

Molekularer Mechanismus für die Funktion von Auxilin bei der Dissoziation der Hülle von clathrinbedeckten Vesikeln

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

Dipl. Biochem. Urte Scheele

geboren am 5. Dezember 1973 in Windhoek

Referent: Prof. Walter Müller
Korreferent: Prof. Ernst Ungewickell

Tag der Promotion: 5. Mai 2003

Zusammenfassung

Der Zerfall der Proteinhülle von clathrinbedeckten Vesikeln erfolgt durch die Bindung des Chaperons Hsc70 an die schweren Ketten von Clathrin. Auxilin rekrutiert als Kofaktor bei diesem Prozeß Hsc70 über eine C-terminale J-Domäne an Clathrinkäfige und stimuliert dabei die ATPase-Aktivität von Hsc70, wodurch dessen Assoziation mit Clathrin verstärkt und die Clathrin-Interaktion mit benachbarten Triskelia im Gitter abgeschwächt wird.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Clathrinbindungsdomäne, die auch für eine Assoziation von Auxilin mit AP-2 verantwortlich ist, näher untersucht werden. Wie Sekundärstrukturanalysen mittels CD-Spektroskopie ergaben, ist diese Domäne weitestgehend unstrukturiert. In der Aminosäuresequenz von Auxilin existieren sowohl für Clathrin als auch für AP-2 mehrere aufeinanderfolgende, schwach affine Bindungsstellen, die kooperativ wirken. Auxilin erkennt dabei dieselben Bindungstaschen auf der terminalen Domäne und der α -Ohrdomäne, mit denen auch AP180 interagiert. Gemeinsame oder überlappende Bindungsmotive scheinen jedoch eine gleichzeitige Bindung von Auxilin an AP-2 und Clathrin auszuschließen.

Die Clathrinbindungsdomäne von Auxilin läßt sich in zwei Subdomänen unterteilen, die etwa den Fragmenten H₆-Aux (547-715) und H₆-Aux (715-902) entsprechen und die komplementäre Bindungseigenschaften für Clathrin und AP-2 aufweisen. *In vitro* Experimente zeigen, daß Auxilin in Abwesenheit von Hsc70 auch die Polymerisation von freien Triskelia fördern kann. Offenbar beruht diese Eigenschaft auf einer Interaktion mit den terminalen und distalen Domänen von Clathrin, die über im richtigen Abstand zueinander angeordnete DLL- und NWQ-Bindungsmotive vermittelt werden kann. Das vordere Auxilinfragment besitzt so trotz einer hohen Affinität zur terminalen Domäne von Clathrin keine nennenswerte Clathrinpolymerisationsaktivität.

Die Eigenschaft von Auxilin, auch Clathrinkäfige, denen die terminalen Domänen fehlen, *in vitro* zu dissoziieren, konnte auf eine Bindung an die distalen Domänen zurückgeführt werden. Die Assoziation des hinteren Fragments mit Clathrin beruht vor allem auf einer Interaktion mit den distalen Domänen, an denen auch die DLL-Motive beteiligt sind. Der Bereich von Aminosäure 715-902 reicht daher aus, um sowohl die Hsc70-abhängige Dissoziation von Clathrinkäfigen als auch die Polymerisation von freien Triskelia zu fördern. Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit wird ein Modell zur Rolle von Auxilin bei der clathrinvermittelten Endozytose vorgeschlagen.

Schlagwörter: Auxilin, Bindungsmotive, Käfigdissoziation

Summary

The coat dissociation of clathrin-coated vesicles is mediated by binding of the chaperone hsc70 to the clathrin heavy chains. Auxilin functions as a cofactor in this process by recruiting hsc70 to the clathrin coat through its C-terminal J-domain and by stimulating the ATPase activity of hsc70. This results in a stronger association of hsc70 with clathrin whereas the interaction of clathrin with other triskelia in the lattice is weakened.

In this study the clathrin binding domain, that also mediates an association of auxilin with AP-2, was examined in more detail. Secondary structure analysis using CD-spectroscopy revealed that this domain is almost completely disordered. Auxilin contains multiple low affinity binding sites for clathrin and AP-2 which are tandemly arranged and work cooperatively. AP180 and auxilin recognize the same binding pockets on the terminal domain of clathrin and on the α -appendage domain of AP-2. Identical or overlapping binding motifs seem to exclude a simultaneous binding of auxilin to AP-2 and clathrin.

The clathrin binding domain of auxilin can be further divided into two subdomains which show complementary binding properties for clathrin and AP-2 and resemble the fragments H₆-Aux (547-715) and H₆-Aux (715-902). *In vitro* experiments demonstrated that auxilin is able to polymerize free triskelia into clathrin cages in the absence of hsc70. Apparently this feature is dependent on the interaction with the terminal and distal domains of clathrin, that can be achieved by a proper spacing of DLL- and NWQ-binding motifs. This explains the low assembly activity of H₆-Aux (547-715) despite a number of TD binding motifs.

The ability of auxilin to dissociate clathrin cages that lack the terminal domains *in vitro*, could be mediated by binding to the distal domains. This interaction involves the DLL-motifs as well and is mainly responsible for the association of the C-terminal auxilin fragment with clathrin. The region from amino acid 715-902 is therefore sufficient to promote the hsc70 dependent dissociation of clathrin coats as well as the polymerization of soluble clathrin to cages. Based on the results of this study a model for the role of auxilin in clathrin mediated endocytosis is proposed.

Key words: auxilin, binding-motifs, uncoating

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	2
Summary	4
Inhaltsverzeichnis	5
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	8
Abkürzungsverzeichnis	11
1. Einleitung	14
1.1 Vesikulärer Transport in eukaryotischen Zellen	14
1.2 Clathrinbedeckte Vesikel	14
1.2.1 Clathrin	14
1.2.2 Adaptorproteine.....	17
1.2.3 Bildung clathrinbedeckter Vesikel	20
1.2.4 Zerfall der Hülle clathrinbedeckter Vesikel	23
Ziel der Arbeit	28
2 Material und Methoden	29
2.1 Material	29
2.1.1 Computerprogramme.....	29
2.1.2 Geräte	29
2.1.3 Verbrauchsmaterialien	30
2.1.4 Kommerzielle Systeme	31
2.1.5 Chemikalien	32
2.1.6 Enzyme und Proteine	33
2.1.7 Antikörper	33
2.1.8 Puffer und Lösungen	34
2.1.9 <i>Escherichia coli</i> Wirtsstämme	35
2.1.10 Oligodesoxynukleotide	35
2.1.11 Liste verwendeter Fusionsproteine.....	36
2.1.12 Sonstige Materialien	38
2.2 Methoden.....	38
2.2.1 Molekularbiologische Methoden	38
2.2.1.1 DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen und Modifikation von 3'- oder 5'-überstehenden Enden.....	38
2.2.1.2 Aufreinigung und Ligation von DNA-Fragmenten	40

2.2.1.3	Klonierung der Auxilinfragmente.....	40
2.2.1.4	Herstellung des polyhistidinmarkierten DPFADLG- Fusionsproteins.....	43
2.2.1.5	Mutagenese potentieller Bindungsmotive von Auxilin	43
2.2.1.6	Polymerase-Kettenreaktion	45
2.2.1.7	Klonierung der Clathrinfragmente	45
2.2.1.8	Transformation in elektro- bzw. thermokompetente Bakterien.....	46
2.2.2	Methoden zur Analyse von Proteinen	48
2.2.2.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	48
2.2.2.2	Westernblot.....	48
2.2.2.3	Densitometrische Auswertung	49
2.2.3	Proteinaufreinigung	49
2.2.3.1	Expression und Isolierung der Fusionsproteine in <i>E. coli</i>	49
2.2.3.2	Gelfiltration und Ionenaustauschchromatographie	51
2.2.3.3	Thrombinverdau von GST-Fusionsproteinen	52
2.2.3.4	Aufreinigung von Hsc70	53
2.2.3.5	Clathrinaufreinigung aus CCV.....	54
2.2.3.6	Trypsinverdau von Clathrinkäfigen.....	55
2.2.3.7	Trypsinverdau von CCV	56
2.2.4	Biophysikalische Strukturanalysen	56
2.2.4.1	Analytische Ultrazentrifugation.....	56
2.2.4.2	Hitzestabilität von Auxilinfragmenten	57
2.2.4.3	CD-Spektroskopie	57
2.2.5	Bindung von biotinylierten Interaktionspartnern an Auxilinpeptide.....	57
2.2.6	Proteinbindungsexperimente und Funktionsanalysen	58
2.2.6.1	Bindungs- und Kompetitionsexperimente mit GST-Fusionsproteinen.....	58
2.2.6.2	Käfigbindungsexperimente.....	59
2.2.6.3	Experimente zum Zerfall von Clathrinkäfigen und der Hülle von CCV.....	59
2.2.6.4	Clathrinpolymerisationsexperimente.....	60
3	Ergebnisse	62
3.1	Interaktion von Auxilin und Clathrin	62
3.1.1	Auxilin- und Clathrinbindung an immobilisierte Fusionsproteine	63
3.1.2	Bindung von rekombinanten Auxilinfragmenten an Clathrinkäfige.....	64
3.2	Dimerisierung von rekombinanten Auxilinfragmenten.....	65
3.3	Interaktion von Auxilin mit AP-2.....	67

3.4	Identifizierung von Clathrin- und AP-2-Bindungsmotiven.....	69
3.5	Strukturanalyse der Clathrinbindungsdomäne von Auxilin.....	71
3.5.1	Sekundärstrukturanalyse durch CD-Spektroskopie	71
3.5.2	Hitzestabilität von rekombinanten Auxilinfragmenten	75
3.6	Bindung von Auxilinfragmenten an Clathrin und AP-2	76
3.7	Bindung von Auxilinmutanten an Clathrin und AP-2	80
3.8	Kompetitionsexperimente	85
3.8.1	Kompetition von Clathrin und AP-2 um Auxilin	85
3.8.2	Kompetition von Auxilin und AP180 um Clathrin und AP-2.....	88
3.9	Funktionsstudien mit Auxilinfragmenten und -mutanten	89
3.9.1	Clathrinpolymerisation zu Käfigen.....	89
3.9.2	Dissoziation von Clathrinkäfigen.....	92
3.9.3	Dissoziation der Hülle von clathrinbedeckten Vesikeln	94
4	Diskussion	96
	Literaturverzeichnis	108
	Danksagung	114
	Wissenschaftlicher Werdegang	115

Beilage: Verwendete Auxilin- und Clathrinfragmente

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen:

- Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Clathrintriskelions (A) und der Grundform eines Clathrinkäfigs, in dem exemplarisch die Lage zweier Triskelia hervorgehoben wurde (B)
- Abbildung 2: Schematischer Aufbau des Adaptorproteinkomplexes AP-2
- Abbildung 3: Modell zur Bildung von clathrinbedeckten Vesikeln
- Abbildung 4: Modell zum Zerfall der Hülle von clathrinbedeckten Vesikeln
- Abbildung 5: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von Auxilin
- Abbildung 6: Bindung von Auxilin (547-910) an GST-TD (A) und von rekombinanten Clathrinfragmenten an GST-Auxilin (547-910) (B)
- Abbildung 7: Bindung der Auxilinfragmente TrxH₆-Aux (547-715) und TrxH₆-Aux (715-902) an rekonstituierte Clathrinkäfige mit und ohne terminale Domänen
- Abbildung 8: Elutionsprofil der Gelfiltration von TrxH₆-Aux (547-715) über eine Superdex 200 Säule
- Abbildung 9: Interaktion von Auxilin (547-910) mit der GST- α -Ohrdomäne (A) und der H₆- β ₂-Ohrdomäne von AP-2 mit GST-Auxilin (547-910) (B)
- Abbildung 10: Bindung von H₆-Aux (547-715) und H₆-Aux (619-738) (A) sowie von TrxH₆-Aux (715-902) in Gegenwart oder in Abwesenheit von 1 mM DTT (B) an immobilisierte Fusionsproteine der α -Ohrdomäne
- Abbildung 11: Bindung von Clathrin-TD und der α -Ohrdomäne von AP-2 an synthetische Auxilinpeptide
- Abbildung 12: CD-Spektroskopie von rekombinanten Auxilinfragmenten
- Abbildung 13: CD-Spektroskopie von H₆-Aux (547-715) und H₆-Aux (715-813) in Gegenwart von 50% TFE (A und C) bzw. äquimolarer Konzentration der terminalen Domäne von Clathrin (B und D)
- Abbildung 14: Hitzestabilität rekombinanter Auxilinfragmente
- Abbildung 15: Bindung von hitzebehandeltem H₆-Aux (619-738) an die α -Ohrdomäne von AP-2
- Abbildung 16: Bindung von TrxH₆-Aux (547-590) (A), TrxH₆-Aux (547-605) (B), TrxH₆-Aux (547-618) (c) und TrxH₆-Aux (619-738) (D) jeweils an Clathrin-TD sowie an die α -Ohrdomäne von AP-2 als immobilisierte GST-Fusionsproteine bzw. an intakte und trypsinbehandelte Clathrinkäfige
- Abbildung 17: Bindung von TrxH₆-Aux (715-776) (A), TrxH₆-Aux (778-902) (B) und TrxH₆-Aux (715-902) (c) an immobilisierte GST-Fusionsproteine von Clathrin-TD sowie der α -Ohrdomäne von AP-2 bzw. an intakte und trypsinbehandelte Clathrinkäfige

- Abbildung 18: Bindung von Aux (547-910), H₆-Aux (547-715) und H₆-Aux (619-738) sowie der mutierten Auxilinfragmente an die GST- α -Ohrdomäne (A) und an GST-TD (B)
- Abbildung 19: Bindung von Aux (547-910), H₆-Aux (547-715), H₆-Aux (715-902) und H₆-Aux (619-738) sowie der mutierten Auxilinfragmente an intakte (A) und an trypsinverdaute Clathrinkäfige, denen die terminalen Domänen fehlen (B)
- Abbildung 20: Bindung von Aux (547-910) Δ^{674} DPF und den DLL-Mutanten dieses Auxilinfragments (A) sowie von H₆-Aux (547-715) und H₆-Aux (547-715) Δ^{591} DLL (B) an die GST- α -Ohrdomäne
- Abbildung 21: Kompetitionsbindungsexperimente von GST-TD und der Ohrdomäne von α -Adaptin um H₆-Aux (547-715) (A) und von TrxH₆-DD und der GST- α -Ohrdomäne um H₆-Aux (619-738) (B)
- Abbildung 22: Kompetitionsbindungsexperiment von GST-TD und der Ohrdomäne von α -Adaptin um TrxH₆-Aux (619-738)
- Abbildung 23: Bindung von TrxH₆-Aux (DPFADLG) an Clathrin-TD und an die α -Ohrdomäne von AP-2 als immobilisierte GST-Fusionsproteine (A) sowie an intakte und trypsinverdaute Clathrinkäfige ohne terminale Domänen (B)
- Abbildung 24: Kompetitionsbindungsexperiment von H₆-Aux (547-715) und H₆-AP180 (328-896) um GST-TD bzw. um die GST- α -Ohrdomäne
- Abbildung 25: Clathrinpolymerisation durch rekombinante Fragmente und Mutanten von Auxilin
- Abbildung 26: Clathrinpolymerisation durch H₆-Aux (715-902), H₆-Aux (715-776) und H₆-Aux (778-902)
- Abbildung 27: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von negativ kontrastierten Clathrinkäfigen, die durch die Auxilinfragmente H₆-Aux (547-715), H₆-Aux (715-902) und Aux (547-910) zusammengelagert wurden
- Abbildung 28: Clathrinpolymerisation durch H₆-Aux (619-738) bzw. durch die dime-
risierten Auxilinfragmente TrxH₆-Aux (619-738) und TrxH₆-Aux (619-
738) Δ^{674} DPF
- Abbildung 29: Dissoziation von rekonstituierten Clathrinkäfigen (A) und von trypsin-
verdauten Käfigen, denen die terminalen Domänen fehlen (B), durch
die rekombinanten Auxilinfragmente Aux (547-910), H₆-Aux (715-
902) und TrxH₆-Aux (778-902)
- Abbildung 30: Dissoziation der Hülle von clathrinbedeckten Vesikeln mit Aux (547-
910) (A), H₆-Aux (715-902) und TrxH₆-Aux (778-902) (B) sowie mit
Mutanten dieser Fragmente (A, C und D)
- Abbildung 31: Modell zur Zusammenlagerung von Clathrinkäfigen durch Auxilin. (A)
Clathrinkäfig mit terminalen Domänen und Auxilin; (B) Detailabbil-
dung von A

Abbildung 32: Modell zur Hsc70-abhängigen Dissoziation von Clathrinkäfigen durch Auxilin (A) und Detailabbildung von A (B)

Tabellen:

- Tabelle 1: Übersicht zur Klonierung der verwendeten Auxilinfragmente
- Tabelle 2: Übersicht über die Auxilinfragmente, die für eine gezielte Mutagenese verwendet wurden
- Tabelle 3: Übersicht zur Klonierung der verwendeten Clathrinfragmente
- Tabelle 4: Thrombinverdaubedingungen für die verwendeten GST-Fusionsproteine
- Tabelle 5: Anteil von Sekundärstrukturelementen rekombinanter Auxilinfragmente
- Tabelle 6: Übersicht über die AP-2- und Clathrinbindungseigenschaften der untersuchten Auxilinfragmente

Abkürzungsverzeichnis

AP180	<i>Assemblyprotein</i> mit einer apparenten Molmasse von 180 kDa
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ATPase	Adenosin-5'-triphosphatase
Aux	Auxilin
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
C-	Carboxy-
CCV	Clathrinbedeckte Vesikel (<i>clathrin coated vesicle</i>)
cDNA	<i>copy</i> DNA
CD	Circulardichroismus
CHC	schwere Kette von Clathrin (<i>clathrin heavy chain</i>)
CHCR	<i>clathrin heavy chain repeat</i>
CIP	Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (<i>calf intestine alkaline phosphatase</i>)
CLC	leichte Kette von Clathrin (<i>clathrin light chain</i>)
COP	<i>coat protein</i>
Da	Dalton
DD	distale Domäne
DEAE	O-2-Diethylaminoethyl
DNA	Desoxynukleinsäure (<i>desoxynucleic acid</i>)
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiotreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemoluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenbis(oxyethylenitrilo)-tetraacetat
Eps15	EGF-Rezeptorproteinsubstrat 15
Epsin	Eps15-interagierendes Protein
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FPLC	<i>fast performance liquid chromatography</i>
GAK	Cyclin G assoziierte Kinase
GBP	Golgebindungspuffer
GSH	Glutathion

GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
GTPase	Guanosin-5'-triphosphatase
H ₆	6 x Histidin
HEPES	[4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-ethansulfonsäure
Hip	<i>Huntingtin interacting protein</i>
Hip1R	<i>Hip1 related</i>
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horseraddish peroxidase</i>)
Hsc70	konstitutiv exprimiertes Hsp70
Hsp70	Hitzeschockprotein mit einer Größe von 70 kDa
IgG	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactosid
LB	Luria Bertani
mAb	monoklonaler Antikörper (<i>monoclonal antibody</i>)
MBN	Mungobohnennuklease
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
MW	Molekulargewichtsstandard (<i>molecular weight</i>)
N-	Amino-
NMR	Kernspinresonanz (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
NTA	Nitrilotriacetat
P	Pellet
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PD	proximale Domäne
PI	Phosphatidyinositol
PIC	Phenyl-Isoamyl-Chloroform
PIP	Phosphatidylinositolphosphat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PRD	Prolinreiche Domäne
PTEN	Phosphatase und Tensin homolog deletiert auf Chromosom 10
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SH	Src Homologie
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TBST	<i>Tris-buffered saline with Tween 20</i>

TD	terminale Domäne
TE	Tris-EDTA
TFE	2,2,2-Trifluorethanol
TGN	Transgolginetzwerk
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Trx	Thioredoxin
U	<i>Units</i>
Ü	Überstand
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett

Aminosäuren wurden entsprechend des Einbuchstabencodes abgekürzt. Die Symbole Φ , p und (-) wurden für große hydrophobe, polare bzw. saure Aminosäurereste verwendet.

1. Einleitung

1.1 Vesikulärer Transport in eukaryotischen Zellen

In eukaryotischen Zellen werden intrazelluläre Transportprozesse zwischen der Plasmamembran, Organellen des endosomalen Kompartiments, Lysosomen und dem *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) durch Membranvesikel vermittelt. Diese Vesikel ermöglichen neben der Aufnahme von extrazellulärem Material wie Nahrungsstoffen, Proteinen und Hormonen auch die lysosomale Degradation von Transmembranproteinen. Spezifisch können so Rezeptoren mit ihren gebundenen Liganden endozytiert und zur Signalherunterregulation in Lysosomen abgebaut oder nach Dissoziation des Liganden zur erneuten Verwendung an die Ausgangsmembran zurücktransportiert werden. Der Transport von lysosomalen Hydrolasen vom TGN zu späten Endosomen erfolgt ebenfalls über Vesikel wie auch die Sekretion von löslichen Proteinen an die Zellumgebung. In Nervenzellen werden die Membranbestandteile von synaptischen Vesikeln nach ihrer Verschmelzung mit der präsynaptischen Membran und der Neurotransmitterfreisetzung durch Vesikelbildung an der Plasmamembran wiedergewonnen.

Die genannten Beispiele für vesikulären Transport werden von clathrinbedeckten Vesikeln (CCV, *clathrin coated vesicles*) vermittelt oder es sind wie im Fall der Reifung sekretorischer Vesikel CCV daran beteiligt. Neben Clathrin gibt es noch mindestens zwei andere Hüllproteine für Vesikel. Über COPI-Vesikel verläuft der anterograde und retrograde Transport zwischen den Golgizisternen, während COPII-bedeckte Vesikel am endoplasmatischen Retikulum (ER) entstehen und neu synthetisierte Proteine zum Golgiapparat befördern.

1.2 Clathrinbedeckte Vesikel

Namensgebend für clathrinbedeckte Vesikel ist das Hüllprotein Clathrin, das in elektronenmikroskopischen Aufnahmen als polygonaler Käfig (lateinisch *clatri* für Gitter) um die Vesikel erscheint. Zusammen mit Adaptorproteinen stellt es die Hauptkomponente der Proteinhülle dar.

1.2.1 Clathrin

Die Grundeinheit des polygonalen Clathrinnetzes um die Membranvesikel ist das sogenannte Clathrintriskelion. Clathrin ist ein oligomeres Protein, das sich aus drei

schweren Ketten (CHC, *clathrin heavy chain*) mit einer Größe von je 192 kDa zusammensetzt, die mit drei leichten Ketten (CLC, *clathrin light chain*) assoziiert sind. Von den leichten Ketten gibt es bei Vertebraten zwei Isoformen, CLCa und CLCb (25-29 kDa), die statistisch an die schweren Ketten binden.

CHCs sind aus 1675 Aminosäuren aufgebaut und lassen sich in drei Domänen unterteilen. Die globuläre N-terminale Domäne (TD) umfaßt etwa die ersten 330 Reste. Eine flexible Region (*linker*) verbindet die terminale mit der distalen Domäne (DD, AS 495-1073), an die sich die proximale Domäne anschließt (PD). Die Zusammenlagerung von drei schweren Ketten zu einem Triskelion wird von einer Trimerisierungsdomäne (AS 1550-1615) in der Nähe des C-Terminus ermöglicht (Abb. 1 A). Vor der Trimerisierungsdomäne liegt auf der proximalen Domäne der Bindungsort für die leichten Ketten. (Eine gute Übersicht gibt Brodsky *et al.*, 2001).

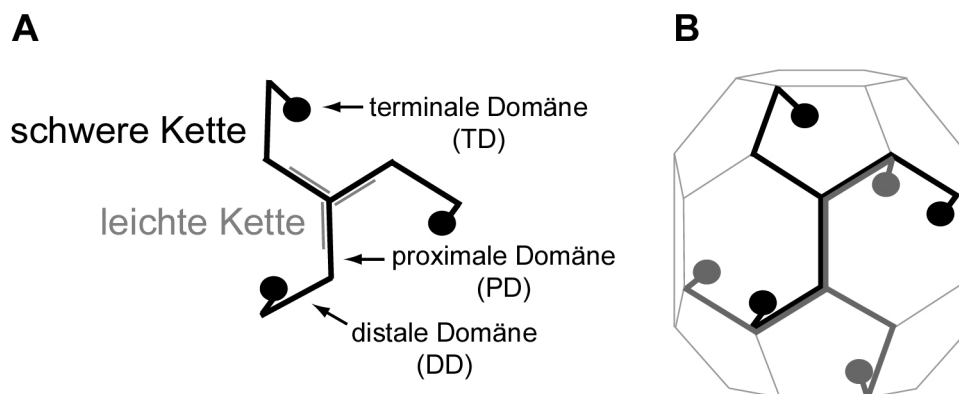


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Clathrintriskelions (A) und der Grundform eines Clathrinkäfigs, in dem exemplarisch die Lage zweier Triskelien hervorgehoben wurde (B). Ein Triskelion besteht aus drei schweren und drei leichten Ketten. Die schweren Ketten sind in eine N-terminale globuläre Domäne, die im Käfig nach innen gerichtet ist, eine distale und eine C-terminale proximale Domäne unterteilt und bilden die Kanten des polygonalen Gitters um Membranvesikel.

Rekombinant exprimierte, verkürzte schwere Ketten, die die proximale Domäne und den Bereich bis zum C-Terminus enthalten, sind in der Lage, zu einem flachen Gitter zu polymerisieren. Die distale Domäne scheint daher vor allem für die Krümmung des Clathrinkäfigs verantwortlich zu sein (Liu *et al.*, 1995).

In leicht saurem Milieu neigen Clathrintriskelien dazu, sich spontan zu Käfigen zusammenzulagern. Unter physiologischen Bedingungen haben die leichten Ketten einen negativ regulatorischen Einfluß auf die Polymerisation von Clathrin, und die Bildung eines Clathrinkäfigs wird von anderen Faktoren oder Proteinen abhängig. Durch Bindung an die leichten Ketten können Calciumionen die Clathrinzusammenlagerung begünstigen (Brodsky *et al.*, 2001).

Der polygonale Clathrinkäfig setzt sich größtenteils aus Pentagonen und Hexagonen zusammen. Ein erhöhter Anteil an Pentagonen im Gitter kann durch den Einbau von Heptagonen ausgeglichen werden. Jeweils vier Triskelia bilden eine Kante, an der zwei proximale Domänen und zwei distale Domänen antiparallel angeordnet sind. Die terminalen Domänen sind im Käfig nicht an der strukturgebenden Interaktion der Clathrinmoleküle miteinander beteiligt. Unterhalb der Ecken sind jeweils drei terminale Domänen nach innen in Richtung der Membran orientiert (Abb. 1 B). Die CHC-Sequenz ist in Eukaryoten hoch konserviert, da sie sowohl Clathrin/Clathrin-Wechselwirkungen als auch die Interaktion mit anderen endozytotischen Proteinen vermittelt (Kirchhausen, 2000).

Kristallstrukturanalysen von Teilen der schweren Ketten ergeben ein recht gutes Bild von der molekularen Struktur des Clathrins. Die Polypeptidkette der terminalen Domäne ist zu einer siebenblättrigen β -Propellerstruktur gefaltet und geht in ein α -helikales Zickzackmuster über, das sich von der *linker*-Region bis zum C-Terminus erstreckt. Der α -helikale Bereich enthält sieben CHC-typische repetitive Sequenzen (CHCR, *clathrin heavy chain repeat*). Der β -Propeller der terminalen Domäne ähnelt strukturell dem von Proteinen mit WD-Sequenzwiederholungen, obwohl kein entsprechendes Muster in der TD-Aminosäuresequenz auftritt. Die β -Untereinheit von heterotrimeren G-Proteinen enthält sieben WD40 Repetitionen, die jeweils ein viersträngiges, antiparalleles β -Faltblatt bilden, das einem Rotorblatt des Propellers entspricht. Wie in der terminalen Domäne von Clathrin sind die sieben Rotorblätter um eine zentrale Achse herum angeordnet und stellen eine hydrophobe Interaktionsfläche für andere Proteine dar. Durch Kristallisation der terminalen Domäne mit kurzen Peptiden bekannter Bindungspartner konnte die Furche zwischen den Rotorblättern 1 und 2 als wichtigste Kontaktfläche identifiziert werden. Die untersuchten Proteine enthielten das sogenannte Clathrin Box I Bindungsmotiv [L(L,I)(D,E,N)(L,F)(D,E)], das sich durch den Wechsel von hydrophoben und sauren Aminosäuren auszeichnet (Dell'Angelica *et al.*, 1998; ter Haar *et al.*, 2000; ter Haar *et al.*, 1998). Häufig tritt es in stärker degenerierter Form auf, so daß sich die Konsensussequenz auf $L\Phi p\Phi(-)$ beläuft, wobei Φ für einen großen hydrophoben, p für einen polaren und (-) für einen sauren Rest stehen. Aufgrund der geringen Übereinstimmung mit dem Box I Motiv wurden die Sequenzen WDLW und LMDLA bzw. LLDLL von drei verschiedenen clathrinbindenden Proteinen zu einem Clathrin Box II Bindungsmotiv zusammengefaßt (Doray und Kornfeld, 2001; Drake und Traub, 2001; Slepnev *et al.*, 2000). Als

weiteres Motiv für die Interaktion mit der terminalen Domäne wurde das Tripeptid DLL beschrieben, das häufig in mehreren Kopien vorhanden ist (Morgan *et al.*, 2000). Alle Motive bestehen aus relativ kurzen Peptidsequenzen, die häufig in tandem angeordnet sind.

Lediglich für das Clathrin Box I Motiv konnte bislang eine direkte Bindung an die Furche des β -Propellers der terminalen Domäne zwischen dem ersten und zweiten Rotorblatt nachgewiesen werden (ter Haar *et al.*, 2000). Bei den anderen Motiven könnte es sich um stark degenerierte Varianten dieses Motivs handeln, denen der saure Rest an der letzten Position fehlt, oder um neue Motive mit anderem Konsensus, die entweder um die gleiche Bindungstasche auf dem β -Propeller konkurrieren oder die mit einer anderen Furche interagieren. In ihrer hydrophoben Natur ähneln sich die verschiedenen Furchen zwischen den Rotorblättern, nur ihre Größe und Zugänglichkeit unterscheiden sich. Die nächst kleinere Furche wird von den Rotorblättern 4 und 5 gebildet und könnte eine alternative Bindungsstelle für TD-Interaktionspartner darstellen (ter Haar *et al.*, 2000).

1.2.2 Adaptorproteine

Neben Clathrin sind in CCV heterotetramere Adaptorproteinkomplexe am stärksten vertreten. Wie sich zeigte, ist die Funktion der Adaptorproteine deutlich komplexer als zunächst angenommen. Sie sind nicht nur in der Lage, Clathrin mit der Membran und mit Membranproteinen zu verknüpfen, sondern interagieren darüber hinaus auch mit einer Vielzahl anderer akzessorischer und regulatorischer Proteine. Tatsächlich gibt es kaum ein im Zusammenhang mit der Bildung von clathrinbedeckten Vesikeln stehendes Protein, das nicht auch an einen der beiden am besten untersuchten Adaptorproteinkomplexe AP-1 oder AP-2 bindet. AP-1 ist hauptsächlich mit CCV assoziiert, die am TGN gebildet werden, während AP-2 an der Plasmamembran auftritt. Zu den heterotetrameren Adaptorproteinkomplexen gehören auch AP-3 und AP-4, deren genaue Bedeutung aber noch relativ unklar ist. AP-3 ist an einem Transportprozeß zu Lysosomen beteiligt, der von Endosomen oder dem TGN ausgehen könnte. Während AP-3 Clathrinbindungsmotive aufweist, scheint AP-4 Bestandteil am TGN gebildeter nichtclathrinbedeckter Vesikel zu sein (eine gute Übersicht geben Robinson und Bonifacino, 2001).

Die Adaptorproteine sind aus vier Untereinheiten, den Adaptinen aufgebaut, die in jeder der vier Gruppen (AP-1 bis AP-4) von verschiedenen Genen kodiert werden

können oder alternative Spleißprodukte darstellen. Aufgrund der Sequenzhomologie zwischen einigen Adaptinen wird ihnen der gleiche griechische Buchstabe β , μ und σ innerhalb der verschiedenen Komplexe zugeordnet. Die sich am stärksten unterscheidenden Untereinheiten zwischen AP-1 und AP-2 werden als α und γ bezeichnet. Die entsprechenden Adaptine von AP-3 und AP-4 wurden analog dazu mit δ und ε benannt (Jarousse und Kelly, 2000).

Da der strukturelle Aufbau der heterotetrameren Adaptorproteine identisch ist, wird im folgenden lediglich AP-2 beschrieben. Der Komplex setzt sich zusammen aus den beiden großen Untereinheiten α und β_2 (100-130 kDa), die jeweils direkt mit einer kleinen Untereinheit σ_2 (17-20 kDa) bzw. einer mittleren Untereinheit μ_2 (50 kDa) assoziiert sind (Abb. 2). Die σ_2 -Untereinheit und die N-terminale Domäne von μ_2 sind sich strukturell sehr ähnlich. Beide zeigen ein fünfsträngiges β -Faltblatt, das seitlich von α -Helices umgeben ist. α - und β_2 -Adaptine können unterteilt werden in eine N-terminale Kopf- oder Rumpfdomäne, die über eine flexible Scharnierregion (*linker*) mit der sogenannten Ohrdomäne (*appendage*, ca. 30 kDa) verbunden ist. Der Rumpf (70-75 kDa) erstreckt sich etwa bis zur Aminosäure 621 (α) bzw. 591 (β_2) und weist eine stark ausgeprägte α -helikale Selenoidstruktur auf, während die *linker*-Region wenig Sekundärstrukturelemente enthält (Collins *et al.*, 2002). Über die Ohrdomäne der α -Untereinheit erfolgt die Interaktion mit akzessorischen Proteinen, die an der Bildung clathrinbedeckter Vesikel beteiligt sind. Für die Bindung von Clathrin ist die entsprechende Domäne vom β -Adaptin zusammen mit einem Bereich der Scharnierregion, die ein typisches Clathrin Box I Motiv enthält, verantwortlich (Owen *et al.*, 2000; Shih *et al.*, 1995). Die α -Untereinheit weist allerdings auch eine schwache Affinität für Clathrin im Scharnier-/Rumpfbereich auf (Goodman und Keen, 1995). Beide Ohrdomänen von AP-2 wurden kristallisiert und zeigen trotz der geringen Sequenzübereinstimmung eine ähnliche Struktur. Sie lassen sich in zwei Subdomänen unterteilen, die jeweils eine etwas andere Orientierung zueinander haben. Die N-terminale Domäne zeigt eine β -*Sandwich*-Struktur aus neun bzw. acht β -Faltblattsträngen, während die C-terminale Domäne als Bindungsplattform aus einem einfachen fünfsträngigen β -Faltblatt besteht, das auf jeder Seite von einer bzw. zwei α -Helices flankiert wird (Owen *et al.*, 1999; Owen *et al.*, 2000).

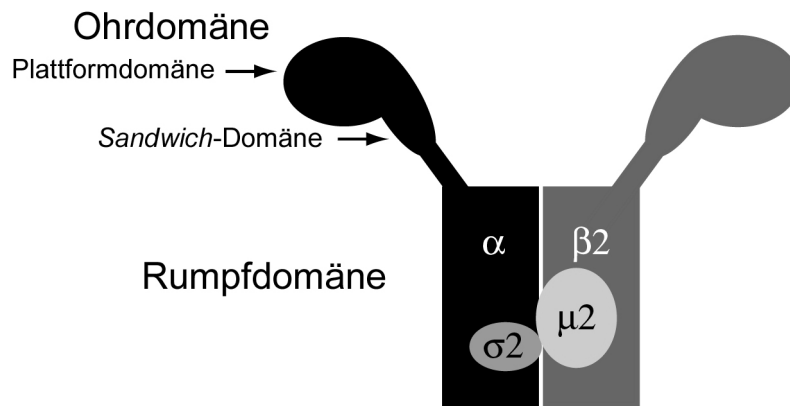


Abbildung 2: Schematischer Aufbau des Adaptorproteinkomplexes AP-2. Bei AP-2 handelt es sich um ein Heterotetramer aus zwei großen Untereinheiten (α und β_2) sowie einer mittleren (μ_2) und einer kleinen (σ_2) Untereinheit. Die Interaktion mit anderen akzessorischen Proteinen und Clathrin erfolgt über die α - und β -Adaptinohrdomänen, die wiederum in zwei Subdomänen unterteilt und über eine Scharnierregion mit der Rumpfdomäne verbunden sind. Die Rekrutierung von AP-2 an die Plasmamembran wird durch die Rumpfdomänen und die mit diesen assoziierten beiden kleineren Untereinheiten oder indirekt über andere lipidbindende Proteine wie Epsin 1 oder AP180 vermittelt.

Die Interaktion mit der Ohrdomäne erfolgt wie die Bindung an die terminale Domäne von Clathrin über kurze lineare Peptidsequenzen. In diesem Zusammenhang wurden DPF/W-haltige Motive sowie die Sequenzabfolge FxDxF beschrieben, wobei x jede beliebige Aminosäure darstellen kann (Brett *et al.*, 2002; Owen *et al.*, 1999). Insbesondere die DPF/W Motive sind unter den akzessorischen Proteinen weit verbreitet und kommen häufig in mehreren Kopien vor. Auch die distale Domäne von Clathrin enthält im ersten CHCR ein Motiv, das dem Konsensus D Φ F/W entspricht. Die C-terminalen Subdomänen der Ohrsegmente von beiden großen Untereinheiten weisen einen hydrophoben Bereich auf, der bei β -Adaptin etwas akzessibler ist und der einen streng konservierten und für die DPF/W-Interaktion essentiellen Tryptophanrest einschließt (Owen *et al.*, 1999; Owen *et al.*, 2000). Einige Proteine sind in der Lage, über dieses Motiv an beide Ohrdomänen zu binden, und können um die Bindungsstellen miteinander konkurrieren. Interessanterweise nimmt dabei das DPW-Motiv eine Sonderstellung ein, da es zusätzlich auch mit einem Bereich auf der N-terminalen Subdomäne interagieren kann. Die Bindungsorte von DPF/W und FxDxF überlappen, wobei das FxDxF-Peptid einen größeren Bereich auf der C-terminalen Bindungsplattform einnimmt (Brett *et al.*, 2002).

Neben den Interaktionen mit akzessorischen Proteinen und mit Clathrin können die Adaptorproteine auch direkt an die zytosomatischen Domänen von Rezeptoren binden. Dileucinhaltige Erkennungssignale, die der Konsensussequenz D/ExxxLL

entsprechen, binden an die β - und μ -Untereinheit (Hofmann *et al.*, 1999; Rapoport *et al.*, 1998). Der C-Terminus von μ -Adaptin interagiert zudem mit Yxx(L/I/V/F/M)-Motiven (Ohno *et al.*, 1995). Die Affinität für Signalpeptide scheint dabei abhängig zu sein von der Phosphorylierung der μ -Untereinheit. Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP₂) und Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat (PIP₃) vermitteln über die Interaktion mit der N-terminalen Rumpfdomäne von α -Adaptin und vermutlich auch mit der C-terminalen Domäne von μ -Adaptin die Rekrutierung von AP-2 an die Plasmamembran (Collins *et al.*, 2002; Gaidarov *et al.*, 1996). Die Affinität für PIP₃ ist höher als für PIP₂, das aber an der Plasmamembran höher konzentriert auftritt. PIP₃ kann aus PIP₂ durch die clathrinstimulierbare PI-3-Kinase C2 α synthetisiert werden (Gaidarov *et al.*, 1996; Gaidarov *et al.*, 2001).

Die μ - und etwas schwächer auch die α -Untereinheit binden zudem Synaptotagmin, ein Transmembranprotein, das als Andockstelle für AP2 dienen könnte (Haucke *et al.*, 2000).

1.2.3 Bildung clathrinbedeckter Vesikel

Der genaue Ablauf der Bildung clathrinbedeckter Vesikel ist noch nicht geklärt. Eine Vielzahl von Proteinen wurde beschrieben, die mit CCV assoziiert zu sein scheinen, deren Bedeutung aber noch weitgehend unklar ist. Es gibt verschiedene Modelle, in denen versucht wird, die bekannten Funktionen beteiligter akzessorischer Proteine in ein Gesamtbild einzufügen.

Unter physiologischen Bedingungen wird die Polymerisation von Clathrintriskelia zu einem polyhedralen Käfig durch clathrinbindende Proteine reguliert. AP-2 und AP180, ein neuronales akzessorisches Protein, stimulieren kooperativ die Clathrinpolymerisation auf Phospholipidmembranen (Ford *et al.*, 2001; Hao *et al.*, 1999). An speziellen Bereichen der Plasmamembran könnte so die Bildung eines *coated pits* initiiert werden. In *Drosophila melanogaster* konnte gezeigt werden, daß AP180 die Vesikelgröße beeinflusst (Zhang *et al.*, 1998). Auch ein Vergleich *in vitro* spontan oder in Gegenwart von AP180 zusammengelagerter Clathrinkäfige macht dies deutlich (Ahle und Ungewickell, 1986). Durch Einstülpung der Membran und der darauf folgenden Abschnürung entsteht ein clathrinbedecktes Vesikel (Abb. 3). Dieser Prozeß verläuft sehr schnell und könnte durch Bindung an bereits an die Plasmamembran rekrutierte Adaptorproteine eingeleitet werden. Die Assoziation von AP-2 mit der Membran wird von Synaptotagmin (Haucke *et al.*, 2000) und der direkten Interaktion

mit Phospholipiden vermittelt. Die Anreicherung von AP-2 in diesen Regionen scheint zu bewirken, daß Transmembranrezeptoren durch Bindung der zytoplasmatischen Domäne selektiv für die Beladung von CCV konzentriert werden.

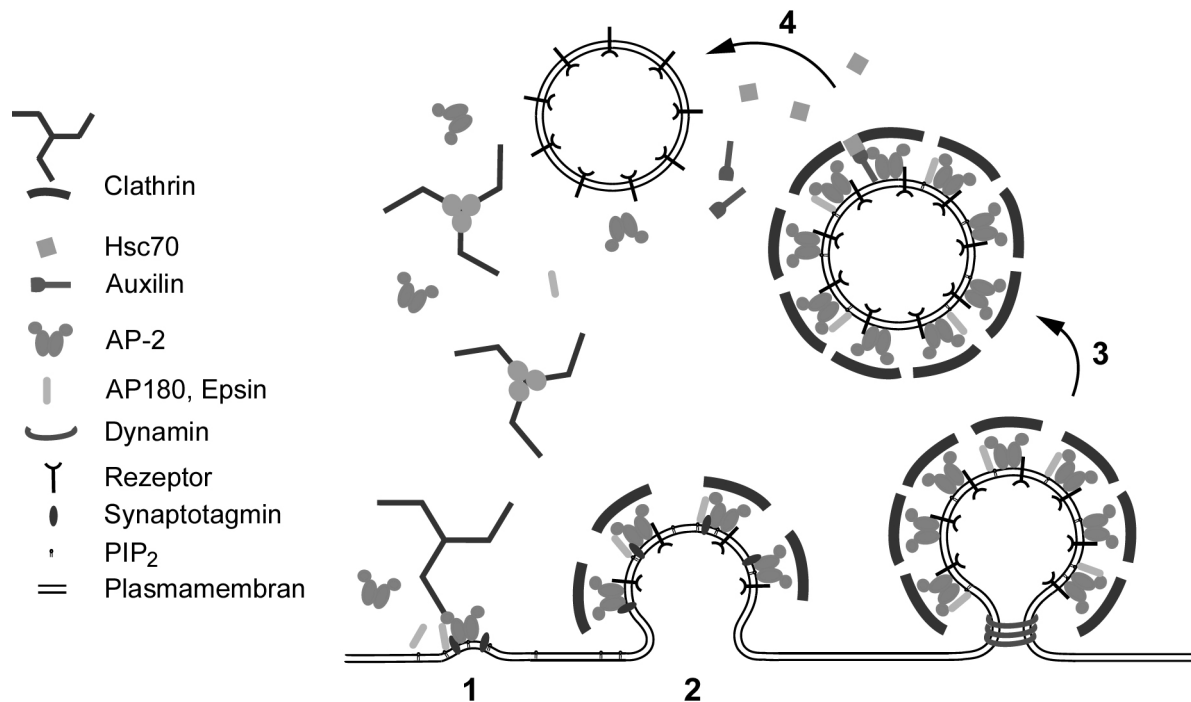


Abbildung 3: Modell zur Bildung von clathrinbedeckten Vesikeln. Die Anlagerung von Clathrin an bestimmte Bereiche der Plasmamembran wird durch Adaptorproteine ausgelöst, die selber über die Assoziation mit Transmembranproteinen und Lipiden an die Membran rekrutiert wurden und dadurch Frachtmoleküle in diesen *coated pits* konzentrieren (1). Die Polymerisation von Clathrin und der Einfluß lipidbindender Proteine bewirken eine zunehmende Krümmung der Membran und die Reifung der Vesikel (2). Die Abschnürung erfordert schließlich die GTPase Dynamin, die spiralförmig um die Halsregion, die das Vesikel noch mit der Plasmamembran verbindet, oligomerisiert (3). Nach der Vesikelfreisetzung muß die Clathrinhülle wieder entfernt werden, um eine Fusion mit der Zielmembran zu ermöglichen (4). Clathrintriskelia, Adaptorproteine und andere akzessorische Proteine stehen damit wieder zur Bildung neuer clathrinbedeckter Vesikel zur Verfügung.

Neben AP-2 binden auch AP180 und einige andere an der Bildung von clathrinbedeckten Vesikeln beteiligte Proteine spezifisch Phosphoinositide in der Membran. Hierzu gehören Epsin, Amphiphysin und Dynamin, deren Interaktion mit PIPs die Deformation der Membran bei der Einstülpung oder Abschnürung zu begünstigen scheint (Farsad *et al.*, 2001; Ford *et al.*, 2002). Endophilin ist eine Lysophosphatidylsäureacyltransferase, die die Lipidzusammensetzung der Membran verändern kann, indem ein Arachidonoylrest auf Lysophosphatidylsäure übertragen wird und Phosphatidylsäure entsteht. Die Bildung von Phosphatidylsäure könnte eine Krümmung der Membran bewirken (Schmidt *et al.*, 1999). Auch unabhängig von dieser Aktivität scheint Endophilin in der Lage zu sein, Membranen zu deformieren (Farsad *et al.*, 2001). Über eine Src-Homologie 3 Domäne (SH3) interagiert Endophilin mit den pro-

linreichen Domänen (PRD) von Dynamin und Amphiphysin (Brodsky *et al.*, 2001). Obwohl Dynamin ebenfalls AP-2 binden kann (Wang *et al.*, 1995), wird es vermutlich erst von Amphiphysin, das neben AP-2 auch mit Clathrin interagiert (Slepnev *et al.*, 2000), an die Plasmamembran rekrutiert. Dynamin ist eine GTPase und an der Abschnürung des Vesikels von der Membran beteiligt. Dabei polymerisiert Dynamin zu Spiralen um den Hals, der das Vesikel noch mit der Membran verbindet, und stimuliert so gleichzeitig die eigene GTPase-Aktivität (Brodsky *et al.*, 2001). Die Hydrolyse von GTP bewirkt eine Konformationsänderung des Dynamins, die schließlich dazu führt, daß das Vesikel freigesetzt wird. Während Amphiphysin die Abschnürung eher begünstigt, scheint Endophilin den Zustand der tubulären Membran in der Halsregion zu stabilisieren (Farsad *et al.*, 2001). Eine Übersicht über den Ablauf der Bildung clathrinbedeckter Vesikel gibt Abbildung 3.

Der genaue Zeitpunkt, wann die meisten akzessorischen oder regulatorischen Proteine in die entstehenden clathrinbedeckten Vesikel integriert werden, ist in vielen Fällen noch unklar. Viele Interaktionen zwischen endozytotischen Proteinen beruhen auf schwach affinen Wechselwirkungen mit kurzen linearen Peptidmotiven. Dazu zählen sowohl die SH3/PRD-Interaktionen, wie auch die Bindung von Clathrin Box Motiven oder die Erkennung von DPF/W-haltigen Sequenzen. Dies impliziert, daß es sich bei der Bildung von clathrinbedeckten Vesikeln um einen sehr dynamischen Prozeß handelt, bei dem zahlreiche Wechselwirkungen transient ausgebildet werden. AP-2 spielt eine Schlüsselrolle bei der Regulation der Bildung von CCV. Fast alle akzessorischen oder regulatorischen Proteine enthalten Bindungsmotive für AP-2. Die Struktur der Bindungstasche auf der Ohrdomäne von α -Adaptin erlaubt aber nicht die gleichzeitige Interaktion mit mehreren DPF/W- bzw. FxDxF-Motiven. Eine streng hierarchisch organisierte, sukzessive Bindung der Interaktionspartner an dieser Stelle könnte die Grundlage für die Regulation des Aufbaus der Clathrinhülle darstellen.

Die Bildung von clathrinbedeckten Vesikeln beruht auf einem komplexen Netzwerk von Protein-Protein-Interaktionen, die gezielt durch bestimmte Modifikationen gesteuert werden können. Bei den meisten der endozytotischen Proteine handelt es sich um Phosphoproteine, deren Affinität zueinander abhängig ist von ihrem Phosphorylierungszustand. So kann die Interaktion von AP-2 mit anderen Proteinen durch Phosphorylierung beeinflusst werden. Zytosolisches AP-2 ist an verschiedenen Stellen im Bereich der Scharnierregionen der beiden großen Untereinheiten auf diese

Weise modifiziert. Da durch Phosphorylierung der β -Untereinheit die Clathrinbindung beeinflusst wird, reduziert so phosphoryliertes AP-2 nicht durch eine unkontrollierte Zusammenlagerung den Anteil von freiem Clathrin im Zytosol (Wilde und Brodsky, 1996). An der Plasmamembran wird die Affinität von AP-2 für Internalisierungssignale von Frachtproteinen durch Phosphorylierung der μ -Untereinheit und einer vermutlich damit einhergehenden Konformationsänderung erhöht (Collins *et al.*, 2002; Ricotta *et al.*, 2002). Entsprechend der zellulären Lokalisation der Adaptorproteine unterscheidet sich der Phosphorylierungszustand von μ - und β -Adaptin (Ghosh und Kornfeld, 2003; Wilde und Brodsky, 1996). Die Interaktion mit AP-2 wird auch durch die Phosphorylierung von Bindungspartnern reguliert. Dies konnte beispielsweise für AP180 und Amphiphysin gezeigt werden. Durch ihre Phosphorylierung wird die Bindung an AP-2 gehemmt. Phosphoryliertes Dynamin wiederum bindet nicht mehr an Amphiphysin (Hao *et al.*, 1999; Slepnev *et al.*, 1998).

1.2.4 Zerfall der Hülle clathrinbedeckter Vesikel

Sobald clathrinbedeckte Vesikel in das Zytosol freigesetzt werden, verlieren sie sehr schnell wieder ihre Hülle. Für den Zerfall müssen die Hüllproteine sowohl voneinander als auch von der Membran dissoziieren, um schließlich die Fusion mit der Zielmembran zu ermöglichen. Clathrin und die Adaptorproteine werden dabei unabhängig voneinander von der Vesikeloberfläche entfernt (Hannan *et al.*, 1998) und stehen wieder für die Bildung neuer CCV zur Verfügung.

Der Zerfall der Hülle von clathrinbedeckten Vesikeln erfolgt unter ATP-Verbrauch durch ein konstitutiv exprimiertes Mitglied der 70 kDa großen Hitzeschockproteinfamilie (Hsc70). In der Zelle erfüllt dieses Chaperon eine Vielzahl verschiedener Aufgaben, indem es zum Beispiel bei der Faltung von Proteinen und der Dissoziation von Proteinaggregaten unerwünschte Protein-Protein-Interaktionen unterbindet (Hendrick und Hartl, 1993).

Neben einer N-terminalen ATPase-Domäne (44 kDa) enthält Hsc70 eine zentrale Substratbindungsdomäne (18 kDa) und eine ca. 10 kDa große, wenig konservierte C-terminale Domäne. Die Selektivität von Hsc70 für ein bestimmtes Substrat ist nur relativ gering. Sie beschränkt sich auf hydrophobe Peptide oder exponierte Proteinsegmente, wie sie auch in ungefalteten Proteinen auftreten (Bukau und Horwich, 1998). Eine Spezifität wird daher erst durch DnaJ-ähnliche Proteine, die als Kofaktoren wirken, vermittelt. Die Struktur der Substratbindungsdomäne von Hsc70 wurde

durch NMR-Spektroskopie bestimmt und entspricht einem β -*Sandwich* aus zwei viersträngigen antiparallelen β -Faltblättern mit einer C-terminalen α -Helix (Morshauser *et al.*, 1999). Die Hydrolyse von ATP führt zu einer Konformationsänderung, durch die das gebundene Substrat in einer Grube der β -Faltblattdomäne von der α -Helix fixiert wird (Wilbanks *et al.*, 1995). Trotz geringer Sequenzübereinstimmungen zeigt die ATPase-Domäne von DnaK, dem Hsc70 Homologen in *Escherichia coli*, eine strukturelle Ähnlichkeit zur entsprechenden Domäne im Aktin (Flaherty *et al.*, 1991).

Die intrinsische ATPase-Aktivität von Hsc70 ist relativ gering und wird durch die Interaktion mit sogenannten J-Domänen Proteinen stimuliert. Für DnaJ als Kofaktor von DnaK in *Escherichia coli* konnte gezeigt werden, daß die Stimulation der ATP-Hydrolyse erst nach der Assoziation eines Substrats mit der Substratbindungsdomäne erfolgt, wobei DnaJ und das gebundene Substrat einen synergistischen Effekt haben. Die Wirkung von DnaJ wird durch eine Kommunikation zwischen der ATPase- und Substratbindungsdomäne von DnaK vermittelt (Laufen *et al.*, 1999; Mayer *et al.*, 1999). Zu den J-Domänen Proteinen gehört auch das neuronale Phosphoprotein Auxilin mit einer Größe von 110 kDa (Ahle und Ungewickell, 1990; Morris *et al.*, 1990), das zusammen mit Hsc70 den Zerfall der Clathrinhülle von CCV einleitet. Die konservierte J-Domäne enthält das zentrale Hsc70 Bindungsmotiv HPDK (Morgan *et al.*, 2001; Ungewickell *et al.*, 1995) und erstreckt sich über den C-Terminus, der bis zu Aminosäure 910 reicht. Der J-Domäne ist eine Region vorgelagert, die die Assoziation von Auxilin mit Clathrin vermittelt und den Bereich von Aminosäure 547 bis 813 umfaßt. Einer N-terminalen Domäne im Auxilin (AS 47-350) (Ungewickell *et al.*, 1995), deren Aminosäuresequenz eine gewisse Homologie zu dem aktinbindenden Protein Tensin und dem Tumorsuppressor PTEN zeigt, konnte noch keine Funktion zugewiesen werden. Die für die Phosphataseaktivität von PTEN kritischen Reste sind im Auxilin nicht konserviert und auch eine Bindung an Phosphoinositide konnte bislang nicht nachgewiesen werden (Lee *et al.*, 1999). Das ubiquitär exprimierte Auxilin2/GAK (Cyclin G-assoziierte Kinase) übernimmt die Aufgabe von Auxilin in nicht-neuronalen Geweben und zeichnet sich durch eine zusätzliche Kinaseaktivität am N-Terminus aus, die neben der AAK1-Kinase für die Phosphorylierung der μ -Untereinheit von AP-1 und AP-2 verantwortlich ist (Conner und Schmid, 2002; Greener *et al.*, 2000; Umeda *et al.*, 2000). Ebenso wie Auxilin bindet GAK an Clathrin und AP-2. Im Unterschied zu Auxilin konnte für GAK zudem eine Interaktion mit dem am TGN lokalisierten AP-1 nachgewiesen werden (Umeda *et al.*, 2000). Es wird ver-

mutet, daß die distale oder proximale Domäne der schweren Kette von Clathrin an der Bindung von Auxilin beteiligt ist. Hierfür spricht, daß auch proteolytisch verdaute Clathrinkäfige, denen die terminalen Domänen fehlen, *in vitro* Hsc70-/auxilinabhängig dissoziieren (Ungewickell *et al.*, 1995).

Ein gängiges Modell für den Zerfall der Clathrinhülle von CCV geht davon aus, daß Auxilin erst Clathrin bindet und dann über die Interaktion mit der J-Domäne Hsc70 zu den Käfigen rekrutiert (Abb. 4). Die Affinität von Auxilin für Hsc70 wird durch das Nucleotid in der ATPase Domäne bestimmt. Die auxilinabhängige Rekrutierung von Hsc70 an die Clathrinhülle erfolgt nur im ATP-gebundenen Zustand. Nach der Bindung von Hsc70 an Clathrin und der Hydrolyse von ATP dissoziiert Auxilin wieder von Hsc70 ab. Hsc70 hemmt die Clathrin-Clathrin-Interaktionen und destabilisiert dadurch die Käfigstruktur (Ungewickell *et al.*, 1995).

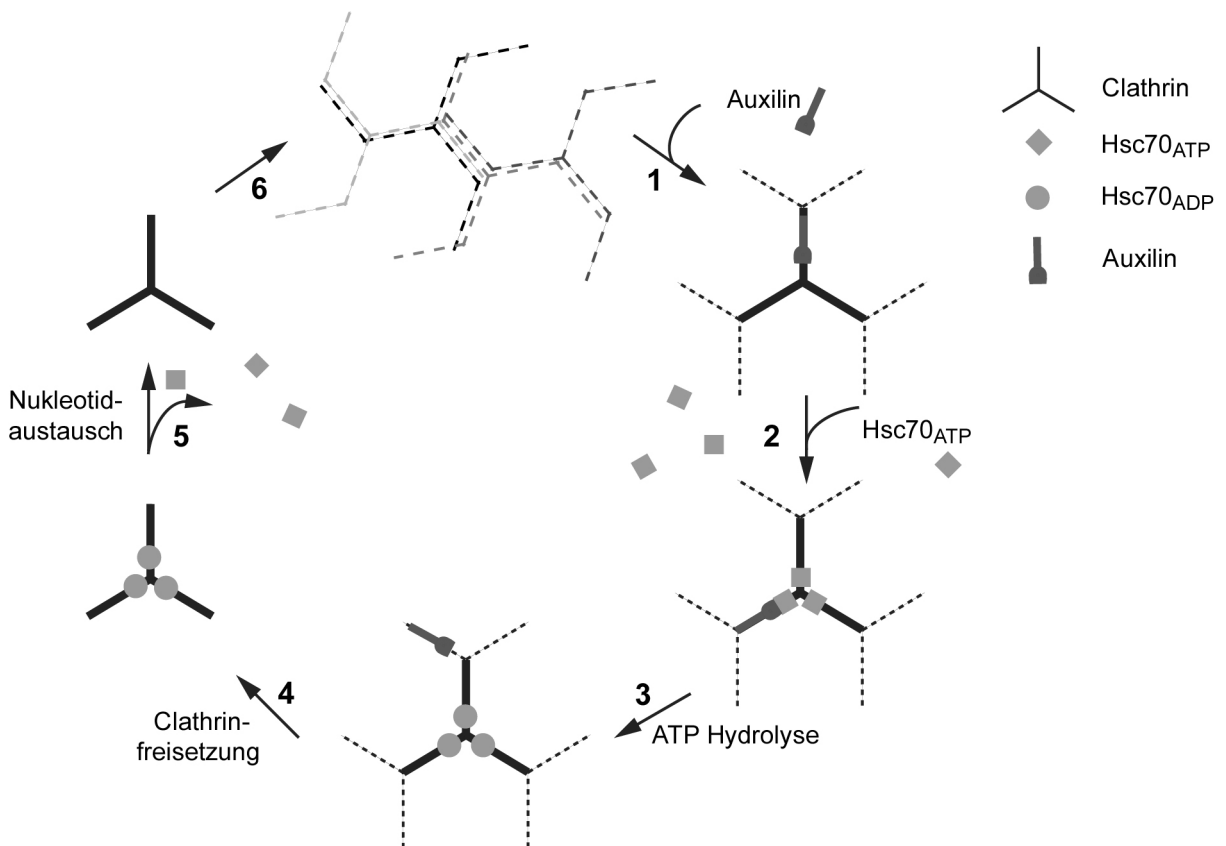


Abbildung 4: Modell zum Zerfall der Hülle von clathrinbedeckten Vesikeln. Die Dissoziation der Clathrinhülle wird durch das clathrinbindende DnaJ-Protein Auxilin eingeleitet (1), das Hsc70_{ATP} an Clathrinkäfige rekrutiert (2) und dessen ATPase-Aktivität stimuliert. Die Hydrolyse von ATP bewirkt eine Konformationsänderung von Hsc70 wodurch die Affinität von Hsc70 zu Auxilin verringert und die zu Clathrin erhöht wird (3). Die Bindung von Hsc70 an Clathrin führt zur Freisetzung von Triskelien aus dem Clathringitterverband (4). Während Hsc70 stöchiometrisch an die schweren Ketten von Clathrin bindet, wirkt Auxilin bei diesem Prozeß katalytisch. Der Nucleotidaustausch von ADP gegen ATP hat die Dissoziation von Hsc70 und Clathrin zur Folge, so daß dieses wieder zur Bildung neuer Vesikel eingesetzt werden kann (5 und 6).

Bei dem Zerfall der Hülle von clathrinbedeckten Vesikeln wirkt Auxilin katalytisch, während Hsc70 stöchiometrisch in einem Komplex mit Clathrin erscheint, der drei Moleküle Hsc70 pro Triskelion enthält (Heuser und Steer, 1989; Ungewickell *et al.*, 1995).

Einiges spricht dafür, daß die Rolle von Hsc70 bei clathrinvermittelten Prozessen deutlich komplexer ist als zunächst angenommen und sich nicht nur auf den Zerfall der Clathrinhülle beschränkt. Um eine Fusion mit dem Zielorganell zu ermöglichen, müssen neben Clathrin auch die Adaptoren von der Vesikelmembran dissoziieren. Wie sich herausstellte ist an diesem Prozeß ebenfalls Hsc70 beteiligt (Hannan *et al.*, 1998). Die Interaktion von Hsc70 mit der Proteinphosphatase 2A führt zur Dephosphorylierung der μ -Untereinheit der Adaptorproteine, wodurch die Affinität für Frachtmoleküle verringert (Ghosh und Kornfeld, 2003) und möglicherweise auch die Interaktion mit Polyphosphoinositiden der Membran beeinträchtigt wird (Collins *et al.*, 2002).

Hsc70 Mutanten zeigen zudem schon Defekte bei früheren Schritten der Endozytose, die mit der *coated pit* Formation im Zusammenhang stehen. So scheinen sie die Bildung leerer Clathrinkäfige zu begünstigen und reduzieren damit den zytosolischen Anteil von Clathrin (Newmyer und Schmid, 2001). Nach der Dissoziation der Hülle von clathrinbedeckten Vesikeln liegen Clathrin und Hsc70 in einem stabilen Komplex vor, der freies Clathrin für die CCV-Bildung an der Membran zur Verfügung stellen könnte (Jiang *et al.*, 2000). Im Bereich der *coated pits* wurde zudem ein ATP-abhängiger Austausch zwischen zytosolischem und an der Membran polymerisiertem Clathrin beobachtet (Wu *et al.*, 2001). Auf diese Weise könnten unter Beteiligung von Hsc70 für die Formation eines sphärischen Käfigs Pentagone in ein zunächst flaches Gitter aus Hexagonen eingefügt werden.

Neben der entscheidenden Rolle von Hsc70 und Auxilin bei der Dissoziation der Proteinhülle von clathrinbedeckten Vesikeln, sind in der Zwischenzeit einige andere Faktoren und Proteine beschrieben worden, die an diesem Prozeß beteiligt sein könnten. Eine Destabilisierung der Hülle könnte so auch die Folge der Phosphorylierung der β -Untereinheit von AP-2 sein, wodurch die Interaktion der Adaptorproteine mit Clathrin gehemmt würde (Wilde und Brodsky, 1996).

Caenorhabditis elegans Mutanten von *unc-26*, dem Orthologen zur Phosphatidylinositolphosphatase Synaptojanin, zeigen vielfältige Defekte, zu denen auch die Anreicherung von clathrinbedeckten Vesikeln gehört (Harris *et al.*, 2000). In transgenen

Mäusen, denen Synaptojanin fehlt, wurde ebenfalls eine CCV-Akkumulation beobachtet (Cremona *et al.*, 1999). Synaptojanin enthält eine zentrale PI5-Phosphatase-Domäne, die PI(4,5)P₂ und PI(3,4,5)P₃ als Substrate umsetzt (McPherson *et al.*, 1996). Die Dephosphorylierung von Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat würde die Affinität von Adaptorproteinen für die Membran verringern und dadurch ihre Dissoziation von der Vesikelmembran einleiten. Neben den Adaptorproteinen binden auch Epsin, Dynamin und AP180 an PIP₂. Synaptojanin selber könnte über die Interaktion mit den SH3-Domänen von Endophilin oder Amphiphysin an die Membran rekrutiert werden. Tatsächlich konnte gezeigt werden, daß die Bindung von Endophilin einen Einfluß auf die Abschnürung und den Zerfall der Proteinhülle von clathrinbedeckten Vesikeln hat (Gad *et al.*, 2000).

Humanes *Stoned B* (hStnB) Protein stimuliert in neuronalen Zellen die Dissoziation von AP-2 von der Membran. Eine μ 2-homologe Domäne von hStnB kann sowohl mit AP-2 als auch mit Synaptotagmin interagieren, und vermutlich kompetitiert hStnB mit AP-2 um die Bindung an Synaptotagmin (Walther *et al.*, 2001).

In Anbetracht dieser vermutlich auch an dem Zerfall der Hülle von clathrinbedeckten Vesikeln beteiligten Proteine ist es naheliegend, daß Hsc70 und Auxilin nicht allein für die Regulation dieses Prozesses verantwortlich sind. Da aber nur diese beiden Proteine mit der direkten Clathrinfreisetzung von CCV in Verbindung gebracht werden konnten, bleiben Hsc70 und Auxilin die entscheidenden Faktoren, die das Gleichgewicht zwischen freiem und polymerisiertem Clathrin in der Zelle aufrechterhalten.

Ziel der Arbeit

Nach dem bislang akzeptierten Modell erfolgt der Zerfall der Hülle von clathrinbedeckten Vesikeln durch die Interaktion von Auxilin mit der distalen oder proximalen Domäne von Clathrin und die Rekrutierung von Hsc70 an diese Region der schweren Kette. Wie sich allerdings herausstellte, bindet Auxilin Clathrin auch im Bereich der terminalen Domäne. Diese Eigenschaft teilt Auxilin mit den meisten an der CCV-Bildung beteiligten Proteinen. Die Bedeutung dieser Interaktion ist aber völlig unklar, da Auxilin auch Käfige dissoziieren kann, denen die terminalen Domänen fehlen.

Für Auxilin existierten weder konkrete Daten über die Interaktion mit den Bindungspartnern Clathrin und AP-2, noch gab es Informationen zum strukturellen Aufbau der Clathrinbindungsdomäne. Neben dem Vorhandensein einer J-Domäne könnten funktionelle Unterschiede zwischen Auxilin und akzessorischen Proteinen, die an der Bildung der Clathrinhülle beteiligt sind, auch auf die Organisation der Clathrinbindungsdomäne zurückzuführen sein.

Es wurde beabsichtigt, mit Hilfe der Herstellung rekombinanter Auxilinfragmente und der gerichteten Mutagenese eine detaillierte molekularbiologische Analyse der Interaktion von Auxilin mit Clathrin und AP-2 zu erstellen und gegebenenfalls daran beteiligte Motive zu identifizieren. In diesem Zusammenhang sollte auch der Auxilinbindungsort auf der schweren Kette von Clathrin näher eingegrenzt werden. Durch funktionelle Analysen dieser Fragmente könnte die Bedeutung einzelner Bereiche und Motive dieser zentralen Domäne für die Aktivität von Auxilin geklärt werden.

Ziel dieser Arbeit ist, durch eine Charakterisierung der Clathrinbindungsdomäne zum besseren Verständnis des molekularen Mechanismus der Dissoziation von CCV beizutragen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Computerprogramme

Für die Datenbearbeitung wurden die Programme Adobe Illustrator 8.0 (Adobe Systems, San Jose, USA), Adobe Photoshop 5.0 (Adobe Systems), Akkuprog (Kindler, 1997), CDPro (Sreerama und Woody, 2000), CPrimer, DNASTar (DNASTar, Madison, USA), Excel 98 (Microsoft, Redmont, USA), MacVector 5.0 (Eastman Kodak Company, Rochester, USA) und NIHImage 1.62 (NIH, Bethesda, USA) verwendet.

2.1.2 Geräte

Gerät	Typbezeichnung	Hersteller, Firmensitz
Blotapparatur		Forschungswerkstätten der Medizinischen Hochschule Hannover
Brutschrank	Certomat BS-1	B.Braun, Melsungen
	B12 Function line	Heraeus, Hanau
CD-Spektrometer	Dichrograph III	Jobin Yvon, Bensheim
Elektronenmikroskop	EM 902	Zeiss
Elektrophoresekammer	Mighty Small II	Hoefer, San Francisco, USA
Elektroporator	MicroPulser	BioRad, München
Entwicklermaschine	Optimax Typ TR	Protec, Oberstenfeld
FPLC-System	Fraktionssammler: FRAC-100	Amersham Biosciences, Freiburg
	Optische Einheit: UV-1	
	Pumpe: P-500	
	Säulen: MonoQ	
	Superdex 200 HR10/30	
	Superose 12 HR10/30	
	Superose 6 prep grade	
Schreiber: REC-102		
	Steuerungsgerät: LCC-501 Plus	
Heizblock	Dri-Block DB-2A	Techne, Cambridge, England
Netzgerät	PowerPac 300, PowerPac 1000	BioRad, München

pH-Meter	MultiCal	WTW, Weilheim
Photometer	DU-640 Spectrophotometer	Beckman Coulter Inc., Krefeld
Reinstwasseranlage	MilliQ	Millipore, Bedford, USA
Rotationsinkubator	3025	GFL, Burgwedel
Schüttelinkubator	KS 15 A Control	Edmund Bühler, Hechingen
Thermocycler	UNO-Thermoblock	Biometra, Göttingen
Ultraschallgerät	Sonifier 250	Branson, Danbury, USA
UV-Leuchttisch	UVT-20 S	Herolab, Wiesbaden
Vortex	Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Wippinkubator	Duomax 1030	Heidolph, Schwabach
Zentrifugen:		
Standzentrifuge	J2-HS (Rotor JA-10)	Beckman Coulter Inc., Krefeld
Tischzentrifugen	5410	Eppendorf, Hamburg
	5417 R	Eppendorf, Hamburg
	(Rotoren:A-8-11, FA45-24-11)	
	Megafuge 1.0 R	Heraeus, Osterode
Präparative UZ	Optima 100 TL	Beckman Coulter Inc., Krefeld
	(Rotoren: TLA45, TLA100.4)	
	Optima LE 80K	Beckman Coulter Inc., Krefeld
	(Rotoren: 45Ti, 70Ti, SW-28)	
Analytische UZ	Optima XL-A (Rotor An50)	Beckman Coulter Inc., Krefeld

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Produkt	Hersteller, Firmensitz
Blotpapier	3MM Chr	Whatman, Maidstone, England
Dialyseschläuche	Spectra/Por 1	Spectrum, Rancho Dominguez, USA
Gelfiltrationssäulen	NAP-5, NAP-10, PD-10	Amersham Biosciences, Freiburg
Kupfernetze	G200-C3	SCI, München
Mikroreaktionsgefäße 0,5 ml und 1,5 ml	Microfuge Tube	Beckman Coulter Inc., Krefeld
		Eppendorf, Hamburg
		Sarstedt, Nümbrecht

Nitrozellulosemembran	Protran	Schleicher & Schuell, Dassel
Probenkonzentrationsgefäße	Centricon-10/-30 Centriprep-30	Millipore, Bedford, USA
Reaktionsgefäße 15 ml und 50 ml		Greiner, Frickenhausen
Chemolumineszenzfilme	Hyperfilm ECL	Amersham Biosciences, Freiburg
Trägermaterialien	ATP-Agarose Ni-NTA-Agarose DEAE-Cellulose DE52	Sigma, Taufkirchen Qiagen, Hilden Whatman, Maidstone, USA
	GSH-Sepharose 4B	Amersham Biosciences, Freiburg
	Sepharose CL-4B	Amersham Biosciences, Freiburg
Ultrazentrifugenröhrchen 3,2 ml und 38 ml		Beckman Coulter Inc., Krefeld
Zellulosenitratfilter (0,2 µm und 0,45 µm Porengröße)		Sartorius, Göttingen

2.1.4 Kommerzielle Systeme

Produkt	Hersteller, Firmensitz
DNA-Molekulargewichtsstandard:	
MW VII	Roche, Mannheim
2-Log	New England Biolabs, Frankfurt
DNA-Vektoren	
pET32a-c	Novagen, Bad Soden
pGEX4T1-3	Pharmacia Biotech, Freiburg
pQE30-32	Qiagen, Hilden
pUC57	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin	Pierce Biotechnology, Rockford, USA
QIA Prep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIA Quick Gelextraktion Kit	Qiagen, Hilden
Quik Change Site Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
Renaissance Enhanced Luminol	NEN, Boston, USA

2.1.5 Chemikalien

Alle Säuren wurden von Riedel-deHaën bezogen. Hier nicht aufgeführte organische Lösungsmittel stammen von Baker. Sigma oder Merck lieferten in der Regel die allgemeinen Laborchemikalien.

Reagenz	Hersteller, Firmensitz
Agarose	BioRad, München
Adenosintriphosphat (ATP)	Roche, Mannheim
Ampicillin	Sigma, Taufkirchen
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen
Coomassie Brilliant Blue R250	Serva, Heidelberg
Creatinphosphat	Sigma, Taufkirchen
Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs)	Roche, Mannheim
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Taufkirchen
Ethidiumbromid	Sigma, Taufkirchen
Glutathion (GSH)	Sigma, Taufkirchen
Guanidiniumhydrochlorid	Sigma, Taufkirchen
Hefeextrakt	BD Biosciences, Heidelberg
Imidazol	Merck, Darmstadt
Isopropylthiogalactosid (IPTG)	Sigma, Taufkirchen
Kanamycin	Sigma, Taufkirchen
Magermilchpulver	Uelzena, Uelzen
β -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	BioRad, München
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma, Taufkirchen
Ponceau S	Sigma, Taufkirchen
Proteaseinhibitormischung <i>Complete</i>	Roche, Mannheim
Trifluorethanol (TFE)	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Sigma, Taufkirchen
Trypton	BD Biosciences, Heidelberg
Tween 20	Sigma, Taufkirchen
Uranylacetat	Merck, Darmstadt
Xylencyanol	Sigma, Taufkirchen

2.1.6 Enzyme und Proteine

Name	Hersteller, Firmensitz	Nummer
β -Galaktosidase	Sigma, Taufkirchen	G-8511
BSA	Sigma, Taufkirchen	A-7517
Carbanhydrase	Sigma, Taufkirchen	C-2273
Creatinphosphokinase	Sigma, Taufkirchen	C-3755
DNA-modifizierende Enzyme:		
Alkalische Phosphatase	Roche, Mannheim	713023
Polymerase I Klenow-Fragment	Roche, Mannheim	1008412
Mungobohnennuklease	New England Biolabs, Frankfurt	M0250S
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	AGS	EP0403
T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot	EL0335
Ovalbumin	Sigma, Taufkirchen	A-7642
Phosphorylase b	Sigma, Taufkirchen	P-4649
S-Protein HRP-Konjugat	Novagen, Bad Soden	69047-3
Streptavidin HRP-Konjugat	Pierce Biotechnology, Rockford, USA	21126
Restriktionsendonucleasen:		
<i>Clal</i> , <i>EcoRI</i> , <i>HaeIII</i> , <i>HindIII</i> , <i>NaeI</i> , <i>SacI</i>	Roche, Mannheim	
<i>AvaI</i> , <i>ApoI</i> , <i>NcoI</i>	New England Biolabs, Frankfurt	
<i>Alw44I</i> (<i>ApaI</i>), <i>BamHI</i> , <i>Cfr42I</i> (<i>SacII</i>), <i>DraI</i> , <i>Eco32I</i> (<i>EcoRV</i>), <i>Eco147I</i> (<i>StuI</i>), <i>Kpn2I</i> (<i>BspMII</i>), <i>KspAI</i> (<i>HpaI</i>), <i>MspI</i> (<i>HpaII</i>), <i>PaeI</i> (<i>SphI</i>), <i>PvuII</i> , <i>SalI</i>	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot	
Trypsininhibitor aus Sojabohnen	Worthington Biochemicals, Lakewood, USA	3570
Thrombin	ICN, Aurora, USA	154163
Trypsin	Worthington Biochemicals, Lakewood, USA	3740

2.1.7 Antikörper

Antikörper	Antigen	Hersteller/Referenz	Katalognr.
anti- α -Adaptin	AP-2 Rumpfdomäne	BD Biosciences	610501
anti-Penta-His	Penta-His	Qiagen, Hilden	34660
mAb 100/4	Auxilin	Ahle und Ungewickell, 1990	
Ziegen-IgG HRP-Konjugat	Maus-IgG	ICN Cappel, Aurora, USA	55563

2.1.8 Puffer und Lösungen

Name	Zusammensetzung
Blockierlösung	8% Magermilpulver, 0,1% Tween 20 in PBS
Coomassiefärbelösung	0,2% Coomassie Brilliant Blue R250, 47,5% Ethanol, 10% konz. Essigsäure
DNA-Auftragspuffer (zehnfach)	0,25% Bromphenolblau, 1,5% Ficoll 400, 0,25% Xylen-cyanol
Elutionspuffer (pH 8,0)	10 mM GSH, 50 mM Tris-HCl
Entfärbelösung	10% Essigsäure, 10% Ethanol
Golgebindingpuffer (pH 7,1)	25 mM HEPES, 125 mM Kaliumacetat, 5 mM Magnesium-acetat
Harnstoffpuffer (pH 8,0)	100 mM NaH ₂ PO ₄ , 10 mM Tris-HCl, 8 M Harnstoff
Imidazol-Elutionspuffer (pH 8,0)	250 mM Imidazol, 300 mM NaCl, 50 mM NaH ₂ PO ₄
Imidazol-Lysispuffer (pH 8,0)	10 mM Imidazol, 300 mM NaCl, 50 mM NaH ₂ PO ₄ , 1% Triton X-100
Imidazol-Waschpuffer (pH 8,0)	20 mM Imidazol, 300 mM NaCl, 50 mM NaH ₂ PO ₄
Laemmli-Laufpuffer	370 mM Glycin, 0,1% SDS, 50 mM Tris
LB-Medium (pH 7,5)	0,5% Hefeextrakt, 1% NaCl, 1% Trypton
Molekulargewichtsstandard	Je 5 mg/ml von BSA, Carbanhydrase, β-Galactosidase, Ovalbumin und Phosphorylase b in Probenpuffer
PBS (pH 7,0)	2,7 mM KCl, 1,9 mM KH ₂ PO ₄ , 137 mM NaCl, 8,2 mM Na ₂ HPO ₄
Ponceau S-Färbelösung	1% Essigsäure, 0,2% Ponceau S
Puffer A (pH 6,4)	1 mM EGTA, 100 mM MES, 0,5 mM MgCl ₂ , 0,02% NaN ₃
Puffer B (pH 7,0)	1 mM DTT, 20 mM Imidazol, 25 mM KCl, 2 mM (NH ₄) ₂ SO ₄
Puffer D (pH 7,0)	1 mM DTT, 20 mM Imidazol
Puffer H (pH 6,5)	0,1 mM EGTA, 0,1 M MES, 0,5 mM MgCl ₂ , 3 mM NaN ₃
Regenerationsmix (zwölfach)	24 mM ATP, 60 mM Creatinphosphat, 24 U/ml Creatinphosphokinase, 12 mM DTT
SOC-Medium (pH 7,0)	20 mM Glucose, 0,5% Hefeextrakt, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ , 10 mM NaCl, 2% Trypton
TBE-Puffer	45 mM Borsäure, 1 mM EDTA, 45 mM Tris
TBST (pH 8,0)	150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 0,1% Tween 20
TE-Puffer (pH 8,0)	1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl
Thrombinpuffer (pH 8,5)	2,5 mM CaCl ₂ , 150mM NaCl, 20 mM Tris-HCl
Transferpuffer	39 mM Glycin, 20% Methanol, 0,04% SDS, 50 mM Tris

SDS-Probenpuffer (vierfach) (pH 8,0)	2 mM EDTA, 50% Glycerin, 10% β -Mercaptoethanol, 10% SDS, 100 mM Tris-HCl, angefärbt mit Bromphenolblausg.
ψ -broth	10 mM KCl, 4 mM MgSO ₄ in LB-Medium

2.1.9 *Escherichia coli* Wirtsstämme

DH5 α , XL1-Blue: Plasmidpräparation

BL21 (DE3) pLysS, M15 (pRep4): Proteinexpression

2.1.10 Oligodesoxynukleotide

Die Oligodesoxynukleotide wurden von den Firmen IBA Naps, Göttingen und Operon, Köln synthetisiert. Für die gezielte Mutagenese und die Herstellung des DPFADLG-Plasmids wurde HPLC-aufgereinigte DNA verwendet.

DNA-Oligonukleotide für das DPFADLG-Konstrukt:

Peptid	5'→3'-Richtung	Sequenz	Schnittstelle
DPFADLG	kodierend	GATC CGATCCTTTGCTGACCTGGGACGTTAAC	<i>HpaI</i>
	nichtkodierend	TCGA GTTAACGTCCCAAGGTCAGCGAAAGGATCG	

PCR-Primer:

PCR-Fragment	5'→3'-Richtung	Primersequenz	Schnittstelle
Aux (547-715)	kodierend	GCC GGATCC GAGTGGACCTACATCCACCCAG	<i>BamHI</i>
	nichtkodierend	GCC GAGCTC ACATGGGCTGGGGAGATGCTTTC	<i>SacI</i>

Primer für die gerichtete Mutagenese:

Mutation	5'→3'-Richtung	Primersequenz	Schnittstelle
⁵⁷⁹ DPF →APA	kodierend	GGTGCCACCTTTGCC CCAGCTGG AGCACCTTC	<i>PvuII</i>
	nichtkodierend	GAAGGTGCTC CAGCTG GGGCAAAGGTGGCACC	
⁶⁰⁵ DPF →APA	kodierend	GTGCTTCC AGTGCAC CCGCTCTTCAGCCTACG	<i>ApaI</i>
	nichtkodierend	CGTAGGCTGAAGAGCGG GTGCACT GGAAGCAC	
⁶⁷⁴ DPF →APA	kodierend	CCCCAGACTCT GGCCC CTGCTGGTGACCTTGGG	<i>HaeIII</i>
	nichtkodierend	CCCAAGGTCAGCAGCAGG GGCC AGAGTCTGGGG	

⁵⁹¹ DLL →APA	kodierend	CCATCAGGTCA AAGCTT TGGCGGGTTCTTTTTTG	<i>HindIII</i>
	nichtkodierend	CAAAAAAGAACCCGCCA AAGCTT GACCTGATGG	
⁷⁸¹ DLL →APA	kodierend	GCAGCTGACTTTG AGGCCT TGGCCTCTGGTCAAG	<i>StuI</i>
	nichtkodierend	CTTGACCAGAGGCCA AGGCCT CAAAGTCAGCTGC	
⁶³⁶ WDW →AAA	kodierend	GTTTCAGGAG CCGCGG CCGCGCATACCAAAC	<i>SacII</i>
	nichtkodierend	GTTTGGTATGCGCGG CCGCGG CTCCTGAAAC	
⁷²⁶ NWQ →AAA	kodierend	GGAGGGGGCTACG CCGCGG CGCAGACACAGTCC	<i>SacII</i>
	nichtkodierend	GGACTGTGTCTGCG CCGCGG CGTAGCCCCCTCC	
⁷⁵³ FS →AA	kodierend	CTACAACGTGAGCGCCGC ATCGAT GCCTGGGG	<i>Clal</i>
	nichtkodierend	CCCCAGGC ATCGAT GCGGCGCTCACGTTGTAG	
⁷⁶² ER →AA	kodierend	GGGGGCCAGAACGCAG CCGGCA AAGCAGCAGC	<i>NaeI</i>
	nichtkodierend	GCTGCTGCTTT GCCGGC TGCGTTCTGGCCCC	
⁵⁹⁰ STOP	kodierend	CTAAACCATCAG GTTAAC ATTTGCTGGGTTT	<i>HpaI</i>
	nichtkodierend	GAACCCAGCAAAT GTTAAC CTGATGGTTTAG	
⁶⁰⁵ STOP	kodierend	CCAGTGCTTCCAG GTTAAC CCTTTCTTCAGCC	<i>HpaI</i>
	nichtkodierend	GGCTGAAGAAAGG GTTAAC TGGAAGCACTGG	

2.1.11 Liste verwendeter Fusionsproteine

pGEX4T-1 Vektoren wurden für die Herstellung von GST-Fusionsproteinen verwendet. pET32a-c und pQE30-31 Vektoren dienten zur Klonierung von N-terminal polyhistidinmarkierten Fusionsproteinen. Dabei enthielt der Fusionsanteil, der sich von den pET32 Vektoren ableitete, neben sechs Histidinresten das vorgelagerte Thioredoxin (Trx). Zur Unterscheidung wurde daher die Bezeichnung als H₆- oder TrxH₆-Fusionsproteine gewählt.

Die Plasmide für GST-TD, die GST- α -Ohrdomäne und die H₆- β ₂-Ohrdomäne wurden von James Keen, Thomas Jefferson Universität, Philadelphia, USA (Goodman *et al.*, 1997), Richard Anderson, Universität von Texas, Dallas, USA (Wang *et al.*, 1995) und Thomas Kirchhausen, Harvard Medical School, Boston, USA (Shih *et al.*, 1995) zur Verfügung gestellt. Die cDNA der schweren Kette von Clathrin im Vektor pBlueskript (KIAA 0034) stammte von Takahiro Nagase, Kazusa DNA-Forschungsinstitut, Kisarazu, Japan.

Fusionsproteine, denen ein oder mehrere putative Bindungsmotive fehlen, wurden im Namen mit dem Symbol Δ vor der mutierten Peptidsequenz bezeichnet.

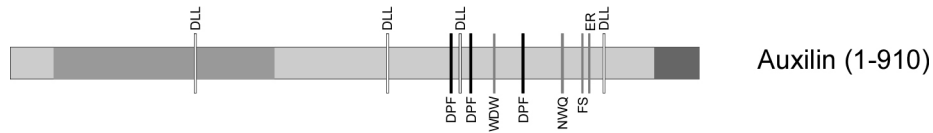


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von Auxilin. Die Positionen bekannter und neu identifizierter Bindungsmotive wurden durch Balken markiert.

Auxilinfragmente	Vektor		
	pGEX4T-1	pET32a-c	pQE30-31
Aux (547-910)	+		
Aux (547-910) Δ^{674} DPF	+		
Aux (547-910) Δ^{674} DPF, Δ^{781} DLL	+		
Aux (547-910) Δ^{591} DLL, Δ^{674} DPF, Δ^{781} DLL	+		
Aux (547-715)		+	+
Aux (547-715) Δ^{579} DPF			+
Aux (547-715) Δ^{605} DPF, Δ^{674} DPF		+	+
Aux (547-715) Δ^{674} DPF		+	+
Aux (547-715) Δ^{636} WDW, Δ^{674} DPF			+
Aux (547-715) Δ^{591} DLL			+
Aux (547-618)		+	
Aux (547-605)		+	
Aux (547-590)		+	
Aux (715-902)		+	+
Aux (715-902) Δ^{726} NWQ			+
Aux (715-902) Δ^{753} FS			+
Aux (715-902) Δ^{753} FS, Δ^{762} ER			+
Aux (715-902) Δ^{762} ER			+
Aux (715-902) Δ^{781} DLL		+	+
Aux (715-813)			+
Aux (715-776)		+	
Aux (778-902)		+	
Aux (619-738)		+	+
Aux (619-738) Δ^{674} DPF		+	+

AP-2 Fragment	Vektor
α -Ohrdomäne	pGEX4T-1

Clathrinfragmente	Vektor	
	pGEX4T-2	pET32a
Clathrin-TD (AS 1-579)	+	
Clathrin-DD (AS 438-1073)		+
Clathrin-PD (AS 1073-1675)		+
Clathrin-D/2PD (AS 730-1675)		+

2.1.12 Sonstige Materialien

Die Schweinehirne wurden vom Schlachthof Hannover bezogen. Clathrinbedeckte Vesikel wurden von Frau Beate Großman und Frau Elke Mallon entsprechend der Vorschrift von Lindner (1994) präpariert. Die SDS-Polyacrylamidgele und einen Großteil der Pufferlösungen stellte Frau Christiane Lemke bereit.

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen und Modifikation von 3'- oder 5'-überstehenden Enden

Die in einem präparativen Restriktionsverdau eingesetzte Menge der Plasmid-DNA mit den Auxilinkonstrukten betrug 3 - 5 μ g entsprechend der erwarteten Fragmentgröße. Von der Vektor-DNA wurden 0,5 - 1,5 μ g verdaut.

Das Volumen der Reaktionsansätze wurde so gewählt, daß die Endkonzentration an Glycerin, die sich aus der zugegebenen Menge an Restriktionsenzymen berechnete, unter 5% lag. Der Verdau erfolgte mit 1 U der Enzyme bei 37°C für eine Stunde. Hiervon abweichende Inkubationsbedingungen wie bei *ApoI* (50°C) wurden dem Beiblatt der jeweiligen Enzyme entnommen. Für einen Doppelverdau der DNA wurde ein Reaktionspuffer benutzt, der beiden Restriktionsenzymen eine Aktivität von mindestens 50% zusprach. War die gleichzeitige Inkubation mit zwei Enzymen nicht möglich, wurden sie nacheinander eingesetzt. Die meisten Enzyme konnten bei 65°C

oder 80°C inaktiviert werden. Hierzu wurden die Ansätze für 20 Minuten im Heizblock bei der entsprechenden Temperatur inkubiert.

Um den Anteil möglicher Selbstligationen der Vektor-DNA zu verringern, wurden die 5'-Phosphatenden durch Behandlung mit der Alkalischen Phosphatase aus Kälberdarm (CIP, *calf intestine alkaline phosphatase*) entfernt. Die Inkubation erfolgte mit 1 U des Enzyms / pMol 5'-phosphorylierter DNA-Enden für eine Stunde bei 37°C in dem ursprünglichen Restriktionsendonukleasepuffer.

Die nach dem Restriktionsverdau generierten 3'- oder 5'-DNA-Überhänge mußten in einigen Fällen als Voraussetzung für die Ligation mit der Vektor-DNA modifiziert werden.

Zum Auffüllen von 5'-überstehenden Enden wurde der Reaktionsansatz mit 1 U des Klenow-Fragments der Polymerase I und 2 mM dNTPs für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Polymerase mußte anschließend bei 75°C für 10 Minuten hitzeinaktiviert werden. 3'-DNA-Überhänge konnten durch die Mungobohnennuklease (MBN) entfernt werden. Hierzu wurden im Reaktionsansatz die Hochsalzpuffer der Restriktionsendonukleasen vermieden und 1 U des Enzyms / µg DNA eingesetzt. Die Inkubation wurde für 30 Minuten bei 30°C durchgeführt. Durch Phenol/Isoamylalkohol/Chloroform (PIC)-Extraktion konnte die MBN inaktiviert und von der DNA abgetrennt werden. Die DNA-Lösung wurde dazu auf ein Volumen von 50 µl mit TE-Puffer aufgefüllt und mit dem gleichen Volumen gepufferter PIC-Mischung versetzt, gevortext und für 5 Minuten in der Tischzentrifuge (Rotor FA45-24-11) bei höchster Umdrehungszahl, was 25.000 x g_{\max} entsprach, zentrifugiert. Die obere, wäßrige Phase mit der DNA wurde abgenommen und die untere, organische Phase durch Zugabe von 50 µl an TE-Puffer erneut extrahiert. Es folgte eine Ethanolfällung der DNA aus den vereinigten wäßrigen Phasen, die mit 1/10 Volumen 3 M Natriumazetat (pH 5,2) und 2,5 Volumina kalter 100%iger Ethanollösung vermischt und für 20 Minuten auf Eis inkubiert wurden. Anschließend wurde die Probe bei 4°C und maximaler Drehzahl für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand entfernt und das DNA-Pellet mit 1 ml 70%igem Ethanol bei RT gewaschen. Nach einem weiteren fünfminütigen Zentrifugationsschritt bei RT wurde das Pellet im Exsikkator getrocknet und in TE-Puffer oder, falls sich ein weiterer Restriktionsverdau anschloß, in dem entsprechenden Restriktionsenzym-puffer wieder aufgenommen.

Ein analytischer Restriktionsverdau diente zur Überprüfung von neu hergestellten Plasmidkonstrukten. Die DNA wurde aus 2 ml Übernachtskulturen der das Plasmid

enthaltenden Bakterien mit dem Qiagen *Plasmid Miniprep Kit* isoliert. Die für den Restriktionsverdau ausgewählten Enzyme ergaben ein charakteristisches Schnittmuster an DNA-Fragmenten, wodurch eine eindeutige Aussage über den erfolgten Einbau der DNA in der richtigen Orientierung möglich wurde. Für den Verdau wurden 4 µl der DNA-Plasmidpräparation (ca. 0,2 µg DNA) und 0,5 U des Enzyms eingesetzt. Die Reaktionsansätze wurden nicht hitzeinaktiviert, sondern direkt wie im Abschnitt 2.2.1.2 beschrieben gelelektrophoretisch analysiert.

2.2.1.2 Aufreinigung und Ligation von DNA-Fragmenten

Die durch den Restriktionsverdau erhaltenen und gegebenenfalls modifizierten DNA-Fragmente wurden elektrophoretisch über ein 1%iges horizontales Agarosegel in TBE-Puffer bei einer angelegten Spannung von 80 V aufgetrennt. Für den Nachweis sehr kleiner Fragmente (< 700 Bp) wurde der Agarosegehalt der Gele in einigen Fällen auf 2 - 3% erhöht. Die Agarose wurde mit 1,43 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Das Ausschneiden der DNA erfolgte unter dem UV-Licht einer Handlampe bei einer Wellenlänge von 330 nm. Für die Extraktion der DNA aus der Agarose wurde das *Qiaquick Gelextraction Kit* verwendet.

7 µl von der zu inserierenden DNA und 1 µl der Vektor-DNA wurden in einem Reaktionsvolumen von 10 - 20 µl mit 1 U der T4-Ligase eingesetzt. Die Ligation von kohäsiven DNA-Enden wurde über Nacht bei 4°C durchgeführt. Sollten nichtüberhängende DNA-Enden ligiert werden, enthielt der Ansatz zusätzlich 5% Polyethylenglykol, und die Inkubation erfolgte über Nacht bei RT. In einigen Fällen wurde anstelle des Vektors und der zu inserierenden DNA lediglich das linearisierte Plasmid (ca. 0,1 - 0,2 µg DNA) in die Ligation eingesetzt. Vor der Transformation in DH5α oder M15 Bakterien mußte die Ligase für 10 Minuten bei 65°C inaktiviert werden.

2.2.1.3 Klonierung der Auxilinfragmente

Die Klonierung der Auxilinfragmente Aux (547-715), Aux (715-902) und Aux (619-738) erfolgte unter Verwendung eines bereits in dem Vektor pGEX 4T-1 vorliegenden Konstrukts, das die cDNA für die Aminosäuren 547-910 von bovinem Auxilin enthielt. Diese Fragmente wurden wiederum für die Herstellung der Auxilinkonstrukte Aux (547-618), Aux (715-776) und Aux (778-902) herangezogen. Als Expressionsvektoren dienten pET32a-b oder pQE30-31. In Tabelle 1 sind die DNA-Konstrukte von Auxilin und die Vektoren für die Klonierung als Übersicht zusammengefaßt.

Die DNA für das N-terminale Auxilinfragment Aux (547-715) wurde mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *Ava*I und *Nco*I gewonnen und nach dem Auffüllen der 5'-überhängenden Enden von beiden Schnittstellen durch das Klenow-Fragment der Polymerase I in den mit *Eco*RV gespaltenen pET32a Vektor inseriert. Zur Isolierung eines DNA-Fragments, das im Auxilin für den Bereich von Aminosäure 547 bis 618 kodiert, wurde das Plasmid mit dem Auxilinkonstrukt Aux (547-715) zunächst mit *Sph*I verdaut. Die entstandenen 3'-DNA-Überhänge konnten durch die Mungobohnennuklease entfernt werden. Der *Nco*I-Verdau der DNA ermöglichte schließlich eine Ligation mit dem durch *Nco*I und *Eco*RV linearisierten Vektor pET32a.

Ein Fragment, das dem C-terminalen Bereich von Auxilin von Aminosäure 715 bis 902 entspricht, wurde durch den Restriktionsverdau der DNA mit *Nco*I und *Apo*I generiert. Als Vektor diente der mit *Nco*I und *Eco*RI geöffnete Expressionsvektor pET32a. Das Konstrukt wurde mit den Enzymen *Nco*I und *Sa*II aus diesem Vektor isoliert und in den mit *Bam*HI und *Sa*II geschnittenen pQE30 Vektor eingebaut. Die 5'-überhängenden DNA-Enden nach dem Verdau mit *Nco*I und *Bam*HI mußten durch die Klenow-Polymerase vor der Ligation aufgefüllt werden. Ein verkürztes C-terminales Fragment von Auxilin, das den Bereich von Aminosäure 778 bis 902 umfaßt, konnte aus der DNA-Sequenz von Aux (715-902) durch den Verdau mit *Pvu*II und *Eco*RI herausgeschnitten und in den mit *Eco*RV und *Eco*RI linearisierten Vektor pET32c kloniert werden. Zur Herstellung des Fragments Aux (715-776) wurde die Plasmid-DNA von Aux (715-902) mit den Restriktionsenzymen *Nco*I und *Pvu*II behandelt. Der für die Ligation verwendete Vektor pET32a mußte zunächst mit *Eco*RI verdaut und die komplementären Basen zu dem entstandenen überstehenden DNA-Stang durch die Klenow-Polymerase ergänzt werden. Als zweite Schnittstelle diente im Vektor ebenfalls die Erkennungssequenz von *Nco*I. Für das Auxilinkonstrukt Aux (715-813) wurde das in den pQE30 Vektor klonierte Fragment Aux (715-902) mit *Bam*HI geschnitten und religiert, was zu dem Verlust des für den Bereich 814-902 kodierenden Segments führte.

Die DNA für Aux (619-738) wurde nach dem Verdau von Aux (547-910) mit *Sph*I und der Zwischenklonierung in den Vektor pUC57 mit *Sa*II und *Hind*III aus diesem wieder herausgeschnitten und in die genauso behandelten Expressionsvektoren pET32b und pQE31 ligiert. Das Konstrukt in dem pQE31 Vektor wurde schließlich mit *Sa*II und *Stu*I geschnitten und die dabei entstandenen DNA-Enden des verkürzten Plas-

mids wieder ligiert, nachdem die Klenow-Polymerase die überstehenden Enden der *Sall*-Schnittstelle aufgefüllt hatte.

Die Auxilinfragmente Aux (547-590) und Aux (547-605) erhielten durch die Mutagenese von Stopkodons (s. 2.2.1.5) jeweils eine zusätzlich in die DNA integrierte Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *HpaI*. Die Schnittstellen für *NcoI* und *HpaI* wurden genutzt, um beide Fragmente in den durch *NcoI* und *EcoRV* geöffneten Vektor pET32a zu klonieren, dessen Leserahmen dadurch hinter der Insertion verschoben wurde. Die Konstrukte wurden daher anschließend mit *EcoRI* nur einfach geschnitten, mit MBN behandelt und wieder ligiert.

Tabelle 1: Übersicht zur Klonierung der verwendeten Auxilinfragmente

Fragment	Ausgangsplasmid	Schnittstellen	Zielvektor	Schnittstellen
Aux (547-715)	pGEX4T-1 mit Aux (547-910)	<i>AvaI</i> ² + <i>NcoI</i> ²	pET32a	<i>EcoRV</i>
Aux (547-590)	pET32a mit Aux (547-715)	<i>NcoI</i> + <i>HpaI</i>	pET32a	<i>NcoI</i> + <i>EcoRV</i>
	pET32a mit Aux (547-590)	<i>EcoRI</i> ³	religiert ¹	
Aux (547-605)	pET32a mit Aux (547-715)	<i>NcoI</i> + <i>HpaI</i>	pET32a	<i>NcoI</i> + <i>EcoRV</i>
	pET32a mit Aux (547-605)	<i>EcoRI</i> ³	religiert ¹	
Aux (547-618)	pET32a mit Aux (547-715)	<i>NcoI</i> + <i>SphI</i> ³	pET32a	<i>NcoI</i> + <i>EcoRV</i>
Aux (619-738)	pGEX4T-1 mit Aux (547-910)	<i>SphI</i>	pUC57	<i>SphI</i>
	pUC57 mit Aux (619-738)	<i>Sall</i> + <i>HindIII</i>	pET32b	<i>Sall</i> + <i>HindIII</i>
	pUC57 mit Aux (619-738)	<i>Sall</i> + <i>HindIII</i>	pQE31	<i>Sall</i> + <i>HindIII</i>
	pQE31 mit Aux (619-738)	<i>Sall</i> ² + <i>StuI</i>	religiert ¹	
Aux (715-902)	pGEX4T-1 mit Aux (547-910)	<i>NcoI</i> + <i>ApoI</i>	pET32a	<i>NcoI</i> + <i>EcoRI</i>
	pET32a mit Aux (715-902)	<i>NcoI</i> ² + <i>Sall</i>	pQE30	<i>BamHI</i> ² + <i>Sall</i>
Aux (715-776)	pET32a mit Aux (715-902)	<i>NcoI</i> + <i>PvuII</i>	pET32a	<i>NcoI</i> + <i>EcoRI</i> ²
Aux (715-813)	pQE30 mit Aux (715-902)	<i>BamHI</i>	pQE30	<i>BamHI</i>
Aux (778-902)	pET32a mit Aux (715-902)	<i>PvuII</i> + <i>EcoRI</i>	pET32a	<i>EcoRV</i> + <i>EcoRI</i>

¹ Religation des nach dem Restriktionsverdau linearisierten Auxilinkonstrukts

² 5'-DNA-Überhang wurde durch Klenow-Polymerase aufgefüllt

³ 3'-DNA-Überhang wurde durch MBN entfernt

2.2.1.4 Herstellung des polyhistidinmarkierten DPFADLG- Fusionsproteins

Für die Klonierung des DPFADLG-Fusionsproteins mußten erst die kodierenden bzw. nichtkodierenden einzelsträngigen Oligodesoxynukleotide zu einem DNA-Doppelstrang zusammengelagert werden.

Der 20 µl Reaktionsansatz enthielt jeweils 1,1 ng der beiden Oligodesoxynukleotide in dem Restriktionsenzym-puffer Y⁺ der Firma MBI Fermentas. Für die Paarung der DNA-Einzelstränge wurde ein Temperaturprofil gewählt, das mit der Denaturierung der DNA bei 95°C für zwei Minuten begann und anschließend für weitere fünf Minuten die berechnete Schmelztemperatur der DNA-Oligonukleotide von 75°C konstant hielt. Über einen Zeitraum von etwas mehr als zwei Stunden wurde der Ansatz mit einer Kühlrate von 0,01 °C/s auf 4°C abgekühlt.

Der Oligodesoxynukleotid-Doppelstrang wies die komplementären überhängenden 5'-Enden zu dem durch *Bam*HI und *Sa*II linearisierten pET32a Vektor auf. Der Vektor wurde nicht dephosphoryliert, da die zu inserierende DNA keine 5'-Phosphatenden aufwies. Für die Ligation wurden 10 µl des doppelsträngigen Oligodesoxynukleotids und 1 µl der Vektor-DNA in einem Gesamtvolumen von 15 µl eingesetzt. Der Ligationserfolg ließ sich durch den analytischen Restriktionsverdau mit *Hpa*I überprüfen.

2.2.1.5 Mutagenese potentieller Bindungsmotive von Auxilin

In der Aminosäuresequenz von Auxilin wurden die DPF-Motive durch APA und die DLL-Motive durch die Sequenz ALA ersetzt. Die Aminosäuren der putativen Motive ⁶³⁶WDW, ⁷²⁶NWQ, ⁷⁵³FS und ⁷⁶²ER wurden durch die entsprechende Anzahl an Alaninen ausgetauscht. Die für die DNA-Mutationen erforderlichen Primersequenzen sind unter 2.1.10 aufgeführt. Zur leichteren Identifizierung der erfolgten Mutationen wurden in die Basensequenzen, die verändert werden sollten, Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen integriert.

Die gerichtete Mutagenese wurde entsprechend des *Quik ChangeTM Site-Directed Mutagenesis* Protokolls der Firma *Stratagene* und unter Verwendung der mitgelieferten Reagenzien durchgeführt. Das Prinzip dieses Systems beruht auf der Replikation beider DNA-Stränge eines Plasmids durch die *Pfu*-Polymerase. Die Primer mit der gewünschten Mutation sind dabei zueinander komplementär. Sie bleiben an die DNA gebunden, so daß ein Einzelstrangbruch entsteht, der nach der Transformation

in XL1-Blue Bakterien geschlossen wird. Durch den Verdau mit *DpnI* wird selektiv die parentale DNA entfernt.

Von der Plasmid-DNA wurden 40 ng eingesetzt, was der empfohlenen Konzentration von 5-50 ng entsprach. Ein Übersichten der Reaktionsansätze mit Mineralöl war nicht erforderlich, weil der Deckel des verwendeten Thermocyclers beheizt werden konnte. Da mehr als eine Aminosäure ausgetauscht werden sollte, wurde die Zahl der Zyklen unter Berücksichtigung der Herstellerempfehlung auf 17 festgesetzt. Als Plasmide wurden Auxilinkonstrukte in den Vektoren GEX4T-1, pET32a-c und pQE30-31 benutzt. Die Zeit für die Replikation der DNA-Stränge richtete sich nach der Plasmidlänge (zwei Minuten / kBp) und betrug zwischen 12 und 14 Minuten.

Tabelle 2: Übersicht über die Auxilinf Fragmente, die für eine gezielte Mutagenese verwendet wurden. Die mutierten Reste und ihre Positionen in der Aminosäuresequenz sind angegeben.

Frag- mente	Mutationen										
	⁵⁹⁰ STOP	⁶⁰⁵ STOP	⁵⁷⁹ DPF	⁶⁰⁵ DPF	⁶⁴⁷ DPF	⁶³⁶ WDW	⁵⁹¹ DLL	⁷⁸¹ DLL	⁷²⁶ NWQ	⁷⁵³ FS	⁷⁶² ER
Aux (547-910)					+						
					+			+			
					+		+	+			
Aux (547-715)	+										
		+									
			+								
				+	+						
					+						
					+	+					
Aux (715-902)								+			
									+		
										+	
									+	+	
											+
Aux (619-738)					+						

2.2.1.6 Polymerase-Kettenreaktion

Die DNA für die Konstrukte Aux (547-715), Aux (547-715) Δ^{674} DPF und Aux (547-715) Δ^{605} DPF, Δ^{674} DPF wurde aus dem pET32a Vektor mit der entsprechenden Auxilinsequenz durch die PCR-Methode (PCR, *polymerase chain reaction*) amplifiziert. Die hierfür verwendeten Primer enthielten zur Ausgangs-DNA nicht komplementäre Restriktionsenzymststellen für *Bam*HI oder *Sac*I sowie drei zusätzliche Basen an den 5'-Enden der DNA und wurden jeweils in einer Konzentration von 0,8 μ M eingesetzt. Die PCR-Reaktion erfolgte mit 0,1 ng der Plasmid-DNA in dem magnesiumhaltigen *complete* Puffer von AGS. Die Endkonzentration der verwendeten dNTPs betrug 0,4 mM.

Nach einem fünfminütigen Denaturierungsschritt bei 95°C wurde zu dem 100 μ l Reaktionsansatz 1 μ l der thermostabilen *Taq*-DNA-Polymerase gegeben, was 2 U des Enzyms entsprach. Es folgten zunächst fünf Zyklen von jeweils 30 Sekunden bei 95°C und 54°C und einer Minute bei 72°C, dem Temperaturoptimum für die Aktivität der *Taq*-Polymerase. Erst nach den ersten Amplifikationsrunden bei 54°C konnte eine Hybridisierung der DNA über die gesamte Länge der Oligodesoxynukleotidsequenz erfolgen. Für die nächsten 25 Zyklen wurde daher die Anlagerungstemperatur der Primer von 54°C auf 66°C erhöht. Die gewählte Temperatur von 66°C lag 5°C unterhalb des mit dem Programm *CPrimer* berechneten Schmelzpunkts der DNA-Oligonukleotide. Der Deckel des verwendeten Geräts wurde während der gesamten PCR auf 98°C beheizt.

Für den Restriktionsverdau mit *Bam*HI und *Sac*I wurden 15 μ l der aufgereinigten PCR-Produkte eingesetzt. Mit den gleichen Enzymen wurden die für die Ligation verwendeten pQE31 Vektoren linearisiert. Die Aufreinigung und Ligation der PCR-Fragmente erfolgte wie unter 2.2.1.2 beschrieben.

Durch Sequenzierung der PCR-Produkte (*Comfort Read Service*, MWG Biotech) wurde festgestellt, daß die DNA von Aux (547-715) die Punktmutation T562A enthält.

2.2.1.7 Klonierung der Clathrinfragmente

Das Ausgangsplasmid für die Klonierung polyhistidinmarkierter Clathrinfragmente war der Vektor pBlueskript mit der inserierten cDNA der schweren Kette von humanem Clathrin. Durch den Restriktionsverdau mit *Msp*I wurde ein DNA-Konstrukt, das für die proximale Domäne und den C-Terminus der schweren Kette kodiert (AS

1073-1675), hergestellt und in den durch *EcoRV* linearisierten Expressionsvektor pET32a integriert.

In der Basensequenz der schweren Kette wird die distale Domäne (AS 438-1073) von einer *StuI*- und einer *BspMII*-Schnittstelle begrenzt. Da sich eine direkte Klonierung über diese beiden Schnittstellen als schwierig erwies, wurde zunächst ein Zwischenprodukt durch den Verdau mit *NcoI* und *BspMII* generiert, das die DNA sowohl für die terminale als auch für die distale Domäne enthielt. Die von *BspMII* erzeugten 5'-überhängenden DNA-Enden mußten durch das Klenow-Fragment der Polymerase I aufgefüllt werden. Als Vektor diente ebenfalls pET32a, der durch *NcoI* und *EcoRV* geöffnet wurde. Zur Gewinnung des entsprechenden Fragments der distalen Domäne wurde das Plasmid mit *NcoI* und *StuI* geschnitten, was zur Deletion des DNA-Segments für die terminale Domäne führte. Nach dem Auffüllen fehlender Basen durch die Klenow-Polymerase wurde das Plasmid religiert.

Ein Konstrukt, das die DNA für den C-terminalen Bereich der distalen Domäne und den Rest der schweren Kette umfaßt (AS 730-1675), konnte durch Verdau mit *DraI* und die Ligation mit dem von *EcoRV* geschnittenen pET32a Vektor hergestellt werden.

Tabelle 3: Übersicht zur Klonierung der verwendeten Clathrinfragmente

Fragment	Ausgangsplasmid	Schnittstellen	Zielvektor	Schnittstellen
Clathrin-TDD (1-1073)	pBS mit CHC	<i>NcoI</i> ¹ + <i>BspMII</i> ¹	pET32a	<i>EcoRV</i>
Clathrin-DD (438-1073)	pET32a mit TDD	<i>NcoI</i> ¹ + <i>StuI</i>	religiert ²	
Clathrin-D/2PD (730-1675)	pBS mit CHC	<i>DraI</i>	pET32a	<i>EcoRV</i>
Clathrin-PD (1073-1675)	pBS mit CHC	<i>MspI</i> ¹	pET32a	<i>EcoRV</i>

¹ 5'-DNA-Überhang wurde durch Klenow-Polymerase aufgefüllt

² Religation des nach dem Restriktionsverdau linearisierten Clathrinkonstrukts

2.2.1.8 Transformation in elektro- bzw. thermokompetente Bakterien

Die Transformation von Ligationsansätzen und von Plasmiden erfolgte in thermokompetente *E.coli* Bakterien. Der verwendete Bakterienstamm war für die Ligationsprodukte entweder DH5 α oder wie im Fall der Transformation von pQE-Vektoren der Stamm M15. Letzterer enthält das zusätzliche Plasmid pRep4, das eine effektive Unterdrückung der Hintergrundexpression sicherstellt. M15 diente auch als Expres-

sionsstamm für pQE-Vektorkonstrukte, während pET- und pGEX-Plasmide für die Proteinexpression in BL21 Bakterien transformiert wurden.

Die Bakterien wurden auf Eis aufgetaut, und 5 - 10 μl von den Ligationsansätzen wurden zu 90 μl der thermokompetenten Bakterien gegeben. Lag bereits ein zirkuläres Plasmid vor reichte 1 μl der DNA bei einer Konzentration von ca. 60 $\mu\text{g/ml}$. Der Ansatz wurde zur Bindung der DNA an die Bakterien zunächst für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte ein kurzer Hitzeschock für drei Minuten bei 42°C. Die auf Eis gestellten Proben wurden mit 500 μl ψ -*broth* Medium versetzt und zur Ausbildung einer Antibiotikaresistenz der Bakterien für 30 Minuten bei 37°C und 230 UpM in den Schüttelinkubator gestellt. Anschließend wurde die Bakteriensuspension in der Tischzentrifuge Typ 5410 für eine Minute bei höchster Umdrehungszahl (12.800 $\times g_{\text{max}}$) abzentrifugiert und der Überstand bis auf 50 μl abgenommen. Das Pellet wurde in dem restlichen Medium resuspendiert und die Bakterien auf einer LB-Agarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum zur Selektionierung auf das transformierte Plasmid ausgestrichen. Die verwendeten Vektoren pET32a-c, pQE30-31 und pGEX4T1-3 enthalten das β -Laktamasegen, das eine Resistenz gegenüber Ampicillin verleiht. Das pRep4 Plasmid der M15 Bakterien trägt zudem ein Kanamycinresistenzgen, wodurch eine Vermehrung der transformierten Bakterien im kanamycin- und ampicillinhaltigen Medium bei einer Kanamycinkonzentration von 25 $\mu\text{g/ml}$ möglich war. Die eingesetzte Konzentration von Ampicillin betrug bei DH5 α - und M15-Bakterien 100 $\mu\text{g/ml}$ und bei BL21-Bakterien 50 $\mu\text{g/ml}$.

Bei einer schwachen Transformationseffizienz konnte das Ergebnis durch Elektroporation verbessert werden. Hierfür wurden 1 μl des Ligationsansatzes und 40 μl der elektrokompetenten Bakterien für eine Minute zunächst auf Eis inkubiert und dann in eine vorgekühlte 0,2 cm Elektroporationsküvette pipettiert. Das gewählte Programm für die Elektroporation war EC2. Nach dem Pulse erfolgte die direkte Zugabe von 1 ml kaltem SOC-Medium zum Transformationsansatz. Die Bakteriensuspension wurde danach in einem 15 ml Reaktionsgefäß für eine Stunde bei 37°C und 230 Upm geschüttelt. Das Ausplattieren der Bakterien entsprach dem Protokoll nach der Thermotransformation.

2.2.2 Methoden zur Analyse von Proteinen

2.2.2.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteingemische konnten gelelektrophoretisch aufgetrennt und ihre Zusammensetzung durch Anfärbung der Proteinbanden analysiert werden. Hierzu wurden 0,8 mm SDS-Polyacrylamidgele (6,5 cm x 9 cm) mit einem linear ansteigenden 9 - 19%igen Acrylamid- und 0,09 - 0,38%igen N,N-Methylenbisacrylamidgradienten und einer Trennstrecke von 5,5 cm verwendet. Das Pufferreservoir der Elektrophoresekammer wurde mit Laufpuffer aufgefüllt. Als Molekulargewichtsstandard dienten 10 µl eines Proteingemisches aus Carbanhydrase (29 kDa), Ovalbumin (45 kDa), BSA (66 kDa), Phosphorylase b aus Kaninchen (96 kDa) und β-Galaktosidase (116 kDa). Die zu analysierenden Proben wurden mit einem Drittel Volumen an vierfach Probenpuffer vermischt, für 2 Minuten bei 95°C in einem Heizblock aufgeköcht und das gebildete Kondensat für eine Minute in der Tischzentrifuge abzentrifugiert. Mit einer 25 µl Hamiltonspritze wurden 10 - 15 µl der Proben in die Taschen des Gels aufgetragen. Bis zum Eintritt der Proteine ins Trenngel wurde für 20 Minuten eine Spannung von 80 V angelegt, die danach unter Wasserkühlung auf 200 V für eine Stunde erhöht werden konnte. Die Anfärbung der im Gel aufgetrennten Proteine erfolgte für mindestens eine Stunde in Coomassiefärbelösung. Überschüssiger Farbstoff wurde aus dem Gel bei RT mit Entfärberlösung und einem Tuch Zellstoff abgezogen.

2.2.2.2 Westernblot

Alternativ zu der Coomassiefärbung sämtlicher Proteinbanden im Gel konnten auch einzelne Proteine nach dem Transfer auf Nitrozellulose immunmarkiert werden. Bei dem angewandten halbtrockenen Westernblotverfahren lagen das Gel und die Nitrozellulosemembran zwischen jeweils sechs Lagen mit Transferpuffer getränkter Filterpapiere. Die zwischen den beiden Graphitelektroden angelegte Stromstärke berechnete sich nach der Transferfläche mit $0,8 \text{ mA/cm}^2$. Der Blot wurde anschließend kurz in Ponceau S Färbelösung geschwenkt und mit Wasser wieder so weit entfärbt, daß die Banden des Molekulargewichtsstandards und die Laufspuren markiert werden konnten. Das vollständige Entfärben erfolgte in PBS. Unspezifische Bindungsstellen auf der Nitrozellulosemembran wurden für 30 Minuten mit Blockierlösung abgesättigt. Anschließend wurde der Blot jeweils für eine Stunde mit einer Verdünnung des primären Antikörpers in PBS mit 3% BSA und des sekundären Antikörpers in Blockier-

lösung inkubiert. Die Antikörperkonzentrationen entsprachen dabei den Herstellerangaben. Während die Verdünnung von polyklonalen Seren empirisch ermittelt wurde, betrug die Konzentration von nichtkommerziellen monoklonalen Antikörpern ca. 2 µg/ml. Die einzelnen Inkubationsschritte erfolgten bei RT auf einem Wippinkubator und wurden durch das Waschen des Blots mit PBS beendet. Als Alternative zu den Antikörperinkubationen wurden TrxH₆-Fusionsproteine in TBST-Puffer direkt von Protein S-HRP gebunden. Da auch der sekundäre Antikörper mit Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert ist, konnten die Proteine nach Zugabe der HRP-Substratlösung durch Chemolumineszenz detektiert werden. Als Reagenz diente *Renaissance Enhanced Luminol* der Firma Nalgene. Die Belichtungszeiten der Hyperfilm ECL Filme richteten sich nach den jeweiligen Signalstärken. Für die Filmentwicklung wurde die auf 31°C beheizte Entwicklermaschine verwendet.

2.2.2.3 Densitometrische Auswertung

Die coomassiegefärbten SDS-Polyacrylamidgele und die belichteten Filme wurden mit einem Agfa Duoscan Scanner und dem Programm Adobe Photoshop digitalisiert und nach der Umwandlung in ein TIFF-Dateiformat mit dem Programm NIH-Image densitometrisch ausgewertet.

2.2.3 Proteinaufreinigung

2.2.3.1 Expression und Isolierung der Fusionsproteine in *E.coli*

Die Expression der GST- Fusionsproteine erfolgte in BL21 Bakterien. Der gleiche Stamm wurde auch bei Plasmiden, die sich von den Vektoren pET32a-c ableiteten, verwendet. Die H₆-Fusionsproteine ohne den Thioredoxinanteil wurden in M15 Bakterien exprimiert.

Bevor die Bakterien im präparativen Maßstab kultiviert wurden, war es sinnvoll, die Expression der Fusionsproteine zunächst in einer 2 ml Kultur zu überprüfen. Hierzu wurde ein Bakterienklon, der das gewünschte Plasmid enthielt, in einer 1:100 Verdünnung in LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum (50 µg/ml Ampicillin bei BL21 Bakterien bzw. 100 µg/ml Ampicillin und 25 µg/ml Kanamycin bei M15 Bakterien) für drei Stunden bei 37°C im Schüttelinkubator vermehrt. Durch Zugabe von 0,5 mM bzw. 1 mM IPTG bei M15 Bakterien konnte die Proteinexpression indu-

ziert werden. Es folgte für drei Stunden eine Inkubation unter Schütteln bei RT. Von der Bakteriensuspension wurden 800 µl abgenommen und in der Tischzentrifuge Typ 5410 für 1 Minute bei maximaler Drehzahl ($12.800 \times g_{\max}$) abzentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal in 1 ml PBS gewaschen und nach der letzten Zentrifugation in 90 µl 0,5 M Tris-HCl (pH 8,0) resuspendiert. Die Lyse der Zellen erfolgte durch Zugabe von 10 µl 10%iger SDS-Lösung und 35 µl des vierfachen SDS-Probenpuffers. Die Bakterien wurden schließlich im Heizblock bei 95°C für 3 Minuten aufgekocht und die Expression der Fusionsproteine nach der Proteinauftrennung in einem SDS-Polyacrylamidgel über einen Westernblot analysiert (s. Abschnitte 2.2.2.1 und 2.2.2.2).

Für die Herstellung einer 1 l Bakterienkultur wurde die entsprechende Menge Medium mit einer 10 ml Übernachtskultur einer 1:1000 Verdünnung der Bakterien und dem jeweiligen Antibiotikum versetzt. Die Bakterien wurden unter den gleichen Bedingungen wie bei der Testinduktion inkubiert und anschließend im Rotor JA-10 bei 6000 UpM ($6.400 \times g_{\max}$) für 15 Minuten abzentrifugiert. Zum Resuspendieren diente kaltes PBS. Nach einem zweiten Zentrifugationsschritt und der Wiederaufnahme der Bakterien in PBS wurde die Suspension in ein 50 ml Kunststoffreaktionsgefäß überführt und bei maximaler Umdrehungszahl ($3.350 \times g_{\max}$) in der Megafuge 1.0R sedimentiert. Das so gewonnene Bakterienpellet konnte in einem Gemisch aus Methanol und Trockeneis schockgefroren und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80°C gelagert werden.

Die meisten H₆- und die TrxH₆- Fusionsproteine ließen sich nativ aufreinigen. Hierzu mußte das gefrorene Pellet einer 1 l Bakterienkultur zunächst in 10 ml Imidazol-Lysispuffer, der 1% des Detergenz Triton X-100 und eine Mischung von Proteaseinhibitoren enthielt, resuspendiert werden. Ein vollständiger Zellaufschluß der auf Eis gehaltenen Bakterien erfolgte durch die Behandlung mit mindestens vier Ultraschallimpulsen von 50 Watt für je 10 Sekunden. Die Zahl der Impulse richtete sich dabei nach der Viskosität der Suspension. Die partikularen Bestandteile des Bakterienlysats konnten anschließend im Rotor 70Ti bei 40.000 UpM ($164.700 \times g_{\max}$) und 4°C für 15 Minuten pelletiert werden.

Der Überstand wurde in einem 15 ml Reaktionsgefäß mit 2 ml kompakter Ni-NTA-Agarose für eine Stunde bei 4°C in einem Rotator inkubiert. Anschließend wurde das mit dem Fusionsprotein beladene Trägermaterial in der Megafuge 1.0R insgesamt dreimal bei maximaler Umdrehungszahl abzentrifugiert und in 12 ml Imidazol-Waschpuffer wiederaufgenommen. Für den zweiten Waschschrift wurde die Ni-NTA-Agaro-

se zusätzlich mit 2 ml einer 10%igen Sucroslösung in Imidazol-Waschpuffer unterschichtet. Zur Elution der Fusionsproteine wurde die Trägermatrix in eine leere NAP-5 Säule überführt. Durch Zugabe des Imidazol-Elutionspuffers in 500 µl Schritten konnte das polyhistidinmarkierte Fusionsprotein in wenigen Fraktionen eluiert werden. Von den erhaltenen Fraktionen wurde jeweils 1 µl der Lösung auf einen Nitrozellulosestreifen aufgetragen und der Proteingehalt nach Färbung mit Ponceau S abgeschätzt. Die proteinreichsten Fraktionen wurden dann vereinigt und die Konzentration im Photometer bestimmt.

Die H₆-Auxilinfragmente Aux (547-715) Δ^{579} DPF und Aux (547-715) Δ^{591} DLL reicher-ten sich in den Bakterien als Aggregate in Einschlußkörpern an. Beide Fusionsproteine mußten daher unter denaturierenden Bedingungen aus den Pellets, die aus der ersten Zentrifugation der Bakterienlysate resultierten, aufgereinigt werden. Hierzu wurden die Pellets in Harnstoffpuffer (pH 8,0) resuspendiert und für eine Stunde bei RT rotiert. Es folgte eine Zentrifugation im Rotor 70Ti bei 40.000 UpM für 15 Minuten. Der Überstand wurde wie oben beschrieben mit Ni-NTA-Agarose inkubiert. Anschließend wurde das Trägermaterial in eine Kunststoffsäule übertragen und mit 20 ml 8 M Harnstoffpuffer (pH 6,5) gewaschen. Als Renaturierungspuffer diente 10 ml PBS mit 2 mM Mercaptoethanol. Vor dem Eluieren der Fusionsproteine wurden 10 ml Imidazol-Waschpuffer über die Säule gegeben. Die weiteren Schritte entsprachen der Aufreinigung unter nativen Bedingungen.

GST-Fusionsproteine ließen sich ebenfalls nichtdenaturierend aufarbeiten. Das Protokoll war abgesehen von den verwendeten Puffern und der Trägermatrix identisch mit dem für die polyhistidinmarkierten Fusionsproteine. Anstelle von imidazolhaltigen Puffern wurde PBS zum Lysieren der Bakterien und Waschen der verwendeten GSH-Sepharose 4B benutzt. Der Elutionspuffer enthielt 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) und 20 mM GSH.

2.2.3.2 Gelfiltration und Ionenaustauschchromatographie

NAP-5, NAP-10 und PD-10 Gelfiltrationssäulen fanden Verwendung, wenn die eluierten Fusionsproteine umgepuffert werden sollten. PD-10 Säulen boten sich auch in einigen Fällen für die quantitative Entfernung von störenden Salzen aus kleineren Probenvolumen als eine Alternative zur Dialyse an.

Zur weiteren Aufreinigung konnten die Fusionsproteine über eine Superdex 200 Säule gelfiltriert werden. Auf diese Weise ließen sich bakterielle Kontaminationen

oder Degradationsprodukte von den Fusionsproteinen abtrennen. Die Auftrennung von Proteingemischen erfolgte dabei ausschlußchromatographisch nach der Molekülgröße, die sich wiederum aus dem hydrodynamischen Radius der Proteine ergab. Die verwendeten Säulen waren Bestandteil eines computergesteuerten FPLC-Systems. Vor einem Gelfiltrationslauf mußte sowohl die Pumpenanlage gewaschen als auch das Säulenmaterial mit 50 ml des Laufpuffers äquilibriert werden. Als Puffer diente Golgibindungspuffer (GBP), der zur Konservierung der Gelfiltrationssäule sterilfiltriert und mit 0,02% Azid versetzt wurde. Die Probe wurde vor der Auftragung für 1 Minute bei maximaler Umdrehungszahl in der Tischzentrifuge zur Entfernung möglicher Proteinaggregate abzentrifugiert. Mit einer Insulinspritze konnten 250 - 500 µl der Proteinlösung über eine entsprechende Probenschleife injiziert werden. Die Auftrennung erfolgte mit 25 ml Puffer in 500 µl Fraktionen, die nach den ersten 6 ml gesammelt wurden.

Bei der Ionenaustauschchromatographie konkurrieren die Proteine aufgrund ihrer geladenen Aminosäurereste mit den Ionen des Puffers um die geladenen Positionen auf der Trägermatrix und können mit ansteigender Salzkonzentration eluiert werden. Zur Probenaufbereitung der Auxilinfragmente H₆-Aux (547-715), H₆-Aux (715-813) und H₆-Aux (715-902) für die CD-spektroskopische Strukturanalyse diente eine MonoQ-Säule als Anionenaustauschermatrix. Während die Auxilinfragmente nicht von dem Trägermaterial gebunden wurden, konnten mit dieser Methode sehr effektiv die Verunreinigungen abgetrennt werden. Die Säule wurde dazu mit 5 ml 25 mM Tris-HCl (pH 8,0) und 1 M NaCl gewaschen und mit 25 ml 25 mM Tris-HCl äquilibriert. Säulenauftragspuffer für die Proteine war ebenfalls 25 mM Tris-HCl. Die in 500 µl Fraktionen eluierten Proben konnten anschließend wie in Abschnitt 2.2.2.1 beschrieben in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und analysiert werden.

2.2.3.3 Thrombinverdau von GST-Fusionsproteinen

Zur Vermeidung einer GST-abhängigen Dimerisierung der Fusionsproteine wurde der GST-Anteil der Fusionsproteine durch den proteolytischen Verdau mit Thrombin entfernt. Hierzu konnte eine von den pGEX4T1-3 Vektoren kodierte Thrombinschnittstelle C-terminal zum GST genutzt werden. Die Konzentrationen der GST-Fusionsproteine und des Enzyms im Reaktionsansatz sind in Tabelle 4 angegeben.

Tabelle 4: Thrombinverdaubedingungen für die verwendeten GST-Fusionsproteine

Fusionsprotein	Konzentration	Thrombin-konzentration
GST-Aux (547-910)	3,5 mg/ml	5 U/ml
GST-Aux (547-910) Δ^{674} DPF	2,2 mg/ml	8 U/ml
GST-Aux (547-910) Δ^{674} DPF, Δ^{781} DLL	4,2 mg/ml	8 U/ml
GST-Aux (547-910) Δ^{591} DLL, Δ^{674} DPF, Δ^{781} DLL	3,5 mg/ml	5 U/ml
GST- α -Ohrdomäne	3,1 mg/ml	8 U/ml
GST-TD	1,9 mg/ml	6 U/ml

Der Verdau erfolgte für 16 Stunden bei 16°C in Thrombinpuffer und wurde durch Zugabe von 1 mM PMSF beendet.

Freigesetztes GST und unverdaute Fusionsproteine ließen sich durch die Inkubation mit GSH-Sepharose für 30 Minuten bei 4°C unter Rotieren abtrennen. Die Menge des verwendeten Trägermaterials richtete sich dabei nach der Konzentration des in den Thrombinverdau eingesetzten Fusionsproteins (1 ml GSH-Sepharose / 5 mg Fusionsprotein) und wurde in einem leichten Überschuß berechnet. Eine sich anschließende Gelfiltration über die Superdex 200 Säule diente der Proteinaufreinigung nach dem Verdau und insbesondere der Entfernung des Thrombins. Gleichzeitig konnte so der Thrombinpuffer durch GBP ersetzt werden.

2.2.3.4 Aufreinigung von Hsc70

Die Aufreinigung von Hsc70 erfolgte angelehnt an das Protokoll von Schlossman *et al.* (1984) aus bei -80°C tiefgefrorenen Schweinehirnen, die zuerst im Wasserbad bei 37°C mit PBS gewaschen und aufgetaut werden mußten. Unter Eiskühlung wurde das grob zerkleinerte Gewebe mit einem Küchenmixer mit 1 ml Puffer H / mg Gewebe homogenisiert. Als Proteaseinhibitor diente 0,1 mM PMSF. Das Homogenat wurde zunächst für 50 Minuten im Rotor JA-10 bei 7.000 UpM (8.700 x g_{max}) abzentrifugiert. Es folgte eine Zentrifugation des Überstand im Rotor 45Ti bei 40.000 UpM (186.000 x g_{max}) für eine Stunde. Der so gewonnene Überstand wurde für zwei Stunden gegen 2 l und anschließend über Nacht gegen 5 l Puffer D bei 4°C dialysiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 40.000 UpM im Rotor 45Ti für 45 Minuten wurde das Zytosol über eine Anionenaustauschchromatografie weiter aufgereinigt. DEAE Cellulose, die zuvor in 0,8 M Imidazol (pH 7,0) äquilibriert und danach in

Puffer D aufgeschwemmt wurde, diente als Trägermatrix der verwendeten DE 52 Säule. Das Waschen der Säule erfolgte mit 1 l Puffer D und 50 mM KCl bei einer Fließgeschwindigkeit von 230 ml / Stunde. Danach wurde bei einer höheren Salzkonzentration von 150 mM KCl in Puffer D eluiert. Die proteinreichen Fraktionen des Eluats wurden vereinigt und über Nacht bei 4°C gegen 2 l Puffer B dialysiert. Der Dialyse folgte eine Zentrifugation in der Megafuge 1.0R für fünf Minuten bei 4.000 UpM ($3.350 \times g_{\max}$). Alle beschriebenen Zentrifugationsschritte wurden bei 4°C durchgeführt. Durch Bindung an ATP-Agarose (3,1 μ M ATP / ml Gel) konnten spezifisch ATPasen wie Hsc70 affinitätschromatographisch von anderen zytosolischen Proteinen abgetrennt werden. Das Trägermaterial wurde in Puffer B äquilibriert und für zwei Stunden bei 4°C mit dem Zentrifugationsüberstand inkubiert. Zum Waschen wurden abwechselnd Puffer B und Puffer B mit 1 M KCl anstelle von 25 mM KCl eingesetzt. Durch die Inkubation in Puffer B mit zunächst 1 mM ATP für 30 Minuten und dann mit 5 mM ATP über Nacht konnten die gebundenen Proteine von der Säule eluiert werden. Die aufgefangenen Fraktionen wurden mit Hilfe einer Centriprep 30-Vorrichtung konzentriert und zur Isolierung von Hsc70 über eine Superose 12 Säule gelfiltriert.

2.2.3.5 Clathrinaufreinigung aus CCV

Freie Clathrintriskelia ließen sich durch die Dissoziation der Proteinhülle aus Schweinehirn präparierter CCV in 0,5 M Tris-HCl (pH 7,0) isolieren. Zu diesem Zweck wurden 1,25 ml der clathrinbedeckten Vesikel mit 250 μ l 3 M Tris-HCl (pH 7,0) vermischt, für 10 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend im Rotor TLA100.4 für 20 Minuten bei 70.000 UpM ($266.200 \times g_{\max}$) und 4°C abzentrifugiert. Der klare Überstand wurde abgenommen und das größtenteils aus den Vesikelmembranen bestehende Pellet erneut mit 0,5 M Tris-HCl (pH 7,0) und 1 mM EDTA extrahiert. Nach einer zweiten Zentrifugation und der Vereinigung beider Überstände konnte Clathrin von den anderen Komponenten der Proteinhülle durch Gelfiltration über eine präparative Superose 6 Säule getrennt werden. Der Säulenlauf erfolgte in 0,5 M Tris-HCl (pH 7,0). Die Proteinzusammensetzung der eluierten 1 ml Fraktionen wurde in einem SDS-Polyacrylamidgel wie im Abschnitt 2.2.2.1 beschrieben analysiert.

Clathrinfraktionen, die nicht durch Adaptorproteine oder andere akzessorische Proteine wie AP180 verunreinigt waren, wurden mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung und 2 mM EDTA (pH 7,0) versetzt und über Nacht auf Eis gestellt. Es folgte die Zen-

trifugation der gefällten Proteine im SW-28 Ausschwingrotor für 20 Minuten bei 4°C und 20.000 UpM ($72.100 \times g_{\max}$). Das Pellet wurde in 700 µl 0,5 M Tris-HCl resuspendiert und für 10 Stunden gegen den gleichen Puffer dialysiert, um eventuell noch vorhandene Clathrinkäfige zu dissoziieren. Proteinaggregate ließen sich durch eine kurze Zentrifugation bei höchster Drehzahl ($25.000 \times g_{\max}$) in der Kühlzentrifuge (Rotor FA45-24-11) entfernen. Es folgte die Dialyse der Probe über Nacht gegen Puffer A und 2 mM CaCl₂, wodurch die Polymerisation des Clathrins zu Käfigen induziert werden konnte. Die gebildeten Käfige wurden durch die Zentrifugation im Rotor TLA45 für 20 Minuten bei 45.000 UpM ($125.900 \times g_{\max}$) von nicht zusammengelagerten Clathrintriskelia abgetrennt. Zum Resuspendieren der pelletierten Clathrinkäfige diente Puffer A mit 2 mM CaCl₂. In dieser Form konnte das Clathrin auf Eis für einige Wochen gelagert werden. Bei Bedarf von freien Triskelia ließen sich die Clathrinkäfige durch Zugabe von 0,5 M Tris-HCl (pH 7,0) wieder dissoziieren.

2.2.3.6 Trypsinverdau von Clathrinkäfigen

Durch einen limitierten Trypsinverdau konnten selektiv die terminalen Domänen von Clathrinkäfigen entfernt werden. Um die Konzentration des in Käfigen vorliegenden Clathrins zu ermitteln, wurden die Clathrinkäfige bei 45.000 UpM ($125.900 \times g_{\max}$) in dem TLA45 Rotor bei 4°C für 30 Minuten abzentrifugiert und in einem definierten Volumen an Puffer A mit 2 mM CaCl₂ wieder aufgenommen. In einer 1:20 Verdünnung in 0,5 M Tris-HCl (pH 7,0) konnte die Clathrinkonzentration der Probe absorptionsphotometrisch bestimmt werden. Der Extinktionskoeffizient wurde mit dem Programm Protean anhand der Aminosäuresequenz berechnet.

Die Käfige mit 1,5 mg/ml Clathrin wurden zunächst in Puffer A und 0,2 mg/ml Trypsin für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Der Verdau wurde für 50 Minuten bei 10°C mit einer Endkonzentration von 0,5 mg/ml Trypsin in einem Gesamtvolumen von 515 µl fortgesetzt. Nach der Trypsinzugabe betrug die Calciumkonzentration in dem Reaktionspuffer 1 mM. Das Enzym wurde anschließend mit 1,3 mg Sojabohneninhibitor / mg Trypsin inaktiviert. Es folgte eine Zentrifugation bei 45.000 UpM im TLA45 Rotor für 30 Minuten. Das Pellet wurde in 600 µl Puffer A mit 2 mM CaCl₂ resuspendiert, mit Inhibitor in einer Endkonzentration von 0,2 mg/ml versetzt und erneut zentrifugiert. Auf diese Weise konnte der größte Teil des Trypsins abgetrennt werden. Die pelletierten, trypsinverdauten Clathrinkäfige wurden in 90 µl GBP aufgenommen und nach der Konzentrationsbestimmung mit 0,2 mg/ml Inhibitor in die Experimente eingesetzt.

2.2.3.7 Trypsinverdau von CCV

Um die Aktivität von Hsc70 und der rekombinant exprimierten Auxilinfragmente bei der Dissoziation der Proteinhülle von clathrinbedeckten Vesikeln zu untersuchen, mußte zunächst das in CCV enthaltene endogene Auxilin quantitativ entfernt werden. Um dies zu erreichen, wurde die bereits in der Literatur beschriebene Proteasesensitivität von Auxilin ausgenutzt (Ahle und Ungewickell, 1990). Da gleichzeitig die Zusammensetzung der CCV insgesamt möglichst wenig verändert werden sollte, wurden diese sehr schwach mit 2 µg/ml Trypsin verdaut. Die Integrität der wichtigsten Komponenten der Proteinhülle von clathrinbedeckten Vesikeln wurde mittels Westernblotanalyse sichergestellt. Lediglich die α -Untereinheit von AP-2 reagierte ebenfalls relativ empfindlich auf das zugegebene Trypsin. Die Verdaubedingungen wurde daher so optimiert, daß Auxilin vollständig inaktiviert und etwa 20% des α -Adaptins in den CCV nicht angegriffen wurden.

In einem 500 µl Reaktionsansatz in PBS wurden 20 µl der CCV-Präparation für 30 Minuten mit Trypsin auf Eis inkubiert. Zur Inaktivierung des Enzyms dienten 20 µg/ml Sojabohneninhibitor. Die CCV wurden nach dem Verdau für 30 Minuten im Rotor TLA45 bei 4°C und 45.000 UpM ($125.900 \times g_{\max}$) abzentrifugiert, das Pellet in 500 µl PBS und 20 µg/ml Inhibitor wieder aufgenommen und nach einem zweiten Zentrifugationsschritt schließlich in 200 µl GBP und 5 µg/ml des Trypsininhibitors resuspendiert.

2.2.4 Biophysikalische Strukturanalysen

2.2.4.1 Analytische Ultrazentrifugation

In Kooperation mit Prof. Claus Urbanke der Abteilung für Biophysikalische Chemie, Medizinische Hochschule Hannover, wurde das Auxilinfragment TrxH₆-Aux (547-715) mittels analytischer Ultrazentrifugation untersucht. Dabei diente ein Sedimentationsgleichgewichtsexperiment, das in der Beckman XL-A analytischen Ultrazentrifuge (Rotor AN50) bei 23.000 UpM und 4°C für 56 Stunden durchgeführt wurde, zur Bestimmung des Molekulargewichts. In Gegenwart von 6 M Guanidiniumhydrochlorid wurde der Ultrazentrifugationslauf wiederholt. Die Messung erfolgte in GBP mit 0,3 bzw. 0,15 mg/ml des durch eine Superdex 200 Gelfiltration aufgereinigten Proteins. Die Daten wurden ausgewertet mit Hilfe des Akkuprog-Programmpakets.

2.2.4.2 Hitzestabilität von Auxilinfragmenten

Die Empfindlichkeit der rekombinant exprimierten Auxilinfragmente GST-Aux (547-910), H₆-Aux (547-715), H₆-Aux (715-902) und H₆-Aux (715-813) gegenüber einer irreversiblen Denaturierung konnte durch die Inkubation für 5 Minuten in einem kochenden Wasserbad getestet werden. Von den Proteinen, die in PBS vorlagen, wurden 0,1 mg/ml und von der GST-Kontrolle 0,5 mg/ml in das Experiment eingesetzt. Zur schnellen Abkühlung der Proben diente eine Kältemischung aus NaCl und Eiswasser mit einer Temperatur von ca. -10°C, in der sie für 5 Minuten geschwenkt wurden. Proteinaggregate konnten bei 45.000 UpM (125.900 x g_{max}) in dem TLA45 Rotor für 10 Minuten abzentrifugiert werden.

2.2.4.3 CD-Spektroskopie

Die Sekundärstrukturanteile in den Auxilinfragmenten H₆-Aux (547-715), H₆-Aux (715-813) und H₆-Aux (715-902) wurden in Kooperation mit Prof. Jürgen Alves der Abteilung für Biophysikalische Chemie, Medizinische Hochschule Hannover, CD-spektroskopisch im Wellenlängenbereich von 200 - 250 nm ermittelt. Die über eine MonoQ-Säule hochaufgereinigten Proben wurden in PBS überführt und in einer Konzentration von 0,5 - 0,9 mg/ml im Jobin Yvon Dichrograph III untersucht. Bei Zugabe von 50% (v/v) Trifluorethanol (TFE) betrug die Endkonzentration der Fusionsproteine 0,25 mg/ml. Die terminale Domäne von Clathrin wurde nach der Abtrennung des GST-Fusionsanteils (s. 2.2.3.3) im äquimolaren Verhältnis zu den Auxilinfragmenten bei einer Gesamteinkonzentration von 1,3 mg/ml eingesetzt. Die Messung erfolgte mit einer Bandbreite von 2 nm, einer Zeitkonstante von 2 Sekunden und einer Meßrate von 2 nm/s. Für die Auswertung der Daten wurde das Programm CDPro verwendet.

2.2.5 Bindung von biotinylierten Interaktionspartnern an Auxilinpeptide

Die Biotinylierung von Clathrin-TD und der α -Ohrdomäne von AP-2 wurde von Frau Huberta Ungewickell entsprechend der Herstellervorschrift für EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin (Pierce Biotechnology) durchgeführt. Dabei wurden 37,5 μ g aktiviertes Biotin / mg Protein eingesetzt. Die Kopplung erfolgte für 30 Minuten bei 25°C. Anschließend wurde nicht gebundenes Reagenz durch Inkubation mit 0,5 M Tris-HCl für 15 Minuten auf Eis abgesättigt. Die Auxilinpeptide wurden *in situ* als 15-mere, die um

jeweils drei Aminosäuren gegeneinander versetzt waren, von Herrn Ronald Frank (AG Molecular Recognition, Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, Braunschweig) auf Zellulosemembran synthetisiert. Die Bindung an synthetische Auxilinpeptide wurde in 5 ml GBP mit 3% BSA und 1 µg/ml der biotinylierten Proteine für eine Stunde bei RT durchgeführt. Zum Waschen diente eiskalter GBP. Streptavidin, das mit Meerrettichperoxidase gekoppelt war, wurde nach Herstellerempfehlung verdünnt und für 30 Minuten mit den an die Membran gebundenen biotinylierten Interaktionspartnern inkubiert. Die Detektion erfolgte wie für Westernblots (Abschnitt 2.2.2.2) beschrieben über Chemolumineszenz.

2.2.6 Proteinbindungsexperimente und Funktionsanalysen

Von allen im folgenden beschriebenen Experimenten wurden unabhängige Mehrfachbestimmungen durchgeführt. Die Darstellungen in Form von Diagrammen beruhen auf den Mittelwerten aus diesen Messungen. Die Standardabweichungen wurden in Form von Fehlerbalken angegeben.

2.2.6.1 Bindungs- und Konkurrenzexperimente mit GST-Fusionsproteinen

Die Bindungsexperimente erfolgten mit GST-Fusionsproteinen, die an GSH-Sepharose gekoppelt waren. Die rekombinanten polyhistidinmarkierten Auxilinfragmente wurden mit GST-TD und der GST- α -Ohrdomäne inkubiert. GST-Auxilin (547-910) mußte zu diesem Zweck erst thrombinverdaut werden, um den GST-Fusionsanteil zu entfernen und eine mögliche Dimerisierung mit den GST-Fusionsproteinen der Trägermatrix auszuschließen. Das GST-Auxilinfragment (547-910) diente auch zur Bindung rekombinanter TrxH₆-Clathrinfragmente. Die Experimente wurden in GBP mit 2×10^{-10} mol der Proteine in einem Gesamtvolumen von 50 µl durchgeführt. Durch Zugabe von 0,1% Triton X-100 und 0,05% BSA sollten unspezifische Bindungsaffinitäten verringert werden. Wenn nicht anders angegeben enthielt der Reaktionsansatz 1 mM DTT. Die mit den GST-Fusionsproteinen beladene GSH-Sepharose wurde mit dem gleichen Volumen von Sepharose CL-4B verdünnt. Als Kontrolle diente an GSH-Sepharose immobilisiertes GST. Die Inkubation erfolgte für eine Stunde auf Eis unter mehrmaligem Aufschwemmen des Trägermaterials.

Bei Konkurrenzexperimenten wurde die GSH-Sepharose mit drei Volumina von Sepharose CL-4B vermischt. Zu $1,5 \times 10^{-10}$ mol der Auxilinfragmente H₆-Aux (547-715), H₆-Aux (619-738) oder TrxH₆-Aux (619-738) wurden für eine Konkurrenz jeweils die äquimolare Menge sowie ein zwei-, fünf- und zehnfacher molarer Über-

schuß eines Fragments von AP180 (H₆57), der distalen Domäne von Clathrin (TrxH₆-DD) bzw. der vom GST-Fusionsanteil befreiten Ohrdomäne von α -Adaptin dazugegeben. In den Ansätzen, die die distale Domäne enthielten, betrug das Reaktionsvolumen 140 μ l.

Die Sepharose wurde im A-8-11 Ausschwingrotor für 2 Minuten bei 10.500 UpM ($10.600 \times g_{\max}$) pelletiert und nach der Entfernung des Überstands zweimal mit je 500 μ l GBP gewaschen. Im ersten Waschschrift wurde die Probe zusätzlich mit 50 μ l 10%iger Sucroselösung in GBP unterschichtet. Der Probenüberstand nach der ersten Zentrifugation und die mit 50 μ l Wasser aufgenommene Trägermatrix wurden über einen Westernblot auf den an das GST-Fusionsprotein gebundenen Anteil der Auxilin- oder Clathrinfragmente hin untersucht.

2.2.6.2 Käfigbindungsexperimente

Für die Bindung von rekombinanten Auxilinfragmenten an rekonstituierte Clathrinkäfige wurden sowohl intakte als auch trypsinverdaute Käfige verwendet, deren Präparation wie in den Abschnitten 2.2.3.5 und 2.2.3.6 beschrieben erfolgte. Die Clathrin-konzentration betrug ca. 7×10^{-11} mol, was 0,3 mg/ml bzw. 0,2 mg/ml für Käfige ohne terminale Domänen entsprach. Von den Auxilinfragmenten wurden $1,4 \times 10^{-10}$ mol eingesetzt. Bei GST-Fusionsproteinen mußte vorher der GST-Anteil durch den Verdau mit Thrombin entfernt werden. Die Clathrinkäfige wurden zusammen mit den Auxilinfragmenten und 1 mM DTT in einem 50 μ l Ansatz in GBP für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Im Rotor TLA45 konnten die Käfige für 30 Minuten bei 45.000 UpM ($125.900 \times g_{\max}$) abzentrifugiert werden. Das Pellet wurde in 50 μ l 0,5 M Tris-HCl (pH 7,0) und Probenpuffer für 10 Minuten gevortext, um die Clathrinkäfige zu dissoziieren. Pellet und Überstand konnten anschließend in einem SDS-Polyacrylamidgel analysiert werden.

2.2.6.3 Experimente zum Zerfall von Clathrinkäfigen und der Hülle von CCV

Die Proteinhülle von clathrinbedeckten Vesikeln konnte in Gegenwart von $1,6 \times 10^{-10}$ mol Hsc70, einem ATP-regenerierenden System und verschiedenen Auxilinkonzentrationen dissoziiert werden. Der 50 μ l Reaktionsansatz in GBP enthielt 20 μ l von trypsinbehandelten CCV (s. Abschnitt 2.2.3.7) und die rekombinanten Auxilinfragmente in einer logarithmischen Verdünnungsreihe mit der Basis 2 ausgehend

von 273 nM. Die Fragmente lagen entweder als H₆-Fusionsproteine oder als thrombinverdaute, GST-freie Proteine vor. Hsc70 mußte zunächst mit dem Regenerationsmix für 20 Minuten auf Eis vorinkubiert werden. Nach Zugabe von 1 mM DTT, der Auxilinfragmente und der CCV fand eine Dissoziation der Proteinhülle der CCV für 15 Minuten bei 25°C statt. Zur Abtrennung der freigesetzten Clathrintriskelia von noch intakten CCV folgte eine Zentrifugation der Proben für 20 Minuten im TLA45 Rotor bei 4°C und 45.000 UpM (125.900 x g_{max}). Das Pellet wurde mit 50 µl 0,5 M Tris-HCl (pH 7,0) und Probenpuffer für 10 Minuten gevortext und mit dem mit Probenpuffer versetzten Überstand in einem SDS-Polyacrylamidgel verglichen.

Der Zerfall von Clathrinkäfigen und trypsinverdauten Clathrinkäfigen (s. Abschnitt 2.2.3.6) erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie die Dissoziation der Hülle von CCV. Die Clathrinkonzentration betrug 1,36 µM, während die Auxilinfragmente in einer Konzentration von 68 nM eingesetzt wurden.

2.2.6.4 Clathrinpolymerisationsexperimente

Die in Puffer A mit 2 mM CaCl₂ gelagerten Clathrinkäfige wurden in einer Konzentration von 2,3 mg/ml bei 45.000 UpM im TLA45 Rotor (125.900 x g_{max}) für 30 Minuten bei 4°C pelletiert, nach Zugabe von 150 µl 0,5 M Tris-HCl (pH 7,0) für eine Stunde auf Eis gestellt und dann resuspendiert. Zum Umpuffern der Clathrintriskelia in 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) diente eine NAP-5 Gelfiltrationssäule. Von den aufgefangenen 100 µl Fraktionen wurde jeweils 1 µl abgenommen und auf einen Nitrozellulosestreifen pipettiert. Nach der Färbung mit Ponceau S konnten die proteinreichen Fraktionen vereinigt und mit 1/9 Volumen an zehnfachem GBP (pH 7,4) versetzt werden. Es folgten für jeweils 30 Minuten eine Inkubation auf Eis und eine Zentrifugation im TLA45 Rotor bei 45.000 UpM. Freie Clathrintriskelia konnten auf diese Weise von spontan oder unter dem Einfluß nicht vollständig entfernter Adaptorproteine zusammengelagerten Clathrinkäfigen abgetrennt werden. Die Clathrinkonzentration im Überstand wurde absorptionsphotometrisch bestimmt und so eingestellt, daß sie 1,36 µM (0,3 mg/ml) in den Experimenten betrug.

Durch Zugabe des zweifachen molaren Überschusses an rekombinanten Auxilinfragmenten ($1,4 \times 10^{-10}$ mol) konnte die Clathrinpolymerisation in GBP induziert werden. Die Inkubation erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz in Gegenwart von 1 mM DTT für eine Stunde auf Eis. Die Proben wurden anschließend bei 45.000 UpM im TLA45 Rotor für 30 Minuten abzentrifugiert und die Pellets in 50 µl 0,5 M Tris-HCl

(pH 7,0) und Probenpuffer für 10 Minuten gevortext. Der Clathrinanteil in den Überstand- und Pelletfraktionen der verschiedenen Ansätze wurde nach der Auftrennung in einem SDS-Polyacrylamidgel densitometrisch bestimmt.

Zur Unterscheidung von pelletierten Käfigen und Clathrinaggregaten wurde ein 100 µl Ansatz vor der Zentrifugation halbiert und sowohl im SDS- Polyacrylamidgel als auch elektronenmikroskopisch untersucht. Für die Negativkontrastierung der Proben wurden die Pellets mit 50 µl Puffer A versetzt, über Nacht auf Eis gestellt und anschließend resuspendiert. Die Bindung der Proteine erfolgte für eine Minute bei RT an einen Kohlefilm, der hierzu von einem mit Kohle bedampften Glimmerstreifen abgelöst wurde. Mit Hilfe des Glimmers wurde der Kohlefilm von der Oberfläche der Proteinlösung in eine 1%ige Uranylacetatlösung übertragen und mit einem zuvor in Natriumethanolat und Wasser gewaschenen Kupfernetz wieder abgenommen. Überschüssiges Uranylacetat konnte von der Probe mit einem angefeuchteten Filterpapier abgezogen werden. Die getrockneten Präparate wurden im Elektronenmikroskop untersucht.

3 Ergebnisse

3.1 Interaktion von Auxilin und Clathrin

Auxilin wurde zunächst als ein Protein identifiziert, das die Zusammenlagerung von Clathrinkäfigen fördert (Ahle und Ungewickell, 1990), bevor die Interaktion mit Hsc70 entdeckt und die Funktion von Auxilin beim Zerfall der Hülle von clathrinbedeckten Vesikeln beschrieben wurde. Auxilin stimuliert nicht nur die Dissoziation von intakten Clathrinkäfigen durch Hsc70, sondern auch die von Käfigen, denen nach limitierter Proteolyse die terminalen Domänen sowie die leichten Ketten fehlen. Daher erscheint es naheliegend, daß der Bindungsort für Auxilin im Bereich der distalen oder proximalen Domäne der schweren Kette von Clathrin zu finden ist. Für andere akzessorische Proteine, die an der Bildung von clathrinbedeckten Vesikeln beteiligt sind und die Clathrinpolymerisation zu Käfigen begünstigen, konnte gezeigt werden, daß sie mit der terminalen Domäne von Clathrin interagieren. Aus diesem Grund war es interessant, eine mögliche Bindung von Auxilin an die verschiedenen Domänen der schweren Kette von Clathrin zu untersuchen.

Für Bindungsexperimente wurden rekombinant exprimierte Fragmente von Auxilin und Clathrin verwendet. Auxilin (AS 1-910) läßt sich nur sehr schlecht in Bakterien exprimieren, während ein verkürztes Fragment (AS 547-910), das nur aus der Clathrinbindungsdomäne und der J-Domäne besteht, gut rekombinant hergestellt werden kann. Da Auxilin (547-910) alle bislang bekannten Funktionen des vollständigen Proteins aufweist, wird es in der Regel für *in vitro* Studien an dessen Stelle eingesetzt (Holstein *et al.*, 1996). Dem Auxilinhomolog Swa2p in *Saccharomyces cerevisiae* fehlt eine der PTEN-ähnlichen Domäne entsprechende N-terminale Region, so daß es im Aufbau dem Fragment Auxilin (AS 547-910) gleicht (Gall *et al.*, 2000; Pishvae *et al.*, 2000). Diese Domäne scheint daher für die Funktion von Auxilin beim Zerfall von clathrinbedeckten Vesikeln nicht essentiell zu sein.

Von Clathrin wurden ebenfalls die verschiedenen Domänen der schweren Kette in *Escherichia coli* exprimiert. In der Literatur wurde bereits ein rekombinantes Protein der proximale Domäne (PD) beschrieben, das über den C-Terminus zu sogenannten *hubs* trimerisieren und ein flaches Clathringitter ausbilden konnte (Liu *et al.*, 1995). Die globuläre N-terminale Domäne kann zwar durch den proteolytischen Verdau von

Clathrinkäfigen gewonnen werden, sie läßt sich aber einfacher und in guter Ausbeute auch bakteriell exprimieren (Goodman *et al.*, 1997).

3.1.1 Auxilin- und Clathrinbindung an immobilisierte Fusionsproteine

In der Hülle von clathrinbedeckten Vesikeln sind jeweils drei terminale Domänen von verschiedenen Triskelia unterhalb der Ecken des Käfigs angeordnet und nach innen in Richtung der Adaptorproteine orientiert. Dadurch entsteht eine hohe lokale Konzentration an terminalen Domänen (TD), die für die Interaktion mit anderen Proteinen erforderlich zu sein scheint. Aus diesem Grund eignen sich für viele Bindungsstudien polymerisierte Clathrinkäfige besser als die freien Triskelia. Die Situation im Clathrinkäfig läßt sich gut mit immobilisierten GST-Fusionsproteinen der terminalen Domäne simulieren, die in hoher Dichte an der Oberfläche der GSH-Sepharose gebunden sind. Um neue Interaktionspartner der terminalen Domäne von Clathrin zu finden, werden daher häufig Bindungsexperimente mit GST-TD durchgeführt.

So konnte gezeigt werden, daß sich unter den Proteinen, die aus Schweinehirnzytosol von der terminalen Domäne gebundenen wurden, auch Auxilin befand (Scheele *et al.*, 2001). Das Experiment wurde mit rekombinant exprimiertem Auxilin (547-910) wiederholt, um eine indirekte, über ein weiteres Protein vermittelte Wechselwirkung auszuschließen. Auch unter diesen Bedingungen wurde eine Bindung von Auxilin (547-910) an GST-TD festgestellt (Abb. 6 A). Folglich besteht eine direkte Interaktion zwischen Auxilin und der terminalen Domäne von Clathrin. Dieses Ergebnis war zunächst überraschend, da es keine Erklärung für die Eigenschaft von Auxilin lieferte, zusammen mit Hsc70, Käfige auch ohne terminale Domänen zu dissoziieren. Neben dem Bindungsort für Auxilin auf der terminalen Domäne müßte es demnach einen weiteren auf der schweren Kette von Clathrin geben. Diese Annahme wurde in einem Bindungsexperiment mit GST-Auxilin (547-910) und rekombinanten polyhistidinmarkierten Clathrinfragmenten überprüft. Tatsächlich konnte so eine Interaktion dieser Fragmente, die der distalen Domäne (DD), der proximalen Domäne (PD) sowie einem Teil der distalen Domäne zusammen mit der proximalen Domäne (D/2PD) von Clathrin entsprachen, mit Auxilin bestätigt werden. Wie sich dabei herausstellte, schien dieser Auxilinbindungsort in erster Linie im Bereich der distalen Domäne zu liegen, da die proximale Domäne nur eine schwache Affinität für Auxilin aufwies (Abb. 6 B).

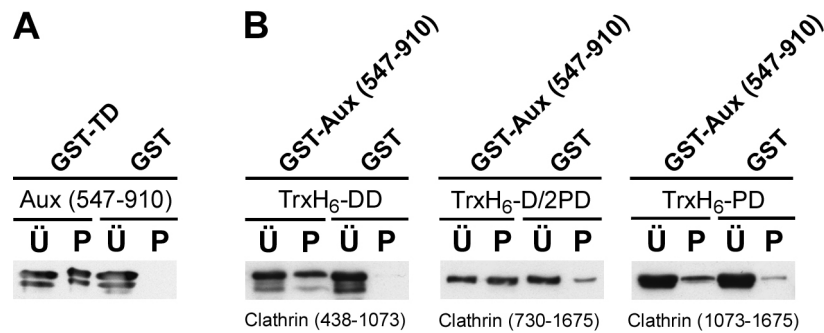


Abbildung 6: Bindung von Auxilin (547-910) an GST-TD (A) und von rekombinanten Clathrinfragmenten an GST-Auxilin (547-910) (B). Die GST-Fusionsproteine wurden an GSH-Sepharose immobilisiert und mit den potentiellen Bindungspartnern für eine Stunde auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Trägermatrix mit den gebundenen Proteinen abzentrifugiert und gewaschen. Aliquots der Überstände (Ü) und Pellets (P) des Experiments wurden durch SDS-PAGE und aufgetrennt und mittels Westernblot analysiert. Als Kontrolle wurde jeweils an GSH-Sepharose gebundenes GST verwendet. Eine direkte Interaktion von Auxilin mit Clathrin wurde sowohl über die terminale als auch über die distale Domäne von Clathrin vermittelt. Die Affinität von Auxilin zur proximalen Domäne war dagegen nur schwach ausgeprägt.

3.1.2 Bindung von rekombinanten Auxilinfragmenten an Clathrinkäfige

Nachdem die Bindungsorte von Auxilin auf der schweren Kette von Clathrin untersucht und eingegrenzt werden konnten, war es naheliegend, auch die Clathrinbindungsstelle von Auxilin zu identifizieren. Mit den beiden rekombinanten Fusionsproteinen TrxH₆-Aux (547-715) und TrxH₆-Aux (715-902) wurde jeweils ein Teil der Clathrinbindungsdomäne von Auxilin (547-910) exprimiert und die Bindung an Clathrin mit rekonstituierten Käfigen getestet. Durch limitierte Proteolyse mit Trypsin wurden von einem Teil der Clathrinkäfige die terminalen Domänen abgetrennt, die Struktur der Käfige aber nicht verändert. Gleichzeitig wurden durch den Verdau die leichten Ketten entfernt, was die Stabilität der Käfige erhöhte (Ungewickell *et al.*, 1995). Interessanterweise interagierten beide Auxilinfusionsproteine sowohl mit den intakten als auch mit den trypsinverdauten Clathrinkäfigen (Abb. 7). Obwohl in den Fragmenten jeweils eine Kopie des DLL-Tripeptids, das als Bindungsmotiv für die terminale Domäne diskutiert wird, enthalten war, unterschieden sie sich deutlich in ihren Clathrinbindungseigenschaften. Während das Fragment TrxH₆-Aux (547-715) eine höhere Affinität zu unverdauten Käfigen hatte, band das C-terminale Auxilinfragment (AS 715-902) kaum besser an die intakten als an die trypsinisierten Clathrinkäfige. Demzufolge scheint die Fähigkeit von TrxH₆-Aux (547-715), mit Clathrinkäfigen zu interagieren, in erster Linie auf der Bindung des Fragments an die terminalen Domänen zu beruhen.

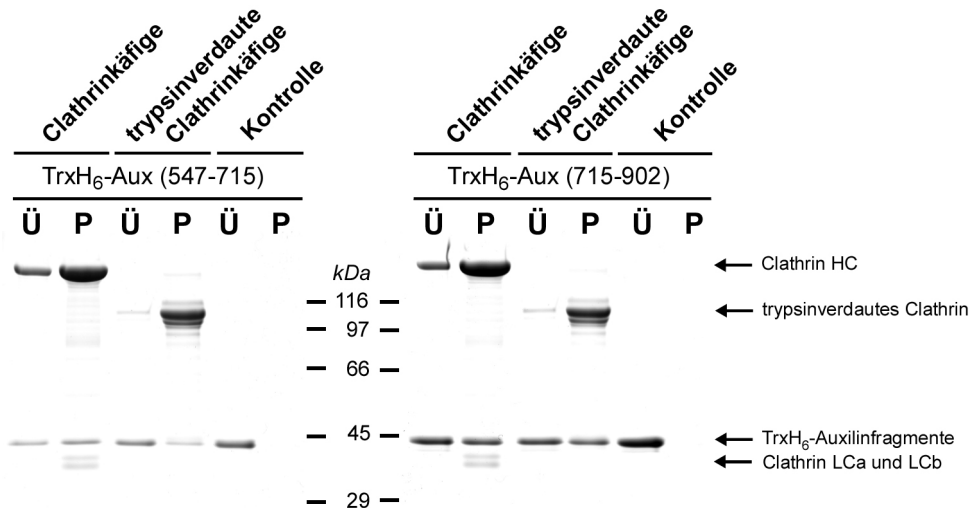


Abbildung 7: Bindung der Auxilinfragmente TrxH₆-Aux (547-715) und TrxH₆-Aux (715-902) an rekonstituierte Clathrinkäfige mit und ohne terminale Domänen. Die Käfige wurden bei 45.000 UpM für 20 Minuten abzentrifugiert. Überstand (Ü) und Pellet (P) wurden durch SDS-PAGE und Coomassiefärbung der Proteinbanden auf ihren Anteil an Auxilin hin untersucht. Als Kontrolle dienten die Auxilinfragmente im Reaktionspuffer ohne Zugabe von Clathrinkäfigen. Beide Fragmente interagierten sowohl mit den intakten als auch mit den trypsinverdauten Käfigen, denen die terminalen Domänen fehlten. Die Wechselwirkung von TrxH₆-Aux (715-902) mit Clathrin war weitestgehend unabhängig von dem Vorhandensein der terminalen Domänen, während die Affinität von TrxH₆-Aux (547-715) zu Käfigen eher durch die terminalen als durch die distalen Domänen vermittelt wurde.

3.2 Dimerisierung von rekombinanten Auxilinfragmenten

Bei der Aufreinigung des Auxilinfragments TrxH₆-Aux (547-715) fiel auf, daß das Protein in zwei Populationen mit Konzentrationsmaxima in den Fraktionen 12 und 15 von der Superdex 200 Gelfiltrationssäule eluiert wurde (Abb. 8).

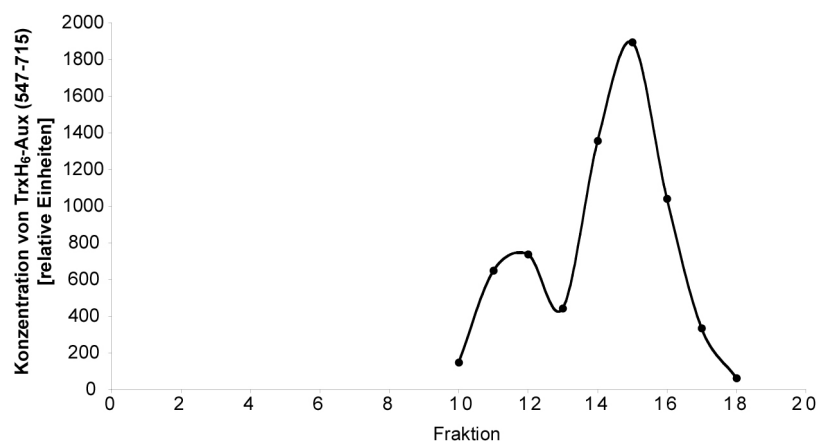


Abbildung 8: Elutionsprofil der Gelfiltration von TrxH₆-Aux (547-715) über eine Superdex 200 Säule. Aliquots der eluierten Proteinfractionen wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und nach Coomassiefärbung densitometrisch ausgewertet. Das rekombinante Auxilinfragment wurde in zwei Konzentrationsmaxima von der Säule eluiert. Dies deutet darauf hin, daß TrxH₆-Aux (547-715) zumindest teilweise als Dimer vorliegt.

Das erhaltene Elutionsprofil wäre mit einer Dimerisierung des Fragments zu erklären, bei der die höher molekulare Form des Proteins schneller die Gelfiltrationssäule durchläuft als das Monomer. Da eine mögliche Dimerisierung Einfluß auf das Bindungsverhalten an Clathrin nehmen kann und für die Interpretation der Ergebnisse von Bedeutung ist, erschien es sinnvoll, die tatsächliche Molmasse des Auxilinfragments zu ermitteln.

Eine Methode, das Molekulargewicht eines Proteins direkt zu bestimmen, stellt die analytische Ultrazentrifugation dar. In Zusammenarbeit mit Prof. Claus Urbanke, Abteilung für Biophysikalische Chemie, Medizinische Hochschule Hannover, wurden mit dem Fragment TrxH₆-Aux (547-715) Sedimentationsdiffusionsgleichgewichtsexperimente durchgeführt. Bei der Zentrifugation wird dabei ein Gleichgewichtszustand zwischen der Sedimentations- und der Diffusionsbewegung von Makromolekülen erreicht, bei dem die Verteilung eines Proteins in der Meßzelle unabhängig von dessen hydrodynamischen Eigenschaften ist. Aus dem gemessenen Konzentrationsprofil kann daher die Molmasse des untersuchten Proteins bestimmt werden. Mit dem Computerprogramm Akkuprog wurde unter der Annahme eines Gleichgewichts zwischen einer monomeren und einer dimeren Form des Auxilinfragments TrxH₆-Aux (547-715) ein Molekulargewicht von 72 kDa ermittelt. Dieser Wert stimmt gut mit der doppelten Molmasse von 2 x 37 kDa für das Monomer überein. Um das Dimer zu dissoziieren, wurde die analytische Ultrazentrifugation in Gegenwart von 6 M Guanidiniumhydrochlorid, das stark denaturierend wirkt, wiederholt. Während Komplexe normalerweise unter diesen Bedingungen in ihre einzelnen Untereinheiten zerfallen, blieb das Auxilindimer stabil. Dieses Ergebnis läßt sich nur dadurch erklären, daß der beobachteten Dimerisierung von TrxH₆-Aux (547-715) eine intermolekulare Disulfidverbrückung von zwei Auxilinfragmenten zugrunde liegt.

Auxilin sollte als zytosolisches Protein *in vivo* eigentlich nicht durch Disulfidbrücken stabilisiert sein. Das Fusionsprotein enthält vier Cysteinreste, die theoretisch an der Ausbildung von Disulfidbrücken beteiligt sein könnten. Da keine Cysteine in der Aminosäuresequenz von AS 547-910 vorhanden sind, müssen die für eine Disulfidbrücke benötigten Reste zu den Aminosäuren gehören, die von dem Expressionsvektor kodiert werden. Tatsächlich sind sowohl im Trx-Fusionsanteil als auch C-terminal zur inserierten Sequenz für Auxilin jeweils zwei Cysteinreste enthalten. Das globulär gefaltete Thioredoxin benötigt die Cysteine für die katalytische Aktivität,

so daß wahrscheinlich die beiden C-terminalen Cysteinreste des Fusionsproteins für die beobachtete Dimerisierung verantwortlich sind.

3.3 Interaktion von Auxilin mit AP-2

Durch die Interaktion eines GST-Fusionsproteins der α -Ohrdomäne von AP-2 mit geblotteten Auxilinfragmenten konnte vor einiger Zeit eine Bindung von Auxilin an AP-2 nachgewiesen werden (Owen *et al.*, 1999). Auf diese Weise wurde der Bindungsort für die α -Ohrdomäne mit einer Region in Verbindung gebracht, die alle in der Auxilinsequenz vorhandenen DPF-Motive enthielt und den Bereich von Aminosäure 577 bis 736 umfaßte.

Während die Assoziation von Amphiphysin mit AP-2 nur über die α -Ohrdomäne vermittelt wird, konnten für AP180, Epsin und Eps15 sowohl Interaktionen mit der α - als auch mit der β_2 -Ohrdomäne gezeigt werden (Owen *et al.*, 2000). Eine mögliche Bindung von Auxilin an die Ohrdomäne von β_2 -Adaptin wurde unter Verwendung von GST-Auxilin (547-910) und einem H₆-Fusionsprotein der β_2 -Ohrdomäne überprüft. Auf diese Weise ließ sich für Auxilin neben einer Interaktion mit der α -Ohrdomäne auch eine Wechselwirkung mit der Ohrdomäne von β_2 -Adaptin nachweisen (Abb. 9 A und B).

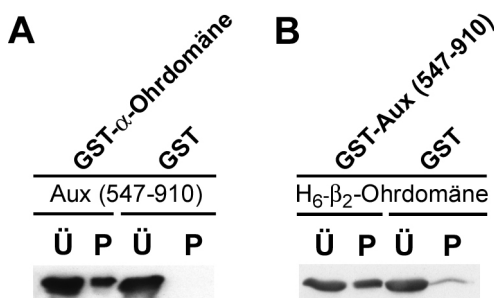


Abbildung 9: Interaktion von Auxilin (547-910) mit der GST- α -Ohrdomäne (A) und der H₆- β_2 -Ohrdomäne von AP-2 mit GST-Auxilin (547-910) (B). Eine Bindung an die immobilisierten GST-Fusionsproteine wurde durch nachfolgenden Westernblot der Überstände (Ü) und Pellets (P) untersucht. In die Bindungsexperimente wurde GST als Kontrolle eingesetzt. Neben einer Assoziation mit AP-2 über die α -Ohrdomäne konnte Auxilin auch direkt an die Ohrdomäne von β_2 -Adaptin binden.

Die Interaktion von Auxilin mit der α -Ohrdomäne von AP-2 sollte nun auch mit den beiden Fragmenten H₆-Aux (547-715) und H₆-Aux (715-902) untersucht werden. Das vordere Auxilinfragment, das die drei Kopien des DPF-Tripeptids besaß, wurde wie erwartet von der GST- α -Ohrdomäne gebunden. Da allerdings auch das C-terminale Fragment mit dem GST-Fusionsprotein schwach interagiert, scheinen an der Wechselwirkung mit AP-2 möglicherweise nicht nur die DPF-Sequenzen, sondern noch weitere Motive beteiligt zu sein (Abb. 10 A und 10 B sowie Abb. 17). Selbst das Vorhandensein nur eines der DPF-Motive in dem Fragment H₆-Aux (619-738) ist offen-

bar für eine Interaktion von Auxilin mit der α -Ohrdomäne ausreichend (Abb. 10 A). Wie bei der Bindung an die terminale Domäne gibt es im Auxilin demnach auch mehr als einen Bindungsort für AP-2.

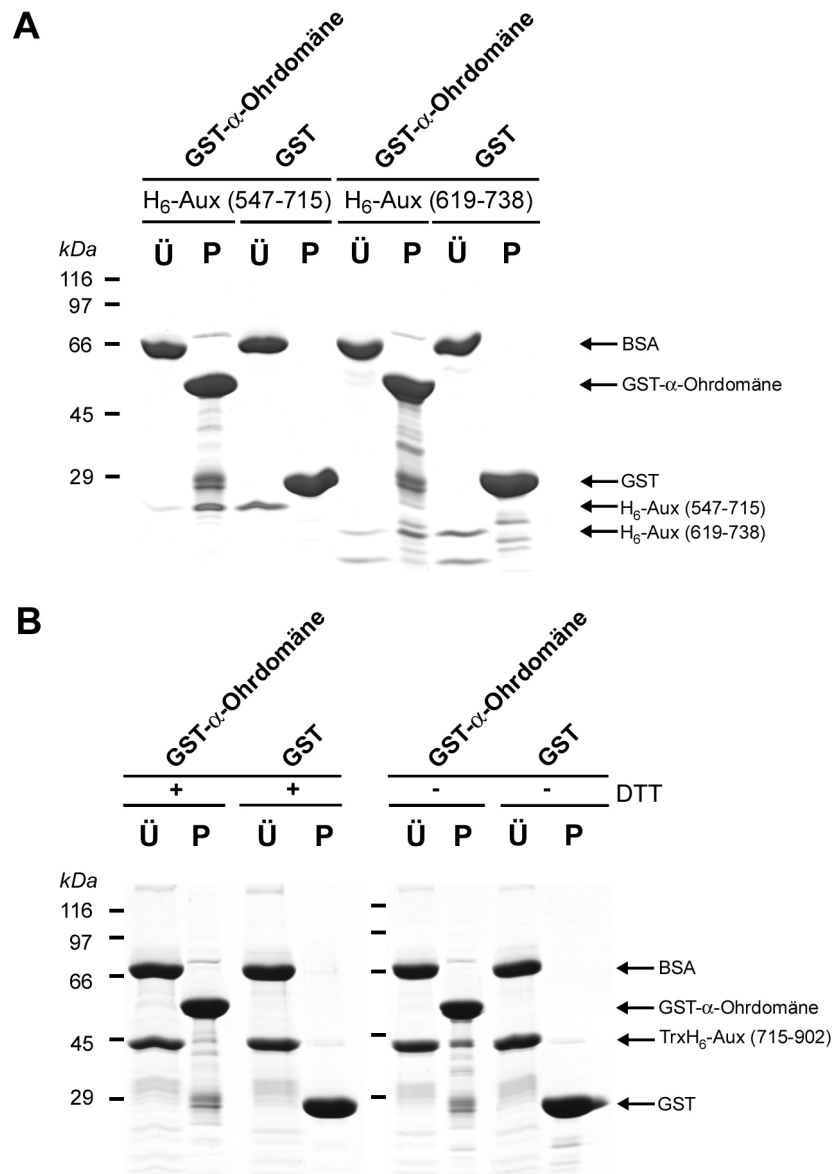


Abbildung 10: Bindung von H₆-Aux (547-715) und H₆-Aux (619-738) (A) sowie von TrxH₆-Aux (715-902) in Gegenwart oder in Abwesenheit von 1 mM DTT (B) an immobilisierte GST-Fusionsproteine der α -Ohrdomäne. Als Kontrolle diente bei den Experimenten GST. Überstände (Ü) und Pellets (P) wurden durch SDS-PAGE und Färbung des Gels mit Coomassie analysiert. Wie bei allen vergleichbaren Bindungsexperimenten enthielten die Ansätze 0,05% BSA und 0,1% Triton X-100, um unspezifische Interaktionen der Proteine zu vermeiden. H₆-Aux (547-715) und H₆-Aux (619-738) besaßen eine ähnliche Affinität für die Ohrdomäne von α -Adaptin, während die Wechselwirkung von TrxH₆-Aux (715-902) mit der α -Ohrdomäne in Gegenwart von 1 mM DTT nur sehr schwach war. Unter nichtreduzierenden Bedingungen, unter denen das Protein teilweise dimerisierte, war die Interaktion dagegen deutlich stärker.

In diesem Zusammenhang wurde die in Abschnitt 3.2 angesprochene Dimerisierung von Auxilinfragmenten und ein Effekt der Disulfidverbrückung auf die Interaktion des

Fragments TrxH₆-Aux (715-902) mit der α -Ohrdomäne überprüft. Das Bindungsexperiment wurde daher sowohl unter nichtreduzierenden Bedingungen als auch in Gegenwart von 1 mM DTT durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, daß eine Dimerisierung die Affinität von Auxilin zu einem Interaktionspartner stark erhöht (Abb. 10 B).

3.4 Identifizierung von Clathrin- und AP-2-Bindungsmotiven

Da Auxilin (547-910) sowohl einen Bereich auf der terminalen als auch auf der distalen Domäne von Clathrin erkennt, ist es wahrscheinlich, daß im Auxilin ebenfalls mehrere Bindungsorte für Clathrin existieren. Um diese näher einzugrenzen und gegebenenfalls Bindungsmotive für die terminale Domäne in der Auxilinsequenz zu identifizieren, wurde die Interaktion von biotinylierten terminalen Domänen mit synthetischen, auf Zellulosemembranstreifen immobilisierten Auxilinpeptiden untersucht. Gebundene terminale Domänen konnten durch die Assoziation des Biotins mit meerrettichperoxidasegekoppeltem Streptavidin und einer anschließenden Chemolumineszenzreaktion nachgewiesen werden. Als Peptide wurden 15-mere gewählt, die jeweils um drei Reste gegeneinander verschoben waren und insgesamt dem Bereich von Aminosäure 570-789 im Auxilin entsprachen.

Obwohl sicherlich auch eine gewisse unspezifische Bindung an einige Fragmente nicht ausgeschlossen werden kann, schien die terminale Domäne eine große Zahl der Auxilinpeptide zu erkennen (Abb. 11). Ein relativ starkes Signal lieferte das Tripeptid ⁵⁹¹DLL, was bereits als TD-Bindungsmotiv für AP180 diskutiert wurde (Morgan *et al.*, 2000). Auxilin enthält zudem drei DPF-Motive, die mit einer Bindung an die α -Ohrdomäne von AP-2 in Verbindung gebracht werden konnten. Wie sich überraschenderweise herausstellte, zeigte auch die terminale Domäne eine Affinität zu Peptiden, deren Gemeinsamkeit sich auf die Aminosäureabfolge DPF beschränkte. Auch ohne das vorausgehende Aspartat in der Sequenz führte das Vorhandensein der beiden Aminosäuren Prolin und Phenylalanin noch zu einem Signal. Das zweite ⁷⁸¹DLL-Motiv befand sich am Ende des gewählten Aminosäurebereichs, den die Auxilinpeptide umfaßten. Nur zwei der Peptide enthielten das vollständige Motiv und riefen durch Bindung der terminalen Domäne ein deutliches Signal hervor. Die Position des Motivs innerhalb des Peptids schien für die Signalintensität eine Rolle zu spielen. In vielen Fällen war das Signal am stärksten, wenn das putative Bindungsmotiv in der Nähe des N-Terminus des Peptids lokalisiert war. Alle Peptide, die im

Zusammenhang mit einer TD-Bindung standen, zeichneten sich durch das Vorhandensein von mindestens einem großen hydrophoben Rest wie Tryptophan oder Phenylalanin aus. Aufgrund dieser Daten kamen als weitere mögliche Motive für die Interaktion mit TD auch die kurzen Peptidsequenzen ⁶³⁶WDW, ⁶⁴⁵FG, ⁷⁰¹FP, ⁷²⁶NWQ und ⁷⁵³FS in Frage.

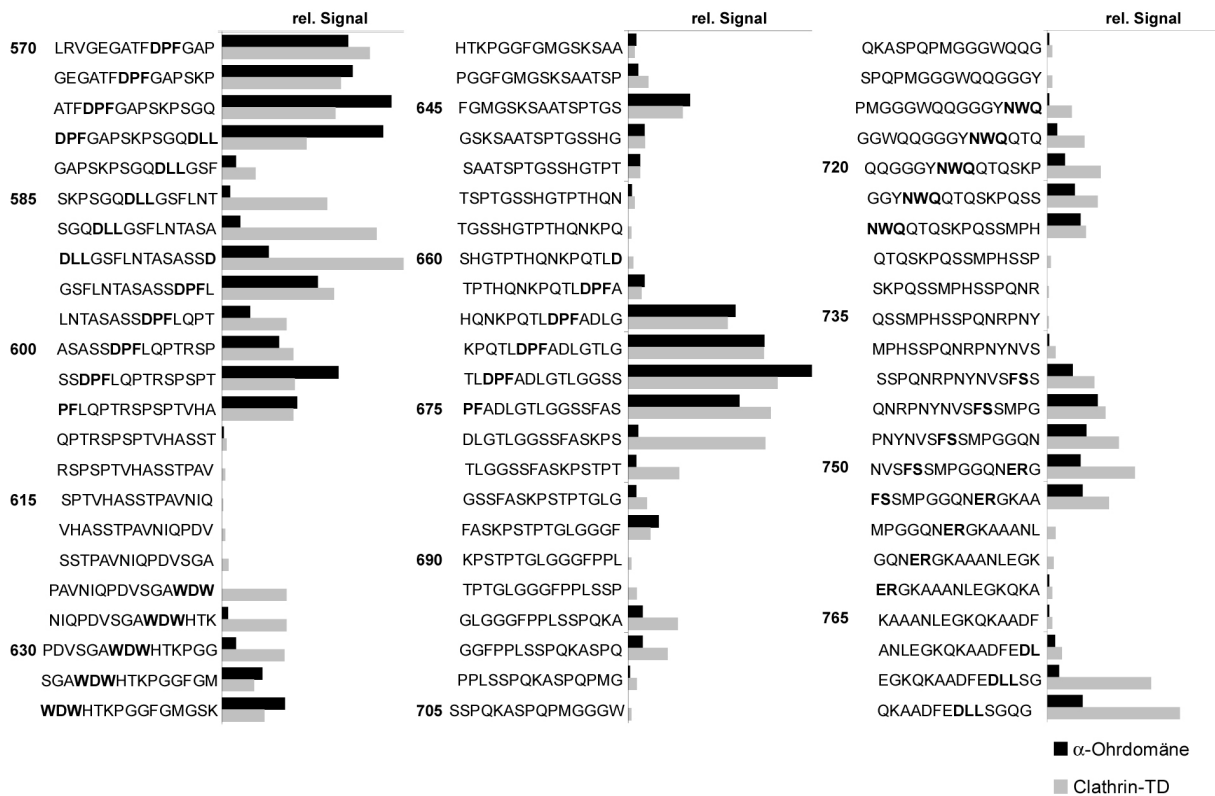


Abbildung 11: Bindung von Clathrin-TD und der α -Ohrdomäne von AP-2 an synthetische Auxilinpeptide. Bei den Peptiden handelte es sich um 15-meren, die um jeweils drei Reste gegeneinander versetzt waren und *in situ* auf Zellulosemembran synthetisiert wurden. Die Bindung der biotinylierten Proteine erfolgte wie in Abschnitt 2.2.5 beschrieben und wurde nach Interaktion von Biotin mit Streptavidin-HRP durch Chemolumineszenz detektiert und densitometrisch ausgewertet. Zahlreiche Auxilinpeptide in dem Bereich von Aminosäure 570-787 interagierten mit einem oder beiden Proteinen und enthielten somit mögliche Bindungsmotive für Clathrin und AP-2. Dabei existierten häufig scheinbar gemeinsame oder überlappende Bindungsstellen für TD und die α -Ohrdomäne.

Die Existenz einer Vielzahl putativer Bindungsstellen für die terminale Domäne legte die Vermutung nahe, daß auch die Interaktion von Auxilin mit AP-2 auf einem ähnlichen Prinzip beruhen könnte. Die in Abschnitt 3.3 beschriebenen Experimente zeigen, daß mindestens zwei Bindungsstellen für die α -Ohrdomäne im Bereich der Aminosäuren 547-910 der Auxilinsequenz vorhanden sind. Um die an der Interaktion von Auxilin mit AP-2 beteiligten Motive zu identifizieren, wurde ein weiterer Zellulosemembranstreifen mit der gleichen Anordnung von Auxilinpeptiden für die Bindung der biotinylierten α -Ohrdomäne verwendet. Interessanterweise stimmte das Signalmuster der Peptide im wesentlichen mit dem für die terminale Domäne überein (Abb. 11).

Unterschiede konnten für das DLL-Motiv, das keinen Einfluß auf die Interaktion mit der α -Ohrdomäne hatte, und die Rolle des Aspartats in der DPF-Sequenz festgestellt werden. Während der saure Rest für die Bindung von TD entbehrlich zu sein schien, nahm die Affinität zur α -Ohrdomäne deutlich ab, wenn das Aspartat in dem Peptid fehlte. Diese Beobachtung wird durch Kristallisationsstudien mit der α -Ohrdomäne bestätigt (Brett *et al.*, 2002). Durch die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung wirkt das Aspartat stabilisierend auf die Struktur und bringt den Prolin- und Phenylalaninrest des DPF-Motivs in eine exponierte Position, die für die Interaktion mit der α -Ohrdomäne wichtig ist.

Zur Kontrolle wurde ein Zellulosemembranstreifen mit der γ -Ohrdomäne von AP-1 inkubiert. Im Gegensatz zur terminalen Domäne und der α -Ohrdomäne konnte keine Bindung an die Auxilinpeptide nachgewiesen werden.

3.5 Strukturanalyse der Clathrinbindungsdomäne von Auxilin

Die Existenz von zahlreichen putativen Clathrinbindungsstellen in Form kurzer linearer Peptidsequenzen warf die Frage nach der Struktur der Clathrinbindungsdomäne auf. Abhängig vom Faltungszustand könnten viele dieser Motive im Auxilin nicht akzessibel sein und dadurch für die Interaktion mit der terminalen Domäne nicht zur Verfügung stehen.

3.5.1 Sekundärstrukturanalyse durch CD-Spektroskopie

Mit Hilfe von Programmen, die über das Internet zugänglich sind, war es möglich anhand der Aminosäuresequenz Vorhersagen über die Struktur von Auxilin zu treffen. Das verwendete Programm prognostizierte für Auxilin (547-910) nur einen geringen Anteil an Sekundärstrukturelementen. Ein höherer Gehalt an α -Helices wurde lediglich für die J-Domäne vorhergesagt. Von einer anderen Arbeitsgruppe wurde bereits mittels NMR-Analyse die Struktur eines C-terminalen Auxilinfragments bestimmt, das die Aminosäuren 737-910 umfaßte. Als Sekundärstrukturelemente konnten nach AS 786 mehrere α -Helices identifiziert werden, während der vordere Bereich nur wenig strukturiert zu sein schien. Eine Schleife enthielt das Hsc70 Bindungsmotiv HPDK (Han *et al.*, 2000). Die J-Domäne im bakteriellen DnaJ mit einer Sequenzhomologie von 19% zur entsprechenden Domäne im Auxilin besteht ebenfalls, wie eine NMR-

Strukturanalyse ergab, aus α -Helices und einer kurzen unstrukturierten Schleife (Hill *et al.*, 1995).

Da sich die vorliegenden Strukturdaten vor allem auf die J-Domäne, nicht aber auf die Clathrinbindungsdomäne von Auxilin beziehen, wurde mit Hilfe verschiedener Auxilinfragmente der gesamte Bereich von AS 547-910 CD-spektroskopisch in Zusammenarbeit mit Prof. Jürgen Alves, Abteilung für Biophysikalische Chemie, Medizinische Hochschule Hannover, untersucht. Das CD-Spektrum eines Proteins setzt sich dabei additiv aus den Beiträgen der einzelnen Sekundärstrukturelemente zusammen. Da α -Helix, β -Faltblatt und statistisches Knäuel jeweils zu einem charakteristischen CD-Spektrum führen, können unter Verwendung von Referenzspektren Aussagen zu Strukturanteilen eines Proteins gemacht werden. Die Auswertung der CD-Spektren mit dem Computerprogramm CPro im Wellenlängenbereich von 200-250 nm ergab für die Fragmente H₆-Aux (547-715) und H₆-Aux (715-813) nur einen Anteil von 5% α -Helix und 13-15% β -Faltblatt, während ca. 70% der Polypeptidkette als statistisches Knäuel vorlagen. Der Gehalt an α -Helix erhöhte sich bei dem Auxilinfragment H₆-Aux (715-902) auf 20%, wenn die Struktur der J-Domäne in die CD-Messung miteinflöß. (Abb. 12 und Tab. 5)

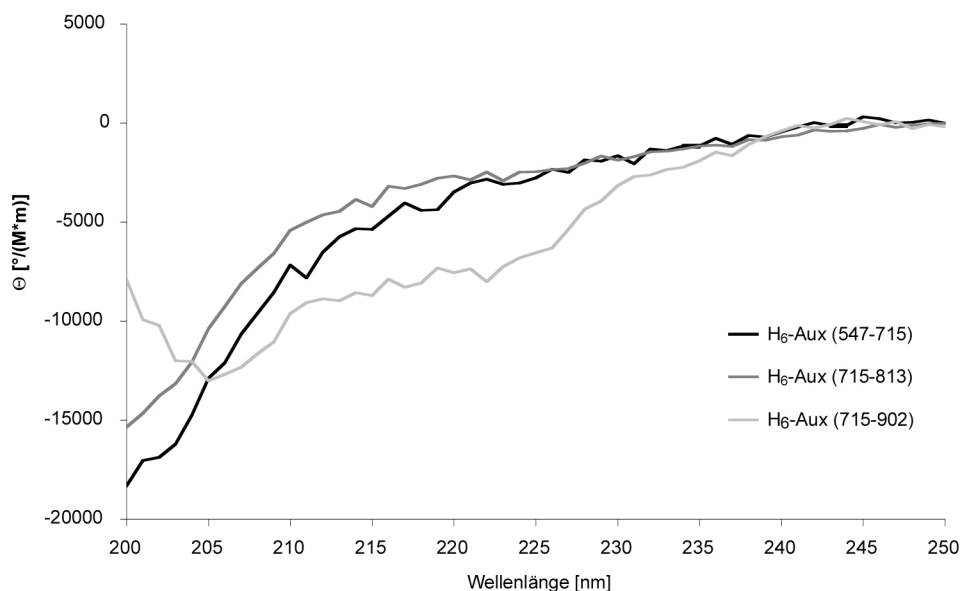


Abbildung 12: CD-Spektroskopie von rekombinanten Auxilinfragmenten. Die CD-Spektren von H₆-Aux (547-715) und H₆-Aux (715-813) zeigten typische Charakteristika von intrinsisch ungefalteten Proteinen mit einem Minimum bei 200 nm und einer geringen Elliptizität Θ bei 220 nm. H₆-Aux (715-902) wies dagegen einen deutlich erhöhten Gehalt an α -Helix auf, der auf das Vorhandensein der J-Domäne zurückzuführen war. Es kam dadurch zu einem Anstieg der molaren Elliptizität unterhalb von 200 nm und zu zwei Minima bei 208 und 220 nm.

Intrinsisch ungefaltete Proteine nehmen in vielen Fällen erst bei der Bindung eines Interaktionspartners Struktur an. In diesem Zusammenhang ist die Interaktion der leichten mit den schweren Ketten von Clathrin sehr interessant, die eine α -helikale Faltung der in Lösung wenig strukturierten leichten Ketten bewirkt (Chen *et al.*, 2002). Dieser Effekt wurde auch bei anderen Proteinen beobachtet. Beispielsweise induziert die DNA-Bindung bei Zinkfingerproteinen die Faltung von Domänen, die in Abwesenheit der DNA unstrukturiert sind. Von Polypeptidhormonen, die in wässriger Lösung ungeordnet sind, wird ebenfalls vermutet, daß sie erst durch Bindung an den Rezeptor Struktur annehmen (Dyson und Wright, 2002).

Die Clathrinbindungsdomäne von Auxilin enthält kaum α -Helix- oder β -Faltblattanteile und könnte möglicherweise durch die Interaktion mit einem Bindungspartner an Sekundärstruktur gewinnen. Das Lösungsmittel 2,2,2-Trifluorethanol (TFE) begünstigt die Ausbildung von α -Helices und wird daher häufig verwendet, um die Helicität von Peptiden zu erhöhen. Durch die Aufnahme eines CD-Spektrums der Auxilinfragmente H₆-Aux (547-715) und H₆-Aux (715-813) nach Zugabe von jeweils 50% TFE wurde eine mögliche Zunahme des α -helikalen Sekundärstrukturgehalts untersucht. Tatsächlich konnte eine Konformationsänderung unter dem Einfluß von TFE beobachtet werden. Die CD-Spektren der Fragmente zeigten in Gegenwart von TFE typische Charakteristika für einen erhöhten Anteil von α -Helix in der Struktur. So konnte eine Zunahme der Elliptizität Θ um 200 nm und die Ausbildung von zwei Minima bei etwa 208 und 222 nm beobachtet werden. Die Auswertung der CD-Daten ergab für beide Auxilinfragmente H₆-Aux (547-715) und H₆-Aux (715-813), daß nach Zugabe von TFE ein bis zwei α -Helices mit einer Länge von jeweils 8-10 Aminosäuren entstanden waren (Abb. 13 A und C sowie Tab. 5).

Tabelle 5: Anteil von Sekundärstrukturelementen rekombinanter Auxilinfragmente

Protein	Strukturelemente [%]			
	α -Helix	β -Faltblatt	Schleife	Stat. Knäuel
H ₆ -Aux (547-715)	5	15	10	69
H ₆ -Aux (715-813)	5	13	9	72
H ₆ -Aux (715-902)	20	18	16	46
H ₆ -Aux (547-715) + TFE	17	12	13	59
H ₆ -Aux (715-813) + TFE	24	12	14	50

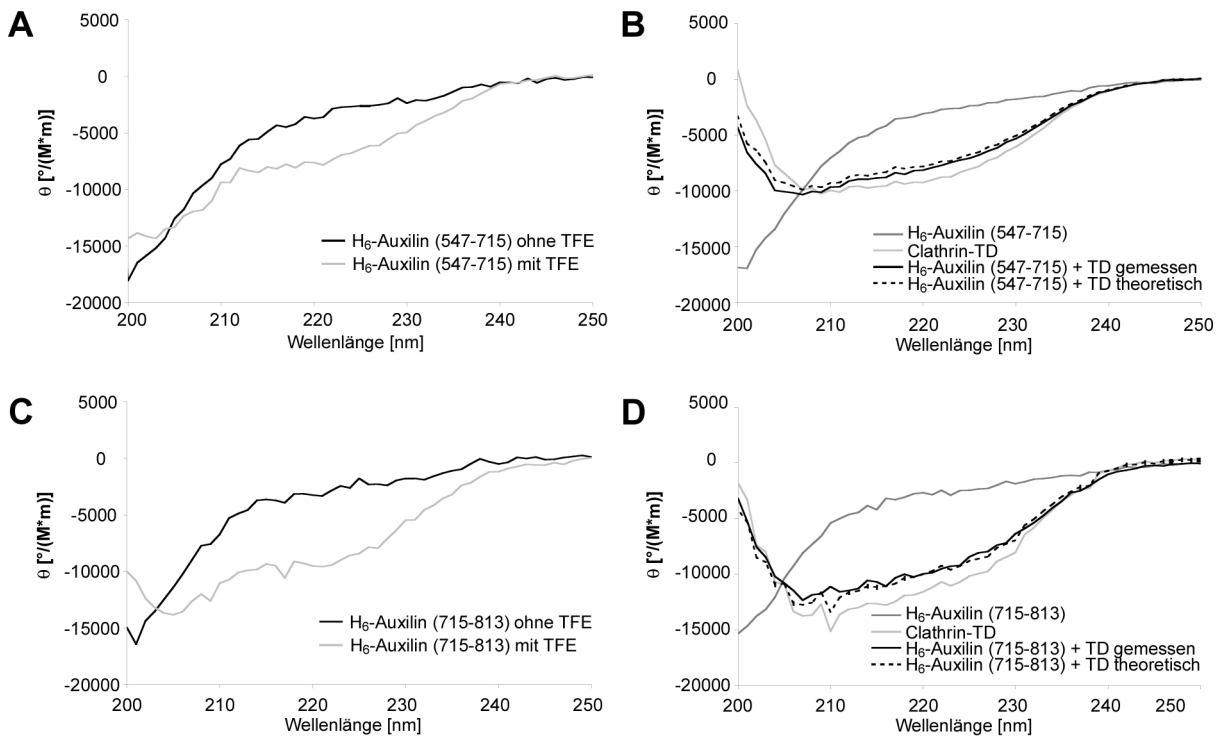


Abbildung 13: CD-Spektroskopie von H₆-Aux (547-715) und H₆-Aux (715-813) in Gegenwart von 50% TFE (A und C) bzw. äquimolarer Konzentration der terminalen Domäne von Clathrin (B und D). TFE induzierte in beiden Fällen die Ausbildung von einem geringen Anteil an α -Helices. Eine Interaktion mit TD hatte keinen Effekt auf die Sekundärstruktur der Auxilinfragmente, da das gemessene CD-Spektrum dem aus der Summe der einzelnen Spektren berechneten entspricht.

Auxilin (547-813) kann unter bestimmten Bedingungen, wie die Experimente mit TFE zeigen, in einer hydrophoben Umgebung begrenzt α -helikale Strukturen ausbilden. Die terminale Domäne von Clathrin könnte durch die Interaktion mit Auxilin auf ähnliche Weise wie TFE die Sekundärstruktur von Auxilin beeinflussen. Teile des ungefalteten Bereichs der Polypeptidkette von Auxilin könnten so auch infolge einer Bindung an TD α -helikale Struktur annehmen. Eine mögliche Wirkung von TD auf die Sekundärstruktur von Auxilin wurde durch ein gemeinsames CD-Spektrum beider Proteine untersucht. Bei diesem Experiment konnte allerdings keine signifikante Veränderung der Elliptizität der beiden Fragmente H₆-Aux (547-715) und H₆-Aux (715-813) aufgrund einer Interaktion mit der terminalen Domäne festgestellt werden (Abb. 13 B und D). Es ist nicht auszuschließen, daß ein schwacher Effekt auf die Faltung von Auxilin nicht meßbar ist und durch den recht hohen α -Helixgehalt in der *Linker*-Region von TD verdeckt wird. Denkbar ist auch, daß unter diesen Bedingungen in Lösung keine Wechselwirkung zwischen Auxilin und Clathrin stattfindet, so daß sich das gemessene Spektrum lediglich additiv aus den CD-Effekten der einzelnen Proteine zusammensetzt. Hierfür spricht, daß eine Bindung von Auxilin an die terminale

Domäne bislang nur mit Hilfe von immobilisierten Fusionsproteinen oder indirekt über eine verringerte Affinität zu trypsinbehandelten Clathrinkäfigen nachgewiesen werden konnte. Dennoch erscheint es auch aufgrund der Daten mit TFE unwahrscheinlich, daß Auxilin bei der Interaktion mit der terminalen Domäne von Clathrin über größere Bereiche eine kompakte Struktur annimmt.

3.5.2 Hitzestabilität von rekombinanten Auxilinfragmenten

Für unstrukturierte Proteine sind eine niedrige Hydrophobizität und große Nettoladung charakteristisch. Auxilin (547-910) ist ebenfalls reich an polaren und geladenen Resten. In der Aminosäuresequenz sind zudem viele Proline enthalten, die eine Ausbildung ausgedehnter α -helikaler Strukturen verhindern. Während bei intrinsisch ungeordneten Proteinen sämtliche Aminosäuren dem Lösungsmittel exponiert sind, können durch die Auffaltung der Polypeptidkette hydrophobe Reste der äußeren Umgebung entzogen und im Inneren des Proteins angeordnet werden. Eine Erhöhung der Temperatur beispielsweise kann so aufgrund der größeren thermischen Bewegung des Proteins schließlich zu einer irreversiblen Denaturierung führen. Ungefaltete Proteine reagieren dagegen häufig weniger empfindlich auf Einflüsse, die eine geordnete Domänenstruktur stören. Daher ist es möglich, aus der Hitzestabilität eines Proteins Rückschlüsse auf dessen Struktur zu ziehen. Um zu überprüfen, ob sich Auxilin unter bestimmten Bedingungen ähnlich wie ein intrinsisch ungeordnetes Protein verhalten kann, wurden verschiedene Fragmente von Auxilin in einem kochenden Wasserbad inkubiert und im Hinblick auf ihre Hitzestabilität untersucht. Während der größte Teil der Fragmente H₆-Aux (547-715) und H₆-Aux (715-813) nach dieser Behandlung weiterhin in löslicher Form im Überstand vorlag, konnte die zugesetzte GST-Kontrolle vollständig als Präzipitat abzentrifugiert werden. Die Hitze-resistenz und die Löslichkeit von Auxilinfragmenten waren bei Vorhandensein der J-Domäne deutlich geringer ausgeprägt. So wurde Aux (547-910) durch das Kochen zu etwa 50% und H₆-Aux (715-902) sogar noch stärker irreversibel denaturiert (Abb. 14).

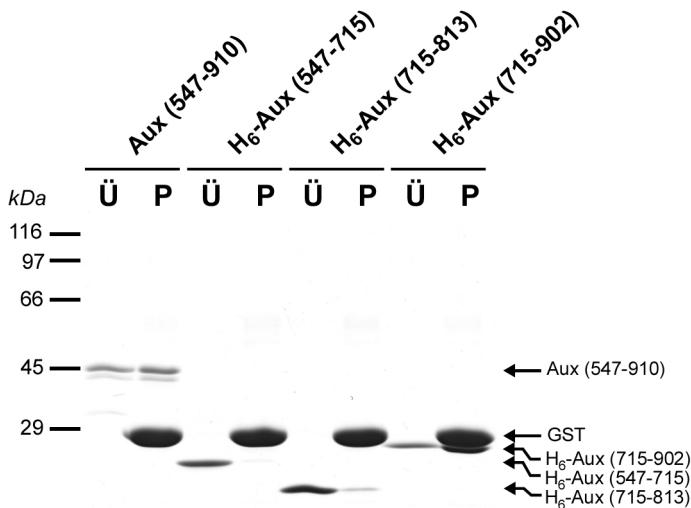


Abbildung 14: Hitzestabilität rekombinanter Auxilinfragmente. H₆-Aux (547-715) und H₆-Aux (715-813) blieben nach einer fünfminütigen Inkubation in Anwesenheit von 0,5 mg/ml GST in einem kochenden Wasserbad und anschließender Schockkühlung gelöst, während Fragmente, die die J-Domäne enthielten, zu einem größeren Anteil präzipitierten. Überstände (Ü) und Pellets (P) nach der Zentrifugation wurden durch SDS-PAGE und Coomassiefärbung analysiert.

Da die Hitzebehandlung die Bindungseigenschaften der Proteine verändert haben könnte, wurde in einem Experiment die Affinität eines gekochten Auxilinfragments zur α -Ohrdomäne von AP-2 mit der des unbehandelten Proteins verglichen. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, daß auch nach dem Kochen das untersuchte Fragment H₆-Aux (619-738) noch an die als GST-Fusionsprotein eingesetzte α -Ohrdomäne bindet (Abb. 15).

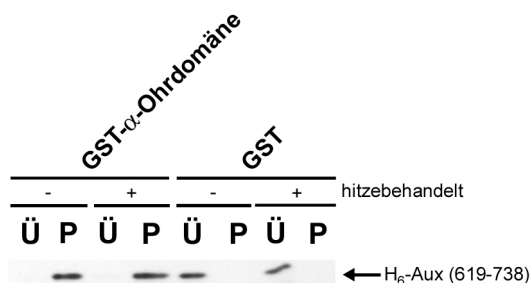


Abbildung 15: Bindung von hitzebehandeltem H₆-Aux (619-738) an die α -Ohrdomäne von AP-2. H₆-Aux (619-738) wurde für fünf Minuten in einem kochenden Wasserbad inkubiert, anschließend schockgekühlt und in einem Bindungsexperiment mit immobilisierter GST- α -Ohrdomäne eingesetzt. Gezeigt ist ein Westernblot der Überstände (Ü) und Pellets (P) nach dem Experiment. Durch diese Behandlung wurden die Bindungseigenschaften des Auxilinfragments nicht nennenswert beeinflusst.

3.6 Bindung von Auxilinfragmenten an Clathrin und AP-2

Da sich die Clathrinbindungsdomäne von Auxilin als unstrukturiert erwiesen hat, konnte der Bereich von Aminosäure 547 bis zum Beginn der J-Domäne weiter in kürzere Fragmente unterteilt werden, ohne dadurch eine Faltung oder Domänenorganisation der Polypeptidkette zu beeinträchtigen. Die Auxilinfragmente TrxH₆-Aux (547-590), TrxH₆-Aux (547-605), TrxH₆-Aux (547-618), TrxH₆-Aux (715-776) und TrxH₆-Aux (778-902) wurden rekombinant exprimiert und anschließend im Hinblick auf ihre Clathrinbindungseigenschaften untersucht. Gleichzeitig wurde in parallelen Experimenten die Interaktion mit AP-2 überprüft. Zur Übersicht ist eine Liste der ver-

wendeten Fragmente auf einem Beiblatt zu finden. Um eine Bindung an TD oder die α -Ohrdomäne nachzuweisen, war in einigen Fällen die Dimerisierung des entsprechenden Auxilinfragments erforderlich. Affinitätsvergleiche sind allerdings in Abwesenheit eines reduzierenden Reagenzes wie DTT schwierig, da der Dimerisierungsgrad der Proteine unterschiedlich ausgeprägt sein kann. Deshalb sind unter diesen Bedingungen nur rein qualitative Aussagen zur Bindung zulässig. Die Experimente wurden jeweils in zwei Ansätzen mit bzw. ohne Zugabe von 1 mM DTT durchgeführt. Die beiden Auxilinfragmente TrxH₆-Aux (547-590) und TrxH₆-Aux (547-590)_{STOP} unterscheiden sich durch ein in die DNA-Sequenz eingefügtes Stopkodon, das eine über den Expressionsvektor vermittelte Dimerisierung des Proteins ausschließt. Während das Vorhandensein nur eines DPF-Motivs an Position AS 579 in TrxH₆-Aux (547-590) dem Monomer keine Interaktion mit AP-2 ermöglichte, trat das Dimer zu etwa 40% zusammen mit dem GST-Fusionsprotein im Pellet auf. Eine Bindung an die terminale Domäne von Clathrin konnte allerdings nicht festgestellt werden. Trotzdem ließ sich dieses Fragment zusammen mit Clathrinkäfigen abzentrifugieren. Eine schwache Assoziation mit trypsinverdauten Käfigen, denen die terminalen Domänen fehlten, war jedoch nur im dimerisierten Zustand des Proteins möglich (Abb. 16 A).

Das Auxilinfragment TrxH₆-Aux (547-605) war in der Lage, neben AP-2 auch Clathrin zu binden (Abb. 16 B). Es enthält außer dem ersten DPF-Tripeptid auch ein ⁵⁹¹DLL-Motiv, das offenbar für die Interaktion des dimerisierten Proteins mit der terminalen Domäne verantwortlich war. Verglichen mit den beiden kürzeren Fragmenten besaß TrxH₆-Aux (547-618) eine höhere Affinität zu AP-2. In der Aminosäuresequenz tauchen zwei DPF-Motive auf, die auch in Gegenwart von 1 mM DTT zu einer schwachen Bindung an die α -Ohrdomäne führten (Abb. 16 C). Die Interaktion sowohl mit GST-TD als auch mit Clathrinkäfigen war dagegen ähnlich stark wie die von TrxH₆-Aux (547-605)

TrxH₆-Aux (619-738) zeichnet sich durch die Existenz nur eines DPF-Motivs an Position AS 674 und den bislang nicht näher charakterisierten Sequenzfolgen ⁶³⁶WDW und ⁷²⁶NWQ aus. Ein möglicher Einfluß der beiden letzteren Tripeptide auf die Interaktion mit Clathrin und AP-2 wurde bereits aufgrund der Bindung von TD bzw. der α -Ohrdomäne an synthetische Auxilinpeptide in Betracht gezogen (Abschnitt 3.4). Wie schon aus Abbildung 10 hervorging, wurde das Fragment H₆-Aux (619-738) auch als Monomer sehr effizient von der α -Ohrdomäne gebunden, wohingegen die

Dimerisierung von TrxH₆-Aux (619-738) die Interaktion mit GST-TD deutlich verbesserte (Abb. 16 D). Die Käfigbindungseigenschaften von H₆-Aux (619-738) sind in Abbildung 18 dargestellt.

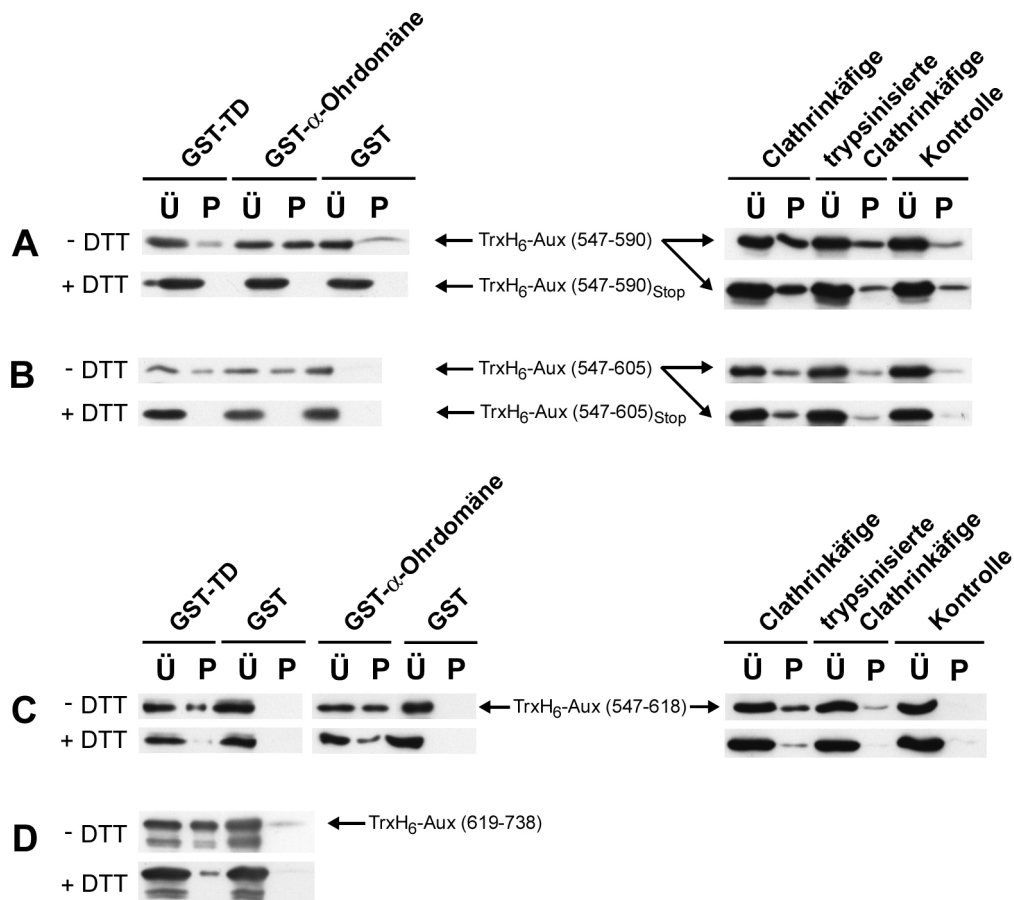


Abbildung 16: Bindung von TrxH₆-Aux (547-590) (A), TrxH₆-Aux (547-605) (B), TrxH₆-Aux (547-618) (c) und TrxH₆-Aux (619-738) (D) jeweils an Clathrin-TD sowie an die α -Ohrdomäne von AP-2 als immobilisierte GST-Fusionsproteine bzw. an intakte und trypsinbehandelte Clathrinkäfige. Die Experimente wurden in Gegenwart oder in Abwesenheit von 1 mM DTT durchgeführt. Als Kontrollen dienten entweder GST oder die Auxilinfragmente ohne zugegebene Käfige. Überstände (Ü) und Pellets (P) von den Experimenten wurden durch Westernblots untersucht. Alle Fragmente zeigten eine Affinität zu AP-2 und der terminalen Domäne sowie zu den Clathrinkäfigen. Unter reduzierenden Bedingungen, unter denen die Proteine nicht dimerisieren konnten, waren diese Interaktionen allerdings nicht oder nur schwach nachweisbar.

Im Fragment TrxH₆-Aux (715-902) sind die putativen Motive ⁷²⁶NWQ, ⁷⁵³FS, ⁷⁶²ER und ⁷⁸¹DLL enthalten, die eine Assoziation mit TD und AP-2 vermitteln könnten. Tatsächlich wurde eine schwache Interaktion beobachtet (Abb. 17 C). Die Wechselwirkung mit der terminalen Domäne ließ sich allerdings nach Zugabe von DTT kaum noch nachweisen. Im Gegensatz dazu schien die Bindung an polymerisiertes Clathrin mit und ohne terminale Domänen nicht vom Dimerisierungszustand des Proteins abzuhängen (Abb. 19). Die beiden kürzeren Auxilinfragmente TrxH₆-Aux (715-

776) und TrxH₆-Aux (778-902) verhielten sich ähnlich im Bezug auf die Interaktion mit TD und der α -Ohrdomäne (Abb. 17 A und 17 B). Eine möglicherweise etwas bessere Bindung an die GST-Fusionsproteine könnte in einer höheren Akzessibilität durch die kleineren Fragmente von Auxilin begründet sein. Verglichen mit TrxH₆-Aux (715-902) konnte eine geringere Affinität zu Clathrinkäfigen festgestellt werden. Interessanterweise wurde dabei die Interaktion des vorderen Auxilinfragments mit trypsinbehandelten Käfigen in Gegenwart von DTT vollständig aufgehoben (Abb. 17 A und 17 B). Die Ergebnisse der Bindungsexperimente mit GST-Fusionsproteinen von TD und der α -Ohrdomäne sowie mit rekonstituierten Clathrinkäfigen sind für die beschriebenen Auxilinfragmente in Tabelle 6 zusammengefasst.

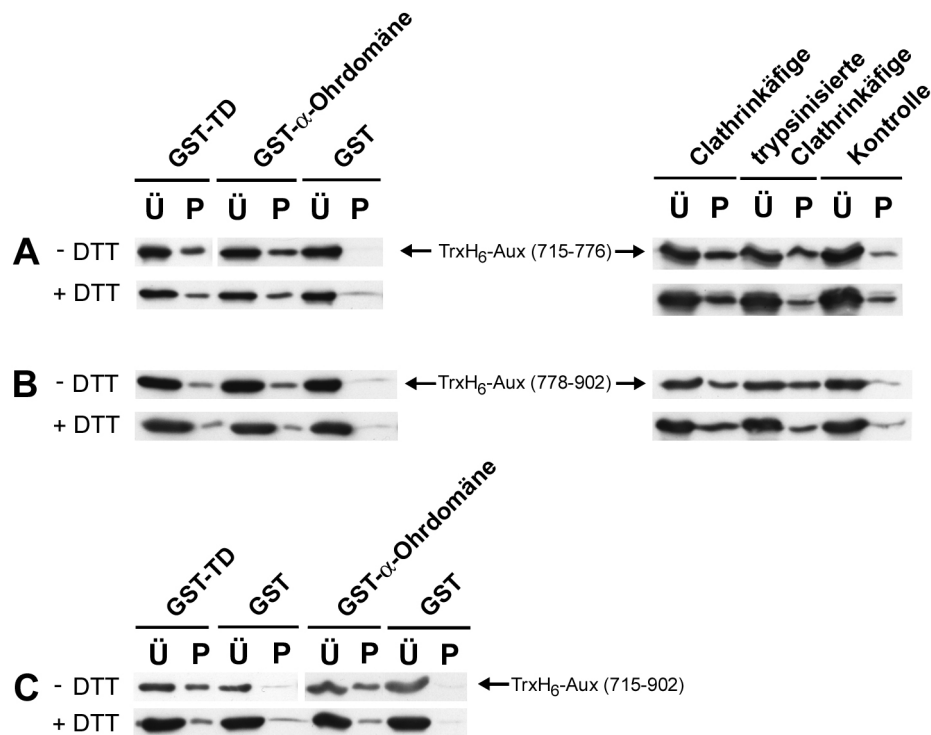


Abbildung 17: Bindung von TrxH₆-Aux (715-776) (A), TrxH₆-Aux (778-902) (B) und TrxH₆-Aux (715-902) (c) an immobilisierte GST-Fusionsproteine von Clathrin-TD sowie der α -Ohrdomäne von AP-2 bzw. an intakte und trypsinbehandelte Clathrinkäfige. Als Kontrolle wurden entweder GST oder die Auxilinfragmente ohne zugegebene Käfige eingesetzt. Die Experimente erfolgten in Gegenwart oder in Abwesenheit von 1 mM DTT. Gezeigt sind Westernblots von Überständen (Ü) und Pellets (P) der Bindungsexperimente. Alle Fragmente interagierten mit AP-2, der terminalen Domäne und den Clathrinkäfigen. Unter reduzierenden Bedingungen, unter denen die Proteine als Monomere vorlagen, waren allerdings weniger als 3% von TrxH₆-Aux (715-902) mit GST-TD assoziiert und eine Wechselwirkung von TrxH₆-Aux (715-776) mit den trypsinverdauten Käfigen war nicht nachweisbar. Die Käfigbindung von H₆-Aux (715-902), die sich als unabhängig von dem Dimerisierungszustand des Proteins erwies, wurde weiter unten näher untersucht (Abb. 19).

Tabelle 6: Übersicht über die AP-2- und Clathrinbindungseigenschaften der untersuchten Auxilinfragmente. 0 - 3% = keine Bindung (-); 3 - 10% = Bindung (+ / ♦); 10 - 50% = gute Bindung (++ / ♦♦); > 50% = sehr gute Bindung (+++ / ♦♦♦). Das Symbol ♦ wurde verwendet, um die Affinitäten der dimerisierten Proteine zu beschreiben.

Auxilinfragment	Bindung an							
	α -Ohrdomäne		Clathrin-TD		Clathrinkäfige		trypsinverd. Clathrinkäfige	
	-DTT	+DTT	-DTT	+DTT	-DTT	+DTT	-DTT	+DTT
TrxH ₆ -Aux (547-590)	♦♦	-	-	-	♦	+	♦	-
TrxH ₆ -Aux (547-605)	♦♦	-	♦♦	-	♦	+	♦	-
TrxH ₆ -Aux (547-618)	♦♦	++	♦♦	-	♦♦	+	♦	-
TrxH ₆ -Aux (619-738)	♦♦♦	+++ ¹	♦♦	+	♦♦♦ ²	++ ¹	♦♦ ²	+ ¹
TrxH ₆ -Aux (715-776)	♦♦	++	♦♦	+	♦	+	♦	-
TrxH ₆ -Aux (778-902)	♦	+	♦	+	♦♦	++	♦♦	+
TrxH ₆ -Aux (715-902)	♦♦	+	♦♦	-	♦♦	++ ³	♦♦	++ ³

¹ mit H₆-Aux (619-738) ermittelt; ² in Scheele *et al.* (2001) beschrieben; ³ mit H₆-Aux (715-902) ermittelt

3.7 Bindung von Auxilinmutanten an Clathrin und AP-2

Durch die Interaktion der terminalen Domäne und der α -Ohrdomäne mit synthetischen Auxilinpeptiden konnten einige putative Bindungsmotive für Clathrin bzw. AP-2 bestimmt werden (Abschnitt 3.4). Ihre funktionelle Bedeutung wurde durch Modifikation der entsprechenden Aminosäuresequenzen mit Hilfe gezielter Mutagenese analysiert. Da sich in einigen Fällen nur für die dimerisierten Auxilinfragmente eine Wechselwirkung mit TD oder der α -Ohrdomäne von AP-2 nachweisen ließ, die abhängig vom Grad der Dimerisierung erheblichen Schwankungen unterliegen konnte, war bei diesen Fusionsproteinen ein Vergleich der Bindungsintensitäten zwischen Wildtyp und mutiertem Fragment nicht sinnvoll. Aus diesem Grund wurden für Bindungsexperimente an GST-Fusionsproteine nur die Auxilinfragmente Aux (547-910), H₆-Aux (547-715) und H₆-Aux (619-738) mit den entsprechenden Mutanten eingesetzt. Mögliche Clathrinbindungsmotive wurden auch in H₆-Aux (715-902), das nur sehr schwach mit TD oder der α -Ohrdomäne interagiert, verändert und im Hinblick auf einen Effekt auf die Assoziation mit Clathrinkäfigen untersucht.

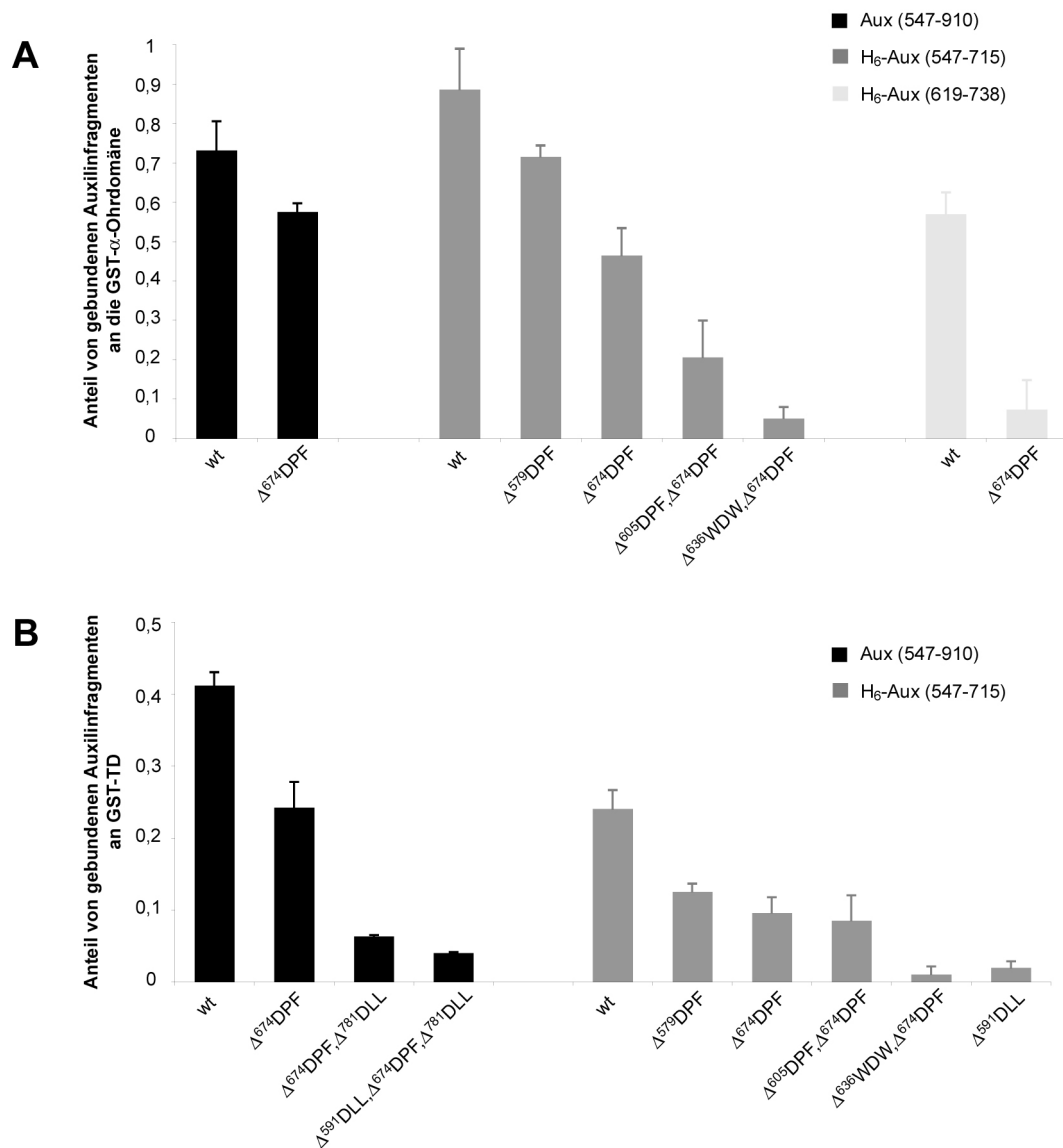


Abbildung 18: Bindung von Aux (547-910), H₆-Aux (547-715) und H₆-Aux (619-738) sowie der mutierten Auxilinfragmente an die GST- α -Ohrdomäne (A) und an GST-TD (B). Die Anteile der an die immobilisierten GST-Fusionsproteine gebundenen Auxilinfragmente wurden in mehreren unabhängigen Experimenten bestimmt und gemittelt ($n \geq 3$). Da die Assoziation von H₆-Aux (619-738) mit der terminalen Domäne nur sehr schwach war, wurde sie nicht quantifiziert und im Diagramm dargestellt. Der Anteil der an die GST-Kontrollen gebundenen Proteine wurde jeweils von den Werten abgezogen. Der Verlust von DLL-Motiven beeinträchtigte die Interaktion mit Clathrin-TD, während die DPF-Motive nicht nur eine Bedeutung für die AP-2-Bindung, sondern auch einen Einfluß auf die Wechselwirkung mit TD hatten. Ebenso spielte die ⁶³⁶WDW-Sequenz sowohl bei der Bindung von der α -Ohrdomäne als auch von TD eine Rolle.

Das Fragment Aux (547-910) umfaßt die vollständige Clathrinbindungsdomäne, die mehrere Bindungsstellen sowohl für die terminale als auch die distale oder proximale Domäne von Clathrin enthält. Erwartungsgemäß wirkte sich das Fehlen der terminalen Domänen in trypsinverdauten Clathrinkäfigen negativ auf die Bindung aus. Die Mutation des ⁶⁷⁴DPF-Motivs zu den Aminosäuren APA führte zu einer schwächeren Interaktion mit der α -Ohrdomäne und reduzierte leicht die Affinität des Fragments zu polymerisiertem Clathrin, da auch ein direkter Einfluß auf die Bindung an GST-TD

beobachtet werden konnte. Wurden zusätzlich zum DPF-Motiv auch die Aminosäuren des zweiten oder beider DLL-Tripeptide zu der Sequenz ALA verändert, war eine stärker verminderte Interaktion mit TD die Folge. Auch die Wechselwirkung mit intakten und trypsinbehandelten Clathrinkäfigen war bei diesen Auxilinmutanten beeinträchtigt (Abb. 18 und 19). Dagegen hatten die DLL-Mutationen keine Auswirkungen auf die Bindung von AP-2 (Abb. 20 A). Während die DLL-Motive scheinbar nur für die Assoziation mit Clathrin von Bedeutung waren, wirkte sich der Verlust des DPF-Motivs sowohl auf die Clathrin- als auch auf die AP-2-Wechselwirkung aus. Ein ähnliches Ergebnis lieferten auch die Auxilinpeptiddaten in Abschnitt 3.4.

Die Clathrinbindungsdomäne von Aux (547-910) wurde in zwei Fragmente unterteilt, von denen das vordere H₆-Aux (547-715) die drei in der Auxilinsequenz vorhandenen DPF-Motive enthält. Der zunehmende Verlust dieser Bindungssequenzen führte sukzessiv zur Abnahme einer Bindung an die α -Ohrdomäne von AP-2 (Abb. 18). In diesem Zusammenhang fiel auf, daß durch Mutation der Aminosäuren ⁵⁷⁹DPF und ⁶⁷⁴DPF die Interaktion mit AP-2 unterschiedlich stark beeinträchtigt wurde. Es scheint daher so, als ob die drei DPF-Motive nicht völlig äquivalent sind. Durch das gleichzeitige Ausschalten des dritten DPF-Tripeptids und des putativen Bindungsmotivs ⁶³⁶WDW konnte der Effekt des mutierten einzelnen DPF-Motivs noch verstärkt werden. Dieses Ergebnis zeigt, daß auch die WDW-Sequenz im Auxilin direkt an der Interaktion mit AP-2 beteiligt ist und bestätigt die mit Hilfe der Auxilinpeptide gewonnenen Erkenntnisse. Verglichen mit der gemeinsamen Mutation von zwei DPF-Motiven hatte die Kombination von ⁶⁷⁴DPF und ⁶³⁶WDW sogar einen größeren Einfluß auf die Assoziation von H₆-Aux (547-715) mit der α -Ohrdomäne.

Bindungsexperimente mit der terminalen Domäne ergaben, daß der Wildtyp von H₆-Aux (547-715) eine um fast 40% geringere Affinität als Aux (547-910) zum GST-Fusionsprotein besaß (Abb. 18). Demnach sind in dem kürzeren Auxilinfragment vermutlich nicht alle Bindungsorte für TD enthalten. Um die Motive zu identifizieren, die in diesem Fragment die Bindung an TD vermitteln, wurden die bereits auf ihre AP-2-Bindungseigenschaften untersuchten Auxilinmutanten auch in Experimente mit der terminalen Domäne eingesetzt. Dabei zeigte sich, daß Mutationen der DPF-Motive erstaunlicherweise auch eine Abnahme der Bindung von H₆-Aux (547-715) an GST-TD zur Folge hatten. Allerdings schien die zweite DPF-Sequenz in der Doppelmutante H₆-Aux (547-715) Δ ⁶⁰⁵DPF, Δ ⁶⁷⁴DPF einen geringeren Einfluß auf die Interaktion mit TD als mit der α -Ohrdomäne zu haben. Der gleichzeitige Austausch des

WDW- und des dritten DPF-Bindungsmotivs resultierte in einem fast vollständigen Verlust der Interaktionsfähigkeit mit TD. Die Mutation des ⁵⁹¹DLL-Motivs hatte einen ähnlichen Effekt. Dadurch konnte das Tripeptid erstmals direkt als Bindungsmotiv für die terminale Domäne identifiziert werden. Im Unterschied dazu zeigte die Auxilinmutante eine unveränderte Affinität zur α -Ohrdomäne (Abb. 20 B).

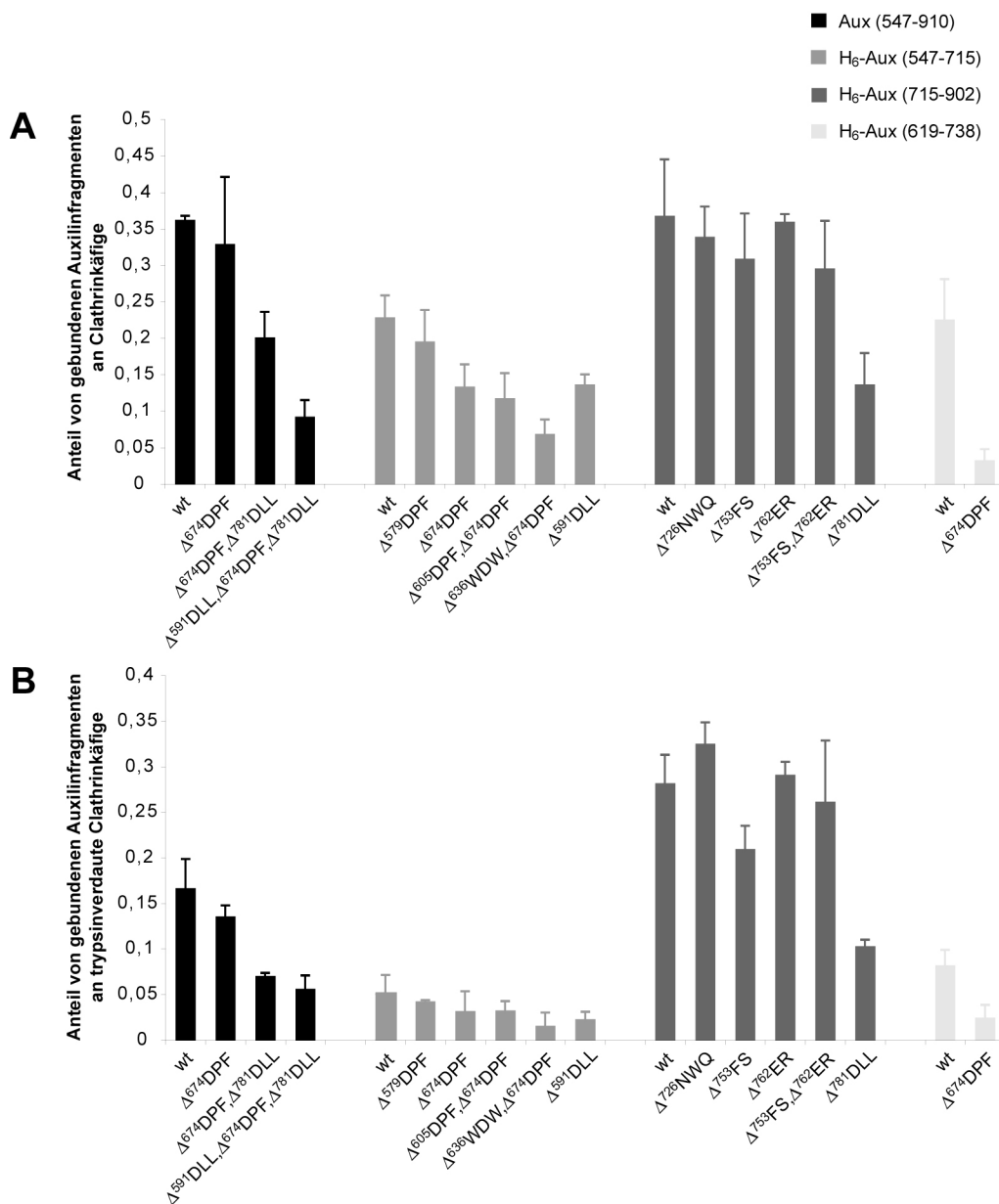


Abbildung 19: Bindung von Aux (547-910), H₆-Aux (547-715), H₆-Aux (715-902) und H₆-Aux (619-738) sowie der mutierten Auxilinfragmente an intakte (A) und an trypsinverdaute Clathrinkäfige, denen die terminalen Domänen fehlen (B). Der Anteil des in Kontrollen spontan präzipitierten Proteins wurde jeweils von dem an die Käfige gebundenen Anteil abgezogen (n \geq 3). H₆-Aux (715-902) interagiert mit beiden Arten von Clathrinkäfigen vergleichbar gut, während H₆-Aux (547-715) eine deutlich höhere Affinität zu den intakten Käfigen besaß. Die DLL-Mutationen vor allem bei Aux (547-910) und H₆-Aux (715-902) sowie der Verlust von ⁶⁷⁴DPF bei H₆-Aux (619-738) beeinflussten die Wechselwirkung mit Clathrinkäfigen sowohl mit als auch ohne terminale Domänen.

Die Bindung von H₆-Aux (547-715) an Clathrinkäfige war wie die Interaktion mit TD im Vergleich zum Auxilinfragment Aux (547-910) um etwa 40% reduziert (Abb. 19). Das Fehlen der terminalen Domänen führte sogar zu einer noch stärker eingeschränkten Assoziation von H₆-Aux (547-715) mit den trypsinverdauten Käfigen. Mutationen in diesem Fragment wirkten sich auf die Bindung an Clathrinkäfige sehr ähnlich aus wie auf die Interaktion mit der terminalen Domäne. Die einzige Ausnahme bildete hier H₆-Aux (547-715) Δ^{591} DLL. Die Mutation des DLL-Motivs, die zu einer dramatischen Abnahme der TD-Bindung führte, bewirkte nur eine moderate Abnahme der Assoziation mit den Käfigen.

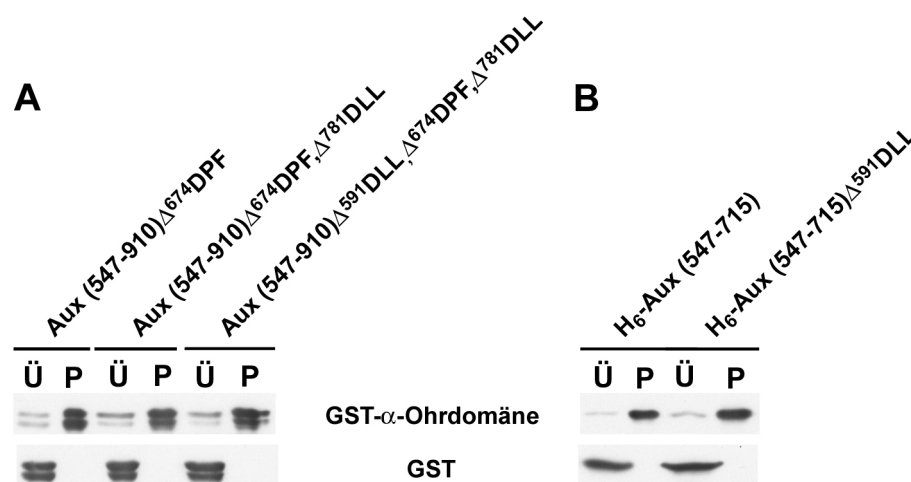


Abbildung 20: Bindung von Aux (547-910) Δ^{674} DPF und den DLL-Mutanten dieses Auxilinfragments (A) sowie von H₆-Aux (547-715) und H₆-Aux (547-715) Δ^{591} DLL (B) an die immobilisierte GST- α -Ohrdomäne. Überstände (Ü) und Pellets (P) nach den Bindungsexperimenten wurden durch Westernblots untersucht. Als Kontrolle diente die Interaktion mit GST. Der Verlust der DLL-Motive hatte keinen Einfluß auf die Wechselwirkung der Proteine mit AP-2.

Auch das Auxilinfragment H₆-Aux (619-738) enthält ein DPF-Motiv in der Aminosäuresequenz. Wurde dieses Motiv zu einer inaktiven Variante mutiert, konnte eine anfänglich relativ starke Assoziation des Wildtyps mit der α -Ohrdomäne nahezu aufgehoben werden (Abb. 18). Eine geringe Restbindung wäre dementsprechend auf das Vorhandensein von mindestens einem weiteren Motiv mit sehr schwacher Affinität zu AP-2 zurückzuführen. Als ein möglicher Kandidat käme hierfür beispielsweise die WDW-Sequenz in Frage. Am bemerkenswertesten war jedoch, daß diese Auxilinmutante sowohl eine geringere Affinität zu intakten als auch zu trypsinverdauten Clathrinkäfigen besaß, was für eine Rolle des DPF-Motivs bei der Bindung von polymerisiertem Clathrin spricht (Abb. 19).

Mutanten des C-terminalen Fragments H₆-Aux (715-902) dienten zur Untersuchung der möglichen Clathrinbindungsmotive ⁷²⁶NWQ, ⁷⁵³FS, ⁷⁶²ER und ⁷⁸¹DLL im Hinblick auf ihre Bedeutung für die Assoziation von Auxilin mit Clathrinkäfigen. Während für die meisten Mutationen nur ein schwacher Effekt nachzuweisen war, führte der Verlust der DLL-Sequenz zu einer deutlichen Abnahme der Affinität von H₆-Aux (715-902) sowohl zu Clathrinkäfigen mit als auch ohne terminale Domänen (Abb. 19). Somit scheint das DLL-Motiv auch an der Interaktion mit der distalen oder proximalen Domäne von Clathrin beteiligt zu sein.

3.8 Wettbewerbsexperimente

3.8.1 Wettbewerb von Clathrin und AP-2 um Auxilin

Neben den mit Hilfe der Auxilinpeptide gewonnenen und in Abschnitt 3.4 beschriebenen Ergebnissen sprechen auch die Bindungsexperimente mit den Auxilinmutanten für das Vorhandensein von gemeinsamen oder überlappenden Motiven für die Interaktion mit der terminalen Domäne von Clathrin und der α -Ohrdomäne von AP-2. In diesem Fall müßten Clathrin und AP-2 um dieselben Bindungsorte konkurrieren. Um *in vitro* nachzuweisen, daß sich zwei Proteine tatsächlich so verhalten, werden häufig Wettbewerbsbindungsexperimente durchgeführt. Da Auxilin zu freien terminalen Domänen in Lösung nur eine sehr schwache Affinität besitzt, wurde TD als GST-Fusionsprotein an GSH-Sepharose immobilisiert und mit dem Auxilinfragment H₆-Aux (547-715) in Gegenwart der α -Ohrdomäne inkubiert. Mit ansteigender molarer Konzentration der α -Ohrdomäne wurde die Assoziation von Auxilin mit der terminalen Domäne zunehmend beeinträchtigt. Die Bindung der α -Ohrdomäne an H₆-Aux (547-715) führte dabei zur Verdrängung des Auxilinfragments von GST-TD (Abb. 21 A). Ein trimerer Komplex zwischen Auxilin, AP-2 und Clathrin konnte dagegen nicht beobachtet werden. Folglich existieren in der Auxilinsequenz Motive, die eine gleichzeitige Interaktion von Auxilin mit TD oder AP-2 ausschließen. Neben der Tatsache, daß es gemeinsame Bindungssequenzen für die α -Ohrdomäne und die terminale Domäne gibt, könnten bei der Wettbewerb auch sterische Aspekte eine Rolle spielen.

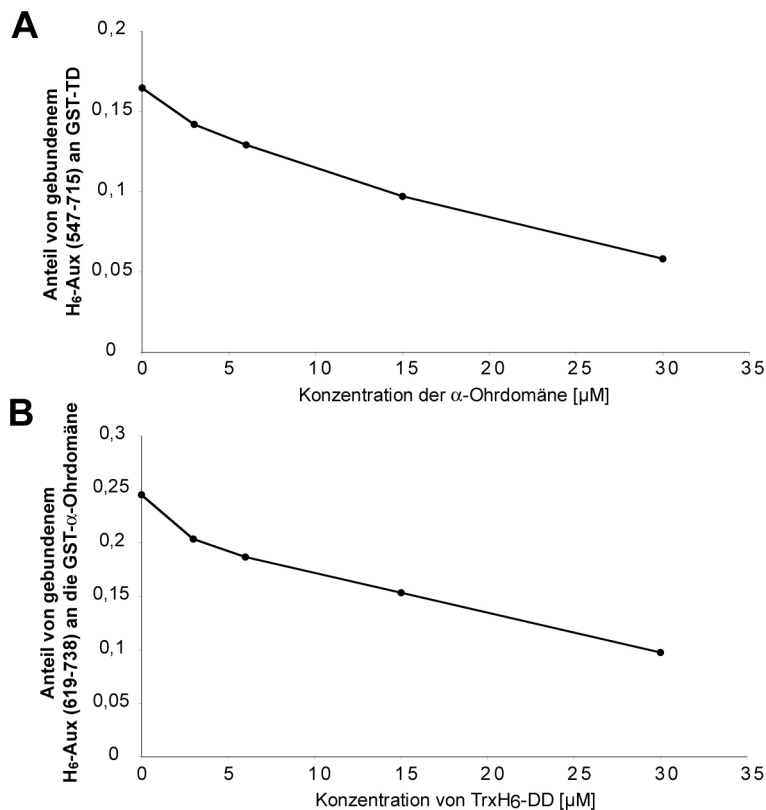


Abbildung 21: Kompetitionsbindungsexperimente von GST-TD und der Ohrdomäne von α -Adaptin um H₆-Aux (547-715) (A) und von TrxH₆-DD und der GST- α -Ohrdomäne um H₆-Aux (619-738) (B). Die Reaktionsansätze enthielten nur Auxilin und die an GSH-Sepharose immobilisierten GST-Fusionsproteine bzw. jeweils die äquimolare Menge oder einen zwei-, fünf- oder zehnfachen Überschuß an dem Protein, das die Auxilinfragmente verdrängen sollte. AP-2 und die terminale bzw. die distale Domäne von Clathrin konkurrierten um die Interaktion mit Auxilin, so daß es gemeinsame oder überlappende Bindungsmotive geben muß.

Das eingesetzte Fragment H₆-Aux (547-715) enthält drei DPF-Motive sowie die ⁶³⁶WDW-Sequenz. Der Verlust des dritten DPF-Motivs in der Aminosäuresequenz beeinflusste nicht nur die Bindung dieser Mutanten an GST-TD, sondern reduzierte auch die Affinität zu Clathrinkäfigen, denen die terminalen Domänen fehlten (siehe Abschnitt 3.7 Abb. 18 und 19). Daher scheint dieses Motiv auch bei der Assoziation von Auxilin mit der distalen oder proximalen Domäne von Clathrin von Bedeutung zu sein. Dieser Effekt war besonders stark ausgeprägt bei H₆-Aux (619-738). In einem Wettbewerbsexperiment wurde überprüft, ob die distale Domäne das gleiche Bindungsmotiv erkennt mit dem auch die α -Ohrdomäne im Auxilin interagiert. Tatsächlich konnte eine Verdrängung von H₆-Aux (619-738) von der GST- α -Ohrdomäne nach Zugabe von TrxH₆-DD beobachtet werden (Abb. 21 B). Da bei einem vergleichbaren Experiment die α -Ohrdomäne und GST-TD um ein gemeinsames oder überlappendes Motiv in TrxH₆-(619-738) konkurrieren (Abb. 22), ist es möglich, daß eine universelle Bindungssequenz in diesem Auxilinfragment für beide Clathrindomänen und AP-2 existiert.

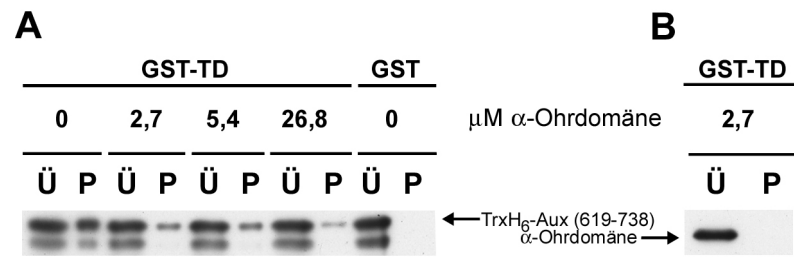


Abbildung 22: Kompetitionsbindungsexperiment von GST-TD und der Ohrdomäne von α -Adaptin um TrxH₆-Aux (619-738). Es wurde die äquimolare Menge bzw. ein zwei- oder zehnfacher Überschuß der α -Ohrdomäne verglichen mit der Auxilinkonzentration zugegeben. Überstände (Ü) und Pellets wurden in einem Westernblot analysiert. Schon geringe Konzentrationen des AP-2-Fragments reichten dabei aus, um TrxH₆-Aux (619-738) effektiv zu verdrängen.

Für den direkten Nachweis der Assoziation eines einzelnen Motivs mit AP-2 und Clathrin, wurde ein TrxH₆-Fusionsprotein eines Peptids exprimiert, das nur das dritte ⁶⁷⁴DPF-Motiv von Auxilin und vier weitere Reste umfaßte, die zwischen Auxilin und GAK konserviert sind. Das DPFADLG-Peptid besaß sowohl zu GST-TD als auch zur GST- α -Ohrdomäne eine schwache Affinität und war zudem in der Lage, an intakte und trypsinisierte Clathrinkäfige zu binden (Abb. 23 A und B). Auf diese Weise konnte direkt gezeigt werden, daß ein oder mehrere DPF-Motive in der Auxilinsequenz mit AP-2 und Clathrin interagieren. Bislang war diese Aussage nur indirekt mit Fragmenten und Mutanten von Auxilin möglich.

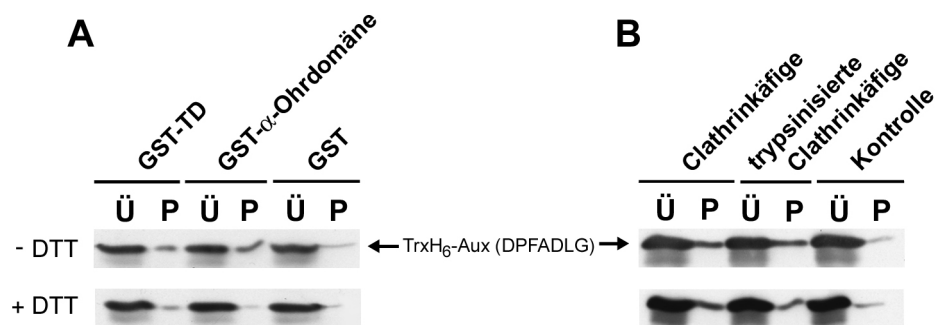


Abbildung 23: Bindung von TrxH₆-Aux (DPFADLG) an Clathrin-TD und an die α -Ohrdomäne von AP-2 als immobilisierte GST-Fusionsproteine (A) sowie an intakte und trypsinverdaute Clathrinkäfige ohne terminale Domänen (B). Als Kontrolle diente die Bindung an GST bzw. spontan präzipitiertes Protein. Die Experimente wurden sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von 1 mM DTT durchgeführt. Gezeigt werden Westernblots von Überständen (Ü) und Pellets (P) der abzentrifugierten Reaktionsansätze. Unter reduzierenden Bedingungen, unter denen das Auxilinpeptid nicht dimerisieren konnte, waren noch schwache Interaktionen mit Clathrin möglich, während sich eine Wechselwirkung mit AP-2 nicht mehr nachweisen ließ.

3.8.2 Konkurrenz von Auxilin und AP180 um Clathrin und AP-2

AP180 bindet wie Auxilin sowohl an AP-2 als auch an die terminale Domäne von Clathrin und enthält zwei DPF-Motive sowie dreimal die Sequenz FxDxF, die an der Interaktion mit AP-2 beteiligt sind (Brett *et al.*, 2002). Es wird vermutet, daß zwölf D(I/L)(F/L)-Tripeptide in der Aminosäuresequenz zur Clathrinbindungsdomäne gehören. Da sich AP180 und Auxilin somit einige Bindungsmotive teilen, wäre es denkbar, daß beide Proteine auch miteinander um die Assoziation mit der α -Ohrdomäne und der terminalen Domäne konkurrieren. Diese Möglichkeit wurde in einem Konkurrenzexperiment von H₆-Aux (547-715) und H₆-AP180 (328-896) um die Bindung an GST-TD bzw. einem GST-Fusionsprotein der α -Ohrdomäne untersucht. Dabei blieb die eingesetzte Auxilinkonzentration konstant, während von AP180 ein zunehmender molarer Überschuß verwendet wurde. Schon geringe Mengen an H₆-AP180 (328-896) reichten aus, um H₆-Aux (547-715) sehr effektiv in den Überstand zu verdrängen (Abb. 24). Bei einem fünffachen Überschuß an AP180 wurde Auxilin quantitativ an der Assoziation mit GST-TD gehindert. Eine höhere Konzentration von H₆-AP180 (328-896) war erforderlich, um mit der im Vergleich zur terminalen Domäne stärkeren Bindung an die α -Ohrdomäne zu konkurrieren.

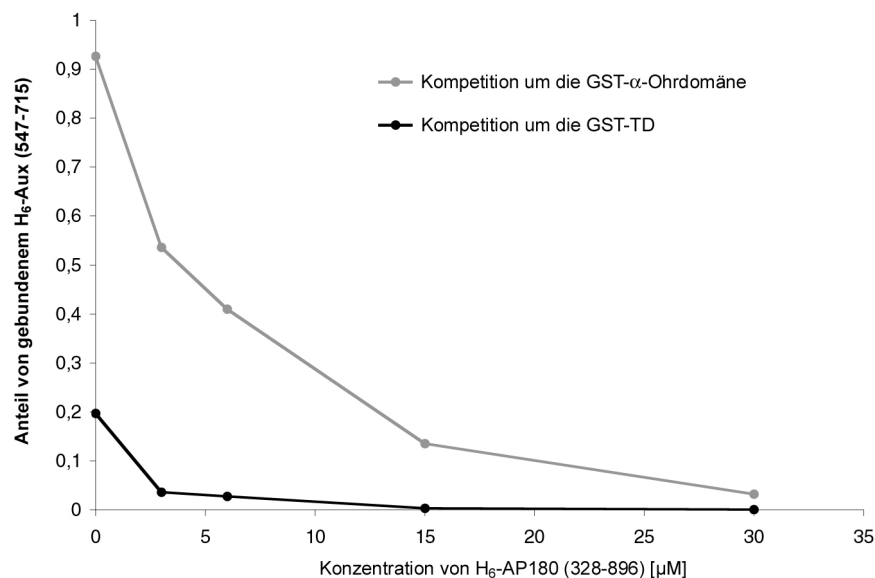


Abbildung 24: Konkurrenzbindungsexperiment von H₆-Aux (547-715) und H₆-AP180 (328-896) um GST-TD bzw. um die GST- α -Ohrdomäne. Für die Konkurrenz wurde die äquimolare Menge bzw. ein zwei-, fünf- oder zehnfacher Überschuß von AP180 im Vergleich zur Auxilinkonzentration eingesetzt. H₆-AP180 (328-896) konnte H₆-Aux (547-715) praktisch quantitativ von den GST-Fusionsproteinen verdrängen, so daß sie gemeinsame oder überlappende Bindungsstellen erkennen müssen.

3.9 Funktionsstudien mit Auxilinfragmenten und -mutanten

3.9.1 Clathrinpolymerisation zu Käfigen

Auxilin wurde in der Literatur zunächst in die Gruppe der sogenannten Clathrin-*Assembly*-Proteine eingeordnet, da es wie AP-2 und AP180 in der Lage war, die Polymerisation von freien Triskelien zu Clathrinkäfigen zu fördern. Wie sich später herausstellte, ist Auxilin an der Hsc70-abhängigen Dissoziation der Hülle von clathrinbedeckten Vesikeln beteiligt. Die Bildung von Clathrinkäfigen scheint daher nicht die eigentliche Funktion von Auxilin bei der Endozytose zu sein, und es ist fraglich, ob diese Eigenschaft eine physiologische Bedeutung hat. Trotzdem wird die Fähigkeit, Clathrin zu polymerisieren, zur funktionellen Aktivität von rekombinanten Auxilinfragmenten gezählt.

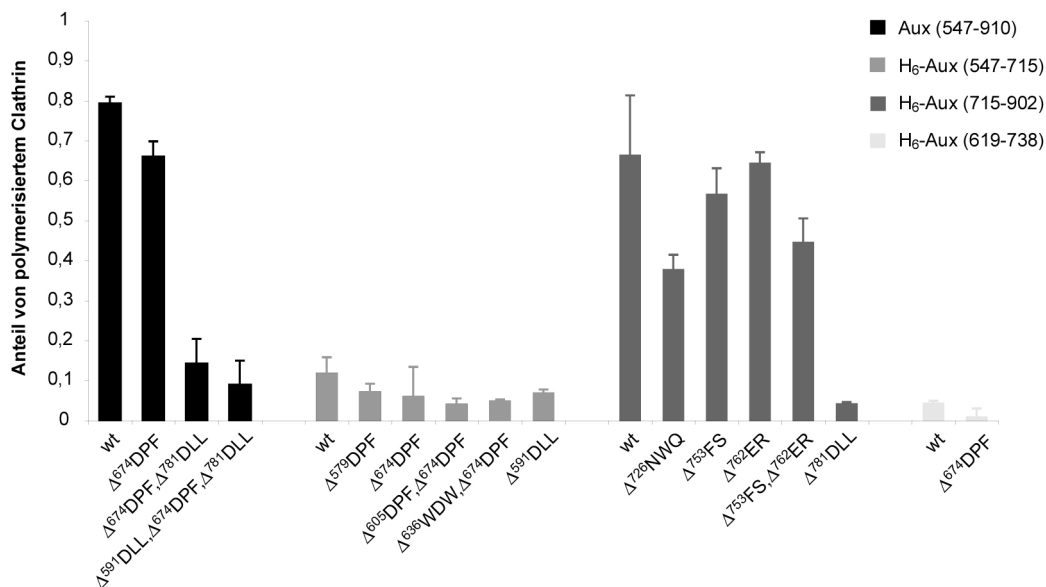


Abbildung 25: Clathrinpolymerisation durch rekombinante Fragmente und Mutanten von Auxilin. Freie Triskelien wurden für eine Stunde auf Eis jeweils mit den Fragmenten Aux (547-910), H₆-Aux (547-715), H₆-Aux (715-902) und H₆-Aux (619-738) bzw. den angegebenen Auxilinmutanten inkubiert und die zusammengelagerten Clathrinkäfige anschließend bei 45.000 UpM für 20 Minuten abzentrifugiert. Im Diagramm ist der gemittelte Anteil von polymerisiertem Clathrin aus mehreren unabhängigen Experimenten dargestellt (n ≥ 3), von dem der Clathrinanteil, der sich unter diesen Bedingungen spontan zusammengelagert hatte, bereits abgezogen wurde. Die Polymerisationsaktivität war hauptsächlich in dem C-terminalen Fragment H₆-Aux (715-902) lokalisiert. Das Fehlen der DLL-Motive hatte auf die Clathrinzusammenlagerung verglichen mit anderen Mutationen den größten Einfluß.

Die *Assembly*-Aktivität des Fragments Aux (547-910) ist vergleichbar mit der des ganzen Proteins und wird durch das Vorhandensein der vollständigen Clathrinbindungsdomäne vermittelt (Holstein *et al.*, 1996). Wurde diese Domäne geteilt und in Form von zwei Fusionsproteinen exprimiert, zeigte sich, daß die Aktivität zur Clathrinpolymerisation vor allem im C-terminalen Bereich von Auxilin lokalisiert war.

H₆-Aux (715-902) stimulierte die Zusammenlagerung von Clathrin zu Käfigen nur unwesentlich schwächer als das Fragment Aux (547-910). Der vordere Bereich der Clathrinbindungsdomäne, der im Fragment H₆-Aux (547-715) enthalten war, reichte dagegen nicht aus, um eine effektive Polymerisation von Clathrinkäfigen zu fördern (Abb. 25).

Mit einer Aufteilung der Clathrinbindungsmotive im Aminosäurebereich 715-902 auf die beiden kürzeren Auxilinfragmente TrxH₆-Aux (715-776) und TrxH₆-Aux (778-902) ging ebenfalls die Fähigkeit, die Bildung von Clathrinkäfigen zu stimulieren, verloren (Abb. 26). Auch bei Dimerisierung der Fragmente in Abwesenheit von DTT kam es zum gleichen Ergebnis (ohne Abbildung).

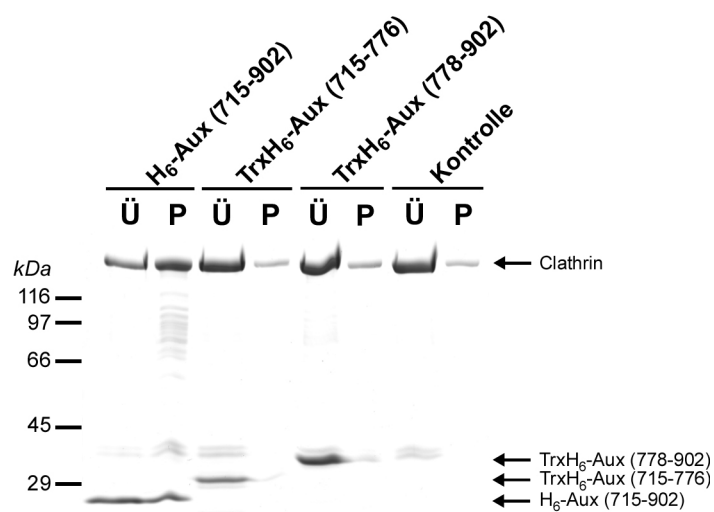


Abbildung 26: Clathrinpolymerisation durch H₆-Aux (715-902), H₆-Aux (715-776) und H₆-Aux (778-902). Clathrintriskelia wurden für eine Stunde auf Eis zusammen mit den rekombinanten Auxilinfragmenten inkubiert. Die zusammengelagerten Käfige konnten anschließend abzentrifugiert werden. Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne Auxilin, aus dem der Anteil von spontan polymerisiertem Clathrin hervorging. Die Überstände (Ü) und Pellets (P) nach der Zentrifugation wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt. Eine weitere Unterteilung des Bereichs von Aminosäure 715-902 in kürzere Auxilinfragmente führte zum Verlust der Polymerisationsaktivität.

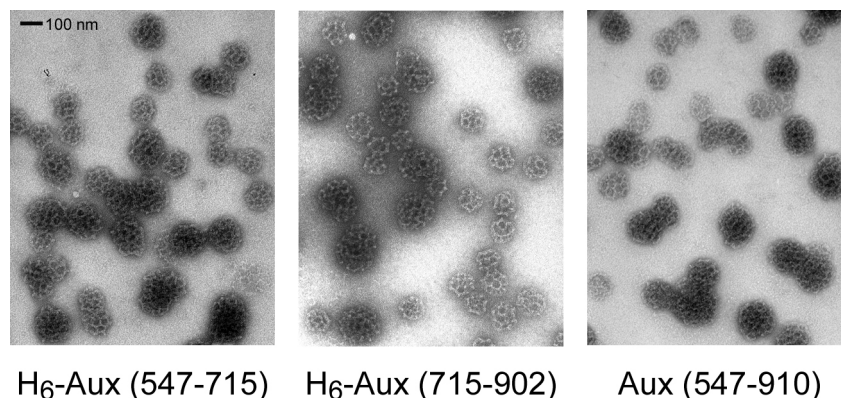


Abbildung 27: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von negativ kontrastierten Clathrinkäfigen, die durch die Auxilinfragmente H₆-Aux (547-715), H₆-Aux (715-902) und Aux (547-910) zusammengelagert wurden. Die Käfige waren relativ heterogen in der Größenverteilung (ca. 80 bis 125 nm) und neigten dazu, Aggregate zu bilden.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen der negativ kontrastierten Käfige sind in Abbildung 27 zu sehen. Die Größenverteilung der Clathrinkäfige war für die beschriebenen Auxilinfragmente ähnlich.

Die Mutation von DPF-Motiven in der Auxilinsequenz hatte nur eine schwache Wirkung auf die *Assembly*-Aktivität. Unter nichtreduzierenden Bedingungen konnte allerdings auch ein Einfluß der DPF-Sequenz auf die Fähigkeit des dimerisierten Auxilinfragments TrxH₆-Aux (619-738), Clathrin zu polymerisieren, festgestellt werden (Abb. 27).

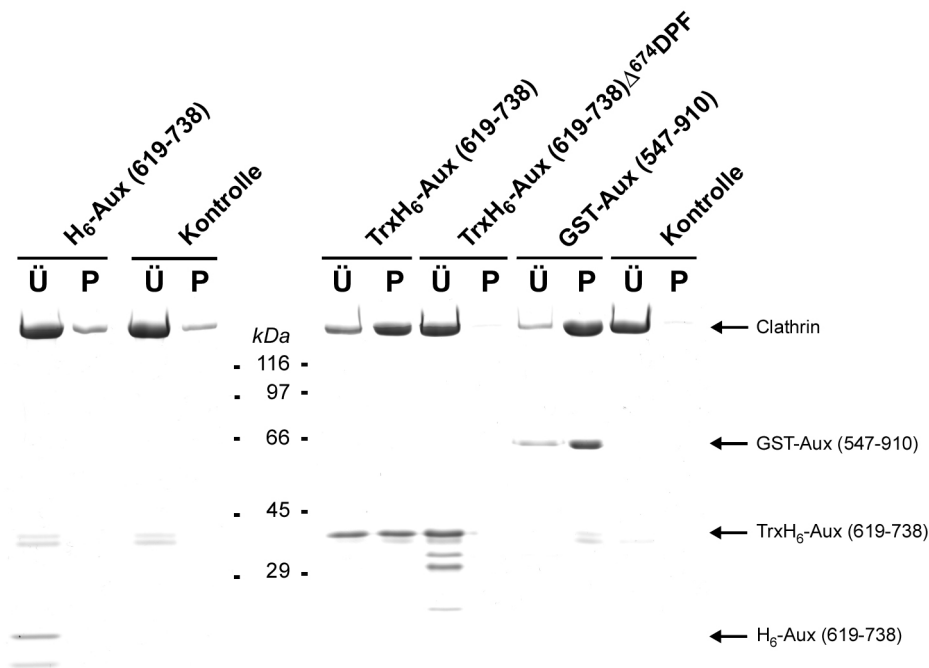


Abbildung 28: Clathrinpolymerisation durch H₆-Aux (619-738) bzw. durch die dimerisierten Auxilinfragmente TrxH₆-Aux (619-738) und TrxH₆-Aux (619-738) Δ^{674} DPF. Clathrin wurde für eine Stunde auf Eis zusammen mit den rekombinanten Auxilinfragmenten inkubiert. Die zusammengelagerten Käfige ließen sich anschließend abzentrifugieren. Überstände (Ü) und Pellets (P) wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und coomassiegefärbt. Als Kontrolle diente der unter diesen Bedingungen spontan polymerisierte Anteil von Clathrin. Unter nichtreduzierenden Bedingungen konnte der Bereich von Aminosäure 619-738 die Polymerisation von Clathrin ähnlich effizient wie GST-Aux (547-910) vermitteln. Wenn eine Dimerisierung des Fragments nicht möglich war oder das 674 DPF-Motiv fehlte, ging diese Eigenschaft verloren.

Mutanten von H₆-Aux (715-902), denen das putative Bindungsmotiv 726 NWQ fehlte, zeigten verglichen mit dem Wildtyp eine Abnahme der Clathrinpolymerisationsaktivität um etwa 40%. Am auffälligsten war jedoch der Effekt bei einer Veränderung der DLL-Sequenzen zu Alaninen. Die Eigenschaft der Auxilinmutanten Aux (547-910) Δ^{674} DPF, Δ^{781} DLL und H6-Aux (715-902) Δ^{781} DLL, Clathrin zu Käfigen zusammenzulagern, war durch den Verlust eines DLL-Motivs gegenüber dem jeweiligen Wildtyp um mehr als 80% reduziert (Abb. 25). Die zwei DLL-Motive in der Clathrin-

bindungsdomäne von Auxilin scheinen jedoch nicht äquivalent zu sein. Obwohl beide Auxilinfragmente jeweils ein DLL-Tripeptid enthalten, besitzt H₆-Aux (547-715) im Unterschied zu H₆-Aux (715-902) nur eine geringe *Assembly*-Aktivität. Für Fragmente von AP180 war dagegen zuvor eine lineare Abhängigkeit der Clathrinpolymerisation von der Zahl der vorhandenen DLL-Sequenzen beobachtet worden (Morgan *et al.*, 2000).

3.9.2 Dissoziation von Clathrinkäfigen

Auxilin wirkt als Kofaktor von Hsc70 beim Zerfall der Hülle von clathrinbedeckten Vesikeln und ermöglicht dadurch deren Fusion mit der jeweiligen Zielmembran. In Gegenwart von Hsc70 und ATP stimuliert Auxilin *in vitro* auch die Dissoziation von rekonstituierten Clathrinkäfigen. Diese Eigenschaft könnte auf eine zelluläre Funktion von Auxilin im Falle einer unspezifischen Aggregation von Clathrin im Zytosol hindeuten. Für diese Reaktion ist das Vorhandensein der terminalen Domänen von Clathrin nicht zwingend erforderlich, so daß auch trypsinisierte Käfige durch Auxilin und Hsc70 dissoziiert werden können.

Um den Zerfall von Clathrinkäfigen zu katalysieren, ist ein Fragment von Auxilin ausreichend, das nur die Clathrinbindungsdomäne und die für eine Interaktion mit Hsc70 benötigte J-Domäne enthält (Holstein *et al.*, 1996). Dessen Aktivität wurde mit der der beiden kürzeren Fragmente H₆-Aux (715-902) und TrxH₆-Aux (778-902) verglichen. Dabei zeigte sich, daß H₆-Aux (715-902) die Dissoziation sowohl von intakten als auch von trypsinverdauten Clathrinkäfigen durch Hsc70 in einem ähnlichen Maß förderte wie das Fragment Aux (547-910), das einen größeren Bereich der Clathrinbindungsdomäne umfaßte. TrxH₆-Aux (778-902) war dagegen nicht in der Lage, den Zerfall von Käfigen zu stimulieren. Folglich müssen in der Region von AS 715-778 Bindungssequenzen für Clathrin enthalten sein, die eine effektive Käfigdissoziation gewährleisten. H₆-Aux (715-902) und TrxH₆-Aux (778-902) besitzen dasselbe ⁷⁸¹DLL-Motiv. Dessen Vorhandensein scheint jedoch nicht die einzige Anforderung an eine funktionelle Clathrinbindungsdomäne zu sein. Dennoch führte der Verlust dieser Bindungssequenz zu einer deutlichen Reduktion der Aktivität der beiden Auxilinfragmente Aux (547-910) Δ^{674} DPF, Δ^{781} DLL und H₆-Aux (715-902) Δ^{781} DLL bei der Dissoziation von Käfigen ohne terminale Domänen. Dieser Effekt war bei intakten Clathrinkäfigen nicht nachzuweisen (Abb. 29 A).

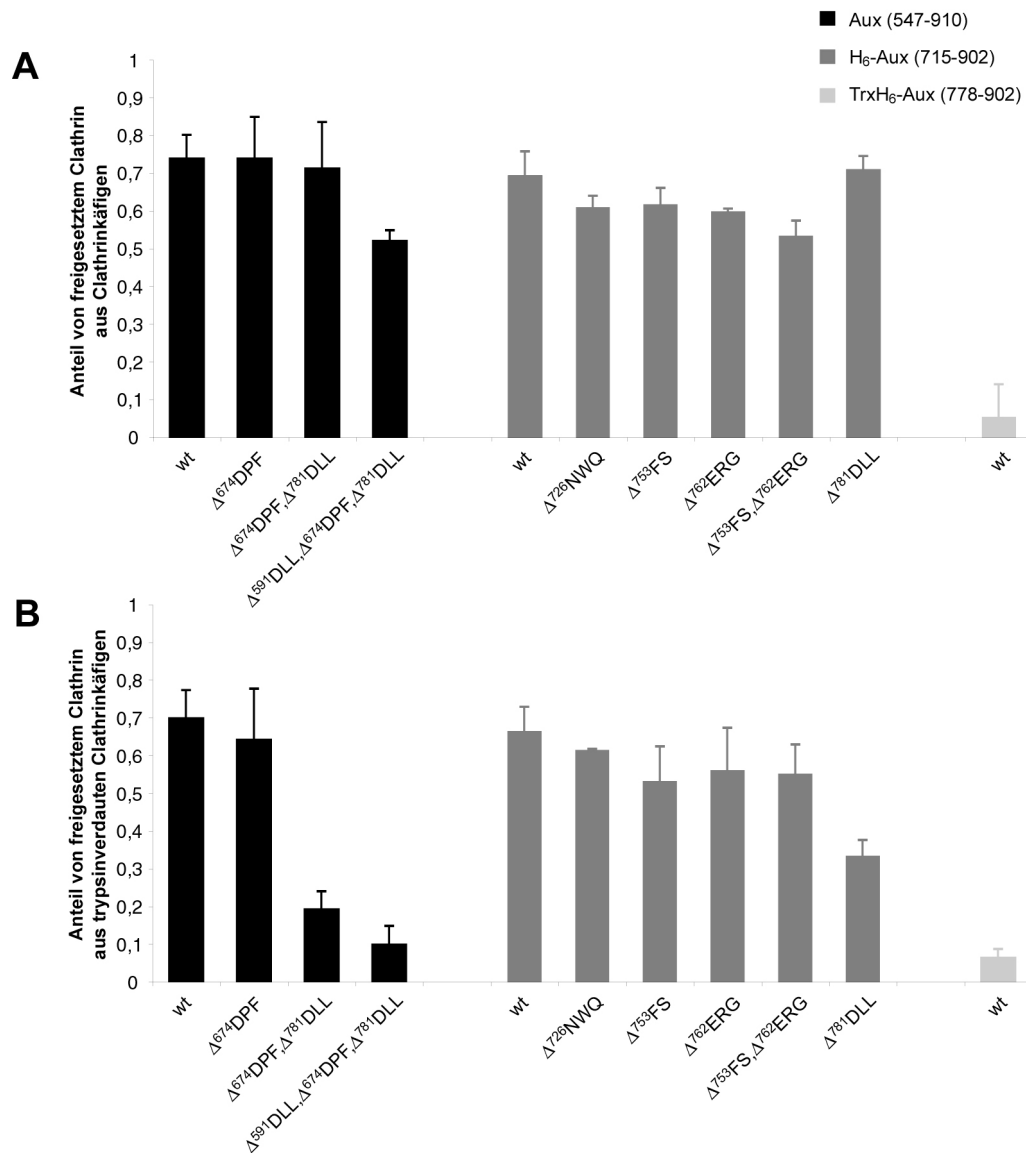


Abbildung 29: Dissoziation von rekonstituierten Clathrinkäfigen (A) und von trypsinverdauten Käfigen, denen die terminalen Domänen fehlen (B), durch die rekombinanten Auxilinfragmente Aux (547-910), H₆-Aux (715-902) und TrxH₆-Aux (778-902). Die Käfige wurden in einem Verhältnis Auxilin:Clathrin von 1:20 in Gegenwart von Hsc70 und ATP für 20 Minuten bei 25°C inkubiert und anschließend abzentrifugiert. Die Anteile freigesetzten Clathrins wurden über mehrere unabhängige Experimente gemittelt ($n \geq 3$). Das C-terminale Fragment, das nur noch den Bereich von Aminosäure 778-902 umfaßt, war im Unterschied zu H₆-Aux (715-902) nicht mehr in der Lage, den Zerfall von intakten oder trypsinbehandelten Clathrinkäfigen zu stimulieren. Wie sich herausstellte sind die DLL-Tripeptide wichtige Motive für diese Aktivität. Für sich genommen reichten sie aber offensichtlich nicht aus, um Clathrinkäfige zu dissoziieren.

Die Interaktion der leichten mit den schweren Ketten vermindert die Stabilität der zusammengelagerten Clathrintriskelia, so daß die unbehandelten Käfige leichter spontan wieder dissoziieren können als die trypsinverdauten, denen die leichten Ketten fehlen. Alternativ könnte auch eine Bindung von Auxilin an die terminale Domäne zu einem besseren Zerfall der intakten Käfige führen. Für diese Möglichkeit spricht, daß die Mutation beider DLL-Tripeptide in Aux (547-910) Δ^{591} DLL, Δ^{674} DPF, Δ^{781} DLL des-

sen katalytische Wirkung gegenüber Aux (547-910) Δ^{674} DPF, Δ^{781} DLL weiter verringert. Abgesehen von den DLL-Motiven war in den Auxilinmutanten der Einfluß anderer Sequenzen auf die Aktivität eher gering. Einen schwachen Effekt schien noch der Austausch der Aminosäuren ⁷⁵³FS zu Alaninen zu haben (Abb. 29).

3.9.3 Dissoziation der Hülle von clathrinbedeckten Vesikeln

Nachdem sich clathrinbedeckte Vesikel in das Zytosol abgeschnürt haben, wird die Hülle um die Vesikel unter dem Einfluß von Auxilin und Hsc70 sehr schnell wieder entfernt. Um diesen Prozeß *in vitro* anders als beim Zerfall rekonstituierter Clathrin-käfige möglichst nah an der Situation in der lebenden Zelle zu untersuchen, wurden clathrinbedeckte Vesikel verwendet. Durch eine milde Behandlung der Vesikel mit Trypsin wurde das endogene Auxilin inaktiviert.

In vitro Dissoziationsexperimente von trypsinbehandelten clathrinbedeckten Vesikeln, in Gegenwart von Hsc70 und ATP sollten Auskunft über die funktionelle Organisation von Auxilin geben. Zu diesem Zweck wurde die Aktivität der rekombinanten Auxilinfragmente Aux (547-910), H₆-Aux (715-902) und TrxH₆-Aux (778-902) bei verschiedenen Konzentrationen miteinander verglichen. Da Auxilin katalytisch wirkt, waren gegenüber der Clathrinkonzentration substöchiometrische Mengen von Auxilin ausreichend. Während H₆-Aux (715-902) bei gleicher Konzentration ca. 75% der Aktivität von Aux (547-910) besaß, konnte TrxH₆-Aux (778-902) nur ca. 10% der CCV im Ansatz dissoziieren (Abb. 30 A und 30 B). Damit zeigt TrxH₆-Aux (778-902) gegenüber CCV eine ähnlich schwache katalytische Aktivität wie bei dem Zerfall von rekonstituierten Clathrinkäfigen. Die Mutation eines ⁶⁴⁷DPF-Motivs im Fragment Aux (547-910) hatte nur eine geringe Wirkung auf die Auxilinfunktion (Abb. 30 A), so daß dieses Bindungsmotiv weder beim Zerfall der Clathrinhülle von CCV noch bei isolierten Käfigen eine große Rolle zu spielen scheint. Von größerer Bedeutung waren dagegen die DLL-Sequenzen. Durch H₆-Aux (715-902) Δ^{781} DLL wurde deutlich weniger Clathrin in den Überstand freigesetzt als durch den Wildtyp (Abb. 30 C). Der Verlust eines weiteren ⁵⁹¹DLL-Motivs in der Aminosäuresequenz von Aux (547-910) Δ^{591} DLL, Δ^{674} DPF, Δ^{781} DLL verstärkte den Effekt von Aux (547-910) Δ^{674} DPF, Δ^{781} DLL noch (Abb. 30 A). Weniger dramatisch wirkten sich dagegen Mutationen der Bindungssequenzen ⁷²⁶NWQ, ⁷⁵³FS und ⁷⁶²ER in dem Fragment H₆-Aux (715-902) auf den Zerfall der Clathrinhülle aus (Abb. 30 C und D). Als zentrales Motiv der Clathrin-

bindungsdomäne stellte sich somit die DLL-Sequenz heraus, deren Funktion möglicherweise durch andere Motive unterstützt wird, die für sich genommen nur einen schwachen Einfluß auf die Dissoziation der Clathrinhülle haben.

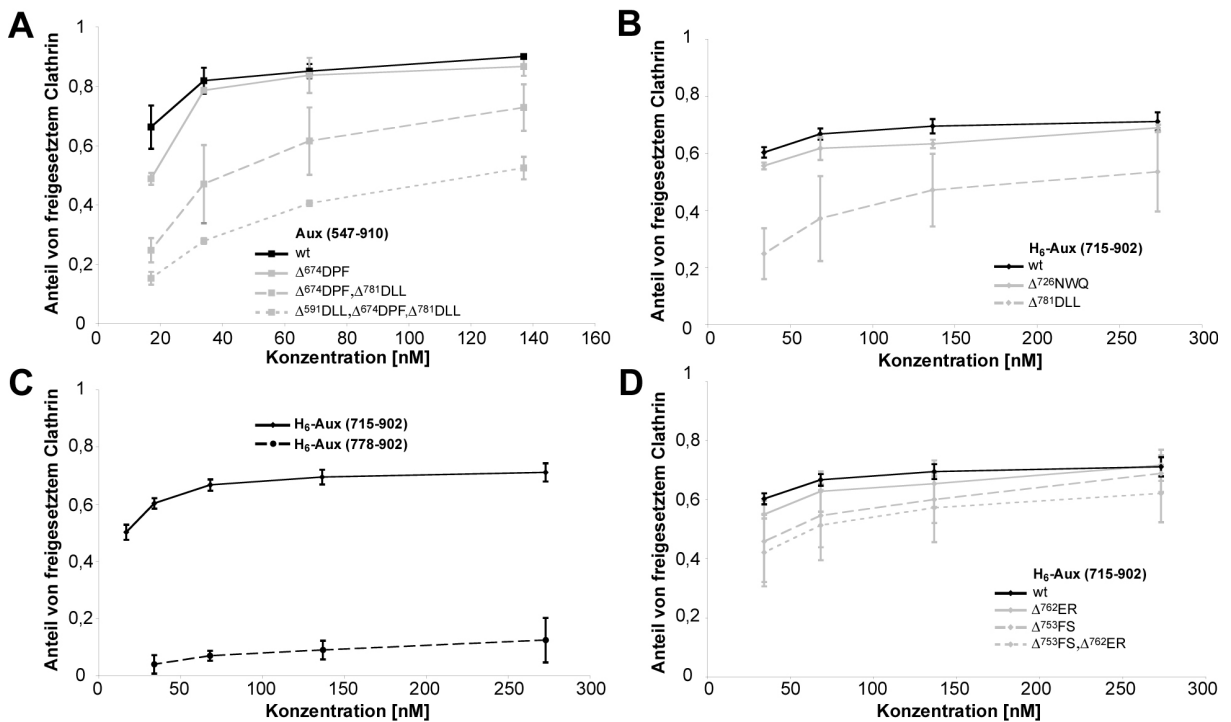


Abbildung 30: Dissoziation der Hülle von clathrinbedeckten Vesikeln mit Aux (547-910) (A), H₆-Aux (715-902) (B) und TrxH₆-Aux (778-902) (C) sowie mit Mutanten dieser Fragmente (A, C und D). Die clathrinbedeckten Vesikel wurden leicht mit Trypsin behandelt, um das endogene Auxilin zu entfernen, und anschließend mit Hsc70, ATP und verschiedenen relativ zum Clathrin substöchiometrischen Auxilinkonzentrationen für 20 Minuten bei 25°C inkubiert. Der nichtdissoziierte Anteil vom freigesetzten Clathrin durch Zentrifugation abgetrennt. Dargestellt sind die Mittelwerte mehrerer unabhängiger Experimente (n ≥ 3). TrxH₆-Aux (778-902) konnte im Unterschied zu H₆-Aux (715-902) den Zerfall der Clathrinhülle nicht nennenswert stimulieren. Den größten Einfluß auf die Dissoziationsaktivität der Auxilinfragmente hatten die DLL-Motive.

4 Diskussion

Die Dissoziation der Hülle von clathrinbedeckten Vesikeln wird durch das Chaperon Hsc70 vermittelt. Wie die meisten Hitzeschockproteine weist es nur eine geringe Substratspezifität auf und benötigt deshalb für seine Rekrutierung an die Clathrinhülle ein J-Domänenprotein. Diese Funktion wird in der Zelle offenbar von Auxilin oder dem ubiquitär exprimierten GAK übernommen, die sowohl an Clathrin als auch über die C-terminale J-Domäne an Hsc70 binden, dessen ATPase-Aktivität stimulieren und damit den Zerfall der Hülle einleiten. Ziel dieser Arbeit war es, die Wirkungsweise von Auxilin auf molekularer Ebene besser zu verstehen und den Widerspruch der Rolle von Auxilin bei der Dissoziation von Clathrinkäfigen und einer Aktivität zur Clathrinpolymerisation zu klären.

Wie andere endozytotische Proteine ist Auxilin in der Lage, *in vitro* die Zusammenlagerung von freiem Clathrin zu Käfigen zu fördern. Bislang ist allerdings noch weitgehend unklar, wie die Interaktion von akzessorischen Proteinen mit Clathrin dessen Polymerisation bewirkt. Eine wichtige Voraussetzung hierfür scheint die Existenz von mehr als einem Clathrinbindungsmotiv zu sein. So verfügt β -Arrestin zwar über das Clathrin Box I Motiv LIEFE, für sich genommen reicht dies aber offensichtlich nicht aus, um einzelne Triskelia zu Clathrinkäfigen zusammenzulagern (Goodman *et al.*, 1997). Unter endozytotischen Proteinen ist die Eigenschaft, neben Clathrin auch AP-2 zu binden, weit verbreitet. Eine zentrale Region weist dabei häufig mehrere aufeinanderfolgende AP-2- und Clathrinbindungsmotive auf. Wie sich bei Amphiphysin (Slepnev *et al.*, 2000), Epsin (Chen *et al.*, 1998; Drake *et al.*, 2000) und Hip1R (Metzler *et al.*, 2001) herausstellte, bestehen diese Motive aus kurzen linearen Peptidsequenzen, die jeweils schwach affine Protein-Protein-Interaktionen vermitteln. Hierzu gehören die DPF/W-, FxDxF-, sowie Clathrin Box I [L(L,I)(D,E,N)(L,F)(D,E)] und Box II Motive, die bislang als PWDLW bei Amphiphysin bzw. als LMDLA bei Epsin beschrieben wurden (Drake, 2001). Möglicherweise zählt auch die Sequenz LLDLL der γ -Ohrdomäne von AP-1 zu den Box II Motiven. Bei dem Bindungsmotiv DLL scheint es sich dagegen eher um eine degenerierte Variante der Clathrin Box Motive zu handeln. Das D(L/I)(L/F)-Tripeptid ist in mehreren Kopien in AP180 vorhanden. Auch Auxilin enthält in einer zentralen Region zwei DLL- sowie drei DPF-Motive, die in der Sequenz alternierend auftreten. Dieser Bereich wurde als Clathrinbindungsdomäne identifiziert (Holstein *et al.*, 1996).

Ein weiteres gemeinsames Merkmal scheint das Vorhandensein einer unstrukturierten Region in der Aminosäuresequenz vieler akzessorischer Proteine zu sein, über die die Interaktion mit AP-2 und Clathrin erfolgt. Dies konnte nicht nur wie in dieser Arbeit für Auxilin, sondern zuvor auch für Epsin und AP180 durch Sekundärstrukturanalyse gezeigt werden (Brett *et al.*, 2002; Kalthoff *et al.*, 2002). Für einige andere Proteine wie Eps15 und Amphiphysin wird mit Hilfe von Computerprogrammen ebenfalls eine ungeordnete Bindungsdomäne für AP-2 und Clathrin prognostiziert. Eine funktionelle Wechselwirkung mit der terminalen Domäne von Clathrin setzt offenbar auch keine definierte Faltung der Polypeptidkette voraus. So führte die Assoziation mit der terminalen Domäne bei Auxilin nicht zu einem Gewinn an Sekundärstruktur. Für die Interaktion mit der α -Ohrdomäne von AP-2 scheint ähnliches zu gelten, da eine Bindung beispielsweise bei Epsin keine Struktur induziert hatte, die CD-spektroskopisch nachweisbar war. Das Fehlen ausgeprägter Sekundärstrukturelemente in der AP-2- und Clathrinbindungsdomäne erklärt, warum kurze Peptidsequenzen für eine Interaktion ausreichen. In einem unstrukturierten Bereich können durch die Ausbildung von Schleifen die großen hydrophoben Reste der DPF/W-Sequenzen den Bindungstaschen auf der α -Ohrdomäne präsentiert werden (Brett *et al.*, 2002). Der wesentliche Vorteil einer solchen Konformation liegt in der hohen Flexibilität, die in einem größeren Einfangradius für eine spezifische Bindungsstelle resultiert. Der gefaltete Zustand besitzt verglichen dazu nur eine eingeschränkte Konformationsfreiheit (Shoemaker *et al.*, 2000). Durch die größere Akzessibilität der Motive können diese kooperativ wirken und so die Affinität der Bindungsdomäne erhöhen.

Die Bindung eines Proteins an die α -Ohrdomäne hängt von der Anzahl der vorhandenen DPF/W-Motive in der Sequenz ab. Epsin, das mehrere Kopien des DPW-Tripeptids enthält, interagiert mit einer zusätzlichen Region auf der α -Ohrdomäne, die sich von der gemeinsamen Bindungsstelle für DPF/W-Motive unterscheidet. Daher ist die Assoziation von Epsin und Eps15, die acht bzw. 15 mal die Sequenz DPW bzw. DPF enthalten, mit AP-2 stärker als die von AP180 und Amphiphysin, bei denen dieses Motiv seltener auftritt. Eine höhere Avidität könnte dabei die Folge einer gleichzeitigen Interaktion mit mehreren α -Ohrdomänen sein. Die FxDxF-Bindungsmotive, die in AP180 und Amphiphysin und Hip1R identifiziert wurden, scheinen zudem für die Assoziation dieser Proteine mit der α -Ohrdomäne eine größere Rolle zu spielen als die DPF-Motive (Brett *et al.*, 2002; Mishra *et al.*, 2001).

Da die Clathrinbindungsdomäne von Auxilin, AP180, Epsin und Amphiphysin strukturell ähnlich aufgebaut sind, erscheint es naheliegend, daß diese Proteine auch die Eigenschaft teilen, Clathrin zu polymerisieren. Es stellt sich daher zwangsläufig die Frage, ob sich Auxilin lediglich durch das Vorhandensein einer J-Domäne, die die Interaktion mit Hsc70 vermittelt, von anderen akzessorischen Proteinen, die an der Bildung von clathrinbedeckten Vesikeln beteiligt sind, unterscheidet und dadurch zum Kofaktor bei der Dissoziation von Clathrinkäfigen wird. Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten zeigen, daß sich Auxilin noch durch weitere Kriterien gegenüber Proteinen wie AP180 für eine Rolle bei dem Hsc70-abhängigen Zerfall der Hülle von clathrinbedeckten Vesikeln auszeichnet. Einen Ansatz zur Klärung dieser Frage lieferte vor kurzem auch ein chimäres Protein aus der Clathrinbindungsdomäne von AP180 und der J-Domäne von Auxilin, dessen Aktivität mit der von Auxilin bei der Dissoziation von Clathrinkäfigen verglichen wurde (Ma *et al.*, 2002). Wie sich herausstellte war dieses Protein zwar in der Lage, den Zerfall von rekonstituierten Clathrinkäfigen zu stimulieren, es war dabei aber weniger effektiv und wirkte nicht wie Auxilin katalytisch. AP180 bindet Clathrin durch die Wechselwirkung mit der terminalen Domäne, während Auxilin zusätzlich eine Affinität zur distalen Domäne von Clathrin besitzt. Möglicherweise liegt in den verschiedenen Clathrinbindungseigenschaften der wesentliche Unterschied zwischen Auxilin und AP180 bzw. dem chimären Protein bei der Zusammenlagerung und Dissoziation von Clathrinkäfigen. *Assembly*-Proteine könnten durch die gleichzeitige Assoziation mit den terminalen Domänen von verschiedenen Triskelia, die im Käfig schließlich unterhalb der Ecken zusammenkommen, oder, wie für Auxilin gezeigt wurde, auch durch eine Interaktion mit den distalen Domänen die Polymerisation eines Clathringitters bewirken. In beiden Fällen würden so zunächst schwache Clathrin-Clathrin-Interaktionen stabilisiert.

Die Clathrinbindungsdomäne von Auxilin läßt sich in zwei Subdomänen unterteilen, die etwa den Fragmenten H₆-Aux (547-715) und H₆-Aux (715-902) entsprechen. Das vordere Fragment enthält sämtliche DPF- sowie eines der beiden DLL-Motive und besitzt eine hohe Affinität zur α -Ohrdomäne von AP-2 und der terminalen Domäne von Clathrin. H₆-Aux (547-715) kann allerdings freie Triskelia nur schlecht zusammenlagern und ein Auxilinkonstrukt einer anderen Arbeitsgruppe, in dem der Bereich von Aminosäure 754-834 deletiert wurde, konnte Clathrinkäfige nur in geringem Maße dissoziieren (Ma *et al.*, 2002). Das C-terminale Auxilinfragment H₆-Aux (715-902) interagiert dagegen nur schwach mit der α -Ohrdomäne und der terminalen Domäne.

Die Clathrinbindung wird vor allem über eine Assoziation mit der distalen Domäne vermittelt, die bei H₆-Aux (547-715) nur wenig ausgeprägt ist. Dabei stimuliert H₆-Aux (715-902) die Polymerisation von Clathrin trotz der geringen Affinität zur terminalen Domäne sowie den Zerfall von Käfigen nur unwesentlich schlechter als das ganze Protein. Beide Auxilinfragmente zeichnen sich somit durch ein komplementäres Bindungsverhalten für AP-2 und Clathrin aus, was die unterschiedlichen funktionellen Eigenschaften erklärt. Für die Clathrinpolymerisation scheint häufig eine Interaktion mit den terminalen Domänen auszureichen, da für viele Proteine, die diese Eigenschaft aufweisen, keine Bindung an die distalen Domänen von Clathrin nachgewiesen werden konnte. AP180 besitzt im Bereich von Aminosäure 305 bis zum C-Terminus zwölfmal das Tripeptid D(I/L)(F/L). Die hohe Aktivität von AP180 zur Clathrinzusammenlagerung scheint in direktem Zusammenhang mit der Anzahl dieser Motive zu stehen, da ein progressiver Verlust dieser Sequenzen in einer verminderten Polymerisationsaktivität der entsprechenden AP180-Fragmente resultiert (Morgan *et al.*, 2000). Auxilin enthält nur zwei DLL-Motive in der Clathrinbindungsdomäne, aber im Rahmen dieser Arbeit konnten weitere Bindungssequenzen identifiziert werden, die ebenfalls an der Interaktion mit der terminalen Domäne beteiligt sind. Die meisten dieser Motive treten in dem Auxilinfragment H₆-Aux (547-715) auf. Da ihr Vorhandensein nicht zwangsläufig eine hohe Polymerisationsaktivität für Clathrin zur Folge hat, könnten die schwache Affinität zur distalen Domäne sowie ein zu geringer Abstand der Bindungssequenzen für die terminale Domäne hierfür verantwortlich sein. Folgen die Motive zu dicht aufeinander, wäre es nicht möglich, mehrere terminale Domänen durch eine gleichzeitige Interaktion miteinander zu verknüpfen. In diesem Zusammenhang sind Deletionsmutanten von Amphiphysin 2 und der γ -Scharnierregion von AP-1 interessant, die im Hinblick auf ihre Clathrinbindungsfähigkeit untersucht wurden. Die γ -Scharnierregion besitzt zwei LLDLL Sequenzen und Amphiphysin 2 die Pentapeptide ³⁹⁰LLDLD und ⁴¹⁶PWDLW, die jeweils für die Interaktion mit Clathrin essentiell sind. Eine verringerte Distanz zwischen den Motiven, resultierte in einem vollständigen Verlust oder wie bei Amphiphysin 2 zumindest zu einer signifikanten Reduktion der Clathrinbindung (Doray und Kornfeld, 2001; Drake und Traub, 2001). Die Existenz zahlreicher Bindungsmotive für die terminale Domäne im Bereich von Aminosäure 547-715 scheint daher erst im Zusammenspiel mit der C-terminalen Region für die Funktion der gesamten Clathrinbindungsdomäne von Auxilin von Bedeutung zu sein.

Wie sich herausstellte, beeinflusst neben den DLL-Bindungsmotiven auch die Sequenz NWQ die Fähigkeit zur Clathrinpolymerisation. Nach Mutation der Sequenz ⁷²⁶NWQ zu AAA zeigt H₆-Aux (715-902) eine deutlich reduzierte Aktivität, Clathrin zusammenzulagern. Dieses Motiv fehlt dem Fragment H₆-Aux (547-715), während es in einem Deletionsfragment von Auxilin (AS 509-754/834-910) (Ma *et al.*, 2002) vorhanden ist. Diese Tatsache könnte das unterschiedliche Verhalten beider Fragmente bei der Zusammenlagerung von Clathrinkäfigen erklären. Die Kombination von einem DLL- und einem NWQ-Bindungsmotiv im richtigen Abstand zueinander scheint einen Einfluß auf die Clathrinpolymerisationsfähigkeit von akzessorischen Proteinen zu haben. Auch die Sequenz DPFADL, die in dem Auxilinfragment TrxH₆-Aux (619-738) neben den Motiven ⁶³⁶WDW und ⁷²⁶NWQ enthalten ist, kann die Polymerisation von freien Triskelia zu Käfigen begünstigen. Als Dimer ist die *Assembly*-Aktivität dieses Fragments mit der des ganzen Proteins vergleichbar. Unter reduzierenden Bedingungen ist das Fusionsprotein jedoch nicht in der Lage, bei einem zweifachen molaren Überschuß zum Clathrin dieses effektiv zu Käfigen zusammenzulagern. Ein Fragment von AP180 (739-901), das keine DLL-Motive, aber die Sequenzen ⁷⁸⁷NWQ und ⁸⁸⁵DPLADL aufweist, zeigt bei doppelt so hoher molarer Konzentration wie Clathrin ebenfalls keine Polymerisationsaktivität. Erst bei einem 20-fachen Überschuß können ca. 40% des eingesetzten Clathrins pelletiert werden, während ein Fragment, das die gesamte Clathrinbindungsdomäne umfaßt, etwa 20 mal effizienter ist (Morgan *et al.*, 2000). Die beiden kürzeren Fragmente von Auxilin und AP180 haben ähnliche Clathrinpolymerisationseigenschaften, die offenbar von vergleichbaren Motiven bestimmt werden. Durch eine höhere lokale Konzentration, die entweder über eine Dimerisierung des Fragments oder über einen größeren molaren Überschuß im Vergleich zum Clathrin erreicht werden kann, läßt sich bei beiden Fragmenten eine gewisse Aktivität zur Polymerisation von Clathrin induzieren.

Das Vorhandensein eines NWQ- und eines DLL-Motivs, möglicherweise neben weiteren Bindungssequenzen, und ein geeigneter Abstand dieser Motive zueinander, der die Verknüpfung mehrerer terminaler Domänen sowie eine Interaktion mit den distalen Domänen erlaubt, könnte der Grund dafür sein, daß der Bereich im Auxilin von Aminosäure 715-902 ausreicht, um eine effektive Clathrinpolymerisation zu gewährleisten. Kürzere Fragmente von Auxilin könnten entweder eine oder beide Bedingungen nicht erfüllen. Tatsächlich ließ sich experimentell bestätigen, daß eine Zusammenlagerung von Clathrin beeinträchtigt wird, wenn Bindungsmotive für die ter-

minale Domäne fehlen. Die beiden Fragmente TrxH₆-Aux (715-776) und TrxH₆-Aux (778-902), die den Bereich von Aminosäure 715-902 weiter unterteilen, enthalten jeweils nur eines der ⁷²⁶NWQ- oder ⁷⁸¹DLL-Motive und können im Gegensatz zu H₆-Aux (715-902), Clathrin nicht mehr zu Käfigen polymerisieren. Eine andere Arbeitsgruppe konnte für ein Auxilinfragment, das von Aminosäure 737 bis zum C-Terminus reicht und dem das ⁷²⁶NWQ-Motiv fehlt, ebenfalls keine Polymerisationsaktivität feststellen (Ma *et al.*, 2002). Die Ergebnisse mit diesen Fragmenten liefern Hinweise für die Bedeutung bestimmter Clathrinbindungssequenzen und eines gewissen Mindestabstands der Motive zueinander als Voraussetzungen für die Zusammenlagerung von Clathrinkäfigen.

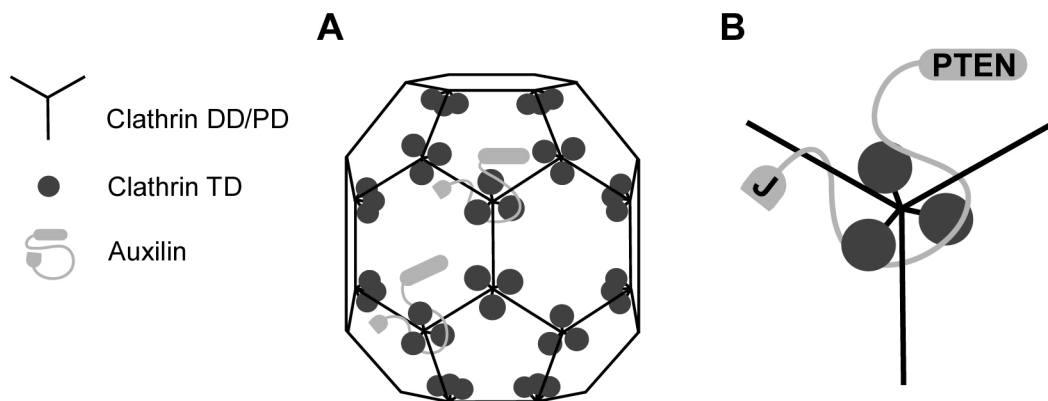


Abbildung 31: Modell zur Zusammenlagerung von Clathrinkäfigen durch Auxilin. (A) Clathrinkäfig mit terminalen Domänen und Auxilin; (B) Detailabbildung von A. Der zentrale Bereich von Auxilin, der die Clathrinbindungsdomäne enthält, ist weitestgehend ungefalted und ermöglicht Auxilin, gleichzeitig an mehrere terminale Domänen sowie an die distale Domäne zu binden. Auf diese Weise könnte Auxilin sowohl durch das Verknüpfen von drei terminalen Domänen unterhalb der Ecken des Käfigs als auch durch die Interaktion mit den distalen Domänen die Gitterstruktur stabilisieren.

Die Dissoziation der Hülle von clathrinbedeckten Vesikeln scheint dagegen noch weitere Anforderungen an Auxilin als Kofaktor bei diesem Prozeß zu stellen als die, die im Zusammenhang mit der Aktivität zur Clathrinpolymerisation genannt wurden. Nicht alle Fragmente von Auxilin, die die J-Domäne enthalten und Clathrin binden, sind in der Lage, den Hsc70-abhängigen Zerfall von Käfigen *in vitro* zu stimulieren. TrxH₆-Aux (778-902) enthält neben der C-terminalen J-Domäne ein DLL-Motiv, dessen Interaktion mit Clathrin offenbar nicht ausreicht, um Käfige zu dissoziieren. Auch der vordere Bereich der Clathrinbindungsdomäne hat zusammen mit der J-Domäne nicht diese Wirkung, wie die Deletionsmutante von Auxilin (AS 509-754/834-910) zeigt (Ma *et al.*, 2002). Allerdings ist nicht auszuschließen, daß eine nichtfunktionelle J-Domäne zu diesem Ergebnis geführt hatte, da in dem Fragment ein helikaler Be-

reich kurz vor oder bereits in der J-Domäne durch die Deletion unterbrochen wurde (Han *et al.*, 2000; Ma *et al.*, 2002).

Im Hinblick auf die Funktion von Auxilin bei der Dissoziation von Clathrinkäfigen könnte die Unterteilung der Clathrinbindungsdomäne in zwei Subdomänen eine Rolle spielen. H₆-Aux (547-715) besitzt eine große Affinität zur terminalen Domäne von Clathrin während das C-terminale Fragment H₆-Aux (715-902) vor allem mit der distalen Domäne assoziiert ist. Da Auxilin im Zusammenspiel mit Hsc70 auch Clathrin käfige, denen nach einem limitierten Verdau mit Trypsin die terminalen Domänen fehlen, *in vitro* dissoziieren kann, scheint für diese Eigenschaft eine Interaktion mit der distalen Domäne verantwortlich sein. Durch die Mutation der DLL-Motive in der Clathrinbindungsdomäne konnte direkt ein Einfluß dieser Sequenzen auf die Bindung an die distale Domäne nachgewiesen werden, die für die Assoziation von Auxilin mit Clathrinkäfigen und die Rekrutierung von Hsc70 notwendig war. Unter den Clathrinbindungsmotiven in der Auxilinsequenz nimmt das DLL-Tripeptid dadurch eine besondere Stellung ein, da es nicht nur an der Zusammenlagerung, sondern auch an dem Zerfall von Clathrinkäfigen beteiligt ist. Das für die Clathrinpolymerisation wichtige Motiv NWQ spielt bei dem Zerfall von Käfigen dagegen keine Rolle, da das Auxilinfragment (738-902), dem diese Sequenz fehlt und das keine *Assembly*-Aktivität zeigt, Hsc70 zu Käfigen rekrutieren und diese dadurch dissoziieren kann (Ma *et al.*, 2002). Das kürzeste Fragment von Auxilin, das in dieser Arbeit untersucht wurde und Clathrinkäfige noch effizient dissoziiert, ist H₆-Aux (715-902). Die Beobachtung, daß trypsinverdaute Käfige ohne terminale Domänen ebenfalls in Gegenwart von Auxilin und Hsc70 zerfallen, stimmt mit der bevorzugten Bindung von H₆-Aux (715-902) an die distale Domäne von Clathrin überein. Ein Dissoziation von Clathrinkäfigen scheint allerdings auch in einem gewissen Maß über die Interaktion mit der terminalen Domäne möglich zu sein, wie ein chimäres Protein aus der J-Domäne von Auxilin und einem Fragment von AP180 zeigt, das nur an die terminale, nicht aber an die distale Domäne von Clathrin bindet. Allerdings war die Aktivität dieses Konstrukts deutlich geringer als die von Auxilin (Ma *et al.*, 2002). Die Assoziation von Auxilin mit der distalen Domäne könnte dafür sorgen, daß Hsc70 korrekt auf der schweren Kette von Clathrin positioniert wird, während eine Interaktion mit der terminalen Domäne dazu dienen könnte, sicherzustellen, daß Hsc70 nur an polymerisiertes Clathrin und nicht an freigesetzte Triskelia im Zytosol rekrutiert wird. Eine Platzierung von Hsc70, die nur über die terminale Domäne vermittelt wird, ist offenbar weniger effizient. Die Affi-

nität von Auxilin für Clathrin wird durch die Existenz von mehreren Bindungsorten erhöht und könnte gewährleisten, daß es hinreichend lange gebunden bleibt, um Hsc70 zum richtigen Bindungsort auf der schweren Kette von Clathrin zu dirigieren.

In der Aminosäuresequenz von Auxilin existieren überlappende oder gemeinsame Bindungsmotive sowohl für die terminale und distale Domäne von Clathrin als auch für die α -Ohrdomäne von AP-2. Hierzu gehören die DLL-Tripeptide, die an beide Clathrindomänen binden, die DPF-Motive, die mit Clathrin und AP-2 assoziiert sein können und schließlich die WDW-Sequenz, die die Bindung von der terminalen Domäne und der α -Ohrdomäne beeinflusst. Auch für Amphiphysin wurde ein Motiv beschrieben, das eine Assoziation mit Clathrin und AP-2 vermitteln konnte (Drake und Traub, 2001). Die entsprechende Sequenz PWDLW hat dabei eine gewisse Ähnlichkeit zum ⁶³⁶WDW-Motiv von Auxilin. Für den Bereich von Aminosäure 547-715 konnte gezeigt werden, daß sich eine gleichzeitige Bindung von AP-2 und Clathrin ausschließt. Diese Tatsache bietet Angriffspunkte zur Regulation der Funktion von Auxilin, da durch die Modifikation von bestimmten Motiven einzelne Interaktionen gezielt verhindert oder ermöglicht werden könnten. Auxilin wurde als Phosphoprotein identifiziert (Morris *et al.*, 1990), das vor allem im vorderen Bereich der Clathrinbindungsdomäne zahlreiche Serin- und Threoninreste als potentielle Phosphorylierungsstellen enthält. Für ein untersuchtes Protein können verschiedene Computerprogramme (z.B. *Pattern Search*) Aminosäurereste prognostizieren, die durch bekannte Kinasen phosphorylierbar sind. So entsprechen beispielsweise die Serine in den Sequenzen SGQ⁵⁹¹DLL und S⁶⁰⁵DPF sowie das zweite Serin von ⁷⁵³FSS dem Konsensus der Caseinkinase I. Das Serin in SGQ⁵⁹¹DLL könnte zudem Substrat für die Caseinkinase II sein, die auch Bestandteil von clathrinbedeckten Vesikeln ist (Bar-Zvi und Branton, 1986). Eine weitere Proteinkinase in CCV ist AAK1 (Conner und Schmid, 2002), die bislang nur mit einer Phosphorylierung der μ -Untereinheit von AP-2 in Zusammenhang gebracht werden konnte. AAK1 zeigt eine Homologie zu der GAK-Kinasedomäne, von der bekannt ist, daß sie eine Autophosphorylierung von GAK bewirkt. Möglicherweise könnte die AAK1 Kinase daher auch Auxilin phosphorylieren.

Auxilin und AP180 konkurrieren *in vitro* sowohl um die Bindung an die terminale Domäne von Clathrin als auch an AP-2. Schon für einige andere akzessorische Proteine konnte gezeigt werden, daß sie mit AP-2 über die gleichen Bindungstaschen auf der α -Ohrdomäne assoziiert sind (Owen *et al.*, 1999). Hierfür könnten vergleich-

bare Bindungsmotive dieser Proteine eine Rolle spielen. In diesem Zusammenhang wurden bereits die DPF/W- und DLL-Tripeptidsequenzen, sowie die Clathrin Box Motive I und II genannt, die in vielen endozytischen Proteinen auftreten. In einigen Fällen scheint das DLL-Motiv jedoch eher, wie bei der Clathrinbindungssequenz LLDLL in der γ -Ohrdomäne von AP-1, Bestandteil eines Pentapeptidmotivs zu sein. Im Auxilin sind die beiden Aminosäuren Phenylalanin und Glutamat dem DLL-Motiv vorgelagert, so daß die Sequenz gewisse Ähnlichkeit zu dem AP-2 Bindungsmotiv FxDxF und der als Clathrinbindungsmotiv postulierten Sequenz LDDLL in Epsin bei *C. elegans* aufweist, da es sich sowohl bei Leucin als auch bei Phenylalanin um große, hydrophobe Reste handelt. Auch die Sequenzen ²⁶⁰LADV F und ³⁷⁵FSDPW in Epsin 1 aus Ratte könnten FxDxF-Motiven entsprechen. Wie sich jetzt bei Auxilin herausstellte, gibt es noch weitere, bislang nicht beschriebene Motive und eine strikte Abgrenzung der Bindungsmotive voneinander läßt sich, wie es scheint, nicht mehr aufrechterhalten. Bereits durch Wettbewerbsstudien konnte gezeigt werden, daß die beiden Clathrin Box Motive an dieselbe Furche auf der terminalen Domäne binden (Doray und Kornfeld, 2001). Bislang gibt es jedoch keine eindeutigen Hinweise, die dafür oder dagegen sprechen, daß DLL-haltige Peptide mit den Clathrin Box Motiven um dieselbe Furche konkurrieren. Als Teil eines der anderen Bindungsmotive wäre die Affinität des Tripeptids für denselben Bindungsort auf der terminalen Domäne erwartungsgemäß geringer, und eine Konkurrenz ließe sich nur schwer nachweisen. Das Vorhandensein mindestens eines geladenen und eines großen, hydrophoben Restes könnte der gemeinsame Konsensus aller Motive sein. Selbst ein gewisser Abstand dieser Reste voneinander, wie es bei ⁷⁵³FS und ⁷⁶²ER im Auxilin der Fall ist, scheint diese Anforderung noch zu erfüllen. Auch in der Aminosäuresequenz von Epsin 1 sind mehrere vergleichbare Sequenzen in einem ähnlichen Abstand zueinander vorhanden, wie ²¹⁹LS und ²²⁸ER. Möglicherweise besitzen allerdings auch einzelne Tryptophan- und Phenylalaninreste eine gewisse Affinität zu Clathrin und AP-2. Hierfür sprechen vor allem die Ergebnisse mit den synthetischen Auxilinpeptiden. Ob eine Konkurrenz bei der Interaktion mit der terminalen Domäne und AP-2 zwischen Proteinen wie Auxilin und AP180 physiologische Relevanz besitzt, bleibt jedoch offen. Zum einen ist Auxilin in wesentlich geringeren Konzentrationen als AP180 vorhanden, zum anderen ist unklar, ob es überhaupt zur Sättigung aller Bindungsorte auf den terminalen Domänen und AP-2 kommt.

Ein denkbares Modell, das mit den neuen Erkenntnissen aus dieser Arbeit im Einklang steht, würde davon ausgehen, daß Auxilin zunächst über die Bindung an AP-2 entweder schon zu *coated pit* Strukturen an der Plasmamembran oder zu bereits abgeschnúrten clathrinbedeckten Vesikeln rekrutiert wird. Als Folge einer Phosphorylierung von gemeinsamen Bindungsmotiven für Clathrin und AP-2 könnte die Interaktion mit AP-2 zu Gunsten einer stärkeren Assoziation mit Clathrin unterbunden werden. Vermutlich könnte Auxilin zu einem frühen Zeitpunkt der Endozytose auch ähnlich wie ein *Assembly*-Protein wirken und über die Bindung an die terminale Domäne die Clathrinhülle zusammen mit anderen akzessorischen Proteinen stabilisieren. Die Interaktion von Auxilin mit den terminalen Domänen verschiedener Clathrinmoleküle, die im Käfig unter dem Scheitelpunkt eines Triskelions zusammenkommen, und die gleichzeitige Assoziation mit den distalen Domänen könnten sicherstellen, daß Hsc70 korrekt auf den schweren Ketten des Clathrintriskelions, vermutlich im Bereich der proximalen Domäne, positioniert wird. Während Auxilin an die terminalen Domänen gebunden bleibt, könnte es nacheinander drei Moleküle Hsc70 zu den schweren Ketten eines Clathrintriskelions rekrutieren und dadurch dieses schließlich freisetzen.

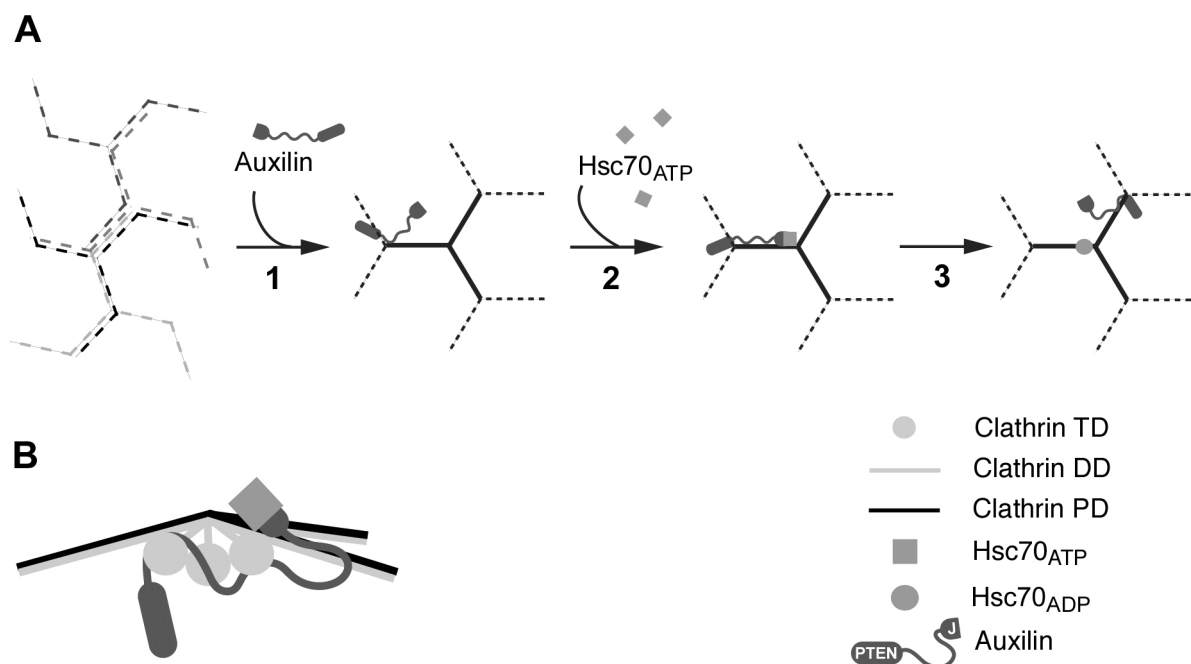


Abbildung 32: Modell zur Hsc70-abhängigen Dissoziation von Clathrin Käfigen durch Auxilin (A) und Detailabbildung von A (B). Auxilin besitzt eine hohe Affinität zu polymerisiertem Clathrin, da es mit drei terminalen Domänen, die unterhalb der Ecken im Käfig zusammenkommen interagieren kann (1). Mehrere Bindungsorte für die distale Domäne stellen sicher, daß die J-Domäne von Auxilin korrekt auf der schweren Kette orientiert wird, um Hsc70 auf der proximalen Domäne zu positionieren (2). Während Auxilin mit den terminalen Domänen assoziiert bleibt, bindet es an die nächste schwere Kette desselben Triskelions (3) und rekrutiert ein weiteres Hsc70. Die Wechselwirkung von Hsc70 mit Clathrin führt zur Freisetzung einzelner Triskelia und schließlich zum Zerfall der Hülle.

Dabei könnte die Aufteilung der Clathrinbindungsdomäne von Auxilin in zwei unterschiedliche Subdomänen eine Rolle spielen. Während der Bereich von Aminosäure 547-715 die Hauptaffinität zur terminalen Domäne besitzt, bindet die C-terminale Region vorrangig an die distale Domäne. Dadurch könnte Auxilin auf dem Clathrinbein fixiert und die J-Domäne korrekt für die Platzierung von Hsc70 ausgerichtet werden. Durch die Bindung von Hsc70 an Clathrin werden entweder nacheinander die Triskelien aus dem Gitterverband gelöst oder durch die Schwächung einzelner Clathrin-Clathrin-Interaktionen schließlich der Zerfall der ganzen Hülle eingeleitet.

Während die Bindung von Auxilin an Clathrin Voraussetzung für eine effiziente Dissoziation der Käfige ist, scheint die Interaktion mit AP-2 nicht unbedingt zu einer Freisetzung der Adaptorproteine beizutragen. Trotzdem kann nicht grundsätzlich ausgeschlossen werden, daß Auxilin durch die Bindung an AP-2 möglicherweise Hsc70 rekrutiert und so auch an der Dissoziation der Adaptorproteine beteiligt ist. Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern allerdings keine Anhaltspunkte für eine solche Funktion von Auxilin, unterstreichen dafür aber die Bedeutung bei dem Hsc70-abhängigen Zerfall der Clathrinhülle. Auxilin unterscheidet sich von anderen akzessorischen Proteinen wie AP180 nicht nur durch das Vorhandensein einer J-Domäne, sondern auch die besondere Organisation der Clathrinbindungsdomäne aus zwei funktionell verschiedenen Subdomänen macht Auxilin zum Kofaktor von Hsc70 beim Zerfall der Hülle von clathrinbedeckten Vesikeln.

Aminosäuresequenz von Auxilin aus Rind

	10	20	30	40	50	60	
MDSSGASSPD	MEPSYGGGLF	DMVKGGAGRL	FSNLKDNLKD	TLKDTSSRVI	QSVTSYTKGD		60
LDFTYVTSRI	IVMSFPLDSV	DIGFRNQVDD	IRSFLDSRHL	DHYTVYNLSP	KSYRTAKFHS		120
RVSECSWPIR	QAPSLHNLFA	VCRNMYNWLL	QNPKNVCVVH	CLDGRAASSI	LVGAMFIFCN		180
LYSTPGPAVR	LLYAKRPGIG	LSPSHRRYLG	YMCDDLADKP	YRPHFKPLTI	KSITVSPVPF		240
FNKQRNGCRP	YCDVLIGETK	IYTTCADFER	MKEYRVQDGK	IFIPLSTTVQ	GDVVVSMYHL		300
	310	320	330	340	350	360	
RSTIGSRLQA	KVINTQIFQL	QFHTGFIPLD	TTVLKFTKPE	LDACDVPEKY	PQLFQVTLDV		360
ELQPHDKVME	LTPPWEHYCT	KDVNPSILFS	SHQEHQDTLV	LGGQAPIDIP	PDNPRHFGQG		420
GFFSTLCWQD	QKSEKSFCEE	DHAALVNQES	EQSDDELLTL	SSPHGNANGD	KPHAARKPSK		480
KQQEPAAPAP	PEDVDLLGLE	GSAVSKNFSS	PAAPPSNSEL	LSDLFGCGGA	AGPVQSCQSG		540
VDDVFHPSGP	TSTQSTPRRS	ATSTSASPTL	RVGEGATFDP	FGAPSKPSGQ	DLLGSFLNTA		600
	610	620	630	640	650	660	
SASS DPF LQP	TRSPSPTVHA	SSTPAVNIQP	DVSGAWD W HT	KPGGFGMGSK	SAATSPTGSS		660
HGTPIHQNKP	QT DPF ADLG	TLGGSSFASK	PSTPTGLGGG	FPPLSSPQKA	SPQPMGGGWQ		720
QGGGY NW QQT	QSKPQSSMPH	SSPQNRPNYN	V SF SMPGGQ	NER GKAAANL	EGKQKAADFE		780
DLL SGQGFNA	HKDKKGPRTI	AEMRKEEMAK	EMDPEKLKIL	EWIEGKERNI	RALLSTMHTV		840
LWAGETKWKP	VGMADLVTPE	QVKKVYRKAV	LVVHPDKATG	QPYEQYAKMI	FMELNDAWSE		900
	910						
FENQGQKPLY							910

Literaturverzeichnis

- Ahle, S. und E. Ungewickell. 1986. Purification and properties of a new clathrin assembly protein. *EMBO J.* 5:3143-9.
- Ahle, S. und E. Ungewickell. 1990. Auxilin, a newly identified clathrin-associated protein in coated vesicles from bovine brain. *J Cell Biol.* 111:19-29.
- Bar-Zvi, D. und D. Branton. 1986. Clathrin-coated vesicles contain two protein kinase activities. Phosphorylation of clathrin beta-light chain by casein kinase II. *J Biol Chem.* 261:9614-21.
- 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., 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.* 17:517-68.
- Bukau, B. und A. L. Horwich. 1998. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell.* 92:351-66.
- 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.* 21:6072-82.
- 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.* 394:793-7.
- 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.* 109:523-35.
- Conner, S. D. und S. L. Schmid. 2002. Identification of an adaptor-associated kinase, AAK1, as a regulator of clathrin-mediated endocytosis. *J Cell Biol.* 156:921-9.
- 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.* 99:179-88.
- Dell'Angelica, E. C., J. Klumperman, W. Stoorvogel und J. S. Bonifacino. 1998. Association of the AP-3 adaptor complex with clathrin. *Science.* 280:431-4.
- 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.* 12:1925-35.
- Drake, M. T., M. A. Downs und L. M. Traub. 2000. Epsin binds to clathrin by associating directly with the clathrin-terminal domain. Evidence for cooperative binding through two discrete sites. *J Biol Chem.* 275:6479-89.
- 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.* 276:28700-9.
- Dyson, H. J. und P. E. Wright. 2002. Coupling of folding and binding for unstructured proteins. *Curr Opin Struct Biol.* 12:54-60.

- 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.
- Flaherty, K. M., D. B. McKay, W. Kabsch und K. C. Holmes. 1991. Similarity of the three-dimensional structures of actin and the ATPase fragment of a 70-kDa heat shock cognate protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88:5041-5.
- 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.* 419:361-6.
- Ford, M. G., B. M. Pearse, 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)P₂ and clathrin by AP180 in the nucleation of clathrin lattices on membranes. *Science.* 291:1051-5.
- Gad, H., N. Ringstad, P. Low, O. Kjaerulff, J. Gustafsson, M. Wenk, G. Di Paolo, Y. Nemoto, J. Crun, M. H. Ellisman, P. De Camilli, O. Shupliakov und L. Brodin. 2000. Fission and uncoating of synaptic clathrin-coated vesicles are perturbed by disruption of interactions with the SH3 domain of endophilin. *Neuron.* 27:301-12.
- 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.* 271:20922-9.
- Gaidarov, I., M. E. Smith, J. Domin und J. H. Keen. 2001. The class II phosphoinositide 3-kinase C2alpha is activated by clathrin and regulates clathrin-mediated membrane trafficking. *Mol Cell.* 7:443-9.
- Gall, W. E., M. A. Higginbotham, C. Chen, M. F. Ingram, D. M. Cyr und T. R. Graham. 2000. The auxilin-like phosphoprotein Swa2p is required for clathrin function in yeast. *Curr Biol.* 10:1349-58.
- Ghosh, P. und S. Kornfeld. 2003. AP-1 binding to sorting signals and release from clathrin-coated vesicles is regulated by phosphorylation. *J Cell Biol.* 160:699-708.
- 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.* 270:23768-73.
- 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.* 272:15017-22.
- Greener, T., X. Zhao, H. Nojima, E. Eisenberg und L. E. Greene. 2000. Role of cyclin G-associated kinase in uncoating clathrin-coated vesicles from non-neuronal cells. *J Biol Chem.* 275:1365-70.
- Han, C. J., J. M. Gruschus, T. Greener, L. E. Greene, J. Ferretti und E. Eisenberg. 2000. Letter to the editor: ¹H, ¹⁵N, and ¹³C NMR backbone assignments and secondary structure of the C-terminal recombinant fragment of auxilin including the J-domain. *J Biomol NMR.* 17:281-2.
- Hannan, L. A., S. L. Newmyer und S. L. Schmid. 1998. ATP- and cytosol-dependent release of adaptor proteins from clathrin-coated vesicles: A dual role for Hsc70. *Mol Biol Cell.* 9:2217-29.

- Hao, W., Z. Luo, L. Zheng, K. Prasad und E. M. Lafer. 1999. AP180 and AP-2 interact directly in a complex that cooperatively assembles clathrin. *J Biol Chem.* 274:22785-94.
- Harris, T. W., E. Hartweg, H. R. Horvitz und E. M. Jorgensen. 2000. Mutations in synaptojanin disrupt synaptic vesicle recycling. *J Cell Biol.* 150:589-600.
- 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.* 19:6011-9.
- Hendrick, J. P. und F. U. Hartl. 1993. Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. *Annu Rev Biochem.* 62:349-84.
- Heuser, J. und C. J. Steer. 1989. Trimeric binding of the 70-kD uncoating ATPase to the vertices of clathrin triskelia: a candidate intermediate in the vesicle uncoating reaction. *J Cell Biol.* 109:1457-66.
- Hill, R. B., J. M. Flanagan und J. H. Prestegard. 1995. 1H and 15N magnetic resonance assignments, secondary structure, and tertiary fold of Escherichia coli DnaJ(1-78). *Biochemistry.* 34:5587-96.
- Hofmann, M. W., S. Honing, D. Rodionov, B. Dobberstein, K. von Figura und O. Bakke. 1999. The leucine-based sorting motifs in the cytoplasmic domain of the invariant chain are recognized by the clathrin adaptors AP1 and AP2 and their medium chains. *J Biol Chem.* 274:36153-8.
- Holstein, S. E., H. Ungewickell und E. Ungewickell. 1996. Mechanism of clathrin basket dissociation: separate functions of protein domains of the DnaJ homologue auxilin. *J Cell Biol.* 135:925-37.
- Jarousse, N. und R. B. Kelly. 2000. Selective inhibition of adaptor complex-mediated vesiculation. *Traffic.* 1:378-84.
- Jiang, R., B. Gao, K. Prasad, L. E. Greene und E. Eisenberg. 2000. Hsc70 chaperones clathrin and primes it to interact with vesicle membranes. *J Biol Chem.* 275:8439-47.
- Kalthoff, C., J. Alves, C. Urbanke, R. Knorr und E. J. Ungewickell. 2002. Unusual structural organization of the endocytic proteins AP180 and epsin 1. *J Biol Chem.* 277:8209-16.
- Kindler, B. 1997. Auswertung von Messungen chemischer Reaktionsgeschwindigkeit und Analyse von Biopolymeren in der Ultrazentrifuge; Anwendungen auf Protein-DNA Wechselwirkungen. Doktorarbeit. Fachbereich Chemie. Universität Hannover
- Kirchhausen, T. 2000. Clathrin. *Annu Rev Biochem.* 69:699-727.
- Laufen, T., M. P. Mayer, C. Beisel, D. Klostermeier, A. Mogk, J. Reinstein und B. Bukau. 1999. Mechanism of regulation of hsp70 chaperones by DnaJ cochaperones. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:5452-7.
- Lee, J. O., H. Yang, M. M. Georgescu, A. Di Cristofano, T. Maehama, Y. Shi, J. E. Dixon, P. Pandolfi und N. P. Pavletich. 1999. Crystal structure of the PTEN tumor suppressor: implications for its phosphoinositide phosphatase activity and membrane association. *Cell.* 99:323-34.
- Lindner, R. 1994. Purification of clathrin-coated vesicles from bovine brain, liver and adrenal gland. *Cell Biology: A Laboratory Handbook (Celis, J. eds)*:525-30.

- Liu, S. H., M. L. Wong, C. S. Craik und F. M. Brodsky. 1995. Regulation of clathrin assembly and trimerization defined using recombinant triskelion hubs. *Cell*. 83:257-67.
- Ma, Y., T. Greener, M. E. Pacold, S. Kaushal, L. E. Greene und E. Eisenberg. 2002. Identification of domain required for catalytic activity of auxilin in supporting clathrin uncoating by Hsc70. *J Biol Chem*. 277:49267-74.
- Mayer, M. P., T. Laufen, K. Paal, J. S. McCarty und B. Bukau. 1999. Investigation of the interaction between DnaK and DnaJ by surface plasmon resonance spectroscopy. *J Mol Biol*. 289:1131-44.
- McPherson, P. S., E. P. Garcia, V. I. Slepnev, C. David, X. Zhang, D. Grabs, W. S. Sossin, R. Bauerfeind, Y. Nemoto und P. De Camilli. 1996. A presynaptic inositol-5-phosphatase. *Nature*. 379:353-7.
- Metzler, M., V. Legendre-Guillemain, L. Gan, V. Chopra, A. Kwok, P. S. McPherson und M. R. Hayden. 2001. HIP1 functions in clathrin-mediated endocytosis through binding to clathrin and adaptor protein 2. *J Biol Chem*. 276:39271-6.
- 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*. 276:46230-6.
- 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*. 20:8667-76.
- Morgan, J. R., K. Prasad, S. Jin, G. J. Augustine und E. M. Lafer. 2001. Uncoating of Clathrin-Coated Vesicles in Presynaptic Terminals: Roles for Hsc70 and Auxilin. *Neuron*. 32:289-300.
- 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*. 265:3354-7.
- Morshauer, R. C., W. Hu, H. Wang, Y. Pang, G. C. Flynn und E. R. Zuiderweg. 1999. High-resolution solution structure of the 18 kDa substrate-binding domain of the mammalian chaperone protein Hsc70. *J Mol Biol*. 289:1387-403.
- Newmyer, S. L. und S. L. Schmid. 2001. Dominant-interfering Hsc70 mutants disrupt multiple stages of the clathrin-coated vesicle cycle in vivo. *J Cell Biol*. 152:607-20.
- 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*. 269:1872-5.
- Owen, D. J., Y. Vallis, M. E. Noble, J. B. Hunter, T. R. Dafforn, P. R. Evans und H. T. McMahon. 1999. A structural explanation for the binding of multiple ligands by the alpha-adaptin appendage domain. *Cell*. 97:805-15.
- 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*. 19:4216-27.
- Pishvaei, B., G. Costaguta, B. G. Yeung, S. Ryazantsev, T. Greener, L. E. Greene, E. Eisenberg, J. M. McCaffery und G. S. Payne. 2000. A yeast DNA J protein required for uncoating of clathrin-coated vesicles in vivo. *Nat Cell Biol*. 2:958-63.

- Rapoport, I., Y. C. Chen, P. Cupers, S. E. Shoelson und T. Kirchhausen. 1998. Di-leucine-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.* 17:2148-55.
- Ricotta, D., S. D. Conner, S. L. Schmid, K. von Figura und S. Honing. 2002. Phosphorylation of the AP2 mu subunit by AAK1 mediates high affinity binding to membrane protein sorting signals. *J Cell Biol.* 156:791-5.
- Robinson, M. S. und J. S. Bonifacino. 2001. Adaptor-related proteins. *Curr Opin Cell Biol.* 13:444-53.
- Scheele, U., C. Kalthoff und E. Ungewickell. 2001. Multiple interactions of auxilin 1 with clathrin and the AP-2 adaptor complex. *J Biol Chem.* 276:36131-8.
- Schlossman, D. M., S. L. Schmid, W. A. Braell und J. E. Rothman. 1984. An enzyme that removes clathrin coats: purification of an uncoating ATPase. *J Cell Biol.* 99:723-33.
- Schmidt, A., M. Wolde, C. Thiele, W. Fest, H. Kratzin, A. V. Podtelejnikov, W. Witke, W. B. Huttner und H. D. Soling. 1999. Endophilin I mediates synaptic vesicle formation by transfer of arachidonate to lysophosphatidic acid. *Nature.* 401:133-41.
- 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.* 270:31083-90.
- 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.* 97:8868-73.
- Slepnev, V. I., G. C. Ochoa, M. H. Butler und P. De Camilli. 2000. Tandem arrangement of the clathrin and AP-2 binding domains in amphiphysin 1 and disruption of clathrin coat function by amphiphysin fragments comprising these sites. *J Biol Chem.* 275:17583-9.
- Slepnev, V. I., 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.* 281:821-4.
- 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.* 287:252-60.
- 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.* 97:1096-100.
- 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.* 95:563-73.
- Umeda, A., A. Meyerholz und E. Ungewickell. 2000. Identification of the universal cofactor (auxilin 2) in clathrin coat dissociation. *Eur J Cell Biol.* 79:336-42.
- 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.* 378:632-5.
- Walther, K., M. Krauss, M. K. Diril, S. Lemke, D. Ricotta, S. Honing, S. Kaiser und V. Haucke. 2001. Human stoned B interacts with AP-2 and synaptotagmin and facilitates clathrin-coated vesicle uncoating. *EMBO Rep.* 2:634-40.

-
- 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.* 270:10079-83.
- Wilbanks, S. M., L. Chen, H. Tsuruta, K. O. Hodgson und D. B. McKay. 1995. Solution small-angle X-ray scattering study of the molecular chaperone Hsc70 and its subfragments. *Biochemistry.* 34:12095-106.
- Wilde, A. und F. M. Brodsky. 1996. In vivo phosphorylation of adaptors regulates their interaction with clathrin. *J Cell Biol.* 135:635-45.
- Wu, X., X. Zhao, L. Baylor, S. Kaushal, E. Eisenberg und L. E. Greene. 2001. Clathrin exchange during clathrin-mediated endocytosis. *J Cell Biol.* 155:291-300.
- 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.* 21:1465-75.

Danksagung

Herrn Prof. Ernst Ungewickell danke ich für die Überlassung dieses interessanten Aspekts der Endozytose als Thema für meine Doktorarbeit, die gute Einarbeitung und die Möglichkeit, das Projekt sehr selbständig in seiner Abteilung verwirklichen zu können.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Walter Müller für seine Betreuung während des gesamten Studiums und gerade während der Endphase der Doktorarbeit, die häufig den Eindruck einer etwas unorganisierten Planung erweckt haben muß.

Frau Huberta Ungewickell danke ich für Ihre Hilfe bei den Experimenten mit den synthetischen Auxilinpeptiden und Frau Christiane Lemke für die Bereitstellung von etlichen Puffern sowie den zahlreichen Polyacrylamidgelen (es müssen einige hundert gewesen sein). Bei Frau Beate Großman und Frau Elke Mallon möchte ich mich für die Präparation von clathrinbedeckten Vesikeln bedanken.

Herrn Ronald Frank bin ich dankbar für die Herstellung der Auxilinpeptide. Herrn Prof. James Keen und Herrn Prof. Richard Anderson, Herrn Dr. Takahiro Nagase und Herrn Prof. Thomas Kirchhausen danke ich für die Expressionsplasmide bzw. die cDNA von Clathrin, die ich verwendet habe.

Nicht zuletzt gilt mein Dank auch Herrn Prof. Jürgen Alves und Herrn Prof. Claus Urbanke für die erfolgreiche Zusammenarbeit bei der CD-Spektroskopie und der analytischen Ultrazentrifugation.

Meinen Freunden Frau Dr. Katrin Gorf und Herrn Dr. Christoph Rose danke ich für Ihre Unterstützung und Motivation, die mir immer wieder gut über einige schwierige Phasen hinweggeholfen haben. Bei Herrn Michael Düwel möchte ich mich für die engagierte und hilfreiche Zusammenarbeit während seines Großversuchs bedanken. Meinen Dank möchte ich auch meinen Eltern aussprechen, die, obwohl ihnen der Hintergrund meiner Arbeit wie ein Buch mit sieben Siegeln vorgekommen sein muß, trotzdem immer dafür Interesse gezeigt haben.

Für weit mehr, als ich hier aufzählen könnte, und nicht zuletzt auch für das Korrekturlesen dieser Arbeit bin ich Herrn Christoph Kalthoff dankbar.

Wissenschaftlicher Werdegang

- 1994 - 2000: Studium der Biochemie an der Universität Hannover
Abschluß mit Diplom im Januar 2000
Titel der Diplomarbeit: „*In vitro* Regulation der Hsc70-abhängigen Dissoziation von Clathrinhüllen “
- 2000 - 2003: Promotion zur Doktorin der Naturwissenschaften an der Universität Hannover
Anfertigung der Dissertation in der Abteilung Zellbiologie der Medizinischen Hochschule Hannover unter der Leitung von Prof. Ernst Ungewickell

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)

Functional evidence for the identification of an *Arabidopsis* clathrin light chain polypeptide. Urte Scheele und Susanne E. Holstein; *FEBS Lett*; 514(2-3):355-60

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)