

**Amphiphysine in der Clathrin-
vermittelten Endocytose:**

**Untersuchungen zur Phosphorylierung
und Membrandeformation**

Von der naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.
genehmigte Dissertation
von

Dipl.-Biochem. Markus Döring
geboren am 16. Februar 1974 in Bad Gandersheim

2006

Referent: Prof. Dr. Ernst J. Ungewickell, Abt. Zellbiologie,
Medizinische Hochschule Hannover

Korreferent: Prof. Dr. H. Holtmann, Inst. F. Physiologische Chemie,
Medizinische Hochschule Hannover

Tag d. Promotion: 29. August 2006

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden die Funktion der Amphiphysine in der Clathrin-vermittelten Endocytose und ihre Regulation durch Proteinphosphorylierung untersucht. Amphiphysin-1 und -2 sind cytosolische Proteine, die während der Bildung eines Endocytosevesikels durch Bindung an Membranlipide und die Clathrinhülle an die Plasmamembran rekrutiert werden. Dort sind sie, im Zusammenwirken mit Dynamin, an der Abschnürung des Vesikels beteiligt. Stimulation von neuroendokrinen Zellen durch Nervenwachstumsfaktor (NGF) bewirkt die Phosphorylierung von Amphiphysin-1, das dann kein Clathrin mehr bindet. Ich konnte zeigen, dass Amphiphysin-1 *in vitro* ein Substrat der Proteinkinase CK-2 ist und dass sich *in vivo* die Phosphorylierung von Amphiphysin-1 und -2 durch Zugabe von CK-2-Inhibitoren hemmen lässt. Die Threoninreste T350 und 387 sind Bestandteil zweier Konsensusmotive für CK-2 die in beiden Amphiphysingenen konserviert sind. Ich mutierte T350 und T387 zu Glutamatresten um eine konstitutive Phosphorylierung zu imitieren. Dies reduzierte die elektroforetische Mobilität, ähnlich wie beim phosphorylierten Wildtypprotein. Interessanterweise führte die Doppelmutation zur Inhibition der Clathrinbindung. Ich vermute daher, dass CK-2 die Amphiphysine phosphoryliert und damit die Interaktion mit Clathrin unterbindet.

Um die Funktion der Amphiphysine in lebenden Zellen untersuchen zu können, stellte ich Amphiphysin-Mutanten her, die fluoreszierende Proteindomänen enthalten. Die Transfektion dieser Konstrukte zeigte den gleichen Phänotyp wie die Expression des Wildtypproteins. In Untersuchungen mit Videomikroskopie konnte ich feststellen, dass in Zellen, die mit markiertem Amphiphysin-1 bzw. -2 transfiziert wurden, hochdynamische Membrantubuli gebildet wurden, die mit Amphiphysin umhüllt waren. Zellen die sowohl mRFP-Amphiphysin-1 als auch EGFP-Amphiphysin-2 expremierten zeigten eine vollständige Co-Lokalisierung beider Proteine in diesen dynamischen tubulären Strukturen. Diese Membrantubuli entstammen hauptsächlich der Plasmamembran und mit einem geringeren Anteil auch endosomalen Membranen. Aufgrund der bekannten Membrantubulierungseigenschaften von Amphiphysinen *in vitro* handelt es sich hierbei möglicherweise um eine bisher wenig untersuchte Aktivität dieser Proteine, bei der sie über ihre BAR-Domäne als Sensor für Membrankrümmung fungieren.

Stichwörter: Amphiphysin, Clathrin, Endocytose, BAR-Domäne, CK-2

Summary

In this work the function of amphiphysins in clathrin mediated-endocytosis and its regulation by protein phosphorylation were investigated. Amphiphysin-1 and -2 are cytosolic proteins that are recruited to the plasma membrane during the formation of an endocytotic vesicle by virtue of their binding to the clathrin coat and to membrane lipids. Stimulation of neuroendocrine cells by nerve growth factor induces amphiphysin phosphorylation and abolishes its clathrin binding ability. I was able to demonstrate that *in vitro* amphiphysin is a substrate of protein kinase CK-2 and that *in vivo* the phosphorylation of amphiphysin-1 and -2 is suppressed upon CK-2-inhibitor treatment. The threonine residues T350 and T387 are part of two consensus motifs for CK-2 that are conserved in both amphiphysin genes. I mutated threonines T350 and T387 to glutamate in order to mimic constitutive phosphorylation. This reduced electrophoretic mobility, similar to phosphorylated wild type protein. Interestingly, the double mutation inhibited clathrin binding activity. Therefore, I propose that CK-2 phosphorylates amphiphysins, thus suppressing interaction with clathrin.

In order to study the amphiphysins' function in living cells, I generated amphiphysin mutants that contained fluorescent protein domains. Transfection of these constructs resulted in a wild type-like phenotype. In live cell imaging experiments with cells transfected with tagged amphiphysin-1 or -2, highly dynamic membrane tubules were formed that were coated with amphiphysin. Cells co-transfected with mRFP-amphiphysin-1 and EGFP-amphiphysin-2 exhibited complete co-localisation of both proteins to these dynamic tubular structures. These membrane tubules mainly originate at the plasma membrane and to a lesser degree also at endosomal membranes. Corresponding to the amphiphysins' well documented membrane tubulation properties *in vitro*, this phenomenon is possibly another activity of these proteins that is of yet scarcely investigated and in which amphiphysins act as sensors of membrane curvature through their BAR domain.

Keywords: amphiphysin, clathrin, endocytosis, BAR domain, CK-2

Zusammenfassung.....	1
Summary.....	2
1 Einleitung.....	7
1.1 Endocytose.....	7
1.1.1 Phagozytose.....	7
1.1.2 Makropinocytose.....	8
1.1.3 Endocytose über Caveolae.....	8
1.1.4 Clathrin und Caveolin unabhängige Endocytose.....	9
1.1.5 Clathrin-vermittelte Endocytose.....	9
1.1.5.1 Clathrin.....	10
1.1.5.2 Adaptorproteine.....	12
1.1.5.2.1 Adaptor Komplexe AP-1 bis AP-4.....	12
1.1.5.2.2 Epsin.....	13
1.1.5.2.3 Eps15 und Eps15R.....	13
1.1.5.2.4 Stonin.....	14
1.1.5.3 Akzessorische Proteine.....	14
1.1.5.3.1 CALM und AP180.....	14
1.1.5.3.2 Auxilin.....	15
1.1.5.3.3 Synaptojanin.....	15
1.1.5.3.4 Dynamin.....	16
1.2 Amphiphysin.....	16
1.2.1 Struktur der Amphiphysine.....	17
1.2.1.1 Die BAR-Domäne.....	17
1.2.1.2 Die prolinreiche Domäne.....	20
1.2.1.3 Die variable Domäne.....	20
1.2.1.4 Die SH3-Domäne interagiert mit Dynamin.....	20
1.2.1.5 Gewebeabhängige Expression der Amphiphysine.....	21
1.2.2 Regulation der Endocytose.....	22
1.2.2.1 Phosphorylierung von Membranlipiden.....	22
1.2.2.2 Phosphorylierung von Proteinen.....	23
1.2.3 Regulation der Amphiphysine über Phosphorylierung.....	24
1.2.4 Amphiphysin als Substrat verschiedener Kinasen.....	25
2 Material und Methoden.....	27
2.1 Methoden.....	27
2.1.1 Molekularbiologische Methoden.....	27
2.1.1.1 DNA-Präparation.....	27
2.1.1.2 Restriktionsverdau.....	27
2.1.1.3 Agarose-Gelelektrophorese.....	27
2.1.1.4 Gel-Extraktion.....	27
2.1.1.5 Ligation.....	28
2.1.1.6 Dialyse von Ligationsansätzen.....	28
2.1.1.7 Elektroporation.....	29
2.1.1.8 Transformation durch thermischen Schock.....	29
2.1.1.9 Schnelltest zur Überprüfung von Ligationsansätzen.....	29
2.1.1.10 Zielgerichtete Mutagenese.....	29
2.1.2 Proteinchemische Methoden.....	31
2.1.2.1 Aufreinigung von Cytosol aus Rattenhirn.....	31

2.1.2.2	Aufreinigung von Clathrintriskelia.....	31
2.1.2.3	Expressionskultur in E. coli BL21c+ und Aufreinigung des Fusionsproteins	31
2.1.2.4	Abschneiden der GST-Domäne.....	32
2.1.2.5	Bindungsexperimente.....	32
2.1.2.6	<i>In vitro</i> Kinasesassays	33
2.1.2.7	<i>In vivo</i> Phosphorylierungsassays.....	33
2.1.2.8	SDS-Gelelektrophorese	34
2.1.2.9	Western Blotting.....	34
2.1.2.9.1	Blot im Halbtrockenverfahren.....	34
2.1.2.9.2	Blot im Tankverfahren	34
2.1.2.9.3	Färbung der Membran.....	34
2.1.2.9.4	Immunoblot der Membran.....	35
2.1.2.9.5	Visualisierung der Banden – HRP-Verfahren.....	35
2.1.2.9.6	Visualisierung der Banden – AP-Verfahren.....	35
2.1.3	Methoden mit eukaryotischen Zellen	35
2.1.3.1	Zellkultur	35
2.1.3.1.1	PC12 – Zellen.....	36
2.1.3.1.2	HeLa-Zellen.....	36
2.1.3.1.3	COS-7-Zellen	37
2.1.3.1.4	PtK2-Zellen	37
2.1.3.2	Mikroinjektion.....	37
2.1.3.3	Transfektion.....	38
2.1.3.4	Mikroskopische Methoden	38
2.1.3.4.1	Flacheinbettung	38
2.1.3.4.2	Immunfluoreszenz.....	39
2.1.3.4.3	Fluoreszenzmikroskopie.....	39
2.1.3.4.4	Videomikroskopie	39
2.1.3.4.5	Sprühpräparation und Bedampfung	40
2.2	Materialien	41
2.2.1	Geräte	41
2.2.2	Chemikalien	42
2.2.3	Verbrauchsmaterial	43
2.2.4	Puffer und Lösungen.....	44
2.2.5	Medien	44
2.2.6	Antikörper	45
2.2.6.1	Primärantikörper.....	45
2.2.6.2	Sekundärantikörper.....	45
2.2.7	Inhibitoren.....	45
2.2.8	Primer.....	46
2.2.9	Plasmid-Konstrukte.....	46
2.2.10	Verwendete Software.....	52
3	Aufgabenstellung	53
4	Ergebnisse	54
4.1	Phosphorylierung von Amphiphysin	54
4.1.1	Simulation der Phosphorylierung durch zielgerichtete Mutagenese	55
4.1.2	Phosphorylierung von Amphiphysin und Interaktion mit Clathrin	56

4.1.3	Phosphorylierung von Threonin 350 und 387 <i>in vitro</i>	58
4.1.4	Phosphorylierung von Amphiphysin und seinen Mutanten in Zellen	58
4.1.5	Pharmakologische Untersuchung der Phosphorylierung von Amphiphysin	59
4.2	Amphiphysin in lebenden Zellen	62
4.2.1	Geschwindigkeiten und Längen Amphiphysin-assoziiierter Strukturen .	64
4.2.2	Einfluß der Temperatur auf Amphiphysin-assoziierte Tubuli	65
4.2.3	Co-Lokalisation mit Membranlipiden	65
4.2.4	Bedeutung der BAR-Domäne für die Membrantubulierung	66
4.2.5	Amphiphysin-2 und die Bildung tubulärer Strukturen	67
4.2.6	Wechselwirkungen von Amphiphysin und anderen BAR-Proteinen	69
4.2.7	Wechselwirkungen von Amphiphysin-Tubuli mit Clathrin	70
4.2.8	Interaktion von Amphiphysin-1 und Dynamin	71
4.2.9	Interaktion von Amphiphysin-Tubuli mit Komponenten des Cytoskeletts 72	
4.2.10	Stimulation der Bildung Amphiphysin-assoziiierter Membrantubuli durch Inhibition von CK-2	73
4.2.11	Amphiphysin-assoziierte Membrantubuli und Frühe Endosomen	74
4.2.12	Einfluss von Amphiphysin 1-Überexpression auf die Clathrin-vermittelte Endocytose	75
4.2.13	Amphiphysin und weitere Marker der Clathrin-vermittelten Endocytose und des endosomalen Transportweges.....	77
4.3	Elektronenmikroskopische Untersuchungen.....	78
4.3.1	Isoliertes Amphiphysin	78
4.3.2	Mikroinjiziertes Amphiphysin in Zellen.....	78
5	Diskussion	80
5.1	Phosphorylierung von Amphiphysin	80
5.1.1	Einfluss der Phosphorylierung Amphiphysins auf die Clathrinbindung	81
5.1.2	Einfluss der Phosphorylierung auf die Bandenverschiebung	82
5.1.3	Amphiphysin als Substrat verschiedener Kinasen	84
5.1.4	Physiologische Bedeutung	85
5.2	Amphiphysin-assoziierte Membrantubuli.....	86
5.2.1	Dynamische Membrantubuli.....	87
5.2.2	Ursprungskompartiment tubulärer Strukturen	89
5.2.3	Interaktion der Membrantubuli mit Clathrin	90
5.2.4	Interaktion der Membrantubuli mit Dynamin.....	91
5.2.5	Amphiphysin-1 und Amphiphysin-2 in tubulären Strukturen	91
5.2.6	Amphiphysin-2 und Membrantubuli	92
5.2.7	Tubuli und Komponenten des Cytoskeletts	92
5.2.8	Mögliche physiologische Bedeutung Amphiphysin-assoziiierter tubulärer Strukturen.....	93
5.3	Schlussbetrachtung.....	95
6	Literatur	96
7	Abkürzungsverzeichnis	107
8	Inhaltsverzeichnis der Video-CD	109
9	Danksagung.....	110
10	Erklärung.....	111

11	Werdegang und Publikationen	112
11.1	Wissenschaftlicher Werdegang.....	112
11.2	Publikationen.....	112

1 Einleitung

1.1 Endocytose

Mit Endocytose bezeichnet man Transportprozesse in Zellen, bei denen durch Einstülpung und anschließende Abschnürung eines Bereichs der Plasmamembran ein intrazelluläres Membranvesikel gebildet wird. Dieses Endocytosevesikel fusioniert mit Endosomen. Schon am Ende des 19. Jahrhunderts wurden Prozesse der Endocytose zum ersten Mal von Mechnikoff beschrieben (Historischer Überblick in Frolov, 1985), doch wurden erst in den vergangenen Jahrzehnten detailliertere Vorstellungen über ihre Bedeutung für alle Zelltypen und über die beteiligte zelluläre Maschinerie entwickelt. Es wird zwischen Pinocytose („Zelltrinken“) und Phagocytose („Zellessen“) unterschieden. Dabei versteht man unter Phagocytose die mit Hilfe der Durchlichtmikroskopie beobachtbare Aufnahme von Partikeln und unter Pinocytose alle anderen endocytotischen Prozesse. Bei der Pinocytose unterscheidet man zwischen Makropinocytose, Clathrin-vermittelter Endocytose, Caveolin-vermittelter Endocytose und schließlich von Clathrin und von Caveolin unabhängiger Endocytose. Daneben existieren wahrscheinlich noch weitere Endocytoseformen. Diese Prozesse unterscheiden sich in der Art des aufgenommenen Materials und in der Größe der gebildeten Vesikel sowie der beteiligten Proteinmaschinerie (Übersicht in Mellman, 1996; Übersicht in Conner & Schmid, 2003).

1.1.1 Phagocytose

Eines der bekanntesten Beispiele für phagocytotische Prozesse stellt sicherlich das Pantoffeltierchen *Paramecium caudatum* dar, welches über diesen Prozess seine Nahrung aufnimmt (Übersicht in Allen & Fok, 2000). Beschränkt man die Betrachtung auf Säugetiere, so sind es vor allem die Makrophagen des Immunsystems, welche auf diesen Prozess angewiesen sind (Übersicht in Aderem & Underhill, 1999). Makrophagen binden zu phagocytierendes Material, z.B. bakterielle Pathogene, mit Hilfe von Rezeptoren an ihrer Zelloberfläche. Diese Bindung wiederum aktiviert über verschiedene Prozesse eine Umorganisation des Actincytoskeletts wodurch

Pseudopodien gebildet werden. Diese „umfließen“ die gebundenen Partikel und bilden ein Phagosom. Das Phagosom fusioniert schließlich mit späten Endosomen oder Lysosomen. Es bildet sich ein Phagolysosom, dessen Inhalt verdaut wird (Überblick in Greenberg, 1999).

1.1.2 Makropinocytose

Hierunter versteht man Prozesse, bei denen die Zellmembran schollen- oder becherförmige Ausstülpungen bildet, die dann auf die Zelloberfläche zurückstürzen und mit ihr fusionieren, wobei größere Mengen extrazellulären Mediums endocytiert werden. Die hierbei gebildeten Vesikel, Makropinosomen, können Durchmesser von mehr als einem Mikrometer erreichen. Während die Makropinocytose mechanistisch nur unzureichend charakterisiert ist, so steht doch fest, dass sie ebenfalls mit einer massiven Umorganisation des Actincytoskeletts einhergeht. Eine wichtige Rolle kommt ihr wahrscheinlich bei der Entfernung aktivierter Membranrezeptoren zu. So löst der Wachstumsfaktor aus Blutplättchen (PDGF) über die Aktivierung der Rho-GTPase Rac und nachfolgender Kinasen die Makropinocytose aus. Auch manche Bakterien machen sich dies zunutze, indem sie Toxine in die Zelle injizieren, welche Rho-GTPasen aktivieren. Durch die nachfolgende Aufnahme gelangen diese Bakterien in ein Milieu welches ihre Replikation ermöglicht (Überblicke in Ridley, 2001; Conner & Schmid, 2003).

1.1.3 Endocytose über Caveolae

Caveolae (lat. Höhlung, Käfig) wurden das erste Mal in den fünfziger Jahren des 20. Jahrhunderts auf der Oberfläche von Endothelzellen beobachtet. Bei Caveolae handelt es sich um flaschenförmige Einstülpungen der Plasmamembran mit einem Durchmesser von 50 – 80 nm, welche durch das Protein Caveolin charakterisiert sind. Caveolin bindet Cholesterol und bildet Dimere, welche mit einer Schleife in das innere Blatt der Lipiddoppelmembran inserieren. Diese Dimere oligomerisieren dann weiter und bilden eine gestreifte Caveolinhülle. Neben ihrer Funktion im intrazellulären Transport von Cholesterol wird eine Rolle von Caveolae u.a. bei der

Kompartimentierung und Regulation verschiedener Signalkaskaden diskutiert. Ein Beispiel hierfür ist die negative Regulation epithelialer NO-Synthase-Kaskade, welche Vasodilatation kontrolliert. Darüber hinaus spielen sie eine Rolle bei der Bildung von T-Tubuli in Muskelzellen und treten auch im *Trans*-Golgi-Netzwerk in Erscheinung. Beispiele für Substanzen, die über Caveolae aufgenommen werden, sind das Virus SV 40, Cholera toxin oder Folsäure. Die Endocytose von SV 40 durch Caveolae beinhaltet die Umorganisation des Actincortex und Internalisierung des Caveolus durch Dynamin. Im Cytoplasma gelangt SV40 in Caveolin-bedeckte Strukturen, die Caveosomen. Diese bilden tubuläre Strukturen, welche die Fracht weiter in Richtung des endoplasmatischen Reticulums transportieren (Überblick in Pelkmans & Helenius, 2002).

1.1.4 Clathrin und Caveolin unabhängige Endocytose

Hierunter fallen die Prozesse der Endocytose, die bisher nur unzureichend charakterisiert sind (Übersicht in McMahon & Mills, 2004).

1.1.5 Clathrin-vermittelte Endocytose

Dieser wichtige Mechanismus der Endocytose wurde erstmals 1964 beschrieben. Roth und Porter beobachteten in elektronenmikroskopischen Aufnahmen bei Oocyten einer Mückenart, dass Dotterproteine in Vertiefungen der Plasmamembran zu finden waren (Roth & Porter, 1964). Diese Vertiefungen hatten einen charakteristischen Durchmesser und eine Hüllstruktur auf der cytosolischen Seite der Membran. In dieser Hülle wurde später Clathrin nachgewiesen. In zahlreichen Arbeiten wurde gezeigt, dass Clathrin-vermittelte Endocytose wahrscheinlich bei allen Lebewesen vorkommt. Nur wenige hoch differenzierte Zelltypen (z.B. Spermien oder Erythrozyten) zeigen keine Clathrin-vermittelte Endocytose (Übersicht in Brodsky *et al.*, 2001). Clathrin-vermittelte Endocytose spielt eine wichtige Rolle u.a. bei der Aufnahme rezeptorgebundener Liganden wie Cholesterin (Übersicht in Hussain, 2001) sowie beim Recycling synaptischer Vesikel (Übersicht in Galli & Haucke, 2004; Übersicht in Augustine *et al.*, 2006). Das Zusammenspiel einer komplexen Proteinmaschinerie, die aus dem Cytosol rekrutiert wird, mit der Plasmamembran bewirkt die Bildung eines

Clathrin-behüllten Endocytosevesikels. Versucht man eine Unterteilung dieses Vorgangs, so bietet sich eine grobe Unterteilung in vier Schritte an (Abb. 1).

- 1.) Bindung der Clathrinhülle an die Plasmamembran
- 2.) Einstülpung der Plasmamembran
- 3.) Abschnürung des Endocytosevesikels über Fusion der Plasmamembran
- 4.) Abbau der Clathrin-Hülle im Cytosol

1.1.5.1 Clathrin

Clathrin (von lat. *Clatri*, Gitter; Pearse, 1976), das namengebende Protein dieses Prozesses, besteht aus zwei verschiedenen Polypeptiden, der schweren Kette (CHC) von ca. 192 kD und der leichten Kette von ca. 25 – 29 kD (Übersicht in Brodsky *et al.*, 2001). In *Homo sapiens* sind zwei für CHC kodierende Gene bekannt, entsprechend der Lokalisation auf den menschlichen Chromosomen spricht man von CHC17 und CHC22, wobei deren Sequenzen zu 85 % identisch sind. (Übersicht in Wilbur *et al.*, 2005). Von den leichten Ketten kennt man in Wirbeltieren zwei Varianten, LCa und LCb; außerdem sind neuronale Spleißvarianten der leichten Ketten beschrieben worden (Wong *et al.*, 1990; Stamm *et al.*, 1992). Funktionelle Grundeinheit des Clathrins ist das Triskelion, in welchem sich drei leichte Ketten und drei schwere Ketten zusammenlagern. Diese Struktur wurde erstmals zu Beginn der achtziger Jahre beschrieben (Ungewickell & Branton, 1981).

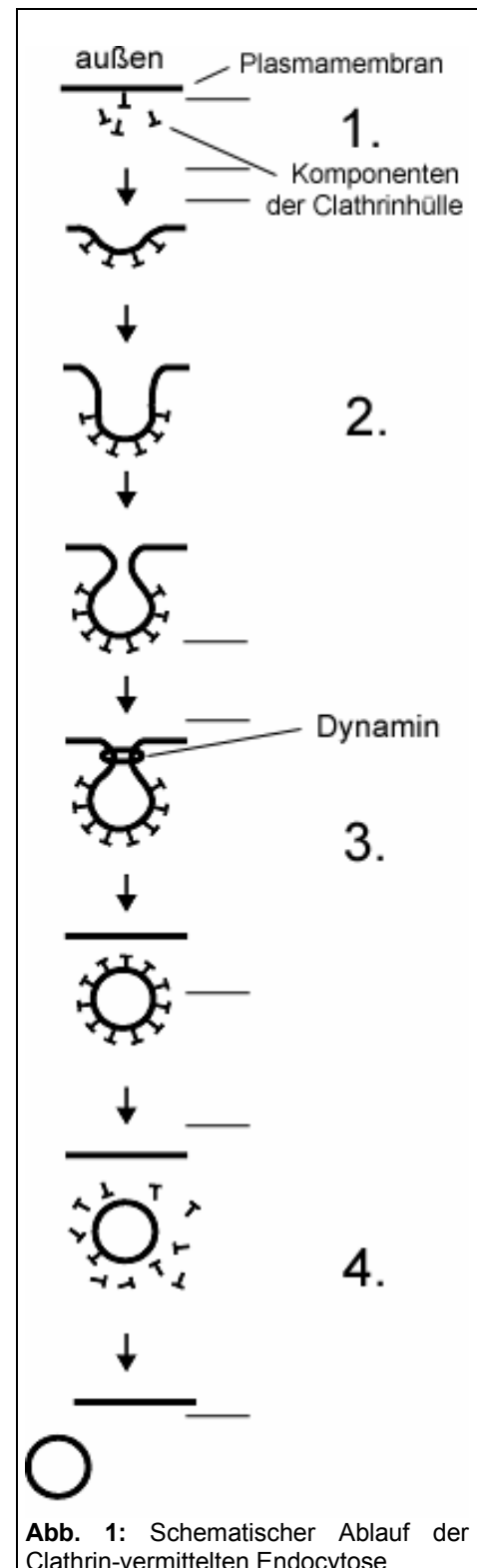
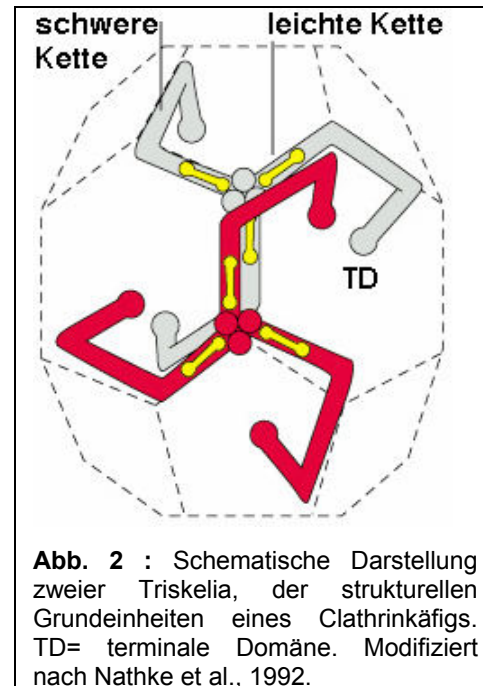


Abb. 1: Schematischer Ablauf der Clathrin-vermittelten Endocytose

Man geht gegenwärtig davon aus, dass Clathrin als Strukturprotein durch die Veränderung der räumlichen Struktur des Clathringitters die Einstülpung der Plasmamembran erzwingt. Hierbei kommt ihm seine Eigenschaft zugute, sich sowohl zu hexagonalen als auch zu pentagonalen Strukturen zusammenlagern zu können und dadurch gekrümmte bis annähernd kugelförmige Strukturen zu bilden (Übersicht in Wilbur *et al.*, 2005).

Die schwere Kette des Clathrin kann in vier Domänen gegliedert werden: Eine C-terminale Domäne, eine proximale Domäne, eine distale Domäne und eine N-terminale Domäne (Kirchhausen & Harrison, 1984). Die Nabe eines Clathrintriskelions wird durch Zusammenlagerung der C-terminalen Domänen gebildet (Liu *et al.*, 1995). Die sich anschließende proximale Domäne ist eine Superhelix aus α -Helices und enthält Heptadenmotive, welche als Bindungsstellen für die leichten Ketten fungieren (Kirchhausen *et al.*, 1987a). Den leichten Ketten kommen wahrscheinlich regulatorische Aufgaben

zu (Acton & Brodsky, 1990). Sie besitzen zehn Heptadenmotive für die Interaktion mit den schweren Ketten (Kirchhausen *et al.*, 1987b). Die sich anschließende distale Domäne wird durch eine Abfolge kurzer α -Helices gebildet, welche durch Salzbrücken miteinander verbunden sind (Ybe *et al.*, 1999). Proximale und distale Domäne sind über eine flexible Scharnierregion miteinander verbunden (Musacchio *et al.*, 1999). Die N-terminale Domäne schließlich wird auch als terminale Domäne bezeichnet. Sie bildet die Struktur eines siebenblättrigen β -Propellers und enthält zwei unabhängige Bindungsstellen für Interaktionspartner des Clathrins. Diese können mit Sequenzen des Typs L(L/I)(D/E/N)(L/F)(D/E) (Clathrin-Box) und PWXXW (W-Box) interagieren (ter Haar *et al.*, 1998; Slepnev *et al.*, 2000; Miele *et al.*, 2004).



1.1.5.2 Adaptorproteine

In der Klasse der Adaptoren fasst man Proteine zusammen, welche die Interaktion zwischen der Plasmamembran und der Clathrinhülle vermitteln.

1.1.5.2.1 Adaptorkomplexe AP-1 bis AP-4

Bei den Adaptorproteinen AP-1, -2, -3 und -4 handelt es sich um ca. 300 kD große Heterotetramere welche aus je zwei schweren, einer mittleren und einer leichten Untereinheit zusammengesetzt sind. Diese Untereinheiten werden als Adaptine bezeichnet. Bei der Clathrin-vermittelten Endocytose an der Plasmamembran ist AP-2 beteiligt, während AP-1, AP-3 und AP-4 bei Transportprozessen von intrazellulären Kompartimenten eine Rolle spielen (Übersicht in Robinson & Bonifacino, 2001). AP-2 ist zusammengesetzt aus α -Adaptin, β 2-Adaptin, μ 2-Adaptin und σ 2-Adaptin (Übersicht in Kirchhausen, 1999). Der AP-2-Adaptorkomplex organisiert die Bildung Clathrin-behüllter Gruben an der Plasmamembran, hierbei bindet die β 2-Untereinheit an Clathrin (Übersicht in Gallusser & Kirchhausen, 1993; Übersicht in Brodsky *et al.*, 2001). Die Bindung an Frachtmoleküle, z.B. Rezeptoren, erfolgt dabei über Interaktion mit der μ 2-Untereinheit. Hierbei erkennen die μ -Untereinheiten das Sequenzmotiv YXX ϕ (ϕ steht hier für einen voluminösen hydrophoben Aminosäurerest) in der cytosolischen Domäne von Rezeptoren, die über Clathrin-vermittelte Endocytose aufgenommen werden (Ohno *et al.*, 1995). Die Bindung dieses Sequenzmotivs wird durch Phosphorylierung eines einzigen Threoninrestes (T156) durch die Adaptor-assoziierte Kinase AAK1 enorm verstärkt (Ricotta *et al.*, 2002). Darüber hinaus sind Interaktionen zwischen anderen Erkennungsmotiven der Rezeptoren und dem AP-2-Adaptorkomplex bekannt, welche aber weniger gut untersucht sind. Die Morphologie der AP-2-Komplexe entspricht einem Kopf mit zwei Ohren (Heuser & Keen, 1988). Neuere Strukturuntersuchungen haben gezeigt, dass die verbleibende Domäne zwischen Ohr und Kern (*hinge*) keine Struktur besitzt und somit die Ohrdomäne weit aus der Plasmamembran herausragen könnte um Bindungspartner zu rekrutieren. Dieser Kopf besteht aus einem kompakten Kern, an welchem sich an zwei flexiblen Verbindungen die so genannten Ohrdomänen befinden. Die Ohren werden dabei vom C-terminalen Anteil der beiden schweren Untereinheiten gebildet, wohingegen der kompakte Kern aus den N-terminalen Domänen dieser Untereinheiten besteht. Hier

finden sich auch die beiden übrigen Untereinheiten. An der flexiblen Scharnierregion der β 2-Untereinheit befindet sich eine Region, über welche der Adaptorkomplex mit Clathrin wechselwirken kann (Dell'Angelica *et al.* 1998). Während die Funktionen von AP-1 und AP-2 mittlerweile gut untersucht sind, sind diese im Falle des AP-3 und noch mehr bei AP-4 relativ schlecht charakterisiert.

1.1.5.2.2 Epsin

Der am besten charakterisierte Vertreter der Proteinfamilie der epsinähnlichen Proteine ist das Epsin-1. Diese Proteine sind gekennzeichnet durch die Fähigkeit zur Wechselwirkung mit der α -Ohrdomäne von AP-2 (Chen *et al.*, 1998). Interessanterweise sind die zwei C-terminalen Drittel von Epsin-1 strukturell ungeordnet (Kalthoff *et al.*, 2002). Innerhalb dieser Domäne befinden sich zwei Bindungsmotive für Clathrin (Drake *et al.*, 2000) und acht DPW-Tripeptide welche an die α -Ohrdomäne binden (Owen *et al.*, 1999; Traub *et al.*, 1999). Darüber hinaus finden sich hier NPF-Tripeptide, welche an die EH (Eps15 Homologie) – Domäne von Eps15 und Intersectin binden (Übersicht in Chen *et al.*, 1998; Übersicht in Hussain *et al.*, 1999). Neben einigen oder allen diesen Bindungsmotiven enthalten die 10 bisher bekannten Vertreter dieser Proteinfamilie eine N-terminale ENTH-Domäne, welche ca. 150 Aminosäuren umfasst und mit Membran-Phospholipiden, insbesondere Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat wechselwirkt. Aufgrund dieser zahlreichen Interaktionsmotive könnte Epsin dazu beitragen, Clathrin an die Plasmamembran zu rekrutieren (Überblick in Legendre-Guillemin *et al.*, 2004).

1.1.5.2.3 Eps15 und Eps15R

Eps15 wurde als Tyrosinkinasesubstrat isoliert (Fazioli *et al.*, 1993). Seine Rolle in der Clathrin-vermittelten Endocytose wurde deutlich, als man es mit AP-2 assoziiert fand (Benmerah *et al.*, 1995). Darüber hinaus ist an die Plasmamembran gebundenes Eps15 an Clathrin behüllten Gruben und Clathrin bedeckten Vesikeln konzentriert (Tebar *et al.*, 1996). Das Protein weist eine N-terminal gelegene EH-Domäne auf, eine zentrale *coiled-coil* Region mit Heptadenmotiven und eine C-terminale Domäne, welche charakteristische DPF-Motive enthält, die mit SH3-Domänen wechselwirken können (Wong *et al.*, 1995). Außerdem finden sich hier Bindungsmotive für den AP-

2-Adaptorkomplex (Iannolo *et al.*, 1997). Eps15R weist C-terminal eine große Homologie zu Eps15 auf. Unter physiologischen Bedingungen fungieren Eps15 und Eps15R offenbar als Komplex (Coda *et al.*, 1998; Sigismund *et al.*, 2005).

1.1.5.2.4 Stonin

Ein Homologes dieses Proteins wurde zuerst in *Drosophila melanogaster* beschrieben, bevor man es in Säugern fand. Man kennt bisher zwei Varianten, Stonin-1 und Stonin-2, welche sich in ihrer Domänenstruktur sehr ähneln. Am N-Terminus befindet sich eine serin- und prolinreiche Domäne, welche bei Stonin-2 NPF-Motive enthält, zentral ein stoninspezifischer Abschnitt und am C-Terminus eine Domäne, welche homolog zur Signalbindungsdomäne von μ -Adaptin ist (Martina *et al.*, 2001). Möglicherweise kompetieren die Stonine mit Frachtproteinen um die Bindung an μ -Adaptin (Walther *et al.*, 2004).

1.1.5.3 Akzessorische Proteine

Hierbei handelt es sich um Proteine, welchen teils ebenfalls Adaptoreigenschaften und teils regulatorische Funktionen im Prozess der Clathrin-vermittelten Endocytose zukommen.

1.1.5.3.1 CALM und AP180

AP180 ist ein neuronales Protein welches strukturelle und funktionelle Übereinstimmungen mit CALM aufweist (Überblick in McMahon, 1999). CALM steht für *clathrin assembly lymphoid myeloid leukemia protein* ausgehend von seiner Funktion in bestimmten Leukämieformen (Dreyling *et al.*, 1996). CALM und AP180 sind charakterisiert durch eine N-terminale ENTH-Domäne, welche Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat binden kann und einen C-Terminus mit der Fähigkeit zur Clathrinbindung (Tebar *et al.*, 1999) Beide Proteine co-existieren auch in manchen Zelltypen (Kusner & Carlin, 2003). Vermutlich bindet AP180 über sich wiederholende DLL-Motive an Clathrin (Morgan *et al.*, 2000). Darüber hinaus ist es in der Lage, über D Φ F/W-Motive mit den Ohrdomänen von AP-2 zu interagieren (Hao *et al.*, 1999; Owen *et al.*, 1999; Meyerholz *et al.*, 2005). Diese zahlreichen Bindungsmotive für Clathrin führen vermutlich zu einer Quervernetzung von Triskelia und erleichtern so die Zusammenlagerung zu Clathrinkäfigen.

1.1.5.3.2 Auxilin

Dieses Protein wurde ursprünglich als neuronenspezifische Komponente von Clathrin-bedeckten Vesikeln identifiziert (Ahle & Ungewickell, 1990). Mittlerweile kennt man in Säugerzellen zwei Formen, das neuronale Auxilin und Auxilin-2 bzw. GAK (Kanaoka *et al.*, 1997). Der N-Terminus beider Proteine verfügt über eine Phosphatase-und-Tensin-Homologiedomäne (PTEN), gefolgt von einer Clathrin-Bindungsdomäne und einer C-terminalen J-Domäne (Greener *et al.* 2000, Umeda *et al.* 2000 Ungewickell *et al.* 1995). Diese Domäne rekrutiert die ATPase hsc70 (*heat shock cognate 70*) an das behüllte Vesikel. Dieses Protein bindet in der Nähe der Nabe des Clathrintriskelions und schwächt die Struktur derart, dass sich der Clathrinkäfig auflösen kann. Darüber hinaus kommen Auxilin weitere Funktionen im Prozess der Enthüllung behüllter Vesikel zu (Scheele *et al.* 2001). Auxilin-2 ist eine Cyclin-G-assoziierte Kinase (daher auch seine alternative Bezeichnung GAK) mit Serin-/Threonin-Kinase-Aktivität und kann die μ -Untereinheit von AP-1 und AP-2 phosphorylieren (Greener *et al.* 2000, Umeda *et al.* 2000).

1.1.5.3.3 Synaptojanin

Synaptojanin-1 ist ein neuronales Protein mit einem Molekulargewicht von 145 kD. Charakteristisch ist seine zentral lokalisierte Inositol-5-phosphatase-Domäne und seine Fähigkeit, ähnlich wie Dynamamin mit SH3-Domänenproteinen zu interagieren (McPherson *et al.*, 1996; de Heuvel *et al.*, 1997; Micheva *et al.*, 1997a). Diese Bindung erfolgt über eine prolinreiche Domäne von Synaptojanin (Cestra *et al.*, 1999). Synaptojanin-2 ähnelt Synaptojanin-1 in Größe und Domänenstruktur, allerdings wird es in zahlreichen Geweben expremiert und unterscheidet sich in Sequenz und Bindungspartnern der prolinreichen Domäne (Nemoto *et al.*, 1997). Vor allem interessant ist die Fähigkeit von Synaptojanin, Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat zu dephosphorylieren, wodurch die Bindungseigenschaften von Membranen, die dieses Lipid enthalten, modifiziert werden.

1.1.5.3.4 Dynamin

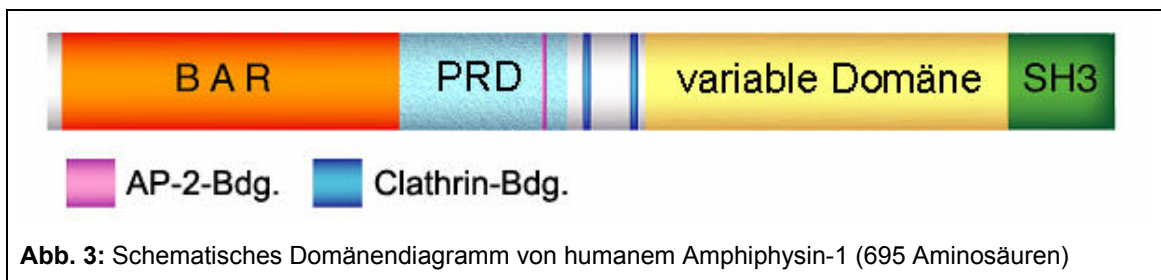
Die Funktion des Dynamins wurde das erste Mal an der *Shibire*-Mutante bei *Drosophila* nachgewiesen (van der Bliëk & Meyerowitz, 1991). In dieser temperatursensitiven Mutante kommt es bei der nicht permissiven Temperatur zu einer massiven Ansammlung von Membraneinstülpungen, jedoch zu keiner Abschnürung von Vesikeln. Durch diese Blockade der Clathrin-vermittelten Endocytose sind die Tiere gelähmt, da das Recycling synaptischer Vesikel in Motoneuronen unterbunden wird (van der Bliëk et al. 1991, Chen et al. 1991). Eine der ersten charakterisierten Eigenschaften des Dynamins war seine Fähigkeit, GTP zu hydrolysieren. (Shjpeten et al. 1989, Obar et al. 1990). Die GTPase-Domäne des Dynamins befindet sich N-terminal, gefolgt von der mittleren Domäne. C-terminal schließen sich eine Pleckstrin-homologiedomäne, eine GTPase-Effektordomäne und eine prolinreiche Domäne an (Obar et al. 1990). Diese prolinreiche Domäne interagiert mit der C-terminalen SH3-Domäne des Amphiphysins (David et al. 1996). Dynamin ist wahrscheinlich ein Mechanoenzym. Seine Hauptfunktion besteht in der Abtrennung des knospenden Vesikels von der Plasmamembran (vergleiche Abb. 5), wobei die mechanistischen Einzelheiten dieses Vorgangs noch Gegenstand der Diskussion sind (Überblick in Sever *et al.*, 2000). In jüngster Zeit wurden allerdings auch Funktionen für Dynamin in Clathrin unabhängigen Endocytoseformen beschrieben (Überblick in van Koppen, 2001).

1.2 Amphiphysin

Amphiphysin wurde zuerst in Präsynapsen von Lichte und Mitarbeitern identifiziert (Lichte *et al.*, 1992), kurz darauf erkannte man es als Antigen der sehr seltenen neurologischen Störung *Stiff Man Syndrome* oder *Stiff person Syndrome* (Überblick in Murinson, 2004). Nach wie vor ist allerdings unklar, ob das Auftreten von Antikörpern gegen unter anderem Amphiphysin nur eine Begleiterscheinung der neurologischen Symptome wie Lähmungen, Zittern etc. ist oder ob es dafür ursächlich verantwortlich ist. Oft geht die Erkrankung mit einer seltenen Form des Mammacarcinoms einher (David *et al.*, 1994). Es sind zwei Gene bekannt, welche für Amphiphysine kodieren, wobei das Expressionsmuster gewebeabhängig ist.

1.2.1 Struktur der Amphiphysine

Die Primärstruktur von Amphiphysin-1 wurde durch Wigge und Mitarbeiter (1998) folgendermaßen untergliedert: Eine α -helikale Domäne (AS 1- 131), eine prolinreiche Domäne (AS 132 – 342), eine wenig konservierte, saure Verbindungsdomäne (AS 343 – 605) und eine SH3-Domäne (AS 606 – 693). Durch die Arbeiten zur Lokalisation von AP-2- und Clathrinbindungsstellen (Slepnev *et al.*, 2000) und zur Bindung von Endophilin (Micheva *et al.*, 1997b) wurde dieses Modell modifiziert. Zhang und Zelhof schlugen in einem Übersichtsartikel die Bezeichnung CLAP-Domäne für den Teil der Amphiphysinsequenz vor, der die Bindungsmotive für Clathrin und AP-2 enthält (Zhang & Zelhof, 2002). Somit ergibt sich ein Schema, wie es in Abb. 3 dargestellt ist.

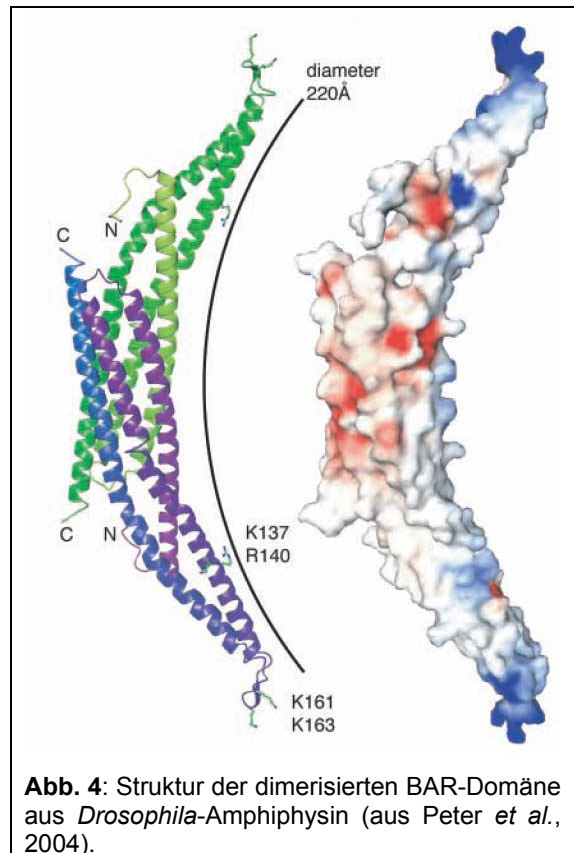


1.2.1.1 Die BAR-Domäne

Die N-terminal gelegene BAR-Domäne erhielt diese Bezeichnung, weil sie in den damals bekannten Amphiphysinhomologen Bin (Bridging Integrator Protein), Amphiphysin und Rvs 161 u. 167 vorkommt (Sakamuro *et al.*, 1996). Mittlerweile kennt man zahlreiche weitere Proteine, welche die BAR-Domäne enthalten und fasst sie entsprechend zur Superfamilie der BAR-Proteine zusammen (Peter *et al.*, 2004). Unter anderem wurde sie beschrieben in Endophilinen, Nexinen, Nadrinen und anderen (Peter *et al.*, 2004). Die BAR-Domäne ist das gemeinsame Merkmal aller bisher identifizierten Mitglieder der Amphiphysin-Familie, sowohl über verschiedene Spezies als auch Spleissvarianten ist sie hochkonserviert (pfam03114;SMART00721) (Ge & Prendergast, 2000). In humanem Amphiphysin-1 umfasst die BAR-Domäne je nach zugrunde liegendem Algorithmus die Aminosäurereste 15 – 199 oder 13 – 233 (pfam03114;SMART00721). In jüngster Zeit deutet sich die mutmaßliche Funktion dieses hochkonservierten Strukturelements an. Die BAR-Domäne spielt demnach offenbar eine Schlüsselrolle bei der Interaktion mit Lipidmembranen. Erste Hinweise

ergaben sich aus der Arbeit von Ramjaun und Mitarbeitern; sie fanden, dass eine Sequenz von 31 Aminosäuren im N-Terminus von Amphiphysin-2 für diese Wechselwirkung verantwortlich ist (Ramjaun *et al.*, 1999). Sie fanden auch, dass diese 31 Aminosäuren wichtig sind für die Fähigkeit von Amphiphysin, Dimere zu bilden. Erste Hinweise auf das Vorkommen von Amphiphysin-1/-2-Dimeren waren von Wigge und Mitarbeitern gefunden worden (Wigge *et al.*, 1997).

Weitere Hinweise in dieser Richtung ergaben die Arbeiten von Takei und Mitarbeitern über die Fähigkeit von Amphiphysin, *in vitro* mit Liposomen zu interagieren und daraus Membrantubuli zu bilden, die mit Amphiphysin bedeckt sind, eine Fähigkeit, die auch Deletionsmutanten aufwiesen, welche nur noch die BAR-Domäne umfassten. (Takei *et al.*, 1999; Takei *et al.*, 2001). Razzaq und Mitarbeiter fanden, dass *Drosophila*-Amphiphysin eine essentielle Komponente für die Organisation der transversalen Tubuli (T-Tubuli) in der Muskulatur dieser Tiere darstellt (Razzaq *et al.*, 2001). Die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* besitzt nur ein einziges Amphiphysin-Gen, das Protein wird während der Entwicklung nahezu im ganzen Tier expremiert. Allerdings ist es nicht in Präsynapsen angereichert, sondern postsynaptisch an der neuromuskulären Endplatte. Nullmutanten sind lebensfähig, aber flugunfähig (Leventis *et al.*, 2001). Diese Befunde wurden unterstützt durch eine Arbeit, in der für Bin1, eine Spleißvariante von Amphiphysin-2 in Säugern, eine ganz ähnliche Funktion nachgewiesen werden konnte (Lee *et al.*, 2002). Peter und Kollegen gelang es, die Struktur der BAR-Domäne von Amphiphysin aus *Drosophila melanogaster* röntgenkristallographisch zu ermitteln. Die Struktur, die sie fanden, besteht aus einem bananenförmigen Dimer, dessen konkave Seite einem



nahezu im ganzen Tier expremiert. Allerdings ist es nicht in Präsynapsen angereichert, sondern postsynaptisch an der neuromuskulären Endplatte. Nullmutanten sind lebensfähig, aber flugunfähig (Leventis *et al.*, 2001). Diese Befunde wurden unterstützt durch eine Arbeit, in der für Bin1, eine Spleißvariante von Amphiphysin-2 in Säugern, eine ganz ähnliche Funktion nachgewiesen werden konnte (Lee *et al.*, 2002). Peter und Kollegen gelang es, die Struktur der BAR-Domäne von Amphiphysin aus *Drosophila melanogaster* röntgenkristallographisch zu ermitteln. Die Struktur, die sie fanden, besteht aus einem bananenförmigen Dimer, dessen konkave Seite einem

Kreis mit einem Radius von ca. 22 nm anliegen würde (Peter *et al.*, 2004). Sie zeigten, dass jedes Monomer drei parallele, α -helikale Strukturen enthält, die sich zusammenlagern. Bereits zuvor war vorgeschlagen worden, dass Amphiphysin als Sensor bzw. Induktor für Membrankrümmung fungieren könnte (Takei *et al.*, 1999). Peter und Mitarbeiter schlugen aufgrund ihrer strukturellen Daten ein Modell vor, bei welchem die definierte Krümmung des BAR-Domänen-Dimers nur mit Membrantubuli bzw. -vesikeln definierter Größe wechselwirkt. Durch Mutageneseexperimente konnten sie zeigen, dass die Membranbindung der BAR-Domäne auf der Wechselwirkung einiger weniger Aminosäurereste mit Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat beruht. Wurden zwei exponierte KXX bzw. KXXR-Motive (K127, R140, K161 und K163, siehe Abb. 4) zu EX(X)E mutiert, wurde dadurch die Membranbindung effektiv inhibiert (Lee & Schekman, 2004; Peter *et al.*, 2004; Überblick in Zimmerberg & McLaughlin, 2004)

In jüngsten Arbeiten wurde das Konzept der BAR-Domäne nochmals erweitert. Itoh und Mitarbeiter gruppieren nun sowohl die BAR-Domänen- als auch die sogenannten F-BAR-Domänenproteine in eine gemeinsame Superfamilie (Itoh *et al.*, 2005). Es handelt sich bei letzteren um eine Gruppe von Proteinen, welche eine sogenannte FCH-Domäne, gefolgt von einer Coiled-Coil-Domäne enthalten. Beide zusammen bilden ein Modul, welches eine gewisse Sequenzhomologie zur BAR-Domäne und insbesondere in Computerprogrammen zur Strukturvorhersage eine Übereinstimmung aufweist (Tsujiita *et al.*, 2006). Ein Prototyp dieser Gruppe von Proteinen ist das Syndapin/PACSIN, ein endocytotisches Protein welches regulatorisch auf das Actincytoskelett einwirkt und ähnlich wie Amphiphysin über seine SH3-Domäne mit Dynamin und Synaptojanin sowie mit dem Protein N-WASP wechselwirken kann (Qualmann *et al.*, 1999; Modregger *et al.*, 2002) Itoh und Mitarbeiter fanden, dass sowohl Syndapin als auch die – für die FCH-Domäne namensgebenden – Proteine FBP17 und CIP4 *in vitro* und *in vivo* eine ausgeprägte Fähigkeit besitzen, Membranen zu tubulieren. Da es sich bei allen genannten Proteinen um Actin-bindende Proteine handelt, sprechen diese Befunde für eine Verbindung zwischen der Regulation des Actincytoskeletts und Membrantubulierung (Überblick in Ren *et al.*, 2006)

1.2.1.2 Die prolinreiche Domäne

An die BAR-Domäne schließt sich die prolinreiche Domäne an. Neben Prolinen finden sich hier auch sehr viele Aspartatreste. In diesem Bereich der Amphiphysinstruktur findet die Bindung von Endophilin (Micheva *et al.*, 1997b) und AP-2 statt (Slepnev *et al.*, 2000). Das Bindungsmotiv FFED interagiert hierbei mit der Ohrdomäne von α -Adaptin (Wang *et al.*, 1995). Im zentralen, konservierten Abschnitt der Amphiphysinstruktur befinden sich zwei Clathrinbindungsmotive (Slepnev *et al.*, 2000; Miele *et al.*, 2004). Bei diesen handelt es sich um die Clathrinbox LLDLD und die W-Box PWXXW.

1.2.1.3 Die variable Domäne

Dieser Abschnitt der Amphiphysinsequenz ist am wenigsten konserviert und funktionell und strukturell nicht charakterisiert.

1.2.1.4 Die SH3-Domäne interagiert mit Dynamin

Im C-Terminus des Amphiphysin liegt eine SH3-Domäne. Diese Domäne kann *in vitro* mit prolinreichen Domänen einer Reihe von Proteinen interagieren, z.B. Dynamin, Synaptojanin und Synapsin (David *et al.*, 1996; Grabs *et al.*, 1997; Micheva *et al.*, 1997a). In Zellen manifestiert sich aber wahrscheinlich nur die Interaktion mit Dynamin. Auf dieser Basis schlugen David und Mitarbeiter ein Modell vor, in dem die Bindung von Amphiphysin zur Rekrutierung von Dynamin an den Hals des knospenden Vesikels führt, wodurch Dynamin zur Oligomerisierung befähigt wird und seine Rolle als Mechanoenzym wahrnehmen kann (David *et al.*, 1996, siehe auch Abb. 5). Die Kopplung dieser Interaktionen mit Clathrin einerseits und Dynamin andererseits konnte im zellfreien System morphologisch bestätigt werden (Takei *et al.*, 1999). Grabs und Mitarbeiter fanden, dass die Bindung der SH3-Domäne von Amphiphysin an die prolinreiche Domäne von Dynamin spezifische Sequenzmotive in beiden Bindungspartnern erfordert, es handelt sich hierbei um die Sequenzen PSRPNR in Dynamin und PXRpxR(H)R(H) in Amphiphysin (Grabs *et al.*, 1997). Weitere Hinweise auf die Wichtigkeit dieser Interaktion ergaben Experimente mit Axonen von *Lampetra fluviatilis* (Neunauge). Mikroinjizierte man die SH3-Domäne von Amphiphysin bzw. ein Peptid, welches das SH3-Bindungsmotiv von Dynamin

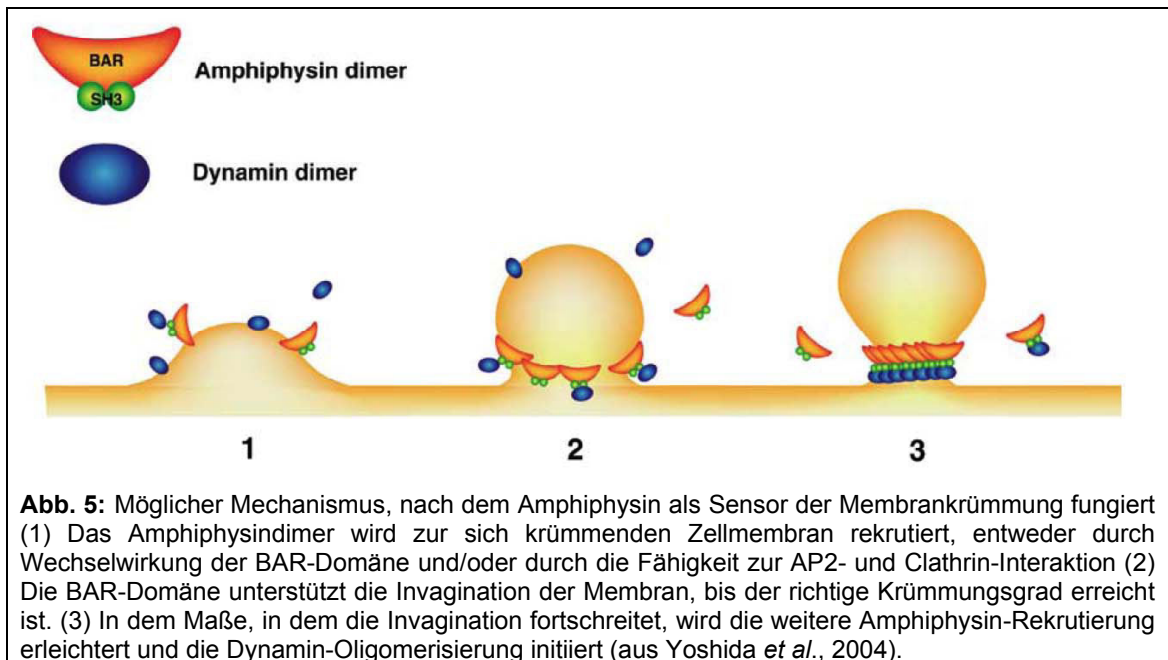


Abb. 5: Möglicher Mechanismus, nach dem Amphiphysin als Sensor der Membrankrümmung fungiert (1) Das Amphiphysindimer wird zur sich krümmenden Zellmembran rekrutiert, entweder durch Wechselwirkung der BAR-Domäne und/oder durch die Fähigkeit zur AP2- und Clathrin-Interaktion (2) Die BAR-Domäne unterstützt die Invagination der Membran, bis der richtige Krümmungsgrad erreicht ist. (3) In dem Maße, in dem die Invagination fortschreitet, wird die weitere Amphiphysin-Rekrutierung erleichtert und die Dynamin-Oligomerisierung initiiert (aus Yoshida *et al.*, 2004).

enthielt, wurde dadurch die Morphologie der Synapse verändert und die Neurotransmitterfreisetzung nach Stimulation verringert (Shupliakov *et al.*, 1997). Interessante Erkenntnisse zur regulatorischen Rolle von Amphiphysin beim Recycling synaptischer Vesikel über Clathrin-vermittelte Endocytose ergab die Untersuchung einer Amphiphysin-1-Deletionsmutante von *Mus musculus*. Die Tiere waren lebensfähig, jedoch war das Recycling synaptischer Vesikel bei ihnen stark gestört. Dies führte unter anderem zu einer erhöhten Mortalitätsrate durch Krampfanfälle und zu einer verminderten Gedächtnisleistung (Di Paolo *et al.*, 2002). Während also Amphiphysin-1 für die Maus nicht unbedingt lebensnotwendig zu sein scheint, so kommt ihm offensichtlich eine wichtige Rolle bei der Feinregulation der Funktion der Synapse zu. Dies steht im Einklang mit der Implikation von Amphiphysin-1 in neurologischen Erkrankungen (De Camilli *et al.*, 1993; Floyd *et al.*, 1998; Schmierer *et al.*, 1998; Antoine *et al.*, 1999; Übersicht in Antoine & Honnorat, 2000).

1.2.1.5 Gewebeabhängige Expression der Amphiphysine

Amphiphysin-1 wird in Nervenzellen in der Nebenniere, Hoden, Lungen und Brustdrüsen expremiert, während Amphiphysin-2 zusätzlich auch in zahlreichen anderen Geweben auftritt (Lichte *et al.*, 1992; Leprince *et al.*, 1997; Ramjaun *et al.*, 1997; Tsutsui *et al.*, 1997; Terada *et al.*, 2002; Hosoya & Tsutsui, 2004). Amphiphysin-2 wird auch als Bin-1 bezeichnet. Die beiden Amphiphysingene werden

in zahlreichen Spleißvarianten expremiert, wobei allen das Vorhandensein einer BAR-Domäne und allen – mit zwei Ausnahmen – die SH3-Domäne gemeinsam ist (Übersicht in Zhang & Zehhof, 2002). Verschiedene Arbeitsgruppen fanden, dass bestimmte Spleißvarianten des Amphiphysin-2 in Tumoren herunterreguliert sind, ein Befund welcher für eine Tumorsuppressorfunktion der Amphiphysine spricht (Sakamuro *et al.*, 1996). In *Saccharomyces cerevisiae* kommen zwei Homologe des Amphiphysin vor, Rvs161 und Rvs167, welche *in vivo* als Dimer fungieren (Lombardi & Riezman, 2001).

1.2.2 Regulation der Endocytose

1.2.2.1 Phosphorylierung von Membranlipiden

Der Phosphorylierung von Membranlipiden kommt Bedeutung bei der Regulation der Endocytose zu. Insbesondere wichtig ist hier das Membranlipid Phosphoinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂). Dieses wird durch spezifische Kinasen aus dem Vorläufermolekül Phosphatidylinositol-4-phosphat (PIP) gebildet. PIP₂ ist ein Molekül, welches an einer Fülle von intrazellulären Prozessen beteiligt ist, so fungiert es als Vorläufer mehrerer intrazellulärer Botenstoffe und als Membrananker für Komponenten des Cytoskeletts (McLaughlin & Murray, 2005). Zahlreiche an der Clathrin-vermittelten Endocytose beteiligten Proteine können über ihre Pleckstrin-Homologie-Domäne (PH-Domäne) mit Phosphoinositiden wechselwirken, wobei unterschiedliche Proteine verschiedene Spezifitäten für PIP₂ aufweisen (Übersicht in Cullen *et al.*, 2001). Weitere Interaktionen ergeben sich über die ENTH-Domäne in vielen endocytotischen Proteinen (Itoh & Takenawa, 2004). Die Bedeutung der Phosphorylierung von PIP zu PIP₂ zeigt sich beispielsweise darin, dass ihre Inhibition die Endocytose des EGFR verhindert (Barbieri *et al.*, 2001). Es gibt aber auch Hinweise, dass PIP₂ nicht synthetisiert werden muss, sondern dass seine lokale Konzentration an der Membran auch über Rekrutierung durch basische Proteine bzw. Proteindomänen erfolgen kann (Laux *et al.*, 2000). In Untersuchungen, in denen der Abbau von PIP₂ verringert war, ergab sich eine Anreicherung von endocytotischen Vesikeln in der Cytomatrix (Cremona *et al.*, 1999). In jüngster Zeit erkannte man die Bedeutung von PIP₂ für die Membranbindung der BAR-Domäne von Amphiphysin (Peter *et al.*, 2004).

1.2.2.2 Phosphorylierung von Proteinen

Auf welche Weise wird die Interaktion der an der Clathrin-vermittelten Endocytose beteiligten Proteine reguliert? Nach dem gegenwärtigen Kenntnisstand geht man davon aus, dass Proteinphosphorylierung in verschiedenen Stadien dieses Prozesses eine entscheidende Rolle spielt. Von zahlreichen Rezeptoren, welche durch Clathrin-vermittelte Endocytose internalisiert werden, ist bekannt, dass sie bei Aktivierung phosphoryliert bzw. autophosphoryliert werden. Ein gut untersuchtes Beispiel ist der Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors (EGFR), welcher nach Ligandenbindung autophosphoryliert wird und daraufhin den AP-2 Adaptorkomplex rekrutiert (Nesterov *et al.*, 1995). Weitere Beispiele umfassen Rezeptoren wie HER2 (Gilboa *et al.*, 1995) oder den T-Zellenrezeptor TCR (Dietrich *et al.*, 1997). Es sind jedoch auch Beispiele bekannt, in denen Phosphorylierung des Rezeptors die Interaktion mit AP-2 inhibiert, so beim CTLA-4-Rezeptor in T-Zellen (Bradshaw *et al.*, 1997; Shiratori *et al.*, 1997). Auf der Ebene der endocytotischen Proteine selbst ergeben sich ebenfalls zahlreiche Anhaltspunkte für die Regulation ihrer Aktivität durch Phosphorylierung. Wird die Phosphorylierung des Adaptorkomplexes AP-2 an seiner μ -Untereinheit inhibiert, so unterbindet dieses eine effiziente Aufnahme von Transferrin über Clathrin-vermittelte Endocytose (Olusanya *et al.*, 2001). Diese Modifikation wird von der Serin-Threonin-Kinase AAK1 katalysiert (Conner & Schmid, 2002). Betrachtet man Clathrin selbst, so finden sich hier zahlreiche Befunde, welche auf eine regulatorische Wirkung der Phosphorylierung der leichten Ketten hinweisen. Die Phosphorylierung von CLC im Gehirn wurde erstmals vor 20 Jahren beschrieben (Schook & Puszkin, 1985; Usami *et al.*, 1985). Interessanterweise unterscheiden sich hier die beiden Isoformen von CLC; CLCb wird von CK-2 phosphoryliert, CLCa wird nicht phosphoryliert (Hill *et al.*, 1988). Zumindest in Hefe scheint jedoch die Phosphorylierung der leichten Ketten von Clathrin für die Stabilität von Triskelia und Käfigen keine Bedeutung zu besitzen (Chu *et al.*, 1999). Zahlreiche weitere endocytotische Proteine werden über Phosphorylierung reguliert (Cousin *et al.*, 2001). In den überwiegenden Fällen scheint die Phosphorylierung dieser Proteine ihre Wechselwirkungen zu vermindern (Slepnev *et al.*, 1998). Viele Erkenntnisse über diese Vorgänge wurden in Studien an isolierten Nervenenden (Synaptosomen) gewonnen. Während ein Großteil der untersuchten prä-synaptischen Proteine als Reaktion auf eine Stimulation phosphoryliert werden, so

existiert auch eine kleine Gruppe, welche dephosphoryliert wird. Es konnte gezeigt werden, dass letztere sämtlich eine Rolle beim Recycling synaptischer Vesikel über Clathrin-vermittelte Endocytose spielen (Cousin *et al.*, 2001; Übersicht in Sudhof, 2004). Diese, von Cousin und Mitarbeitern auch als „Dephosphine“ bezeichneten Proteine sind im einzelnen: Dynamin-1 (Robinson *et al.*, 1993), Synaptojanin-1 (McPherson *et al.*, 1994; McPherson *et al.*, 1996), die Adaptorproteine Epsin-1, Eps15 und AP180 (Chen *et al.*, 1999; Cousin *et al.*, 2001) und Amphiphysin-1 und -2 (Bauerfeind *et al.*, 1997; Wigge *et al.*, 1997). Die Dephosphorylierung dieser Proteine erfolgt sehr rasch als Reaktion auf einen Calcium-Influx durch spannungsabhängige Calciumkanäle. Sie wird vermittelt durch die Calcium/Calmodulin-abhängige Phosphatase Calcineurin. Es wurde gezeigt, dass die sehr spezifischen Calcineurin-Inhibitoren Cyclosporin A und FK506 in Synaptosomen die Endocytose synaptischer Vesikel, nicht jedoch ihre Exocytose unterbinden konnten (Marks & McMahon, 1998; Cousin *et al.*, 2001). Sie inhibieren ebenfalls die Endocytose des AMPA-Rezeptors in postsynaptischen Dendriten (Beattie *et al.*, 2000) und die Clathrin-vermittelte Aufnahme von Transferrin in nicht-neuronalen Zellen (Lai *et al.* 2000).

1.2.3 Regulation der Amphiphysine über Phosphorylierung

Bauerfeind und Mitarbeiter konnten erstmals zeigen, dass Amphiphysin-1 in Neuronen konstitutiv phosphoryliert vorliegt, ähnlich wie die synaptischen Proteine Dynamin 1 und Synaptojanin 1 (Bauerfeind *et al.*, 1997). Wird eine Präparation aus neuronalen Zellen, so genannten Synaptosomen, durch erhöhte Kaliumkonzentration stimuliert, so erfolgt eine rasche Dephosphorylierung des Proteins. Diese Phosphorylierung ist abhängig vom Einstrom extrazellulärer Calciumionen, nicht jedoch von vorhergehender Exocytose neurotransmittergefüllter Vesikel. Durch pharmakologische Experimente wurde gezeigt, dass diese Dephosphorylierung von der Phosphatase Calcineurin vermittelt wird. Amphiphysin-1 und Phospho-Amphiphysin lassen sich dabei über ihre unterschiedliche elektrophoretische Mobilität unterscheiden. Eine andere Arbeitsgruppe kam zu dem Befund, dass auch Amphiphysin-2 schneller Phosphorylierung und Dephosphorylierung unterworfen ist (Wigge *et al.*, 1997). Die bereits erwähnte Funktion von Calcineurin als Mediator der Dephosphorylierung von Amphiphysin konnte in Synaptosomen nachgewiesen werden

(Marks & McMahon, 1998). In einer Arbeit von Lai und Mitarbeitern konnte gezeigt werden, dass das Protein Cain als Inhibitor von Calcineurin fungiert. Darüber hinaus bindet es an die SH3-Domäne von Amphiphysin-1, ohne jedoch dessen Interaktion mit anderen endocytotischen Proteinen zu beeinflussen (Lai *et al.*, 2000).

1.2.4 Amphiphysin als Substrat verschiedener Kinasen

In mehreren Veröffentlichungen wurden verschiedene Kinasen für die Phosphorylierung der Amphiphysine verantwortlich gemacht. Rosales und Kollegen fanden eine Interaktion zwischen Amphiphysin-1 und cdk5 (Rosales *et al.*, 2000) in welcher Amphiphysin-1 als Substrat auftrat. Eine andere Arbeitsgruppe präziserte diese Ergebnisse dahingehend, dass diese Phosphorylierung in der Region der putativen Phosphorylierungsstellen Serin 272, 276 und 285 stattfindet (Floyd *et al.*, 2001). Cdk5 gehört zur Familie der cyclinabhängigen Kinasen und wird unter anderem mit der Regulation des Wachstums von Neuriten und der Richtungsbestimmung von Neuronen, möglicherweise über die Regulation der Aktivität des Actincytoskeletts, in Verbindung gebracht (Übersicht in Smith, 2003). Die Arbeit von Floyd und Mitarbeitern beschreibt ebenfalls eine Phosphorylierung von Amphiphysin in der für cdk5-Phosphorylierung angenommenen Region durch den cdc2/Cyclin B-Kinasekomplex; möglicherweise kommt dieser Phosphorylierung auch eine Bedeutung in der Zellteilung zu (Floyd *et al.*, 2001). Tomizawa und Kollegen zeigten die Bedeutung des cdk5/p35-Komplexes für Amphiphysin-1-Phosphorylierung in Experimenten mit cdk5-Inhibitoren und mit p35-defizienten Mäusen. Über tryptischen Verdau gekoppelt mit MS-Analytik und Mutageneseexperimente identifizierten sie die Phosphorylierungsstellen als die Serine 262, 272, 276, 285 und Threonin 310. Cdk5-abhängige Phosphorylierung von Amphiphysin-1 beeinträchtigte die Bindung von β -Adaptin sowie die Interaktion mit Dynamin (Tomizawa *et al.*, 2003). Allerdings wurden die Befunde bezüglich der Bedeutung von cdk5 für die Phosphorylierung von Amphiphysin-1 auch in Frage gestellt: Tan und Mitarbeiter konnten lediglich die Re-Phosphorylierung von Dynamin-1 und Synaptojanin-1, nicht aber von Amphiphysin-1, durch cdk5 *in vivo* nachweisen (Tan *et al.*, 2003). Eine weitere Arbeitsgruppe fand, dass die Phosphorylierung von Amphiphysin-2 im Cerebellum von Mäusen verstärkt

war, wenn diese zuvor einer Elektroschockbehandlung ausgesetzt waren (Koo *et al.*, 2002).

2 Material und Methoden

2.1 Methoden

2.1.1 Molekularbiologische Methoden

2.1.1.1 DNA-Präparation

Zur Aufreinigung von Plasmid-DNA wurden die entsprechenden Kits der Firma Qiagen nach Maßgabe des Herstellers verwendet.

2.1.1.2 Restriktionsverdau

Plasmid-DNA wurde mit Restriktionsendonucleasen gemäß dem Protokoll des jeweiligen Herstellers verdaut. Üblicherweise wurde bezüglich der verwendeten Puffer den Herstellerempfehlungen gefolgt. Im Falle von Doppelverdau wurden die optimalen Pufferbedingungen mit Hilfe des Online-Tools „Double Digest“ der Firma Fermentas ermittelt (<http://www.fermentas.com/doubledigest/index.html>).

2.1.1.3 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten bzw. zur Kontrolle von Plasmiden wurden 0,7 – 1,2%ige (w/v) Agarose-Gele verwendet. Die Agarose wurde im Mikrowellenofen mit dem entsprechenden Volumen TAE-Puffer bis zur klaren Lösung aufgeköcht, 5 µl einer 0,1 %igen Ethidiumbromidlösung hinzugefügt und das Gel gegossen. Der Elektrophoreselauf erfolgte bei maximal 120 V, typischerweise, bis der Frontmarker an der unteren Gelkante angelangt war. Die Detektion erfolgte unter UV-Licht. Verdaute DNA wurde mit Hilfe von Agarose-Gelelektrophorese aufgereinigt, wobei je nach Fragmentgröße Gelkonzentrationen zwischen 0,8 % und 1,2 % zum Einsatz gelangten. Die Banden mit den gewünschten Fragmenten wurden ausgeschnitten und die DNA mit Hilfe des *Gel Extraction Kit* der Firma Qiagen isoliert.

2.1.1.4 Gel-Extraktion

Zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus ausgeschnittenen Banden aus Agarosegelen wurde das „QIAquick Gel Extraction Kit“ gemäß den Angaben des Herstellers verwendet.

2.1.1.5 Ligation

Ligationsansätze von DNA-Fragmenten wurden gemäß den Spezifikationen des Ligaseherstellers zusammengesetzt und zur Reaktion gebracht. In Abweichung von diesen Spezifikationen wurde, insbesondere bei schwierigen Ligationen (beispielsweise Ligationen glatter Enden) ein Zyklus-Ligationsprotokoll verwendet. Hierbei durchläuft der Ansatz in einem Thermocycler verschiedene Temperaturen, um auszunutzen, dass einerseits die Aktivität der T4-Ligase bei einer Temperatur von 37°C optimal ist, andererseits bei tieferen Temperaturen die DNA-Fragmente und ihre Enden einer geringeren thermischen Bewegung unterliegen und somit statistisch länger in der zur Ligation geeigneten Kombination aufeinander treffen. Der Verlauf des Zyklus war wie folgt:

- 1.) 20 min 37°C
- 2.) 1 min 10°C
- 3.) 30 s 22°C , dann Schleife an 2.), 30 x wiederholen
- 4.) 30 s 4°C
- 5.) 30 s 30°C, dann Schleife an 1.), 10 x wiederholen
- 6.) 1 h 37°C
- 7.) 15 min 65°C
- 8.) Pause bei 4°C

2.1.1.6 Dialyse von Ligationsansätzen

Nach erfolgter Mutagenesereaktion und Restriktionsverdau mit DpnI wurden die zu transformierenden Ansätze einer Entsalzung unterzogen. Hierzu wurde ein Nitrocellulosefilter in einem mit Millipore-Wasser gefülltem Becherglas schwimmen gelassen und typischerweise die Hälfte des Reaktionsansatzes (20 µl) auf dieses Filter pipettiert. Nach 20 min Inkubationszeit entfernte man den Reaktionsansatz und führte ihn der Elektroporation zu.

2.1.1.7 Elektroporation

Der Ansatz wurde mit auf 50 µl Eis aufgetauter *E.coli* DH5α (präpariert gemäß (Sambrook J., 1998)) vermengt und in einer Elektroporationsküvette einem Hochspannungspuls ausgesetzt. Sofort danach wurde diese Mischung in 1 ml eiskaltem SOC-Medium aufgenommen und 1 h bei 37°C im Schüttler inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz auf einer LB-Agarplatte mit Antibiotikumzusatz mittels eines Drigalski-Spatels ausplattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet.

2.1.1.8 Transformation durch thermischen Schock

Circa 50 Nanogramm der zu transformierenden DNA wurden mit 50 µl auf Eis aufgetauter, kompetenter *E.coli* DH5α (präpariert gemäß Sambrook J., 1998) vermischt und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend inkubierte man den Ansatz exakt 90 Sekunden bei 42°C. Nach einer weiteren kurzen Inkubation auf Eis wurde 1 ml LB-Medium (mit Antibiotikumzusatz) zugesetzt und eine Stunde bei 37°C im Schüttler inkubiert. Danach wurde auf einer LB-Agarplatte (mit Antibiotikumzusatz) ausplattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet.

2.1.1.9 Schnelltest zur Überprüfung von Ligationsansätzen

Diese Methode wurde verwendet, um schnell eine große Anzahl von Kolonien zu überprüfen. Hierzu wurden 100 µl einer Übernachtskultur der jeweiligen *E.coli*-DH5α-Kolonien mit 50 µl Phenol-Chlorform-Mischung und 10 µl Schnelltest-Puffer versetzt und ca. 30 s auf dem Vortex geschüttelt. Anschließend erfolgte Zentrifugation für 2 min bei 12000 rpm in der Tischzentrifuge. Etwa 20 µl des wässrigen Überstands wurden direkt auf ein Agarosegel aufgetragen und elektrophoresiert. Als Kontrolle wurde das Ausgangsplasmid verwendet.

2.1.1.10 Zielgerichtete Mutagenese

Gerichtete Mutagenesen wurden nach dem „Quikchange“-Protokoll der Firma Stratagene durchgeführt. Dieses Protokoll wurde dahingehend modifiziert, dass das Restriktionsenzym DpnI auch von anderen Herstellern bezogen wurde, sowie das PCR-Produkt mittels Elektroporation in *E.coli*-Bakterien des Stammes XL1 Blue transformiert wurde (Sambrook J., 1998). Mutageneseprimer wurden für die

jeweiligen Aminosäureaustausche entworfen und von der Firma IBA, Göttingen bezogen. Beim Entwurf der Primer wurde nach folgender Formel verfahren:

$$T_M = 81,5 + 0,41 (\%GC) - 675/N - \% \text{ Fehlpaarung}$$

Hierbei sollte der Schmelzpunkt T_M idealerweise größer / gleich 78°C sein. N bezeichnet die Anzahl der Basen des Primers. Weiterhin war beim Entwurf der Primer zu beachten, dass sich die gewünschte Mutation (maximal sechs Basenaustausche) möglichst in der Mitte des Primers befand, der idealerweise zwischen 30 und 45 Basen lang war. Wenn möglich wurden die auszutauschenden Basen so gewählt, dass nach erfolgter Mutagenese entweder eine zusätzliche Restriktionsschnittstelle entstand oder eine im Wildtyp enthaltene endogene Schnittstelle zerstört wurde. Auf diese Weise ergab sich eine elegante Möglichkeit, positive von falsch-positiven Klonen zu unterscheiden. Positive Klone wurden zusätzlich durch DNA-Sequenzierung verifiziert. Zur Mutagenesereaktion wurde folgender Ansatz verwandt:

5 μl 10X Reaktionspuffer QuikChange
5–50 ng doppelsträngiges DNA-Templat
125 ng Oligonucleotidprimer #1
125 ng Oligonucleotidprimer #2
1 μl of dNTP mix (25 μM)
steriles bidestilliertes H_2O auf ein Endvolumen von 50 μl

Zur Durchführung der Reaktion gibt Stratagene das folgende Protokoll an, welches so übernommen wurde. Außer bei schwierigen Mutagenesereaktionen wurden 16 Zyklen gefahren.

1. 30 s Vorheizen 95°C
2. 30 s 95°C
3. 1 min 55°C
4. 1min/ Kilobase 68°C
Schleife zu 2.

2.1.2 Proteinchemische Methoden

2.1.2.1 Aufreinigung von Cytosol aus Rattenhirn

Etwa 1 g gefrorenes Cerebellum der Ratte wurden in den Glas-Teflon-Homogenisator gegeben, mit Homogenisationspuffer auf 5 ml aufgefüllt und ca. 5 min auftauen gelassen. Ein erster Homogenisationsschritt erfolgte bei 800 rpm durch langsames Auf- und Abbewegen des Teflonstempels (1-2 Mal). Nach der Zugabe des Proteaseinhibitorcocktails (PMSF 1:250, AEL und ABP 1:500) wurde im zweiten Homogenisierungsschritt die Rotationsgeschwindigkeit bei halb eingeführtem Stempel langsam von 800 rpm auf 2000 rpm erhöht und dann fünfmal langsam auf- und abbewegt. Anschließend wurde in ein SS34-Zentrifugenröhrchen überführt, Triton X-100 in einer Endkonzentration von 1% zugefügt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach erfolgter Austarierung der Zentrifugenröhrchen wurde bei 4°C und 3000 rpm für 10 min zentrifugiert, der Überstand in neue Zentrifugenröhrchen überführt und die Pellets verworfen. Es schloss sich der zweite Zentrifugationsschritt an bei 4°C und 12000 rpm für 20 min. Der so gewonnene Überstand wurde entweder direkt in Bindungsexperimente eingesetzt oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.1.2.2 Aufreinigung von Clathrintriskelia

Clathrintriskelia wurden nach dem Protokoll von R. Lindner (1992) aufgereinigt und waren eine freundliche Gabe von Shashi Kant, Institut für physiologische Chemie, Medizinische Hochschule Hannover.

2.1.2.3 Expressionskultur in E. coli BL21c+ und Aufreinigung des Fusionsproteins

Mit einer einzigen Kolonie von mit dem gewünschten Konstrukt beimpften Bakterien wurde zunächst eine Vorkultur (2,5 ml LB-Medium mit Antibiotikumzusatz) beimpft. Diese wurde über Nacht inkubiert und in 100 – 500 ml LB-Medium mit Antibiotikazusatz für die Hauptkultur überimpft. Diese wurde im Inkubator bei 220 rpm und 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,45 – 0,55 wachsen gelassen. Anschließend wurde mit 0,1 mM IPTG induziert und bei Raumtemperatur und 220 rpm 5 h lang expremiert. Um die Bakterien zu ernten wurde 30 min bei 4°C im bei 4300 rpm in 50 ml-Greiner-Röhrchen in der Kühlzentrifuge Megafuge 1.0 R zentrifugiert. Bei

größeren Ansätzen erfolgte die Zentrifugation alternativ in 500 ml-Zentrifugenbechern im GS3-Rotor für 10 min bei 5000 rpm und 4°C. Das Pellet wurde entweder bei -20°C gelagert oder direkt weiter verarbeitet. Hierzu versetzte man auf Eis mit 5 ml eiskaltem PBS und dem o.g. Proteaseinhibitorcocktail. Nach gründlichem Resuspendieren durch Vortexen und Pipettieren überführte man den Ansatz in ein SS34-Zentrifugenröhrchen. Der Aufschluss der Zellen erfolgte durch drei Ultraschallpulse von je 5 s Dauer und je 1 min Abstand bei etwa 30 % Leistung (Branson Sonifier 250). Anschließend wurde Triton X-100 in einer Endkonzentration von 1% zugesetzt und 15 min auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation im SS34-Rotor für 5 min bei 12.000 rpm wurde der Überstand auf ein entsprechendes Volumen zuvor zweimal mit eiskaltem PBS gewaschener Glutathion-Sepharose gegeben und dieser Ansatz nun für 1 h bei 4°C auf dem Probenrad inkubiert. Danach erfolgte Sedimentierung für 1 min bei 2000 rpm und 4°C in der Megafuge 1.0 R und anschließend dreimaliges Waschen mit 5 ml eiskaltem, sterilen PBS. Zuletzt erfolgte Resuspendierung der beladenen Sepharose in einem passenden Volumen eiskalten, sterilen PBS.

2.1.2.4 Abschneiden der GST-Domäne

Da es bei den nach dem zuvor geschilderten Verfahren expremierten Proteinen um GST-Fusionsproteine handelt, ist ein Verdauungsschritt mit einer Protease vonnöten, um das GST-freie Protein zu erhalten. Hierzu wurden die mit Protein beladenen Sepharose-Kügelchen zweimal mit „Prestission-Protease“-Puffer gewaschen und anschließend in dem gewünschten Puffervolumen resuspendiert. Zum Abbau der GST-Domäne versetzt man mit 10 u „Prestission Protease“ pro mg rekombinantes Protein und inkubiert über Nacht bei 4°C auf dem Probenrad. Um überschüssiges Enzym zu binden, versetzt man nach dieser Inkubation mit einem Zehntel des Gesamtvolumens unbeladener Sepharose und inkubiert für 1h auf dem Probenrad bei 4°C. Die Pelletierung erfolgte bei voller Drehzahl in der Tischzentrifuge, so dass man die überstehende Proteinlösung möglichst quantitativ abnehmen konnte.

2.1.2.5 Bindungsexperimente

Bindungsexperimente wurden mit GST-markiertem rekombinantes Amphiphysin-1 durchgeführt. Dieses wurde im pGEX6 Expressionsvektor expremiert und an

Sepharsekugeln gebunden. Gebundenes GST-Amphiphysin-1 wurde mit Clathrin-Triskelia in Homogenisierungspuffer für eine Stunde bei 4°C inkubiert. Die Ansätze wurden dabei vorsichtig auf einem Rad bewegt. Nach der Inkubation wurden die Sepharsekugeln in der Tischzentrifuge pelletiert und der Überstand abgenommen. Anschließend wurde dreimal mit Bindungspuffer gewaschen und dreimal mit Elutionspuffer eluiert, wobei das Gesamtvolumen Elutionspuffer pro Ansatz dem ursprünglich eingesetzten Volumen Triskelia-Lösung entsprach. Die vereinigten Eluate bzw. Überstände wurden mit 6-fach Probenpuffer und 1-Mercaptoethanol supplementiert. Analyse der Clathringehalte erfolgte über SDS-PAGE und Western Blot.

2.1.2.6 *In vitro* Kinasesassays

Ein µg rekombinantes Amphiphysin-1 wurden 30 min bei 37 ° C in einem Ansatz inkubiert welcher 1 mM Mg²⁺, 100 µM ATP, 2,5 u rekombinanter CK-2, 1 µg poly-L-Lysin and 3 µCi ³²P-γ-ATP enthielt und mit 10 mM TRIS-HCl pH 7,4 auf 50 µl supplementiert wurde. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 6fachem Probenpuffer abgestoppt. Analyse der Ansätze erfolgte durch SDS-PAGE auf Gradientengelen und Färbung mit Coomassie-Blau. Nach dem Entfärben inkubierte man das Gel 30 min in einer Lösung von 10 % (v/v) Ethanol und 3 % (v/v) Glycerol in Wasser und trocknete anschließend in einem Vakuumtrockner. Das getrocknete Gel wurde in einer Expositionscassette auf Röntgenfilm gelegt und bei – 80 ° C über Nacht exponiert. Die Entwicklung des Films erfolgte in der Entwicklermaschine.

2.1.2.7 *In vivo* Phosphorylierungsassays

PC 12 251C Zellen wurden in einer Dichte von 8x10⁵ Zellen pro Loch auf einer 24-Loch-Platte ausgesät und zur Konfluenz wachsen gelassen (~ über Nacht). Man platzierte die Platten in einem 37°C-Wasserbad, saugte das Medium ab und wusch zweimal mit je einem ml vorgewärmten KRB⁺-Puffer. Anschließend fügte man zu jedem Well 300 µl vorgewärmten Puffer mit der gewünschten InhibitorKonzentration. Nach dieser Vorinkubation wurden je 15 µl einer Vorverdünng von NGF oder PMA hinzugefügt, so dass die gewünschte Endkonzentration erreicht wurde. Man inkubierte in Anwesenheit von Inhibitor und Stimulator.

2.1.2.8 SDS-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde in einer Hoefer SE250-Apparatur durchgeführt. Dabei wurden für die meisten Untersuchungen Gradientengele (9-19% Polyacrylamid) mit einer Dicke von 1,5 mm verwendet. Zur Analyse von Phosphorylierungs- und Kinaseexperimenten, bei denen eine erhöhte Trennschärfe vonnöten war, wurden 5,5%ige Gele mit einer Dicke von 0,75 mm verwendet. Die Elektrophorese wurde unter Wasserkühlung der Apparaturen auf 7°C mit einer konstanten Stromstärke von 25 mA pro Gel in Laufpuffer durchgeführt.

2.1.2.9 Western Blotting

2.1.2.9.1 *Blot im Halbtrockenverfahren*

Auf der Unterseite der Halbtrockentransfervorrichtung wurden sechs Stücke Whatman-Papier, die zuvor mit Transferpuffer getränkt worden waren, blasenfrei übereinander gelegt (Ausrollen mit einer Glaspipette). Dann wurde eine passende Nitrocellulosemembran (mit Puffer befeuchtet) aufgelegt und anschließend das Gel, wobei Luftblasen peinlich vermieden wurden. Dann wurden wiederum sechs Lagen puffergetränktes Whatman-Papier blasenfrei aufgebracht und der Deckel der Halbtrockentransfervorrichtung aufgesetzt. Transfer erfolgte für 60 min bei einer Stromstärke von 0,8 mA/cm² Membran.

2.1.2.9.2 *Blot im Tankverfahren*

Hierzu wurden Gel und Nitrocellulosemembran zwischen zwei Lagen Whatman-Papier in den Transferrahmen des Hoefer-Tankblotsystems eingespannt. Diese Anordnung wurde dann in den mit Transferpuffer gefüllten Transfertank eingesetzt und unter Wasserkühlung auf 7°C 60 min bei 8 mA/cm² Membran transferiert.

2.1.2.9.3 *Färbung der Membran*

Nach erfolgtem Transfer wurde die Membran mit deionisiertem Wasser gewaschen und mit einer einfach konzentrierten Ponceau S-Lösung für mindestens 20 min auf dem Kippschüttler inkubiert. Die Färbelösung wurde entfernt und vorsichtig mit deionisiertem Wasser gewaschen. Die nun sichtbar gewordenen Banden des

Molekulargewichtsmarkern wurden mit einem Bleistift markiert und die Membran auf Format geschnitten.

2.1.2.9.4 Immunoblot der Membran

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen auf der Membran wurde diese zunächst für 1h mit Blockierungspuffer auf dem Kippschüttler inkubiert, alle folgenden Schritte fanden ebenfalls auf dem Kippschüttler statt. Nach der Blockierung wurde vier mal fünf Minuten mit PBS gewaschen. Danach erfolgte 1 – 2 stündige Inkubation in einer Lösung des Primärantikörpers in einer 3%igen BSA-Lösung in PBS. Es wurde vier mal fünf Minuten mit PBS gewaschen, 1h in einer Lösung des Sekundärantikörpers inkubiert und wiederum vier mal fünf Minuten mit PBS gewaschen.

2.1.2.9.5 Visualisierung der Banden – HRP-Verfahren

Hierzu wurde die Membran dreimal fünf Minuten mit TBS gewaschen und anschließend exakt eine Minute mit der ECL-Arbeitslösung inkubiert. Hernach wurde die Membran vorsichtig abgetropft, faltenfrei in Frischhaltefolie eingeschlagen und in einer Belichtungscassette fixiert. Man exponierte mit Röntgenfilm zwischen wenigen Sekunden und mehreren Stunden. Entwicklung erfolgte automatisch in der Optimax Typ TR-Entwicklermaschine.

2.1.2.9.6 Visualisierung der Banden – AP-Verfahren

Hierzu wurde die Membran zunächst dreimal für 10 min mit TSM-Puffer gewaschen. Anschließend erfolgte Inkubation in einer Lösung aus 165 µg/ml BCIP und 330 µg/ml NBT in TSM-Puffer solange bei Raumtemperatur unter Lichtschutz, bis eine deutliche Färbung der Proteinbanden hervortrat.

2.1.3 Methoden mit eukaryotischen Zellen

2.1.3.1 Zellkultur

In dieser Arbeit wurden insgesamt vier verschiedene Säugetierzelllinien verwendet.

2.1.3.1.1 PC12 – Zellen

In dieser Arbeit wurden PC 12-Zellen des Klons 251C aus dem Labor von W.B. Huttner (MPI für Molekulare Zellbiologie und Genetik, Dresden) verwendet. Ursprünglich wurden diese Zellen aus dem adrenalen Pheochromocytom der Ratte gewonnen. Sie werden oft als einfaches Modellsystem für neuronale Zellen verwendet, u.a. bilden sie bei längerer Behandlung mit NGF einen neuronalen Phänotyp aus. Sie können elektrisch erregt werden und neben anderem Dopamin und Noradrenalin sezernieren (Greene & Tischler, 1976). Diese Zelllinie wurde in DMEM-Medium mit Zusatz von 10% Pferdeserum, 5% fötalem Kälberserum und 2% Glutamin (Wachstumsmedium) bei 37°C in einer Atmosphäre mit 10% Kohlendioxid kultiviert. Alle im Folgenden beschriebenen Arbeitsschritte erfolgten in einer Sterilwerkbank. Zum Passagieren der Zellen wurden die Zellen bei einer Konfluenz von etwa 80% mit 10 ml vorgewärmten PBS gewaschen und anschließend mit 2 ml einer Lösung von Trypsin (0,25% w/v) und EDTA (0,02% w/v) in DMEM bedeckt. Die so behandelten Zellen inkubierte man typischerweise 5 Minuten bei 37°C, so dass sich die Zellen vom Untergrund lösen konnten. Man stoppte die Reaktion durch Zugabe von 18 mL Wachstumsmedium und löste eventuell noch verbleibende Zellen durch Auf- und Abpipettieren ab. Die Zellsuspension wurde nun in einem 50 mL-Greiner-Röhrchen zentrifugiert (5 min, 800rpm, Labofuge, RT). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 2 ml Wachstumsmedium resuspendiert und durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren mit einer eng geschmolzenen Pasteurpipette weiter vereinzelt, da diese Zelllinie zur Aggregation neigt. Hernach erfolgte die Bestimmung der Zellzahl durch Zusatz von Trypanblaulösung und Auszählen in der Neubauer-Kammer.

2.1.3.1.2 HeLa-Zellen

Es handelt sich hierbei um eine Epithelzelllinie aus einem humanen Adenocarcinom aus dem *Cervix uteri*. Die ursprüngliche Zelllinie wurde 1954 beschrieben (Chang, 1954). Der Subklon SS6 war eine freundliche Gabe von C. Weber (MPI für Experimentelle Medizin Göttingen). HeLa SS6 Zellen wurden in DMEM-Medium mit Zusatz von 10% fötalem Kälberserum und 1mM Pyruvat (Wachstumsmedium) bei

37°C in einer Atmosphäre mit 5% Kohlendioxid kultiviert. Das Passagieren erfolgte wie bei PC12-Zellen beschrieben, allerdings wurde direkt nach dem Trypsinierungsschritt mit Wachstumsmedium gequenchet und auf die gewünschte Endkonzentration verdünnt.

2.1.3.1.3 COS-7-Zellen

Diese Zelllinie stammt aus der grünen Meerkatze (*Cercopithecus aethiops*) und wurde durch Transformation der Zelllinie SV-1 durch SV40 erhalten (Gluzman, 1981). Der verwendete Klon war eine freundliche Gabe von B. Sodeik (Institut für Virologie, MH Hannover). Diese Zellen zeichnen sich durch eine abgeflachte Morphologie aus, haben aber den großen Vorteil phylogenetischer Nähe zu z.B. humanen Zellen. COS-7-Zellen wurden entsprechend dem Protokoll für HeLa SS6-Zellen behandelt.

2.1.3.1.4 PtK2-Zellen

Bei dieser Zelllinie handelt es sich um eine immortalisierte Zelllinie aus dem Nierenepithel des Zwergnasenkängurus (*Potorous tridactylis*) (Walen, 1965). Der verwendete Klon war eine freundliche Gabe von B. Sodeik (Institut für Virologie, MH Hannover). Diese Zellen eignen sich aufgrund ihrer flachen Morphologie besonders gut, um strukturelle Veränderungen durch *in vivo* Fluoreszenzmikroskopie zu untersuchen. Nachteilig bei dieser Zelllinie ist allerdings die phylogenetische Entfernung zu anderen Säugetierarten, so dass Immunfluoreszenzen endogener Proteine mit den üblichen Antikörpern versagen. PtK2-Zellen wurden in MEM-Medium mit Zusatz von 10% fötalem Kälberserum und 1mM Glutamin kultiviert. Ansonsten wurde wie bei HeLa- und COS-7-Zellen verfahren.

2.1.3.2 Mikroinjektion

Zur Mikroinjektion von GFF-Amphiphysin in HeLaZellen wurden der InjectmanNI2 von Eppendorf und das Zeiss Axiovert 200 M verwendet. GFP-Amphiphysin wurde in einer Konzentration von ca. 1µg/µl in Puffer G verwendet, wobei mit einer Druckdifferenz von 180 hPa gearbeitet wurde. Der Injektionspuls dauerte 0,4 – 0,6 s für HeLa-Zellen und 0,4 – 1,2 s für PtK2-Zellen. Waren die so injizierten Zellen für elektronenmikroskopische Untersuchungen vorgesehen, wurden die Zellen in einer Glasbodenkulturschale mit eingezättem Schachbrettmuster ausgesät. Alle Zellen eines

Quadrates wurden injiziert. Nach der Injektion ließ man die Zellen 30 – 60 min mit Wachstumsmedium bei 37°C inkubieren. Anschließend wurden die mikroinjizierten Zellen mit Videomikroskopie überprüft und für die Elektronenmikroskopie präpariert.

2.1.3.3 Transfektion

Transfektionen von Eukaryontenzellen wurden mit Lipofectamine 2000 von Invitrogen durchgeführt. Zellen wurden hierbei auf etwa 80% Konfluenz wachsen gelassen. Bei Transfektionen in 24-Loch-Platten wurden pro Loch 0,8 µg DNA mit 50 µl Optimem verdünnt. Anschließend wurde 1 µl Lipofectamine 2000 in 50 µl Optimem verdünnt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die beiden Verdünnungen gemischt und 25 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurde das Medium auf den Zellen aspiriert und gegen serumfreies Medium ausgetauscht. Nach erfolgter Inkubation wurde dann der gemischte Transfektionsansatz hinzupipettiert. Nach maximal fünfstündiger Inkubation im Brutschrank wurde das DNA-Lipofectamine-haltige Medium aspiriert und gegen serumhaltiges Wachstumsmedium ausgetauscht.

2.1.3.4 Mikroskopische Methoden

2.1.3.4.1 Flacheinbettung

Die Zellen wurden nach der Mikroinjektion mit PBS gewaschen und anschließend in einer Lösung aus 2% Glutaraldehyd und in Cacodylatpuffer über Nacht fixiert und anschließend 3 mal 10 min mit Wasser gewaschen. Eine erste Kontrastierung erfolgte in einer Lösung aus 1 % Osmiumtetroxid und 1,5 % Kaliumhexacyanoferrat(III) für 30 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde 3 – 4 mal 10 min mit Wasser gewaschen und in einer Ethanolreihe dehydratisiert: Jeweils fünf Minuten in 70%igem und 90%igem Ethanol, dann zweimal fünf Minuten in absolutem Ethanol. Danach wurde in Epon-Lösung eingebettet. Zum Aushärten des Epons wurde für ca. 2 Tage bei 60°C inkubiert. Um das Deckglas abzusprengen wurde das Präparat abwechselnd in kochendes Wasser und in flüssigen Stickstoff getaucht, bis sich das Deckglas löste. Nur die Fläche eines Quadrates mit mikroinjizierten Zellen wurde im Ultramikrotom angeschnitten, wobei Ultradünnschnitte von 60 nm Dicke angefertigt wurden. Diese wurden mit Kupfergittern aufgenommen, mit einer gesättigten Uranylacetatlösung

inkubiert, gewaschen und anschließend mit einer Bleicitrat-Lösung nach Reynolds inkubiert (Reynolds, 1963).

2.1.3.4.2 Immunfluoreszenz

Auf Deckgläsern gezogene Zellen wurden 2 mal mit PBS gewaschen und anschließend mit einer 4%igen Paraformaldehyd-Lösung in PBS fixiert. Danach erfolgten drei Waschschriffe mit TBS. Vor dem nächsten Schritt wurde mindestens 5 min gewartet oder aber die Deckgläser über Nacht bei 4°C gelagert. Zur Permeabilisierung der Zellen wurden die Deckgläser exakt 5 min mit einer 0,1 %igen Lösung von Triton X-100 in PBS inkubiert und anschließend drei mal mit PBS gewaschen. Die verwendeten Primärantikörper wurden in einer 3%igen Lösung von bovinem Serumalbumin in PBS verdünnt und die erhaltene Lösung anschließend 5 min in der Tischzentrifuge bei voller Geschwindigkeit abzentrifugiert, um eventuell gebildete Aggregate zu entfernen. Von diesen Verdünnungen wurden pro Deckglas 20 µl in eine mit Parafilm ausgekleidete Petri-Schale pipettiert, die Deckgläser mit der Zellschicht auf diese Tropfen gelegt und 45 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Deckgläschen drei Mal in PBS gewaschen, und zwar so, dass sie mit der Pinzette je 10 s in einem Becherglas mit PBS geschwenkt wurden. Für die Inkubation mit Sekundärantikörper wurde analog verfahren, allerdings wurde der letzte PBS-Waschschritt durch einen Waschschritt mit Wasser ersetzt. Danach trocknete man die Deckgläschen vorsichtig mit Filterpapier und deckte sie auf Objektträgern mit 5 µl Prolong Antifade oder 10 µl Mowiol/DABCO ein.

2.1.3.4.3 Fluoreszenzmikroskopie

Die so hergestellten Präparate wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M betrachtet. Es wurden die Ölimmersionsojektive 100x und 40x verwendet. Hierbei wurde mit einer Anregungswellenlänge von 490 nm für GFP-Fusionsproteine bzw. FITC-konjugierte Antikörper und einer Emissionswellenlänge von 525 nm gearbeitet. Für mRFP-Fusionsproteine bzw. TRITC-konjugierte Antikörper betragen die entsprechenden Werte 540 nm und 580 nm.

2.1.3.4.4 Videomikroskopie

Für Aufnahmen an lebenden Zellen kamen sowohl das Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M als auch das Konfokale Fluoreszenzmikroskop Zeiss LSM 510 Meta zum Einsatz. Die Zellen, welche entweder transfiziert oder mikroinjiziert worden waren, wurden auf 30 mm-Deckgläschen in supplementiertem Leibovitz-Medium betrachtet, wobei eine Temperatur von 37°C durch die Klimaeinrichtung des jeweiligen Mikroskops gehalten wurde.

2.1.3.4.5 Sprühpräparation und Bedampfung

Um isoliertes Amphiphysin im Elektronenmikroskop zu analysieren, wurden Präparate nach der Methode von Tyler und Branton erzeugt (Tyler & Branton, 1980). Hierzu wurde ein Teil einer Proteinlösung mit einem Gehalt von ca. 50µg/ml mit zwei Teilen reinen Glycerols gründlich gemischt. Hiervon wurden wenige Mikroliter mit der Sprühvorrichtung auf gespaltene Glimmerplättchen aufgesprüht. Diese wurden zunächst mit einer Platin-Kohle-Legierung bis zu einer Schichtdicke von 1 nm unter einem Winkel von 8° bedampft. Anschließend erfolgte senkrechte Bedampfung mit Kohle bis zu einer Schichtdicke von 10 nm. Die Präparate wurden dann auf bidestilliertem Wasser vorsichtig abgeschwemmt, auf Kupfergrids aufgenommen und an Filterpapier getrocknet.

2.2 Materialien

2.2.1 Geräte

Gerät	Typbezeichnung	Hersteller, Ort
Elektrophoresekammer (Agarosegel)	Mini-Sub Cell GT	BioRad, München
Elektrophoresekammer (Minigel)	SE250, Hoefer	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Feinwaage	Sartorius Universal Sartorius Isocal	Sartorius, Göttingen
Elektroporationsgerät	MicroPulser	BioRad, München
Entwicklermaschine	Optimax Typ TR	Protec, Oberstenfeld
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 200M	Carl Zeiss, Obercochem
Geltrockner	Slab Gel Dryer GD 2000	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Glas-Teflon-Homogenisator	Potter S	B. Braun International, Melsungen
Halbtrocken-Blotsystem		Werkstatt der MH Hannover
Gefrierätzanlage	BAF 400 T	Balzers, Vaduz, Liechtenstein
Inkubatoren (Eukaryotenzellen)	HeraCell	Heraeus, Göttingen
Inkubatoren (Bakterien)	Product Line	Heraeus, Göttingen
Konfokales Fluoreszenzmikroskop	Zeiss LSM 510 Meta	Carl Zeiss, Obercochem
Kühlapparatur	Julabo F12	Julabo, Seelbach
Kühlzentrifuge	Centrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
Kühlzentrifuge	Megafuge 1.0 R	Heraeus, Göttingen
Mikroinjektionsgerät	Injectman NI 2	Eppendorf, Hamburg
Mikrowellenofen	R 330-A	Sharp, Osaka
Netzgeräte	PowerPac 300 PowerPac 1000	BioRad, München
Neubauer-Zählkammer	Brightline Hemocytometer	Hausser Scientific, Horsham, PA, USA
pH-Meter	MultiCal	WTW, Weilheim
Probenrad	Apparat 2	Werkstatt der MH Hannover
Rotor	JA20	Beckman Coulter Inc., Krefeld
Rotor	JA10	Beckman Coulter Inc., Krefeld
Spektralphotometer	DU 640	Beckman Coulter Inc., Krefeld
Sprühvorrichtung	nach Tyler und Branton	Werkstatt der MH Hannover
Sterilwerkbank	HeraSafe	Heraeus, Göttingen
SS34- Zentrifugenröhrchen		Sorvall, Newport, CT, USA
Tankblot-Apparatur (kleines Gel)	TE22 Hoefer	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Thermocycler	UNO-Thermoblock	Biometra, Göttingen
Tischzentrifuge	Omnilab 5410	Eppendorf, Hamburg
Überkopf-Schüttler	Apparat 1	Werkstatt der MH Hannover
Ultramikrotom	Ultracut E	Reichert u. Jung
Ultraschallgerät	Sonifier 250	Branson Sonic Power company, Danbury, CT, USA
Ultrazentrifuge	J2 HS Centrifuge	Beckman Coulter Inc., Krefeld
Ultrazentrifugenrotoren	SS-34 GS-3	Sorvall, Newport, CT, USA
UV-Leuchttisch	UVT 20 S	Herolab, Wiesbaden
Vortex	Vortex-Genie	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
Wippinkubator	Duomax 1030	Heidolph, Schwabach

2.2.2 Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien von der Firma Riedel-de Haën bezogen.

Substanz	Hersteller
Acrylamid/ Bisacrylamid (29:1)	Roth
Ampicillin	Roth
Antipain	Sigma
Aprotinin	Sigma
Ammoniumpersulfat	Roth
Bestatin	Sigma
Bleicitrat	Serva
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma
Bromphenolblau	Roth
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck
Coomassie Brilliant Blue G250	Serva
Coomassie Brilliant Blue R250	Serva
Dimethylarsinsäure Natriumsalz Trihydrat	Merck
Dinatriumtetraborat	Merck
Dulbecco's Modified Eagle Medium DMEM	Gibco
DMSO	Merck
DNA-Gelextraktionskit	QIAGEN
DNA-Minipräpkit	QIAGEN
Dithiothreitol DTT	Sigma
E-64	Sigma
ECL Plus	Pierce
EDTA	Roth
EGTA	Roth
EPON	Resolution Performance
Essigsäure	Baker
fötales Kälberserum <i>FCS Gold</i>	PAA
Glutaraldehyd	Sigma
Glutathion-Sepharose	Pharmacia
Glucose	Merck
Glycerol	Sigma
HEPES	Roth
Immersionöl	Carl Zeiss
IPTG	Roth
Isopropanol	Merck
Kanamycin	Gibco BRL
Kaliumacetat	Sigma
Kaliumchlorid	Roth
Kaliumhydroxid	Roth
LB-Agar	Becton-Dickinson
Leibovitz' L15 Medium	Gibco
Leupeptin	Sigma
Lipidfarbstoff FM 64-4	Calbiochem
Lipofectamine 2000	Invitrogen
Magermilchpulver	Sucofin TSI/ Uelzena
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Roth
Modified Eagle Medium MEM	Cytogen/ Merck
Molekulargewichtsmarker Protein High Range	Biorad
Molekulargewichtsmarker DNA 1000 bp	NEB
2-Mercaptoethanol	Sigma
Methanol	Baker
Natriumazid	Roth
Natriumchlorid	Merck

Natriumdihydrogenphosphat	Merck
Natriumhydroxid	Merck
NBT	Merck
n-Butanol	Merck
NGF (human, β recombinant, β -Form)	Boehringer
Osmiumtetroxid	Polyscience
Paraformaldehyd	Fluka
Phalloidin (markiert mit Rhodamin)	Molecular Probes
Pepstatin	Sigma
Phorbolmyristoylacetat PMA	Calbiochem
Phenylmethylsulfonsäurefluorid PMSF	Roth
Poly-L-Lysin	Sigma
Ponceau S	Sigma
<i>Prolong Antifade Kit</i>	Molecular Probes
Restriktionsendonucleasen	Fermentas und NEB
Salzsäure	Baker
Natriumdodecylsulfat SDS	BioRad
TEMED	BioRad
Transferrin markiert mit Texas-Rot	Molecular Probes
Triton X-100	Roth
Trypanblau	Sigma
Trypsin-EDTA-Lösung	Biochrom
Phenol-Chloroform-Mischung	Roth

2.2.3 Verbrauchsmaterial

Material	Modell	Hersteller
Blot-Papier	3 mm Chr	Whatman
Blot-Membran	Protran	Schleicher & Schuell
Deckgläser	12 mm, 30 mm Durchmesser	Menzel – Gläser
ECL – Filme	Hyperfilm – ECL	Pharmacia
Filme für die Elektronenmikroskopie	4489	Kodak
Filterpapier	695	Schleicher & Schuell
Kupfernetze für Elektronenmikroskopie	3,05 mm 200 Maschen	SCI
Objektträger		Menzel – Gläser
Parafilm		National Can
Pasteurpipetten		Brandt
Petrischalen	Nunclon Surface	Nalge Nunc
Pipettenspitzen	Plastibrand	Brandt
Reaktionsgefäße 1,5 mL		Sarstedt
Reaktionsgefäße 1,5 mL	Safelock	Eppendorf
Reaktionsgefäße 15 / 50 mL	Cellstar	Greiner Bio – One
sterile Pipetten 5 / 10 / 25 mL	Cellstar	Greiner Bio – One
Ultrazentrifugenröhrchen 1,5 mL	Microfuge Polyallomer	Beckman
Zellkulturplatten	Nunclon Surface	Nalge Nunc
Zellkulturschale/geätzter Glasboden		MaTec

2.2.4 Puffer und Lösungen

Lösung	Zusammensetzung
ABP (500x)	5 mg Antipain, 1 mg Bestatin, 1 mg Pepstatin in 1 ml Methanol
AEL (500x)	1mg Aprotinin, 1mg E-64, 1 mg Leupeptin in 1ml Wasser
Agar-Platten	1% (w/v) Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 1% (w/v) NaCl, 1,2% (w/v) LB-Agar, 1mM NaOH
AP-Substratlösung	33 µl BCIP-Stammlösung, 66 µl NBT-Stammlösung in 10 ml TSM-Puffer
BCIP-Stammlösung	50 mg/ml BCIP in N,N-Dimethylformamid
Blockierungspuffer	6,9 g/l NaH ₂ PO ₄ , 9 g/l NaCl, 5% (w/v) Milchpulver, pH 7,8
Bindungspuffer/ Homogenisierungspuffer	150 mM NaCl, 10 mM HEPES, 1 mM MgCl ₂ , 1 mM EGTA, pH 7,4
Cacodylatpuffer	100 mM Natriumcacodylat, pH 7,4
DNA-Auftragungspuffer	0,05% (w/v) Bromphenolblau, 0,05% (w/v) Xylencyanol FF, 6 % (v/v) Glycerol
DNA-Auftragungspuffer für Schnelltest	40% (v/v) Glycerol, 0,02% (w/v) Bromphenolblau
Krebs-Ringer-Lösung (KRB ^{ow})	132 mM NaCl, 4,8 mM KCl, 2,4 mM Mg ₂ SO ₄ , 1,1 mM CaCl ₂ , 0,1 mM EGTA, 10 mM Glucose, 10 mM HEPES, pH 7,4
Laufpuffer für SDS-PAGE	25 mM Tris-HCl, 190 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS, pH 8,3
LB-Medium	1% (w/v) Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 0,5% (w/v) NaCl, 1mM NaOH
NBT-Stammlösung	50 mg/ml NBT in 70% (v/v) N,N-Dimethylformamid
PBS-Lösung	2 mM KH ₂ PO ₄ , 12 mM Na ₂ HPO ₄ , 130 mM, 3 mM KCl, pH 7,3
PMSF (250x)	400 mg PMSF in 10 ml 2-Propanol
Ponceau-S-Lösung (10x)	2% (w/v) Ponceau S, 30% (w/v) Trichloressigsäure, 30% (w/v) Sulfosalicylsäure
Probenpuffer (für SDS-PAGE 6x)	30% (v/v) Glycerol, 350 mM SDS, 350 mM Tris, eine Spur Bromphenol, pH 6,8 (vor Gebrauch verdünnt, Mercaptoethanol in einer Endkonzentration von 1%)
Precession Protease-Puffer	50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM Dithiothreitol, pH 7,0
Puffer G	25 mM Hepes, 125 mM Kaliumacetat, 50 mM Magnesiumacetat, pH 7.3
Sammelgelpuffer (4x)	0,5 M Tris/HCl, pH 6,8
SOC-Medium	2% (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 0,05% (w/v) NaCl, 1mM NaOH, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 20 mM Glucose
TAE-Puffer	40mM Tris/Acetate, 2mM EDTA, pH 8,5
TBS-Puffer	100 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5
Transfer-Puffer (Tankverfahren)	48 mM Tris, 380 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS, 10% (v/v) Methanol
Transferpuffer (Halbtrockenverfahren)	50 mM Tris, 39 mM Glycin, 0,037 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Methanol
Trenngelpuffer (4x)	1,5 M Tris/HCl, pH 8,8
TSM-Puffer	100 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl ₂ , pH 9,5

2.2.5 Medien

Medium	Zusammensetzung
Zellkulturmedium für PC12-Zellen	10% (v/v) Pferdeserum, 5% (v/v) Fötale Kälberserum, 2% Glutamin (alle vier Wochen neu hinzugesetzt) in DMEM
Zellkulturmedium für HeLa SS6-Zellen und COS7-Zellen	10% (v/v) Fötale Kälberserum in DMEM
Zellkulturmedium für PtK2-Zellen	10% (v/v) Fötale Kälberserum, 2% Glutamin (alle vier Wochen neu hinzugesetzt) in MEM
Medium für Videomikroskopie lebender Zellen	10% (v/v) Fötale Kälberserum in Leibovitz L15

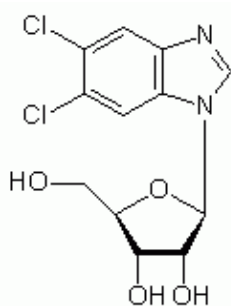
2.2.6 Antikörper

2.2.6.1 Primärantikörper

Antikörper	Typ	Verdünnung	Herkunft
α -Amphiphysin 1, finale Blutung	polyklonal	WB 1:250	selbst hergestellter Antikörper gegen SH3-Domäne v. Amphiphysin-1
α -Bin1	monoklonal	WB 1:125	Upstate Biotechnology
α -Bramp2	monoklonal	WB 1:1000	Transduction Laboratories
α -Clathrin schwere Kette TD	monoklonal	WB 1:1000	Transduction Labs
α -Clathrin schwere Kette X-22	monoklonal	IF 1:1000	F. Brodsky
α -Clathrin leichte Kette R461-11	polyklonal	WB 1:250	E. Ungewickell
α -Clathrin leichte Kette	monoklonal	IF 1:500	Santa Cruz
α -Dynamin II	monoklonal	IF 1:25	Transduction Labs
α -EEA1	polyklonal	IF 1:500	M. Zerial
α -EEA1	monoklonal	IF 1:250	Transduction Labs
α -Hip1R	monoklonal	WB 1:100	BD Biosciences
α -HRS	polyklonal	IF 1:100	Alexis Biochemicals
α -Mannose-6-phosphat-Rezeptor	polyklonal	IF 1:1000	Hoflack
α -Rab5	monoklonal	IF 1:500	BD Biosciences

2.2.6.2 Sekundärantikörper

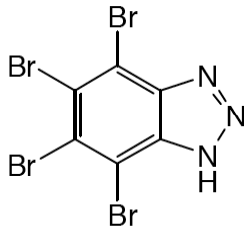
Antigen	Konjugat	Verdünnung	Hersteller
α -Maus-IgG	Rhodamin FITC	1:1000	Dianova
α -Kaninchen-IgG	Rhodamin FITC	1:1000	Dianova
α -Maus-IgG	alkal. Phosphatase Meerrettichperoxidase	1:500 1:2000	Cappel ICN
α -Kaninchen-IgG	alkal. Phosphatase Meerrettichperoxidase	1:500 1:2000	Cappel ICN



2.2.7 Inhibitoren

5,6-Dichloro-1- β -D-ribofuranosylbenzimidazol (5,6-Dichlorobenzimidazolribosid, DRB) ist ein zellpermeabler spezifischer Inhibitor der Proteinkinase CK-2 ($IC_{50}=6\mu M$) (Zandomeni *et al.*, 1983).

4,5,6,7-Tetrabromotrienzotriazol, 4,5,6,7-Tetrabromo-2-azabenzimidazol, TBB,



Tbbt, ist eine zellpermeable Benzotriazol-Verbindung und wirkt als hochselektiver, ATP/GTP kompetitiver Inhibitor der Proteinkinase CK-2 (Szyszka *et al.*, 1995). Die in dieser Arbeit verwendete Charge war eine freundliche Gabe von Dr. Pinna, Universität Padua. Mittlerweile ist diese Substanz bei

Calbiochem kommerziell erhältlich.

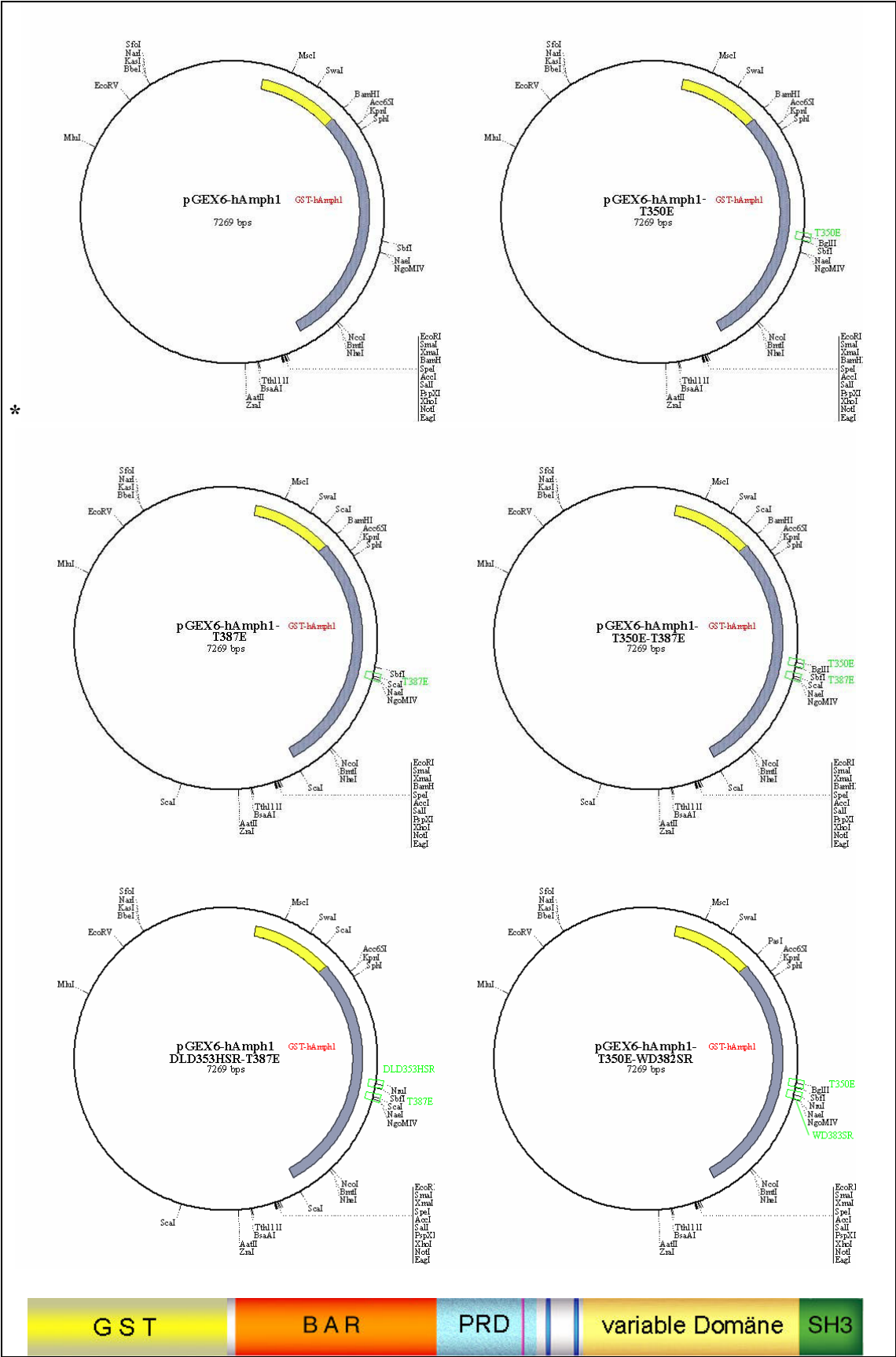
2.2.8 Primer

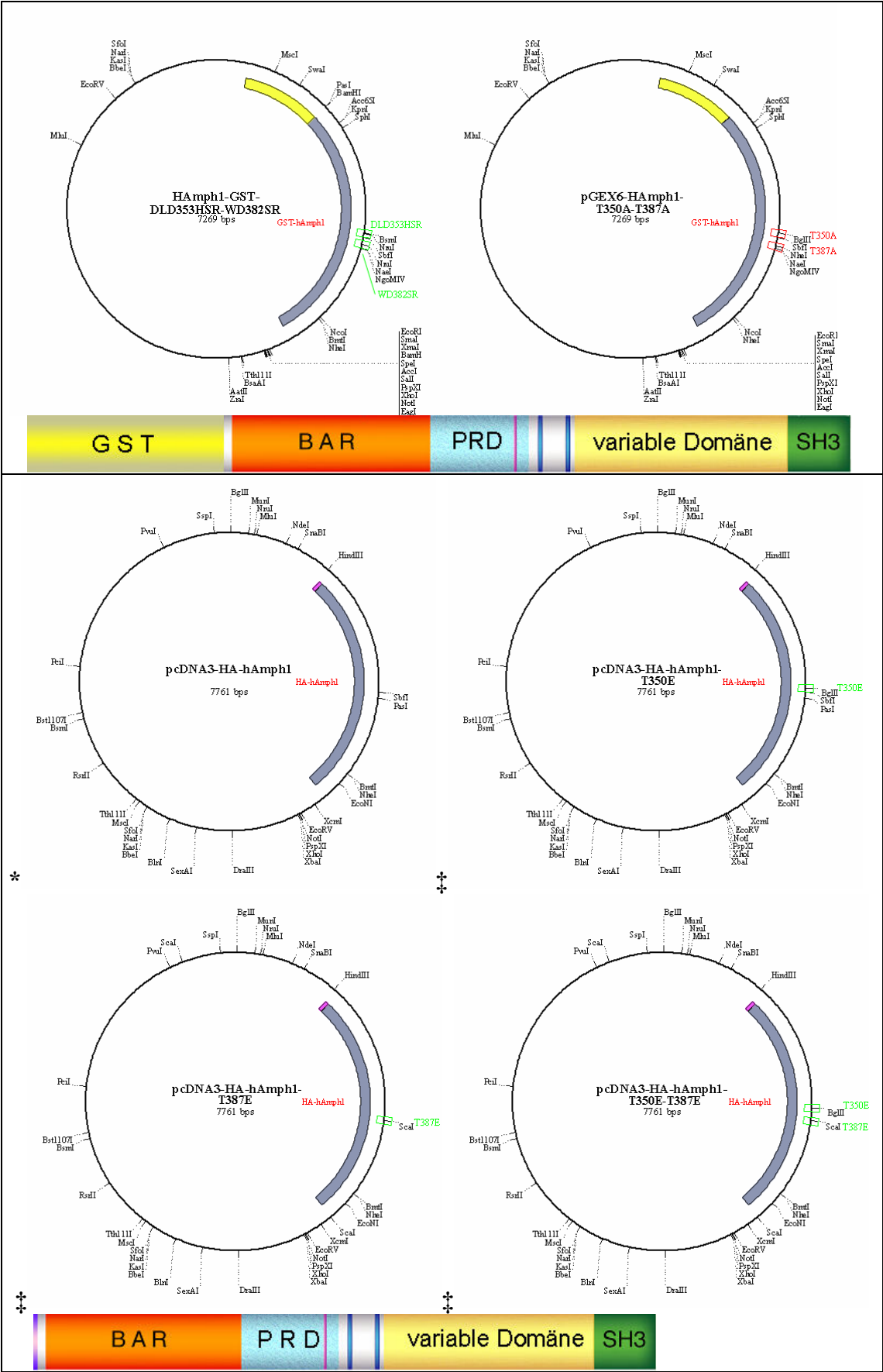
Die verwendeten Mutageneseprimer waren zwischen 33 und 36 Basen lang, Stratagene empfiehlt hier eine Länge von 30 – 45 Basen. Die Schmelztemperatur der Primer sollte idealerweise 78 ° C nicht unterschreiten. Es sind hier nur die *Sense*-Primer angegeben.

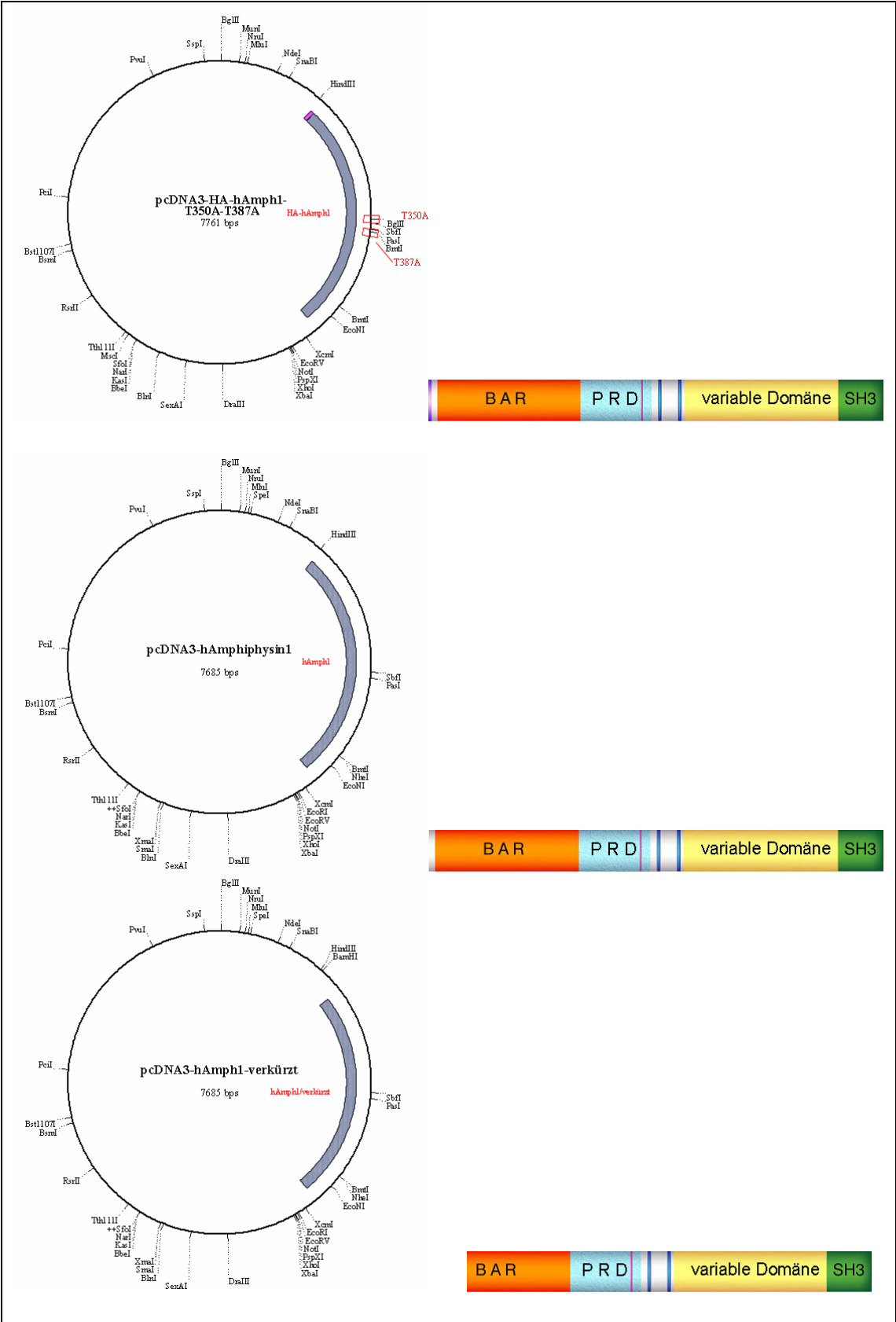
Primer	Sequenz
T350E	5' GGT GAA GAA AGA GGA GGA GTT GCT AGA TCT GGA C 3'
T387E	5' GAC CTA TGG ACG GAA AGT ACT GAT TTG GTA CAG CC 3'
T350A	5' GGT GAA GAA AGA GGA GGC TTT GCT AGA TCT GGA C 3'
T387A	5' GAC CTA TGG ACG GCT AGC ACT GAT TTG GTA CAG CC 3'
DLD353HSR	5' GGA GAC TTT GCT GCA TTC GCG ATT TGA TCC TTT CAA 3'
WD382SR	5' CAG ACA TTG CCC TCG CGA CTA TGG ACG ACA AGC 3'
CTG-hAmph1-pEGFPN1	5' CAC CCG ACG CTT AGA TCT GGG CAA CAA GTG GG 3'
ATG-Hamph1-pcDNA3	5' GGT ACC GAG CTC GGA ATG GCC GAC ATC AAG ACG 3'

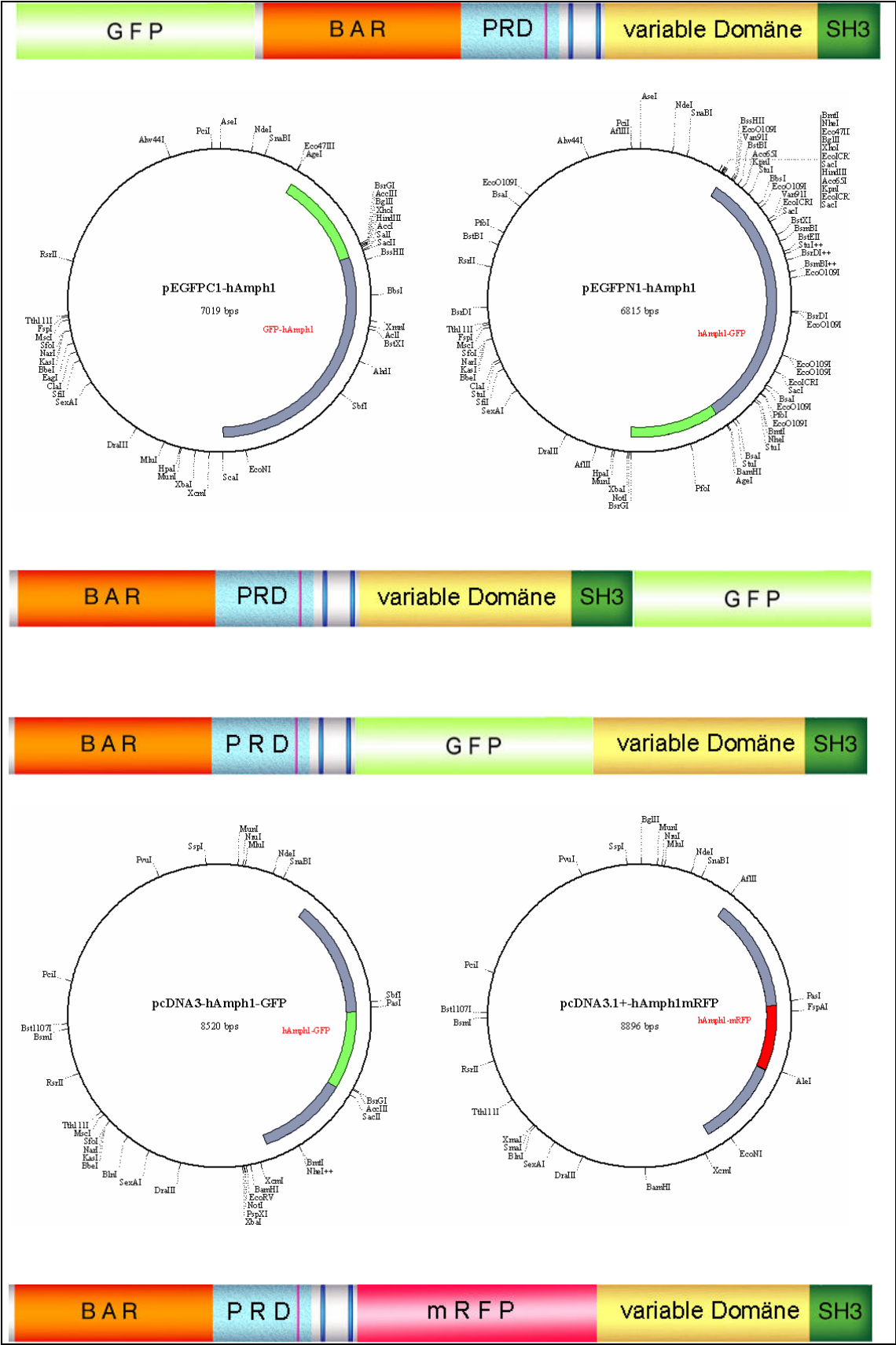
2.2.9 Plasmid-Konstrukte

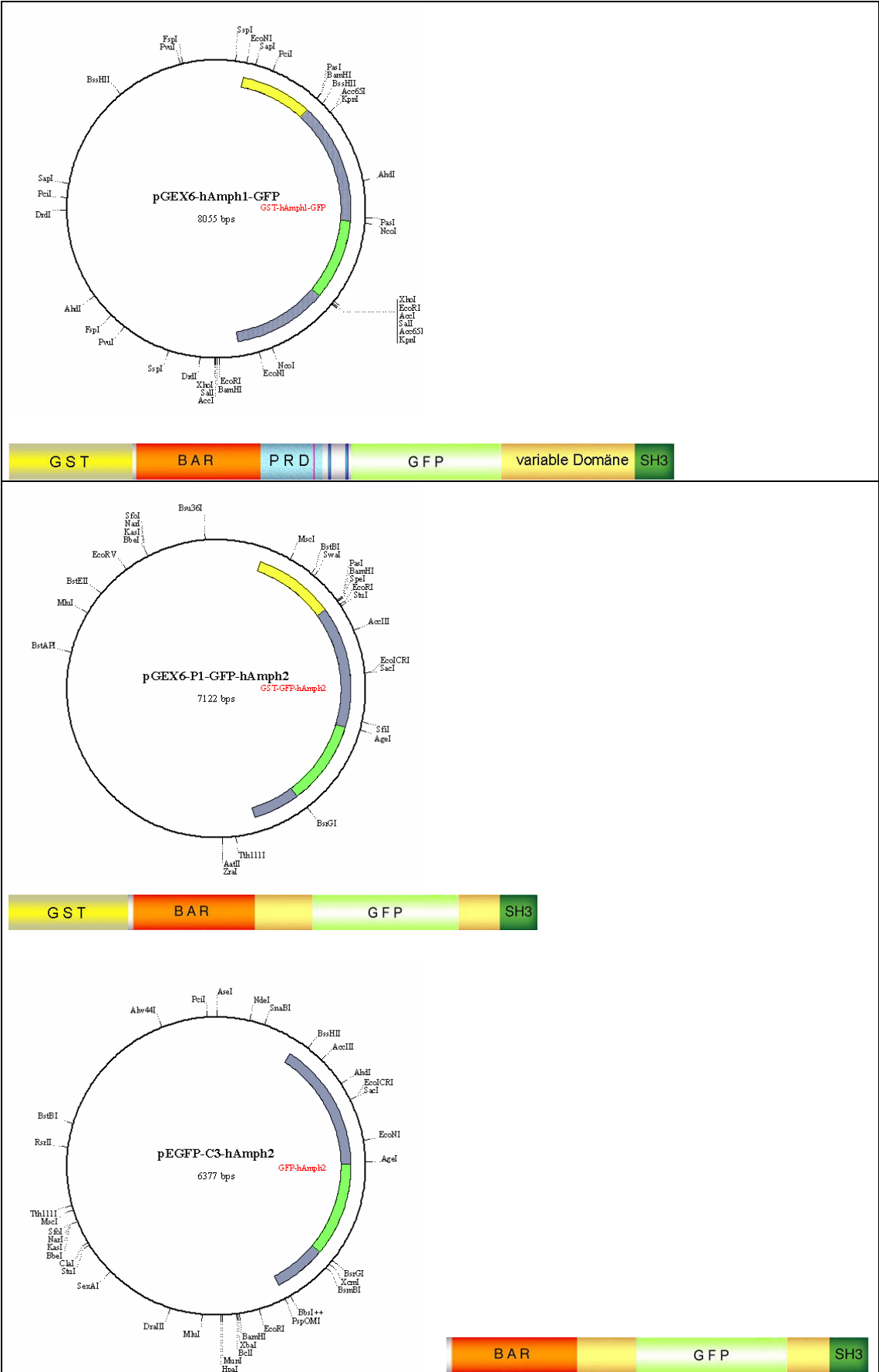
Es wurden Konstrukte basierend auf den Vektoren pGEX6 (Amersham Pharmacia), pcDNA3+ (Invitrogen) und pEGFP (Clontech) verwendet. Die mit * gekennzeichneten Konstrukte waren eine freundliche Gabe von P. DeCamilli, New Haven, CT, USA. Die mit ‡ gekennzeichneten Konstrukte wurden in Zusammenarbeit mit N. Schrader hergestellt. Der Vektor mRFP-pcDNA3.1 war eine freundliche Gabe von A. Ungewickell, Saint Louis, MO, USA











2.2.10 Verwendete Software

Programm	Hersteller
Excel 2002	Microsoft
Word 2000	Microsoft
Photoshop	Adobe
Illustrator 8.0	Adobe
LSM 510-Meta Software 3.2	Carl Zeiss
Axiovision 4.2	Carl Zeiss
Clone Manager 5.0	SEC
Metamorph 6.2	Meta Imaging
EndNote 9.0	Thomson ISI Research Soft

3 Aufgabenstellung

In dieser Arbeit sollte zum einen die Phosphorylierung von Amphiphysin untersucht werden, wie sie in Nervenzellen, aber auch in Modellsystemen wie neuroendokrinen Zellen unter dem Einfluss von PMA oder NGF stattfindet. Es sollte untersucht werden, welche Kinase hieran mitwirkt, welche Aminosäurereste betroffen sind und wie die Wechselwirkung des Proteins mit Clathrin beeinflusst wird. Hierzu kamen molekulargenetische, biochemische und pharmakologische Methoden zur Anwendung.

Weiter sollte das Verhalten von Amphiphysin in lebenden Zellen untersucht werden. Dazu wurden Fusionsproteine mit Fluoreszenzmarkern geschaffen um das Protein fluoreszenzmikroskopisch zu untersuchen. Das Verhalten von überexprimiertem Amphiphysin wurde sowohl durch Co-Immunfluoreszenzen in fixierten Zellen als auch durch videomikroskopische Beobachtungen lebender Zellen untersucht. Die so gewonnenen Erkenntnisse wurden durch elektronenmikroskopische Untersuchungen ergänzt.

4 Ergebnisse

4.1 Phosphorylierung von Amphiphysin

In der Arbeitsgruppe Bauerfeind war schon zuvor gezeigt worden, dass in PC12-Zellen die Behandlung mit Nervenwachstumsfaktor (NGF) oder Phorbolestern (PMA) die Phosphorylierung von Amphiphysin-1 induziert (Abb. 6). Phosphoryliertes und unphosphoryliertes Amphiphysin-1 (und Amphiphysin-2) können durch SDS-Gelelektrophorese getrennt werden, wobei die obere die phosphorylierte Form repräsentiert (Bauerfeind *et al.*, 1997). In einem Überlagerungsexperiment, in dem die phosphorylierte und unphosphorylierte

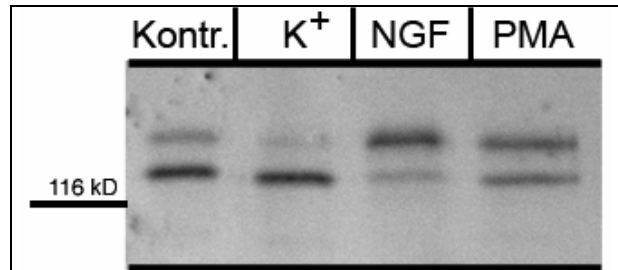


Abb. 6: In PC-12-Zellen führt eine Behandlung mit erhöhter Kaliumionenkonzentration zur Depolarisierung der Zelle und zur Dephosphorylierung von Amphiphysin-1. Nervenwachstumsfaktor oder Phorbolster stimulieren die Phosphorylierung.

Amphiphysin-1

Homo sapiens

QENIISFFEDNFVPEISVTTSPSQNEVPEVKKEETLLDLDLDFDPFKPEVTPAGSAGVTHSPMSQTLPWDLWTTSTDLVQ

Mus musculus

QENIINFFEDNFVPEINVTTPSQNEVLEVKKEETLLDLDLDFDPFKPDVAPAGSAAATHSPMSQTLPWDLWTTSTDLVQ

Rattus norvegicus

QENIINFFEDNFVPEINVTTPSQNEVLEVKKEETLLDLDLDFDPFKPDVTPAGSAAATHSPMSQTLPWDLWTTSTDLVQ

Gallus gallus

QENIINLFDNFVPEINVTTPSQNEIPETKKVESLLDLDLDFDPFKPEVV---STGVTHSPMSQTLPWDLWTTSELVQ

Amphiphysin-2

Homo sapiens

QEQLISLFDITFVPEISVTTSPSQFEAPGPFSEQASLLDLDLDFDPLPPVTPVKAP----TPSGQSI PWDLWEPTESPA

Mus musculus

QEQLISLFDDAFVPEISVTTSPSQFEAPGPFSEQASLLDLDLDFEPLPPVASPVKAP----TPSGQSI PWDLWEPTESQA

Rattus norvegicus

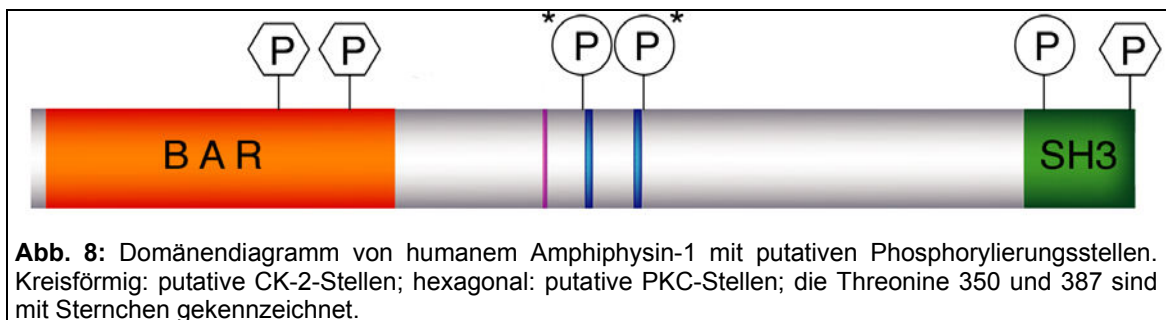
QEQLISLFDDAFVPEISVTTSPSQFEAPGPFSEQASLLDLDLDFEPLPPVASPVKAP----TPSGQSI PWDLWEPTESQA

Bos taurus

QEQLISLFDITFVPEISVTTSPSQFEAPGPFSEQASLLDLDLDFDPLPPVASPVKAP----TPSGQSI PWDLWEPTESQA

Abb. 7: Sequenzvergleich der Aminosäuren 316 – 393 von Amphiphysin-1 aus verschiedenen Spezies. Darunter dargestellt sind die homologen Amphiphysin-2-Sequenzen aus verschiedenen Spezies. Die putativen CK-2-Phosphorylierungsstellen sind rot gekennzeichnet.

Form von Amphiphysin-1 getrennt und an eine Nitrocellulosemembran gebunden wurden, konnte nur das unphosphorylierte Protein an die terminale Domäne des Clathrin binden (Döring et al., 2006). Daher habe ich die Primärsequenzen von Amphiphysin-1 und -2 auf konservierte Proteinkinasekonsensussequenzen untersucht, die in der Nähe der bekannten Clathrinbindungsstellen liegen. Es ist plausibel, dass solche phosphorylierten Aminosäurereste für die Inhibition der Clathrinbindung des phosphorylierten Proteins verantwortlich sein können. Beim Vergleich der Amphiphysin-1-Sequenzen aus verschiedenen Spezies wurde eine Reihe solcher konservierten Phosphorylierungsstellen gefunden. Als der Sequenzvergleich auch auf Amphiphysin-2 aus verschiedenen Spezies ausgedehnt wurde, blieben schließlich sechs konservierte Sequenzen übrig, drei für Proteinkinase C (PKC) und drei für die Proteinkinase CK-2 (im folgenden CK-2 genannt) (Abb. 7 und 8). Zwei dieser potentiellen Phosphorylierungsstellen liegen in unmittelbarer Nähe der Clathrinbindungsmotive. Es handelt sich hierbei um die Threoninreste 350 und 387.

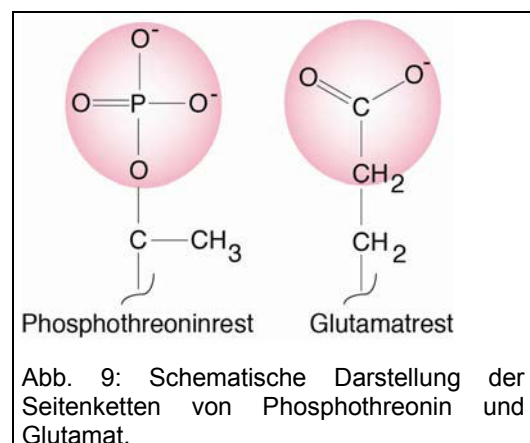


4.1.1 Simulation der Phosphorylierung durch zielgerichtete Mutagenese

Um zu untersuchen, welche Bedeutung Phosphorylierung dieser beiden Threoninreste für die Funktion des Amphiphysin-1 hat, wurde eine konstitutive Phosphorylierung dieser beiden Aminosäuren simuliert. Mit Hilfe zielgerichteter Mutagenese wurden die für Threonin codierenden Triplets gegen für Glutamat codierende Triplets ausgetauscht.

Man machte sich hierbei zu Nutze, dass die

Seitenketten von Phosphothreonin und von Glutamat einen vergleichbaren sterischen



Anspruch und eine vergleichbare Dichte negativer Ladung aufweisen (Abb. 9). Diese Vorgehensweise wird auch als molekulares Mimikry bezeichnet (Schneider und Fanning 1988). Außerdem wurden Mutanten generiert, deren Clathrinbindungsmotive zerstört waren (Slepnev *et al.*, 2000). Diese Mutanten wurden mit Hilfe des pGEX-Expressionssystems als GST-Fusionsproteine expremiert und aufgereinigt. Bei der Analyse der Mutanten mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung zeigte sich, dass die Glutamatmutanten eine verringerte elektrophoretische Mobilität aufweisen, ähnlich dem Phospho-Amphiphysin-1 (Abb. 10).

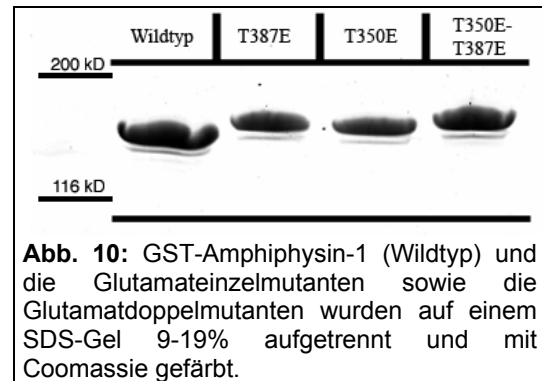


Abb. 10: GST-Amphiphysin-1 (Wildtyp) und die Glutamateinzelmutanten sowie die Glutamatdoppelmutanten wurden auf einem SDS-Gel 9-19% aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt.

4.1.2 Phosphorylierung von Amphiphysin und Interaktion mit Clathrin

Um zu untersuchen, welchen Einfluss die Phosphorylierung der Threoninreste 350 und 387 auf die Clathrinbindung hat, wurden Bindungsexperimente mit den Glutamatmutanten durchgeführt. Untersucht wurde die Bindung von Clathrin aus Rattenhirncytosol. Die Pellets und Überstände aus diesen Experimenten wurden mit SDS-PAGE und Western Blot analysiert (Abb. 11).

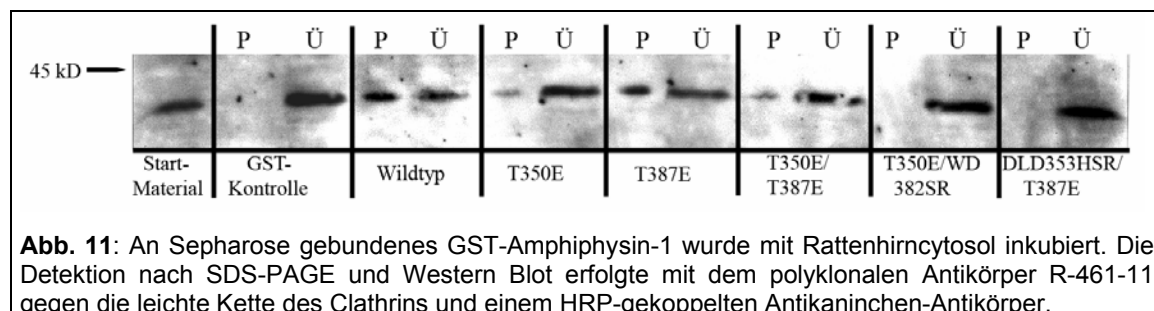


Abb. 11: An Sepharose gebundenes GST-Amphiphysin-1 wurde mit Rattenhirncytosol inkubiert. Die Detektion nach SDS-PAGE und Western Blot erfolgte mit dem polyklonalen Antikörper R-461-11 gegen die leichte Kette des Clathrins und einem HRP-gekoppelten Antikörper.

Es zeigte sich, dass Wildtyp-GST-Amphiphysin-1 Clathrin aus Rattenhirncytosol präzipitierte. Mit GST beladene Sepharosekügelchen konnten hingegen kein Clathrin aus Rattenhirncytosol binden. Das heißt, eine unspezifische Bindung konnte in diesen Experimenten nicht beobachtet werden. Ebenso verhielten sich Proteine, bei denen jeweils ein Clathrinbindungsmotiv zerstört und der entferntere Threoninrest

phosphoryliert waren. Daher sind auch indirekte Interaktionen, z.B. vermittelt durch AP-2 oder Dynamin, in diesen Experimenten nicht aufgetreten. Bei den Mutanten T387E und vor allem bei T350E und der Doppelmutante T350E-T387E war die Fähigkeit zur Clathrinbindung deutlich herabgesetzt. Die Glutamatmutante in der Nähe der W-Box (T387E) zeigte eine schwächere Inhibition als die Mutante T350E. Vergleicht man die Clathrinbindung der zweiten Glutamatmutante (T350E) und die Mutante, bei der zusätzlich die W-Box zerstört wurde (T350E-WD382SR), so kann man abschätzen, dass der Betrag des T387 zur Regulation der Clathrinbindung deutlich geringer war als der von T350. Offensichtlich führte der Austausch von Threonin 350 und/ oder Threonin 387 gegen Glutamat zu einer deutlichen Herabsetzung der Clathrinbindungsfähigkeit, so wie sie auch bei phosphoryliertem Amphiphysin-1 beobachtet wurde.

Um sämtliche indirekten Interaktionen auszuschließen, wurden Bindungsexperimente mit GST-Amphiphysin-1 und aufgereinigten Clathrintriskelia aus Schweinehirn durchgeführt (Abb. 12).

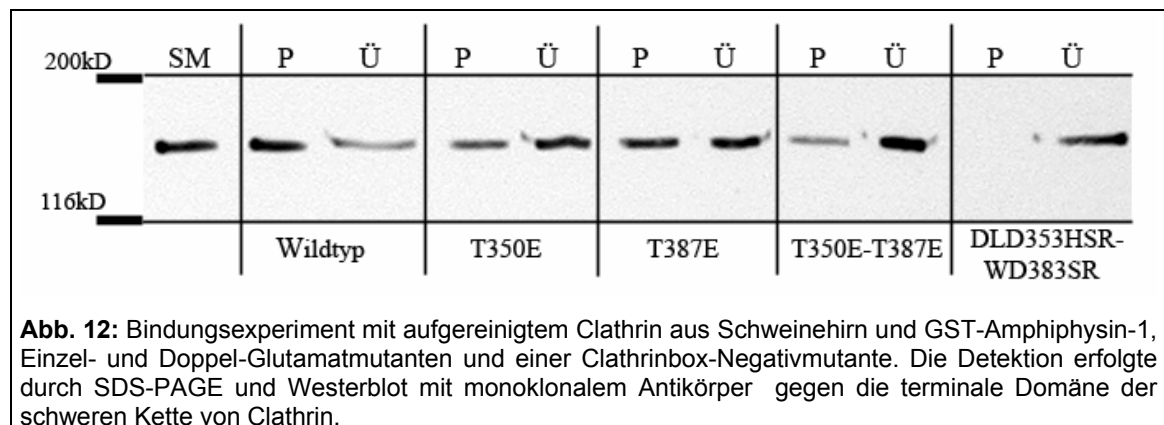


Abb. 12: Bindungsexperiment mit aufgereinigtem Clathrin aus Schweinehirn und GST-Amphiphysin-1, Einzel- und Doppel-Glutamatmutanten und einer Clathrinbox-Negativmutante. Die Detektion erfolgte durch SDS-PAGE und Westerblot mit monoklonalem Antikörper gegen die terminale Domäne der schweren Kette von Clathrin.

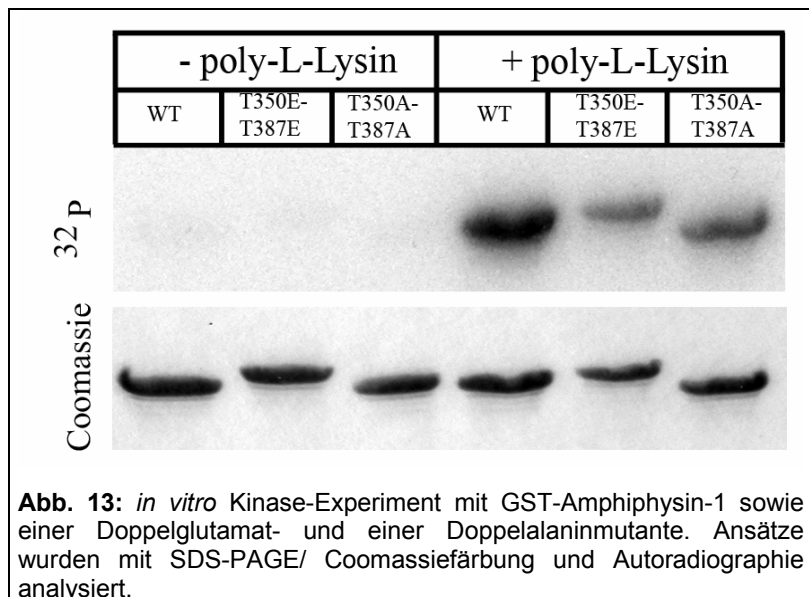
Es zeigte sich, dass Bindungsexperimente mit aufgereinigtem Clathrin die Ergebnisse der Bindungsexperimente mit Rattenhirncytosol bestätigten. Während Wildtyp-Amphiphysin-1 einen Großteil des angebotenen Clathrins präzipitierte, war diese Fähigkeit bei den Glutamateinzelmutanten und der Glutamatdoppelmutante deutlich reduziert. Allerdings wurde die Clathrinbindungsfähigkeit nicht vollständig zerstört, so

wie es bei der Clathrinbox-Doppelnegativmutante der Fall war. Auch hier zeigte sich, dass der Beitrag des T387 geringer war als der des T350.

4.1.3 Phosphorylierung von Threonin 350 und 387 *in vitro*

Um zu untersuchen, ob diese putativen Phosphorylierungsstellen tatsächlich durch CK-2 phosphoryliert werden können, wurden GST-Amphiphysin-1 und seine Mutanten mit rekombinanter CK-2 und ^{32}P - γ -ATP inkubiert (Abb. 13). Dabei wurden Ansätze mit und ohne poly-L-Lysin-Zusatz durchgeführt. Poly-L-Lysin wirkt als spezifischer Stimulator der CK-2 (Pinna et al. 1993). Hierbei konnte beobachtet werden: (1) Amphiphysin-1 ist ein Substrat der CK-2. (2) Die Mutanten, bei denen T350 und T387 entweder durch Glutamat oder durch Alanin ersetzt wurde, hatten deutlich weniger radioaktives Phosphat eingelagert. (3) Alle beobachteten Phosphorylierungsreaktionen waren spezifisch, da ohne Poly-L-Lysin kein Phosphat eingebaut wurde. Diese

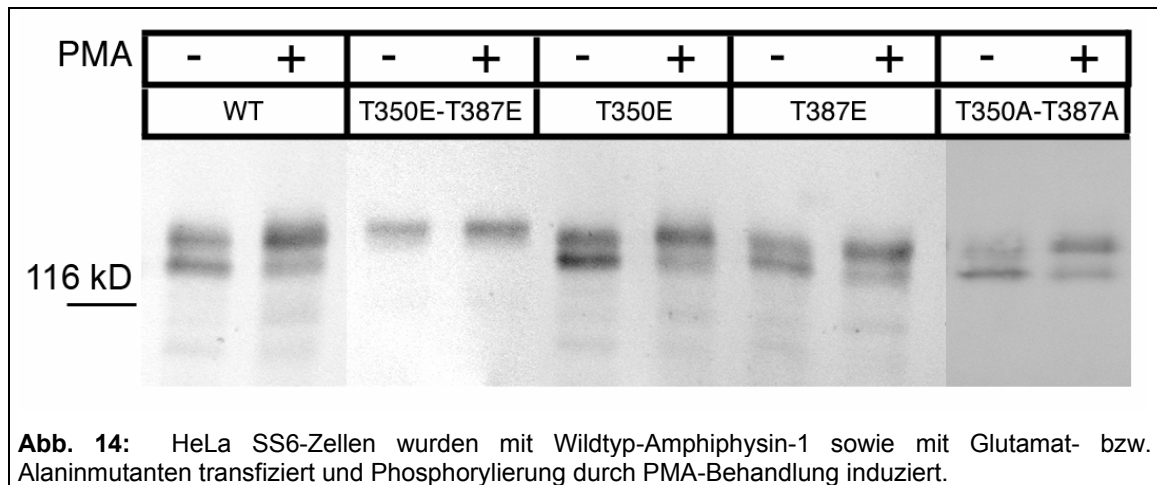
Ergebnisse zeigen, dass Amphiphysin-1 *in vitro* an den Aminosäureresten T350 und T387 phosphoryliert werden kann.



4.1.4 Phosphorylierung von Amphiphysin und seinen Mutanten in Zellen

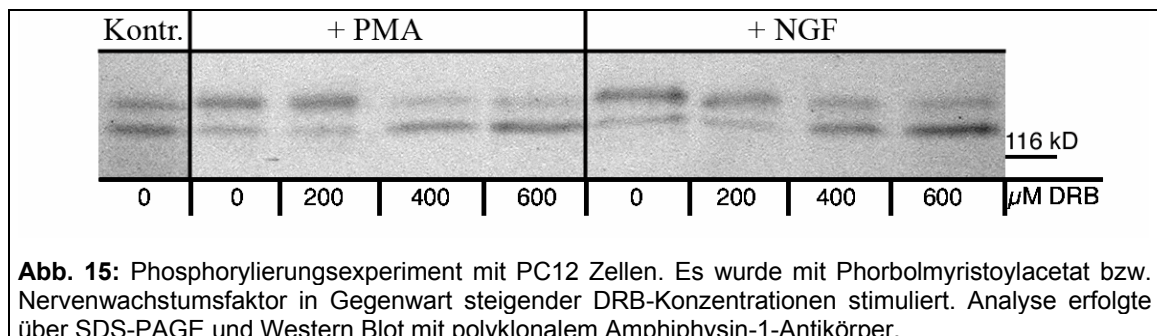
Die gereinigten GST-Fusionsproteine der Doppelglutamatmutante wanderten in der Elektrophorese deutlich langsamer als der Wildtyp. Um zu überprüfen, ob diese Eigenschaft dem charakteristischen Laufverhalten des phosphorylierten Amphiphysin-

1 in Zellen entspricht, wurden Wildtyp- und mutiertes Amphiphysin-1 in HeLa SS6-Zellen expremiert. Dabei zeigte sich, dass Wildtyp und die Einzelglutamatmutanten nach Stimulation mit PMA noch die charakteristische Bandenverschiebung aufwiesen, während dies bei der Doppelglutamatmutante nicht mehr der Fall war. Allerdings trat das Phänomen der Bandenverschiebung bei der Doppelalaninmutante noch auf (Abb. 14).



4.1.5 Pharmakologische Untersuchung der Phosphorylierung von Amphiphysin

Es konnte gezeigt werden, dass die CK-2 *in vitro* and *in vivo* in der Lage ist, Amphiphysin-1 zu phosphorylieren. Es blieb die Frage, ob diese Kinase auch für die NGF- und PMA-induzierte Phosphorylierung von endogen expremiertem Amphiphysin-1 verantwortlich ist. Es wurden Experimente durchgeführt, bei denen PC12-Zellen mit PMA oder NGF stimuliert wurden. Vor und während dieser Stimulation wurden spezifische Inhibitoren der CK-2 eingesetzt, um die Beteiligung der CK-2 an der PMA- bzw. NGF-induzierten Phosphorylierung zu untersuchen (Abb. 15).



Die durch PMA und NGF induzierte Amphiphysin-1-Phosphorylierung wird durch DRB unterdrückt und geht bei Einwirkung noch höherer Konzentrationen unter das Phosphorylierungsniveau der nicht mit NGF induzierten Zellen zurück.

Da Inhibitorexperimente oft das Problem der mangelnden Spezifität aufweisen wurden weitere Phosphorylierungsexperimente unter Verwendung eines anderen CK-2-Inhibitors durchgeführt (Abb. 16). Diese Experimente bestätigten die Ergebnisse aus den Phosphorylierungsexperimenten mit DRB. Allerdings erwies sich TBB schon bei geringerer Konzentration als wirksamer.

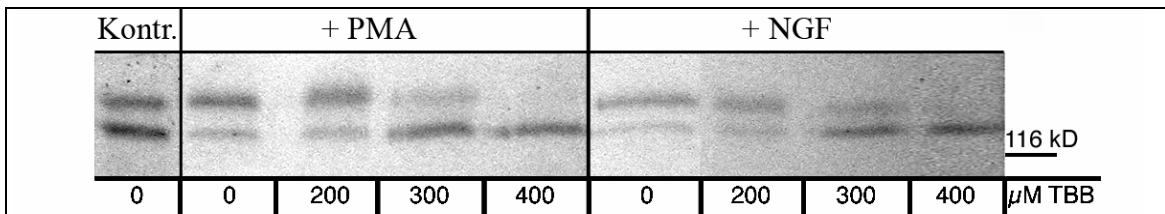


Abb. 16: Phosphorylierungsexperiment mit PC12 Zellen. Es wurde mit Phorbolmyristoylacetat bzw. Nervenwachstumsfaktor in Gegenwart steigender TBB-Konzentrationen stimuliert. Analyse erfolgte über SDS-PAGE und Western Blot mit polyklonalem Amphiphysin-1-Antikörper.

Da die putativen Phosphorylierungsstellen für CK-2 auch in Amphiphysin-2 konserviert sind wurde der Einfluss von CK-2 Inhibitoren auf die Amphiphysin-2-Phosphorylierung untersucht (Abb. 17 und 18.).

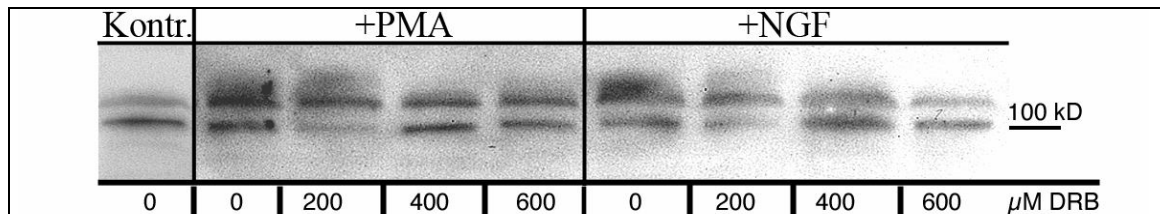


Abb. 17: Phosphorylierungsexperiment mit PC12 Zellen. Es wurde mit Phorbolmyristoylacetat bzw. Nervenwachstumsfaktor in Gegenwart steigender DRB-Konzentrationen stimuliert. Analyse erfolgte über SDS-PAGE und Western Blot mit monoklonalem Amphiphysin-2-Antikörper.

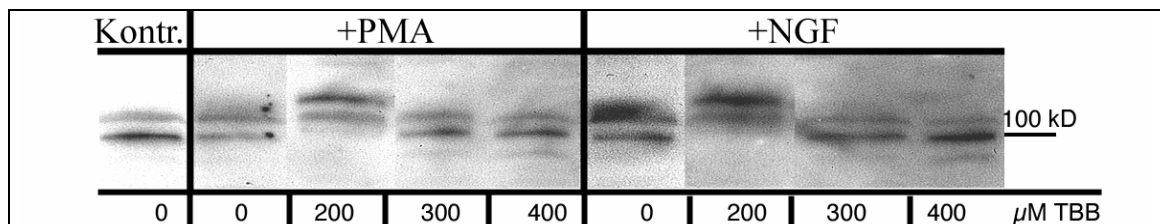


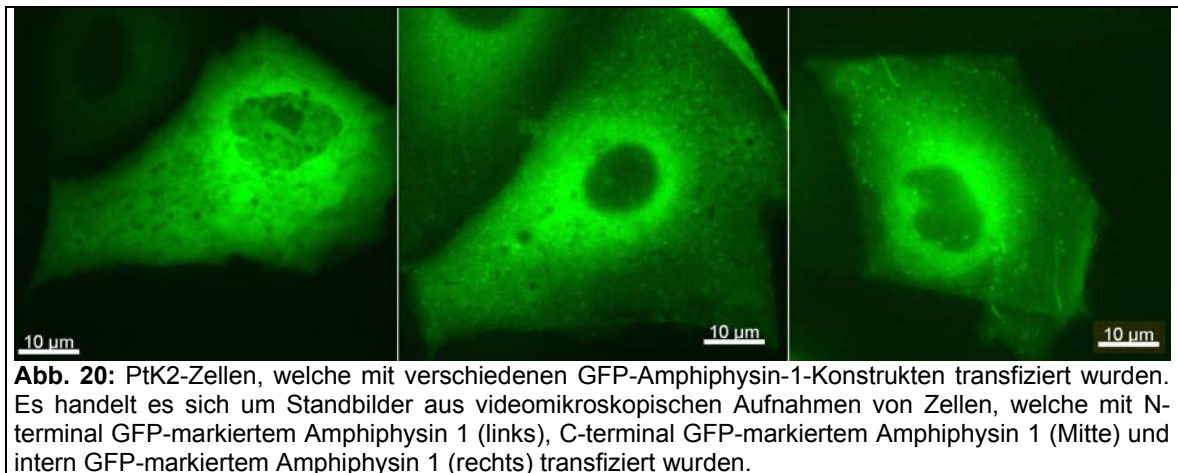
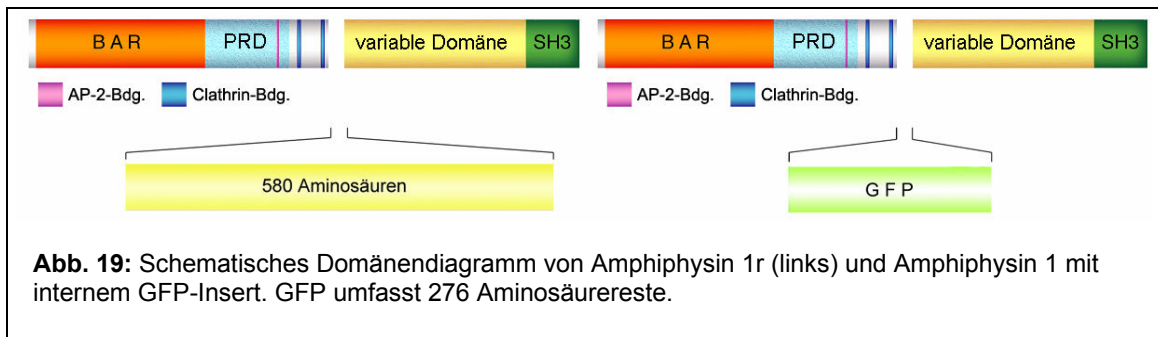
Abb. 18: Phosphorylierungsexperiment mit PC12 Zellen. Es wurde mit Phorbolmyristoylacetat bzw. Nervenwachstumsfaktor in Gegenwart steigender TBB-Konzentrationen stimuliert. Analyse erfolgte über SDS-PAGE und Western Blot mit monoklonalem Amphiphysin-2-Antikörper.

Diese Experimente bestätigten weitgehend die Befunde für Amphiphysin-1. Allerdings war der Effekt von DRB auf die Phosphorylierung von Amphiphysin-2 nicht so ausgeprägt. Darüber hinaus ist das Bandenmuster von Amphiphysin-2 etwas komplexer als im Falle von Amphiphysin-1, ein Effekt, welcher aus früheren Arbeiten bekannt ist (Pfander und Bauerfeind, unveröffentlichte Resultate).

4.2 Amphiphysin in lebenden Zellen

In diesem Abschnitt wurden die subzelluläre Lokalisation und die Eigenschaften von Amphiphysinen in lebenden Zellen untersucht. Hierzu wurden Untersuchungen an lebenden Zellen durchgeführt, die durch Immunfluoreszenzexperimente ergänzt wurden. Zu diesem Zweck wurden Fusionsproteine aus GFP und humanem Amphiphysin-1 in Zellen expremiert, die kein eigenes Amphiphysin bilden, z.B. HeLa-Zellen oder PtK2-Zellen. Zellen, die das Wildtypprotein, d.h. ohne GFP, expremieren bilden charakteristische längliche Amphiphysin-1-positive Strukturen (vergleiche dazu Abb. 25) Das gleiche Verhalten wurde auch nach Überexpression von Amphiphysin-2 beobachtet (Lee *et al.*, 2002; Peter *et al.*, 2004). Konstrukte, die GFP am N- oder C-Terminus der Amphiphysinsequenz trugen zeigten keine solchen Strukturen (Abb. 20). Das Protein war diffus im Cytosol verteilt. Diese Konstrukte waren daher nicht geeignet, Amphiphysin-1 in lebenden Zellen zu untersuchen, weshalb ich eine andere Strategie wählte.

Aus den Arbeiten von Terada *et al.* (2002) und Hosoya *et al.* (2004) war bekannt, dass in der Retina von Säugern eine spezifische Spleißvariante von Amphiphysin-1 expremiert wird, Amphiphysin-1r. Diese Spleissvariante enthält bei Aminosäure 394 ein sehr großes Insert (580 aa, Abb. 19). Die Bedeutung dieses Inserts ist bisher ungeklärt. Aufgrund dieser Arbeit bot es sich an, ein Konstrukt herzustellen, welches die für GFP codierende Sequenz an exakt der Stelle enthält, an der beim Amphiphysin-1r-Transkript sich die Sequenz für das 580-Aminosäuren-Insert befindet. Wurde das so erhaltene Konstrukt mit interner GFP-Markierung (im folgenden intGFP-Amphiphysin-1 genannt) überexpremiert, bildeten diese Zellen GFP-Amphiphysin-1-positive Strukturen, die denen des Wildtyps glichen (Abb. 20).



Als nächstes wurde mit Hilfe des intGFP-Amphiphysin-1-Konstruktes die Frage untersucht, wie Amphiphysin-assoziierte Tubuli sich in lebenden Zellen verhalten. Hierzu wurden HeLa SS 6-Zellen und PtK2-Zellen mit diesem Konstrukt transfiziert und mit Videofluoreszenzmikroskopie beobachtet. Hierbei zeigte sich, dass es sich bei den Amphiphysin-assoziierten Tubuli um Strukturen von hoher Dynamik handelt, welche sich in Zeiträumen von wenigen Sekunden bis zu Minuten morphologisch stark verändern. Hierbei können verschiedene Prozesse beobachtet werden: Es treten Verlängerungen und Verkürzungen auf, gelegentlich zeigen sich Abknospungen oder Strukturen, welche sich in Gänze durch die Zelle zu bewegen scheinen. Einen Eindruck von der hohen Dynamik dieser Tubuli gibt Abb. 21. Es handelt sich hierbei um eine Serie von Standbildern aus einer videomikroskopischen Aufnahme (siehe Anhang).

4.2.1 Geschwindigkeiten und Längen Amphiphysin-assoziiierter Strukturen

In videomikroskopischen Aufnahmen können diverse Strukturen verschiedener Morphologien beobachtet werden, welche mit Amphiphysin-1 assoziiert sind. Neben einem gewissen Pool, welcher diffus im Cytosol verteilt ist, finden sich in fast allen überexprimierenden Zellen Punkt- und kürzere, längliche Strukturen. Zellen, die ein bestimmtes Niveau der Überexpression erreichen, weisen die sehr charakteristischen, dynamischen Tubuli auf. Betrachtet man die Längen und Elongationsgeschwindigkeiten dieser Strukturen, so ergibt sich ein Trend, wie er in Abb. 22 dargestellt ist: Während die Länge der (quantifizierbaren) Tubuli sich zwischen 3 und 19 μm bewegt, weist das Gros Längen zwischen 4 und 10 μm auf. Während sich für die Schrumpfungsgeschwindigkeiten der Tubuli keine bestimmte Verteilung

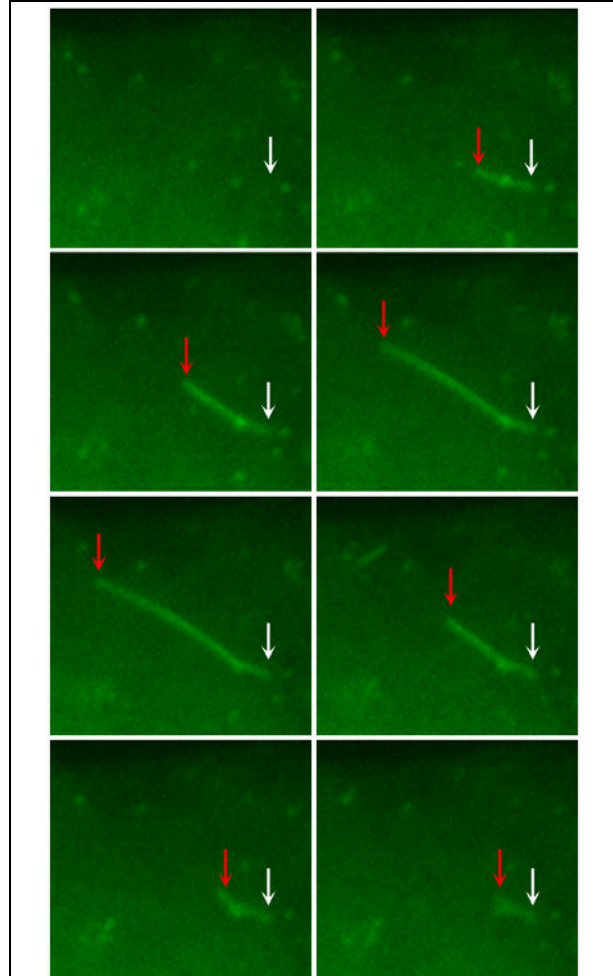
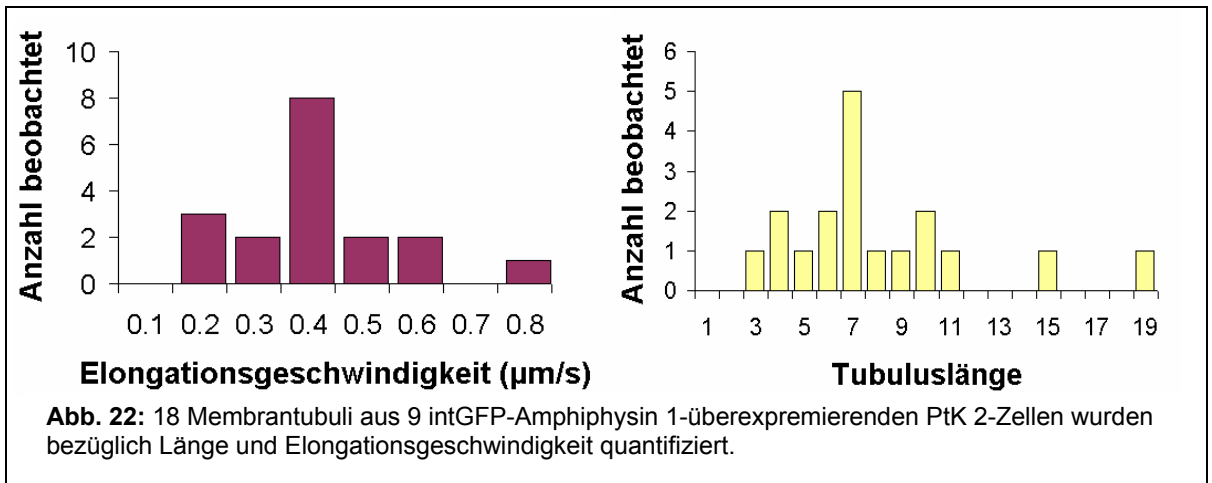


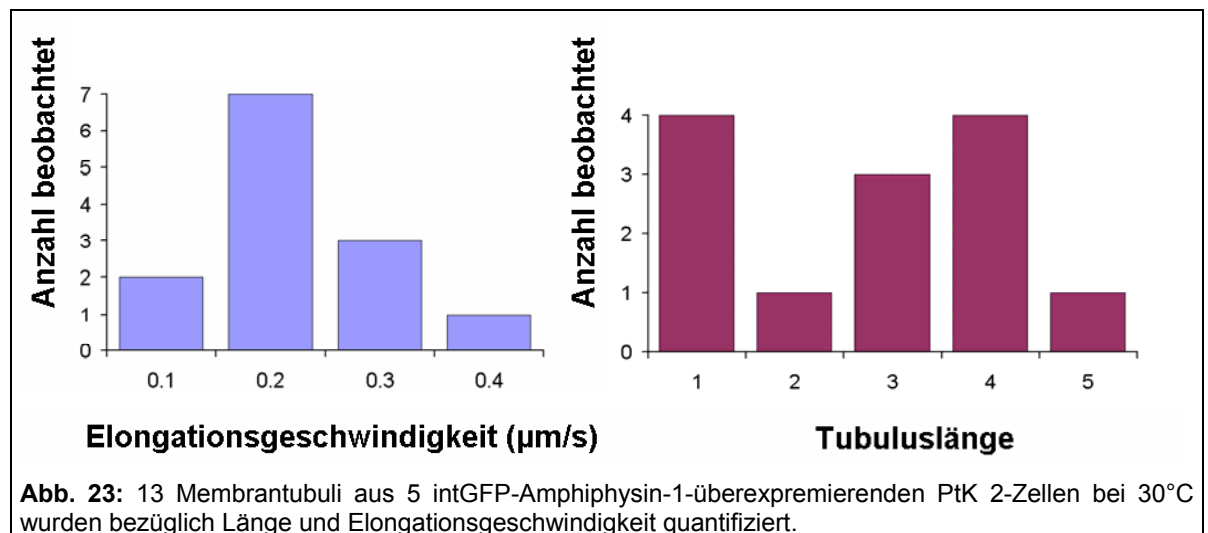
Abb. 21: Eine Serie von Standbildern, welche die Dynamik der Amphiphysin-1-assoziierten Strukturen verdeutlicht. Die Aufnahmen zeigen einen Ausschnitt aus einer PtK2-Zelle, die mit intGFP-Amphiphysin-1 transfiziert wurde. Der zeitliche Abstand beträgt 4,6 Sekunden.

erkennen lassen, so zeigt sich bei der Elongationsgeschwindigkeit eine Häufung um 0,4 $\mu\text{m}/\text{s}$. Hierbei ist Elongationsgeschwindigkeit definiert als die Geschwindigkeit, mit welcher Tubuli vom ersten Auftreten bis zum ersten Schrumpfen wachsen.



4.2.2 Einfluß der Temperatur auf Amphiphysin-assoziierte Tubuli

Wurden PtK2-Zellen, welche Amphiphysin-1-GFP überexprimierten, bei einer Umgebungstemperatur von 30°C statt wie üblich bei 37°C beobachtet, so wurden kürzere Strukturen mit geringeren Elongationsgeschwindigkeiten beobachtet (Abb. 23)



4.2.3 Co-Lokalisation mit Membranlipiden

Um zu untersuchen, ob die beobachteten Strukturen mit Membranen assoziiert sind, wurden intGFP-Amphiphysin-1-exprimierende Zellen mit dem Lipidfarbstoff FM 4-64 versetzt. Dieser Farbstoff ist amphiphil, d.h. er ist wasserlöslich und kann in die äußere Lipidschicht der Plasmamembran eindringen. Allerdings ist der Farbstoff nicht

in der Lage, durch die Membran zu diffundieren. In wässriger Lösung fluoresziert er nur sehr schwach, weist jedoch eine wesentlich stärkere Fluoreszenz auf, sobald er in eine Membran eingelagert wird. Aufgrund der Vielzahl von membranassoziierten Kompartimenten in der Zelle sind nur wenige Strukturen erkennbar, welche Co-Lokalisation zwischen Amphiphysin-1-assoziierten Tubuli und dem Farbstoff FM 64-4 erkennen lassen. Diese Experimente bestätigen, dass es sich bei den Amphiphysin enthaltenden Tubuli um membranassoziierte Strukturen handelt, wie in Abb. 24 erkennbar wird.

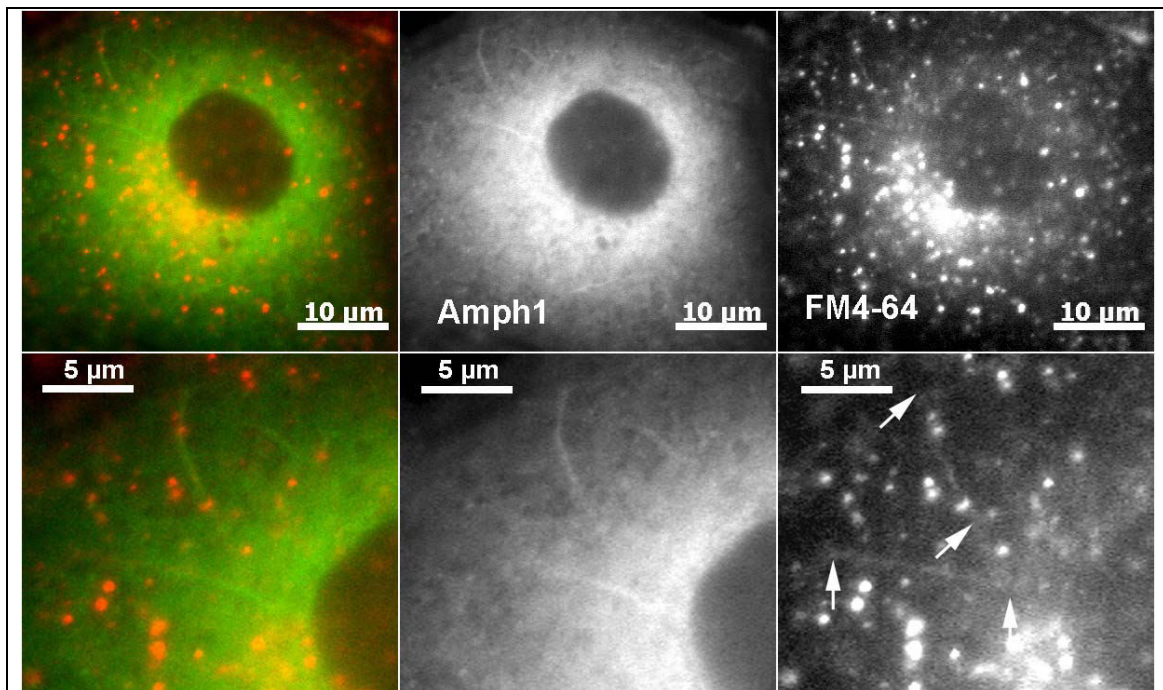


Abb. 24: Standbild aus einer Videomikroskopieaufnahme von Ptk2-Zellen, welche Amphiphysin-1-GFP überexprimierten und mit dem Lipidfarbstoff FM 4-64 behandelt wurden. Neben zahlreichen stark rot gefärbten Strukturen, bei denen es sich sowohl um Aggregationen als auch um vesikuläre Kompartimente handeln könnte ist erkennbar, dass die Amphiphysin-assoziierten Tubuli durch den Lipidfarbstoff markiert werden (Untere Reihe: Vergrößerung 200 %, Enden tubulärer Strukturen sind mit Pfeilen gekennzeichnet).

4.2.4 Bedeutung der BAR-Domäne für die Membrantubulierung

Als Nebenprodukt der Klonierungsstrategie zur Erzeugung eines unmarkierten Amphiphysin-1-Konstrukts zur Expression in eukaryotischen Zellen wurde ein Konstrukt erhalten, das N-terminal um 69 Aminosäuren verkürzt ist. Wurde dieses Konstrukt in der Immunfluoreszenz mit dem intGFP-Konstrukt bzw. dem Wildtyp-

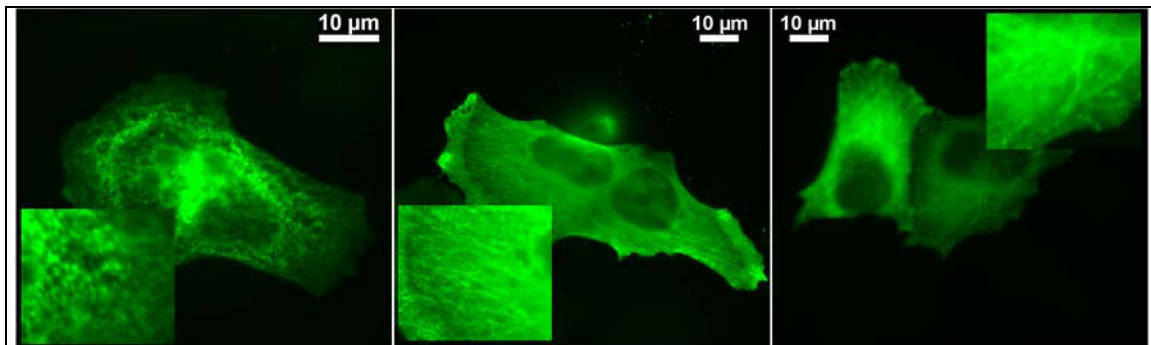


Abb. 25: Transfizierte und fixierte HeLa-Zellen. Links eine Zelle transfiziert mit dem N-terminal verkürzten Amphiphysin-1-Konstrukt, in der Mitte eine Zelle, die mit dem Wildtyp-Konstrukt transfiziert (beide wie unter *Immunfluoreszenz* beschrieben behandelt) und rechts eine Zelle, die mit dem intGFP-Konstrukt transfiziert wurde. Die Ausschnitte sind um den Faktor zwei vergrößert.

Konstrukt verglichen, so zeigte sich, dass N-terminal verkürztes Amphiphysin-überexpressierende Zellen einen Phänotyp besaßen, der sich deutlich von dem unterscheidet, der sich bei Überexpression von Wildtyp-Amphiphysin – also dem vollständigen Protein – und intGFP beobachten ließ: Während letztere zu deutlich erkennbaren tubulären Strukturen in den Zellen führten, ließen sich im Falle des verkürzten Konstrukts nur größere Aggregationen und Punktate beobachten (Abb. 25).

4.2.5 Amphiphysin-2 und die Bildung tubulärer Strukturen

Amphiphysin-1 und -2 können ein Heterodimer bilden. Um Amphiphysin-1 und -2 in der lebenden Zelle zu untersuchen, wurden PtK2-Zellen mit einem GFP-Amphiphysin-2-Konstrukt und einem mRFP-Amphiphysin-1-Konstrukt transfiziert und mit Videomikroskopie untersucht. Bei Co-Expression dieser Konstrukte zeigte sich, dass die tubulären, dynamischen Strukturen sowohl Amphiphysin-1 als auch Amphiphysin-2 enthielten (Abb. 26).

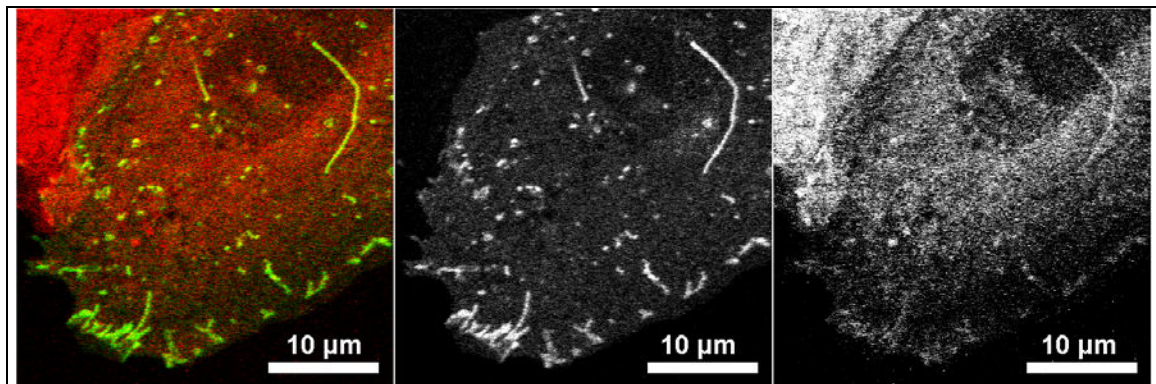


Abb. 26: Standbilder einer videomikroskopischen Aufnahme von Ptk2-Zellen, welche mit Amphiphysin-1-mRFP und Amphiphysin-2-GFP co-transfiziert wurden. Die Co-Lokalisation in tubulären Strukturen ist deutlich zu erkennen. Die Filmdatei, aus welcher diese Standbilder stammen, befindet sich im Anhang 8.

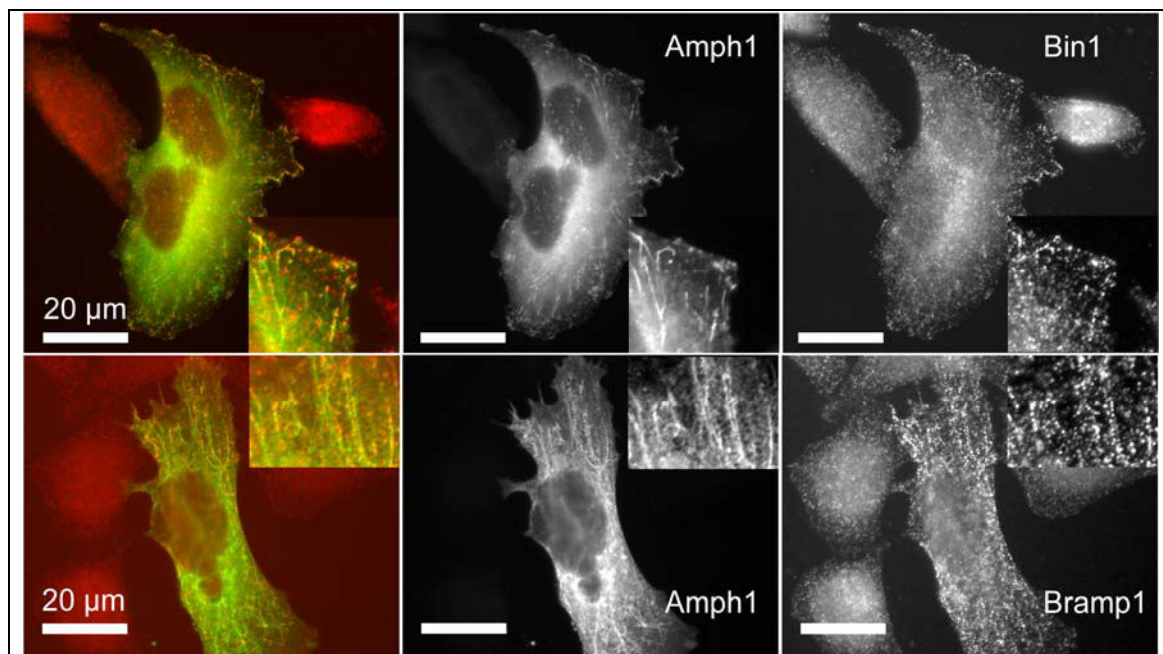


Abb. 27: HeLa-Zellen, die intGFP-Amphiphysin-1-GFP (Amph1) überexprimieren wurden gegen endogenes Amphiphysin-2 gefärbt. Dabei wurden die Antikörper Bin-1 (obere Reihe) und Bramp-2 (untere Reihe) verwendet. Die Ausschnitte sind um den Faktor 2 vergrößert dargestellt.

Es wurde untersucht, ob das endogene Amphiphysin-2 in intGFP-Amphiphysin-1-transfizierten Zellen auch mit den intGFP-Amphiphysin-1-assoziierten Membrantubuli co-lokalisierte. Hierzu wurden die überexprimierenden Zellen fixiert und mit Antikörpern gegen Amphiphysin-2 eine Immunfluoreszenz durchgeführt. Das Ergebnis zeigt Abbildung 27. Es konnte eine deutliche Co-Lokalisation zwischen überexprimiertem GFP-Amphiphysin-1 und endogenem Amphiphysin beobachtet

werden, und zwar derart, dass die Amphiphysin-1-Tubuli von Amphiphysin-2 in einem perlschnurartigen Muster dekoriert waren. Hierbei ist allerdings nicht klar, inwiefern diese Anordnung auf die – aus Sicht von Amphiphysin-2 – ungünstige Stöchiometrie zurückzuführen ist, oder ob es sich hierbei um einen Artefakt der Fixierungsmethode handelt.

Zur Untersuchung der Frage, ob auch Amphiphysin-2 alleine dynamische Tubuli bildet, wurden Ptk2-Zellen mit rekombinantem GFP-Amphiphysin-2 mikroinjiziert. Es zeigte sich, dass Amphiphysin-2 ebenfalls die Fähigkeit zur Ausbildung hochdynamischer Tubuli besitzt (Abb. 28). Dies spricht dafür, dass die Amphiphysin-1 und -2 gemeinsame BAR-Domäne entscheidend für die Fähigkeit zur Tubulusbildung ist.

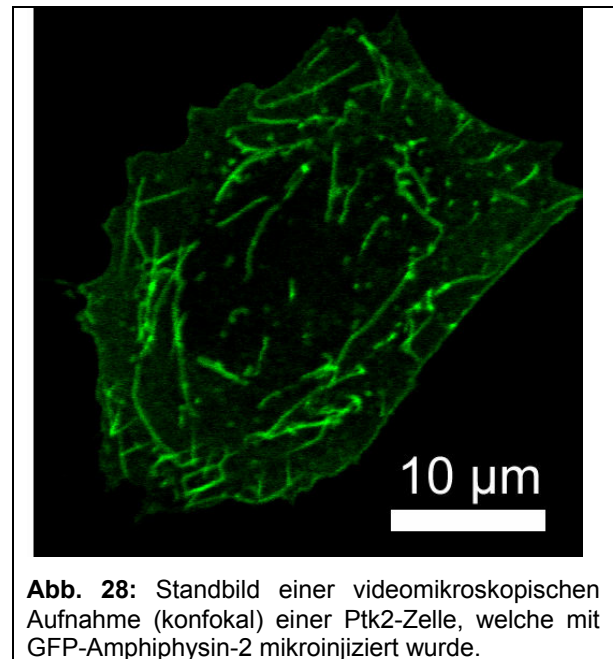


Abb. 28: Standbild einer videomikroskopischen Aufnahme (konfokal) einer Ptk2-Zelle, welche mit GFP-Amphiphysin-2 mikroinjiziert wurde.

4.2.6 Wechselwirkungen von Amphiphysin und anderen BAR-Proteinen

In jüngster Zeit zeigten verschiedene Veröffentlichungen das Vermögen von BAR-Proteinen, Membrantubuli zu bilden (Überblick in Ren *et al.*, 2006). Eines dieser Proteine ist Sorting Nexin-1 (Carlton *et al.*, 2004). Um zu ermitteln, ob Amphiphysin-1 und Sorting Nexin-1 (SNX-1) bei der Membrantubulierung zusammenarbeiten, wurden Ptk2 Zellen mit mRFP-Amphiphysin-1 und GFP-SNX-1 co-transfiziert. Abbildung 29 zeigt, dass beide Proteine bei der Bildung von Membrantubuli räumlich völlig unabhängig voneinander agieren.

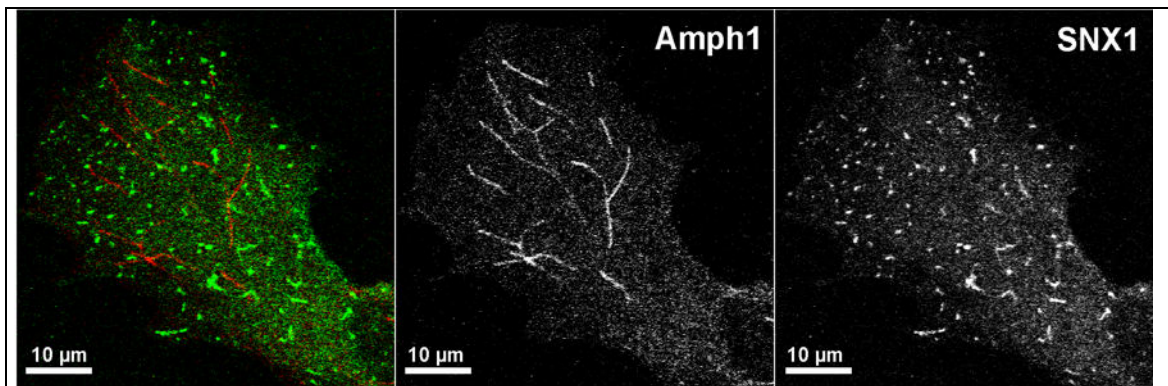


Abb. 29: PtK2-Zellen, die mRFP-Amphiphysin-1 und GFP-Sorting Nexin 1 überexprimierten zeigten keinerlei Co-Lokalisation zwischen diesen Proteinen (Standbild aus einer videomikroskopischen Aufnahme, die dazugehörige Filmdatei befindet sich im Anhang.)

4.2.7 Wechselwirkungen von Amphiphysin-Tubuli mit Clathrin

Einer der wichtigsten Interaktionspartner des Amphiphysin ist Clathrin. Daher wurde überprüft, ob sich in den Amphiphysin-assoziierten Tubuli Clathrin nachweisen lässt. In lebenden Zellen, welche mit intGFP-Amphiphysin-1 und Clathrin leichte Kette co-transfiziert wurden, war allerdings keinerlei Co-Lokalisation der fraglichen Proteine beobachtbar.

Im Falle der Co-Lokalisation von intGFP-Amphiphysin-1 mit Clathrin ergab sich ein uneinheitliches Bild in Abhängigkeit vom verwendeten Antikörper. Während in Immunfluoreszenzen mit einem Antikörper gegen die schwere Kette von Clathrin (X-22) deutliche Co-Lokalisation mit den intGFP-Amphiphysin-1-Tubuli beobachtet werden konnte, war diese bei Färbung mit einem Antikörper gegen die leichte Kette von Clathrin deutlich weniger ausgeprägt. Mit X-22 gefärbte Zellen zeigten Co-

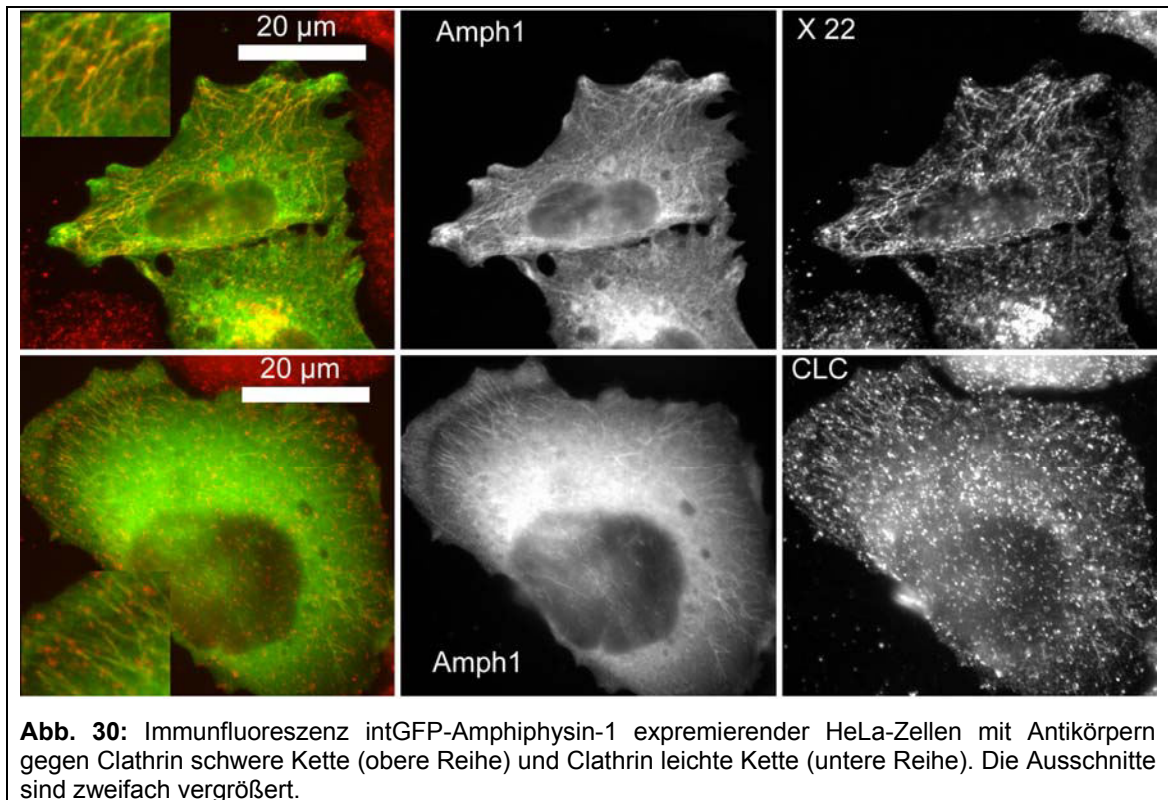
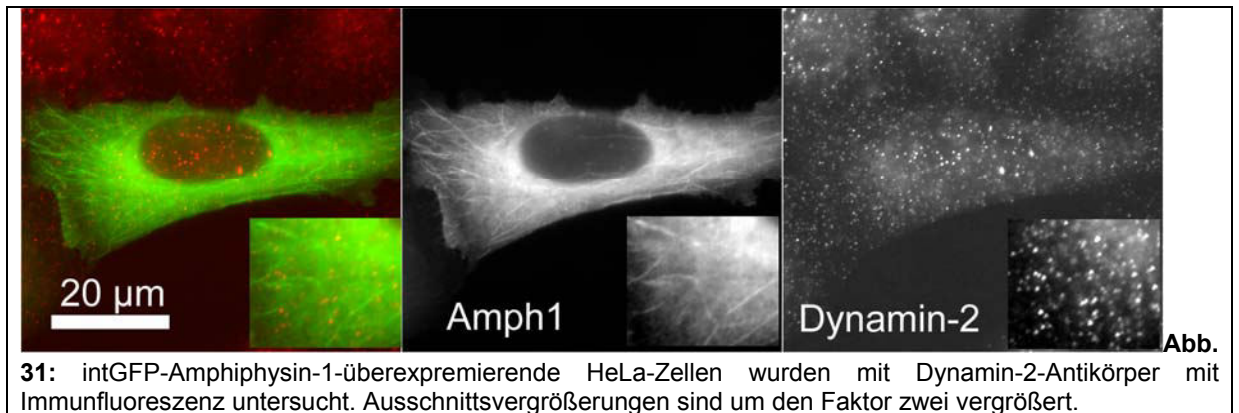


Abb. 30: Immunfluoreszenz intGFP-Amphiphysin-1 exprimierender HeLa-Zellen mit Antikörpern gegen Clathrin schwere Kette (obere Reihe) und Clathrin leichte Kette (untere Reihe). Die Ausschnitte sind zweifach vergrößert.

Lokalisation über längere Abschnitte der Tubuli hinweg. Bei R 461-gefärbten Zellen war bestenfalls punktförmige Co-Lokalisation an den Enden von Tubuli beobachtbar (Abb. 30). Möglicherweise differenziert der X-22-Antikörper aufgrund einer höheren Affinität zu clathrinhaltigen Bereichen an den Tubuli nicht so stark zwischen Bereichen unterschiedlicher Clathrinkonzentration. Der Antikörper R461 hingegen bindet nur an solche Bereiche der Tubuli, welche deutlich überdurchschnittliche Clathrinkonzentrationen enthalten. Es ist vorstellbar, dass die Enden von Amphiphysin-Tubuli mit einer Clathrinkappe abschließen.

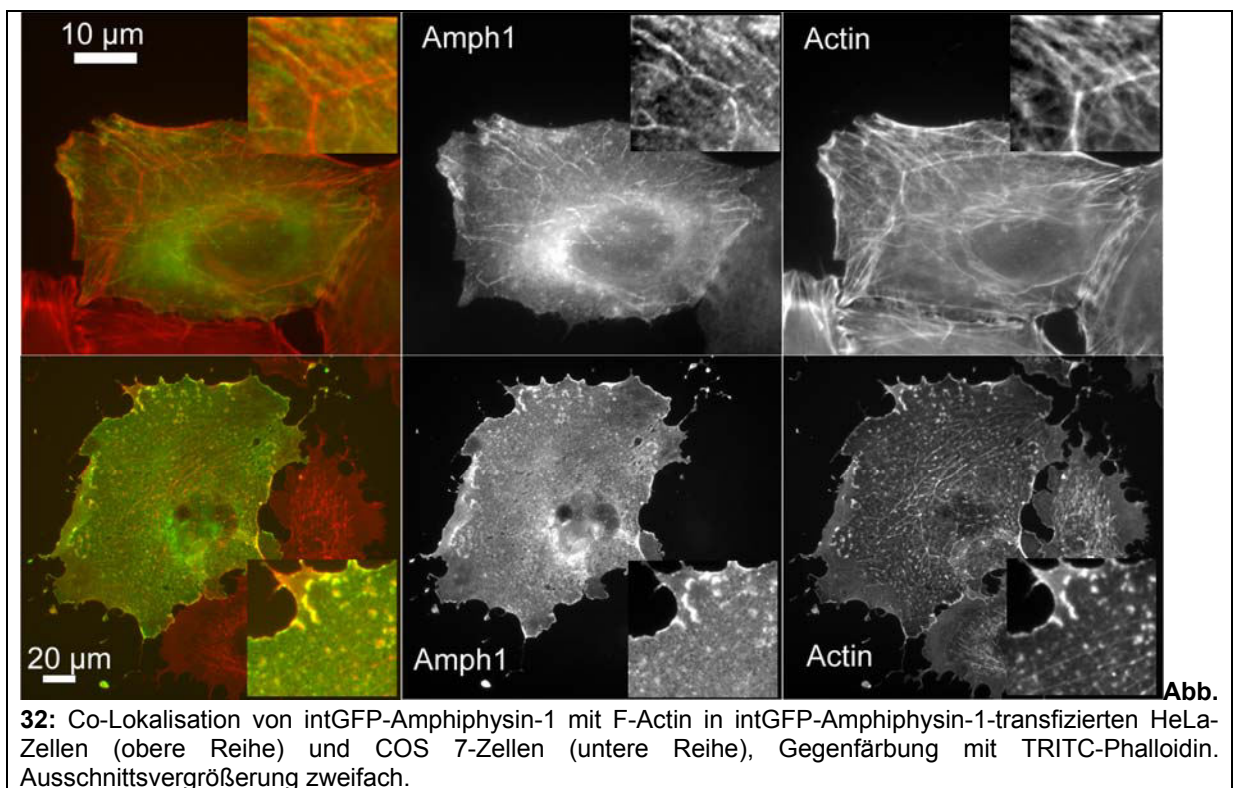
4.2.8 Interaktion von Amphiphysin-1 und Dynamin

Ein weiterer zentraler Interaktionspartner von Amphiphysin ist Dynamin. Aus diesem Grunde wurde die Co-Lokalisation von Dynamin mit den tubulären Strukturen über Immunfluoreszenz untersucht (Abbildung 31). Hier ließ sich keine starke Co-Lokalisation nachweisen. Lediglich vereinzelte Dynamin-positive Punkte scheinen sich an der Spitze von Tubuli zu befinden.



4.2.9 Interaktion von Amphiphysin-Tubuli mit Komponenten des Cytoskeletts

Aufgrund morphologischer Überlegungen erschien es nahe liegend zu untersuchen, ob Amphiphysin-Tubuli mit Komponenten des Cytoskeletts assoziiert sind. Hierzu wurden Ptk2-Zellen, welche konstitutiv YFP-Actin exprimieren, mit intGFP-Amphiphysin transfiziert. Diese Experimente ließen leider aufgrund der sehr ähnlichen Emmissionsspektren von YFP und GFP keine genaue Aussage zu. Stattdessen wurde in fixierten Zellen mittels Immunfluoreszenz dieser Zusammenhang untersucht, wobei COS-7 und HeLa SS6-Zellen Verwendung fanden (Abb. 32.)



In HeLa SS6-Zellen war eine ganz leichte Co-Lokalisation zu beobachten. Diese ist allerdings viel zu schwach, um daraus eine mögliche Parallelität von Amphiphysin-Tubuli und Actinfilamenten abzuleiten. Es scheint sich hier vielmehr um Überkreuzungen dieser morphologisch ähnlichen Strukturen zu handeln. In COS-7 Zellen konnten nur verhältnismäßig selten Amphiphysin-Tubuli beobachtet werden. Nennenswerte Co-Lokalisation trat nur in der Zellperipherie auf.

4.2.10 Stimulation der Bildung Amphiphysin-assoziiierter Membrantubuli durch Inhibition von CK-2

Bei der Behandlung intGFP-Amphiphysin-1-exprimierender Zellen mit dem CK-2-Inhibitor TBB fiel auf, dass diese Zellen einen deutlich veränderten Phänotyp aufwiesen (Abb. 33). Sie enthielten deutlich mehr Tubuli als unbehandelte Zellen, und diese wiesen eine größere morphologische Varianz auf. Es fanden sich zahlreiche sehr kurze gekrümmte Strukturen aber auch wesentlich längere, gerade Strukturen. Einzelbilder solcher Zellen lassen darüber hinaus Verzweigungen in diesen Strukturen vermuten, dieses wird aber bei der Beobachtung von videomikroskopischen Filmen nicht bestätigt. Vielmehr scheint dieser Eindruck durch die schiere Fülle tubulärer Strukturen zu entstehen.

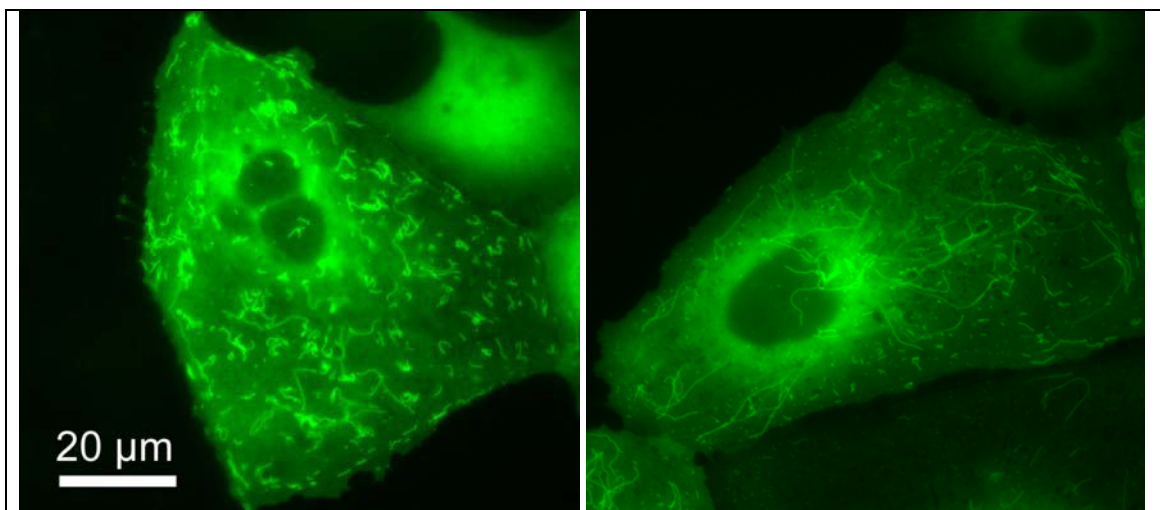
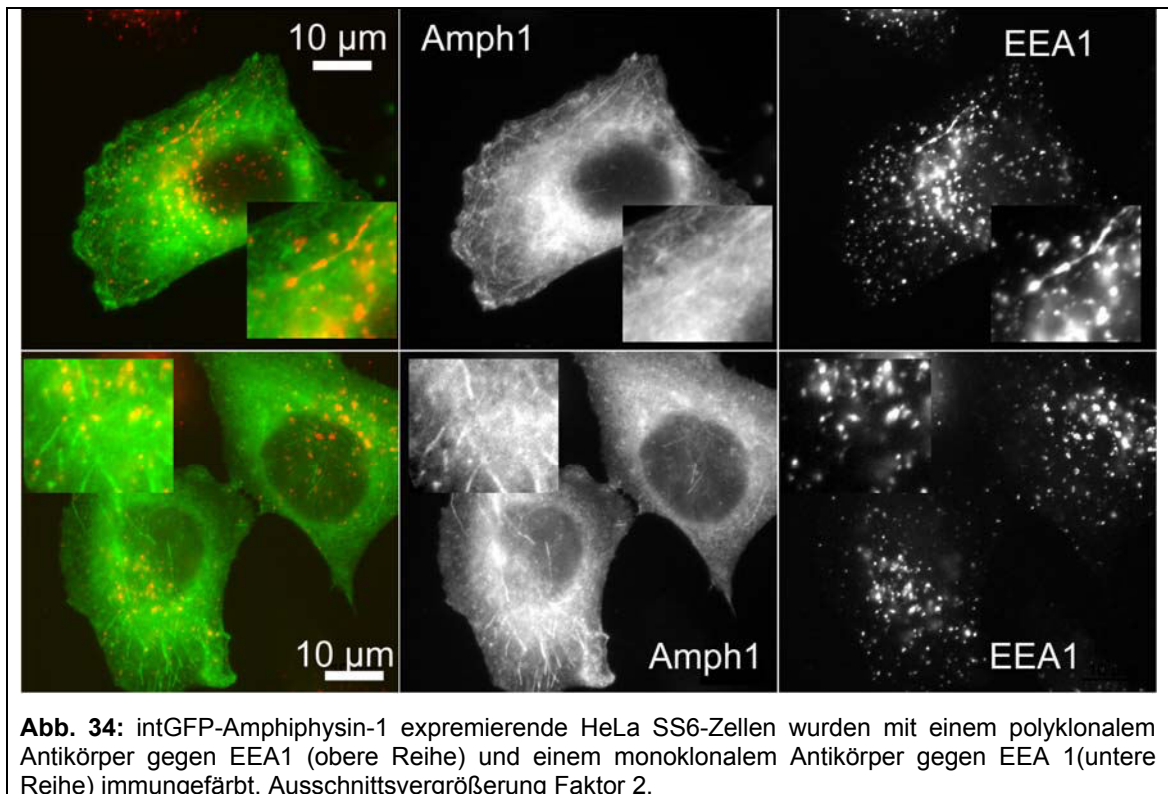


Abb. 33: Mit intGFP-Amphiphysin transfizierte PtK2-Zellen nach TBB-Behandlung (Standbilder aus videomikroskopischen Aufnahmen). Die Zellen weisen stark unterschiedliche Tubulimorphologien auf. Zugehörige Filmdateien finden sich im Anhang 8.

4.2.11 Amphiphysin-assoziierte Membrantubuli und Frühe Endosomen

Außer der Plasmamembran enthält die Zelle zahlreiche membranumhüllte Kompartimente, welche teilweise über Clathrin-vermittelte Prozesse in Verbindung stehen. Ein Beispiel hierfür sind die frühen Endosomen, welche eine Durchgangsstation bei der Prozessierung endocytierter Materials darstellen. Zur Untersuchung der Frage, ob Amphiphysin-assoziierte Membrantubuli mit diesem Kompartiment in Verbindung stehen, wurden Immunfluoreszenzen mit zwei verschiedenen Antikörpern gegen einen Marker des frühen Endosoms, das EEA1 (*early endosome antigen 1*) durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Experimente zeigt Abb. 34.



Mit beiden Antikörpern ließ sich eine teilweise Co-Lokalisation mit Amphiphysin-assoziierten Tubuli beobachten, wobei dieser Effekt in Färbungen mit dem polyklonalen Antikörper ausgeprägter war. Hier lassen sich teilweise Co-Lokalisationen über mehrere Mikrometer Länge beobachten, während diese im Falle des monoklonalen Antikörpers sehr viel punktueller ausfallen. Dieses Ergebnis lässt

vermuten, dass Amphiphysin-assoziierte Membrantubuli nicht nur an der Plasmamembran sondern auch an frühen Endosomen entstehen können.

4.2.12 Einfluss von Amphiphysin 1-Überexpression auf die Clathrin-vermittelte Endocytose

Ein etablierter Marker der Clathrin-vermittelten Endocytose ist das Eisentransportprotein Transferrin. Dieses wird nach Bindung an den Transferrinrezeptor über Clathrin-vermittelte Endocytose in die Zelle aufgenommen (Harding *et al.*, 1983). Aufgrund der relativ niedrigen erzielten Transfektionsraten erschien es nicht sinnvoll, eine biochemische Quantifizierung der

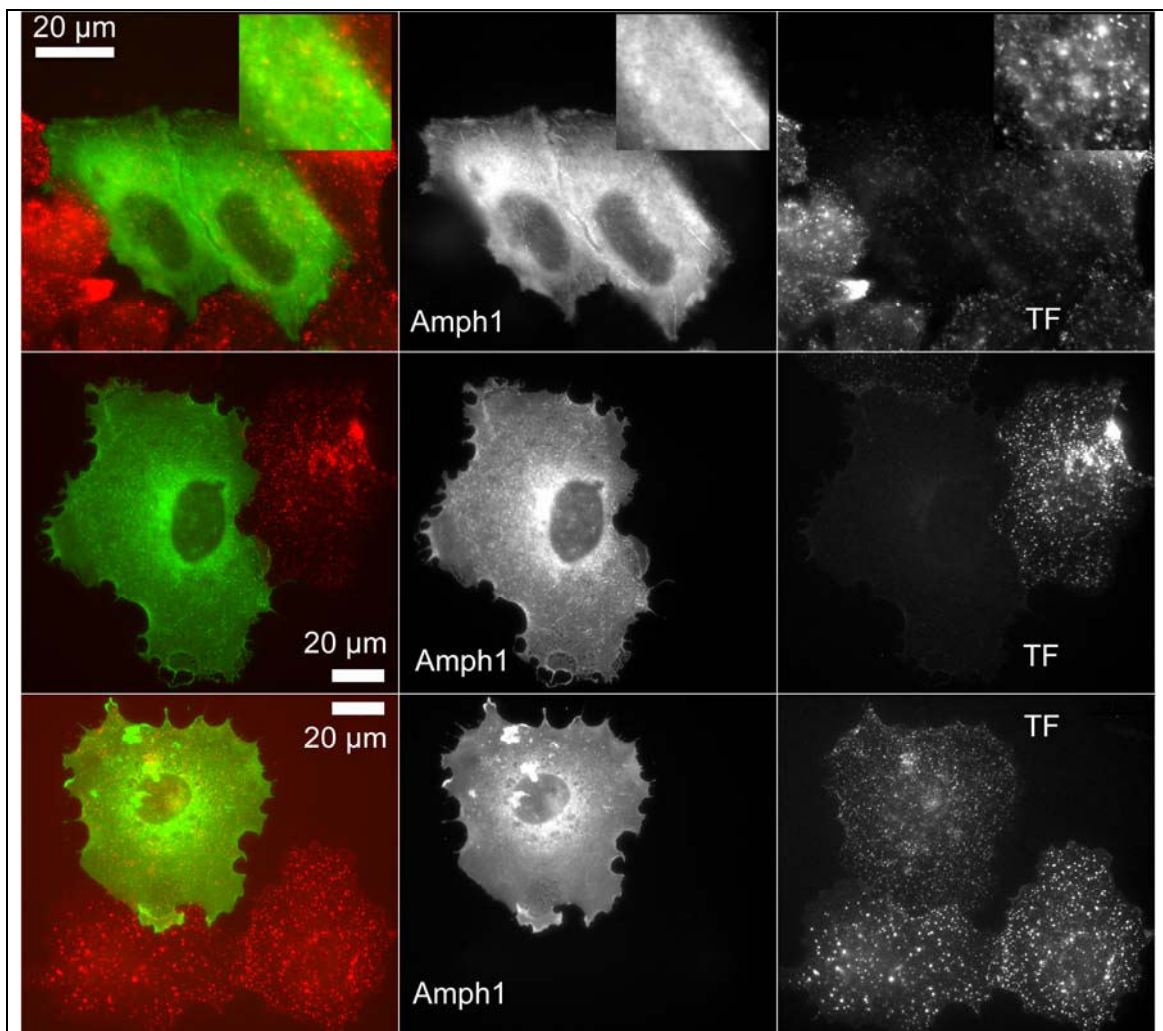


Abb. 35: intGFP-Amphiphysin-1-überexprimierende HeLa-Zellen (obere Reihe) wurden mit TRITC-Transferrin (TF) präinkubiert, in Wachstumsmedium überführt und nach 5 min fixiert. intGFP-Amphiphysin-1-überexprimierende COS-7-Zellen wurden in gleicher Weise behandelt, allerdings wurde auf Inkubation in Wachstumsmedium in der mittleren Reihe verzichtet sondern sofort fixiert; in der unteren Reihe betrug die Dauer der Inkubation in Wachstumsmedium 10 min.

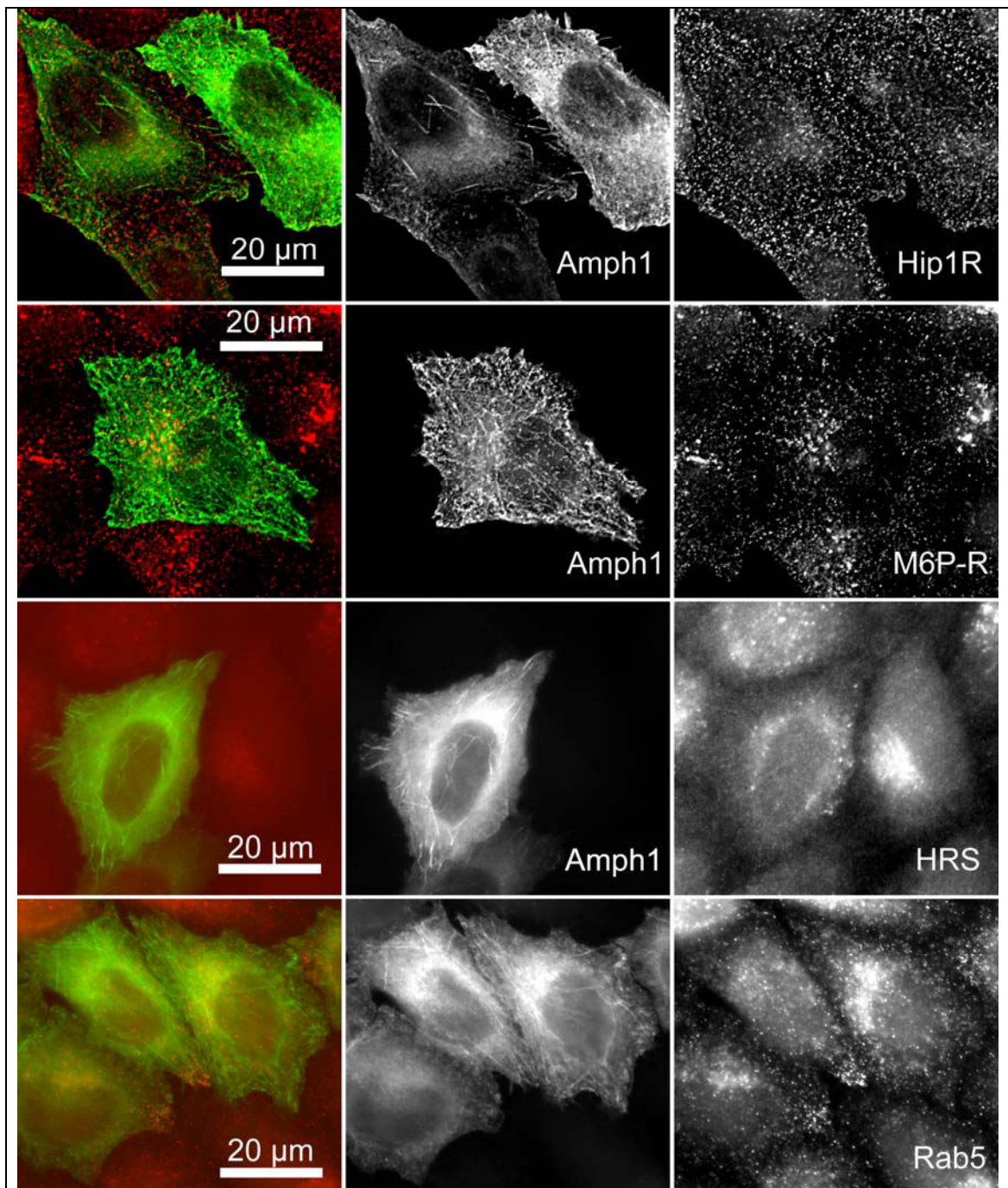


Abb. 36: Immunfluoreszenz verschiedener Markerproteine. HeLa-Zellen, die intGFP-Amphiphysin-1 exprimierten, wurden mit Antikörper für die angegebenen Proteine gefärbt. Die Aufnahmen der beiden oberen Reihen wurden durch Dekonvolution von Z-Stapelaufnahmen erhalten.

Transferrinaufnahme vorzunehmen. Stattdessen wurden die Versuche zur Transferrin-Aufnahme mit einem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Transferrin durchgeführt. Da es sich hierbei um humanes Transferrin handelte, konnten Ptk2-Zellen keine Verwendung finden, stattdessen wurden COS-7 und HeLa SS6-Zellen eingesetzt. Die

Ergebnisse dieser Experimente zeigt Abbildung 35. In all diesen Experimenten war zu beobachten, dass in intGFP-Amphiphysin-1 überexprimierenden Zellen die Aufnahme von Transferrin blockiert oder verzögert war. Im Falle der COS-7-Zellen gleicht sich die Transferrin-Aufnahme von transfizierten und nichttransfizierten Zellen an. Allerdings können hier keine Aussagen über eventuelle Co-Lokalisationen mit tubulären Strukturen getroffen werden, da diese in COS-7-Zellen so gut wie nicht auftreten. Die geringe Menge Transferrin, welche von Amphiphysin-1-GFP überexprimierenden HeLa SS6-Zellen noch aufgenommen wurde, scheint allerdings teilweise mit Enden tubulärer Strukturen zu co-lokalisieren.

4.2.13 Amphiphysin und weitere Marker der Clathrin-vermittelten Endocytose und des endosomalen Transportweges

Zahlreiche weitere Proteine eignen sich als Marker für Stationen der Clathrin-vermittelten Endocytose und des endosomalen Transportweges. Zur Feststellung möglicher Verbindungen Amphiphysin-assoziiierter Tubuli wurden Immunfluoreszenzen gegen vier dieser Proteine durchgeführt. Es waren dies im einzelnen HIP1r (*Huntingtin Interacting Protein 1 related*), ein Interaktionspartner von Clathrin leichten Ketten, HRS (*Hepatocyte Growth Factor-Regulated Tyrosine Kinase Substrate*), ein Marker der frühen Endosomen, Rab 5, welches eine kleine GTPase ist und ebenfalls in frühen Endosomen vorliegt und schließlich der Mannose-6-phosphatrezeptor, welcher vor allem in späten Endosomen bzw. Lysosomen vorliegt. Keines dieser Proteine zeigte jedoch eine Co-Lokalisation mit intGFP-Amphiphysin-1.

4.3 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Um weitere Aufschlüsse über die Natur der Amphiphysin-Membran-Tubuli zu gewinnen, wurden elektronenmikroskopische Untersuchungen sowohl an aufgereinigtem, rekombinanten Amphiphysin als auch an Zellen durchgeführt, in welche aufgereinigtes, rekombinantes Amphiphysin mikroinjiziert wurde.

4.3.1 Isoliertes Amphiphysin

GST-Amphiphysin wurde in *E. coli* expremiert, aufgereinigt und die GST-Markierung abgeschnitten und Sprühpräparate nach der Methode von Tyler und Branton (1980) angefertigt. Diese

wurden mit dem Transmissionselektronenmikroskop untersucht. Sowohl bei Amphiphysin-1 als auch bei Amphiphysin-2 konnte man charakteristische, runde Strukturen mit einem Durchmesser von 15 – 20 nm erkennen (Abb. 37)

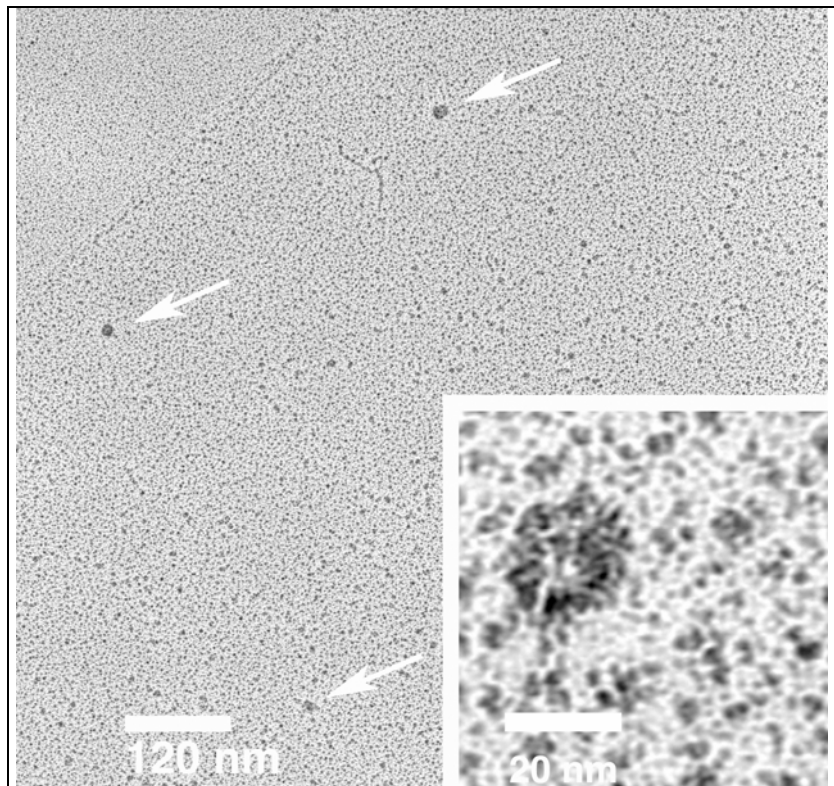


Abb. 37: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Sprühpräparats von Amphiphysin-1. Es sind runde Strukturen von etwa 20 nm Durchmesser zu erkennen.

4.3.2 Mikroinjiziertes Amphiphysin in Zellen

In elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Zellen, die GFP-Amphiphysin-2 mikroinjiziert und flacheingebettet worden waren, ließen sich charakteristische Strukturen erkennen, die nur in den mit intGFP-Amphiphysin-1 mikroinjizierten

Zellen zu finden waren, nicht aber in Zellen, die mit Puffer injiziert worden waren. Hierbei handelt es sich um Anschnitte von Membrantubuli, meistens Querschnitte, seltener auch tangentialer oder Längsschnitte (Abb. 38, rechts unten). Der Durchmesser der Querschnitte betrug etwa 50 nm. Auf der cytosolischen Seite der Membran war eine elektronendichte Hüllschicht zu erkennen, die sich morphologisch deutlich vom „Stachelsaum“ Clathrin-bedeckter Vesikel unterscheidet. Es ist plausibel, dass es sich bei diesen Membrantubuli um die dynamischen Strukturen handelt, die in der Videomikroskopie beobachtet wurden.

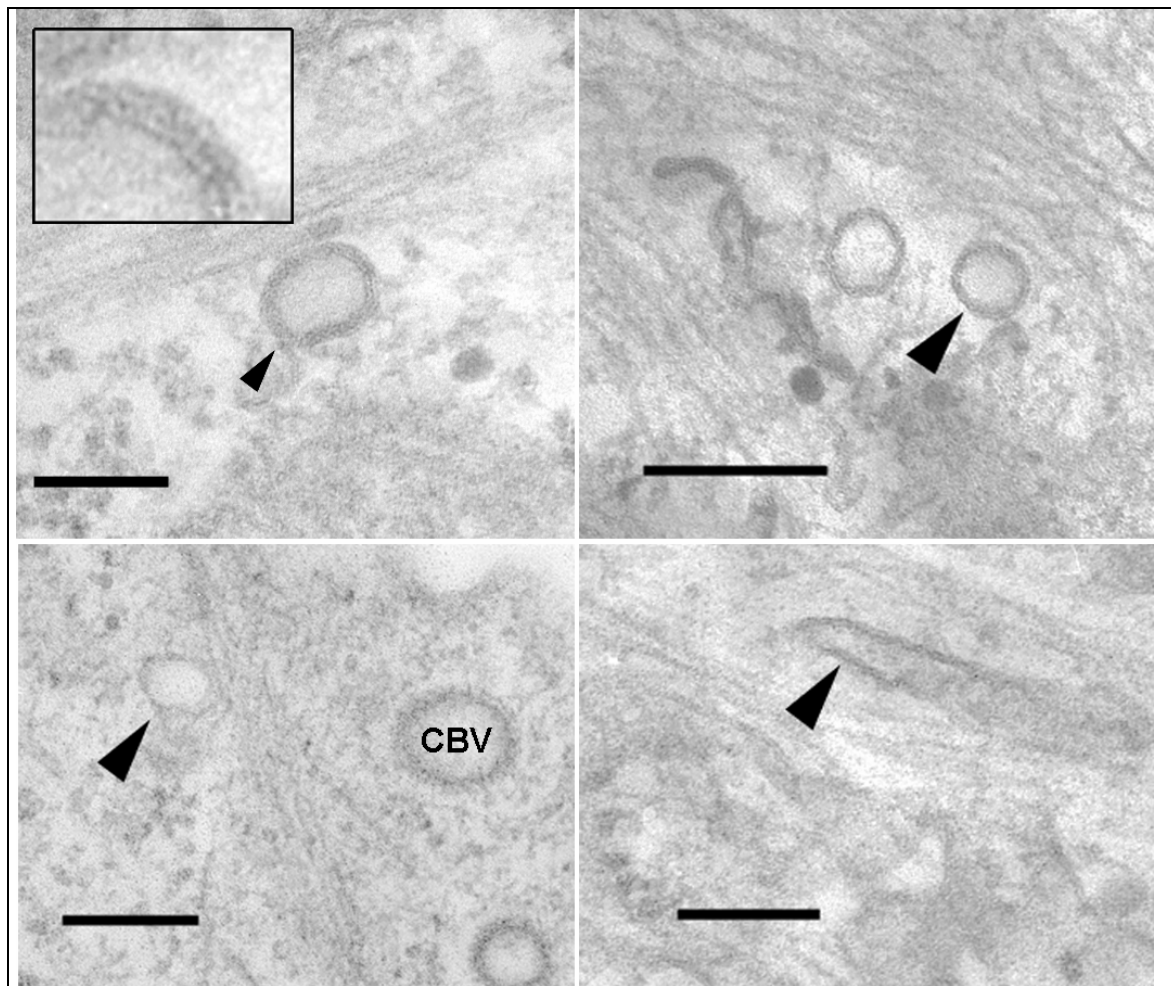


Abb. 38: Elektronenmikroskopische Aufnahmen flacheingebetteter HeLa SS6-Zellen, die mit GFP-Amphiphysin-1 mikroinjiziert worden waren. Die Maßstabsbalken sind jeweils 100 nm lang; CBV = Clathrin behülltes Vesikel. Die Pfeile kennzeichnen charakteristische, behüllte Strukturen (rechts unten im Schräganschnitt).

5 Diskussion

5.1 Phosphorylierung von Amphiphysin

Meine Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Threoninreste 350 und 387 in der Sequenz des humanen Amphiphysin-1 CK-2-Phosphorylierungsstellen sind. In Kinaseexperimenten mit radioaktivem Phosphat konnte ich zeigen, dass Amphiphysin *in vitro* ein Substrat der CK-2 ist und dass die Inkorporierung von radioaktivem Phosphat in solchen Mutanten reduziert ist, in denen die Threonine T350 und T387 durch Glutamat oder Alanin ersetzt worden waren. Eine vollständige Unterbindung der Phosphatinkorporation trat nicht auf, dies ist allerdings auch nicht zu erwarten, da sich in der Sequenz von Amphiphysin-1 auch solche CK-2-Konsensussequenzen befinden, welche nicht hochkonserviert sind. Es ist deshalb durchaus möglich, dass auch diese Stellen *in vitro* phosphoryliert werden. Darüber hinaus enthält auch die GST-Sequenz einige putative CK-2-Phosphorylierungsstellen, die ebenfalls zur Gesamtposphatinkorporation beitragen könnten. Der Befund aus *in vitro* Experimenten konnte in Versuchen mit kultivierten neuroendokrinen Zellen bestätigt werden. Wie in Abbildung 6 gezeigt, wird die Phosphorylierung von Amphiphysin-1 durch NGF induziert. Diese Stimulation der Phosphorylierung ließ sich durch spezifische CK-2-Inhibitoren wirkungsvoll unterdrücken. Da diese Phosphorylierung auch durch den Phorbolster PMA bewirkt werden kann, und da Phorbolster spezifische Aktivatoren der Proteinkinase C sind, wurde zunächst vermutet, dass Amphiphysin-1 ein Substrat der Proteinkinase C sei. Inhibitoren der Proteinkinase C hemmen jedoch nur die PMA-induzierte Phosphorylierung in PC-12-Zellen und nicht die durch NGF ausgelöste (Döring et al., 2006). Daher kann man annehmen, dass die durch PMA stimulierte Proteinkinase C auf einem NGF-unabhängigen Weg die Aktivität der CK-2 stimuliert, so dass diese dann Amphiphysin phosphorylieren kann. Der Effekt der Stimulation der Phosphorylierung konnte auch im Falle von Amphiphysin-2 beobachtet werden und ließ sich hier ebenfalls durch spezifische Inhibitoren der CK-2 unterdrücken. Allerdings ließ sich in der Wirkung der Inhibitoren ein Unterschied feststellen: TBB zeigte bereits in geringeren Konzentrationen als DRB die Fähigkeit, die Amphiphysin-Phosphorylierung zu reduzieren. Dies steht in

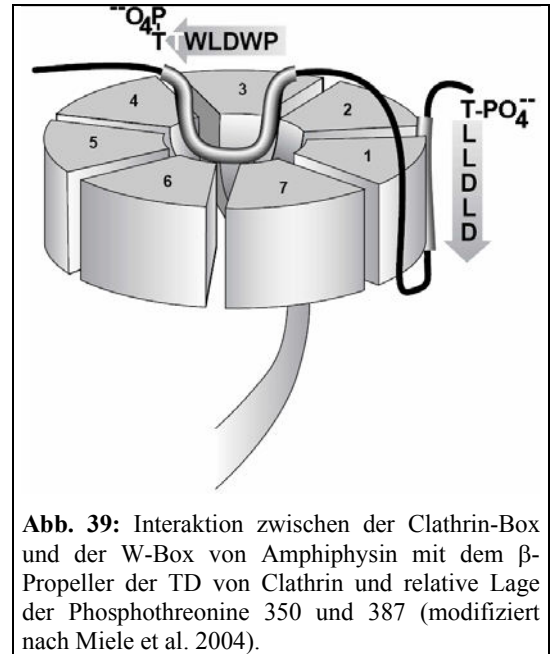
Übereinstimmung mit den IC_{50} -Werten für die beiden Inhibitoren, diese betragen $6 \mu\text{M}$ für DRB und $1,6 \mu\text{M}$ für TBB.

5.1.1 Einfluss der Phosphorylierung Amphiphysins auf die Clathrinbindung

Die Mutagenese der Threoninreste 350 und 387 von Amphiphysin-1 unterdrückte die Bindung von Clathrin fast völlig. Da sich die Ergebnisse aus Bindungsexperimenten mit Rattenhirncytosol und mit aufgereinigten Clathrintriskelia gleichen, kann man davon ausgehen, dass die direkte Bindung zwischen Clathrin und Amphiphysin betroffen ist und nicht indirekte Interaktionen z.B. über Dynamin oder AP-2. Dies erscheint auch insofern schlüssig, als die mutierten Threoninreste relativ weit vom kanonischen AP-2-Bindungsmotiv entfernt sind (24 bzw. 61 Aminosäuren Abstand), sich jedoch wie bereits dargelegt in unmittelbarer Nachbarschaft zur Clathrin-Box und zur W-Box befinden. In Bindungsexperimenten sowohl mit Rattenhirncytosol als auch mit aufgereinigten Triskelia hat darüber hinaus die Phosphorylierung des Threoninrestes 350 einen stärkeren Einfluss auf die Fähigkeit Amphiphysins Clathrin zu binden als die Phosphorylierung von Threonin 387. Dies könnte ebenfalls aus dem unterschiedlichen Abstand dieser Phosphorylierungsstellen zu den jeweiligen Bindungsmotiven resultieren. Denkbar ist aber auch, dass beide Bindungsstellen unterschiedlich stark zu der Wechselwirkung zwischen Amphiphysin und Clathrin beitragen. Eine Phosphorylierung der dazugehörigen Threonine hätte demnach auch einen unterschiedlich starken Effekt auf diese Wechselwirkung. Dem entgegen stehen allerdings die Befunde von Miele und Mitarbeitern, welche sehr ähnliche Bindungskonstanten für beide Motive fanden (Miele *et al.*, 2004). Eine wahrscheinlichere Erklärung für diesen Unterschied findet sich in den unterschiedlichen Bindungsmodi der beiden Motive. Die genannte Arbeitsgruppe fand in Co-Kristallisationsexperimenten eine Struktur, wie sie in Abb. 39 dargestellt ist. Dabei bindet die W-Box mit zwei Tryptophanresten in einer hydrophoben Tasche des siebenblättrigen β -Propellers, der von der terminalen Domäne der schweren Kette von Clathrin gebildet wird, während die Clathrinbox über elektrostatische Wechselwirkungen an der Außenseite dieser zylindrischen Struktur bindet. Es ist leicht einsehbar, dass das Einführen zusätzlicher negativer Ladung in Position 350 einen größeren Einfluss auf diese elektrostatische Wechselwirkung hat. Der Einfluss

dieses Vorgehens in Position 387 auf die hydrophobe Wechselwirkung der W-Box mit ihrem Bindungspartner dürfte vergleichsweise geringer ausfallen.

Meine Befunde legen nahe, dass die Phosphorylierung von Threonin 350 und 387 die Wechselwirkung von Amphiphysin und Clathrin sehr stark inhibiert, jedoch nicht vollständig aufhebt. Eine vollständige Zerstörung der beiden Clathrinbindungsmotive (durch die Mutationen DLD353HSR und WD382SR) führt hingegen zu einer kompletten Unterdrückung dieser Interaktion (Slepnev *et al.*, 2000, siehe auch Abb. 12). Dieser Unterschied ist leicht nachvollziehbar: Im



Falle der Glutamatmutanten werden zwei saure Reste in direkter Nachbarschaft zu den Clathrinbindungsmotiven eingefügt, während durch die DLD353HSR-Mutation ein sauer-neutral-saures Motiv gegen ein basisch-polar-basisches Motiv ausgetauscht wurde. Bei der WD382SR Mutation werden der sterisch anspruchsvolle Tryptophanrest gegen den kleinen Serinrest und der saure Aspartatrest gegen den basischen Argininrest ausgetauscht. Konsequenterweise ist die Clathrinbindung dann auch in den Mutanten vollständig unterdrückt, in denen Phosphorylierung eines Bindungsmotivs mit der Zerstörung des jeweils anderen Bindungsmotivs kombiniert waren. Schließlich sollte man auch nicht übersehen, dass der Austausch Threonin zu Glutamat eine Phosphorylierung von Threonin zwar sehr gut imitiert, letzten Endes aber die sterischen und elektronischen Verhältnisse nicht vollständig identisch sind.

5.1.2 Einfluss der Phosphorylierung auf die Bandenverschiebung

Die Phosphorylierung von Amphiphysin-1 lässt sich leicht über Elektrophorese und Western Blot detektieren, da es zu einer charakteristischen Bandenverschiebung kommt (Bauerfeind *et al.*, 1997). Ein ähnlicher Effekt konnte auch für Amphiphysin-2

beobachtet werden (Marks & McMahon, 1998). Interessanterweise führte der Austausch der Threonine 350 und 387 gegen Glutamat ebenfalls zu einer Verringerung der elektrophoretischen Mobilität des Proteins, wobei dieser Effekt bei beiden Resten unterschiedlich stark ausgeprägt (er ist größer für T387). Es zeigte sich, dass infolge einer Stimulation mit Phorbolestern (NGF konnte hier nicht eingesetzt werden, da dieser Zelllinie der entsprechende Rezeptortyp fehlt) die Glutamateinzelmutanten T350E und T387E sehr wohl noch phosphorylierungsbedingte Bandenverschiebung aufwiesen. Allerdings war diese bei der Glutamatdoppelmutante nicht mehr gegeben, diese zeigte vielmehr die gleiche elektrophoretische Mobilität wie die phosphorylierte Form des Wildtypproteins. Wurden die Threoninreste 350 und 387 hingegen durch Alanin ersetzt, so trat sehr wohl noch eine phosphorylierungsbedingte Bandenverschiebung auf. Diese Beobachtung ist in Übereinstimmung mit den *in vitro* Kinaseexperimenten; hier wurde die Doppelalaninmutante ebenfalls noch phosphoryliert. Vermutlich werden also noch weitere CK-2-Konsensusstellen in der Amphiphysin1-Sequenz sowohl *in vivo* als auch *in vitro* phosphoryliert und tragen zu einer Bandenverschiebung bei. Es stellt sich die Frage, warum nicht auch die Doppelglutamatmutante, welche ja *in vitro* ebenfalls noch phosphoryliert werden kann, eine weitere Bandenverschiebung bei Phosphorylierung aufweist. Möglicherweise tritt hier ein gewisser Sättigungseffekt auf, so dass ab einem bestimmten Punkt weiteres Hinzufügen saurer Reste die elektrophoretische Mobilität des Amphiphysin-1 nicht mehr weiter verringern kann. Hierfür spricht auch der Befund, dass in Bakterien expremiertes GST-T350E-T387E-Amphiphysin-1 nur eine marginal geringere elektrophoretische Mobilität aufweist als GST-T387E-Amphiphysin-1. Noch nicht erklärt ist damit allerdings die Diskrepanz zwischen der *in vivo* beobachteten Bandenverschiebung bei der T350A-T387A-Mutante und der Tatsache, dass diese in *in vitro* Phosphorylierungsexperimenten nicht beobachtet werden konnte. Es ist denkbar, dass *in vivo* auch andere Kinasen –vielleicht auch die Proteinkinase C – zu der beobachteten Bandenverschiebung beitragen.

5.1.3 Amphiphysin als Substrat verschiedener Kinasen

Vor und während der Erstellung dieser Arbeit erschienen mehrere Arbeiten, welche sich ebenfalls mit dem Phänomen der Phosphorylierung von Amphiphysin auseinandersetzen. Die Zusammenschau dieser Arbeiten in Verbindung mit meinen Befunden legt nahe, dass Amphiphysin Substrat einer ganzen Reihe verschiedener Kinasen ist. Die hier gezeigte Induktion der Amphiphysin-Phosphorylierung durch Nervenwachstumsfaktor wurde zwischenzeitlich ebenfalls von einer anderen Arbeitsgruppe gezeigt (Shang *et al.*, 2004). Allerdings machte diese Arbeitsgruppe als verantwortliche Kinase die MAPK aus und als Phosphorylierungsstellen die Serinreste 285 und 293. Jedoch fanden auch Shang und Mitarbeiter, dass die Mutagenese dieser Aminosäuren die NGF-induzierte Phosphorylierung von Amphiphysin nicht vollständig unterdrückte, was die Beteiligung weiterer Kinasen nahe legt. Auch ist bekannt, dass CK-2 in der Lage ist, MAPK zu phosphorylieren und dadurch zu aktivieren (Hildesheim *et al.*, 2005), so dass möglicherweise beide Kinasen gleichzeitig Amphiphysin phosphorylieren. Es ist aber auch vorstellbar, dass in Zellen je nach einwirkendem Stimulus unterschiedliche Kinasen auf Amphiphysin einwirken und auf diese Weise zu Amphiphysin-Populationen unterschiedlicher Funktion führen. Es ist vorstellbar, dass die Interaktionen zwischen Amphiphysin und seinen zahlreichen Bindungspartnern auch differenziell reguliert werden. So könnte die von mir dargestellte Phosphorylierung durch CK-2 die Wechselwirkung mit Clathrin regulieren, während die Phosphorylierung durch MAPK die Bindung von AP-2 regulieren könnte. In diesem Zusammenhang interessant sind auch die Arbeiten von Floyd und Mitarbeitern und Tomizawa und Mitarbeitern. Beide Gruppen fanden, dass Amphiphysin von der Kinase cdk5 phosphoryliert werden kann, wobei erstere Arbeitsgruppe die Serinreste 272, 276 und 285 als Phosphorylierungsstellen identifizierte (Floyd *et al.*, 2001). Tomizawa und Kollegen fanden zusätzlich eine Phosphorylierung von Serin 261 und Threonin 310 durch diese Kinase. Floyd und Mitarbeiter beobachteten einen Einfluss der cdk5-vermittelten Amphiphysin-Phosphorylierung auf die Proliferation und Differenzierung von Zellen, während Tomizawa *et al.* die konzertierte Phosphorylierung der fünf genannten Reste als Regulator der AP-2-Bindung identifizierten. Die Phosphorylierung dieser Aminosäuren blieb ohne Einfluss auf die Clathrinbindung (Tomizawa *et al.*, 2003).

Diese Befunde sind allerdings nicht unumstritten, eine andere Arbeit fand – unter Verwendung spezifischer cdk5-Inhibitoren und dominant-negativer cdk5-Mutanten – keinerlei Beitrag dieser Kinase zur Phosphorylierung von Amphiphysin (Tan *et al.*, 2003). Diese negativen Befunde werden von bisher nicht publizierten Experimenten der Arbeitsgruppe Bauerfeind gestützt, in denen die spezifischen cdk5-Inhibitoren Roscovitin und Olomoucine keinen Einfluss auf die NGF-induzierte Amphiphysin-Phosphorylierung in PC12-Zellen hatten. CK-2 kann jedoch die Aktivität von cdk5 negativ regulieren (Lim *et al.*, 2004). Es ist also denkbar, dass in Neuronen mit ihrer hohen Konzentration von cdk5 in präsynaptischen Endigungen Amphiphysin durch diese Kinase phosphoryliert wird. Wird CK-2 aktiviert, z.B. durch NGF-induzierte Prozesse, wird eine andere Auswahl von Aminosäureresten in Amphiphysin phosphoryliert und gleichzeitig die Aktivität der cdk5 gehemmt. NGF und andere Neurotrophine können die Aktivierung von Ck-2 bewirken: Eine Stimulation der CK-2-Aktivität in NGF-behandelten PC12-Zellen wurde beobachtet (Kleijn *et al.*, 1998). Blanquet fand, dass BDGF (*brain derived growth factor*) und Neurotrophin-4 die Aktivität von CK-2 in Hippocampus-Dünnschnitten erhöhen (Blanquet, 1998; Blanquet, 2000). Dies lässt folgendes Szenario plausibel erscheinen: NGF führt zur Aktivierung der CK-2, die dann – neben anderen Substraten – Amphiphysin phosphoryliert. Diese Phosphorylierung vermindert dann die Interaktion zwischen Amphiphysin und Clathrin.

5.1.4 Physiologische Bedeutung

Liganden-induzierte Signalübertragung, welche von Rezeptoren in der Plasmamembran ausgeht, kann durch Clathrin-vermittelte Endocytose reguliert werden (Übersicht in Le Roy & Wrana, 2005). NGF-Stimuli werden durch die Aktivierung der Rezeptor-Tyrosinkinase *trkA* vermittelt, diese wird durch Clathrin-vermittelte Endocytose internalisiert (Beattie *et al.*, 2000). Möglicherweise spielt die Endocytose des NGF-*trkA*-Komplexes in Neuronen eine Rolle für den retrograden Transport des NGF-Signals von der präsynaptischen Endigung zum Zellkörper (Übersicht in Howe & Mobley, 2005). In diesem Modell könnte die Regulation der Endocytose durch NGF die Weiterleitung des NGF-Signals beeinflussen. Die NGF-induzierte

Phosphorylierung von Amphiphysin-1 durch die CK-2 und die dadurch bewirkte Hemmung der Clathrin-Amphiphysin-Interaktion bietet eine Erklärungsmöglichkeit für die Regulation der Clathrin-vermittelten Endocytose und des anschließenden vesikulären Transports des NGF-trkA-Komplexes. Möglicherweise erhöht die verringerte Clathrinbindungsfähigkeit von Phosphoamphiphysin dessen Interaktionsmöglichkeiten mit solchen Bindungspartnern wie AP-2 oder Dynamin. Es ist bekannt, dass die Bindung an Clathrin die Interaktion zwischen Amphiphysin und Dynamin inhibiert (McMahon *et al.*, 1997). Diese Überlegungen stehen darüber hinaus im Einklang mit Befunden an Knock-out-Mäusen, welche Amphiphysin die Rolle eines Feinregulators endocytotischer Prozesse zuweisen (Di Paolo *et al.*, 2002).

5.2 Amphiphysin-assoziierte Membrantubuli

Die Fähigkeit von Amphiphysinen, tubuläre Membranstrukturen zu bilden, konnte *in vitro* bereits vor einigen Jahren gezeigt werden (Takei *et al.*, 1998; Takei *et al.*, 2001). Darüber hinaus wurden tubuläre Strukturen, die Amphiphysin enthalten, auch in fixierten Zellen nachgewiesen. Verschiedene Arbeitsgruppen fanden, dass Amphiphysin in Zellen möglicherweise mit tubulären Strukturen assoziiert ist. So fanden Butler und Mitarbeiter hohe Konzentrationen von Amphiphysin-2 an T-Tubuli von Säugermuskeln (Butler *et al.*, 1997). Razzaq und Kollegen fanden, dass Amphiphysin in *Drosophila melanogaster* nicht mit der Clathrin-vermittelten Endocytose in Verbindung steht, sondern dort ebenfalls an den T-Tubuli der Flugmuskulatur lokalisiert ist. Dort spielt es offenbar eine entscheidende Rolle bei der neuromuskulären Kopplung; Amphiphysin-Knock-out-Tiere sind flugunfähig (Razzaq *et al.*, 2001; Muller *et al.*, 2003). In ähnlicher Weise äußert sich der Knock-Out von Amphiphysin-2 bei Mäusen, ihr Phänotyp zeigt starke Veränderungen der Myofibrillen der Herzmuskulatur (Muller *et al.*, 2003).

5.2.1 Dynamische Membrantubuli

Um die Aktivität von Amphiphysin-1 in lebenden Zellen beobachten zu können, habe ich ein GFP-Fusionsprotein hergestellt, bei dem GFP im Zentrum von Amphiphysin-1 sitzt, an einer Stelle, die in der Retina durch ein großes Insert besetzt wird. Dieses Fusionsprotein, im Unterschied zum N- und C-terminal markiertem Protein, bildete tubuläre Strukturen, welche in fixierten Zellen den durch überexprimiertes Wildtyp-Amphiphysin gebildeten sehr ähnelten. In videomikroskopischen Aufnahmen zeigten diese Strukturen eine sehr hohe Dynamik. Typischerweise folgte auf eine relativ homogene Wachstumsphase eine Schrumpfungsphase. Letztere war allerdings nicht sehr gleichmäßig, sondern oft durch eine rasche Folge von Wachstums- und Schrumpfungsprozessen gekennzeichnet. Betrachtete man lediglich die initiale Wachstumsphase, so ergaben sich Elongationsgeschwindigkeiten zwischen 0,2 und 0,8 $\mu\text{m/s}$, wobei die meisten Ereignisse bei 0,4 $\mu\text{m/s}$ beobachtet werden konnten. Die Tubuluslängen schwankten zwischen 3 und 19 μm , mit einer deutlichen Häufung bei 7 μm . Offensichtlich sind diese Wachstumsprozesse temperaturabhängig, die Quantifizierung tubulärer Strukturen in Zellen bei 30°C ergab eine Häufung der Elongationsgeschwindigkeiten um 0,2 $\mu\text{m/sec}$. Auch waren die Längen der Tubuli deutlich verringert; hier konnte eine eher heterogene Verteilung der Längen von 1 – 5 μm beobachtet werden. Mit welchen anderen zellulären Vorgängen lässt sich das dynamische Wachstum der Amphiphysin bedeckten Membrantubuli vergleichen? Es bietet sich der Vergleich mit dem *Self-Assembly* von Mikrotubuli aus Tubulindimeren an. Wie viele Amphiphysinmoleküle müssen also am Membrantubulus assoziieren, um die beobachteten Wachstumsraten zu erklären? Als Grundlage soll hier die Struktur der BAR-Domäne von *Drosophila*-Amphiphysin dienen (Peter et al. 2004). Peter und Mitarbeiter fanden, dass die beiden BAR-Domänen eines Amphiphysin-Dimers eine bananenförmige Struktur bilden, deren konkave Seite das Segment eines imaginären Kreises mit einem Durchmesser von 22 nm bildet. Die beiden Enden der BAR-Domänenstruktur schließen auf diesem gedachten Kreis einen Winkel von 74° ein. Geht man von einer dichten Packung dieser Dimere auf der Membranoberfläche aus, so kann man die gebildete ringförmige Struktur näherungsweise als Fünfeck auffassen, dessen Seitenlänge und damit Abstand der beiden Dimer-Enden sich zu

$(11/2)\sqrt{10-2\sqrt{5}} \text{ nm} = 12,9 \text{ nm}$ ergibt. Aus der Struktur ergibt sich eine Dicke des Dimers von 2,7 nm. Bei dichter Stapelung entspräche ein Tubulus von 1 μm Länge also einem Zylinder aus insgesamt etwa 1850 Amphiphysin-Dimeren, so dass bei einer Elongationsrate von 0,4 $\mu\text{m/s}$ eine Nettoaustauschrate von 740 Dimeren/s resultiert. Dies ist eine realistische Größenordnung für solche Prozesse, so fanden Walker und Kollegen in *in vitro* Experimenten mit Mikrotubuli – konzentrationsabhängige – Nettoaustauschraten in der Größenordnung von 100 Tubulin-Dimeren/s (Walker *et al.*, 1988).

Die Strukturen, die in Sprühpräparaten von isoliertem Amphiphysin unter dem Elektronenmikroskop beobachtet wurden, haben einen Durchmesser von etwa 20 nm. Man muss allerdings einwenden, dass die Amphiphysin-assoziierten Membrantubuli in Zellen in der Elektronenmikroskopie einen Durchmesser von etwa 50 nm hatten. Dieser Durchmesser ist (1.) deutlich größer als der Durchmesser von *in vitro* mit isoliertem Amphiphysin und künstlichen Membranen induzierten Tubuli, (2.) deutlich größer als die in elektronenmikroskopischen Aufnahmen an isoliertem sprühpräpariertem Amphiphysin und (3.) deutlich größer als der gedachte Kreis, den die konkave Seite der BAR-Domänenstruktur nahe legt. Welche Erklärung gibt es für diese Diskrepanz? Möglicherweise werden zusätzliche cytosolische Proteine der Zelle an die Membrantubuli rekrutiert, die einen anderen Tubulusdurchmesser verursachen. Diese Möglichkeit wird nahe gelegt durch jüngste Veröffentlichungen aus Untersuchungen der Arbeitsgruppe um DeCamilli (Itoh *et al.*, 2005). Itoh und Mitarbeiter untersuchten die Tubulierungsfähigkeit von BAR-Domänenproteinen und einer neuen Gruppe von Proteinen, welche sie F-BAR-Domänenproteine nannten, *in vitro* und *in vivo*. Sie fanden ebenfalls eine *in vitro* Tubulierungsaktivität bei Amphiphysin, allerdings nur nach Behandlung mit Latrunculin B, und sie fanden, dass unterschiedliche BAR-Domänenproteine mit unterschiedlichen Tubulidurchmessern korrelieren. Einschränkend muss man bei der Betrachtung einer etwaigen Rekrutierung eines anderen BAR-Domänenproteins durch Amphiphysin allerdings bedenken, dass die Zelle dieses Protein in einem stöchiometrischen Verhältnis zur Verfügung stellen müsste. Da Amphiphysin in meinen Experimenten überexprimiert wurde, ist diese

Variante eher unwahrscheinlich. Schließlich muss bei möglichen Erklärungen für die erwähnte Diskrepanz auch betrachtet werden, dass über unterschiedliche Lipidkompositionen der beiden Membranblätter die Membrankrümmung stark beeinflusst werden kann (Überblick in McMahon & Gallop, 2005). Für einen kleineren Durchmesser der tubulären Strukturen sprechen auch ältere morphologische Arbeiten, in denen Clathrin behüllte Gruben mit tubulären Strukturen mit einem Durchmesser von 17 nm assoziiert waren (Willingham & Pastan, 1983).

5.2.2 Ursprungskompartiment tubulärer Strukturen

Meine Befunde weisen darauf hin, dass es sich bei den Amphiphysin-haltigen Tubuli um Strukturen handelt, welche ihren Ursprung an der Plasmamembran haben. Hierfür gibt es mehrere Argumente: In Experimenten mit dem Lipidfarbstoff FM 4-64 wird dieser Farbstoff sehr schnell in das Membransystem der Zelle aufgenommen und fluoresziert in dieser Anordnung sehr stark. Während einer Phase von wenigen Minuten lässt sich auf diese Weise der zelleinwärts gerichtete Membranverkehr beobachten (nach kurzer Zeit sind dann die intrazellulären Membranen so mit dem Farbstoff gesättigt, dass keine einzelnen Strukturen mehr differenziert werden können). Es zeigte sich, dass während dieser initialen Phase eine Co-Lokalisation zwischen GFP-Amphiphysin-1 und Lipidmembran gebundenem FM 4-64 in tubulären Strukturen beobachtet werden kann. Für diesen Ursprung der Tubuli sprechen auch einige andere Beobachtungen: So konnte mit endosomalen und lysosomalen Markern keine Co-Lokalisation beobachtet werden. Selten wurde Co-Lokalisation von EEA1 und GFP-Amphiphysin beobachtet. Ein weiteres Indiz für die Plasmamembran als Ursprungsort der Tubuli ist die Tatsache, dass in videomikroskopischen Beobachtungen keinerlei Zusammenwirken zwischen Amphiphysin-1 und Sorting Nexin-1 bei der Bildung von Membrantubuli beobachtet wurde. Sorting Nexin-1 ist wie Amphiphysin ein BAR-Domänenprotein. Es bildet tubuläre Strukturen aus, welche für Transportprozesse zwischen Lysosomen und Trans-Golgi-Netzwerk verantwortlich sind (Carlton *et al.*, 2004).

5.2.3 Interaktion der Membrantubuli mit Clathrin

Die Interaktion zwischen Clathrin und Amphiphysin ist *in vitro* gut dokumentiert (Drake & Traub, 2001; Miele *et al.*, 2004). In dieser Arbeit konnten jedoch auf mikroskopischer Ebene nur Subpopulationen des Clathrins co-lokalisiert mit Amphiphysin beobachtet werden. In videomikroskopischen Beobachtungen lebender Zellen, welche sowohl intGFP-Amphiphysin-1 als auch RFP-Clathrin Leichte Kette überexprimierten konnte keinerlei Co-Lokalisation beobachtet werden. Auch die charakteristischen Strukturen die mit Amphiphysin mikroinjizierte Zellen unter dem Elektronenmikroskop aufwiesen deuten auf die Abwesenheit von Clathrin hin. In Experimenten mit fixierten Zellen war der Befund nicht eindeutig: Während in manchen Zellen bei Färbung mit Antikörper gegen die schwere Kette von Clathrin eine teilweise Co-Lokalisation mit Amphiphysin-1-Tubuli beobachtet werden konnte, war dies bei Immunfluoreszenzen mit einem Antikörper gegen leichte Kette kaum der Fall. Tatsächlich konnte ich nur gelegentlich eine leichte Co-Lokalisation der Spitzen Amphiphysin-haltiger Tubuli mit Clathrin positiven Punktäe beobachten. Es ist vorstellbar, dass manche der Tubuli an ihren Enden kappenartige Strukturen aufweisen, welche positiv für Clathrin reagieren. Wie ist die Diskrepanz zwischen den biochemischen und den mikroskopischen Ergebnissen zu erklären? Während man *in vitro* idealerweise die Interaktion zwischen zwei aufgereinigten Proteinen in etwa stöchiometrischem Verhältnis betrachtet, sind die Verhältnisse in lebenden Zellen wesentlich komplexer, da Proteinkonzentrationen ständig reguliert werden und sich räumlich und zeitlich um Größenordnungen unterscheiden können. Da im zuvor erwähnten Modell der Clathrin-vermittelten Endocytose Amphiphysin gewissermaßen als Scharnier zwischen Clathrin einerseits und Dynamin andererseits betrachtet wird, ist es denkbar, dass zu einem gegebenen Zeitpunkt nur sehr kleine Subpopulationen von Amphiphysin und Clathrin interagieren. Dies erklärt immer noch nicht die Diskrepanz zwischen den Effekten bei Verwendung unterschiedlicher Clathrin-Antikörper. Da die Epitope der verwendeten Clathrin-Antikörper sich an unterschiedlichen Stellen des Clathrintriskelions befinden, ist möglicherweise unter den speziellen räumlichen Verhältnissen eines Amphiphysin-assoziierten Membrantubulus nur eines dieser Epitope gut zugänglich.

5.2.4 Interaktion der Membrantubuli mit Dynamin

In fixierten intGFP-Amphiphysin-1-überexprimierenden Zellen in einer Immunfluoreszenz mit α -Dynamin-2-Antikörper sollte überprüft werden, ob Amphiphysin-Tubuli mit der ubiquitär exprimierten Dynamin-Isoform co-lokalisieren. Es konnte keinerlei Co-Lokalisation festgestellt werden. Es gibt in der Literatur zahlreiche Hinweise auf das Zusammenwirken von Amphiphysin und Dynamin (Yoshida *et al.*, 2004; Takei *et al.*, 2005). Man geht davon aus, dass im Prozess der Clathrin-vermittelten Endocytose Amphiphysin Dynamin an den Hals der knospenden Vesikel rekrutiert, wobei die Interaktionen mit Clathrin einerseits und Dynamin andererseits sich gegenseitig ausschließen (McMahon *et al.*, 1997). Möglicherweise handelt es sich bei der Bildung der tubulären Strukturen um Prozesse, die sich morphologisch stark von Clathrin-vermittelter Endocytose unterscheiden, so dass weder Clathrin noch Dynamin in diesen Tubuli eine prominente Rolle spielen. Auch ist denkbar, dass durch eine sehr dichte Bedeckung membranöser Tubuli eine Wechselwirkung mit Dynamin und/oder Clathrin erschwert wird und die Interaktion mit Amphiphysin alleine eine zu geringe Affinität aufweist. Im Widerspruch hierzu stehen allerdings die Befunde von Itoh und Kollegen, welche eine Interaktion von Amphiphysin und Dynamin bei der Bildung von Membrantubuli fanden (Itoh *et al.*, 2005).

5.2.5 Amphiphysin-1 und Amphiphysin-2 in tubulären Strukturen

In videomikroskopischen Aufnahmen lebender Zellen, welche mit Amphiphysin-1 und -2-Konstrukten co-transfiziert waren, konnte ich ein deutliches Zusammenwirken beider Proteine in tubulären Strukturen beobachten. Das Zusammenwirken beider Amphiphysin-Isoformen wird in der Literatur seit längerem diskutiert, bisher waren es jedoch vorwiegend *in vitro* Untersuchungen, welche diesen Schluss nahe legen (Ramjaun *et al.*, 1999; Di Paolo *et al.*, 2002; Friesen *et al.*, 2006). Insofern ist es interessant, ein direktes Zusammenwirken beider Proteine in Zellen zu beobachten. Auch wenn nur GFP-Amphiphysin-1 überexprimiert und gegen Amphiphysin-2 gefärbt wird, lässt sich eine deutliche Co-Lokalisation mit dem endogenen Amphiphysin-2 feststellen.

5.2.6 Amphiphysin-2 und Membrantubuli

Ich konnte beobachten, dass Amphiphysin 2 alleine ebenfalls in der Lage ist, in Zellen hochdynamische tubuläre Strukturen zu bilden. Dies ist insofern beachtenswert, als in der bisherigen Literatur Amphiphysin-2 bzw. *Drosophila*-Amphiphysin eine Rolle bei der Bildung tubulärer Strukturen in Zellen zugewiesen wurde (Butler *et al.*, 1997; Razzaq *et al.*, 2001). Auch scheint dieser Befund zu bestätigen, dass Clathrin für die beobachteten Tubulierungsprozesse von bestenfalls untergeordneter Bedeutung ist, weil dem von mir verwandten Amphiphysin-2-Konstrukt die Clathrinbindungsstellen fehlen.

5.2.7 Tubuli und Komponenten des Cytoskeletts

In Immunfluoreszenzexperimenten konnte keine Co-Lokalisation zwischen Mikrotubuli und Amphiphysin-Tubuli beobachtet werden. Anders waren die Befunde für Actinfilamente, hier konnte, insbesondere in der Zellperipherie, Co-Lokalisation beobachtet werden. Dieser und andere Befunde legen eine Verbindung zwischen Amphiphysin und dem Actincytoskelett nahe. Während der Anfertigung dieser Arbeit publizierten DeCamilli und Mitarbeiter eine Arbeit, in der sie ebenfalls die Bildung von Membrantubuli infolge von Amphiphysin-Überexpression zeigten. Allerdings verwendeten sie das N-terminal markierte GFP-Fusionsprotein, welches sich in meinen Experimenten als inaktiv erwiesen hatte. Dieses Fusionsprotein zeigte allerdings dann Tubulierungsaktivität, wenn die Zellen mit Latrunculin B behandelt wurden (Itoh *et al.*, 2005). Latrunculin ist ein Naturstoff aus einem marinen Schwamm und besitzt die Eigenschaft, Actinfilamente zu depolymerisieren. Diese Substanz führt bei Zellen, welche das Amphiphysin-1-Fusionsprotein mit interner GFP-Markierung exprimieren zu einer Verstärkung der Tubulierungsaktivität (Christian Hähnel, mündliche Mitteilung). Darüber hinaus haben weitere Autoren einen Zusammenhang zwischen Amphiphysin und der Regulation des Actincytoskeletts gefunden. So kann Amphiphysin über seine SH3-Domäne mit actinbindenden Proteinen interagieren. (Friesen *et al.*, 2006; Überblick in Ren *et al.*, 2006). In diesem Kontext ist auch der Befund zu betrachten, dass die Tubulierungsaktivität von GFP-Amphiphysin überexprimierenden Zellen durch Behandlung mit dem CK-2-Inhibitor TBB stark

zunahm. Diese Zunahme kann nicht über die zuvor diskutierte Phosphorylierung von Amphiphysin-1 an den Threoninresten 350 und 387 erklärt werden, da die T350A-T387-A und T350E-T387E-Mutanten von GFP-Amphiphysin die gleiche Tubulierungsaktivität aufwiesen wie das Wildtyp-Protein (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise besteht auch hier ein Zusammenhang mit der Regulation des Actincytoskeletts. In der Literatur existieren zahlreiche Hinweise auf Interaktionen zwischen CK-2 und Actin. Beispielsweise kann das Protein WASP durch CK-2 phosphoryliert werden, wodurch sich seine Affinität zum Arp2/3-Komplex erhöht und die Actin-Polymerisation begünstigt wird (Cory *et al.*, 2003).

5.2.8 Mögliche physiologische Bedeutung Amphiphysin-assoziiierter tubulärer Strukturen

Was ist also die physiologische Bedeutung dieser Membrantubuli? Hier sind mehrere Szenarien denkbar: 1. Möglicherweise handelt es sich bei den beobachteten Strukturen um eine Übersteigerung der Funktion von Amphiphysin in der Clathrin-vermittelten Endocytose. Durch das große Überangebot an Amphiphysin in transfizierten oder mikroinjizierten Zellen ist es vorstellbar, dass die normalerweise nur transiente Wechselwirkung des Amphiphysins mit dem Hals des knospenden Vesikels übergeht in eine Sättigung dieser Struktur mit Amphiphysin. Dynamin, dem im gegenwärtigen Modell die Funktion eines Mechanoenzym bei der Abtrennung des knospenden Vesikels zukommt, könnte so nicht mehr an seinen Wirkungsort gelangen. Die Konsequenz wäre eine immer tiefere Einbuchtung des knospenden Vesikels und eine weitere Bedeckung der sich bildenden tubulären Struktur mit Amphiphysin. Diese Erklärung wäre im Einklang mit den gelegentlich beobachteten „Clathrinkappen“ an Amphiphysin-Tubuli. Gegen dieses Erklärungsmodell sprechen verschiedene Einwände: Einerseits wurde diese *in vivo* Tubulierungsaktivität auch bei anderen BAR-Domänen-Proteinen beobachtet, welche nicht mit Clathrin-vermittelter Endocytose in Verbindung gebracht werden (Itoh *et al.*, 2005; Tsujita *et al.*, 2006). Andererseits konnte ich diese Tubulierungsaktivität auch bei einer Amphiphysin-2-Isoform beobachten, welche keine AP-2 und Clathrin-Interaktionsmotive enthält und deshalb nicht unbedingt spezifisch an den Hals knospender Clathrin bedeckter Vesikel rekrutiert wird. Eine Rekrutierung durch Dimerisierung mit endogenem Amphiphysin-

1 erscheint aufgrund stöchiometrischer Überlegungen unwahrscheinlich. 2. Möglicherweise handelt es sich bei den Amphiphysin-assoziierten Membrantubuli aber auch um eine physiologische Struktur. Es ist vorstellbar, dass es sich bei den beobachteten Tubuli um den Bestandteil eines Clathrin unabhängigen endocytotischen Prozesses handelt. Hierfür spricht die Tatsache, dass es bei einem gewissen Anteil der Membrantubuli zur Abknospung kommt, wobei also letzten Endes auch Vesikel in das Cytosol entlassen würden. Außerdem konnte in Transferrin-Aufnahmeexperimenten manchmal eine Co-Lokalisation der Membrantubulispitzen mit Transferrin beobachtet werden. Dynamin, welches ebenfalls in der Lage ist, Membranen zu tubulieren, wurde in jüngster Zeit auch verstärkt mit Clathrin-unabhängiger Endocytose in Zusammenhang gebracht (Übersicht in Praefcke & McMahon, 2004). In diesem Kontext erwähnenswert ist auch das Konzept des „Rezeptosoms“ welches von Pastan in den frühen Achtzigern diskutiert wurde (Willingham & Pastan, 1983). Dieses Modell geht davon aus, dass Clathrin-bedeckte Vesikel tatsächlich gar nicht in das Cytosol abgeschnürt werden, sondern über membranöse Stiele mit der Plasmamembran in Verbindung bleiben. Die Fracht des Vesikels, z.B. ein aktivierter Rezeptor, könnte dann durch teilweise Fusion mit endosomalen Kompartimenten übernommen werden, worauf sich die tubuläre Struktur wieder zur Zelloberfläche zurückzieht und der Prozess von neuem beginnt. Für diese These spricht meine Beobachtung, dass viele Amphiphysin-assoziierte Tubuli oszillieren, sich also über einen längeren Zeitraum Wachstums- und Schrumpfungsprozesse abwechseln. Außerdem konnte bei einer kleinen Subpopulation der Membrantubuli in fixierten Zellen eine punktuelle Co-Lokalisation mit EEA1 beobachtet werden, was mit dem geschilderten Übernahmemechanismus konform wäre. 3. Schließlich muss auch berücksichtigt werden, dass Amphiphysin als Bestandteil statischer tubulärer Strukturen in Zellen, die nicht mit endocytotischen Prozessen assoziiert sind, seit längerem diskutiert wird. Bereits erwähnt wurden die Arbeiten von Razzaq und Mitarbeitern über die Funktion des *Drosophila*-Amphiphysin bei der Bildung transversaler Tubuli in der Flugmuskulatur dieser Insekten sowie die Erkenntnisse zur Bedeutung von Amphiphysin-2 für die Bildung transversaler Tubuli in der Herzmuskulatur von Mäusen. Jüngste Untersuchungen an Dünnschnitten zeigen, dass tubuläre Strukturen im distalen Tubulus der Niere große morphologische Ähnlichkeit

zu den von mir beobachteten Tubuli aufweisen und darüber hinaus in der Immunfluoreszenz stark positiv für Amphiphysin-2 reagieren (Dr. S. Groos, mündliche Mitteilung). In diesem Zusammenhang erwähnenswert ist auch der Befund, dass Amphiphysin-assoziierte Membrantubuli in Zellen, die mit CK-2-Inhibitoren behandelt wurden, nicht nur sehr viel zahlreicher sind als in unbehandelten Zellen, sondern nach etwa 30 min jede Dynamik einbüßen und in einen statischen Zustand übergehen.

Schließlich ist es auch denkbar, dass alle drei geschilderten Prozesse nebeneinander stattfinden. Dies erscheint plausibel, da die beobachteten Membrantubuli eine recht heterogene Morphologie aufweisen. So existieren neben sehr dynamischen, langen Strukturen solche von kurzer oder fast punktförmiger Gestalt, neben geraden Tubuli gibt es gebogene Strukturen, und zahlreichen Tubuli mit stationärem Ausgangspunkt stehen solche gegenüber, deren beide Enden eine hohe Dynamik aufweisen.

5.3 Schlussbetrachtung

Im Kontext der Literatur der letzten Jahre leisten meine Ergebnisse einen Beitrag zur Aufklärung des komplexen Phosphorylierungsmusters von Amphiphysin. Es wird immer deutlicher, dass die Phosphorylierung von Amphiphysin ein sehr komplexer Vorgang ist, an dem eine Vielzahl von Kinasen beteiligt ist und bei dem die Interaktion mit verschiedenen Bindungspartnern sehr differenziert reguliert wird. Gleichmaßen tragen meine Befunde zur Aufklärung eines Aspektes der Amphiphysin-Funktion bei, der in jüngster Zeit mehr und mehr in den Fokus des Interesses gelangt ist, nämlich die direkte Interaktion von Amphiphysin mit zellulären Membranen. Hier sind in den nächsten Jahren viele weitere aufregende Erkenntnisse zu erwarten.

6 Literatur

- Acton, S. L., and Brodsky, F. M. (1990). Predominance of clathrin light chain LCb correlates with the presence of a regulated secretory pathway. *J Cell Biol* *111*, 1419-1426.
- Aderem, A., and Underhill, D. M. (1999). Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* *17*, 593-623.
- Ahle, S., and Ungewickell, E. (1990). Auxilin, a newly identified clathrin-associated protein in coated vesicles from bovine brain. *J Cell Biol* *111*, 19-29.
- Allen, R. D., and Fok, A. K. (2000). Membrane trafficking and processing in *Paramecium*. *Int Rev Cytol* *198*, 277-318.
- Antoine, J. C., Absi, L., Honnorat, J., Boulesteix, J. M., de Brouker, T., Vial, C., Butler, M., De Camilli, P., and Michel, D. (1999). Anti-amphiphysin antibodies are associated with various paraneoplastic neurological syndromes and tumors. *Arch Neurol* *56*, 172-177.
- Antoine, J. C., and Honnorat, J. (2000). [Anti-neuronal antibodies and central nervous system diseases: contribution to diagnosis and pathophysiology]. *Rev Neurol (Paris)* *156*, 23-33.
- Augustine, G. J., Morgan, J. R., Villalba-Galea, C. A., Jin, S., Prasad, K., and Lafer, E. M. (2006). Clathrin and synaptic vesicle endocytosis: studies at the squid giant synapse. *Biochem Soc Trans* *34*, 68-72.
- Barbieri, M. A., Heath, C. M., Peters, E. M., Wells, A., Davis, J. N., and Stahl, P. D. (2001). Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase-1beta is essential for epidermal growth factor receptor-mediated endocytosis. *J Biol Chem* *276*, 47212-47216.
- Bauerfeind, R., Takei, K., and De Camilli, P. (1997). Amphiphysin I is associated with coated endocytic intermediates and undergoes stimulation-dependent dephosphorylation in nerve terminals. *J Biol Chem* *272*, 30984-30992.
- Beattie, E. C., Howe, C. L., Wilde, A., Brodsky, F. M., and Mobley, W. C. (2000). NGF signals through TrkA to increase clathrin at the plasma membrane and enhance clathrin-mediated membrane trafficking. *J Neurosci* *20*, 7325-7333.
- Benmerah, A., Gagnon, J., Begue, B., Megarbane, B., Dautry-Varsat, A., and Cerf-Bensussan, N. (1995). The tyrosine kinase substrate eps15 is constitutively associated with the plasma membrane adaptor AP-2. *J Cell Biol* *131*, 1831-1838.
- Blanquet, P. R. (1998). Neurotrophin-induced activation of casein kinase 2 in rat hippocampal slices. *Neuroscience* *86*, 739-749.
- Blanquet, P. R. (2000). Identification of two persistently activated neurotrophin-regulated pathways in rat hippocampus. *Neuroscience* *95*, 705-719.
- Bradshaw, J. D., Lu, P., Leytze, G., Rodgers, J., Schieven, G. L., Bennett, K. L., Linsley, P. S., and Kurtz, S. E. (1997). Interaction of the cytoplasmic tail of CTLA-4 (CD152) with a clathrin-associated protein is negatively regulated by tyrosine phosphorylation. *Biochemistry* *36*, 15975-15982.
- Brodsky, F. M., Chen, C. Y., Knuehl, C., Towler, M. C., and Wakeham, D. E. (2001). Biological basket weaving: formation and function of clathrin-coated vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol* *17*, 517-568.

- Butler, M. H., David, C., Ochoa, G. C., Freyberg, Z., Daniell, L., Grabs, D., Cremona, O., and De Camilli, P. (1997). Amphiphysin II (SH3P9; BIN1), a member of the amphiphysin/Rvs family, is concentrated in the cortical cytomatrix of axon initial segments and nodes of ranvier in brain and around T tubules in skeletal muscle. *J Cell Biol* 137, 1355-1367.
- Carlton, J., Bujny, M., Peter, B. J., Oorschot, V. M., Rutherford, A., Mellor, H., Klumperman, J., McMahon, H. T., and Cullen, P. J. (2004). Sorting nexin-1 mediates tubular endosome-to-TGN transport through coincidence sensing of high- curvature membranes and 3-phosphoinositides. *Curr Biol* 14, 1791-1800.
- Cestra, G., Castagnoli, L., Dente, L., Minenkova, O., Petrelli, A., Migone, N., Hoffmuller, U., Schneider-Mergener, J., and Cesareni, G. (1999). The SH3 domains of endophilin and amphiphysin bind to the proline-rich region of synaptojanin 1 at distinct sites that display an unconventional binding specificity. *J Biol Chem* 274, 32001-32007.
- Chang, R. S. (1954). Continuous subcultivation of epithelial-like cells from normal human tissues. *Proc Soc Exp Biol Med* 87, 440-443.
- Chen, H., Fre, S., Slepnev, V. I., Capua, M. R., Takei, K., Butler, M. H., Di Fiore, P. P., and De Camilli, P. (1998). Epsin is an EH-domain-binding protein implicated in clathrin-mediated endocytosis. *Nature* 394, 793-797.
- Chen, H., Slepnev, V. I., Di Fiore, P. P., and De Camilli, P. (1999). The interaction of epsin and Eps15 with the clathrin adaptor AP-2 is inhibited by mitotic phosphorylation and enhanced by stimulation-dependent dephosphorylation in nerve terminals. *J Biol Chem* 274, 3257-3260.
- Chu, D. S., Pishvae, B., and Payne, G. S. (1999). A modulatory role for clathrin light chain phosphorylation in Golgi membrane protein localization during vegetative growth and during the mating response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 10, 713-726.
- Coda, L., Salcini, A. E., Confalonieri, S., Pelicci, G., Sorkina, T., Sorkin, A., Pelicci, P. G., and Di Fiore, P. P. (1998). Eps15R is a tyrosine kinase substrate with characteristics of a docking protein possibly involved in coated pits-mediated internalization. *J Biol Chem* 273, 3003-3012.
- Conner, S. D., and Schmid, S. L. (2002). Identification of an adaptor-associated kinase, AAK1, as a regulator of clathrin-mediated endocytosis. *J Cell Biol* 156, 921-929.
- Conner, S. D., and Schmid, S. L. (2003). Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 422, 37-44.
- Cory, G. O., Cramer, R., Blanchoin, L., and Ridley, A. J. (2003). Phosphorylation of the WASP-VCA domain increases its affinity for the Arp2/3 complex and enhances actin polymerization by WASP. *Mol Cell* 11, 1229-1239.
- Cousin, M. A., Tan, T. C., and Robinson, P. J. (2001). Protein phosphorylation is required for endocytosis in nerve terminals: potential role for the dephosphins dynamin I and synaptojanin, but not AP180 or amphiphysin. *J Neurochem* 76, 105-116.
- Cremona, O., Di Paolo, G., Wenk, M. R., Luthi, A., Kim, W. T., Takei, K., Daniell, L., Nemoto, Y., Shears, S. B., Flavell, R. A., McCormick, D. A., and De Camilli, P. (1999). Essential role of phosphoinositide metabolism in synaptic vesicle recycling. *Cell* 99, 179-188.

- Cullen, P. J., Cozier, G. E., Banting, G., and Mellor, H. (2001). Modular phosphoinositide-binding domains--their role in signalling and membrane trafficking. *Curr Biol* 11, R882-893.
- David, C., McPherson, P. S., Mundigl, O., and de Camilli, P. (1996). A role of amphiphysin in synaptic vesicle endocytosis suggested by its binding to dynamin in nerve terminals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 331-335.
- David, C., Solimena, M., and De Camilli, P. (1994). Autoimmunity in stiff-Man syndrome with breast cancer is targeted to the C-terminal region of human amphiphysin, a protein similar to the yeast proteins, Rvs167 and Rvs161. *FEBS Lett* 351, 73-79.
- De Camilli, P., Thomas, A., Cofield, R., Folli, F., Lichte, B., Piccolo, G., Meinck, H. M., Austoni, M., Fassetta, G., Bottazzo, G., and et al. (1993). The synaptic vesicle-associated protein amphiphysin is the 128-kD autoantigen of Stiff-Man syndrome with breast cancer. *J Exp Med* 178, 2219-2223.
- de Heuvel, E., Bell, A. W., Ramjaun, A. R., Wong, K., Sossin, W. S., and McPherson, P. S. (1997). Identification of the major synaptojanin-binding proteins in brain. *J Biol Chem* 272, 8710-8716.
- Di Paolo, G., Sankaranarayanan, S., Wenk, M. R., Daniell, L., Perucco, E., Caldarone, B. J., Flavell, R., Picciotto, M. R., Ryan, T. A., Cremona, O., and De Camilli, P. (2002). Decreased synaptic vesicle recycling efficiency and cognitive deficits in amphiphysin 1 knockout mice. *Neuron* 33, 789-804.
- Dietrich, J., Kastrop, J., Nielsen, B. L., Odum, N., and Geisler, C. (1997). Regulation and function of the CD3gamma DxxxLL motif: a binding site for adaptor protein-1 and adaptor protein-2 in vitro. *J Cell Biol* 138, 271-281.
- Drake, M. T., Downs, M. A., and Traub, L. M. (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, 6479-6489.
- Drake, M. T., and Traub, L. M. (2001). Interaction of two structurally distinct sequence types with the clathrin terminal domain beta-propeller. *J Biol Chem* 276, 28700-28709.
- Dreyling, M. H., Martinez-Climent, J. A., Zheng, M., Mao, J., Rowley, J. D., and Bohlander, S. K. (1996). The t(10;11)(p13;q14) in the U937 cell line results in the fusion of the AF10 gene and CALM, encoding a new member of the AP-3 clathrin assembly protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 4804-4809.
- Fazioli, F., Minichiello, L., Matoskova, B., Wong, W. T., and Di Fiore, P. P. (1993). eps15, a novel tyrosine kinase substrate, exhibits transforming activity. *Mol Cell Biol* 13, 5814-5828.
- Floyd, S., Butler, M. H., Cremona, O., David, C., Freyberg, Z., Zhang, X., Solimena, M., Tokunaga, A., Ishizu, H., Tsutsui, K., and De Camilli, P. (1998). Expression of amphiphysin I, an autoantigen of paraneoplastic neurological syndromes, in breast cancer. *Mol Med* 4, 29-39.
- Floyd, S. R., Porro, E. B., Slepnev, V. I., Ochoa, G. C., Tsai, L. H., and De Camilli, P. (2001). Amphiphysin 1 binds the cyclin-dependent kinase (cdk) 5 regulatory subunit p35 and is phosphorylated by cdk5 and cdc2. *J Biol Chem* 276, 8104-8110.
- Friesen, H., Humphries, C., Ho, Y., Schub, O., Colwill, K., and Andrews, B. (2006). Characterization of the Yeast Amphiphysins Rvs161 and Rvs167 Reveals Roles for the Rvs Heterodimer In Vivo. *Mol Biol Cell*.

- Frolov, V. A. (1985). I. I. Mechnikoff's contribution to immunology. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol* 29, 185-191.
- Galli, T., and Haucke, V. (2004). Cycling of synaptic vesicles: how far? How fast! *Sci STKE* 2004, re19.
- Gallusser, A., and Kirchhausen, T. (1993). The beta 1 and beta 2 subunits of the AP complexes are the clathrin coat assembly components. *Embo J* 12, 5237-5244.
- Ge, K., and Prendergast, G. C. (2000). Bin2, a functionally nonredundant member of the BAR adaptor gene family. *Genomics* 67, 210-220.
- Gilboa, L., Ben-Levy, R., Yarden, Y., and Henis, Y. I. (1995). Roles for a cytoplasmic tyrosine and tyrosine kinase activity in the interactions of Neu receptors with coated pits. *J Biol Chem* 270, 7061-7067.
- Gluzman, Y. (1981). SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* 23, 175-182.
- Grabs, D., Slepnev, V. I., Songyang, Z., David, C., Lynch, M., Cantley, L. C., and De Camilli, P. (1997). The SH3 domain of amphiphysin binds the proline-rich domain of dynamin at a single site that defines a new SH3 binding consensus sequence. *J Biol Chem* 272, 13419-13425.
- Greenberg, S. (1999). Modular components of phagocytosis. *J Leukoc Biol* 66, 712-717.
- Greene, L. A., and Tischler, A. S. (1976). Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73, 2424-2428.
- Hao, W., Luo, Z., Zheng, L., Prasad, K., and Lafer, E. M. (1999). AP180 and AP-2 interact directly in a complex that cooperatively assembles clathrin. *J Biol Chem* 274, 22785-22794.
- Harding, C., Heuser, J., and Stahl, P. (1983). Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J Cell Biol* 97, 329-339.
- Heuser, J. E., and Keen, J. (1988). Deep-etch visualization of proteins involved in clathrin assembly. *J Cell Biol* 107, 877-886.
- Hildesheim, J., Salvador, J. M., Hollander, M. C., and Fornace, A. J., Jr. (2005). Casein kinase 2- and protein kinase A-regulated adenomatous polyposis coli and beta-catenin cellular localization is dependent on p38 MAPK. *J Biol Chem* 280, 17221-17226.
- Hill, B. L., Drickamer, K., Brodsky, F. M., and Parham, P. (1988). Identification of the phosphorylation sites of clathrin light chain LCb. *J Biol Chem* 263, 5499-5501.
- Hosoya, O., and Tsutsui, K. (2004). Localized expression of amphiphysin Ir, a retina-specific variant of amphiphysin I, in the ribbon synapse and its functional implication. *Eur J Neurosci* 19, 2179-2187.
- Howe, C. L., and Mobley, W. C. (2005). Long-distance retrograde neurotrophic signaling. *Curr Opin Neurobiol* 15, 40-48.
- Hussain, M. M. (2001). Structural, biochemical and signaling properties of the low-density lipoprotein receptor gene family. *Front Biosci* 6, D417-428.
- Hussain, N. K., Yamabhai, M., Ramjaun, A. R., Guy, A. M., Baranes, D., O'Bryan, J. P., Der, C. J., Kay, B. K., and McPherson, P. S. (1999). Splice variants of intersectin are components of the endocytic machinery in neurons and nonneuronal cells. *J Biol Chem* 274, 15671-15677.

- Iannolo, G., Salcini, A. E., Gaidarov, I., Goodman, O. B., Jr., Baulida, J., Carpenter, G., Pelicci, P. G., Di Fiore, P. P., and Keen, J. H. (1997). Mapping of the molecular determinants involved in the interaction between eps15 and AP-2. *Cancer Res* 57, 240-245.
- Itoh, T., Erdmann, K. S., Roux, A., Habermann, B., Werner, H., and De Camilli, P. (2005). Dynamin and the actin cytoskeleton cooperatively regulate plasma membrane invagination by BAR and F-BAR proteins. *Dev Cell* 9, 791-804.
- Itoh, T., and Takenawa, T. (2004). Regulation of endocytosis by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and ENTH proteins. *Curr Top Microbiol Immunol* 282, 31-47.
- Kalthoff, C., Alves, J., Urbanke, C., Knorr, R., and Ungewickell, E. J. (2002). Unusual structural organization of the endocytic proteins AP180 and epsin 1. *J Biol Chem* 277, 8209-8216.
- Kanaoka, Y., Kimura, S. H., Okazaki, I., Ikeda, M., and Nojima, H. (1997). GAK: a cyclin G associated kinase contains a tensin/auxilin-like domain. *FEBS Lett* 402, 73-80.
- Kirchhausen, T. (1999). Adaptors for clathrin-mediated traffic. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15, 705-732.
- Kirchhausen, T., and Harrison, S. C. (1984). Structural domains of clathrin heavy chains. *J Cell Biol* 99, 1725-1734.
- Kirchhausen, T., Harrison, S. C., Chow, E. P., Mattaliano, R. J., Ramachandran, K. L., Smart, J., and Brosius, J. (1987a). Clathrin heavy chain: molecular cloning and complete primary structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 8805-8809.
- Kirchhausen, T., Scarmato, P., Harrison, S. C., Monroe, J. J., Chow, E. P., Mattaliano, R. J., Ramachandran, K. L., Smart, J. E., Ahn, A. H., and Brosius, J. (1987b). Clathrin light chains LCA and LCB are similar, polymorphic, and share repeated heptad motifs. *Science* 236, 320-324.
- Kleijn, M., Welsh, G. I., Scheper, G. C., Voorma, H. O., Proud, C. G., and Thomas, A. A. (1998). Nerve and epidermal growth factor induce protein synthesis and eIF2B activation in PC12 cells. *J Biol Chem* 273, 5536-5541.
- Koo, Y. J., Kim, S. J., Jeon, S. H., Kim, S. R., Kang, U. G., Park, J. B., and Kim, Y. S. (2002). Electroconvulsive shock increases the phosphorylation of amphiphysin II in the rat cerebellum. *Neurosci Lett* 330, 135-138.
- Kusner, L., and Carlin, C. (2003). Potential role for a novel AP180-related protein during endocytosis in MDCK cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 285, C995-1008.
- Lai, M. M., Luo, H. R., Burnett, P. E., Hong, J. J., and Snyder, S. H. (2000). The calcineurin-binding protein cain is a negative regulator of synaptic vesicle endocytosis. *J Biol Chem* 275, 34017-34020.
- Laux, T., Fukami, K., Thelen, M., Golub, T., Frey, D., and Caroni, P. (2000). GAP43, MARCKS, and CAP23 modulate PI(4,5)P(2) at plasmalemmal rafts, and regulate cell cortex actin dynamics through a common mechanism. *J Cell Biol* 149, 1455-1472.
- Le Roy, C., and Wrana, J. L. (2005). Clathrin- and non-clathrin-mediated endocytic regulation of cell signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 112-126.
- Lee, E., Marcucci, M., Daniell, L., Pypaert, M., Weisz, O. A., Ochoa, G. C., Farsad, K., Wenk, M. R., and De Camilli, P. (2002). Amphiphysin 2 (Bin1) and T-tubule biogenesis in muscle. *Science* 297, 1193-1196.
- Lee, M. C., and Schekman, R. (2004). Cell biology. BAR domains go on a bender. *Science* 303, 479-480.

- Legendre-Guillemain, V., Wasiak, S., Hussain, N. K., Angers, A., and McPherson, P. S. (2004). ENTH/ANTH proteins and clathrin-mediated membrane budding. *J Cell Sci* *117*, 9-18.
- Leprince, C., Romero, F., Cussac, D., Vayssiere, B., Berger, R., Tavitian, A., and Camonis, J. H. (1997). A new member of the amphiphysin family connecting endocytosis and signal transduction pathways. *J Biol Chem* *272*, 15101-15105.
- Leventis, P. A., Chow, B. M., Stewart, B. A., Iyengar, B., Campos, A. R., and Boulianne, G. L. (2001). Drosophila Amphiphysin is a post-synaptic protein required for normal locomotion but not endocytosis. *Traffic* *2*, 839-850.
- Lichte, B., Veh, R. W., Meyer, H. E., and Kilimann, M. W. (1992). Amphiphysin, a novel protein associated with synaptic vesicles. *Embo J* *11*, 2521-2530.
- Lim, A. C., Hou, Z., Goh, C. P., and Qi, R. Z. (2004). Protein kinase CK2 is an inhibitor of the neuronal Cdk5 kinase. *J Biol Chem* *279*, 46668-46673.
- Lindner, R., and Ungewickell, E. (1992). Clathrin-associated proteins of bovine brain coated vesicles. An analysis of their number and assembly-promoting activity. *J Biol Chem* *267*, 16567-16573.
- Liu, S. H., Wong, M. L., Craik, C. S., and Brodsky, F. M. (1995). Regulation of clathrin assembly and trimerization defined using recombinant triskelion hubs. *Cell* *83*, 257-267.
- Lombardi, R., and Riezman, H. (2001). Rvs161p and Rvs167p, the two yeast amphiphysin homologs, function together in vivo. *J Biol Chem* *276*, 6016-6022.
- Marks, B., and McMahon, H. T. (1998). Calcium triggers calcineurin-dependent synaptic vesicle recycling in mammalian nerve terminals. *Curr Biol* *8*, 740-749.
- Martina, J. A., Bonangelino, C. J., Aguilar, R. C., and Bonifacino, J. S. (2001). Stonin 2: an adaptor-like protein that interacts with components of the endocytic machinery. *J Cell Biol* *153*, 1111-1120.
- McLaughlin, S., and Murray, D. (2005). Plasma membrane phosphoinositide organization by protein electrostatics. *Nature* *438*, 605-611.
- McMahon, H. T. (1999). Endocytosis: an assembly protein for clathrin cages. *Curr Biol* *9*, R332-335.
- McMahon, H. T., and Gallop, J. L. (2005). Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling. *Nature* *438*, 590-596.
- McMahon, H. T., and Mills, I. G. (2004). COP and clathrin-coated vesicle budding: different pathways, common approaches. *Curr Opin Cell Biol* *16*, 379-391.
- McMahon, H. T., Wigge, P., and Smith, C. (1997). Clathrin interacts specifically with amphiphysin and is displaced by dynamin. *FEBS Lett* *413*, 319-322.
- McPherson, P. S., Garcia, E. P., Slepnev, V. I., David, C., Zhang, X., Grabs, D., Sossin, W. S., Bauerfeind, R., Nemoto, Y., and De Camilli, P. (1996). A presynaptic inositol-5-phosphatase. *Nature* *379*, 353-357.
- McPherson, P. S., Takei, K., Schmid, S. L., and De Camilli, P. (1994). p145, a major Grb2-binding protein in brain, is co-localized with dynamin in nerve terminals where it undergoes activity-dependent dephosphorylation. *J Biol Chem* *269*, 30132-30139.
- Mellman, I. (1996). Endocytosis and molecular sorting. *Annu Rev Cell Dev Biol* *12*, 575-625.
- Meyerholz, A., Hinrichsen, L., Groos, S., Esk, P. C., Brandes, G., and Ungewickell, E. J. (2005). Effect of clathrin assembly lymphoid myeloid leukemia protein depletion on clathrin coat formation. *Traffic* *6*, 1225-1234.

- Micheva, K. D., Kay, B. K., and McPherson, P. S. (1997a). Synaptojanin forms two separate complexes in the nerve terminal. Interactions with endophilin and amphiphysin. *J Biol Chem* *272*, 27239-27245.
- Micheva, K. D., Ramjaun, A. R., Kay, B. K., and McPherson, P. S. (1997b). SH3 domain-dependent interactions of endophilin with amphiphysin. *FEBS Lett* *414*, 308-312.
- Miele, A. E., Watson, P. J., Evans, P. R., Traub, L. M., and Owen, D. J. (2004). Two distinct interaction motifs in amphiphysin bind two independent sites on the clathrin terminal domain beta-propeller. *Nat Struct Mol Biol* *11*, 242-248.
- Modregger, J., DiProspero, N. A., Charles, V., Tagle, D. A., and Plomann, M. (2002). PACSIN 1 interacts with huntingtin and is absent from synaptic varicosities in presymptomatic Huntington's disease brains. *Hum Mol Genet* *11*, 2547-2558.
- Morgan, J. R., Prasad, K., Hao, W., Augustine, G. J., and Lafer, E. M. (2000). A conserved clathrin assembly motif essential for synaptic vesicle endocytosis. *J Neurosci* *20*, 8667-8676.
- Muller, A. J., Baker, J. F., DuHadaway, J. B., Ge, K., Farmer, G., Donover, P. S., Meade, R., Reid, C., Grzanna, R., Roach, A. H., Shah, N., Soler, A. P., and Prendergast, G. C. (2003). Targeted disruption of the murine Bin1/Amphiphysin II gene does not disable endocytosis but results in embryonic cardiomyopathy with aberrant myofibril formation. *Mol Cell Biol* *23*, 4295-4306.
- Murinson, B. B. (2004). Stiff-person syndrome. *Neurologist* *10*, 131-137.
- Musacchio, A., Smith, C. J., Roseman, A. M., Harrison, S. C., Kirchhausen, T., and Pearse, B. M. (1999). Functional organization of clathrin in coats: combining electron cryomicroscopy and X-ray crystallography. *Mol Cell* *3*, 761-770.
- Nemoto, Y., Arribas, M., Haffner, C., and DeCamilli, P. (1997). Synaptojanin 2, a novel synaptojanin isoform with a distinct targeting domain and expression pattern. *J Biol Chem* *272*, 30817-30821.
- Nesterov, A., Kurten, R. C., and Gill, G. N. (1995). Association of epidermal growth factor receptors with coated pit adaptins via a tyrosine phosphorylation-regulated mechanism. *J Biol Chem* *270*, 6320-6327.
- Ohno, H., Stewart, J., Fournier, M. C., Bosshart, H., Rhee, I., Miyatake, S., Saito, T., Gallusser, A., Kirchhausen, T., and Bonifacino, J. S. (1995). Interaction of tyrosine-based sorting signals with clathrin-associated proteins. *Science* *269*, 1872-1875.
- Olusanya, O., Andrews, P. D., Swedlow, J. R., and Smythe, E. (2001). Phosphorylation of threonine 156 of the mu2 subunit of the AP2 complex is essential for endocytosis in vitro and in vivo. *Curr Biol* *11*, 896-900.
- Owen, D. J., Vallis, Y., Noble, M. E., Hunter, J. B., Dafforn, T. R., Evans, P. R., and McMahon, H. T. (1999). A structural explanation for the binding of multiple ligands by the alpha-adaptin appendage domain. *Cell* *97*, 805-815.
- Pearse, B. M. (1976). Clathrin: a unique protein associated with intracellular transfer of membrane by coated vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* *73*, 1255-1259.
- Pelkmans, L., and Helenius, A. (2002). Endocytosis via caveolae. *Traffic* *3*, 311-320.
- Peter, B. J., Kent, H. M., Mills, I. G., Vallis, Y., Butler, P. J., Evans, P. R., and McMahon, H. T. (2004). BAR domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin BAR structure. *Science* *303*, 495-499.
- Praefcke, G. J., and McMahon, H. T. (2004). The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nat Rev Mol Cell Biol* *5*, 133-147.

- Qualmann, B., Roos, J., DiGregorio, P. J., and Kelly, R. B. (1999). Syndapin I, a synaptic dynamin-binding protein that associates with the neural Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Mol Biol Cell* *10*, 501-513.
- Ramjaun, A. R., Micheva, K. D., Bouchelet, I., and McPherson, P. S. (1997). Identification and characterization of a nerve terminal-enriched amphiphysin isoform. *J Biol Chem* *272*, 16700-16706.
- Ramjaun, A. R., Philie, J., de Heuvel, E., and McPherson, P. S. (1999). The N terminus of amphiphysin II mediates dimerization and plasma membrane targeting. *J Biol Chem* *274*, 19785-19791.
- Razzaq, A., Robinson, I. M., McMahon, H. T., Skepper, J. N., Su, Y., Zehhof, A. C., Jackson, A. P., Gay, N. J., and O'Kane, C. J. (2001). Amphiphysin is necessary for organization of the excitation-contraction coupling machinery of muscles, but not for synaptic vesicle endocytosis in *Drosophila*. *Genes Dev* *15*, 2967-2979.
- Ren, G., Vajjhala, P., Lee, J. S., Winsor, B., and Munn, A. L. (2006). The BAR domain proteins: molding membranes in fission, fusion, and phagy. *Microbiol Mol Biol Rev* *70*, 37-120.
- Reynolds, E. S. (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* *17*, 208-212.
- Ricotta, D., Conner, S. D., Schmid, S. L., von Figura, K., and Honing, S. (2002). Phosphorylation of the AP2 mu subunit by AAK1 mediates high affinity binding to membrane protein sorting signals. *J Cell Biol* *156*, 791-795.
- Ridley, A. J. (2001). Rho proteins, PI 3-kinases, and monocyte/macrophage motility. *FEBS Lett* *498*, 168-171.
- Robinson, M. S., and Bonifacino, J. S. (2001). Adaptor-related proteins. *Curr Opin Cell Biol* *13*, 444-453.
- Robinson, P. J., Sontag, J. M., Liu, J. P., Fykse, E. M., Slaughter, C., McMahon, H., and Sudhof, T. C. (1993). Dynamin GTPase regulated by protein kinase C phosphorylation in nerve terminals. *Nature* *365*, 163-166.
- Rosales, J. L., Nodwell, M. J., Johnston, R. N., and Lee, K. Y. (2000). Cdk5/p25(nck5a) interaction with synaptic proteins in bovine brain. *J Cell Biochem* *78*, 151-159.
- Roth, T. F., and Porter, K. R. (1964). Yolk Protein Uptake in the Oocyte of the Mosquito *Aedes Aegypti*. *J Cell Biol* *20*, 313-332.
- Sakamuro, D., Elliott, K. J., Wechsler-Reya, R., and Prendergast, G. C. (1996). BIN1 is a novel MYC-interacting protein with features of a tumour suppressor. *Nat Genet* *14*, 69-77.
- Sambrook J., F. E. F., Maniatis T. (1998). *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Schmierer, K., Valdueza, J. M., Bender, A., DeCamilli, P., David, C., Solimena, M., and Zschenderlein, R. (1998). Atypical stiff-person syndrome with spinal MRI findings, amphiphysin autoantibodies, and immunosuppression. *Neurology* *51*, 250-252.
- Schook, W. J., and Puszkin, S. (1985). Brain clathrin light chain 2 can be phosphorylated by a coated vesicle kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* *82*, 8039-8043.
- Sever, S., Damke, H., and Schmid, S. L. (2000). Garrotes, springs, ratchets, and whips: putting dynamin models to the test. *Traffic* *1*, 385-392.

- Shang, W. H., Adachi, Y., Nakamura, A., Copeland, T., Kim, S. R., and Kamata, T. (2004). Regulation of amphiphysin I by mitogen-activated protein kinase: its significance in nerve growth factor receptor-mediated endocytosis. *J Biol Chem* 279, 40890-40896.
- Shiratori, T., Miyatake, S., Ohno, H., Nakaseko, C., Isono, K., Bonifacino, J. S., and Saito, T. (1997). Tyrosine phosphorylation controls internalization of CTLA-4 by regulating its interaction with clathrin-associated adaptor complex AP-2. *Immunity* 6, 583-589.
- Shupliakov, O., Low, P., Grabs, D., Gad, H., Chen, H., David, C., Takei, K., De Camilli, P., and Brodin, L. (1997). Synaptic vesicle endocytosis impaired by disruption of dynamin-SH3 domain interactions. *Science* 276, 259-263.
- Sigismund, S., Woelk, T., Puri, C., Maspero, E., Tacchetti, C., Transidico, P., Di Fiore, P. P., and Polo, S. (2005). Clathrin-independent endocytosis of ubiquitinated cargos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 2760-2765.
- Slepnev, V. I., Ochoa, G. C., Butler, M. H., and De Camilli, P. (2000). Tandem arrangement of the clathrin and AP-2 binding domains in amphiphysin I and disruption of clathrin coat function by amphiphysin fragments comprising these sites. *J Biol Chem* 275, 17583-17589.
- Slepnev, V. I., Ochoa, G. C., Butler, M. H., Grabs, D., and De Camilli, P. (1998). Role of phosphorylation in regulation of the assembly of endocytic coat complexes. *Science* 281, 821-824.
- Smith, D. (2003). Cdk5 in neuroskeletal dynamics. *Neurosignals* 12, 239-251.
- Stamm, S., Casper, D., Dinsmore, J., Kaufmann, C. A., Brosius, J., and Helfman, D. M. (1992). Clathrin light chain B: gene structure and neuron-specific splicing. *Nucleic Acids Res* 20, 5097-5103.
- Sudhof, T. C. (2004). The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci* 27, 509-547.
- Szyszkka, R., Grankowski, N., Felczak, K., and Shugar, D. (1995). Halogenated benzimidazoles and benzotriazoles as selective inhibitors of protein kinases CK I and CK II from *Saccharomyces cerevisiae* and other sources. *Biochem Biophys Res Commun* 208, 418-424.
- Takei, K., Haucke, V., Slepnev, V., Farsad, K., Salazar, M., Chen, H., and De Camilli, P. (1998). Generation of coated intermediates of clathrin-mediated endocytosis on protein-free liposomes. *Cell* 94, 131-141.
- Takei, K., Slepnev, V. I., and De Camilli, P. (2001). Interactions of dynamin and amphiphysin with liposomes. *Methods Enzymol* 329, 478-486.
- Takei, K., Slepnev, V. I., Haucke, V., and De Camilli, P. (1999). Functional partnership between amphiphysin and dynamin in clathrin-mediated endocytosis. *Nat Cell Biol* 1, 33-39.
- Takei, K., Yoshida, Y., and Yamada, H. (2005). Regulatory mechanisms of dynamin-dependent endocytosis. *J Biochem (Tokyo)* 137, 243-247.
- Tan, T. C., Valova, V. A., Malladi, C. S., Graham, M. E., Berven, L. A., Jupp, O. J., Hansra, G., McClure, S. J., Sarcevic, B., Boadle, R. A., Larsen, M. R., Cousin, M. A., and Robinson, P. J. (2003). Cdk5 is essential for synaptic vesicle endocytosis. *Nat Cell Biol* 5, 701-710.
- Tebar, F., Bohlander, S. K., and Sorkin, A. (1999). Clathrin assembly lymphoid myeloid leukemia (CALM) protein: localization in endocytic-coated pits, interactions

with clathrin, and the impact of overexpression on clathrin-mediated traffic. *Mol Biol Cell* *10*, 2687-2702.

Tebar, F., Sorkina, T., Sorkin, A., Ericsson, M., and Kirchhausen, T. (1996). Eps15 is a component of clathrin-coated pits and vesicles and is located at the rim of coated pits. *J Biol Chem* *271*, 28727-28730.

ter Haar, E., Musacchio, A., Harrison, S. C., and Kirchhausen, T. (1998). Atomic structure of clathrin: a beta propeller terminal domain joins an alpha zigzag linker. *Cell* *95*, 563-573.

Terada, Y., Tsutsui, K., Sano, K., Hosoya, O., Ohtsuki, H., and Tokunaga, A. (2002). Novel splice variants of amphiphysin I are expressed in retina. *FEBS Lett* *519*, 185-190.

Tomizawa, K., Sunada, S., Lu, Y. F., Oda, Y., Kinuta, M., Ohshima, T., Saito, T., Wei, F. Y., Matsushita, M., Li, S. T., Tsutsui, K., Hisanaga, S., Mikoshiba, K., Takei, K., and Matsui, H. (2003). Cophosphorylation of amphiphysin I and dynamin I by Cdk5 regulates clathrin-mediated endocytosis of synaptic vesicles. *J Cell Biol* *163*, 813-824.

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

Tsujita, K., Suetsugu, S., Sasaki, N., Furutani, M., Oikawa, T., and Takenawa, T. (2006). Coordination between the actin cytoskeleton and membrane deformation by a novel membrane tubulation domain of PCH proteins is involved in endocytosis. *J Cell Biol* *172*, 269-279.

Tsutsui, K., Maeda, Y., Seki, S., and Tokunaga, A. (1997). cDNA cloning of a novel amphiphysin isoform and tissue-specific expression of its multiple splice variants. *Biochem Biophys Res Commun* *236*, 178-183.

Tyler, J. M., and Branton, D. (1980). Rotary shadowing of extended molecules dried from glycerol. *J Ultrastruct Res* *71*, 95-102.

Ungewickell, E., and Branton, D. (1981). Assembly units of clathrin coats. *Nature* *289*, 420-422.

Usami, M., Takahashi, A., Kadota, T., and Katoda, K. (1985). Phosphorylation of a clathrin light chain of coated vesicles in the presence of histones. *J Biochem (Tokyo)* *97*, 1819-1822.

van der Blik, A. M., and Meyerowitz, E. M. (1991). Dynamin-like protein encoded by the *Drosophila shibire* gene associated with vesicular traffic. *Nature* *351*, 411-414.

van Koppen, C. J. (2001). Multiple pathways for the dynamin-regulated internalization of muscarinic acetylcholine receptors. *Biochem Soc Trans* *29*, 505-508.

Walén, K. H. (1965). Spatial Relationships in the Replication of Chromosomal DNA. *Genetics* *51*, 915-929.

Walker, R. A., O'Brien, E. T., Pryer, N. K., Soboeiro, M. F., Voter, W. A., Erickson, H. P., and Salmon, E. D. (1988). Dynamic instability of individual microtubules analyzed by video light microscopy: rate constants and transition frequencies. *J Cell Biol* *107*, 1437-1448.

Walther, K., Diril, M. K., Jung, N., and Haucke, V. (2004). Functional dissection of the interactions of stonin 2 with the adaptor complex AP-2 and synaptotagmin. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 964-969.

- Wang, L. H., Sudhof, T. C., and Anderson, R. G. (1995). The appendage domain of alpha-adaptin is a high affinity binding site for dynamin. *J Biol Chem* *270*, 10079-10083.
- Wigge, P., Kohler, K., Vallis, Y., Doyle, C. A., Owen, D., Hunt, S. P., and McMahon, H. T. (1997). Amphiphysin heterodimers: potential role in clathrin-mediated endocytosis. *Mol Biol Cell* *8*, 2003-2015.
- Wigge, P., and McMahon, H. T. (1998). The amphiphysin family of proteins and their role in endocytosis at the synapse. *Trends Neurosci* *21*, 339-344.
- Wilbur, J. D., Hwang, P. K., and Brodsky, F. M. (2005). New faces of the familiar clathrin lattice. *Traffic* *6*, 346-350.
- Willingham, M. C., and Pastan, I. (1983). Formation of receptosomes from plasma membrane coated pits during endocytosis: analysis by serial sections with improved membrane labeling and preservation techniques. *Proc Natl Acad Sci U S A* *80*, 5617-5621.
- Wong, D. H., Ignatius, M. J., Parosky, G., Parham, P., Trojanowski, J. Q., and Brodsky, F. M. (1990). Neuron-specific expression of high-molecular-weight clathrin light chain. *J Neurosci* *10*, 3025-3031.
- Wong, W. T., Schumacher, C., Salcini, A. E., Romano, A., Castagnino, P., Pelicci, P. G., and Di Fiore, P. (1995). A protein-binding domain, EH, identified in the receptor tyrosine kinase substrate Eps15 and conserved in evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* *92*, 9530-9534.
- Ybe, J. A., Brodsky, F. M., Hofmann, K., Lin, K., Liu, S. H., Chen, L., Earnest, T. N., Fletterick, R. J., and Hwang, P. K. (1999). Clathrin self-assembly is mediated by a tandemly repeated superhelix. *Nature* *399*, 371-375.
- Yoshida, Y., Kinuta, M., Abe, T., Liang, S., Araki, K., Cremona, O., Di Paolo, G., Moriyama, Y., Yasuda, T., De Camilli, P., and Takei, K. (2004). The stimulatory action of amphiphysin on dynamin function is dependent on lipid bilayer curvature. *Embo J* *23*, 3483-3491.
- Zandomeni, R., Bunick, D., Ackerman, S., Mittleman, B., and Weinmann, R. (1983). Mechanism of action of DRB. III. Effect on specific in vitro initiation of transcription. *J Mol Biol* *167*, 561-574.
- Zhang, B., and Zehhof, A. C. (2002). Amphiphysins: raising the BAR for synaptic vesicle recycling and membrane dynamics. *Bin-Amphiphysin-Rvsp*. *Traffic* *3*, 452-460.
- Zimmerberg, J., and McLaughlin, S. (2004). Membrane curvature: how BAR domains bend bilayers. *Curr Biol* *14*, R250-252.

7 Abkürzungsverzeichnis

AP	Adaptorproteinkomplex
AP180	<i>assembly</i> protein mit einer apparenten Molekülmasse von 180 kDa
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BDGF	<i>brain derived growth factor</i> , Wachstumsfaktor im Gehirn
Bin-1	<i>bridging integrator 1</i>
Bramp-2	<i>brain amphiphysin 2</i> , Amphiphysin-2 im Gehirn
BSA	Bovines Serumalbumin
CALM	<i>Clathrin Assembly Lymphoid Myeloid Leukemia Protein</i>
cdk5	<i>cyclin dependent kinase 5</i> , cyclinabhängige Kinase 5
CHC	<i>clathrin heavy chain</i> , schwere Kette des Clathrins
CK-2	Caseinkinase 2
CLC	<i>clathrin light chain</i> , leichte Kette des Clathrins
C-terminal	carboxyterminal
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium
ECL	<i>Enhanced Chemoluminescence Reagent</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEA1	<i>early endosomal antigen 1</i> , Antigen in frühen Endosomen 1
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i> , eine Variante des GFP mit verstärkter Fluoreszenzintensität
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i> , Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors
EGTA	Ethylenbis(oxyethylenitrilo)-tetraacetat
EH-Domäne	Eps15-Homologiedomäne
ENTH-Domäne	Epsin N-terminale Homologiedomäne
Eps15	EGF-Rezeptorproteinsubstrat 15
Epsin	Eps15-interagierendes Protein
ER	endoplasmatisches Reticulum
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
GFP	grün fluoreszierendes Protein, isoliert aus der Qualle <i>Aequorea victoria</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosin-5'-Triphosphat
HC	schwere Kette von Clathrin (<i>heavy chain</i>)
HEPES	[4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-ethansulfonsäure
Hip1r	<i>huntingtin interacting protein 1 related</i>
Hsc70	konstitutiv expremiertes Hitzeschockprotein mit einer Größe von 70 kDa
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kD	Kilodalton

LC	leichte Kette von Clathrin (<i>light chain</i>)
MAPK	<i>mitogen associated proten kinase</i> , Mitogen-assoziiertes Protein-Kinase
MEM	modifiziertes Eagle Medium
mRFP	monomeres rot fluoreszierendes Protein
M6P-R	Mannose-6-phosphatrezeptor
N-terminal	aminoterminal
NGF	<i>Nerve growth factor</i> , Nervenwachstumsfaktor
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered Saline</i> , Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i> , Wachstumsfaktor aus Blutplättchen
pH-Wert	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionenkonzentration
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbolmyristoylacetat
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SNX-1	<i>sorting nexin-1</i>
SV40	<i>simian virus 40</i> , Affenvirus SV40
TBS	<i>tris buffered saline</i> , Tris gepufferte Kochsalzlösung
TD	terminale Domäne der schweren Kette von Clathrin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRITC	Tetramethylrhodamin-iso-thiocyanat
Triton	t-Octylphenoxypoly-etoxyethanol
T-Tubuli	transversale Tubuli
trkA	Tyrosinrezeptorkinase A
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i> , gelb fluoreszierendes Protein

8 Inhaltsverzeichnis der Video-CD

Video 1: PtK2-Zelle transfiziert mit intGFP-Amphiphysin1, vergl. Abb. 20 (rechts)

Video 2: Ausschnittsvergrößerung aus einer PtK2-Zelle transfiziert mit intGFP-Amphiphysin-1, vergl. Abb. 21

Video 3: Amphiphysintubuli co-lokalisieren mit Lipidmembranen in PtK2-Zellen, die mit intGFP-Amphiphysin-1 transfiziert wurden, vergl. Abb. 24

Video 4: PtK2-Zelle co-transfiziert mit mRFP-Amphiphysin-1 und GFP-Amphiphysin-2, vergl. Abb.26 (Zeitraffer 20-fach)

Video 5: PtK2-Zelle mikroinjiziert mit GFP-Amphiphysin-2, vergl. Abb. 28 (Zeitraffer 30-fach)

Video 6: PtK2-Zelle co-transfiziert mit mRFP-Amphiphysin-1 und GFP-SNX1, vergl. Abb. 29 (Zeitraffer 20-fach)

Video 7: PtK2-Zelle transfiziert mit intGFP-Amphiphysin, behandelt mit TBB, vergl. Abb. 33

Video 8: PtK2-Zelle transfiziert mit intGFP-Amphiphysin, behandelt mit TBB, vergl. Abb. 33

9 Danksagung

Diese Dissertation wurde im Institut für Zellbiologie im Zentrum Anatomie der Medizinischen Hochschule Hannover unter der Leitung von Herrn Dr. Rudolf Bauerfeind angefertigt. Ich danke ihm für die Möglichkeit dieses Projekt zu bearbeiten, für seine hervorragende, geduldige Betreuung und die enorme Unterstützung bei der Flacheinbettung und Elektronenmikroskopie. Herrn Professor Dr. Ungewickell und Herrn Professor Dr. Holtmann danke ich für die Übernahme von Referat und Korreferat dieser Arbeit.

Außerdem danke ich:

Zunächst allen Kollegen im Institut für die gute Zusammenarbeit.

Herrn Dr. Lars Hinrichsen und Herrn Michael Düwel für viele gute Diskussionen und Anregungen zum Manuskript dieser Arbeit.

Frau Dr. Anika Meyerholz für ihre große Hilfe beim Ausdrucken dieser Arbeit.

Frau Dr. Stephanie Groos für viele hilfreiche Diskussionen und Anregungen und gemeinsame Mahle.

Frau Huberta Ungewickell für viele Reagenzien und gute Tips.

Frau Christiane Lemke für so manches Gel und manche Midipräp sowie Frau Elke Mallon und Frau Beate Großmann für ihre Unterstützung in der Zellkultur. Frau Angelika Hundt für Tips um die Bildverarbeitung. Herrn Gerd Preiss für seine große Unterstützung bei Sprühpräparation und Bedampfung.

Der Graduiertenförderung der Konrad-Adenauer-Stiftung für substanzielle materielle und ideelle Unterstützung.

Kerstin Radtke für ihre Liebe und Geduld in den vergangenen Jahren.

Meinen Eltern für ihre immerwährende Unterstützung während des Studiums und der Dissertation.

10 Erklärung

Hierdurch erkläre ich, dass die Dissertation

„Amphiphysine in der Clathrin-vermittelten Endocytose: Untersuchungen zur Phosphorylierung und Membrandeformation“

selbstständig verfasst und alle benutzten Hilfsmittel sowie evtl. zur Hilfeleistung herangezogene Institutionen vollständig angegeben wurden.

Die Dissertation wurde nicht schon als Diplom- oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, den 04.05.06.


(Unterschrift)

Name: Markus Döring

11 Werdegang und Publikationen

11.1 Wissenschaftlicher Werdegang

10.1995 – 08.2001	Studium der Biochemie an der Universität Hannover, Abschluss: Diplom Diplomarbeit: Untersuchung zur Phosphorylierung von Amphiphysin
10.2001 – 04.2002	Tätigkeit als wissenschaftliche Hilfskraft im Institut für physiologische Chemie, Medizinische Hochschule Hannover
05.2002 – 05.2006	Promotion im Fach Zellbiologie an der Universität Hannover, Anfertigung der Doktorarbeit in der Abteilung Zellbiologie, Medizinische Hochschule Hannover

11.2 Publikationen

09. 2003	Döring M, Schrader N., Bauerfeind R.: <i>„Characterization of of amphiphysin-1 phosphorylation“</i> Poster: ELSO 2003 Conference, Abstract # 584, Dresden
03.2006	Döring M., Hähnel C., Bauerfeind R.: <i>„BAR domain dependent tubulation of membranes by amphiphysin“</i> Poster: Annual meeting of the German Society for Cell Biology, Abstract # MS3-16, Braunschweig
	Döring M., Loos A., Schrader N., Pfander B., Bauerfeind, R.: <i>„Nerve growth factor induced phosphorylation of amphiphysin-1 by casein kinase 2 regulates clathrin-amphiphysin interactions“</i> J Neurochem. 2006 Sep;98(6):2013-22. PMID: 1694511