

# **Untersuchungen zur Rolle von ENTH-Domänenproteinen bei der Bildung clathrinbedeckter Vesikel**

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften  
Dr. rer. nat.  
genehmigte Dissertation  
von

**Dipl. Biochem. Christoph Kalthoff**

geboren am 27. September 1973 in Oldenburg

Referent: Prof. Walter Müller  
Korreferent: Prof. Ernst Ungewickell  
  
Tag der Promotion: 8. Mai 2003

## Zusammenfassung

Epsin 1 und AP180 sind an der Bildung clathrinbedeckter Transportvesikel an der Plasmamembran beteiligt. In beiden Proteinen vermittelt eine aminoterminaler  $\alpha$ -helikale ENTH-Domäne die Interaktion mit dem seltenen Membranlipid PtdIns-(4,5)-P<sub>2</sub>. Der carboxyterminale Bereich enthält dagegen sämtliche bekannten Proteininteraktionsmotive und ist im Fall von AP180 dazu in der Lage, freies Clathrin *in vitro* zu Käfigen zusammenzulagern. Im Gegensatz zur ENTH-Domäne war über die Struktur dieser Bereiche bislang wenig bekannt. Deshalb wurden in dieser Arbeit Epsin 1 und AP180 ausführlich biophysikalisch untersucht. Mit Hilfe von analytischer Gelfiltration und Ultrazentrifugation sowie CD-Spektroskopie konnte gezeigt werden, daß außerhalb der ENTH-Domänen Epsin 1 und AP180 fast vollständig unstrukturiert sind und eine Konformation haben, die einem statistischen Knäuel entspricht. Außerdem konnte gezeigt werden, daß auch Epsin 1 wie AP180 die Zusammenlagerung von Clathrin zu Käfigen fördern kann. Es wird ein Modell vorgeschlagen, nach dem in einer frühen Phase der Bildung clathrinbedeckter Vesikel Epsin 1 und AP180 über ihre ENTH-Domänen an PtdIns-(4,5)-P<sub>2</sub> rekrutiert werden, ihrerseits über ihre flexiblen Bereiche andere Hüllkomponenten in der Nähe der Membran konzentrieren und dadurch die Bildung der Vesikel initiieren.

Darüberhinaus konnte durch Homologievergleiche in Datenbanken ein weiteres, bislang unbekanntes ENTH-Domänenprotein identifiziert werden, daß aufgrund der beobachteten Eigenschaften Clint (Clathrin interagierendes Protein mit *trans*-Golgi Lokalisation) genannt wurde. Es bindet an die terminale Domäne von Clathrin, die  $\gamma$ -Ohrdomäne von AP-1 und die GAE-Domäne von GGA2. Von zwei putativen Clathrinboxbindungsmotiven konnte nur eines, <sup>423</sup>LFDLM, durch gezielte Mutagenese als funktionelles Clathrinbindungsmotiv identifiziert werden. Liposomenbindungsexperimente haben ergeben, daß auch die Clint-ENTH-Domäne mit Phosphoinositiden interagiert. Die Bindung ist allerdings schwächer und weniger selektiv als die von Epsin 1. Durch Immunfluoreszenzmarkierung konnte gezeigt werden, daß Clint im Bereich des TGN mit Clathrin und AP-1 kolokalisiert und diese Verteilung durch Brefeldin A beeinflusst wird. Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß Clint in die Bildung von clathrinbedeckten Vesikeln am TGN involviert ist und dabei eine ähnliche Rolle spielen könnte wie Epsin 1 und AP180 an der Plasmamembran.

**Schlagnworte:** clathrinbedeckte Vesikel, ENTH-Domäne, Clint

## Summary

Epsin 1 and AP180 are involved in the formation of Clathrin-coated transport vesicles at the plasma membrane. They each have an aminoterminal  $\alpha$ -helical ENTH-domain, which mediates the association with the rare membrane lipid PtdIns-(4,5)-P<sub>2</sub>, whereas the carboxyterminal region contains all known protein interaction motifs and is, in the case of AP180, capable of assembling free clathrin to cages *in vitro*. In contrast to the ENTH-domain nothing was known about the structure of these regions so far. Therefore, in this study Epsin 1 and AP180 were extensively examined by biophysical methods. Using analytical gel filtration and ultracentrifugation as well as CD-spectroscopy it was demonstrated that outside the ENTH-domains Epsin 1 and AP180 are almost completely unstructured and have a random coil conformation. Furthermore it could be shown that Epsin 1 like AP180 is capable of promoting assembly of free Clathrin to cages *in vitro*. A model is suggested that in an early phase of the formation of Clathrin-coated vesicles Epsin 1 and AP180 are recruited to PtdIns-(4,5)-P<sub>2</sub>, use their flexible segments to concentrate other coat-components near the membrane and thereby initiate the formation of the vesicle.

Furthermore, a novel ENTH-domain protein could be identified by homology searches in databases. In reference to its function it was named Clint (Clathrin interacting protein with *trans*-Golgi localization). It binds to the terminal domain of Clathrin, the  $\gamma$ -ear domain of AP-1 and the GAE-domain of GGA2. Of the two putative Clathrin box motifs only one, <sup>423</sup>LFDLM, could be identified as a functional Clathrin binding sequence by site-directed mutagenesis. Liposome binding experiments have shown that the ENTH-domain of Clint interacts with phosphoinositides. However, the interaction has a lower affinity and is less selective than that of the Epsin 1-ENTH domain. Using immunofluorescence it could be shown that Clint colocalizes with Clathrin and AP-1 in the area of the TGN and that this distribution is influenced by treatment of the cells with Brefeldin A. The obtained results indicate that Clint is involved in the formation of Clathrin coated vesicles at the TGN and that it could play a role equivalent to that of Epsin 1 and AP180 at the plasma membrane.

**Key words:** clathrin-coated vesicles, ENTH-domain, Clint

## Danksagung

Die Arbeiten zu dieser Dissertation wurden in der Abteilung Zellbiologie der Medizinischen Hochschule Hannover unter Leitung von Prof. Ernst Ungewickell durchgeführt. Ihm danke ich für die Überlassung des Projektes und die Möglichkeit, in seiner Gruppe die Arbeit anfertigen zu können. Besonders dankbar bin ich ihm für Freiheiten, die er mir bei der Arbeit an dem Projekt gelassen hat und die Ermutigung, auch Dinge zu tun, die nicht zwangsläufig zum Erfolg führen mußten.

Professor Walter Müller danke ich für die Betreuung der Promotion und dafür, daß er trotz des manchmal chaotischen Hin und Hers immer da war.

Professor Jürgen Alves und Claus Urbanke möchte ich für die erfolgreiche Zusammenarbeit und Diskussionsbereitschaft danken.

Ich danke Frau Christiane Lemke für ihre stete Hilfsbereitschaft, hunderte von Gelen und viele Liter von Puffer. Frau Huberta Ungewickell, Frau Beate Großmann und Frau Elke Mallon danke ich für die Hilfe bei einigen Bindungsexperimenten, Experimenten mit Säugetierzellen und die Präparation clathrinbedeckter Vesikel.

Herrn Claus-Henning Nagel, Herrn Rüdiger Kohl, Herrn Stefan Mahrhold und Herrn Jens Mittag danke ich für die engagierte und hilfreiche Mitarbeit während ihrer Praktika. Herrn Lars Hinrichsen und Herrn Markus Döring danke ich für das Korrekturlesen der Arbeit.

Professor Jürgen Wehland danke ich dafür, daß er mir Tubulin und Zellen zur Verfügung gestellt hat. Auch Professor Klaus Weber danke ich für Zelllinien, die für diese Arbeit verwendet wurden. Dr. Robert Lindner danke ich für das Überlassen von Mausgewebe. Darüberhinaus danke ich Dr. Hong Chen, Dr. Takahiro Nagase, Professor Thomas Kirchhausen, Professor Richard Anderson und Professor James Keen für DNA-Plasmide, die ich verwendet habe.

Meinen Freunden Dr. Katrin Gorf und Dr. Christoph Rose bin ich mehr als dankbar für unsere Freundschaft und die stete Motivation, nicht nur durch so manchen Spieleabend. Meinen Eltern danke ich für die - nicht nur finanzielle - Unterstützung über all die Jahre und Urte danke ich für viel mehr als ich hier schreiben kann.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>3</b>
<b>Summary.....</b>	<b>4</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>5</b>
<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>6</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>9</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>12</b>
1.1 Clathrinbedeckte Vesikel .....	12
1.2 Clathrin .....	12
1.3 Adaptoren .....	14
1.4 Proteine mit ENTH-Domänen und verwandten Strukturen .....	17
1.4.1 Epsin.....	18
1.4.2 AP180 und CALM .....	19
1.4.3 Hip1 und Hip1R.....	21
1.4.4 GGAs.....	21
1.5 Molekularer Ablauf der Bildung von clathrinbedeckten Vesikeln .....	22
1.5.1 Vesikelbildung an der Plasmamembran .....	22
1.5.2 Vesikelbildung am TGN.....	25
1.6 Aufgabenstellung.....	27
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>28</b>
2.1 Verwendete Materialien.....	28
2.1.1 Chemikalien .....	28
2.1.2 Proteine und Enzyme .....	29
2.1.3 Kommerzielle Systeme .....	30
2.1.4 Zellen und Gewebe.....	31
2.1.5 Nukleinsäuren .....	31
2.1.6 Oligodesoxynukleotide .....	33
2.1.7 Antikörper .....	33
2.1.8 Verbrauchsmaterialien.....	35
2.2 Benutzte Geräte.....	36
2.2.1 Laborgeräte .....	36
2.2.2 Software .....	38
2.3 Benutzte Puffer und Lösungen .....	39
2.4 Molekularbiologische Methoden .....	40
1.1.1 Klonierung von DNA-Fragmenten.....	40
2.4.2 Transformation von DNA in <i>Escherichia coli</i> .....	41
2.4.3 Polymerasekettenreaktion .....	42
2.4.4 Herstellung von Plasmiden zur Proteinexpression.....	44
2.4.5 Gerichtete Mutagenese .....	45

2.5	Proteinanalytik .....	46
2.5.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese .....	46
2.5.2	Westernblot .....	47
2.5.3	Digitalisierung und Densitometrie .....	47
2.6	Proteinexpression und -aufreinigung .....	48
2.6.1	Expression von Fusionsproteinen in <i>E. coli</i> .....	48
2.6.2	Aufreinigung von Fusionsproteinen aus <i>E. coli</i> .....	48
2.6.3	Entfernung des Fusionsanteils durch Thrombinverdau .....	50
2.6.4	Proteinreinigung über Anionenaustauschchromatographie.....	50
2.6.5	Proteinreinigung durch Gelfiltration.....	50
2.7	Aufarbeitung von Gewebe .....	51
2.7.1	Herstellung von Zytosol und weiteren Gewebeextrakten .....	51
2.7.2	Herstellung von Gewebehomogenaten aus Maus .....	52
2.7.3	Präparation von Clathrin.....	52
2.8	Biophysikalische Analysen .....	53
2.8.1	Analytische Gelfiltration .....	53
2.8.2	Sucrosedichtegradientenzentrifugation .....	54
2.8.3	Analytische Ultrazentrifugation.....	55
2.8.4	CD-Spektroskopie.....	56
2.8.5	Hitzedenaturierung.....	56
2.9	Bindungsexperimente .....	56
2.9.1	GST-Bindungsexperimente .....	56
2.9.2	Liposomenbindungsexperimente .....	57
2.9.3	Zusammenlagerung von Clathrinkäfigen .....	58
2.9.4	Mikrotubulibindungsexperimente .....	59
2.10	Arbeiten mit kultivierten eukaryotischen Zellen.....	60
2.10.1	Immunfluoreszenzmarkierung.....	60
2.10.2	Behandlung von Zellen mit Brefeldin A.....	61
2.10.3	Transfektion von eukaryotischen Zellen .....	61
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>62</b>
3.1	Hydrodynamische Eigenschaften von Epsin 1 und AP180 .....	62
3.1.1	Analytische Gelfiltration .....	63
3.1.2	Sedimentationseigenschaften von Epsin 1 und AP180 .....	65
3.2	Sekundärstrukturanalyse von Epsin 1 und AP180.....	68
3.2.1	Circular dichroismusspektroskopie .....	68
3.2.2	Hitzestabilität der ungeordneten Bereiche von Epsin 1 und AP180.....	70
3.3	Zusammenlagerung von Clathrinkäfigen durch Epsin 1 .....	72
3.4	Identifizierung des neuen ENTH-Domänen Proteins Clint .....	73
3.4.1	Analyse der Primärsequenz von Clint.....	74
3.5	Protein-Proteininteraktionsstudien mit Clint .....	77
3.5.1	Identifizierung von Proteininteraktionspartnern von Clint .....	77
3.5.2	Eingrenzung der Bindungsorte auf Clint für Clathrin und GGA2 .....	80
3.5.3	Identifizierung von Clathrinbindungsmotiven durch Mutagenese.....	81
3.6	Lipidbindung durch die ENTH-Domäne von Clint .....	83
3.7	Gewebeverteilung von Clint.....	84
3.8	Intrazelluläre Lokalisation von Clint .....	85
3.8.1	Clint in subzellulären Fraktionen .....	85
3.8.2	Lokalisation von Clint in kultivierten eukaryotischen Zellen.....	86
3.9	Rolle der ENTH-Domäne bei der intrazellulären Lokalisation.....	89
3.9.1	Lokalisation von GFP-Fusionsproteinen von ENTH-Domänen .....	89

---

3.9.2	Identifizierung neuer Bindungspartner der ENTH-Domäne von Clint .....	91
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>94</b>
4.1	Flexible Clathrinbindungsdomänen als Strukturprinzip .....	94
4.2	Epsin 1 und AP180 bei der Bildung von Clathrinhüllen.....	98
4.3	Clint bei der Bildung von clathrinbedeckten Vesikeln am TGN.....	100
4.4	Die Rolle der ENTH-Domäne bei der Vesikelbildung.....	102
<b>5</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>105</b>
5.1	Aminosäuresequenzen der untersuchten Proteine.....	105
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>107</b>
	<b>Wissenschaftlicher Werdegang.....</b>	<b>116</b>

## Abkürzungsverzeichnis

AP	Adaptorprotein (z.B. AP-1, AP-2)
AP180	<i>assembly</i> protein mit einer apparenten Molekülmasse von 180 kDa
Arf1	ADP-Ribosylierungsfaktor 1
Arf-GEF	Arf-Guaninukleotidaustauschfaktor ( <i>Arf guanine nucleotide exchange factor</i> )
BFA	Brefeldin A
BLAST	<i>Basic Logical Alignment Search Tool</i>
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
CALM	<i>clathrin assembly lymphoid myeloid leukemia protein</i>
CCD	<i>charge-coupled device</i>
CD	Circulardichroismus
cDNA	kopierte DNA ( <i>copyDNA</i> )
Chol.	Cholesterin
Clint	Clathrininteragierendes Protein mit <i>trans</i> -Golgilokalisation
DMEM	Dulbeccos Modifikation von Eagles Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>desoxyribonucleic acid</i> )
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>Enhanced Chemoluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenbis(oxyethylenitrilo)-tetraacetat
EH	Eps15-Homologie
ENTH-Domäne	Epsin N-terminale Homologiedomäne
Eps15	EGF-Rezeptorproteinsubstrat 15
Epsin	Eps15-interagierendes Protein
FPLC	<i>Fast Performance Liquid Chromatography</i>
GAE-Domäne	<i>gamma-appendage-ear</i> -Domäne
GAK	Cyclin G-assoziierte Kinase
GAT-Domäne	GGA- und TOM-Domäne
GBP	Golgebindungspuffer
GFP	Grünfluoreszierendes Protein
GGA	Golgi-lokalisiertes, $\gamma$ -Ohr-enthaltendes, Arf1 bindendes Protein
$g_{\max}$	maximale Beschleunigung in Vielfachen der Erdbeschleunigung ( $g$ )
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase

---

GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	Guanosintriphosphatase
GTP- $\gamma$ -S	Guanosin-5'-[ $\gamma$ -thio]triphosphat
H <sub>6</sub>	6 x Histidin
HC	schwere Kette ( <i>heavy chain</i> )
Hepes	[4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-ethansulfonsäure
Hip1	Huntingtin interagierendes Protein 1
Hip1R	Hip1-ähnliches Protein ( <i>Hip1-related</i> )
Hsc70	<i>cognate heat shock-protein</i> mit einer Größe von 70 kDa
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
kDa	Kilodalton
LAP	wie AP180 ( <i>like AP180</i> )
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LC	leichte Kette ( <i>light chain</i> )
MDBK-Zellen	Madin-Darby Rindernierenzellen ( <i>Madin-Darby bovine kidney cells</i> )
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
MHH	Medizinische Hochschule Hannover
mRNA	Botenribonukleinsäure ( <i>messenger ribonucleic acid</i> )
MT	Mikrotubuli
MW	Molekulargewicht ( <i>molecular weight</i> )
MWCO	Molekulargewichtsausschlußgrenze ( <i>molecular weight cut-off</i> )
NPS@	<i>Network Protein Sequence Analysis</i>
NTA	Nitrilotriacetat
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PC	Phosphatidylcholin
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PDB	Proteindatenbank ( <i>protein database</i> )
PE	Phosphatidylethanolamin
PEM-Puffer	Pipes-EDTA-Magnesiumpuffer
PFA	Paraformaldehyd
PIC-Extraktion	Phenol-Isoamyl-Chloroformextraktion
Pipes	Piperazin- <i>N,N'</i> --bis(etansulfonsäure)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PONDR	<i>Predictor of Naturally Disordered Regions</i>
PP	Polypropylen

---

PtdIns	Phosphatidylinositol
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
TBE-Puffer	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TBS	trisgepufferte Salzlösung ( <i>Tris-buffered saline</i> )
TD	Terminale Domäne
TGN	<i>trans</i> -Golgi-Netzwerk
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur ( <i>melting temperature</i> )
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
trx	Thioredoxin
trx/H <sub>6</sub>	Thioredoxin/6 x Histidin
U	<i>units</i> (Enzymeinheiten)
UIM	Ubiquitininteraktionsmotiv
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
VHS-Domäne	Vps27p-, Hrs- und Stam-Domäne
WASP	Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein

Darüberhinaus wurden Aminosäuren innerhalb von Sequenzen mit dem Einbuchstabencode (wobei x für eine beliebige und  $\Phi$  für eine große hydrophobe Aminosäure stehen) und einzelne Aminosäuren im Text mit dem Dreibuchstabencode abgekürzt.

# 1 Einleitung

## 1.1 Clathrinbedeckte Vesikel

Eukaryotische Zellen sind in zahlreiche membranumhüllte Kompartimente unterteilt. Zwischen diesen sowie mit der Plasmamembran herrscht ein reger Austausch von Membranvesikeln, über die lösliche oder rezeptorgebundene Frachtmoleküle und Membranbestandteile transportiert werden (aktuelle Übersichten geben Brodsky *et al.*, 2001, und Gu *et al.*, 2001).

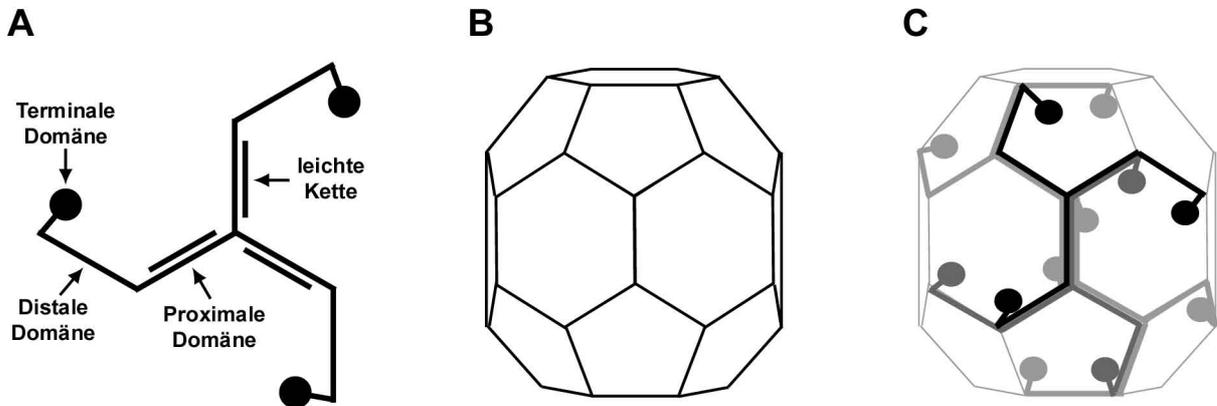
Viele dieser Transportprozesse werden durch clathrinbedeckte Vesikel vermittelt. Darunter sind einerseits solche, bei denen Vesikel an der Plasmamembran gebildet werden, etwa bei der rezeptorvermittelten Endozytose oder der Wiederverwendung der Membranen von synaptischen Vesikeln, andererseits aber auch zahlreiche Transportvorgänge, bei denen Vesikel an intrazellulären Membranen entstehen, wie beim Transport lysosomaler Hydrolasen vom *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) zu späten Endosomen oder der Bildung und Reifung sekretorischer Granula.

Strukturell zeichnen sich clathrinbedeckte Vesikel dadurch aus, daß sie eine polyedrische käfigartige Proteinhülle besitzen. Nach diesem elektronenmikroskopischen Erscheinungsbild wurde dann auch die Hauptkomponente der Proteinhülle, das Clathrin (von lateinisch *clatri*, das Gitter), benannt, nachdem es isoliert und charakterisiert wurde (Pearse, 1976).

## 1.2 Clathrin

Tatsächlich ist Clathrin für die gitterartige Struktur der Proteinhülle verantwortlich. Frei in Lösung allerdings bildet es sogenannte Triskelia, dreibeinige Strukturen, die aus jeweils drei schweren und drei leichten Ketten bestehen (Ungewickell und Branton, 1981). Die ca. 190 kDa großen schweren Ketten (*heavy chain*, HC) interagieren dabei in der Nähe ihrer Carboxytermini im Zentrum der Triskelia und bilden jeweils ein Bein. Sie formen über ausgestreckte  $\alpha$ -helikale Zickzack-Strukturen vom Zentrum ausgehend zunächst eine proximale und eine über eine Biegung verbundene distale Domäne (Ybe *et al.*, 1999). Daran schließt sich über eine flexible Verbindungsregion die globuläre, aus einem Propeller aus  $\beta$ -Faltblättern gebildete aminoterminal Domäne (TD) an (ter Haar *et al.*, 1998). Mit den proximalen Domänen ist

jeweils einer der beiden Typen der ca. 25 kDa großen leichten Ketten (*light chain*, LCa oder LCb) assoziiert. Dabei bilden die leichten Ketten eine  $\alpha$ -Helix, die sich an die Zick-Zack-Struktur der Proximalen Domänen anlagert (Abbildung 1.1 A; Chen *et al.*, 2002).



**Abbildung 1.1** Schematische Darstellung von Clathrintriskelien und -käfigen. A: Abgebildet ist ein Clathrintriskelion bestehend aus drei schweren und drei leichten Ketten. Die schweren Ketten gliedern sich jeweils in eine carboxyterminale Proximale Domäne, eine Distale Domäne und eine Terminale Domäne. Sie trimerisieren in der Nähe des Carboxyterminus zur sternförmigen Struktur des Triskelions. Mit jeweils einer Proximalen Domäne ist eine leichte Kette assoziiert. B: Grundform des hexagonalen Fasses, der einfachsten Käfigstruktur, zu der Clathrintriskelien polymerisieren können. Sie besteht aus acht Hexagonen und zwölf Pentagonen. C: Beispielhaft ist die Lage von vier Triskelien in die Käfigstruktur eingezeichnet worden. Jede Seite der Form wird von zwei Proximalen und zwei Distalen Domänen gebildet, die antiparallel zueinander angeordnet sind. Jede Ecke wird vom Zentrum eines Triskelions gebildet. Darunter kommen drei Terminale Domänen von anderen Triskelien zusammen.

In leicht saurer Umgebung und in Anwesenheit von zweiwertigen Kationen wie  $\text{Ca}^{2+}$  lagern sich Clathrintriskelien spontan zu polyedrischen Käfigen zusammen (Crowther *et al.*, 1976). Die Kanten dieser Polyeder werden dabei von jeweils zwei antiparallel zueinander liegenden Proximalen und Distalen Domänen der Triskelien gebildet, während je drei Terminale Domänen unterhalb der Ecken ins Innere der Käfige weisen (Smith *et al.*, 1998). Um eine sphärische Gestalt annehmen zu können, müssen in die grundsätzlich vorwiegend hexagonalen Clathringitter zwölf Pentagone inseriert sein. Dabei entstehen häufig ikosaedrische Strukturen oder, als kleinste mögliche, solche, die als hexagonales Faß bezeichnet werden (Abbildung 1.1 B und C).

Diese Käfigstrukturen ähneln recht stark denen, die auch clathrinbedeckte Vesikel umgeben, die aus Gewebe isoliert werden können und in elektronenmikroskopischen Aufnahmen sichtbar sind. Allerdings bilden sich die Gitterstrukturen unter physiologischen Bedingungen nicht spontan aus. Darüber hinaus ist Clathrin im allgemeinen auch nicht in der Lage, direkt selbst mit Membranen oder den zu transportie-

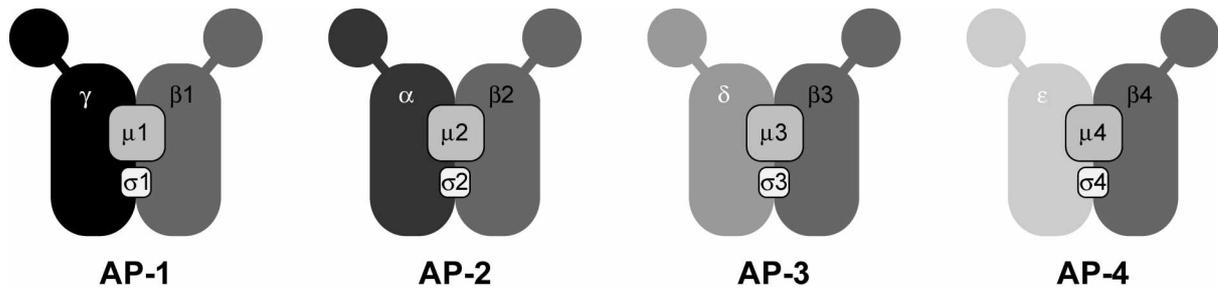
renden Frachtmolekülen zu interagieren. In der Zelle gibt es daher ein komplexes Netzwerk aus sogenannten Adaptoren und akzessorischen Proteinen, die diese Wechselwirkungen vermitteln und die Bildung von clathrinbedeckten Vesikeln regulieren. Einige davon, die im Rahmen dieser Arbeit eine Rolle spielen, sollen im folgenden vorgestellt werden.

Unter den Proteinen, die mit der Vesikelbildung in Verbindung gebracht werden, sind viele, die bislang nur wenig charakterisiert wurden, und über deren Rolle bei dem Prozeß erst relativ wenig bekannt ist.

Ein großer Teil der akzessorischen Proteine und Adaptoren interagiert mit der Terminalen Domäne des Clathrins. In Kokristallisationsexperimenten konnte gezeigt werden, daß lineare Peptide aus Aminosäuren einer Sequenz mit dem Konsensus L(L/I)(D/E/N)(L/F)(D/E) (Dell'Angelica *et al.*, 1998) in einer Furche zwischen den Rotorblättern eins und zwei des  $\beta$ -Propellers der Terminalen Domäne binden (ter Haar *et al.*, 2000). Diese Sequenz wurde daher als Clathrinboxmotiv bezeichnet. Einige solcher Motive, für die in Mutationsstudien auch tatsächlich eine Bedeutung bei der Bindung an Clathrin nachgewiesen wurde, erscheinen allerdings recht degeneriert. So ist teilweise an Stelle des zweiten sauren Restes ein weiterer aliphatischer oder aromatischer hydrophober Rest vorhanden. Da in clathrinbindenden Proteinen häufig mehrere solcher Motive vorkommen und diese kooperativ zu wirken scheinen, wurde gefolgert, es könnte sich um mehrere Klassen von Bindungsmotiven (Box 1- und Box 2-Motive) mit unterschiedlichen Bindungsstellen auf dem  $\beta$ -Propeller handeln (Drake *et al.*, 2000a).

### 1.3 Adaptoren

Die neben Clathrin in den Vesikelhüllen am häufigsten vorkommenden Proteine sind die Adaptorproteinkomplexe oder Adaptoren AP-1 und AP-2. Es handelt sich dabei um Heterotetramere von Untereinheiten, die als Adaptine bezeichnet werden. Sie haben die Zusammensetzungen  $\gamma$ - $\beta$ 1- $\mu$ 1- $\sigma$ 1- bzw.  $\alpha$ - $\beta$ 2- $\mu$ 2- $\sigma$ 2-Adaptin. Die großen Untereinheiten  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  sind  $\sim$ 100 kDa schwer und bestehen alle aus einer Rumpfdomäne, die mit den anderen Adaptinen im Komplex interagiert, sowie einer Ohrdomäne, die über eine flexible Scharnierregion mit dem Rumpf verbunden ist. Darüber hinaus enthält jeder Komplex eine ca. 50 kDa große mittlere  $\mu$ - sowie eine ca. 20 kDa große kleine  $\sigma$ -Untereinheit (Abbildung 1.2; Collins *et al.*, 2002).



**Abbildung 1.2** Schematische Übersicht über den molekularen Aufbau der Adaptorproteine AP-1 bis AP-4. Sie bestehen jeweils aus zwei großen Untereinheiten  $\alpha$ ,  $\beta$ 1-4,  $\gamma$ ,  $\delta$  oder  $\epsilon$ , einer mittleren Untereinheit  $\mu$ 1-4 und einer kleinen Untereinheit  $\sigma$ 1-4. Die Rumpfbereiche der großen Untereinheiten sind über flexible Verbindungsbereiche mit den Ohrdomänen verbunden.

Die Ohrdomänen der Adaptoren stellen neben der Terminalen Domäne des Clathrins zentrale Interaktions- und damit wahrscheinlich auch Regulationsplattformen bei der Bildung clathrinbedeckter Vesikel dar, da sie zahlreiche akzessorische und andere strukturelle Proteine binden. Tatsächlich gibt es kaum ein Protein, das mit der Bildung clathrinbedeckter Vesikel in Verbindung gebracht wird, das nicht mit einer dieser vier Domänen interagiert (eine Übersicht ist in Brodsky *et al.*, 2001 enthalten).

Auch bei der Bindung an die Ohrdomänen sind kurze lineare Peptidmotive für die Interaktionen verantwortlich. So wurde auf der  $\alpha$ -Ohrdomäne eine Bindungstasche identifiziert, an die DP(FW)- und FxDxF-Motive binden (wobei x eine beliebige Aminosäure darstellt), sowie eine weitere, die nur mit DPW-Peptiden interagiert (Brett *et al.*, 2002). Diese Bindungsmotive kommen in den Proteinen, die an die  $\alpha$ -Ohrdomäne binden, oft zahlreich und in tandem angeordnet vor.

Es konnte ferner gezeigt werden, daß die Scharnierregionen der  $\beta$ -Adaptine selbst an Clathrin binden (Shih *et al.*, 1995). Sie interagieren über Clathrinbox 1-Motive mit der Terminalen Domäne. Umgekehrt bindet Clathrin an die Ohrdomäne von  $\beta$ 2-Adaptin (Owen *et al.*, 2000). Auch Bindungen der Terminalen Domänen an  $\alpha$ - und die Scharnierregion von  $\gamma$ -Adaptin wurden beschrieben (Doray und Kornfeld, 2001; Goodman und Keen, 1995). Durch diese Interaktionen sind sowohl AP-1 als auch AP-2 in der Lage, unter physiologischen Bedingungen, unter denen sich frei in Lösung befindliche Clathrintriskelia eigentlich nicht zu Käfigen zusammenlagern, deren Polymerisation zu polyedrischen Strukturen zu fördern (Keen *et al.*, 1979).

Auf der anderen Seite wurde beobachtet, daß  $\alpha$ -Adaptin an die seltenen Membranphospholipide Phosphatidylinositol-(4,5)-biphosphat (PtdIns-(4,5)-P<sub>2</sub>) und

Phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphat (PtdInsP<sub>3</sub>) bindet, denen eine Rolle bei der Regulation der Bildung von clathrinbedeckten Vesikeln zugesprochen wird (Gaidarov *et al.*, 1996). Auch in der ca. 50 kDa großen  $\mu$ 2-Untereinheit wurde durch Kokristallisation eine Bindungsstelle für die polyphosphorylierte Lipidkopfgruppe Inositolhexakisphosphat gefunden (Collins *et al.*, 2002). Außerdem gibt es Hinweise, daß auch der AP-1-Komplex mit PtdIns-(4,5)-P<sub>2</sub> interagiert (Crottet *et al.*, 2002).

Schließlich können die Adaptorproteinkomplexe auch mit einer Anzahl von Frachtmolekülen direkt interagieren. So erkennen die  $\mu$ -Untereinheiten tyrosinbasierte Internalisationsmotive, die in verschiedenen Rezeptoren vorkommen und das Konsensusmotiv YxxØ besitzen (wobei x für eine beliebige Aminosäure steht und Ø eine Aminosäure mit großem hydrophobem Rest bezeichnet; Bonifacino und Dell'Angelica, 1999; Ohno *et al.*, 1995). Ferner binden die  $\beta$ -Untereinheiten Dileucinmotive in zytoplasmatischen Domänen von Rezeptoren (Rapoport *et al.*, 1998). Auch interagieren  $\alpha$ - und  $\mu$ 2-Adaptin mit Synaptotagmin, einem Transmembranprotein in synaptischen Vesikeln, das zahlreiche Isoformen in allen Zelltypen hat (Haucke *et al.*, 2000).

Zusammengenommen verfügen die Adaptorproteinkomplexe damit über die Möglichkeit, die Zusammenlagerung von Clathrin zu fördern und ein Bindeglied zur Membran und zu Frachtmolekülen herzustellen. Dabei sind je nach dem, wo Vesikel gebildet werden, verschiedene Adaptoren am Aufbau der Clathrinhülle beteiligt. Während AP-2 bei allen Vesikelbildungsprozessen an der Plasmamembran wie etwa der rezeptorvermittelten Endozytose oder der Wiedergewinnung der Membranbestandteile Synaptischer Vesikel beteiligt ist, vermittelt AP-1 den Aufbau von Clathrinhüllen an den meisten intrazellulären Membranen (Ahle *et al.*, 1988). Am besten charakterisiert ist dabei der von Mannose-6-Phosphatrezeptoren abhängige Transport lysosomaler Hydrolasen vom TGN zu späten Endosomen. Auch am retrograden Transport der Rezeptoren zurück zum TGN könnte AP-1 beteiligt sein (Meyer *et al.*, 2000).

Außer diesen beiden Adaptoren sind mit AP-3, das aus den Adaptinen  $\delta$ ,  $\beta$ 3,  $\mu$ 3 und  $\sigma$ 3 besteht, sowie AP-4 mit der Zusammensetzung  $\epsilon$ ,  $\beta$ 4,  $\mu$ 4 und  $\sigma$ 4 noch zwei weitere homologe Adaptorproteinkomplexe beschrieben worden (Abbildung 1.2). Für AP-3 ist zwar bekannt, daß es direkt mit Clathrin interagiert, Clathrinhüllen an synthetische Liposomen binden kann und an der Bildung von Membranvesikeln an TGN und Endosomen beteiligt ist. Ob diese jedoch Clathrin enthalten, ist bislang unklar

(Dell'Angelica *et al.*, 1998; Drake *et al.*, 2000b; Shi *et al.*, 1998; Simpson *et al.*, 1996). Für AP-4 scheint dagegen festzustehen, daß es in die Bildung von nicht clathrinhaltigen Vesikeln am TGN involviert ist (Hirst *et al.*, 1999).

Zumindest AP-1 und AP-2 scheinen aber eine zentrale Rolle bei der Entstehung von Clathrinhüllen zu spielen. Neuere Ergebnisse zeigen allerdings auch, daß es neben den heterotetrameren Adaptorproteinkomplexen weitere Proteine gibt, die an der Bildung von clathrinbedeckten Vesikeln beteiligt sind und die Bindeglieder zwischen Clathrin, Frachtmolekülen und der Membran darstellen könnten.

#### 1.4 Proteine mit ENTH-Domänen und verwandten Strukturen

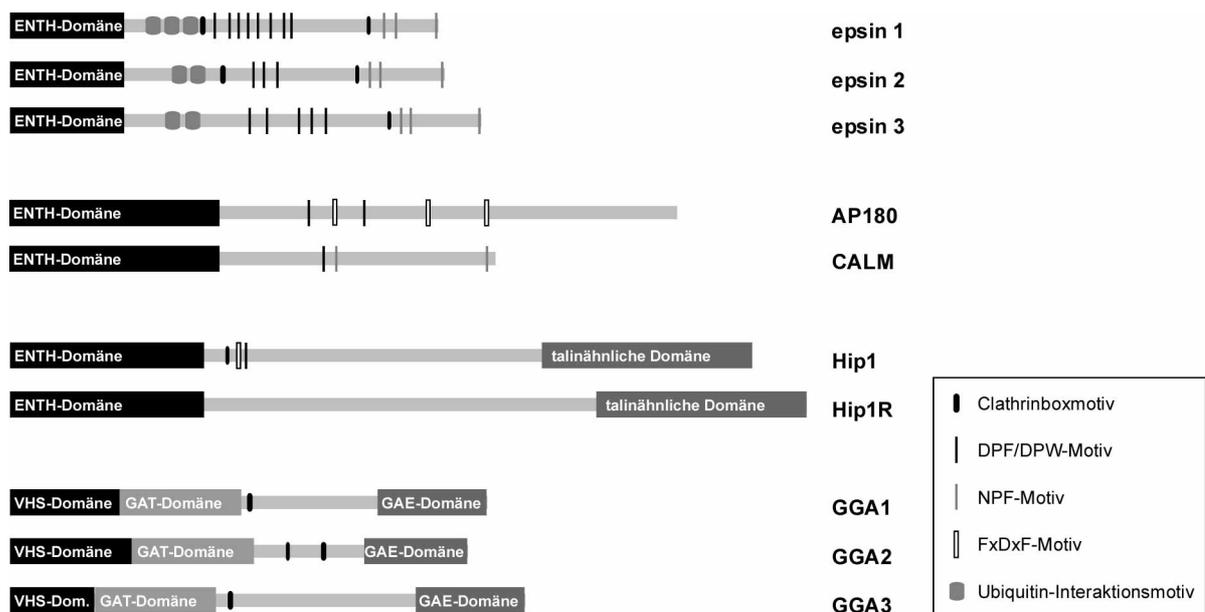
Zu den Proteinen, die adaptorähnliche Funktionen haben könnten, zählen auch einige Vertreter der Familie der ENTH- (Epsin-NH<sub>2</sub>-terminalen Homologie-) Domänenproteine. Die ENTH-Domäne wurde zunächst als der von Hefen bis hin zu Säugetieren am höchsten konservierte Bereich innerhalb der Epsinproteine identifiziert (Kay *et al.*, 1999). Durch Homologievergleiche konnte gezeigt werden, daß auch die Säugetierproteine AP180 und CALM (*clathrin assembly lymphoid myeloid leukemia protein*), sowie Hip1 (*Huntingtin-interacting protein*) und Hip1R (*Hip1-related*) ENTH-Domänen enthalten (Ford *et al.*, 2001; Mishra *et al.*, 2001). Alle diese Proteine binden Clathrin und wurden mit der Bildung clathrinbedeckter Vesikel in Verbindung gebracht. Sie haben in der Regel hochkonservierte Orthologe in anderen Organismen wie Invertebraten und Hefen (eine aktuelle Übersicht gibt De Camilli *et al.*, 2002).

Von verschiedenen ENTH-Domänen wurden bereits die dreidimensionalen Strukturen durch Röntgenkristallographie bestimmt. Es handelt sich um Solenoide von  $\alpha$ -Helices, die durch unterschiedlich lange Schleifen miteinander verbunden sind. Dabei sind die ENTH-Domänen von AP180, CALM, Hip1 und Hip1R mit rund 260 Aminosäuren und zehn  $\alpha$ -Helices (Ford *et al.*, 2001; Mao *et al.*, 2001) deutlich größer als die der Epsine, die nur ca. 160 Aminosäuren lang sind und acht  $\alpha$ -Helixabschnitte umfassen (Ford *et al.*, 2002; Hyman *et al.*, 2000). Insgesamt haben aber alle ENTH-Domänen trotz teilweise recht geringer Homologie auf Primärsequenzebene sehr ähnliche Strukturen, die sich vor allem über die sieben ersten Helices fast zur Deckung bringen lassen.

### 1.4.1 Epsin

Das namensgebende Mitglied der ENTH-Domänenproteinfamilie wurde zunächst als Bindungspartner der EH-Domäne des ebenfalls mit der Endozytose in Verbindung gebrachten Proteins Eps15 identifiziert und Epsin genannt (*Eps15 interacting protein* Chen *et al.*, 1998). Mit Ausnahme der ENTH-Domäne war über die Struktur von Epsin bislang wenig bekannt. Allerdings finden sich im Bereich außerhalb der ENTH-Domäne zwei Clathrinbindungsmotive (je ein Box 1 und ein Box 2-Motiv) und acht Kopien des AP-2 bindenden DPW-Peptids, sowie drei NPF-Motive, die die Bindung an Eps15 und andere EH-Domänen Proteine vermitteln (Chen *et al.*, 1998; Drake *et al.*, 2000a).

Direkt hinter der ENTH-Domäne sind drei Ubiquitin-Interaktionsmotive (UIM) angeordnet (Abbildung 1.3). Über diese kann Epsin einerseits mit monoubiquitinierten Transmembranrezeptoren interagieren, andererseits aber auch selbst monoubiquitiniert werden (Oldham *et al.*, 2002; Polo *et al.*, 2002). Darüber hinaus konnte zumindest in Hefe gezeigt werden, daß das Vorhandensein der UIM in Epsin für die Internalisation eines monoubiquitinierten Transmembranrezeptors von Bedeutung ist (Shih *et al.*, 2002). Diese Resultate deuten darauf hin, daß Epsin nicht nur in der Lage ist, mit Clathrin und anderen Hüllkomponenten zu interagieren, sondern auch selbst Frachtmoleküle zu erkennen.



**Abbildung 1.3** Übersicht über die Domänenstrukturen von Proteinen mit ENTH-Domäne sowie den GGA-Proteinen. Die identifizierten Domänen und Bindungsmotive für Clathrin, AP-2 und Eps15 sind durch Symbole markiert.

Außerdem ist bekannt, daß Epsin auch mit Membranlipiden interagiert. Es besitzt eine basische Bindungstasche, die selektiv an PtdIns-(4,5)-P<sub>2</sub> sowie mit geringerer Affinität auch in PtdInsP<sub>3</sub> bindet (Itoh *et al.*, 2001). Dabei faltet sich ein zunächst als unstrukturiert identifizierter Bereich am Aminoterminus der ENTH-Domäne zu einer amphipathischen  $\alpha$ -Helix auf, deren hydrophile Seite Teil der Bindungstasche wird. Die Assoziation der ENTH-Domäne mit PtdIns-(4,5)-P<sub>2</sub>-haltigen Liposomen verändert deren Oberflächenkrümmung derart, daß sich proteinbedeckte tubuläre Membranen ausbilden. Es wurde spekuliert, daß bei diesem Prozeß die hydrophobe Seite der amphipathischen Helix in die Membranoberfläche inseriert wird und so die Änderung der Krümmung bewirkt (Ford *et al.*, 2002).

Im Laufe der Zeit wurden weitere Epsingene entdeckt, so daß das hier beschriebene Protein nunmehr als Epsin 1 bezeichnet wird. In Säugern wurden zwei weitere Epsine identifiziert, die zueinander eine hohe Homologie aufweisen. Alle besitzen grundsätzlich die gleichen hier beschriebenen Elemente, wenn auch, was die Bindungsmotive angeht, zum Teil in etwas unterschiedlicher Anzahl (Abbildung 1.3). Während Epsin 1 überwiegend in neuronalem Gewebe vorkommt, ist Epsin 2 deutlich ubiquitärer verteilt (Rosenthal *et al.*, 1999). Epsin 3 dagegen ist keratinozytenspezifisch und scheint eine Rolle bei der Interaktion der Zellen mit der extrazellulären Matrix zu spielen (Spradling *et al.*, 2001).

#### 1.4.2 AP180 und CALM

Das am längsten bekannte und in clathrinbedeckten Vesikeln aus Hirn am häufigsten vorkommende Protein mit einer ENTH-Domäne ist das AP180 (Ahle und Ungewickell, 1986). Es enthält ebenso wie die Epsine Bindungsmotive für AP-2 (hier zwei DPF-Peptide und drei FxDxF-Motive) und kann mit seinem carboxyterminalen Bereich mit der Terminalen Domäne von Clathrin interagieren, auch wenn hierfür die Bindungsmotive noch nicht eindeutig identifiziert sind (Morgan *et al.*, 2000). Bereits frühzeitig wurde beobachtet, daß es die Zusammenlagerung von freiem Clathrin zu besonders homogenen und kompakten Käfigen fördern kann (Ahle und Ungewickell, 1986). Es gibt Hinweise, daß für diese Funktion DLL- und DLF-Peptide, die in zwölf Kopien im Bereich außerhalb der ENTH-Domäne vorkommen, wichtig sind (Morgan *et al.*, 2000). Ubiquitin-Interaktionsmotive besitzt AP180 im Gegensatz zu den Epsinen allerdings nicht (Abbildung 1.3).

Weiterhin ergab die Charakterisierung von AP180, daß es mit Ausnahme der ENTH-Domäne äußerst reich an polaren und geladenen Aminosäuren sowie an Prolin ist und daß es einen extrem sauren mittleren Bereich sowie einen recht basischen carboxyterminalen Teil besitzt. Insbesondere der saure Bereich führt zu einer im Vergleich zu durchschnittlichen Proteinen deutlich reduzierten Bindung von SDS und damit zu einer stark reduzierten Mobilität in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese. Daher wurde AP180 zunächst als Protein mit einer apparenten Molmasse von 180 kDa identifiziert, obwohl es tatsächlich nur eine Molekülmasse von 91 kDa aufweist (Morris *et al.*, 1993).

Während AP180 nur in neuronalem Gewebe vorkommt, wird das eng verwandte Protein CALM ubiquitär exprimiert. Die größte Homologie besitzen auch AP180 und CALM innerhalb der ENTH-Domäne. Insgesamt haben beide Proteine einen ähnlichen modularen Aufbau und binden sowohl AP-2 als auch Clathrin (Tebar *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1995). Allerdings besitzt CALM zusätzlich zwei NPF-Motive, über die es mit EH-Domänen Proteinen wie Eps15 oder Intersectin interagieren könnte (Abbildung 1.3).

Während die dreidimensionale Struktur von AP180 selbst noch nicht aufgeklärt worden ist, konnten mit den ENTH-Domänen von CALM sowie dem AP180-Orthologen in *Drosophila melanogaster*, LAP, Röntgenkristallstrukturanalysen durchgeführt werden (Ford *et al.*, 2001; Mao *et al.*, 2001). Beide Strukturen sind sich so ähnlich, daß gefolgert werden kann, daß sich auch AP180 in Säugetieren entsprechend faltet. In die Studie mit CALM wurden auch Kokristallisationsexperimente mit kurzkettigen Phosphoinositiden und Phospholipidkopfgruppen eingeschlossen. Tatsächlich konnte auch auf der Oberfläche der ENTH-Domäne von CALM eine PtdIns-(4,5)-P<sub>2</sub>-Bindungsstelle identifiziert werden. Allerdings befindet sie sich an einer völlig anderen Stelle als in Epsin 1. Die an der Bindung beteiligten Aminosäurereste sind lediglich in AP180 konserviert. Auch in Liposomenbindungsexperimenten konnte eine Interaktion von AP180 und CALM über diese Bindungsstelle mit PtdIns-(4,5)-P<sub>2</sub> bestätigt werden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß AP180 Clathrin an eine synthetische Phospholipidschicht rekrutieren kann, wenn diese PtdIns-(4,5)-P<sub>2</sub> enthält. Ist in dem System auch AP-2 zugegen, kann man sogar sich hervorwölbende Strukturen mit Clathringittern erkennen, die denen sich bildender Clathrinvesikel an der Plasmamembran ähneln (Ford *et al.*, 2001).

### 1.4.3 Hip1 und Hip1R

Die dritte Gruppe von Proteinen mit einer ENTH-Domäne sind Hip1 und Hip1R. Beide sind benannt nach ihrer Fähigkeit, mit Huntingtin, das bei der Chorea Huntington eine wichtige Rolle spielt, zu interagieren. Darüber hinaus bindet Hip1R über eine zentrale *coiled coil*-Domäne an die leichte Kette von Clathrin (Engqvist-Goldstein *et al.*, 2001) während Hip1 in der Lage ist, die Terminale Domäne von Clathrin über ein Box 1-Motiv und AP-2 über ein DPF- sowie drei FxDxF-ähnliche Motive zu binden (Abbildung 1.3; Mishra *et al.*, 2001).

Das besondere an beiden Proteinen aber ist die carboxyterminale Talin-Homologiedomäne, über die sie mit Actin interagieren können. Auf diese Weise stellen Hip1 und Hip1R ein Bindeglied zwischen Clathrinhüllen und dem Actinzytoskelett dar (Engqvist-Goldstein *et al.*, 1999; Engqvist-Goldstein *et al.*, 2001).

### 1.4.4 GGAs

Die GGA (von Golgi-lokalisierte,  $\gamma$ -Ohr-enthaltende, Arf bindende) Proteine besitzen keine eigentliche ENTH-Domäne, ihre aminoternale VHS- (von Vps27p, Hrs und Stam) Domäne ist dieser allerdings strukturell äußerst ähnlich. Obwohl eine Homologie auf Primärsequenzebene zwischen beiden Domänen nicht detektierbar ist, beträgt die Standardabweichung der Atome in der Kristallstruktur nur rund 1.8 Å (De Camilli *et al.*, 2002).

Beim Menschen wurden drei Gene für GGAs identifiziert. Die Produkte aller drei haben einen sehr ähnlichen modularen Aufbau. Die aminoternale VHS-Domäne ist in der Lage, die zytoplasmatischen Domänen von Mannose-6-Phosphat-rezeptoren sowie Sortilin im TGN zu binden, die für den Export von Proteinen aus dem Golgiapparat wichtig sind (Nielsen *et al.*, 2001; Puertollano *et al.*, 2001a; Zhu *et al.*, 2001). Die sich daran anschließende GAT- (GGA *and* TOM) Domäne kann dagegen an Arf1 (ADP-Ribosylierungs Faktor 1) binden, eine kleine GTPase, über die die GGAs an das TGN rekrutiert werden. Beide Domänen sind wiederum über einen flexiblen Linker, der bei allen drei GGAs ein Box 1 Clathrinbindungsmotiv enthält, mit der GAE- ( *$\gamma$ -appendage ear*) Domäne verbunden (Abbildung 1.3). Diese ist homolog zur Ohrdomäne von  $\gamma$ -Adaptin und ebenfalls in der Lage Clathrin zu binden (Puertollano *et al.*, 2001b).

Auch die GGAs besitzen demnach die Fähigkeit, Clathrin mit Frachtmolekülen und über Arf1 auch mit der Membran zu verbinden. Tatsächlich kann in Abhängigkeit

von GGA1 und in Gegenwart von GTP- $\gamma$ -S, einem nicht-hydrolysierbaren GTP-Analogon, das GTPasen wie Arf1 in ihrer aktiven Konformation stabilisiert, Clathrin aus Zytosol an artifizielle Liposomen, die PtdIns-(4,5)-P<sub>2</sub> enthalten, rekrutiert werden (Puertollano *et al.*, 2001b).

## 1.5 Molekularer Ablauf der Bildung von clathrinbedeckten Vesikeln

Über den genauen Ablauf der Bildung clathrinbedeckter Vesikel ist bislang relativ wenig bekannt. Die Zahl der Proteine, die an dem Prozeß beteiligt zu sein scheinen, ist groß, und zwischen den unterschiedlichen Prozessen, bei denen clathrinbedeckte Vesikel eine Rolle spielen, ist experimentell mitunter schwierig zu diskriminieren. Dennoch fügen sich zahlreiche Einzelbeobachtungen inzwischen zu einem Bild zusammen, das eine Vorstellung von den Prozessen vermittelt, die zur Vesikelbildung führen.

### 1.5.1 Vesikelbildung an der Plasmamembran

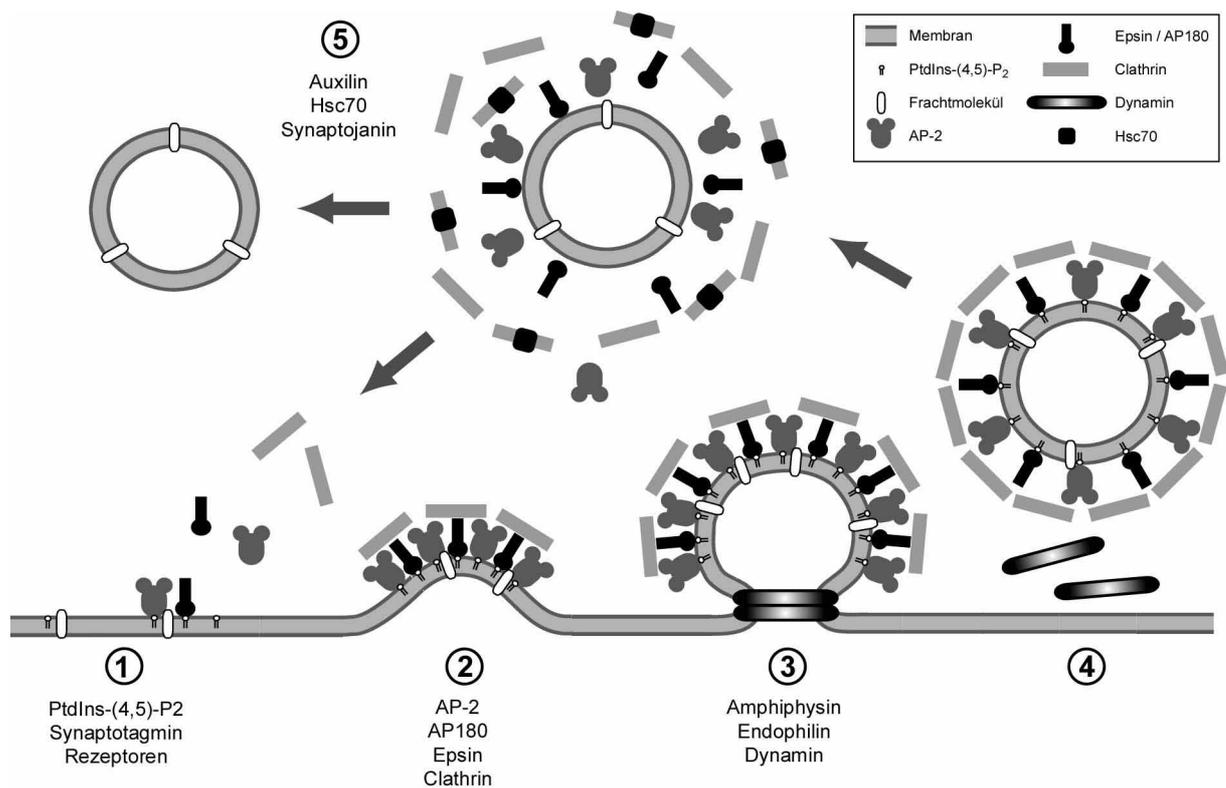
Zunächst einmal stellt sich die Frage, wie es bei der Vesikelbildung zur Krümmung der Membran kommt. Es ist vielfach spekuliert worden, daß Clathrin, das von sich aus die Tendenz hat, sich zu sphärischen Käfigstrukturen zusammenzulagern, durch indirekte Bindung an die Membran deren Einstülpung bewirken könnte. Es ist allerdings in der Zwischenzeit für eine Reihe von Proteinen und Proteindomänen gezeigt worden, daß diese in der Lage sind, allein durch Assoziation mit Membranen deren Krümmung zu verändern. Mit der ENTH-Domäne von Epsin ist darunter auch eine, die eine Rolle in frühen Schritten der Bildung clathrinbedeckter Vesikel zu spielen scheint (Ford *et al.*, 2002). Wie bereits erwähnt konnte *in vitro* sogar beobachtet werden, daß bei Inkubation von AP180, AP-2, Clathrin und einer PtdIns-(4,5)-P<sub>2</sub>-haltigen Membran eingestülpte Clathrinstrukturen auf die Lipidoberfläche rekrutiert werden, die sogenannten *coated pits* ähneln (Ford *et al.*, 2001).

Tatsächlich scheint das Vorhandensein bestimmter Phosphoinositide eine wichtige Rolle bei der Bildung und womöglich auch beim Zerfall clathrinbedeckter Vesikel zu spielen. Es konnte *in vitro* gezeigt werden, daß die Bildung von PtdIns-(4,5)-P<sub>2</sub> in aufgereinigten Lysosomenmembranen zur Rekrutierung von AP-2 haltigen Clathrinhüllen führt (Arneson *et al.*, 1999).

Außerdem existieren weitere Faktoren in der Plasmamembran, die initiale Bindungsstellen für die Rekrutierung von Hüllkomponenten darstellen könnten. Dazu zählen einerseits Proteine wie Synaptotagmin, ein Transmembranprotein, das Be-

standteil von synaptischen Vesikeln ist, aber zahlreiche Isoformen auch in nichtneuronalem Gewebe hat. Es assoziiert mit PtdIns-(4,5)-P<sub>2</sub> und bindet AP-2 (Haucke *et al.*, 2000). Andererseits assoziieren viele Hüllkomponenten aber auch direkt mit den zytoplasmatischen Bereichen von Frachtmolekülen wie Transmembranrezeptoren. So bindet AP-2 an einige tyrosinbasierte und dileucinhaltige Internalisationsmotive (Chen *et al.*, 1990; Ohno *et al.*, 1995; Rapoport *et al.*, 1998), während Epsin 1 mit monoubiquitinierten Rezeptoren interagiert (Polo *et al.*, 2002).

Es ist daher denkbar, daß die Bildung einer Clathrinhülle initiiert wird, wenn Frachtmoleküle, andere Membranproteine und Signale in Form geeigneter Phosphoinositide an der Membran zur Rekrutierung von Adaptoren und anderen Proteinen wie Epsinen oder AP180 führen (Abbildung 1.4, Schritt 1). Diese wiederum könnten die Einstülpung der Membran bewirken, ihrerseits Clathrin binden und dessen Polymerisation einleiten (Abbildung 1.4, Schritt 2).



**Abbildung 1.4** Schematische Übersicht über den molekularen Ablauf der Bildung clathrinbedeckter Vesikel. 1: Membranständige Faktoren wie PtdIns-(4,5)-P<sub>2</sub>, Frachtmoleküle und Synaptotagmin führen zur Rekrutierung von ENTH-Domänenproteinen und AP-2. 2: Möglicherweise der Einfluß der ENTH-Domäne von Epsin 1 führt zur Einstülpung der Membran, Clathrin wird an Adaptorproteine gebunden und es kommt zur kooperativen Ausbildung einer Clathrinhülle. 3: Unter Einfluß von weiteren akzessorischen Proteinen wird die Membrankrümmung weiter verändert, Dynamin bildet ringförmige Strukturen um den Hals der Einstülpung. 4: Unter Konformationsänderung von Dynamin infolge von GTP-Hydrolyse wird das Clathrinvesikel von der übrigen Membran abgeschnürt. 5: Hsc70 wird durch Auxilin an die Clathrinhülle rekrutiert und aktiviert. Es bindet an die Beine der Clathrintriskelia und führt dadurch zur Dissoziation der Hülle. Proteine wie Synaptojanin könnten durch Veränderung der Lipidzusammensetzung der Membran die Freisetzung akzessorischer Proteine wie AP-2, Epsin 1 oder AP-180 bewirken.

Da längst nicht alle Frachtmoleküle direkt an Adaptoren binden, gibt es weitere akzessorische Faktoren, die sicherstellen könnten, daß die entsprechenden Proteine in die sich bildenden *coated pits* mit eingeschlossen werden. So stellen z.B. die Arrestine eine Verbindung zu G-Protein-gekoppelten Rezeptoren dar (Goodman *et al.*, 1997).

Im weiteren Verlauf kommt es zu einer zunehmend tieferen Einstülpung der Membran und schließlich zu einer Abschnürung des Vesikels. An diesem Prozeß ist die GTPase Dynamin beteiligt, die möglicherweise durch das Protein Amphiphysin rekrutiert wird (Shupliakov *et al.*, 1997). Auch Endophilin 1, das seinerseits über eine SH3-Domäne an Dynamin bindet, ist am Abschnürungsprozeß beteiligt. Alle drei Proteine binden an Phosphoinositide und besitzen ähnlich wie Epsin 1 die Fähigkeit, Membrankrümmung zu beeinflussen (Farsad *et al.*, 2001; Sweitzer und Hinshaw, 1998; Takei *et al.*, 1999). Dies erscheint insofern sinnvoll, als die Membran im Halsbereich des abzuschnürenden Vesikels besonders stark deformiert werden muß. Im Gegensatz zu anderen GTPasen, die meist eher molekulare Schalter darstellen, gibt es Hinweise, daß die GTP-Hydrolyse durch Dynamin zur mechanischen Abtrennung des Vesikels von der Donormembran führen könnte. Dynamin bildet eine Spirale um den Hals des abzuschnürenden Vesikels (Abbildung 1.4, Schritte 3 und 4). *In vitro* konnte gezeigt werden, daß eine Konformationsänderung bei der GTP-Hydrolyse sowohl zur Streckung als auch zur Konstriktion der Spirale führt (Stowell *et al.*, 1999; Sweitzer und Hinshaw, 1998).

Nach der Abschnürung der Vesikel, wird deren Hülle rasch wieder entfernt, um eine Fusion mit der Zielmembran zu ermöglichen. An diesem Prozeß ist das Chaperon Hsc70 beteiligt, das durch das neuronale clathrinbindende J-Domänenprotein Auxilin bzw. dessen ubiquitäres Homolog Auxilin 2/GAK an die Käfige herangeführt und zur ATP-Hydrolyse stimuliert wird. In der Folge binden Hsc70-Moleküle an die Beine der Clathrintriskelia, unterbinden dadurch die Wechselwirkungen im Clathringerüst und bewirken so dessen Zerfall (Abbildung 1.4, Schritt 5; Umeda *et al.*, 2000; Ungewickell *et al.*, 1995). Die Affinität der Adaptoren und übrigen akzessorischen Proteine zur Vesikelmembran könnte unter Mitwirkung von Synaptojanin verringert werden, dessen PtdIns-5-Phosphatasedomäne in der Lage ist, Membranlipide zu dephosphorylieren (Cremona *et al.*, 1999).

Es wird deutlich, daß es sich bei dem Prozeß der Vesikelbildung nicht um eine monokausale Kette von Ereignissen, sondern um eine hochkooperative, konzertierte

Aktion zahlreicher beteiligter Proteine handelt. Dabei ist es unwahrscheinlich, daß bei jeder Vesikelbildung alle mit dem System in Verbindung gebrachten Proteine beteiligt sind. Vielmehr erscheint es sinnvoll, daß bei einem Abschnürungsprozeß abhängig von Ort, Fracht und Zweck eine spezielle Kombination von Adaptoren und akzessorischen Proteinen mitwirkt.

Dies und die Tatsache, daß es einige zentrale Domänen zu geben scheint, die prinzipiell mit zahlreichen Partnern interagieren können, machen es unabdingbar, daß die beschriebenen Interaktionen streng reguliert werden. Bereits seit längerem ist bekannt, daß zytosolische und membrangebundene Adaptoren sich in ihrem Phosphorylierungszustand unterscheiden (Bar-Zvi *et al.*, 1988). Für diese und andere clathrinassoziierte Proteine wie Auxilin und AP180 konnte gezeigt werden, daß sie durch Kinasen, die mit clathrinbedeckten Vesikeln assoziiert sind, phosphoryliert werden (Morris *et al.*, 1990). Dabei scheint Dephosphorylierung allgemein die Affinität der Hüllkomponenten zueinander zu erhöhen (Slepnev *et al.*, 1998; Wilde und Brodsky, 1996). Speziell für Epsin 1 konnte ähnlich wie auch für einige andere Proteine gezeigt werden, daß es in Abhängigkeit von Stimulation in Nervenendigungen dephosphoryliert wird und sich dadurch seine Affinität zu AP-2 erhöht (Chen *et al.*, 1999). Es scheint daher so, als ob Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungszyklen eine Kaskade von Assoziationen der an der Vesikelbildung beteiligten Proteine zueinander kontrollieren und die beteiligten Proteine Teile eines hochdynamischen und streng regulierten Netzwerkes sind.

### 1.5.2 Vesikelbildung am TGN

Die Frage, wie die initiale Einstülpung der Membran vonstatten geht, stellt sich am TGN weniger als an der Plasmamembran, da hier die Vesikel meist von den ohnehin schon gekrümmten Enden der tubulovesikulären Strukturen abgeschnürt werden. Darüber hinaus sind an der Vesikelbildung am TGN andere Adaptoren und akzessorische Faktoren beteiligt als an der Plasmamembran. Die Prinzipien, die zur Rekrutierung der Proteinhülle und zur Abschnürung der Vesikel führen, dürften allerdings ähnliche sein.

Ein konzeptionell wichtiger Unterschied besteht jedoch darin, daß die Bildung von Clathrinhüllen am TGN abhängig von der Aktivität der GTPase Arf1 ist. Dieses nur 21 kDa große Protein kann eine Myristoylierung am Aminoterminus als Membrananker nutzen und in seiner GTP-Form an Phosphatidylsäure in der Membran

binden (Manifava *et al.*, 2001). Die Aufrechterhaltung des GTP-Zustandes ist dabei abhängig von spezifischen Arf Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (Arf-GEF), die sich durch das Pilzmetabolit Brefeldin A (BFA) inhibieren lassen. Studien mit BFA konnten zeigen, daß AP-1 in Abhängigkeit von Arf1 an Golgimembranen rekrutiert wird (Traub *et al.*, 1993). *In vitro* konnte die Rekrutierung von AP-1 an synthetische Liposomen mit PtdIns-(4,5)-P<sub>2</sub>, tyrosinbasierten Sortierungssignalen und Arf1-GTP rekonstituiert werden (Crottet *et al.*, 2002).

Auch GGA1 kann über seine GAT-Domäne durch Arf1 an das TGN gebunden werden (Puertollano *et al.*, 2001b). Auf der anderen Seite ist es in der Lage an dileucinbasierte Golgiexportsignale von Sortilin und den Mannose-6-phosphatrezeptoren zu binden. Zumindest für letztere konnte gezeigt werden, daß die Interaktion mit GGA1 für ihren Transport zu späten Endosomen notwendig ist (Nielsen *et al.*, 2001; Puertollano *et al.*, 2001a; Zhu *et al.*, 2001).

Auch am TGN werden also in Abhängigkeit von Membranfaktoren Adaptoren und adaptorähnliche Proteine rekrutiert, die ihrerseits Clathrin binden und zur Polymerisation veranlassen könnten. Für AP-3 konnte sogar *in vitro* gezeigt werden, daß es in Abwesenheit anderer Faktoren Clathrin an artifizielle Liposomen rekrutieren kann (Drake *et al.*, 2000b). Im Falle von AP-1 sind dazu noch zusätzliche, bislang unidentifizierte zytosolische Faktoren notwendig (Zhu *et al.*, 1999).

Ob GGAs und AP-1 bei der Rekrutierung von Clathrinhüllen zusammenwirken oder unabhängig voneinander unterschiedliche Vesikel bilden, ist zwar heftig diskutiert worden, bislang aber unklar geblieben. Es wurde spekuliert, daß GGAs die Transmembranrezeptoren in clathrinbedeckte Vesikel rekrutieren und an AP-1 übergeben, selbst aber nicht in die Vesikelhülle mit eingebaut werden (Doray *et al.*, 2002). Auf der anderen Seite existieren allerdings auch Daten, die dafür sprechen, daß es sich um ähnliche aber dennoch alternative Transportwege handelt. So ist in Hefe AP-1 für GGA-vermittelten Transport nicht zwingend notwendig. Lediglich bei Mehrfachmutanten, denen AP-1 und GGAs fehlen, sind die entsprechenden Transporte gestört (Costaguta *et al.*, 2001; Hirst *et al.*, 2001).

Insgesamt ist die Zahl der Proteine, die mit der Bildung von Clathrinvesikeln am TGN in Verbindung gebracht werden, verglichen mit der für die Plasmamembran bislang noch klein. Daher ist anzunehmen, daß in Zukunft noch weitere Faktoren identifiziert werden, die hierbei eine Rolle spielen, und sich dadurch ein vollständigeres Bild über die Vesikelabschnürung am TGN ergibt.

## 1.6 Aufgabenstellung

Obwohl die ENTH-Domänenproteine Epsin 1 und AP180 wichtige Rollen bei der Bildung clathrinbedeckter Vesikel spielen, war bislang nur wenig zu ihrem Aufbau bekannt. Lediglich von der ENTH-Domäne gab es durch Kristallstrukturanalysen ein recht genaues Bild. Die bekannten Protein-Protein-Interaktionen allerdings werden alle durch den übrigen Teil der Proteine vermittelt. Auch war unbekannt, ob Epsin 1 und AP180 in Lösung möglicherweise oligomerisieren wie es beispielsweise bei Amphiphysin der Fall ist, das Dimere bildet.

Epsin 1 und AP180 sollten daher umfassend biophysikalisch und funktionell charakterisiert werden, um neue Informationen zu ihrem Aufbau zu erhalten. Auf diesem Wege sollten Gemeinsamkeiten und Unterschiede beider Proteine aufgezeigt und Erkenntnisse gewonnen werden, die zum Verständnis Ihrer Funktion beitragen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Verwendete Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien

Substanz	Hersteller
Agarose	BioRad (München)
Ampicillin	Sigma (Taufkirchen)
Bacto-Agar	BD Biosciences (Heidelberg)
Brefeldin A	Sigma (Taufkirchen)
Bromphenolblau	Sigma (Taufkirchen)
Cholesterin (Grade I, aus Schweineleber)	Sigma (Taufkirchen)
Complete Proteaseinhibitor	Roche (Mannheim)
Coomassie Brilliant Blue R250	Serva (Heidelberg)
Desoxynukleotidtriphosphate	Roche (Mannheim)
Desoxynukleotidtriphosphatmix (f. PCR)	AGS-Hybaid (Heidelberg)
Dithiothreitol (DTT)	Sigma (Taufkirchen)
EDTA	Sigma (Taufkirchen)
EGTA	Sigma (Taufkirchen)
Ethidiumbromid	Sigma (Taufkirchen)
Ficoll 400	Amersham Biosciences (Freiburg)
Fötales Kälberserum	PAA Laboratories (Linz, Österreich)
Glutathion	Sigma (Taufkirchen)
Hefeextrakt	BD Biosciences (Heidelberg)
Hepes	Sigma (Taufkirchen)
Imidazol	Merck (Darmstadt)
Isopropylthiogalactosid (IPTG)	Sigma (Taufkirchen)
Magermilchpulver	Uelzena (Uelzen)
Natriumazid	Merck (Darmstadt)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	BioRad (München)
Natriumpyruvat	Sigma (Taufkirchen)
Paraformaldehyd (PFA)	Fluka (Steinheim)
Penicillin / Streptomycin-Lösung	Life Technologies (Karlsruhe)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma (Taufkirchen)

Phosphatidylcholin (Typ III-B, aus Rinderhirn)	Sigma (Taufkirchen)
Phosphatidylethanolamin (Typ IV, aus Sojabohnen)	Sigma (Taufkirchen)
Phosphatidylinositol und Phosphatidylinositolphosphate	Echelon (Salt Lake City, UT, USA)
Pipes	Roth (Karlsruhe)
Ponceau S	Sigma (Taufkirchen)
Sucrose	Calbiochem (Darmstadt)
Taxol	Taxol
Tris (Trizma Base)	Sigma (Taufkirchen)
Triton X-100	Sigma (Taufkirchen)
Trypton	BD Biosciences (Heidelberg)
Uranylacetat	Merck (Darmstadt)
Xylencyanol	Sigma (Taufkirchen)

**Tabelle 2.1** Verwendete Chemikalien.

Säuren und organische Lösungsmittel wurden von Baker (Deventer, Niederlande) bezogen. Alle weiteren Laborchemikalien stammten von Sigma (Taufkirchen).

### 2.1.2 Proteine und Enzyme

Protein / Enzym	Bestellnummer	Hersteller
Alkalische Phosphatase aus Kalbsdarm	713023	Roche (Mannheim)
Alkoholdehydrogenase	A-8656	Sigma (Taufkirchen)
Apoferritin	A-3660	Sigma (Taufkirchen)
Carboanhydrase als biophysikal. Standard	C-7025	Sigma (Taufkirchen)
Carboanhydrase als MW-Standard	C-2273	Sigma (Taufkirchen)
DNA-Polymerase I Klenow-Fragment	1008412	Roche (Mannheim)
Katalase	C-9322	Sigma (Taufkirchen)
Lactatdehydrogenase	127230	Roche (Mannheim)
Lysozym	L-6876	Sigma (Taufkirchen)
Mungobohnennuklease	0250S	New England Biolabs (Frankfurt)
Ovalbumin als biophysikalischer Standard	A-5253	Sigma (Taufkirchen)
Ovalbumin als MW-Standard	A-7642	Sigma (Taufkirchen)

Phosphorylase b	P- 4649	Sigma (Taufkirchen)
Restriktionsendonukleasen	diverse	MBI Fermentas (St.Leon-R.)
Rinderserumalbumin (BSA) für Puffer	A-7306	Sigma (Taufkirchen)
Rinderserumalbumin (BSA), fettfrei	A-7030	Sigma (Taufkirchen)
Rinderserumalbumin als biophys. Standard	A-8531	Sigma (Taufkirchen)
Rinderserumalbumin als MW-Standard	A-7571	Sigma (Taufkirchen)
T4-DNA-Ligase	EL0335	MBI Fermentas (St.Leon-R.)
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	EP0403	MBI Fermentas (St.Leon-R.)
Thrombin	154163	ICN (Aurora, OH, USA)
Thyroglobulin	T-9145	Sigma (Taufkirchen)
$\beta$ -Galactosidase	G-8511	Sigma (Taufkirchen)

**Tabelle 2.2** Verwendete Enzyme und Proteine.

Phosphocellulose gereinigtes Tubulin aus Rinderhirn (aufgereinigt nach Paturle-Lafanechere *et al.*, 1991) wurde von Prof. Jürgen Wehland, Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (Braunschweig) zur Verfügung gestellt.

### 2.1.3 Kommerzielle Systeme

Zweck	System	Hersteller
Chemolumineszenzdetektion	<i>Renaissance Westernblot Chemoluminescence Reagent Plus</i>	NEN (Boston, MA, USA)
Gerichtete Mutagenese	<i>QuickChange Site Directed Mutagenesis Kit</i>	Stratagene (Amsterdam, Niederlande)
Plasmid-Minipräparation	<i>QIAprep Spin Miniprep Kit</i>	Qiagen (Hilden)
Präparation endotoxinfreier DNA	<i>EndoFree Plasmid Maxi Kit</i>	Qiagen (Hilden)
Agarosegeleextraktion	<i>QIAquick Gel Extraction Kit</i>	Qiagen (Hilden)
Montieren von Deckgläschen auf Objektträgern	<i>ProLong Antifade Kit</i>	Molecular Probes (Leiden, Niederlande)
Transfektion von DNA in eukaryotische Zellen	<i>SuperFect Transfection Reagent</i>	Qiagen (Hilden)

**Tabelle 2.3** Verwendete kommerzielle Systeme.

### 2.1.4 Zellen und Gewebe

<i>Escherichia coli</i> -Stamm	Anbieter
DH5 $\alpha$	Life Technologies (Karlsruhe)
BL21 (DE3)	Novagen (Madison, WI, USA)
XL1-Blue (Bestandteil von QuickChange)	Stratagene (Amsterdam, Niederlande)
M15	Qiagen (Hilden)

**Tabelle 2.4** Verwendete *Escherichia coli*-Stämme.

Säugetierzelllinie	Ursprung	Anbieter / Quelle
HeLa SS6	Mensch	s.u.
Caco 2	Mensch	s.u.
Madin-Darby Bovine Kidney (MDBK)	Rind	American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)

**Tabelle 2.5** Verwendete Säugetierzelllinien.

HeLa SS6-Zellen wurden von Klaus Weber (Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie, Göttingen) und Caco 2-Zellen von Jürgen Wehland (Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, Braunschweig) zur Verfügung gestellt, die sie ursprünglich von der American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) bezogen haben.

Die Zelllinien wurden von Frau Beate Großmann, Abteilung Zellbiologie, Medizinische Hochschule Hannover (MHH), in DMEM mit 10 % fötalem Kälberserum kultiviert.

Die Proben aus Mäusegeweben stammten von einer ca. sechs Wochen alten männlichen C3H-Maus, die von Dr. Robert Lindner, Abteilung Zellbiologie, MHH, zur Verfügung gestellt wurde.

Schweinehirne wurden vom Schlachthof Hannover bezogen. Daraus isolierte clathrinbedeckte Vesikel wurden von Frau Elke Mallon und Frau Beate Großmann, Abteilung Zellbiologie, MHH, nach (Lindner, 1994) präpariert.

### 2.1.5 Nukleinsäuren

cDNA	Quelle	Zitat
Epsin 1 in pBluescript	Hong Chen, Yale University (New Haven, CT, USA)	(Chen <i>et al.</i> , 1998)
KIAA0171 in pBluescript	Takahiro Nagase, Kazusa DNA Research Institute (Kisarazu, Japan)	(Nagase <i>et al.</i> , 1996)

**Tabelle 2.6** Verwendete cDNAs.

Vektor	Expression von	In	Anbieter
pET32a-c	trx/H <sub>6</sub> -Fusionsproteine	<i>E. coli</i>	Novagen (Madison, WI, USA)
pQE30-32	H <sub>6</sub> -Fusionsproteine	<i>E. coli</i>	Qiagen (Hilden)
pUC57	- (Klonierungsvektor)	-	MBI Fermentas (St.Leon-Rot)
pGEX-6P1-3	GST-Fusionsproteine	<i>E. coli</i>	Amersham Biosc. (Freiburg)
pEGFP-N1-3	GFP-Fusionsproteine	Säugerzellen	Clontech (Heidelberg)

**Tabelle 2.7** Verwendete Expressions- und Klonierungsvektoren.

Produkt	Vektor	Quelle	Zitat
GST-GGA2	pGEX-4T1	Stuart Kornfeld, Washington University (St.Louis, MO, USA)	(Zhu <i>et al.</i> , 2001)
GST-GGA2-GAE-Domäne	pGEX-6P1	Stuart Kornfeld, s.o.	(Zhu <i>et al.</i> , 2001)
GST-Clathrin TD	pGEX-2T	James Keen, Thomas Jefferson University (Philadelphia, PA, USA)	(Goodman <i>et al.</i> , 1997)
GST- $\alpha$ -Ohrdomäne	pGEX-2T	Richard Anderson, University of Texas (Dallas, TX, USA)	(Wang <i>et al.</i> , 1995)
H <sub>6</sub> - $\beta$ 2-Ohrdomäne	pRSETc	Thomas Kirchhausen, Harvard Medical School (Boston, MA, USA)	(Shih <i>et al.</i> , 1995)
H <sub>6</sub> - $\gamma$ -Ohrdomäne	pQE30	Ernst Ungewickell, Zellbiologie, MHH	(Umeda <i>et al.</i> , 2000)
H <sub>6</sub> -AP180	pQE31	Ernst Ungewickell, s.o.	(Norris <i>et al.</i> , 1995)
H <sub>6</sub> -AP180 (328-896)	pQE31	Ruth Knorr, Zellbiologie, MHH	(Scheele <i>et al.</i> , 2001)
H <sub>6</sub> -AP180 (328-745)	pQE31	Ruth Knorr, s.o.	(Kalthoff <i>et al.</i> , 2002a)
H <sub>6</sub> -AP180 (1-330)	PQE31	Ruth Knorr, s.o.	(Kalthoff <i>et al.</i> , 2002a)
H <sub>6</sub> -AP180 (745-896)	pQE31	Ruth Knorr, s.o.	(Kalthoff <i>et al.</i> , 2002a)
GST-AP180-(1-329)	pGEX	Kai Ulbricht	

**Tabelle 2.8** Verwendete Expressionsplasmide.

### 2.1.6 Oligodesoxynukleotide

Name	Sequenz	Restriktions-schnittstelle
Clint1for	CC <b>GGATCC</b> ATGTTGAACATGTGGAAGGTGCGCG	<i>Bam</i> HI
Clint162rev	GGC <b>GTCGAC</b> CCCCAACATACTTGTCTTTGTTC	<i>Sal</i> I
Clint163for	GGGG <b>GATCCT</b> CAGACAGTGTGGAGG	<i>Bam</i> HI
Clint334for	GAT <b>GGATCC</b> AGCCAGTCAACAGGAGG	<i>Bam</i> HI
Clint337rev	CCT <b>GTCGACT</b> GGCTGGTGCCATCAAAC	<i>Sal</i> I
Clint499rev	GAT <b>GTCGACT</b> TGGGGTTTGGGAAGGCTG	<i>Sal</i> I
Clint625rev	CC <b>GTCGACC</b> ATCCCAACATCACCTATCTGCACAGC	<i>Sal</i> I
Epsin1for	TGG <b>GATCC</b> ATGTCGACATCATCGCTGCG	<i>Bam</i> HI
Epsin157rev	GC <b>CTCGAG</b> AGTCTGTGCCAGTTTCTCCTTGG	<i>Xho</i> I

**Tabelle 2.9** Verwendete Oligodesoxynukleotide für Polymerasekettenreaktionen. Die angehängten Restriktionsschnittstellen sind fett markiert.

Name	Sequenz	Restriktions-schnittstelle
Motiv1for	GCAAGTCAT <u>CCGGT</u> GAC <u>GCT</u> GTTG <u>GCT</u> GCGTTTGATGGC	<i>Msp</i> I
Motiv1rev	GCCATCAAAC <u>G</u> CAG <u>G</u> CAACAG <u>G</u> CGTCAC <u>CCGG</u> ATGACTTGC	<i>Msp</i> I
Motiv2for	CAAATTCTTCAG <u>ACGCG</u> T <u>T</u> TG <u>GCT</u> GCTATGGGCTCGTCC	<i>Mlu</i> I
Motiv2rev	GGACGAGCCCATAG <u>G</u> CAGCAA <u>ACGCG</u> TCTGAAGAATTTG	<i>Mlu</i> I

**Tabelle 2.10** Verwendete Oligodesoxynukleotide für Mutagenese. Gegenüber der Ursprungssequenz veränderte Basen sind unterstrichen, die eingeführten Restriktionsschnittstellen sind fett markiert.

Die Oligodesoxynukleotide wurden von IBA-NAPS (Göttingen), MWG-Biotech (Ebersberg) oder Operon (Köln) synthetisiert. Für die Mutagenese wurde die HPSF-gereinigte Qualität von MWG-Biotech verwendet.

### 2.1.7 Antikörper

Gegen verschiedene Antigene wurden polyklonale Peptidantikörper verwendet, die für den Einsatz in der Immunfluoreszenz zuvor affinitätsgereinigt wurden. Zu diesem Zweck wurden 1 mg der Antikörperpeptide über den aminoterminalen Cysteinrest an 1 ml SulfoLink Gel gekoppelt und diese Matrix zur Reinigung verwendet.

Antigen	Peptidsequenz	Auftragsimmunisierer
Clint	NH <sub>2</sub> -CASPDQNASTHTPQSS-COOH	Eurogentech (Seraing, Belgien)
Eps15	NH <sub>2</sub> -CQEDLELAIALSKSEISEA-COOH	Biosciences (Göttingen)
Epsin 1	NH <sub>2</sub> -CEERIRRGDDLRLQMA-COOH	Biosciences (Göttingen)

**Tabelle 2.11** Peptide zur Generierung verwendeter polyklonaler Seren.

Die optimalen Verdünnungen für die polyklonalen Seren wurden empirisch ermittelt.

Antigen	Antikörper	Quelle	Zitat
AP180	MAB AP180-I	Ernst Ungewickell, Zellbiologie, MHH	(Ahle und Ungewickell, 1986)
Clathrin	X22	Frances Brodsky, University of California (San Francisco, CA, USA)	(Brodsky, 1985)
$\alpha$ -Adaptin	AP.6	Frances Brodsky, s.o.	(Chin <i>et al.</i> , 1989)
$\alpha$ -Adaptin	mAb100/2	Ernst Ungewickell, s.o.	(Ahle <i>et al.</i> , 1988)
$\beta$ -Adaptin	mAb100/1	Ernst Ungewickell, s.o.	(Ahle <i>et al.</i> , 1988)
$\gamma$ -Adaptin	mAb100/3	Ernst Ungewickell, s.o.	(Ahle <i>et al.</i> , 1988)

**Tabelle 2.12** Verwendete nichtkommerzielle monoklonale Mausantikörper.

Nichtkommerzielle monoklonale Antikörper wurden auf ca. 2  $\mu$ g/ml verdünnt.

Antigen	Nummer	Hersteller
Clathrin schwere Kette	C43820	Transduction Laboratories (Lexington, KY, USA)
Dynamin 1	D25520	Transduction Laboratories (Lexington, KY, USA)
Penta-Histidin	34660	Qiagen (Hilden)
$\alpha$ -Tubulin	T-5168	Sigma (Taufkirchen)
$\delta$ -Adaptin	611328	Transduction Laboratories (Lexington, KY, USA)
$\gamma$ -Adaptin	610386	Transduction Laboratories (Lexington, KY, USA)

**Tabelle 2.13** Verwendete kommerzielle monoklonale Mausantikörper.

Antigen	Konjugat	Nummer	Hersteller
Maus-IgG	Meerrettichperoxidase	55563	ICN (Aurora, OH, USA)
Kaninchen-IgG	Meerrettichperoxidase	55689	ICN (Aurora, OH, USA)
Maus-IgG	Trimethyl-Rhodamin	115-025-146	Dianova (Hamburg)
Kaninchen-IgG	Fluorescein-Isothiocyanat	111-095-144	Dianova (Hamburg)

**Tabelle 2.14** Verwendete Sekundärantikörper.

Alle kommerziellen Antikörper wurden nach Herstellerangaben verdünnt.

### 2.1.8 Verbrauchsmaterialien

Material	Produkt	Hersteller
Affinitätsmatrix	GSH-Sepharose	Amersham Biosciences (Freiburg)
	Ni-NTA-Agarose	Qiagen (Hilden)
Blotpapier	3MM Chr	Whatman (Maidstone, England)
Chemolumineszenzfilm	Hyperfilm ECL	Amersham Biosciences (Freiburg)
Deckgläschen	rund, Ø 12 mm	Menzel-Glaser (Braunschweig)
Dialyseschläuche	Spectra/Por MWCO:6-8,000	Spectrum (Rancho Dominguez, CA, USA)
Elektroporationsküvetten	Gene Pulser Cuvette 0,2 cm	BioRad (München)
Entsalzungssäulen	PD-10	Amersham Biosciences (Freiburg)
	NAP 10	Amersham Biosciences (Freiburg)
	NAP 5	Amersham Biosciences (Freiburg)
Gaze		Rauscher (Pattensen)
Gelfiltrationsmedium	Sepharose CL-4B	Amersham Biosciences (Freiburg)
Kupfernetze für EM	G200-C3	SCI (München)
Laborfilm	Parafilm N	American National Can (Chicago, IL, USA)
Mikroreaktionsgefäße	1,5 ml	Sarstedt (Nümbrecht)
	1,5 ml Safe Lock	Eppendorf (Hamburg)
	0,5 ml Safe Lock	Eppendorf (Hamburg)
Nitrozellulosemembran	Protran	Schleicher & Schuell (Dassel)
Objektträger	Matrand	Menzel-Glaser (Braunschweig )
Pasteurpipetten		Brand (Wertheim)
Pipettenspitzen		Brand (Wertheim)

Reaktionsgefäße	15 ml, 50 ml PP	Greiner (Frickenhausen)
Skalpellklingen	No. 11	Feather (Tokio, Japan)
Ultrazentrifugengefäße	9,5 x 38 mm Polyallo- mer 1,5 ml	Beckman Coulter (Krefeld)
	13 x 51 mm Polycarbo- nat Thick-Wall 3,2 ml	Beckman Coulter (Krefeld)
	13 x 51 mm Polyallo- mer 5,0 ml	Beckman Coulter (Krefeld)
	25 x 89 mm Polycarbo- nat Thick-Wall 38,0 ml	Beckman Coulter (Krefeld)
Zellkulturschalen	35 mm Nunclon	Nunc (Wiesbaden)
Zellulosenitratfilter	0,2 µm Porengröße	Sartorius (Göttingen)

**Tabelle 2.15** Verwendete Verbrauchsmaterialien.

SDS-Polyacrylamidgele wurden von Frau Christiane Lemke gegossen und zur Verfügung gestellt.

## 2.2 Benutzte Geräte

### 2.2.1 Laborgeräte

Gerät	Typ	Hersteller
Agarosegellaufkammer		Forschungswerkstätten Max-Planck Institut (Martinsried)
Analyt. Ultrazentrifuge	XL-A mit An-40, An-50Ti und An-60	Beckman Coulter (Krefeld)
Blotapparatur		MHH-Forschungswerkstätten (Hannover)
CD-Spektrometer	Dichrograph III	Jobin-Yvon (Bensheim)
Chromatographieanlage	FPLC-System mit Steuerungsgerät Pumpen Photometer Schreiber Fraktionssammler Säulen	Amersham Biosciences (Freiburg)
	LCC-501 Plus	
	P-500	
	UV-1	
	REC112	
	FRAC-100	
	MonoQ	
	Superdex 200 HR10/30	
Elektronenmikroskop	EM 301	Philips (Eindhoven, Niederlande)
Elektrophoresekammer	Mighty Small II	Hoefer (Freiburg)
Elektroporator	MicroPulser	BioRad (München)

Entwicklermaschine	Optimax Typ TR	Protec (Oberstenfeld)
Gradientenmischer	20 ml	H. Hölzel (München)
Heizblock	DRI-BLOCK DB-2A	Techne (Cambridge, England)
Homogenisierer	Potter S	B. Braun (Melsungen)
Inkubatoren	Function Line B12	Heraeus (Hanau)
	Hera cell RS 232	Heraeus (Hanau)
Lichtmikroskop	Eclipse E800 mit VFM-EPI-Fluoreszenzaufsatz	Nikon (Düsseldorf)
	MicroMAX CCD-Kamera	Princeton Instruments (Trenton, NJ, USA)
Membranpumpe	N86 KN-18	KMF (Freiburg)
Mikropipetten	Nichipet	Nichiryō (Tokio, Japan)
Mikrospritze	702 N	Hamilton (Bonaduz, Schweiz)
Netzgeräte	PowerPac 300	BioRad (München)
	PowerPac 1000	BioRad (München)
peristaltische Pumpe	Pump P-1	Amersham Biosciences (Freiburg)
pH-Meter	pH526	WTW (Weinheim)
Reinstwasseranlage	MilliQ	Millipore (Bedford, MA, USA)
Rotator	3025	GFL (Burgwedel)
Scanner	Duoscan	Agfa (Mortsel, Belgien)
Schüttelinkubator	Certomat BS-1	B. Braun (Melsungen)
Schüttler	KS 15 A control	Edmund Bühler (Hechingen)
Spektralphotometer	DU-640	Beckman Coulter (Krefeld)
Standzentrifuge	J2-HS mit JA-10 und JA-20	Beckman Coulter (Krefeld)
Sterilwerkbank	HeraSafe HS18	Heraeus (Hanau)
Thermoblock (programmierbar)	UNO-Thermoblock	Biometra (Göttingen)
Tischzentrifugen	5417R mit A-8-11 und FA45-24-11	Eppendorf (Hamburg)
	5410	Eppendorf (Hamburg)
	1.0R mit #2704	Heraeus (Osterode)
Ultraschallgerät	Sonifier 250 C	Branson (Danbury, CT, USA)

Ultrazentrifugen	Optima 100 TL mit TLA45 und TLA 100.4	Beckman Coulter (Krefeld)
	Optima LE 80K mit Type 70 Ti und SW28	Beckman Coulter (Krefeld)
	Optima L8-70 SW55Ti	Beckman Coulter (Krefeld)
UV-Handlampe	NU-4 KL	Konrad Benda (Wiesloch)
UV-Leuchttisch	UVT-20 S	Herolab (Wiesbaden)
Vortex	Vortex-Genie 2	Scientific Industries (Bohemia, NY, USA)
Wippinkubator	Duomax 1030	Heidolph (Schwabach)

**Tabelle 2.16** Verwendete Geräte.

## 2.2.2 Software

*Alignments* und Analysen der Primärsequenzen auf pI-Werte wurden mit MegAlign 1.05 und EditSeq 3.75 aus dem DNASTar-Programmpaket (DNASTar, Madison, WI, USA) durchgeführt. Für *Alignments* wurde der Clustal V Algorithmus mit einer *gap penalty* von 15 und einer *gap length penalty* von 10 gewählt. Zur Auswahl geeigneter Oligodesoxynukleotide für die PCR wurde das Programm CPrimer verwendet (Greg Bristol, University of California, Los Angeles, CA, USA). Zu Prognosen von Sekundärstrukturen wurden die internetzugänglichen Server PONDR (<http://www.pondr.com>, Romero *et al.*, 1997) und NPS@ ([http://npsa-pbil.ipbc.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=npsa\\_nn.html](http://npsa-pbil.ipbc.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_nn.html); Combet *et al.*, 2000) sowie für Tertiärstrukturen SWISS-MODEL (<http://www.expasy.org/swissmod/swiss-model.html>; Guex und Peitsch, 1997) genutzt. Die Darstellung der Raumstrukturen von Epsin 1 und Clint erfolgte mit Hilfe von RasMol 2.6 Software (von Roger Sayle, die Software ist frei erhältlich unter <http://www.umass.edu/microbio/rasmol/getras.htm>). Zur Auswertung von Daten aus analytischer Ultrazentrifugation wurde das Programm Akku-prog benutzt (Kindler, 1997). CD-spektroskopische Daten wurden mit CDPro Software unter Verwendung des erweiterten Satzes an Referenzspektren ausgewertet (Sreerama und Woody, 2000). Alle weiteren Auswertungen erfolgten mit Hilfe von Excel 98 (Microsoft, Redmont, WA, USA). Immunfluoreszenzaufnahmen wurden fotografiert unter Verwendung von IPLab Software 3.2 (Scanalytics, Fairfax, VA, USA). Alle digitalisierten Bilder wurden mit Adobe Photoshop 5.0 (Adobe Systems, San Jose, CA, USA) weiterbearbeitet. Densitometrische Analysen erfolgten mit NIH-Image

1.62 (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Grafiken und Abbildungen wurden mit Hilfe von Adobe Illustrator 8.0 (Adobe Systems, San Jose, CA, USA) erstellt.

### 2.3 Benutzte Puffer und Lösungen

Puffer / Lösung	Zusammensetzung
Blockierlösung	PBS mit 8 % Magermilchpulver, 0,1 % Tween 20
Coomassie-Färbelösung	0,2 % Coomassie Brilliant Blue R 250, 10 % Essigsäure, 47,5 % Ethanol
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle's Medium von Gibco BRL, Karlsruhe (Nummer 41965-039), 1 % Natriumpyruvat, 2 % Penicillin / Streptomycin-Lösung
DNA-Auftragslösung (Endkonzentration)	0,025 % Bromphenolblau, 0,025 % Xylencyanol, 1,5 % Ficoll 400
GSH-Elutionspuffer	50 mM Tris·HCl, 10 mM Glutathion (pH 8,0)
Homogenisationspuffer	25 mM Hepes, 250 mM Sucrose, 0,5 M DTT (pH 7,3)
Imidazol-Elutionspuffer	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol (pH 8,0)
Imidazol-Lysispuffer	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol (pH 8,0)
Imidazol-Waschpuffer	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol (pH 8,0)
Laemmli-Laufpuffer	50 mM Tris, 370 mM Glycin, 0,1 % SDS
LB-Agar	LB-Medium + 1,5 % Bacto-Agar
LB-Medium	0,5 % Hefeextrakt, 1 % Trypton, 1 % NaCl (pH 7,5)
Liposomenbindungspuffer	25 mM Hepes, 125 mM NaCl (pH 7,4)
Mikrotubulinbindungspuffer	100 mM Pipes, 1 mM EGTA, 1 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 mM GTP, 20 µM Taxol (pH 7,4)
Molekulargewichtstandard	0,1 % Phosphorylase b, 0,1 % β-Galaktosidase, 0,1 % Rinderserumalbumin, 0,1 % Ovalbumin, 0,1 % Carbanhydrase in SDS-Probenpuffer
PBS	1,9 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 8,2 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl
PEM-Puffer	100 mM Pipes, 1 mM EGTA, 1 mM MgCl <sub>2</sub> (pH 6,8)
PIC-Lösung	Phenol : Chloroform : Isoamylalkohol (25:24:1), gepuffert mit TE-Puffer
Ponceau-Lösung	0,2 % Ponceau S, 1 % Essigsäure
Puffer A	100 mM MES, 1 mM EGTA, 0,5 mM MgCl <sub>2</sub> , 0,02 % NaN <sub>3</sub> (pH 6,4)
SDS-Probenpuffer	25 mM Tris·HCl, 2,5 % SDS, 2,5 % β-Mecaptoethanol, 12,5 % Glycerin, angefärbt mit Bromphenolblau (pH 8,0)

---

SOC-Medium	0,5 % Hefeextrakt, 2 % Trypton, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 20 mM Glukose (pH 7,0)
TBE-Puffer	45 mM Tris, 45 mM Borsäure, 1 mM EDTA
TBS	20 mM Tris·HCl, 140 mM NaCl (pH 7,6)
TE-Puffer	10 mM Tris·HCl, 1 mM EDTA (pH 8,0)
Thrombinpuffer	20 mM Tris·HCl, 150 mM NaCl, 2,5 mM CaCl <sub>2</sub> (pH 8,5)
Transferpuffer	50 mM Tris, 39 mM Glycin, 0,037 % SDS, 20% Methanol
Ψ-Broth	LB-Medium + 4 mM MgSO <sub>4</sub> + 10 mM KCl

---

**Tabelle 2.17** Verwendete Puffer und Lösungen.

Für alle Puffer und Lösungen wurde Reinstwasser aus der MilliQ-Anlage verwendet.

## 2.4 Molekularbiologische Methoden

### 2.4.1 Klonierung von DNA-Fragmenten

Zur Klonierung von DNA-Fragmenten in ein anderes Plasmid wurden 2 µg der Ausgangsplasmide, mindestens jedoch soviel, daß vom erwünschten Fragment 0,1 µg erhalten werden konnten, in Verdauung mit Restriktionsendonukleasen eingesetzt. Dazu wurden die Plasmide mit 3 U/µg DNA für eine Stunde bei ihrem Temperaturoptimum in den von den Herstellern gelieferten und empfohlenen Puffern verdaut. Das Verdauvolumen betrug mindestens 10 µl, wurde aber so gewählt, daß die in 50 % Glycerin gelieferten Restriktionsenzyme nicht mehr als 10 % des Gesamtvolumens ausmachten und damit die Endkonzentration an Glycerin 5 % nicht überstieg. Wenn mit mehreren Enzymen verdaut werden sollte und die Verdaubedingungen (Puffer und Temperatur) der Enzyme zueinander kompatibel waren, wurden Doppelverdauungen durchgeführt. Wenn möglich wurden die Ansätze anschließend nach Herstellerangaben hitzeinaktiviert.

In einigen Fällen mußten Schnittstellen modifiziert werden. Dazu wurde zunächst mit dem ersten Enzym verdaut, dieses inaktiviert, die Schnittstelle mit dem Modifikationsenzym behandelt, auch dieses inaktiviert und schließlich die DNA mit dem zweiten Enzym verdaut. Zum Auffüllen von 5'-Überhängen wurden die Verdauungsansätze mit 2 U des Klenow-Fragments der DNA-Polymerase 1 in Gegenwart von 2 mM dNTPs für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Zum Abdauen von 5' oder 3'-Überhängen wurden diese für 30 Minuten bei 30 °C mit 1 U Mungobohnennuklease inkubiert.

biert. Diese mußte anschließend durch PIC-Extraktion inaktiviert und entfernt werden. Dazu wurde der Ansatz auf 50 µl mit TE-Puffer aufgefüllt, mit 50 µl Phenol/Isoamyl/Chloroformlösung versetzt, für 10 s gevortext und für 5 Minuten bei höchster Drehzahl in der Tischzentrifuge 5410 ( $12.800 \times g_{\max}$ ) zentrifugiert. Die wässrige, obere Phase wurde abgenommen und die organische Phase durch Zugabe von 50 µl TE-Puffer, Vortexen und Zentrifugieren reextrahiert. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) versetzt und die DNA mit 2,5 Volumen eiskaltem Ethanol gefällt. Nach 20 Minuten auf Eis wurde der Ansatz für 5 Minuten bei 4 °C und höchster Drehzahl im Rotor FA45-24-11 ( $25.000 \times g_{\max}$ ) pelletiert. Das Pellet wurde mit 1 ml 70 %igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in TE-Puffer resuspendiert.

Vektor-DNA wurde nach den Restriktionsverdau für eine Stunde bei 37 °C mit 1 U alkalischer Phosphatase aus Kalbsdarm inkubiert, um eine Religation der Plasmide zu verhindern.

Nach den Verdau wurden die Ansätze je nach Größe der erwarteten Fragmente auf ein 0,8 bis 2 %iges Agarosegel in TBE-Puffer mit 1,4 µg/ml Ethidiumbromid aufgetragen und für 45 Minuten bei 80 V aufgetrennt. Die gewünschten Banden wurden unter einer UV-Handlampe bei einer Wellenlänge von 366 nm ausgeschnitten und mit dem *Qiaquick Gel Extraction Kit* aus der Agarose extrahiert.

Jeweils 2 µl extrahierte Vektor-DNA wurden mit 6 µl zu inserierender DNA für 2 Stunden bei Raumtemperatur im vom Hersteller mitgelieferten Puffer und 20 µl Gesamtvolumen mit 1 U T4-DNA-Ligase behandelt. Anschließend wurde die Ligase für 10 Minuten bei 65 °C hitzeinaktiviert und ein Teil des Ansatzes in *E.coli* DH5α transformiert.

#### 2.4.2 Transformation von DNA in *Escherichia coli*

Vektor-DNA sowie Ligationsansätze wurden durch Thermotransformation in einen geeigneten *E.coli*-Stamm eingeführt. Um die Bakterien zunächst thermokompetent zu machen, wurden sie in LB-Medium bis zu einer Dichte von  $E_{600\text{nm}}=0,5$  wachsen gelassen, auf Eis gekühlt und für 15 Minuten bei 3.000 UpM ( $1.900 \times g_{\max}$ ) in einer Heraeus 1.0R-Zentrifuge pelletiert. Nach Resuspendieren in einem fünftel Kulturvolumen 100 mM MgCl<sub>2</sub> wurden die Bakterien wie zuvor abzentrifugiert und in einem fünftel Kulturvolumen 100 mM CaCl<sub>2</sub> wieder aufgenommen. Die Suspension wurde für 30 Minuten auf Eis stehen gelassen und ein weiteres mal abzentrifugiert.

Die Bakterien wurden schließlich in 1/20 des ursprünglichen Kulturvolumens 100 mM CaCl<sub>2</sub> mit 5% Glycerin resuspendiert, in Ethanol und Trockeneis schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

Die thermokompetenten Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und jeweils mit 90 µl der Suspension mit 5 µl Ligationsansatz oder 1 µl aufgereinigter DNA versetzt. Nach 30 Minuten auf Eis wurden die Transformationsansätze für 3 Minuten bei 42 °C in einem Heizblock inkubiert, auf Eis gestellt und mit 500 µl Ψ-Broth aufgenommen. Zur Expression von Resistenzmarkern wurden die Ansätze für 30 Minuten bei 37 °C und 230 UpM in einen Schüttelinkubator gestellt und auf LB-Agarplatten mit zur Selektion auf das transformierte Plasmid geeigneten Antibiotika ausplattiert.

Ligationsansätze mit geringer Effizienz wurden auch durch Elektroporation transformiert. Dazu wurden die Bakterien zunächst bis zu einer Dichte von  $E_{600nm}=0,5$  in LB-Medium inkubiert und für 20 Minuten auf Eis gekühlt. Anschließend wurden sie viermal gewaschen, indem sie für 15 Minuten bei 4.000 UpM ( $3.300 \times g_{max}$ ) in einer Heraeus 1.0R-Zentrifuge pelletiert und dann zuerst in einem, dann einem halben, 1/20 und schließlich 1/250 Kulturvolumen 10 % Glycerin resuspendiert wurden. Die Bakteriensuspension wurde in Ethanol und Trockeneis schockgefroren und bei -80 °C bis zur Verwendung gelagert.

Die elektrokompetenten Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und 40 µl der Suspension mit 1 µl Ligationsansatz versetzt. Der Transformationsansatz wurde in eine vorgekühlte 0,2 cm Elektroporationsküvette überführt, unter dem Programm EC2 im Elektroporator transformiert und in 500 µl SOC-Medium resuspendiert. Anschließend wurden die Ansätze wie oben beschrieben vorinkubiert und ausplattiert.

### 2.4.3 Polymerasekettenreaktion

Durch Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) wurden der offene Leserahmen von Clint sowie Fragmente von Clint und Epsin 1 amplifiziert. Um die DNA-Stücke mit Schnittstellen zu versehen, die zur Klonierung in Expressionsvektoren geeignet waren, wurden DNA-Oligodesoxynukleotide als *Primer* verwendet, die an ihrem 5'-Ende in einem nicht mit der Vorlage paarenden Bereich Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen *Bam*HI, *Sall* oder *Xho*I enthielten. Um einen effizienten Verdau durch die Enzyme zu gewährleisten, wurden zudem noch zwei oder drei weitere beliebige Nukleotide am 5'-Ende angefügt. Für

die Reaktion wurde in 0,5 ml-Reaktionsgefäßen 1 ng Ausgangs-DNA, jeweils 80 pmol der beiden Oligodesoxynukleotide sowie 40 nmol Desoxynukleotidtriphosphate in einem 100 µl Ansatz mit AGS *Gold complete* Puffer von AGS zusammengegeben. Die Mischung wurde für 5 Minuten bei 94 °C im programmierbaren Heizblock mit einer Deckeltemperatur von 98 °C denaturiert und dann mit 2 U *Taq*-DNA-Polymerase versetzt. Anschließend wurde der in Tabelle 2.18 beschriebene Temperaturzyklus gestartet:

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	94 °C	30 s	
Oligodesoxynukleotidanlagerung	$T_m(1) - 5$ °C	30 s	5 x
Desoxynukleotidpolymerisation	72 °C	1 min /1000 Bp	
Denaturierung	94 °C	30 s	
Oligodesoxynukleotidanlagerung	$T_m(2) - 5$ °C	30 s	25 x
Desoxynukleotidpolymerisation	72 °C	1 min /1000 Bp	
Desoxynukleotidpolymerisation	72 °C	10 min	1x

**Tabelle 2.18** Temperaturzyklen für die Polymerasekettenreaktion. Dabei ist  $T_m(1)$  die Schmelztemperatur des Bereich des Oligodesoxynukleotids, der mit der Ausgangs-DNA paart,  $T_m(2)$  dagegen die Schmelztemperatur des gesamten Oligodesoxynukleotids.

Die Anlagerungstemperatur wurde so gewählt, daß sie 5 °C unter dem Schmelzpunkt des Oligodesoxynukleotids lag, der durch das Programm CPrimer bestimmt worden war. Dabei wurde für die ersten fünf Zyklen die Schmelztemperatur für den Bereich, der mit der Ausgangs-DNA paart, und für die restlichen 25 Zyklen die für das gesamte Oligodesoxynukleotid gewählt. Die PCR-Ansätze wurden anschließend auf ein 1 %iges Agarosegel in TBE-Puffer mit 1,4 µg/ml Ethidiumbromid aufgetragen, für 45 Minuten bei 80 V aufgetrennt und unter einer UV-Handlampe bei einer Wellenlänge von 366 nm ausgeschnitten. Nach Gelextraktion mit dem *Qiaquick Gel Extraction Kit* wurde das PCR-Produkt wie unter 2.4.1 beschrieben mit den geeigneten Restriktionsenzymen verdaut und in den Vektor pUC57 kloniert. Alle PCR-Produkte wurden nachträglich durch automatisierte DNA-Sequenzierung (*Comfort Read-Service* von MWG Biotech) überprüft. Dabei wurde festgestellt, daß das Fragment Clint-(163-499) die Punktmutation A405V enthält. Tabelle 2.19 gibt eine Übersicht über die durch PCR generierten Fragmente.

Produkt	Ausgangsplasmid	DNA-Oligodesoxynukleotid	
		Vorwärts	rückwärts
Clint	KIAA0171/pBluescript	Clint1for	Clint625rev
Clint-(1-162)	KIAA0171/pBluescript	Clint1for	Clint162rev
Clint-(163-337)	KIAA0171/pBluescript	Clint163for	Clint337rev
Clint-(334-499)	KIAA0171/pBluescript	Clint334for	Clint499rev
Clint-(163-499)	KIAA0171/pBluescript	Clint163for	Clint499rev
Epsin 1-(1-157)	Epsin1/pBluescript	Epsin1for	Epsin157rev

**Tabelle 2.19** Proteine und Fragmente, die durch PCR amplifiziert wurden. Die Sequenzen der verwendeten Oligodesoxynukleotide sind in Tabelle 2.9 aufgelistet.

#### 2.4.4 Herstellung von Plasmiden zur Proteinexpression

Zur Expression von Fusionsproteinen in Bakterien sowie in kultivierten eukaryotischen Zellen wurden die offenen Leserahmen und Fragmente von Clint und Epsin 1 wie in Abschnitt 2.4.1 beschrieben in entsprechende Expressionsvektoren kloniert. Als Ausgangsplasmide dienten dabei in der Regel die cDNAs der Proteine in pBluescript oder die in pUC57 subklonierten PCR-Fragmente. In einigen Fällen wurden bereits bestehende Plasmide mit Restriktionsenzymen geöffnet und religiert, indem anstelle von Vektor und zu inserierender DNA ca. 0,2 µg des geöffneten und über ein Agarosegel aufgereinigten Plasmids in die Ligation eingesetzt wurden.

Tabelle 2.20 gibt eine Übersicht über die so generierten Expressionsvektoren. Zur Überprüfung des Erfolgs der Klonierungen wurde aus den transformierten Bakterien mit dem *Plasmid Miniprep Kit* von Qiagen die Plasmid-DNA gewonnen und mit Restriktionsenzymen verdaut, die für das gewünschte Produkt ein charakteristisches Schnittmuster ergeben. Der Verdau wurde durchgeführt wie in Abschnitt 2.4.1 für präparative Verdaus beschrieben, allerdings wurden hier 4 µl (entsprechend ca. 0,2 µg) Plasmidpräparation und jeweils 0,5 U der Enzyme eingesetzt. Die Ansätze wurden ohne Inaktivierung in einem Agarosegel aufgetrennt und auf einem UV-Leuchttisch analysiert.

Fusionsprotein	Ausgangsplasmid	Enzyme	Zielpiasmid	Enzyme
trx/H <sub>6</sub> -Clint	Clint/pUC57	<i>Bam</i> HI + <i>Sal</i> I	pET32a	<i>Bam</i> HI + <i>Sal</i> I
trx/H <sub>6</sub> -Clint-(1-162)	Clint-(1-162)/pUC57	<i>Bam</i> HI + <i>Sal</i> I	pET32a	<i>Bam</i> HI + <i>Sal</i> I
trx/H <sub>6</sub> -Clint-(163-337)	Clint-(163-337)/pUC57	<i>Bam</i> HI + <i>Sal</i> I	pET32a	<i>Bam</i> HI + <i>Sal</i> I
trx/H <sub>6</sub> -Clint-(334-499)	Clint-(334-499)/pUC57	<i>Bam</i> HI + <i>Sal</i> I	pET32a	<i>Bam</i> HI + <i>Sal</i> I
trx/H <sub>6</sub> -Clint-(163-499)	Clint-(163-499)/pUC57	<i>Bam</i> HI + <i>Sal</i> I	pET32a	<i>Bam</i> HI + <i>Sal</i> I
trx/H <sub>6</sub> -Clint-(245-625)	Clint/pET32a	<i>Bam</i> HI + <i>Bgl</i> II	Religation	
GST- Clint	Clint/pUC57	<i>Bam</i> HI + <i>Sal</i> I	PGEX-4T2	<i>Bam</i> HI + <i>Sal</i> I
GST- Clint-(1-162)	Clint-(1-162)/pUC57	<i>Bam</i> HI + <i>Sal</i> I	pGEX-6P1	<i>Bam</i> HI + <i>Sal</i> I
GST- Clint-(245-625)	Clint/pGEX-4T1	<i>Bam</i> HI + <i>Bgl</i> II	Religation	
Clint-(1-162)-EGFP	Clint-(1-162)/pUC57	<i>Bam</i> HI + <i>Sal</i> I	PEGFP-N3	<i>Bgl</i> II + <i>Sal</i> I
trx/H <sub>6</sub> -Epsin 1-(2-575)	Epsin 1/pBluescript	<i>Sal</i> I	pET32c	<i>Sal</i> I
trx/H <sub>6</sub> -Epsin 1-(2-144)	Epsin 1/pBluescript	<i>Paul</i> <sup>1</sup> + <i>Sal</i> I	pET32c	<i>Not</i> I <sup>2</sup> + <i>Sal</i> I
H <sub>6</sub> -Epsin 1-(144-575)	Epsin 1/pBluescript	<i>Paul</i> <sup>1</sup> + <i>Sal</i> I	PQE32	<i>Sma</i> I + <i>Sal</i> I
GST-Epsin 1-(1-157)	Epsin 1-(1-157)/pUC57	<i>Bam</i> HI + <i>Xho</i> I	pGEX-6P1	<i>Bam</i> HI + <i>Sal</i> I
Epsin 1-(1-157)-EGFP	Epsin 1-(1-157)/pUC57	<i>Bam</i> HI + <i>Xho</i> I	PEGFP-N3	<i>Bgl</i> II + <i>Sal</i> I

<sup>1</sup> Aufgefüllt mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase 1.

<sup>2</sup> Überhang entfernt mit Mungobohnennuklease.

**Tabelle 2.20** Übersicht über die generierten Expressionsplasmide.

## 2.4.5 Gerichtete Mutagenese

Zur gezielten Mutation von putativen Bindungsmotiven wurde das *QuickChange Sitedirected Mutagenesis Kit* von Stratagene verwendet. Der Entwurf der Oligodesoxynukleotide mit den Mutationen und die Durchführung der Reaktion erfolgten streng nach den Vorschriften des Herstellers. Zur leichteren Identifizierbarkeit positiver Klone wurde darauf geachtet, daß durch die Mutationen neue Restriktionsenzymststellen in die DNA-Sequenz eingeführt wurden, deren Anwesenheit sich über analytische Enzymverdau überprüfen ließen.

Bei der Reaktion lagern sich die zueinander komplementären Oligodesoxynukleotide nach dem Aufschmelzen der DNA an die parentale Ausgangs-DNA an und werden durch eine hochprozessive *Pfu*-DNA-Polymerase so verlängert, daß eine vollständige Kopie des Plasmides entsteht. Die Reaktion wurde ebenso wie eine PCR thermozyklisch in einem programmierbaren Heizblock durchgeführt. Es wurden 17 Zyklen und eine Elongationszeit von jeweils 14 Minuten gewählt. Anschließend wurde die methylierte, parentale DNA durch einen Verdau mit dem Restriktionsen-

zym *DpnI* abgebaut und ein Teil des Ansatzes in superkompetente *E. coli* XL1-Blue transformiert, die in der Lage sind die verbleibenden Einzelstrangbrüche zu schließen.

Der Erfolg der Mutation wurde nach Plasmidminipräparation durch einen analytischen Restriktionsverdau wie in Abschnitt 2.4.4 beschrieben sowie durch automatisierte DNA-Sequenzierung (*Comfort Read-Service* von MWG Biotech) überprüft. Die durchgeführten Mutationen sind in Tabelle 2.21 dargestellt.

Mutante	Ausgangsplasmid	Oligonukleotid-paar
Clint-(334-499) → <sup>423</sup> AFAAM	Clint-(334-499)/pET32a	Motiv2for/rev
Clint-(163-499) → <sup>326</sup> AVAAF	Clint-(163-499)/pET32a	Motiv2for/rev
Clint-(163-499) → <sup>423</sup> AFAAM	Clint-(163-499)/pET32a	Motiv1for/rev
Clint-(163-499) → <sup>326</sup> AVAAF/ <sup>423</sup> AFAAM	Clint-(163-499)→ <sup>326</sup> AVAAF/pET32a	Motiv2for/rev

**Tabelle 2.21** Übersicht über die mit *QuickChange* durchgeführten Mutationen.

## 2.5 Proteinanalytik

### 2.5.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur Analyse von Proteingemischen wurden diese durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt. Die Proben wurden mit einem Drittel Volumen vierfach SDS-Probenpuffer versetzt, für zwei Minuten bei 95 °C erhitzt und mit einer 25 µl Hamiltonspritze in die Taschen eines SDS-Polyacrylamidgels geladen. Neben den Proben wurden 10 µl eines Molekulargewichtstandards mit fünf Proteinen von 29 bis 116 kDa aufgetragen. Es wurden 0,8 mm dicke 6,5 x 9 cm große Gele mit einem 9-19 %igen Acrylamid- und einem 0,09-0,38 %igen Bisacrylamidgradienten sowie einer Trennstrecke von 5,5 cm verwendet. Als Sammelgelpuffer wurde 125 mM Tris·HCl (pH 6,8) mit 0,1 % SDS, als Trenngelpuffer 375 mM Tris·HCl (pH 8,8) mit 0,1 % SDS verwendet. Die Auftrennung erfolgte in Laemmli-Laufpuffer für 15 Minuten bei 80 V und für eine Stunde bei 200 V.

Wenn das Gel nicht zum Transfer auf eine Nitrozellulosemembran verwendet wurde, schloß sich eine Färbung mit Coomassie an. Dazu wurde das Gel für eine Stunde in Coomassie-Färbelösung inkubiert und anschließend in Entfärbelösung gewaschen.

## 2.5.2 Westernblot

Um einzelne Proteine in einem SDS-Polyacrylamidgel spezifisch zu markieren, wurden sie in einem halbtrockenen Westernblotverfahren auf Nitrozellulosemembran transferiert. Dazu wurden auf der Anodenplatte der Blotapparatur nacheinander sechs Lagen in Transferpuffer getränkten Whatman 3MM Blotpapiers, eine Lage Nitrozellulosemembran, das ungefärbte Gel sowie sechs weitere Lagen Blotpapier luftblasenfrei aufgeschichtet. Nach Aufsetzen der Kathodenplatte wurden die Proteine durch einen Stromfluß von  $0,8 \text{ mA/cm}^2$  Transferfläche auf die Nitrozellulosemembran übertragen. Anschließend wurde der Blot für zehn Sekunden in Ponceau S-Färbelösung geschwenkt und mit Wasser entfärbt. Nach Markierung der Spuren und der Banden des Molekulargewichtstandards, wurde die Membran mit PBS vollständig entfärbt und zur Absättigung von unspezifischen Proteinbindungsstellen für 30 Minuten mit Blockierlösung inkubiert. Nach Waschen mit PBS wurde die Blotmembran nacheinander für eine Stunde mit einer primären Antikörperlösung in 3% BSA in PBS inkubiert, kräftig mit PBS gewaschen, für eine Stunde mit einer Verdünnung eines gegen das Primär-IgG gerichteten und mit Meerrettichperoxidase gekoppelten sekundären Antikörpers in Blockierlösung behandelt und erneut mit PBS gewaschen. Schließlich wurde die Membran für eine Minute mit einer nach Herstellervorschrift angesetzten und mit einem Teil Wasser verdünnten *Renaissance Enhanced Luminol*-Lösung inkubiert, in Frischhaltefolie eingeschlagen und mit *Hyperfilm ECL*-Filmen je nach Signalstärke für Belichtungszeiten von zehn Sekunden bis zu zwei Stunden exponiert. Die Filme wurden anschließend in einer Optimax Typ TR-Entwicklermaschine bei  $31 \text{ }^\circ\text{C}$  entwickelt

## 2.5.3 Digitalisierung und Densitometrie

Die gefärbten SDS-Polyacrylamidgele und die belichteten Chemolumineszenzfilme wurden mit einem Agfa DuoScan Scanner digitalisiert und mit Adobe Photoshop 5.0 weiterbearbeitet. Zur densitometrischen Auswertung wurden die Dateien in das TIFF-Format umgewandelt und mit dem Programm NIH-Image 1.62 analysiert.

## 2.6 Proteinexpression und -aufreinigung

### 2.6.1 Expression von Fusionsproteinen in *E. coli*

Plasmide zur Expression von Fusionsproteinen in Prokaryoten wurden wie in Abschnitt 2.4.2 beschrieben in den *E. coli* Stamm BL21 (DE3) transformiert (Plasmide, die auf pQE30-32-Vektoren basierten wurden direkt in DH5 $\alpha$  exprimiert). Zur Expression im präparativen Maßstab wurden Übernachtskulturen der Bakterien 1:100 in LB-Medium verdünnt und bis zu einer Bakteriendichte von  $E_{600nm} \approx 0,5$  in einem Schüttelinkubator bei 37°C und 200 UpM inkubiert. Zur Selektion auf das Expressionsplasmid wurden 50  $\mu\text{g/ml}$  des Antibiotikums Ampicillin (bei DH5 $\alpha$  100  $\mu\text{g/ml}$  Ampicillin) zugesetzt. Das Kulturvolumen betrug je nach gewünschter Bakterienmenge zwischen 0,5 und zwei Liter. Nach Erreichen der oben genannten Bakteriendichte wurden 0,5 mM IPTG zugesetzt und die Kultur für weitere drei Stunden auf einem Inkubationsschüttler bei 250 UpM und Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien auf verschiedene Zentrifugengefäße aufgeteilt, für 15 Minuten bei 4 °C und 6.000 UpM ( $6.400 \times g_{max}$ ) in einem JA-10 Rotor pelletiert, mit eiskaltem PBS resuspendiert, in einem Gefäß vereinigt und erneut wie zuvor zentrifugiert. Schließlich wurden sie ein zweites Mal mit PBS gewaschen, in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und für 20 Minuten bei 4.000 UpM ( $3.300 \times g_{max}$ ) und 4 °C in einer Heraeus 1.0 R-Zentrifuge pelletiert. Nach Abgießen des Überstandes wurden die so gewonnenen Bakterienpellets in einer Kältemischung aus Ethanol und Trockeneis schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

### 2.6.2 Aufreinigung von Fusionsproteinen aus *E. coli*

Zur Aufreinigung von 6x-His markierten Fusionsproteinen (solche, die mit Plasmiden exprimiert wurden, die auf pQE- oder pET32-Vektoren basieren) wurden die Bakterienpellets in 9 ml Imidazol-Lysispuffer unter Zusatz von 1 mM PMSF aufgetaut und resuspendiert. Wenn die Bakterien vollständig aufgetaut waren, wurde der Suspension 1 ml 10 % Triton X-100 in Imidazol-Lysispuffer zugesetzt. Die Bakterien wurden mindestens viermal für 10 s mit einem Branson Sonifier 250 bei 20 % Ausgangsleistung sonifiziert. Wenn das Homogenat nach vier Zyklen noch zu viskos war, wurde die Sonifizierung solange wiederholt bis die Suspension homogen erschien. Anschließend wurde das Lysat durch Zentrifugation für 15 Minuten bei 40.000 UpM ( $164.700 \times g_{max}$ ) in einem Type 70 Ti-Rotor geklärt. Bakterienlysate, die das

H<sub>6</sub>-Epsin 1-(144-575)-Fusionsprotein enthielten, wurden an dieser Stelle in ein 50 ml-Reaktionsgefäß überführt, das fest verschlossen und für drei Minuten unter ständiger Agitation in einem kochenden Wasserbad inkubiert wurde. Anschließend wurde das Gefäß für fünf Minuten in eine ca. -10 °C kalte Kältemischung aus Kochsalz und Eiswasser gegeben und schließlich das Lysat wie oben beschrieben erneut abzentrifugiert.

Die Lysate wurden anschließend in einem 15 ml-Reaktionsgefäß mit 2 ml Ni-NTA-Agarose je Liter ursprünglicher Bakterienkultur für eine Stunde unter ständiger Rotation bei 4 °C inkubiert. Die Ni-NTA-Agarose mit dem gebundenen Fusionsprotein wurde dreimal mit je 12 ml Imidazol-Waschpuffer gewaschen, indem die Trägermatrix für eine Minute bei 4.000 UpM ( $3.300 \times g_{\max}$ ) in einer Heraeus 1.0 R-Zentrifuge sedimentiert und mit dem Puffer resuspendiert wurde. Im zweiten Waschschriff wurde die Suspension dabei zusätzlich mit 2 ml 10 % Sucrose in Imidazol-Waschpuffer unterschichtet. Schließlich wurde die Ni-NTA-Agarose mit dem Protein in eine leere Kunststoffsäule überführt, mit 5 ml Imidazol-Waschpuffer gewaschen und mit Imidazol-Elutionspuffer tröpfchenweise eluiert. Das Eluat wurde in 0,5 ml-Fraktionen gesammelt, von denen 1 µl-Aliquots auf eine Nitrozellulosemembran aufgetragen und mit Ponceau S angefärbt wurden. Entsprechend des so ermittelten Proteingehalts wurden die Fraktionen vereinigt und, wenn sie nicht durch Gelfiltration weitergereinigt werden sollten, über Entsalzungssäulen in den gewünschten Puffer überführt.

Die Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen (exprimiert mit Plasmiden, die auf pGEX-Vektoren basieren) erfolgte analog. Allerdings wurde anstelle von Ni-NTA-Agarose GSH-Sepharose verwendet und PBS anstelle von Imidazol-Lysis- und -waschpuffer benutzt. Die Elution erfolgte mit GSH-Elutionspuffer.

Zur Herstellung von GST- oder GST-Fusionsprotein-Sepharose für Proteinbindungsexperimente wurden die geklärten Bakterienlysate zunächst mit einem Unterschuß (0,5 ml) an GSH-Sepharose inkubiert, und nach dem Waschen nicht mit Elutionspuffer behandelt. Das restliche Fusionsprotein im Lysat wurde anschließend mit 1,5 ml GSH-Sepharose gebunden und wie zuvor beschrieben gewaschen und eluiert.

### 2.6.3 Entfernung des Fusionsanteils durch Thrombinverdau

Der Fusionsanteil von trx/H<sub>6</sub>-Epsin 1 wurde mit Hilfe von Thrombin vom Rest des Proteins entfernt. Dazu wurde das Fusionsprotein nach der Elution in Thrombinpuffer überführt. Eine Lösung mit einer Konzentration von 8 mg/ml wurde mit 8 U/ml Thrombin für 16 Stunden bei 16 °C verdaut. Die Reaktion wurde gestoppt durch Zugabe von 1 mM PMSF. Zur Entfernung von unverdaulichem Fusionsprotein wurde der Ansatz für 30 Minuten bei 4 °C mit 200 µl Ni-NTA-Agarose je 1 ml Verdauvolumen unter ständiger Rotation inkubiert. Nach einminütiger Zentrifugation bei 4.000 UpM (3.300 x  $g_{\max}$ ) in einer Heraeus 1.0 R-Zentrifuge wurde der Überstand abgenommen und wie nachfolgend beschrieben über eine Anionenaustauschersäule und anschließende Gelfiltration weiter gereinigt.

### 2.6.4 Proteinreinigung über Anionenaustauschchromatographie

Thrombinverdautes Epsin 1 und H<sub>6</sub>-Epsin-(144-575) wurden für die nachfolgenden biophysikalischen Untersuchungen über den Anionenaustauscher MonoQ gereinigt. Dazu wurden die Proben über PD-10 Entsalzungssäulen in 25 mM Tris-HCl (pH 8,0) umgepuffert und anschließend an die MonoQ-Säule gebunden, die an ein FPLC-System angeschlossen war. Die Elution erfolgte über einen 0 - 0,5 M NaCl-Gradienten, der in dem Bereich, in dem die Proteine eluiert wurden, eine Steigung von 5 mM/ml aufwies. Das Eluat wurde in 1 ml-Fractionen gesammelt, die durch SDS-PAGE und Coomassiefärbung auf ihren Proteingehalt analysiert wurden. Die saubersten Fractionen wurden zur weiteren Aufreinigung in eine Gelfiltration eingesetzt.

### 2.6.5 Proteinreinigung durch Gelfiltration

Die H<sub>6</sub>-Clint- und -AP180-Fragmente, die nachfolgend in GST-Bindungsexperimente eingesetzt wurden, sowie die saubersten Fractionen aus der Anionenaustauschchromatographie wurden abschließend durch Gelfiltration über eine FPLC-Anlage mit einer Superdex 200 HR10/30-Säule gereinigt. Dazu wurde die Säule zunächst mit 50 ml eines geeigneten Puffers äquilibriert. Für Proben, die zu biophysikalischen Analysen verwendet wurden, war dies PBS. Proteine für Bindungsexperimente dagegen wurden in GBP gefiltert, dem zur Verhinderung von mikrobiellem Wachstum 0,02 % NaN<sub>3</sub> zugesetzt worden war. Anschließend wurden 500 µl des Ausgangsmaterials aufgetragen und mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,5 ml pro

Minute gelfiltriert. Das Eluat wurde in 500 µl-Fractionen aufgefangen und durch SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert. Die saubersten Fractionen konnten direkt in die nachfolgenden Experimente eingesetzt werden.

## 2.7 Aufarbeitung von Gewebe

### 2.7.1 Herstellung von Zytosol und weiteren Gewebeextrakten

Zur Herstellung von Hirn- oder Nierenzytosol wurden ca. 5 g Großhirnrinde oder Niere vom Schwein grob zerkleinert und mit einem äquivalenten Volumen Homogenisationspuffer (1 ml Puffer / 1 g Gewebe), dem Complete Proteaseinhibitor zugesetzt war, in einem 15 ml Potter S-Gefäß homogenisiert. Das Homogenat wurde durch 4 Lagen Gaze filtriert, für 10 Minuten bei 4.000 UpM ( $3.300 \times g_{\max}$ ) in einer Heraeus 1.0 R-Zentrifuge von Kernen und Zelltrümmern befreit und für eine Stunde bei 90.000 UpM ( $440.000 \times g_{\max}$ ) in einem TLA100.4-Rotor zentrifugiert. Der klare Überstand wurde mit einer Glaspasteurpipette abgenommen und stellte das Zytosol dar.

Zur Herstellung von Trisextrakt wurde das Pellet in genau soviel 0,5 M Tris-HCl (pH 7,0) resuspendiert, wie zuvor an Zytosol gewonnen worden war. Die Suspension wurde ebenfalls für eine Stunde bei 90.000 UpM ( $440.000 \times g_{\max}$ ) zentrifugiert, und der klare Trisextrakt mit einer Pasteurpipette abgenommen.

Zur Gewinnung von Tritonextrakt wurde das Pellet aus der Trisextraktion mit 1 % Triton X-100 in GBP resuspendiert und erneut wie zuvor zentrifugiert. Der klare Überstand wurde abgenommen und als Tritonextrakt verwendet.

Auf analoge Weise wurde auch Mäuseniere fraktioniert. Hierzu wurde eine Mäuseniere (0,32 g) mit 320 µl Homogenisationspuffer mit Complete Proteaseinhibitor und 1 mM DTT in einem 2 ml-Potter S-Gefäß homogenisiert. Das Homogenat wurde nicht durch Gaze filtriert, sondern direkt für 15 Minuten bei 5.000 UpM ( $2.700 \times g_{\max}$ ) in einem A-8-11-Ausschwingrotor zentrifugiert. Alle weiteren Zentrifugationen wurden für 45 Minuten bei 45.000 UpM ( $125.900 \times g_{\max}$ ) in einem TLA45-Rotor durchgeführt. Das Pellet nach der niedertourigen Zentrifugation und das Pellet nach der Tritonextraktion wurden in 10 % SDS resuspendiert. Von allen Fractionen wurden Proben abgenommen, so verdünnt, daß alle Proben miteinander vergleichbar waren, und für die SDS-PAGE vorbereitet.

Vor der Benutzung in Experimenten mußten Zytosol und Trisextrakt über eine PD-10- oder NAP-5-Entsalzungssäule in den entsprechenden Puffer für das Experiment überführt werden. Alle Extrakte wurden direkt vor dem Einsetzen in ein Experi-

ment für zwei Minuten bei höchster Drehzahl ( $12.800 \times g_{\max}$ ) in der Tischzentrifuge 5410 abzentrifugiert, um Aggregate zu entfernen.

### 2.7.2 Herstellung von Gewebehomogenaten aus Maus

Zur Bestimmung der Gewebeverteilung von Clint wurden einer Maus innerhalb von 30 Minuten nach dem Töten Proben von Herz, Hirn, Milz, Lunge, Leber, Skelettmuskel, Niere und Hoden entnommen und in Mikroreaktionsgefäße überführt. Zu jeweils 100 mg Gewebe wurden 330  $\mu\text{l}$  Wasser, 120  $\mu\text{l}$  10 % SDS und 150  $\mu\text{l}$  vierfach Probenpuffer gegeben. Das Gewebe wurde mit einem Kunststoffstößel zerkleinert, mit einem Ultraturrax homogenisiert und für 5 Minuten in einem Heizblock bei 95 °C erhitzt. Aliquots, die 1,4 mg Ausgangsgewebe entsprachen, wurden durch SDS-PAGE und Westernblot auf ihren Gehalt an Clint analysiert. Zur Quantifizierung des Gesamtproteingehaltes wurden außerdem Proben entsprechend 0,2 mg Ausgangsgewebe über SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Die Bandenintensität von Clint in den Spuren des Westernblots und die Gesamtproteingehalte der Spuren im coomassiegefärbten Gel wurden densitometrisch bestimmt und aufeinander bezogen.

### 2.7.3 Präparation von Clathrin

Als Ausgangsmaterial für die Aufreinigung von Clathrin diente eine Präparation clathrinbedeckter Vesikel aus Schweinehirn. 1,25 ml dieser Suspension wurden zur Extraktion der Hüllproteine mit 250  $\mu\text{l}$  3 M Tris·HCl (pH 7,0) gemischt, zehn Minuten auf Eis inkubiert und für 20 Minuten bei 70.000 UpM ( $266.200 \times g_{\max}$ ) in einem TLA100.4-Rotor zentrifugiert. Der klare Überstand wurde abgenommen und das Pellet durch Resuspendieren in 500  $\mu\text{l}$  0,5 M Tris·HCl (pH 7,0) und erneute Zentrifugation reextrahiert. Die vereinigten Überstände wurden anschließend in einer FPLC-Anlage unter Verwendung einer Superose 6-Säule mit einem 2,2 x 52 cm großen Gelbett in 0,5 M Tris·HCl (pH 7,0) und 0,02 %  $\text{NaN}_3$  gelfiltriert. Es wurden 1 ml-Fractionen gesammelt, die durch SDS-PAGE und Coomassiefärbung auf ihren Proteingehalt analysiert wurden. Nach einem Elutionsvolumen von ca. 40 ml wurde eine Fraktion aufgefangen, die zwar eine hohe Extinktion aber einen nur einen geringen Proteingehalt hatte. Es handelte sich dabei vorwiegend um hülfreie Membranvesikel. Nach ca. 47 ml konnte die Clathrinfraktion gewonnen werden, zu der sich ab ca. 51 ml zunehmend Adaptorproteine mischten.

Clathrinhaltige Fraktionen, die frei von Adaptoren und Resten von Membranesikeln waren, wurden vereinigt und durch Zugabe von einem Volumen gesättigter Ammoniumsulfatlösung mit 2 mM EDTA über Nacht auf Eis ausgefällt. Das Präzipitat wurde durch 20 minütige Zentrifugation bei 20.000 UpM ( $72.100 \times g_{\max}$ ) in einem SW28-Rotor und Verwerfen des Überstandes gewonnen und in 700  $\mu$ l 0,5 M Tris-HCl (pH 7,0) resuspendiert. Das resuspendierte Clathrin wurde zum Entfernen des Ammoniumsulfats für zehn Stunden bei 4 °C gegen 1 l 0,5 M Tris-HCl (pH 7,0) dialysiert und für zwei Minuten bei 16.400 UpM ( $25.000 \times g_{\max}$ ) im Rotor FA45-24-11 abzentrifugiert. Der Überstand wurde zur Bildung von Clathrinkäfigen über Nacht gegen 1 l Puffer A mit 2 mM  $\text{CaCl}_2$  dialysiert. Die Käfige wurden anschließend für 30 Minuten bei 45.000 UpM ( $125.900 \times g_{\max}$ ) in einem TLA45-Rotor abzentrifugiert und in 300  $\mu$ l Puffer A mit 2 mM  $\text{CaCl}_2$  resuspendiert. Die so gewonnene Präparation hatte eine Konzentration von 3,3 mg/ml und konnte bis zur Verwendung in einem Experiment auf Eis gelagert werden.

## 2.8 Biophysikalische Analysen

### 2.8.1 Analytische Gelfiltration

Zur Bestimmung hydrodynamischer Radien wurde die analytische Gelfiltration oder auch Größenausschlußchromatographie eingesetzt. Dieses Verfahren beruht darauf, daß Proteine verschiedener Größe unterschiedlich tief in das Innere der Gelmatrix eindringen können, und kleinen Proteinen dadurch ein größeres Volumen im Gelbett zur Verfügung steht. Auf diese Weise eluieren größere Proteine bereits nach geringerem Pufferdurchlauf als kleinere (Laurent und Killander, 1964).

Die Analysen wurden unter Verwendung einer Superdex 200 HR10/30-Säule mit einem FPLC-System durchgeführt. Die Elutionsvolumina aufgereinigter Proteine wurden durch Auswertung der Schreiberprofile ermittelt. Zur Bestimmung der Elutionspositionen von zytosolischem Epsin 1 und AP180 wurden 500  $\mu$ l Schweinehirnzytosol auf die Säule aufgetragen und während der Elution 500  $\mu$ l-Fractionen gesammelt. Diese wurden durch SDS-PAGE und Westernblot auf ihren Gehalt an Epsin 1 und AP180 untersucht. Die Elutionspositionen der einzelnen Fraktionen wurden berechnet, indem das Totvolumen zwischen dem Photometer des FPLC-Systems und dem Fraktionssammler zu dem Volumen addiert wurde, das bis zu der Mitte der jeweiligen Fraktion gesammelt worden war. Die Westernblots wurden densitometrisch ausgewertet, und das relative Signal wurde gegen das berechnete Eluti-

onsvolumen der Fraktion aufgetragen. Das Maximum dieser Kurve stellte das Elutionsvolumen des jeweiligen Proteins dar.

Zur Kalibration der Säule wurden die Elutionsvolumina von Proteinen mit bekannten Stokesradien bestimmt. Als Standards dienten Thyroglobulin (mit einem Stokesradius von 8,6 nm; Le Maire *et al.*, 1986), Apoferritin (6,6 nm), Alkoholdehydrogenase (4,6 nm), Rinderserumalbumin (3,6 nm) und Carboanhydrase (2,0 nm; alle Potschka, 1987). Clathrinkäfige wie in Abschnitt 2.7.3 beschrieben dienten zur Bestimmung des Ausschlußvolumens ( $V_0$ ). Der Verteilungskoeffizient  $K_D$  wurde nach der Formel

$$K_D = \frac{V_E - V_0}{V_t - V_0}$$

berechnet (wobei  $V_E$  das Elutionsvolumen der jeweiligen Probe und  $V_t$  das Totalvolumen der Säule darstellen). Eine Auftragung der Stokesradien gegen die Quadratwurzel der negativen dekadischen Logarithmen der Verteilungskoeffizienten resultierte in einer Geraden (Laurent und Killander, 1964). Dieser lineare Zusammenhang wurde benutzt, um aus den Elutionsvolumina von Epsin 1, AP180 und Fragmenten dieser Proteine deren Stokesradien zu bestimmen.

Die Gelfiltrationen des Schweinehirnzytosols wurden in 0,5 M Tris durchgeführt, die von aufgereinigten Proteinen sowohl in 0,5 M Tris als auch in PBS. Dabei wurden keine Unterschiede im Elutionsverhalten der untersuchten Proteine zwischen beiden Puffern festgestellt.

## 2.8.2 Sucroседichtegradientenzentrifugation

Zur Bestimmung der Sedimentationskoeffizienten von Epsin 1 und AP180 in Schweinehirnzytosol wurde dieses auf einen Sucroседichtegradienten aufgetragen und zentrifugiert. Zu diesem Zweck wurden mit einem Gradientenmischer, der an eine peristaltische Pumpe angeschlossen war, in dünnwandigen 13 x 51 mm Polyallomer Ultrazentrifugenröhrchen lineare 5 bis 20 %ige Sucroседegradien mit einem Volumen von 5 ml in 0,5 M Tris-HCl (pH 7,0) gegossen. Die Gradienten wurden entweder mit 200 µl Schweinehirnzytosol oder einer Mischung verschiedener Standards mit bekannten Sedimentationskoeffizienten überschichtet. Diese Lösung enthielt jeweils 0,14 mg/ml Lysozym (1,91 S), Ovalbumin (3,55 S), Rinderserumalbumin (4,44 S), Lactatdehydrogenase (6,93 S) und Katalase (11,20 S; alle Sober, 1970). Die Gradienten wurden für 18 Stunden bei 40.000 UpM ( $194.400 \times g_{\max}$ ) in einem SW55Ti-Rotor zentrifugiert und anschließend vom Meniskus her in 220 µl-Schritten

mit einer Mikroliterpipette fraktioniert. Die Fraktionen mit den Standards wurden durch SDS-PAGE und Coomassiefärbung analysiert, während die Proben mit den zytosolischen Fraktionen durch Westernblot untersucht und densitometrisch ausgewertet wurden. Der lineare Zusammenhang zwischen den bekannten s-Werten und den Fraktionsnummern der Verteilungsmaxima der Standards wurde benutzt, um die Sedimentationskoeffizienten der zytosolischen Proteine zu bestimmen. Als interne Kontrolle diente G-Aktin, dessen s-Wert mit 3,2 S bestimmt wurde und damit dem publizierten Wert entspricht (Sober, 1970).

### 2.8.3 Analytische Ultrazentrifugation

Die Sedimentationskoeffizienten und Molekülmassen aufgereinigter Proteine wurden in Zusammenarbeit mit Professor Claus Urbanke (Abteilung für Biophysikalische Chemie, Medizinische Hochschule Hannover) durch Analytische Ultrazentrifugation in einer Beckman XL-A-Zentrifuge mit An-40- und An-60-Rotoren bestimmt. Dabei wurde die Sedimentationsrate durch Zentrifugation in Doppelsektoreinsätzen mit 12 mm Wegstrecken untersucht. Für die Messungen wurden hochaufgereinigte Proben verwendet, die entweder gelfiltriert oder durch Anionenaustauschchromatographie gereinigt und anschließend gelfiltriert worden waren. Die eingesetzten Proteinkonzentrationen lagen zwischen  $E_{280\text{nm}}=0,1$  und  $E_{280\text{nm}}=0,4$  in PBS und die Messungen durch das Spektralphotometer der Ultrazentrifuge wurden bei 230 und 280 nm durchgeführt. Für Messungen in Guanidiniumchlorid wurde die benötigte Menge als wässrige Lösung in Mikroreaktionsgefäße pipettiert und eingetrocknet. Anschließend wurde das Salz mit der verdünnten Probe für die Messung resuspendiert. Die Sedimentationskonstanten wurden durch Analyse der Wanderungsgeschwindigkeit der Grenzschicht und Korrektur auf 20 °C und Wasser als Lösungsmittel ( $s_{20,w}$ ) bestimmt (Laue *et al.*, 1992).

Zur Ermittlung der Molekülmassen wurden die Proteine in Sedimentations-Diffusionsgleichgewichtszentrifugationen untersucht. Die Gleichgewichtseinstellung wurde in An-50 Ti-Rotoren mit sechskanal Mittelstücken aus kohlegefülltem Epon bei 12.000 UpM sowie Wellenlängen von 230 und 280 nm beobachtet. Die gemessenen Gleichgewichtsverteilungen wurden mit Hilfe des Programms Akkuprog (Kindler, 1997) analysiert.

## 2.8.4 CD-Spektroskopie

Die Sekundärstrukturanteile aufgereinigter Proteine wurden durch CD- (Zirkulardichroismus-) Spektroskopie im fernen UV-Bereich bestimmt. Die Messungen wurden in Zusammenarbeit mit Professor Jürgen Alves (Abteilung für Biophysikalische Chemie, Medizinische Hochschule Hannover) in einem Jobin Yvon Dichrograph III-Spektrometer bei Wellenlängen von 195 bis 245 nm mit einer Bandweite von 2 nm, einer Meßgeschwindigkeit von 0,03 nm/s und einer Zeitkonstante von 2 s durchgeführt. Die Probenkonzentrationen betragen zwischen 0,5 und 1 mg/ml und als Puffer wurde PBS verwendet. Dabei wurde darauf geachtet, daß das PBS frei von Verunreinigungen war und keine Absorption zwischen 205 und 250 nm aufwies.

Bestimmte Sekundärstrukturen ergeben in diesen Messungen charakteristische Spektren. Deren Anteil in einem neu aufgenommenen Spektrogramm können durch computerunterstützte Analyse mit Hilfe von Vergleichspektren bestimmt werden. Eine solche Auswertung der Spektren erfolgte durch CDPro Software unter Verwendung des erweiterten Referenzsatzes von Proteinspektren (Sreerama und Woody, 2000).

## 2.8.5 Hitzedenaturierung

Zur Überprüfung, ob bestimmte Proteine empfindlich gegenüber irreversibler Hitzedenaturierung sind, wurden sie in kochendem Wasser erhitzt. Zu diesem Zweck wurden 10 µg des zu untersuchenden Proteins und 0,1 mg GST in 100 µl PBS in ein Mikroreaktionsgefäß pipettiert. Dieses wurde fest verschlossen, für 5 Minuten in einem sprudelnd kochenden Wasserbad inkubiert und anschließend für fünf Minuten in einer -10 °C kalten Kältemischung aus NaCl und Eiswasser schockgekühlt. Die Proben wurden für 10 Minuten bei 45.000 UpM ( $125.900 \times g_{\max}$ ) in einem TLA45-Rotor zentrifugiert. Überstand und resuspendiertes Pellet wurden durch SDS-PAGE und Coomassiefärbung analysiert.

## 2.9 Bindungsexperimente

### 2.9.1 GST-Bindungsexperimente

Zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen *in vitro* wurden Bindungsexperimente mit GST-Fusionsproteinen durchgeführt, die an GSH-Sepharose immobilisiert waren. Je nach Fragestellung und vorliegenden Proben variierten die Bedingungen leicht. Für Bindungsexperimente mit aufgereinigten Proteinen enthielten die

50 µl Inkubationsansätze 6 - 10 pmol des zu bindenden Proteins in GBP mit 0,1 % Triton X-100 und 0,05 % BSA zur Verhinderung von unspezifischen Wechselwirkungen sowie 1 mM DTT. Diese Ansätze wurden mit 10 µl GSH Sepharose inkubiert, die zuvor mit einem Überschuß des jeweiligen GST-Fusionsproteins inkubiert worden waren. Zur leichteren Handhabung wurden zusätzlich 10 µl Sepharose CL-4B zugegeben. Nach dem Mischen wurden die Proben unter gelegentlichem Resuspendieren für 45 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze für zwei Minuten bei 10.500 UpM ( $10.600 \times g_{\max}$ ) im A-8-11-Rotor zentrifugiert und die Überstände abgenommen. Die Pellets wurden zweimal durch Resuspendieren in 1 ml GBP und erneutes Abzentrifugieren gewaschen. Im ersten Waschschrift wurden die resuspendierten Ansätze zusätzlich mit 50 µl 10 % Sucrose in GBP unterschichtet. Schließlich wurde die Sepharose mit den gebundenen Proteinen in 50 µl PBS resuspendiert und ebenso wie die Überstände durch SDS-PAGE und Coomassiefärbung sowie Westernblot analysiert. Als Kontrollen dienten Ansätze, in denen statt der GST-Fusionsproteine GST verwendet wurde.

Insbesondere wenn in den Experimenten die Bindungseffizienzen verschiedener Proteine an denselben Partner verglichen werden sollten, wurden besonders reine, zusätzlich gefilterte Proben eingesetzt und darauf geachtet, daß sie in gleichen molaren Konzentrationen vorlagen.

Für Bindungsexperimente aus Zytosol wurden 30 µl GSH-Sepharose mit dem jeweils gebundenen Fusionsprotein und 100 µl Zytosol in GBP eingesetzt. In Experimenten, die dazu dienten unbekannte Bindungspartner der ENTH-Domäne zu identifizieren, enthielt ein Ansatz 30 µl Trägermatrix und 1 ml Zytosol, Tris- oder Tritonextrakt in GBP (im Fall von Zytosol und Trisextrakt zusätzlich mit 0,1 % Triton X-100). In diesen Experimenten wurde das Sepharosepellet nach dem Waschen in 100 µl PBS resuspendiert.

## 2.9.2 Liposomenbindungsexperimente

Zur Bestimmung der Affinität für Phosphoinositide wurden Bindungsexperimente mit synthetischen phospholipidhaltigen Liposomen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die Dipalmitoylderivate von Phosphatidylinositol und allen sieben natürlich vorkommenden Phosphoinositiden in Konzentrationen von 0,1 mg/ml in Methanol : Chloroform : Wasser im Verhältnis 2 : 1 : 0,8 gelöst. In einem 50 x 12 mm Glasröhrchen wurden zu je 50 µl einer Lipidmix-Stammlösung aus 6 mg/ml Phospha-

tidylcholin, 2,5 mg/ml Phosphatidylethanolamin und 1 mg/ml Cholesterin in Chloroform 50 µl dieser Phosphoinositidverdünnung gegeben. Die Lösungsmittel des Lipidgemischs wurden unter einem kontinuierlichen Stickstoffstrom bis zum Trocknen abgedampft und für ca. drei Stunden im evakuierten Exsikkator nachgetrocknet. Auf den Lipidfilm wurden 500 µl GBP mit 1 mM DTT gegeben. Nach mehrmaligem intensiven Mischen auf dem Vortex wurden die Ansätze über Nacht zum Quellen des Lipidfilms bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneuter Behandlung mit dem Vortex wurden die Liposomen für ca. 10 Minuten mit dem Branson Sonifier 250 bei einer Ausgangsleistung von 10 % und Intervallen von 20 % sonifiziert bis die Lösung annähernd klar war. Die so gewonnenen Liposomen enthielten 5 Gewichtsprozent des angegebenen Phosphoinositids in einer Grundlipidmischung aus Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin und Cholesterin im Gewichtsverhältnis 6 : 2,5 : 1 und waren über mehrere Wochen bei 4 °C stabil.

Für Bindungsexperimente wurden die Liposomen in Mikroreaktionsgefäßen für 10 Minuten bei 16.400 UpM ( $25.000 \times g_{\max}$ ) in einem FA45-24-11-Rotor abzentrifugiert und mit einer Konzentration von 1 mg/ml in Liposomenbindungspuffer resuspendiert. Jeweils 25 µg Liposomen wurden mit 20 pmol des zu testenden Proteins und 25 µg fettfreiem BSA in 50 µl Liposomenbindungspuffer mit 1 mM DTT gemischt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze für 10 Minuten bei 16.400 UpM ( $25.000 \times g_{\max}$ ) im FA45-24-11-Rotor abzentrifugiert. Die Überstände wurden abgenommen, die Pellets in 50 µl PBS resuspendiert und alle Proben durch SDS-PAGE und Westernblot analysiert. Es wurden jeweils drei unabhängige Experimente durchgeführt, die Bandenintensitäten densitometrisch ausgewertet und die Ergebnisse gemittelt. Die Fehlerbereiche wurden durch Bestimmung der Standardabweichungen berechnet. Zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse erfolgte die Auftragung wie in (Itoh *et al.*, 2001).

### 2.9.3 Zusammenlagerung von Clathrinkäfigen

Um zu prüfen, ob ein Protein in der Lage ist, unter physiologischen Bedingungen die Zusammenlagerung von Clathrin zu Käfigen zu fördern, wurden Clathrinkäfige, deren Herstellung in Abschnitt 2.7.3 beschrieben wurden, durch Zentrifugation für 30 Minuten bei 45.000 UpM ( $125.900 \times g_{\max}$ ) in einem TLA45-Rotor pelletiert. Durch Resuspendieren in 0,5 M Tris·HCl (pH 7,0) zerfielen die Käfige in einzelne Triskelia. Diese wurden über eine PD-10-Säule in 10 mM Tris·HCl (pH 8,0) umgepuffert und

nach Zugabe eines neuntel Volumens zehnfach GBP für 30 Minuten auf Eis vorinkubiert. Um den Anteil Clathrin, der in diesem Puffer spontan zur Aggregation neigt, abzutrennen, wurde der Ansatz für 30 Minuten bei 45.000 UpM ( $125.900 \times g_{\max}$ ) im TLA45-Rotor abzentrifugiert. In 100  $\mu$ l Ansätzen in GBP wurden 0,3 mg/ml Clathrin und ein zweifacher molarer Überschuß des zu testenden Proteins eingesetzt. Die Proben wurden für eine Stunde auf Eis inkubiert und in zwei Aliquots zu je 50  $\mu$ l aufgeteilt, die für 20 Minuten bei 45.000 UpM ( $125.900 \times g_{\max}$ ) im TLA45-Rotor pelletiert wurden. Nachdem von einem Aliquot der Überstand abgenommen und das Pellet in 50  $\mu$ l PBS resuspendiert worden war, konnten die Proben durch SDS-PAGE und Coomassiefärbung analysiert werden.

Zur Überprüfung, ob durch die Inkubation tatsächlich Clathrinkäfige entstanden waren, wurde das zweite Aliquot mit Uranylacetat negativkontrastiert und im Elektronenmikroskop untersucht. Zu diesem Zweck wurde das Pellet in Puffer A resuspendiert und auf Parafilm pipettiert. Ein dünner Kohlefilm, der auf frisch gespaltenen Glimmer aufgedampft worden war, wurde auf den Tropfen gleiten gelassen. Nach einer Minute, in der die Käfige an den Graphitfilm adhäreren konnten, wurde dieser auf einen Tropfen mit 1 % Uranylacetat übertragen und mit einem zuvor mit Natriumethanolat depassivierten Kupfernetzchen aufgenommen. Das Überschüssige Uranylacetat wurde mit einem feuchten Filterpapier abgezogen und das Präparat getrocknet. Anschließend wurde es in einem Philips EM-301 betrachtet und fotografiert.

#### 2.9.4 Mikrotubulibindungsexperimente

Zur Untersuchung der Bindung an assemblierte Mikrotubuli wurden 150  $\mu$ g phosphozellulosegereinigtes Tubulin bei einer Konzentration von 4 mg/ml in PEM-Puffer mit 1 mM GTP und 20  $\mu$ M Taxol für 30 Minuten bei 37 °C polymerisiert. Die gebildeten und stabilisierten Mikrotubuli wurden für 20 Minuten bei 45.000 UpM ( $125.900 \times g_{\max}$ ) in einem TLA45-Rotor abzentrifugiert und in 125  $\mu$ l Mikrotubulibindungspuffer resuspendiert. Jeweils 30  $\mu$ g der Mikrotubuli wurden in 50  $\mu$ l-Ansätzen mit 15  $\mu$ g der GST-Fusionsproteine, die auf ihre Bindung an Mikrotubuli hin untersucht werden sollten, in Mikrotubulibindungspuffer für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze mit 50  $\mu$ l 10 % Sucrose in Mikrotubulibindungspuffer unterschichtet und für 20 Minuten bei 45.000 UpM ( $125.900 \times g_{\max}$ ) im TLA45-Rotor abzentrifugiert. Die Überstände wurden abgenom-

men und zusammen mit den Pellets, die in 100 µl Wasser resuspendiert wurden, durch SDS-PAGE und Coomassiefärbung analysiert.

## 2.10 Arbeiten mit kultivierten eukaryotischen Zellen

### 2.10.1 Immunfluoreszenzmarkierung

Zur Untersuchung der subzellulären Verteilung von Proteinen in kultivierten Säugetierzellen wurden diese mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern inkubiert. Dazu wurden 24 Stunden vor der Fixierung in 2 ml Medium  $6 \times 10^4$  HeLa SS6-, MDBK- oder Caco 2-Zellen in 35 mm-Zellkulturschalen ausgesät, die zuvor mit jeweils vier in 70 %igem Ethanol desinfizierten Deckgläschen ausgelegt worden waren. Anschließend wurden die Zellen bis zum Experiment bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

Die Zellen wurden immunmarkiert, wenn sie zu ca. 80% konfluent waren. Vor der Behandlung wurden sie zunächst fixiert. Zu diesem Zweck wurden die Zellen dreimal durch Absaugen des Überstandes und Zugeben von 2 ml PBS gewaschen, für zehn Minuten bei Raumtemperatur mit 2 ml 4 % PFA in PBS fixiert und drei weitere Male mit PBS gewaschen. Zur Neutralisation von evtl. verbleibendem Formaldehyd wurden die Zellen anschließend für fünf Minuten mit 2 ml TBS behandelt und kurz mit PBS gespült. Zur Permeabilisierung wurden 2 ml 0,5 % Triton X-100 in PBS auf die Zellen pipettiert und für fünf Minuten stehen gelassen. Anschließend wurde wiederum dreimal mit PBS gewaschen. Zur Immunmarkierung wurde eine feuchte Kammer mit Parafilm ausgelegt, darauf 20 µl der Antikörperverdünnung pipettiert und jeweils ein Deckgläschen mit den Zellen nach unten auf diesen Tropfen gelegt. Die feuchte Kammer wurde nun für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Auf diese Weise wurden die Deckgläschen nacheinander mit dem primären und einem gegen das Primär-IgG gerichteten und mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten sekundären Antikörper inkubiert. Zwischen und nach den Inkubationen wurden die Deckgläschen nacheinander in drei 50 ml-Bechergläsern mit PBS gespült und schließlich unter Verwendung von *Prolong Antifade* auf Objektträgern montiert. Nach dem Trocknen wurden die Zellen in einem Nikon Eclipse E800 Mikroskop mit Epi-Fluoreszenz betrachtet und unter Verwendung einer Princeton Instruments CCD-Kamera und IPLab 3.2.4 Software fotografiert.

### 2.10.2 Behandlung von Zellen mit Brefeldin A

Zur Untersuchung des Einflusses von Arf1 bei der Rekrutierung von Proteinen an das TGN, wurden HeLa SS6- und MDBK-Zellen wie zur herkömmlichen Immunfluoreszenzmarkierung vorbehandelt. Vor der Fixierung jedoch wurden die Zellen einmal mit frischem Medium gewaschen und für zwei bis fünf Minuten bei 37 °C mit 2 µg/ml Brefeldin A in Medium inkubiert. Anschließend wurden sie dreimal mit PBS gewaschen und wie in Abschnitt 2.10.1 beschrieben fixiert und immunfluoreszenzmarkiert. Zur Überprüfung, ob der Effekt reversibel war, wurden die Zellen vor der Fixierung für eine Stunde bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> mit Medium inkubiert.

### 2.10.3 Transfektion von eukaryotischen Zellen

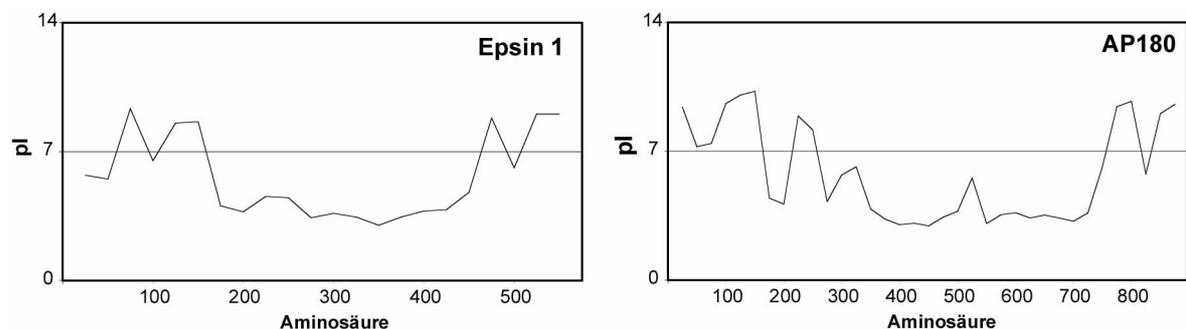
Zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation einzeln exprimierter Protein-domänen, wurden HeLa SS6-Zellen mit Expressionsplasmiden transfiziert, die auf pEGFP-N3-Vektoren basieren und für GFP-Fusionsproteine kodieren. Zu diesem Zweck wurden je  $6 \times 10^4$  Zellen 24 Stunden vor der Transfektion in eine 35 mm-Schale mit vier zuvor in 70 % Ethanol sterilisierten Deckgläschen ausgesät. Für diese Experimente wurde nur DNA verwendet, die zuvor mit Qiagen *EndoFree Plasmid Maxiprep Kits* aufgereinigt worden war. Die Transfektion wurde mit 1 µg DNA unter Verwendung von *Superfect Transfection Reagent* von Qiagen unter Beachtung der Herstellervorschriften durchgeführt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Hydrodynamische Eigenschaften von Epsin 1 und AP180

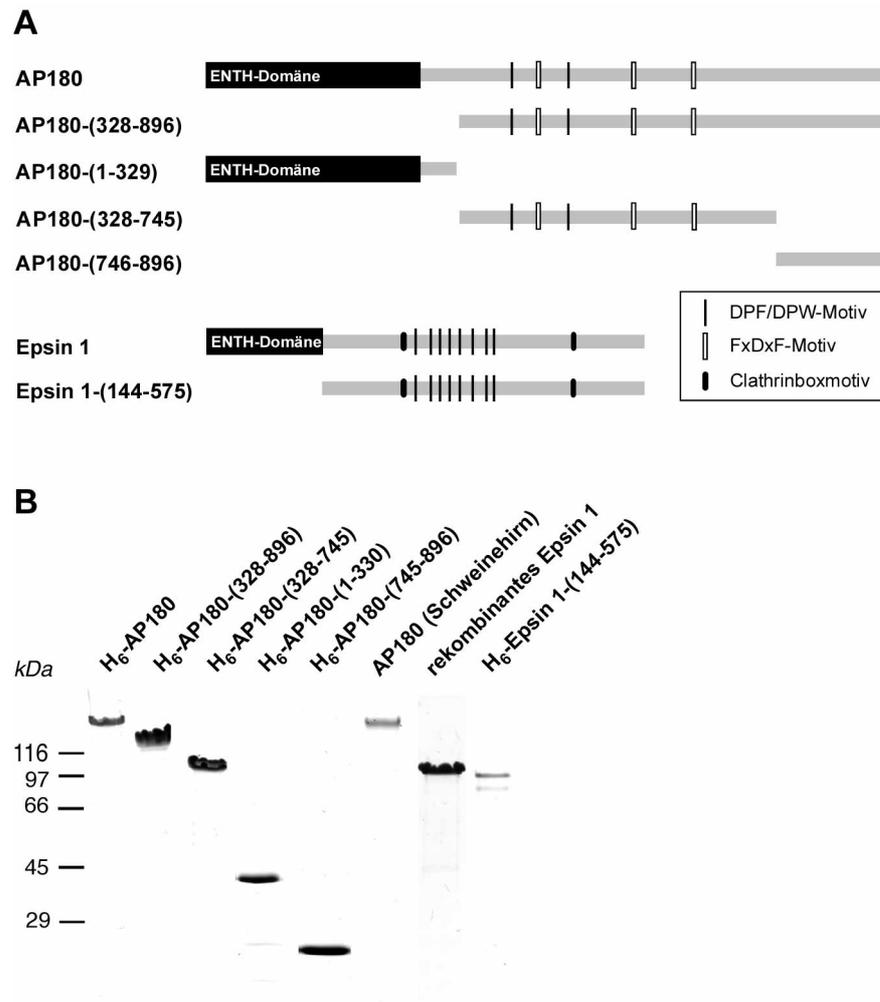
Epsin 1 und AP180 sind an der Bildung von clathrinbedeckten Vesikeln beteiligt und scheinen Bindeglieder zwischen Phosphoinositiden in der Membran einerseits und Hüllkomponenten wie Clathrin und AP-2 andererseits darzustellen. Dabei wird die Lipidinteraktion von den aminoterminalen ENTH-Domänen vermittelt, die in verschiedenen Kristallisationsstudien untersucht wurden und deren Raumstruktur bekannt ist (Ford *et al.*, 2002; Ford *et al.*, 2001; Hyman *et al.*, 2000; Mao *et al.*, 2001). Der übrige Bereich bei beiden Proteinen, der für alle bislang bekannten Proteinwechselwirkungen verantwortlich ist, wurde dagegen bislang biophysikalisch kaum untersucht.

Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen von Epsin 1 und AP180 zeigt, daß beide Proteine über die Homologie im Bereich der ENTH-Domäne hinaus eine Reihe von Auffälligkeiten verbindet. Beide Proteine weisen in den strukturell bislang uncharakterisierten Abschnitten, die carboxyterminal von den ENTH-Domänen angeordnet sind, zahlreiche Protein-Protein-Interaktionsmotive auf. Es sind diese Abschnitte der Proteine, die wichtig sind für ihre Bindungen an Clathrin, AP-2 und im Falle von Epsin 1 auch an Eps15. Auffällig ist darüber hinaus, daß auch Epsin 1, wie es bereits zuvor für AP180 beschrieben wurde, in diesem Bereich besonders reich an polaren und geladenen Aminosäureresten ist. Beide Proteine haben einen auffallend sauren mittleren Abschnitt und eine basische Region am Carboxyterminus (Abbildung 3.1).



**Abbildung 3.1** Verteilung saurer und basischer Bereiche über die Sequenzen von Epsin 1 und AP180. Aus der Aminosäurezusammensetzung wurde in 25er Schritten über jeweils 50 Aminosäuren der isoelektrische Punkt berechnet und gegen die Position in der Aminosäuresequenz aufgetragen. Es ist deutlich zu erkennen, daß sowohl Epsin 1 als auch AP180 einen deutlich sauren mittleren Bereich und einen leicht basischen carboxyterminalen Bereich besitzen.

Insbesondere aufgrund des ausgedehnten sauren Bereichs bindet Epsin 1 ebenso wie AP180 vergleichsweise schlecht SDS. Dies führt zu einem abnormalen Migrationsverhalten in der SDS-PAGE, so daß die Banden leicht verzerrt wirken und die apparente Molmasse deutlich höher als die tatsächliche ist (Morris *et al.*, 1993). Während AP180, das nach seiner Aminosäurezusammensetzung zu urteilen ca. 91 kDa groß ist, sich wie ein ca. 180 kDa schweres Protein verhält, migriert das gut 60 kDa große Epsin 1 bei etwa 105 kDa (Abbildung 3.2 B).

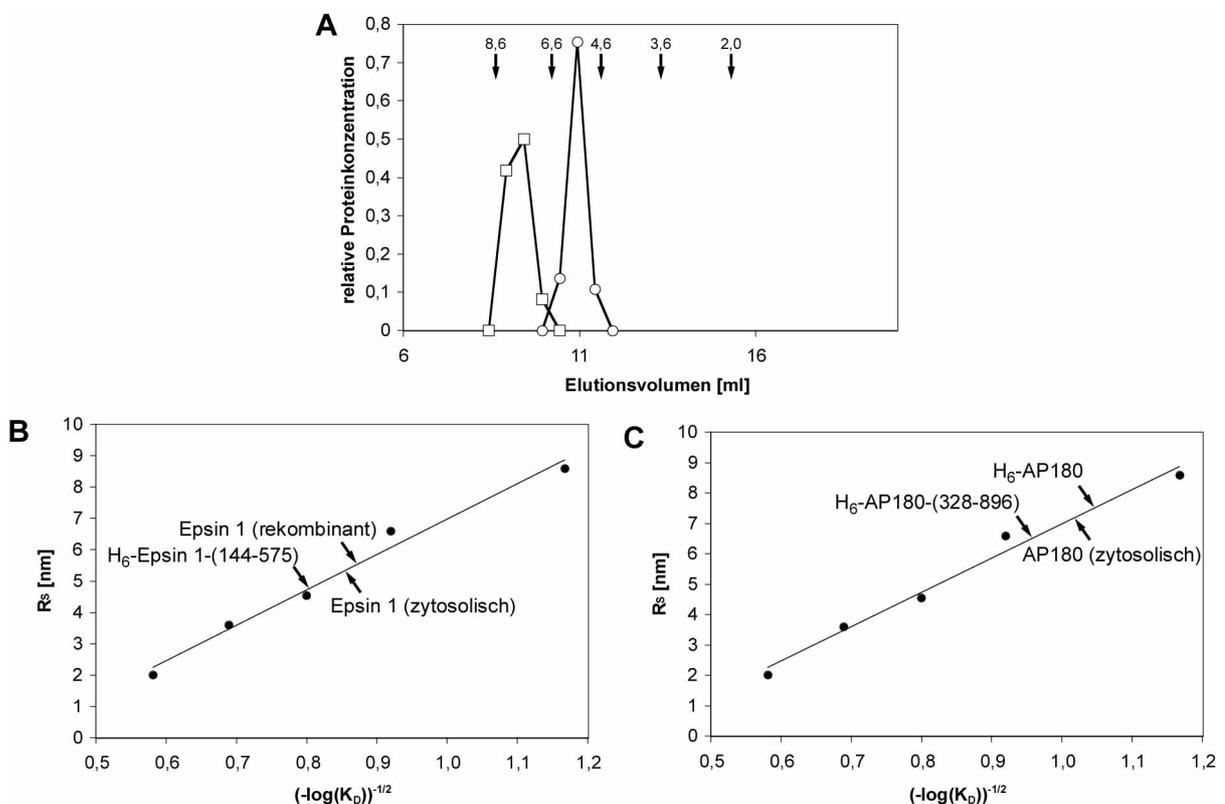


**Abbildung 3.2** Schematische Übersicht über die Domänenstrukturen von Epsin 1 und AP180 sowie die für diese Studie verwendeten rekombinant exprimierten Fragmente (A). B: Coomassiegefärbtes SDS-Polyacrylamidgel aller Fragmente, die für die biophysikalischen Untersuchungen eingesetzt wurden.

### 3.1.1 Analytische Gelfiltration

Bei der Aufreinigung von rekombinantem Epsin 1 fiel weiterhin auf, daß es gemeinsam mit ungleich größeren Proteinen von Gelfiltrationssäulen eluiert. Um zu testen, ob sich zytosolisches Epsin 1 und möglicherweise auch AP180 ähnlich verhalten, wurde Schweinehirnzytosol durch eine Superdex 200 Gelfiltrationssäule auf-

getrennt, fraktioniert und analysiert (Abbildung 3.3 A). Die Quadratwurzeln der negativen dekadischen Logarithmen der Verteilungskoeffizienten ( $K_D$ ) von Makromolekülen bei einer solchen Gelfiltration sind linear abhängig von deren Stokes-Radien ( $R_S$ ) (Laurent und Killander, 1964). Unter Verwendung dieser Beziehung und einer Reihe von Proteinstandards mit bekannten Stokes-Radien wurde eine Kalibrationsgerade erstellt, mit deren Hilfe sich die entsprechenden Größen für Epsin 1 und AP180 ermitteln ließen. Mit Werten von  $R_S = 5,3$  nm für Epsin 1 und  $R_S = 7,5$  nm für AP180 besitzen beide Proteine hydrodynamische Radien, die eigentlich charakteristisch sind für erheblich größere globuläre Proteine mit Molekülmassen von 230 bzw. 550 kDa (Abbildungen 3.3 B und C und Tabelle 3.1).



**Abbildung 3.3** Analytische Gelfiltration mit einer kalibrierten Superdex 200-Säule. A: Die Elutionsprofile von Epsin 1 (O) und AP180 (□) in Schweinehirnzytosol ermittelt durch Westernblotanalyse der eluierten Fraktionen. Am oberen Rand sind die Stokes Radien der verwendeten Standardproteine an der Stelle ihrer jeweiligen Elutionsmaxima angegeben. B und C: Kalibrationsgeraden zur Ermittlung der hydrodynamischen Radien von Epsin 1, AP180 und Fragmenten beider Proteine. Die Stokes Radien von fünf Standardproteinen wurden gegen die Quadratwurzeln der negativen dekadischen Logarithmen ihrer Verteilungskoeffizienten bei der Gelfiltration aufgetragen. Die entsprechenden Werte für Epsin 1, AP180 und die Fragmente ohne die ENTH-Domänen sind durch Pfeile markiert. Die so ermittelten Stokes Radien sind außergewöhnlich groß. Die Beobachtung, daß auch die Fragmente ohne die ENTH-Domänen nicht viel kleiner erscheinen, legt nahe, daß die physikalischen Eigenschaften dieser Bereiche in Epsin 1 und AP180 für die ungewöhnlich großen hydrodynamischen Radien der Gesamtproteine verantwortlich sind.

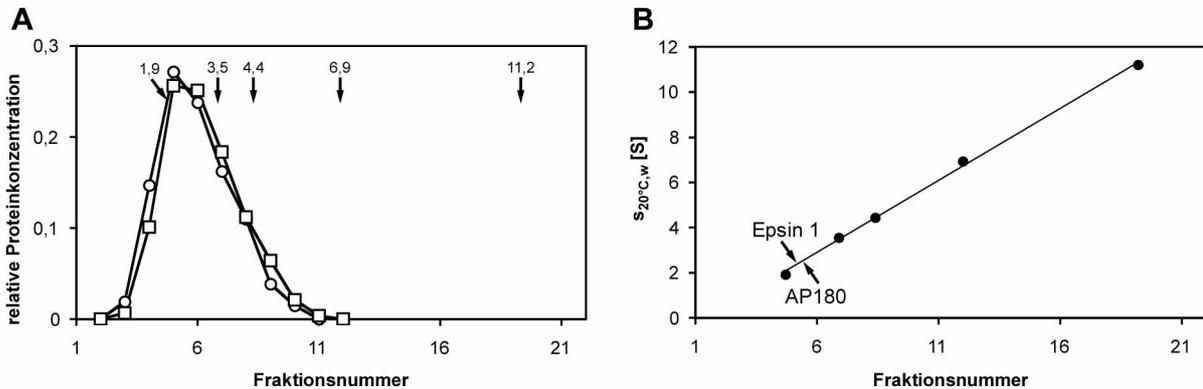
Die beobachteten hydrodynamischen Eigenschaften lassen sich entweder dadurch erklären, daß Epsin 1 und AP180 oligomerisieren, im Komplex mit anderen zytosolischen Komponenten vorliegen, eine ausgestreckte stabähnliche Form haben oder daß sie über größere Bereiche keine kompakt gefaltete Struktur besitzen. Um die Möglichkeit auszuschließen, daß zytosolisches Epsin 1 und AP180 im Komplex mit anderen zytosolischen Proteinen eluieren und dies der Grund für die großen gemessenen Stokes-Radien ist, wurden rekombinantes Epsin 1 und H<sub>6</sub>-AP180 aufgereinigt und ebenfalls durch analytische Gelfiltration untersucht. In beiden Fällen waren die Ergebnisse denen, die mit zytosolischen Proteinen erhalten wurden, sehr ähnlich (Abbildungen 3.3 B und C und Tabelle 3.1).

Da die Struktur der ENTH-Domänen bekannt war und es sich bei beiden Proteinen um kompakte  $\alpha$ -helikale Strukturen handelt, war anzunehmen, daß für die außergewöhnlichen hydrodynamischen Eigenschaften die carboxyterminalen Bereiche verantwortlich sind. Daher wurden die rekombinant exprimierten Fragmente H<sub>6</sub>-Epsin 1-(144-575) und H<sub>6</sub>-AP180-(328-896), denen die ENTH-Domänen fehlen, ebenfalls durch Gelfiltration analysiert. Die Messungen zeigen, daß die Stokes-Radien der aminoterminal verkürzten Fragmente nur unwesentlich kleiner sind als die der vollständigen Proteine (Abbildungen 3.3 B und C und Tabelle 3.1). Tatsächlich scheint also das hydrodynamische Verhalten von Epsin 1 und AP180 durch die strukturelle Organisation Ihrer carboxyterminalen Segmente dominiert zu werden.

### 3.1.2 Sedimentationseigenschaften von Epsin 1 und AP180

Um zu überprüfen, ob die beobachteten großen Stokes-Radien die Folge einer möglichen Oligomerisierung sind, wurden die Sedimentationseigenschaften von Epsin 1 und AP180 durch Ultrazentrifugation untersucht. Schweinehirnzytosol wurde wie in Abschnitt 2.8.2 beschrieben auf einen linearen 5-20 %igen Sucrosegradienten aufgetragen und zentrifugiert. Der Gradient wurde anschließend fraktioniert und durch Westernblot auf die Verteilung von Epsin 1 und AP180 untersucht (Abbildung 3.4 A). Auch hier dienten auf einen parallelen Gradienten aufgetragene Proteine mit bekannten Sedimentationskoeffizienten ( $s_{20^{\circ}\text{C},\text{W}}$ ) als Standards. Die Auftragung Ihrer  $s_{20^{\circ}\text{C},\text{W}}$ -Werte gegen die Fraktionsnummer mit ihrem Verteilungsschwerpunkt ergab eine Gerade, die zur Kalibration verwendet wurde. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, daß die Sedimentationskoeffizienten von Epsin 1 und AP180 mit 2,4 bzw. 2,5 für Proteine ihrer Molekülmasse außergewöhnlich niedrig sind (Abbildung 3.4 B

und Tabelle 3.1). Die Messungen zeigen, daß beide Proteine einen sehr hohen Reibungskoeffizienten besitzen.



**Abbildung 3.4** Sucroседichtegradientenzentrifugation von Epsin 1 und AP180 in Schweinehirnzytosol. A: Verteilungsprofile von Epsin 1 (O) und AP180 (□) über den 5-20%-Sucrosegradienten, ermittelt durch Westernblotanalyse des fraktionierten Gradienten. Am oberen Rand sind die Sedimentationskoeffizienten der verwendeten Standardproteine an der Stelle ihrer jeweiligen Verteilungsmaxima angegeben. B: Kalibrationsgerade zur Ermittlung der Sedimentationskoeffizienten von zytosolischem Epsin 1 und AP180. Die  $s_{20^\circ\text{C,w}}$ -Werte von fünf Standardproteinen wurden gegen die Fraktion mit ihrem Verteilungsschwerpunkt aufgetragen. Die entsprechenden Werte für Epsin 1 und AP180 sind mit Pfeilen markiert. Die ermittelten Sedimentationskoeffizienten sind außerordentlich niedrig, was dafür spricht, daß beide Proteine entweder entfaltet sind oder sehr ausladende Konformationen haben.

Durch Einsetzen der gemessenen Stokes-Radien und Sedimentationskoeffizienten in die Svedberg-Gleichung 
$$s = \frac{M(1 - \bar{V}\rho_L)}{N_A 6\pi\eta R_s}$$
 (wobei M die Molmasse,  $\bar{V}$  das partielle spezifische Volumen des Proteins,  $\rho_L$  die Dichte des Lösungsmittels,  $N_A$  die Avogadrozahl und  $\eta$  die Viskosität der Lösung darstellen) ist es möglich, die Molekülmassen der untersuchten Proteine abzuschätzen. Für Epsin 1 wurde dabei eine Masse von rund 60 kDa und für AP180 eine Masse von rund 90 kDa errechnet. Diese Werte legen nahe, daß beide Proteine im Zytosol tatsächlich überwiegend als Monomer vorliegen.

Zur direkten Bestimmung Ihrer Molekülmassen wurden hoch aufgereinigtes rekombinantes Epsin 1, H<sub>6</sub>-AP180 sowie die Fragmente ohne die ENTH-Domänen, H<sub>6</sub>-Epsin 1-(144-575) und H<sub>6</sub>-AP180-(328-896), durch Sedimentations-Diffusions-Gleichgewichtszentrifugation in einer analytischen Ultrazentrifuge untersucht. Die Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Professor Claus Urbanke (Abteilung für Biophysikalische Chemie, Medizinische Hochschule Hannover) durchgeführt. Die erhaltenen Daten zeigen, daß alle untersuchten Proteine zum größten Teil Monomere sind (ohne Abbildung).

Darüber hinaus wurden in einer Sedimentationsgeschwindigkeitsmessung auch die Sedimentationskoeffizienten der rekombinant exprimierten Proteine und Proteinfragmente bestimmt. Die erhaltenen Werte sind ähnlich niedrig, wie die zuvor durch Dichtegradientenzentrifugation für die zytosolischen Proteine gemessenen. Die Messungen wurden in An- und Abwesenheit des stark denaturierend wirkenden chaotropen Salzes Guanidiniumchlorid durchgeführt. Dabei beeinflusste die Denaturierung nur sehr geringfügig die Sedimentationseigenschaften (Tabelle 3.1).

Die durch Dichtegradienten- und Analytische Ultrazentrifugation gewonnenen Daten zeigen, daß die carboxyterminalen Bereiche von Epsin 1 und AP180 ausge dehnte Strukturen besitzen und die beobachteten großen hydrodynamischen Radien nicht auf Selbstassoziation zurückzuführen sind. Die gemessenen Reibungskoeffizienten sind konsistent entweder mit einer stabähnlichen Struktur mit einer Dicke von 1,5 bis 2 nm und einer Länge von rund 50 nm oder mit einer nahezu ungefalteten Polypeptidkette.

Protein	Methode					
	berechnet aus Amino- säurezusam- mensetzung	Analytische Gelfiltration	Dichtegra- dientenzen- trifugation	Analytische Ultrazentrifugation		
				nativ		denat.
				M	$R_s$	$s_{20^\circ\text{C},\text{W}}$
[kDa]	[nm]	[S]	[nm]	[S]	[S]	
Epsin 1 (zytosolisch)	60,2	$5,3 \pm 0,6$	$2,4 \pm 0,6$	n.b.	n.b.	n.b.
Epsin 1 (rekombinant)	64,6	$5,5 \pm 0,1$	n.b.	4,6	3,4 <sup>a</sup>	2,8 <sup>b</sup>
H <sub>6</sub> -Epsin 1-(144-575)	45,8	$4,8 \pm 0,1$	n.b.	4,1	2,7	2,6 <sup>b</sup>
AP180 (zytosolisch)	91,4	$7,5 \pm 0,8$	$2,5 \pm 0,6$	n.b.	n.b.	n.b.
H <sub>6</sub> -AP180	93,3	$7,2 \pm 0,2$	n.b.	5,9	3,4	n.b.
H <sub>6</sub> -AP180-(328-896)	57,4	$6,5 \pm 0,1$	n.b.	5,2	2,4 <sup>c</sup>	2,1 <sup>d</sup>

<sup>a</sup> Verteilung von  $s_{20^\circ\text{C},\text{W}}$ -Werten zwischen 3,0 und 3,8 S.

<sup>b</sup> In 5 M Guanidiniumchlorid gemessen.

<sup>c</sup> Verteilung von  $s_{20^\circ\text{C},\text{W}}$ -Werten zwischen 2,1 und 2,8 S.

<sup>d</sup> In 6 M Guanidiniumchlorid gemessen.

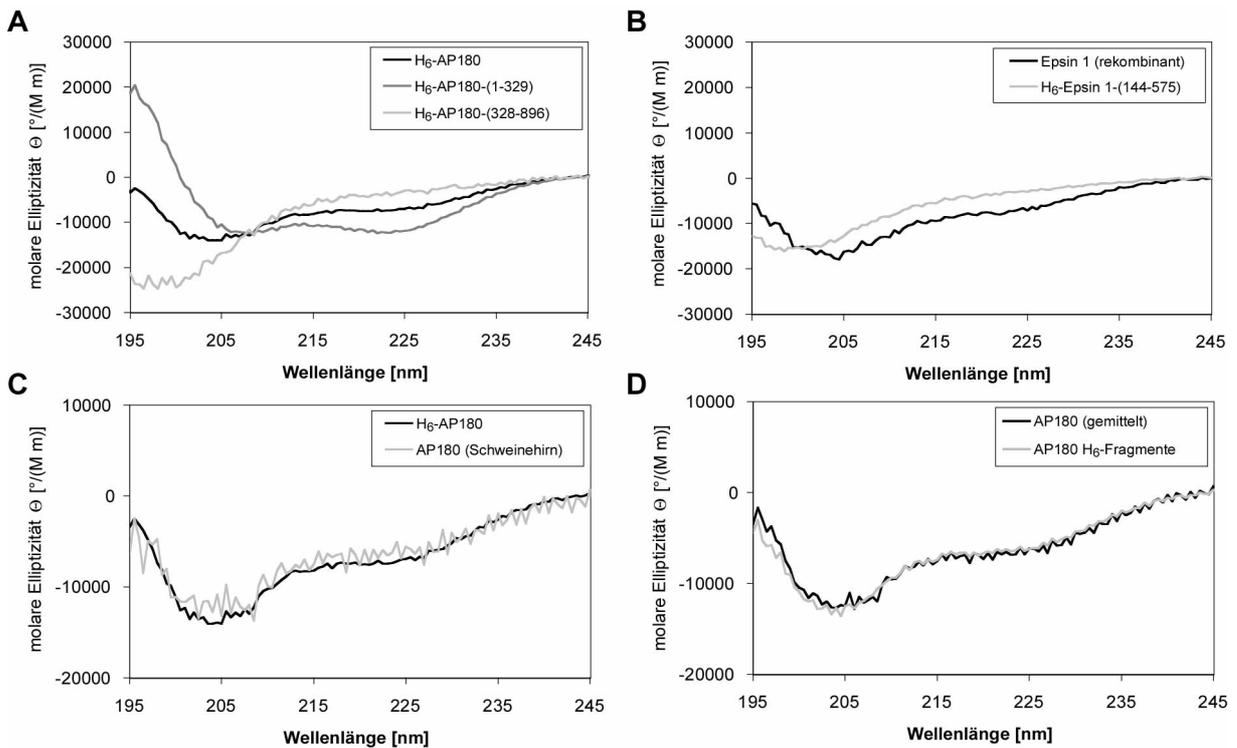
**Tabelle 3.1** Hydrodynamische Eigenschaften von Epsin 1, AP180 und Fragmenten ohne die ENTH-Domänen. Die Tabelle gibt eine Übersicht über die mit verschiedenen Methoden bestimmten Werte. Die Molekülmassen in der zweiten Spalte wurden aus den bekannten Aminosäurezusammensetzungen berechnet. Die letzten beiden Spalten zeigen einen Vergleich der  $s_{20^\circ\text{C},\text{W}}$ -Werte in Gegenwart bzw. Abwesenheit von Guanidiniumchlorid. Die durch Analytische Ultrazentrifugation bestimmten Sedimentationskoeffizienten haben Fehler <5%. n.b., nicht bestimmt.

## 3.2 Sekundärstrukturanalyse von Epsin 1 und AP180

### 3.2.1 Circular dichroismusspektroskopie

Während die hydrodynamischen Analysen von Epsin 1 und AP180 zeigen konnten, daß die carboxyterminalen Bereiche ohne die ENTH-Domänen ausge dehnte Strukturen besitzen, lassen die Methoden keine Rückschlüsse darauf zu, ob es sich um regelmäßig gefaltete, ausgestreckte Formen wie etwa stabähnliche *coiled coil* Domänen handelt, oder ob die Polypeptidketten ungefaltete, sogenannte Statistische Knäuel sind. Um diese Möglichkeiten unterscheiden zu können, wurden Epsin 1 und AP180 sowie einige Fragmente beider Proteine durch Circular dichroismusspektroskopie (CD-Spektroskopie) im fernen UV-Bereich (ca. 190 bis 250 nm) analysiert. Bestimmte Sekundärstrukturanteile verursachen bei diesen Messungen charakteristische Spektren, so daß sich durch computergestützte Analyse des Spektrums einer Proteinprobe unter Verwendung von Referenzdaten deren Sekundärstrukturanteile bestimmen lassen. Die Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Professor Jürgen Alves (Abteilung für Biophysikalische Chemie, Medizinische Hochschule Hannover) durchgeführt.

Insgesamt sind die Spektren von rekombinant exprimiertem Epsin 1 und von H<sub>6</sub>-AP180 sehr ähnlich (vgl. schwarze Kurven in Abbildungen 3.5 A und B). Beide zeigen typische Charakteristika eines gewissen  $\alpha$ -Helixanteils, werden aber offenbar dominiert durch einen hohen Gehalt von statistisch orientierten Polypeptidketten. Eine Auswertung unter Verwendung von CDPro Software ergab einen  $\alpha$ -Helixgehalt von 21 % für Epsin 1 und von 22 % für AP180. Spektren der Fragmente H<sub>6</sub>-Epsin 1-(144-575) und H<sub>6</sub>-AP180-(328-896), denen die ENTH-Domänen fehlen, zeigen praktisch keine Anzeichen von  $\alpha$ -Helix mehr (hellgraue Kurven in Abbildung 3.5 A und B). Der berechnete Anteil an der Gesamtstruktur beträgt nur noch 6 bzw. 5 %. Der Gehalt von Statistischem Knäuel dagegen ist mit 66 % im Falle des Epsin- und mit 84 % im Falle des AP180-Fragments ausgesprochen hoch. Im Gegensatz dazu hat das Fragment H<sub>6</sub>-AP180-(1-329), das die ENTH-Domäne enthält, einen  $\alpha$ -Helixanteil von 42 %. Fast der komplette  $\alpha$ -helikale Anteil an der Gesamtstruktur ist daher auf die ENTH-Domäne zurückzuführen (Abbildung 3.5 A).



**Abbildung 3.5** CD-Spektroskopie von Epsin 1, AP180 und Fragmenten beider Proteine im ferneren UV-Bereich. A und B: Vergleich der Spektren von rekombinant exprimiertem Epsin 1 und  $H_6$ -AP180 mit Fragmenten beider Proteine. Während die vollständigen Proteine noch deutlich Charakteristika von  $\alpha$ -Helixanteilen aufweisen (Minima bei ca. 208 und 222 nm und ein Maximum unterhalb von 200 nm), haben die Fragmente  $H_6$ -Epsin 1-(144-575) und  $H_6$ -AP180-(328-896) kaum Anteile geordneter Sekundärstrukturen. Fast der gesamte  $\alpha$ -Helixanteil von AP180 ist im Fragment  $H_6$ -AP180-(1-329) enthalten. C: Ein Vergleich der Spektren von rekombinantem und aus Schweinehirn aufgereinigtem AP180 zeigt, daß das ungewöhnliche CD-Spektrum nicht auf die rekombinante Expression zurückzuführen ist. D: Vergleich zwischen gemittelten Spektren von AP180 und den aufsummierten einzelnen gemessenen Spektren von  $H_6$ -Fusionsproteinen der AP180-Fragmente (1-329), (329-745) und (746-896). Beide Kurven sind deckungsgleich, so daß die Beobachteten geringen Sekundärstrukturanteile der hinteren Fragmente Folge der isolierten Expression und eines Verlustes intramolekularer Interaktionen sind.

Um zu überprüfen, ob die beobachteten Sekundärstrukturen möglicherweise auf die rekombinante Expression in Bakterien zurückzuführen sind, wurde auch das CD-Spektrum von hochaufgereinigtem AP180, das aus clathrinbedeckten Vesikeln aus Schweinehirn isoliert wurde, gemessen und mit dem von  $H_6$ -AP180 verglichen (Abbildung 3.5 C). Beide Spektren sind nahezu identisch, so daß davon ausgegangen werden kann, daß die rekombinant exprimierten Fragmente tatsächlich die gleiche Struktur besitzen, wie AP180 im Gewebe.

Damit darüber hinaus ausgeschlossen werden kann, daß der geringe Sekundärstrukturanteil der aminoterminal verkürzten Fragmente Folge eines Verlustes von intramolekularen Wechselwirkungen ist, wurden die Spektren von drei zueinander komplementären rekombinant exprimierten Fragmenten von AP180

(H<sub>6</sub>-AP180-(1-329), H<sub>6</sub>-AP180-(328-745) und H<sub>6</sub>-AP180-(745-896)) unabhängig voneinander gemessen. Die drei Spektren wurden arithmetrisch aufsummiert und mit einem gemittelten Spektrum aus rekombinant exprimierten und aufgereinigtem vollständigen AP180 verglichen (Abbildung 3.5 D). Beide Spektren sind fast identisch, so daß die beobachteten Sekundärstrukturanteile keine Artefakte aufgrund der isolierten Expression der Fragmente sind.

Zusammengenommen zeigen die Ergebnisse, daß Epsin 1 und AP180 abgesehen von den überwiegend  $\alpha$ -helikalen ENTH-Domänen aus ausgedehnten und kaum strukturierten Polypeptidketten bestehen.

Protein	Struktur			
	$\alpha$ -Helix	$\beta$ -Faltblatt	Schleifen	Stat. Knäuel
	[%]	[%]	[%]	[%]
Epsin 1 (rekombinant)	21	10	13	56
H <sub>6</sub> -Epsin 1-(144-575)	6	16	12	66
AP180 (aus Schweinehirn)	18	17	16	47
H <sub>6</sub> -AP180	22	10	13	55
H <sub>6</sub> -AP180-(1-329)	42	9	18	30
H <sub>6</sub> -AP180-(328-896)	5	5	6	84

**Tabelle 3.2** Durch CD-Spektroskopie bestimmte Sekundärstrukturanteile von rekombinant exprimiertem Epsin 1, AP180 aus Schweinehirn, H<sub>6</sub>-AP180 und rekombinant exprimierten Fragmenten beider Proteine. Die Spektren wurden mit CDPro Software wie unter 2.8.4 beschrieben ausgewertet. Es fällt auf, daß die ENTH-Domänen beider Proteine fast für den gesamten  $\alpha$ -helikalen Strukturanteil verantwortlich sind, während die carboxyterminalen Teile einen sehr hohen Anteil an Statistischem Knäuel haben.

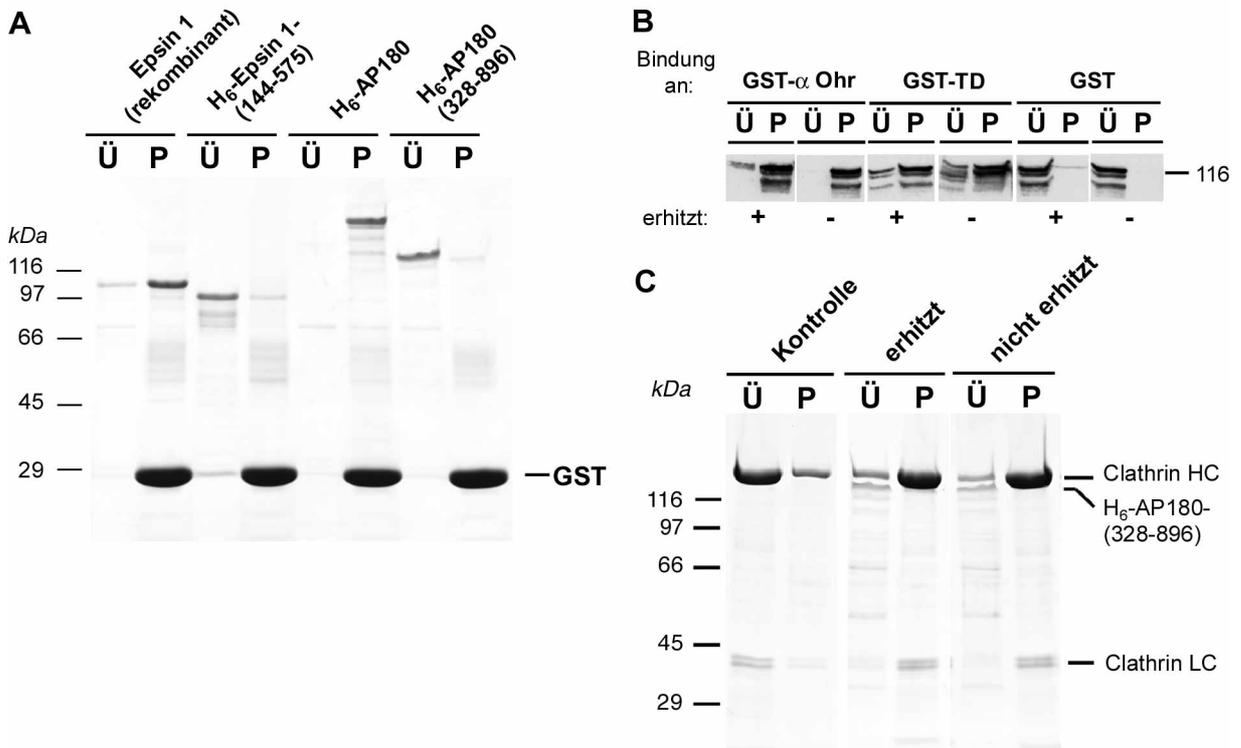
### 3.2.2 Hitzestabilität der ungeordneten Bereiche von Epsin 1 und AP180

Bei der Faltung kompakter Proteine werden in der Regel zahlreiche hydrophobe Interaktionen zwischen den Aminosäureseitenketten ausgebildet. Wasser wird aus dem Inneren der Domänen meist völlig ausgeschlossen. Im Gegensatz dazu ist in einem unstrukturierten Protein die Polypeptidkette sehr flexibel und praktisch alle Aminosäuren sind dem Lösungsmittel exponiert. Die eingangs beschriebene geringe Zahl an unpolaren Aminosäureresten in Epsin 1 und AP180 scheint mit dem beobachteten Mangel an geordneter Raumstruktur daher durchaus konform zu sein.

Eine Folge der Tatsache, daß kompakte Proteindomänen meistens hydrophobe Kernbereiche besitzen, ist, daß diese bei Erhitzung durch zunehmende thermische Bewegung exponiert werden und unkontrolliert inter- und intramolekulare

Wechselwirkungen eingehen. Die Folge ist irreversible Denaturierung und Präzipitation der Proteine. Auf der anderen Seite sollten unstrukturierte Proteine ohne kompakt gefaltete Domänen, die ohnehin permanent dem Lösungsmittel ausgesetzt sind, unempfindlich gegenüber irreversibler thermischer Denaturierung sein.

Um zu testen, ob dies bei den entsprechenden Bereichen von Epsin 1 und AP180 der Fall ist, wurden die aufgereinigten rekombinanten Proteine sowie die aminoterminal trunkierten Fragmente ohne die ENTH-Domänen in kochendem Wasser erhitzt und anschließend in einem Kältebad schockgekühlt. Die Ansätze wurden zentrifugiert, um koaguliertes Protein abzutrennen, und durch SDS-PAGE analysiert. Tatsächlich erwiesen sich H<sub>6</sub>-Epsin 1-(144-575) und H<sub>6</sub>-AP180-(328-896) als hitzeresistent und verblieben im Überstand, wohingegen die vollständigen Proteine mit den ENTH-Domänen präzipitierten und sich im Pellet wiederfanden (Abbildung 3.6 A).



**Abbildung 3.6** Hitzestabilität der carboxyterminalen Bereiche von Epsin 1 und AP180. A: Die rekombinant exprimierten vollständigen Proteine Epsin 1 und AP180, sowie die Fragmente, denen die ENTH-Domänen fehlen, wurden in Gegenwart von GST in einem kochenden Wasserbad erhitzt, schockgekühlt und abzentrifugiert. Während das GST und die vollständigen Proteine mit den ENTH-Domänen koagulieren und ins Pellet gehen, sind die aminoterminal verkürzten Fragmente thermostabil und verbleiben im Überstand. B: Vergleich der Bindung von hitzebehandeltem und nicht erhitztem H<sub>6</sub>-AP180-(328-896) an GST-Fusionsproteine der  $\alpha$ -Ohrdomäne von AP-2 und der Terminalen Domäne von Clathrin (TD). Es sind keine signifikanten Unterschiede in den Bindungseigenschaften festzustellen. C: Vergleich der Fähigkeit von hitzebehandeltem und nicht hitzebehandeltem AP180-(328-896), Clathrintriskelien zu Käfigen zusammenzulagern. Die Fusionsproteine wurde mit löslichem Clathrin inkubiert und gebildete Käfige wurden durch Ultrazentrifugation pelletiert. Auch hier sind keine Unterschiede in den Eigenschaften mit und ohne Erhitzen erkennbar.

Weiterhin sollte getestet werden, ob die Hitzebehandlung die Funktionen oder Bindungseigenschaften der thermostabilen Bereiche beeinträchtigt hatte. Dafür wurden unbehandeltes und erhitztes H<sub>6</sub>-AP180-(328-896) im Vergleich in Bindungsexperimente mit GST-Fusionsproteinen der Terminalen Domäne von Clathrin und der Ohrdomäne von  $\alpha$ -Adaptin sowie in Zusammenlagerungsexperimenten von freiem Clathrin zu Käfigen eingesetzt. In keinem der Experimente konnten Unterschiede zwischen erhitztem und unbehandeltem Fusionsprotein beobachtet werden (Abbildung 3.6 B und C).

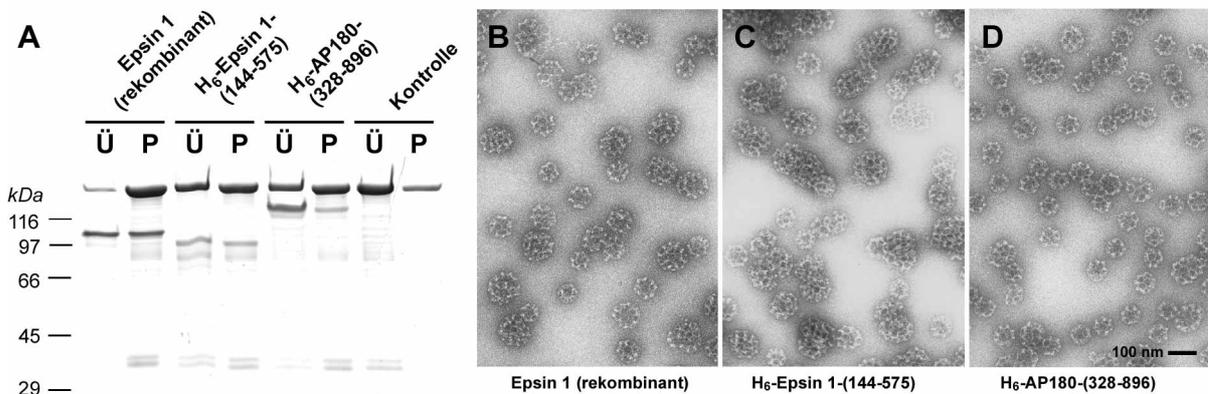
Die unstrukturierten aminoterminal verkürzten Fragmente von Epsin 1 und AP180 sind demnach unempfindlich gegenüber irreversibler thermischer Denaturierung. Sie können für mehrere Minuten auf 100 °C erhitzt werden, ohne daß sie ihre bekannten funktionellen und Bindungseigenschaften verlieren.

### 3.3 Zusammenlagerung von Clathrinkäfigen durch Epsin 1

Obwohl Epsin 1 und AP180 auf Aminosäuresequenzebene außerhalb der ENTH-Domäne nur geringe Homologien aufweisen, haben beide Proteine auffällige Ähnlichkeiten. Sie haben mit der Terminalen Domäne von Clathrin, der  $\alpha$ -Ohrdomäne von AP-2 und dem Membranlipid PtdIns-(4,5)-P<sub>2</sub> nicht nur die wichtigsten Interaktionspartner gemeinsam. Wie in den vorangegangenen Abschnitten gezeigt wurde, haben sie auch einen sehr ähnlichen strukturellen Aufbau. Dies legt nahe, daß beide Proteine auch ähnliche Funktionen in der Zelle haben könnten. Die wichtigste beschriebene funktionelle Eigenschaft von AP180 ist, daß es in der Lage ist, *in vitro* unter physiologischen Bedingungen die Zusammenlagerung von freien Clathrintriskelia zu Käfigen zu fördern (Ahle und Ungewickell, 1986).

Um zu testen, ob auch Epsin 1 dazu in der Lage ist, wurde rekombinant exprimiertes Epsin 1 zusammen mit aufgereinigtem Clathrin in physiologischem Puffer inkubiert. Käfige, die sich gebildet hatten, wurden durch Ultrazentrifugation abgetrennt und durch SDS-PAGE analysiert. Als Positivkontrolle diente H<sub>6</sub>-AP180-(328-896). Wie sich zeigte, war Epsin 1 sogar sehr effizient in der Lage, Clathrintriskelia zu polymerisieren, so daß sich diese fast vollständig im Pellet wiederfanden. Da die bekannten Bindungsorte für Clathrin im mittleren und carboxyterminalen Bereich von Epsin 1 liegen, wurde auch das aminoterminal verkürzte Fragment H<sub>6</sub>-Epsin 1-(144-575) in das Experiment eingesetzt. Tatsächlich war dieses Fusionsprotein zur Käfig-

bildung ausreichend, wenn es auch etwas weniger effektiv als das vollständige Protein zu sein schien (Abbildung 3.7 A).



**Abbildung 3.7** Zusammenlagerung von Clathrin zu Käfigen durch Epsin 1. A: Epsin 1 und das Fragment H<sub>6</sub>-Epsin 1-(144-575) wurden in einem physiologischen Puffer mit freien Clathrintriskelien inkubiert. Gebildete Käfige wurden durch Ultrazentrifugation pelletiert. Als Kontrollen wurde Clathrin allein sowie in Gegenwart H<sub>6</sub>-AP180-(328-896), das sehr stark die Zusammenlagerung von Clathrin zu Käfigen unterstützt, inkubiert. Sowohl Epsin 1 als auch das aminoterminal verkürzte Epsinfragment fördern sehr effizient die Bildung von Clathrin Käfigen *in vitro*. B: Elektronenmikroskopische Aufnahmen mit Uranylacetat negativ kontrastierter Käfige, die in dem in A dargestellten Experiment gebildet wurden. Sowohl Epsin 1 als auch das aminoterminal verkürzte Fragment führen zur Bildung von Clathrin Käfigen, allerdings erscheinen diese größer und weniger regelmäßig als die, die durch AP180-(328-896) gebildet wurden.

Schließlich sollte überprüft werden, ob bei dem Experiment tatsächlich Clathrin Käfige gebildet wurden, oder ob lediglich unspezifische Aggregate abzentrifugiert worden waren. Aus diesem Grund wurden die pelletierten Strukturen mit Uranylacetat negativ kontrastiert und elektronenmikroskopisch untersucht. Die Aufnahmen in den Abbildungen 3.7 B und C zeigen, daß sowohl unter Einfluß von rekombinantem Epsin 1 als auch von H<sub>6</sub>-Epsin 1-(144-575) Käfige mit regelmäßiger polyedrischer Struktur entstanden sind. Von AP180 ist bekannt, daß es zur Bildung besonders kleiner und gleichmäßiger Clathrin Käfige führt. Ein Vergleich der Abbildungen 3.7 B und C mit Abbildung 3.7 D zeigt, daß die durch Epsin 1 gebildeten Käfige deutlich größer und unregelmäßiger sind als die aus dem Experiment mit H<sub>6</sub>-AP180-(328-896).

### 3.4 Identifizierung des neuen ENTH-Domänen Proteins Clint

Die Ergebnisse der biophysikalischen und biochemischen Charakterisierung von Epsin 1 und AP180 machen deutlich, daß beide Proteine nicht nur die recht schwach ausgeprägte Homologie im Bereich der ENTH-Domäne verbindet, sondern sie insgesamt strukturell und möglicherweise sogar funktionell sehr ähnlich sind. Um

zu überprüfen, ob die gewonnenen Erkenntnisse sich auch auf weitere verwandte Proteine übertragen lassen, wurden Homologievergleiche zu anderen ENTH-Domänenproteinen unternommen. Dabei stellte sich heraus, daß im humanen Genom ein Gen für ein weiteres, bislang uncharakterisiertes Protein mit einer ENTH-Domäne zu finden ist. Die cDNA zu diesem Protein wurde bereits 1996 als Klon KIAA0171 bei einer systematischen Suche nach uncharakterisierten Genen in der unreifen humanen Myelomzelllinie KG-1 identifiziert (Nagase *et al.*, 1996). Das Genprodukt dieses cDNA-Klons wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit exprimiert und untersucht. Aufgrund der gefundenen Eigenschaften wurde es Clint (für *Clathrin interagierendes Protein mit trans-Golgilokalisation*) genannt.

### 3.4.1 Analyse der Primärsequenz von Clint

Ein *Alignment* unter Verwendung des Clustal V-Algorithmus zeigt, daß Clint im aminoterminalen Bereich eine hohe Homologie zu den ENTH-Domänen anderer Proteine besitzt (Abbildung 3.8 A und B). Diese ist besonders ausgeprägt zur ENTH-Domäne von Epsin 1 (die Ähnlichkeit beträgt 49 % über die ersten 158 Aminosäuren), aber auch zu Epsin 2 und Epsin 3 besteht eine recht große Ähnlichkeit (in beiden Fällen 47,7 %). Im Vergleich dazu ist die Homologie zu den entsprechenden Bereichen von AP180 und CALM deutlich geringer. Nur etwa über die ersten 100 Aminosäuren entsprechend den ersten fünf  $\alpha$ -Helices ist es möglich, ein zufriedenstellendes *Alignment* zwischen den Sequenzen zu erhalten. Die Ähnlichkeit von Clint zu AP180 beträgt in diesem Bereich 16,8 %, die zu CALM 17,9 %. Zu den anderen bekannten Proteinen mit einer ENTH-Domäne, Hip1 und Hip1R, konnte mit dem verwendeten Algorithmus keine Homologie festgestellt werden. Allerdings ist die Ähnlichkeit von Hip1 und Hip1R auch zu den anderen ENTH-Domänenproteinen auf Ebene der Aminosäuresequenz nur relativ gering ausgeprägt. Sie beruht eher auf wenigen konservierten Resten und einer ähnlichen Faltung.



rechnet. Die vorhergesagte Struktur ist tatsächlich der der ENTH-Domäne von Epsin 1 äußerst ähnlich. Sie besteht aus acht  $\alpha$ -Helices mit unterschiedlich langen, flexiblen Schleifenstrukturen dazwischen (Abbildung 3.8 D).

Für Epsin 1 wurde zuvor beschrieben, daß sich zwischen den Helices 3 und 4 eine hydrophobe Bindungstasche für PtdIns-(4,5)-P<sub>2</sub> befindet, die von den Seitenketten der Aminosäuren Arg<sup>63</sup>, Arg<sup>72</sup> und Lys<sup>77</sup> gebildet wird (Itoh *et al.*, 2001). Alle diese Aminosäuren, die an der Bindung des Phosphoinositids beteiligt sind, sind in der Clintstruktur konserviert (hier sind dies Arg<sup>67</sup>, Arg<sup>77</sup> und Lys<sup>81</sup>). Obwohl sich in der Schleife zwischen den Helices 3 und 4 mit Met<sup>68</sup> eine zusätzliche Aminosäure befindet, wird in dem Modell die Ausbildung einer ähnlichen basischen Tasche prognostiziert. Während das Rückgrat der Polypeptidkette in diesem Bereich fast deckungsgleich mit dem von Epsin 1 ist, sind allerdings die Orientierungen der Arginin- und Lysinseitenketten vermutlich aufgrund von Nachbarschaftseffekten und unterschiedlicher Raumauffüllung durch benachbarte Aminosäuren leicht unterschiedlich (in Abbildung 3.8 D in schwarz dargestellt). Außerdem besitzt Clint mit Arg<sup>78</sup> eine weitere basische Aminosäure deren Seitenkette in die hypothetische Phosphoinositidbindungstasche hineinragt (in Abbildung 3.8 D in grau dargestellt). Wenn Clint wie Epsin 1 über diese Stelle an Phospholipide bindet, ist es daher gut denkbar, daß es eine andere Spezifität besitzt, weil möglicherweise die negativen Ladungen anderer Phosphatreste besser stabilisiert werden. Die basischen Aminosäuren, die in AP180 und CALM für die Assoziation mit PtdIns-(4,5)-P<sub>2</sub> verantwortlich sind, sind in Clint nicht konserviert.

Für die Bereiche außerhalb der ENTH-Domäne von Clint wurde versucht, über den BLAST-Server Homologien zu weiteren Proteinen zu identifizieren, aber es konnten keine signifikanten Ähnlichkeiten zu anderen Proteinen gefunden werden. Außerdem ergaben auch alle Versuche, die Sekundär- oder Tertiärstruktur für den carboxyterminalen Bereich vorherzusagen, keine zuverlässigen Ergebnisse. Aufgrund der Aminosäuresequenz kann daher nicht eindeutig geschlossen werden, daß der Bereich außerhalb der ENTH-Domäne ähnlich schwach strukturiert ist wie der entsprechende Bereich von Epsin 1 und AP180.

Allerdings konnten in diesem Abschnitt der Clintsequenz zwei kurze Peptidsequenzen mit Ähnlichkeiten zu Clathrinbindungsmotiven identifiziert werden. Diese Motive vermitteln in vielen Proteinen, die an der Bildung von Clathrinhüllen beteiligt sind, Interaktionen mit der Terminalen Domäne von Clathrin. Die Sequenzen

<sup>326</sup>LVDLF und <sup>423</sup>LFDLM besitzen beispielsweise Ähnlichkeit zu dem Motiv LLDLL, das in  $\gamma$ -Adaptin vorkommt (Doray und Kornfeld, 2001). Vom Konsensus her haben diese Sequenzen Gemeinsamkeiten mit zahlreichen Clathrinbox 1-Motiven der Folge L(L/I)(D/E/N)(L/F)(D/E) (Dell'Angelica *et al.*, 1998; ter Haar *et al.*, 2000). Das Vorhandensein einer hydrophoben Aminosäure an der fünften Position an Stelle einer sauren scheint allerdings eher dafür zu sprechen, daß die Motive vom Clathrinbox 2-Typ  $\Phi$ (D/E)L $\Phi$  (wobei  $\Phi$  für eine große hydrophobe Aminosäure steht) sind (Drake und Traub, 2001).

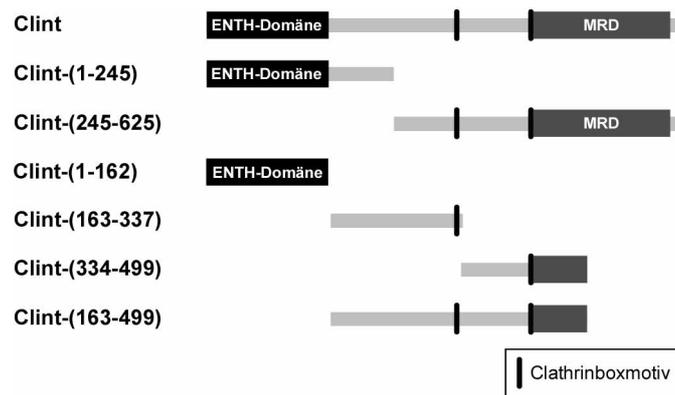
Weitere häufig in ähnlichen Proteinen vorkommende Protein-Protein-Interaktionsmotive wie etwa die AP-2 bindenden DPF/W (in AP180, CALM, Epsin oder Auxilin) und FxDxF (in Amphiphysin 1, Hip1R oder AP180), das EH-Domänenbindungsmotiv NPF (in Epsin oder CALM) sowie Ubiquitininteraktionsmodule (UIM) konnten in Clint nicht identifiziert werden. Zwar gibt es ein DPF-Peptid innerhalb der ENTH-Domäne, allerdings ist dieses auch in Epsin 1 konserviert und es wurde bereits zuvor gezeigt, daß es nicht in dessen Interaktion mit AP-2 involviert ist (Chen *et al.*, 1998).

Eine auffällige Eigenschaft des Carboxyterminus von Clint ist sein Reichtum an Methioninresten. Im Bereich zwischen Met<sup>427</sup> und Met<sup>605</sup> kommt diese Aminosäure insgesamt 31 mal vor, davon allein 17 mal zwischen Met<sup>549</sup> und Met<sup>600</sup>. Dieser Bereich soll deshalb als Methioninreiche Domäne bezeichnet werden (MRD).

### 3.5 Protein-Proteininteraktionsstudien mit Clint

#### 3.5.1 Identifizierung von Proteininteraktionspartnern von Clint

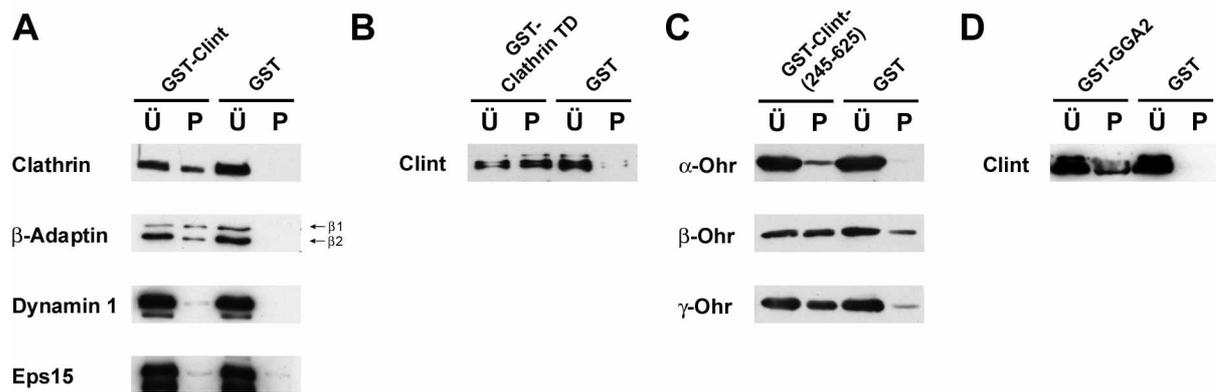
Um zu testen, mit welchen denkbaren Bindungspartnern Clint tatsächlich interagiert, wurden vollständiges Clint und Fragmente davon rekombinant als Fusionsproteine mit GST und Thioredoxin-H<sub>6</sub> (trx/H<sub>6</sub>) exprimiert und in GST-Sedimentationsbindungsexperimente eingesetzt. Eine Übersicht über die verwendeten Clint-Fragmente gibt Abbildung 3.9.



**Abbildung 3.9** Schematische Übersicht über die Domänenorganisation von Clint und die für diese Studie verwendeten rekombinant exprimierten Fragmente. Putative Bindungsmotive für Clathrin sowie die ENTH-Domäne und die Methioninreiche Domäne (MRD) sind markiert.

Für die Experimente wurden GST-Fusionsproteine an einer Glutathion-(GSH-) Sepharosematrix immobilisiert und mit einer Lösung möglicher Bindungspartner inkubiert. Anschließend wurde die GSH-Sepharose mitsamt der gebundenen Proteine durch Zentrifugation vom Überstand getrennt, gewaschen und durch SDS-PAGE und Westernblot analysiert.

Da Hirngewebe eine gute Quelle für Komponenten des Endozytoseapparates ist, wurde zunächst GST-Clint an GSH-Sepharose immobilisiert und mit Schweinehirnzytosol inkubiert. Im Westernblot zeigt sich daß tatsächlich eine gewisse Menge an Clathrin, AP-1 und AP-2 mit Clint ins Pellet gezogen wurde (Abbildung 3.10 A). Eine Assoziation mit Dynamin 1 und Eps15 konnte dagegen nicht nachgewiesen werden. Ein Vergleich der Banden von  $\beta$ 1-Adaptin (als Bestandteil von AP-1) und  $\beta$ 2-Adaptin (als Bestandteil von AP-2) zeigt, daß, obwohl deutlich mehr AP-2 im Zytosol vorhanden war, etwa gleich viel von beiden Komplexen mit dem GST-Clint assoziierte. Dies legte die Vermutung nahe, daß Clint eine höhere Affinität für AP-1 als für AP-2 haben könnte.



**Abbildung 3.10** Proteininteraktionen von Clint. Die Bindungsexperimente wurden durchgeführt, indem GST-Fusionsproteine an GSH-Sepharose immobilisiert und mit Zytosol oder aufgereinigten Proteinen inkubiert wurden. Die gebundenen Proteine wurden durch Zentrifugation der Trägermatrix abgetrennt (P), während nicht gebundenes Protein im Überstand blieb (Ü). Immobilisiertes GST diente als Kontrolle. A: Inkubation von GST-Clint mit Schweinehirnzytosol. Sowohl Clathrin als auch  $\beta$ 1- und  $\beta$ 2-Adaptin binden an Clint, nicht jedoch Dynamin 1 und Eps15. B: Rekombinant exprimiertes Clint bindet direkt an die Terminale Domäne von Clathrin. C: GST-Clint-(245-625) bindet die Ohrdomänen von  $\gamma$ - und  $\beta$ 2-Adaptin sowie deutlich schwächer auch von  $\alpha$ -Adaptin. D: Clint interagiert direkt mit GST-GGA2.

Um auszuschließen, daß es sich bei den beobachteten Bindungen um indirekte, durch weitere zytosolische Faktoren vermittelte Wechselwirkungen handelt, wurden weitere Bindungsexperimente mit rekombinant exprimierten und aufgereinigten Fusionsproteinen durchgeführt. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, daß  $\text{trx}/\text{H}_6$ -Clint direkt mit einem GST-Fusionsprotein der Terminalen Domäne von Clathrin (GST-TD) interagiert (Abbildung 3.10 B). Um eine direkte Bindung von Clint an die Adaptorproteine nachzuweisen, wurden Fusionsproteine verwendet, die die Ohrdomänen von  $\alpha$ -,  $\beta$ 2- und  $\gamma$ -Adaptin enthielten. Für diese Bereiche, insbesondere für die  $\alpha$ -Ohrdomäne, konnte gezeigt werden, daß sie die zentralen Bindungsdomänen der Adaptine sind. Fast alle charakterisierten Interaktionen der Adaptorproteinkomplexe werden über ihre Ohrdomänen vermittelt. Das Ergebnis des Bindungsexperimentes zeigt, daß die Ohrdomäne von  $\gamma$ -Adaptin eine starke direkte Wechselwirkung mit GST-Clint-(245-625) eingeht. Auch  $\text{H}_6$ - $\beta$ 2-Ohrdomäne bindet noch deutlich an das Clint-Fragment, wohingegen die  $\alpha$ -Ohrdomäne nur eine sehr schwache Bindung an GST-Clint-(245-625) zeigt (Abbildung 3.10 C). In Kontrolllexperimenten mit GST-Clint-(1-245) wurden weder Clathrin noch AP-Komplexe gebunden (ohne Abbildung). Clint assoziiert demnach direkt mit der Terminalen Domäne von Clathrin, den Ohrdomänen von  $\gamma$ - und  $\beta$ 2-Adaptin sowie zu einem geringeren Maße auch mit der Ohr-

domäne von  $\alpha$ -Adaptin. Für alle diese Wechselwirkungen ist der Bereich zwischen Aminosäure 245 und dem Carboxyterminus verantwortlich.

Vor kurzem wurde gezeigt, daß das überwiegend Golgi-lokalisierte Protein GGA2 mit Clathrin, Arf1 und den zytosolischen Teilen der Mannose-6-Phosphatrezeptoren interagiert (Hirst *et al.*, 2000; Puertollano *et al.*, 2001b; Zhu *et al.*, 2001). Es wird angenommen, daß es die Rolle eines adaptorähnlichen Proteins im intrazellulären Membranverkehr spielen könnte. Aus diesem Grund wurde es auch als potentieller Bindungspartner von Clint in Betracht gezogen. Ein Experiment mit  $\text{trx}/\text{H}_6$ -Clint und GST-GGA2 zeigt, daß Clint tatsächlich direkt mit GGA2 interagiert (Abbildung 3.10 D).

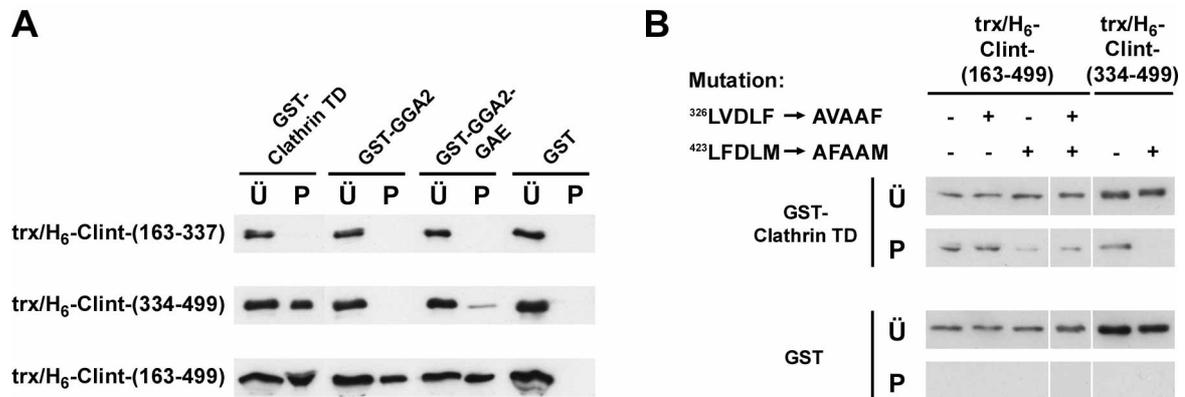
### 3.5.2 Eingrenzung der Bindungsorte auf Clint für Clathrin und GGA2

Um die Bindungsorte für GGA2 und Clathrin innerhalb der Clintsequenz näher einzugrenzen, wurden weitere verkürzte Fragmente von Clint als  $\text{trx}/\text{H}_6$ -Fusionsproteine exprimiert und in GST-Bindungsexperimenten verwendet. Das Fragment (163-499) beginnt direkt im Anschluß an die ENTH-Domäne, umschließt den mittleren Teil des Proteins und reicht bis in die Methioninreiche Domäne hinein. Die Fragmente (163-337) und (334-499) teilen das zuvor beschriebene Fragment noch einmal in zwei etwa gleich große Teile, wobei jedes von ihnen eines der beiden putativen Clathrinboxmotive enthält.

Die Bindungsexperimente mit GST-TD ergaben, daß sowohl  $\text{trx}/\text{H}_6$ -Clint-(163-499) als auch  $\text{trx}/\text{H}_6$ -Clint-(334-499), nicht jedoch  $\text{trx}/\text{H}_6$ -Clint-(163-337), an die Terminale Domäne von Clathrin binden (Abbildung 3.11 A). Der Bereich zwischen den Aminosäuren 334 und 499, in dem sich auch das Motiv <sup>423</sup>LFDLM befindet, enthält demnach eine wichtige Clathrinbindungsstelle. Auf der anderen Seite scheint das Motiv <sup>326</sup>LVDLF, das sich im vorderen Fragment befindet, keine wichtige Rolle bei der Assoziation mit Clathrin zu spielen.

In einem ähnlichen Experiment konnte gezeigt werden, daß  $\text{trx}/\text{H}_6$ -Clint-(163-499) relativ stark an GST-GGA2 bindet. Die beiden kürzeren Fragmente zeigen dagegen keine Affinität zu GGA2 (Abbildung 3.11 A). Dies könnte einerseits bedeuten, daß der Bindungsort für die Interaktion durch Aufteilung auf zwei Fusionsproteine zerstört wurde. Andererseits könnte die Bindung von Clint an GGA2 aber auch durch eine Reihe von hintereinander angeordneten Bindungsstellen mit geringen Einzelaffinitäten vermittelt werden, die für eine starke Wechselwirkung kooperativ zusam-

menwirken müssen. Ein ähnliches Konzept wurde bereits für die Interaktionen anderer Proteine mit der Ohrdomäne von  $\alpha$ -Adaptin oder der Terminalen Domäne von Clathrin vorgeschlagen (Drake *et al.*, 2000a; Scheele *et al.*, 2001).



**Abbildung 3.11** Eingrenzung der Bindungsorte von für die Terminale Domäne von Clathrin in der Clintsequenz. A: Die Hauptbindung für Clathrin TD ist im Clintfragment (334-499) lokalisiert, da nur trx/H<sub>6</sub>-Clint-(163-499) und trx/H<sub>6</sub>-Clint-(334-499), nicht aber trx/H<sub>6</sub>-Clint-(163-337) an GST-TD binden. An GST-GGA2 bindet nur das Fragment trx/H<sub>6</sub>-Clint-(163-499), nicht jedoch die verkürzten Konstrukte, so daß durch die Aufteilung entweder der Bindungsort zerstört wurde oder die einzelnen Fragmente über zu geringe Einzelaaffinitäten verfügen. Da ähnliche Ergebnisse mit GST-GGA2-GAE erzielt wurden, scheint der Bindungsort für Clint auf Seite von GGA2 im Bereich der GAE-Domäne zu liegen. B: Identifikation des Clathrinbindungsmotivs durch Mutationsanalyse. Die kurzen Peptidsequenzen <sup>326</sup>LVDLF und <sup>423</sup>LFDLM wurden zu AVAAF bzw. AFAAM mutiert. Nur Veränderungen im Motiv <sup>423</sup>LFDLM führten zu einer Verringerung der Bindung an GST-TD.

Die GGA-Proteine sind in eine Reihe von kompakten Domänen organisiert. Am Carboxyterminus befindet sich die sogenannte GAE-Domäne (*gamma-appendage-ear*-Domäne). Wegen ihrer Homologie zur Ohrdomäne von  $\gamma$ -Adaptin war es eine naheliegende Möglichkeit, daß sich der Clintbindungsort von GGA2 in diesem Bereich befindet. Deshalb wurde auch GST-GGA2-GAE in die Bindungsexperimente mit den Clintfragmenten eingesetzt. Tatsächlich zeigte sich ein sehr ähnliches Bild wie bei der Bindung an das vollständige GGA2. Auch an die GAE-Domäne bindet effizient nur das Fragment trx/H<sub>6</sub>-Clint-(163-499) (Abbildung 3.11 A).

### 3.5.3 Identifizierung von Clathrinbindungsmotiven durch Mutagenese

Die Ergebnisse der Bindungsexperimente mit GST-TD und den verkürzten Clintfragmenten machen deutlich, daß nicht allein aus der Ähnlichkeit einer Peptidsequenz zu bekannten Bindungsmotiven geschlossen werden kann, daß diese tatsächlich an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt ist. Obwohl die Fragmente trx/H<sub>6</sub>-Clint-(163-337) und trx/H<sub>6</sub>-Clint-(334-499) beide ein putatives Clathrinboxmotiv ent-

halten, haben sie deutlich unterschiedliche Eigenschaften bei der Bindung an GST-TD gezeigt. Um zu prüfen, ob es sich bei <sup>326</sup>LVDLF und <sup>423</sup>LFDLM tatsächlich um funktionelle Clathrinbindungsmotive handelt, wurden in den Fusionsproteinen beide Peptide durch gerichtete Mutagenese zu <sup>326</sup>AVAAF und <sup>423</sup>AFAAM verändert und erneut Bindungsexperimente mit GST-TD durchgeführt. Durch die Mutagenese wurden also die konservierten Aminosäuren im Konsensus LΦDLΦ (wobei Φ eine große hydrophobe Aminosäure darstellt) zu Alanin mutiert.

Die Ergebnisse in Abbildung 3.11 B zeigen, daß bei Experimenten mit dem Fragment trx/H<sub>6</sub>-Clint-(163-499) eine Mutation von <sup>423</sup>LFDLM, nicht aber von <sup>326</sup>LVDLF zu einer Reduktion der Bindung an GST-TD führt. Auch eine Doppelmutation beider Sequenzen bewirkt keine weitere signifikante Abnahme der Assoziation. Ein Rest von Affinität zur Terminalen Domäne von Clathrin bleibt also auch nach Veränderung beider Motive vorhanden.

Die Mutation von <sup>423</sup>LFDLM im verkürzten Fragment trx/H<sub>6</sub>-Clint-(334-499) bewirkte dagegen einen vollständigen Verlust der Bindung an GST-TD. Die Ergebnisse zeigen also, daß das der Hauptanteil der Bindung an die Terminale Domäne von Clathrin durch das Motiv <sup>423</sup>LFDLM vermittelt wird.

Es wird aber auch deutlich, daß es weitere Affinitäten für TD in der Clintsequenz geben muß. Eine Rolle von <sup>326</sup>LVDLF konnte mit den durchgeführten Experimenten zwar nicht nachgewiesen, allerdings auch nicht völlig ausgeschlossen werden. Es wäre beispielsweise möglich, daß die Mutationen der beiden Leucine und des einen Aspartats zu Alanin nicht zu einem vollständigen Verlust der Affinität der Motive zum Bindungsort auf der Terminalen Domäne geführt haben. Auf der anderen Seite konnte jedoch für das sehr ähnliche Pentapeptid LLDLL in der γ-Ohrdomäne von AP-1 gezeigt werden, daß die Veränderung jedes einzelnen der fünf Reste praktisch zu einer vollständigen Zerstörung des Bindungsmotivs führt (Doray und Kornfeld, 2001). Eine weitere Möglichkeit ist, daß es weitere schwache Affinitäten in den Fragmenten gibt. Mögliche Kandidaten wären die Tripeptide <sup>342</sup>DLF und <sup>488</sup>NLL, die Ähnlichkeit zu DLL besitzen, das mit der Assoziation von AP180 zur Terminalen Domänen in Verbindung gebracht wurde (Morgan *et al.*, 2000). Die Tripeptide sind für sich genommen möglicherweise zwar nicht in der Lage, eine über diesen Ansatz detektierbare Affinität zu Clathrin zu vermitteln, könnten aber zusammengenommen zu einer meßbaren Bindung führen.

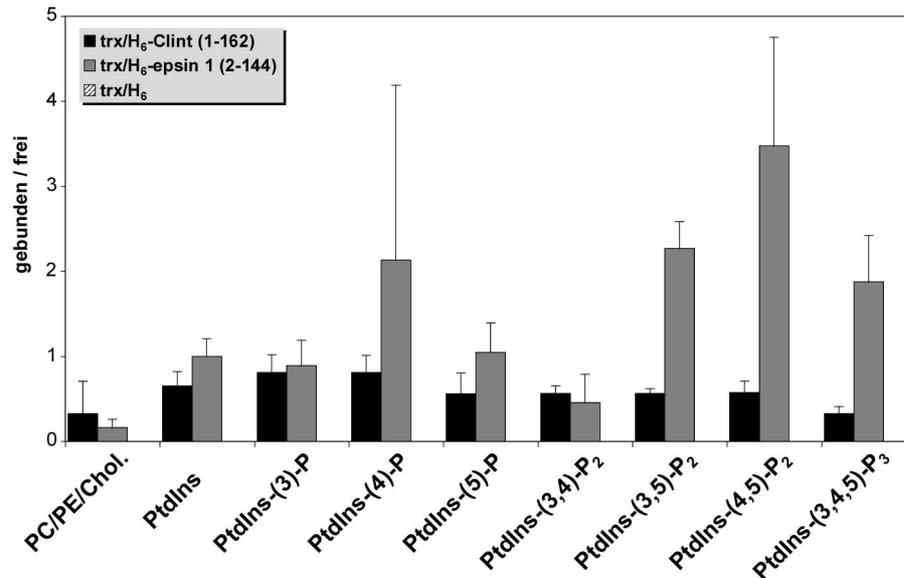
Da das Fusionsprotein trx/H<sub>6</sub>-Clint-(163-337) von vorne herein nicht an die Terminale Domäne gebunden hatte, konnte eine Mutation in diesem Fragment nicht zu einer Klärung der Rolle von <sup>324</sup>LFDLM führen.

Die generierten Proteinmutanten wurden auch in Bindungsexperimente mit der GAE-Domäne von GGA2 eingesetzt. Allerdings konnten keine Unterschiede zwischen den Bindungseigenschaften der veränderten Proteine zu denen mit den Wildtypsequenzen festgestellt werden (ohne Abbildung).

### **3.6 Lipidbindung durch die ENTH-Domäne von Clint**

Da die in Epsin 1 identifizierte basische Lipidbindungstasche in der Clintsequenz konserviert ist, erschien es naheliegend zu überprüfen, ob auch Clint an Phosphoinositide bindet, und ggf. dessen Spezifität mit der von Epsin 1 zu vergleichen.

Zu diesem Zweck wurden artifizielle Liposomen hergestellt, die jeweils 5 % eines der acht natürlich vorkommenden Phosphoinositide enthielten. Die Liposomen wurden mit trx/H<sub>6</sub>-Fusionsproteinen der ENTH-Domänen von Clint und Epsin 1 inkubiert, abzentrifugiert und durch SDS-PAGE und Westernblot auf gebundenes Protein untersucht. Während mit diesem Ansatz die Ergebnisse von Itoh *et al.* (Itoh *et al.*, 2001) mit Epsin 1 weitgehend reproduziert werden konnten, war nur eine geringe Bindung der Clint-ENTH-Domäne an die Liposomen festzustellen. Clint zeigte eine gleichermaßen schwache Affinität für fast alle Phosphoinositide. Eine Selektivität für eine bestimmte Lipidkopfgruppe war nicht auszumachen. Lediglich die Assoziation mit PtdIns-(3)-Phosphat oder PtdIns-(4)-Phosphat war im Vergleich zu den anderen Lipiden leicht erhöht (Abbildung 3.12).



**Abbildung 3.12** Bindung der ENTH-Domänen von Clint an artifizelle Liposomen aus Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylethanolamin (PE) und Cholesterin (Chol.) im Verhältnis 6:2,5:1, denen 5 % des angegebenen Phosphoinositids zugemischt wurden. Während die Ergebnisse für die ENTH-Domäne von Epsin 1 weitgehend mit denen aus einer früheren Studie übereinstimmen (Itoh *et al.*, 2001), und das Fragment bevorzugt an PtdIns-(4,5)-P<sub>2</sub> bindet, scheint die ENTH-Domäne von Clint mit deutlich geringerer Affinität und nur wenig ausgeprägter Selektivität an die Phosphoinositide zu binden.

### 3.7 Gewebeverteilung von Clint

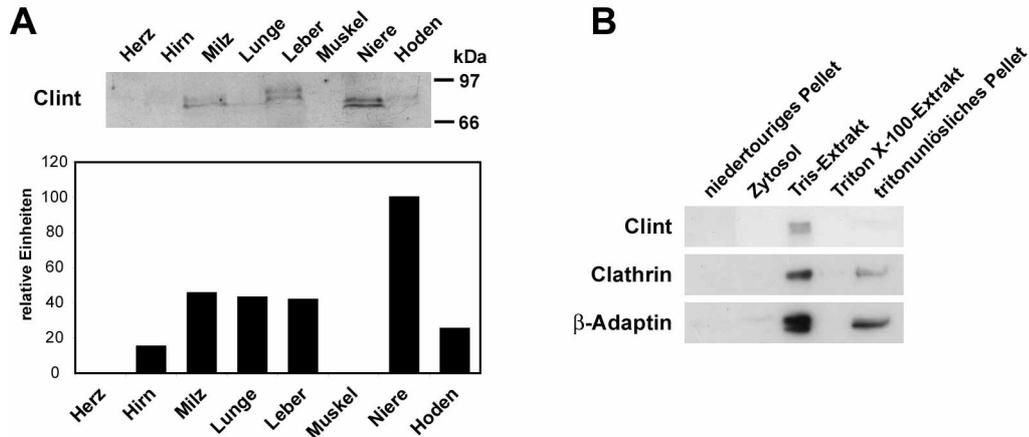
Von der Gruppe um Dr. Nagase, die die cDNA von KIAA0171 ursprünglich isoliert hatte, war bereits eine systematische Northernblotanalyse mit einer KIAA0171-spezifischen Sonde durchgeführt worden. Dabei wurde festgestellt, daß das Gen (dessen Produkt Clint ist) in allen untersuchten Geweben und Zelllinien in niedrigem bis mittlerem Maße exprimiert wird (Nagase *et al.*, 1996).

Da die Ergebnisse dieser Untersuchung nicht zwingend auch etwas über den tatsächlichen Proteingehalt in den einzelnen Geweben aussagen, wurde die Gewebeverteilung hier auch durch Westernblotanalyse überprüft. Zu diesem Zweck wurden Gewebehomogenate verschiedener Mausorgane durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembran übertragen und mit einem Antikörper gegen Clint immunmarkiert.

Clint wird durch die SDS-PAGE zu einer Doppelbande mit einer apparenten Molekülmasse von rund 80 kDa aufgetrennt. Die Aufspaltung der Bande könnte einerseits Folge alternativen mRNA-*splicings* sein, andererseits aber auch durch Proteolyse oder posttranslationelle Modifikationen verursacht sein.

Die höchste Konzentration von Clint wurde in der Niere gefunden. Auch Milz, Lunge, Leber und Hoden enthielten noch deutliche Mengen des Proteins. Hirn, in

dem zahlreiche endozytotische Proteine wie AP180 und Epsin 1 besonders angereichert sind, enthält dagegen nur wenig Clint (Abbildung 3.13 A).



**Abbildung 3.13** Verteilung von Clint in Geweben und innerlich der Zelle. A: Gewebeverteilung von Clint. Vergleichbare Mengen lysierter Mausorgane wurden durch einen Westernblot auf den Gehalt an Clint analysiert (oben). Die Banden wurden densitometrisch ausgewertet, auf den Proteingehalt der Proben normalisiert und als Säulendiagramm dargestellt (unten). Clint kommt am häufigsten in der Niere vor, ist aber auch in Hirn, Milz, Lunge, Leber und Hoden zu finden. B: Intrazelluläre Lokalisation von Clint. Mäuseniere wurde homogenisiert und differenziell zentrifugiert. In einem niedertourigen Pellet, das einer groben Kernfraktion entspricht ist kein Clint zu finden, ebensowenig wie im Zytosol nach Ultrazentrifugation. Das Pellet der hochtourigen Zentrifugation wurde nacheinander mit 0,5 M Tris-HCl pH 7,0 und 1 % Triton X-100 in GBP resuspendiert und erneut zentrifugiert. Die Behandlung mit 0,5 M Tris wäscht bereits alles Clint von den Membranen herunter, so daß es sich bei Clint um ein peripheres Membranprotein handelt.

### 3.8 Intrazelluläre Lokalisation von Clint

#### 3.8.1 Clint in subzellulären Fraktionen

Um zu überprüfen, ob Clint innerhalb der Zelle überwiegend zytosolisch oder an Membranen gebunden vorliegt, und in welcher Form es ggf. mit den Membranen assoziiert ist, wurde eine Zellfraktionierung durchgeführt und mit verschiedenen chemischen Extraktionen der Membranfraktion kombiniert.

Für das Experiment wurde Mäuseniere in einem isotonischen Puffer homogenisiert und zentrifugiert. Clint war weder im Pellet nach einer niedertourigen Zentrifugation, das einer groben Kernfraktion entsprach, noch im Zytosol, dem Überstand nach Zentrifugation bei  $125.000 \times g_{\max}$  für 45 Minuten, zu finden. Praktisch das gesamte Clint befand sich ebenso wie das Clathrin und die Adaptorproteine AP-1 und AP-2 nach der Hochgeschwindigkeitszentrifugation im Pellet und lag damit membrangebunden vor. Im folgenden wurde die Membranfraktion mit 0,5 M Tris bei pH 7,0 extrahiert. Dies ist eine Waschbedingung, die viele peripher mit Membranen assoziierte Proteine von diesen herunterlöst und auch verwendet wird, um Clathrin-

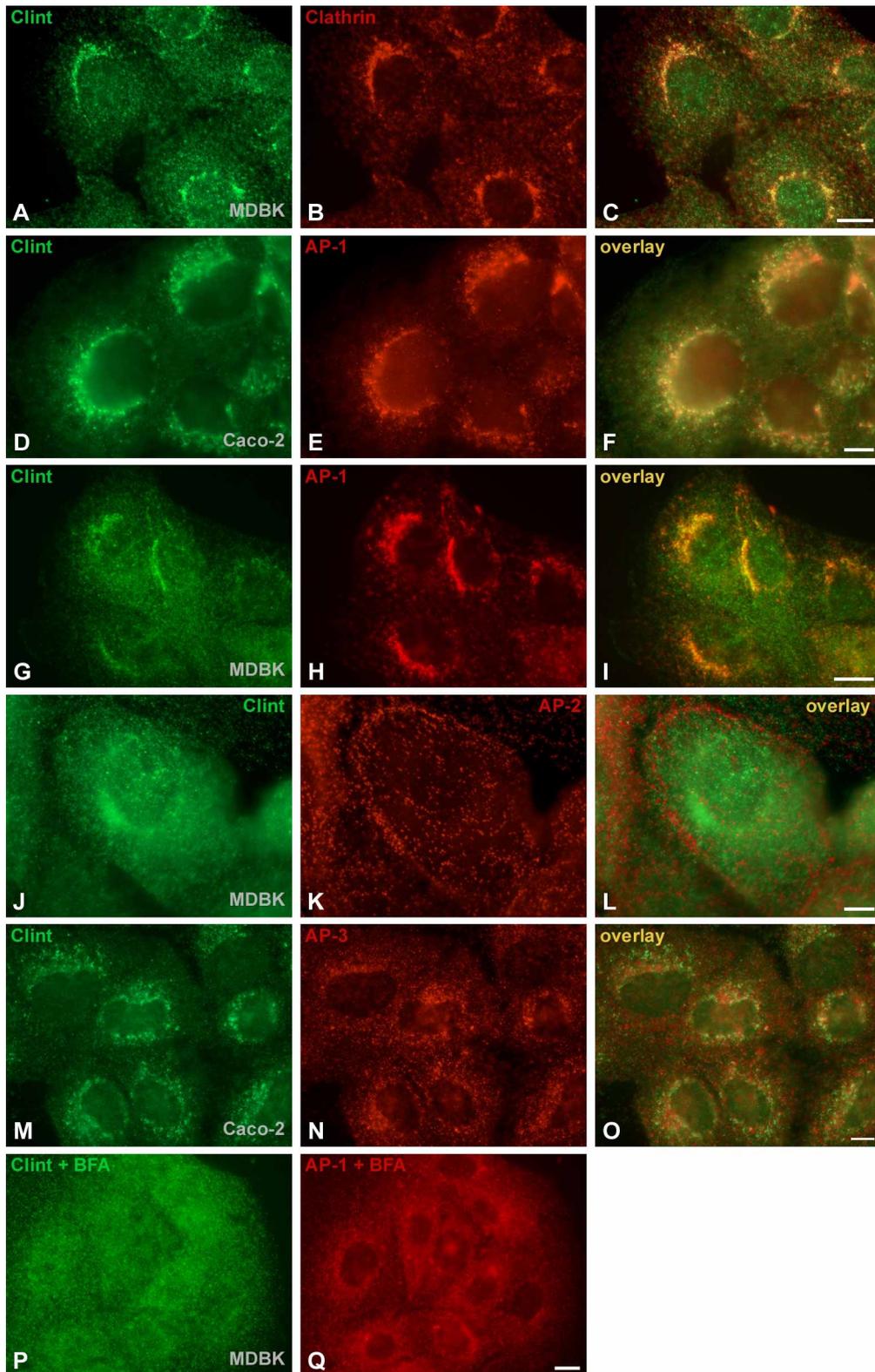
hüllen von Vesikelpräparationen zu dissoziieren. Die Behandlung mit Tris löste das Clint quantitativ von den Membranen, ebenso wie den größten Teil des Clathrins und der Adaptoren (Abbildung 3.13 B). Clint ist demnach ein peripheres Membranprotein, das sich ebenso wie Clathrinhüllen mit 0,5 M Tris bei pH 7,0 von den Membranen herunterwaschen läßt. In weiteren Experimenten konnte auch gezeigt werden, daß Clint Bestandteil der Hülle clathrinbedeckter Vesikel ist (Kalthoff *et al.*, 2002b).

### 3.8.2 Lokalisation von Clint in kultivierten eukaryotischen Zellen

Die *in vitro* Protein-Interaktionsstudien haben gezeigt, daß Clint bevorzugt mit Faktoren, die an der Bildung von clathrinbedeckten Vesikeln am *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) beteiligt sind, wie etwa AP-1 oder GGA2 und weniger mit Komponenten des Endozytoseapparats wie AP-2 interagiert. Diese Befunde werfen die Frage auf, wo Clint in der Zelle zu finden ist, und mit welchen anderen Proteinen es dort möglicherweise kolokalisiert.

Um Antworten auf diese Fragen zu erhalten, wurden Immunfluoreszenzuntersuchungen an Säugetierzelllinien durchgeführt. Da Clint in Nierengewebe besonders angereichert war, wurde zunächst die Rindernierenepithelzelllinie Madin-Darby *Bovine Kidney* (MDBK-) Zellen untersucht und mit Antikörpern gegen Clint markiert.

Unter dem Fluoreszenzmikroskop wird sichtbar, daß Clint im perinukleären Bereich angereichert ist. Gegenfärbungen mit Clathrin und AP-1 zeigen, daß Clint mit beiden Proteinen um den Kern herum kolokalisiert, so daß es sich bei diesen Strukturen offenbar um das TGN handelt (Abbildungen 3.14 A bis C und G bis I). Darüber hinaus kommt Clint in zahlreichen punktuellen vesikulären Strukturen vor, die über das gesamte Zytoplasma verteilt sind. Diese werden allerdings weder mit Antikörpern gegen Clathrin noch mit solchen gegen die Adaptorproteine AP-1, AP-2 oder AP-3 markiert (Abbildungen 3.14 A bis O).



**Abbildung 3.14** Immunfluoreszenzmarkierung von Clint und anderen Proteinen in MDBK- und Caco 2-Zellen. A bis C: Clint und Clathrin kolokalisieren im perinukleären Bereich von MDBK-Zellen. In der Peripherie der Zellen gibt es eine deutliche punktuelle Färbung für Clint, die sich allerdings nicht mit der von Clathrin deckt. D bis I: Clint kolokalisiert auch mit AP-1 im Bereich des TGN von MDBK- (D bis F) und Caco 2 Zellen (G bis I). Auch hier ist allerdings keine Übereinstimmung im Bereich der peripheren Vesikel zu erkennen. J bis L: Es gibt keine Überlappung der Färbungen von Clint und AP-2 in MDBK-Zellen. M bis O: Obgleich sowohl Clint als auch AP-3 perinukleär angereichert sind, ist kaum eine Übereinstimmung der Verteilungen im Detail erkennbar. P und Q: Eine Behandlung von MDBK-Zellen mit Brefeldin A für fünf Minuten vor der

Fixierung führt zu einer Umverteilung sowohl des AP-1 als auch des Clint im Bereich des TGN, was darauf hindeutet, daß Clint wie AP-1 Arf1-abhängig an die Membran rekrutiert wird. Die vesikuläre Färbung von Clint in der Peripherie der Zellen wird dadurch jedoch nicht beeinflusst. Die Größenbalken entsprechen 10 µm.

Clint konnte außerdem auch in der humanen Enterozytenzelllinie Caco 2 durch Immunfluoreszenz nachgewiesen werden. Das Färbemuster in diesen Zellen ist dem in den MDBK-Zellen sehr ähnlich (vgl. Abbildungen 3.14 A,G und J mit D und M). Auch hier ließ sich eine hervorragende Kolokalisation mit AP-1 im Bereich des Golgiapparates beobachten (Abbildung 3.14 D bis F). Eine Doppelmarkierung von Clint und AP-3 zeigt dagegen, daß beide Proteine zwar im perinukleären Bereich angeordnet sind, ihre Färbemuster allerdings nur wenig überlappen und im Detail eher komplementär sind (Abbildung M bis O). Eine Kolokalisation zwischen Clint und AP-2 konnte in keiner der verwendeten Zelllinien beobachtet werden (Abbildung 3.14 J bis L).

Es ist bekannt, daß die Rekrutierung von AP-1 und den GGAs an die Membranen des TGN von der GTPase Arf1 abhängig ist. Dieser Prozeß läßt sich sehr effizient durch das Pilzmetabolit Brefeldin A inhibieren. Da darüber hinaus die Proteinhüllen an den Golgimembranen äußerst dynamische Strukturen sind, führt eine Blockierung der Rekrutierung von AP-1 oder GGA durch BFA zu einer raschen Umverteilung dieser Hüllbestandteile ins Zytoplasma (Puertollano *et al.*, 2001b; Stamnes und Rothman, 1993; Traub *et al.*, 1993). Die Beobachtung, daß Clint mit Clathrin, AP-1 und GGA2 *in vitro* interagiert, legt die Vermutung nahe, daß es in den denselben oder einen ähnlichen zellulären Prozeß involviert ist. Daher wurde überprüft, ob auch die Verteilung von Clint empfindlich gegenüber einer Behandlung mit BFA ist. Tatsächlich konnte festgestellt werden, daß nach fünfminütiger Inkubation der Zellen mit 2 µg/ml BFA vor der Fixierung der größte Teil des zuvor perinukleär lokalisierten Clints in das Zytoplasma umverteilt worden war. Die punktuelle Färbung in der zellulären Peripherie dagegen wurde durch BFA nicht erkennbar beeinflusst (Abbildungen 3.14 P und Q). Wurden die Zellen nach der BFA-Behandlung nicht sofort fixiert, sondern gewaschen und mit frischem Medium weiterinkubiert, war die Verteilung von Clint und AP-1 innerhalb von 60 Minuten wieder wie die in unbehandelten Zellen (ohne Abbildung).

### 3.9 Rolle der ENTH-Domäne bei der intrazellulären Lokalisation

#### 3.9.1 Lokalisation von GFP-Fusionsproteinen von ENTH-Domänen

Die Ergebnisse der Immunfluoreszenzmarkierung von endogenen Proteinen in Säugetierzellen legen nahe, daß Clint in die Bildung clathrinbedeckter Vesikel am TGN involviert ist. Um allerdings zu klären, welche Rolle es in diesem Prozeß genau spielt, wäre es von Interesse, zu wissen, welcher Bereich des Moleküls für die subzelluläre Verteilung verantwortlich ist. Alle Proteininteraktionen von Clint, die bislang *in vitro* identifiziert und charakterisiert wurden, werden über einen Bereich carboxyterminal der Aminosäure 245 vermittelt. Wenn also die direkte Interaktion mit Clathrin, GGA oder AP-1 Voraussetzung für eine Assoziation von Clint mit Golgimembranen ist, sollte ein Proteinfragment, dem der mittlere und carboxyterminale Bereich fehlt, allein nicht in der Lage sein, an das TGN zu binden.

Um zu überprüfen, ob dies tatsächlich der Fall ist, wurde ein Fusionsprotein aus der ENTH-Domäne von Clint (Aminosäuren 1-162) und dem Grün Fluoreszierenden Protein (*green fluorescent protein*, GFP) kloniert und in HeLa SS6-Zellen exprimiert. Da für Epsin 1 bekannt ist, daß der Aminoterminus der ENTH-Domäne an der Lipidbindung beteiligt ist (Ford *et al.*, 2002; Itoh *et al.*, 2001), wurde das Protein so konstruiert, daß der GFP-Anteil mit dem Carboxyterminus der ENTH-Domäne fusioniert ist. Dadurch sollte verhindert werden, daß das GFP mit einer möglichen Membranssoziation der ENTH-Domäne interferiert.

Unter dem Fluoreszenzmikroskop wird deutlich, daß die isolierte ENTH-Domäne sehr wohl in der Lage ist, an perinukleäre Strukturen zu binden. Dabei kolo-kalisiert das Clint-(1-162)-GFP-Konstrukt in diesem Bereich sowohl mit Clathrin als auch mit AP-1 (Abbildungen 3.15 A bis C und D bis F). Das Ergebnis zeigt, daß für die Bindung an Golgimembranen die Interaktion mit Clathrin, GGA oder AP-1 nicht notwendig ist.

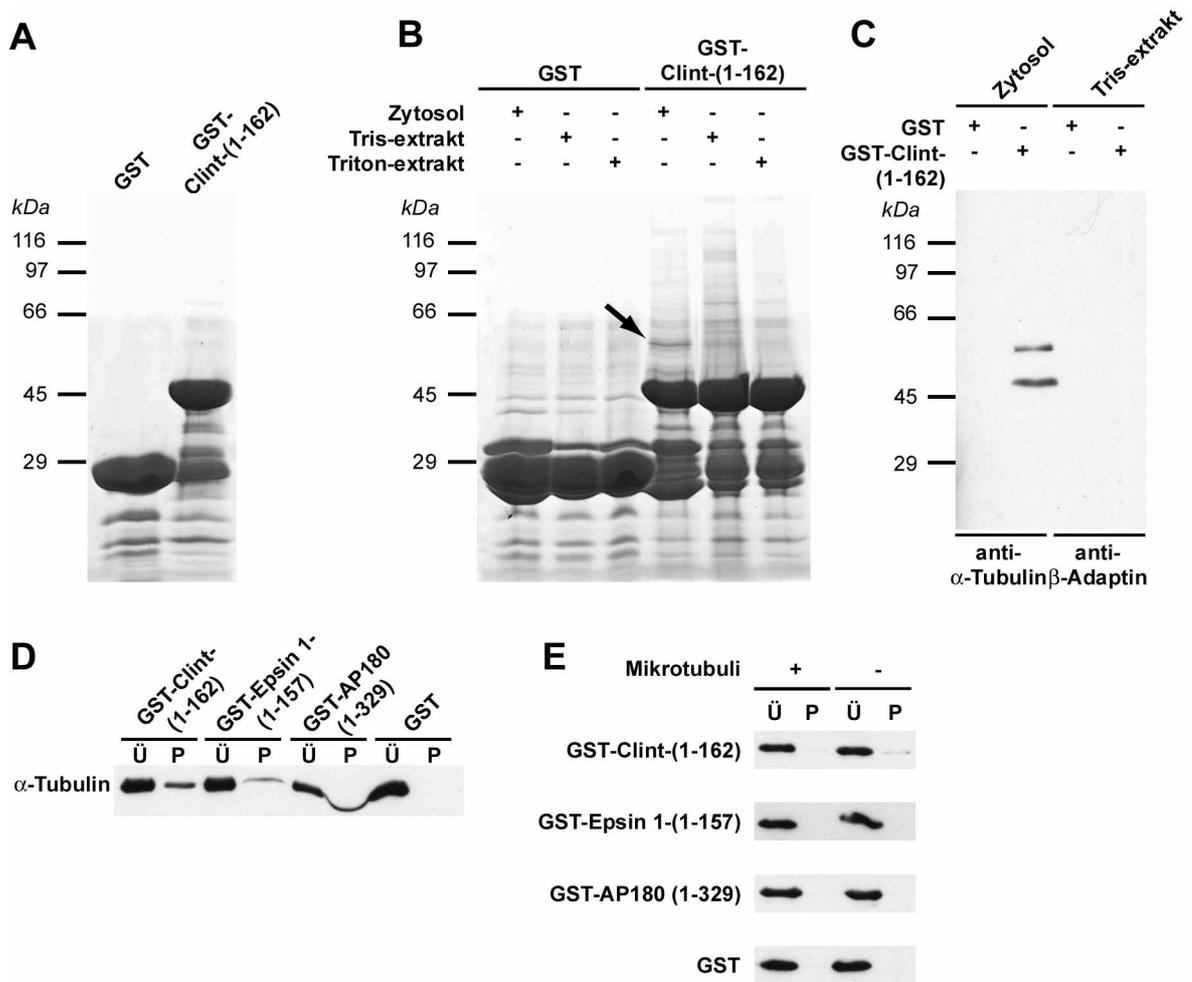


Das Ergebnis wirft die Frage auf, wie sich die ENTH-Domäne von Epsin 1 in einem vergleichbaren Experiment verhält. Zwar war in einer früheren Studie bereits ein GFP-Konstrukt der aminoterminalen Domäne von Epsin 1 verwendet worden, allerdings wurde das Fusionsprotein dabei so stark überexprimiert, daß die publizierten Aufnahmen der transfizierten Zellen keine Rückschlüsse auf seine subzelluläre Verteilung zulassen (Chen *et al.*, 1998). Daher wurde ein Fusionsprotein der ENTH-Domäne von Epsin 1 konstruiert, das dem zuvor beschriebenen Clintkonstrukt entsprach, und ebenfalls in HeLa SS6-Zellen transfiziert. Epsin 1-(1-157)-GFP reichte sich teilweise an der Plasmamembran an und war dabei v.a. in Bereichen zu finden, die nach Immunmarkierung auch positiv für AP-2 waren. Da die Färbung der Epsin-ENTH-Domäne allerdings nicht wie die von AP-2 aus distinkten Punkten besteht, sondern über größere Membranbereiche verteilt zu sein scheint, kann jedoch nicht von einer Kolo-kalisation gesprochen werden. Eindeutig zu erkennen ist dagegen, daß Epsin 1-(1-157)-GFP nicht an Membranen im Bereich des TGN bindet (Abbildungen 3.15 J bis L). Auch diese Ergebnisse sprechen demnach dafür, daß die ENTH-Domäne entscheidend an der Lokalisation des Gesamtproteins in der Zelle beteiligt ist.

### 3.9.2 Identifizierung neuer Bindungspartner der ENTH-Domäne von Clint

Die in Abschnitt 3.6 beschriebene schwache und wenig selektive Bindung der ENTH-Domäne von Clint an Phosphoinositide läßt es fraglich erscheinen, ob diese Lipidinteraktion allein für die Lokalisation von Clint an das TGN verantwortlich sein kann. Zwar war für Epsin 1 postuliert worden, daß es durch Wechselwirkung mit PtdIns-(4,5)-P<sub>2</sub> an bestimmte Bereiche der Plasmamembran bindet (Ford *et al.*, 2002; Itoh *et al.*, 2001), dennoch erscheint es wahrscheinlich, daß noch weitere zytosolische oder membrangebundene Proteine an der Rekrutierung von Clint über die ENTH-Domäne beteiligt sind. Aus diesem Grund wurde versucht, Bindungspartner der ENTH-Domäne in verschiedenen Gewebeextrakten aus Schweineiere zu identifizieren. GST-Clint-(1-162) wurde an GSH-Sepharose immobilisiert und mit Zytosol und einem Trisextrakt sowie einem Tritonextrakt der Membranfraktion inkubiert. Zur Herstellung der beiden letzteren Lösungen wurde die Membranfraktion nach der Präparation von Zytosol nacheinander zunächst mit 0,5 M Tris bei pH 7,0 und anschließend mit 1 % Triton-X 100 in einem physiologischen Puffer resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Die Überstände wurden auf physiologische Pufferbedingungen

eingestellt und mit GST-Clint-(1-162) inkubiert. Die Sepharosematrix wurde anschließend gewaschen und durch SDS-PAGE und Coomassiefärbung auf gebundene Proteine untersucht. Während die meisten der als Banden sichtbaren Proteine entweder auch mit der GST-Kontrolle assoziierten oder deren Bindung an GST-Clint-(1-162) nicht reproduzierbar war, fiel insbesondere eine deutliche Bande mit einer apparenten Molekülmasse von etwa 55 kDa auf, die aus dem Zytosol an das Fusionsprotein gebunden hatte. Durch Westernblotanalyse konnte diese Bande als  $\alpha$ -Tubulin identifiziert werden (Pfeil in Abbildung 3.16 B und Abbildung 3.16 C). Es wurde außerdem überprüft, ob es sich bei weiteren Banden mit rund 100 kDa um Adaptorproteine handeln könnte. Ein Westernblot gegen  $\beta$ -Adaptin zeigte allerdings kein Signal (Abbildung 3.16 C).



**Abbildung 3.16** Identifizierung neuer Bindungspartner der ENTH-Domänen. GST und GST-Clint-(1-162) wurden an GSH-Sepharose immobilisiert und mit Schweinenierenzytosol sowie Tris- und Tritonextrakten der Membranfraktion von Schweineniere inkubiert. A: GST und GST-Clint-(1-162) wie sie in die Bindungsexperimente eingesetzt wurden. B: Gebundene Proteine aus den Gewebeeextrakten mit GST-Sepharose und GST-Clint-(1-162)-Sepharose. Insbesondere eine Bande fällt auf, die aus Zytosol an das Clintfragment, nicht aber an die GST-Kontrolle gebunden hat. C: Ein Westernblot identifiziert die Bande, die in B mit dem Pfeil markiert wurde

als  $\alpha$ -Tubulin. Bei Banden im Bereich von rund 100 kDa, die aus Trisextrakt gebunden wurden handelt es sich offenbar nicht um AP-1 oder AP-2, da der Blot gegen  $\beta$ -Adaptin negativ war. D: Aufgereinigtes Tubulin aus Rinderhirn bindet direkt an GST-Clint-(1-162), GST-Epsin 1-(1-157) und GST-AP180-(1-329). E: Die GST-Fusionsproteine der ENTH-Domänen wurden mit polymerisierten Mikrotubuli inkubiert, die durch Ultrazentrifugation abgetrennt wurden. Eine Assoziation konnte nicht nachgewiesen werden.

Die Assoziation von Tubulin mit der ENTH-Domäne von Clint wurde dagegen näher untersucht. Dabei wurden auch die ENTH-Domänen anderer Proteine mit eingeschlossen. Zunächst wurde ein Bindungsexperiment von aufgereinigtem Tubulin aus Rinderhirn an GST-Clint-(1-162), GST-Epsin 1-(1-157) bzw. GST-AP180-(1-329) durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß Tubulin nicht nur mit der ENTH-Domäne von Clint, sondern auch mit denen von Epsin 1 und AP180 interagiert (Abbildung 3.16 D). Dieses Ergebnis warf natürlich die Frage auf, ob die ENTH-Domänen auch in der Lage sind, an polymerisierte Mikrotubuli zu binden. Um diese Frage zu überprüfen wurden mit Taxol stabilisierte Mikrotubuli *in vitro* mit den verschiedenen ENTH-Domänen inkubiert und durch Ultrazentrifugation pelletiert. Die Analyse der Proben durch SDS-PAGE und Westernblot ergab jedoch, daß keine der ENTH-Domänen mit den Mikrotubuli kosedimentierte (Abbildung 3.16 E).

Es konnte demnach  $\alpha$ -Tubulin als neuer Bindungspartner der ENTH-Domänen von Clint und AP180 identifiziert werden. An polymerisierte Mikrotubuli binden die ENTH-Domänen allerdings unter den untersuchten Bedingungen nicht.

## 4 Diskussion

### 4.1 Flexible Clathrinbindungsdomänen als Strukturprinzip

Die biophysikalische Analyse von Epsin 1 und AP180 hat ergeben, daß beide Proteine abgesehen von ihren ENTH-Domänen fast ausschließlich aus flexiblen Polypeptidketten bestehen, die als statistische Knäuel angeordnet sind. Ein Blick in die Literatur zeigt, daß dieses Strukturprinzip gar nicht so selten ist. Es gibt zahlreiche Beispiele von Proteinen, die in Lösung unter physiologischen Bedingungen keine Struktur annehmen (gute Übersichten geben Dunker *et al.*, 2001 und Dyson und Wright, 2002). Häufig wird eine solche Konformation auch als unstrukturiert, nativ ungefalted oder intrinsisch ungeordnet bezeichnet.

So sind unter anderen viele nukleinsäurebindende Proteine ungefalted. Auf einen Großteil der ribosomalen Proteine trifft dies ebenso zu (Uversky *et al.*, 2000) wie auf zahlreiche Transkriptionsfaktoren (Dyson und Wright, 2002). Aber auch bei der strukturellen Organisation der Zelle spielen flexible Proteine wichtige Rollen. Ein prominentes Beispiel ist das mikrotubuliassoziierte Protein Tau, das an polymerisierte Mikrotubuli bindet und diese stabilisiert (Schweers *et al.*, 1994). Durch Gendefekte neigt das ansonsten sehr lösliche Protein dazu,  $\beta$ -Faltblattstrukturen auszubilden und zu sogenannten gepaarten helikalen Filamenten zu polymerisieren, die eine Rolle bei der Entstehung der Alzheimer Krankheit spielen (von Bergen *et al.*, 2001).

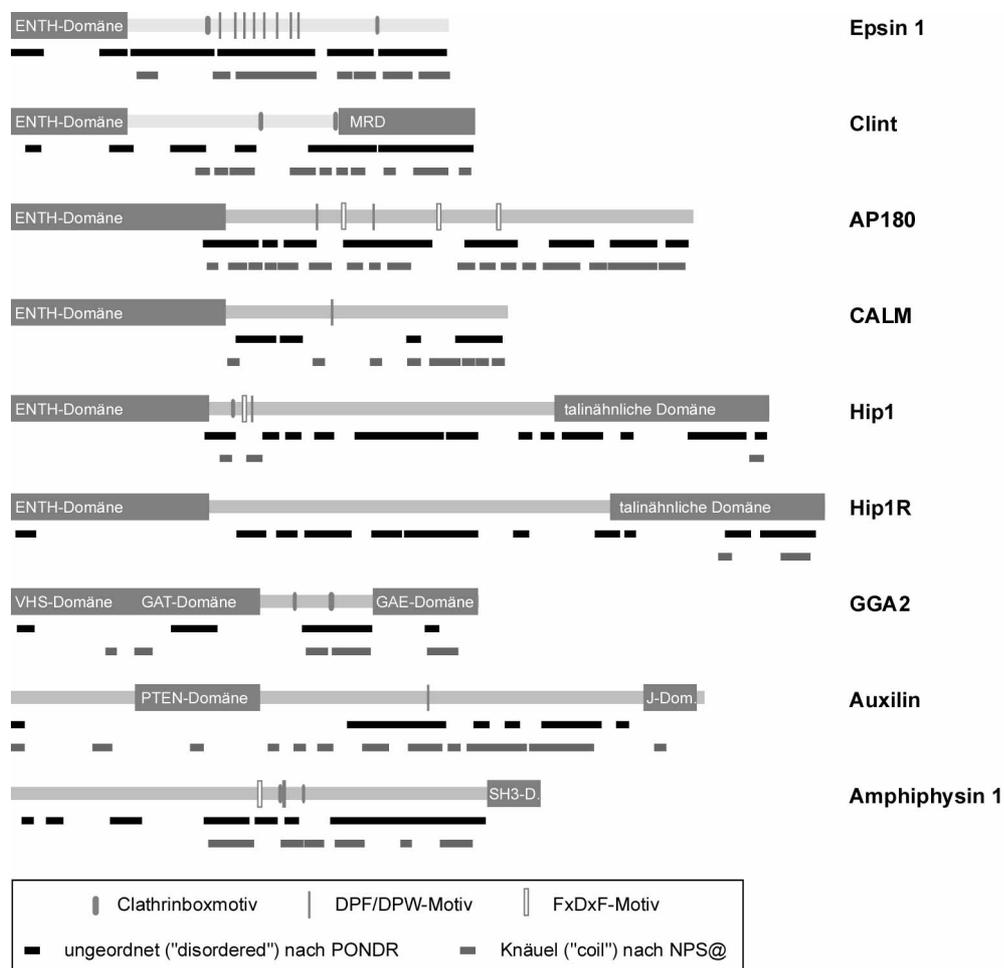
Durch Analyse der Aminosäurezusammensetzung von über 90 Proteinen, die in voneinander unabhängigen Studien als nativ ungefalted identifiziert worden waren, wurde versucht, Gemeinsamkeiten abzuleiten, die dieser Eigenschaft von Proteinen zugrunde liegen. Dabei stellte sich heraus, daß es eine Kombination von niedriger Gesamthydrophobizität und hoher Nettoladung ist, die die meisten intrinsisch ungeordneten Proteine von kompakt gefalteten unterscheidet (Uversky *et al.*, 2000). Wie bereits in Abschnitt 3.1 beschrieben, besitzen auch Epsin 1 und AP180 eine solche Aminosäurezusammensetzung. Auf diese Weise ist auch die gute Thermostabilität beider Proteine zu erklären. Die hohe Nettoladung führt zu einer extrem großen Löslichkeit in wässrigem Medium, und der Mangel an unpolaren Aminosäuren verhindert eine Aggregation mit anderen Proteinen bei der Erhitzung. Schließlich sind es vor

allem hydrophobe Wechselwirkungen, die bei irreversibler thermischer Denaturierung zur Koagulation führen.

In einem anderen Ansatz wurde ein hierarchisches neuronales Netzwerk mit den Aminosäuresequenzen von intrinsisch ungeordneten Proteinen und Proteinfragmenten trainiert und anschließend zur Prognose unstrukturierter Bereiche in unbekanntem Proteinsequenzen verwendet (das System wurde PONDR für *predictor of naturally disordered regions* genannt; Romero *et al.*, 1997). Das Programm wurde von den Autoren im folgenden dazu benutzt, ganze Genome auszuwerten und ungefaltete Bereiche in den offenen Leserahmen aller Gene zu prognostizieren. Das erstaunliche Ergebnis der Studie war, daß mit zunehmender Komplexität des Organismus auch die Zahl der unstrukturierten Bereiche in ihren Proteinen zunahm. So wurden beispielsweise bei *Escherichia coli* nur in 8 % der Genprodukte ungeordnete Aminosäuresequenzen von 50 Resten oder mehr vorhergesagt, nur 2 % der Proteine sind vollständig ungeordnet. Dagegen wird prognostiziert, daß *Drosophila melanogaster* (der höchst entwickelte untersuchte Organismus) in 41 % seiner Proteine unstrukturierte Bereiche von 50 Aminosäuren oder mehr hat und 17 % der Proteine vollständig ungefaltet sind (Dunker *et al.*, 2001). Die Autoren spekulieren, daß schwach strukturierte Proteine in Strukturdatenbanken wie der *protein database* (PDB) bislang deutlich unterrepräsentiert sind, da die meisten Ansätze, Daten über die räumliche Organisation von Proteinen zu erhalten wie Röntgenstrukturanalyse nur in der Lage sind, kompakte Strukturen zu determinieren. Ein Mangel an Ordnung wird dagegen häufig für uninteressant erachtet und gar nicht publiziert. In der PDB, in der die Strukturdaten in Form von Raumkoordinaten gespeichert sind, lassen sich flexible Bereiche ohnehin nicht ablegen.

Da nun hier bereits für zwei Proteine, die an der Bildung von clathrinbedeckten Vesikeln beteiligt sind, festgestellt wurde, daß ihre Clathrinbindungsdomänen ungeordnet sind, wurde der PONDR-Algorithmus verwendet, um auch andere clathrinbindende Proteine zu untersuchen. Zum Vergleich wurden darüberhinaus dieselben Sequenzen auch mit dem NPS@-Programm analysiert (Combet *et al.*, 2000). Dies ist ebenfalls ein hierarchisches neuronales Netzwerk, das Sekundärstrukturen von Proteinen vorhersagt. In Abbildung 4.1 sind bei einer Reihe von Proteinen, die an der Bildung von clathrinbedeckten Vesikeln beteiligt sind, alle Bereiche markiert, die über mehr als 15 Aminosäuren entweder als „ungeordnet“ (PONDR) oder „Knäuel“ (NPS@) prognostiziert wurden. Zunächst einmal ist zu erkennen, daß beide Pro-

gramme Epsin 1 und AP180 korrekt mit Ausnahme der ENTH-Domäne fast vollständig als unstrukturiert vorhergesagt haben. Aber auch in den meisten anderen untersuchten Proteinsequenzen kommen ausgedehnte strukturarme Bereiche vor. Es fällt auf, daß in den meisten Fällen die linearen Peptidsequenzen, die für die Bindung an Clathrin (Clathrinboxmotive) und AP-2 (DPF/W, FxDxF) notwendig sind, in solchen ungefalteten Domänen liegen. Es drängt sich daher der Verdacht auf, daß es sich bei derart ungefalteten Bereichen um ein verbreitetes Strukturprinzip von Clathrin- und Adaptorproteinbindungsdomänen handelt, und der Mangel an Sekundär- und Tertiärstruktur für die Funktion und Regulation der Proteine wichtig ist.



**Abbildung 4.1** Ungeordnete Polypeptidketten als Strukturprinzip in Clathrinbindungsdomänen. Dargestellt sind schematische Übersichten über die Domänenstrukturen einer Auswahl von akzessorischen Proteinen bei der Bildung clathrinbedeckter Vesikel. Bekannte Domänen und Bindungsmotive für Clathrin und AP-2 wurden markiert. Unter den Sequenzen wurden jeweils durch einen schwarzen Balken Bereiche kenntlich gemacht, die über mehr als 15 Aminosäuren durch das PONDNR-Programm als ungeordnet („disordered“) vorhergesagt wurden. In grau wurden Bereiche gekennzeichnet, die über mehr als 15 Reste vom Programm NPS@ als Knäuel („coil“) prognostiziert wurden. Es fällt auf, daß in vielen Proteinen die Bindungsorte für Clathrin und AP-2 in weitgehend ungeordnet vorhergesagten Abschnitten der Proteine liegen.

Für viele der Proteine, die als intrinsisch ungeordnet identifiziert wurden, ist bekannt, daß sie nur isoliert in Lösung diese Eigenschaft besitzen, in Gegenwart ihrer Bindungspartner dagegen an Struktur gewinnen. Sie falten sich demnach erst bei der Interaktion mit anderen Proteinen. Beispiele dafür sind etwa der zytosolische Teil, des Transmembranproteins E-Cadherin, der intrinsisch ungeordnet ist, aber bei Bindung an  $\beta$ -Catenin Struktur annimmt (Huber *et al.*, 2001; Huber und Weis, 2001). Auch die GTPase-Bindungsdomäne von Mitgliedern der Wiskott-Aldrich Syndrom Protein (WASP) Familie ist nativ ungefalted, kann aber bei Interaktion mit einer intramolekularen regulatorischen Domäne oder heterologen GTPasen voneinander unterschiedliche, überwiegend  $\alpha$ -helikale Strukturen ausbilden (Kim *et al.*, 2000; Rudolph *et al.*, 1998). Kürzlich wurde für auch für die leichten Ketten von Clathrin, die frei in Lösung überwiegend unstrukturiert sind, gezeigt, daß sie bei Assoziation mit den schweren Ketten  $\alpha$ -Helizes bilden (Chen *et al.*, 2002).

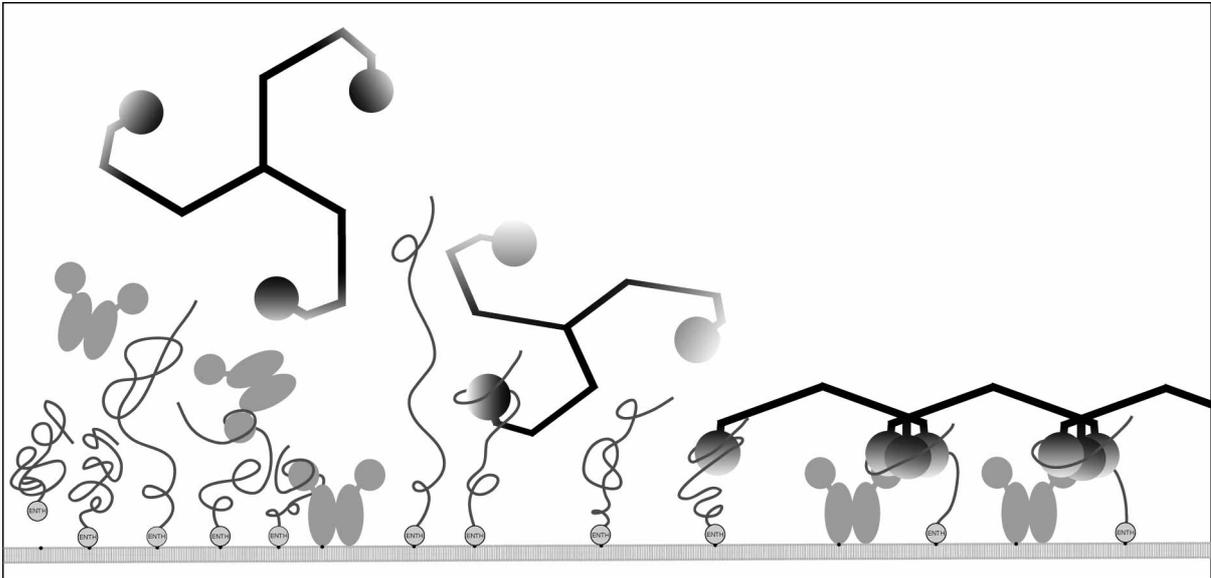
Die Frage ist, welchen Vorteil eine solche strukturelle Organisation bringt. Einerseits bietet sie natürlich wie im Fall der WASP-GTPase-Bindungsdomäne, die Möglichkeit, mit unterschiedlichen Partnern sich gegenseitig ausschließende Bindungen einzugehen. Dunker *et al.* haben aber auch die thermodynamischen Konsequenzen derartiger Bindungen untersucht und festgestellt, daß der Entropieverlust bei der Bindung zu einer Verringerung des Betrags der Freien Energie führt. Damit sind Assoziationen mit niedriger Affinität, gleichzeitig aber hoher Spezifität möglich (Dunker *et al.*, 2001). Derartige Bindungseigenschaften könnten bei Interaktionen in einem hochdynamischen Prozeß wie der Bildung von clathrinbedeckten Vesikeln durchaus von Nutzen sein. Nach der Vorabpublikation der in dieser Arbeit beschriebenen biophysikalischen Untersuchungen wurde allerdings in einer weiteren Studie die sogenannte DPW-Domäne von Epsin 1 (Aminosäuren 229 bis 407) ebenfalls durch CD-Spektroskopie als ungeordnet identifiziert. Die Zugabe der Ohrdomäne von  $\alpha$ -Adaptin, an die Epsin mit vergleichsweise hoher Affinität bindet, führte allerdings nicht zu einer Zunahme in der Gesamtstruktur (Brett *et al.*, 2002). Zwar ist nicht auszuschließen, daß ein Gewinn an Ordnung unter den gewählten Bedingungen nicht detektierbar war, dennoch muß davon ausgegangen werden, daß Faltungsprozesse bei der Assoziation der Proteininteraktionsdomänen von Epsin 1 und AP180 eine untergeordnete Rolle spielen.

## 4.2 Epsin 1 und AP180 bei der Bildung von Clathrinhüllen

Ein weiterer Vorteil, den die intrinsische Unordnung für die Clathrinbindungsdomänen von Epsin 1 und AP180 haben könnte, liegt in der Flexibilität der Struktur. Sie könnte beiden Proteinen im Vergleich mit einer kompakten, starren Form Vorteile bei der Rekrutierung anderer Bestandteile der Clathrinhülle bringen. Berechnungen von Shoemaker *et al.* haben ergeben, daß ungefaltete Strukturen gegenüber gefalteten tatsächlich einen deutlich vergrößerten Einfangradius für Protein-Protein-Interaktionen besitzen und dadurch initiale schwache Interaktionen leichter ausgebildet werden können. Die Autoren sprechen in diesem Zusammenhang auch von einem Fliegenfängermechanismus (*fly-casting mechanism*; Shoemaker *et al.*, 2000).

Basierend auf den hier beschriebenen Daten wurde in Bezug auf Epsin 1 und AP180 ein Modell entwickelt, in dem die beobachtete Strukturarmut eine wichtige Rolle in der Bildung von Clathrinhüllen spielt. Epsin 1 und AP180 könnten in einem frühen Stadium der Vesikelbildung über ihre ENTH-Domänen an die Membranoberfläche gebunden werden. Dabei könnte die Interaktion sowohl durch Bindung an PtdIns-(4,5)-P<sub>2</sub> als auch über weitere Proteine wie etwa Frachtmoleküle vermittelt werden. Die Ergebnisse, die in Abschnitt 3.9.1 mit GFP-Fusionsproteinen der ENTH-Domänen von Epsin 1 und Clint gewonnen wurden, sprechen durchaus dafür, daß die ENTH-Domäne für die Membranlokalisation des Gesamtproteins verantwortlich ist. Mit Hilfe des flexiblen carboxyterminalen Schwanzes könnten dann weitere Komponenten der Vesikelhülle wie etwa die Adaptoren oder das Clathrin rekrutiert werden. Die ENTH-Domänenproteine würden dabei für eine hohe lokale Konzentration von flexibel zugänglichen Bindungsstellen für Clathrin und AP-2 sorgen, die in der Lage sind, diese Hüllbestandteile in einem Bereich, in dem Vesikel abgeschnürt werden sollen, zu konzentrieren. Gibt es erst einmal einige initiale Wechselwirkungen zwischen Clathrin und AP-2, die zur kooperativen Bildung einer Käfigstruktur führen, könnte diese durch Assoziation mit den ENTH-Domänenproteinen stabilisiert werden (Abbildung 4.2). Überschlägige Berechnungen haben ergeben, daß es dabei, was die möglichen Abstände der Bindungsorte angeht, durchaus denkbar wäre, daß Epsin 1 und AP180 mit mehreren Domänen gleichzeitig interagieren. Diese Möglichkeit wird auch dadurch unterstützt, daß bislang nur ein einziger Bindungsort für Clathrinboxmotive auf der Terminalen Domäne entdeckt wurde, Epsin 1 aber mehrere Bindungsstellen besitzt, die kooperativ bei der Bindung von Clathrin zusammenwirken (Drake *et al.*, 2000a; ter Haar *et al.*, 2000). Auf der Ohrdomäne von  $\alpha$ -Adaptin

gibt es zwar zwei Bindungsorte, die mit DPW-Motiven, wie sie in Epsin 1 vorkommen, interagieren können (Brett *et al.*, 2002), allerdings besitzt Epsin 1 acht Kopien dieses Tripeptids (Chen *et al.*, 1998).



**Abbildung 4.2** Schematische Darstellung zum möglichen Ablauf der Zusammenlagerung der endozytotischen Maschinerie an der Plasmamembran und der Rolle der ENTH-Domänenproteine bei diesem Prozeß. Wahrscheinlich wird die Bildung der Clathrinhülle initiiert durch hohe lokale Konzentrationen von PtdIns-(4,5)-P<sub>2</sub> in der Membran. Durch die Interaktion mit dem Lipid und womöglich auch mit anderen Proteinen werden Epsin 1 oder AP180 über ihre ENTH-Domänen an die Membran gebunden. Ihre flexiblen carboxyterminalen Schwänze sind in der Lage initiale Wechselwirkungen mit den Adapterproteinen und Clathrin einzugehen und diese in der Nähe der Membran zu konzentrieren. Sobald es zur kooperativen Zusammenlagerung der einzelnen Komponenten zu einer Clathrinhülle kommt, könnte diese durch Interaktion mit den flexiblen Bindungsdomänen von Epsin 1 und AP180 stabilisiert werden.

Zusammengenommen würde demnach die Rekrutierung von Epsin 1 oder AP180 zur Initiierung der Bildung der Clathrinhülle führen. Ergebnisse, daß Epsin 1 und AP180 *in vitro* gitterförmige Strukturen auf einer Membranoberfläche zusammenlagern können, wenn sie mit Clathrin und einer artifiziellen PtdIns-(4,5)-P<sub>2</sub>-haltigen Lipidschicht inkubiert werden, unterstützen dieses Modell (Ford *et al.*, 2002; Ford *et al.*, 2001).

Fraglich bleibt allerdings, ob die Epsine und AP180 bzw. dessen ubiquitäres Homolog CALM kooperativ an denselben Vesikelbildungsprozessen beteiligt sind oder ob sie möglicherweise spezialisiert in unterschiedliche Transportvorgänge involviert sind. Die Tatsache, daß AP180 spezifisch in neuronalem Gewebe vorkommt und in Nervenendigungen angereichert ist, spricht dafür, daß es bei der Wiedergewinnung der Membranbestandteile synaptischer Vesikel eine Rolle spielt. Darüberhinaus ist bekannt, daß AP180 bei Inkubation mit Clathrin zur Bildung besonders kleiner und regelmäßiger Käfigstrukturen führt (Ahle und Ungewickell, 1986). Tatsächlich

konnte gezeigt werden, daß in *Drosophila melanogaster* eine Mutation im Gen für das AP180-Ortholog LAP zu einer Bildung größerer synaptischer Vesikel führt (Zhang *et al.*, 1998). Ob an diesen Prozessen auch Epsin beteiligt ist, läßt sich allerdings aufgrund der vorhandenen Daten nicht sagen.

### 4.3 Clint bei der Bildung von clathrinbedeckten Vesikeln am TGN

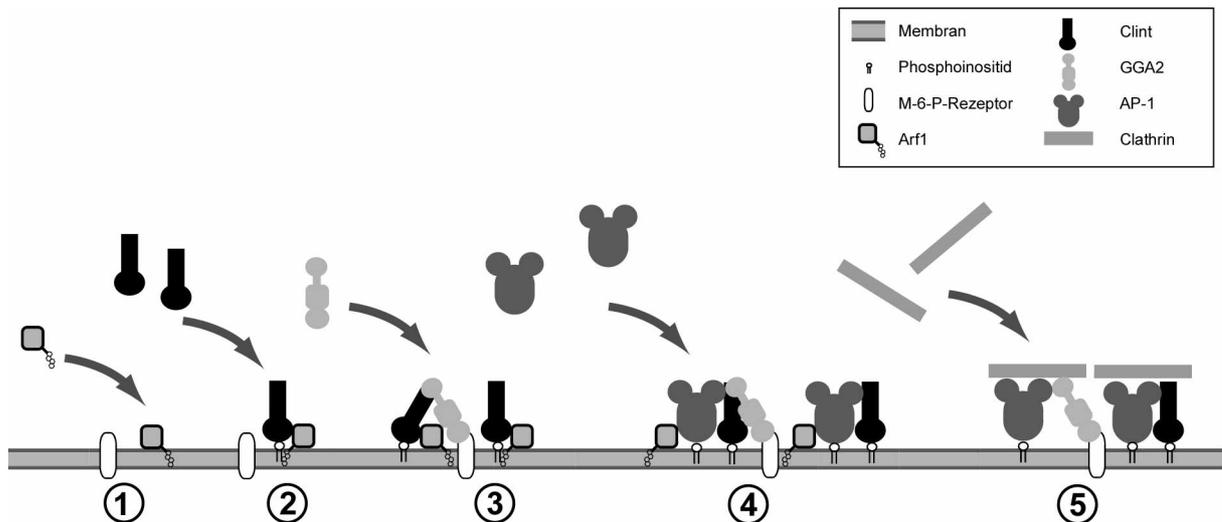
Im Rahmen dieser Arbeit konnte das neue ENTH-Domänenprotein Clint identifiziert werden. Im Gegensatz zu den anderen Mitgliedern der Proteinfamilie interagiert es bevorzugt mit Proteinen, die an der Bildung von clathrinbedeckten Vesikeln am TGN beteiligt sind. Es drängt sich daher der naheliegende Verdacht auf, daß Clint bei diesem Prozeß die gleiche Rolle spielt, die etwa Epsin 1 beim vergleichbaren Vorgang an der Plasmamembran hat.

Zwar kolokalisiert Clint mit AP-1, GGA2 und Clathrin im Bereich des TGN, so daß es durchaus in den selben Kontext eingebunden zu sein scheint. Allerdings ist nicht klar, ob der carboxyterminale Bereich ähnlich organisiert ist wie bei Epsin 1 oder AP180. Clint scheint neben möglicherweise mehreren schwachen nur eine hochaffine Bindungsstelle für Clathrin zu besitzen und ist nicht wie Epsin 1 und AP180 in der Lage unter physiologischen Bedingungen Clathrin zu Käfigstrukturen zusammenzulagern (ohne Abbildung). Auch die strukturelle Organisation von Clint scheint anders zu sein. Die in Abbildung 4.1 gezeigte Übersicht macht deutlich, daß die für die Sequenz von Clint prognostizierten strukturarmen Bereiche weniger ausgedehnt sind als in Epsin 1 und AP180. Auch die Erfahrung beim Umgang mit Clint zeigt, daß es sich anders verhält als die beiden anderen untersuchten ENTH-Domänenproteine. Der carboxyterminale Teil besitzt nicht die hohe Löslichkeit von Epsin 1 oder AP180 sondern neigt eher zur Aggregation (ohne Abbildung). Dennoch ist es gut möglich, daß Clint nur wenige gefaltete Bereiche enthält und abschnittsweise eine ausreichende Flexibilität besitzt, um die gleichen Aufgaben wie die übrigen untersuchten ENTH-Domänenproteine zu erfüllen.

Parallel zu den hier beschriebenen Untersuchungen haben weitere Arbeitsgruppen über verschiedene Ansätze ebenfalls das Genprodukt von KIAA0171 als neues clathrinbindendes Protein identifiziert und zwischenzeitlich auch publiziert. Es wurde dabei als Enthoprotin (Wasiak *et al.*, 2002) bzw. EpsinR (Hirst *et al.*, 2003; Mills *et al.*, 2003) bezeichnet. Die Ergebnisse stimmen mit den hier beschriebenen und zu dieser Arbeit vorab publizierten Daten (Kalthoff *et al.*, 2002b) weitgehend

überein. Eine der Arbeiten hat jedoch darüberhinausgehend festgestellt, daß eine Überexpression von EpsinR/Clint zu einem gestörten Transport der lysosomalen Hydrolase Cathepsin D führt, die normalerweise AP-1-abhängig vom TGN zu späten Endosomen transportiert wird, von wo aus sie zu den Lysosomen gelangt. Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, daß EpsinR/Clint tatsächlich an diesem Transport beteiligt ist (Mills *et al.*, 2003). Allerdings kann auch nicht ausgeschlossen werden, daß die große Zahl an Clintmolekülen lediglich am Prozess beteiligte Komponenten wie AP-1 bindet und dadurch an ihrer Funktion hindert, ohne an dem Vorgang selbst beteiligt zu sein. Dennoch erscheint es in Anbetracht der verfügbaren Daten wahrscheinlich, daß Clint gemeinsam mit AP-1 und den GGA-Proteinen in die Bildung von Clathrinvesikeln am TGN involviert ist, auch wenn schlüssige funktionelle Beweise hierfür noch ausstehen.

Ein denkbare Modell für die Vesikelbildung am TGN wäre, daß zunächst Arf1 an die *trans*-Golgiembranen bindet. Möglicherweise beeinflusst es dort indirekt die Lipidzusammensetzung, so daß Phosphoinositide gebildet werden, an die Komponenten der Clathrinhülle binden können (Abbildung 4.3, Schritt 1). Außerdem kann nun Arf1-abhängig Clint über seine ENTH-Domäne an die Membran rekrutiert werden (Abbildung 4.3, Schritt 2). Über den carboxyterminalen Bereich sorgt Clint zusammen mit Arf1 im folgenden dafür, daß AP-1 und GGA2 an das TGN binden (Abbildung 4.3, Schritte 3 und 4). Die GGAs könnten nun durch die Interaktion mit den Mannose-6-phosphatrezeptoren diese in dem Bereich fixieren, in dem die Clathrinhülle gebildet werden soll. Schließlich wird auch Clathrin aus dem Zytoplasma an die Golgiembranen rekrutiert, so daß sich kooperativ ein Netzwerk aus Clint, GGA2, AP-1 und Clathrin bildet und so die Abschnürung eines Clathrinvesikels initiiert wird (Abbildung 4.3, Schritt 5).



**Abbildung 4.3** Modell zur Ausbildung einer Clathrinhülle am TGN. 1: Arf1 bindet an die Membran und beeinflusst dort möglicherweise die Lipidzusammensetzung. 2: Arf1-abhängig wird Clint über seine ENTH-Domäne an das TGN rekrutiert. 3 bis 4: Unter dem Einfluß von Clint und Arf1 werden auch GGA2 und AP-1 an die Golgimembranen gebunden. Durch seine Interaktion mit den Mannose-6-phosphatrezeptoren könnte GGA diese in dem Bereich fixieren, in dem das Vesikel abgeschnürt wird. 5: Durch Rekrutierung von Clathrin kommt es zur kooperativen Ausbildung einer Proteinhülle und im folgenden zur Abschnürung eines clathrinbedeckten Vesikels.

#### 4.4 Die Rolle der ENTH-Domäne bei der Vesikelbildung

Interessant für die weitere Aufklärung der Funktionen von AP180, CALM, den Epsinen und Clint könnte vor allem die Untersuchung der Rolle der ENTH-Domänen werden. Bislang wurden sie lediglich als Lipidbindungsmodule betrachtet (Ford *et al.*, 2001; Itoh *et al.*, 2001). Clint und Epsin 1 besitzen eine recht gut ausgeprägte Homologie in diesem Bereich und offenbar scheint auch die Phosphoinositidbindungs-tasche von Epsin 1 in der Clintsequenz konserviert zu sein, wenn auch durch Modellierung der Struktur gewisse Unterschiede vorhergesagt wurden. Tatsächlich unterscheiden sich auch die beobachteten Bindungseigenschaften. Während Epsin 1 recht spezifisch PtdIns-(4,5)-P<sub>2</sub> bindet, ist die Assoziation von Clint mit Phosphoinositiden deutlich schwächer und wenig selektiv. Nicht allein aus diesem Grund erscheint es vergleichsweise unwahrscheinlich, daß Epsin 1 oder Clint nur durch die Lipidinteraktion an ihre Zielmembran dirigiert werden. So ist PtdIns-(4,5)-P<sub>2</sub> nicht nur wichtig für die Vesikelbildung an der Plasmamembran, es kommt auch in Membranen des Golgiapparats vor und ist an der Regulation der Dynamik des Zytoskellets beteiligt (Roth, 1999; Sechi und Wehland, 2000).

Auch die Tatsache, daß die ENTH-Domänen Phospholipidbindungsstellen an unterschiedlichen Stellen besitzen, zeigt, daß diese Eigenschaft zwar wichtig ist, sich jedoch offenbar sekundär entwickelt hat. Darüberhinaus besitzen die VHS-Domänen, wie sie z.B. in den GGAs vorkommen, eine Faltung, die der der ENTH-Domänen ex-

trem ähnlich ist. Für sie konnte allerdings bislang keine Bindung an Phosphoinositide gezeigt werden. Im Gegensatz dazu ist zumindest für die GGA-Proteine gezeigt worden, daß die VHS-Domänen die Bindung an den zytosolischen Teil von Transmembranproteinen am TGN wie den Mannose-6-Phosphatrezeptoren vermitteln (Puertollano *et al.*, 2001a; Zhu *et al.*, 2001). Vor diesem Hintergrund erscheint es durchaus denkbar, daß auch die ENTH-Domänen nicht nur Lipid- sondern auch Protein-Interaktionsmodule sind.

Eine solche Protein Wechselwirkung könnte auch die Ursache für die beobachtete BFA-abhängigkeit der Golgilokalisation der ENTH-Domäne von Clint sein. Es wäre zwar denkbar, daß die Assoziation mit den Golgimembranen auch durch Arf1-abhängige Veränderung der Lipidkomposition beeinflusst wird, die ENTH-Domäne könnte aber durchaus auch durch Interaktion mit weiteren Arf1-abhängig ans TGN gebundenen Proteinen, möglicherweise sogar mit Arf1 selbst, rekrutiert werden.

Die Suche nach unidentifizierten Bindungspartnern hat zwar keine Proteine ergeben, die für die Assoziation von Clint mit dem TGN verantwortlich sind, allerdings hat sie gezeigt, daß die ENTH-Domänen von Clint, Epsin 1 und AP180 direkt mit unpolymerisiertem Tubulin interagieren. Gerade im Fall von Tubulin ist zunächst fraglich welche Relevanz eine solche Assoziation *in vivo* hat. Tubulin ist eines der häufigsten Proteine im Gewebe und die Zahl an Proteinen, mit denen es zu interagieren scheint, ist groß. Die Reproduzierbarkeit, mit der die ENTH-Domänen an Tubulin binden, läßt allerdings annehmen, daß hinter der Affinität eine funktionelle Bedeutung stecken könnte. Für die ENTH-Domäne von Epsin 1 hatte es bereits zuvor Berichte gegeben, daß sie an Tubulin bindet (De Camilli *et al.*, 2002). Darüberhinaus gibt es ältere Beobachtungen, daß AP180 spezifisch mit Tubulin interagiert und diese Wechselwirkung durch Phosphorylierung regulierbar ist, ohne daß die Assoziation auf eine bestimmte Region von AP180 eingegrenzt worden wäre. Es konnte gezeigt werden, daß Phosphorylierung durch eine Kinase, die mit der Hülle clathrinbedeckter Vesikel assoziiert ist, eine Bindung von AP180 an Tubulin verstärkt, während Phosphorylierung von Tubulin durch Casein Kinase II die Interaktion inhibiert (Kohtz und Puszkin, 1989). Aber auch Assoziationen mit anderen Komponenten von Clathrinhüllen sind beobachtet worden. Es gab bereits vor etwa zwanzig Jahren Berichte, daß Tubulin mit clathrinbedeckten Vesikeln und im speziellen mit der  $\mu$ -Untereinheit von Adaptorproteinen assoziiert ist (Kelly *et al.*, 1983; Pfeffer *et al.*, 1983). Eine direkte Interakti-

on mit löslichem Tubulin ist für die Ohrdomäne von  $\gamma$ -Adaptin beobachtet, allerdings nicht näher auf ihre Relevanz untersucht worden (Doray und Kornfeld, 2001). Außerdem wurde gezeigt, daß AP-1 über das mikrotubuliassoziierte Protein 1a an polymerisierte Mikrotubuli bindet (Orzech *et al.*, 2001). Schließlich hat eine Studie ergeben, daß AP-1 über seine  $\beta$ -Untereinheit mit dem KIF-13 Mikrotubulimotor aus der Kinesinfamilie interagiert, und Hinweise geliefert, daß Vesikel nach dem Verlust ihrer Clathrinhülle über AP-1 mit dem Motor assoziiert bleiben und dieser den Transport entlang von Mikrotubuli vermittelt (Nakagawa *et al.*, 2000). Insgesamt gibt es also eine Reihe von Beobachtungen, daß clathrinassoziierte Proteine mit Tubulin und Mikrotubuli interagieren. Allerdings ist für alle Transportprozesse entlang von Mikrotubuli eine direkte oder indirekte Bindung an polymerisiertes Tubulin notwendig. Beobachtet wurde hier jedoch nur eine Wechselwirkung mit nicht assembliertem Tubulin, so daß es unwahrscheinlich erscheint, daß die ENTH-Domänen an der Organisation der Bewegung entlang von Mikrotubuli beteiligt sind. Denkbar wäre höchstens noch, daß ENTH-Domänenproteine an endständige Tubulinmoleküle binden und dadurch den Einstieg in den Transportprozeß erleichtern. In einem solchen Fall wäre eine Bindung an die stabilisierten Mikrotubuli mit nur wenigen Enden in einem Sedimentationsexperiment wie hier sicherlich nicht detektierbar. Das allerdings ist reine Spekulation.

Eine weitere Möglichkeit bestände darin, daß ENTH-Domänenproteine in die Dynamik von Mikrotubuli eingreifen. Einerseits stellen diese wichtige Transportschienen für Vesikel dar, andererseits sind sie für die strukturelle Organisation von vesikulären Organellen, insbesondere des Golgiapparates sehr wichtig (Thyberg und Moskalewski, 1999). Es wäre demnach denkbar, daß über ENTH-Domänen Tubulin rekrutiert oder die Bildung neuer Mikrotubuli initiiert wird.

Derartige Fragen zu klären ist eine interessante Herausforderung für zukünftige Untersuchungen. Möglicherweise stellen Epsin 1, AP180 und Clint wichtige Bindeglieder zwischen Membransystem und Zytoskelett dar und helfen, die Dynamik beider Systeme zu koordinieren. Die vorliegende Arbeit hat gezeigt, daß ENTH-Domänenproteine wichtige Rollen bei der Bildung von clathrinbedeckten Vesikeln spielen, ihre Rolle aber weit darüber hinauszugehen scheint, nur ein einfaches Bindeglied zwischen Membran und anderen Hüllbestandteilen darzustellen.

## 5 Anhang

### 5.1 Aminosäuresequenzen der untersuchten Proteine

#### Epsin 1 aus Ratte (*rattus norvegicus*)

MSTSSLRRQM	KNIVHNYSEA	EIKVREATSN	DPWGPSSSLM	SEIADLTYNV	VAFSEIMSMI	60
WKRLNDHGKN	WRHVYKAMTL	MEYLIKTGSE	RVSQCKENM	YAVQTLKDFQ	YVDRDGDQDQ	120
VNVREKAKQL	VALLRDEDRL	REERAHALKT	KEKLAQTATA	SSAAVGSQPP	PEAEQAWPQS	180
SGEEELQLQL	ALAMSKEEFAD	QPPSCGPEDD	VQLQLALSLS	REEHDKEERI	RRGDDLRLQM	240
AIEESKRETG	GKEESSLMDL	ADVFTTPAPP	QASDPWGGPA	SVPTAVPVAA	AASDPWGAPA	300
VPPAADPWGG	AAPTASGDP	WRPAAPTGPS	VDPWGGTPAP	AAGEGPTSDP	WGSADGGAPV	360
SGPPSSDPWA	PAPAFSDPWG	GSPAKPSSNG	TAVGGFDTEP	DEFSDFDRLR	TALPTSGSST	420
GELELLAGEV	PARSPGAFDM	SGVGGSLAES	VGSPPPAATP	TPTPTTRKTP	ESFLGPNAAAL	480
<b>VDLDSL</b> VSRLP	GPTPPGAKAS	<b>NPFL</b> PSGA	TGPSVTNPFQ	PAPPATLTLN	QLRLSPVPPV	540
PGAPPTYISP	LGGGPGLPPM	MPPGPPAPNT	<b>NPFL</b> L			575

#### AP180 aus Rind (*bos taurus*)

MSGQTLTDRI	AAAQYSVTGS	AVARAVCKAT	THEVMGPKKK	HLDYLIQATN	ETNVNIPQMA	60
DTLFRERATNS	SWVVVFKALV	TTHHLMVHGN	ERFIQYLASR	NTLFNLSNFL	DKSGSHGYDM	120
STFIRRYRY	LNEKAFSYRQ	MAFDFARVKK	GADGVMRTMV	PEKLLKSMPI	LQGQIDALLE	180
FDVHPNELTN	GVINAAMLL	FKDLIKLFAC	YNDGVINLLE	KFFEMKKGQC	KDALEIYKRF	240
LTRMTRVSEF	LKVADEVGID	KGDIPDLTQA	PSSLMETLEQ	HLNTLEGKKP	GNNEGSGAPS	300
PLSKSSPATT	VTSPNSTPAK	TIDTSPVVDI	FATASAAAPV	SSAKPSSDLL	DLQPDFSGAR	360
AGAAAPVPPP	TGGATAWGDL	LGEDSLAALS	SVPSEAPISD	<b>PFAPE</b> SPPT	TTTEPASASA	420
SATTAVTAAT	TEVDL <b>FGDAF</b>	AASPGEAPAA	SEGATAPATP	APVAAALDAC	SG <b>NDPF</b> APSE	480
GSAEAAPELD	LFAMKPPETS	APVVTPTAST	APPVPATAPS	PAPTAVAATA	ATTTAAAAAT	540
TTATTSAAAA	TTAAAPPALD	I <b>FGDLF</b> DSAP	EVAAASKPDV	APSIDLFGTD	AFSSPPRGAS	600
PVPESLITAD	LLSVDAFAAP	SPASTASPAK	AESSGVIDLF	<b>GDAFG</b> SSASE	TQPAPQAVSS	660
SSASADLLAG	FGGSFMAPST	TPVTQAQNNL	LQPNFEAAFG	TTPSTSSSSS	FDPSGDLLMP	720
TMAPSGQPAP	VSMVPPSPAM	SASKGLGSDL	DSSLASLVGN	LGISGTTSKK	GDLQWNAGEK	780
KLITGGANWQP	KVTPATWSAG	VPPQGTVPPT	SSVPPGAGAP	SVGQPGAGYG	MPPAGTGMIM	840
MPQQPVMFAQ	PMMRPPFGAA	AVPGTQLSPS	PTPATQSPKK	PPAKDPLADL	NIKDFL	896

Clint aus dem Menschen (*homo sapiens*)

MLNMWKVREL VDKATNVVMN YSEIESKVRE ATNDDPWGPS GQLMGEIACA TFMYEQFPEL 60  
 MNMLWSRMLK DNKKNWRRVY KSLLLLAYLI RNSERVVTS AREHIYDLRS LENYHFVDEH 120  
 GKDQGINIRQ KVKELVEFAQ DDDRLREERK KAKKNKDKYV GVSSDSVGGF RYSERYDPEP 180  
 KSKWDEEWDK NKSAFPFSDK LGELSDKIGS TIDDTISKFR RKDREDSPER CSDSDEEKKA 240  
 RRRGRSPKGEF KDEEETVTTK HHHITQATEI TTRHKRTAN PSKTIDLGAA AHYTGDKASP 300  
 DQNASTHTPQ SSVKTSVPSS KSSGDLVDLF DGT'SQSTGGS ADLFGGFADF GSAAAAGSFP 360  
 SQVTATSGNG DFGDWSAFNQ APSGPVASSG EFFGSASQPA VELVSGSQSA LGPPPAASNS 420  
 SDLFDLMGSS QATMTSSQSM NFSMMSTNTV GLGLPMSRSQ NTDMVQKSVS KTLPTWSDP 480  
 SVNISLDNLL PGMQPSKPOQ PSLNIMIQQQ NMQQPMNMT QSFQAVNLSS PSNMLPVRPQ 540  
 TNALIGGMP MSMPNVMTGT MGMAPLGNTP MMNQSMGMN MNIGMSAAGM GLITGTMGMGM 600  
 PNIAMTSGTV QPKQDAFANF ANFSK 625

## 6 Literaturverzeichnis

Ahle, S., A. Mann, U. Eichelsbacher, und E. Ungewickell. 1988. Structural relationships between clathrin assembly proteins from the Golgi and the plasma membrane. *EMBO J.* 7:919-929.

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

Arneson, L.S., J. Kunz, R.A. Anderson, und L.M. Traub. 1999. Coupled inositide phosphorylation and phospholipase D activation initiates clathrin-coat assembly on lysosomes. *J Biol Chem.* 274:17794-17805.

Bar-Zvi, D., S.T. Mosley, und D. Branton. 1988. In vivo phosphorylation of clathrin-coated vesicle proteins from rat reticulocytes. *J Biol Chem.* 263:4408-4415.

Bonifacino, J.S., und E.C. Dell'Angelica. 1999. Molecular bases for the recognition of tyrosine-based sorting signals. *J Cell Biol.* 145:923-926.

Brett, T.J., L.M. Traub, und D.H. Fremont. 2002. Accessory protein recruitment motifs in clathrin-mediated endocytosis. *Structure (Camb).* 10:797-809.

Brodsky, F.M. 1985. Clathrin structure characterized with monoclonal antibodies. I. Analysis of multiple antigenic sites. *J Cell Biol.* 101:2047-2054.

Brodsky, F.M., C.Y. Chen, C. Knuehl, M.C. Towler, und D.E. Wakeham. 2001. Biological basket weaving: formation and function of clathrin-coated vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 17:517-568.

Chen, C.Y., M.L. Reese, P.K. Hwang, N. Ota, D. Agard, und F.M. Brodsky. 2002. Clathrin light and heavy chain interface: alpha-helix binding superhelix loops via critical tryptophans. *EMBO J.* 21:6072-6082.

Chen, H., S. Fre, V.I. Slepnev, M.R. Capua, K. Takei, M.H. Butler, P.P. Di Fiore, und P. De Camilli. 1998. Epsin is an EH-domain-binding protein implicated in clathrin-mediated endocytosis. *Nature.* 394:793-797.

Chen, H., V.I. Slepnev, P.P. Di Fiore, und P. De Camilli. 1999. The interaction of epsin and Eps15 with the clathrin adaptor AP-2 is inhibited by mitotic phosphorylation and enhanced by stimulation-dependent dephosphorylation in nerve terminals. *J Biol Chem.* 274:3257-3260.

Chin, D.J., R.M. Straubinger, S. Acton, I. Nathke, und F.M. Brodsky. 1989. 100-kDa polypeptides in peripheral clathrin-coated vesicles are required for receptor-mediated endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86:9289-9293.

Collins, B.M., A.J. McCoy, H.M. Kent, P.R. Evans, und D.J. Owen. 2002. Molecular architecture and functional model of the endocytic AP2 complex. *Cell.* 109:523-535.

Combet, C., C. Blanchet, C. Geourjon, und G. Deleage. 2000. NPS@: network protein sequence analysis. *Trends Biochem Sci.* 25:147-150.

- Costaguta, G., C.J. Stefan, E.S. Bensen, S.D. Emr, und G.S. Payne. 2001. Yeast Gga coat proteins function with clathrin in Golgi to endosome transport. *Mol Biol Cell*. 12:1885-1896.
- Cremona, O., G. Di Paolo, M.R. Wenk, A. Luthi, W.T. Kim, K. Takei, L. Daniell, Y. Nemoto, S.B. Shears, R.A. Flavell, D.A. McCormick, und P. De Camilli. 1999. Essential role of phosphoinositide metabolism in synaptic vesicle recycling. *Cell*. 99:179-188.
- Crottet, P., D.M. Meyer, J. Rohrer, und M. Spiess. 2002. ARF1.GTP, Tyrosine-based Signals, and Phosphatidylinositol 4,5- Bisphosphate Constitute a Minimal Machinery to Recruit the AP-1 Clathrin Adaptor to Membranes. *Mol Biol Cell*. 13:3672-3682.
- Crowther, R.A., J.T. Finch, und B.M. Pearse. 1976. On the structure of coated vesicles. *J Mol Biol*. 103:785-798.
- De Camilli, P., H. Chen, J. Hyman, E. Panepucci, A. Bateman, und A.T. Brunger. 2002. The ENTH domain. *FEBS Lett*. 513:11-18.
- Dell'Angelica, E.C., J. Klumperman, W. Stoorvogel, und J.S. Bonifacino. 1998. Association of the AP-3 adaptor complex with clathrin. *Science*. 280:431-434.
- Doray, B., P. Ghosh, J. Griffith, H.J. Geuze, und S. Kornfeld. 2002. Cooperation of GGAs and AP-1 in packaging MPRs at the trans-Golgi network. *Science*. 297:1700-1703.
- Doray, B., und S. Kornfeld. 2001. gamma Subunit of the ap-1 adaptor complex binds clathrin: implications for cooperative binding in coated vesicle assembly. *Mol Biol Cell*. 12:1925-1935.
- Drake, M.T., M.A. Downs, und L.M. Traub. 2000a. Epsin binds to clathrin by associating directly with the clathrin- terminal domain. Evidence for cooperative binding through two discrete sites. *J Biol Chem*. 275:6479-6489.
- Drake, M.T., und L.M. Traub. 2001. Interaction of two structurally distinct sequence types with the clathrin terminal domain beta-propeller. *J Biol Chem*. 276:28700-28709.
- Drake, M.T., Y. Zhu, und S. Kornfeld. 2000b. The assembly of AP-3 adaptor complex-containing clathrin-coated vesicles on synthetic liposomes. *Mol Biol Cell*. 11:3723-3736.
- Dunker, A.K., J.D. Lawson, C.J. Brown, R.M. Williams, P. Romero, J.S. Oh, C.J. Oldfield, A.M. Campen, C.M. Ratliff, K.W. Hipps, J. Ausio, M.S. Nissen, R. Reeves, C. Kang, C.R. Kissinger, R.W. Bailey, M.D. Griswold, W. Chiu, E.C. Garner, und Z. Obradovic. 2001. Intrinsically disordered protein. *J Mol Graph Model*. 19:26-59.
- Dyson, H.J., und P.E. Wright. 2002. Coupling of folding and binding for unstructured proteins. *Curr Opin Struct Biol*. 12:54-60.
- Engqvist-Goldstein, A.E., M.M. Kessels, V.S. Chopra, M.R. Hayden, und D.G. Drubin. 1999. An actin-binding protein of the Sla2/Huntingtin interacting protein 1 family is a novel component of clathrin-coated pits and vesicles. *J Cell Biol*. 147:1503-1518.

- Engqvist-Goldstein, A.E., R.A. Warren, M.M. Kessels, J.H. Keen, J. Heuser, und D.G. Drubin. 2001. The actin-binding protein Hip1R associates with clathrin during early stages of endocytosis and promotes clathrin assembly in vitro. *J Cell Biol.* 154:1209-1224.
- Farsad, K., N. Ringstad, K. Takei, S.R. Floyd, K. Rose, und P. De Camilli. 2001. Generation of high curvature membranes mediated by direct endophilin bilayer interactions. *J Cell Biol.* 155:193-200.
- Ford, M.G., I.G. Mills, B.J. Peter, Y. Vallis, G.J. Praefcke, P.R. Evans, und H.T. McMahon. 2002. Curvature of clathrin-coated pits driven by epsin. *Nature.* 419:361-366.
- Ford, M.G., B.M. Pearce, M.K. Higgins, Y. Vallis, D.J. Owen, A. Gibson, C.R. Hopkins, P.R. Evans, und H.T. McMahon. 2001. Simultaneous binding of PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> and clathrin by AP180 in the nucleation of clathrin lattices on membranes. *Science.* 291:1051-1055.
- Gaidarov, I., Q. Chen, J.R. Falck, K.K. Reddy, und J.H. Keen. 1996. A functional phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate/phosphoinositide binding domain in the clathrin adaptor AP-2 alpha subunit. Implications for the endocytic pathway. *J Biol Chem.* 271:20922-20929.
- Goodman, O.B., Jr., und J.H. Keen. 1995. The alpha chain of the AP-2 adaptor is a clathrin binding subunit. *J Biol Chem.* 270:23768-23773.
- Goodman, O.B., Jr., J.G. Krupnick, V.V. Gurevich, J.L. Benovic, und J.H. Keen. 1997. Arrestin/clathrin interaction. Localization of the arrestin binding locus to the clathrin terminal domain. *J Biol Chem.* 272:15017-15022.
- Gu, F., C.M. Crump, und G. Thomas. 2001. Trans-Golgi network sorting. *Cell Mol Life Sci.* 58:1067-1084.
- Guex, N., und M.C. Peitsch. 1997. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis.* 18:2714-2723.
- Haucke, V., M.R. Wenk, E.R. Chapman, K. Farsad, und P. De Camilli. 2000. Dual interaction of synaptotagmin with mu2- and alpha-adaptin facilitates clathrin-coated pit nucleation. *EMBO J.* 19:6011-6019.
- Hirst, J., N.A. Bright, B. Rous, und M.S. Robinson. 1999. Characterization of a fourth adaptor-related protein complex. *Mol Biol Cell.* 10:2787-2802.
- Hirst, J., M.R. Lindsay, und M.S. Robinson. 2001. GGAs: roles of the different domains and comparison with AP-1 and clathrin. *Mol Biol Cell.* 12:3573-3588.
- Hirst, J., W.W. Lui, N.A. Bright, N. Totty, M.N. Seaman, und M.S. Robinson. 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.
- Hirst, J., A. Motley, K. Harasaki, S.Y.P. Chew, und M.S. Robinson. 2003. EpsinR: an ENTH Domain-Containing Protein that Interacts with AP-1. *Mol Biol Cell.* in Druck, publiziert am 18. November 2002 als 10.1091/mbc.E02-09-5992

- Huber, A.H., D.B. Stewart, D.V. Laurents, W.J. Nelson, und W.I. Weis. 2001. The cadherin cytoplasmic domain is unstructured in the absence of beta- catenin. A possible mechanism for regulating cadherin turnover. *J Biol Chem.* 276:12301-12309.
- Huber, A.H., und W.I. Weis. 2001. The structure of the beta-catenin/E-cadherin complex and the molecular basis of diverse ligand recognition by beta-catenin. *Cell.* 105:391-402.
- Hyman, J., H. Chen, P.P. Di Fiore, P. De Camilli, und A.T. Brunger. 2000. Epsin 1 undergoes nucleocytoplasmic shuttling and its eps15 interactor NH(2)-terminal homology (ENTH) domain, structurally similar to Armadillo and HEAT repeats, interacts with the transcription factor promyelocytic leukemia Zn(2)+ finger protein (PLZF). *J Cell Biol.* 149:537-546.
- Itoh, T., S. Koshiba, T. Kigawa, A. Kikuchi, S. Yokoyama, und T. Takenawa. 2001. Role of the ENTH domain in phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate binding and endocytosis. *Science.* 291:1047-1051.
- Kalthoff, C., J. Alves, C. Urbanke, R. Knorr, und E.J. Ungewickell. 2002a. Unusual structural organization of the endocytic proteins AP180 and epsin 1. *J Biol Chem.* 277:8209-8216.
- Kalthoff, C., S. Groos, R. Kohl, S. Mahrhold, und E.J. Ungewickell. 2002b. Clint: A Novel Clathrin-binding ENTH-Domain Protein at the Golgi. *Mol Biol Cell.* 13:4060-4073.
- Kay, B.K., M. Yamabhai, B. Wendland, und S.D. Emr. 1999. Identification of a novel domain shared by putative components of the endocytic and cytoskeletal machinery. *Protein Sci.* 8:435-438.
- Keen, J.H., M.C. Willingham, und I.H. Pastan. 1979. Clathrin-coated vesicles: isolation, dissociation and factor-dependent reassociation of clathrin baskets. *Cell.* 16:303-312.
- Kelly, W.G., A. Passaniti, J.W. Woods, J.L. Daiss, und T.F. Roth. 1983. Tubulin as a molecular component of coated vesicles. *J Cell Biol.* 97:1191-1199.
- Kim, A.S., L.T. Kakalis, N. Abdul-Manan, G.A. Liu, und M.K. Rosen. 2000. Autoinhibition and activation mechanisms of the Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Nature.* 404:151-158.
- Kindler, B. 1997. Auswertung von Messungen chemischer Reaktionsgeschwindigkeit und Analyse von Biopolymeren in der Ultrazentrifuge; Anwendungen auf Protein-DNA Wechselwirkungen. Dissertation im Fachbereich Chemie. Universität Hannover, Hannover. 1997.
- Kohtz, D.S., und S. Puszkin. 1989. Phosphorylation of tubulin by casein kinase II regulates its binding to a neuronal protein (NP 185) associated with brain coated vesicles. *J Neurochem.* 52:285-295.
- Laue, T.M., B.D. Shah, T.M. Ridgeway, und S.L. Pelletier. 1992. *In* Computer-aided interpretation of analytical sedimentation data for proteins. S.E. Harding, A.J. Rowe,

und J.C. Horton, editors. Royal Society of Chemistry, Cambridge, United Kingdom. 90-125.

Laurent, T.C., und J. Killander. 1964. A Theory of Gel Filtration and its Experimental Verification. *J Chromatog.* 14:331-339.

Le Maire, M., L.P. Aggerbeck, C. Monteilhet, J.P. Andersen, und J.V. Moller. 1986. The use of high-performance liquid chromatography for the determination of size and molecular weight of proteins: a caution and a list of membrane proteins suitable as standards. *Anal Biochem.* 154:525-535.

Lindner, R. 1994. Purification of clathrin-coated vesicles from bovine brain, liver and adrenal gland. *Cell Biology: A Laboratory Handbook (Celis, J. eds):*525-530.

Manifava, M., J.W. Thuring, Z.Y. Lim, L. Packman, A.B. Holmes, und N.T. Ktistakis. 2001. Differential binding of traffic-related proteins to phosphatidic acid- or phosphatidylinositol (4,5)- bisphosphate-coupled affinity reagents. *J Biol Chem.* 276:8987-8994.

Mao, Y., J. Chen, J.A. Maynard, B. Zhang, und F.A. Quioco. 2001. A novel all helix fold of the AP180 amino-terminal domain for phosphoinositide binding and clathrin assembly in synaptic vesicle endocytosis. *Cell.* 104:433-440.

Meyer, C., D. Zizioli, S. Lausmann, E.L. Eskelinen, J. Hamann, P. Saftig, K. von Figura, und P. Schu. 2000. mu1A-adaptin-deficient mice: lethality, loss of AP-1 binding and rerouting of mannose 6-phosphate receptors. *EMBO J.* 19:2193-2203.

Mills, I.G., G.J. Praefcke, Y. Vallis, B.J. Peter, L.E. Olesen, J.L. Gallop, P.J. Butler, P.R. Evans, und H.T. McMahon. 2003. EpsinR: an AP1/clathrin interacting protein involved in vesicle trafficking. *J Cell Biol.* 160:213-222.

Mishra, S.K., N.R. Agostinelli, T.J. Brett, I. Mizukami, T.S. Ross, und L.M. Traub. 2001. Clathrin- and AP-2-binding sites in HIP1 uncover a general assembly role for endocytic accessory proteins. *J Biol Chem.* 276:46230-46236.

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

Morris, S.A., A. Mann, und E. Ungewickell. 1990. Analysis of 100-180-kDa phosphoproteins in clathrin-coated vesicles from bovine brain. *J Biol Chem.* 265:3354-3357.

Morris, S.A., S. Schroder, U. Plessmann, K. Weber, und E. Ungewickell. 1993. Clathrin assembly protein AP180: primary structure, domain organization and identification of a clathrin binding site. *EMBO J.* 12:667-675.

Nagase, T., N. Seki, K. Ishikawa, A. Tanaka, und N. Nomura. 1996. Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. V. The coding sequences of 40 new genes (KIAA0161-KIAA0200) deduced by analysis of cDNA clones from human cell line KG-1. *DNA Res.* 3:17-24.

- Nakagawa, T., M. Setou, D. Seog, K. Ogasawara, N. Dohmae, K. Takio, und N. Hirokawa. 2000. A novel motor, KIF13A, transports mannose-6-phosphate receptor to plasma membrane through direct interaction with AP-1 complex. *Cell*. 103:569-581.
- Nielsen, M.S., P. Madsen, E.I. Christensen, A. Nykjaer, J. Gliemann, D. Kasper, R. Pohlmann, und C.M. Petersen. 2001. The sortilin cytoplasmic tail conveys Golgi-endosome transport and binds the VHS domain of the GGA2 sorting protein. *EMBO J*. 20:2180-2190.
- Norris, F.A., E. Ungewickell, und P.W. Majerus. 1995. Inositol hexakisphosphate binds to clathrin assembly protein 3 (AP-3/AP180) and inhibits clathrin cage assembly in vitro. *J Biol Chem*. 270:214-217.
- Ohno, H., J. Stewart, M.C. Fournier, H. Bosshart, I. Rhee, S. Miyatake, T. Saito, A. Gallusser, T. Kirchhausen, und J.S. Bonifacino. 1995. Interaction of tyrosine-based sorting signals with clathrin-associated proteins. *Science*. 269:1872-1875.
- Oldham, C.E., R.P. Mohny, S.L. Miller, R.N. Hanes, und J.P. O'Bryan. 2002. The ubiquitin-interacting motifs target the endocytic adaptor protein epsin for ubiquitination. *Curr Biol*. 12:1112-1116.
- Orzech, E., L. Livshits, J. Leyt, H. Okhrimenko, V. Reich, S. Cohen, A. Weiss, N. Melamed-Book, M. Lebendiker, Y. Altschuler, und B. Aroeti. 2001. Interactions between adaptor protein-1 of the clathrin coat and microtubules via type 1a microtubule-associated proteins. *J Biol Chem*. 276:31340-31348.
- Owen, D.J., Y. Vallis, B.M. Pearse, H.T. McMahon, und P.R. Evans. 2000. The structure and function of the beta 2-adaptin appendage domain. *EMBO J*. 19:4216-4227.
- Paturle-Lafanechere, L., B. Edde, P. Denoulet, A. Van Dorsselaer, H. Mazarguil, J.P. Le Caer, J. Wehland, und D. Job. 1991. Characterization of a major brain tubulin variant which cannot be tyrosinated. *Biochemistry*. 30:10523-10528.
- Pearse, B.M. 1976. Clathrin: a unique protein associated with intracellular transfer of membrane by coated vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 73:1255-1259.
- Pfeffer, S.R., D.G. Drubin, und R.B. Kelly. 1983. Identification of three coated vesicle components as alpha- and beta-tubulin linked to a phosphorylated 50,000-dalton polypeptide. *J Cell Biol*. 97:40-47.
- Polo, S., S. Sigismund, M. Faretta, M. Guidi, M.R. Capua, G. Bossi, H. Chen, P. De Camilli, und P.P. Di Fiore. 2002. A single motif responsible for ubiquitin recognition and monoubiquitination in endocytic proteins. *Nature*. 416:451-455.
- Potschka, M. 1987. Universal calibration of gel permeation chromatography and determination of molecular shape in solution. *Anal Biochem*. 162:47-64.
- Puertollano, R., R.C. Aguilar, I. Gorshkova, R.J. Crouch, und J.S. Bonifacino. 2001a. Sorting of mannose 6-phosphate receptors mediated by the GGAs. *Science*. 292:1712-1716.

- Puertollano, R., P.A. Randazzo, J.F. Presley, L.M. Hartnell, und J.S. Bonifacino. 2001b. The GGAs promote ARF-dependent recruitment of clathrin to the TGN. *Cell*. 105:93-102.
- Rapoport, I., Y.C. Chen, P. Cupers, S.E. Shoelson, und T. Kirchhausen. 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.
- Romero, P., Z. Obradovic, und K. Dunker. 1997. Sequence Data Analysis for Long Disordered Regions Prediction in the Calcineurin Family. *Genome Inform Ser Workshop Genome Inform*. 8:110-124.
- Rosenthal, J.A., H. Chen, V.I. Slepnev, L. Pellegrini, A.E. Salcini, P.P. Di Fiore, und P. De Camilli. 1999. The epsins define a family of proteins that interact with components of the clathrin coat and contain a new protein module. *J Biol Chem*. 274:33959-33965.
- Roth, M.G. 1999. Lipid regulators of membrane traffic through the Golgi complex. *Trends Cell Biol*. 9:174-179.
- Rudolph, M.G., P. Bayer, A. Abo, J. Kuhlmann, I.R. Vetter, und A. Wittinghofer. 1998. The Cdc42/Rac interactive binding region motif of the Wiskott Aldrich syndrome protein (WASP) is necessary but not sufficient for tight binding to Cdc42 and structure formation. *J Biol Chem*. 273:18067-18076.
- Scheele, U., C. Kalthoff, und E. Ungewickell. 2001. Multiple interactions of auxilin 1 with clathrin and the ap-2 adaptor complex. *J Biol Chem*. 276:36131-36138.
- Schweers, O., E. Schonbrunn-Hanebeck, A. Marx, und E. Mandelkow. 1994. Structural studies of tau protein and Alzheimer paired helical filaments show no evidence for beta-structure. *J Biol Chem*. 269:24290-24297.
- Sechi, A.S., und J. Wehland. 2000. The actin cytoskeleton and plasma membrane connection: PtdIns(4,5)P(2) influences cytoskeletal protein activity at the plasma membrane. *J Cell Sci*. 113 Pt 21:3685-3695.
- Shi, G., V. Faundez, J. Roos, E.C. Dell'Angelica, und R.B. Kelly. 1998. Neuroendocrine synaptic vesicles are formed in vitro by both clathrin-dependent and clathrin-independent pathways. *J Cell Biol*. 143:947-955.
- Shih, S.C., D.J. Katzmann, J.D. Schnell, M. Sutanto, S.D. Emr, und L. Hicke. 2002. Epsins and Vps27p/Hrs contain ubiquitin-binding domains that function in receptor endocytosis. *Nat Cell Biol*. 4:389-393.
- Shih, W., A. Gallusser, und T. Kirchhausen. 1995. A clathrin-binding site in the hinge of the beta 2 chain of mammalian AP-2 complexes. *J Biol Chem*. 270:31083-31090.
- Shoemaker, B.A., J.J. Portman, und P.G. Wolynes. 2000. Speeding molecular recognition by using the folding funnel: the fly-casting mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:8868-8873.

- Shupliakov, O., P. Low, D. Grabs, H. Gad, H. Chen, C. David, K. Takei, P. De Camilli, und L. Brodin. 1997. Synaptic vesicle endocytosis impaired by disruption of dynamin-SH3 domain interactions. *Science*. 276:259-263.
- Simpson, F., N.A. Bright, M.A. West, L.S. Newman, R.B. Darnell, und M.S. Robinson. 1996. A novel adaptor-related protein complex. *J Cell Biol*. 133:749-760.
- Slepnev, V.I., G.C. Ochoa, M.H. Butler, D. Grabs, und P.D. Camilli. 1998. Role of phosphorylation in regulation of the assembly of endocytic coat complexes. *Science*. 281:821-824.
- Smith, C.J., N. Grigorieff, und B.M. Pearse. 1998. Clathrin coats at 21 Å resolution: a cellular assembly designed to recycle multiple membrane receptors. *EMBO J*. 17:4943-4953.
- Sober, H.A. 1970. CRC Handbook of Biochemistry: selected data for molecular biology. Chemical Rubber Co., Cleveland, Ohio.
- Spradling, K.D., A.E. McDaniel, J. Lohi, und B.K. Pilcher. 2001. Epsin 3 is a novel extracellular matrix-induced transcript specific to wounded epithelia. *J Biol Chem*. 276:29257-29267.
- Sreerama, N., und R.W. Woody. 2000. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Anal Biochem*. 287:252-260.
- Stamnes, M.A., und J.E. Rothman. 1993. The binding of AP-1 clathrin adaptor particles to Golgi membranes requires ADP-ribosylation factor, a small GTP-binding protein. *Cell*. 73:999-1005.
- Stowell, M.H., B. Marks, P. Wigge, und H.T. McMahon. 1999. Nucleotide-dependent conformational changes in dynamin: evidence for a mechanochemical molecular spring. *Nat Cell Biol*. 1:27-32.
- Sweitzer, S.M., und J.E. Hinshaw. 1998. Dynamin undergoes a GTP-dependent conformational change causing vesiculation. *Cell*. 93:1021-1029.
- Takei, K., V.I. Slepnev, V. Haucke, und P. De Camilli. 1999. Functional partnership between amphiphysin and dynamin in clathrin-mediated endocytosis. *Nat Cell Biol*. 1:33-39.
- Tebar, F., S.K. Bohlander, und A. Sorkin. 1999. Clathrin assembly lymphoid myeloid leukemia (CALM) protein: localization in endocytic-coated pits, interactions with clathrin, and the impact of overexpression on clathrin-mediated traffic. *Mol Biol Cell*. 10:2687-2702.
- ter Haar, E., S.C. Harrison, und T. Kirchhausen. 2000. Peptide-in-groove interactions link target proteins to the beta-propeller of clathrin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:1096-1100.
- ter Haar, E., A. Musacchio, S.C. Harrison, und T. Kirchhausen. 1998. Atomic structure of clathrin: a beta propeller terminal domain joins an alpha zigzag linker. *Cell*. 95:563-573.

- Thyberg, J., und S. Moskalewski. 1999. Role of microtubules in the organization of the Golgi complex. *Exp Cell Res.* 246:263-279.
- Traub, L.M., J.A. Ostrom, und S. Kornfeld. 1993. Biochemical dissection of AP-1 recruitment onto Golgi membranes. *J Cell Biol.* 123:561-573.
- Umeda, A., A. Meyerholz, und E. Ungewickell. 2000. Identification of the universal cofactor (auxilin 2) in clathrin coat dissociation. *Eur J Cell Biol.* 79:336-342.
- Ungewickell, E., und D. Branton. 1981. Assembly units of clathrin coats. *Nature.* 289:420-422.
- Ungewickell, E., H. Ungewickell, S.E. Holstein, R. Lindner, K. Prasad, W. Barouch, B. Martin, L.E. Greene, und E. Eisenberg. 1995. Role of auxilin in uncoating clathrin-coated vesicles. *Nature.* 378:632-635.
- Uversky, V.N., J.R. Gillespie, und A.L. Fink. 2000. Why are "natively unfolded" proteins unstructured under physiologic conditions? *Proteins.* 41:415-427.
- von Bergen, M., S. Barghorn, L. Li, A. Marx, J. Biernat, E.M. Mandelkow, und E. Mandelkow. 2001. Mutations of tau protein in frontotemporal dementia promote aggregation of paired helical filaments by enhancing local beta-structure. *J Biol Chem.* 276:48165-48174.
- Wang, L.H., T.C. Sudhof, und R.G. Anderson. 1995. The appendage domain of alpha-adaptin is a high affinity binding site for dynamin. *J Biol Chem.* 270:10079-10083.
- Wasiak, S., V. Legendre-Guillemin, R. Puertollano, F. Blondeau, M. Girard, E. De Heuvel, D. Boismenu, A.W. Bell, J.S. Bonifacino, und P.S. McPherson. 2002. Entropotin: a novel clathrin-associated protein identified through subcellular proteomics. *J Cell Biol.* 158:855-862.
- Wilde, A., und F.M. Brodsky. 1996. In vivo phosphorylation of adaptors regulates their interaction with clathrin. *J Cell Biol.* 135:635-645.
- Ybe, J.A., F.M. Brodsky, K. Hofmann, K. Lin, S.H. Liu, L. Chen, T.N. Earnest, R.J. Fletterick, und P.K. Hwang. 1999. Clathrin self-assembly is mediated by a tandemly repeated superhelix. *Nature.* 399:371-375.
- Zhang, B., Y.H. Koh, R.B. Beckstead, V. Budnik, B. Ganetzky, und H.J. Bellen. 1998. Synaptic vesicle size and number are regulated by a clathrin adaptor protein required for endocytosis. *Neuron.* 21:1465-1475.
- Zhu, Y., B. Doray, A. Poussu, V.P. Lehto, und S. Kornfeld. 2001. Binding of GGA2 to the lysosomal enzyme sorting motif of the mannose 6- phosphate receptor. *Science.* 292:1716-1718.
- Zhu, Y., M.T. Drake, und S. Kornfeld. 1999. ADP-ribosylation factor 1 dependent clathrin-coat assembly on synthetic liposomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:5013-5018.

## Wissenschaftlicher Werdegang

- 1994 - 2000: Studium der Biochemie an der Universität Hannover  
Abschluß mit Diplom im Januar 2000  
Titel der Diplomarbeit: „Untersuchungen zur Zusammenlagerung der Proteinhülle clathrinbedeckter Vesikel“
- 2000 - 2003: Promotion zum Doktor der Naturwissenschaften an der Universität Hannover  
Anfertigung der Dissertation in der Abteilung Zellbiologie der Medizinischen Hochschule Hannover unter der Leitung von Prof. Ernst Ungewickell

## Wissenschaftliche Publikationen:

Multiple interactions of auxilin 1 with clathrin and the AP-2 adaptor complex. Urte Scheele, Christoph Kalthoff und Ernst Ungewickell; *J Biol Chem*; 276(39): 36131-8 (2001)

Unusual structural organization of the endocytic proteins AP180 and epsin 1. Christoph Kalthoff, Jürgen Alves, Claus Urbanke und Ernst J. Ungewickell; *J Biol Chem*; 277(10): 8209-16 (2002)

Clint: a novel clathrin binding ENTH-domain protein at the Golgi. Christoph Kalthoff, Stephanie Groos, Rüdiger Kohl, Stefan Mahrhold und Ernst J. Ungewickell; *Mol Biol Cell*; 13(11): 4060-73 (2002)

A Novel strategy for the purification of recombinantly expressed unstructured protein domains. Christoph Kalthoff; *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*; 786(1-2): 247-54

Molecular and functional characterization of clathrin and AP-2 binding determinants within a disordered domain of auxilin. Urte Scheele, Jürgen Alves, Ronald Frank, Michael Düwel, Christoph Kalthoff und Ernst J. Ungewickell; *J Biol Chem*; im Druck , elektronische Version online erhältlich unter [10.1074/jbc.M303738200](https://doi.org/10.1074/jbc.M303738200)