für Kinasen ermöglichen.

## 3.7.3. Limitierte Proteolyse von AP2

Um Fragmente von AP2 zu generieren, wurde AP2 aus Schweinehirn mit Trypsin für 0-20 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von SDS-Ladepuffer gestoppt und im Anschluss mittels Coomassie-Färbung und Western-Blot analysiert (Abb. 3.24). Nach Coomassie-Färbung (Abb.3.24. A: Spur1) sind  $\alpha$ ,  $\beta$ 2 und  $\mu$ 2 die dominanten Banden, während  $\sigma$ 2 nicht sichtbar ist, da es sich unter den gewählten Bedingungen (10% SDS-Gel) in der Laufmittelfront bewegt. Im Verlauf eines 20-minütigen Verdauens bleibt  $\mu$ 2 weitgehend intakt (D: Spur 1-4), während die großen Untereinheiten tryptisch verdaut werden. Die Doppelbande bei 100kDa nimmt stark ab, während eine bzw. mehrere Banden im Bereich von ~65kDa an Intensität gewinnen (A: Spuren 1-4). Der Nachweis mit Antikörpern gegen die jeweiligen Core-Anteile von  $\alpha$  und  $\beta$ 2 bestätigt die Position dieser Fragmente (Vergleiche B und C Spur 1-4). In den Western-Blots für  $\alpha$  und  $\beta$ 2 sind keine Fragmente sichtbar, die kleiner als 50kDa sind, da beide Antikörper gegen die Core-Domänen der Untereinheiten gerichtet sind. Mangels geeigneter Antikörper kann die Existenz der Ear-Domänen nicht im Western-Blot gezeigt werden, allerdings sind entsprechend zu erwartende Fragmente von 25-35kDa in der Coomassie-Färbung erkennbar (A: Spur 3 und 4 markiert mit \*).



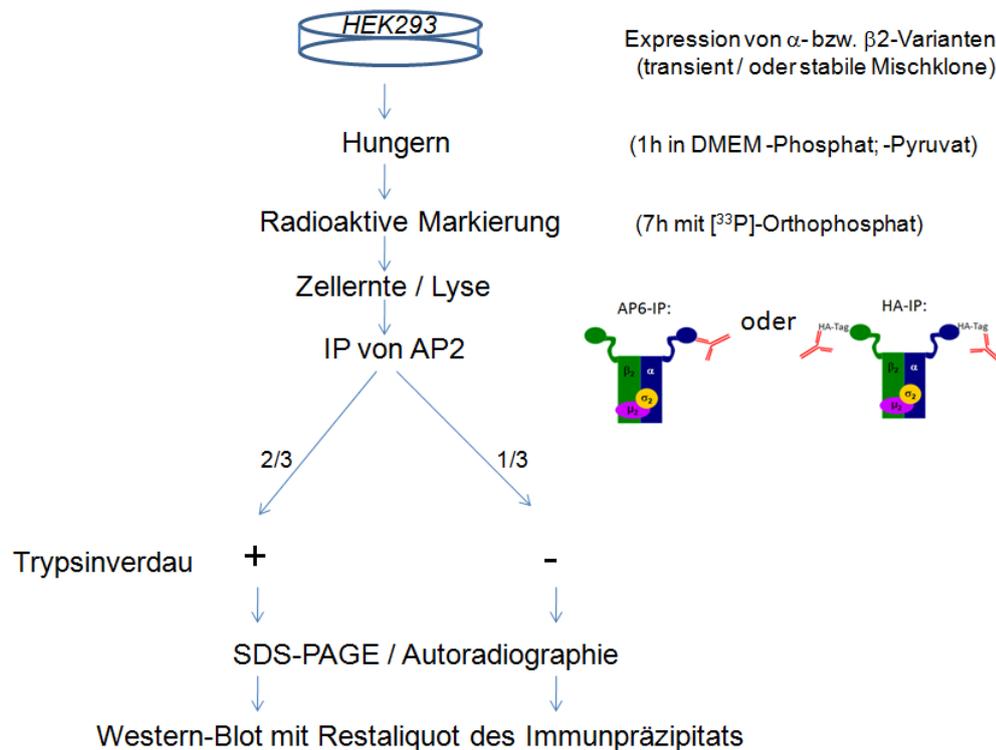
**Abb.3.24.: Limitierter Verdau von aufgereinigten AP2.** Je 20 $\mu$ g aus Schweinehirn aufgereinigtes AP2 wurden mit 0,2 $\mu$ g Trypsin für 0, 1, 5 und 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Probenpuffer gestoppt und durch Coomassie-Färbung und Western-Blot analysiert mit Antikörpern gegen N-terminale Epitope von  $\alpha$ - und  $\beta$ 2-Adaptin sowie gegen  $\mu$ 2.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass ein limitierter tryptischer Verdau von AP2 zu einer Fragmentierung der großen Untereinheiten in die jeweiligen Core-

und Ear- Regionen führt. Die sie verbindenden unstrukturierten Hinge-Regionen werden stark abgebaut, während die  $\mu 2$ -Untereinheit kaum durch Trypsin angegriffen wird.

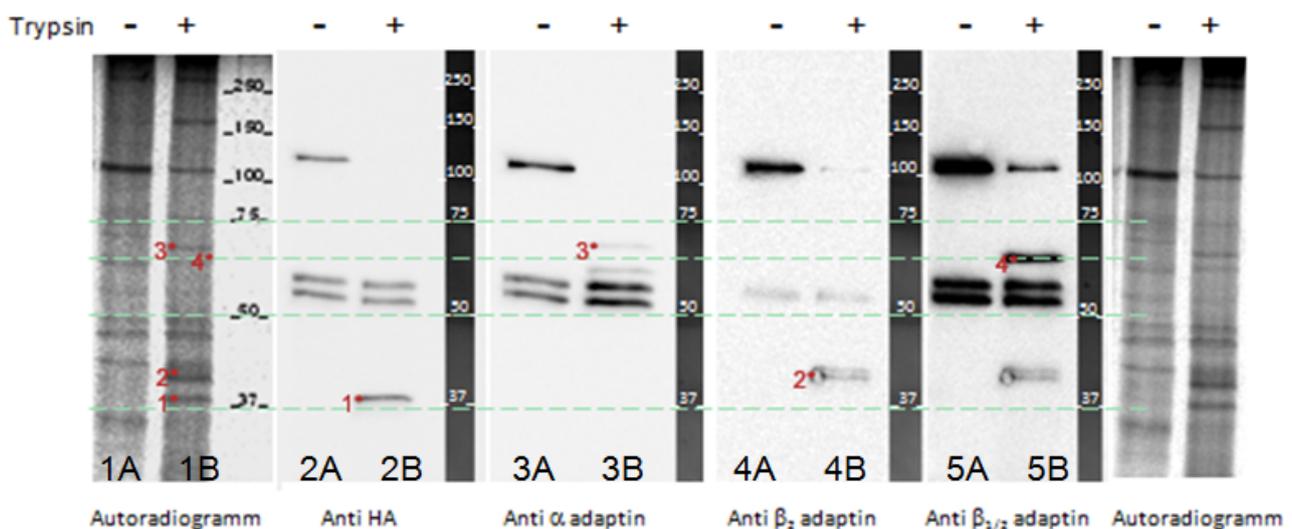
### 3.7.4. Phosphorylierungsmuster von AP2-Untereinheiten nach limitierten tryptischen Verdau

Die Bedingungen für einen limitierten tryptischen Verdau wurden mit AP2 aus Schweinehirn als Substrat etabliert (s.o.). Durch Trypsinbehandlung werden die Ear-Domänen vom Core-Anteil getrennt, erstere sind aber mangels geeigneten Antikörper nicht direkt nachweisbar. Deshalb wurde ein  $\alpha$ -Adaptin-Konstrukt mit einem C-terminalen (also am Ear befindlichen) HA-Tag in HEK293-Zellen exprimiert. Die Zellen wurden anschließend mit radioaktivem Phosphat markiert, geerntet, gefolgt von der Isolierung und dem anschließenden Verdau von AP2. Der Nachweis von Phosphorylierungen und den entstehenden Fragmenten erfolgte mittels SDS-PAGE/Autoradiographie bzw. Western-Blot (siehe Schema A für Details).



**Schema A.: Tryptischer Verdau radioaktiv markierter, immunisolierter AP2-Komplexe.**  $\alpha$ - oder  $\beta 2$ -Varianten wurden transient oder stabil in HEK293 Zellen exprimiert. Die Zellen wurden für 1h gehungert und anschließend für 7h mit  $[^{33}\text{P}]$ -Orthophosphat versetzt (1mCi/15cm Schale). Nach Ernte und Zellyse wurde AP2 entweder mittels AP6-Antikörper, oder über den HA-Tag der entsprechenden rekombinanten Untereinheit immunisoliert. 2/3 des Präzipitats wurde mit Trypsin limitiert verdaut, 1/3 nicht verdaut. Der Verdau wurde mit Probenpuffer abgestoppt und der gesamte Ansatz für die autoradiographische Analyse genutzt, im Anschluss die Matrix erneut mit Probenpuffer versetzt und dies für die Analyse über Western-Blot verwendet.

Im Autoradiogramm von isoliertem mit radioaktiven Phosphat markiertem AP2 ist ein 100kDa Bande prominent, die die phosphorylierten  $\alpha$ - und  $\beta_2$ -Untereinheiten repräsentiert, die in der konventionellen SDS-PAGE auf einer Höhe migrieren (Abb. 3.25. Spur 1A). Die Intensität dieser Bande nimmt erwartungsgemäß nach Trypsineinwirkung ab (Spur 1B), wobei vier Banden mit kleinerem Molekulargewicht erkennbar werden (rot markiert). Der Nachweis des  $\alpha$ -ear-Fragmentes im Western-Blot mit einem HA-Antikörper zeigt eine Bande, deren Molekulargewicht von  $\sim 37$ kDa mit dem Fragment 1\* im Autoradiogramm übereinstimmt. Das eigentliche Ear hat ein Molekulargewicht von 26kDa, ein Ear-Fragment mit komplettem Hinge-Anteil sollte bei 42kDa migrieren. Die mit 1\* annotierte Bande entspricht daher wahrscheinlich einem  $\alpha$ -Ear mit etwa 90 Aminosäureresten der Hinge-Region. Die im Autoradiogramm nach Trypsinverdau sichtbare Doppelbande 2\* korespondiert mit einer Doppelbande mit äquivalentem Molekulargewicht, die im Western-Blot mit einem  $\beta_2$ -Antikörper angefärbt ist. Hier ist wichtig zu bemerken, dass im  $\beta_2$ -Hinge keine Arginin-Reste vorkommen, außerdem ist einzig die erste Aminosäure der Hinge-Region ein Lysin (Lys590). Da Trypsin Peptidbindungen nur C-terminal dieser beiden Aminosäurereste spaltet, müsste ein Hinge/Ear-Fragment mit  $\sim 43$ kDa entstehen. Dies korreliert mit dem Molekulargewicht der oberen Bande. Die geringfügig kleinere Bande entsteht wahrscheinlich durch tryptische Abspaltung der 7 C-terminalen Aminosäuren vom  $\beta_2$ -Ear, die in einem unstrukturierten Bereich liegen (Owen et al., 2000).



**Abb.3.25: Analyse eines tryptischen Verdau von immunisoliertem AP2.** Limitierter Verdau von AP2 aus dem Immunpräzipitat eines HEK293 Mischklons, welcher ein C-terminal HA-markiertes,  $\alpha$ -Adaptin stabil exprimiert. Von links nach rechts: Autoradiogramm, Antikörperfärbung mit Anti HA,  $\alpha$ -Adaptin,  $\beta_2$ -Adaptin und  $\beta_{1/2}$ -Adaptin-Antikörper, sowie erneut dasselbe Autoradiogramm, aber ohne Hilfslinien.

Die mit 3\* und 4\* gekennzeichneten Banden im Autoradiogramm des IP-Verdau könnten den Core-Fragmenten von  $\alpha$ - und  $\beta$ 2-Adaptin entsprechen. Allerdings gleichen sich die Intensitäten der mit 4\* annotierten Bande in der unbehandelten Kontrolle und nach Trypsinverdau, so dass die Bande vermutlich nicht dem  $\beta$ 2-Core entspricht.

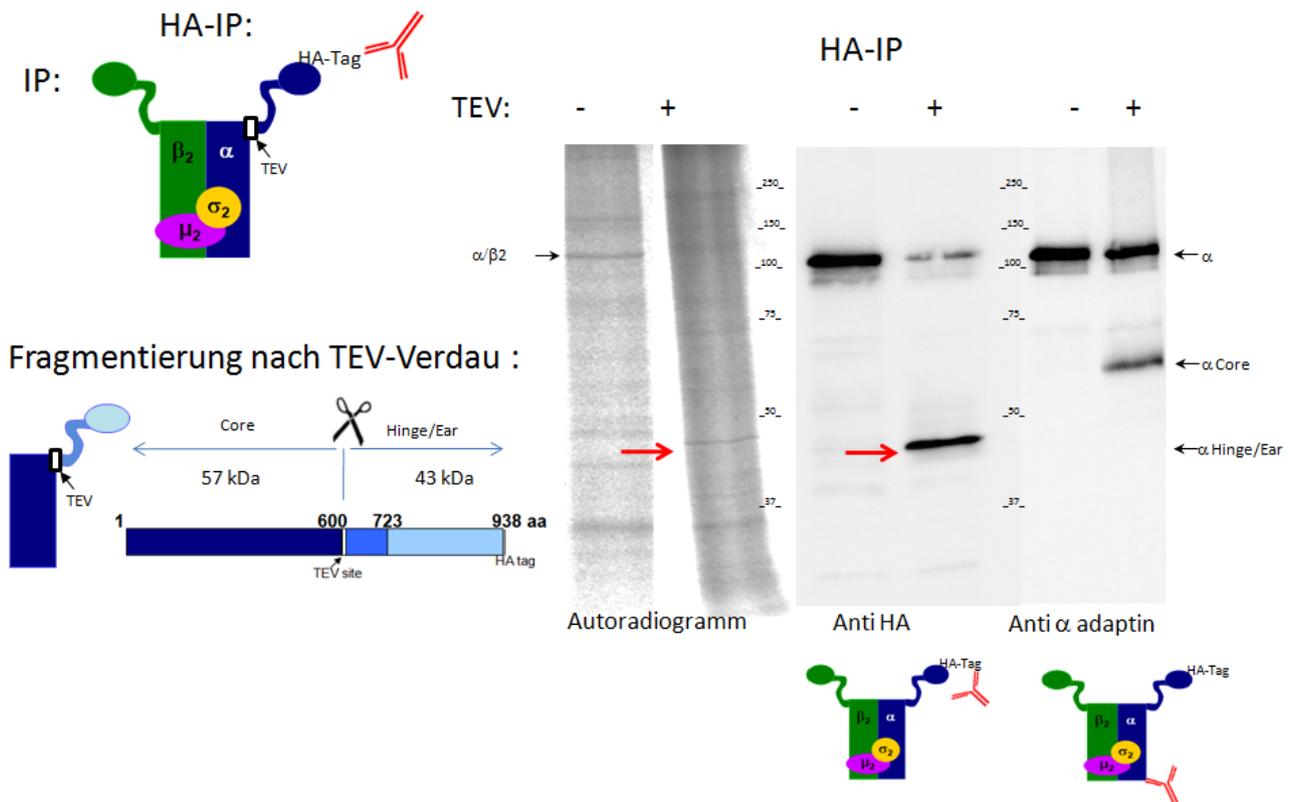
Bande Nummer 3\* des Autoradiogramms hat ein Molekulargewicht von ~60-70 kDa und zeigt eine Position, die dem  $\alpha$ -Core im Western-Blot entspricht. Eine naheliegende Schlussfolgerung ist demnach, dass die  $\alpha$ -Untereinheit sowohl im Core-Anteil (3\*) als auch im Hinge/Ear-Bereich (1\*) phosphoryliert wird. Demgegenüber erscheint es eher wahrscheinlich, dass  $\beta$ 2 vorwiegend im Hinge/Ear-Bereich phosphoryliert wird.

Anzumerken sei hier, dass im Autoradiogramm nach IP-Verdau (Spur 1B) eine deutliche Bande bei einem Molekulargewicht von ~180kDa erscheint, die in der unverdauten Bande nicht zu erkennen ist (Spur 1A). Dieses Phänomen konnte in vielen Autoradiogrammen nach tryptischem Verdau von AP2-Immunisolaten beobachtet werden. Hierbei handelt es sich vermutlich um die schwere Kette von Clathrin. Hochmolekulare Clathrin-Polymere sind häufige Kontaminanten bei AP2-IPs. Vermutlich können nach tryptischen Verdau monomere Clathrinmoleküle, die aus diesen hochmolekularen Polymeren abgespalten wurden, in das Gel einlaufen und detektiert werden.

### 3.7.5. Validierung der $\alpha$ -Adaptin Phosphorylierung

Nach dem tryptischen Verdau von [ $^{33}$ P]-Orthophosphat-markierten AP2 war die eindeutige Zuordnung der entstehenden Fragmente schwierig und nicht eindeutig. Als Alternative wurde daher zunächst eine Variante von  $\alpha$ -Adaptin kloniert, in die am Übergang zwischen Core- und Hinge-Region eine TEV-Schnittstelle eingefügt wurde und die am C-Terminus einen HA-Tag besaß (AP2A1\_N-TEV\_HA; Abb.3.26. links). Ein Verdau dieser  $\alpha$ -Adaptin-Variante mit TEV-Protease sollte zwei definierte Fragmente liefern, dessen Phosphorylierungsstatus einfach zuzuordnen sein sollte. Auch diese Variante wurde in *HEK293*-Zellen zur Expression gebracht (als stabiler Mischklon), gefolgt von radioaktiver Markierung, Immunsolierung mit HA-Antikörper, TEV-Verdau und abschließender Analyse mittels Autoradiogramm und Western-Blot. Der Verdau von AP2A1\_N-TEV\_HA sollte in einem Core-Fragment mit 57kDa und einem Hinge/Ear-Fragment von 43kDa resultieren (Abb.3.26. links). Genau diese

Größen waren auch in den entsprechenden Western-Blots detektierbar (Abb.3.26 rechts), aber nur das Hinge/Ear-Fragment war im Autoradiogramm nach TEV-Verdau erkennbar (roter Pfeil). Eine Bande, deren Molekulargewicht dem  $\alpha$ -Core-Fragment hätte zugeordnet werden können, war nicht detektierbar. Unter Verwendung dieser Methode ist also die Phosphorylierung der Hinge/Ear-Region von  $\alpha$ -Adaptin erkennbar, der Core-Anteil von  $\alpha$ -Adaptin bleibt unphosphoryliert.

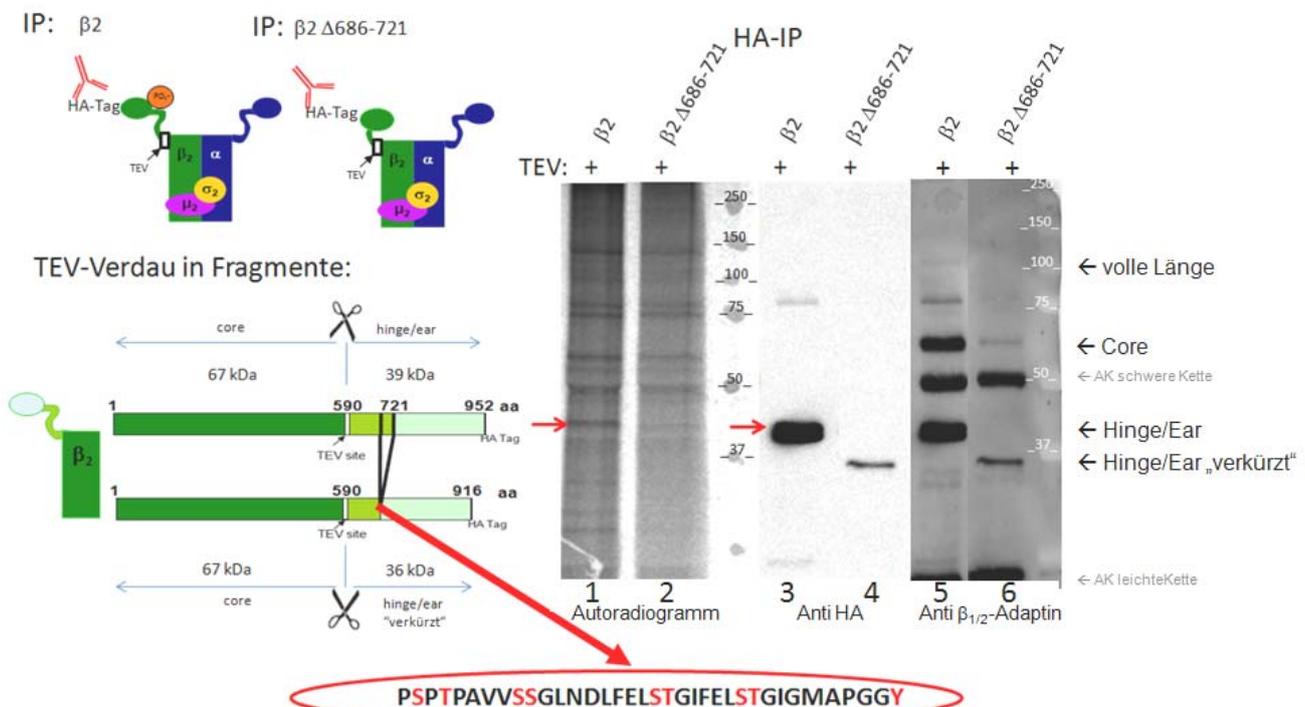


**Abb.3.26.: Bestimmung der Phosphorylierungsregionen in der  $\alpha$ -Untereinheit von AP2.** Die Region der Phosphorylierung innerhalb der  $\alpha$ -Untereinheit wurde nach TEV-Verdau mittels Autoradiographie und Antikörperfärbung bestimmt.

### 3.7.6. Validierung der $\beta$ 2-Adaptin Phosphorylierung

Die für  $\alpha$ -Adaptin vorgestellten Versuche wurden in gleicher Weise mit Varianten der  $\beta$ 2-Untereinheit durchgeführt, wobei eine  $\beta$ 2-Wildtyp-Variante mit TEV-Schnittstelle im Übergang vom Core-Anteil zur Hinge-Region (AP2B1\_ApoI-TEV\_HA) generiert wurde und eine zweite, deren C-terminale 36 Aminosäure-Reste der Hinge-Region deletiert waren (AP2B1\_Δ686-721\_ApoI-TEV\_HA).

Nach TEV-Verdau von [<sup>33</sup>P]-Orthophosphat-markierten AP2 war im Bereich von 100kDa kaum Signal detektierbar (Abb 3.27. Spur 1 und 2). Somit hatte die TEV-Protease die rekombinanten Untereinheiten vollkommen umgesetzt. Dies bestätigte sich in den korrespondierenden Western-Blots, in denen nur noch die durch TEV-Verdau entstandenen Hinge/Ear-Fragmente sichtbar waren (Spuren 3 und 4). Der auffällige Unterschied in der Signalintensität für die Hinge/Ear-Fragmente von AP2B1\_ApoI-TEV\_HA und AP2B1\_Δ686-721\_ApoI-TEV\_HA liegt in der sparsamen Verwendung der Probe. Da nur ein winziger Bruchteil der IP-Probe für die Western-Blot-Analyse verwendet wurde, führten schon kleinste Änderungen im pipettierten Volumen zu einer drastischen Änderung der Signalstärke. Demgegenüber steht aber eine weitgehend übereinstimmende Intensität in den Banden der Autoradiographie (vergleiche Spuren 1 und 2). Mit einer wichtigen Ausnahme: Das für AP2B1\_Δ686-721\_ApoI-TEV\_HA zu erwartende Hinge/Ear-Fragment, was im Western-Blot eindeutig erkennbar ist (Spur 4), fehlt im Autoradiogramm (Spur 2). Das für AP2B1ApoI-TEV\_HA zu erwartende Hinge/Ear-Fragment, ist sowohl im Western-Blot (Spur 3) als auch im Autoradiogramm (Spur 1) detektierbar.



**Abb.3.27.: Bestimmung der Phosphorylierungs-Region in der β<sub>2</sub>-Untereinheit von AP2.** Autoradiogramm und Western-Blot der IP von *in vivo* phosphoryliertem β<sub>2</sub>-Adaptin-Konstrukten nach TEV-Verdau. Die Phosphorylierung des β<sub>2</sub>-Hinges scheint im Bereich von AS 686-721 vorzuliegen. Die Sequenz ist eingekreist und die möglichen Phosphorylierungsstellen in rot hervorgehoben.

Dies ist der erste wichtige Hinweis darauf, dass die Phosphorylierung von  $\beta 2$  unter den gewählten Bedingungen in den 36 C-terminalen Aminosäuren der Hinge-Region erfolgt. Weitere Versuche, die im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit leider nicht mehr durchgeführt werden konnten, müssen diesen interessanten Befund allerdings noch untermauern.

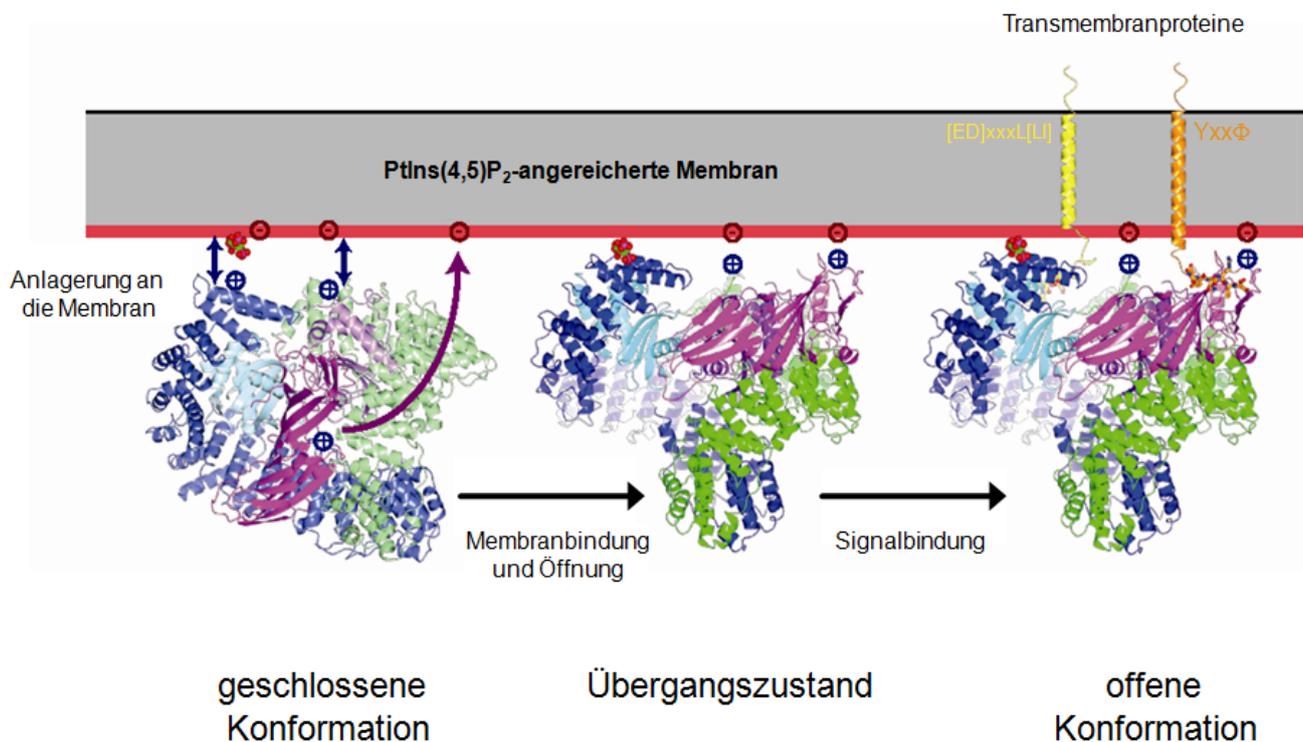
Mittels der entsprechenden Antikörper waren im Western-Blot auch die  $\beta 2$ -Core-Fragmente nachweisbar (Spur 5 und 6). Im Autoradiogramm fehlen allerdings Banden auf entsprechender Höhe (Spur 1 und 2), so dass wir schlussfolgern können, dass der  $\beta 2$ -Core unter unseren Versuchsbedingungen nicht phosphoryliert wird.

## 4. Diskussion

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht die funktionelle Regulation des Clathrin Adaptor Komplexes 2 (AP2). Dahin gehend wurden die Signal- und Membranbindung von AP2, die Beteiligung der AP2-Ear-Domänen sowie die posttranslationale Modifikation durch Phosphorylierung als mögliche Faktoren der Regulation untersucht.

### 4.1. AP2-Membran- und Signalbindung

Die eindrucksvolle Konformationsänderung zwischen der geschlossenen und der offenen Konformation, die durch die Strukturaufklärung des AP2-Komplexes durch unsere Kollaborationspartner beschrieben wurde, führt zu einer Umgestaltung des gesamten AP2-Cores. Basierend auf den umfangreichen Vorarbeiten und den in dieser Arbeit vorgestellten Daten favorisieren wir das folgende Modell einer Membranrekrutierung von AP2:



**Abb. 4.1.: Modell der Membran- und Signalbindung von AP2.** In der geschlossenen Konformation wird AP2 durch positiv geladene Aminosäurereste an der Oberfläche der α- und β2-Untereinheiten an das Ptlns(4,5)P<sub>2</sub> der Plasmamembran angelagert. Die Umlagerung des Komplexes, vor allem aber der μ2-Untereinheit, führt ausgelöst durch elektrostatische Wechselwirkungen von C-μ2 mit der Membran, zur Öffnung des Komplexes. In der offenen Konformation können nun membrangebundene Sortierungssignale gebunden werden, was die offene Konformation zusätzlich stabilisiert.

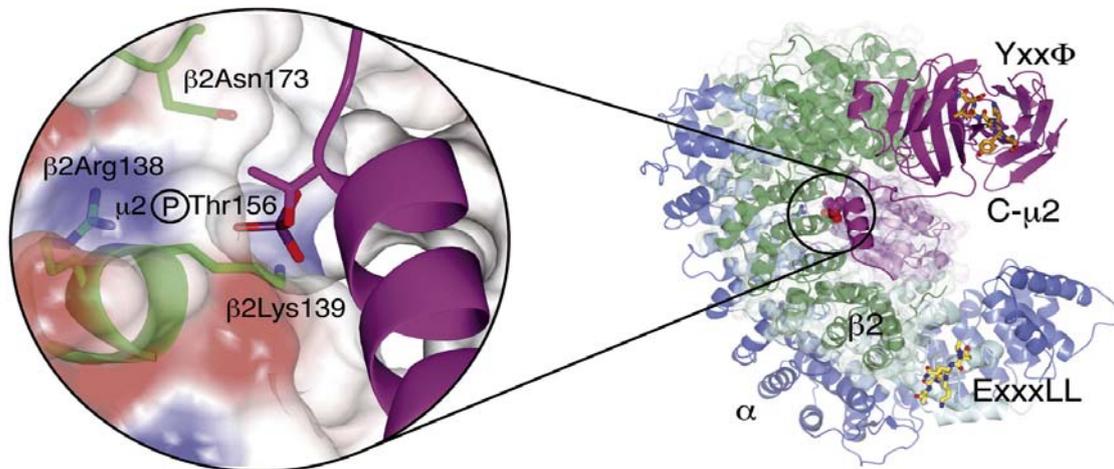
Ab einer kritischen Konzentration von Ptlns(4,5)P<sub>2</sub> in der Plasmamembran kann AP2, das noch in der geschlossenen Konformation vorliegt, durch Bereiche positiv geladener Aminosäurereste an den Oberflächen der  $\alpha$ - und  $\beta$ 2-Untereinheiten an Ptlns(4,5)P<sub>2</sub> binden (Abb.4.1. links). Dies führt zu einer Umlagerung des AP2-Komplexes, an der alle Untereinheiten beteiligt sind. Die stärkste Umlagerung erfährt die C- $\mu$ 2-Domäne. Sie vollzieht eine 127° Drehung um die eigene Achse, wodurch sowohl die zwei Ptlns(4,5)P<sub>2</sub>-Interaktionsbereiche, wie auch die Yxx $\Phi$ -Bindungstasche in C- $\mu$ 2, die zuvor durch Teile der  $\beta$ 2-Untereinheit blockiert waren, frei werden und der Membran zugewandt sind. Die Bindung der beiden C- $\mu$ 2-Ptlns(4,5)P<sub>2</sub>-Interaktionsbereiche an der Membran stabilisiert die „Öffnung“ des Komplexes (Abb.4.1. mitte). In dieser „geöffneten“ Konformationen kann AP2 an Sortierungssignale von Membranproteinen mit Yxx $\Phi$ - oder [ED]xxxL[LI]- Motiven binden. Die Membran- und Signalbindung über die C- $\mu$ 2-Domäne stabilisiert AP2 an der Membran und führt damit zu der energetisch stabilen offenen Konformation des AP2-Komplexes (Abb.4.1. rechts).

Das aktuelle Modell, das die Bedeutung für Ptlns(4,5)P<sub>2</sub> für die Initiation der strukturellen Umlagerungen in AP2 verdeutlicht, unterscheidet sich maßgeblich von dem vorherigen Modell, das eine phosphorylierungsabhängige Konformationsänderung des AP2-Komplexes vorsah (Collins et al., 2002), da *in vitro* gezeigt werden konnte, dass durch die Phosphorylierung von  $\mu$ 2 die Affinität des AP2-Komplexes zu Yxx $\Phi$ -Motiven um das bis zu 20fache gesteigert werden konnte (Fingerhut et al., 2001; Ricotta et al., 2002; Höning et al., 2005). Dies wurde durch die Überexpression von  $\mu$ 2-Varianten, in denen das Thr156 zu Alanin mutiert wurde, gestützt. In den Zellen war die Endozytose des Tyrosinmotiv-enthaltenden Transferrinrezeptors signifikant reduziert (Olusanya et al., 2001; Conner and Schmid, 2002).

### **4.1.1. Die offene Konformation wird durch die Phosphorylierung in $\mu$ 2 stabilisiert und damit die Bindung an Yxx $\Phi$ -Signale erhöht**

Die Strukturanalyse der offenen Konformation von AP2 erlaubt einen Rückschluss auf die Funktion der Phosphorylierung. Nach Membrankontakt über die  $\alpha$ - und  $\beta$ 2-Untereinheiten kommt es zur Umlagerung von  $\mu$ 2, wobei die C-Domäne eine 129° Drehung um ihre eigene Achse vollzieht. Dies führt zu einem Versatz von C- $\mu$ 2 um

39 Å relativ zur N- $\mu$ 2-Domäne. Dadurch wird eine vormals innenliegende Fläche nach außen gekehrt und im zuvor unstrukturierten Linker zwischen den beiden  $\mu$ 2-Domänen eine 4fach gewundene Helix ausgebildet (Abb.4.2. rechts).



**Abb. 4.2.: Modell der  $\mu$ 2-Phosphorylierung in der offenen Konformation von AP2.** In der offenen Konformation bildet der zuvor unstrukturierte Linker zwischen N- $\mu$ 2 und C- $\mu$ 2 eine vierfach gewundene Helix (rechts). Am C-terminalen Ende dieser Helix liegt das Thr156. Nach Phosphorylierung kann dessen Phosphatgruppe durch zwei positiv geladene Reste ( $\beta$ 2Arg138 und  $\beta$ 2Lys139) stabilisiert werden (links).  $\beta$ 2Asn173 kann eine Wasserstoffbrückenbindung zur Phosphatgruppe des  $\mu$ 2PhosphoThr156 ausbilden und damit die offene Konformation stabilisieren (aus Jackson et al., 2010).

Thr156 kommt dadurch am C-terminalen Ende dieser Helix zu liegen. Nach Phosphorylierung kann dessen Phosphatgruppe durch zwei positiv geladene Reste ( $\beta$ 2Arg138 und  $\beta$ 2Lys139) und durch eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen  $\beta$ 2Asn173 und der Phosphatgruppe stabilisiert werden (Abb.4.2. links).

Die Ausbildung der Helix und die dreifache Koordination des Phosphats sind Teil der Stabilisierung der offenen Konformation und erklären die beobachtete phosphorylierungsabhängige Affinitätssteigerung bei der Bindung Yxx $\Phi$ -haltiger Sortierungssignale. Die Daten legen außerdem nahe, dass die Phosphorylierung von  $\mu$ 2 erst im Rahmen der Membranbindung stattfindet. Demzufolge ist diese Phosphorylierung nicht der Auslöser der Konformationsänderung. Diese Annahme steht im Einklang mit Ergebnissen, die zeigen dass AAK1, die  $\mu$ 2-phosphorylierende Kinase, in CCVs mit AP2 kolokalisiert und dass AAK1 durch assembliertes Clathrin stimuliert werden kann. Die Phosphorylierung von  $\mu$ 2 erfolgt somit erst nach Membranrekrutierung, nicht aber im Cytosol (Conner and Schmid, 2002; Conner et al., 2003; Jackson et al., 2003).

## 4.1.2. Problem der räumlichen Anordnung von Sortierungssignalen

In der offenen Struktur des AP2-Komplexes kommen die Yxx $\Phi$ -Bindungstasche in  $\mu$ 2 und die [ED]xxxL[LI]-Bindungstasche in  $\sigma$ 2 in einer Ebene mit den vier Ptlns(4,5)P<sub>2</sub>-Interaktionsregionen zu liegen (Abb.3.4.B). Somit sollte AP2 zumindest theoretisch Yxx $\Phi$ - und [ED]xxxL[LI]-Motive gleichzeitig binden können. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass AP2 *in vitro* sowohl zwei verschiedene kurze Signalpeptide in einer Membranumgebung (Abb.3.10) als auch zwei verschiedene Signale in einer Polypeptidkette simultan binden kann (3.11).

Die Situation, dass zwei verschiedene, kurze Signalpeptide in einer Membranumgebung gebunden werden, entspräche der simultanen Bindung von AP2 an zwei Transportproteine mit unterschiedlichen Sortierungssignalen. Der Abstand zwischen den beiden Motiv-Bindungstaschen beträgt ca. 65-70Å in der offenen Konformation, was in etwa einer Länge von 25-30 Aminosäuren entspricht. Da Transportproteine aber meist ausladende extrazelluläre Domänen besitzen, ist es unwahrscheinlich, dass sich zwei Transportproteine mit Signalsequenzen in „kurzen“ cytoplasmatischen Teilen in der Membran so nahe kommen, dass ein einziger AP2-Komplex die Signale beider Transportproteine simultan binden kann. Cargoproteine mit kurzen (10-20 AS) cytoplasmatischen Anteilen und mit Sortierungssignalen vom Yxx $\Phi$ -Typ sind u.a. LAMP-1, -2A, -2B, -2C, CD63 oder LAP. Signalpeptid-Sequenzen vom [ED]xxxL[LI]-Typ in kurzen cytoplasmatischen Bereichen finden sich z.B. in LIMP II (zusammengefasst in Eskelinen et al., 2003; Eskelinen et al., 2005).

Es wäre aber dennoch denkbar, dass ein AP2-Komplex die Signalpeptid-Sequenz eines Cargoproteins mit kurzem cytoplasmatischem „Tail“ bindet sowie simultan das Signal-Motiv eines Membranproteins mit längerer cytoplasmatischer Sequenz (wie es z.B. der MPR300 mit einer cytoplasmatischen Polypeptidkette von 146 Aminosäuren darstellt) bindet. Diese Situation lässt sich mit unseren derzeit zur Verfügung stehenden Assays nicht nachstellen. Hierfür müssten nicht nur kurze Signalpeptide des einen Typs lipidverknüpft in die Liposomen eingearbeitet werden, sondern auch lange Peptide mit Signalen des anderen Typs über einen His-Tag an lipidverknüpftes Ni-NTA gebunden werden, das zuvor zusätzlich in die Liposomen eingearbeitet wurde. Die für die Messung benötigten Liposomen mit verschiedenen kombinierten Signalen in gleich hoher Signalbelastung (als Kombination aus gekoppelten und gebundenen Peptiden) zu generieren, ist methodisch äußerst anspruchsvoll.

In anderen Versuchen konnte ich zeigen, dass AP2 zwei verschiedene Sortierungsmotive eines Transportproteins binden kann. Auf die *in vivo* Situation übertragen würde dies bedeuten, dass im unstrukturierten cytoplasmatischen Bereich des Transportproteins die zwei Sortierungssignale mindestens 25-30 Aminosäuren (~65-70 Å) voneinander entfernt liegen, um mit beiden Motiv-Bindungstaschen von AP2 interagieren zu können. Die Experimente mit „Superpeptiden“ zeigten, dass die Bindung von AP2 an „Superpeptide“ mit beiden Sortierungssignalen in entsprechendem Abstand wesentlich affiner war als die Bindung von AP2 an solche, in denen jeweils ein Sortierungssignal mutiert war (Abb.3.11.). Allerdings zeigte AP2 die gleiche Affinität zu Peptiden mit beiden Signalen, in denen die theoretisch benötigte Entfernung von 25-30 Aminosäuren zwischen den beiden Signalen deutlich (auf 15 Aminosäuren) unterschritten wurde (Abb.3.11.). Auch wenn AP2 ein sehr flexibler Komplex ist, der in zwei strukturell verschiedenen Zuständen existiert, von denen auch Übergangszustände vorkommen (vergleiche Abb.3.3. und 4.1.), so erscheint unwahrscheinlich, dass die beiden Signalbindungstaschen in AP2 noch näher zusammenrutschen, als sie in der offenen Konformation zu liegen kommen. Daher erscheint eher wahrscheinlich, dass sich in diesem Versuch die „Superpeptide“ durch eine zu hohe Signalbeladung überlagerten, also nicht nur die Signale eines Peptides, sondern auch die benachbarter Peptide an die Motiv-Taschen eines AP2-Komplexes banden. Um diesen Effekt auszulöschen, müsste wahrscheinlich der Gehalt an Ni-NTA, über das die Peptide an die Liposomen gekoppelt werden, drastisch reduziert werden.

Es stellt sich aber die Frage, ob diese *in vitro* Ergebnisse von biologischer Relevanz sind. Untersuchungen von Typ I und Typ II Membranproteinen zeigten, dass in nur 4 Fällen beide Sortierungsmotive gleichzeitig (YxxΦ- und [ED]xxxL[LI]) und in einem Abstand von mindestens 20 Aminosäuren in der cytoplasmatischen Domäne von Transmembranproteinen vorkommen: bei CIMPR (*cation independend mannose phosphate receptor*) (Chen et al., 1993), Furin (Voorhees et al., 1995), vGlut-1 (Kim and Ryan, 2009) und LRP1 (Li et al., 2001) (persönliche Mitteilung M. S. Robinson). Die vier Cargo-Proteine besitzen jedoch sehr komplexe Transportrouten, wobei angenommen werden kann, dass eines der Sortierungssignale für die Internalisierung und ein Anderes für den intrazellulären Transport und das Recycling genutzt wird. Dass AP2 *in vitro* zwei verschiedene Sortierungssignale eines Cargo-

Moleküls mit höherer Affinität bindet, ist demnach ein versuchsbedingtes Phänomen und hat wohl kaum eine biologische Relevanz.

### **4.1.3. Die Bedeutung der geschlossenen und offenen Konformation von AP2**

Versuche, die Bindung von AP2 an Tyrosinsignale in Liposomen durch eine Vorinkubation mit löslichem Peptid zu inhibieren, misslangen im Gegensatz zu der Inhibition des löslichen C- $\mu$ 2 Anteils von AP2 mit demselben Peptid. Dies zeigt, dass AP2 in Lösung in der geschlossenen signalunzugänglichen Konformation vorliegt, während die offene Konformation erst nach Wechselwirkung mit der Plasmamembran vorliegt. Die Kinetik des Übergangs zwischen geschlossener und offener Konformation konnten unsere Kollaborationspartner in Cambridge anhand von *stopped-flow*-Experimenten bestimmen (Jackson et al., 2010). Die Daten zeigen, dass diese beiden Extremzustände der (membrangebundenen) offenen und (cytosolischen) geschlossenen Konformation auch die Möglichkeit von Übergangszuständen zulassen und bieten daher eine einleuchtende Erklärung für die Struktur der „ausgeklinkten“ Konformation (Kelly et al., 2008).

### **4.2. Einfluss von Arf6 auf die Membranbindung von AP2**

Wir favorisieren die Vorstellung, dass  $\text{PtIns}(4,5)\text{P}_2$  der wesentliche Faktor für die Membranrekrutierung von AP2 ist, der zudem maßgeblich die Konformationsänderung des Komplexes einleitet.

Demgegenüber stehen Daten zu den anderen Adaptoren (AP1, AP3 und AP4) und dem am Golgi-ER Transport beteiligten Protein COPI (Kirchhausen, 2000a; McMahon and Mills, 2004), die zeigen, dass deren Membranrekrutierung im Wesentlichen durch GTP-Arf1 vermittelt wird (AP1: (Austin et al., 2000); AP3: (Faundez et al., 1998); AP4: (Boehm et al., 2001); COPI: (Spang et al., 1998)). Für AP2 wurde Ähnliches beschrieben. Hier soll GTP-Arf6 beteiligt sein (Paleotti et al., 2005). Die Autoren zeigten in *Liposomen-spin-down*- Assays das GTP-Arf6 AP2 in Abwesenheit von Phosphatidylinositolphosphaten an die Membran rekrutieren kann. Sie berichteten aber auch von einem kooperativen Effekt in Gegenwart von Phosphatidylinositolphosphaten bei der Rekrutierung.

Ich habe im Rahmen meiner Arbeit versucht, die Rolle von Arf6 in unserem Biosensor-basierten System zu analysieren. Die Ergebnisse zu diesen Versuchen sind aber vorläufig und noch nicht abgeschlossen, weshalb sie nur an dieser Stelle kurz diskutiert werden sollen.

Ich habe dazu Arf6 in der *dominant aktiven* (*Arf6 $\Delta$ 1-13(T27N)*) und der *dominant negativen* (*Arf6 $\Delta$ 1-13(Q67L)*) Form aus Bakterien aufgereinigt (2.3.13.). Die Beladung mit GDP- bzw. GTP wurde von Anke Deggerich aus unserer Arbeitsgruppe überprüft. Die Funktionalität der Proteine habe ich nachgewiesen, indem ich die bekannte GTP-Arf-abhängige Rekrutierung der GGA-GAT-Domäne zeigen konnte (vergleiche dazu 1.2.3.).

PtIns(4,5)P<sub>2</sub>-Liposomen und PtIns(4,5)P<sub>2</sub>-Liposomen plus Tyrosin- und Dileucinsignalen wurden auf einem L1-Sensorchip immobilisiert. Danach wurde AP2 injiziert, gefolgt von der Injektion von *dominant aktiven*- oder *dominant negativen* Arf6. Während eine Bindung von *dominant negativen* Arf6 an beide Oberflächen kaum nachweisbar war, zeigte *dominant aktives* Arf6 ein gegenüber PtIns(4,5)P<sub>2</sub>-Liposomen plus AP2 deutlich stärkere Bindung an Liposomen mit PtIns(4,5)P<sub>2</sub> und Sortierungssignalen über die zuvor AP2 injiziert wurde. Die Analyse der Daten wurde allerdings durch zwei Faktoren erschwert: Erstens war es nicht möglich, reproduzierbare Belegung mit AP2 zu schaffen, da unmittelbar nach Injektion dessen Dissoziationsphase eintritt, folglich während der anschließenden Injektion von Arf6 die Menge von AP2 auf der Oberfläche stetig abnimmt (Vergleiche dazu Abb.2.6. und Abb.3.6). Zweitens variiert unter der gewählten Versuchsanordnung der gebundene Anteil von AP2 stark, da es ja an PtIns(4,5)P<sub>2</sub>-Liposomen in Gegenwart von Sortierungssignalen mit 70fach höherer Affinität bindet als an Liposomen die nur PtIns(4,5)P<sub>2</sub> enthalten (Abb.3.6.).

Die Resultate deuten aber an, dass AP2 Arf6 in GTP-gebundener Form binden kann und sie lassen vermuten, dass die Bindung von einer Stabilisierung der offenen AP2-Konformation abhängig ist. Dies würde wiederum bedeuten, dass die Bindung von Arf6 an AP2 erst nach dessen Membran- und Signalbindung erfolgt, Arf6 also kein Rekrutierungsfaktor für AP2 darstellt. Dieser Effekt könnte aber ebenso über die geringere Affinität und gleichzeitig höhere Dissoziation des AP2-Komplexes von PtIns(4,5)P<sub>2</sub>-Liposomen ohne Sortierungssignal erklärt werden.

*In vivo* erfolgt die Membranbindung von Arf-Proteinen in Abhängigkeit ihrer Myristoylierung. Die Expression von entsprechend modifizierten Arf ist aufwendig und

ineffizient, so dass wir eine Arf-Variante benutzen, deren N-terminale Helix inklusive Myristoylierungsstelle deletiert und durch einen 6xHis-Tag ersetzt ist. Dieses kann artifiziell für eine Membranverankerung genutzt werden, wenn Liposomen ein Ni-NTA-Lipid enthalten.

Wurde auf diese Weise Arf6 an Liposomen rekrutiert, so war anschließend eine signifikante Bindung von AP2 an *dominant aktives* Arf6 detektierbar, jedoch kaum Bindung von AP2 an *dominant negatives* Arf6.

In Kontrolleexperimenten war allerdings eine stark unspezifische Bindung an unbeladene Ni-NTA-Lipid-haltige Liposomen zu beobachten. Daher ist es für die aktuellen Versuche erforderlich, die nicht mit Arf-belegten Ni-NTA-Gruppen abzusättigen. Höchstwahrscheinlich muss der Gehalt an Ni-NTA-Lipid in den Liposomen (oben 3%) ebenfalls reduziert werden, um die Probleme unspezifischer Bindungen zu minimieren

Ob Arf6-GTP wirklich als Rekrutierungsfaktor für AP2 an die Plasmamembran wirkt oder Arf6-GTP lediglich ein Cargoprotein von AP2 ist, konnte in diesen Versuchen nicht gezeigt werden. Die Versuche sowie die Erkenntnisse aus der offenen Struktur lassen auch die Möglichkeit zu, dass Arf6-GTP ein Cargo-Protein von AP2 ist und diesen Adaptorkomplex über Bereiche bindet, die nur in der offenen Konformation zugänglich sind. Dies könnte einen neuen Regulationsmechanismus der Cargo-Erkennung von AP2 darstellen, der in Zukunft noch genauer untersucht werden soll.

Paleotti *et al* zeigten, dass Arf6-GTP gereinigtes AP2 *in vitro* an Liposomen, in Abwesenheit von  $\text{Ptlns}(4,5)\text{P}_2$ , rekrutieren kann (Paleotti et al., 2005), was für die Funktion eines Rekrutierungsfaktors spricht. Auch dies wollen wir in zukünftigen Experimenten überprüfen. Dafür soll myristoyliertes Arf6 aus Bakterien gereinigt werden, um unspezifische Bindungen von AP2 an Ni-NTA-Liposomen zu vermeiden und um eine gleichmäßige Signalabeladung der Liposomen zu gewährleisten.

### **4.3. Expression rekombinanter AP2-Untereinheiten in Zellkultur**

Um weitere Regulationsmöglichkeiten der AP2-Funktion untersuchen zu können, die eine Beteiligung der Ear-Domänen der großen Untereinheiten oder eine Modifikation durch Phosphorylierung einschließen sollten, wurden rekombinante Varianten beider großen AP2-Untereinheiten kloniert und in Zellkultur zur Expression gebracht. Alle in Abbildung 3.16 dargestellten Varianten konnten in *HeLa* und *HEK293*-Zellen

exprimiert werden und wurden nach 2-3 Tagen Expression in die endogenen AP2-Komplexe eingebaut. Das konnte durch die Kolo-kalisation der jeweiligen rekombinanten großen Untereinheiten mit den endogenen Untereinheiten des Komplexes in der Immunfluoreszenz oder durch die Co-Immunisolierung endogener Untereinheiten über den HA-Tag der rekombinanten Untereinheiten gezeigt werden. Alle Mutanten wiesen eine dem Wildtyp entsprechende Lokalisation und Verteilung auf. Es muss jedoch angemerkt werden, dass die erfolgreiche Identifizierung von Phosphorylierungsstellen in den großen Untereinheiten von AP2 stark davon abhängt, in wie weit es gelingt, rekombinante Untereinheiten in ausreichender Stärke in allen Zellen zu exprimieren.

Damit die Menge an rekombinantem Protein auf ein Maximum erhöht werden kann, sollen in Zukunft diese Zellkulturen (zurzeit existieren stabile Mischklone aller  $\alpha$ - und  $\beta$ 2-Varianten, von denen ~30-60% aller Zellen rekombinantes Protein exprimieren) subkloniert werden, um reine, stark exprimierende Klone zu erhalten.

Um den Einbau der rekombinanten Untereinheiten in den endogenen AP2-Komplex zu erhöhen, soll die Expression der entsprechenden endogenen Untereinheit zusätzlich durch *knock-down* mit siRNA reduziert werden. Um zu gewährleisten, dass die Expression der rekombinanten Untereinheit davon unbeeinflusst bleibt, soll siRNA gegen die UTR-Region in der m-RNA der jeweiligen endogenen Untereinheit genutzt werden. Entsprechende siRNAs gegen die endogenen  $\alpha$ - und  $\beta$ 2-Untereinheiten wurden bereits designed und in Zellkultur getestet (nicht gezeigt). Die Expression der endogenen Untereinheiten konnte nach 3 siRNA-Behandlungen innerhalb einer Woche auf etwa 10% reduziert werden.

#### **4.4. Die $\alpha$ -Ear-Domäne, aber nicht die $\beta$ 2-Ear-Domäne bindet an den AP2-Core**

Von den großen AP2-Untereinheiten sind die Strukturen der N-terminalen Core-Anteile und die Strukturen der C-terminalen Ear-Domänen aufgeklärt. Die Struktur des AP2-Komplexes mit den Wildtyp-(Volllängen-)Proteinen scheiterte bisher an der Tatsache, dass die Hinge-Regionen beider großen Untereinheiten dem bakteriellen Verdau einheim fallen. Daher ist über die Lage und Funktion der Hinge- und Ear-Domänen im Komplex nichts bekannt. Anders als üblicherweise dargestellt, könnten

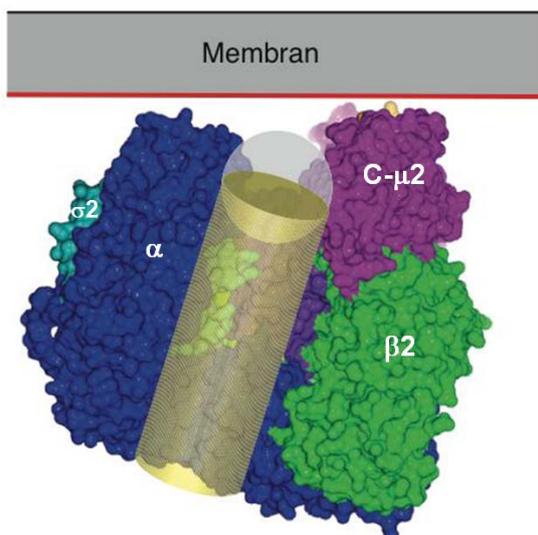
die Hinge- oder Ear-Regionen an sich selbst oder an den Core-Komplex binden (Abb.3.15.).

Ähnliches ist für AP3 gezeigt, dessen  $\delta$ -Ear-Domäne an den AP3-Core rückbindet (Lefrancois et al., 2004). Die  $\delta$ -Untereinheit des AP3-Komplexes ist homolog zu der  $\alpha$ -Untereinheit des AP2-Komplexes.

Durch die Immunisolierung von  $\alpha$ - und  $\beta$ 2-Konstrukten, mit TEV-Schnittstellen im Bereich der Hinge-Regionen, konnte nach TEV-Verdau gezeigt werden, dass der  $\alpha$ -Ear/Hinge-Anteil an den AP2-Core bindet (Abb.3.19.). Die Tatsache, dass sowohl ein Ear/Hinge-Fragment (AS 600-945) als auch ein Ear-Fragment mit nur 20 Aminosäuren des Hinges (AS 704-945) an den AP2-Core banden, zeigte, dass diese Interaktion über die  $\alpha$ -Ear-Domäne stattfindet, eventuell mit Beteiligung der letzten 20 C-terminalen Aminosäuren des Hinges.

Die Bindung des  $\beta$ 2-Ears an den AP2-Core konnte in entsprechenden Versuchen mit  $\beta$ 2-TEV-Konstrukten nicht nachgewiesen werden (Abb.3.20.).

Diese Resultate werfen die Frage auf, was diese Bindung des  $\alpha$ -Ears an den AP2-Core determiniert. Es wäre beispielsweise möglich, dass diese Bindung konformationsabhängig reguliert wird. So weist die offene Konformation des AP2-Komplexes eine „Rinne“ auf, in einem Bereich, der zuvor durch die C- $\mu$ 2-Untereinheit belegt war (Abb.4.3.). In diese Rinne könnte das  $\alpha$ -Ear binden.



**Abb. 4.3.: Mögliche Bindungsstelle für das  $\alpha$ -Ear in der offenen Konformation von AP2.** In der „Schale“ aus  $\alpha$ - und  $\beta$ 2-Untereinheit entsteht durch die Dislokation von C- $\mu$ 2 (violett) eine Rinne (gelb). Diese Fläche könnte eine mögliche Interaktionsfläche für das  $\alpha$ -Ear oder auch Arf6 darstellen (Cartoon von David Owen).

In den Versuchen zur  $\alpha$ -Ear-Core-Bindung wurden den Zellysaten während der Immunpräzipitation Detergenzien zugesetzt, also sowohl cytosolische wie auch membrangebundene Adaptoren immunisoliert. Es kann daher nicht differenziert werden, ob das Rückbinden des  $\alpha$ -Ears in der geschlossenen, der offenen oder in

beiden Konformationen stattfindet. Dies soll in Zukunft durch IPs in Abwesenheit von Detergenzien sowie mit Biacore-basierten Bindungsstudien näher untersucht werden. Auch die Region der Ear-Core-Interaktion soll in Zukunft bestimmt werden. Im Falle einer Bindung des  $\alpha$ -Ears in die vom Core ausgebildete Rinne (Abb.4.13.) würde es sich um eine großflächige Anlagerung handeln. Dies könnte durch *Crosslinking-Experimente* mit anschließender massenspektrometrischer Analyse der kovalent *verlinkten* Peptide vor dem Hintergrund der bekannten Struktur nachgewiesen werden.

Eine weitere attraktive Vorstellung ist eine Bindung der  $\alpha$ -Ear-Domäne an den AP2-Core in der cytosolischen (geschlossenen) Konformation, wie es auch Lefrancois et al. für die AP3  $\delta$ -Ear-Domäne zeigen konnten (Lefrancois et al., 2004). Durch solch eine Rückbindung könnte die Interaktion des  $\alpha$ -Ears mit den vielen bekannten Bindungspartnern reguliert, also im Cytosol verhindert werden, da Bereiche der Sandwich- und Plattform-Domänen des Ears (über die diese Interaktionen stattfinden) nicht mehr zugänglich wären (siehe dazu 1.3.2.). Die Ear-Core-Bindung würde durch eine (durch Membrankontakt induzierte) Konformationsänderung aufgehoben werden, wodurch die Interaktion mit den Ear-Bindungspartnern (nur!) in der offenen Konformation, also an der Membran ermöglicht würde.

Im Kontext der Bindung des  $\alpha$ -Ears an den AP2-Core in der cytosolischen Konformation wäre auch die Bindung von Arf6-GTP in der bei der offenen Konformation gebildeten Rinne denkbar, zumal erste Biacore basierte Bindungsstudien darauf hinweisen, dass Arf6-GTP verstärkt an AP2 in Signalgebundener, also offener Konformation, bindet (vergleiche 4.2). Die Wechselwirkungen zwischen AP2 und Arf6 könnten also entsprechend der Interaktionen von AP3 mit Arf1 erfolgen. Für AP3 konnte gezeigt werden, dass die Rückbindung der  $\delta$ -Ear-Domäne an den AP3-Core im Bereich der  $\delta/\sigma$ 3-Kontaktflächen in der cytosolischen Form die Wechselwirkungen des Membran-Rekrutierungsfaktors Arf1 mit AP3 *in vivo* und *in vitro* blockierte. Erst an der Membran konnte eine Bindung von Arf1 an AP3 gezeigt werden (Lefrancois et al., 2004). Ob sich diese Interaktion von AP3 mit Arf1/ $\delta$ -Ear auf die Interaktion AP2 und Arf6/ $\alpha$ -Ear übertragen lässt, sollen zukünftige Bindungsstudien zeigen. Die hier gezeigten Zusammenhänge von Struktur und Funktion der offenen und geschlossenen Konformation von AP2 für die Membran- und Signalbindung sprechen dafür, dass solch eine konformationsabhängige Bindung verschiedener

Bindungspartner möglich ist und einen weiteren, wenn auch völlig neuen Regulationsmechanismus der AP2-Funktion darstellen könnte.

### **4.5. Nachweis von Phosphorylierungsstellen in $\alpha$ - und $\beta$ 2-Adaptin**

Die beabsichtigte Identifizierung von Phosphorylierungsstellen in den großen Untereinheiten von AP2 ist nicht gelungen. Folgende Gründe haben das Vorhaben stark beeinträchtigt:

Im Gegensatz zur Phosphorylierung der  $\mu$ 2-Untereinheit, die bekanntermaßen *in vitro* bereits durch die Zugabe von ATP zu aus CCVs-extrahierten Proteinen oder AP2-Komplexen stattfindet (Pauloin and Thuriereau, 1993) (siehe auch 1.3.5.), war es nicht möglich, die großen Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$ 2 in ähnlicher Weise *in vitro* zu phosphorylieren. Unter unseren Versuchsbedingungen konnte die in der Literatur beschriebene verstärkte  $\beta$ 2-Phosphorylierung durch die Poly-L-Lysin stimulierte Kinase CVAK104 (*coated vesicle associated Kinase of 104kDa*) (Conner and Schmid, 2005) (1.3.5.) nicht reproduziert werden. Die Tatsache, dass mehrere für die Kinasefunktion entscheidende Reste im katalytischen Zentrum des Enzyms fehlen (Manning et al., 2002), wirft aber die Frage auf, ob CVAK 104 tatsächlich eine Kinase ist und somit die beschriebene Phosphorylierung der  $\beta$ 2-Untereinheit durch eine unbekannte Kontaminante katalysiert wird, die in unseren gereinigten CCVs fehlte.

Mittels Massenspektrometrie konnten keine Phosphorylierungsstellen ermittelt werden, obwohl in radioaktiven Parallelversuchen die Phosphorylierungen aller drei Untereinheiten nachweisbar waren (nicht gezeigt). Dies könnte daran liegen, dass die Peptide zu groß oder zu klein waren, um in der Masse „fliegen“ zu können. Damit eine möglichst große Varianz in der Masse und Ladung der zu analysierenden Peptide erreicht werden konnte, wurden 3 verschiedene Proteasen – Trypsin, Chymotrypsin und V8 – alleine und in Kombination eingesetzt, um so die Chance auf einen Nachweis der Peptide zu erhöhen. Obwohl in verschiedenen Ansätzen auch verschiedene Peptide nachgewiesen werden konnten und durch die Kombination dieser Ansätze die Sequenzabdeckung auf bis zu 80% erhöht werden konnte, führte dieser Ansatz auch zu keinem Ergebnis.

Auch wurde über Phosphatgruppen-bindende Titandioxidsäulen versucht, zunächst Phosphopeptide anzureichern und nach Elution durch ESI (*Electrospray Ionization*)-

Massenspektrometrie nachzuweisen, leider ebenfalls ohne Erfolg. Wir konnten unter Verwendung von [<sup>33</sup>P]-markierten Material lediglich zeigen, dass im Rahmen der einzelnen Arbeitsschritte über 95% des radioaktiven Ausgangssignals verloren gingen, durch Verluste aufgrund unspezifischer Bindungen an die Plastikoberflächen der Säulen, Eppendorf Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen (nicht gezeigt). In Zukunft müssen daher Plastikmaterialien verwendet werden, an deren Oberfläche die Adhäsion von Molekülen minimiert ist.

Ein weiterer Grund für die schlechte Nachweisbarkeit von Phosphorylierungsstellen könnte darin liegen, dass diese in einem ohnehin schon stark negativ geladenen Sequenzabschnitt vorliegen und sich dadurch schlecht ionisieren lassen, der Nachweis über das Masse/Ladungs-Verhältnis somit erschwert wird.

### **4.5.1. $\alpha$ - und $\beta$ 2-Adaptin werden in den Hinge/Ear-Bereichen phosphoryliert**

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass beide großen Untereinheiten von AP2 in Bereichen der Hinge/Ear-Region phosphoryliert werden. Erste Studien eines limitierten, tryptischen Verdau zeigen für die  $\alpha$ - und  $\beta$ 2-Untereinheiten nach Verdau phosphorylierte Fragmente im Autoradiogramm. Die Fragmente konnten über den parallelen Nachweis durch Antikörperfärbung den  $\alpha$ - und  $\beta$ 2-Hinge/Ear-Regionen zugeordnet werden. Dies bestätigt die Ergebnisse von Wilde und Brodsky, die ebenfalls durch Fragmentierungsstudien die Phosphorylierung beider großen Untereinheiten den Hinge-Regionen zuordneten (Wilde and Brodsky, 1996). Meine Experimente zeigten darüber hinaus auch die Phosphorylierung der Core-Fragmente der großen Untereinheiten. Der Nachweis war jedoch wesentlich schwächer und die Core-Fragmente beider großer Untereinheiten lagen nach SDS-PAGE sehr nah beieinander, was die genaue Zuordnung zur  $\alpha$ - und  $\beta$ 2-Untereinheiten erschwerte.

Eine weitere Problematik in den Experimenten bestand in der starken Abnahme des Phosphorylierungssignals nach Fragmentierung. Dies liegt daran, dass nicht das gesamte Protein limitiert verdaut wird, also auch noch Vollängen-Protein vorhanden ist. Es könnte auch darauf hinweisen, dass durch den limitierten Verdau phosphorylierte Fragmente entstehen. Wenn diese kleiner als 10 kDa sind verbleiben sie nicht im SDS-Gel und entgehen der Detektion. In der  $\beta$ 2-Hinge-Region zeigte ein *in silico*-Verdau mit Trypsin, dass in diesem Bereich nur eine Schnittstelle für den Angriff mit Trypsin – Lys590 – existiert, somit ein Hinge-Fragment von über 10kDa

generiert würde, was im Gel nachgewiesen werden kann. Die Sequenz des  $\alpha$ -Hinges hat in den 124 Aminosäureresten 10 potentielle Schnittstellen für Trypsin (5xArg und 5xLys). Es ist also wenig erstaunlich, wenn zahlreiche kleine Peptide entstehen, die nicht im SDS-Gel auftauchen. In Zukunft könnte dies durch den Gebrauch von hochauflösenden Schägger-Tricine-Gelen (Schagger and von Jagow, 1987) nachgewiesen werden, die auch für Peptide von 1kDa (also von etwa 9 Aminosäuren) geeignet sind.

Ein weiterer und durchaus realistischer Grund für die starke Abnahme des Signals nach Trypsin-Verdau ist die Möglichkeit von Mehrfachphosphorylierungen in beiden Untereinheiten. Für  $\beta$ 2-Adaptin konnte gezeigt werden, dass nach Stimulation von EGF- oder Angiotensin-Rezeptoren Phosphorylierungen in Tyr6 bzw. Tyr737 auftreten (Laporte et al., 1999; Fessart et al., 2007; Huang et al., 2003). Diese Phosphorylierungen sind sehr spezifisch, tragen aber (gerade in den unfragmentierten Untereinheiten) zum Gesamtsignal bei. In diesem Beispiel würde bei einer gleichzeitigen Tyr6 und Tyr737-Phosphorylierung in  $\beta$ 2-Adaptin nach Trypsin-Behandlung sowohl das Core-Fragment als auch das Ear-Fragment mit einer Phosphatgruppe modifiziert sein.

Um den Signalverlust, der im limitierten Verdau beobachtet wurde, so gering wie möglich zu halten und die Anzahl der resultierenden Fragmente zu reduzieren, wurden  $\alpha$ - und  $\beta$ 2-Adaptin-Konstrukte mit einer TEV-Schnittstellen kloniert, so dass eine Untereinheit in genau zwei definierte Fragmente gespalten werden konnte, während die andere Untereinheit intakt bleibt. In den entsprechenden Experimenten konnten dann auch die entstandenen Fragmente problemlos den jeweiligen rekombinanten Untereinheiten zugeordnet werden.

Die Analyse eines  $\alpha$ -Konstruktes, dem N-terminal des Hinges eine TEV-Schnittstelle eingefügt wurde, bestätigte nach TEV-Verdau, dass die Phosphorylierung von  $\alpha$ -Adaptin im Bereich der Ear/Hinge-Region auftritt. Es wurde ein weiteres Konstrukt mit einer TEV-Schnittstelle C-terminal des Hinges generiert, um die Phosphorylierung auf die Hinge- bzw. Ear-Region weiter einzuengen. Die Expressionrate des rekombinanten Proteins war bislang jedoch zu gering, um genügend Protein für ein eindeutiges Signal in dem Autoradiogramm zu immunisolieren. Anhand der Subselektion stabiler, stark exprimierender Klone und der dadurch höheren Expression der rekombinanten Untereinheit sollte dies in nächster Zukunft möglich sein.

Hierbei soll angemerkt werden, dass einige der generierten Varianten zwar korrekt kloniert und auch exprimiert wurden, jedoch nach Expression direkt proteosomal degradiert wurden. Das konnte durch die Inhibition der Proteasomen mit Lactacystin und Epoxymycin nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Es war z.B. nicht möglich, den gesamten Hinge zu deletieren und durch einen 6xFlag Tag zu ersetzen. Ob die Degradation dieses Konstruktes auf der Wichtigkeit des Hinges für die Funktion von AP2 beruht oder auf dessen fehlerhafter Faltung, die z.B. durch die starke Ladung des Tags hervorgerufen wurde (Flag-Tag: DYKDDDDK), bleibt unklar.

Die Analyse eines  $\beta$ 2-Konstruktes, dem N-terminal des Hinges eine TEV-Schnittstelle eingefügt wurde bestätigte nach TEV-Verdau, dass die Phosphorylierung von  $\beta$ 2-Adaptin im Bereich der Ear/Hinge-Region stattfindet. Die Analyse eines weiteren Konstruktes, dem zusätzlich die letzten 35 Aminosäuren des Hinges deletiert wurden, zeigte an, dass die Phosphorylierung innerhalb dieser 35 Aminosäuren stattfindet. Somit bleiben nur noch 9 (aus 26) potentielle Phosphorylierungsstellen innerhalb des  $\beta$ 2-Hinges übrig, in denen die Phosphorylierung stattfinden kann. In Zukunft sollen diese Phosphorylierungen durch *site directed mutagenesis* einzeln oder in Kombination mutiert werden und die genaue Position bestimmt werden.

Sobald die Phosphorylierungsstellen in den großen Untereinheiten von AP2 identifiziert sind, werden wir damit beginnen, Phosphorylierungsmutanten zu generieren. Damit der Effekt dieser Phosphorylierungen besser charakterisiert werden kann, soll die Expression der entsprechenden endogenen Untereinheit reduziert werden. Um zu gewährleisten, dass die Expression der entsprechenden rekombinanten Untereinheit davon unbeeinflusst bleibt, soll siRNA gegen die UTR-Region in der m-RNA der jeweiligen endogenen Untereinheit genutzt werden. Die Expression der endogenen Untereinheiten konnte nach 3 siRNA-Behandlungen innerhalb einer Woche auf etwa 10% reduziert werden. Dadurch sollte es möglich sein, die Bedeutung dieser Phosphorylierungen zu charakterisieren.

Unter diesen Bedingungen soll dann der Einfluss dieser Phosphorylierungen untersucht werden auf:

- die Stabilität des AP2-Komplexes durch metabolische Markierung
- die Lokalisation von AP2 über Cytosol/Membran-Fraktionierung
- die Bindungseigenschaften über Biacore-Assays

- die Endozytose über die Stimulation verschiedener Rezeptoren, wie den LDL oder Transferrin-Rezeptor

## 5. Zusammenfassung

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit steht die funktionelle Regulation des Clathrin Adaptor Komplexes 2 (AP2). AP2 ist an der Erkennung und Rekrutierung von Cargo-Proteinen an der Plasmamembran und deren Internalisierung über Clathrin-vermittelte Endozytose beteiligt.

Es konnte gezeigt werden, dass die Interaktion von AP2 mit  $\text{Ptlns}(4,5)\text{P}_2$  in der Plasmamembran die treibende Kraft für eine strukturelle Umlagerung in AP2 zu der „offenen“ Konformation ist und synergistisch zur Erkennung von Sortierungssignalen führt. Die funktionelle Bedeutung dieser „offenen“, signalgebundenen Konformation von AP2 für die Membran- und Signalbindung konnte beschrieben sowie die Relevanz der „geschlossenen“ Konformation in Lösung erklärt werden.

Die Ear-Domänen der großen AP2-Untereinheiten binden an eine Vielzahl von CCV-assoziierten Proteinen, die unter anderem für die Bildung eines CCVs von Bedeutung sind. Die hier vorgelegten Resultate zeigen, dass die Ear-Domäne der  $\alpha$ -Untereinheit an den AP2-Komplex rückbindet. Dies eröffnet theoretisch eine neue Möglichkeit der funktionellen Regulation von AP2.

Die funktionelle Bedeutung der Phosphorylierung der großen Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta_2$  von AP2 ist bis dato noch nicht geklärt. Zwar konnten zwei Phosphorylierungsstellen in der  $\beta_2$ -Untereinheit nach Stimulation spezifischer Rezeptoren identifiziert werden, jedoch sind die Phosphorylierungsstellen in  $\alpha$ - und  $\beta_2$ -Adaptin unter *steady-state* Bedingungen bis dato unbekannt. Erste Versuche zeigten, dass die Hinge/Ear-Regionen der  $\alpha$ -Untereinheit und ein Bereich im C-terminalen  $\beta_2$ -Hinge (AS 686-721) phosphoryliert werden. Die genaue Position und Funktion der jeweiligen Phosphorylierungen müssen in weiterführenden Arbeiten genauer untersucht werden.

Diese Arbeit konnte einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der funktionellen Regulation von AP2 im Rahmen der Rekrutierung an die Plasmamembran liefern. Außerdem liefert sie erste Hinweise auf eine weitere Ebene der Regulation durch Verlagerung der Ear-Domäne von  $\alpha$ -Adaptin und durch Phosphorylierung.

### 6. Summary

This work deals with the functional regulation of the clathrin adaptor complex 2 (AP2). AP2 is involved in the recognition and recruitment of cargo proteins at the plasma membrane and the internalization of its cargoes via clathrin mediated endocytosis.

This work could show, that the endocytic cargo binding of AP2 is driven by its interaction with Ptlns(4,5)P<sub>2</sub>-containing membranes. This is the initial step for a large conformational change into the “open” conformation of AP2 and important for endocytic motif recognition and binding. We could show the functional importance of this “open” conformation for membrane and signal binding of AP2 as well as the relevance of the cytosolic “closed” conformation in the absence of membrane interactions.

The Ear domains of AP2 bind to a variety of CCV associated proteins. Our results show that the ear domain of the  $\alpha$ -subunit can bind to the core of the AP2 complex. These findings open a new possibility for a functional regulation of this complex.

Until now the functional relevance of large subunit phosphorylation is unclear. Two phosphorylation sites have been identified in the  $\beta$ 2-subunit, appearing after the stimulation of specific receptors. The phosphorylation sites of the  $\alpha$ - and  $\beta$ 2-subunit under steady-state conditions are still unknown. First results show that these phosphorylations take place in the hinge/ear regions of the  $\alpha$ -subunit and in the c-terminal part of the  $\beta$ 2-hinge (aa 686-721), but the exact phosphorylation sites have to be determined in the future.

This work is an important contribution to the understanding of the functional relevance of the AP2 complex in the process of recruitment. In addition it suggests a new level of regulation by the displacement of the  $\alpha$ -ear-domain and by phosphorylation.

## 7. Literaturverzeichnis

- Ahle S, Ungewickell E (1986) Purification and properties of a new clathrin assembly protein. *Embo J* 5:3143-3149.
- Austin C, Hinners I, Tooze SA (2000) Direct and GTP-dependent interaction of ADP-ribosylation factor 1 with clathrin adaptor protein AP-1 on immature secretory granules. *J Biol Chem* 275:21862-21869.
- Ball CL, Hunt SP, Robinson MS (1995) Expression and localization of alpha-adaptin isoforms. *J Cell Sci* 108 ( Pt 8):2865-2875.
- Behnia R, Munro S (2005) Organelle identity and the signposts for membrane traffic. *Nature* 438:597-604.
- Benmerah A, Begue B, Dautry-Varsat A, Cerf-Bensussan N (1996) The ear of alpha-adaptin interacts with the COOH-terminal domain of the Eps 15 protein. *J Biol Chem* 271:12111-12116.
- Boehm M, Bonifacino JS (2001) Adaptins: the final recount. *Mol Biol Cell* 12:2907-2920.
- Boehm M, Aguilar RC, Bonifacino JS (2001) Functional and physical interactions of the adaptor protein complex AP-4 with ADP-ribosylation factors (ARFs). *Embo J* 20:6265-6276.
- Bonifacino JS, Traub LM (2003) Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Biochem* 72:395-447.
- Brett TJ, Traub LM, Fremont DH (2002) Accessory protein recruitment motifs in clathrin-mediated endocytosis. *Structure* 10:797-809.
- Chaudhuri R, Mattera R, Lindwasser OW, Robinson MS, Bonifacino JS (2009) A basic patch on alpha-adaptin is required for binding of human immunodeficiency virus type 1 Nef and cooperative assembly of a CD4-Nef-AP-2 complex. *J Virol* 83:2518-2530.
- Chen H, Fre S, Slepnev VI, Capua MR, Takei K, Butler MH, Di Fiore PP, De Camilli P (1998) Epsin is an EH-domain-binding protein implicated in clathrin-mediated endocytosis. *Nature* 394:793-797.
- Chen HJ, Remmler J, Delaney JC, Messner DJ, Lobel P (1993) Mutational analysis of the cation-independent mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor. A consensus casein kinase II site followed by 2 leucines near the carboxyl terminus is important for intracellular targeting of lysosomal enzymes. *J Biol Chem* 268:22338-22346.
- Cheng Y, Boll W, Kirchhausen T, Harrison SC, Walz T (2007) Cryo-electron tomography of clathrin-coated vesicles: structural implications for coat assembly. *J Mol Biol* 365:892-899.
- Chuang E, Alegre ML, Duckett CS, Noel PJ, Vander Heiden MG, Thompson CB (1997) Interaction of CTLA-4 with the clathrin-associated protein AP50 results in ligand-independent endocytosis that limits cell surface expression. *J Immunol* 159:144-151.

- Collins BM, Watson PJ, Owen DJ (2003) The structure of the GGA1-GAT domain reveals the molecular basis for ARF binding and membrane association of GGAs. *Dev Cell* 4:321-332.
- Collins BM, McCoy AJ, Kent HM, Evans PR, Owen DJ (2002) Molecular architecture and functional model of the endocytic AP2 complex. *Cell* 109:523-535.
- Conner SD, Schmid SL (2002) Identification of an adaptor-associated kinase, AAK1, as a regulator of clathrin-mediated endocytosis. *J Cell Biol* 156:921-929.
- Conner SD, Schmid SL (2005) CVAK104 is a novel poly-L-lysine-stimulated kinase that targets the beta2-subunit of AP2. *J Biol Chem* 280:21539-21544.
- Conner SD, Schroter T, Schmid SL (2003) AAK1-mediated micro2 phosphorylation is stimulated by assembled clathrin. *Traffic* 4:885-890.
- Crowther RA, Pearse BM (1981) Assembly and packing of clathrin into coats. *J Cell Biol* 91:790-797.
- Dell'Angelica EC, Mullins C, Bonifacino JS (1999) AP-4, a novel protein complex related to clathrin adaptors. *J Biol Chem* 274:7278-7285.
- Dell'Angelica EC, Ohno H, Ooi CE, Rabinovich E, Roche KW, Bonifacino JS (1997) AP-3: an adaptor-like protein complex with ubiquitous expression. *Embo J* 16:917-928.
- Dietrich J, Hou X, Wegener AM, Geisler C (1994) CD3 gamma contains a phosphoserine-dependent di-leucine motif involved in down-regulation of the T cell receptor. *Embo J* 13:2156-2166.
- Dietrich J, Hou X, Wegener AM, Pedersen LO, Odum N, Geisler C (1996) Molecular characterization of the di-leucine-based internalization motif of the T cell receptor. *J Biol Chem* 271:11441-11448.
- Doherty GJ, McMahon HT (2009) Mechanisms of endocytosis. *Annu Rev Biochem* 78:857-902.
- Donaldson JG (2003) Multiple roles for Arf6: sorting, structuring, and signaling at the plasma membrane. *J Biol Chem* 278:41573-41576.
- Doray B, Lee I, Knisely J, Bu G, Kornfeld S (2007) The gamma/sigma1 and alpha/sigma2 hemicomplexes of clathrin adaptors AP-1 and AP-2 harbor the dileucine recognition site. *Mol Biol Cell* 18:1887-1896.
- Edeling MA, Smith C, Owen D (2006a) Life of a clathrin coat: insights from clathrin and AP structures. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:32-44.
- Edeling MA, Mishra SK, Keyel PA, Steinhauser AL, Collins BM, Roth R, Heuser JE, Owen DJ, Traub LM (2006b) Molecular switches involving the AP-2 beta2 appendage regulate endocytic cargo selection and clathrin coat assembly. *Dev Cell* 10:329-342.
- Eskelinen EL, Tanaka Y, Saftig P (2003) At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins. *Trends Cell Biol* 13:137-145.
- Eskelinen EL, Cuervo AM, Taylor MR, Nishino I, Blum JS, Dice JF, Sandoval IV, Lippincott-Schwartz J, August JT, Saftig P (2005) Unifying nomenclature for the isoforms of the lysosomal membrane protein LAMP-2. *Traffic* 6:1058-1061.
- Faundez V, Horng JT, Kelly RB (1998) A function for the AP3 coat complex in synaptic vesicle formation from endosomes. *Cell* 93:423-432.

- Feng L, Seymour AB, Jiang S, To A, Peden AA, Novak EK, Zhen L, Rusiniak ME, Eicher EM, Robinson MS, Gorin MB, Swank RT (1999) The beta3A subunit gene (Ap3b1) of the AP-3 adaptor complex is altered in the mouse hypopigmentation mutant pearl, a model for Hermansky-Pudlak syndrome and night blindness. *Hum Mol Genet* 8:323-330.
- Fessart D, Simaan M, Zimmerman B, Comeau J, Hamdan FF, Wiseman PW, Bouvier M, Laporte SA (2007) Src-dependent phosphorylation of beta2-adaptin dissociates the beta-arrestin-AP-2 complex. *J Cell Sci* 120:1723-1732.
- Fingerhut A ((2000)) Untersuchungen zur Beeinflussung der Interaktion von AP2 mit cytoplasmatischen Rezeptordomänen durch die Phosphorylierung und Dephosphorylierung von AP2. In: Universität Göttingen.
- Fingerhut A, von Figura K, Höning S (2001) Binding of AP2 to sorting signals is modulated by AP2 phosphorylation. *J Biol Chem* 276:5476-5482.
- Fölsch H, Pypaert M, Schu P, Mellman I (2001) Distribution and function of AP-1 clathrin adaptor complexes in polarized epithelial cells. *J Cell Biol* 152:595-606.
- Gaidarov I, Keen JH (1999) Phosphoinositide-AP-2 interactions required for targeting to plasma membrane clathrin-coated pits. *J Cell Biol* 146:755-764.
- Georgieva-Hanson V, Schook WJ, Puszkin S (1988) Brain coated vesicle destabilization and phosphorylation of coat proteins. *J Neurochem* 50:307-315.
- Hannon GJ (2002) RNA interference. *Nature* 418:244-251.
- Hansen J (2007) Phosphorylierungsstatus des Clathrin-assoziierten Adaptor-Komplexes AP-2 in MDBK-Zellen. In. Göttingen: Georg-August-Universität.
- Hanson VG, Schook WJ, Puszkin S (1990) Novel regulatory role of phosphorylated clathrin light chain beta in bovine brain coated vesicles. *J Neurochem* 54:46-50.
- Heilker R, Manning-Krieg U, Zuber JF, Spiess M (1996) In vitro binding of clathrin adaptors to sorting signals correlates with endocytosis and basolateral sorting. *Embo J* 15:2893-2899.
- Hirst J, Bright NA, Rous B, Robinson MS (1999) Characterization of a fourth adaptor-related protein complex. *Mol Biol Cell* 10:2787-2802.
- Hirst J, Motley A, Harasaki K, Peak Chew SY, Robinson MS (2003) EpsinR: an ENTH domain-containing protein that interacts with AP-1. *Mol Biol Cell* 14:625-641.
- Hirst J, Lui WW, Bright NA, Totty N, Seaman MN, Robinson MS (2000) A family of proteins with gamma-adaptin and VHS domains that facilitate trafficking between the trans-Golgi network and the vacuole/lysosome. *J Cell Biol* 149:67-80.
- Höning S, Sandoval IV, von Figura K (1998) A di-leucine-based motif in the cytoplasmic tail of LIMP-II and tyrosinase mediates selective binding of AP-3. *Embo J* 17:1304-1314.

- Höning S, Ricotta D, Krauss M, Spate K, Spolaore B, Motley A, Robinson M, Robinson C, Haucke V, Owen DJ (2005) Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate regulates sorting signal recognition by the clathrin-associated adaptor complex AP2. *Mol Cell* 18:519-531.
- Huang F, Jiang X, Sorkin A (2003) Tyrosine phosphorylation of the beta2 subunit of clathrin adaptor complex AP-2 reveals the role of a di-leucine motif in the epidermal growth factor receptor trafficking. *J Biol Chem* 278:43411-43417.
- Huang KM, D'Hondt K, Riezman H, Lemmon SK (1999) Clathrin functions in the absence of heterotetrameric adaptors and AP180-related proteins in yeast. *Embo J* 18:3897-3908.
- Huizing M, Anikster Y, Gahl WA (2000) Hermansky-Pudlak syndrome and related disorders of organelle formation. *Traffic* 1:823-835.
- Itoh T, De Camilli P (2006) BAR, F-BAR (EFC) and ENTH/ANTH domains in the regulation of membrane-cytosol interfaces and membrane curvature. *Biochim Biophys Acta* 1761:897-912.
- Jackson AP, Flett A, Smythe C, Hufton L, Wetthey FR, Smythe E (2003) Clathrin promotes incorporation of cargo into coated pits by activation of the AP2 adaptor micro2 kinase. *J Cell Biol* 163:231-236.
- Jackson LP, Kelly BT, McCoy AJ, Gaffry T, James LC, Collins BM, Höning S, Evans PR, Owen DJ (2010) A large-scale conformational change couples membrane recruitment to cargo binding in the AP2 clathrin adaptor complex. *Cell* 141:1220-1229.
- Kantheti P, Qiao X, Diaz ME, Peden AA, Meyer GE, Carskadon SL, Kapfhamer D, Sufalko D, Robinson MS, Noebels JL, Burmeister M (1998) Mutation in AP-3 delta in the mocha mouse links endosomal transport to storage deficiency in platelets, melanosomes, and synaptic vesicles. *Neuron* 21:111-122.
- Kelly BT, McCoy AJ, Späte K, Miller SE, Evans PR, Höning S, Owen DJ (2008) A structural explanation for the binding of endocytic dileucine motifs by the AP2 complex. *Nature* 456:976-979.
- Kent HM, McMahon HT, Evans PR, Benmerah A, Owen DJ (2002) Gamma-adaptin appendage domain: structure and binding site for Eps15 and gamma-synergin. *Structure* 10:1139-1148.
- Kim SH, Ryan TA (2009) A distributed set of interactions controls mu2 functionality in the role of AP-2 as a sorting adaptor in synaptic vesicle endocytosis. *J Biol Chem* 284:32803-32812.
- Kim YM, Benovic JL (2002) Differential roles of arrestin-2 interaction with clathrin and adaptor protein 2 in G protein-coupled receptor trafficking. *J Biol Chem* 277:30760-30768.
- Kirchhausen T (2000a) Three ways to make a vesicle. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:187-198.
- Kirchhausen T (2000b) Clathrin. *Annu Rev Biochem* 69:699-727.
- Kirchhausen T, Harrison SC (1981) Protein organization in clathrin trimers. *Cell* 23:755-761.

- Knuehl C, Chen CY, Manalo V, Hwang PK, Ota N, Brodsky FM (2006) Novel binding sites on clathrin and adaptors regulate distinct aspects of coat assembly. *Traffic* 7:1688-1700.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Laporte SA, Oakley RH, Zhang J, Holt JA, Ferguson SS, Caron MG, Barak LS (1999) The beta2-adrenergic receptor/betaarrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:3712-3717.
- Lasic DD (1997) Colloid chemistry. Liposomes within liposomes. *Nature* 387:26-27.
- Lefrancois S, Janvier K, Boehm M, Ooi CE, Bonifacino JS (2004) An ear-core interaction regulates the recruitment of the AP-3 complex to membranes. *Dev Cell* 7:619-625.
- Letourneur F, Klausner RD (1992) A novel di-leucine motif and a tyrosine-based motif independently mediate lysosomal targeting and endocytosis of CD3 chains. *Cell* 69:1143-1157.
- Li Y, Lu W, Marzolo MP, Bu G (2001) Differential functions of members of the low density lipoprotein receptor family suggested by their distinct endocytosis rates. *J Biol Chem* 276:18000-18006.
- Lindwasser OW, Smith WJ, Chaudhuri R, Yang P, Hurley JH, Bonifacino JS (2008) A diacidic motif in human immunodeficiency virus type 1 Nef is a novel determinant of binding to AP-2. *J Virol* 82:1166-1174.
- Manfredi JJ, Bazari WL (1987) Purification and characterization of two distinct complexes of assembly polypeptides from calf brain coated vesicles that differ in their polypeptide composition and kinase activities. *J Biol Chem* 262:12182-12188.
- Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S (2002) The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298:1912-1934.
- Marks MS, Woodruff L, Ohno H, Bonifacino JS (1996) Protein targeting by tyrosine- and di-leucine-based signals: evidence for distinct saturable components. *J Cell Biol* 135:341-354.
- McMahon HT, Mills IG (2004) COP and clathrin-coated vesicle budding: different pathways, common approaches. *Curr Opin Cell Biol* 16:379-391.
- McMahon HT, Kozlov MM, Martens S (2010) Membrane curvature in synaptic vesicle fusion and beyond. *Cell* 140:601-605.
- Meyer C, Zizioli D, Lausmann S, Eskelinen EL, Hamann J, Saftig P, von Figura K, Schu P (2000) mu1A-adaptin-deficient mice: lethality, loss of AP-1 binding and rerouting of mannose 6-phosphate receptors. *Embo J* 19:2193-2203.
- Mitsunari T, Nakatsu F, Shioda N, Love PE, Grinberg A, Bonifacino JS, Ohno H (2005) Clathrin adaptor AP-2 is essential for early embryonal development. *Mol Cell Biol* 25:9318-9323.
- Morris SM, Cooper JA (2001) Disabled-2 colocalizes with the LDLR in clathrin-coated pits and interacts with AP-2. *Traffic* 2:111-123.

- Musacchio A, Smith CJ, Roseman AM, Harrison SC, Kirchhausen T, Pearse BM (1999) Functional organization of clathrin in coats: combining electron cryomicroscopy and X-ray crystallography. *Mol Cell* 3:761-770.
- Nielsen MS, Madsen P, Christensen EI, Nykjaer A, Gliemann J, Kasper D, Pohlmann R, Petersen CM (2001) The sortilin cytoplasmic tail conveys Golgi-endosome transport and binds the VHS domain of the GGA2 sorting protein. *Embo J* 20:2180-2190.
- Ohno H, Fournier MC, Poy G, Bonifacino JS (1996) Structural determinants of interaction of tyrosine-based sorting signals with the adaptor medium chains. *J Biol Chem* 271:29009-29015.
- Ohno H, Stewart J, Fournier MC, Bosshart H, Rhee I, Miyatake S, Saito T, Gallusser A, Kirchhausen T, Bonifacino JS (1995) Interaction of tyrosine-based sorting signals with clathrin-associated proteins. *Science* 269:1872-1875.
- Olusanya O, Andrews PD, Swedlow JR, Smythe E (2001) Phosphorylation of threonine 156 of the mu2 subunit of the AP2 complex is essential for endocytosis in vitro and in vivo. *Curr Biol* 11:896-900.
- Ooi CE, Moreira JE, Dell'Angelica EC, Poy G, Wassarman DA, Bonifacino JS (1997) Altered expression of a novel adaptin leads to defective pigment granule biogenesis in the *Drosophila* eye color mutant garnet. *Embo J* 16:4508-4518.
- Owen DJ (2004) Linking endocytic cargo to clathrin: structural and functional insights into coated vesicle formation. *Biochem Soc Trans* 32:1-14.
- Owen DJ, Evans PR (1998) A structural explanation for the recognition of tyrosine-based endocytotic signals. *Science* 282:1327-1332.
- Owen DJ, Collins BM, Evans PR (2004) Adaptors for clathrin coats: structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20:153-191.
- Owen DJ, Vallis Y, Pearse BM, McMahon HT, Evans PR (2000) The structure and function of the beta 2-adaptin appendage domain. *Embo J* 19:4216-4227.
- Owen DJ, Vallis Y, Noble ME, Hunter JB, Dafforn TR, Evans PR, McMahon HT (1999) A structural explanation for the binding of multiple ligands by the alpha-adaptin appendage domain. *Cell* 97:805-815.
- Paleotti O, Macia E, Luton F, Klein S, Partisani M, Chardin P, Kirchhausen T, Franco M (2005) The small G-protein Arf6GTP recruits the AP-2 adaptor complex to membranes. *J Biol Chem* 280:21661-21666.
- Pauloin A, Thuriereau C (1993) The 50 kDa protein subunit of assembly polypeptide (AP) AP-2 adaptor from clathrin-coated vesicles is phosphorylated on threonine-156 by AP-1 and a soluble AP50 kinase which co-purifies with the assembly polypeptides. *Biochem J* 296 ( Pt 2):409-415.
- Pearse BM (1975) Coated vesicles from pig brain: purification and biochemical characterization. *J Mol Biol* 97:93-98.
- Pearse BM (1976) Clathrin: a unique protein associated with intracellular transfer of membrane by coated vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73:1255-1259.
- Pearse BM, Robinson MS (1984) Purification and properties of 100-kd proteins from coated vesicles and their reconstitution with clathrin. *Embo J* 3:1951-1957.

- Peter BJ, Kent HM, Mills IG, Vallis Y, Butler PJ, Evans PR, McMahon HT (2004) BAR domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin BAR structure. *Science* 303:495-499.
- Pitcher C, Honing S, Fingerhut A, Bowers K, Marsh M (1999) Cluster of differentiation antigen 4 (CD4) endocytosis and adaptor complex binding require activation of the CD4 endocytosis signal by serine phosphorylation. *Mol Biol Cell* 10:677-691.
- Praefcke GJ, Ford MG, Schmid EM, Olesen LE, Gallop JL, Peak-Chew SY, Vallis Y, Babu MM, Mills IG, McMahon HT (2004) Evolving nature of the AP2 alpha-appendage hub during clathrin-coated vesicle endocytosis. *Embo J* 23:4371-4383.
- Puertollano R, Aguilar RC, Gorshkova I, Crouch RJ, Bonifacino JS (2001) Sorting of mannose 6-phosphate receptors mediated by the GGAs. *Science* 292:1712-1716.
- Rapoport I, Chen YC, Cupers P, Shoelson SE, Kirchhausen T (1998) Dileucine-based sorting signals bind to the beta chain of AP-1 at a site distinct and regulated differently from the tyrosine-based motif-binding site. *Embo J* 17:2148-2155.
- Ricotta D, Conner SD, Schmid SL, von Figura K, Höning S (2002) Phosphorylation of the AP2 mu subunit by AAK1 mediates high affinity binding to membrane protein sorting signals. *J Cell Biol* 156:791-795.
- Ricotta D, Hansen J, Preiss C, Teichert D, Höning S (2008) Characterization of a protein phosphatase 2A holoenzyme that dephosphorylates the clathrin adaptors AP-1 and AP-2. *J Biol Chem* 283:5510-5517.
- Rodionov DG, Bakke O (1998) Medium chains of adaptor complexes AP-1 and AP-2 recognize leucine-based sorting signals from the invariant chain. *J Biol Chem* 273:6005-6008.
- Rohde G, Wenzel D, Haucke V (2002) A phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate binding site within mu2-adaptin regulates clathrin-mediated endocytosis. *J Cell Biol* 158:209-214.
- Sambrook J (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. NY Cold Spring Harbor Laboratory Press 2. Auflage.
- Sandoval IV, Bakke O (1994) Targeting of membrane proteins to endosomes and lysosomes. *Trends Cell Biol* 4:292-297.
- Schagger H, von Jagow G (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 166:368-379.
- Schmid EM, McMahon HT (2007) Integrating molecular and network biology to decode endocytosis. *Nature* 448:883-888.
- Schmid EM, Ford MG, Burtley A, Praefcke GJ, Peak-Chew SY, Mills IG, Benmerah A, McMahon HT (2006) Role of the AP2 beta-appendage hub in recruiting partners for clathrin-coated vesicle assembly. *PLoS Biol* 4:e262.
- Schmid SL (1997) Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: an integrated process. *Annu Rev Biochem* 66:511-548.

- Schmidt U, Briese S, Leicht K, Schurmann A, Joost HG, Al-Hasani H (2006) Endocytosis of the glucose transporter GLUT8 is mediated by interaction of a dileucine motif with the beta2-adaptin subunit of the AP-2 adaptor complex. *J Cell Sci* 119:2321-2331.
- Schook WJ, Puszkin S (1985) Brain clathrin light chain 2 can be phosphorylated by a coated vesicle kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:8039-8043.
- Schroder S, Ungewickell E (1991) Subunit interaction and function of clathrin-coated vesicle adaptors from the Golgi and the plasma membrane. *J Biol Chem* 266:7910-7918.
- Seaman MN, Ball CL, Robinson MS (1993) Targeting and mistargeting of plasma membrane adaptors in vitro. *J Cell Biol* 123:1093-1105.
- Sevrioukov EA, He JP, Moghrabi N, Sunio A, Kramer H (1999) A role for the deep orange and carnation eye color genes in lysosomal delivery in *Drosophila*. *Mol Cell* 4:479-486.
- Shiba T, Kawasaki M, Takatsu H, Nogi T, Matsugaki N, Igarashi N, Suzuki M, Kato R, Nakayama K, Wakatsuki S (2003) Molecular mechanism of membrane recruitment of GGA by ARF in lysosomal protein transport. *Nat Struct Biol* 10:386-393.
- Shiratori T, Miyatake S, Ohno H, Nakaseko C, Isono K, Bonifacino JS, Saito T (1997) Tyrosine phosphorylation controls internalization of CTLA-4 by regulating its interaction with clathrin-associated adaptor complex AP-2. *Immunity* 6:583-589.
- Simpson F, Peden AA, Christopoulou L, Robinson MS (1997) Characterization of the adaptor-related protein complex, AP-3. *J Cell Biol* 137:835-845.
- Spang A, Matsuoka K, Hamamoto S, Schekman R, Orci L (1998) Coatamer, Arf1p, and nucleotide are required to bud coat protein complex I-coated vesicles from large synthetic liposomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:11199-11204.
- Späte K (2007) Signalbindung und Membraninteraktion von heterotetrameren Adaptorprotein-Komplexen. In: Georg-August-Universität zu Göttingen.
- Stahelin RV, Long F, Peter BJ, Murray D, De Camilli P, McMahon HT, Cho W (2003) Contrasting membrane interaction mechanisms of AP180 N-terminal homology (ANTH) and epsin N-terminal homology (ENTH) domains. *J Biol Chem* 278:28993-28999.
- ter Haar E, Harrison SC, Kirchhausen T (2000) Peptide-in-groove interactions link target proteins to the beta-propeller of clathrin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:1096-1100.
- Traub LM (2009) Tickets to ride: selecting cargo for clathrin-regulated internalization. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10:583-596.
- Ungewickell E, Branton D (1981) Assembly units of clathrin coats. *Nature* 289:420-422.
- Voorhees P, Deignan E, van Donselaar E, Humphrey J, Marks MS, Peters PJ, Bonifacino JS (1995) An acidic sequence within the cytoplasmic domain of furin functions as a determinant of trans-Golgi network localization and internalization from the cell surface. *Embo J* 14:4961-4975.

- Watt SA, Kular G, Fleming IN, Downes CP, Lucocq JM (2002) Subcellular localization of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate using the pleckstrin homology domain of phospholipase C delta1. *Biochem J* 363:657-666.
- Wilde A, Brodsky FM (1996) In vivo phosphorylation of adaptors regulates their interaction with clathrin. *J Cell Biol* 135:635-645.
- Zaremba S, Keen JH (1985) Limited proteolytic digestion of coated vesicle assembly polypeptides abolishes reassembly activity. *J Cell Biochem* 28:47-58.
- Zerial M, McBride H (2001) Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:107-117.
- Zhang Y, Allison JP (1997) Interaction of CTLA-4 with AP50, a clathrin-coated pit adaptor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:9273-9278.
- Zhen L, Jiang S, Feng L, Bright NA, Peden AA, Seymour AB, Novak EK, Elliott R, Gorin MB, Robinson MS, Swank RT (1999) Abnormal expression and subcellular distribution of subunit proteins of the AP-3 adaptor complex lead to platelet storage pool deficiency in the pearl mouse. *Blood* 94:146-155.
- Zheng Q, Bobich JA (2004) ADP-ribosylation factor6 regulates both [3H]-noradrenaline and [14C]-glutamate exocytosis through phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Neurochem Int* 45:633-640.
- Zizioli D, Meyer C, Guhde G, Saftig P, von Figura K, Schu P (1999) Early embryonic death of mice deficient in gamma-adaptin. *J Biol Chem* 274:5385-5390.

## Erklärung

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

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

### Teile meiner Arbeit sind wie folgt publiziert:

1. Jackson LP, Kelly BT, McCoy AJ, Gaffry T, James LC, Collins BM, Honing S, Evans PR, Owen DJ A large-scale conformational change couples membrane recruitment to cargo binding in the AP2 clathrin adaptor complex. Cell 141:1220-1229.
2. Katoh Y, Ritter B, Gaffry T, Blondeau F, Honing S, McPherson PS (2009) The clathrin family, neuron-specific lipid- and clathrin-binding Sec14 proteins regulating lysosomal morphology. J Biol Chem 284:27646-27654.

### Kongressbeiträge (Poster):

1. 58. Mosbacher Kolloquium der GBM: Protein and lipid sorting in health and disease. Mosbach, 2007
2. SFB 523 Symposium: Intracellular Transport & Trafficking. Göttingen, 2008
3. First Joint Congress of the Swiss and German Societies of Cell Biology (ZMG and DGZ). Konstanz, 2009

### Kongressbeiträge (Vortrag):

1. First International Symposium on "Protein Trafficking in Health and Disease". Hamburg, 2010

Köln, im August 2010

Thomas Gaffry

## Lebenslauf

### Thomas Gaffry

---

---

#### Persönliche Information

- Familienstand : verheiratet
- Staatsangehörigkeit: deutsch
- Geburtsdatum: 03.12.1975
- Geburtsort: Leverkusen

#### Ausbildung

07.1982-06.1984 Besuch der Grundschule Neustadtstraße in Leverkusen-Opladen

07.1984-06.1986 Besuch der Grundschule Uferstraße in Leichlingen

07.1986-06.1995 Besuch des Städtischen Gymnasiums Am Hammer in Leichlingen

10.1996-03.1999 Grundstudium Biologie Fachrichtung Diplom an der Universität zu Köln

03.1999 Vordiplom Biologie an der Universität zu Köln

04.1999-09.2000 und 04.2004-12.2005 Hauptstudium Biologie Fachrichtung Diplom an der Universität zu Köln

12.2005 Mündliche Diplomprüfung Biologie an der Universität zu Köln

01.2006-10.2006 Diplomarbeit am Institut für Biochemie an der Universität zu Köln

Ab 11.2006 Promotion am Institut für Biochemie I an der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln

#### Wehrdienst

10.1995-07.1996 Wehrdienst im Transportbataillon Dietz-Limburg

#### Berufserfahrung

12.2000-03.2004 Setassistent im Bereich Film und Fernsehen

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. Jürgen Dohmen und Herrn Prof. Dr. Stefan Höning danke ich für die offizielle Betreuung und Begutachtung meiner Dissertation. Bei Herrn Prof. Dr. Siegfried Roth möchte ich mich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes und bei Herrn Priv. Doz. Dr. Markus Plomann für die Übernahme des Beisitzes bedanken.

Ich möchte mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Höning für die vorbildhafte Betreuung und freundschaftliche Unterstützung bedanken.

Dr. David Owen, sowie Dr. Bernard Kelly und Dr. Lauren Jackson aus Cambridge, UK möchte ich für die äußerst fruchtbare Kollaboration, die vielen Anregungen, Unmengen an Proteinen und Peptiden, aber auch immer wieder humorvollen e-mail-Kontakte danken.

Auch danke ich Dr. Peter McPherson und Dr. Yohei Katoh aus Montreal, Kanada für die gute Zusammenarbeit sowie für ihre Geduld bei der Etablierung der Bedingungen unserer Bindungsstudien.

Den Mitarbeitern vom ZMMK Servicelabor danke ich für die freundschaftliche und kompetente Unterstützung.

Allen Mitgliedern des Trafficking Seminars, insbesondere Markus Plomann, Gerrit Praefcke, Dagmar Moersdorf, Sven Schellmann, Sylvia Schael, Elena Rahn, Philip Petermann, Jan Kormann, Florian Heßner und Tanja Riyahi danke ich für den regen Austausch von Ideen, Methoden und Materialien sowie für die fachliche und freundschaftliche Unterstützung bei den kleineren und größeren Problemen des Laboralltages.

Ein großer Dank geht an meine Arbeitsgruppe, unseren beiden unermütlchen „Helferchen“ Andrea Rüger und Ireen Schaffrath, den „Mädels von der Lipid-Fraktion“ Anke Deggerich und Anne Tschichholz sowie der „Herrin aller Macrophagen“ Anika Steffen. Ein besonderer Dank gilt Dominic Teichert für die unermütlche Hilfsbereitschaft und immer gute Laune mit der er stets die Arbeit an unserem gemeinsamen Thema „CCVs“ bereicherte. Kira und Maarten, den

## Danksagung

---

Ehemaligen, danke ich für die freundschaftliche Unterstützung auch über die Arbeitszeit hinaus. Ihr alle habt meinen Laboralltag sowie auch so manche Stunde außerhalb des Labs bereichert.

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

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei meiner Familie und allen Freunden bedanken, die immer an mich geglaubt haben und mir stets Rückhalt gaben.

Der größte Dank aber gilt meiner Frau Sandra für ihre stets liebevolle Unterstützung.