

Institut für Biochemie 2



GEORG-AUGUST-UNIVERSITÄT  
GÖTTINGEN

**Das synaptische Vesikelrecycling:  
Molekulare Funktionen des AP-1-Komplexes  
und seiner  $\sigma$ 1B-Adaptinuntereinheit**

Dissertation

zur Erlangung des mathematisch-naturwissenschaftlichen Doktorgrades

"Doctor rerum naturalium"

der Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von

Manuel Kratzke

aus

Kassel

Göttingen 2012

Mitglied des Betreuungsausschusses (Referent):

Prof. Dr. Peter Schu

Institut für Biochemie 2

Zentrum für Biochemie und Molekulare Zellbiologie

Georg-August-Universität, Göttingen

Mitglied des Betreuungsausschusses (Koreferentin):

Prof. Dr. Claudia Steinem

Institut für Organische und Biomolekulare Chemie

Georg-August-Universität, Göttingen

Mitglied des Betreuungsausschusses:

Prof. Dr. Jürgen Wienands

Abteilung für zelluläre und molekulare Immunologie

Georg-August-Universität, Göttingen

Mitglied des Betreuungsausschusses:

Dr. Hans Dieter Schmitt

Abteilung für Neurobiologie

Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen

Mitglied des Betreuungsausschusses:

Dr. Dr. Oliver Schlüter

Abteilung für molekulare Neurobiologie

European Neuroscience Institute, Göttingen

Mitglied des Betreuungsausschusses:

Dr. Judith Stegmüller

Abteilung für zelluläre und molekulare Neurobiologie

Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin, Göttingen

Tag der mündlichen Prüfung: 02.08.2012

# Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig angefertigt habe und keine Hilfsmittel oder Quellen, außer den in der Arbeit angegebenen, benutzt bzw. verwendet habe.

Göttingen, den 28.6.2012

---

(Manuel Kratzke)



---

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung .....	1
1.1 Vesikulärer Proteintransport .....	2
1.2 Adaptorproteinkomplexe.....	5
1.2.1 Adaptinisoformen.....	8
1.2.2 Bindungsstellen von Sortierungssignalen .....	8
1.2.3 Clathrin und clathrinumhüllte Vesikel.....	10
1.2.4 Funktionen und Lokalisierung der AP-Komplexe .....	11
1.2.5 AP-1 vermittelte Vesikelbildung .....	13
1.3 Assoziierte Adaptorproteine.....	16
1.3.1 Clathrin-assoziierte Sortierungs-Proteine (CLASPs).....	17
1.4 Adaptorproteinkomplexvermittelter Transport .....	21
1.4.1 AP-Komplexe in der epithelialen polaren Sortierung.....	21
1.4.2 AP-Komplexe in der synaptischen Sortierung.....	21
1.4.3 Funktionen von AP-Komplexen am SV-Recycling .....	24
1.4.4 Beteiligung von Rab-Proteinen am SV-Recycling .....	26
1.4.5 Beteiligung von SNARE-Proteinen am SV-Recycling .....	27
1.5 KO-Modelle zur Funktionsanalyse der AP-1 Adaptine .....	29
1.5.1 Phänotypen des $\sigma$ 1B „knock-out“ Mausmodells.....	32
1.5.2 Veränderungen $\sigma$ 1B-defizienter hippocampaler Neuronen .....	33
1.6 Fragestellung .....	35
2. Materialien und Methoden.....	37
2.1 Puffer .....	37
2.2 Zellbiologische Methoden.....	38
2.2.1 Kultivierung von Maus embryonalen Fibroblasten.....	39
2.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	39
2.3 Biochemische Methoden .....	39
2.3.1 Proteinextraktion aus MEF .....	39
2.3.2 Differentielle Zentrifugation eines Cortexextrakts.....	40
2.3.3 Lineare Dichtegradientenzentrifugation .....	40
2.3.3.1 Sedimentationszentrifugation.....	43
2.3.3.2 Flotationszentrifugation.....	44
2.3.4 Proteinextraktion und Synaptosomenisolation aus Cortex .....	44
2.3.5 Proteinbestimmung nach Bradford.....	44
2.3.6 Proteinfällung nach Wessel und Flügge.....	45
2.3.7 Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli.....	46

---

2.3.8	Proteintransfer auf eine Trägermembran (Western-Blot).....	49
2.3.9	Halbtrockenblot.....	49
2.3.10	Immunfärbung auf Nitrozellulose/PVDF-Membranen .....	50
2.3.11	Strippen von Transfermembranen .....	52
2.3.12	Verwendete Antikörper .....	52
2.3.13	Transfermembran für Western-Blot-Quantifizierungen .....	55
2.3.14	Quantifizierung von Western-Blots.....	55
2.3.15	Proteolytischer Verdau von Synaptosomen .....	58
2.3.16	Coomassiefärbung von Polyacrylamidgelen .....	59
2.3.17	Silberfärbung von Polyacrylamidgelen .....	60
2.3.18	2D-Gelelektrophorese.....	60
2.3.19	Quantifizierung von Phosphatidylinositolphosphaten .....	63
2.4	Massenspektrometrische Methoden .....	65
2.4.1	Vorbereitung von Proteinproben für die Massenspektrometrie.....	66
2.4.2	In-Gel-Verdau von Proteinproben .....	67
2.4.3	Massenspektrometrie trypsinverdauter Peptide .....	68
2.4.4	iTRAQ™-Massenspektrometrie .....	68
2.4.5	Shotgun-Massenspektrometrie .....	73
2.5	Elektronenmikroskopische Aufnahmen.....	74
2.6	Geräte .....	75
2.6.1	Zentrifugen und Rotoren .....	76
2.6.2	Spezielle Auswertungs- und Analysesoftware.....	76
3.	Proteinmengen im Cortex, in Synaptosomen und in MEF .....	77
3.1	Golgi und <i>trans</i> -Golgi-Netzwerk.....	79
3.2	Transportvesikelproteine .....	80
3.3	Endosomale Proteine .....	83
3.4	Trennung von Prä- und Postsynapse.....	87
4.	Anreicherung früher endosomaler Kompartimente .....	91
4.1	Differentielle Zentrifugation .....	91
4.2	Dichtegradientenzentrifugation .....	92
4.2.1	Puffersysteme der Dichtegradientenzentrifugation.....	93
4.2.2	Gesamtproteinverteilung im Gradienten.....	94
4.2.3	Markerproteinverteilung im Dichtegradienten.....	96
4.2.4	Differentieller Vergleich der Proteinprofile .....	98
4.2.5	Differentielle Unterschiede in den Fraktionen D und E .....	102
4.3	Flotationsdichtegradientenzentrifugation.....	108
4.3.1	Flotationsdichtegradientenzentrifugation der Fraktionen D und E .....	111

---

---

4.4	Proteinprofile der Fraktionierung in der SDS-PAGE .....	116
4.5	2D-Gelelektrophorese .....	117
5.	iTRAQ™-Massenspektrometrie endosomaler Fraktionen .....	121
5.1	Elektronenmikroskopische Aufnahmen.....	122
5.2	Das iTRAQ™-Massenspektrometrieexperiment .....	123
5.2.1	iTRAQ™-Markierungen der Fraktionen D4 und E5.....	127
5.3	Identifizierung veränderter Signalverhältnisse .....	129
5.4	Verifizierung veränderter Signalverhältnisse.....	131
5.5	Beispiel zur Identifizierung und Verifizierung eines Proteins.....	132
5.6	Ergebnisse der iTRAQ™-Massenspektrometrie .....	133
5.6.1	Reinheit der neuronalen, endosomalen Fraktionen D4 und E5.....	134
5.6.2	Kontrolle der Vollständigkeit der Proteomanalyse.....	135
5.7	Proteom der neuronalen, endosomalen Fraktionen E5.....	136
5.7.1	Veränderungen von nicht endosomalen oder SV-Proteinen .....	140
5.7.2	Veränderungen von endosomalen oder SV-Proteinen .....	142
5.8	Proteom der neuronalen, endosomalen Fraktionen D4.....	146
5.8.1	Veränderungen von nicht endosomalen oder SV-Proteinen .....	148
5.8.2	Veränderungen von endosomalen oder SV-Proteinen .....	149
5.9	Rab-Proteine als Marker endosomaler Populationen.....	152
5.10	Hinweise auf eine endosomale Beteiligung am SV-Recycling .....	158
5.11	WB-Verifikation von iTRAQ™-Ergebnissen .....	160
5.11.1	Korrelation von iTRAQ™ und WB-Quantifizierungen .....	161
5.11.2	WB-Ergebnisse in Bezug auf iTRAQ™-Daten .....	167
6.	Einfluss der AP-1/σ1B-Defizienz auf die PI-Mengen .....	171
6.1	Differentielle Veränderungen von PI-3-P .....	171
6.2	Einfluss der AP-1/σ1B-Defizienz auf hVps 34.....	172
6.3	Quantifizierung weiterer endosomaler PIs und PI-4-P .....	174
7.	Diskussion.....	177
7.1	Anreicherung endosomaler Strukturen des Cortex .....	177
7.2	iTRAQ™-Analyse der endosomalen Fraktionen .....	179
7.3	Spezifität von Veränderungen für ein Zellkompartiment.....	181
7.4	Zusammensetzung der ldE und hdE.....	182
7.5	Veränderungen funktioneller Proteingruppen .....	184
7.5.1	Veränderungen früher endosomaler Proteine .....	184
7.5.2	Veränderungen später endosomaler Proteine .....	186
7.5.3	Veränderungen von Hüllenproteinen .....	186
7.5.4	Veränderungen von SV und deren Transport .....	190

---

7.5.5 Veränderungen von ‚dense core vesicle‘ Proteinen .....	193
7.5.6 Stressgranula .....	194
7.6 Synaptosomale Funktionen des AP-1/ $\sigma$ 1B-Komplexes.....	195
7.7 Ausblick.....	199
7.8 Modell des defizienten SV-Recyclings .....	200
8. Zusammenfassung.....	203
9. Literaturverzeichnis .....	205
Abkürzungen.....	225
Danksagung.....	229
Lebenslauf .....	231
Anhang .....	i

---

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1: Vesikulärer Transport des sekretorischen Weges in Säugerzellen. ....	3
Abb. 1-2: Schritte der Vesikelentstehung, -abknospung und -fusion. ....	4
Abb. 1-3: Schematische Darstellung der heterotetrameren AP-Komplexe. ....	7
Abb. 1-4: Zusammensetzung der AP-Komplexe 1 bis 4. ....	8
Abb. 1-5: Struktur des AP-1-Komplexes. ....	10
Abb. 1-6: Struktur eines Clathrinkäfiges. ....	11
Abb. 1-7: Hüllenproteine und Transportwege. ....	12
Abb. 1-8: AP-1-Membrananbindung. ....	14
Abb. 1-9: Modell der Biogenese von AP-1/CCVs. ....	15
Abb. 1-10: Modell für die Arf-vermittelte Vesikelbildung. ....	16
Abb. 1-11: Beteiligung von Stonin 2 bei der SV-Bildung. ....	18
Abb. 1-12: Die drei vesikulären Pools. ....	24
Abb. 1-13: Mögliche Recyclingrouten von synaptischen Vesikeln (SV). ....	26
Abb. 1-14: Rab-Proteine, Effektoren und deren Beteiligung am SV-Recycling. ....	27
Abb. 1-15: Kristallstruktur neuronaler SNARE-Kernkomplexe. ....	28
Abb. 1-16: Die SNARE vermittelte Vesikelfusion und das Recycling der SNARE- Proteine. ....	29
Abb. 1-17: Zusammensetzung des AP-1 und dessen bekannte Adaptinisoformen. ....	30
Abb. 1-18: Gewebsspezifische Expression der AP 1 Adaptine $\sigma 1A$ , $\sigma 1B$ und $\sigma 1C$ . ....	32
Abb. 1-19: Überlebensfähigkeit verschiedener AP 1 "knock-out" Mausmodelle. ....	33
Abb. 1-20: 3D-Rekonstruktion von Präsynapsen hippocampalen Neuronen. ....	34
Abb. 2-1: Dichteverteilung im Gradienten über die sechs Fraktionen A bis F. ....	43
Abb. 2-2: Precision Plus Protein Standard All Blue (Bio Rad, München). ....	49
Abb. 2-3: Aufbau des halbtrockenen Proteintransfers. ....	50
Abb. 2-4: Prinzip einer Western-Blot-Membranentwicklung. ....	51
Abb. 2-5: Vergleich der Signalintensität von Proteintransfers auf PVDF- und Nitrozellulosemembranen. ....	55
Abb. 2-6: Bestimmung der relativen Verteilung eines Proteins über verschiedene Fraktionen. ....	56
Abb. 2-7: Bestimmung der differentiellen Änderung der Proteinmenge zwischen den Genotypen in der gleichen Fraktion. ....	56
Abb. 2-8: Western-Blot-Quantifizierung von WT- und KO-Zellen. ....	57
Abb. 2-9: Schematische Darstellung eines PI(3)P Mass Strip™. ....	64
Abb. 2-10: NuPAGE®-Gel des iTRAQ™-Experiments. ....	70
Abb. 2-11: Probenmarkierungen mit den iTRAQ™-Reagenzien. ....	71

---

## Abbildungsverzeichnis

---

Abb. 3-1: Proteinmengen von GM 130 (130 kDa).....	80
Abb. 3-2: Proteinmengen von TGN 38 (85 – 95 kDa).....	80
Abb. 3-3: Proteinmengen von AP-1/ $\gamma$ 1 (91,4 kDa).....	81
Abb. 3-4: Proteinmengen von AP-1/ $\gamma$ 2 (87,9 kDa).....	81
Abb. 3-5: Proteinmengen von AP-2/ $\alpha$ (107,7 kDa).....	82
Abb. 3-6: Proteinmengen von Chc (191,6 kDa).....	82
Abb. 3-7: Proteinmengen von Vamp 2 (12,7 kDa).....	82
Abb. 3-8: Proteinmengen von Synaptotagmin 1 (47,4 kDa).....	83
Abb. 3-9: Proteinmengen von Rab 5 (durchschnittliche Masse der Isoformen A, B und C: 23,6 kDa).....	84
Abb. 3-10: Proteinmengen von Rabex 5 (56,9 kDa).....	84
Abb. 3-11: Proteinmengen von EEA 1 (160,9 kDa).....	84
Abb. 3-12: Proteinmengen von Syntaxin 6 (20,0 kDa).....	85
Abb. 3-13: Proteinmengen von Syntaxin13 (30,5 kDa).....	85
Abb. 3-14: Proteinmengen von Appl 1 (79,3 kDa).....	86
Abb. 3-15: Proteinmengen von Appl 2 (73,9 kDa).....	86
Abb. 3-16: Proteinmengen von TSG 101 (44,1 kDa).....	86
Abb. 3-17: Prä- und postsynaptische Bereiche von Neuronen.....	89
Abb. 4-1: Differentielle Zentrifugation.....	92
Abb. 4-2: Sedimentationszentrifugation (65 000 g).....	93
Abb. 4-3: EEA1-Stabilität des KO in Puffer A und B.....	94
Abb. 4-4: Gesamtproteinverteilung nach einer linearen 65 000 g-Zentrifugation.....	95
Abb. 4-5: Verteilung von zytosolischen Proteinen in der Sedimentationszentrifugation.....	95
Abb. 4-6: Proteinprofile von AP 1/ $\gamma$ 1, AP 2/ $\alpha$ , Chc, Vamp 2 und Synaptotagmin 1.....	97
Abb. 4-7: Proteinprofile von GM 130, TGN 38, Syntaxin 6, Rab 5 Appl 1 und Appl 2.....	100
Abb. 4-8: Proteinprofile von EEA 1 und TSG 101.....	101
Abb. 4-9: Proteinmengen von Vamp 2.....	103
Abb. 4-10: Proteinmengen von Synaptotagmin 1.....	103
Abb. 4-11: Proteinmengen von Clathrin (Chc).....	103
Abb. 4-12: Proteinmengen von AP-1/ $\gamma$ 1.....	104
Abb. 4-13: Proteinmengen von AP-1/ $\gamma$ 2.....	104
Abb. 4-14: Proteinmengen von AP-2/ $\alpha$ .....	104
Abb. 4-15: Proteinmengen von Syntaxin 6.....	105
Abb. 4-16: Proteinmengen von Syntaxin 13.....	105
Abb. 4-17: Proteinmengen von Vti 1a.....	105

---

---

Abb. 4-18: Proteinmengen von Rab 5.....	106
Abb. 4-19: Proteinmengen von Rabex 5.....	106
Abb. 4-20: Proteinmengen von EEA 1.....	106
Abb. 4-21: Proteinmengen von Syntaxin 16.....	107
Abb. 4-22: Flotationsdichtegradientenzentrifugation der Fraktionen A bis F.....	108
Abb. 4-23: Proteinprofile in der Sedimentationszentrifugation.....	109
Abb. 4-24: Proteinprofile von EEA 1 in der Sedimentationszentrifugation.....	110
Abb. 4-25: Differentielle Veränderungen in den Gradientenfraktionen D3-D5.....	113
Abb. 4-26: Differentielle Veränderungen in den Gradientenfraktionen E3-E5.....	115
Abb. 4-27: SDS-PAGE der Sedimentationszentrifugationsfraktionen.....	116
Abb. 4-28: Repräsentative SDS-PAGE der Flotationsdichtegradientenzentrifugationen.....	117
Abb. 4-29: 2D-PAGE der Fraktion E.....	118
Abb. 4-30: 2D-PAGE der Fraktion F.....	118
Abb. 5-1: Flotationsgradientenreinigung der Fraktionen D und E.....	122
Abb. 5-2: <i>Negative-staining</i> -EM Aufnahmen der Fraktionen D4 und E5.....	123
Abb. 5-3: iTRAQ™-Reagenzien und deren Proteinmarkierung.....	124
Abb. 5-4: „Quiet region“ im Bereich zwischen 113 bis 119 Da.....	125
Abb. 5-5: MS- und MS/MS-Proteinfragmentierung eines iTRAQ™-Experiments.....	126
Abb. 5-6: NuPAGE® Bis-Tris Gel der Fraktionen D4 und E5.....	128
Abb. 5-7: Verdau und iTRAQ™-Markierung eines Gelstückes.....	129
Abb. 5-8: iTRAQ™-Proteinsignalverhältnisse 116:117 der Bande 13.....	130
Abb. 5-9: Veränderte iTRAQ™-Proteinsignalverhältnisse 116:117 der Bande 13.....	131
Abb. 5-10: Summe der über die iTRAQ™-Experimente identifizierten Proteine.....	134
Abb. 5-11: Summe der identifizierten Proteine über iTRAQ™- und Shotgun- Experimente.....	136
Abb. 5-12: Zusammensetzung der neuronalen, endosomalen Fraktion E5.....	137
Abb. 5-13: Proteingruppen der Fraktion E5, die nicht direkt am neuronalen, endosomalen Recycling beteiligt sind.....	142
Abb. 5-14: Proteingruppen der Fraktion E5, die möglicherweise direkt am neuronalen, endosomalen Recycling beteiligt sind.....	146
Abb. 5-15: Zusammensetzung der neuronalen, endosomalen Fraktion D4.....	147
Abb. 5-16: Proteingruppen der Fraktion D4, die nicht direkt am neuronalen, endosomalen Recycling beteiligt sind.....	149
Abb. 5-17: Proteingruppen der Fraktion D4, die möglicherweise direkt am neuronalen, endosomalen Transport beteiligt sind.....	152

---

Abb. 5-18: Western-Blot-Quantifizierungen zur Verifikation der iTRAQ™- Ergebnisse.....	166
Abb. 6-1: Differentielle PI-3-P Verteilung.....	172
Abb. 6-2: Verteilung von EEA 1 und hVps34 des WT im 65 000 g-Gradienten.....	173
Abb. 6-3: Verteilung zwischen WT und KO von hVps 34.....	173
Abb. 6-4: PIP-Metabolismus in frühen Endosomen [Paolo und Camilli 2006].....	174
Abb. 6-5: Anreicherung von PIPs auf Organellmembranen des späten sekretorischen Weges. [Santiago-Tirado und Bretscher 2011].....	175
Abb. 6-6: Differentielle PI-4-P Verteilung.....	176
Abb. 7-1: Einfluss der AP-1/σ1B-Defizienz auf das SV-Recycling.....	201

---

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1-1: Clathrin-assoziierte Sortierungs-Proteine.....	19
Tab. 2-1: Verwendete Zelllinien aus WT und AP-1/ $\sigma$ 1B-defizienten Mäusen. ....	38
Tab. 2-2: Zusammensetzungen der Lösungen für Gele unterschiedlicher Acrylamidkonzentrationen. ....	48
Tab. 2-3: Primäre Antikörper, die in dieser Arbeit verwendet wurden.....	53
Tab. 2-4: Sekundäre HRP-gekoppelte Antikörper, die in dieser Arbeit verwendet wurden.....	55
Tab. 3-1: Stabilität von Markerproteinen in Synaptosomen gegen Proteasen. ....	88
Tab. 4-1: Differentielle Veränderungen im Cortex und den Gradientenfraktionen D und E .....	107
Tab. 4-2: Differentielle Veränderungen in den Gradientenfraktionen D3-D5 und E3-E5. ....	115
Tab. 5-1: Proteineinträge der endosomalen/Rab-Datenbank. ....	154
Tab. 5-2: Identifizierte Rab-Proteine in den Fraktionen D4 und E5 und deren Lokalisierung nach Mori <i>et al.</i> ....	155
Tab. 5-3: Funktionen der in den Fraktionen D4 und E5 massenspektrometrisch identifizierten Rab-Proteine der endosomal/Rab-Datenbank.....	157
Tab. 5-4: Validierung von signifikant veränderten Proteinen der iTRAQ™- Quantifizierung, die vermutlich direkt am endosomalen, vesikulären Transport beteiligt sind. ....	166

---

---

---

## 1. Einleitung

Die Proteinsortierung zwischen membranumschlossenen Kompartimenten einer Zelle spielt eine zentrale Rolle sowohl für die Bildung und Aufrechterhaltung dieser Kompartimente als auch für die interzelluläre Kommunikation. Hierfür wird ein hochspezialisiertes Transportnetzwerk benötigt. Dem frühen sekretorischen Weg folgend und beginnend am endoplasmatischen Retikulum (ER) werden neusynthetisierte Proteine zunächst zum Golgi-Apparat transportiert, wo sie zumeist mehreren Modifikationen unterworfen werden, bevor sie in das *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) und somit in den späten sekretorischen Weg übergehen. Im Verlauf des späten sekretorischen Weges werden die Proteine vom TGN zu Endosomen und weiter zu Lysosomen, der Plasmamembran oder sekretorischen Organellen sortiert. Proteine, die ausgehend von der Plasmamembran auf dem endozytotischen Weg transportiert werden, durchlaufen die in dem sekretorischen Weg beschriebenen Kompartimente in umgekehrter Reihenfolge.

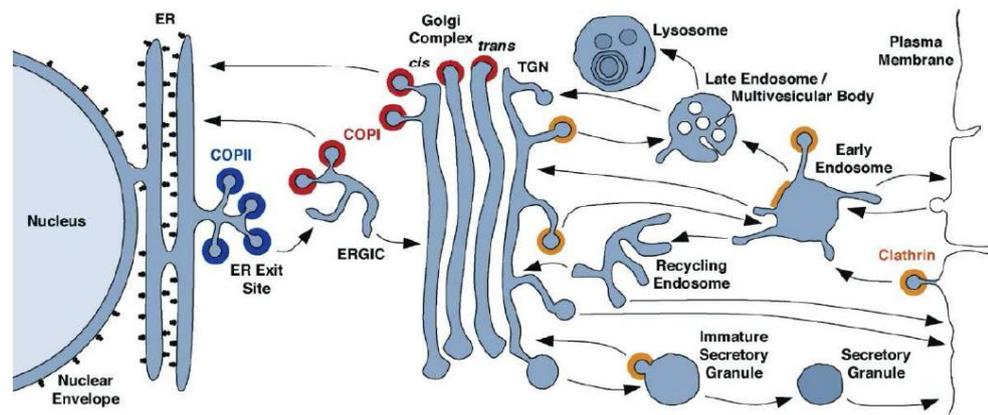
Der Proteintransport wird von membranumschlossenen Vesikeln vermittelt, deren Bildung nach einem grundsätzlich einheitlichen Mechanismus erfolgt: Sie wird durch eine Krümmung der „Donormembran“ eingeleitet, welche durch eine spezifische Lipidzusammensetzung und unter der Beteiligung von speziellen Proteinen auf der zytosolischen Membranseite vermittelt wird. Im weiteren Verlauf führt die Anlagerung zusätzlicher Proteine zu einer Bildung von sphärischen Membraneinstülpungen, welche nur noch über einen „Membranstiel“ mit der „Donormembran“ in Verbindung stehen. Von diesem Membranstiel erfolgt die Abknospung der Vesikel in das Zytoplasma. Über spezifische Proteine auf der Vesikeloberfläche wird eine Anbindung an Motorproteine vermittelt, mit deren Hilfe der vesikuläre Transport entlang eines Netzwerkes aus Zytoskelettfilamenten zur Membran des Zielkompartiments bewerkstelligt wird. Hochspezifische Interaktionen zwischen der Vesikel- und der Zielmembran führen zuerst zum Andocken und später zur Fusion mit dem Zielkompartiment. Für einen selektiven Transport eines Vesikels von einer Donor- zu einer Zielmembran ist darüber hinaus eine Vielzahl von hochspezifischen Interaktionen während des Transportprozesses notwendig, sodass jede Vesikelpopulation eine definierte Protein- und Lipidzusammensetzung aufweisen muss.

Dieser spezifische Transport wird neben anderen Mechanismen durch so genannte „Coated-Vesikel“ bewerkstelligt, welche einen Durchmesser von bis zu 100 nm aufweisen. Deren Bildung wird durch die Rekrutierung von zytosolischen Proteinen vermittelt und es kommt in dessen Verlauf zu einer Anreicherung von zu transportierenden Proteinen auf der Vesikelmembran sowie einer Umhüllung mit assoziierten Proteinen,

dem „Coat“. Nach der Abknospung des Coated-Vesikels wird die Umhüllung entfernt, was für eine spezifische Fusion mit einem Zielkompartiment entscheidend ist.

### 1.1 Vesikulärer Proteintransport

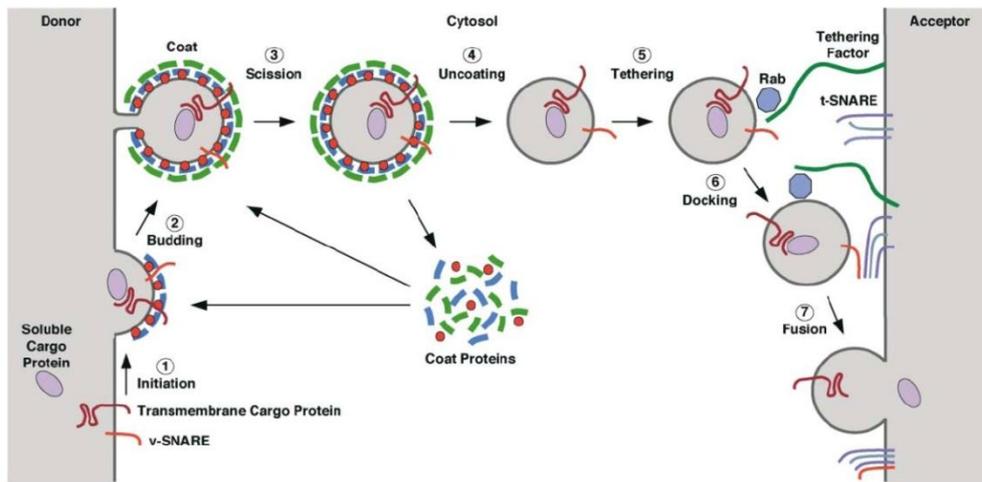
Eine zentrale Aufgabe beim intrazellulären, sekretorischen Transport von Proteinen sowie bei der Kommunikation zwischen Organellen übernehmen umhüllte Vesikel (Übersichtsartikel: Bonifacino and Lippincott-Schwartz 2003, Bonifacino and Glick 2004, Pucadyil and Schmid 2009). Mit ihrer Hilfe findet eine hoch spezialisierte Form des intrazellulären Transports statt, indem es auf und in den Vesikeln zu einer Konzentrierung der zu transportierenden Fracht (*cargo*) kommt. Vesikuläre Transporter wurden erstmalig im Jahre 1975 von Palade beschrieben [Palade 1975]. In den vergangenen Jahrzehnten wurden mehrere Transportsysteme umhüllter Vesikel identifiziert und drei Typen umhüllter Vesikel im Detail untersucht: Clathrinumhüllte Vesikel (*clathrin coated vesicle*, CCV), welche eine zentrale Rolle beim Transport des späten sekretorischen Sortierungsweges, im endozytischen Sortierungsweg und beim synaptischen Vesikelrecycling einnehmen, Coat-Protein Komplex I (COP-I) umhüllte Vesikel, welche am retrograden Transport im frühen sekretorischen Weg beteiligt sind und COP-II umhüllte Vesikel, welche den Proteinexport vom Endoplasmatischen Retikulum (ER) hin zum Golgi-Apparat vermitteln [Beck *et al.* 2009]. Zytosolische Hüllenproteine, wie Clathrin und die Adaptorporteinkomplexe (AP-Komplexe) sowie die Coat-Protein Komplexe I und II verbinden sich selbstständig zu einer polymeren Struktur, sind an der Deformation der Donormembran beteiligt und interagieren direkt mit den zu transportierenden Proteinen. Hüllenproteinkomplexe spielen eine duale Rolle: Sie verfügen einerseits über die Fähigkeit an Membranen zu binden und andererseits binden sie an die zu transportierenden membrangebundenen Proteine und vermitteln deren Konzentrierung auf Vesikeln.



**Abb. 1-1: Vesikulärer Transport des sekretorischen Weges in Säugerzellen.**

Die Transportwege werden durch Pfeile angezeigt. Die bekannten Orte der einzelnen Hüllenproteine sind farblich hervorgehoben: COP-II (blau), COP-I (rot) und Clathrin (orange). Die Zusammensetzung der Clathrinhüllen ist heterogen und besteht u. a. aus verschiedenen Adaptorproteinen. [Bonifacino und Glick 2004]

Damit sichergestellt ist, dass die Abknospung von umhüllten Vesikeln von einem Zellkompartiment oder einer spezifischen Membranregion stattfindet, ist eine Vielzahl von weiteren Faktoren an deren Entstehung und Abknospung beteiligt (vgl. Abb. 1-1). Integrale oder periphere Membranproteine stellen eine organellspezifische Plattform für die initiale Anlagerung von Hüllenproteinen dar. Die Anlagerung von Proteinen an eine Membran wird darüber hinaus von deren Phospholipidzusammensetzung beeinflusst. Eine Vielzahl von Zellkompartimenten weist eine charakteristische Zusammensetzung von Phosphatidylinositolphosphaten auf, die über eine spezifische Zusammensetzung von Kinasen und Phosphatasen aufgebaut und über deren Regulation gesteuert wird (Übersichtsartikel: Matteis und Godi 2004, Paolo und Camilli 2006, Santiago-Tirado und Bretscher 2011). Für die selektive Organellmembranbindung von vielen Proteinen, die an der Vesikeltransportmaschinerie beteiligt sind, spielen spezielle Bindungsstellen für Phosphatidylinositolphosphate eine wichtige Rolle.



**Abb. 1-2: Schritte der Vesikelentstehung, -abknospung und -fusion.**

(1) Membrangebundene Hüllkomponenten (blau) werden über eine Bindung an membranasoziierte GTPasen (rot) und/oder an spezifische Phosphatidylinositolphosphate an die Donormembran gebunden. (2) Von der Vesikelmembran entferntere Proteine (grün) binden während des Abknospungsprozesses (budding). (3) Die Abspaltung (*scission*) wird entweder direkt von den Hüllenproteinen oder von assoziierten Proteinen vermittelt. (4) Abstreifung der Hülle (*uncoating*). (5) Der „nackte“ Vesikel bewegt sich entlang des Zytoskeletts in Richtung der Akzeptormembran. Die Annäherung des Vesikels an die Akzeptormembran (*tethering*) geschieht durch eine Kombination von Rab-Proteinen und weiteren Anbindungsfaktoren. (6) Die Anbindung (*docking*) des Vesikels wird durch die Ausbildung eines v- und t-SNARE Vier-Helix-Komplexes vermittelt. (7) Dieser trans-SNARE-Komplex leitet die Vesikelfusion mit der Donormembran ein, in deren Verlauf die Transportproteine in das Akzeptorkompartiment übergehen. [Bonifacino und Glick 2004]

GTP-bindende Proteine (G-Proteine) spielen eine entscheidende Rolle in der Organisation des sekretorischen und endozytotischen Weges. Die überwiegende Zahl dieser G-Proteine sind Mitglieder der Rab-Familie (*Ras-related in brain*, Rab), welche über eine C-terminale Prenylgruppe an eine Membran binden können. Die Rekrutierung einiger Effektor- und Hüllenproteine wird durch eine zweite Klasse von G-Proteinen vermittelt, welche eine charakteristische, N-terminale amphipathische Helix besitzen. In Abhängigkeit von der Bindung von GTP können diese G-Proteine mit Hilfe ihrer amphipathischen Helix in Membranen verankert werden. Die am besten charakterisierten Mitglieder der Familie der ADP-Ribosylierungsfaktoren (*ADP-ribosylation factor*, ARF) sind Sar 1, Arf 1 und Arf 6 [Gillingham und Munro 2007]. Eine Schlüsselfunktion beim Transport von umhüllten Vesikeln nehmen die GTPasen Arf 1 und Sar 1 ein. Arf 1 ist an der Bildung von COP-I-Vesikeln sowie an der Bildung von CCVs am TGN, Sar 1 an der Bildung von COP-II-Vesikeln am ER und Dynamin an der Bildung von CCVs an der Plasmamembran beteiligt. Diese GTPasen vermitteln die Konzentrierung von Proteinen auf den Vesikeln, sind sowohl an deren Entstehung als auch an deren Abknospung von der Donormembran beteiligt und erhöhen die Genauigkeit und Effizienz der Vesikelbildung. Darüber hinaus ermöglicht das hohe Protein-zu-Lipid-Verhältnis der Vesikel

einen hochselektiven Proteintransport [Pucadyil und Schmid 2009]. Neben den bis hierhin beschriebenen kleinen GTPasen spielt das große G-Protein Dynamin am Ende der Vesikelbildung eine entscheidende Rolle. Das Mechanoenzym Dynamin lagert sich an den Membranstil des abknospenden Vesikels an und vermittelt eine Membranabschnürung und in dessen Folge die Vesikelfreisetzung [Danino und Hinshaw 2001, Ferguson und De Camilli 2012].

Rab-Proteine kontrollieren die räumliche und zeitliche Bildung von Vesikeln, den Annäherungs- und Anbindungsprozess zwischen Vesikeln und einer Akzeptormembran sowie die Bindung zwischen Vesikeln und dem Zytoskelett in einer Vielzahl von vesikulären Transportprozessen (Übersichtsartikel: Barr und Lambright 2010). Durch ihre Interaktion mit spezifischen Effektorproteinkomplexen erhöhen sie die Präzision des vesikulären Transports und spielen eine wichtige Rolle bei der Identifizierung des Zielorgans. Darüber hinaus fungieren Rab-Proteine, wie alle G-Proteine, als „molekulare Schalter“, indem sie zwischen einer GTP-gebundenen aktiven und einer nicht GTP-gebundenen inaktiven Form wechseln.

Die Aktivierung von G-Proteinen wird durch den Austausch von GDP gegen GTP und ihre Inaktivierung durch die Hydrolyse von GTP erzielt. Für eine zeitliche Kontrolle des aktiven bzw. inaktiven Zustands von Rab-Proteinen sind spezielle Regulatoren notwendig: GDP-GTP Austauschfaktoren (*GDP-GTP exchange factors*, GEFs) regulieren deren Aktivierung und GTPase aktivierende Proteine (*GTP hydrolysis activating proteins*, GAPs) oder GDP Dissoziationsinhibitoren (*GDP dissociation inhibitors*, GDI) regulieren ihre Inaktivierung. Die Anbindung von GEFs an eine bestimmte Membran führt zu einer spezifischen Aktivierung von Rab-Proteinen, dies führt beispielsweise im sekretorischen Weg zu einer definierten Proteinzusammensetzung einer Vesikelhülle oder Membrandomäne. GAPs oder GDIs definieren das Zeitfenster, welches für spezifische Protein-Protein-Interaktionen und somit für einen spezifischen Vesikelentstehungs-, Transport- oder Fusionsprozess sowie die definierte Proteinzusammensetzung eines Vesikels bzw. einer Membrandomäne benötigt wird.

Die Anbindung von Transportvesikeln an die Zielmembran wird von Rab-Proteinen vermittelt und durch die spezifischen Paarungen von SNARE-Proteinen, die sich sowohl auf der Transportvesikelmembran als auch auf der Zielmembran befinden und zu einem Vier-Helix-Komplex zusammenfinden, wird die Fusion des Vesikels mit der Zielmembran eingeleitet (Übersichtsartikel: Jahn und Scheller 2006).

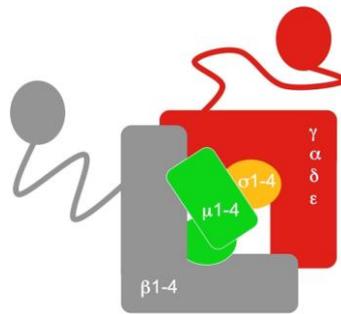
## 1.2 Adaptorproteinkomplexe

Die zuerst identifizierten AP-Komplexe waren AP-1 und AP-2, die aus clathrinumhüllten Vesikeln aufgereinigt wurden. Aufgrund ihrer Fähigkeit *in vitro* den Aufbau von

Clathrinkäfigen zu fördern, wurden sie auch als „*assembly polypeptides*“ oder Adaptine bezeichnet [Pearse und Robinson 1984]. Später konnten durch cDNA-Datenbankrecherchen zwei weitere Mitglieder der Adaptorproteinkomplex (AP-Komplex)-Familie identifiziert werden: AP-3 und AP-4 [Pevsner *et al.* 1994, Hirst *et al.* 1999]. Die genauen Funktionen der AP-Komplexe konnten bis heute nur teilweise aufgeklärt werden, wobei der AP-2 das am besten charakterisierte Mitglied dieser Komplexfamilie ist. AP-1 und AP-2 sind die klassischen, clathrinassoziierten AP-Komplexe, die eine Bindung zwischen Clathrin, spezifischen Membranproteinen und Lipiden vermitteln. Darüber hinaus binden sie an zusätzliche Proteine (*accessory proteins*), die an der Hüllenbildung sowie deren Abbau beteiligt sind, wie AP 180, Epsin und Auxilin (Übersichtsartikel: Robinson und Bonifacino 2001, Schu 2001, Nakatsu und Ohno 2003).

Sowohl AP-3 als auch AP-4 werden nicht zu den klassischen clathrinbindenden AP-Komplexen gezählt. Der AP-3 weist ebenfalls eine Clathrin-Bindungsdomäne auf [ter Haar *et al.* 2000], über deren Funktion jedoch noch Unklarheit herrscht. Während er zunächst nicht in CCV-Isolationen nachgewiesen werden konnte [Robinson 2004], konnte in neueren Proteomanalysen eine Cofraktionierung von AP-3 mit CCVs gezeigt werden [Borner 2006]. Später konnten Borner *et al.* aus der humanen, epithelialen Tumorzelllinie HeLa AP-3 gebundene CCVs isolieren [Borner *et al.* 2007]. Eine mögliche Erklärung für die späte Identifikation von AP-3 in CCVs könnte darin liegen, dass sowohl clathrinassoziierte als auch clathrinfreie vesikuläre Population existieren [Peden *et al.* 2004]. Andererseits besteht die Möglichkeit, dass die AP-3 Bindung an Clathrin sehr schwach ist oder die Menge von AP-3, die an Clathrin bindet, zelltypspezifische Unterschiede aufweist [Newell-Litwa *et al.* 2007]. AP-4 besitzt weder eine klassische Clathrinbindungsdomäne noch konnten spezifische Interaktionen mit Clathrin nachgewiesen werden.

Mit Hilfe von Sequenzanalysen, Immunolokalisationen und RNAi knock down Experimenten von Proteinen mit bis dahin nicht näher bekannter Funktion haben im Jahre 2011 Hirst *et al.* die Existenz eines weiteren AP-Komplexes, dem AP-5, postuliert [Hirst *et al.* 2011]. Alle AP-Komplexe sind Heterotetramere und setzen sich aus jeweils vier verschiedenen Untereinheiten, den Adaptinen, zusammen (vgl. Abb. 1-3).



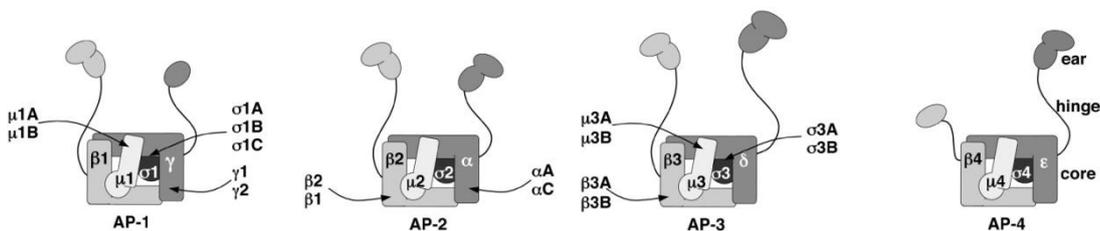
**Abb. 1-3: Schematische Darstellung der heterotetrameren AP-Komplexe.**

Diese sind aus jeweils vier Untereinheiten aufgebaut.

Jeder AP-Komplex besteht aus zwei großen Untereinheiten mit jeweils einem Molekulargewicht von 100 bis 140 kDa ( $\gamma, \beta 1$ ;  $\alpha, \beta 2$ ;  $\delta, \beta 3$  und  $\epsilon, \beta 4$  für die AP-Komplexe 1 bis 4). Deren aminoterminalen Enden bilden jeweils eine globuläre Domäne aus, die so genannte „trunk“ (Rumpf)-Domäne, welche über eine unstrukturierte „hinge“ (Scharnier)-Domäne mit der carboxyterminalen „ear“ (Ohr)-Domäne verbunden ist. Jeweils eine der beiden großen Untereinheiten ( $\gamma 1$ ,  $\alpha$ ,  $\delta$  und  $\epsilon$  für AP-1 – 4) weist eine begrenzte Sequenzhomologität auf, während jeweils die zweite große Untereinheit ( $\beta 1 – 4$  für AP-1 – 4) die höchste Sequenzhomologität zwischen den AP-Komplexen aufweist. Trotz der Sequenzunterschiede von  $\gamma$ - und  $\alpha$ -Adaptinen bilden sie homologe Tertiärstrukturen aus [Heldwein *et al.* 2004, Collins *et al.* 2002]. Neben diesen Adaptinen besteht jeder AP-Komplex aus einer mittleren Untereinheit mit einem Molekulargewicht von etwa 50 kDa ( $\mu 1-4$ ) und einer kleinen Untereinheit mit einem Molekulargewicht von etwa 20 kDa ( $\sigma 1-4$ ). Zusammen mit der Untereinheit mittlerer Größe und der kleinen Untereinheit bilden die beiden Rumpfdomänen eines AP-Komplexes dessen Kern (*core*) (vgl. Abb. 1-4). Jeweils eine der großen Untereinheiten jedes AP-Komplexes ( $\gamma$ ,  $\alpha$ ,  $\delta$  bzw.  $\epsilon$ ) vermittelt die Anbindung an die Zielmembran. Über eine Clathrinbindungsdomäne, die sogenannte Clathrin Box, in der zweiten großen Untereinheit ( $\beta 1-3$ ) der AP-Komplexe 1 bis 3 findet eine Anbindung des AP-Komplexes an Clathrin statt [Brodsky *et al.* 2001]. Der AP-4 weist keine Clathrin Box auf, sodass keine Clathrinbindung stattfinden kann [Boehm und Bonifacino 2001, Dell' Angelica *et al.* 1999]. Die Mittlere Untereinheit ( $\mu 1-4$ ) ist für die Erkennung von zu transportierenden Proteinen (*Cargo*) verantwortlich. Jede von ihnen erkennt Tyrososinsortierungssignale im zytosomatischen Abschnitt von zu transportierenden Membranproteinen (Bonifacino und Traub 2003). Den kleinen Untereinheiten ( $\sigma 1-4$ ) wird die Aufrechterhaltung der Komplexstabilität zugeschrieben.

### 1.2.1 Adaptinisoformen

Für die Hälfte der Adaptine, aus denen die AP-Komplexe aufgebaut sind, wurden bei Säugetieren Isoformen identifiziert (vgl. Abb. 1-4), welche durch unterschiedliche Gene kodiert werden. Sowohl für den AP-5 als auch den AP-4 sind keine Isoformen bekannt. Für den AP-3 sind jeweils zwei Isoformen des  $\beta$ 3-Adaptins ( $\beta$ 3A und  $\beta$ 3B), des  $\mu$ 3-Adaptins ( $\mu$ 3A und  $\mu$ 3B) sowie des  $\sigma$ 3-Adaptins ( $\sigma$ 3A und  $\sigma$ 3B) bekannt. Der AP-2 besitzt zwei Isoformen des  $\alpha$ - ( $\alpha$ A und  $\alpha$ B) und zwei des  $\beta$ -Adaptins ( $\beta$ 1 und  $\beta$ 2). Die meisten Isoformen sind für den AP-1 bekannt:  $\gamma$ 1 und  $\gamma$ 2 für das  $\gamma$ -,  $\mu$ 1A und  $\mu$ 1B für das  $\mu$ 1- und  $\sigma$ 1A,  $\sigma$ 1B und  $\sigma$ 1C für das  $\sigma$ 1-Adaptin. Durch die Kombination der verschiedenen Isoformen können bis zu zwölf AP-1-, vier AP-2-, acht AP-3-Komplexe und ein AP-4-Komplex mit unterschiedlichen Funktionen gebildet werden [Mattera *et al.* 2011].



**Abb. 1-4: Zusammensetzung der AP-Komplexe 1 bis 4.**

Für jeden AP-Komplex ist schematisch seine Struktur dargestellt. Entsprechend der jeweiligen bekannten Adaptinisoformen sind deren mögliche Kombinationen zu einem der vier AP-Komplexe gezeigt. [Mattera *et al.* 2011]

### 1.2.2 Bindungsstellen von Sortierungssignalen

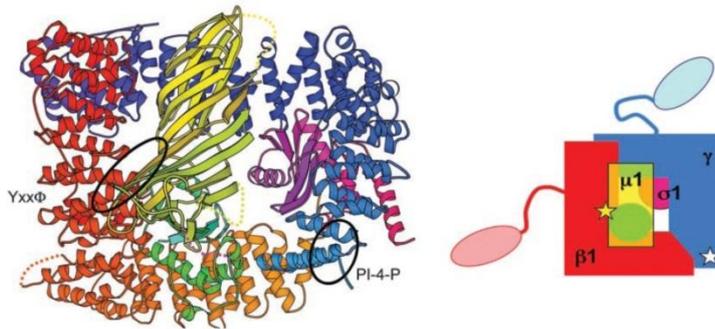
Die Sortierung von Transmembranproteinen zu unterschiedlichen interzellulären Kompartimenten ist abhängig von spezifischen Sortierungssignalen, welche sich in den zytosolischen Domänen der zu transportierenden Proteine befinden. Unter den bekannten Sortierungssignalen bilden die so genannten tyrosinbasierten Sortierungssignale ( $Yxx\Phi$ ) eine der am besten charakterisierten Gruppe. Sie werden von spezifischen Bindungsstellen im jeweiligen  $\mu$ -Adaptin der AP-Komplexe 1 bis 4 erkannt und entsprechen der folgenden Aminosäuresequenz:  $xxxYxx\Phi$ , wobei x eine beliebige, Y Tyrosin und  $\Phi$  eine Aminosäure mit einer sperrigen, hydrophoben Seitenkette, wie Leucin, Isoleucin, Methionin, Phenylalanin oder Valin, darstellt. Entscheidend für die Bindung dieser Sortierungssignale an ein  $\mu$ -Adaptin sind die Aminosäuren Y und  $\Phi$ .

Neben den tyrosinbasierten Sortierungssignalen ist eine weitere Gruppe bekannt, die konservierten dileucinbasierten Sortierungssignale, welche die folgende Aminosäuresequenz aufweisen:  $(D/E)xxxL(L/I)$ . Für das homologe  $\sigma$ 2 des AP-2 liegen hierzu Kristallstrukturdaten vor, die zeigen, dass diese Bindungsstelle in diesem Adaptin liegt.

Aus Bindungsstudien im *Yeast Three-Hybrid* (Y3H)-System ist bekannt, dass Dileucin-signale an die Adaptinhemikomplexe  $\gamma$ - $\sigma$ 1,  $\alpha$ - $\sigma$ 2 und  $\delta$ - $\sigma$ 3 binden [Janvier *et al.* 2003, Chaudhuri *et al.* 2007, Doray *et al.* 2007] Darüber hinaus haben Lee *et al.* Hinweise auf kooperative Effekte zwischen den Bindungsstellen für tyrosin- und dileucinbasierende Signale gefunden [Lee *et al.* 2008].

Mit Hilfe von Mutationen in den Hemikomplexen konnte *in vitro* gezeigt werden, dass Dileucinmotive an ähnliche Stellen in den AP-Komplexen 1, 2 und 3 binden. Die Bindungsspezifität ist, analog zu den tyrosinbasierten Sortierungsmotiven, abhängig von der Aminosäuresequenz der Sortierungssignale sowie von der jeweiligen Bindungsstelle in den einzelnen AP-Komplexen. Durch eine Kombination der verschiedenen  $\gamma$ - und  $\sigma$ 1-Adaptinisformen des AP-1-Komplexes konnte *in vitro* gezeigt werden, dass die Affinität eines (D/E)xxxL(L/I)-Signals in Abhängigkeit mit dem Zusammenspiel unterschiedlicher Adaptinisformen steht. Mattera *et al.* konnten zeigen, dass AP-1  $\gamma$ 1- $\sigma$ 1A,  $\gamma$ 1- $\sigma$ 1B und  $\gamma$ 1- $\sigma$ 1C Hemikomplexe alle (D/E)xxxL(L/I)-Signale erkennen, jedoch  $\gamma$ 2- $\sigma$ 1A und  $\gamma$ 2- $\sigma$ 1B Hemikomplexe eine Spezifität für bestimmte Signale besitzen [Mattera *et al.* 2011]. Dies zeigt, dass abhängig von der AP-Komplexzusammensetzung eine gewisse Spezifität für bestimmte Sortierungssignale besteht und bietet die Möglichkeit einer spezifischen und effizienten interzellulären Proteinsortierung. Die exakte Lokalisation der Bindungsstelle sowie der genaue Mechanismus der Interaktion zwischen Dileucinmotiven und der Bindungsstelle sind für die AP-1- und AP-3-Komplexe noch nicht bekannt.

Sowohl für den AP-1 als auch für den AP-2 sind neben Proteinbindungsmotiven Phosphatidylinositolphosphat-Bindungsmotive bekannt, über die die AP-Komplexe spezifisch an Membranen bestimmter Kompartimente binden können. Im Kern des AP-2 befinden sich mindestens zwei PI-4,5-P<sub>2</sub> Bindungsstellen, welche auf der C-terminalen Domäne des  $\mu$ 2-Adaptins sowie dem aminoterminalen Ende des  $\alpha$ -Adaptins liegen [Collins *et al.* 2002]. Aus Röntgenkristallstrukturanalysen des AP-1 ist bekannt, dass nur das  $\gamma$ -Adaptin eine PI-4-P Bindungsstelle besitzt [Heldwein *et al.* 2004].



### Abb. 1-5: Struktur des AP-1-Komplexes.

Im Strukturmodell (links) sind die Bindestellen für PI-4-P im  $\gamma$ -Adaptin sowie für Yxx $\Phi$ -Motive im  $\mu$ 1-Adaptin durch Ovale markiert. Die Färbung entspricht der des schematischen AP-1 Modells (rechts) [Heldwein *et al.* 2004].

### 1.2.3 Clathrin und clathrinumhüllte Vesikel

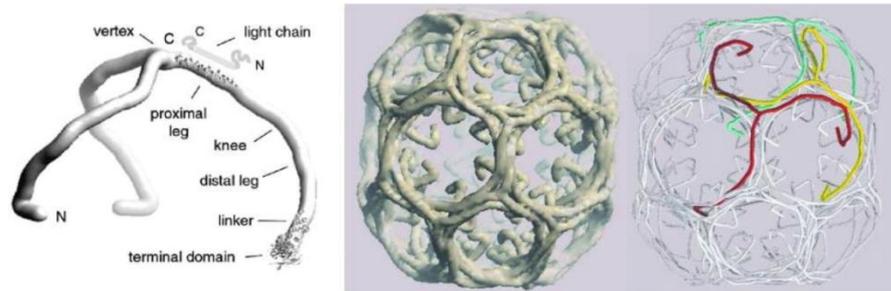
Clathrinumhüllte Vesikel (*clathrin coated vesicles*, CCV) vermitteln einen Weg der Endozytose von der Plasmamembran und sind darüber hinaus an der Proteinsortierung zwischen dem *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) und endosomalen Kompartimenten beteiligt (Übersichtsartikel: Young 2007, Mills 2007, McPherson 2010). Namensgebend für diese Vesikel ist das Protein Clathrin, welches den Hauptbestandteil der Vesikelhülle ausmacht.

Die Clathrinhülle ist eine dreidimensionale Anordnung von so genannten Triskelien. Jedes Triskelium setzt sich aus drei schweren Ketten (*clathrin heavy chain*, Chc) von 190 kDa, welche über einen Knotenpunkt (*vertex*) miteinander verbunden sind, und drei leichten Ketten (*clathrin light chain*, Clc) von 25 kDa zusammen. Die löslichen Triskelien können zu einem gleichmäßigen, polyedrischen Gitter polymerisieren, wobei sich jeweils der Knotenpunkt einer Triskelieneinheit auf einer Polyederecke befindet und die Clathrinketten die Polyederkanten bilden.

Chc-Proteine können in drei Bereiche unterteilt werden: Eine nahe (*proximale*), eine ferne (*distal*) und eine N-terminale Domäne (vgl. Abb. 1-6). Der Knotenpunkt eines Triskels bildet zusammen mit den nahen Domänen den so genannten „Hub“, welcher bei der Trimerisation von schweren Ketten, der Bindung der leichten Ketten sowie der Ausbildung und Stabilität der Käfigstruktur eine wichtige Aufgabe spielt. Die N-terminalen Domänen der schweren Ketten weisen eine  $\beta$ -Propellerstruktur auf, über die sie an eine Vielzahl von Peptidmotiven mit unterschiedlicher Spezifität binden können. Dies bietet die Möglichkeit für eine Vielzahl von Adaptor- und Membranproteinen an die Clathrinhülle zu binden. Diese Bindungsdomänen sind in das Innere des Polyeders gerichtet und ermöglichen einen Kontakt zu den Adaptorproteinen, welche Clathrin an die Membran rekrutieren, die Anbindung der Clathrinhülle an die Membran vermitteln

und mit Transportproteinen interagieren können. Die Anbindung von Proteinen an diese Bindungsdomäne findet über konservierte „Clathrin-Box“ Motive statt.

Es existierten zwei Isoformen des Clc-Proteins, welche sehr ähnliche Funktionen übernehmen, jedoch lediglich eine Sequenzhomologität von 60% aufweisen. Ihre Aufgaben liegen in der Bindung und Regulierung der Trimerisation der strukturgebenden schweren Ketten. Sie binden an die nahen Domänen der schweren Ketten, sind auf der Oberfläche des Clathrinkäfigs lokalisiert, stützen vermutlich die „Beine“ der Triskelia und stabilisieren auf diese Weise den Trimerisationsprozess [Young 2007].



**Abb. 1-6: Struktur eines Clathrinkäfiges.**

Schematische Darstellung eines Clathrintriskelions (links), die Struktur eines Clathrinkäfigs (Mitte) und die Position eines Triskelions in einem Clathrinkäfig (rechts) [Kirchhausen 2000].

*In vitro* besitzt gereinigtes Clathrin bei einem leicht sauren pH die Fähigkeit, spontan polyedrische Strukturen auszubilden [Kirchhausen und Harrison 1981]. Unter physiologischen Bedingungen werden für die Polymerisation jedoch Adaptorproteine benötigt. Im Gegensatz zu den *in vitro* Strukturen ist die sich *in vivo* bildende Clathrinhülle kleiner und deren polyedrische Gestalt regelmäßiger [Pearse und Robinson 1984].

Die an der endozytotischen und TGN/endosomalen Proteinsortierung beteiligten CCVs sind keine statischen, sondern dynamische Strukturen. Durch *Fluorescence Recovery after Photobleaching* (FRAP) Experimente konnte von Wu *et al.* gezeigt werden, dass es unabhängig voneinander zu einem schnellen und dynamischen Austausch von Clathrin und Adaptoren gegen zytosolische Proteine kommt [Wu *et al.* 2003]. Darüber hinaus konnte von Hinrichsen *et al.* gezeigt werden, dass die Dekoration einer Membrandomäne mit Adaptorproteinkomplexen nicht zu einer Krümmung der Membran führt [Hinrichsen *et al.* 2006]. Diese Beobachtung weist darauf hin, dass Clathrin für die Krümmung einer Membrandomain notwendig ist. Darüber hinaus findet durch Clathrin eine Stabilisierung von Proteinen wie Epsin statt, welche eine Membrandeformation vermitteln.

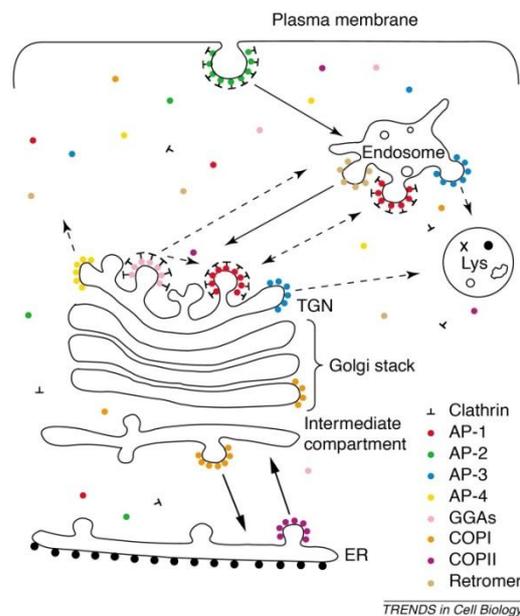
#### 1.2.4 Funktionen und Lokalisierung der AP-Komplexe

„Knock-out“ Mausmodelle haben gezeigt, dass die AP-Komplexe eine unterschiedliche Relevanz für Entwicklung und Lebensfähigkeit von Säugetieren besitzen. Sowohl AP-4

## 1.2 Adaptorproteinkomplexe

als auch AP-3-defiziente Mäuse sind lebensfähig und besitzen einen neuronalen Phänotyp [Matsuda *et al.* 2008, Newell-Litwa *et al.* 2009]. Der AP-4 ist am Transport vom TGN zu Endosomen beteiligt. Der AP-3 ist hauptsächlich endosomal lokalisiert und am frühen endosomal zu lysosomalen Transport beteiligt [Reusch *et al.* 2002, Peden *et al.* 2004]. AP-2-defiziente Mäuse sind über die Geburt hinaus nicht lebensfähig [Mitsunari *et al.* 2005]. Der AP-2 ist an der Plasmamembran lokalisiert und ist entscheidend an der clathrinvermittelten Endozytose beteiligt. Auch eine AP-1-Defizienz ist bei Mäusen letal. Der Zeitpunkt der *in utero* Letalität ist hier abhängig von der Wahl des ausgeschalteten Adaptins [Zizioli *et al.* 1999, Meyer *et al.* 2000]. Dieser AP-Komplex ist sowohl am TGN als auch an Endosomen lokalisiert und vermittelt den clathrinabhängigen vesikulären Transport vom TGN zu frühen Endosomen.

Die Letalität AP-1- und AP-2-defizienter Mäuse zeigt, dass diese AP-Komplexe essentiell für die zelluläre Proteinsortierung sind, während AP-3 und AP-4 voraussichtlich an spezialisierten Sortierungswegen beteiligt sind, die für die Lebensfähigkeit von Säugtieren entbehrlich sind.



### Abb. 1-7: Hüllenproteine und Transportwege.

Gestrichelte Linien zeigen Transportwege von Transportproteinen an, deren vollständige Aufgaben noch nicht bekannt sind: Z. B. ist nicht bekannt, ob AP-1 am TGN zu Endosomen und/oder am Endosomen zu TGN Transportwegen beteiligt ist. Abkürzungen: ER: Endoplasmatisches Retikulum, Lys: Lysosom, TGN: trans-Golgi-Netzwerk. [Robinson 2004].

Die genaue Lokalisation des AP-5 ist noch nicht bekannt. Für diesen AP-Komplex wird eine Lokalisation an späten Endosomen vorausgesagt und eine Beteiligung am Transport von diesen zu anderen Membranorganellen. Voraussichtlich interagiert das fünfte

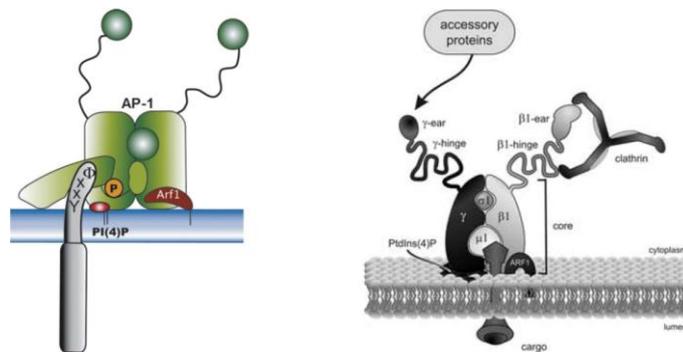
---

Mitglied der AP-Komplexfamilie nicht mit Clathrin. Die genaue Struktur und Funktion von AP-5 ist nicht bekannt [Hirst *et al.* 2011].

### 1.2.5 AP-1 vermittelte Vesikelbildung

Der Mechanismus, der zur Bildung von clathrinumhüllten Vesikeln (CCV) führt, wurde in den vergangenen Jahrzehnten für die AP-2 vermittelte Endozytose ausführlich untersucht. Aufgrund der leichten experimentellen Zugänglichkeit ist er der am besten verstandene, von AP-Komplexen vermittelte Transportweg. Da im Rahmen dieser Arbeit der AP-1 vermittelte vesikuläre Transport von zentraler Bedeutung ist, wird im Folgenden nur auf die weitaus weniger untersuchte AP-1 vermittelte Vesikelbildung eingegangen.

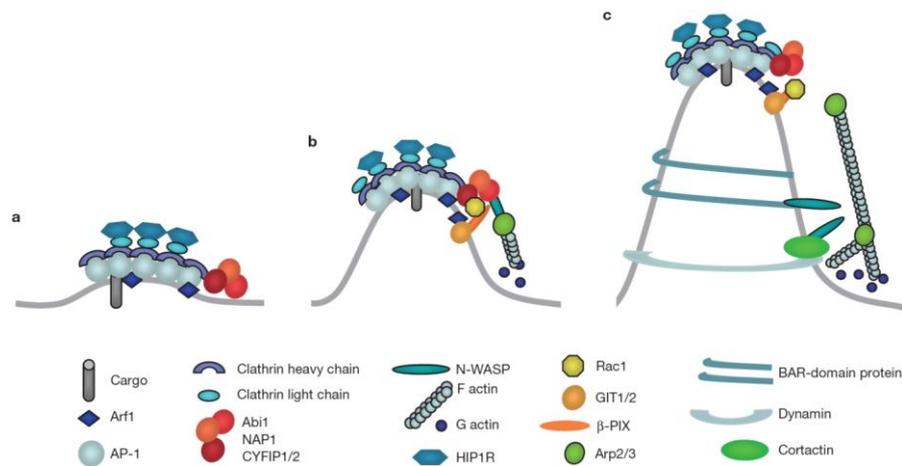
Bei der AP-1 vermittelten Bildung von CCVs am *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) besitzt die kleine GTPase Arf 1 eine zentrale Funktion bei der Rekrutierung der AP-1/Clathrinhülle, und im Speziellen für die selektive Anbindung von AP-1, an die Membran. Darüber hinaus ist bekannt, dass sowohl PI-4-P als auch Cargo-Proteine hierfür benötigt werden. Der genaue Mechanismus, welcher zu einer spezifischen Anlagerung von AP-1 an eine Membrandomäne führt, sowie die Funktion der Cargo-Proteine sind bis heute nicht abschließend geklärt. Neben anderen identifizierten Bonifacino und Traub um die 20 mit Clathrin assoziierten Sortierungsproteine [Bonifacino und Traub 2003] und die Arbeitsgruppe von Hoflack etwa 40 Proteine, die *in vitro* mit AP-1-umhüllten Membranen assoziieren [Baust *et al.* 2006]. Deren genaue Funktion muss jedoch noch bestimmt werden. Voraussichtlich wird die Bildung von AP-1-haltigen Vesikeln durch die Membrananbindung von Arf 1 und dessen Aktivierung eingeleitet, indem Arf 1 durch einen Brefeldin A (BFA)-sensitiven GEF in seine GTP-gebundene, aktive Form überführt wird. Arf 1-GTP vermittelt die Konzentrierung von speziellen Proteinen auf der Membrandomäne und bildet so eine hochaffine Bindungsstelle für AP-1. Durch die Bindung an Sortierungssignale (vgl. 1.2.2) in der zytoplasmatischen Domäne von membranverankerten Proteinen wird vermutlich die Rekrutierung von AP-1 an die Membran eingeleitet. Die Interaktion von AP-1 mit Sortierungssignalen führt zu einer Konformationsänderung der Kerndomäne dieses AP-Komplexes, wodurch die Bindung an Arf 1-GTP verstärkt wird.



**Abb. 1-8: AP-1-Membrananbindung.**

Links ist die durch Arf 1 und tyrosinbasierte, sortierungssignaltragende (YXXΦ) Membranproteine vermittelte Membrananbindung dargestellt. Die Erkennung von YXXΦ-Signalen durch AP-1 ist nur bei einer simultanen PI-4-P-Bindung möglich. [Krauß und Haucke 2007] Rechts sind darüber hinaus die Interaktionen der AP-1 Scharnier- und Ohrdomänen mit assoziierten Proteinen (accessory proteins) und Clathrin dargestellt. [McPherson und Ritter 2005]

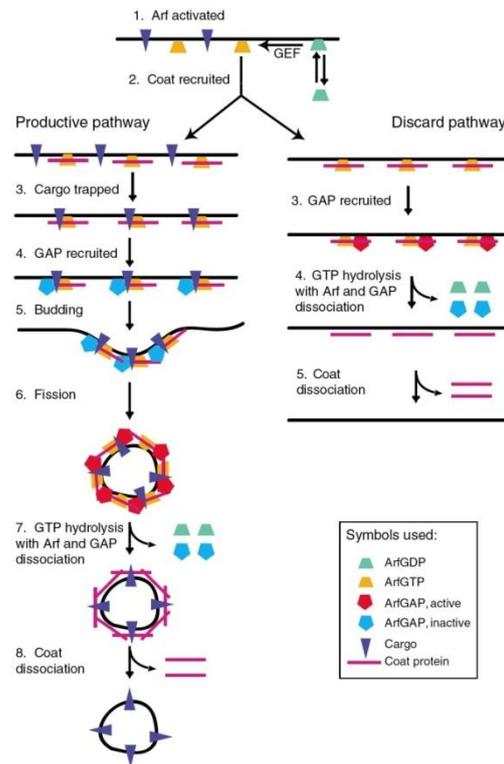
Durch die stabile Assoziation zwischen AP-1 und Arf 1-GAP wird vermutlich die Zeit bereitgestellt, die für die Rekrutierung von Clathrin sowie die Konzentrierung von Cargo-Proteinen benötigt wird. Membrangebundene Proteine mit zytoplasmatischen Sortierungssignalen im Zusammenspiel mit Arf 1-GTP stellen voraussichtlich eine minimale Maschinerie für die AP-1-Membrananbindung dar [Lee *et al.* 2008]. Die Membrananbindung von AP-1 wird darüber hinaus durch das in der TGN-Membran angereicherte Phosphoinositolphosphat PI-4-P beschleunigt. Arf1-GTP aktiviert PI-4-P-Kinasen [Anitei *et al.* 2010], die zu einer Erhöhung der PI-4-P-Konzentration in der Membrandomäne führen [Crottet *et al.* 2002, Wang *et al.* 2003, Nie und Randazzo 2006, Gillingham und Munro 2007]. In Abb. 1-9 wird ein Modell von Anitei *et al.* zur Biogenese von AP-1/CCVs gezeigt.



**Abb. 1-9: Modell der Biogenese von AP-1/CCVs.**

(a) Arf 1-abhängige Rekrutierung von Hüllenproteinen sowie Proteinen, die für die Aktinpolymerisation notwendig sind. Durch die Arf 1-Aktivierung werden AP-1 und Clathrin sowie der CYFIP-Abi-NAP 1-Komplex an die TGN-Membran rekrutiert. HIP 1R bindet an die leichte Kette von Clathrin und verhindert möglicherweise eine Aktinpolymerisation in diesem Stadium der Vesikelbildung. (b) Rac 1-abhängige Ausbildung von tubulären Strukturen. Rac 1 wird durch seinen GEF  $\beta$ -PIX, welcher einen Komplex mit Arf 1-GAP GIT 1 und/oder GIT 2 bildet, aktiviert und bindet an CYFIP. Dies führt zu einer N-WASP-abhängigen Aktivierung von Arp 2/3, durch die die Aktinpolymerisation eingeleitet wird. (c) Ausbildung tubulärer Strukturen. BAR-domänenproteine, Dynamin 2 und Cortactin binden an tubuläre Membranen. Diese Moleküle können an N-WASP binden und auf diese Weise die Arp 2/3-vermittelte Aktinpolymerisation aufrechterhalten. [Anitei *et al.* 2010]

Durch die GTP-Hydrolyse von aktiviertem Arf 1 wird die Bildung eines Vesikels unterbrochen. Diese kann u. a. durch das Arf-GAP 1 geschehen, von dem eine Lokalisation mit dem Golgi-Apparat bekannt ist. Untersuchungen in Hefe, in denen festgestellt wurde, dass Arf-GAP 1 vor allem an Membranen mit einer hohen Krümmung bindet [Mesmin *et al.* 2007], weisen darauf hin, dass Arf-GAP 1 vor allem in Vesikeln aktiviert ist, die kurz vor der Abknospung stehen. Durch die späte Aktivierung von Arf-GAP 1 während der Vesikelentstehung wird Arf 1 vermutlich erst zu einem Zeitpunkt inaktiviert, zu dem die Ausbildung der Vesikelhülle abgeschlossen ist [Gillingham und Munro 2007]. Die Beteiligung von Arf-GAP 1 an der AP-1 vermittelten Vesikelbildung wird durch Studien von Rawet *et al.* untermauert, die eine Interaktion zwischen AP-1 und Arf-GAP 1 zeigen konnten [Rawet *et al.* 2010]. Die Arf-vermittelte Vesikelbildung ist in Abb. 1-10 noch einmal veranschaulicht.



**Abb. 1-10: Modell für die Arf-vermittelte Vesikelbildung.**

Das Schema beinhaltet die essentiellen Schritte, die nach dem klassischen Modell für den Arf 1-abhängige Membrantransportweg notwendig sind. [Nie und Randazzo 2006]

Die Bindung von Clathrin an AP-1 erfolgt jeweils über Bindungsstellen, die so genannte Clathrin Box, in den Scharnierdomänen der großen Adaptine. Im  $\beta$ -Adaptin bindet Clathrin an ein LLNLD-Motiv und im  $\gamma$ -Adaptin über LLDLL-Motive, welche *in vitro* eine Polymerisation der Käfigstruktur hervorrufen [Doray und Kornfeld 2001]. Die weiteren Schritte des Abknospungsprozesses von AP-1/CCVs sind bis heute nicht zusammenhängend verstanden. Vermutlich spielt die Aktivität der GTPase Dynamin hier eine wichtige Rolle. Die Ablösung der Hüllenproteine vom vollständig gebildeten AP-1/CCV erfolgt durch die Phosphorylierung des  $\beta$ 1-Adaptins, wodurch die Bindungsaffinität zu Clathrin aufgehoben wird [Wilde und Brodsky 1996, Ghosh und Kornfeld 2003]. Im weiteren Verlauf wird die Ablösung der Vesikelhülle durch das von Auxilin rekrutierte *Heat shock cognate protein 70* (Hsc 70) [Hannan *et al.* 1998] sowie die Dephosphorylierung des  $\mu$ 1-Adaptins durch die Phosphatase PP2A ausgelöst, in deren Folge dessen Affinität für Erkennungssignale abnimmt [Doray und Kornfeld 2001, Ricotta *et al.* 2008].

### 1.3 Assoziierte Adaptorproteine

Neben den heterotetrameren AP-Komplexen sind weitere Adaptorproteine bekannt, welche an der Proteinsortierung beteiligt sind. Eine Gruppe sind die monomeren GGAs (*Golgi-localized, gamma-ear containing, ADP-ribosylation factor-binding proteins*), wel-

che *in vivo* mit AP-1 kolokalisieren und *in vitro* an AP-1 binden [Bai *et al.* 2004] (Übersichtsartikel: Bonifacino 2004). In Säugern sind drei GGAs bekannt: GGA 1, GGA 2 und GGA 3. GGA 1 und GGA 3 nicht aber GGA 2 sind *in vivo* phosphoryliert und binden an Ubiquitin oder ubiquitinierte Proteine. Alle drei sind am Proteintransport vom TGN zu Endosomen beteiligt, ihre Funktionen sowie deren mögliche Redundanz sind *in vivo* nicht bekannt. In diesem Jahr wurde eine GGA „knock-out“ Studie veröffentlicht. GGA 1- sowie GGA 3-defiziente Mäuse sind lebensfähig und sie besitzen keinen ausgeprägten Phänotyp. Der „Doppel-knock-out“ von GGA 1 und GGA 3 ist bei 58% der Tiere letal. Eine GGA 2-Defizienz führt abhängig vom genetischen Hintergrund zu einer embryonalen oder neonatalen Letalität, jedoch wurden bei diesen Tieren keine histologischen Veränderungen festgestellt. Die Letalität zeigt, dass weder GGA 1 noch GGA 3 die Funktionen von GGA 2 kompensieren können. Die Funktionen des GGA 2 sind bis heute nicht bekannt. Eine Defizienz eines oder mehrerer GGAs führt zu keiner Veränderung der Menge der übrigen GGAs oder des AP-1, was auf keine wechselseitige Regulierung hindeutet [Govero *et al.* 2012].

Strukturell besitzen diese Proteine eine N-terminale VHS-Domäne, gefolgt von einer GAT-Domäne, eine verbindende Scharnierregion und eine C-terminale GAE-Domäne. Letztere ist homolog zur Ohrdomäne von  $\gamma$ -Adaptinen. Analog zu AP-1 werden GGAs aus dem Zytosol an das TGN rekrutiert, indem sie über die GAT-Domäne an Arf-GTP und PI-4-P binden. Die VHS-Domäne bindet an Dileucin-Sortierungsmotive (AC-LL), welche in zytoplasmatischen Bereichen von zu transportierenden Proteinen vorhanden sind, und vermittelt die Sortierung dieser Proteine in den sich bildenden clathrinumüllten Vesikeln. Die GAT-Domäne interagiert mit einer Vielzahl von assoziierten Proteinen, welche sowohl für die Bildung als auch die korrekte Sortierung von GGA-Vesikeln notwendig sind [Boman *et al.* 2000, Puertollano *et al.* 2001, Bonifacino 2004, Wang *et al.* 2007, Braulke und Bonifacino 2009].

### 1.3.1 Clathrin-assoziierte Sortierungs-Proteine (CLASPs)

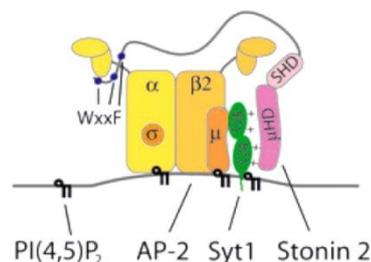
Neben den GGAs sind an der Entstehung von und der Proteinsortierung auf CCVs weitere, als clathrin-assoziierte Sortierungs-Proteine (CLASPs) bezeichnete, Adaptorproteine beteiligt, von denen ein Großteil direkt mit den heterotetrameren AP-Komplexen interagiert. Sie sind essentiell für die Proteinsortierung, Hüllenbildung und Clathrinrekrutierung, Membrankrümmung und Vesikelabknospung. Darüber hinaus sind sie an der Entfernung der Vesikelhülle von clathrinumhüllten Transportvesikeln beteiligt. Die Beteiligung der CLASPs an der CCV Bildung wurde für den AP-2 am umfassendsten untersucht, jedoch sind nur wenige Arbeiten bezüglich der AP-Komplexe 1 und 3 durchgeführt worden.

### 1.3 Assoziierte Adaptorproteine

---

Eine Gruppe von CLASPs, die vermutlich eine wichtige Aufgabe beim SV-Recycling besitzen, sind Stonine. Sie sind eine kleine Familie von konservierten, mit dem  $\mu$ 2-Adaptin verwandten Protein, die vermutlich als spezifische Proteinsortierungsadaptoren fungieren (Übersichtsartikel: Maritzen *et al.* 2010). Ihren Namen verdankt diese Proteinfamilie eines vor über 30 Jahren entdeckten temperaturabhängigen Phänotyps in *D. melanogaster*, der an das Verhalten von unter Alkoholeinfluss stehenden Tieren (im Englischen: *stoned*) erinnert [Grigliatti *et al.* 1973]. Wenig ist über die Lokalisierung und Funktion von Stonin 1 bekannt. Stonin 2 besitzt voraussichtlich eine verknüpfende Funktion zwischen AP-2, Eps 15 und dem calciumsensitiven Protein Synaptotagmin 1, welches auf synaptischen Vesikeln (SV) lokalisiert ist. Mutationen im Gen für Stonin 2 haben eine Beteiligung an der synaptischen Reizübertragung gezeigt. In Stonin 2 defizienten *D. melanogaster* ist eine Reduktion der Anzahl von SV sowie den SV-Proteinen Synaptotagmin zu erkennen.

Alle Stonine besitzen eine C-terminale, dem  $\mu$ -Adaptin homologe Domäne ( $\mu$ HD), die jedoch nicht in der Lage ist, wie dieses, tyrosinbasierte Sortierungssignale zu erkennen. Im Vergleich zu  $\mu$ -Adaptinen fehlt ihnen die N-terminale Domäne, über die sie mit  $\beta$ -Adaptinen verknüpft werden können und sind nicht in der Lage, Komplexe mit anderen Adaptinen zu bilden. Die N-terminale Domäne (NTD) trägt eine Reihe von Peptiden, über die eine Bindung an die Ohr-Domäne von AP-Komplexen (bekannt ist diese bis heute nur für AP-2) ausgebildet werden kann.



**Abb. 1-11: Beteiligung von Stonin 2 bei der SV-Bildung.**

Beteiligung von Stonin 2 an der Membranbindung von Synaptotagmin 1 (Syt1) bei der Bildung von synaptischen Vesikeln während der AP-2 vermittelten Endozytose. [Maritzen *et al.* 2010].

Stonin 2 ist zu einem gewissen Teil im Gehirn angereichert und konnte präsynaptisch durch eine direkte Assoziierung mit Proteinen der Synaptotagminfamilie lokalisiert werden. Physiologisch fungiert Stonin 2 vermutlich als ein synaptotagminspezifischer Adaptor für das SV-Recycling, indem er AP-2 bei der Erkennung und Rekrutierung von SV Proteinen wie Synaptotagmin 1 unterstützt und stärkt deren Anbindung an die Vesikelmembran [Maritzen *et al.* 2010].

Weitere Clathrin-assoziierte Sortierungs-Proteine, ihre Funktion, deren Bindungspartner sowie ihre gewebsspezifische Expression werden, soweit bekannt, in der nach-

folgende Tabelle in Kürze beschrieben. Die Auswahl ist auf CLASPs beschränkt, deren Funktion umfassend untersucht wurde. Aufgrund von fehlenden Informationen kann für den AP-1 zum jetzigen Zeitpunkt keine Gruppe von CLASPs genannt werden, deren Funktionen vergleichbar umfassend und gesichert bekannt wären.

**Tab. 1-1: Clathrin-assoziierte Sortierungs-Proteine.**

Clathrin-assoziierte Sortierungs-Proteine, die an der Endozytose und CCV-Bildung beteiligt sind. [McPherson und Ritter 2005]

Protein	Funktion	Bindungspartner	Gewebe
AAK 1	Ser/Thr Kinase, phosphoryliert $\mu$ 2-Adaptine, reguliert die Rekrutierung von YXX $\Phi$ -basierten Sortierungsmotiven	$\alpha$ -Ohr	Gehirn (präsyn.), Leber
Amphiphysin	Rekrutiert Dynamin/Synaptojanin an Membranen, vermittelt möglicherweise Membrankrümmung	Membran (elektrostatistisch), Dynamin, Synaptojanin, $\alpha$ -Ohr, Endophilin, Clathrin (terminale Domäne)	Amphiphysin 1: Gehirn (präsyn.)
AP 180	Clathrinmembranrekrutierung und Clathrinpolymerisation	PI-4,5-P <sub>2</sub> , Clathrin (terminale Domäne), $\alpha$ -Ohr	AP 180: Gehirn (präsyn.), CALM, ubiquitär (homolog)
Auxilin 1	Rekrutiert Hsc 70 an CCVs, aktiviert Uncoating-Aktivität von Hsc 70	Hsc 70, Clathrin (terminale Domäne), $\alpha$ -Ohr	Gehirn (präsyn.)
Auxilin 2/GAK	Rekrutiert Hsc 70 an CCVs, aktiviert Uncoating-Aktivität von Hsc 70, Ser/Thr Kinase, phosphoryliert $\mu$ 2-Adaptine	Hsc 70, Clathrin (terminale Domäne), $\alpha$ -Ohr	ubiquitär
$\beta$ -Arrestin	Clathrinrekrutierung	$\beta$ 2-Ohr, Clathrin (terminale Domäne), PI-4,5-P <sub>2</sub> , PI-3,4,5-P <sub>3</sub>	ubiquitär
Dynamin	GTPase, vermittelt Abknospung von CCVs	Amphiphysin, Endophilin, Intersectin, PACSIN, Inositolphosphate	Dynamin 1: Gehirn (präsyn.), Dynamin 2: ubiquitär Dynamin 3: Gehirn, Hoden

### 1.3 Assoziierte Adaptorproteine

Protein	Funktion	Bindungspartner	Gewebe
Endophilin	Reguliert Membranrekrutierung und Phosphataseaktivität von Synaptojanin, vermittelt möglicherweise Membrankrümmung	Membran (elektrostatistisch), Dynamamin, Synaptojanin, Amphiphysin	Endophilin 1: Gehirn (präsyn.), Endophilin 2: ubiquitär Endophilin 3: Gehirn, Hoden
Epsin	Clathrinmembranrekrutierung und Clathrinpolymerisation, vermittelt Membrankrümmung, Adaptor für ubiquinierte Proteine	PI-4,5-P <sub>2</sub> , α-Ohr, EH Domäne von Eps 15, Intersectin, Clathrin (terminale Domäne)	Epsin 1: Gehirn (präsyn.), Epsin 2: Gehirn Endophilin 3: Epitheliale Wunden
Eps 15	Regulation der Clathrinpolymerisation	α-Ohr, Epsin, AP 180, Synaptojanin 170	Gehirn (präsyn.)
Hip 1	Regulation der Clathrinpolymerisation durch Interaktion mit Clc, Cargoadaptor für AMPA Rezeptoren	Phospholipide, α-Ohr, Clathrin (terminale Domäne), Clc	im sich entwickelnden Gehirn
Hip 1r/Hip 2r	Regulation der Clathrinpolymerisation durch Interaktion mit Clc, Verknüpfung von CCPs mit Aktin	Phospholipide, Clc, Actin	Gehirn
Hsc 70	Uncoating GTPase	Auxilin, Auxilin 2/GAK	ubiquitär
Syndapin	Verknüpft mit Exozytose und dem Aktinzytoskeltt	Dynamamin, N-WASP	Syndapin 1: Gehirn
Stonin 2	Vermutlich: Regulation des SV-Recyclings	Eps 15, α-Ohr, μ2	Gehirn, Neuronen
Synaptojanin	Dephosphorylierung von Inositolphosphaten. Reguliert Hüllenstabilität.	α-Ohr, Amphiphysin, Endophilin, Intersectin, Syndapin	Gehirn (präsyn.)

Es sind nur die Hauptfunktion und Bindungspartner angegeben. Bei der gewebsspezifischen Expression bezieht sich das Gewebe mitunter auf die Anreicherung eines Proteins in diesem. AAK 1, adapter associated kinase; AP 180, adapter protein 180; CALM, cathrin assembly lymphoid myeloid leukemia; CCPs, cathrin-coated vesicles; GAK, cyclin G-associated kinase, Hsc 70, heat shock cognate 70; Hip, huntingtin-interacting protein; Clc, clathrin light chain; Präsyn.: präsynaptisch.

## 1.4 Adaptorproteinkomplexvermittelter Transport

### 1.4.1 AP-Komplexe in der epithelialen polaren Sortierung

Die Ausbildung von Zellpolarität ist ein komplexer, aber viel untersuchter Prozess, der in verschiedenen Zelltypen wie Epithelzellen oder Neuronen studiert wurde. Epithelzellen besitzen Aufgaben, welche für das Überleben multizellulärer Organismen unabdingbar sind. Allen Zellen dieses Typs gemeinsam ist ihre Eigenschaft der Polarität: Sie weisen einen äußeren, apikalen Bereich auf, der z. B. der Haut- oder Darmschleimhaut zugewandt ist, und einen inneren, basalen, der dem darunter liegenden Gewebe zugewiesen ist. In Epithelzellen wird zwischen einer basalen und einer apikalen Proteinsortierung unterschieden. Für die Aufrechterhaltung der epithelialen Zellpolarität spielt der AP-1 eine wichtige Rolle, welcher vornehmlich am TGN und Endosomen lokalisiert ist. In Epithelzellen wird zwischen zwei AP-1 Komplexisformen unterschieden, AP-1A und AP-1B, welche sich in ihrer  $\mu$ 1-Untereinheit ( $\mu$ 1A bzw.  $\mu$ 1B) unterscheiden. Ersterer wird ubiquitär und letzterer epithelspezifisch exprimiert [Ohno *et al.* 1999, Fölsch *et al.* 2001]. Neben der etablierten Beteiligung des AP-1A am vesikulären Transport zwischen TGN und frühen Endosomen und des AP-1B an der basolateralen Sortierung von Recyclingendosomen zur basolateralen Plasmamembran [Fölsch *et al.* 1999, Ohno *et al.* 1999, Eskelinen *et al.* 2002, Fölsch 2005, Deborde *et al.* 2008] wurden von Gravotta *et al.* neue Funktionen des AP-1A im basolateralen Sortierungsweg am TGN festgestellt. „Knockdown“ Experimente haben gezeigt, dass möglicherweise der AP-1B zu einem gewissen Teil die Funktionen des AP-1A kompensieren kann [Gravotta *et al.* 2012]. Beide AP-1-Komplexe sind an der endosomalen Sortierung beteiligt, spielen eine zentrale Rolle in der basolateralen Sortierung und sind essentiell für die Entwicklung von multizellulären Organismen [Lee *et al.* 1994, Zizioli *et al.* 1999]. Neben der etablierten Funktion des AP-1 am basolateralen Sortierungsweg konnte kürzlich auch dessen Beteiligung an der apikalen Sortierung gezeigt werden [Shafaq-Zadah *et al.* 2012]. In epithelialen sensorischen Organen von *Drosophila* konnte gezeigt werden, dass der AP-1 an der apikalen Sortierung von Recyclingendosomen zur apikalen Membran beteiligt ist [Benhra *et al.* 2011].

In Epithelzellen ist der AP-1 entscheidend für die basolaterale und apikale Sortierung unter der Beteiligung von endosomalen Strukturen.

### 1.4.2 AP-Komplexe in der synaptischen Sortierung

Der überwiegende Teil der Reizübertragung zwischen Neuronen findet über chemische Synapsen statt. Prä- und postsynaptische Bereiche sind hochspezialisierte neuronale Kompartimente (Übersichtsartikel: Bonanomi *et al.* 2006, Kennedy und Ehlers 2006,

Chua *et al.* 2010). In den präsynaptischen Bereichen findet eine hocheffiziente Protein-sortierung statt, um die spezifische Proteinzusammensetzung von synaptischen Vesikeln (SV) während deren schnellen Recyclings zu gewährleisten. Eine charakteristische Proteinzusammensetzung ist für eine effiziente Neurotransmitterfreisetzung erforderlich. Im Vergleich zu anderen Sortierungswegen weisen SV-Proteine abweichende Sortierungsmotive auf und sind Teil des komplexen Netzwerks von Protein-Protein und Protein-Lipid Interaktionen. Durch die Neurotransmitterfreisetzung wird eine Depolarisation der Postsynapse ausgelöst. Eine Regulation der Rezeptor- und Proteinkanaldichte auf der postsynaptischen Membran wird mit Hilfe des vesikulären Transports reguliert. Sowohl in prä- als auch in postsynaptischen Kompartimenten spielt der vesikuläre Transport eine entscheidende Rolle. Aufgrund der hohen Exo- und Endozytoserate im präsynaptischen Kompartiment ist hier die Rate des vesikulären Transports erheblich höher als in der Postsynapse. In beiden synaptischen Kompartimenten spielt der clathrinvermittelte vesikuläre Transport eine wichtige Rolle. Der AP-2 Komplex vermittelt hier die Endozytose von der jeweiligen synaptischen Membran.

Während der AP-2 prä- und postsynaptisch lokalisiert ist, wurden der AP-1 und AP-3 zum überwiegenden Teil präsynaptisch nachgewiesen [Glyvuk *et al.* 2010, Newell-Litwa *et al.* 2010]. Darüber hinaus wurden beide AP-Komplexe im Proteom synaptischer Vesikel nachgewiesen [Takamori *et al.* 2006]. Für den AP-3 sind zwei Isoformen AP-3A und AP-3B bekannt, von denen nur erstere ubiquitär exprimiert wird. Es sind zwei gehirnspezifische Adaptinisoformen  $\beta$ 3B und  $\mu$ 3B bekannt, welche in den neuronalen AP-3B-Komplex, bestehend aus den Adapinen  $\delta$ ,  $\beta$ 3B,  $\mu$ 3B und  $\sigma$ 3, integriert werden (vgl. Abb. 1-4) [Reusch *et al.* 2002, Danglot und Galli 2007]. Dies deutet stark darauf hin, dass diese beiden AP-Komplexe, AP-1 und AP-3, eine spezifische Funktion beim synaptischen Vesikelrecycling besitzen. Jedoch zeigte die  $\mu$ 3B „knock-out“ Maus keinen Phänotyp. Lediglich die Defizienz des  $\delta$ -Adaptins führte im Maus „knock-out“ Modell zu einer neurologischen Störung und zum Verlust beider AP-3 Isoformen [Newell-Litwa *et al.* 2009]. Ihr Phänotyp ist analog zu dem des humanen Hermansky-Pudlak Syndroms, welches sich durch Albinismus, eine erhöhte Blutungsneigung und das Auftreten einer Lungenfibrose auszeichnet. Die Ursache hierfür ist eine fehlerhafte Membranproteinsortierung von Endosomen zu Lysosomen und lysosomalen Organellen [Li *et al.* 2004, Di Pietro und Dell'Angelica 2005, Raposo und Marks 2007, Setty *et al.* 2007, Setty *et al.* 2008]. Im Mausmodell wurde eine Veränderung der SV Biogenese festgestellt. Der AP-3 ist an der endosomalen Sortierung beteiligt und reguliert die Proteinzusammensetzung und Morphologie von synaptischen Vesikeln in präsynaptischen Kompartimenten verschiedener Gehirnregionen [Newell-Litwa *et al.* 2010].

Synaptische Vesikel werden basierend auf ihren funktionellen und morphologischen Eigenschaften in drei verschiedene Pools unterteilt. Ein Teil der synaptischen Vesikel ist direkt mit der aktiven Zone verbunden (*docked vesicles*). Eine weitere kleine Gruppe von 5 bis 10% aller synaptischer Vesikel gehört dem *readily releasable pool* (RRP) an. Diese Vesikel befinden sich in direkter Nähe zur aktiven Zone und stehen für die Neurotransmitterfreisetzung unmittelbar zur Verfügung. Ein Charakteristikum des RRP ist dessen schnelle Erschöpfung während einer Stimulation sowie dessen schnelle Regeneration innerhalb von 1 min direkt von der Plasmamembran. Die dritte Gruppe synaptischer Vesikel bildet der Reservepool (*reserve pool*), welcher erst nach einer starken, lang andauernden Stimulation erschöpft ist. Seine Regeneration erfolgt durch ein direktes SV-Recycling von der Plasmamembran oder von Membranfragmenten, die sich von der Plasmamembran abschnüren. Die Rückkehr eines SV zu dem Pool, aus dem er entstammt, erfolgt möglicherweise mit Hilfe von charakteristischen Markerproteinen auf der Vesikeloberfläche. Neben der direkten Regeneration eines Pools auf dem endozytotischen Weg können SV von einem in einen anderen Pool überführt werden [Bonanomi *et al.* 2006].

Für die Fusion mit und das anschließende Recycling von der Plasmamembran gibt es mehrere etablierte Modelle. Entsprechend dem Recyclingweg synaptischer Vesikel wird zwischen einer kurzen und einer langen Route unterschieden. Bei den Modellen der kurzen Route kommt es zwischen den SV und der Plasmamembran nur zur Ausbildung einer Fusionspore, durch die die Neurotransmitter in den synaptischen Spalt freigesetzt werden. Diese Vesikel unterliegen einer schnellen Recyclingrate und durch die transienten Fusion kann ihre korrekte Proteinzusammensetzung wieder schnell hergestellt werden und sie können umgehend in den RRP zurückgeführt werden. Aufgrund des minimalen und kurzen Kontakts zur Membran der aktiven Zone wird diese Form der Neurotransmitterfreisetzung als „Kiss-and-Run“ Modell bezeichnet. Einen noch schnelleren Mechanismus stellt das „Kiss-and-Stay“ Modell dar, bei dem das SV-Recycling ohne ein Abdocken von der aktiven Zone vonstatten geht [Südhof *et al.* 2004]. Bei den Modellen der langen Route kommt es zu einer vollständigen Fusion der SV mit der Plasmamembran, welche vor allem unter starker Stimulation stattfindet. Die Regeneration dieser SV findet unter der Beteiligung von AP-2 über eine clathrinvermittelte Endozytose (CME) oder unter der Abschnürung von Plasmamembranstrukturen in die Synapse und anschließender SV Bildung von diesen Strukturen statt. Im Verhältnis zu den „Kiss-and-Run“ und „Kiss-and-Stay“ Modellen stellt die clathrinvermittelte SV Regeneration einen langsameren Recyclingweg dar, da eine neue Bildung von SV von der Plasmamembran notwendig ist. Im Zuge einer starken Stimulation fusioniert eine Vielzahl von SV vollständig mit der aktiven Zone, wodurch sich deren Membranoberflä-

che vergrößert und sich folglich das Membran-zu-Volumenverhältnis des synaptischen Spalts verändert. Zur Aufrechterhaltung der synaptischen Funktionalität findet eine Internalisierung von großen Membranstrukturen von der Plasmamembran statt („Bulk Endozytose“), von der es voraussichtlich zu einer clathrinvermittelten Neubildung von SV kommt. Die weitere Proteinsortierung nach der clathrinvermittelten Vesikelbildung findet wahrscheinlich unter der Beteiligung von endosomalen Strukturen statt. [Bonanomi *et al.* 2006, Danglot und Galli 2007].



**Abb. 1-12: Die drei vesikulären Pools.**

[Danglot und Galli 2007]

### 1.4.3 Funktionen von AP-Komplexen am SV-Recycling

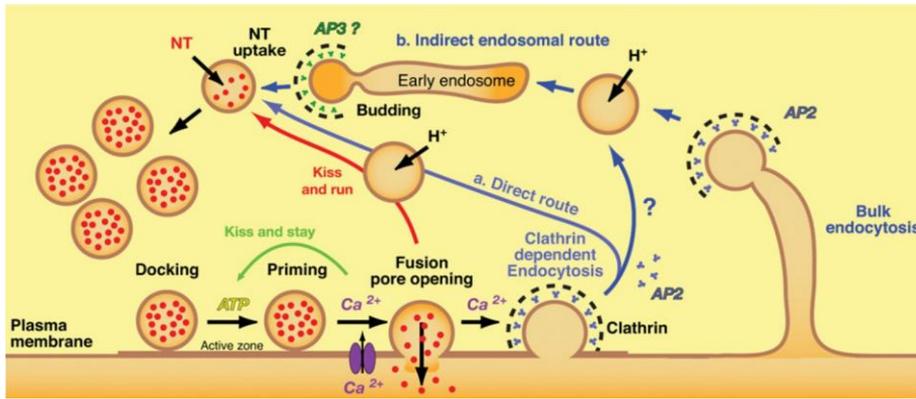
Die Regeneration von synaptischen Vesikeln nach deren Fusion mit der aktiven Zone wird u. a. durch die Adaptorproteine AP-1, AP-2, AP-3, Stonin 2, Epsin 1, Amphiphysin 1, Dynamin 1 und AP 180 vermittelt (Übersichtsartikel: Ungewickell und Hinrichsen 2007, Haucke *et al.* 2011, McMahon und Boucrot 2001). Sie fungieren als Sortierstellen für die Wiederherstellung der spezifischen Proteinzusammensetzung von synaptischen Vesikeln. Der genaue Mechanismus der Proteinsortierung während des Recyclings von synaptischen Vesikeln ist kaum aufgeklärt. Die genauen Schritte, die an der Wiederauffüllung und Sortierung von Proteinen auf synaptische Vesikel beteiligt sind, müssen noch erforscht werden. Unter einer milden Stimulation von Synapsen ist die AP-2 und clathrinvermittelte Endozytose (AP-2/CME), neben dem „Kiss-and-Run“ Weg, der hauptsächliche Weg des SV-Recyclings [Granseth *et al.* 2006, Jung und Haucke 2007, Zhu *et al.* 2009].

Neben der CME ist ein weiterer synaptischer endozytotischer Weg bekannt, welcher während einer starken Stimulation aktiviert wird: die so genannten „Bulk Endozytose“. Bei der Bulk Endozytose kommt es zu Einstülpungen der Plasmamembran und der Abspaltung von großen endosomalen Strukturen in das Zytoplasma. Synaptische Vesikel müssen daraufhin von diesen Kompartimenten gebildet werden [Richards *et al.* 2000, Evans und Cousin 2007]. Der genaue Mechanismus dieses Endozytosewegs ist nicht bekannt. Während die CME unter einer starken Stimulation schnell erschöpft ist, bietet die Bulk Endozytose die Möglichkeit einer effizienten synaptischen Plasma-

membranregeneration in kurzer Zeit [Royle und Lagnado 2003, Wu *et al.* 2007, Clayton *et al.* 2008]. Abhängig vom endozytotischen Weg werden die SV zu einem bestimmten vesikulären Pool sortiert: So gelangen nach neuesten Erkenntnissen die SV nach der CME zum *readily releasable pool* (RRP) und solche, die über die Bulk Endozytose regeneriert wurden, in den Reservepool [Cheung *et al.* 2010]. Eine Beteiligung an der Biogenese synaptischer Vesikel wird dem AP-3 zugeschrieben. Darüber hinaus vermittelt er die Bildung von sekretorischen und lysosomalen Organellen.

Durch eine Reduktion der AP-2 Funktionalität in Neuronen konnten von Augustine *et al.* deutliche Veränderungen festgestellt werden. Neben der Reduktion von vesikulären Strukturen um 70% war eine Zunahme der Plasmamembranoberfläche zu erkennen [Augustine *et al.* 2006]. Jedoch war keine vollständige Reduktion der Endozytose zu erkennen. Der AP-1 ist an der vesikulären Sortierung am TGN sowie an frühen Endosomen beteiligt. Im Gegensatz zum AP-2 und AP-3 konnte nur für den AP-1 eine Beteiligung an der Bildung von Vesikeln von Recyclingendosomen nachgewiesen werden [Pagano *et al.* 2004]. Möglicherweise ist der AP-1 folglich an der Proteinsortierung von synaptischen endosomalen Strukturen beteiligt und vermittelt neben der CME einen weiteren endozytotischen Weg zur Regeneration von synaptischen Vesikeln. Ein „knock-out“ Experiment von AP-2 in *C. elegans* unterstützen die Theorie eines weiteren Recyclingswegs neben der CME [Gu *et al.* 2008].

Endosomale Strukturen in Synpasen sind hochdynamische Kompartimente, welche nach einer Stimulation schnell wieder verschwinden, während die Zahl von synaptischen Vesikeln steigt. Neben dem AP-1 wird nach neueren Erkenntnissen auch dem AP-3 ein Rolle im SV-Recycling über endosomale Intermediate zugeschrieben, die jedoch nicht genau bekannt ist [Danglot und Galli 2007, Newell-Litwa *et al.* 2007]. In Abb. 1-13 ist ein Schema der möglichen, beim Beginn dieser Arbeit bekannten, SV-Recyclingrouten gezeigt.



**Abb. 1-13: Mögliche Recyclingrouten von synaptischen Vesikeln (SV).**

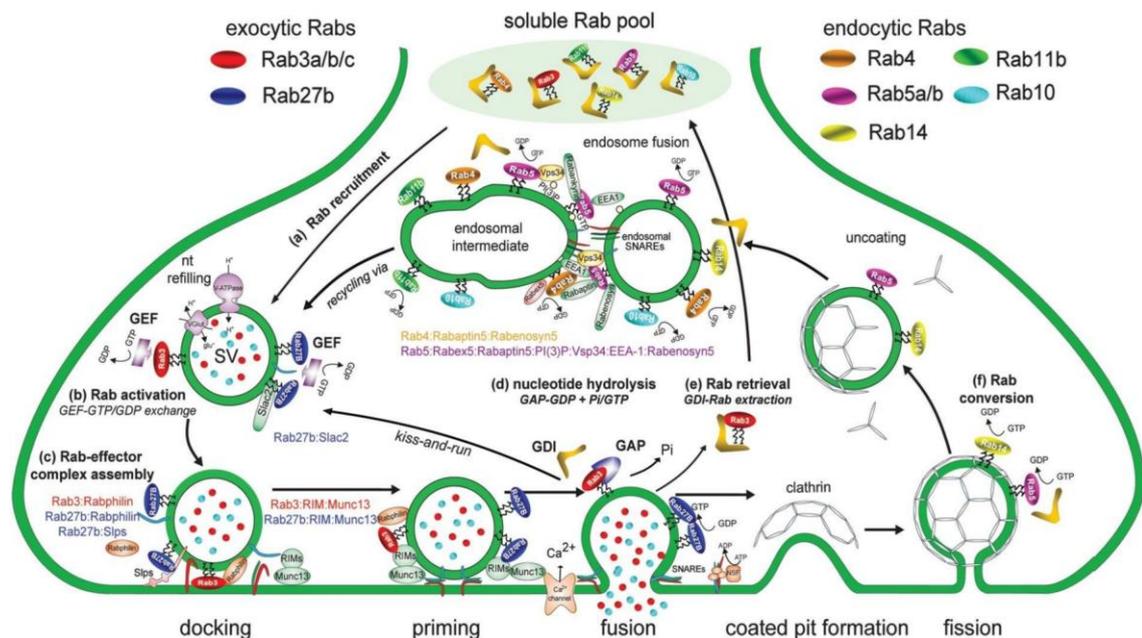
SV fusionieren entweder teilweise mit der Plasmamembran und werden über eine kurze Route (Kiss-and-Run, Kiss-and-Stay) recycelt oder sie fusionieren komplett mit der Plasmamembran und werden über eine lange clathrinvermittelte Route direkt von der Plasmamembran oder nach einer starken Stimulation von großen Membraneinstülpungen (Bulk Endozytose) regeneriert. Hier spielt der AP-2 eine wichtige Rolle. Die genaue Lokalisierung des AP-1 ist nicht bekannt. Der AP-3 ist vermutlich an der SV Bildung von frühen Endosomen beteiligt. [Dangelot und Galli 2007]

#### 1.4.4 Beteiligung von Rab-Proteinen am SV-Recycling

Das synaptische Vesikel (SV) Recycling wird durch eine Reihe von konservierten Proteinen kontrolliert und reguliert. Hierbei spielt eine definierte Auswahl der über 60 im Menschen bekannten Rab-Proteine eine wichtige Rolle (Übersichtsartikel: Pavlos und Jahn 2011). Eine organell- bzw. kompartimentspezifische Anreicherung von Rab-Proteinen vermittelt sehr wahrscheinlich neben weiteren Faktoren einen zielgerichteten zellulären Transport. SV unterliegen einer schnellen Exo- und Endozytose, was eine hohe Effektivität und Präzision dieser Prozesse voraussetzt. Um spezifische Interaktionen mit Membrandomänen oder intermediären Organellen zu gewährleisten, weisen SV eine definierte Proteinzusammensetzung auf. Rab-Proteine rekrutieren bestimmte Effektorproteine auf die Vesikelmembran oder auf Organellmembrandomänen und vermitteln auf diese Weise den SV Kontakt mit Motorproteinen sowie die SNARE abhängige Vesikelfusion mit der Plasmamembran oder einem Zielkompartiment.

Untersuchung von hochaufgereinigten SV haben gezeigt, dass mindestens 11 Rab-Proteine auf ihnen angereichert sind [Pavlos *et al.* 2010]. Diese beinhalten Rab-Proteine der Exozytose (Rab 3a/b/c und Rab 27b) und solche des endozytotischen Weges (Rab 4, Rab 5, Rab 10, Rab 11b und Rab 14). Während die an der Exozytose beteiligten Rab-Proteine vermutlich an der korrekten Zielführung sowie der Regulation der Neurotransmitterfreisetzung beteiligt sind, steht die Aufklärung der Funktion der endozytotischen Rab-Proteine erst am Anfang. Vor fast 40 Jahren wurde von Heuser und Reese erstmalig die Beteiligung endosomaler Kompartimente am synaptosomalen Recycling vorhergesagt [Heuser und Reese 1973]. Erst in jüngerer Zeit reifte die Er-

kenntnis, dass SV neben der exozytischen auch mit einer endozytischen Proteinmaschinerie, wie Rab- und SNARE-Proteine, ausgestattet sind [Fischer von Mollard *et al.* 1994, Takamori *et al.* 2006, Rizzoli *et al.* 2006]. Das auf SV identifizierte Protein Rab 5 wurde zuvor vor allem als charakteristischer Bestandteil von frühen Endosomen angesehen, auf denen es die Rekrutierung von Proteinen und Lipiden der frühen endosomalen Signalkaskade (Rabaptin 5, Rabex 5, Vps 34, PI-3-P, EEA 1 und Rabenosyn 5) einleitet [Stenmark 2009]. Diese Signalkaskade wird heute für das SV-Recycling ebenfalls vorhergesagt (vgl. Abb. 1-14). Auf eine Beteiligung endosomaler Kompartimente am SV-Recycling weisen darüber hinaus die auf SV identifizierten und auf Endosomen lokalisierten Rab-Proteine Rab 4 und Rab 11 sowie die am CCV Transport und Recycling beteiligten Rab 10 und Rab 14 hin. In Abb. 1-14 ist die Beteiligung von Rab-Proteinen an der Exo- und Endozytose sowie dem Recycling von synaptischen Vesikeln zusammenfassend dargestellt [Pavlos und Jahn 2011].



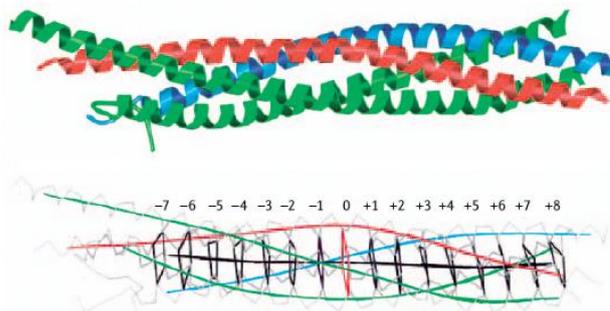
**Abb. 1-14: Rab-Proteine, Effektoren und deren Beteiligung am SV-Recycling.**

Beteiligung von Rab-Proteinen und deren Effektoren an der Exo- und Endozytose sowie dem Recycling von synaptischen Vesikeln [Pavlos und Jahn 2011]. Eine ausführliche Darstellung der Komponenten, die an der Reizübertragung in chemischen Synapsen beteiligt sind, wurde von Chua *et al.* erstellt [Chua *et al.* 2010].

### 1.4.5 Beteiligung von SNARE-Proteinen am SV-Recycling

SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*)-Proteine sind konservierte Schlüsselkomponenten der Membranfusionsmaschinerie. Sie vermitteln die Membranfusion in fast allen Schritten des sekretorischen Weges sowie beim Recycling synaptischer Vesikel (Übersichtsartikel: Jahn und Scheller 2006). Allen gemeinsam ist ein 60-70 Aminosäuren langes SNARE Motiv, über das sie

mit anderen SNARE-Proteinen interagieren. Funktionale SNARE-Komplexe bilden heterooligomere, parallele  $\alpha$ -Helixbündel aus vier SNARE-Proteinen aus, wobei jeder SNARE-Komplex aus einer Kombination von je einem SNARE-Protein aus einer der vier SNARE-Klassen besteht. Die Kernregion dieses Helixbündels besteht aus 16 gestapelten Schichten von miteinander interagierenden Seitenketten (vgl. Abb. 1-15), welche bis auf die mittlere, die „O“ Schicht, ausgeprägt hydrophob sind. Das Charakteristikum der „O“ Schicht bilden drei hochkonservierte Glutamin (Q)-Reste sowie ein hochkonservierter Arginin (R)-Rest. Entsprechend dieser Aminosäurereste werden die SNARE-Motive in die Klassen der Qa-, Qb-, Qc- und R-SNAREs unterteilt.



**Abb. 1-15: Kristallstruktur neuronaler SNARE-Kernkomplexe.**

Kristallstruktur des neuronalen SNARE-Kernkomplexes (oben). Dieser Komplex besteht aus den SNARE Motiven: Syntaxin 1 (Qa, rot), Snap 25 (25-kDa synaptosome-associated protein; Qb und Qc, beide grün) und Vamp 2 (vesicle-associated membrane protein 2/synaptobrevin; R, blau). Unten sind schematisch die verschiedenen Schichten eines SNARE-Bündels dargestellt. Die schwarze Linie zeigt die Achse der Superhelix an. Die „O“ Schicht ist in Rot dargestellt. [Jahn und Scheller 2006]

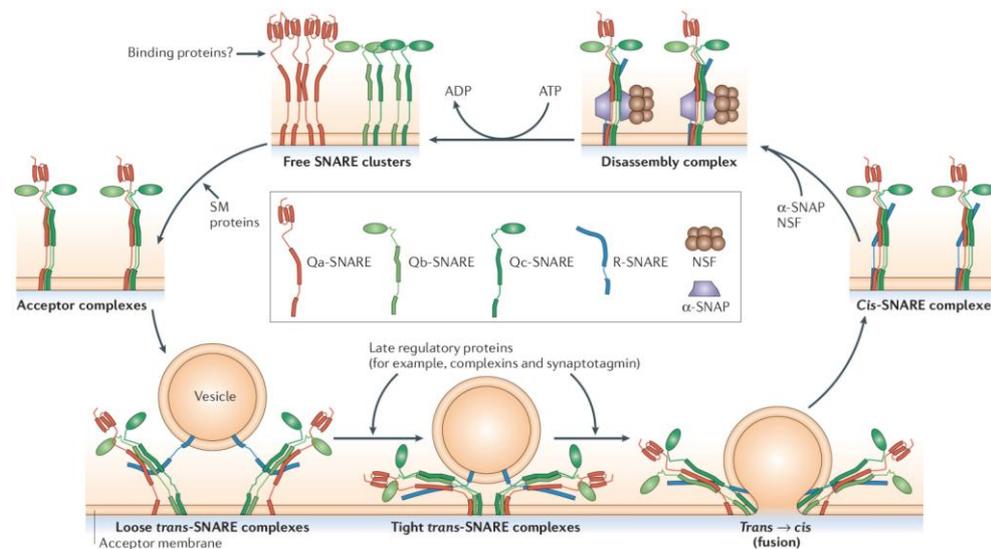
In neuronalen Zellen sind SNARE-Proteine essentiell für die Exozytose von synaptischen Vesikeln und sind an der Regulation der Signalübertragung beteiligt (Übersichtsartikel: Ramakrishnan *et al.* 2012). Entsprechend deren Lokalisation entweder in der Akzeptormembran (*target membrane*) oder der Vesikelmembran (*vesicle membrane*) werden sie als t- bzw. v-SNAREs bezeichnet. t-SNAREs gehören in der Regel der Klasse der Q-SNAREs und v-SNAREs der Klasse der R-SNAREs an. In Neuronen werden drei Gruppen von SNARE-Proteinen unterschieden:

Synaptobrevins (auch als *Vesicle-associated membrane protein* (Vamp) bekannt) sind integrale SV Membranproteine und somit v-SNAREs. Sie sind Teil der calciumabhängigen Vesikelfusionsmaschinerie. Von ihnen werden zwei Isoformen, Synaptobrevin 1 und 2 (bzw. Vamp 1 und 2) in Neuronen exprimiert.

Syntaxine sind transmembrane t-SNAREs, die auf der Plasmamembran lokalisiert sind, die calciumabhängige Exozytose regulieren und mit einer Vielzahl von regulatorischen Proteinen interagieren. Die Hauptisoformen im Gehirn sind Syntaxin 1A sowie 1B.

Synaptosomal-assoziierte Proteine (SNAP) spielen eine zentrale Rolle als t-SNAREs bei der Membranfusion, deren wichtigste Isoform SNAP-25 ist. Diese SNARE-Proteine sind peripher mit der präsynaptischen Membran verbunden und steuern zwei Helices zu einem funktionsfähigen SNARE-Kernkomplex bei. Sie werden für die calciumabhängige Exozytose benötigt und interagieren mit Synaptotagminen und Calciumkanälen.

Die SNARE-vermittelte Fusion zwischen Vesikeln und einer Akzeptormembran sowie das Recycling der SNARE-Proteine verläuft nach einem generellen Mechanismus, der in Abb. 1-16 gezeigt ist. Die Beschreibung der einzelnen Schritte sowie die Funktionen essentieller, beteiligter Proteine sind der Bildunterschrift zu entnehmen.



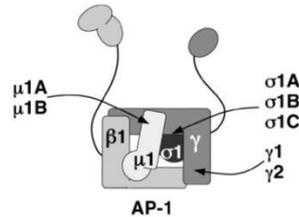
**Abb. 1-16: Die SNARE vermittelte Vesikelfusion und das Recycling der SNARE-Proteine.**

Freie Q-SNAREs sind in der Plasmamembran in Clustern organisiert (oben links). Vermutlich vermitteln SM (Sec 1/Munc 18-related) Proteine die Zusammenlagerung der t-SNAREs zu einem Akzeptorkomplex, welcher mit den vesikulären R-SNAREs interagiert und einen lockeren trans-Komplex aus vier Helices ausbildet. Die Festigung der Bindungen zwischen den SNARE-Motiven führt zur Ausbildung eines stabilen trans-Komplexes, dem die Öffnung einer Fusionspore nachfolgt. Während der regulierten Exozytose werden die letzten drei transienten Schritte über späte regulatorische Proteine (late regulatory proteins) wie Complexine (kleine Proteine, die an die Oberfläche des SNARE-Komplexes binden) und Synaptotagmine (welche calciumabhängig aktiviert werden) kontrolliert. Während der Fusion verliert der SNARE-Komplex seine Stabilität und geht in eine cis-Konfiguration über. Mit Hilfe des AAA+ (ATPasen, die mit einer Vielzahl von zellulären Aktivitäten in Verbindung stehen) Proteins NSF (N-ethylmaleimidsensitive factor) und gemeinsam mit SNAPs (soluble NSF attachment proteins), welche als Kofaktoren fungieren, wird die Formation des SNARE-Komplexes aufgelöst. R- und Q-SNAREs werden anschließend durch Membransortierungsschritte, wie beispielsweise die Endozytose, separiert. [Ramakrishnan *et al.* 2012]

## 1.5 KO-Modelle zur Funktionsanalyse der AP-1 Adaptine

Von den Adaptinen des AP-1-Komplexes ist, bis auf die  $\beta$ 1-Untereinheit, für jedes Adaptin mindestens eine Isoformvariante bekannt. Für das  $\gamma$ -Adaptin sind die beiden

Isoformen  $\gamma 1$  und  $\gamma 2$  bekannt, welche von zwei Arbeitsgruppen genauer charakterisiert wurden. Trotz der strukturellen Ähnlichkeit beider Adaptinisoformen, zeigten Untersuchungen hinsichtlich der zellulären Lokalisation keine übereinstimmenden Ergebnisse [Lewin *et al.* 1998, Takatsu *et al.* 1998].



**Abb. 1-17: Zusammensetzung des AP-1 und dessen bekannte Adaptinisoformen.**  
[Mattera *et al.* 2011]

Gendeletionsexperimente in Hefe haben keinen Aufschluss über die Funktion von AP-1 erbracht. So zeigten Mutanten, bei denen jeweils alle vier Adaptine von AP-1 ausgeschaltet wurden, keinen Wachstumsphänotyp [Yeung *et al.* 1999]. Für die Identifikation der *in vivo* Signifikanz der AP-1 vermittelten Bildung von CCVs sowie deren zellulären Transport in Säugetieren wurden "knock-out" Mausmodelle etabliert, bei denen unterschiedliche AP-1-Adaptine ausgeschaltet wurden.

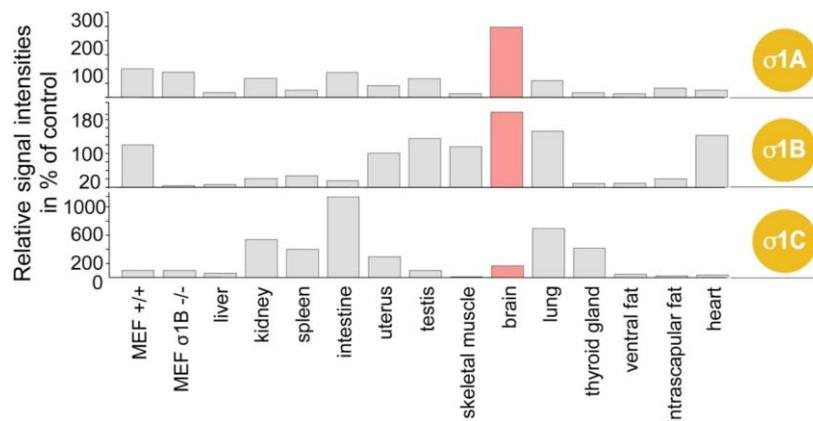
Für die Untersuchung des Einflusses des  $\gamma 1$ -Adaptins auf die Entwicklung sowie die Proteinsortierung in Säugetieren wurde eine  $\gamma 1$  "knock-out" Mauslinie erschaffen. Homozygote  $\gamma 1(-/-)$ -Embryonen starben zwischen dem Tag 3,5 und 4,5 in ihrer embryonalen Entwicklung, während heterozygote  $\gamma 1(+/-)$ -Tiere lebensfähig sind. Zellen von  $\gamma 1(-/-)$ -Embryonen waren in Kultur ebenfalls nicht lebensfähig. In heterozygoten Zellen ist eine Reduktion des  $\gamma 1$ -Adaptins um die Hälfte zu erkennen. Bei einer unveränderten Menge an mRNA für die  $\beta 1$ - und  $\mu 1$ -Adaptine konnten keine freien  $\beta 1$ - und  $\mu 1$ -Adaptine nachgewiesen werden. Dies deutet stark auf ein vollständiges Fehlen von AP-1 in  $\gamma 1(-/-)$ -Zellen hin. Während die Funktion von AP-1 nicht für die Lebensfähigkeit von Hefe erforderlich ist, ist dieser AP-Komplex für die Entwicklung höherer Eukaryoten, wie Mäuse, essentiell. Die Letalität  $\gamma 1$ -defizienter Mäuse weist darüber hinaus darauf hin, dass  $\gamma 2$  nicht dessen Funktion kompensieren kann und folglich beide Adaptinisoformen eine unterschiedliche Funktion besitzen. [Zizioli *et al.* 1999]. Von C. Riel wurden die gewebespezifischen  $\gamma$ -Adaptinexpressionsniveaus mittels Northern-Blots untersucht. Beide Adaptinisoformen,  $\gamma 1$  und  $\gamma 2$ , werden in allen Geweben exprimiert. Nur in der Skelettmuskulatur ist eine veränderte, erhöhte Expression des  $\gamma 2$ - im Vergleich zum  $\gamma 1$ -Adaptin zu erkennen, was auf einen weiteren Unterschied der Funktion der  $\gamma$ -Adaptine hinweist [Riel 2004].

Mäuse, die hinsichtlich des  $\mu$ 1A-Gens homozygot defizient sind, weisen eine Letalität in der Embryonalphase nach dem Tag 13,5 auf. Bei  $\mu$ 1A homozygot defizienten Embryonen treten Einblutungen im Rückenmarkskanal sowie in Ventrikeln auf. Alle Organanlagen sind vorhanden, bis auf die für das Gehirn, was auf eine essentielle Funktion des AP-1 im Gehirn hinweist. Die genauen Ursachen für diesen Phänotyp sind bis heute nicht bekannt. Im Vergleich zu  $\gamma$ 1-defizienten Embryonen bricht die embryonale Entwicklung dieses „knock-outs“ deutlich später ab, was durch die epithelspezifische  $\mu$ 1B-Isoform bedingt sein könnte. Von  $\mu$ 1A-defizienten Embryonen konnten Fibroblastenzelllinien gewonnen werden, bei denen eine Veränderung der AP-1 abhängigen Proteinsortierung zu beobachten ist. Es ist eine Fehlsortierung der Mannose-6-Phosphat (M6P) Rezeptoren (MPR) MPR 46 und MPR 300 zu erkennen, von denen nur letzterer an M6P-tragende Proteine binden kann. Beide MPR-Rezeptoren akkumulieren in endosomalen Kompartimenten, was auf einer Blockierung des Rücktransportwegs zum TGN beruht. Es ist jedoch nicht bekannt, ob der AP-1-Komplex an diesem retrograden Transportweg direkt oder indirekt beteiligt ist. Eine erhöhte endosomale Konzentration des MPR 300 führt voraussichtlich zu einer Steigerung von dessen Exozytoserate zur Plasmamembran, welche ihrerseits eine gesteigerte Endozytose hervorruft. Dies führt zu einer unveränderten Gleichgewichtskonzentration des MPR 300 an der Plasmamembran. Im Zuge dessen wurde eine vermehrte Sezernierung sowie Aufnahme von lysosomalen Enzymen festgestellt. [Meyer *et al.* 2000, Meyer *et al.* 2001, Medigeschi und Schu 2003]. Der AP-1 vermittelte Transport des MPR 300 von Endosomen zum TGN besitzt indirekt einen negativen Einfluss auf die Sortierungsrate von Rezeptoren zwischen der Plasmamembran und Endosomen.

Biochemische Untersuchungen von Extrakten  $\mu$ 1A-defizienter Fibroblasten zeigten, dass die verbleibenden drei Adaptine des AP-1 als heterotrimerer Komplex assembliert sind. Freie  $\gamma$ -,  $\beta$ - oder  $\sigma$ 1-Adaptine konnten nicht nachgewiesen werden. Die Proteinmengen des  $\gamma$ - und des  $\sigma$ 1-Adaptins des KO sind im Vergleich zu WT-Fibroblasten reduziert, während die mRNA-Mengen nicht verändert sind. Dies deutet entweder auf eine geringere Stabilität von  $\gamma$ - und  $\sigma$ 1-Adaptinen in einem heterotrimeren Komplex oder auf eine veränderte Regulation der Transkription hin [Zizioli *et al.* 1999, Meyer *et al.* 2000].

In Zebrafisch AP-1/ $\mu$ 1B „knock-down“ Experimenten konnte gezeigt werden, dass das  $\mu$ 1B-Adaptin für die Entwicklung niederer Wirbeltiere unentbehrlich ist [Zizioli 2010]. Auch AP-1B defiziente Mäuse sind lebensfähig: Als Phänotyp zeigen sie Entzündungen des Dickdarms aufgrund eines apikalen Sortierungsdefekts des Zytokinrezeptors [Takahashi *et al.* 2011].

Für das  $\sigma$ 1-Adaptin sind drei Gene bekannt, auf welchen die Isoformen  $\sigma$ 1A,  $\sigma$ 1B und  $\sigma$ 1C kodiert sind. Diese Isoformen zeigen eine 70-80%-ige Identität auf Proteinebene [Riel 2004] und *in vitro* konnte eine Interaktion mit beiden  $\gamma$ -Adaptinisformen gezeigt werden [Takatsu *et al.* 1998, Takatsu *et al.* 2001, Mattera *et al.* 2011]. Die Expression der  $\sigma$ 1-Adaptinisformen ist gewebsspezifisch: Während  $\sigma$ 1A ubiquitär exprimiert wird, werden die  $\sigma$ 1B und die  $\sigma$ 1C Isoformen gewebsspezifisch exprimiert.  $\sigma$ 1A und  $\sigma$ 1B zeigen die höchste Expression im Gehirn [Glyvuk *et al.* 2010].



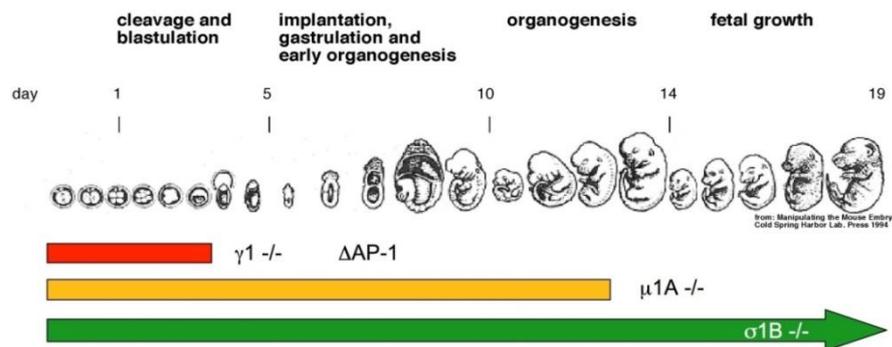
**Abb. 1-18: Gewebsspezifische Expression der AP 1 Adaptine  $\sigma$ 1A,  $\sigma$ 1B und  $\sigma$ 1C.**

[Glyvuk *et al.* 2010, verändert]

Im Gehirn zeigt AP-1 die höchsten Expressionsniveaus im Hippocampus und im Cerebellum (Allen Brain Atlas Resources, Seattle, Allen Institute for Brain Science 2009). Für das  $\sigma$ 1B-Adaptin ist ein „knock out“ Mausmodell etabliert [Riel 2004, Baltes 2008], dessen Phänotyp im Folgenden genauer beschrieben wird. Von AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienten Mäusen konnten lebensfähige Maus embryonale Fibroblasten (MEF) Zelllinien gewonnen werden [Riel 2004, Baltes 2008].

### 1.5.1 Phänotypen des $\sigma$ 1B „knock-out“ Mausmodells

Für die Analyse der  $\sigma$ 1-Funktion wurde in unserer Arbeitsgruppe in vorangegangenen Doktorarbeiten ein  $\sigma$ 1B „knock-out“ Mausmodell etabliert und der Phänotyp defizienter Mäuse analysiert [Riel 2004, Baltes 2008]. Das  $\sigma$ 1B-Gen, welches X-Chromosomal lokalisiert ist, wurde durch Einfügen einer Neomycinresistenzkassette zerstört [Riel 2004]. Defiziente Mäuse beiderlei Geschlechts sind lebensfähig und fertil und wurden gezüchtet. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass das  $\sigma$ 1B-Adaptin für die Entwicklung und das Überleben von Mäusen nicht essentiell ist, nicht für die ubiquitären „Haushaltsfunktionen“ („house-keeping“ functions) des AP-1 notwendig ist und dessen Funktion wahrscheinlich zumindest teilweise durch die beiden verbleibenden Adaptinisformen  $\sigma$ 1A und  $\sigma$ 1C kompensiert werden kann.



**Abb. 1-19: Überlebensfähigkeit verschiedener AP 1 "knock-out" Mausmodelle.**

$\gamma 1$ -defiziente Mäuse sterben in utero nach Tag 3,5 (rot),  $\mu 1A$ -defiziente Mäuse sterben in utero nach Tag 13,5 (orange) und  $\sigma 1B$ -defiziente Mäuse zeigen keinen Entwicklungsphänotyp (grün).

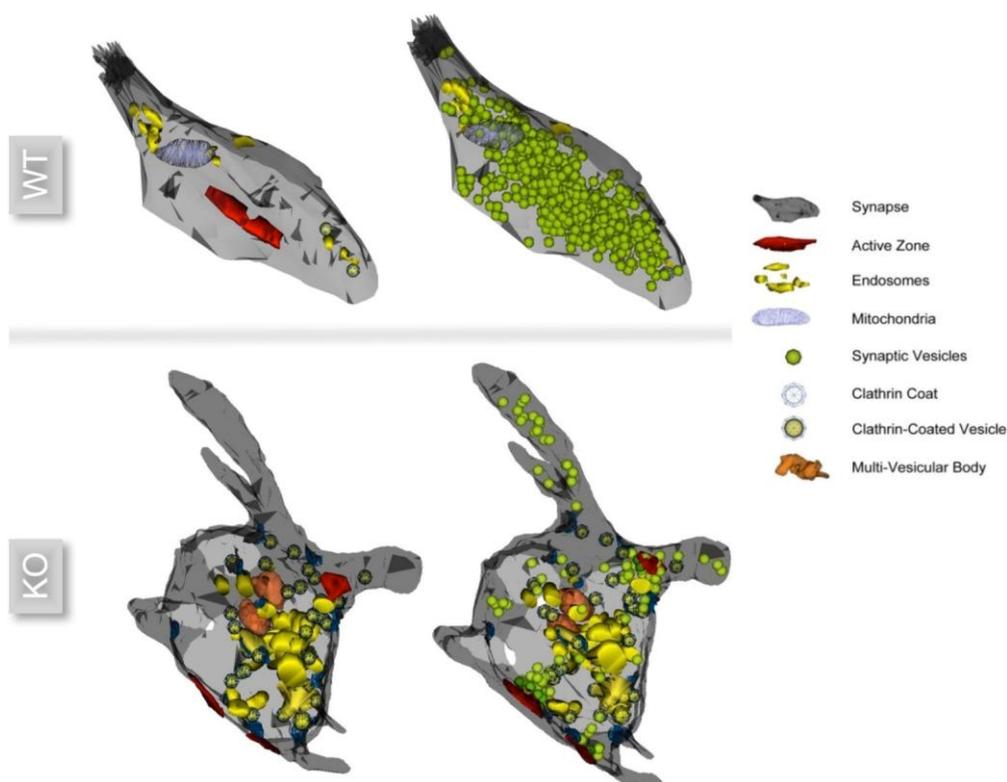
Eine Vielzahl der männlichen  $\sigma 1B$ -defizienten Mäuse zeigten einen sehr starken Harnrückstau, welcher zu einer angeschwollenen Harnblase und einer Flüssigkeitsansammlung im Nierenbecken führte. Darüber hinaus zeigten defiziente Mäuse beiderlei Geschlechts eine Reduktion des Fettgewebes, womit jedoch keine funktionelle Beeinträchtigung einhergeht. Verhaltensstudien von  $\sigma 1B$ -defizienten Mäusen zeigten, dass diese Tiere eine verschlechterte motorische Koordination besitzen, hypoaktiv sind und eine reduzierte räumliche Gedächtnisleistung aufweisen [Baltes 2008]. Dieser Phänotyp zeigt Übereinstimmungen mit einem humanen Krankheitsbild, welcher hier stärker ausgeprägt ist und ebenfalls durch die Mutation des X-chromosomalen  $\sigma 1B$ -Gens verursacht wird. Menschen, die diese Genmutation aufweisen, entwickeln eine schwere geistige Entwicklungsverzögerung, erlernen das Gehen erst in einem Alter von vier bis sechs Jahren, entwickeln keine differenzierte Sprache und benötigen eine lebenslange Betreuung [Tarpey *et al.* 2006].

Die aus Verhaltensstudien von defizienten Mäusen gewonnenen Erkenntnisse deuten stark auf eine neuronale Funktion des AP-1/ $\sigma 1B$ -Komplexes hin, welcher anhand von primären hippocampalen Neuronen genauer untersucht wurde.

### 1.5.2 Veränderungen $\sigma 1B$ -defizienter hippocampaler Neuronen

In Proteomanalysen von clathrinumüllten Vesikeln (CCV) wurden in jüngerer Zeit die Adaptine  $\sigma 1A$  und  $\sigma 1B$  identifiziert [Borner *et al.* 2006]. Das  $\beta 1$ -Adaptin des AP-1 konnte im Proteom von synaptischen Vesikeln (SV) nachgewiesen werden [Takamori *et al.* 2006]. Dies weist darauf hin, dass der AP-1 Komplex am SV-Recycling beteiligt ist. Zur Identifizierung der zellulären Verteilung von AP-1 in hippocampalen Neuronen wurde für Immunfluoreszenzuntersuchungen ein Antikörper gegen AP-1/ $\gamma 1$  verwendet. Es wurde eine Kolokalisation von AP-1 mit SV gezeigt. Eine Kolokalisation mit postsynap-

tischen Strukturen war nur sehr schwach ausgeprägt [Glyvuk *et al.* 2010]. Dies weist auf eine vorwiegend präsynaptische Lokalisierung von AP-1 in hippocampalen Boutons hin. Elektronenmikroskopische (EM) Aufnahmen hippocampaler Boutons zeigten clathrinumhüllte Strukturen in der Nähe von Clustern synaptischer Vesikel und eine Veränderung der Anzahl synaptischer Vesikel zwischen den Genotypen. Im Vergleich zum WT ist die Zahl an SV in KO Boutons reduziert. Durch eine Stimulation (900 AP/10 Hz) der Synapsen wird dieser Effekt verstärkt. Neben der Reduktion synaptischer Vesikel wurden in KO Synapsen vergrößerte, clathrinumhüllte, endosomale Membranstrukturen identifiziert. Darüber hinaus wurde aus EM Aufnahmen eine effiziente Anlagerung von SVs an die aktive Zone einer Synapse in beiden Genotypen abgeleitet [Glyvuk *et al.* 2010].



**Abb. 1-20: 3D-Rekonstruktion von Präsynapsen hippocampaler Neuronen.**

Anreicherung von endosomalen und clathrin umhüllten Strukturen in Präsynapse des WT und des KO [Glyvuk *et al.* 2010]. Jeweils links sind aus Gründen der Übersichtlichkeit die synaptischen Vesikel nicht dargestellt.

Nach der Beobachtung von einer veränderten Anzahl synaptischer Vesikel zwischen den Genotypen in EM Aufnahmen wurde der Einfluss der  $\sigma 1B$ -Defizienz auf die Kinetik der SV Exo- und Endozytose ermittelt. Hierzu wurde Vamp 2, ein Transmembranprotein synaptischer Vesikel, mit einem pH-sensitiven grünen Fluoreszenzprotein (synaptopHluorin) fusioniert und die SV-Recyclingrate über die Reacidifizierung synaptischer Vesikel bestimmt. Hier offenbarte sich ein Defekt im SV-Recycling, der durch eine un-

vollständige Reacidifizierung synaptischer Vesikel des KO im Vergleich zum WT angezeigt wurde [Glyvuk *et al.* 2010].

Die Effizienz der Anlagerung synaptischer Vesikel an die aktive Zone wird durch die  $\sigma$ 1B-Defizienz nicht grundlegend beeinträchtigt, sodass die Ursache für das gestörte SV-Recycling nicht mit einem Defekt in der Biogenese synaptischer Vesikel im sekretorischen Weg am TGN erklärt werden kann. Neben der Lokalisation des AP-1 am TGN ist dieser an Endosomen lokalisiert. Der Vergleich von EM Aufnahmen beider Genotypen hat gezeigt, dass die  $\sigma$ 1B-Defizienz zu einer Vergrößerung endosomaler Strukturen führt. Eine mögliche Notwendigkeit für eine endosomale Beteiligung an der Regenerierung von synaptischen Vesikeln nach einer starken Stimulation ist neben der vermutlich schnelleren Vesikelbildung im Vergleich zur CME von der Plasmamembran der Bedarf einer schnellen Reacidifizierung. Darüber hinaus ist die Anzahl synaptischer Vesikel sowie deren Recyclingkinetik in defizienten Synapsen reduziert. Diese Beobachtungen weisen stark darauf hin, dass vor allem nach einer starken Stimulation neben der clathrin vermittelten Endozytose das synaptische Vesikelrecycling durch endosomale Strukturen unter einer Beteiligung des AP-1/ $\sigma$ 1B-Komplexes eine wichtige Rolle spielt.

## 1.6 Fragestellung

Der AP-1 Komplex vermittelt den Transport zwischen dem TGN und frühen Endosomen. In neuronalen Zellen ist er vermutlich am Recycling synaptischer Vesikel beteiligt und spielt hier wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der Proteinsortierung durch endosomale Kompartimente, wie sie beispielsweise nach einer starken Stimulation gebildet werden. Der AP-1 Komplex ist ein Heterotetramer und besteht aus vier Adaptinen. Jedes leistet einen bestimmten Beitrag zur Membran- und Clathrinbindung, Sortierungssignalerkennung sowie zu der Rekrutierung von assoziierten Proteinen. Für die Identifikation der Funktionen des  $\sigma$ 1B Adaptins wurde von C. Riel ein „knock-out“ Mausmodell etabliert, dessen Phänotyp von J. Baltés untersucht wurde [Riel 2004, Baltés 2008].

Die Fragestellung dieser Arbeit war die biochemische Analyse des neuronalen Phänotyps  $\sigma$ 1B-defizienter Mäuse. AP-1 Komplexe zyklisieren zwischen Membranen und dem Zytoplasma, wodurch sie die Membrananbindung vieler weiterer Proteine zum einen vermitteln und zum anderen stabilisieren. Aufgrund der endosomalen Lokalisation des AP-1 wird vermutet, dass folglich die AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz einen Einfluss auf Proteine mit endosomalen Funktionen besitzt. Zur Analyse der molekularen Ursachen für die von Glyvuk *et al.* durch elektronen- und immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen beschriebenen vermehrten endosomalen und clathrinumüllten Strukturen

[Glyvuk *et al.* 2010] sollten Endosomen des Cortex gereinigt und zur Identifikation von spezifischen  $\sigma$ 1B-Interaktionspartnern Unterschiede in der Proteinzusammensetzung der Endosomen zwischen beiden Genotypen charakterisiert werden.

## 2. Materialien und Methoden

Alle verwendeten Lösungen wurden, sofern dies nicht anders angegeben ist, mit Reinstwasser angesetzt. Dieses wurde mit Hilfe der Reinstwasseranlage GenPure (TKM, Niederelbert) gewonnen.

### 2.1 Puffer

PBS

(phosphate buffered saline): 140 mM NaCl (AppliChem, Darmstadt)  
 2,5 mM KCl (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)  
 6,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)  
 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)  
 pH 7,5

TBS: 100 mM Tris/HCl (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)  
 100 mM NaCl (AppliChem, Darmstadt)  
 pH 7,5

TBS-T: 100 mM Tris/HCl (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)  
 100 mM NaCl (AppliChem, Darmstadt)  
 0.05 % Tween 20 (AppliChem, Darmstadt)  
 pH 7,5

Puffer A: 38 mM Kaliumaspartat (Sigma, Steinheim)  
 38 mM Kaliumglutamat (Sigma, St. Louis, USA)  
 38 mM Kaliumgluconat (Fluka, Buchs, CH)  
 20 mM MOPS (Sigma, Steinheim)  
 5 mM Glutathion (red.) (AppliChem, Darmstadt)  
 10 mM Kaliumcarbonat (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)  
 0,5 mM Mg<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Sigma, Steinheim)  
 1 mM EDTA (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)  
 1 mM EGTA (Sigma, Steinheim)  
 1:5000 Protease Inhibitor Cocktail (Sigma, München)  
 10 nM Calyculin A (Axxora, Lörrach)  
 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (Sigma, St. Louis, USA)  
 pH 7,1

## 2.2 Zellbiologische Methoden

Tab. 2-1: Verwendete Zelllinien aus WT und AP-1/ $\sigma$ 1B-defizienten Mäusen.

Zelllinie	Beschreibung	Referenz
S1B111 D5	Primäre embryonale Mausfibroblasten, Genotyp +/+	Baltes 2008
S1B111 E8	Primäre embryonale Mausfibroblasten, Genotyp -/-	Baltes 2008

### Lösungen und Medien:

PBS:	150 mM NaCl	(AppliChem, Darmstadt)	
	120 mM KCl	(Carl Roth GmbH, Karlsruhe)	
	10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	(Carl Roth GmbH, Karlsruhe)	
	0,1 g Phenolrot	(Carl Roth GmbH, Karlsruhe)	
	pH 7,4		
Trypsin-EDTA Lösung:	0,5 g/L Trypsin		
	0,2 g/L EDTA	(Gibco Invitrogen, Karlsruhe)	
Medium:	4,5 g/L Dulbecos modifiziertes Eagle Medium, (DMEM)	(Gibco Invitrogen, Karlsruhe)	
	10% (v/v) Fötale Kälberserum (FKS)	(PAN, Aidenbach)	
	1% (v/v) Penicilin/Streptomycin (100x Stocklösung)	(Gibco Invitrogen, Karlsruhe)	
	1% (v/v) Glutamin (200 mM, 100x Stocklösung)	(Gibco Invitrogen, Karlsruhe)	
	Einfriermedium:	4,5 g/L DMEM	(Gibco Invitrogen, Karlsruhe)
		10% (v/v) Fötale Kälberserum (FKS)	(PAN, Aidenbach)
5% (v/v) Dimethylsulfoxid		(Fluka, Schweiz)	
1% (v/v) Penicilin/Streptomycin (100x Stocklösung)		(Gibco Invitrogen, Karlsruhe)	
1% (v/v) Glutamin (200 mM, 100x Stocklösung)		(Gibco Invitrogen, Karlsruhe)	

### Plastikwaren:

Zellkulturflaschen:	Nunc (Thermo Scientific), Dänemark
Zellkulturschalen:	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellschaber:	Sarstedt, USA
Kryoröhrchen:	Nunc (Thermo Scientific), Dänemark

### **2.2.1 Kultivierung von Maus embryonalen Fibroblasten**

In einem Birtschrank wurden Maus embryonale Fibroblasten (MEF) unter einer was-sergesättigten Atmosphäre bei 37 °C und einer CO<sub>2</sub>-Konzentration von 5% (v/v) in Zellkulturschalen (Oberfläche: 25 cm<sup>2</sup>) kultiviert. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen unter sterilen Bedingungen passagiert. Hierzu wurden die adhären-ten Zellen mit PBS (5 mL, 37 °C) gewaschen und anschließend durch Zugabe von Trypsin-EDTA Lösung (0,5 mL) und Schwenken von der Zellkulturschale gelöst. Durch Zugabe von Kulturmedium (4,5 mL, 37 °C) wurde die Trypsin-Aktivität gestoppt. Die Zellen wurden durch mehrmaliges Aufsaugen mit einer Pipette vereinzelt und anschließend in der gewünschten Dichte ausgesät. Im Allgemeinen fand eine Verdünnung der Zelldichte im Verhältnis 1:5 statt.

### **2.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Zur langfristigen Lagerung wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert. Hierfür wurden die Zellen, wie unter 2.2.1 beschrieben, vom Boden der Zellkulturschalen ab-gelöst. Die Zellen wurden bei Raumtemperatur für 3 min bei 100 g zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, die Zellen in Einfriermedium (1 mL, 4 °C) resuspendiert und 15 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden sie in 1 mL Kryoröhrchen überführt, für 1 h bei -20 °C gelagert und anschließend in flüssigem Stickstoff zur Langzeitlagerung eingefroren. Dimethylsulfoxid im Medium dient der Vermeidung der Bildung von schäd-lichen Eiskristallen.

Zur Vermeidung von Zellschäden ist beim Auftauen ein zügiges Arbeiten notwendig. Die Zellen wurden in einem auf 37 °C erwärmten Wasserbad aufgetaut, zu 10 mL vor-gewärmtem Medium gegeben und anschließend für 3 min bei 100 g zentrifugiert. Das Pellet wurde in frischem Medium gelöst und die Zellen in eine Kulturflasche ausgesät.

## **2.3 Biochemische Methoden**

### **2.3.1 Proteinextraktion aus MEF**

Proteinase-Inhibitor-Cocktail (PIC): Sigma, München

MEF wurden in einer Zellkulturschale kultiviert, zweimal mit PBS gewaschen, mit ei-nem Zellschaber abgelöst und in ein 2 mL Reaktionsgefäß überführt. Sie wurden bei 120 g, 4 °C zentrifugiert, das Pellet gewaschen und erneut bei 500 g, 4 °C zentrifugiert. Zum Homogenisieren wurde das Pellet in PBS aufgenommen, zehnmals durch eine 22G Kanüle aufgezogen und für 30 sec im Ultraschallbad behandelt.

### 2.3.2 Differentielle Zentrifugation eines Cortexextrakts

Membrangebundene und lösliche Proteine eines Zellaufschlusses können über eine differentielle Zentrifugation voneinander getrennt werden. Zur Differenzierung, ob ein Protein auf Organellen oder Membranfragmenten mit einer hohen oder niedrigen Dichte angereichert ist, wurde eine differentielle Zentrifugation in drei aufeinanderfolgenden Kraftfeldern durchgeführt.

Ein Mauscortex wurde mit einem Skalpell in 1,5 mL Puffer A in Würfel mit einer Kantenlänge von etwa 1 mm geschnitten, mit einem Glaspotter durch jeweils 10 Hübe (ein Hub entspricht einer Auf- und Abbewegung) zunächst mit einem „Loose“- und nachfolgend mit einem „Tight“-Kolben bei einer Verdrehung um jeweils etwa 20° homogenisiert und das Homogenisat bei 1000 g für 10 min zentrifugiert. Hieraus resultierte ein Pellet (P1) mit einem Volumen von 700 µL und einem Überstand (S1) von 800 µL. 700 µL des Überstands S1 wurden bei 13 000 g für 15 min zentrifugiert, wobei sich die Suspension in ein Pellet (P13) von 80 µL und einen Überstand (S13) von 620 µL aufteilte. Der Überstand S13 wurde für 40 min bei 100 000 g zentrifugiert und dabei wurde ein Pellet (P100) mit einem Volumen von 20 µL und ein Überstand (S100) von 480 µL erhalten. Alle Schritte wurden bei 4 °C durchgeführt.

Von jeder Fraktion wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford (siehe 2.3.5) durchgeführt und die Verteilung von Markerproteinen zwischen den Fraktionen mit Hilfe von semiquantitativen Western-Blots (siehe 2.3.14) bestimmt.

### 2.3.3 Lineare Dichtegradientenzentrifugation

Zur Anreicherung von axonalen endosomalen Strukturen aus Neuronen wurde eine zweistufige Dichtegradientenzentrifugation verwendet, die von McCaffrey *et al.* entwickelte wurde [McCaffrey *et al.* 2009]. Veränderungen wurden hinsichtlich des Cortexaufschlusses vorgenommen. Darüber hinaus wurde sie um einen Schritt zum Aufschluss von Synpatosomen erweitert. Die Dichtegradientenzentrifugation wurde von McCaffrey *et al.* mit einem Puffer beschrieben, der endosomale Strukturen stabilisiert (Puffer A). Im Rahmen dieser Arbeit wurde sie darüber hinaus mit zwei weiteren Puffern durchgeführt, die clathrinumhüllte Strukturen bzw. synaptische Vesikel stabilisieren (Puffer B bzw. C) [Maycox *et al.* 1992].

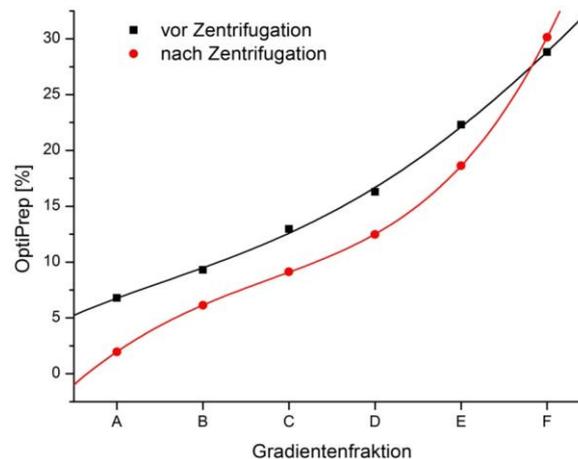
Dichtegradienten Medium: OptiPrep™, 60% (Axis-Shield PoC AS, Oslo, Norway)

Zentrifugenröhren: 7/16 x 2 3/8 ultra clear tube (Beckman)

Gradientenmischer:	Gradient Station <i>ip</i>	(BioComp Instruments, Kanada)	
Puffer A:	38 mM Kaliumaspartat	(Sigma, Steinheim)	
	38 mM Kaliumglutamat	(Sigma, St. Louis, USA)	
	38 mM Kaliumgluconat	(Fluka, Buchs, CH)	
	20 mM MOPS	(Sigma, Steinheim)	
	5 mM Glutathion (red.)	(AppliChem, Darmstadt)	
	10 mM Kaliumcarbonat	(Carl Roth GmbH, Karlsruhe)	
	0,5 mM Mg <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	(Sigma, Steinheim)	
	1 mM EDTA	(Carl Roth GmbH, Karlsruhe)	
	1 mM EGTA	(Sigma, Steinheim)	
	1:5000 Protease Inhibitor Cocktail	(Sigma, München)	
	10 nM Calyculin A	(Axxora, Lörrach)	
	1 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	(Sigma, St. Louis, USA)	
	pH 7,1		
	Puffer B:	38 mM Kaliumaspartat	(Sigma, Steinheim)
		38 mM Kaliumglutamat	(Sigma, St. Louis, USA)
38 mM Kaliumgluconat		(Fluka, Buchs, CH)	
20 mM MES/NaOH		(SERVA GmbH, Heidelberg)/ (AppliChem, Darmstadt)	
5 mM Glutathion (red.)		(AppliChem, Darmstadt)	
10 mM Kaliumcarbonat		(Carl Roth GmbH, Karlsruhe)	
0,5 mM Mg <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>		(Sigma, Steinheim)	
1 mM EDTA		(Carl Roth GmbH, Karlsruhe)	
1 mM EGTA		(Sigma, Steinheim)	
1:5000 Protease Inhibitor Cocktail		(Sigma, München)	
10 nM Calyculin A		(Axxora, Lörrach)	
1 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>		(Sigma, St. Louis, USA)	
pH 6,5			
Puffer C:		38 mM Kaliumaspartat	(Sigma, Steinheim)
		38 mM Kaliumglutamat	(Sigma, St. Louis, USA)
	38 mM Kaliumgluconat	(Fluka, Buchs, CH)	
	20 mM MES/NaOH	(SERVA GmbH, Heidelberg)/ (AppliChem, Darmstadt)	
	0,32 M Sucrose	(Carl Roth GmbH, Karlsruhe)	

5 mM Glutathion (red.)	(AppliChem, Darmstadt)
10 mM Kaliumcarbonat	(Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
0,5 mM Mg <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	(Sigma, Steinheim)
1 mM EDTA	(Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
1 mM EGTA	(Sigma, Steinheim)
1:5000 Protease	
Inhibitor Cocktail	(Sigma, München)
10 nM Calyculin A	(Axxora, Lörrach)
1 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	(Sigma, St. Louis, USA)
pH 6,5	

Lineare Dichtegradienten wurden in Zentrifugenröhren (maximales Volumen 4,2 mL) mit Hilfe des Gradientenmischers (Gradient Station *ip*, BioComp Instruments, Kanada) hergestellt. Für den Gradienten wurde ein Gesamtvolumen von 3,4 mL gewählt, so dass dieser mit bis zu 800 µl beladen werden konnte. Die Herstellung des Gradienten erfolgte in zwei Schritten: Zuerst wurde die Zentrifugenröhre mit 1,7 mL Puffer A, B oder C befüllt und anschließend dieser mit 1,7 mL einer Mischung aus Puffer A, B oder C und OptiPrep™ (60%) im Verhältnis 1:1 unterschichtet. Anschließend wurden diese zwei Komponenten im Gradientenmischer bei 17 upm für 2 min 14 sec unter einem Winkel von 79° rotiert, wodurch ein linearer Dichtegradient mit einer OptiPrep™-Konzentration von 0 bis 30% resultierte. Zur Ermittlung der Linearität und Stabilität des Dichtegradienten wurde die Dichteverteilung vor und nach einer Zentrifugation bei 65 000 g, 4 °C für 5 h bestimmt. Dazu wurde der Dichtegradient in sechs Fraktionen (A bis F) mit demselben Volumen aufgeteilt und die Dichteverteilung des Gradienten refraktometrisch unter Verwendung einer Eichgeraden bestimmt. In Abb. 2-1 ist die Dichteverteilung vor und nach der Zentrifugation dargestellt.



**Abb. 2-1: Dichteverteilung im Gradienten über die sechs Fraktionen A bis F**

Jeder Gradient wurde mit einem Probenvolumen von 800  $\mu\text{L}$  beladen, welches frei von OptiPrep™ war. Die leichte Abnahme der Linearität nach der Zentrifugation, kann auf eine nicht vollständige Durchmischung vom Ladevolumen und dem Dichtegradienten zurückgeführt werden.

### 2.3.3.1 Sedimentationszentrifugation

Alle nachfolgenden Schritte wurden, soweit nicht anders angegeben, auf Eis durchgeführt. Der Cortex eines Mausgehirns wurde in einer Plastikpetrischale mit 1 mL 0,1x Puffer A, B oder C versetzt. Durch den hypoosmotischen Puffer wird ein Anschwellen der Neuronen hervorgerufen, sodass eine effektivere Permeabilisierung ermöglicht wird. Mit einem Skalpell wurde der Cortex in Würfel mit einer Kantenlänge von etwa 1 mm geschnitten und mit einer abgeschnittenen 1000  $\mu\text{L}$  Plastikpipette in einen 1 mL Glashomogenisator überführt. Es wurden 500  $\mu\text{L}$  Puffer A, B oder C in den Glashomogenisator hinzugefügt und mit jeweils zehn Hüben (ein Hub entspricht einer Auf- und Abbewegung), zunächst mit einem „Loose“- und nachfolgend mit einem „Tight“-Kolben bei einer Verdrehung um jeweils etwa 20° homogenisiert. Teilweise intakte Zellen und große Membranen wurden durch eine Zentrifugation bei 1000 g, 4 °C und für 10 min abgetrennt. In das Pellet sedimentieren unaufgeschlossene Zellen, semiintakte Zellen, in denen die Golgikompartimente verbleiben, sowie Membranfragmente. [Grimes *et al.* 1996] Der Überstand, der im Folgenden als Cortexfraktion bezeichnet wird, bestehend aus kleineren Organellen, wie z. B. Endosomen und Vesikeln, und wurde mit einer 200  $\mu\text{L}$  Plastikpipette in ein 1,5 mL Plastikreagiergefäß überführt. Zum mechanischen Aufschluss der sich in der Cortexfraktion befindenden Synaptosomen wurde ein Ball-Homogenisator verwendet und in Anlehnung an Faúndez *et al.* wurde eine Spaltbreite von 12  $\mu\text{m}$  gewählt [Faúndez *et al.* 1997]. Die Cortexfraktion wurde durch eine 20 G-Kanüle in eine Omifix® 40 Solo U-40 (B. Braun, Melsungen) Insulinspritze überführt

und 20-mal durch einen „Ball-Homogenisator“ mit einer Spaltbreite von 12  $\mu\text{m}$  gedrückt. Durch Zugabe von 10x-Puffer A, B oder C wurde eine einfache Pufferkonzentration hergestellt. Von diesem Extrakt wurden 700  $\mu\text{L}$  auf einen linearen OptiPrep™-Gradienten (0-30%) geladen und bei 65 000 g, 4 °C für 5 h zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Gradient in sechs Fraktionen von jeweils 683  $\mu\text{L}$  mit einer abgeschnittenen 1000  $\mu\text{L}$  Plastikpipette fraktioniert. Die Proteinmenge jeder Fraktion wurde nach Bradford (siehe 2.3.5) bestimmt. Zur Aufbewahrung wurden die Fraktionen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20 °C gelagert.

### 2.3.3.2 Flotationszentrifugation

Für eine Aufreinigung der Fraktionen des Sedimentationsgradienten wurden diese Fraktionen unter einen linearen OptiPrep™-Gradienten (0-30%) geladen. Zu 400  $\mu\text{L}$  jeder Fraktion des Sedimentationsgradienten wurden 472  $\mu\text{L}$  OptiPrep™ (60%) hinzugeführt, sodass eine OptiPrep™ Konzentration von mindestens 32,5% erreicht wurde. Diese Mischungen wurden mit einer Kanüle (19G, 10 cm) unter einen linearen OptiPrep™-Gradienten (0-30%) geladen und bei 100 000 g, 4 °C für 18 h ins Gleichgewicht zentrifugiert. Anschließend wurde der Gradient mit einer abgeschnittenen 1000  $\mu\text{L}$  Plastikpipette in fünf Fraktionen desselben Volumens aufgeteilt. Zur Aufbewahrung wurden die Fraktionen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20 °C gelagert.

### 2.3.4 Proteinextraktion und Synaptosomenisolation aus Cortex

Zur Extraktion von Proteinen des Cortexes wurde dieser, wie unter 2.3.2.1 beschrieben, aufgeschlossen. Der Überstand der 1000 g Zentrifugation wird im Folgenden als Cortexfraktion bezeichnet. Synaptosomen wurden durch eine differentielle Zentrifugation der Cortexfraktion bei 10 200g, 4 °C für 15 min erhalten [Huttner *et al.* 1983].

### 2.3.5 Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die von Bradford beschriebene Methode verwendet. Das Prinzip beruht auf der konzentrationsabhängigen Farbänderung eines Farbstoffs durch die Bindung an Proteine [Bradford 1976]. Die Bindung des Farbstoffs Coomassie® Brilliant Blue G-250 an ein Protein führt zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm zu 595 nm [Reisner *et al.* 1975, Fazekas de St Groth *et al.* 1963, Sedmack und Grossberg 1977]. Der Farbstoff Coomassie® Brilliant Blue bindet an basische und aromatische Aminosäurereste, wie vor allem Arginin [Compton und Jones 1985]. Da der Extinktionskoeffizient des Coomassie®-BSA-Komplexes über den Bereich der 10-fachen Konzentrierung konstant ist [Spector

1978], kann das Lambert-Beersche Gesetz in diesem Konzentrationsbereich zur Bestimmung der Proteinkonzentration angewendet werden.

Bio-Rad-Farbreagenz:	Bio-Rad, München
Tecan Mikrotiterplatten Photometer Spectra II:	Tecan, SLT, Schweiz
iMark Microplate Reader:	Bio-Rad, Japan
Proteinstandardlösung (1 mg/mL Rinderserumalbumin, BSA):	New England Biolabs, GmbH, Frankfurt am Main
Zellkultur 96-well-Platte:	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

Mit Hilfe der Proteinstandardlösung (BSA) wurde eine Verdünnungsreihe der Proteinkonzentrationen von 0-16 µg/mL hergestellt. Von den zu untersuchenden Proben wurden jeweils 1-15 µL pipettiert. Das Gesamtvolumen jeder Probe wurde mit Wasser auf 800 µL ergänzt. Anschließend wurden 200 µL des Farbreagenzes hinzugefügt, der Ansatz gevortext und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Bestimmung der Absorption bei 595 nm wurden jeweils 200 µL in Doppelwerten auf eine 96-well-Platte pipettiert und im ELISA-Reader ausgelesen.

### 2.3.6 Proteinfällung nach Wessel und Flügge

Proteine wurden nach der von Wessel und Flügge entwickelten Methode gefällt [Wessel und Flügge 1984]. Hierbei handelt es sich um eine Methanol-Chloroform-Wasserfällung, die sowohl für lösliche als auch hydrophobe Proteine aus verdünnten Lösungen entwickelt wurde. Die Effektivität der Fällung wird durch die Anwesenheit von Detergenzien, Lipiden, Salzen, diversen Puffern und β-Mercaptoethanol nicht beeinträchtigt.

Methanol:	AppliChem, Darmstadt
Chloroform:	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Zu der Probe, aus der die Proteine gefällt werden sollten, wurde das dreifache Volumen an Methanol gegeben, gevortext und für 10 sec bei 9000 g zentrifugiert. Das einfache Probenvolumen an Chloroform wurde hinzugefügt, gevortext und für 10 sec bei 9000 g zentrifugiert. Das einfache Probenvolumen an Wasser wurde hinzugefügt, gevortext und 5 min bei 9000 g zentrifugiert. Die obere Phase (anorganische Phase) wurde verworfen und die untere mit dem dreifachen Volumen an Methanol versetzt, gevor-

text und 15 min bei mindestens 24000 g zentrifugiert (Tischkühlzentrifuge Mikro 200R, Hettich, Tuttlingen). Der Übersand wurde verworfen und der Niederschlag, die gefällten Proteine, bei Raumtemperatur getrocknet. Gefällte Proteine wurden direkt weiterverarbeitet oder bei -20 °C gelagert.

### 2.3.7 Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli

Die SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) ist eine weit verbreitete biochemische Methode zur Auftrennung einer Proteinmischung nach der Molekularmasse im elektrischen Feld, welche erstmals von Laemmli im Jahre 1970 beschrieben wurde [Laemmli 1970]. Für die Trennung der Proteine werden diese in Gegenwart eines Überschusses des anionischen Detergenzes Natriumdodecylsulfat (SDS) denaturiert. Die Effizienz der Denaturierung wird durch das Aufkochen der Probe erhöht. SDS bricht die nichtkovalenten Bindungen nativer Proteine auf, lagert sich an diese an und führt dadurch zu einer konstant negativen Nettoladung der Proteine. Der überwiegende Teil der Proteine bindet die Sulfatgruppen des SDS in einem konstanten Verhältnis von Masse zu Ladung, sodass diese im elektrischen Feld ein einheitliches Wanderungsverhalten in Richtung der Anode zeigen. Die Anlagerung des negativ geladenen SDS an die Proteinketten führt durch die elektrostatischen Abstoßungskräfte zu einer Linearisierung der Proteine, was eine Auftrennung nach deren Kettenlänge, welche proportional zur Molekülmasse ist, ermöglicht. Bei einer denaturierenden SDS-PAGE, welche in dieser Arbeit ausschließlich verwendet wurde, werden die Disulfidbrücken zwischen den Cysteinen in den Proteinen durch eine reduzierende Thiolverbindung gespalten. In dieser Arbeit wurde Dithiothreitol (DTT) verwendet. Dies führt zu einer nahezu ausschließlichen Auftrennung der Proteine nach deren molekularer Masse.

Das Prinzip einer Gelelektrophorese beruht darin, dass sich geladene Moleküle, im Fall der SDS-PAGE Proteine, in einer Gelmatrix durch Aufbau eines elektrischen Feldes bewegen. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine ist abhängig von der Feldstärke, der Ladung der Moleküle und dem mechanischen Widerstand, welcher von der Gelmatrix hervorgerufen wird. Folglich kann das Wanderungsverhalten durch die Stärke des elektrischen Feldes und dem Vernetzungsgrad der Gelmatrix beeinflusst werden. Polyacrylamidgele bestehen aus einer Matrix aus inerten Acrylamidpolymeren, die über N, N'-Methylenbisacrylamid quervernetzt sind. Durch die Quervernetzung entstehen Poren, deren Größe von der Konzentration der Polyacrylamidmonomere sowie dem Grad der Quervernetzungen abhängig sind. Die Polymerisation von Acrylamid wird durch den radikalischen Zerfall von Peroxidsulfationen eingeleitet, welche Tetra-

methylethyldiaminmoleküle aktivieren. Letztere fungieren als Starter der Radikalkettenpolymerisation.

Bei einer diskontinuierlichen Gelelektrophorese wird dem Trenngel ein Sammelgel mit sehr großer Porenweite vorangestellt, dessen pH-Wert um zwei Einheiten niedriger liegt als der des Trenngels. Dies führt zu einer Konzentrierung der denaturierten Proteine an der Grenzfläche beider Gele und erhöht auf diese Weise die Auflösung der Proteintrennung im Trenngel.

Rotiphorese®-Gel30:	Acrylamid-/Bisacrylamidlösung	(Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
4x Sammelgelpuffer:	0,5 M Tris/HCl	(Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
	0,4% (w/v) Natriumdodecylsulfat	(SERVA GmbH, Heidelberg)
	pH 6,8	
4x Trenngelpuffer:	1,5 M Tris/HCl	(Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
	0,4% (w/v) Natriumdodecylsulfat	(SERVA GmbH, Heidelberg)
	pH 8,8	
10% APS:	10% (w/v) Ammoniumperoxid-	
	sulfat	(Merck, Darmstadt)
	Lagerung: lichtgeschützt bei 4 °C	
TEMED:	N, N, N', N'-Tetramethylethyl-	
	enediamin	(SERVA GmbH, Heidelberg)
1 x Laufpuffer:	50 mM Tris	(Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
	400 mM Glycin	(Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
	0,1% (w/v) Natriumdodecylsulfat	(SERVA GmbH, Heidelberg)
	pH 8,6	
6x reduzierender		
Probenpuffer:	750 mM Tris/HCl	(Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
	9% (w/v) Natriumdodecylsulfat	(SERVA GmbH, Heidelberg)
	1% (v/v) Bromphenolblaulösung	
	(gesättigt)	(Merck, Darmstadt)
	60% (v/v) Glycerol	(Sigma-Aldrich, Steinheim)
	pH 6,8	
	Lagerung: bei -20°C	
	300 mM DTT	(AppliChem, Darmstadt)
	wurde jeweils frisch zugegeben	
Proteinmolekulargewichtsmarker:	Precision Plus Protein Standard	
	All Blue	(Bio-Rad, München)

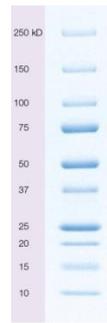
**Tab. 2-2: Zusammensetzungen der Lösungen für Gele unterschiedlicher Acrylamidkonzentrationen.**

Die angegebenen Volumina beziehen sich auf ein Minigel. Für ein Großgel wurde der vierfache Ansatz eines Minigels verwendet.

Acrylamid/%	<b>Sammelgel</b>	<b>Trenngel</b>			
	4,5	7,5	10	12,5	15
Rotiphorese®-Gel30/mL	0,45	1,8	2,7	3,3	4,0
Laufpuffer/mL	0,75	2,0	2,0	2,0	2,0
H <sub>2</sub> O/mL	1,8	3,9	3,2	2,6	1,9
TEMED/μL	3	8	8	8	8
10% APS/μL	30	80	80	80	80

Die SDS-PAGE wurde in Minigelkammern (Bio-Rad, München) oder in Großgelkammern (Werkstatt des Instituts) durchgeführt. Fettfreie Glasplatten wurden mit einem Abstand 1,5 mm bei Mini- und Großgelen in eine dafür vorgesehene Halterung eingespannt, zu etwa zwei Dritteln mit Trenngellösung befüllt (siehe Tab. 2-2) und mit 70%igem Ethanol überschichtet. Die Polymerisation wurde über eine Vergleichsprobe der Trenngellösung kontrolliert. Nach der Polymerisation wurde das Ethanol entfernt, mit Wasser gespült und das Trenngel mit Sammelgellösung überschichtet. Unmittelbar danach wurde ein Probenaschenkamm für 10 oder 11 Taschen für Minigele oder für bis zu 22 Taschen für Großgele eingesetzt. Nach der Polymerisation wurde der Probenaschenkamm entfernt, das Gel mit Glaspatten und Abstandhaltern in die entsprechende Gelkammer eingesetzt und die Kammern mit Laufpuffer befüllt.

Proteinproben wurden entsprechend ihrer Gesamtproteinkonzentration entweder direkt im Verhältnis 1:6 mit 6x reduzierendem Probenpuffer versetzt oder nach Wessel und Flügge gefällt (siehe 2.3.6) und in 1x reduzierendem Probenpuffer solubilisiert. Anschließend wurden die Proteinproben in 1x reduzierendem Probenpuffer für 5 min bei 95 °C inkubiert und nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur in die Probenaschen gefüllt. Für die Zuordnung der Proteingröße wurde der vorgefärbte Marker Precision Plus Protein All Blue Standard (Bio-Rad, München) (Abb. 2-2) verwendet.



**Abb. 2-2: Precision Plus Protein Standard All Blue (Bio Rad, München).**

Nach der Beladung der Geltaschen wurde eine konstante Stromstärke von 35 mA für Minigele und 10 mA für Großgele angelegt, bis die Lauffront das Sammelgel verlassen hatte. Anschließend wurde die Stromstärke auf Konstant 65 mA für Minigele und 20 mA für Großgele erhöht.

### 2.3.8 Proteintransfer auf eine Trägermembran (Western-Blot)

Nach der elektrophoretischen Auftrennung einer Proteinmischung in einem SDS-Polyacrylamidgel wurde diese auf eine Trägermembran aus Nitrozellulose oder Polyvinylidenfluorid (PVDF) transferiert. Durch die Anbindung von SDS an die Proteine besitzen diese eine negative Nettoladung und wandern im elektrischen Feld zur Anode. Nach der SDS-PAGE wird dieses Gel über eine Trägermembran gelegt und eine Spannung angelegt, sodass es zu einer Wanderung der Proteine aus dem Gel auf die Membran kommt. Hier liegen die Proteine in der gleichen relativen Position zueinander vor wie im Gel und sind in dieser Form z. B. für die Dekoration mit Antikörpern zugänglich.

Der Proteintransfer wurde mit einer modifizierten Methode des von Kyhse-Andersen beschriebenen halbtrockenen ElektrobloTTings durchgeführt [Kyhse-Andersen 1984].

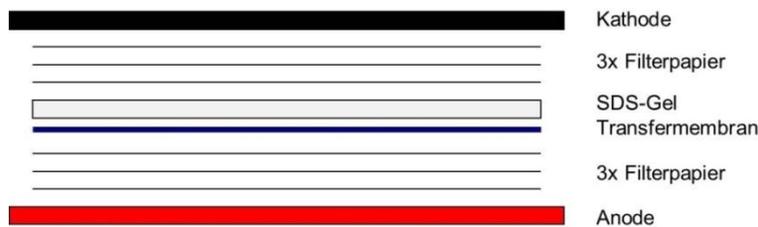
### 2.3.9 Halbtrockenblot

Anodenpuffer:	75 mM Tris/HCl	(Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
	20 % Methanol	(AppliChem, Darmstadt)
	pH 7,4	
Kathodenpuffer:	40 mM $\epsilon$ -Aminocapronsäure	(Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
	20 mM Tris/HCl	(Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
	20 % Methanol	(AppliChem, Darmstadt)
	pH 9,0	
PVDF-Membran:	Immobilon®-P, Millipore, Billerica, USA	
Nitrozellulosemembran:	Nitrocellulose Transfer Membran, Whatman GmbH, Dassel	

Filterpapier: Blotting Paper Sheets, 330 g/m<sup>2</sup>, Satorius Stedim  
Biotech GmbH, Göttingen

Semi-Dry Western-Blot Kammer: Werkstatt des Instituts

Filterpapiere und die Transfermembran wurden entsprechend der Größe des SDS-Gels zugeschnitten. PVDF-Membranen wurden für 10 sec in Methanol benetzt und anschließend in Anodenpuffer äquilibriert. Nitrozellulosemembranen wurden mit Wasser benetzt und anschließend in Anodenpuffer äquilibriert. Auf der Anodenplatte einer Semi-Dry Western-Blot Kammer wurden drei in Anodenpuffer getränkte Filterpapiere und abschließend die Transfermembran luftblasenfrei übereinander geschichtet. Hierauf wurde das SDS-Gel gelegt und mit drei in Kathodenpuffer getränkten Filterpapieren überschichtet. Der Transfer der Proteine erfolgte bei 1 mA/cm<sup>2</sup> Gelfläche über 75 min.

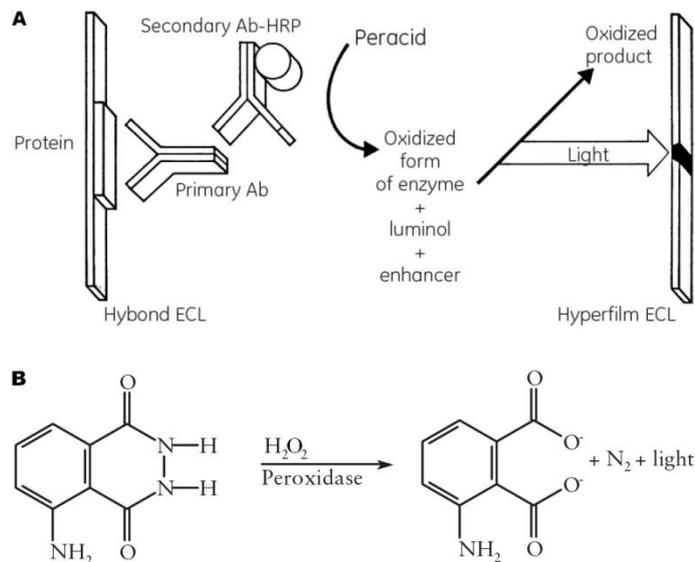


**Abb. 2-3: Aufbau des halbtrockenen Proteintransfers.**

Hier ist dieser aus einem SDS-Gel auf eine Nitrozellulose- oder PVDF-Membran schematisch dargestellt.

### 2.3.10 Immunfärbung auf Nitrozellulose/PVDF-Membranen

Die nun auf eine Membran transferierten Proteine können mit Hilfe von Antikörpern nachgewiesen werden. Unspezifische Bindungsstellen auf der Membran wurden durch die Inkubation mit einem Blockierungspuffer abgesättigt und die Membran anschließend mit einem Primärantikörper inkubiert. Der Primärantikörper bindet spezifisch an das Epitop eines Proteins. Anschließend wurde die Membran mit einem Sekundärantikörper inkubiert, welcher spezifisch an die schwere Kette des Primärantikörpers bindet. Hierfür wurden Sekundärantikörper verwendet, die mit dem Enzym Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase ,HRP) gekoppelt sind. In Gegenwart von HRP und Wasserstoffperoxid kommt es zu der in Abb. 2-4 B dargestellten Oxidation von Luminol, bei der u. a. Licht der Wellenlänge 425 nm emittiert wird [Whitehead *et al.* 1979]. Diese Lumineszenz wird für die quantitative Detektion eines Proteins verwendet.



**Abb. 2-4: Prinzip einer Western-Blot-Membranentwicklung.**

**A** Prinzip der Detektion eines HRP-gekoppelten Antikörperkomplexes mit Luminol. **B** Reaktion des Luminols in Gegenwart von  $\text{H}_2\text{O}_2$  und HRP. Ab: Antikörper. (aus: Amersham ECL Western-Blottin detection reagents and analysis system, Product Booklet, GE Healthcare)

Blockierungspuffer: TBS-T

5% Magermilchpulver

ECL Reagenz

(Amersham):

Amersham™ ECL Western

Blotting Detection Reagents

(GE Healthcare, UK)

ECL Reagenz

(Millipore):

Luminata™ Forte Western

HRP Substrate

(Millipore, Billerica, USA)

Intelligent Dark Box II,

LAS-1000:

(Fuji, Japan)

Nach dem Transfer der Proteine aus dem SDS-Gel auf eine Membran wurden die unspezifischen Bindungsstellen durch die Inkubation mit dem Blockierungspuffer für 1 h bei Raumtemperatur abgedeckt. Anschließend wurde die Membran über Nacht bei 4 °C mit einem Primärantikörper inkubiert. Alle nachfolgenden Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Zur Entfernung von überschüssigem Primärantikörper wurde die Membran dreimal für 15 min mit Blockierungspuffer gewaschen und anschließend für 1 h bei Raumtemperatur mit Sekundärantikörper inkubiert. Überschüssiger Sekundärantikörper wurde durch viermaliges Waschen für jeweils 10 min mit TBS-T entfernt. Alle Inkubations- und Waschschrte wurden auf einem Schüttelinkubator ausgeführt.

Die auf diese Weise präparierte Membran wurde 5 min mit einem ECL Reagenz inkubiert und die Intensität des emittierten Lichts mit Hilfe eines Detektors (Fuji LAS-1000) erfasst. Die Belichtungszeiten lagen zwischen 30 sec und 6 min.

### 2.3.11 Strippen von Transfermembranen

Um mehr als nur ein Protein mit Hilfe eines Immunoblots auf einer Membran detektieren zu können, kann diese entsprechend des molekularen Gewichts eines Proteins zerschnitten werden und die Membranbereiche können getrennt voneinander inkubiert werden. Besitzen mehrere Proteine eine ähnliche Molekularmasse, werden für eine zweite Inkubation mit weiteren Primärantikörpern der primäre und sekundäre Antikörper der ersten Dekoration entfernt. Dieses Entfernen von wird als „Stripping“ bezeichnet. Hierzu wurde im Rahmen dieser Arbeit eine von Abcam (Cambridge, UK) beschriebene Methode verwendet, welche leicht modifiziert wurde.

Stripping-Puffer (1 L):	15 g Glycin	(Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
	1 g SDS	(SERVA GmbH, Heidelberg)
	10 mL Tween 20	(AppliChem, Darmstadt)
	pH 2,2 (mit HCl eingestellt)	

Die Entfernung der Antikörper erfolgte unter milden Bedingungen. Die Membran wurde für zweimal 7 min mit Stripping-Puffer gewaschen. Anschließend wurde sie dreimal für 5 min mit Wasser, zweimal für 10 min mit TBS-T und einmal für 10 min mit Blockierungslösung gewaschen. Daraufhin wurde die Membran mit einem primären und sekundären Antikörper, wie oben beschrieben, dekoriert. Transfermembranen konnten bis zu zweimal gestrippt und erneut, ohne einen erkennbaren signifikanten Verlust der Antikörperspezifität gegen ein Protein, dekoriert werden. Antikörper der ersten Membrandekoration konnten nicht in allen Fällen auf diese Weise entfernt werden und konnten weiterhin detektiert werden. Da die Gefahr des Verlusts einer signifikanten Proteinmenge von der Membran durch eine harschere Strippingmethode zu hoch war, wurde hiervon abgesehen.

### 2.3.12 Verwendete Antikörper

Zur Quantifizierung der Verteilung von Proteinen zwischen verschiedenen Fraktionen sowie für die semiquantitative Bestimmung von Proteinmengen zwischen einer WT- und KO-Fraktion wurden die in Tab. 2-3 aufgelisteten primären Antikörper des IgG-Typs verwendet. Für Western-Blot-Quantifizierungen wurden die in Tab. 2-4 aufgelisteten HRP-gekoppelten sekundären Antikörper verwendet. Primäre Antikörper wurden

von den folgenden Firmen oder von den in Tab. 2-3 angegebenen Arbeitsgruppen bezogen:

- Abcam, Cambridge (UK)
- BD Transduction Laboratories, Heidelberg
- Cell Signaling, Danvers (USA)
- Epitomics, Burlingame (USA)
- GeneTex, Irvine (USA)
- Proteintech Group, Chicago (USA)
- Santa Cruz, Heidelberg
- Synaptic Systems (SySy), Göttingen
- Merck Millipore, Billerica (USA)

**Tab. 2-3: Primäre Antikörper, die in dieser Arbeit verwendet wurden.**

M: Maus, K: Kaninchen, Z: Ziege, m: monoklonal, p: polyklonal, S: Serum.

Name	Organismus	Klonalität	Mol.-gewicht	Hersteller	Produkt- oder Klonnummer	Verdünnung
14-3-3 $\beta/\alpha$	K	p	28 kDa	Cell Signaling	9636	1:1000
14-3-3 $\gamma$	K	p	33 kDa	Santa Cruz	sc-731	1:200
14-3-3 $\zeta/\delta$	K	p	28 kDa	Cell Signaling	9639	1:1000
14-3-3 $\eta$	K	p	28 kDa	Cell Signaling	9640	1:1000
Aak 1	K	p	100 kDa	Santa Cruz	sc-134662	1:200
Aak 1	K		100 kDa	S. Conner/S. Schmidt	JCB <b>2002</b> , 156, 921.	1:750
AP 180	M	m	92 kDa	A. Zhang/P. Camilli	Klon: LP2D11	1:1000
AP-1/ $\gamma$ 1	M	m	94 kDa	BD Transduction Laboratories	610386	1:2000
AP-1/ $\gamma$ 2	K	S	88 kDa	Schu, Uni Göttingen	Kaninchen #6	1:500
AP-2/ $\alpha$	M	m	104 kDa	BD Transduction Laboratories	610508	1:3000
Appl 1	K	p	80 kDa	Miaczynska, Uni-Warschau (PL)	Cell <b>2004</b> , 116, 445.	1:1000
Appl 2	K	p	75 kDa	Miaczynska, Uni-Warschau (PL)	Cell <b>2004</b> , 116, 445.	1:2000
Arf	K	p	21 kDa	Santa Cruz	sc-9063	1:200
Arf 1	K	p	21 kDa	Wieland, Uni Heidelberg	PNAS <b>2003</b> , 100, 8253.	1:5000
Arf-GAP 1	K	S	45 kDa	Wieland, Uni Heidelberg	Traffic <b>2009</b> , 10, 307.	1:5000
Arl 8B	Z	p	22 kDa	Santa Cruz	sc-99272	1:200
ATP6V0a2 (a2)	K	p	98 kDa	GeneTex	GTX110248	1:1000
ATP6V1E1 (E1)	K	p	26 kDa	GeneTex	GTX114056	1:1000
Auxilin	K		102 kDa	M. Butler/P. Camilli		1:1000
CaMK II $\alpha$	M	m	50 kDa	Merck Millipore	05-532	1:2000
CaMK II $\delta$	M	m	54 kDa	Santa Cruz	sc-100362	1:200
Casein kinase II $\alpha$	K	S	45 kDa	Santa Cruz	sc-131507	1:1000
Clathrin heavy chain (Chc)	M	m	190 kDa	BD Transduction Laboratories	610500	1:3000
Clathrin light chain (Clc)	M	m	25 kDa	SySy	Klon: 157.1	1:200
Dock 6	K	p	230 kDa	Santa Cruz	sc-131507	1:200
Eaa 1	K	p	180 kDa	Abcam	ab2900	1:1000

## 2.3 Biochemische Methoden

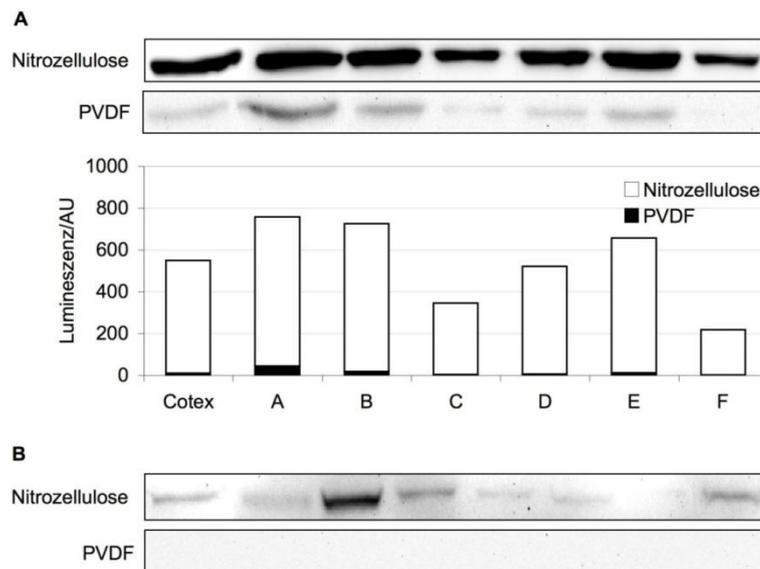
Name	Organismus	Klonalität	Mol.-gewicht	Hersteller	Produkt- oder Klonnummer	Verdünnung
Eaat 1	K	p	65 kDa	Santa Cruz	sc-15316	1:1000
Eaat 2	Z	p	70 kDa	Santa Cruz	sc-7760	1:1000
Epsin 2	K		64 kDa	J. Rosenthal/P. Camilli	JBC <b>1999</b> , 274, 33959.	1:1000
Gak	K	p	144 kDa	Santa Cruz	sc-7864	1:200
GM 130	M	m	130 kDa	BD Transduction Laboratories	610823	1:1000
Hippocalcin	Z	p	22 kDa	Santa Cruz	sc-51296	1:200
Homer 1	K	p	41 kDa	SySy	160002	1:1000
hVps 34	K	p	102 kDa	Abcam	ab73262	1:1000
hVps 34	K	p	102 kDa	Cell Signaling	3811	1:1000
Perq 2	K	p	149 kDa	Freund, Uni Berlin		1:1000
Psd 95	K	p	95 kDa	SySy	124002	1:1000
Rab 10	Z	p	23 kDa	Santa Cruz	sc-6564	1:200
Rab 14	K	p	24 kDa	Santa Cruz	sc-98610	1:500
Rab 2	K	p	24 kDa	Santa Cruz	sc-28567	1:200
Rab 3	M	m	25 kDa	Jahn, Uni Göttingen	Klon: 42.1	1:1000
Rab 31	K	p	26 kDa	Santa Cruz	sc-85111	1:200
Rab 8B	Z	p	24 kDa	Santa Cruz	sc-26579	1:200
Rabex 5	M	m	60 kDa	BD Transduction Laboratories	612558	1:1000
Rabphilin 3A	M	m	26 kDa	Jahn, Uni Göttingen	Klon: 84.2	1:1000
Rap 1B	Z	p	21 kDa	Santa Cruz	sc-1484	1:200
Reticulon 3	K	p	104 kDa	Santa Cruz	sc-33599	1:200
Rme 8	K		255 kDa	McPherson		1:1000
Scamp 1	K	p	38 kDa	SySy	121002	1:1000
Soring Nexin 3 (Snx 3)	K		19 kDa	P. Cullen, Uni Bristol (UK)		1:750
Synapsin 1	M	m	74 kDa	Jahn, Uni Göttingen	Klon: Mo 11.22	1:1000
Synaptogyrin 1	K	S	26 kDa	Jahn, Uni Göttingen	Serum "Einstein"	1:1000
Synaptogyrin 3	Z	p	25 kDa	Santa Cruz	sc-34965	1:200
Synaptopodin	K	p	29 kDa	SySy	102002	1:1000
Synaptotagmin 1	K	p	47 kDa	SySy	105002	1:1000
Syntaxin 13	M	m	38 kDa	Jahn, Uni Göttingen	Klon: 151.1	1:750
Syntaxin 16	K	S	37 kDa	Eur. J. Cell Biol. <b>2002</b> , 81, 273.		1:1000
Syntaxin 3	K	S	33 kDa	Jahn, Uni Göttingen	Kaninchen #29	1:1000
Syntaxin 6	M	m	31 kDa	BD Transduction Laboratories	610635	1:1000
Tgn 38	M	m	90 kDa	BD Transduction Laboratories	610898	1:1000
Tsg 101	M	m	46 kDa	GeneTex	GTX70255	1:1000
Vamp 2	K	p	19 kDa	Abcam	ab3347	1:3000
Vamp 8	K	m	17 kDa	Epitomics	2379-1	1:1000
hVps 15	Z	p	150 kDa	Santa Cruz	sc-8219	1:200
Vps 33A	K	p	68 kDa	Proteintech	16896-1-AP	1:1000
hVps 35	K		92 kDa	P. Cullen, Uni Bristol (UK)		1:750
Vti 1a	K	S	25 kDa	Eur. J. Cell Biol. <b>2002</b> , 81, 273.		1:1000
WDR 7	K	p	164 kDa	Santa Cruz	sc-85210	1:200
$\alpha/\beta$ SNAP	M	m	30 kDa	SySy	112111	1:4000

**Tab. 2-4: Sekundäre HRP-gekoppelte Antikörper, die in dieser Arbeit verwendet wurden.**  
K: Kaninchen, Z: Ziege, p: polyklonal.

Name	Organismus	Klonalität	Hersteller	Produktnr.	Verdünnung
anti-Maus	Z	p	DIANOVA, Hamburg	111-035-144	1:10000
anti-Kaninchen	Z	p	DIANOVA, Hamburg	115-035-062	1:10000
anti-Ziege	K	p	DIANOVA, Hamburg	305-035-045	1:10000

### 2.3.13 Transfermembran für Western-Blot-Quantifizierungen

Mit einer Auswahl an Antikörpern wurde die optimale Transfermembran für die Western-Blot-Quantifizierungen ermittelt und es wurden hierzu PVDF- und Nitrozellulosemembranen miteinander verglichen. Die Signalintensitäten der Entwicklungen auf Nitrozellulosemembranen war für  $\gamma 1$  im Mittel 39-fach höher als auf PVDF-Membranen und für die Antikörper gegen EEA 1, hVps 34 und p150 konnten auf PVDF-Membranen keine oder lediglich sehr schwache Signale detektiert werden, sodass im Folgenden alle Transfers auf Nitrozellulosemembranen durchgeführt wurden. Dies ist exemplarisch in Abb. 2-5 für die primären Antikörper AP 1/ $\gamma 1$  und hVps 15 dargestellt.



**Abb. 2-5: Vergleich der Signalintensität von Proteintransfers auf PVDF- und Nitrozellulosemembranen.**

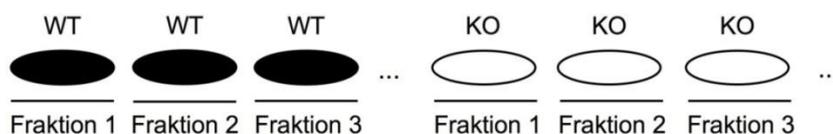
Es wurde von jeder Fraktion die gleiche Gesamtproteinmenge aufgetragen. **A** Western-Blots sowie deren Quantifizierungen des Primärantikörpers AP-1/ $\gamma 1$  und **B** Western-Blots des Primärantikörpers hVps 15.

### 2.3.14 Quantifizierung von Western-Blots

Western-Blot-Quantifizierungen wurden im Allgemeinen im Rahmen dieser Arbeit dafür verwendet, um den Einfluss der AP-1/ $\sigma 1B$ -Defizienz auf die Verteilung sowie die Menge von Proteinen zu bestimmen. Von Interesse war einerseits die Verteilung eines Pro-

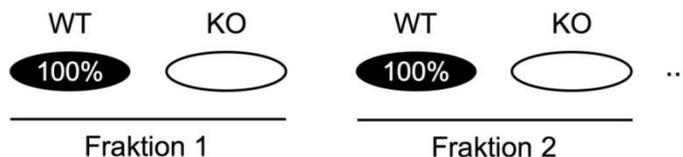
teils über die Fraktionen einer differentiellen Zentrifugation oder eines linearen Dichtegradienten. Andererseits wurde mit Hilfe von Western-Blot-Quantifizierungen die Verteilung der Menge eines Proteins in der gleichen Fraktion des WT und des KO differentiell ermittelt.

Zur Bestimmung der Verteilung der Menge eines Proteins über verschiedene Fraktionen wurde von jeder Fraktion das gleiche Probenvolumen verwendet und alle Proben einer Fraktionierung nebeneinander auf demselben Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Durch den Vergleich der Signalintensitäten kann die relative Verteilung eines Proteins über einen Gradienten oder in den Fraktionen einer differentiellen Zentrifugation bestimmt werden. Dies ist schematisch in Abb. 2-6 dargestellt.



**Abb. 2-6: Bestimmung der relativen Verteilung eines Proteins über verschiedene Fraktionen.**

Für die Untersuchung des Einflusses der AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz auf die Menge eines Proteins in einem Gesamtzell- oder Gesamtgewebeeextrakt sowie in derselben Gradientenfraktion beider Genotypen wurden Proben der gleichen Gesamtproteinmenge nebeneinander auf ein Gel aufgetragen (Abb. 2-7).

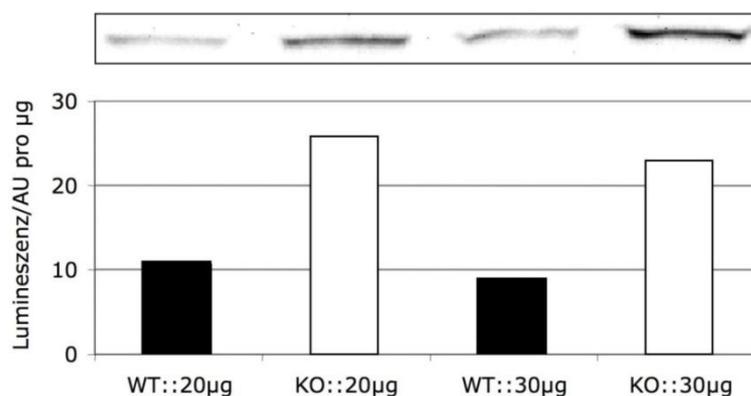


**Abb. 2-7: Bestimmung der differentiellen Änderung der Proteinmenge zwischen den Genotypen in der gleichen Fraktion.**

Von Interesse war die mögliche differentielle Veränderung der Menge eines Proteins, welche durch die AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz hervorgerufen wird. Hierfür wurde das Western-Blot-Signal des KO einer Fraktion auf das des WT normiert und das Signal des KO in % von dem des WT angegeben. Für die Bestimmung der Proteinmenge im Western-Blot ist eine interne Kontrolle und eine Normierung auf diese notwendig. Hierfür bieten sich „Haushaltsprotein“ (*housekeeping protein*) wie Hsc 70 oder Aktin an [Heidebrecht *et al.* 2009]. In der überwiegenden Anzahl der Fraktionen war die Konzentration dieser Proteine im Vergleich zu den zu quantifizierenden Proteinen erheblich höher, sodass eine aussagekräftige Quantifizierung beider Proteingruppen auf demselben Blot nicht möglich war. Zudem wurden diese zytoplasmatischen Proteine im Verlauf der Zentrifugation abgereichert.

Um einen differentiellen Vergleich mehrerer Signalintensitäten durchführen zu können, müssen folgende Bedingungen erfüllt sein: Die Gesamtproteinkonzentration der zu untersuchenden Proben muss bekannt sein und die Western-Blot-Signale dürfen sich nicht im Sättigungsbereich des Dokumentationssystems befinden. Für eine möglichst genaue Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration wurde diese für jede Fraktion mindestens dreimal nach Bradford (siehe 2.3.5) durchgeführt und der Mittelwert gebildet. Darüber hinaus wurde die Gesamtproteinmenge der Proben variiert und das Verhältnis der Signalintensität zur Gesamtproteinmenge gebildet. Außerdem wurde die Belichtungszeit variiert. Auf diese Weise wurde sichergestellt, dass sich die Western-Blot-Signale nicht im Sättigungsbereich des Dokumentationssystems befanden. Dies soll nachfolgend anhand eines Beispiels genauer erläutert werden.

Werden unterschiedliche Gesamtproteinkonzentrationen einer Fraktion geladen, so sollte der Quotient aus der Lumineszenz und der Gesamtproteinmenge unverändert bleiben. In Abb. 2-8 ist die differentielle Quantifizierung der EEA 1 (*early endosome antigen 1*)-Menge zwischen zwei Genotypen dargestellt. Konnte, wie in diesem Beispiel, keine signifikante Abhängigkeit des Quotient aus der Lumineszenz und der Gesamtproteinmenge von der geladenen Gesamtproteinmenge festgestellt werden, so wurden diese Signale für die differentielle Bestimmung einer möglichen durch die AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz hervorgerufenen Veränderung der Proteinmenge verwendet.



**Abb. 2-8: Western-Blot-Quantifizierung von WT- und KO-Zellen.**

Es wurden 20 bzw. 30 µg Gesamtproteine pro Spur geladen. Dargestellt ist der Quotient aus Lumineszenz und der Gesamtproteinmenge. Primärer Antikörper: EEA 1.

Eine weitere Kontrolle dafür, dass eine detektierte Signalveränderung zwischen den Genotypen nicht von einer fehlerhaften Gesamtproteinkonzentrationsbestimmung oder von Gelartefakten hervorgerufen wurde, bildete die Detektion von mehreren Proteinen von unterschiedlichem Molekulargewicht auf einem Blot. Hier konnten stets Signalveränderungen beobachten werden, die für ein Protein aber nicht für eine Gelspur charakteristisch waren.

### 2.3.15 Proteolytischer Verdau von Synaptosomen

Während des Aufschlusses von neuronalem Gewebe führen die dabei auftretenden Scherkräfte zu einer Abtrennung der präsynaptischen Endigungen von den Axonen, Gliazellen und einem Großteil der postsynaptischen Strukturen. Anschließend verschließt sich die präsynaptischen Endigungen wieder und ein Teil der postsynaptischen Dichte sowie Teile der postsynaptischen Membran bleiben mit der präsynaptischen Endigung verankert [Dunkley *et al.* 2008]. Diese nach einem Aufschluss entstehenden membranumschlossenen Strukturen werden als Synaptosomen bezeichnet. Mit Hilfe der Inkubation von Synaptosomen mit Proteasen wurde versucht, die postsynaptischen, nicht membranumschlossenen Proteine selektiv zu verdauen.

Trypsin:	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Proteinase K:	Roche, Indianapolis, USA
Triton X-100:	Boeringer, Mannheim
Trichloressigsäure (TCA):	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Proteinase-Inhibitor-Cocktail (PIC):	Sigma, München
1x reduzierender Probenpuffer:	125 mM Tris/HCl (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) 2% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SERVA GmbH, Heidelberg) 0,2% (v/v) Bromphenolblaulösung (gesättigt) (Merck, Darmstadt) 20% (v/v) Glycerol (Sigma-Aldrich, Steinheim) pH 6,8 Lagerung: bei -20°C 50 mM DTT (wurde jeweils frisch zugegeben) (AppliChem, Darmstadt)

Alle Schritte wurden, sofern nicht anders angegeben, bei 4 °C durchgeführt. Aus den Cortexfraktionen von zwei Gehirnen wurden die Synaptosomen in Form eines Pellets einer 10 200 g-Zentrifugation gewonnen. Das Pellet, die Synaptosomen, wurde in 1,20 mL Puffer A resuspendiert, eine Proteinbestimmung nach Bradford (2.3.5) durchgeführt und in sechs 1,5 mL Reaktionsgefäße jeweils 190 µL der Synaptosomensuspension überführt. Zwei der sechs Synaptosomensuspensionen wurden mit keiner Protease, zwei mit 50 µg/mL Trypsin und zwei mit 50 µg/mL Proteinase K versetzt. Jeweils

eine Synaptosomensuspension ohne Protease, mit Trypsin und mit Proteinase K wurde mit 0,2% Triton X-100 versetzt. Alle sechs Ansätze wurden für 30 min inkubiert. Die Inkubation wurde durch die Zugabe von 200 µL Trichloressigsäure (20%-ig) abgebrochen, die Ansätze durchmischt und für 30 sec bei 16 000 g zentrifugiert. Die Überstände wurden entfernt, die Niederschläge (ohne diese zu resuspendieren) mit 200 µL Aceton gewaschen, für 30 sec bei 16 000 g zentrifugiert und der Überstand entfernt. Dieser Acetonwaschschritt wurde einmal wiederholt. Anschließend wurden die Niederschläge an der Luft bei Raumtemperatur getrocknet. Jeder Niederschlag wurde in 100 µL 1x reduzierendem Puffer aufgenommen, mit Proteinase-Inhibitor-Cocktail im Verhältnis 1:5000 versetzt und für 5 min bei 95 °C aufgeköcht. Der proteolytische Abbau von prä- und postsynaptischen Proteinen wurde mit Hilfe von Western-Blot-Quantifizierungen der Markerproteine Vamp 2, AP-1/γ1, Chc, EEA 1, PSD 95 und Homer 1 überprüft.

### 2.3.16 Coomassiefärbung von Polyacrylamidgelen

Färbungen von Proteinen in Polyacrylamidgelen mit dem Farbstoff Coomassie wurden nach einem von D. Hesse und O. Jahn (Proteomgruppe des Max-Planck-Instituts für Experimentelle Medizin, Göttingen) modifizierten Protokoll von Neuhoff *et al.* [Neuhoff *et al.* 1985] durchgeführt.

Färbelösung (Stock):	0,1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250	(AppliChem, Darmstadt)
	2% (w/v) <i>ortho</i> -Phosphorsäure	(Merck, Darmstadt)
	10% (w/v) Ammoniumsulfat	(Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
Färbelösung (Arbeitslösung):	80% (w/v) Färbelösung (Stock) 20% (v/v) Methanol	(AppliChem, Darmstadt)
Fixierlösung:	10% (v/v) Essigsäure (100%) 40% (v/v) Ethanol	(Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
Waschlösung:	1% (v/v) Essigsäure (100%)	(Carl Roth GmbH, Karlsruhe)

Polyacrylamidgele wurden für mindestens 1 h in Fixierlösung inkubiert und anschließend zweimal für 10 min mit Wasser gewaschen. Das so vorbereitete Gel wurde in Färbelösung (Arbeitslösung) über Nacht gefärbt und daraufhin so lange in Waschlösung gewaschen, bis alle Coomassiepartikel entfernt waren. Alle Schritte wurden unter leichtem Schwenken bei Raumtemperatur durchgeführt.

### 2.3.17 Silberfärbung von Polyacrylamidgelen

Färbungen von Proteinen in einem Polyacrylamidgelen mit Silber als Farbstoff wurden nach einem Protokoll der Arbeitsgruppe Schmidt (Universität Göttingen) durchgeführt. Von Polyacrylamidgelen, die nach diesem Protokoll gefärbt werden, können direkt massenspektroskopische Untersuchungen durchgeführt werden.

Fixierlösung:	10% (v/v) Essigsäure (100%)	(Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
	40% (v/v) Ethanol	(Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
Waschlösung 1:	30% (v/v) Ethanol	(Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
Waschlösung 2:	5% (v/v) Essigsäure (100%)	(Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
Thiosulfatlösung:	0,8 mM Natriumthiosulfat	(Sigma, St. Louis, USA)
Silbernitratlösung:	0,2% (w/v) Silbernitrat	(Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
	0,02% (w/v) Formaldehyd (37%)	(Merck, Darmstadt)
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> -Lösung:	3% (w/v) Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	(Merck, Darmstadt)
	0,02% (w/v) Formaldehyd (37%)	(Merck, Darmstadt)

Polyacrylamidgele wurden für mindestens 1 h in Fixierlösung inkubiert und anschließend zweimal für jeweils 20 min mit Waschlösung und einmal für 20 min mit Wasser gewaschen. Daraufhin wurden die auf diese Weise fixierten Gele für 1 min mit Thiosulfatlösung inkubiert, dreimal für 20 sec mit Wasser gewaschen, für 20 – 60 min in Silbernitratlösung inkubiert und erneute dreimal für 20 sec mit Wasser gewaschen. Die nachfolgende Inkubation in Natriumcarbonatlösung wurde so lange durchgeführt, bis die Proteinbanden im Gel zu erkennen waren und unmittelbar danach wurde die Entwicklung mit Waschlösung 2 gestoppt. Das Gel wurde für 10 min in Waschlösung 2 inkubiert und anschließend zweimal mit Wasser für 1 min gewaschen. Alle Schritte wurden unter leichtem Schwenken bei Raumtemperatur durchgeführt.

### 2.3.18 2D-Gelelektrophorese

Die zweidimensionale (2D-) Gelelektrophorese ist eine Methode, bei der die isoelektrische Fokussierung (IEF) und die SDS-PAGE miteinander kombiniert werden. Unabhängig voneinander etabliert wurde diese Methode von Klose und O'Farrell [Klose 1975, O'Farrell 1975].

Aminosäuren sind amphotere Moleküle, deren Nettoladung in Lösung abhängig vom pH-Wert der Lösung ist. Bei einem für jedes Protein charakteristischen pH-Wert, dem so genannten isoelektrischen Punkt (pI), beträgt deren Nettoladung null. Die isoelektrische Fokussierung macht sich dieses Phänomen zu Nutze: Eine Proteinmischung wird

auf ein Gel mit einem pH-Gradienten aufgetragen und in ein elektrisches Feld gebracht. In diesem findet so lange eine Wanderung der Proteine statt, bis sie den pH-Wert des Gels erreichen, an dem ihre Nettoladung verschwindet (isoelektrischer Punkt). Auf diese Weise findet eine Auftrennung der Proteine entsprechend ihres isoelektrischen Punkts statt. Da für diese Auftrennungsmethode die Ladung eines Proteins durch den Puffer, in dem es gelöst ist, möglichst nicht beeinflusst werden soll, können ionische Detergenzien wie SDS nicht verwendet werden.

Nach der isoelektrischen Fokussierung werden die Proteine durch eine SDS-PAGE (2.3.7) orthogonal zur ersten Dimension entsprechende deren Größe aufgetrennt. Durch die Kombination beider Trennverfahren lässt sich eine sehr hochauflösende Trennung erzielen.

Ettan IPGphor II Isoelectric Focusing System:	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Immobiline DryStrip Reswelling Tray:	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Immobiline DryStrip gel, pH 4-7, 11 cm:	GE Healthcare Bio-Sciences AB, Schweden
Immobiline DryStrip gel, pH 3-11 NL, 11 cm:	GE Healthcare Bio-Sciences AB, Schweden
PlusOne, DryStrip Cover Fluid:	GE Healthcare Bio-Sciences AB, Schweden
IPG Puffer:	GE Healthcare Bio-Sciences AB, Schweden
1% Bromphenolblau (Stock):	1% Bromphenolblau (Merck, Darmstadt)
	50 mM Tris (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
Redhydrierungs-Puffer (CHAPS):	8 M Harnstoff (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
	2% (w/v) CHAPS (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
	0,5% IPG Puffer
	0,002% Bromphenolblau (Stock)
	Lagerung: bei -20 °C
	20 mM DTT (wurde jeweils frisch zugesetzt) (AppliChem, Darmstadt)
	1:5000 PIC (wurde jeweils frisch zugesetzt) (Sigma, München)

### Redhydrierungs-Puffer

(Triton X-100):	7 M Harnstoff	(Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
	2 M Thioharnstoff	(Sigma, St. Louis, USA)
	2% (w/v) Triton X-100	(Boeringer, Mannheim)
	0,5% IPG Puffer	
	0,002% Bromphenolblau (Stock)	
	Lagerung: bei -20 °C	
	20 mM DTT (wurde	
	jeweils frisch zugesetzt)	(AppliChem, Darmstadt)
	1:5000 PIC (wurde	
	jeweils frisch zugesetzt)	(Sigma, München)
SDS Äquilibrierungs-Puffer:	6 M Harnstoff	(Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
	75 mM Tris/HCl	(Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
	29,3% (w/v) Glycerol	(Sigma-Aldrich, Steinheim)
	2% SDS	(SERVA GmbH, Heidelberg)
	0,002% Bromphenolblau (Stock)	
	1% (w/v) DTT	(AppliChem, Darmstadt)
	2,5% (w/v) Iodoacetamid	(Sigma, München)
	pH 8,8	
	Lagerung: bei -20 °C	

Die isoelektrische Fokussierung wurde, sofern nicht anders angegeben, nach dem Protokoll „2D Electrophoresis, Principles and Methods“ der Firma Amersham (Little Chalfont, UK) durchgeführt. Detaillierte Angaben zu Puffern, Materialien und Geräten sind den Anleitungen des Herstellers zu entnehmen.

Für die isoelektrische Fokussierung wurden 11 cm Immobiline DrySrip Gele mit einer maximalen Proteinkapazität von 200 µg verwendet. Proteinmischungen wurden nach Wessel und Flügge gefällt (2.3.6) und in einem Harnstoff Rehydrierungs-Puffer resublimiert, sodass die Proteinkonzentration 1 µg/µL betrug. Neben der routinemäßig verwendeten chaotropen Verbindung CHAPS [Perdew *et al.* 1983, Luche *et al.* 2003] wurde Triton X-100 verwendet [Luche 2003]. 11 cm Immobiline DrySrip Gele wurden im Rehydrierungs-Puffer, in dem die zu trennenden Proteine solubilisiert wurden, rehydriert und es wurde eine isoelektrische Fokussierung durchgeführt. Dazu wurde sowohl für pH 3-11 NL als auch für pH 4-7 Streifen folgendes einstufiges Programm verwendet:

- konstante Spannung: 500 V
- Fokussierungszeit: 1 h

- Stromstärke pro Streifen: 50  $\mu$ A
- Temperatur: 20 °C

Unverzüglich nach der beendeten isoelektrischen Fokussierung wurden die Gele für die zweite Dimension in einem SDS-haltigen Äquilibrations-Puffer unter leichtem Schwenken für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Äquilibration wurden die Proben direkt für die SDS-PAGE auf ein SDS-Gel gelegt und elektrophoretisch aufgetrennt (siehe 2.3.7). Zur Detektion der Proteine nach der SDS-PAGE wurde eine Coomassiefärbung des Gels durchgeführt.

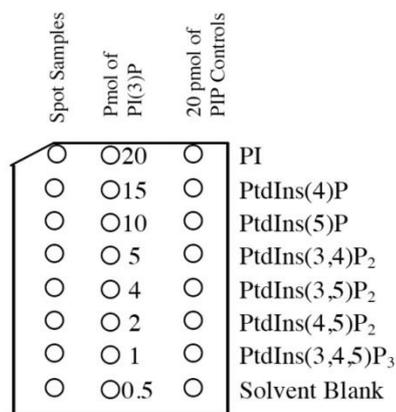
### 2.3.19 Quantifizierung von Phosphatidylinositolphosphaten

Phosphatidylinositolphosphate wurden durch das Auftragen auf eine Nitrozellulosemembran und einen Immunoblot unter Verwendung eines primären und sekundären Antikörpers quantifiziert. Phosphatidylinositol-3-phosphat (PI-3-P) und Phosphatidylinositol-4-phosphat (PI-4-P) wurden mit Mass Strip™ Kits (Echelon, Salt Lake City, USA) quantifiziert. Genaue Angaben zu Puffern, Membranen und Detektionsreagenzien sind den Angaben des Herstellers zu entnehmen. Für die Quantifizierung von Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphat (PI-3,4-P<sub>2</sub>) und Phosphatidylinositol-3,5-bisphosphat (PI-3,5-P<sub>2</sub>) waren keine Mass Strip™ Kits erhältlich und es wurde in Anlehnung an die Mass Strip™ Kits ein Quantifizierungsprotokoll entwickelt.

Trichloressigsäure (TCA):	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
PI(3)P Mass Strip™ Kit, K-3600	Echelon, Salt Lake City, USA
PI(4)P Mass Strip™ Kit, K-4000	Echelon, Salt Lake City, USA
D-myo-Phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate, P-3416:	Echelon, Salt Lake City, USA
Gereinigter Anti-PI(3,4)P <sub>2</sub> Antikörper, Z-P034:	Echelon, Salt Lake City, USA
D-myo-Phosphatidylinositol-3,5-bisphosphate, P-3516:	Echelon, Salt Lake City, USA
Gereinigter Anti-PI(3,5)P <sub>2</sub> Antikörper, Z-P035:	Echelon, Salt Lake City, USA
Hybond-C Extra, RPN203E:	GE Healthcare Europe, Freiburg
Methanol:	AppliChem, Darmstadt
Chloroform:	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Bovines Serumalbumin (BSA):	SERVA GmbH, Heidelberg
PBS-T:	PBS
	0.1% Tween 20 (AppliChem, Darmstadt)

Von den Proben, in denen die Phosphatidylinositolphosphatmenge quantifiziert werden sollte, wurde zuerst eine TCA-Fällung entsprechend dem Mass Strip™ Kit Protokoll durchgeführt. Ziel war eine differentielle Quantifizierung der Phosphatidylinositolphosphatmenge von Fraktionen zweier Genotypen, sodass je Genotyp und Fraktion jeweils die gleiche Gesamtproteinmenge gefällt wurde. Von der Cortexfraktion wurden 1,30 mg Gesamtproteine gefällt. Aufgrund der deutlich geringeren Gesamtproteinkonzentration in den Fraktionen der 65 000 g-Zentrifugation wurde hier die maximal mögliche Menge gefällt.

Aus dem Niederschlag der TCA-Fällung wurden die Phosphatidylinositolphosphate extrahiert, auf eine Membran aufgetragen und mit einem Immunoblot quantifiziert. Für PI-3-P und PI-4-P wurde dies nach dem entsprechenden Mass Strip™ Kit Protokoll durchgeführt.



**Abb. 2-9: Schematische Darstellung eines PI(3)P Mass Strip™.**  
(Echelon, Salt Lake City, USA)

Quantifizierungen von PI-3,4-P<sub>2</sub> und PI-3,5-P<sub>2</sub> wurden in Anlehnung an einen von Dowler *et al.* beschriebenen Protein Lipid Overlay Assay [Dowler *et al.* 2002], ein Protokoll der Arbeitsgruppe Gozani der Universität Stanford [Gozani 2011] und das Mass Strip™ Kit Protokoll der Firma Echelon (Salt Lake City, USA) durchgeführt.

Für eine quantitative Bestimmung von PI-3,4-P<sub>2</sub> und PI-3,5-P<sub>2</sub> wurde D-myosphosphatidylinositol-3,4-bisphosphate in Methanol/Chloroform (1:1) und D-myosphosphatidylinositol-3,5-bisphosphate in Methanol/Chloroform/Wasser (2:1:0,8) gelöst, 0,5, 1, 2, 5, 10, 20, 40 und 60 pmol als Referenzreihe auf eine Hybond-C Extra Membran aufgetragen und diese für 1 h unter Lichtausschluss getrocknet. Die so vorbereiteten Membranen wurden noch am selben Tag weiterverwendet. Isolierte Phosphatidylinositolphosphaten von bis zu acht Proben wurden auf dieselbe Membran aufgetragen und unter Lichtausschluss getrocknet. Die Membran wurde für 1 h mit PBS-T/3% BSA blockiert, dreimal mit PBS-T für 5 min gewaschen und 2 h mit einem primären Antikörper gegen PI-3,4-P<sub>2</sub> oder PI-3,5-P<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal mit

PBS-T für 5 min gewaschen und für 1 h mit einem gegen den primären Antikörper spezifischen HRP-gekoppelten sekundären Antikörper inkubiert. Die Membran wurde dreimal mit PBS-T gewaschen und mit ECL Reagenz entwickelt. Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Für die Quantifizierung wurde von den Signalen der Referenzreihe eine Eichgerade erstellt und die Phosphatidylinositolphosphatmenge der Proben bestimmt.

## 2.4 Massenspektrometrische Methoden

Die Massenspektrometrie (MS) ist eine Methode, mit der die Masse von Atomen oder Molekülen bestimmt werden kann. In der Biochemie wird sie überwiegend zur Bestimmung der Masse von Proteinen und Proteinfragmenten und zur Identifizierung von Proteinen in einer Mischung verwendet. Für eine Massenbestimmung werden die Analyte zunächst in die Gasphase überführt, ionisiert, im elektrischen Feld beschleunigt und anhand deren Eigenschaften im elektrischen Feld das Masse zu Ladungsverhältnis ( $m/z$ ) ermittelt.

Eine weiche Ionisierungsmethode ist die Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (*Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization*, MALDI), welche eine besonders effektive Methode für große Moleküle wie Polymere und Proteine ist, weshalb sie in der Proteinanalytik weit verbreitet ist. Das Prinzip beruht auf der Kokristallisation der Analyte mit einer Matrixsubstanz. Als Matrixmoleküle werden kleine organische Verbindungen verwendet, welche vor der Kristallisation im Überschuss (zwischen 100- bis 100 000-fach) mit den Analyten vermischt werden. Während der Kristallisation findet ein „Einbau“ der Analyte in die Matrix statt. Durch den Beschuss der Matrix mit einem kurzen, hochenergetischen Laserpuls findet nach der Relaxation eines Teils der Energie im Kristallgitter eine explosionsartige Freisetzung von Teilchen von der Matrixoberfläche statt. Es kommt zu einer Verdampfung der freigesetzten Matrixpartikel und in dessen Verlauf zu einer Ionisierung der Analyte mit einer Nettoladung von +1. Ein großer Vorteil dieser Ionisierungsmethode ist die geringe Fragmentierungsrate von großen Molekülen.

Nach der Ionisierung werden die geladenen Moleküle im elektrischen Feld beschleunigt und besitzen anschließend alle die gleiche Energie und folglich entsprechend ihrer Masse unterschiedliche Geschwindigkeiten. Eine Detektionsmethode der ionisierten und beschleunigten Analyte ist die Flugzeitmethode (*time-of-flight*, TOF), welche sich die Geschwindigkeitsunterschiede der Analyte zu Nutze macht. Es wird die Zeit bestimmt, die ein Analyt vom Zeitpunkt der Beschleunigung bis zum Erreichen des Detektors (meist ein Sekundärelektronenvervielfältiger) benötigt, und aus dieser die Masse errechnet.

$$E = \frac{1}{2}mv^2 \Rightarrow \text{TOF} \propto \sqrt{\frac{m}{z}}$$

Die Vorteile gegenüber anderen Detektionsmethoden bestehen darin, dass sie keine Filterwirkung besitzt und somit alle ionisierten Analyte simultan gemessen werden können. Darüber hinaus ist eine sehr schnelle Messung über den gesamten Massenbereich möglich. Mit modernen Apparaturen können bis zu 100 000 komplette Spektren pro Sekunde gemessen werden. Da mit dieser Methode auch große Moleküle problemlos detektiert werden können, wird sie häufig mit weichen Ionisierungsmethoden wie der MALDI kombiniert.

Für eine spezifischere Quantifizierung von Proteinen ist die Verwendung der Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) weit verbreitet. Hierfür werden zwei Analysatoren, im Rahmen dieser Arbeit zwei TOF-Analysatoren (TOF-TOF), hintereinander gekoppelt. Zwischen beiden Analysatoren befindet sich eine Kollisionszelle, die mit einem Inertgas gefüllt ist. Durch die Kollision der Ionen mit den Gasatomen oder Gasmolekülen findet eine charakteristische Fragmentierung statt. Anhand des Fragmentierungsmusters können Proteine eindeutig identifiziert werden.

Bei komplexen Probenmischungen wird der Massenspektrometrie ein Trennverfahren wie eine Flüssigkeitschromatographie (LC/MS) vorangestellt, um die Menge der simultan zu messenden Proteine zu reduzieren.

### 2.4.1 Vorbereitung von Proteinproben für die Massenspektrometrie

Um die Anzahl von Proteinen, die gleichzeitig für die Massenspektrometrie aufgearbeitet und anschließend gemessen werden, zu reduzieren, werden komplexe Proteinmischungen zunächst elektrophoretisch aufgetrennt. Daran schließt sich der zentrale Schritt des In-Gel-Verdau an, welcher von Rosenfeld *et al.* entwickelt wurde [Rosenfeld *et al.* 1992]. Er beinhaltet im Wesentlichen die folgenden vier Schritte: Entfärbung der Gelstücke, Reduzierung und Alkylierung von Cysteinen zur irreversiblen Spaltung von Disulfidbrücken, wodurch eine optimale Entfaltung der Proteine erzielt wird, proteolytische Spaltung und Extraktion der erhaltenen Peptide. Trypsin ist eine Serinprotease, die die Peptidbindungen spezifisch am Carboxyterminus der basischen Aminosäuren Arginin und Lysin spaltet. Befindet sich in unmittelbarer Nachbarschaft zur Spaltstelle eine saure Aminosäure (Aspartat oder Glutamat), so wird die Hydrolyse beeinträchtigt. Keine Spaltung findet statt, wenn der Carboxyterminus zur Schnittstelle ein Prolin aufweist [Thiede *et al.* 2000]. Durch den Trypsinverdau findet eine charakteristische Fragmentierung der Proteine statt: Diese Fragmente werden massenspektrometrisch identifiziert. Durch einen Abgleich der identifizierten Fragmente mit einer Pro-

teindatenbank kann auf die sich in der Probe befindenden Proteine geschlossen werden. Die Methode des In-Gel-Verdau ist in der Proteomanalyse weit verbreitet.

### 2.4.2 In-Gel-Verdau von Proteinproben

Von einer Proteinprobe wurde eine SDS-PAGE durchgeführt, das Gel coomassiegefärbt und Banden für einen In-Gel-Verdau ausgewählt und ausgeschnitten oder eine ganze Gelspur in Gelstücke gleicher Größe zerschnitten. Der In-Gel-Verdau wurde nach einem Protokoll der Arbeitsgruppe Schmidt (Universität Göttingen) durchgeführt. Alle Lösungen wurden mit HPLC-Wasser (J.T. Baker, Griesheim) angesetzt.

Waschlösung:	25 mM Ammoniumcarbonat	(Sigma, Steinheim)
Acetonitrillösung 50:	50% (v/v) Acetonitril	(Merck, Darmstadt)
	25 mM Ammoniumcarbonat	(Sigma, Steinheim)
Reduktionsreagenz:	10 mM DTT	(AppliChem, Darmstadt)
	25 mM Ammoniumcarbonat	(Sigma, Steinheim)
Carbamidmethylierungsreagenz:	25 mM Iodacetamid	(Sigma, Steinheim)
	25 mM Ammoniumcarbonat	(Sigma, Steinheim)
Trypsinlösung:	20 ng/μl Trypsin	(Promega, Mannheim)
	4 ppm Trifluoressigsäure	(Fluka, Buchs, CH)
	25 mM Ammoniumcarbonat	(Sigma, Steinheim)
Extraktionslösung:	1 % Trifluoressigsäure	(Fluka, Buchs, CH)
Lösepuffer:	0,1% Trifluoressigsäure	(Fluka, Buchs, CH)

Jedes Gelstück wurde in 100 μL Waschlösung für 15 min bei 37 °C unter leichtem Schwenken inkubiert, der Überstand verworfen und zweimal für 30 min bei 37 °C unter leichtem Schwenken in Acetonitrillösung 50 inkubiert. Der Überstand wurde entfernt und für 10 min bei 37 °C unter leichtem Schwenken in 100% Acetonitril inkubiert, der Überstand entfernt und für 5 min bei Raumtemperatur in einem geöffneten Reaktionsgefäß getrocknet. Zum Aufbrechen der Disulfidbrücken wurde das Gelstück für 1 h bei 56 °C mit Reduktionsreagenz inkubiert, auf Eis abgekühlt und der Überstand verworfen.

Zur Alkylierung der Cysteine werden die Gelstücke in 10 μL Carbamidmethylierungsreagenz für 30 min bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss und leichtem Schwenken inkubiert, der Übersand entfernt und 10 min bei 37 °C unter leichtem Schwenken mit Reduktionsreagenz inkubiert und der Überstand entfernt. Die Gelstücke wurden in 100 μL Acetonitrillösung 50 für 30 min und 100 μL 100% Acetonitril für 10 min bei

37 °C unter leichtem Schwenken inkubiert und der Überstand jeweils entfernt. Das Gelstück wurde für 5 min bei Raumtemperatur getrocknet.

Durch Zugabe von 6 µL Trypsinlösung wurde der Verdau eingeleitet. Nach der Zugabe wurde für 15 min auf Eis inkubiert, um ein Quellen des Gels zu erzielen, und anschließend für mindestens 4 h bei 37 °C inkubiert. Für die Isolation der verdauten Peptide wurde der Überstand abgenommen und das Gel mit 20 µL Extraktionslösung für 30 min bei 37 °C unter Schwenken inkubiert. Die Extraktionslösung wurde abgenommen und mit dem Überstand des Verdau vereinigt. Die extrahierten Peptide wurden in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und in 10 µL Lösepuffer durch Vortexen und Ultraschallbehandlung resolvasiert. Gelöste Peptide wurden entweder direkt massenspektrometrisch vermessen oder bei -20 °C gelagert.

### 2.4.3 Massenspektrometrie trypsinverdauter Peptide

Alle massenspektrometrischen Messungen wurden in der Arbeitsgruppe Schmidt (Universität, Göttingen) durchgeführt. Peptide wurden entweder direkt auf ein MALDI-AnchorChip-Target (Bruker Daltonics GmbH, Bremen) aufgetragen oder über eine Nano-LC, EASY-nLC II (Proxeon, Thermo Fisher Scientific, Dreieich) aufgetrennt und fraktioniert über einen LC-MALDI Fraction Collector, PROTEINEER fc II (Bruker Daltonics GmbH, Bremen) auf ein MALDI-AnchorChip-Target aufgetragen. MALDI-Massenspektrometrieexperimente, bei denen die Peptidmischungen auf diese Weise vorfraktioniert wurden, werden im Folgenden als LC-MALDI bezeichnet.

Alle Schritte wurden nach Protokollen von Bruker Daltonics GmbH (Bremen) und Proxeon, Thermo Fisher Scientific (Dreieich) durchgeführt. Genaue Angaben zu Lösungen, Puffern und Arbeitsbedingungen sind den Angaben der jeweiligen Protokolle der Hersteller zu entnehmen.

### 2.4.4 iTRAQ™-Massenspektrometrie

Mit einem iTRAQ™ (*Isobaric tags for relative and absolute quantitation*)-Massenspektrometrieexperiment können bis zu vier individuelle Proben getrennt voneinander markiert und die relativen Mengenunterschiede eines Proteins oder Peptids bestimmt werden. Eine detaillierte Beschreibung der Theorie dieser Methode ist in Kapitel 5 zu finden.

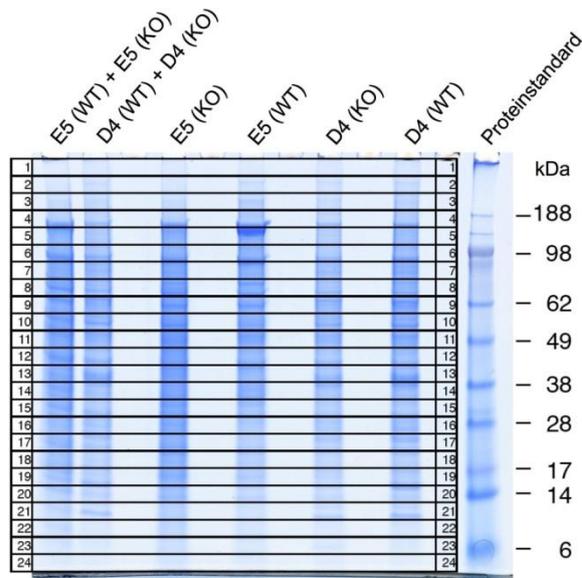
## SDS-Ladepuffer

(O. Jahn, Göttingen):	106 mM Tris HCl
	141 mM Tris base
	2% Lithiumlaurylsulfat
	10% Glycerol
	0,51 mM EDTA
	0,22 mM Coomassie G250
	0,175 mM Phenolrot
	50 mM 1,4-Dithiothreitol
	pH = 8,5

iTRAQ™-Markierungsreagenzien: iTRAQ™ Reagents-4plex (AB Sciex Germany GmbH, Darmstadt)

Die Proteine von unterschiedlichen Proben, von denen eine iTRAQ™-Massenspektrometrie durchgeführt wurde, wurden nach Wessel und Flügge (2.3.6) gefällt, in 20 µL SDS-Ladepuffer aufgenommen, für 20 min bei 40 °C inkubiert und eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt. Für die iTRAQ™-Quantifizierung dieser Arbeit wurden Proteine der Fraktionen D4 und E5 sowohl des WT als auch des KO analysiert. Alle weiteren Arbeitsschritte wurden in der Proteomics-Gruppe des Max-Planck-Instituts für Experimentelle Medizin (Göttingen) nach der von C. Schmidt und H. Urlaub beschriebenen Methode zur iTRAQ™-Markierung von in-gel-verdauten Proteinen durchgeführt [Schmidt und Urlaub 2009]. Die dort beschriebene Methode der Probenmarkierung wurde von O. Jahn (Proteomics-Gruppe, Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin, Göttingen) automatisiert und durchgeführt, was zu einer deutlich erhöhten Reproduzierbarkeit der experimentellen Daten führt. Alle Angaben zu Reagenzien, Puffern, Materialien und Arbeitsschritten sind der Veröffentlichung von Schmidt und Urlaub zu entnehmen [Schmidt und Urlaub 2009].

Jeweils 15 µg der in SDS-Ladepuffer aufgenommenen Proteine jeder Probe und eine Mischung aus jeweils 7,5 µg der Fraktionen D4 (WT) und D4 (KO) sowie eine Mischung aus jeweils 7,5 µg der Fraktionen E4 (WT) und E4 (KO) wurden auf ein NuPAGE®-Gel (Invitrogen, Carlsbad, USA) aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 2-10).

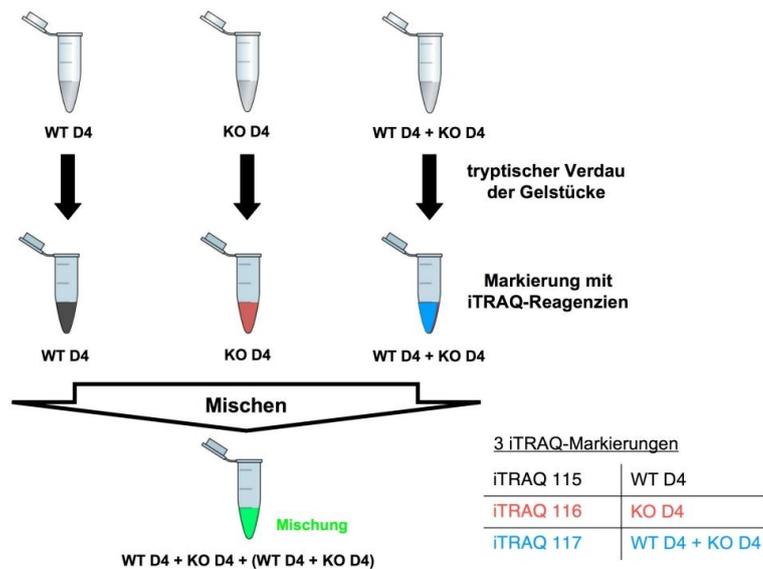


**Abb. 2-10: NuPAGE®-Gel des iTRAQ™-Experiments.**

NuPAGE®-Gel der vier Proben und der zwei Mischungen, die nach der elektrophoretischen Auftrennung und einem In-Gel-Verdau mit iTRAQ™-Reagenzien markiert wurden. Die horizontalen Linien zeigen die Schnittstellen für die Aufteilung der Gelbänder an. Die Gelbänder wurden mit einem speziellen Gelspurschneider [Schmidt und Urlaub 2009] in exakt gleichgroße Gelstücke unterteilt.

Im Gegensatz zum Laemmli-System besitzt das NuPAGE®-System mehrere Vorteile [Schmidt und Urlaub 2009]: Aufgrund des neutralen pH-Werts ist die Proteinstabilität in der Elektrophorese erhöht, was zu einer Erhöhung der Bandenschärfe führt. Darüber hinaus kommt es zu einer kompletten Reduktion der Disulfidbrücken und zu keinem Bindungsbruch zwischen Asparagin und Prolin. Durch die hohe Auflösung dieses Gel-systems über eine wesentlich geringere Strecke als im Laemmli-System ist dieses System sehr gut dazu geeignet, um eine gesamte Gelbänder für einen In-Gel-Verdau in Stücke aufzuteilen.

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine einer Probe entsprechend ihrer Masse wurde jede Bande in 24 gleichgroße Gelstücke unterteilt (Abb. 2-10) und tryptisch verdaut. Proteinproben der Gelstücke des WT wurden mit dem iTRAQ™-Reagenz 115, die des KO mit dem iTRAQ™-Reagenz 116 und die der Mischung aus WT und KO mit dem iTRAQ™-Reagenz 117 markiert. Jeweils die markierten Proben eines Molekulargewichts beider Genotypen und der Mischung der Fraktion D4 oder E5 wurden vereinigt und lyophilisiert. Dies ist in Abb. 2-11 noch einmal veranschaulicht.



**Abb. 2-11: Probenmarkierungen mit den iTRAQ™-Reagenzien.**

In der ersten Reihe (grau) sind symbolisch die Reaktionsgefäße mit den Gelstücken desselben Molekulargewichtsbereiches des WT, des KO und der Mischung aus WT und KO dargestellt. Nach dem tryptischen Verdau fand die iTRAQ™-Markierung statt (mittlere Reihe: schwarz, rot und blau). Alle drei markierten Proben jeden Molekulargewichts wurden nach der Markierung vereinigt (grün). Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist ausschließlich die Markierung der Fraktion D4 dargestellt. Proben der Fraktion E5 wurden analog markiert.

Nach der Vereinigung der Proben resultierten 24 gemischte, iTRAQ™-markierte, lyophilisierte Proben der Fraktion D4 und 24 der Fraktion E5, welche bis zur späteren LC-MALDI-Messung in der Abteilung Schmidt (Universität Göttingen) bei -20 °C gelagert wurden.

Für das LC-MALDI-Massenspektrometrieexperiment wurden die iTRAQ™-markierten Proben in Lösepuffer resolubilisiert und jeweils über eine Nano-LC, EASY-nLC II (Proxeon, Thermo Fisher Scientific, Dreieich) aufgetrennt. Als Vorsäule wurde eine NS-MP-10 Bio Sphere C18, 5 µm, 120R (NanoSeparations, Nieuwkoop, NL) und als Trennsäule eine Acclaim Pep Map 100, 75 µm i. d. x 15 cm (Dionex, Idstein) verwendet. Mit Hilfe eines LC-MALDI Fraction Collector, PROTEINEER fc II (Bruker Daltonics GmbH, Bremen) wurden die einzelnen LC-Fractionen auf ein AnchorChip Target (Bruker Daltonics GmbH, Bremen) aufgetragen. Jede Probe wurde auf diese Weise in 96 Fractionen aufgeteilt, auf ein MALDI-AnchorChip-Target (Bruker Daltonics GmbH, Bremen) aufgetragen und von jeder Fraktion mit dem Massenspektrometer MALDI-TOF ultraflex extreme (Bruker Daltonics GmbH, Bremen) ein MS-MALDI-Experiment durchgeführt. Die Steuerung des Massenspektrometers sowie die Aufnahme der Messdaten erfolgten mit Hilfe der Programme flex Analysis (Bruker Daltonics GmbH, Bremen) und flex Control (Bruker Daltonics GmbH, Bremen) und WARP-LC (Bruker Daltonics GmbH, Bremen). Die Analyse der Peptid- bzw. Proteindaten wurde mit dem Programm BioTools (Bruker

## 2.4 Massenspektrometrische Methoden

---

Daltonics GmbH, Bremen) durchgeführt. Detaillierte Angaben zur Steuerung der Geräte sind den Anleitungen der Hersteller zu entnehmen.

Peptide und Proteine wurden durch einen Abgleich der massenspektrometrischen Daten gegen die Proteindatenbanken NCBI und UniProtKB mit den folgenden WARP-LC und Mascot Parametern identifiziert.

### Peptididentifikation (WARP-LC):

- Version: 1.2
- Suchmethode: ultraflex\_ITRAQ4plex\_mouse
- Submitted Spectra: CID

### Mascot:

- Datenbank: NCBIInr oder SwissProt
- Ausgelassene Spaltstellen: 1
- Instrumenten Typ CID: MALDI-TOF-TOF
- Peptidtoleranz: 25,0 ppm
- Peptidladung: 1+
- Masse: Monoisotopisch
- Enzyme: Trypsin
- Variable Modifikationen: iTRAQ4plex (K)  
iTRAQ4plex (N-term)  
iTRAQ4plex (Y)
- Taxonomie: Mus musculus (house mouse)
- Instrument Type ETD: Standard
- MS/MS Tolerance: 0,8 Da
- #13C: 0
- Peptide Score Grenzwert: 20,0
- Gewichtungsfaktoren: 1,0
- Min. 1 Peptide(s) mit Score: > 55,0
- Identity Threshol (only Mascot): EIN
- Proteine akzeptiert, wenn: Mascot > 80,0 anderenfalls wenn: Phenyx > 12,0
- Peptide akzeptiert, wenn: Mascot > 10,0 anderenfalls wenn: Phenyx > 5,0
- Im Falle von uneindeutiger Bestimmung, Peptide akzeptiert basierend auf: Protein Score

Die Auswertung der iTRAQ™-Signale der quantifizierten Proteine wurde mit dem Programm Proteinscape (Bruker Daltonics GmbH, Bremen) durchgeführt. Anhand der iTRAQ™-Signale wurden die relativen Veränderungen der Mengen der quantifizierten

Proteine bestimmt und diese anhand einer Kontrolle validiert. Die Validierung wurde mit Hilfe einer selbst geschriebenen Excelarbeitsmappe durchgeführt. Dies ist ausführlich in Kapitel 5 beschrieben.

### 2.4.5 Shotgun-Massenspektrometrie

Zur Identifizierung von Proteinen in einer komplexen Mischung wurde neben der gelbasierten Methode von Link *et al.* eine gelfreie Methode etabliert [Link *et al.* 1999]. Mit ihr werden proteolytisch gespaltene Proteine über eine eindimensionale Flüssigkeitschromatographie aufgetrennt und mit Hilfe einer Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) quantifiziert. Diese Methode wird in Anlehnung an die Schrotschussesequenzierung (*Shotgun Sequencing*) als Shotgun-Massenspektrometrie bezeichnet.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Protokoll in Anlehnung an die von Morgenthal *et al.* und Reumann *et al.* etablierten Methoden verwendet: Die Proteinmischung wird durch einen zweistufigen Verdau mit Lys-C gefolgt von Trypsin verdaut [Morgenthal *et al.* 2007, Reumann *et al.* 2007]. Alle Puffer und Lösungen wurden, sofern nicht anders angegeben, mit HPLC-Wasser (J.T. Baker, Griesheim) angesetzt.

Lys-C Verdaupuffer:	8 M Harnstoff	(Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
	50 mM Tris/HCl	(Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
	1 mM EDTA	(Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
	pH 7,5	
	[für 200 µl: 145,5 µl Harnstoff (11 M), 10 µl Tris/HCl (1 M, pH 8.0), 0,2 µl EDTA (1 M), 44,5 µl H <sub>2</sub> O]	
Trypsin Verdaupuffer:	50 mM Tris/HCl	(Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
	10% Acetonitril	(Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
	10 mM CaCl <sub>2</sub>	(Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
	pH 7,5	
DTT-Lösung:	1 M DTT	(AppliChem, Darmstadt)
Iodacetamid-Lösung:	1 M Iodacetamid	(Sigma, Steinheim)
Lys-C	0,02 µg/µl rLys-C	(Promega, Madison, USA)
	in Resuspension Buffer V181A	(Promega, Madison, USA)
Trypsin-EDTA Lösung:	0,5 g/L Trypsin	
	0,2 g/L EDTA	(Gibco Invitrogen, Karlsruhe)
TFA-Lösung	10% Trifluoressigsäure (TFA)	(Fluka, Buchs, CH)

Gefällte oder lyophilisierte Proteine wurden in Lys-C Verdaupuffer aufgenommen (je 1 µg Proteinen wurden 2 µL des Puffers hinzugefügt), zur Reduktion von Disulfidbrü-

cken das entsprechende Volumen an DTT-Lösung zum Erreichen einer Konzentration von 5 mM hinzugefügt und für 30 min bei 37 °C unter leichtem Schwenken inkubiert. Anschließend wurde die Lösung für die Alkylierung mit dem entsprechenden Volumen einer Iodacetamid-Lösung zum Erreichen einer Konzentration von 20 mM versetzt und für 30 min, bei Raumtemperatur, unter Lichtausschluss und leichtem Schwenken inkubiert. Zum Abbruch der Iodacetamid-Reaktion wurde mit DTT-Lösung eine finale Konzentration an DTT von 11 mM eingestellt. Für den Lys-C-Verdau der Proteine wurde die Lösung mit Lys-C in einem Verhältnis von Enzym zu Substrat von 1:1000 versetzt und für 5 h bei 37 °C unter leichtem Schwenken inkubiert. Anschließend wurde die Lösung bis zum Erreichen einer Harnstoffkonzentration von 2 M mit Trypsin Verdaupuffer versetzt, Trypsin-EDTA Lösung in einem Verhältnis von Enzym zu Substrat von 1:20 hinzugefügt und für 10 bis 15 h bei 37 °C unter leichtem Schwenken inkubiert. Der Verdau wurde durch die Zugabe von TFA-Lösung mit einer Zielkonzentration von 1% TFA gestoppt und bis zum Massenspektrometrieexperiment bei 4 °C gelagert.

Für die massenspektrometrische Analyse der verdauten Peptide wurden diese über eine Umkehrphasen-Flüssigkeitschromatographie (*Reversed-phase liquid chromatography*, RP-LC) in 1152 Fraktionen aufgetrennt und auf ein MALDI-AnchorChip-Target (Bruker Daltonics GmbH, Bremen) aufgetragen. Als Vorsäule fanden eine NS-MP-10 Bio Sphere C18, 5 µm, 120R (NanoSeparations, Nieuwkoop, NL) und als Trennsäule eine Acclaim Pep Map 100, 75 µm i. d. x 15 cm (Dionex, Idstein) Verwendung.

## 2.5 Elektronenmikroskopische Aufnahmen

Eine morphologische Untersuchung der endosomalen Fraktionen D4 und E5 wurde mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie durchgeführt. Mit dieser Betriebsart für Elektronenmikroskope ist eine direkte Abbildung von Objekten mit Hilfe eines Elektronenstrahls möglich. Die Auflösungsgrenze liegt bei unter 1 nm, wodurch eine Abbildung auch von kleinen biologischen Strukturen problemlos möglich ist. Zur transmissionselektronenmikroskopischen Messung müssen biologische Proben zunächst fixiert und aufgrund ihres geringen eigenen Kontrasts für die verwendete Methode des Negative Stains mit Atomen hoher Elektronendichte wie Blei oder Uran gefärbt werden.

Die Präparation sowie die transmissionselektronenmikroskopische Abbildung der endosomalen Fraktionen wurde von der Arbeitsgruppe Riedel (Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen) nach einer in „Präparationsmethodik in der Elektronenmikroskopie“ beschriebenen Methode durchgeführt [Robinson *et al.* 1985].

## 2.6 Geräte

Acrylamidgel-Elektrophoresekammer	Bio-Rad, München
Acrylamidgel-Elektrophoresekammer	Werkstatt des Instituts
Branson Sonifier 450	Heinemann, Schwäbisch Gmünd
Phasenkontrastmikroskop	Zeiss, Jena
Heizblock Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
LAS-1000 Gel Dokumentationssystem	Fuji, Japan
Semi-Dry Western-Blot Kammer	Werkstatt des Instituts
Tecan Mikrotiterplatten Photometer Spectra II	Tecan, SLT, Schweiz
iMark Microplate Reader	Bio-Rad, Japan
Vakuumkonzentrator Sped Vac SVC100H	Bachofer, Reutlingen
CO <sub>2</sub> -Inkubator HERAcell 150	Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold
Mikrobiologische Sicherheitswerkbank, HERAsafe KS 12	Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold
Gradientenmischer, Gradient Station <i>ip</i>	BioComp Instruments, Kanada
UV-Visible Spectrophotometer Cary 50 Bio	Varian, Darmstadt
Analysenwaage ABJ 220-4M	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern
Präzisionswaagen BP 3100 P	Satorius, Göttingen
pH-Meter inoLab pH Level 1	WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim
Reinstwasseranlage GenPure	TKA, Niederelbert
MALDI-TOF ultraflex extreme	Bruker Daltonics GmbH, Bremen
Nano-LC, EASY-nLC II	Proxeon, Thermo Fisher Scientific, Dreieich
LC-MALDI Fraction Collector, PROTEINEER fc II	Bruker Daltonics GmbH, Bremen
Ettan IPGphor II Isoelectric Focusing System	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
1 mL Glashomogenisator (1 mL Tissue Grinder, Dounce	Wheaton, Millville, USA

### 2.6.1 Zentrifugen und Rotoren

Tischkühlzentrifuge Mikro 200R	Hettich, Tuttlingen
Tisch-Ultrazentrifuge TL-100 mit Rotor TLA-45	Beckmann Coulter, Krefeld
Ultrazentrifuge Optima™ L-90K mit Rotor SW 60	Beckmann Coulter, Krefeld

### 2.6.2 Spezielle Auswertungs- und Analysesoftware

Proteinscape (v 2.1.0577)	Bruker Daltonics GmbH, Bremen
flex Analysis (v 3.3)	Bruker Daltonics GmbH, Bremen
flex Control (v 3.3)	Bruker Daltonics GmbH, Bremen
BioTools (v 3.2)	Bruker Daltonics GmbH, Bremen
WARP-LC (v 1.2)	Bruker Daltonics GmbH, Bremen
Image Reader LAS-1000 Pro (v 2.1)	Fuji, Japan
AIDA (v 3.10.033)	raytest GmbH, Straubenhardt
ImageJ (v 1.45 I)	National Institut of Health, USA

### 3. Proteinmengen im Cortex, in Synaptosomen und in MEF

Ausgehend vom Phänotyp AP-1/ $\sigma$ 1B-defizienter Mäuse, welche hypoaktiv sind und eine beeinträchtigte motorische Koordination sowie ein verschlechtertes räumliches Vorstellungsvermögen aufweisen, wurden in vorangegangenen Experimenten neuronale Veränderungen untersucht, die durch diese Defizienz hervorgerufen werden. In hippocampalen Neuronen konnte gezeigt werden, dass der AP-1-Komplex präsynaptisch lokalisiert ist und die AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz zu einer Beeinträchtigung des synaptischen Vesikelrecyclings führt. Elektronenmikroskopisch wurde in den Präsynapsen defizienter hippocampaler Neuronen eine reduzierte Anzahl synaptischer Vesikel festgestellt. Darüber hinaus sind vermehrt endosomale Strukturen vorhanden, welche gegenüber denen von WT-Neuronen vergrößert sind. Des Weiteren war die Anzahl clathrinumhüllter Strukturen in diesen Synapsen erhöht [Glyvuk *et al.* 2010]. Basierend auf diesen Beobachtungen kann die Annahme gemacht werden, dass der AP-1/ $\sigma$ 1B-Komplex für die Sortierung eines Teils der Proteine von synaptischen Vesikeln verantwortlich ist. Die Veränderungen endosomaler Strukturen weisen stark darauf hin, dass an der Proteinsortierung synaptischer Vesikel ein endosomaler Sortierungsweg beteiligt ist. Die molekularen Einflüsse auf das synaptische Vesikelrecycling sollen biochemisch untersucht und hierzu die synaptischen vesikelassoziierten Endosomen von  $\sigma$ 1B-defizienten Synapsen biochemisch charakterisiert werden.

Zunächst sollte überprüft werden, ob die in Präsynapsen beobachteten Veränderungen spezifisch für dieses Kompartiment sind. Da sich Prä- und Postsynapsen nicht voneinander trennen lassen, wurden Veränderungen im Cortex denen in Synapsen gegenübergestellt. Es wurden drei Gruppen von Markerproteinen gewählt, die auf Organellen oder Vesikeln lokalisiert sind, welche am Recyclingweg synaptischer Vesikel beteiligt sind. Es handelt sich um Marker für den Golgi-Apparat, das *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN), synaptische Vesikel und Endosomen. Ausgehend von den bekannten Einflüssen der AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz auf die Proteinsortierung von primären hippocampalen Neuronen wurden mit Hilfe dieser Markerproteine die Auswirkungen der AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz auf den Cortex und Synaptosomen biochemisch untersucht und die Proteinmengen dieser Markerproteine für den WT und den KO mit semiquantitativen Western-Blot Experimenten bestimmt. Sind die Veränderungen in AP-1/ $\sigma$ 1B-defizienten Synaptosomen im Vergleich zum Cortex stärker, so deutet das auf Veränderungen hauptsächlich in den Synapsen hin. Von ausgewählten Markerproteinen wurden zum Vergleich des Einflusses der Defizienz auf neuronale und nicht neuronale Zellen Quantifizierungen zwischen WT und AP-1/ $\sigma$ 1B-defizienten MEF durchgeführt.

Für den Golgi-Apparat und das *trans*-Golgi-Netzwerk wurden die Marker GM 130 bzw. TGN 38 gewählt. Diese Marker sind im *cis*-Golgi, dem ER zugewandten Bereich, bzw. im *trans*-Golgi-Netzwerks (TGN), dem der Plasmamembran und dem endosomalen Recycling zugewandten Bereich, lokalisiert. Sie wurden gewählt, um mögliche Einflüsse des KO auf den Golgi kompartimentspezifisch untersuchen zu können. GM 130 (Golgi-Matrix-Protein von 130 kDa) ist vermutlich ein Strukturprotein, welches im *cis*-Golgi lokalisiert ist und dessen genaue Funktion unbekannt ist. Der Antikörper erkennt dieses Protein unabhängig von seiner Phosphorylierung (BD Transduction Laboratories, Heidelberg). TGN 38 ist am TGN an der Sortierung von Proteinen in Transportvesikel beteiligt. Über ein tyrosin-basiertes Sortierungssignal vermittelt TGN 38 die spezifische Lokalisierung von Proteinen an das TGN [Banting und Ponnambalam 1997].

Für Transportvesikel des synaptischen Vesikelrecyclings wurden als Marker für synaptische Vesikel das Vesikel-assoziierte Membranprotein Vamp 2 (*Vesicle-associated membrane protein 2*) und Synaptotagmin 1 gewählt. Vamp 2 ist ein Transmembranprotein, welches auf synaptischen Vesikeln lokalisiert und als v-SNARE an der Fusion dieser mit der Zielmembran beteiligt ist. Synaptotagmin 1 ist ein  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitives Transmembranprotein synaptischer Vesikel, welches die Exozytose von diesen während einer Depolarisation und dem darauf folgenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Präsynapse vermittelt. Die clathrinvermittelte Endozytose (*clathrin mediated endocytosis*, CME) spielt eine zentrale Rolle für das synaptische Vesikelrecycling, welche durch den AP-2-Komplex vermittelt wird. Als Markerprotein für diesen Adaptorkomplex dient das Adaptin  $\alpha$ , von dem zwei Isoformen existieren: die neuronale und muskuläre Isoform A und die ubiquitäre Isoform B. Der hier verwendete Antikörper ist spezifisch für die Isoform A. AP-1 vermittelt den Transport clathrinumhüllter Vesikel vom TGN hin zu Endosomen. Für diesen Komplex dienten die beiden Adaptorisoformen  $\gamma 1$  und  $\gamma 2$  als Markerproteine. Clathrin ist ein zentrales strukturgebendes Protein, welches bei der Bildung von einer Gruppe von Transportvesikeln eine zentrale Rolle spielt, die nach diesem Protein clathrin umhüllte Vesikel CCV (*clathrin coated vesicles*) genannt werden. Clathrin bildet ein nicht kovalent gebundenes Triskel aus, welches je aus drei leichten und drei schweren Ketten besteht. Als Markerprotein für Clathrin wurde ein Antikörper gegen die schwere Kette (*clathrin heavy chain*, Chc) eingesetzt.

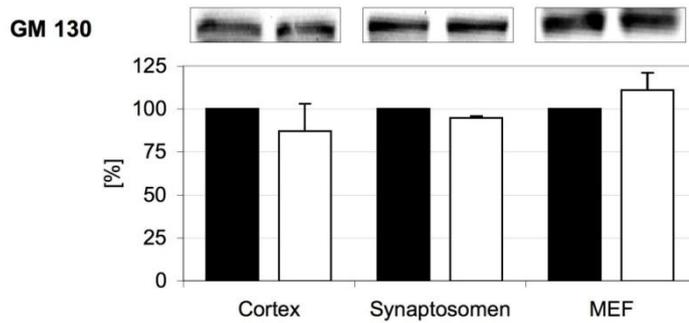
Aufgrund des Einflusses des AP-1/ $\sigma 1\text{B}$ -Komplexes auf das synaptische Vesikelrecycling sowie das Vorhandensein veränderter endosomaler Strukturen in defizienten Neuronen wurden Markerproteine gegen vornehmlich frühe Endosomen gewählt. Als Marker für frühe Endosomen wurden Rab 5, EEA 1, Rabex 5 sowie die Proteine des frühen endosomalen SNARE-Komplexes Syntaxin 6, Syntaxin 13, Vti 1a und Vamp 4 verwendet [Brandhorst *et al.* 2006]. Rab 5 (*Ras-related protein 5*) ist vornehmlich auf frühen

Endosomen sowie an der Plasmamembran lokalisiert und ist an der homotypischen Fusion von frühen Endosomen beteiligt. Es sind die drei Isoformen A, B und C bekannt, die untereinander eine hohe Homologie von über 79 % aufweisen. Rab 5 bindet nur in seinem aktivierten GTP-gebundenen Zustand an die Zielmembran. Rabex 5 bildet einen Komplex mit Rabaptin 5, welcher an Rab 5 bindet und dessen GDP/GTP-Austausch vermittelt. Rabex 5 wurde als weiterer Marker für frühe Endosomen verwendet. EEA 1 (*early endosomal antigen 1*) ist ein peripheres Membranprotein, welches hauptsächlich auf frühen Endosomen und im Zytoplasma zu finden ist. Es vermittelt die homotypische Fusion früher Endosomen, an der Rab 5 und darüber hinaus der endosomale SNARE-Komplex bestehend aus Syntaxin 6, Syntaxin 13, Vti 1a (*vesicle transport v-SNARE protein 1a*) und Vamp 4 (*vesicle-associated membrane protein 4*) beteiligt ist. Dessen Mitglieder wurden ebenfalls als Marker früher Endosomen verwendet. Während EEA 1 auf Rab 5-positiven und PI-3-P-angereicherten Endosomen lokalisiert ist, stellen Appl 1- und Appl 2-positiv Endosomen eine Vorstufe dieser dar. Anhand neuester Forschungsergebnisse wird angenommen, dass eine Anreicherung von PI-3-P zu einem Austausch von Appl gegen EEA 1 führt [Zoncu *et al.* 2009, Urbanska *et al.* 2011]. Die Funktion Appl-positiver Endosomen ist noch weitgehend unbekannt. Als Marker des späten endosomalen Abbauweges wurden Antikörper gegen das Protein TSG 101 (*tumor susceptibility gene 101 protein*) eingesetzt. Es ist ein Mitglied des ESCRT I-Komplexes, welcher an der Bildung von späten Endosomen mit multivesikulären Körpern (*multi vesicular bodies*, MVB) beteiligt ist.

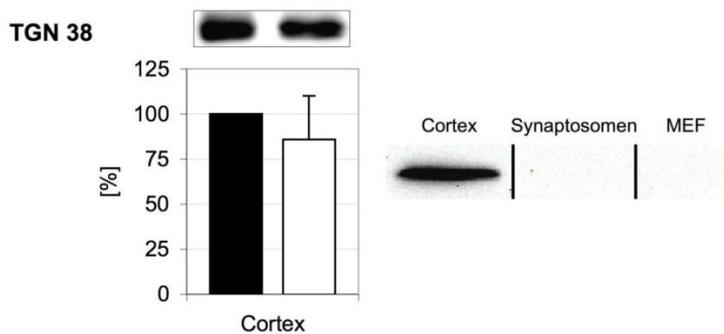
### 3.1 Golgi und *trans*-Golgi-Netzwerk

Der Golgi-Apparat ist u. a. für die Biosynthese sekretorischer Vesikel und ihrer Proteine essentiell. Im *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) werden die Proteine anschließend in die verschiedenen sekretorischen Wege sortiert. TGN 38 ist ein Markerprotein des TGN, welches hauptsächlich in diesem Organell zu finden ist. Quantifizierungen der Konzentrationen von GM 130 und TGN 38 im Cortex zeigten zwischen den Genotypen keine signifikanten Unterschiede. In Synaptosomen und in MEF ist GM 130 ebenfalls nicht signifikant verändert. Dies weist darauf hin, dass es durch die AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz zu keinen grundlegenden Veränderungen dieses Biosyntheseweges kommt.

Unterschiede zwischen den Genotypen konnten für TGN 38 in Synaptosomen und in MEF nicht untersucht werden, da in diesen Extrakten im Western-Blot keine Signale detektiert werden konnten (Abb. 3-2). Die geringe Menge von TGN 38 in Synaptosomen weist darauf hin, dass das *trans*-Golgi-Netzwerk in diesem Extrakt stark abgereichert ist.



**Abb. 3-1: Proteinmengen von GM 130 (130 kDa).**  
 Im Cortex (n=10), in Synaptosomen (n=2) und MEF (n=2).



**Abb. 3-2: Proteinmengen von TGN 38 (85 – 95 kDa).**  
 Im Cortex (n=12). In Synaptosomen und im 500 g Überstand ist TGN 38 mittels Western-Blot nicht detektierbar. Dies ist hier exemplarisch für den WT gezeigt.

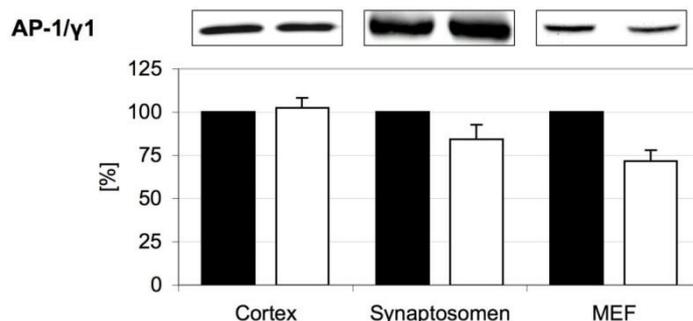
### 3.2 Transportvesikelproteine

Adaptorproteinkomplexuntereinheiten, die Adaptine, sind nur in ihrem tetrameren Komplex stabil und Monomere werden *in vivo* abgebaut [Zizioli *et al.* 1999]. Nach dem Ausschalten des AP-1/ $\sigma$ 1B-Komplexes, welcher die höchste Expression im Gehirn zeigt, stellte sich die Frage, ob dadurch eine Reduktion des AP-1-Komplexes im Cortex oder den Synaptosomen zu beobachten ist. Im Vergleich zum WT Cortex ist der Proteingehalt von AP-1/ $\gamma$ 1 im KO nicht signifikant verändert und der von AP-1/ $\gamma$ 2 um ungefähr 15% nur sehr leicht erhöht.

In der synaptosomalen Fraktion ist eine leichte, signifikante Verringerung der AP-1/ $\gamma$ 1-Menge zu erkennen, während die Proteinmenge des AP-1/ $\gamma$ 2-Komplexes nicht signifikant erhöht ist. Diese Verringerung von AP-1/ $\gamma$ 1 deutet stark auf eine synaptosomale Lokalisierung des AP-1/ $\sigma$ 1B-Komplexes hin. Nach dem „Allen Mouse Brain Atlas“ zeigen AP-1/ $\sigma$ 1A und B die höchste Expression im Hippocampus, sodass die sehr schwache Reduktion von AP-1/ $\gamma$ 1 auf den geringen Anteil des Hippocampus am Cortex erklärt werden kann.

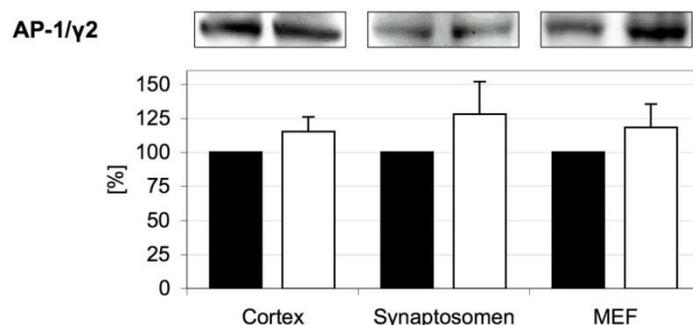
Die Proteinmenge von AP-1/γ1 wurde darüber hinaus in MEF Zellen quantifiziert: In defizienten Zellen ist eine deutliche Reduktion zu erkennen, was den Einfluss der AP-1/σ1B-Defizienz auch auf andere, nicht neuronale Zelltypen zeigt.

MEF-Zellen haben aufgrund ihrer hohen Wachstumsrate auch einen sehr aktiven vesikulären Transport, ähnlich dem in der Präsynapse. Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass der AP-1/σ1B hier eine spezifische Funktion erfüllt. Vermutlich vermittelt der AP-1/σ1B-Komplex hier einen zusätzlichen Proteintransport auf dem gleichen Weg wie der AP-1/σ1A-Komplex.



**Abb. 3-3: Proteinmengen von AP-1/γ1 (91,4 kDa).**

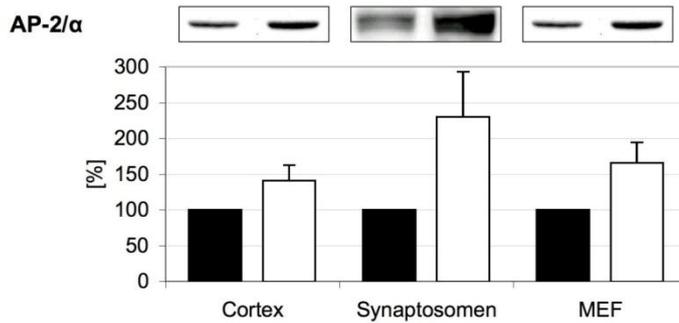
Im Cortex (n=7), in Synaptosomen (n=4) und MEF (n=6).



**Abb. 3-4: Proteinmengen von AP-1/γ2 (87,9 kDa).**

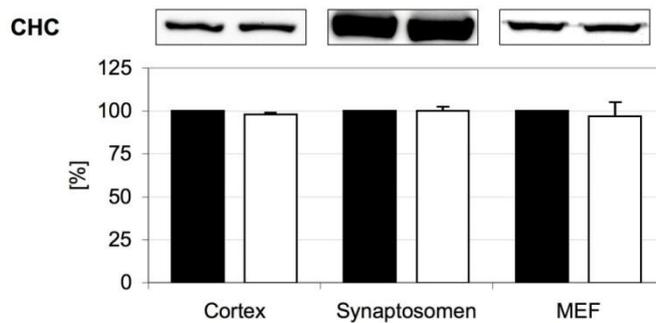
Im Cortex (n=6), in Synaptosomen (n=7) und MEF (n=8).

Neben dem AP-1- spielt der AP-2-Komplex beim synaptischen Vesikelrecycling eine zentrale Rolle, da er eine zentrale Rolle bei der clathrinvermittelten Endocytose (CME) spielt. Im defizienten Cortex ist die Menge des AP-2-Komplexes um ca. 140 % erhöht. Sowohl in Synaptosomen als auch in MEF ist diese Erhöhung im Vergleich zum Cortex deutlich ausgeprägter, was darauf hinweist, dass die Proteinmengen des AP-1- und des AP-2-Komplexes wechselseitig reguliert werden könnten.



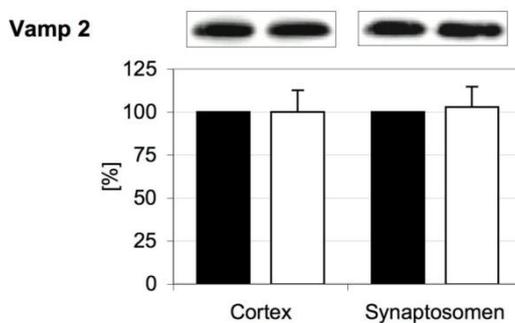
**Abb. 3-5: Proteinmengen von AP-2/α (107,7 kDa).**  
Im Cortex (n=8), in Synaptosomen (n=6) und MEF (n=8).

In elektronenmikroskopischen (EM) Aufnahmen von hippocampalen Neuronen sind vermehrt clathrinumhüllte Strukturen zu erkennen, jedoch zeigt der Vergleich der Proteinmengen von Clathrin im Cortex, in Synaptosomen und in MEF keinen Unterschied zwischen den Genotypen. Demzufolge verändern sich lediglich die cytoplasmatischen und vesikulären Clathrin-Pool-Größen.

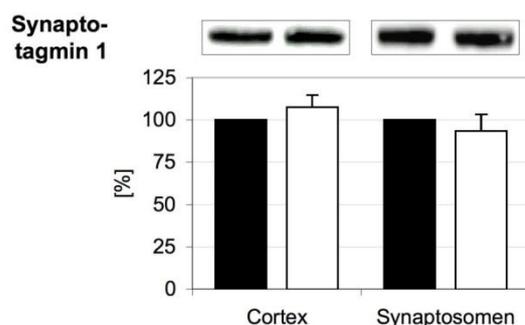


**Abb. 3-6: Proteinmengen von Chc (191,6 kDa).**  
Im Cortex (n=5), in Synaptosomen (n=14) und MEF (n=9).

Auf die mit synaptischen Vesikeln assoziierten Proteine Vamp 2 und Synaptotagmin 1 hat die AP-1/σ1B-Defizienz auf Proteinebene sowohl im Cortex als auch in Synaptosomen keinen erkennbaren Einfluss. Während in hippocampalen Neuronen ein deutlicher Einfluss der AP-1/σ1B-Defizienz auf die Anzahl synaptischer Vesikel zu erkennen ist, scheint die Menge an synaptischen Vesikelproteinen nicht abzunehmen.



**Abb. 3-7: Proteinmengen von Vamp 2 (12,7 kDa).**  
Im Cortex (n=20) und, in Synaptosomen (n=9).



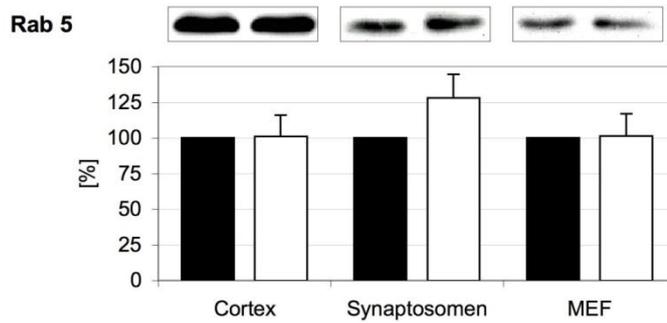
**Abb. 3-8: Proteinmengen von Synaptotagmin 1 (47,4 kDa).**

Im Cortex (n=11) und, in Synaptosomen (n=8).

### 3.3 Endosomale Proteine

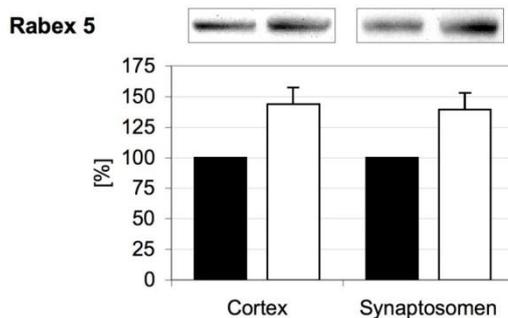
In EM-Aufnahmen sind in hippocampalen Neuronen des KO vermehrt vergrößerte endosomale Strukturen zu erkennen, sodass sich die Frage stellt, ob diese Beobachtung auch auf Proteinebene im gesamten Cortex zu erkennen ist und ob Unterschiede zwischen dem Cortex und Synaptosomen vorhanden sind. Ein Charakteristikum von frühen Endosomen ist u. a. ihr hoher Gehalt der GTPase Rab 5 sowie von EEA 1. Rab 5 ist im defizienten Cortex und in defizienten MEF nicht verändert und in Synaptosomen ist dieses Protein um ungefähr 28 % erhöht. Rabex 5, der GTP-Austauschfaktor GEF (*guanine nucleotide exchange factor*) von Rab 5, ist im Gegensatz dazu in beiden Fraktionen um etwa 40 % erhöht. In MEF war eine Quantifizierung aufgrund eines zu geringen Proteinanteils nicht möglich. Der frühe endosomale Marker EEA 1 ist ebenfalls im defizienten Gewebe des Cortex, in defizienten Synaptosomen und in MEF erhöht. Der Anstieg dieses Markers ist im Cortex und in MEF stärker ausgeprägt als in Synaptosomen.

Der Vergleich der durch die AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz hervorgerufenen Veränderungen endosomaler Proteinmengen zwischen dem Cortex, den Synaptosomen und den MEF zeigt, dass die Defizienz den deutlichsten Einfluss auf EEA 1 besitzt. Die Menge dieses Proteins wird sowohl in Synaptosomen als auch in anderen Zelltypen und Zellkompartimenten beeinflusst, während die Proteinmenge von Rab 5 ausschließlich in Synaptosomen verändert ist. Nur in Synaptosomen ist ein signifikanter Einfluss der AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz auf alle diese endosomalen Marker vorhanden, sodass davon ausgegangen werden kann, dass höchstwahrscheinlich der Einfluss der Defizienz auf Rab 5-, Rabex 5- und EEA 1-positive frühe Endosomen am größten ist, wodurch die mikroskopischen Daten bestätigt werden.



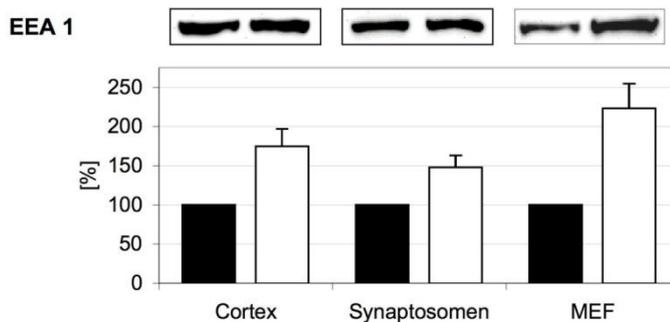
**Abb. 3-9: Proteinmengen von Rab 5 (durchschnittliche Masse der Isoformen A, B und C: 23,6 kDa).**

Im Cortex (n=13), in Synaptosomen (n=10) und MEF (n=8).



**Abb. 3-10: Proteinmengen von Rabex 5 (56,9 kDa).**

Im Cortex (n=4) und in Synaptosomen (n=7).



**Abb. 3-11: Proteinmengen von EEA 1 (160,9 kDa).**

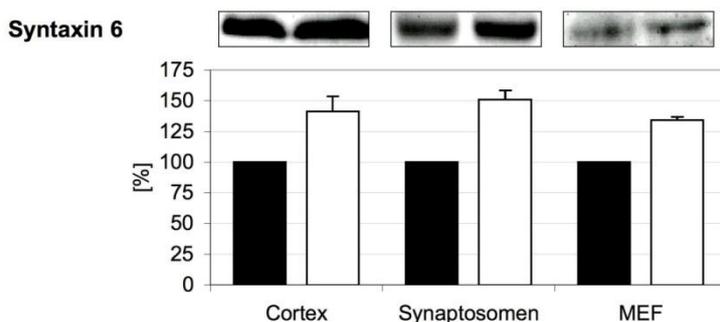
Im Cortex (n=8), in Synaptosomen (n=5) und MEF (n=6).

Frühe Endosomen sind hochdynamische Organellen, die miteinander fusionieren können [Rizzoli *et al.* 2006, Baryscha *et al.* 2009]. Diese homotypische Fusion früher Endosomen wird neben EEA 1 u. a. durch den SNARE-Proteinkomplex aus Syntaxin 6, Syntaxin 13, Vamp 4 und Vti 1a vermittelt [Brandhorst *et al.* 2006].

Im Cortex und in Synaptosomen ist die Menge an Syntaxin 6 im KO erhöht. Syntaxin 13 ist im defizienten Cortex ebenfalls erhöht, während die AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz auf die Menge von Vti 1a keinen Einfluss hat. In Synaptosomen waren keine Quantifizierungen von Vti 1a möglich, da hier die Menge dieses Proteines offensichtlich zu gering war. Für Vamp 4 waren entweder aus demselben Grund oder aufgrund eines zu un-

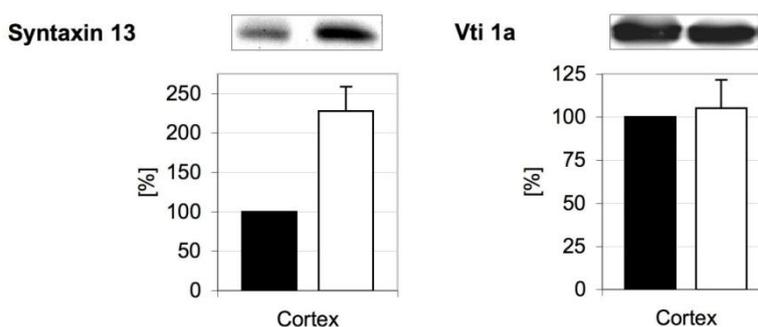
spezifischen Antikörpers Quantifizierungen in allen drei Extrakten nicht möglich. In MEF konnte durch Western-Blot-Quantifizierungen keines der frühen endosomalen SNARE-Proteine nachgewiesen werden, was auf deren neuronale Lokalisation hinweist, da deren Expression vornehmlich in Neuronen hoch ist.

Der Anstieg einiger der frühen endosomalen SNARE-Proteine ist ein zusätzlicher Hinweis auf eine Veränderung früher Endosomen, die durch die AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz hervorgerufen wird.



**Abb. 3-12: Proteinmengen von Syntaxin 6 (20,0 kDa).**

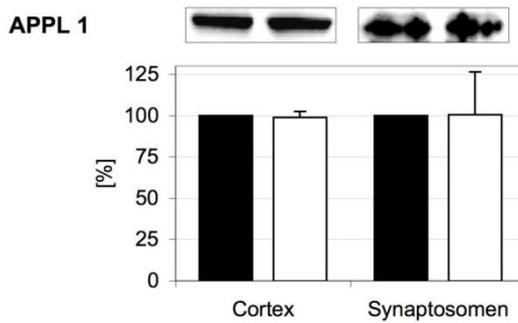
Im Cortex (n=7), in Synaptosomen (n=4) und MEF (n=3).



**Abb. 3-13: Proteinmengen von Syntaxin13 (30,5 kDa).**

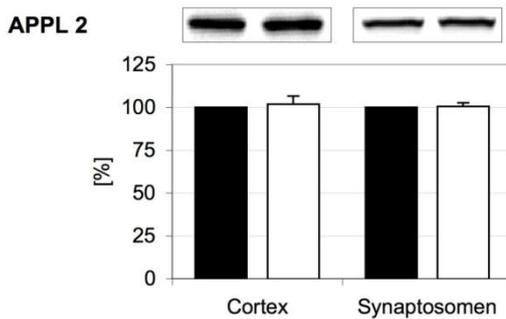
Im Cortex (n=6) und Vti 1a (25,0 kDa) im Cortex (n=10).

Appl 1 und Appl 2 sind Marker für eine weitere endosomale Population. Im Gegensatz zu den bisher untersuchten endosomalen Proteinen sind für diese im Cortex und in Synaptosomen keine Veränderungen im KO zu erkennen, was darauf hinweist, dass nur die Population an frühen Rab 5 positiven Endosomen beeinflusst ist.



**Abb. 3-14: Proteinmengen von Appl 1 (79,3 kDa).**

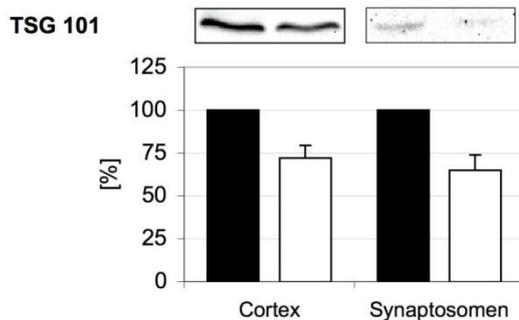
Im Cortex (n=3), in Synaptosomen (n=6).



**Abb. 3-15: Proteinmengen von Appl 2 (73,9 kDa).**

Im Cortex (n=8), in Synaptosomen (n=3).

TSG 101 ist ein Protein des ESCRT-I Komplexes und wird während des späten endosomalen Abbauweges über den MVB-Weg zum Teil verbraucht [Raiborg und Stenmark 2009]. Im Cortex und in Synaptosomen ist der Proteingehalt von TSG 101 jeweils im KO um etwa 25 % verringert, was auf eine Hochregulation dieses Abbauweges hinweist. Auf eine vornehmlich synaptosomale Veränderung des MVB-Abbauweges weisen die Ergebnisse nicht hin, da die Reduktionen im KO in beiden Extrakten in derselben Größenordnung liegen. Sie bestätigen aber die Beobachtung einer veränderten Anzahl an MVB-Endosomen in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Synapsen.



**Abb. 3-16: Proteinmengen von TSG 101 (44,1 kDa).**

Im Cortex (n=8), in Synaptosomen (n=3).

Der Vergleich der Veränderungen auf Proteinebene zwischen Cortex und Synaptosomen liefert einen starken Hinweis darauf, dass AP-1/ $\sigma$ 1B überwiegend in letzteren lokalisiert ist und dort vor allem die Proteine, die am synaptischen Vesikelrecycling durch Endosomen beteiligt sind, von der AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz beeinflusst werden. Eine erhöhte Konzentration des AP-2 Komplexes weist auf eine gesteigerte CME in Synapsen hin und könnte eine Erklärung für das vermehrte Auftreten von CCVs in elektronenmikroskopischen Aufnahmen darstellen.

Der Anstieg von Proteinen früher Endosomen, sowohl in neuronalen Zellen als auch in MEF, weist sehr stark auf die Beteiligung des AP-1/ $\sigma$ 1B-Komplexes am endosomalen Recycling hin. Die Veränderung von Transportproteinen und endosomalen Proteinen in defizienten Synaptosomen weist sehr stark auf eine Beteiligung des AP-1/ $\sigma$ 1B-Komplexes hauptsächlich am synaptischen Vesikelrecycling hin und stellt darüber hinaus eine biochemische Bestätigung vorangegangener Experimente dar. Auf Appl 1- und Appl 2-positive Endosomen hat die AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz auf Proteinebene keinen Einfluss, sodass in der Tat nur eine bestimmte endosomale Population durch die Defizienz verändert wird. Darüber hinaus scheint der späte endosomale Abbauweg über MVB im KO deutlich stärker aktiviert zu sein, was durch eine ungenügende Proteinsortierung durch frühe Endosomen hervorgerufen werden könnte.

### **3.4 Trennung von Prä- und Postsynapse**

In AP-1/ $\sigma$ 1B-defizienten hippocampalen Neuronen konnte ein beeinträchtigt synaptisches Vesikelrecycling gezeigt und es konnten vermehrt endosomale und clathrinumhüllte Strukturen nachgewiesen werden. Das Markerprotein des AP-1-Komplexes  $\gamma$ 1 wurde in der Immunfluoreszenz u. a. in der Präsynapse lokalisiert, sodass ein direkter Zusammenhang zwischen der AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz und der durch sie hervorgerufenen Veränderungen von endosomalen Strukturen in der Präsynapse vermutet wird. Biochemisch konnte gezeigt werden, dass die AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz einen Anstieg des frühen endosomalen Markerproteins EEA 1 hervorruft. Aus der Literatur ist bekannt, dass EEA 1 in immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen zunächst nur überwiegend postsynaptisch nachgewiesen wurde [Wilson *et al.* 2000]. Dies schließt jedoch eine präsynaptische Lokalisation von EEA 1 nicht aus, da der Nachweis dieses Proteins durch eine geringe Konzentration in der Präsynapse erschwert sein könnte. In späteren Untersuchungen wurde EEA 1 sowohl in prä- als auch in postsynaptischen Kompartimenten identifiziert [Selak *et al.* 2004]. Um festzustellen, ob die beobachteten Veränderungen der Markerproteinmengen in den Synaptosomen von dem prä- oder dem postsynaptischen Anteil hervorgerufen werden, wurde über einen proteolytischen Verdau versucht, Prä- und Postsynapse voneinander zu trennen. Während der Präpa-

### 3.4 Trennung von Prä- und Postsynapse

ration von Synaptosomen verschließen sich die präsynaptischen Nervenendigungen wieder, was zu einem Einschluss von postsynaptischen Organellen, Zytoplasma sowie dem Zytoskelett in einem Membransack führt. Meist bleibt ein Teil der postsynaptischen Membran und die mit ihr verbundenen postsynaptischen Dichte mit der präsynaptischen Membran verbunden [Dunkley *et al.* 2008]. Durch die Zugabe von Proteasen sollten die postsynaptischen Proteine verdaut werden, während die präsynaptischen durch die verschlossene Membran geschützt werden. Die synaptosomale Fraktion wurde mit Proteinase K oder Trypsin versetzt, bei 4 °C inkubiert und anschließend wurden Western-Blot-Quantifizierungen durchgeführt. Als Marker für die Postsynapse wurden PSD 95 (*postsynaptic density protein 95 kDa*) und Homer 1 verwendet, welche Proteine der postsynaptischen Dichte sind. Über PSD 95 binden NMDA-Rezeptoren, K<sup>+</sup>-Kanäle und Neuroligine, welches neuronale Adhäsionsproteine sind. Homer 1 ist ein Strukturprotein der postsynaptischen Dichte und ist in erregenden Synapsen angereichert [Yuan *et al.* 2012]. Als Kontrolle für den proteolytischen Verdau wurden Synaptosomen zuerst mit Triton-X 100 und anschließend mit Proteinase K bzw. Trypsin versetzt, um einen Abbau der möglicherweise membranumschlossenen Proteine zu ermöglichen.

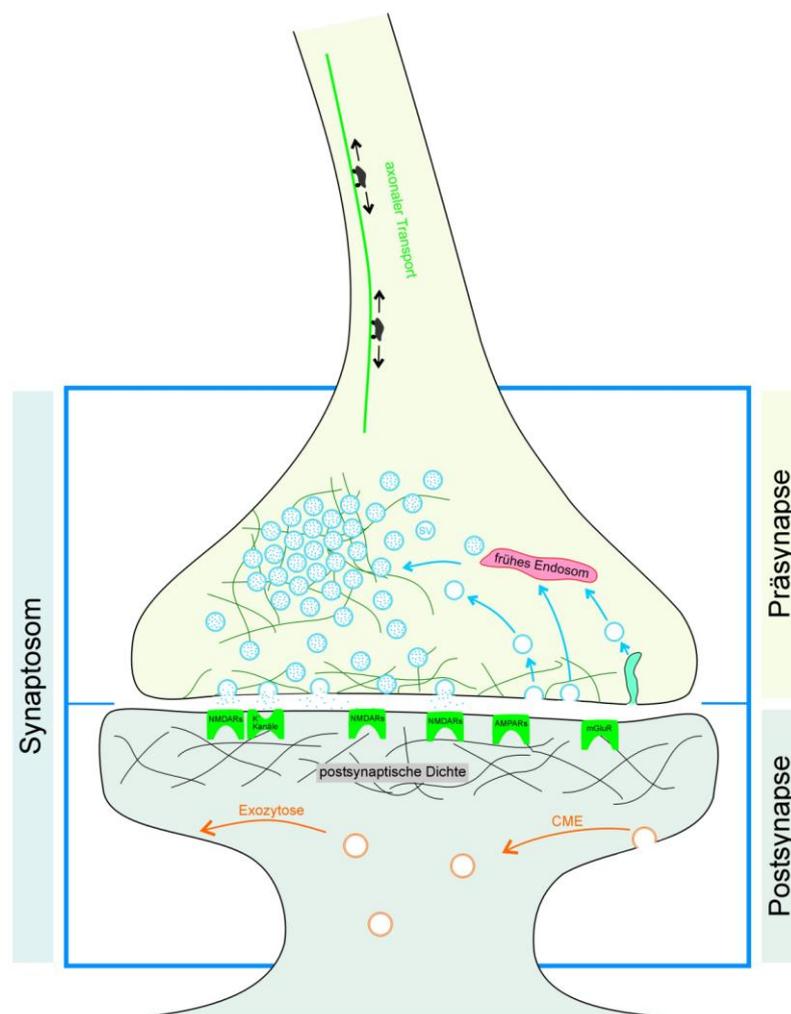
**Tab. 3-1: Stabilität von Markerproteinen in Synaptosomen gegen Proteasen.**

Einfluss der Inkubation mit Trypsin bzw. Proteinase K in Gegenwart und Abwesenheit von Triton-X 100 auf die Stabilität von Markerproteinen in Synaptosomen. Die Proteinestabilität wurde mit Western-Blots bestimmt. Von jedem Ansatz wurde dieselbe Gesamtproteinmenge geladen. Angegeben ist der Anteil und dessen Fehler [%] der Proteinmenge eines Ansatzes an der Summe aus allen Ansätzen für ein Markerprotein gemittelt über drei unabhängige Experimente.

Trypsin	-	-	+	+	-	-
Proteinase K	-	-	-	-	+	+
Triton-X 100	-	+	-	+	-	+
<u>Antikörper:</u>						
Vamp 2	39±5	58±5	3±5	0,0	0,0	0,0
γ1	13±8	16±4	37±7	30±18	0,0	0,0
Chc	9±9	16±9	20±6	30±11	19±4	20±23
EEA 1	6±6	80±15	14±9	0,0	0,0	0,0
PSD 95	40±4	36±2	18±3	1±1	4±6	1±2
Homer 1	30±24	30±5	30±22	3±5	9±5	1±2

Sowohl durch eine Inkubation mit Trypsin als auch mit Proteinase K wurden präsynaptische Proteine im Vergleich zu postsynaptischen bevorzugt abgebaut. Die Resistenz der postsynaptischen Markerproteine gegenüber einem proteolytischen Verdau macht einen selektiven Abbau der postsynaptischen Proteinen nicht möglich. Der Abbau von

präsynaptischen Proteinen in Gegenwart von Proteinase K weist darauf hin, dass die Präsynapse zumindest nicht vollständig verschossen ist. Prä- und postsynaptische Anteile lassen sich vermutlich nur über eine experimentell erheblich aufwendigere Methode voneinander trennen, dessen Entwicklung im Rahmen dieser Arbeit zeitlich nicht möglich war.



**Abb. 3-17: Prä- und postsynaptische Bereiche von Neuronen.**

In der Präsynapse sind schematisch das SV-Recycling, das Aktinzytoskelett und der axonale Transport dargestellt. In der Postsynapse sind deren Rezeptor- und Kanalproteine, die postsynaptische Dichte sowie der im Vergleich zur Präsynapse weitaus weniger ausgeprägte vesikuläre Transport angedeutet.

Der Vergleich der Unterschiede der Markerproteinmengen zwischen den Genotypen von Cortex und Synaptosomen zeigte, dass der AP-1/ $\sigma$ 1B-Komplex in letzteren lokalisiert ist und die durch die AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz hervorgerufenen Veränderungen hier stärker ausgeprägt sind als im Cortex. Die synaptischen Bereiche sind Orte mit einer sehr hohen Transportrate von Vesikeln und Proteinen. Im Vergleich zur Postsynapse sind diese Transportwege in der Präsynapse deutlich aktiver. Der Grund hierfür liegt in der hohen Anzahl von Neurotransmittern, die sekretiert und anschließend wieder in

### 3.4 Trennung von Prä- und Postsynapse

---

synaptische Vesikel recycelt werden müssen. Dies führt dazu, dass die Menge an Proteinen, die am vesikulären Transport- und Sortierungsweg beteiligt sind, in der Präsynapse deutlich höher ist als in der Postsynapse (vgl. Abb. 3-17). In Synaptosomen ist der Anteil der präsynaptischen Proteine demzufolge erheblich größer als der der postsynaptischen. Folglich werden die hier beobachteten Veränderungen von Markerproteinen vor allem vom präsynaptischen Anteil hervorgerufen. Aus diesem Grund ist eine Trennung von Prä- und Postsynapse für eine differentielle Betrachtung der durch die AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz hervorgerufenen Veränderungen nicht zwingend erforderlich.

Biochemische Analysen des Cortex sowie von Synaptosomen haben gezeigt, dass die AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz Veränderungen früher, EEA 1 positiver endosomaler Kompartimente hervorruft. Für eine detaillierte biochemische Charakterisierung dieser Veränderungen, wurden diese endosomalen Kompartimente mit Hilfe einer Dichtegradientenzentrifugation angereichert.

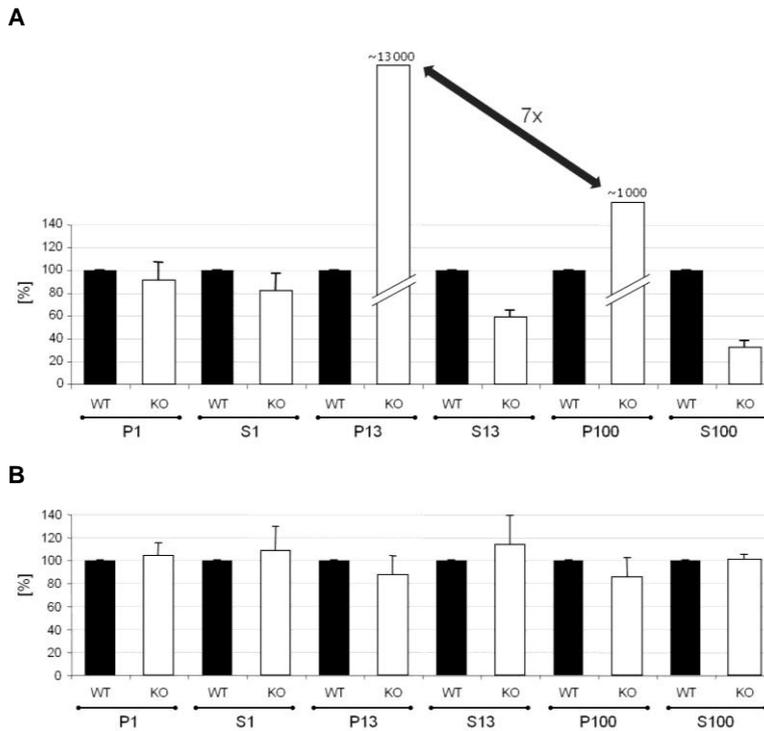
## 4. Anreicherung früher endosomaler Kompartimente

Die Analyse von Extrakten des Cortex sowie von Synaptosomen zeigte vor allem für Markerproteine von frühen endosomalen Strukturen sowie des späten endosomalen Abbauweges signifikante Veränderungen, welche durch das Ausschalten des AP-1/ $\sigma$ 1B-Komplexes hervorgerufen werden. Für eine detaillierte biochemische Untersuchung dieser Veränderungen wurde eine Dichtegradientenzentrifugation zur Anreicherung von Endosomen etabliert. Anhand von Markerproteinen wurde die Verteilung von Organellen und Vesikeln des synaptischen und endosomalen Recyclingweges untersucht, mit dem Ziel, eine endosomale Fraktion zu identifizieren, deren Proteinzusammensetzung durch die AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz verändert ist. Da das Interesse vor allem an der Identifizierung von differentiellen Unterschieden zwischen den Genotypen lag, wurde der Fokus nicht primär auf die Gewinnung einer hochreinen Fraktion synaptischer Endosomen gelegt.

Mögliche differentielle Veränderungen in den Fraktionen des Dichtegradienten, die durch die AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz hervorgerufen werden, wurden mit semiquantitativen Western-Blots charakterisiert. Einerseits wurde die Verteilung von Markerproteinen über die Fraktionen des Gradienten bestimmt und andererseits wurden die Proteinmengen von Markerproteinen beider Genotypen von derselben Fraktion verglichen.

### 4.1 Differentielle Zentrifugation

Als Vorversuch für die Dichtegradientenzentrifugation wurde eine differentielle Zentrifugation durchgeführt, um herauszufinden, ob die Veränderung der endosomalen Markerproteine von membrangebundenen Bestandteilen, dem zytosolischen Anteil oder von beiden hervorgerufen wird. Hierzu wurde EEA 1 verwendet, da dies ein Marker für die frühe endosomale Population ist, welche im Cortex und in Synaptosomen durch die AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz am deutlichsten verändert ist. Es wurden Cortexaufschlüsse in drei aufeinanderfolgenden Kraftfeldern von 1000 g, 13 000 g und 100 000 g zentrifugiert und sowohl im jeweiligen Überstand als auch dem Pellet der Gehalt von EEA 1 mit semiquantitativen Western-Blots bestimmt. Für eine semiquantitative Bestimmung der Markerproteinmengen mittels Western-Blot wurden jeweils von derselben Fraktion Proben mit verschiedenen Gesamtproteinmengen geplottet und die Signale auf die jeweilige Proteinmenge normiert. Auf diese Weise wurde sichergestellt, dass sich die Signale in einem linearen Detektionsbereich befanden. WT und KO einer Fraktion wurden nebeneinander aufgetragen und die Signalintensität des WT als Standard für eine Fraktion verwendet.



**Abb. 4-1: Differentielle Zentrifugation.**

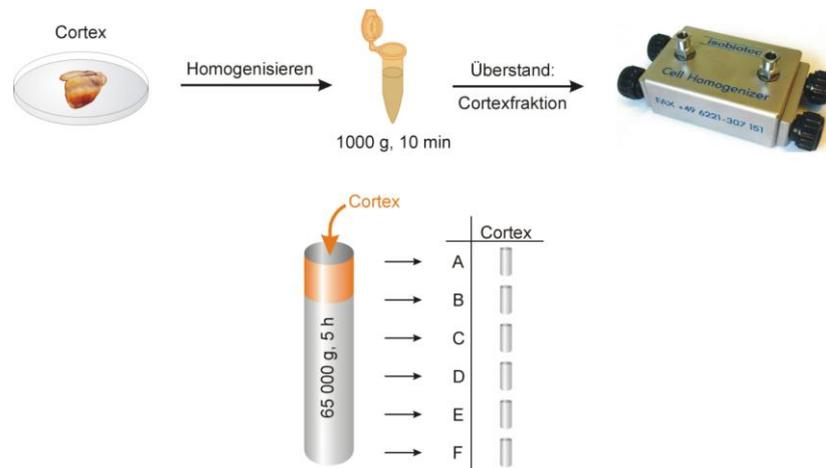
Differentielle Zentrifugation von semiquantitativen Western-Blots des Cortex im Kraftfeld von 1000 g, 13 000 g und 100 000 g (n = 3). **A:** Markerprotein EEA 1, **B:** Markerprotein  $\gamma$ 1.

Nach einer 13 000 g sowie einer 100 000 g Zentrifugation ist die Menge an EEA 1 im KO im Vergleich zum WT in der jeweiligen Pelletfraktion drastisch erhöht. Dieser Anstieg ist im Pellet der 13 000 g-Zentrifugation etwa siebenmal höher als in der 100 000 g-Zentrifugation. Im jeweiligen Überstand ist die EEA 1-Menge um etwa 40% bzw. 70% reduziert. Dies zeigt, dass die AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz neben einer Erhöhung der EEA 1-Menge eine Umverteilung dieses Proteins auf Membranstrukturen hervorruft. Als Kontrolle wurden die Proteinmengen aller Fraktionen der differentiellen Zentrifugation von  $\gamma$ 1 bestimmt, da es im Cortex differentiell nicht verändert war. Diese sind in allen Fraktionen nicht signifikant verändert. Mit dieser Zentrifugation konnte gezeigt werden, dass die veränderten Proteinmengen von EEA 1 im Cortex und in Synaptosomen vor allem auf Unterschiede von EEA 1-haltigen endosomalen Strukturen zurückzuführen sind. Um diese veränderten Endosomen genauer zu charakterisieren, wurden sie mit Hilfe einer Dichtegradientenzentrifugation angereichert und die Proteinmengen von Markerproteinen differentiell bestimmt.

## 4.2 Dichtegradientenzentrifugation

Der Aufschluss des Cortex wurde mit Hilfe einer linearen Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennt und die Verteilung von Markerproteinen des Golgi-Apparats sowie des *trans*-Golgi-Netzwerks (GM 130 und TGN 38), von Transportvesikeln (Vamp 2, Synap-

totagmin 1, AP-1/ $\gamma$ 1 und AP-2/ $\alpha$ ) und von frühen Endosomen (EEA 1 und Rab 5) durch Western-Blot-Quantifizierungen im Gradienten ermittelt.



**Abb. 4-2: Sedimentationszentrifugation (65 000 g)**

Dargestellt sind der Aufschluss und die Fraktionierung des Cortex sowie dessen Auftrennung im linearen Dichtegradienten.

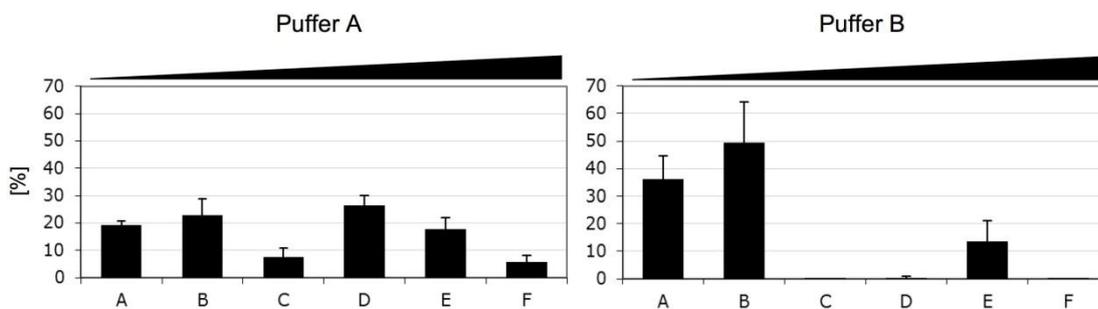
Es wurde ein linearer OptiPrep™-Dichtegradient von 0 bis 30% verwendet und dieser nach einer Zentrifugation von 5 h in sechs Fraktionen A bis F aufgeteilt. Hierbei ist A die Fraktion der geringsten und F die Fraktion der höchsten Dichte. Die Verteilung eines Markerproteins über den gesamten Gradienten wurde durch einen Western-Blot aller sechs Fraktionen bestimmt und diese Verteilung im Folgenden als Proteinprofil bezeichnet. Im Gegensatz zur differentiellen Zentrifugation wurde hier zunächst nicht die Verteilung der Proteinmengen zwischen den Genotypen, sondern die Verteilung eines Proteins im Gradienten bestimmt, indem von jeder Fraktion eine Probe mit demselben Volumen verwendet wurde. Von allen Fraktionen eines Gradienten wurde eine SDS-PAGE durchgeführt, diese auf eine Membran geplottet und das Proteinprofil über einen Western-Blot bestimmt. Für jeden Genotyp wurde für ein Markerprotein jeweils ein Proteinprofil erstellt, und dieses mit dem des anderen Genotyps verglichen. Auf diese Weise konnten Unterschiede im Proteinprofil eines Proteins identifiziert werden, die durch die AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz hervorgerufen werden.

#### 4.2.1 Puffersysteme der Dichtegradientenzentrifugation

Zur Untersuchung von veränderten EEA 1-haltigen Endosomen wurden verschiedene Pufferbedingungen getestet, mit dem Ziel möglichst hoher Stabilität membrangebundener Proteine und regulatorischer Proteine, die zwischen Membranen und dem Zytosol zirkulieren. Aufgrund des Einflusses der AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz auf Teile des vesikulären Transports und endosomale Strukturen wurde die Dichtegradientenzentrifugation mit drei etablierten Puffersystemen durchgeführt und Proteinprofile für Markerproteine

## 4.2 Dichtegradientenzentrifugation

von Transportvesikeln und von frühen Endosomen erstellt. Es wurden ein MOPS-Puffer mit einem pH-Wert von 7,1 (Puffer A), unter dessen Bedingungen vor allem endosomale Proteine stabilisiert werden, ein MES-Puffer mit einem pH von 6,5 (Puffer B), in dem clathrinumhüllte Strukturen stabilisiert werden, und ein MES/Sucrose-Puffer mit einem pH von 6,5 und einer Konzentration von 0,32 M Sucrose (Puffer C), in welchem synaptische Vesikel und clathrinumhüllte Strukturen stabilisiert werden, verwendet. Beim Vergleich der Proteinprofile dieser drei Puffersysteme zeigte sich insbesondere für EEA 1 die höchste Stabilitätsabhängigkeit von der Wahl des Puffers. Der Vergleich der Proteinprofile von EEA 1 aus defizienten Extrakten von Zentrifugationen in Puffer A und B zeigt eine deutlich geringere Membranstabilität dieses Proteins im sauren MES-Puffer (Puffer B) gegenüber dem neutralen MOPS-Puffer (Puffer A), sodass in Puffer B der größte Anteil von EEA 1 in den Fraktionen A und B vorhanden ist, was in Abb. 4-3 dargestellt ist. Darüber hinaus zeigte sich in Puffer B im Vergleich zu Puffer A auch für weitere Markerproteine wie AP-2/ $\alpha$ , AP-1/ $\gamma$  1 und Vamp 2 eine deutlich geringere Stabilität. In Gegenwart von 0,32 M Sucrose (Puffer C) war die Stabilität von membrangebundenem EEA 1 ähnlich groß wie im Puffer A, jedoch besaß der Gradient des Puffers C eine deutlich geringere Trennschärfe als der des Puffers A, sodass signifikante Veränderungen der Proteinverteilungen zwischen den Genotypen, die in Puffer A zu erkennen sind, in Puffer C nicht mehr festgestellt werden können.



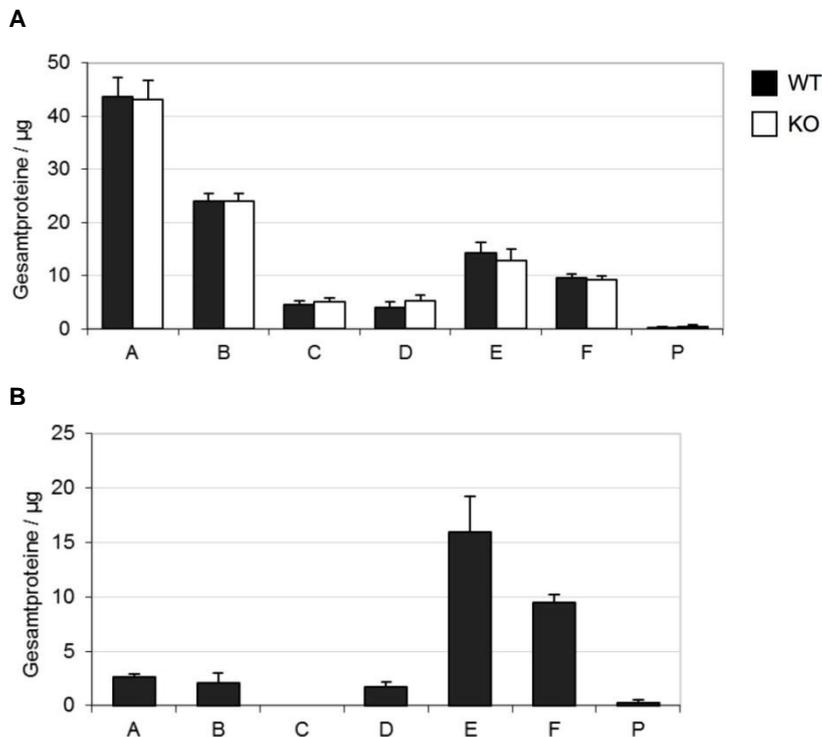
**Abb. 4-3: EEA1-Stabilität des KO in Puffer A und B.**

Da die Stabilität von Markern für Transportproteine und Endosomen sowie die Trennschärfe des Gradienten im Puffer A am höchsten sind, wurden alle Dichtegradientenzentrifugationen in diesem Puffer durchgeführt.

### 4.2.2 Gesamtproteinverteilung im Gradienten

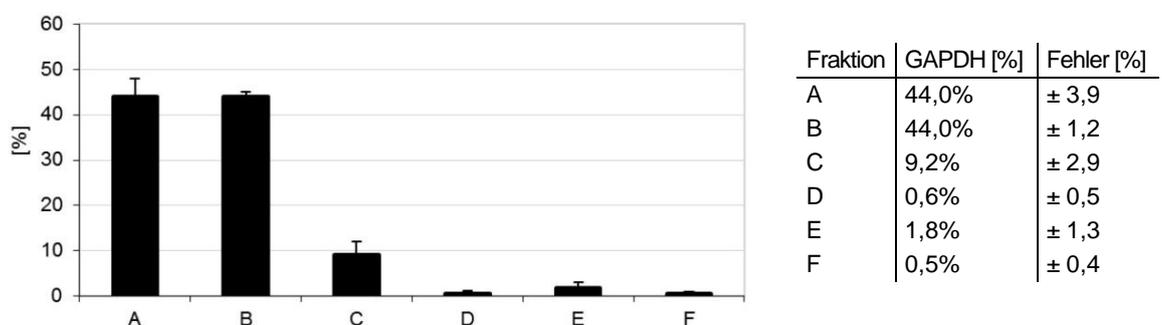
Die Gesamtproteinverteilung im Dichtegradienten der 65 000 g Zentrifugation des Cortex unterscheidet sich zwischen den Genotypen nicht signifikant. In den beiden Fraktionen geringer Dichte A und B befinden sich nach der Zentrifugation 67% der geladenen Proteine der Cortexfraktion. Auf die übrigen Fraktionen höherer Dichte C bis F

verteilen sich die verbleibenden 33%. Vermutlich bestehen die Fraktionen A und B zum großen Teil aus zytosolischen Proteinen, die während der Zentrifugation nicht wandern. Da nach der Zentrifugation kein Pellet nachgewiesen werden konnte, sedimentierten keine Proteine auf den Boden des Gradienten.



**Abb. 4-4: Gesamtproteinverteilung nach einer linearen 65 000 g-Zentrifugation.**  
A WT und KO Cortex und B WT Synaptosomen.

Anhand des zytosolischen Proteins Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), welches in der Glycolyse die Umwandlung von Glycerinaldehyd-3-Phosphat zu 1,3-Bisphosphoglycerat katalysiert, wurde die Verteilung der zytosolischen Proteine im Gradienten ermittelt: Mit jeweils 44% in den Fraktionen A und B ist der überwiegende Teil dieser Proteine über die Fraktionen geringer Dichte verteilt. In der Fraktion C befinden sich 9% und in den Fraktionen hoher Dichte (D-F) befindet sich jeweils etwa 1%.



**Abb. 4-5: Verteilung von zytosolischen Proteinen in der Sedimentationszentrifugation.**  
Markerprotein: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), n=2.

## 4.2 Dichtegradientenzentrifugation

---

In den Fraktionen A und B befinden sich überwiegend die zytosolischen und nicht membranassoziierte Proteine, während sich folglich in den Fraktionen C bis F zum größten Teil membrangebundene Proteine oder Proteine aus Organellen und Vesikeln befinden.

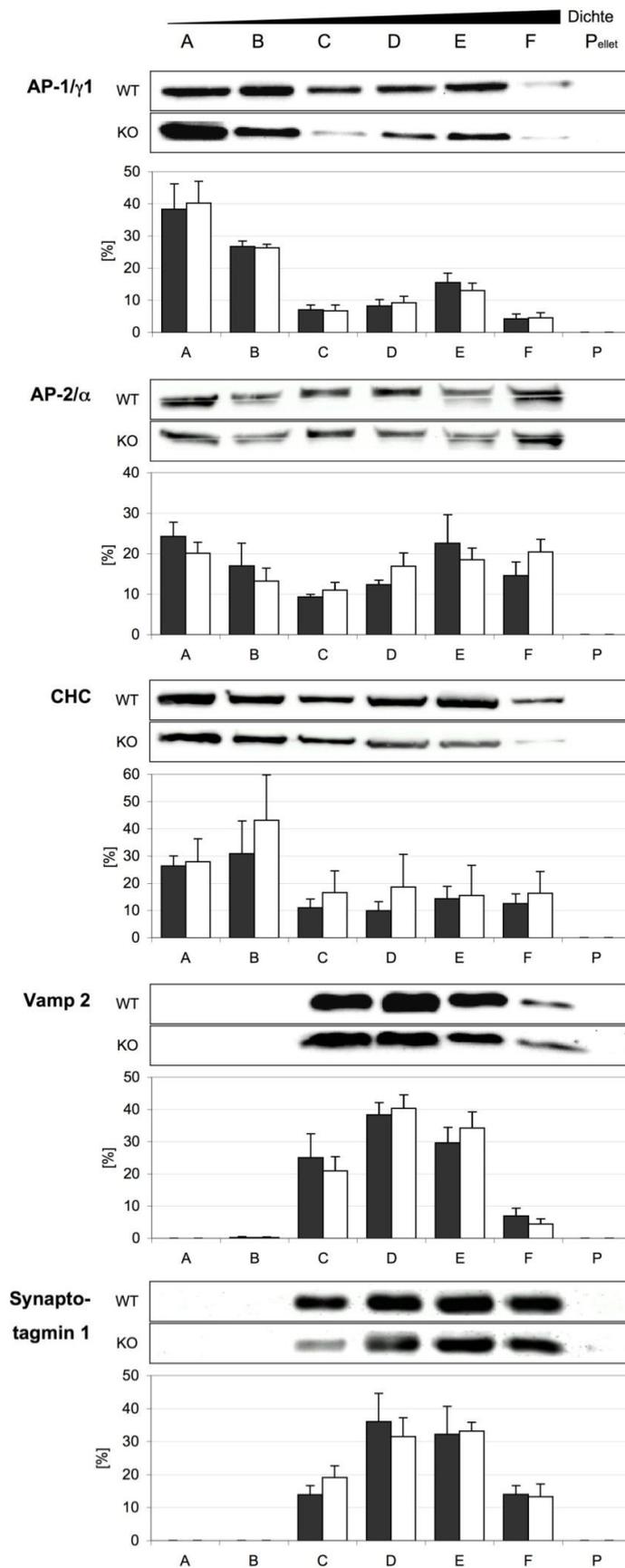
Neben der Dichtegradientenzentrifugation des Cortex wurde diese ebenfalls mit Synaptosomen durchgeführt. Hier konnte in den Fraktionen A und B nur eine geringe Proteinmenge nachgewiesen werden und der Hauptanteil aller Proteine ist in den Fraktionen hoher Dichte C bis F vorhanden (Abb. 4-4 B). Der Vergleich der Gesamtproteinprofile der Dichtegradientenzentrifugationen des Cortex mit der der Synaptosomen zeigt, dass in letzterer lediglich ein geringer Anteil an löslichen Proteinen vorhanden ist, welche bei der Gewinnung von Synaptosomen abgetrennt wurden.

In der Dichtegradientenzentrifugation des Cortex ist das Gesamtproteinverhältnis von A und B (lösliche Proteine) zu C bis F (membranengebundenen Proteine) etwa 2:1. Bei der Gewinnung von Synaptosomen aus dem Cortexextrakt beträgt das Gesamtproteinverhältnis des synaptosomalen Überstandes zur Synaptosomenfraktion 2,5:1. Beide Gesamtproteinverhältnisse weisen eine hohe Analogie auf. Der Anteil an zytosolischen Proteinen in den Fraktionen D bis F der Dichtegradientenzentrifugation des Cortex ist, wie oben gezeigt, gering. Im Dichtegradienten von Synaptosomen ist im Gegensatz zu dem des Cortex der Anteil an zytosolischen Proteinen in den Fraktionen A und B deutlich reduziert. Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass in den Fraktionen D bis F der Dichtegradientenzentrifugation des Cortex eine Anreicherung von synaptosomalen Bestandteilen stattfindet.

### 4.2.3 Markerproteinverteilung im Dichtegradienten

In den beiden Fraktionen geringer Dichte A und B verbleiben die löslichen und zytosolischen Bestandteile der aufgeschlossenen Zellen, während die Fraktionen D bis F weitgehend frei sind von diesen Proteinen. In den Fraktionen D bis F sind die membrangebundenen und von Organellen umschlossenen Proteine zu finden.

Mit Ausnahme der Markerproteine für synaptische Vesikel sind alle hier quantifizierten Proteine sowohl in den zytosolischen Fraktionen als auch den Membranfraktionen vertreten, was deren zelluläre Verteilung zwischen Membranen und dem Zytosol oder einen teilweisen Verlust der Anbindung an Membranen während des Aufschlusses und der Zentrifugation anzeigt. In Abb. 4-6 sind exemplarisch sowohl die Quantifizierungen für Markerproteine von Transportproteinen über die angegebene Anzahl von Experimenten als auch repräsentative Western-Blots dargestellt. Für einen Genotyp betrachtet, wichen die Verteilungsmuster der Markerproteine in den Fraktionen A bis F über eine Vielzahl von Experimenten nicht signifikant voneinander ab, was für eine hohe Reproduzierbarkeit dieser Zentrifugation spricht.



**Abb. 4-6: Proteinprofile von AP 1/γ1, AP 2/α, Chc, Vamp 2 und Synaptotagmin 1.** AP-1/γ1 (n=5/n=6), AP-2/α (n=3/n=3), Chc (n=5/n=5), Vamp 2 (n=3/n=3) und Synaptotagmin 1 (n=6/n=6). n ist die Anzahl an unabhängigen Experimenten (WT/KO).

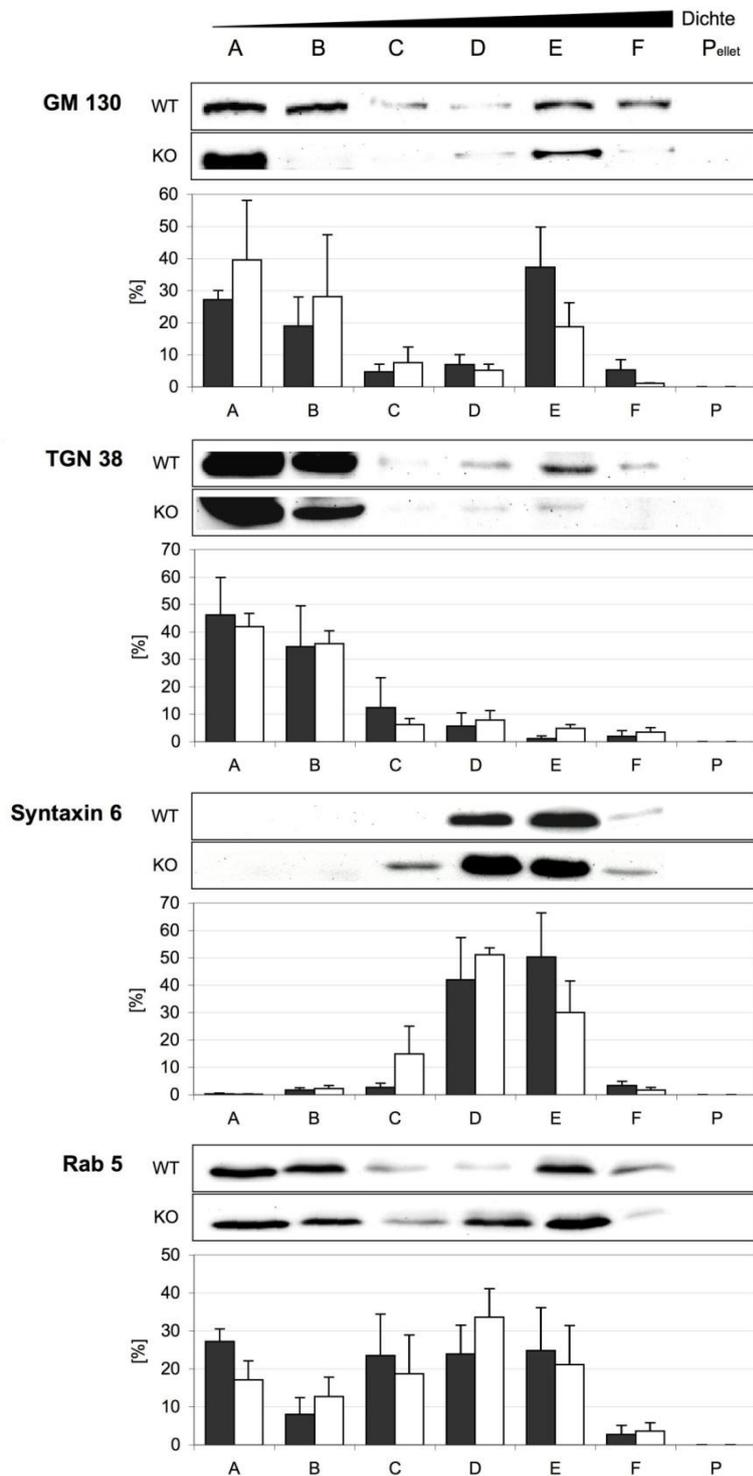
Der deutlichste Einfluss der AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz auf Neuronen wurde in Synaptosomen festgestellt. Aus diesem Grund wurde die Dichtegradientenzentrifugation zusätzlich zu der des Cortexextrakts auch von Synaptosomen durchgeführt. Im Vergleich zum Dichtegradienten des Cortexextrakts ist die Proteinmenge der Markerproteine in den Gradientenfractionen von Synaptosomen deutlich geringer, wodurch zum einen die Western-Blot-Quantifizierungen von Antikörpern mit einer niedrigeren Spezifität deutlich erschwert waren und zum anderen eine weitere Aufreinigung einer Fraktion problematisch werden würde. Darüber hinaus birgt die Gradientenzentrifugation von Synaptosomen im Vergleich zu der des Cortex das Risiko einer erhöhten experimentellen Fehleranfälligkeit, da für die synaptosomale Vorfraktionierung mehr experimentelle Schritte vonnöten sind als für die Herstellung des Cortexextraktes. Da die Reproduzierbarkeit der Fraktionierung des Dichtegradienten von höchstem Interesse war, eine weitere Reinigung der Membranfraktionen durchgeführt werden sollte und differentielle Unterschiede zwischen den Genotypen untersucht werden sollten, wurde eine Anreicherung von frühen Endosomen aus Synaptosomen nicht weiter verfolgt. Die geringe Proteinmenge der synaptosomalen Fraktion hätte durch eine hohe Zahl an Versuchen ausgeglichen werden müssen, deren Durchführung mit dem zeitlichen Rahmen dieses Projektes nicht vereinbar gewesen wäre.

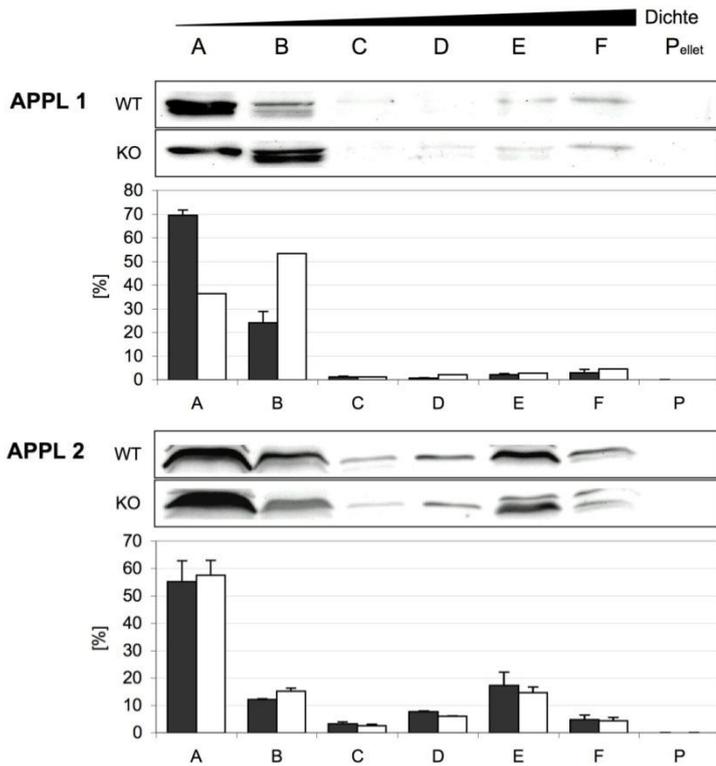
### 4.2.4 Differentieller Vergleich der Proteinprofile

Zur Identifizierung von differentiellen Unterschieden der Protein- und Organellverteilung im Cortex, die durch die Defizienz des AP-1/ $\sigma$ 1B-Komplexes hervorgerufen werden, wurden die Proteinprofile der Dichtegradientenzentrifugation von Markerproteinen für den Golgi-Apparat, das *trans*-Golgi-Netzwerk, Transportvesikel und Endosomen miteinander verglichen. Das Proteinprofil wurde für jedes Markerprotein für beide Genotypen mit Hilfe von Western-Blot-Quantifizierungen bestimmt. Für Markerproteine des Golgi-Apparates, das *trans*-Golgi-Netzwerk und für Transportvesikel (siehe 4.2.3) sind keine signifikanten differentiellen Unterschiede im Proteinprofil zwischen den Genotypen zu erkennen. Appl 1 und Appl 2 sind Markerproteine für eine Population von Rab 5-positiven und EEA 1-negativen frühen Endosomen [Zoncu *et al.* 2009, Urbanska *et al.* 2011]. Während sowohl im Cortex als auch in Synaptosomen keine Unterschiede der Appl 1- und Appl 2-Menge festgelegt wurden, sollte das Proteinprofil der Dichtegradientenzentrifugation darüber Aufschluss geben, ob die AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz zu einer Umverteilung dieser Markerproteine zwischen dem Cytosol und den Membranstrukturen oder den Organellen verschiedener Dichte führt. Die AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz ruft für Appl 1 und Appl 2 keine signifikanten differentiellen Unterschiede im Proteinprofil

hervor. Auch die Proteinprofile der frühen endosomalen Markerproteine Rab 5 und Syntaxin 6 zeigten keine signifikanten Veränderungen.

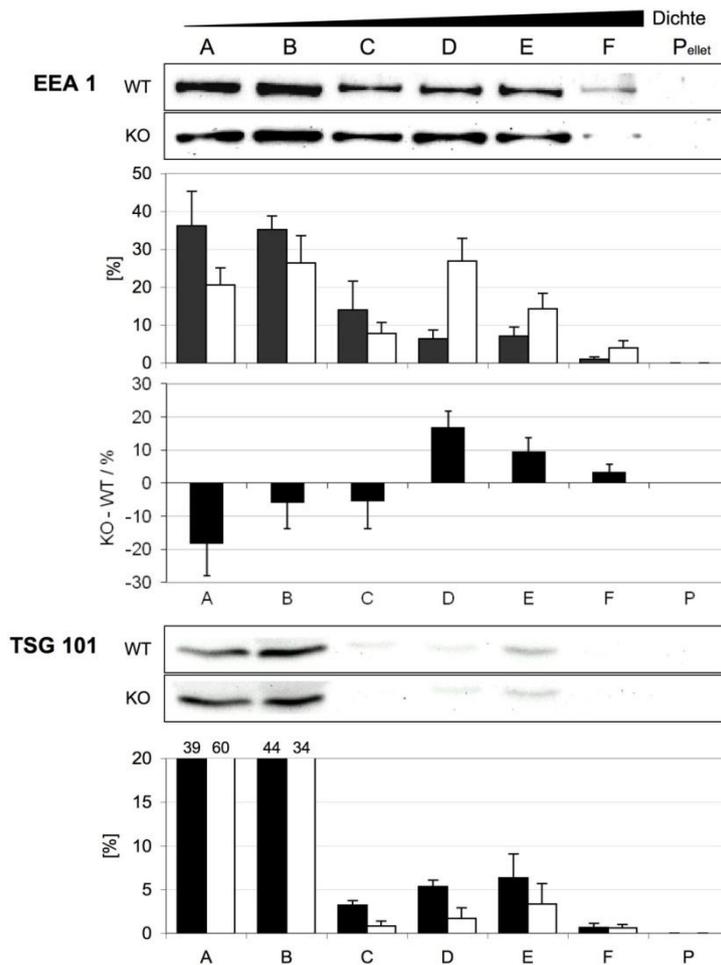
In Abb. 4-7 bzw. Abb. 4-8 ist für jedes Markerprotein und für jeden Genotyp ein repräsentativer Western-Blot sowie die Quantifizierung des Proteinprofils dargestellt.





**Abb. 4-7: Proteinprofile von GM 130, TGN 38, Syntaxin 6, Rab 5 Appl 1 und Appl 2.**  
 GM 130 (n=3/n=2), TGN 38 (n=3/n=4), Syntaxin 6 (n=3/n=3), Rab 5 (n=4/n=4) Appl 1 (n=2/n=1)  
 und Appl 2 (n=2/n=2). n ist die Anzahl an unabhängigen Experimenten (WT/KO).

Der differentielle Vergleich der Proteinprofile von EEA 1 zeigte eine signifikante Veränderung zwischen den Genotypen. Im Vergleich zum WT ist EEA 1 im KO in den Fraktionen A bis C reduziert und in den Fraktionen D bis E erhöht, sodass die Menge an EEA 1 im KO nicht nur absolut ansteigt, sondern es darüber hinaus zu einer Umverteilung von den zytosolischen Fraktionen in die Membranfraktionen kommt. Wie bereits durch die differentielle Zentrifugation gezeigt werden konnte, führt die AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz dazu, dass EEA 1 vermehrt membrangebunden vorliegt, wodurch es zu einer Verringerung der zytosolischen Konzentration kommt.



**Abb. 4-8: Proteinprofile von EEA 1 und TSG 101.**

Von EEA 1 sind neben den Proteinprofile die Differenz der Proteinprofile von KO und WT dargestellt. EEA 1 ( $n=5/n=6$ ) und TSG 101 ( $n=2/n=2$ ).  $n$  ist die Anzahl an unabhängigen Experimenten (WT/KO).

Der Marker des späten endosomalen, multivesikulären Abbauweges TSG 101 ist im Cortex und in Synaptosomen des KO reduziert. Ungefähr 85% dieses Proteins befinden sich in den Fraktionen A und B. Aufgrund ihrer geringen Dichte befinden sich in diesen Fraktionen die Lysosomen, in die TSG 101 sortiert und anschließend abgebaut wird. Werden die Proteinprofile beider Genotypen miteinander verglichen, so ist in den Fraktionen C bis E eine differentielle Abnahme der Proteinmenge um jeweils etwa 50% zu erkennen. Die Abnahme könnte auf eine Stimulation des späten endosomalen, multivesikulären Abbauweges hinweisen. Darüber hinaus deutet sie darauf hin, dass die AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz neben einer Veränderung von frühen Endosomen auch zu einer Veränderung von späten Endosomen führt und bestätigt den in elektronenmikroskopischen Aufnahmen beobachteten Anstieg von multivesikulären späten Endosomen.

Durch den Vergleich der Proteinprofile endosomaler Markerproteine konnte gezeigt werden, dass die AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz einen unterschiedlichen Einfluss auf verschiedene endosomale Populationen besitzt. Während sowohl für die Proteinprofile von Appl 1

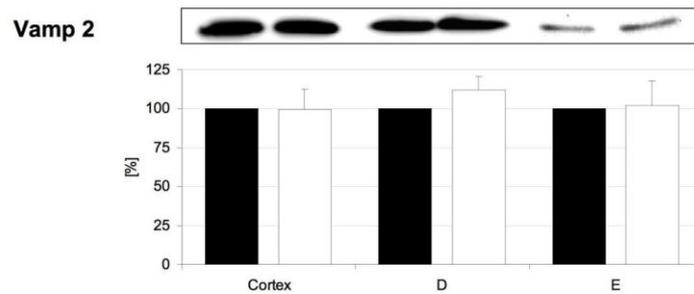
und Appl 2 als auch für die von Rab 5 und Syntaxin 6 keine signifikanten differentiellen Unterschiede erkennbar sind, weisen die von EEA 1 und TSG 101 signifikante Unterschiede auf. Dies zeigt einen Einfluss des AP-1/ $\sigma$ 1B-Komplexes auf frühe Endosomen und zumindest zum Teil auf Endosomen des späten Abbauweges. Durch die differentiell unveränderten Proteinprofile von Rab 5, Appl 1, und Appl 2 konnte gezeigt werden, dass von der Defizienz nur eine begrenzte endosomale Population verändert wird.

### 4.2.5 Differentielle Unterschiede in den Fraktionen D und E

Die durch die AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz hervorgerufenen Veränderungen haben den größten Einfluss auf frühe Endosomen (Markerprotein: EEA 1), welcher in den Fraktionen D und E am stärksten ausgeprägt ist. Darüber hinaus sind in diesen Fraktionen die größten differentiellen Unterschiede des späten endosomalen Markers TSG 101 auf Membranstrukturen zu erkennen. Für eine detailliertere Analyse des Einflusses der AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz in den Fraktionen D und E wurden die möglichen Änderungen der Proteinmengen der Markerproteine zwischen den Genotypen in jeder Fraktion bestimmt. Hierzu wurden von diesen Fraktionen semiquantitative Western-Blots durchgeführt und die Proteinmengen auf die des WT normiert.

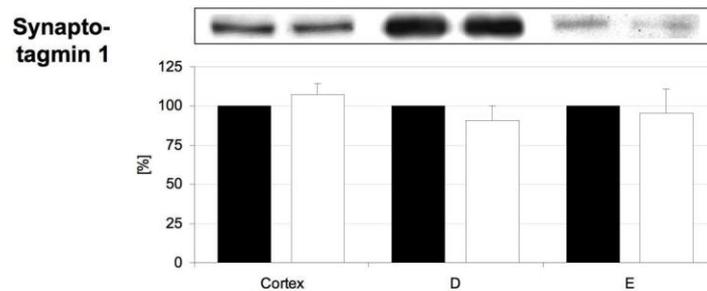
Zur Überprüfung der Reinheit der Fraktionen D und E wurde in ihnen jeweils die Menge der Golgi-Marker TGN 38 und GM 130 semiquantitativ bestimmt. Die Betrachtung des Gesamtproteinprofils von TGN 38 zeigt, dass dieser Marker sich überwiegend in den Fraktionen A und B befindet. Im Western-Blot waren die Signale von TGN 38 in beiden Fraktionen sehr schwach, was auf eine Abreicherung dieses Organells hinweist. Darüber hinaus konnte aufgrund der geringen Signalintensitäten dessen differentielle Verteilung nicht ermittelt werden. GM 130 ist in beiden Fraktionen vorhanden und ist nicht differentiell verändert.

Wie bereits für die Cortexfraktion zu erkennen war, sind die Markerproteine von synaptischen Vesikeln (Vamp 2 und Synaptotagmin 1) sowie Clathrin in den Fraktionen D und E differentiell nicht signifikant verändert. Die leichte Reduktion der Proteinmengen von Synaptotagmin 1 in den Fraktionen D und E könnte einen biochemischen Hinweis auf eine verringerte Anzahl synaptischer Vesikel in diesen Fraktionen darstellen.



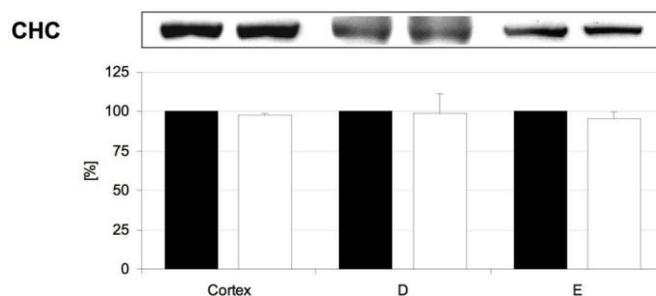
**Abb. 4-9: Proteinmengen von Vamp 2.**

Im Cortex (n=20), in D (n=10) und E (n=8).



**Abb. 4-10: Proteinmengen von Synaptotagmin 1.**

Im Cortex (n=11), in D (n=13) und E (n=12).

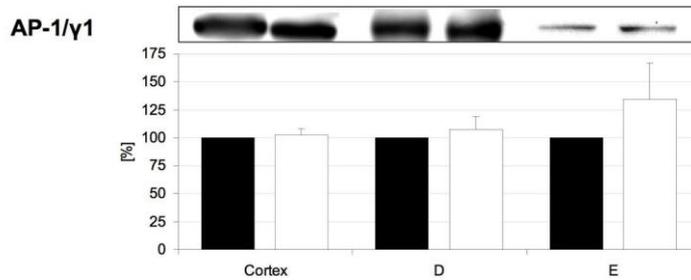


**Abb. 4-11: Proteinmengen von Clathrin (Chc).**

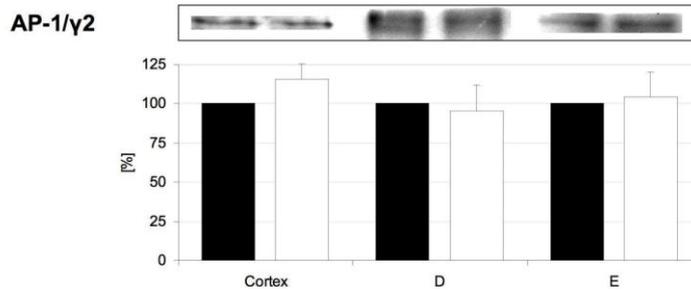
Im Cortex (n=5), in D (n=10) und E (n=3).

Zur Identifizierung einer möglichen spezifischen Lokalisation des AP-1/ $\sigma$ 1B-Komplexes in den Fraktion D bzw. E des Dichtegradienten wurden die Mengen der Markerproteine des AP-1-Komplexes  $\gamma$ 1 und  $\gamma$ 2 semiquantitativ bestimmt. Differentiell sind sie hier, wie in der Cortexfraktion, unverändert.

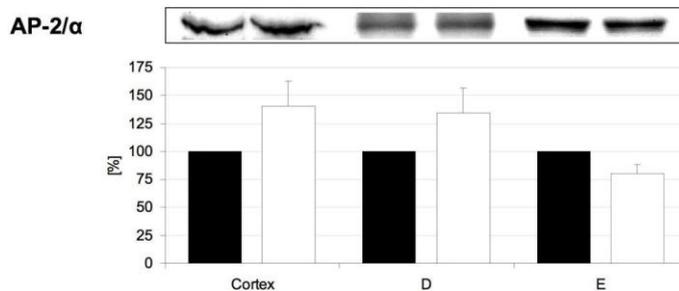
In der Elektronenmikroskopie wurden vermehrt clathrinumhüllte Strukturen identifiziert. AP-2 ist der Adaptorkomplex, welcher an der clathrinvermittelten Endozytose beteiligt und dessen Proteinmenge im Cortex differentiell verändert ist. Dessen Marker, das  $\alpha$ -Adaptin, ist in der Fraktionen D4 differentiell erhöht und in E5 differentiell reduziert. Diese Unterschiede zwischen beiden Fraktionen deuten auf verschiedene Pools an Transportvesikeln hin.



**Abb. 4-12: Proteinmengen von AP-1/γ1.**  
Im Cortex (n=7), in D (n=7) und E (n=5).



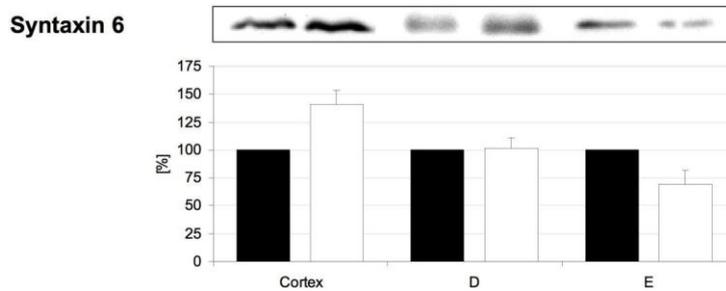
**Abb. 4-13: Proteinmengen von AP-1/γ2.**  
Im Cortex (n=6), in D (n=12) und E (n=5).



**Abb. 4-14: Proteinmengen von AP-2/α.**  
Im Cortex (n=6), in D (n=10) und E (n=8).

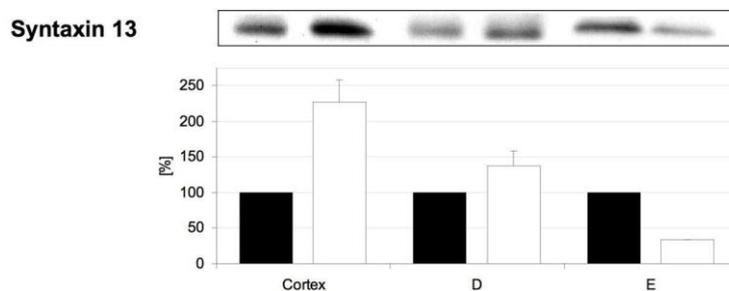
Die Mitglieder des SNARE-Komplexes, bestehend aus Syntaxin 6, Syntaxin 13, Vamp 4 und Vti 1a, welche die homotypische Fusion früher Endosomen vermitteln, sind in den Fraktionen D und E nicht einheitlich verändert. Während Syntaxin 6 und Syntaxin 13 in der Cortexfraktion im KO erhöht sind und Vti 1a unverändert verbleibt, sehen deren Veränderungen in der Gradientenfraktion D folgendermaßen aus: Syntaxin 6 und Vti 1a zeigen keine Veränderung und Syntaxin 13 ist deutlich erhöht. In der Fraktion E sind Syntaxin 6, Syntaxin 13 und Vti 1a reduziert. Über die Proteinverteilung von Vamp 4 kann aufgrund sehr geringer Signalintensitäten keine Aussagen gemacht werden. Wie Benthani *et al.* gezeigt haben, hat die Änderung der Proteinmenge eines SNARE-Proteins in der hier beobachteten Größeordnung keinen zwingenden Einfluss auf die Funktion des gesamten Komplexes [Bethani *et al.* 2007]. Die SNARE-Proteine können somit nicht als direkte Marker für frühe Endosomen angesehen werden, jedoch

weisen die differentiellen Unterschiede ihrer Proteinmengen stark auf eine Veränderung von frühen Endosomen hin.



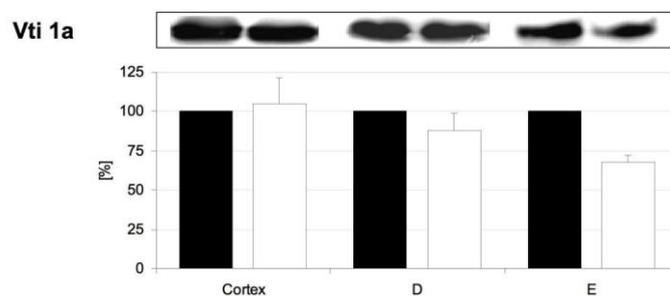
**Abb. 4-15: Proteinmengen von Syntaxin 6.**

Im Cortex (n=7), in D (n=7) und E (n=3).



**Abb. 4-16: Proteinmengen von Syntaxin 13.**

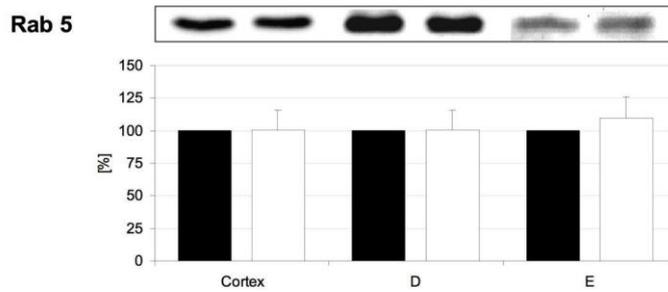
Im Cortex (n=6), in D (n=8) und E (n=1).



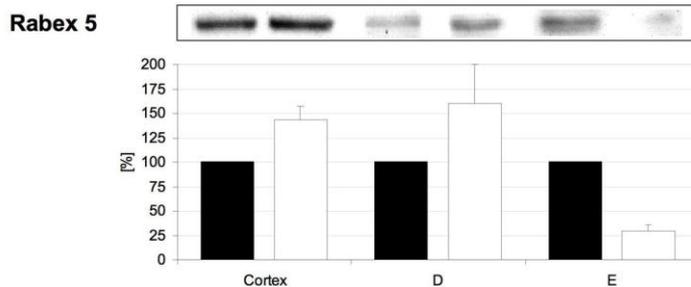
**Abb. 4-17: Proteinmengen von Vti 1a.**

Im Cortex (n=10), in D (n=12) und E (n=3).

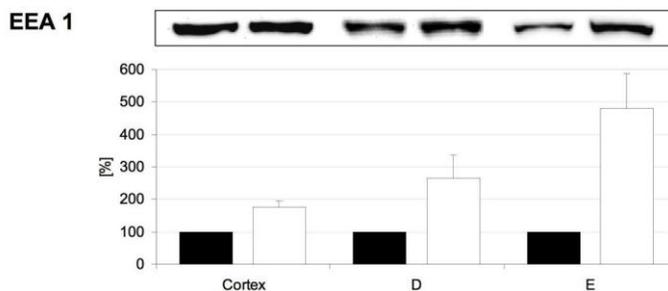
Die frühen endosomalen Markerproteine zeigen unter dem Einfluss des KO folgende Veränderungen: Für Rab 5 ist in den Fraktionen D und E analog zur Cortexfraktion keine signifikante Veränderung zu erkennen. Rabex 5 ist sowohl in der Cortexfraktion als auch der Fraktion D im KO um etwa 50% erhöht, während dieses Protein in der Fraktion E um etwa 70% reduziert ist. Dies stellt einen weiteren Hinweis auf zwei unterschiedliche endosomale, vesikuläre Pools in den Fraktionen D und E dar.



**Abb. 4-18: Proteinmengen von Rab 5.**  
Im Cortex (n=13), in D (n=10) und E (n=5).



**Abb. 4-19: Proteinmengen von Rabex 5.**  
Im Cortex (n=4), in D (n=9) und E (n=4).

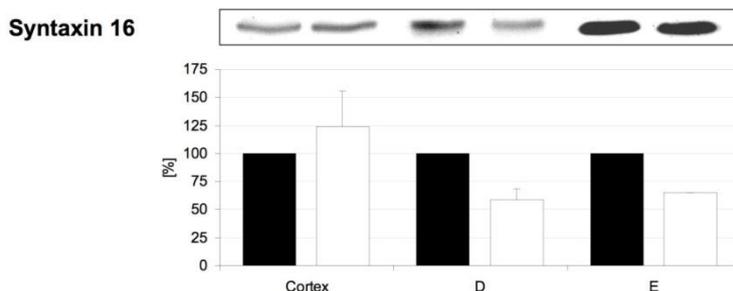


**Abb. 4-20: Proteinmengen von EEA 1.**  
Im Cortex (n=8), in D (n=8) und E (n=6).

EEA 1 zeigt in den Fraktionen D und E mit etwa 250% bzw. 500% den höchsten differentiellen Anstieg im KO und ist weit über den in der Cortexfraktion hinaus erhöht. Dies weist nicht nur auf eine erhöhte Proteinkonzentration von EEA 1 im AP-1/ $\sigma$ 1B-defizienten Cortex hin, sondern zeigt darüber hinaus, dass es im KO vermehrt membrangebunden vorliegt und eine AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz zu einer Veränderung von frühen Endosomen führt. Einerseits stellt dies eine Bestätigung der Ergebnisse der Elektronenmikroskopie dar, in der vermehrt endosomale Strukturen zu erkennen gewesen sind. Andererseits zeigt es, dass der sehr starke differentielle Anstieg der EEA 1-Menge auf Membranstrukturen, der in der differentiellen Zentrifugation zu erkennen war, von frühen endosomalen Strukturen hervorgerufen wird, die sich in den Fraktionen D und E anreichern.

Das SNARE-Protein Syntaxin 16 vermittelt den retrograden Transport von frühen bzw. recycling Endosomen und späten Endosomen zum *trans*-Golgi-Netzwerk [Chen *et al.*

2010a]. In den Fraktionen D und E des KO ist dieses Protein reduziert, was einen zusätzlichen Hinweis auf eine Veränderung des endosomalen Sortierungsweges darstellt.



**Abb. 4-21: Proteinmengen von Syntaxin 16.**

Im Cortex (n=6), in D (n=7) und E (n=1).

**Tab. 4-1: Differentielle Veränderungen im Cortex und den Gradientenfraktionen D und E**

Durch AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz hervorgerufene differentielle Veränderungen in der Cortexfraktion und den Gradientenfraktionen D und E. – : keine Veränderung,  $\uparrow$  : Zunahme im KO,  $\downarrow$  : Abnahme im KO, ( ) : Änderung nicht signifikant.

Protein	Cortex	D	E
Vamp 2	–	–	–
Synaptotagmin 1	–	–	–
Chc	–	–	–
AP-1/ $\gamma$ 1	–	–	–
AP-1/ $\gamma$ 2	–	–	–
AP-2/ $\alpha$	$\uparrow$	$\uparrow$	$\downarrow$
Syntaxin 6	$\uparrow$	–	$\downarrow$
Syntaxin 13	$\uparrow$	$\uparrow$	( $\downarrow$ )
Syntaxin 16	–	$\downarrow$	$\downarrow$
Vti 1a	–	–	$\downarrow$
Rab 5	–	–	–
Rabex 5	$\uparrow$	$\uparrow$	$\downarrow$
EEA 1	$\uparrow$	$\uparrow$	$\uparrow$

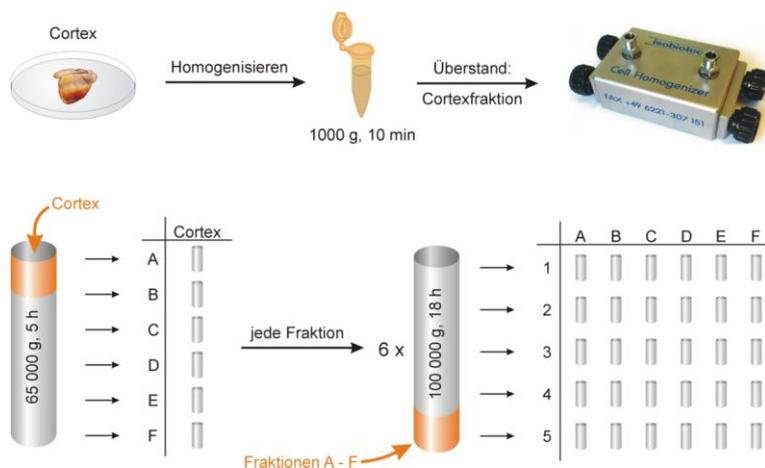
Der differentielle Vergleich der Fraktionen D und E zeigt, dass die AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz vornehmlich einen Einfluss auf den endosomalen Sortierungsweg und die AP-2- und clathrinvermittelte Endocytose hat. In der Fraktion D führt die AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz zu einer Erhöhung der frühen endosomalen Markerproteine Rabex 5 und EEA 1, während Rab 5 unverändert bleibt. In der Fraktion E sind die Markerproteine des AP-2-Komplexes früher Endosomen bis auf EEA 1 und die Proteine des frühen endosomalen SNARE-Komplexes alle reduziert. Während EEA 1 stark erhöht ist, wird Rab 5 nicht verändert. Dies weist darauf hin, dass nur eine bestimmte Population früher Endosomen durch die AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz verändert wird. Die Reduktion des SNARE-Proteins Syntaxin 16 weist darauf hin, dass im KO neben dem frühen endosomalen auch der späte endosomale Sortierungsweg beeinflusst wird, worauf die veränderten Proteinmengen von TSG 101 sowie die elektro-

### 4.3 Flotationsdichtegradientenzentrifugation

nenmikroskopischen Daten ebenfalls hinweisen. Für eine detailliertere Untersuchung dieser Veränderungen in den Fraktionen D und E wurden u. a. diese durch eine Flotationszentrifugation gereinigt.

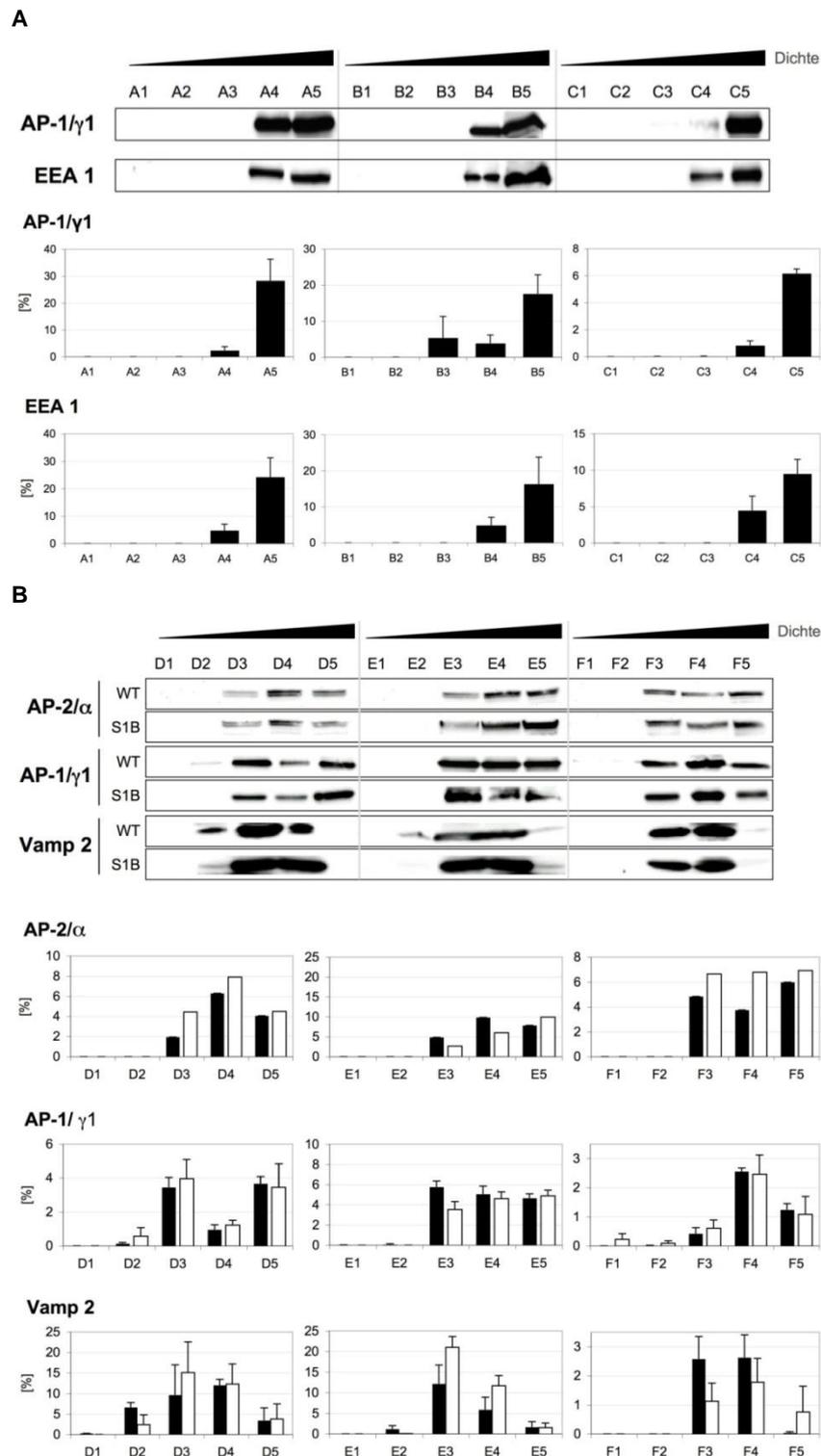
### 4.3 Flotationsdichtegradientenzentrifugation

Um die Fraktionen A bis F der 65 000 g Sedimentationszentrifugation zu reinigen, wurden diese sechs Fraktionen jeweils unter einen zweiten linearen Dichtegradienten geladen und eine 100 000 g Flotationszentrifugation über 18 h durchgeführt. Im Gegensatz zur Sedimentationszentrifugation, in der vor allem eine Separierung der Bestandteile nach ihrer Größe stattfindet, kommt es in der Flotationszentrifugation zu einer Auftrennung anhand der Dichte der geladenen Bestandteile [McCaffrey *et al.* 2009]. Aufgrund der deutlich geringeren Gesamtproteinmenge in der Flotationszentrifugation wurden deren Gradienten jeweils nicht in sechs, sondern nur in fünf Fraktionen aufgeteilt. Die Bezeichnung der einzelnen Fraktionen ist in Abb. 4-22 dargestellt und soll hier noch einmal exemplarisch für eine Fraktion erklärt werden: Jede Fraktion trägt den Buchstaben ihrer Ladefraktion (z. B. D für die vierte Fraktion des ersten Gradienten) und die Nummer der Fraktion der Flotationszentrifugation (z. B. D3 für die dritte Fraktion der Sedimentationszentrifugation, die mit der Fraktion D geladen wurde).



**Abb. 4-22: Flotationsdichtegradientenzentrifugation der Fraktionen A bis F.**

Die zweite Zentrifugation liefert insgesamt 30 Fraktionen, von denen analog zur Sedimentationszentrifugation das Proteinprofil für Markerproteine des Golgi-Apparats, des *trans*-Golgi-Netzwerks, von synaptischen Vesikeln und von Endosomen mit Western-Blots bestimmt wurde. Aufgrund des geringen Proteingehalts im Flotationsgradienten wurden alle Proteine einer Fraktion gefällt und für Western-Blot-Quantifizierungen eine SDS-PAGE durchgeführt. In der Flotationszentrifugation von den Fraktionen A, B und C findet keine ausgeprägte Wanderung der Ladefraktion statt, was auf den überwiegenden Anteil an löslichen Proteinen zurückgeführt werden kann. Dies wird exemplarisch in Abb. 4-23 A gezeigt.

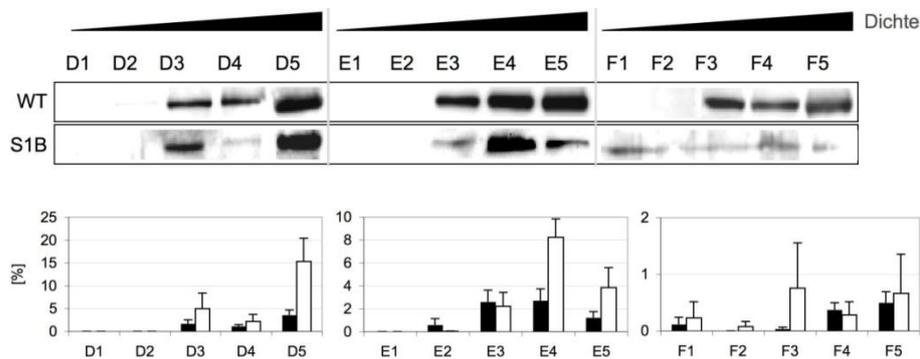


**Abb. 4-23: Proteinprofile in der Sedimentationszentrifugation.**

**A** In der Sedimentationszentrifugation der Fraktionen A, B und C kam es zu keiner signifikanten Wanderung der geladenen Proteine. Exemplarisch sind die Proteinprofile und deren Quantifizierung über fünf unabhängige Experimente für die Markerproteine AP-1/γ1 und EEA 1 des WT abgebildet. **B** Repräsentative Blots und Quantifizierungen der Proteinprofil der Markerproteine AP-2/α, AP-1/γ1 und Vamp 2 der Sedimentationszentrifugation von den Fraktionen D, E und F (n=5).

### 4.3 Flotationsdichtegradientenzentrifugation

Nach der Flotationszentrifugation ist im Allgemeinen die höchste Konzentration eines Markerproteins in der Fraktion mit derselben Dichte wie der der Ladefraktion zu finden, was auf eine weitgehende Auftrennung des Cortexextraktes bereits in der Sedimentationszentrifugation hinweist. Während es in der Sedimentationszentrifugation zu einer Auftrennung von Membranstrukturen verschiedener Dichte kommt, werden diese Strukturen, die sich in den Fraktionen D, E und F befinden, durch die Flotationszentrifugation von Verunreinigungen befreit. In Abb. 4-23 B und Abb. 4-24 sind repräsentative Western-Blots der Proteinprofile der Flotationszentrifugation sowie deren Quantifizierungen gezeigt. Über mehrere Experimente war eine gleichbleibende Verteilung der Markerproteine in den einzelnen Gradientenfraktionen zu erkennen, sodass von einer hohen Reproduzierbarkeit dieser Flotationszentrifugation ausgegangen werden kann. Für die Markerproteine des Golgi-Apparats und des *trans*-Golgi-Netzwerks (GM 130 und TGN 38) sowie für Transportvesikel (AP-1/ $\gamma$ 1, AP-2/ $\alpha$ , Vamp 2 und Chc) sind zwischen den Genotypen keine signifikanten differentiellen Unterschiede erkennbar. Wie bereits den Proteinprofilen der Sedimentationszentrifugation zu entnehmen war, zeigt der frühe endosomale Marker EEA 1 zwischen den Genotypen signifikante Veränderungen.



**Abb. 4-24: Proteinprofile von EEA 1 in der Sedimentationszentrifugation.**

Verteilung von EEA 1 in den Fraktionen D, E und E der Sedimentationszentrifugation (n = 3). Die Proteinmenge jeder Fraktion ist in % der Gesamtproteinmenge an EEA 1 in der Cortexfraktion angegeben.

Die differentiellen Veränderungen sind zwischen den Fraktionen D4 und D5 sowie F2-F5 am deutlichsten ausgeprägt. Während in D und E die höchste EEA 1-Konzentration um die Dichte der korrespondierenden Ladefraktion verteilt ist, kommt es in Fraktion F im KO *in vitro* zu einer Umverteilung von EEA 1 im Gradienten. Diese Umverteilung weist zum einen auf den Erhalt der *in vitro*-Aktivität frühen Endosomen hin und ist zum anderen eine weitere Bestätigung der Veränderung früher Endosomen, welche durch die AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz hervorgerufen wird.

### 4.3.1 Flotationsdichtegradientenzentrifugation der Fraktionen D und E

In 4.2.5 wurden die differentiellen Unterschiede zwischen den Genotypen der Fraktionen D und E analysiert, in denen die größten Auswirkungen der AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz auf endosomale Markerproteine identifiziert werden konnten. Diese Fraktionen wurden jeweils durch eine Flotationszentrifugation weiter gereinigt und mit semiquantitativen Western-Blots mögliche Unterschiede der Proteinmengen der Markerproteine ihrer Subfraktionen 3, 4 und 5 bestimmt. Da in den jeweiligen Subfraktionen 1 und 2 mittels Western-Blot keine Proteine quantifiziert werden konnten, wird auf diese im Folgenden nicht weiter eingegangen.

Markerproteine für synaptischen Vesikel, wie Vamp 2 und Synaptotagmin 1, sind in den Subfraktionen des Flotationsgradienten, welche den gereinigten Fraktionen des Sedimentationsgradienten entsprechen (D3/D4 der Ladefraktion D und E4 der Ladefraktion E), im KO reduziert, was auf eine verringerte Anzahl an synaptischen Vesikeln zurückgeführt werden kann. Dieses Resultat stellt eine Unterstützung der elektronenmikroskopischen Beobachtungen dar. Da diese Einflüsse der AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz nur in den gereinigten Subfraktionen, jedoch nicht in ihren Ladefraktionen D und E zu erkennen sind, weist dies darauf hin, dass es sich bei ersteren um gereinigte synaptosomale Fraktionen handelt.

Markerproteine des AP-1-Komplexes sind wie in den Fraktionen D und E auch in den gereinigten Fraktionen im Allgemeinen nicht verändert. Eine Ausnahme stellt die Fraktion E3 dar: Hier ist  $\gamma$ 1 in der Fraktion des KO reduziert und  $\gamma$  2 erhöht, was auf eine spezifische Lokalisierung des AP-1/ $\sigma$ 1B-Komplexes auf Organellen dieser Dichte hindeuten könnte. Für den AP-2-Komplex, der an der clathrinvermittelten Endozytose beteiligt ist, ist wie bereits im Sedimentationsgradienten auch in den gereinigten Fraktionen kein einheitlicher Trend der Veränderung zu erkennen.

Von dem SNARE-Komplex Syntaxin 6, Syntaxin 13, Vamp 4 und Vti 1a, der an der Fusion früher Endosomen beteiligt ist, ist Vti 1a analog zu den Ladefraktionen D und E nicht verändert. Syntaxin 6 zeigt in den Fraktionen D3 – D5 keine signifikanten Veränderungen und Syntaxin 13 konnte hier nicht detektiert werden. In den Subfraktionen E3-E5 sind Syntaxin 6 und Syntaxin 13 differentiell erhöht.

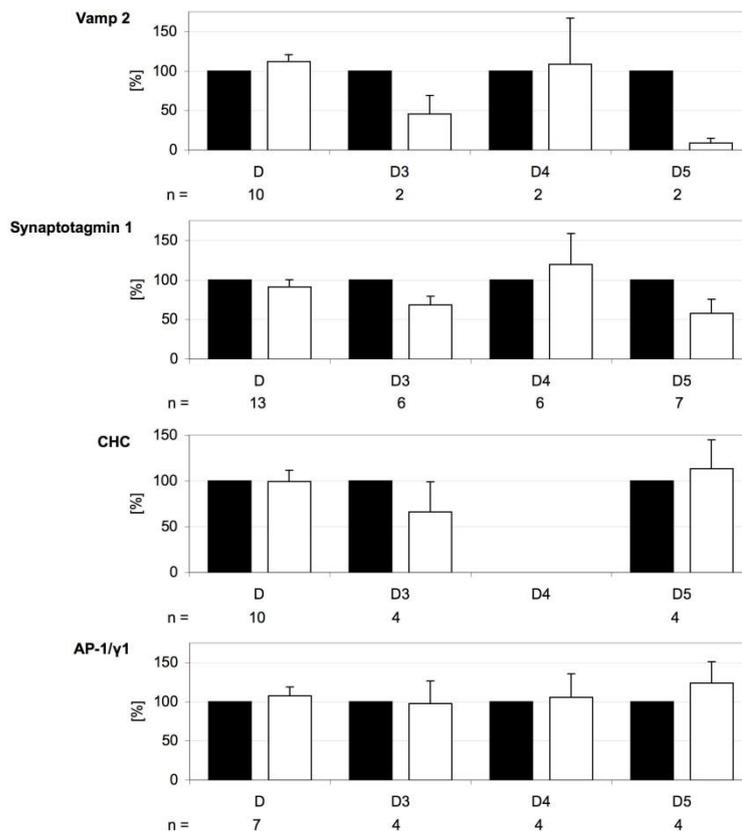
Während für den endosomalen Marker Rab 5 in den Fraktionen D und E keine Unterschiede zwischen den Genotypen zu erkennen sind, ist dieses Protein sowohl in der Fraktion D4 als auch der Fraktion E5 des KO erhöht. Diese stellen die gereinigten Fraktionen der Ladefraktion dar und sind neben der synaptosomalen Fraktion die einzigen, in der eine differentielle Erhöhung zu beobachten ist. Das Markerprotein früher Endosomen EEA 1 ist in allen sechs Subfraktionen (D3 – D5 und E3 – E5) erhöht, wo-

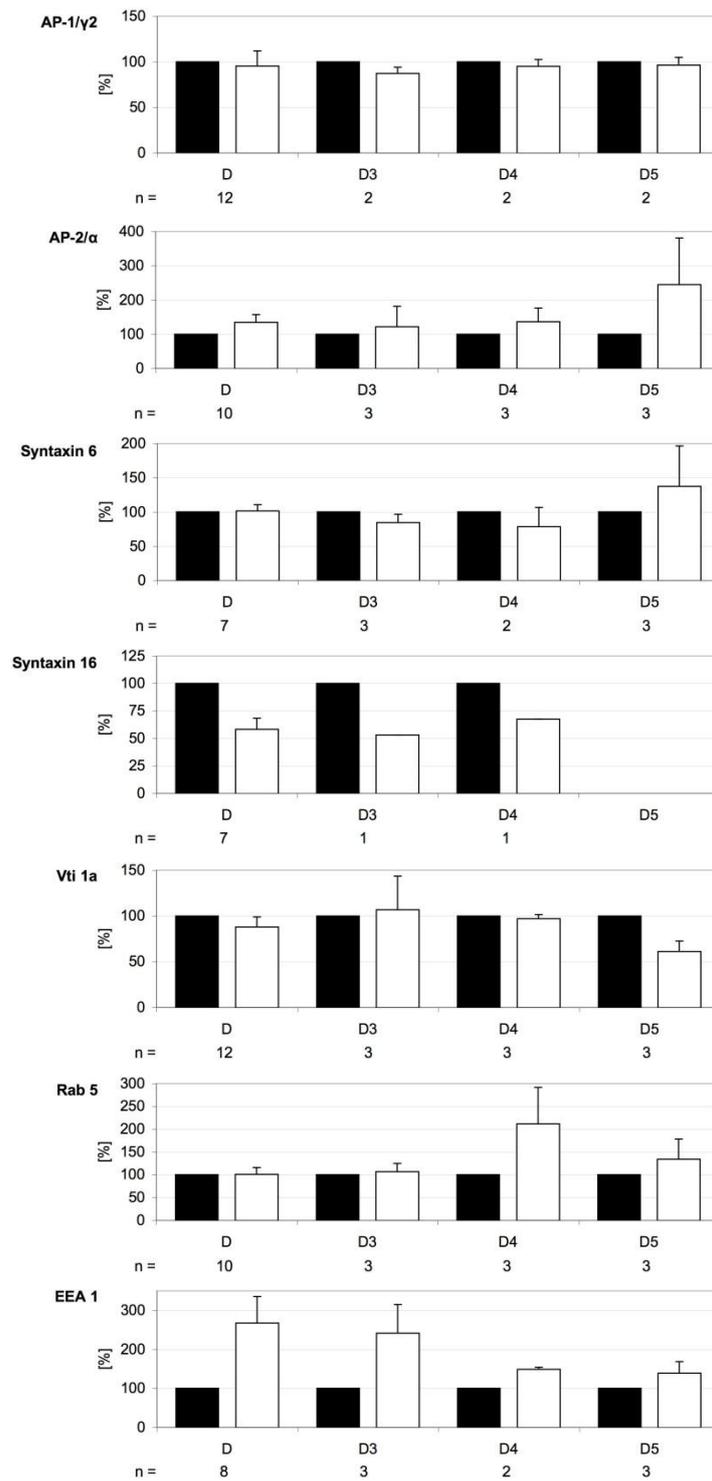
### 4.3 Flotationsdichtegradientenzentrifugation

bei diese nur in den Fraktionen D5 nicht signifikant ist. Dass eine signifikante Erhöhung der EEA 1 Menge nur in den Fraktionen D3, D4, E3 und E4 zu erkennen ist, weist darauf hin, dass dieses Protein über den Zeitraum der gesamten Zentrifugationen an den Membranen veränderter Endosomen verbleibt, da es anderenfalls vermehrt und in differentiell unterschiedlichen Mengen in der jeweiligen Ladefraktion 5 zu finden sein müsste. Die Tatsache, dass sich die Hauptmenge an endosomalen Markerproteinen in der jeweiligen gereinigten Fraktion befindet, die der Dichte der Ladefraktion entspricht, weist stark darauf hin, dass es während der Zentrifugation zu keiner Veränderung der Dichte von mit EEA 1-assoziierten frühen Endosomen kommt.

Das am retrograden Transport von frühen und späten Endosomen sowie Recyclingendosomen zum *trans*-Golgi-Netzwerk beteiligte SNARE-Protein Syntaxin 16 ist in den Fraktionen des KO D3 – D5 und E3 – E5 reduziert, was dessen Reduktion in Kompartimenten verschiedener Dichte und einen Einfluss des AP-1/ $\sigma$ 1B-Komplexes auch auf späte Endosomen anzeigt.

In Abb. 4-25, Abb. 4-26 und Tab. 4-2 sind die differentiellen Unterschiede, die von der AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz in den Fraktionen D3-D5 und E3-E5 hervorgerufen werden, zusammenfassend dargestellt.

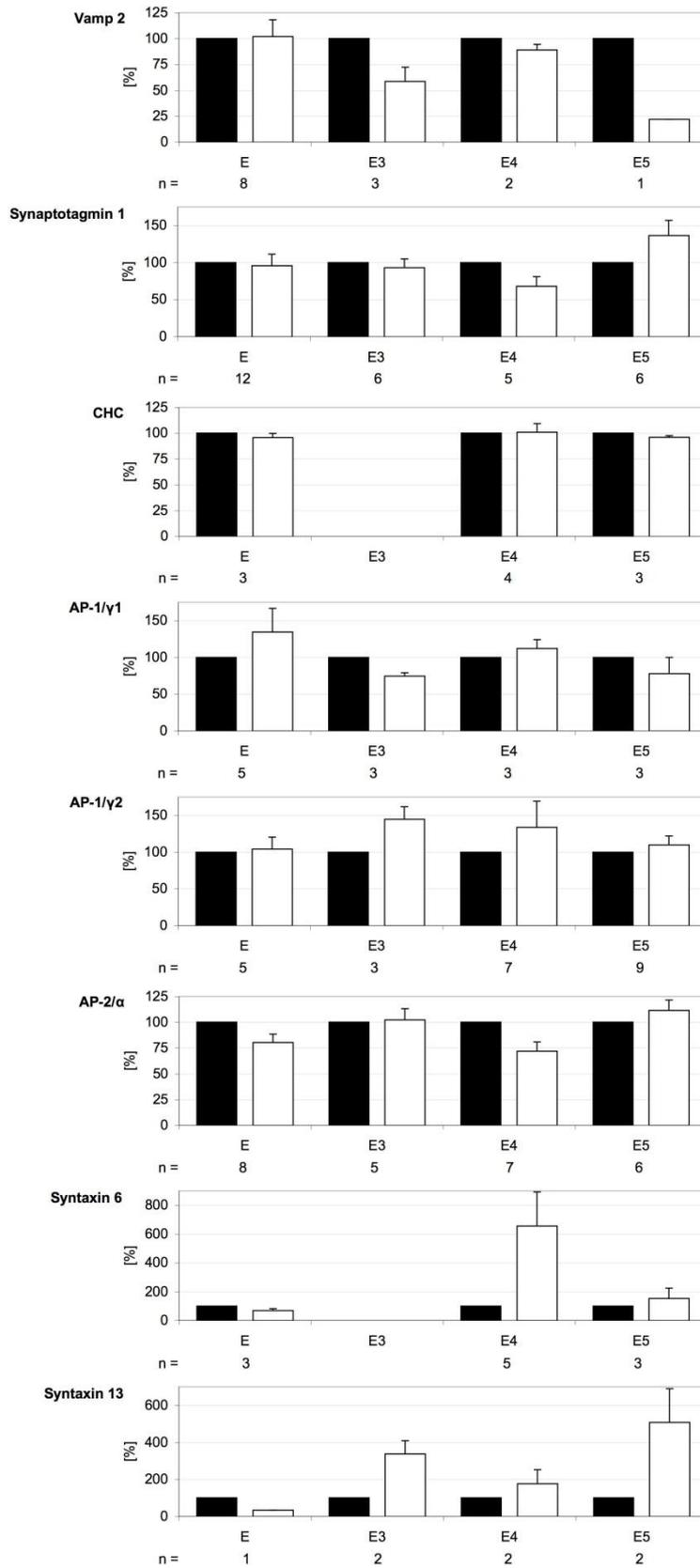


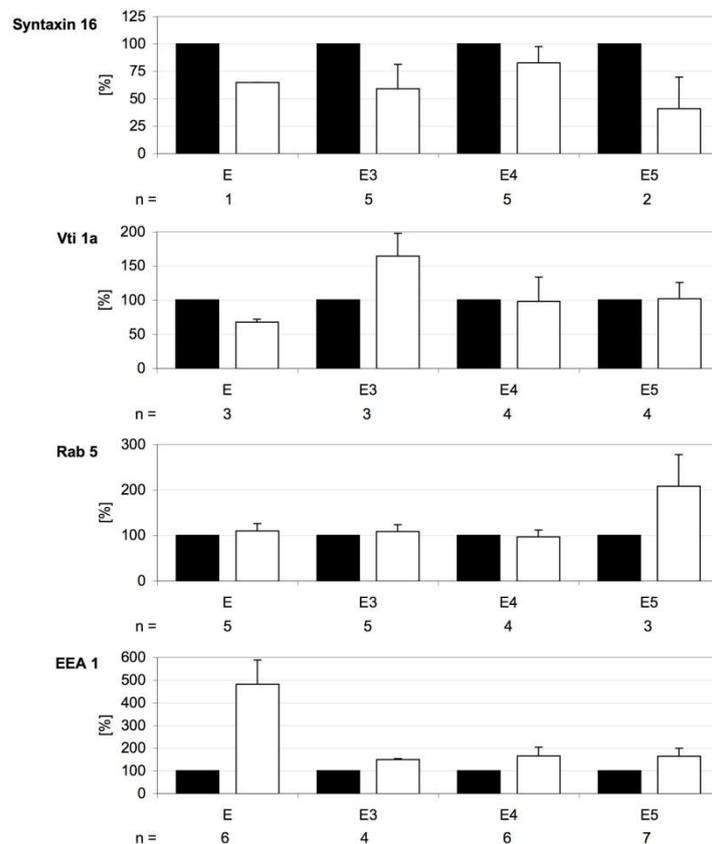


**Abb. 4-25: Differentielle Veränderungen in den Gradientenfraktionen D3-D5.**

Zum Vergleich sind je Markerprotein die differentiellen Veränderungen der Fraktion D, aus der die Fraktionen D3-D5 gewonnen worden, dargestellt. n gibt die Anzahl an unabhängigen Experimenten an.

### 4.3 Flotationsdichtegradientenzentrifugation





**Abb. 4-26: Differentielle Veränderungen in den Gradientenfractionen E3-E5.**

Zum Vergleich sind je Markerprotein die differentiellen Veränderungen der Fraktion E, aus der die Fraktionen E3-E5 gewonnen worden, dargestellt. n gibt die Anzahl an unabhängigen Experimenten an.

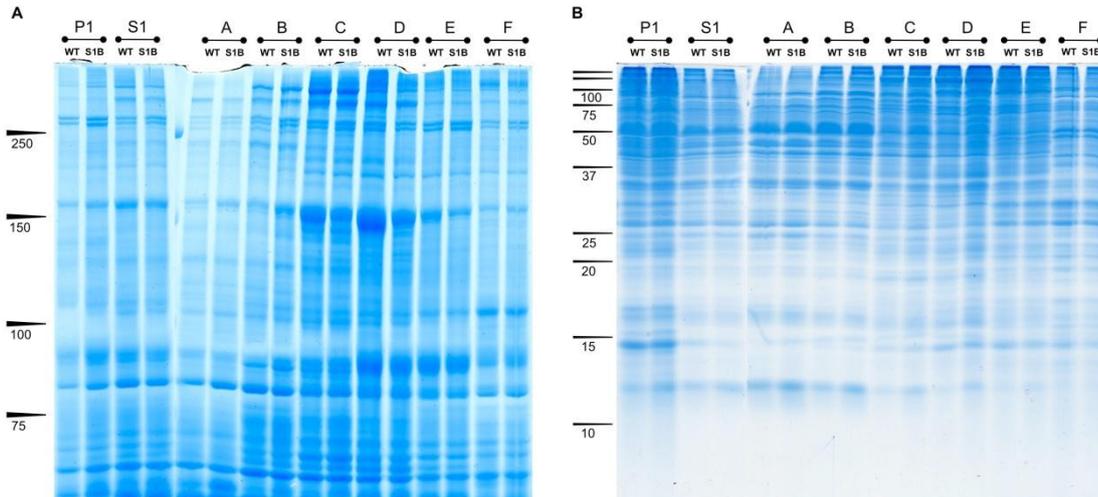
**Tab. 4-2: Differentielle Veränderungen in den Gradientenfractionen D3-D5 und E3-E5.**

Durch die AP-1/σ1B-Defizienz hervorgerufene Veränderungen in den Gradientenfractionen D und E und ihren jeweiligen Subfraktionen D3-D5 und E3-E5. – : keine Veränderung, ↑ : Zunahme im KO, ↓ : Abnahme im KO, ( ) : Änderung nicht signifikant, X : keine Signale.

Protein	D	D3	D4	D5	E	E3	E4	E5
Vamp 2	–	↓	(–)	↓	–	↓	↓	(↓)
Synaptotagmin 1	–	↓	(↑)	↓	–	–	↓	↑
Chc	–	–	X	–	–	X	–	–
AP-1/γ1	–	–	–	–	–	↓	–	–
AP-1/γ2	–	–	–	–	–	↑	–	–
AP-2/α	↑	(↑)	(↑)	↑	↓	(↑)	↓	↑
Syntaxin 6	–	(↓)	–	–	↓	X	↑	(↑)
Syntaxin 13	↑	X	X	X	(↓)	↑	↑	↑
Syntaxin 16	↓	↓	↓	X	↓	↓	↓	↓
Vti 1a	–	–	–	↓	↓	(↑)	–	–
Rab 5	–	–	↑	–	–	–	–	↑
Rabex 5	↑	X	X	X	↓	X	X	X
EEA 1	↑	↑	↑	(↑)	↑	↑	↑	↑

## 4.4 Proteinprofile der Fraktionierung in der SDS-PAGE

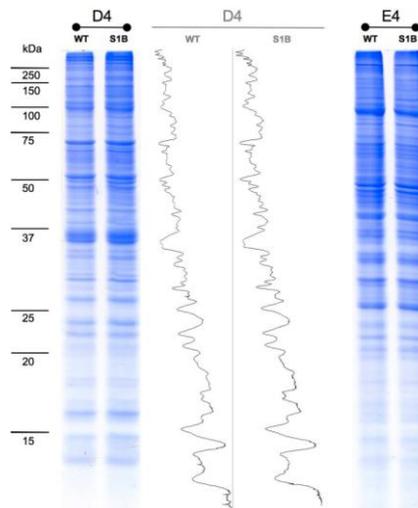
Zur Identifizierung von weiteren Proteinen, welche möglicherweise in der Folge der AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz verändert sind, wurden SDS-PAGE der Fraktionen A bis F von der Sedimentationszentrifugation durchgeführt und diese coomassiegefärbt (Abb. 4-27).



**Abb. 4-27: SDS-PAGE der Sedimentationszentrifugationsfraktionen.**

Gesamtproteinprofil der 65 000 g Dichtegradientenzentrifugationsfraktionen von WT und KO in Puffer A. **A** 7,5% SDS-PAGE, **B** 15% SDS-PAGE. Beide Gele coomassiegefärbt.

Während zwischen den einzelnen Fraktionen deutliche Unterschiede in der Proteinverteilung zu erkennen sind, zeigt das Proteinprofile des WT und des KO derselben Fraktion keine signifikanten Veränderungen. Anschließend wurden SDS-PAGE von Fraktionen des Flotationsgradienten durchgeführt. Exemplarisch sind hier die coomassiegefärbten SDS-Gele der Fraktionen D4 und E4 abgebildet. Von den Banden der Fraktion D4 (WT und KO) sind exemplarisch die Intensitätsprofile gezeigt, für die keine differentiellen Unterschiede zu erkennen sind. Wie bereits für eine Vielzahl von Proteinprofilen von Markerproteinen festgestellt wurde, sind auch für die Gesamtproteinprofile der gereinigten Fraktionen keine Unterschiede zwischen den Genotypen erkennbar.

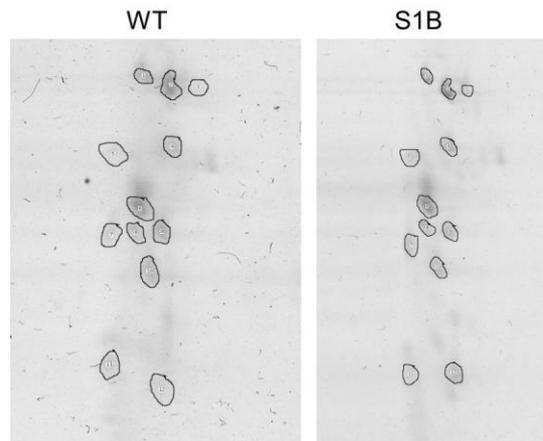


**Abb. 4-28: Repräsentative SDS-PAGE der Flotationsdichtegradientenzentrifugationen**  
Links: Fraktion D4 mit Intensitätsprofil der Proteinverteilung, rechts: Fraktion E4.

## 4.5 2D-Gelelektrophorese

Eine höhere Auftrennung von Proteinen einer Probe kann durch eine 2D-PAGE erzielt werden. Gefällte Proteine einer Fraktion wurden in einem Rehydrierungspuffer ohne und einem mit dem Detergens Triton X-100 in Lösung gebracht.

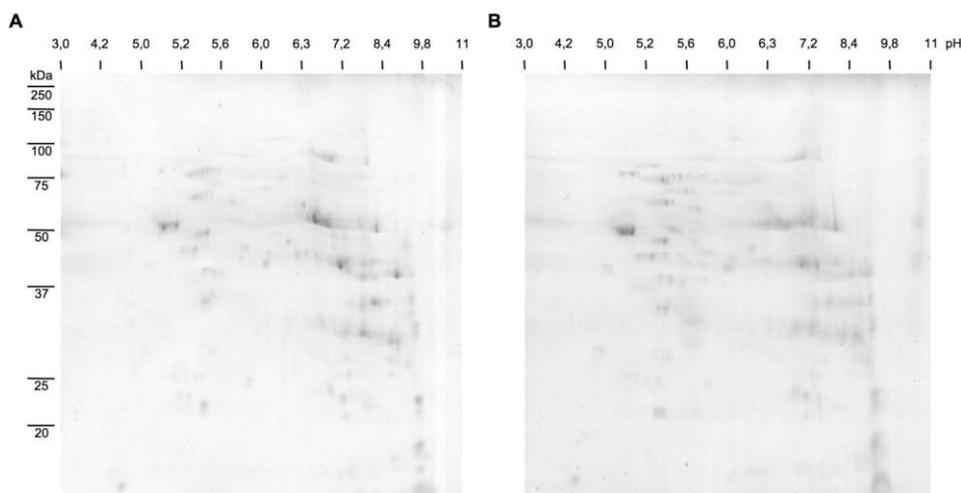
Von Proben, die in dem Rehydrierungspuffer ohne Triton X-100 aufgenommen wurden und von denen die isoelektrische Fokussierung (IEF) in einem nichtlinearen IPG-Streifen des pH-Bereiches von 3 bis 11 durchgeführt wurde, ließen sich in der zweiten Dimension nur wenige Spots in einem begrenzten pH-Bereich um 5,8 nachweisen. Ein coomassiegefärbtes Gel dieser 2D-PAGE ist in Abb. 4-29 zu sehen. Durch die Verwendung von IPG-Streifen des pH-Bereiches 4-7 war keine höhere Auftrennung dieser Proteine möglich, vielmehr konnten annähernd keine Proteine im SDS-Gel mehr gefärbt werden. Zwischen 2D-PAGE beider Genotype konnten unter diesen Bedingungen keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.



**Abb. 4-29: 2D-PAGE der Fraktion E.**

Rehydrierungspuffer ohne Triton X-100, IPG-Streifen pH 3-11 NL. Dargestellt ist ein Ausschnitt um den pH-Bereich 5,8.

Wie in 4.2.2 gezeigt wurde, bestehen die Fraktionen hoher Dichte aus einem großen Anteil membrangebundener Proteine. Möglicherweise kann die geringe Anzahl an Proteinen, die in der zweiten Dimension (SDS-PAGE) durch Coomassiefärbung nachweisbar sind, auf eine ungenügende Solubilisierung dieser in der ersten Dimension zurückgeführt werden. Zur Verbesserung der Löslichkeit membrangebundener Proteine wurde ein Rehydrierungspuffer mit Triton X-100 verwendet [Luche *et al.* 2003]. Unter diesen Bedingungen konnte die Anzahl an nachweisbaren Proteinen in der zweiten Dimension deutlich erhöht werden, was in Abb. 4-30 exemplarisch dargestellt ist. Die Quantifizierung der Gele der zweiten Dimension zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen WT und KO.



**Abb. 4-30: 2D-PAGE der Fraktion F.**

Rehydrierungspuffer mit Triton X-100, IPG-Streifen pH 3-11 NL. **A** WT, **B** KO.

Die Anzahl der detektierbaren Proteine ist stark von der Wahl des Rehydrierungspuffers und im Speziellen von dessen Detergens abhängig. Dies stellt ein hohes Maß an

Vorselektierung der Proteine dar, die für diese Methode resolubilisiert werden. Für eine Auftrennung mit Hilfe einer 2D-PAGE aller Proteine aus einer Gradientenfaktion wären umfangreiche Testreihen hinsichtlich des Rehydrierungspuffers notwendig gewesen, deren Nutzen den Zeitaufwand aller Voraussicht nach nicht gerechtfertigt hätte. Da sich darüber hinaus unter den hier beschriebenen Bedingungen über eine 2D-PAGE keine Veränderungen auf Proteinebene zeigten, wurden keine weiteren Untersuchungen mit dieser Methode durchgeführt.

Western-Blot-Quantifizierungen von neuronalen Extrakten haben gezeigt, dass die AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz zu Veränderungen von endosomalen Kompartimenten führt. Diese Ergebnisse konnten vorangegangene elektronenmikroskopische Beobachtungen bestätigen. Nachdem 2D-PAGE Experimente keinen Hinweis auf weitere Proteine lieferten, deren Mengen durch die Defizienz verändert sind, sollten mit Hilfe von massenspektrometrischen Methoden mögliche Veränderungen identifiziert werden.



## 5. iTRAQ™-Massenspektrometrie endosomaler Fraktionen

Biochemische Untersuchungen von Fraktionen der 65 000 g Dichtegradientensedimentationszentrifugation zeigten, dass in den Fraktionen C bis F hauptsächlich Vesikel, Organellen und Membranfragmente vorhanden sind. Der Hauptanteil von synaptischen Vesikeln und Endosomen befindet sich in den Fraktionen D und E. In diesen beiden Fraktionen sind die differentiellen Unterschiede von endosomalen Markerproteinen am stärksten ausgeprägt: Das frühe endosomale Markerprotein EEA 1 ist in beiden Fraktionen des defizienten Cortex deutlich erhöht und der Marker TSG 101 des späten endosomalen Abbauweges über MVB ist eindeutig reduziert. Die Betrachtung der differentiellen Unterschiede aller endosomaler Markerproteine zeigt, dass die AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz in beiden Fraktionen unterschiedliche Veränderungen hervorruft, was auf zwei individuelle endosomale Populationen hindeutet. Für eine detaillierte Analyse der durch die Defizienz hervorgerufenen Veränderungen wurden die Fraktionen D und E mit einer Dichtegradientenflotationszentrifugation bei 100 000 g gereinigt. In den gereinigten Fraktionen D4 und E5 ist eine Abreicherung einer Vielzahl von Proteinen zu erkennen, was deren biochemische differentielle Quantifizierung erschwert. Der frühe endosomale Marker EEA 1 ist in den gereinigten Fraktionen eindeutig erhöht und zusätzlich ist auch ein Anstieg von Rab 5 in den KO Fraktionen zu erkennen. Jedoch ist der differentielle Anstieg von Rab 5 nicht auf diese Fraktionen beschränkt und daher nicht spezifisch. Aufgrund der niedrigen Proteinmenge in den gereinigten Fraktionen war die Bestätigung der Daten zu den 65 000 g Fraktionen durch Western-Blot-Quantifizierungen nicht möglich. Lediglich EEA 1 bildet hier eine Ausnahme.

Zur Identifikation von möglichen differentiellen Unterschieden in der Menge von Proteinen der Fraktionen D4 und E5, wurden iTRAQ™-Massenspektrometrieexperimente durchgeführt. Das Ziel bestand zum einen darin weitere Bestätigungen für den von Glyvuk *et al.* beschriebenen Einfluss der AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz auf das synaptische Vesikelrecycling unter einer Beteiligung von endosomalen Zwischenstufen [Glyvuk *et al.* 2010] zu finden und zum anderen in der Identifikation von Proteinen die  $\sigma$ 1B-abhängig an diesem beteiligt sind.

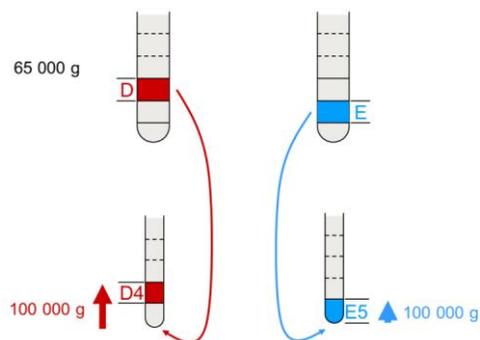


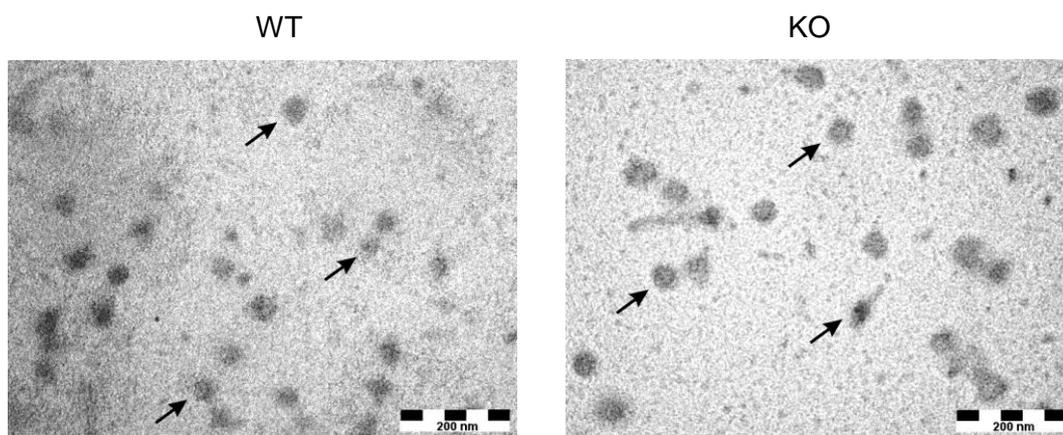
Abb. 5-1: Flotationsgradientenreinigung der Fraktionen D und E.

### 5.1 Elektronenmikroskopische Aufnahmen

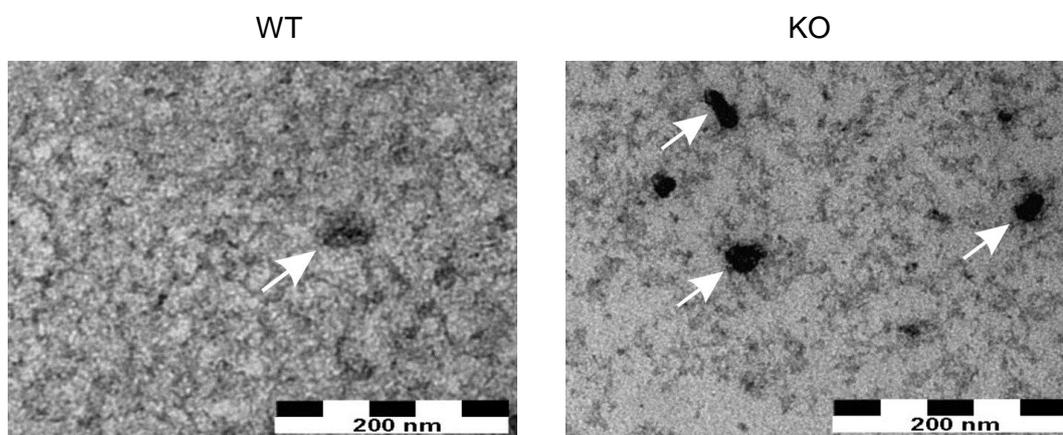
Von den Fraktionen D4 und E5 wurden *negative stain* elektronenmikroskopische Aufnahmen durchgeführt. In der Fraktion D4 sind vesikuläre Strukturen mit einem Durchmesser zwischen etwa 40 und 100 nm zu erkennen. Takamori *et al.* haben gezeigt, dass der Durchmesser von kleinen Transportvesikeln zwischen 40 und 80 nm liegt und synaptische Vesikel im Mittel einen Durchmesser von 40 nm aufweisen [Takamori *et al.* 2006]. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen weisen darauf hin, dass es sich bei der Fraktion D4 um eine Anreicherung von kleinen Strukturen des vesikulären Transports mit einem hohen Anteil an synaptischen Vesikeln handelt. Zwischen den Genotypen konnten keine signifikanten Veränderungen festgestellt werden.

In elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Fraktion E5 sind im Gegensatz zu denen der Fraktion D4 keine vesikulären Strukturen identifiziert worden, die direkt auf synaptische Vesikel hindeuten. Hier sind elektronendichte Strukturen mit einem Durchmesser zwischen 50 und 100 nm zu erkennen von denen in der Fraktion des KO etwa ein- bis zweimal so viele im Vergleich zum WT vorhanden sind.

## D4



## E5



**Abb. 5-2: Negative-staining-EM Aufnahmen der Fraktionen D4 und E5.**

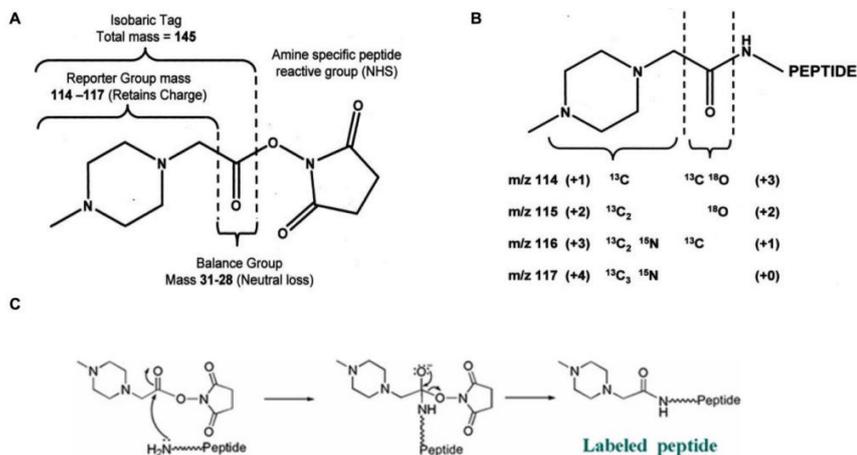
Vesikuläre Strukturen in der D4 Fraktion sind mit schwarzen und elektronendichte Strukturen der E5 Fraktion mit weißen Pfeilen markiert.

## 5.2 Das iTRAQ™-Massenspektrometrieexperiment

Mit einem iTRAQ™-Massenspektrometrieexperiment können bis zu vier individuelle Proben getrennt voneinander markiert und die relativen Mengenunterschiede eines Proteins anschließend in allen Proben in einem Experiment bestimmt werden. Wie bereits der Name für diese Methode andeutet (iTRAQ™: *Isobaric tags for relative and absolute quantitation*), beruht das Grundprinzip auf der Markierung von Proteinen oder Peptiden mit bis zu vier unterschiedlichen Markierungsreagenzien gleicher Masse. Jedes der vier iTRAQ™-Reagenzien setzt sich aus drei Gruppen zusammen: einer reaktiven aminspezifischen Gruppe, einer Ausgleichsgruppe und einer Reportergruppe, wobei die beiden letzteren den *isobaric Tag* bilden (Abb. 5-3 A). Über die reaktive aminspezifische Gruppe findet eine kovalente Bindung an eine primäre Aminogruppe von Proteinen oder Peptiden statt (Abb. 5-3 C) und diese Gruppe wird nach der Reaktion, der Markierung, abgespalten. Folglich können alle endständigen Aminogruppen inklu-

## 5.2 Das iTRAQ™-Massenspektrometrieexperiment

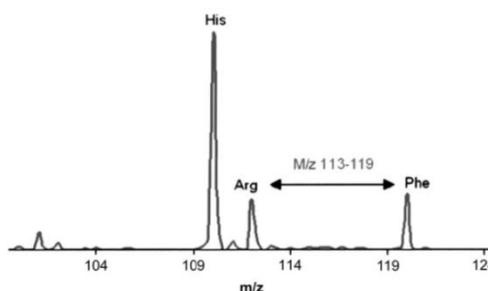
sive der  $\epsilon$ -Aminogruppen von Proteinen oder Peptiden markiert werden. Alle *isobaric Tags* der vier Markierungsreagenzien unterscheiden sich in der Zusammensetzung der Kohlenstoff-, Stickstoff- und Sauerstoffisotope. Diese sind, wie in Abb. 5-3 B gezeigt ist, so gewählt, dass die Masse der Reportergruppe 114, 115, 116 und 117 Da beträgt. Die jeweiligen Isotope der Ausgleichsgruppe sind so gewählt, dass die Gesamtmasse aller *isobaric Tags* 145 Da beträgt.



**Abb. 5-3: iTRAQ™-Reagenzien und deren Proteinmarkierung.**

**A** iTRAQ™-Reagenz: dargestellt sind die drei Gruppen [Ross *et al.* 2004, verändert]. **B** Isotopenzusammensetzung der vier iTRAQ™-Reagenzien [Ross *et al.* 2004, verändert]. **C** Reaktionsmechanismus der Peptidmarkierung ([www.moffitt.org](http://www.moffitt.org)).

Die Identifizierung von Proteinen oder Peptiden, die mit einem der vier iTRAQ™-Reagenzien markiert worden sind, erfolgt über die Fragmentierungseigenschaften des *isobaric Tags*. Der einfache Massenspektrometriemodus (MS) führt zu keiner Fragmentierung des *isobaric Tags*, während es in der Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) zu einer Fragmentierung in die Ausgleichsgruppe und Reportergruppe kommt. Während das Fragment der Ausgleichsgruppe keine Ladung, trägt ist das Fragment der Reportergruppe geladen. Folglich kann nur die Reportergruppe vom Detektor aufgezeichnet werden, dessen Masse zwischen 114 und 117 Da liegt und charakteristisch ist für ein Markierungsreagenz. Die Massen der Reportergruppen wurden in diesem Bereich gewählt, um Auswirkungen auf das MS- und MS/MS-Spektrum der markierten Proteine oder Peptide so gering wie möglich zu halten. Darüber hinaus sind im Allgemeinen in Peptidspektren im Bereich zwischen 113 bis 119 Da keine Signale zu erkennen, es handelt sich um eine so genannte „*quiet region*“, sodass keine Wechselwirkungen der Reporterionensignale mit denen von Aminosäurefragmenten oder Immoniumionen zu erwarten sind.

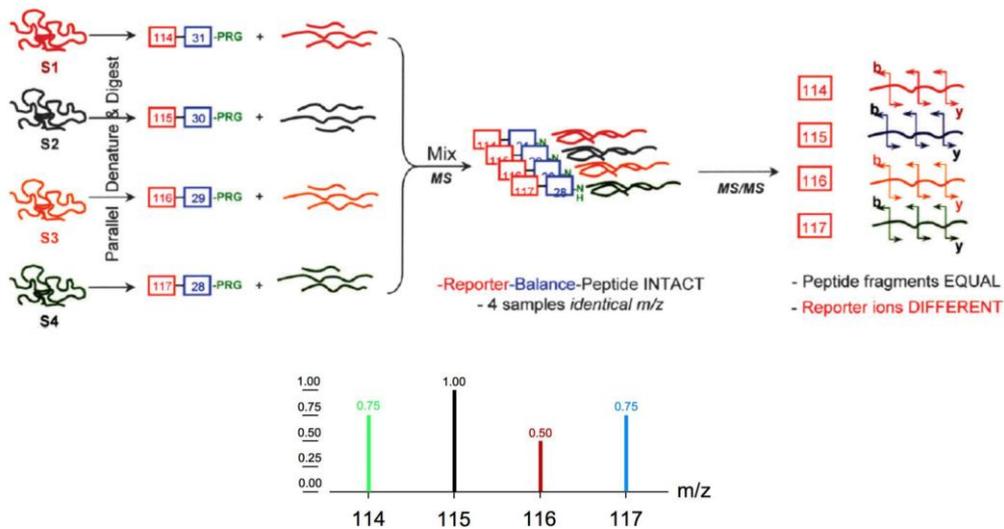


**Abb. 5-4: „Quiet region“ im Bereich zwischen 113 bis 119 Da.**

Kumulatives Ionenspektrum über mehr als 75 000 MALDI MS- oder MS/MS-Spektren mit dem Fokus auf dem niedrigen Massenbereich, der „quiet region“ zwischen 113-119 Da. [Zieske 2006]

Mit einem iTRAQ™-Massenspektrometrieexperiment können bis zu vier verschiedene Protein- oder Peptidproben markiert werden, mit dem Ziel, absolute oder relative Unterschiede in der Proteinmenge zwischen den Proben zu analysieren. Dazu werden die Proben entweder auf Proteinebene markiert und anschließend verdaut oder zuerst verdaut und anschließend auf Peptidebene markiert. Gleiche Gesamtproteinmengen der Proben werden gemischt und diese massenspektrometrisch gemessen. Hierbei wird zunächst ein MS- und nachfolgend ein MS/MS-Spektrum aufgenommen. Da der *isobaric Tag* während der MS-Methode nicht fragmentiert, liefert jedes Peptid ein um die Masse von 145 Da verschobenes Spektrum, unabhängig davon, mit welchem Reagenz es markiert wurde. Die MS/MS-Methode führt zu einer Fragmentierung des Tags und liefert die gleichen Peptidfragmentesignale, jedoch unterschiedliche für die Reporterionen. Die Intensität der Signale der Reporterionen ist proportional zu der Menge des Peptids in einer Probe. Anhand dieser Signale können die relativen Mengenunterschiede der Peptide, und somit auch der Proteine, zwischen den Proben bestimmt werden.

## 5.2 Das iTRAQ™-Massenspektrometrieexperiment



**Abb. 5-5: MS- und MS/MS-Proteinfragmentierung eines iTRAQ™-Experiments.**

Oben: Generelles Schema der Markierung von vier Proben (S1 – S4), Verdau, Mischung und anschließende MS- und MS/MS-Fragmentierung [Zieske 2006]. Unten: Exemplarisch sind die Reportersignale eines Peptids dargestellt.

Im Vergleich zu anderen Massenspektrometriemethoden für die Identifizierung von Unterschieden in der Proteinmenge zwischen mindestens zwei Proben, die auf dem Prinzip der Isotopenmarkierung beruhen, besitzt die iTRAQ™-Methode viele Vorteile. Am meisten bekannt ist die ICAT (*I*sotope *C*oded *A*ffinity *T*ags) Methode, bei der Cysteine mit einem leichten oder einem schweren Markierungsreagenz über eine thiolreaktive Gruppe markiert werden. Der größte Nachteil dieser Methode ist die Beschränkung auf Cysteine für die Markierung. Darüber hinaus können nur zwei verschiedene Proben markiert werden.

Eine weitere weit verbreitete Methode ist SILAC (*S*table *I*sotope *L*abelling by *A*mino *A*cids in *C*ell *C*ulture). Die Markierung erfolgt *in vivo* über den Einbau von isotopenmarkierten Aminosäuren in Proteine, indem nur eine oder mehrere essentielle isotopenmarkierte Aminosäuren zur Verfügung gestellt werden. Vorteile sind die hohe Effizienz der Markierung sowie die gute Vergleichbarkeit zweier Zelltypen oder Organismen, sofern beide unter identischen Bedingungen gewachsen sind. Jedoch ist diese Methode für komplexere Organismen sehr kostenintensiv und mit ihr können lediglich zwei Proben miteinander verglichen werden [Ross *et al.* 2004, Zieske 2006].

Die Vorteile der iTRAQ™-Methode sind vielfältig. Durch die Möglichkeit der Markierung auf Peptidebene ist eine sehr hohe Markierungseffizienz von über 97% [Ross *et al.* 2004] gewährleistet. Im Gegensatz zu anderen massenspektrometrischen Methoden zur Identifikation von differentiellen Proteinmengenunterschieden, werden bei der iTRAQ™-Methode alle Proteine mit einem *isobaric Tag* markiert, welcher zu einer gleichförmigen Massenverschiebung von allen Proteine führt. Ein und dasselbe Protein

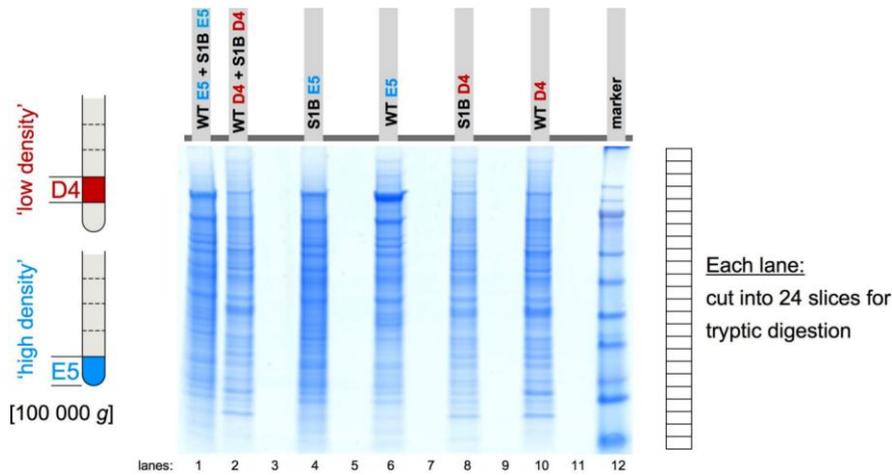
oder Peptid aus unterschiedlichen Proben besitzt folglich auch nach der Markierung dieselbe Masse und liefert somit nur ein Massensignal. Die Wahrscheinlichkeit Peptide oder Proteine mit einem geringen Mengenanteil in jeder Probe zu detektieren wird mit dieser Methode erhöht: Befindet sich die Peptide- oder Proteinmenge in einer Probe unterhalb der Detektionsgrenze, so erhöht sich durch die Summation von allen Mengen aus allen Proben die Wahrscheinlichkeit, dass die Summe aller Mengen über der Detektionsgrenze liegt. Bei der Markierung auf Peptidebene bietet sich der Vorteil, dass die Signalverhältnisse der Reporterionen über die Anzahl aller identifizierten Peptide eines Proteins gemittelt werden können, was deren Aussagekräftigkeit erhöht. Darüber hinaus ist diese Methode nicht auf den Vergleich von zwei Proben limitiert, da vier verschiedene Markierungsreagenzien zur Verfügung stehen. Auch posttranslatorische Modifikationen eines Proteins lassen sich mit dieser Methode identifizieren [Zieske 2006]. Einer der ausschlaggebenden Vorteile, der zur Wahl dieser Methode für die Fragestellung dieser Arbeit geführt hat, ist die Möglichkeit, Proben auf Protein- bzw. Peptidebene mit einer sehr hohen Effizienz zu markieren, da eine *in vivo* Markierung sehr kostenintensiv gewesen wäre und darüber hinaus die Markierung einer neuronalen Zellkultur zu artefaktanfällig ist.

### 5.2.1 iTRAQ™-Markierungen der Fraktionen D4 und E5

Für die Quantifizierung differentieller Unterschiede zwischen den Genotypen einer endosomalen Fraktion wurden zwei Markierungsreagenzien benötigt. Ein verbleibendes Markierungsreagenz wurde für eine Kontrolle verwendet. Durch coomassiegefärbte und silbergefärbte SDS-Gele konnte gezeigt werden, dass es sich bei den Fraktionen D4 und E5 um komplexe Proteinmischungen handelt, die zwischen den Fraktionen nicht aber zwischen den Genotypen deutliche Unterschiede aufweisen. (siehe 4.4). Zur Erhöhung der Auflösung der iTRAQ™-Massenspektrometrie wurden die Fraktionen zunächst über eine NuPAGE® Bis-Tris Gel aufgetrennt. Hierfür wurde jeweils dieselbe Gesamtproteinmenge jedes Genotyps der Fraktionen D4 und E5 geladen. Als Kontrolle wurden die Fraktionen beider Genotypen von D4 und E5 jeweils im Verhältnis 1:1 gemischt und geladen. Alle Spuren wurden in gleichgroße Banden aufgeteilt. In der Coomassiefärbung dieses Gels sind unterschiedliche Färbeintensitäten zu erkennen, was auf Gelartefakte zurückgeführt werden kann (vgl. Abb. 5-6). Für die unter 5.3 beschriebene Ermittlung von differentiell veränderten Proteinsignalen ist folglich für jede Bande eine Normierung auf die Proteine notwendig, die durch die AP-1/σ1B-Defizienz aller Wahrscheinlichkeit nach nicht verändert werden, für die jedoch ,hervorgerufen durch Gelartefakte und eine möglicherweise fehlerbehaftete Gesamtproteinkonzentration, eine scheinbare differentielle Veränderung angezeigt wird. Jede Spur wurde in 24

## 5.2 Das iTRAQ™-Massenspektrometrieexperiment

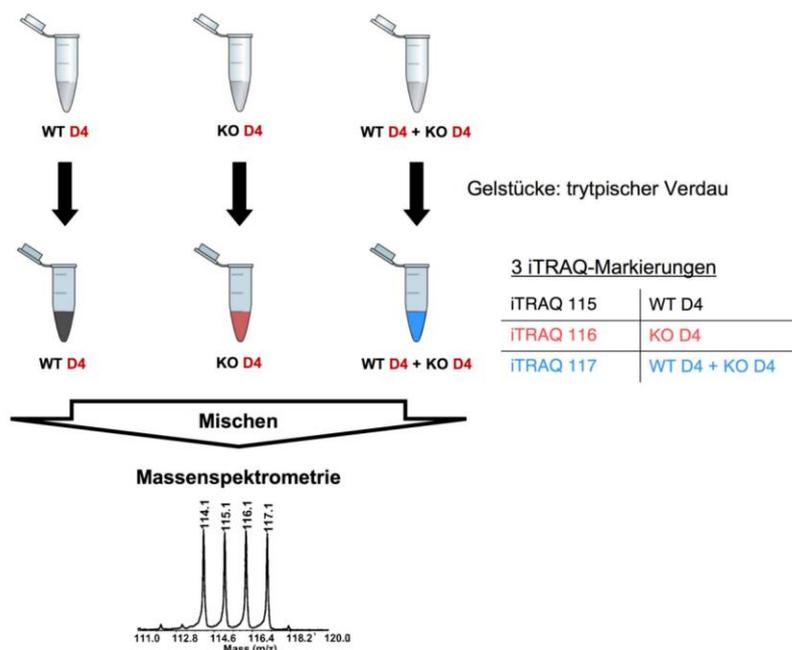
gleichgroße Stücke aufgeteilt und von jedem ein Trypsinverdau durchgeführt. Dabei wurden die Spuren des Gels so zerschnitten, dass jede Spur in dieselben Massenbereiche aufgetrennt wurde. Dies ist die Voraussetzung dafür, um differentielle Unterschiede der Menge eines Proteins zwischen den Genotypen identifizieren zu können. In Abb. 5-6 ist das coomassiegefärbte Gel gezeigt, von dem die iTRAQ™-Massenspektrometrie durchgeführt wurde.



**Abb. 5-6: NuPAGE® Bis-Tris Gel der Fraktionen D4 und E5.**

Rechts sind die 24 Sektionen dargestellt, in die jede Spur unterteilt wurde.

Nach dem Trypsinverdau wurden die Peptide jeden Verdaus separat markiert. Alle Peptide der WT-Fraktionen D4 sowie E5 wurden jeweils mit dem Markierungsreagenz 115 markiert und die der KO-Fraktionen mit dem Markierungsreagenz 116. Peptide der Kontrolle, Mischfraktionen aus WT und KO im Verhältnis 1:1 der Fraktionen D4 und E5, wurden mit dem Markierungsreagenz 117 markiert.



**Abb. 5-7: Verdau und iTRAQ™-Markierung eines Gelstückes.**

Symbolisch sind der Verdau und die Proteinmarkierung mit den iTRAQ™-Reagenzien eines Gelstückes der WT-, KO- und der Kontrollfraktion der Fraktion D4 dargestellt. Von jedem Gelstück wurden die markierten Proben vereinigt und eine iTRAQ™-Massenspektrometrie durchgeführt. (Spektrum aus [Ross et al. 2004])

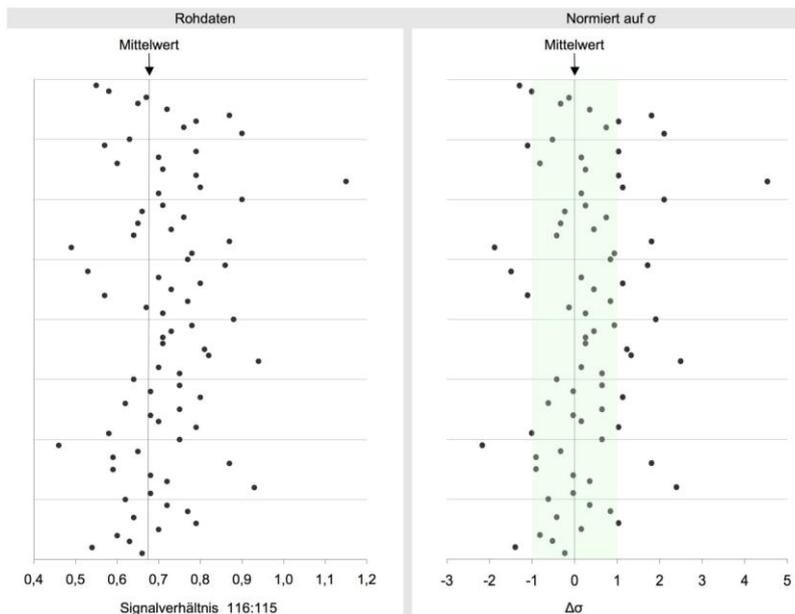
Für jeden der 24 Massenbereiche des SDS-Gels ergaben sich so drei unterschiedlich markierte Proben, welche für die späteren iTRAQ™-Massenspektrometriemessungen vereinigt wurden. Von jeder der Fraktionen D4 und E5 wurden folglich 24 dreifach markierte Proben erhalten, die getrennt voneinander gemessen wurden.

### 5.3 Identifizierung veränderter Signalverhältnisse

Jede der 24 markierten Proben der Fraktionen D4 und E5 wurde einzeln massenspektrometrisch gemessen. Zum Vergleich der differentiellen Unterschiede der Proteinmengen wurde das Signal des Markierungsreagenzes 116 (KO) auf das des Markierungsreagenzes 115 (WT) normiert. Idealerweise sollte das Verhältnis für unveränderte Proteine eins betragen. Aufgrund des milden Phänotyps der AP-1/σ1B-Defizienz ist es nicht zu erwarten, dass der überwiegende Anteil der detektierten Proteine differentiell verändert ist, sodass auch der Mittelwert aller Verhältnisse etwa bei eins liegen sollte. Die tatsächlichen Mittelwerte aller Messungen lagen jedoch im Bereich zwischen 0,09 und 8,26. Eine Ursache hierfür liegt sicherlich darin, dass nicht jede Spur der SDS-PAGE mit der exakt gleichen Gesamtproteinmenge beladen wurde, trotz einer aufwendigen Proteinbestimmung. Ein weiterer Grund könnte darin liegen, dass in den Proben der überwiegende Teil der Proteine differentiell verändert ist. Um die Ursache der Mittelwertsabweichung von eins zu überprüfen, wurden die Signalverhältnisse des Markie-

### 5.3 Identifizierung veränderter Signalverhältnisse

rungsreagenzes 116 (KO) zum Markierungsreagenzes 115 (WT) in einem Punktdiagramm dargestellt (Abb. 5-8 links). Wie zu erkennen ist, sind die Punkte gleichmäßig um den Mittelwert von 0,68 gestreut, sodass eine gleichmäßige differentielle Abnahme aller Proteine des KO ausgeschlossen werden kann. Die Abweichung des Mittelwerts von eins wird vermutlich auf eine ungleiche Gesamtproteinmenge beider Proben zurückzuführen sein. Um signifikante differentielle Unterschiede von Proteinmengen zu identifizieren, muss demzufolge die Abweichung der Signalverhältnisse vom Mittelwert und nicht von eins betrachtet werden, da eine Beladung mit Fraktionen mit unterschiedlicher Gesamtproteinmenge zu einer Abweichung von eins führt. Es wurden der Mittelwert und die Standardabweichung  $\sigma$  aller Signalverhältnisse gebildet und der Mittelwert als Nullwert gewählt. Um die Abweichung der Signalverhältnisse vom Mittelwert von allen 24 Proben miteinander vergleichen zu können, werden die Signalverhältnisse als Vielfache der Standardabweichung dargestellt. Als Maß, ob ein Protein verändert ist oder nicht, wurde die einfache Standardabweichung  $\sigma$  gewählt: Alle Veränderungen die im Bereich  $-\sigma < \text{Signalverhältnis} < +\sigma$  liegen, werden als nicht signifikant betrachtet. In Abb. 5-8 (rechts) ist dieses exemplarisch für den Massenbereich von 38 bis 42 kDa (Bande 13) der Fraktion D4 gezeigt.

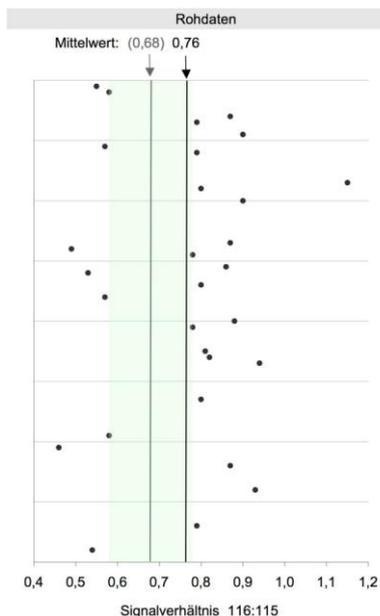


**Abb. 5-8: iTRAQ™-Proteinsignalverhältnisse 116:117 der Bande 13.**

Signalverhältnisse 116:115 der Proteine für den Massenbereich von 38 bis 42 kDa (Bande 13) der Fraktion D4. Rechts: Signalverhältnisse normiert auf die Standardabweichung  $\sigma$ . Hellgrün ist der Bereich  $-\sigma < \text{Signalverhältnis} < +\sigma$  hervorgehoben. Alle Abweichungen außerhalb dieses Bereiches werden als signifikant angesehen.

In den einzelnen Proben waren bis zu 30% aller Signalverhältnisse verändert. Wird der Mittelwert aller veränderter Signalverhältnisse dem der unveränderten einer Probe gegenübergestellt, so weichen beide nie mehr als eine Standardabweichung (aller Sig-

nalverhältnisse) voneinander ab. Der Mittelwert aller Signalverhältnisse kann folglich als Idealwert eines Proteins angesehen werden, welches zwischen den Genotypen nicht differentiell verändert ist. In Abb. 5-9 ist dies exemplarisch für den Massenbereich von 38 bis 42 kDa (Bande 13) der Fraktion D4 dargestellt.



**Abb. 5-9: Veränderte iTRAQ™-Proteinsignalverhältnisse 116:117 der Bande 13.**

Dargestellt sind alle veränderten Signalverhältnisse 116:115 der Proteine für den Massenbereich von 38 bis 42 kDa (Bande 13) der Fraktion D4. In Klammern ist der Mittelwert aller Signalverhältnisse und daneben der der veränderten Signalverhältnisse angegeben. In hellgrün ist die Standardabweichung aller Signalverhältnisse dargestellt.

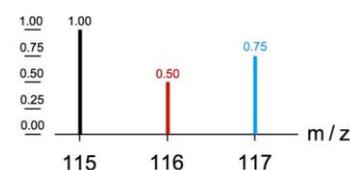
## 5.4 Verifizierung veränderter Signalverhältnisse

Veränderte Proteinsignale wurden anhand der Signale der Kontrolle auf ihre Signifikanz überprüft. Wie oben erläutert, besteht die Kontrolle aus einer 1:1 Mischung beider Genotypen der Fraktion D4 bzw. E5. Ist ein Protein differentiell verändert, so müsste die Änderung in der Kontrolle mit halber Intensität zu beobachten sein, was anhand des folgenden Beispiels erklärt werden soll:

- Gleiche Gesamtproteinmengen geladen
- Differentielle Unterschiede eines Proteins

$$\text{WT} = 1.00 \quad \text{S1B} = 0.50$$

Signale der iTRAQ-Markierungen:



Berechnung:

Signale für...			Σ
iTRAQ 115	WT D4	100% of 1.00	1.00
iTRAQ 116	S1B D4	100% of 0.50	0.50
iTRAQ 117	WT D4 + S1B D4	50% of 1.00 + 50% of 0.50	0.75

Aufgrund der ungleichen Gesamtproteinmengen der geladenen Fraktionen konnte die Kontrolle nicht auf diese Weise durchgeführt werden, sondern musste angepasst werden. Um von dem Einfluss ungleicher Gesamtproteinmengen unabhängig zu werden, wurde das Signalverhältnis von 115:117 bzw. 116:117 gebildet. Ist das auf die Standardabweichung normierten Signalverhältnis 116:115 (WT:KO) größer als +1, so muss das Signalverhältnis 115:117 kleiner und das von 116:117 größer als 1 sein. Bei einem auf die Standardabweichung normierte Signalverhältnis 116:115 (WT:KO) kleiner als -1 muss das Signalverhältnis 115:117 größer und das von 116:117 kleiner als 1 sein. Dies soll im Folgenden erläutert werden:

- der Signalwert von 115 sei 1, da auf 115 normiert wird
- 1. Signalverhältnis 116:115 > 1:
  - $117 = \frac{1}{2}(115 + 116)$
  - $115:117 = \frac{115}{\frac{1}{2}(115+116)} < 1$ , da  $116 > 1$  ist  $\frac{1}{2}(115 + 116) > 115$
  - $116:117 = \frac{116}{\frac{1}{2}(115+116)} > 1$ , da  $116 > 1$  ist  $\frac{1}{2}(115 + 116) < 116$
- 2. Signalverhältnis 116:115 < 1:
  - $115:117 = \frac{115}{\frac{1}{2}(115+116)} > 1$ , da  $116 < 1$  ist  $\frac{1}{2}(115 + 116) < 115$
  - $116:117 = \frac{116}{\frac{1}{2}(115+116)} < 1$ , da  $116 < 1$  ist  $\frac{1}{2}(115 + 116) > 116$

Auf diese Weise konnte sichergestellt werden, dass eine signifikante Veränderung des Signalverhältnisses von 116:115 nicht durch Fehler hervorgerufen worden ist, die während der Präparation und der Markierung aufgetreten sein könnten. Die veränderten Signale aller Proteine wurden mit dieser Kontrolle verifiziert und nur diese Proteine im Folgenden als verändert bezeichnet.

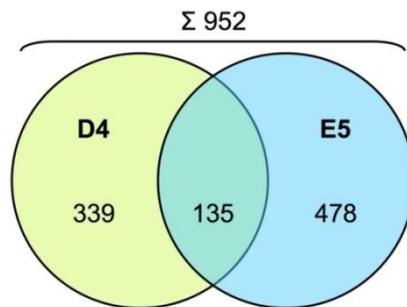
## 5.5 Beispiel zur Identifizierung und Verifizierung eines Proteins

Die Identifizierung und Verifizierung eines Proteins soll beispielhaft für das *Clathrin coat assembly protein* (AP 180) der Fraktion E5 detailliert beschrieben werden. Zunächst wurden aus den Rohdaten für alle 24 Gelstücke die Einträge für Keratinproteine entfernt, da es sich bei ihnen um Kontaminationen handelt. Anschließend wurden für jede Fraktion separat die Mittelwerte und Standardabweichungen der Signalverhältnisse 116:115, 115:117 und 116:117 gebildet, der Mittelwert von den Signalverhältnissen abgezogen und diese Daten für die spätere Auswertung zu dem massenspektrometrischen Datensatz von jedem Protein hinzugefügt. Das um den Mittelwert verringerte

Signalverhältnis 116:115 (KO:WT) wurde auf den Mittelwert normiert. Die Datensätze aller Proteine wurden in einer Tabelle zusammengeführt und nach Proteindatenbank-*Accession*-Nummer sortiert. Viele Proteine wurden, wie mit dieser empfindlichen Methode zu erwarten war, nicht ausschließlich in einer Bande identifiziert, sondern erstreckten sich über einen Bereich aneinander angrenzender Banden. Nun wurde anhand der Proteinmasse überprüft, ob ein Protein in einer Bande identifiziert wurde, in deren Massenbereich dieses zu erwarten war. Es wurden nur Proteine akzeptiert, die in einer Bande identifiziert wurden, in deren Massenbereich das Protein erwartet wurde. AP 180 wurde in den Banden 14 – 10 und 7, 6 identifiziert, was einem Massenbereich von 29 – 53 und 72 – 110 kDa entspricht. AP 180 besitzt eine kalkulierte Masse von 91,8 kDa und wurde somit der Bande 6 (80 – 110 kDa) zugewiesen, in der dieses Protein auch den höchsten Score von 334,5 aufweist. Dies zeigt an, dass sich hier auch die Hauptmenge des Proteins befindet. Zur Identifikation, ob ein Protein verändert ist, wurde überprüft, ob das auf den Mittelwert normierte Signalverhältnis von 116:115 größer als 1 oder kleiner als -1 ist. Für AP 180 beträgt es -2,44, was auf eine Veränderung hinweist. Zur Verifikation wurde überprüft, ob das Signalverhältnis von 115:117 größer und das von 116:117 kleiner als 1 ist. Dies ist für AP 180 mit 0,60 und -0,05 der Fall, sodass dieses Protein als verändert angesehen wurde. Anschließend wurde AP 180 der Proteingruppe „Vesikulärer Transport“ zugeordnet und der Tabelle aller identifizierten Proteine hinzugefügt. Auf diese Weise wurde mit allen weiteren Proteinen verfahren.

## 5.6 Ergebnisse der iTRAQ™-Massenspektrometrie

Mit der iTRAQ™-Massenspektrometrie wurde einerseits das Proteom der neuronalen, endosomalen Fraktionen D4 und E5 bestimmt und andererseits konnten mögliche differentielle Veränderungen der identifizierten Proteine festgestellt werden. In der Fraktion D4 wurden 516 und in der Fraktion E5 618 Proteine oder Proteinisoformen identifiziert. Von diesen Proteinen sind in D4 42 und in E5 5 identifiziert worden, die eine sehr hohe Homologie zu anderen Proteine dieser Fraktionen aufweisen und die bis heute nicht als eigene Isoformen angesehen werden. Die Gesamtproteinanzahl beider Fraktionen wurde jeweils um diese Proteine reduziert. In beiden Fraktionen wurden 135 identische Proteine identifiziert. Folglich befinden sich in der Fraktion D4 339 und der Fraktion E5 478 Proteine, die charakteristisch für die jeweilige Fraktion sind. Das Gesamtproteom beider Fraktionen umfasst 952 Proteine. Alle Proteine sind im Anhang in Tab. A-1 aufgelistet, entsprechend der Fraktion in der sie identifiziert wurden.



**Abb. 5-10: Summe der über die iTRAQ™-Experimente identifizierten Proteine.**

Dargestellt sind die Anzahl der Proteine oder Proteinisoformen, die in der Fraktion D4 (hellgrün), in der Fraktion E5 (hellblau) und in beiden Fraktionen (türkis) identifiziert wurden. 952 ist die Summe aller Proteine oder Proteinisoformen aus beiden Fraktionen. Abzüglich der 135 Proteine, die in beiden Fraktionen identifiziert wurden, verbleiben 817 Proteine, die charakteristisch für eine der beiden Fraktionen sind.

In der Fraktion D4 sind 111 (22%) und in der Fraktion E5 143 (23%) Proteine oder Proteinisoformen verändert (vgl. Anhang Abb. A-1). Von der überwiegenden Zahl dieser Proteine wurden zwei oder mehr Peptide identifiziert, die für die iTRAQ™-Signalberechnung verwendet wurden. Die iTRAQ™-Signale für ein Protein ergeben sich aus dem Mittelwert der Signale von allen identifizierten Peptiden eines Proteins. Mit einer Erhöhung der Anzahl an identifizierten Peptiden geht folglich eine Erhöhung der Signifikanz der iTRAQ™-Daten einher, da nur in dem Fall iTRAQ™-Daten für ein Protein bestimmt werden, wenn die Streuung aller Peptidsignale gering ist (vergleiche Angaben des Herstellers: Proteinscape 2.1, Bruker Daltonics GmbH, Bremen).

Die Funktionen von 44% der veränderten Proteine kann in einen direkten Zusammenhang mit dem endosomalen, vesikulären Transport gebracht werden, während für die übrigen von einem indirekten Einfluss ausgegangen werden muss. Biochemische Untersuchungen dieser beiden Fraktionen wiesen darauf hin, dass es sich bei ihnen um zwei unterschiedliche neuronale, endosomale Populationen handelt. Um diese genauer charakterisieren und um mögliche spezifische Einflüsse der AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz analysieren zu können, werden die Ergebnisse für beide Fraktionen später getrennt dargestellt.

### 5.6.1 Reinheit der neuronalen, endosomalen Fraktionen D4 und E5

In der Ausgangsfraktion, der Cortexfraktion, aus der die endosomalen Fraktionen D4 und E5 durch Zentrifugationen gewonnen wurden, betrug die Gesamtproteinmenge im Mittel 6,90 mg. Die Gesamtproteinmenge der Fraktionen D4 und E5 beträgt im Mittel 22 bzw. 57  $\mu$ g, was einen Anteil an der Gesamtproteinmenge der Cortexfraktion von 3,2 bzw. 8,3 ‰ entspricht. Die neuronalen, endosomalen Fraktionen besitzen folglich nur einen sehr geringen Anteil an der Proteinmenge der Cortexfraktion. Aufgrund ihrer

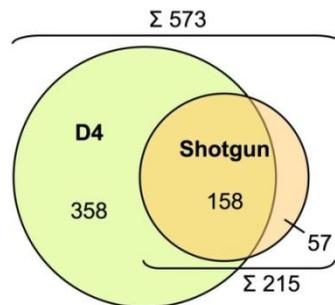
Komplexität und ihrer hohen Anzahl in einer Zelle, stellen Proteine von Mitochondrien sowie die von Organellen der Proteinbiosynthese (wie z. B. Ribosomen) einen hohen Anteil aller zellulären Proteine dar. Im Vergleich hierzu ist der Anteil von Proteinen des endosomalen, vesikulären Transports am Proteom einer Zelle weitaus geringer. Mitochondriale Proteine, Proteine des Energiestoffwechsels und solche der Proteinbiosynthese haben an der Fraktion D4 einen Anteil von 32% und der Fraktion E5 einen von 51%. Demgegenüber beträgt der Anteil von Proteinen des endosomalen, vesikulären Transports 47 bzw. 30%. Dies stellt eine deutliche Anreicherung von Proteinen des endosomalen, vesikulären Transports dar. Neben Proteinen dieser Gruppen wurden weitere Proteine identifiziert, die mit dem endosomalen, vesikulären Transport in Verbindung gebracht werden können: Hierbei handelt es sich um neuronale Proteine, die zum Teil direkt und zum Teil indirekt am vesikulären Transport beteiligt sind. Darüber hinaus wurden Proteine mit regulatorischen Funktionen, wie Kinasen und Phosphatasen, identifiziert.

### **5.6.2 Kontrolle der Vollständigkeit der Proteomanalyse**

Für die Identifizierung von Proteinen mit massenspektrometrischen Peptidanalysemethoden ist ein möglichst vollständiger Verdau aller Proteine einer Probe notwendig. Wie unter 5.2.1 beschrieben, wurden die Proteine der beiden Fraktionen zunächst SDS-solubilisiert, über ein Gel entsprechend ihrem molekularen Gewicht aufgetrennt und anschließend mit Trypsin verdaut. Auch wenn bei dieser etablierten Methode davon ausgegangen werden kann, dass der überwiegende Teil aller Proteine auf diese Weise massenspektrometrisch nachgewiesen werden kann [Schmidt und Urlaub 2009], wurde die Vollständigkeit mit einer unabhängigen massenspektrometrischen Methode überprüft. Hierzu wurde von der Fraktion D4 eine Shotgun-Analyse durchgeführt [Morgenthal *et al.* 2007, Reumann *et al.* 2007]. Bei dieser Methode wird ein zweistufiger Verdau durchgeführt: Zuerst werden die Proteine mit Harnstoff denaturiert und in dieser Form mit der Endoproteinase Lys-C verdaut. Die geringe Konzentration von Lys-C führt zu einem unvollständigen Verdau. Daraufhin werden diese vorfragmentierten Proteine mit Trypsin verdaut. Dieser zweistufige Verdau erhöht die Wahrscheinlichkeit des Verdau von Proteinen, die von Trypsin alleine nur schlecht verdaut werden. Die so für die Massenspektrometrie vorbereiteten Proteine wurden über eine Umkehrphasen-Flüssigkeitschromatographie (*Reversed-phase liquid chromatography*, RP-LC) in 1152 Fraktionen aufgetrennt. Da bei dieser Methode im Gegensatz zu der iTRAQ™-Methode keine Auftrennung der Protein über ein Gel stattfindet, ist die zu erwartende Anzahl an Proteinen, die mit dieser Methode identifiziert werden können, etwa um 50% geringer [persönliche Informationen, O. Jahn]. Um das mit der iTRAQ™-Methode iden-

tifizierte Proteom auf Vollständigkeit zu überprüfen, wurden die mit der Shotgun-Methode identifizierten Proteine mit den identifizierten Proteinen der iTRAQ™-Methode verglichen.

In der Shotgun-Analyse wurden 215 Proteine identifiziert, dies entspricht 41,5% der Proteine der iTRAQ™-Methode. Von den 215 Proteinen wurden 158 in beiden Methoden identifiziert und folglich wurden mit der Shotgun-Methode 57 neue Proteine identifiziert. Diese neu identifizierten Proteine haben am Proteom der Fraktion D4 (alle identifizierten Proteine aus beiden Methoden) einen Anteil von 10,0%.



**Abb. 5-11: Summe der identifizierten Proteine über iTRAQ™- und Shotgun-Experimente.**

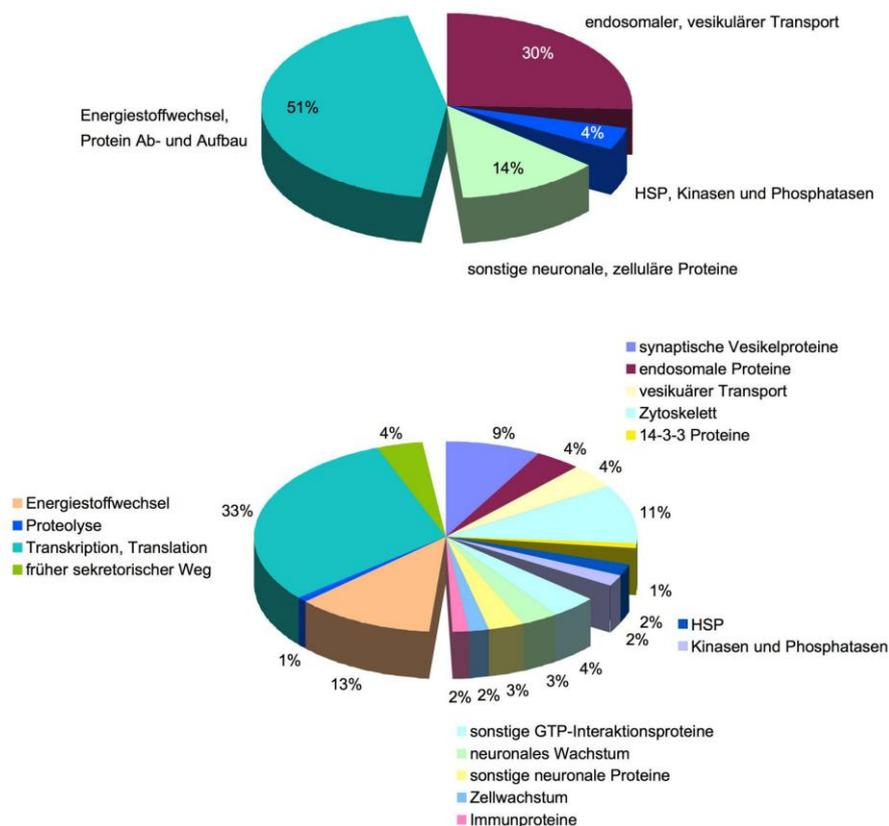
Dargestellt sind die Anzahl der Proteine oder Proteinisoformen, die in der Fraktion D4 mit der iTRAQ™-Methode (hellgrün) und der Shotgun-Methode (orange) identifiziert wurden. 158 Proteine wurden sowohl mit der iTRAQ™- als auch mit der Shotgun-Methode und 57 nur mit der Shotgun-Methode identifiziert. Insgesamt umfasst das Proteom der Fraktion D4 573 Proteine oder Proteinisoformen.

Unter den mit der Shotgun-Methode identifizierten Proteinen befanden sich keine, die einer neuen Proteingruppe zugeordnet werden konnten, also einer Gruppe an Proteinen, die nicht bereits aus der Analyse mit der iTRAQ™-Methode resultierte. Darüber hinaus befinden sich unter den neuen Proteinen keine funktionell neuen Proteine des endosomalen, vesikulären Transports. Bei ihnen handelt es sich hingegen um weitere Isoformen bereits mit der iTRAQ™-Methode identifizierter Proteine, sodass mit der Shotgun-Methode keine funktionell neuen Proteine identifiziert wurden. Mit 41,5% ist der Anteil der identifizierten Proteine im Vergleich zur iTRAQ™-Methode noch geringer als erwartet. Diese Resultate weist sehr stark auf eine umfassende Identifizierung des Proteoms der endosomalen, neuronalen Fraktionen mit der iTRAQ™-Methode hin.

## 5.7 Proteom der neuronalen, endosomalen Fraktionen E5

Die neuronale, endosomale Fraktion E5 stellt die gereinigte Fraktion mit Bestandteilen höherer Dichte dar, in der 618 unterschiedliche Proteine oder Proteinisoformen identifiziert wurden und von denen 143 (23%) verändert sind. Die identifizierten Proteine wurden zu vier Gruppen zusammengefasst, welche aus den weiter unten dargestellten funktionellen Gruppen bestehen. In Abb. 5-12 sind diese Gruppen sowie deren Anteil

an der identifizierten Gesamtproteinanzahl dieser Fraktion dargestellt (siehe Anhang Tab. A-1).



**Abb. 5-12: Zusammensetzung der neuronalen, endosomalen Fraktion E5.**

Oben: Aufteilung des Proteoms in Proteine des endosomalen, vesikulären Transports und Proteine, die nicht direkt an diesem beteiligt sind. Unten: Anteil einer Proteingruppe an der Gesamtproteinanzahl der Fraktion. Dargestellt sind alle Proteingruppen mit einem Anteil von mehr als 1%.

Anhand der Proteinzusammensetzung der Fraktion kann auf deren Reinheit geschlossen werden. Diese Fraktion scheint frei von Kontaminationen des Golgi-Apparats sowie des *trans*-Golgi-Netzwerks zu sein, da keine Strukturproteine dieser Organellen gefunden wurden. Proteine, die diesen Kompartimenten zugeordnet werden können, sind Bestandteile von Transportvesikeln, die mit dem Golgi-Apparat oder dem *trans*-Golgi-Netzwerk assoziiert sind (wie z. B. COP bzw. AP-1). Proteine, die am vesikulären Transport zwischen dem endoplasmatischen Retikulum und dem Golgi-Apparat beteiligt sind (Proteingruppe: früher sekretorischer Weg), stellen 4% aller identifizierten Proteine dar. Den größten Anteil haben mit 33% transkriptionelle und translationelle Proteine. Von Proteomanalysen von clathrinumhüllten Vesikeln (CCV) ist bekannt, dass diese Proteine in gereinigten CCV-Fractionen zu finden sind [McPherson 2010]. Aufgrund der ähnlichen Größe und Masse von RNA-Granulas haben Blondeau *et al.* postuliert, dass diese Strukturen mit CCVs kofraktionieren [Blondeau *et al.* 2004].

Eine weitere Gruppe von Proteinen, die nicht unmittelbar am endosomalen oder vesikulären Recycling beteiligt ist, stellen die Proteine des Energiestoffwechsels dar, zu denen vor allem metabolische Enzyme und mitochondriale Proteine gehören. Sie haben einen Anteil von 13% an der Fraktion E5. Aufgrund des sehr aktiven vesikulären Transports und Recyclings in der Präsynapse besitzen sie eine hohe Mitochondriendichte, welche die benötigte Energie zur Verfügung stellt [Zuber *et al.* 2005]. Einige metabolische Enzyme wie Aldolasen [Lu *et al.* 2001] und Phosphofruktokinase [Su *et al.* 2003] interagieren direkt mit der V-Typ-ATPase, die für die Azidifizierung von synaptischen Vesikeln und Endosomen notwendig ist. Eine Kofraktionierung dieser Proteine mit gereinigten CCVs ist bekannt [McPherson 2010] und kann in dieser Fraktion auf deren vermehrtes Auftreten und deren teilweise Interaktion mit endosomalen und vesikulären Kompartimenten zurückgeführt werden.

1% der identifizierten Proteine wurden der Proteingruppe Proteolyse zugeordnet, von denen keines verändert war.

Insgesamt beträgt der Anteil der Proteine des frühen sekretorischen Wegs, der transkriptionalen und translationalen Proteine, sowie der Proteine der Proteolyse 51% von allen identifizierten Proteinen dieser Fraktion. Sie wurden, wie in Abb. 5-12 zu sehen ist, zur Gruppe „Energiestoffwechsel, Proteinab- und Aufbau“ zusammengefasst.

Die Proteine, die möglicherweise indirekt am endosomalen und vesikulären Transport beteiligt sein könnten, sind sonstige neuronale, zelluläre Proteine sowie Hitzeschockproteine (*Heat Shock Proteins*, HSP), Kinasen und Phosphatasen. Ihr Anteil an der Gesamtproteinanzahl beträgt 14% bzw. 4%. Hierzu gehören die folgenden Proteingruppen:

Kinasen stellen 2% der Proteine der Fraktion E5 dar. Die Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Phosphoinositiden spielen eine zentrale Rolle in der Reifung von Endosomen. So ist die spezifische Phosphoinositidzusammensetzung ein Charakteristikum einer endosomalen Population [Huotari und Helenius 2011]. Außerdem werden viele Proteine, die am vesikulären Transport beteiligt sind, über Kinasen reguliert. Die verschiedenen Klassen von Hitzeschockproteinen unterscheiden sich sowohl in ihrer Struktur als auch ihrer Funktion. So fungieren einige von ihnen als Chaperone und wieder andere, wie HSP 70, sind am *Uncoating* der Clathrinhülle beteiligt. Ihr Anteil an der Gesamtproteinanzahl beträgt 2%.

Weitere Proteingruppen sind sonstige GTP-Interaktionsproteine, neuronale Wachstumsproteine, sonstige neuronale Proteine, Proteine des Zellwachstums und Immunproteine. Sie sind mit 4%, 3%, 3%, 2% bzw. 2% vertreten.

Proteine, die am endosomalen, vesikulären Transport beteiligt sind, stellen 30% aller Proteine dieser Fraktion dar. Den Hauptanteil hieran bilden Proteine des Zytoskelettes, synaptischer Vesikel, des vesikulären Transports und 14-3-3-Proteine mit 11%, 9%, 4% und 1%. Das Zytoskelett spielt eine zentrale Rolle für den vesikulären Transport: Vesikel und insbesondere synaptische Vesikel von Pools, die nicht unmittelbar exozytiert werden, sind mit dem Zytoskelett verankert. Diese Proteine wie  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin sowie Aktin wurden in Proteinanalysen von CCVs nachgewiesen [Blondeau *et al.* 2004]. Nach dem Vergleich aller identifizierter Proteine mit der Proteomanalyse synaptischer Vesikel von Takamori *et al.* konnten 51 Proteine synaptischer Vesikel identifiziert werden [Takamori *et al.* 2006]. 3% sind GTP-Interaktionsproteine (GTPasen oder am GTP-Austausch beteiligte Proteine) und ein Anteil von weniger als 1% sind Kanalproteine des  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Transports sowie des Transports von Neurotransmittern. Mitglieder dieser Proteingruppe spielen eine zentrale Rolle in der Aufnahme von Neurotransmittern in synaptische Vesikel und konnten im Proteom von CCVs bzw. synaptischen Vesikeln nachgewiesen werden.

Endosomale Proteine, denen auch Proteine des späten endolysosomalen Sortierungsweges zugeordnet wurden, stellen 4% aller Proteine dar. Sowohl das Proteom von CCVs [Blondeau *et al.* 2004] als auch von synaptischen Vesikeln [Takamori *et al.* 2006] zeigte keine signifikante Kofraktionierung von endosomalen Proteinen.

In Proteomanalysen von clathrinumhüllten Vesikeln und synaptischen Vesikeln war der Anteil endosomaler Proteine so gering, dass sie als Kontamination angesehen wurden. In der Fraktion E5 wurden 4% des Proteoms Proteinen des endosomalen Sortierungsweges zugeordnet und diese werden folglich als ein Bestandteil dieser Fraktion angesehen. Ferner konnte eine Vielzahl synaptischer Vesikelproteine eindeutig nachgewiesen werden. Neben dem Hinweis der biochemischen Ergebnisse bestätigen auch die Massenspektrometrieergebnisse die hohe Anreicherung einer neuronalen, endosomalen Fraktion. Der mit 52% scheinbar hohe Anteil an Proteinen, die nicht direkt am neuronalen, endosomalen Vesikelrecycling beteiligt sind, ist dadurch erklärbar, dass Organellen wie Mitochondrien, das endoplasmatische Retikulum und der Golgi-Apparat eine wesentlich komplexere Proteinzusammensetzung aufweisen als Organellen des endosomalen, vesikulären Transports. Einige wenige kontaminierende Organellen führen daher zu einer Vielzahl von unterschiedlichen Proteinen. In der Fraktion E5 wurden außer Proteinen des endosomalen Sortierungsweges keine Proteingruppen identifiziert, die nicht auch in Proteomanalysen von CCVs, und zum Teil von synaptischen Vesikeln, gefunden wurden. Da in erster Linie die Veränderungen, die durch die AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz am endosomalen, vesikulären Transportweg hervorgerufen wer-

den, in dieser Fraktion differentiell bestimmt werden sollten, wurde von weiteren Reinigungsschritten zur Erhöhung des Anteils von Proteinen dieses Transportweges abgesehen. Darüber hinaus bietet sich die Möglichkeit, den Einfluss der AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz auf Proteingruppen (wie z. B. transkriptorischer und translatorischer Proteine) zu untersuchen, die nicht direkt am neuronalen, endosomalen und vesikulären Sortierungsweg beteiligt sind. Anhand der iTRAQ™-Signale wurden alle Proteine dieser Fraktion auf differentielle Veränderungen hin untersucht.

### 5.7.1 Veränderungen von nicht endosomalen oder SV-Proteinen

Proteine der Gruppe des Energiestoffwechsels, Protein Ab- und Aufbau, welche vermutlich nicht direkt am neuronalen, endosomalen Recycling beteiligt sind, machen 51% der Fraktion E5 aus. Mit Hilfe der oben beschriebenen Auswertung der iTRAQ™-Signale wurden differentielle Unterschiede der Proteinmengen bestimmt. Insgesamt sind 21% dieser Proteine differentiell verändert.

Von den transkriptorischen und translatorischen Proteinen sind 27% differentiell verändert. In Abb. A-1 (siehe Anhang) ist die differentielle Abweichung jedes Proteins dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz eine Erhöhung der Proteinmenge von den meisten dieser veränderten Proteine hervorruft. Die Betrachtung aller ribosomalen Proteine zeigt, dass von ihnen mit 39% ein deutlich höherer Anteil verändert ist und die Proteinmenge von allen erhöht ist. Die Erhöhung dieser Proteine deutet auf eine gesteigerte Proteinbiosynthese in defizienten Neuronen hin.

Von den Proteinen des frühen sekretorischen Weges sind 4% verändert. Dies bestätigt die biochemischen Ergebnisse, in denen keine grundlegenden Veränderungen des Golgi-Apparates zu erkennen waren.

Von der Proteingruppe des Energiestoffwechsels sind 15% differentiell verändert und tendenziell sind die Proteinmengen differentiell leicht reduziert. Untersuchungen hinsichtlich des synaptischen Vesikelrecyclings in hippocampalen Neuronen haben gezeigt, dass die AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz das synaptische Vesikelrecycling negativ beeinträchtigt. Möglicherweise ruft dies in der Folge eine Reduzierung des Energiestoffwechsels hervor.

Für die proteolytischen Proteine sind keine Veränderungen zu erkennen, was darauf hinweist, dass die AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz in dieser Fraktion keinen erhöhten zytoplasmatischen Proteinabbau hervorruft.

Von den Proteinen, die möglicherweise am endosomalen, vesikulären Transport beteiligt sein könnten, sind von den Hitzeschockproteinen, Kinasen und Phosphatasen 28%

und von den Proteinen des Energiestoffwechsels, Protein Ab- und Aufbau 18% verändert.

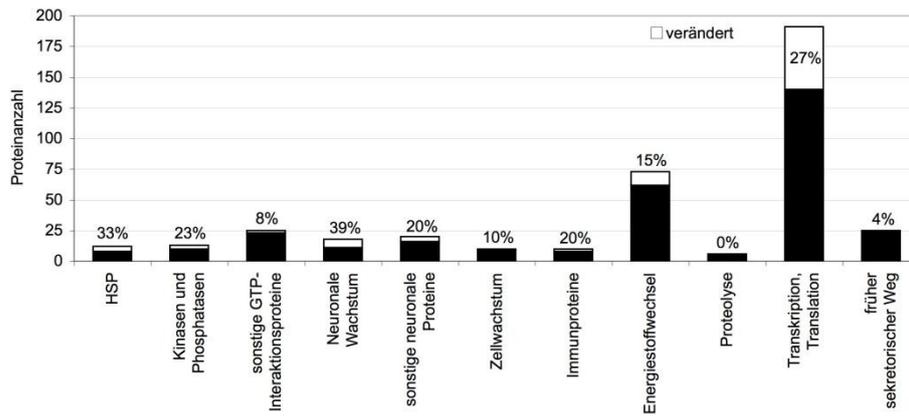
Mitglieder der Proteingruppe der Hitzeschockproteine, Kinasen und Phosphatasen sind in der Tendenz reduziert. Von den veränderten Proteinen sind alle, bis auf eines, reduziert. Proteine dieser Gruppe sind an einer Vielzahl von Transport- und Signalwegen beteiligt, sodass die Ursache für diese Veränderung in der Reduktion dieser Wege sowie der Reduktion des Energiestoffwechsels liegen könnte.

Mit 8% ist der Anteil der veränderten sonstigen GTP-Interaktionsproteine gering, was darauf hinweist, dass die AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz keine signifikanten Veränderungen für Mitglieder dieser Gruppe hervorruft.

Von den Mitgliedern der Proteingruppe neuronales Wachstum sind 39% verändert, von denen mit Ausnahme eines Proteins alle reduziert sind. Darüber hinaus ist für die übrigen Proteine ebenfalls eine tendenzielle Reduktion zu erkennen. Die Ausbildung neuer Synapsen sowie deren Stärke sind mit der Reizübertragungsintensität von Neuronen verknüpft [Cline und Haas 2008]. Ein beeinträchtigt synaptisches Vesikelrecycling könnte demzufolge einen Einfluss auf das Wachstum und somit auf dessen regulatorische Proteine haben. Die in dieser Fraktion beobachtete differentielle Reduktion der identifizierten neuronalen Wachstumsproteine könnte in der Tat auf eine reduzierte neuronale Plastizität hindeuten.

Auch sonstige neuronale Proteine sind tendenziell reduziert, wobei insgesamt 20% verändert sind. Deren Reduktion könnte auf eine negative Beeinflussung der neuronalen Plastizität hindeuten. So ist beispielsweise Hippocalcin am Recycling von AMPAR-Rezeptoren beteiligt, interagiert mit AP-2/ $\beta$ 2 und ist im Hippocampus lokalisiert [Palmer *et al.* 2005].

Von Proteinen des Zellwachstums sind 10% und von den Immunproteinen 20% verändert. Für beide Gruppen ist keine tendenzielle Veränderung zu erkennen. In Abb. 5-13 sind die Anzahl der identifizierten Proteine dieser Gruppen sowie der Anteil der veränderten Proteine dargestellt.



**Abb. 5-13: Proteingruppen der Fraktion E5, die nicht direkt am neuronalen, endosomalen Recycling beteiligt sind.**

Dargestellt ist die Gesamtanzahl der Mitglieder einer Proteingruppe sowie der prozentuale Anteil veränderter Proteine □.

### 5.7.2 Veränderungen von endosomalen oder SV-Proteinen

Von der Fraktion E5 konnten 30% der identifizierten Proteine dem endosomalen, vesikulären Transport zugeordnet werden. Zur Charakterisierung des möglichen spezifischen Einflusses der AP-1/σ1B-Defizienz auf einen Recyclingweg oder ein neuronales Kompartiment wurden diese in folgende funktionelle Gruppen eingeteilt:

- Synaptische Vesikelproteine
- Proteine des vesikulären Transports
  - synaptischer Vesikeltransport
  - Endo- und Exozytose synaptischer Vesikel
  - CCV/AP-1/2/3-uncoating
  - endosomales synaptisches Vesikelrecycling
  - V-ATPase
  - 14-3-3-Proteine
- Kleine GTPasen und verwandte Proteine
- Zytoskelett

Da viele der identifizierten Proteine funktionell nicht ausschließlich einer dieser Gruppen zugeordnet werden konnten, sind sie in mehrere Gruppen aufgenommen worden. Dem Proteom synaptischer Vesikel konnten 51 Proteine der Fraktion E5 zugeordnet werden [Takamori *et al.* 2006]. Von ihnen sind 31% verändert und alle bis auf ein Protein reduziert. Insgesamt ist zu erkennen, dass die Proteine synaptischer Vesikel auch tendenziell differentiell reduziert sind. Dies bestätigt die elektronenmikroskopischen Aufnahmen, in denen in defizienten Neuronen weniger synaptische Vesikel identifiziert wurden. Reduziert sind Proteine der V-ATPase, welche für die Azidifizierung synaptischer Vesikel notwendig sind, und die Proteine Arf 1 sowie Arf-GAP 1, welche bei

spielsweise an der AP-1-Membranrekrutierung beteiligt sind. Außerdem sind Rab 3a, b, c und Rabconnectin 3 reduziert, welche an der Exocytose synaptischer Vesikel beteiligt sind. Die Reduktion von Proteinen, die sowohl an der Entstehung als auch der Exocytose beteiligt sind, sind eine Bestätigung des beobachteten beeinträchtigten synaptischen Vesikelrecyclings und stellt einen weiteren biochemischen Hinweis auf ein verringerte Zahl synaptischer Vesikel dar. Darüber hinaus sind die Untereinheiten der CaMK-II (Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II)  $\alpha$  und  $\delta$  verändert. CaMK-II spielt bei der Langzeit-Potenzierung des Hippocampus eine wichtige Rolle und ist an der Ausbildung des räumlichen Gedächtnisses beteiligt [Pastalkova *et al.* 2006]. Dies könnte möglicherweise ein molekularer Hinweis für die Ursache des Phänotyps AP-1/ $\sigma$ 1B-defizienter Mäuse sein, die ein beeinträchtigtes räumliches Gedächtnis aufweisen.

97 Proteine des vesikulären Transports wurden identifiziert und von ihnen sind 38% verändert. Die Mehrheit von ihnen ist reduziert. Tendenziell sind alle Proteine des vesikulären Transports reduziert. Ihre Zusammensetzung weist darauf hin, dass es sich bei diesen Vesikeln vornehmlich um synaptische Vesikel handelt. Um festzustellen, ob die AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz auf einen bestimmten Teil, z. B. die Endo- oder die Exocytose, einen spezifischen Einfluss hat, wurden diese Proteine in die oben genannten Gruppen unterteilt. Von Proteinen der Endocytose, der Exocytose und Proteinen, die am Transport synaptischer Vesikel beteiligt sind, sind 30%, 25% bzw. 26% verändert und diese alle reduziert. Dies weist nicht auf einen spezifischen Einfluss der Defizienz hin, sondern zeigt, dass sie vermutlich eine Beeinträchtigung des gesamten SV-Recyclings hervorruft. Von Proteinen, die der Bildung und dem Uncoating von clathrinumhüllten Vesikeln zugeordnet wurden, sind 36% verändert. Diese sind alle reduziert, was einen weiteren Hinweis auf einen Defekt im Verlauf der Endocytose synaptischer Vesikel darstellt. Darüber hinaus deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass das vermehrte Auftreten von clathrinumhüllten Strukturen durch einen *Uncoating*-Defekt hervorgerufen werden könnte, was die elektronenmikroskopischen Beobachtungen unterstützt.

Dem endosomalen Recycling wurden 4% aller Proteine dieser Fraktion zugeordnet. Die gemeinsame Identifikation von Proteinen des Recyclings von synaptischen Vesikeln sowie von Proteinen früher Endosomen deutet auf eine Beteiligung von frühen endosomalen Strukturen am Recycling von synaptischen Vesikeln hin. Von Proteinen, die an diesem Recyclingweg beteiligt sein könnten, sind 34% verändert und diese reduziert. Bei ihnen handelt es sich jedoch nicht um Proteine früher Endosomen, sondern um solche, die am endosomalen vesikulären Transport beteiligt sein könnten. Die identifizierten Proteine früher Endosomen, EEA 1 und Rab 5 (a, c), sind nicht signifikant

verändert. Dies steht bezüglich EEA 1 im Widerspruch zu den Western-Blot-Quantifizierungen dieser Fraktion (vgl. 4.3.1) und könnte möglicherweise auf einen unvollständigen Verdau oder eine in der iTRAQ™-Quantifizierung zu gering bestimmte differentielle Veränderung von EEA 1 zurückzuführen sein (vgl. 5.9). Möglicherweise stellen frühe Endosomen an dieser Fraktion nicht den Hauptanteil aller endosomalen Populationen dar, was darauf hinweisen könnte, dass in dieser Fraktion weitere verwandte Kompartimente, wie beispielsweise späte Endosomen oder vielleicht auch *Dense-Core-Vesicles* (DSC), vorhanden sind. Eine geringe EEA 1-Menge würde die Quantifizierung von diesem differentiellen Unterschied durch die iTRAQ™-Methode erschweren.

Von der V-ATPase, die für die Azidifizierung von synaptischen Vesikeln und Endosomen notwendig ist, wurden acht Untereinheiten der V1- und zwei der VO-Domäne gefunden. 50% dieser Untereinheiten sind verändert und sind im Mittel reduziert. Für das Recycling synaptischer Vesikel ist deren schnelle Azidifizierung essentiell [Budzinski *et al.* 2011]. Da im Mittel pro synaptischem Vesikel nur ein bis zwei V-ATPasen vorhanden sind [Takamori *et al.* 2006], wäre durch deren Reduktion auf synaptischen Vesikeln ein deutlicherer Einfluss zu erwarten. Die Reduktion der V-ATPase könnte ein Hinweis auf eine der Ursachen des beeinträchtigten synaptischen Vesikelrecyclings in hippocampalen Neuronen sein.

Die Isoformen von 14-3-3-Proteinen, die in dieser Fraktion identifiziert wurden, sind alle verändert, jedoch konnten die Veränderungen von zwei Isoformen nicht durch die Kontrollen bestätigt werden. Bis auf 14-3-3  $\beta/\alpha$  sind alle reduziert. Für diese Proteingruppe wurde eine Vielzahl von regulatorischen Funktionen beschrieben, u. a. spielen sie eine entscheidende Rolle in neurodegenerativen Krankheiten [Sluchanko und Gusev 2010] und es konnte eine Beteiligung am synaptischen Vesikelrecycling gezeigt werden [Deery *et al.* 2009]. Deren überwiegende Reduktion stellt einen Hinweis auf deren Beteiligung am synaptischen Vesikelrecycling dar, an dem der AP-1/ $\sigma$ 1B-Komplex beteiligt ist.

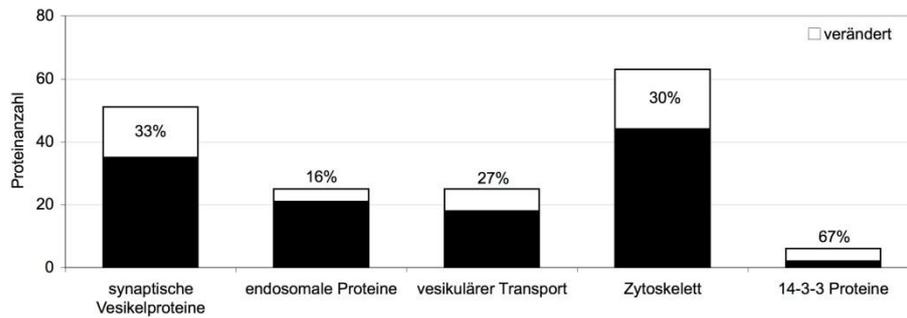
Von kleinen GTPasen und verwandten Proteinen sind 18% verändert. Im Mittel sind die Proteine dieser Gruppe reduziert. Eine negative Veränderung ist für die an der Exozytose synaptischer Vesikel beteiligten Proteine Rab 3 (a, b, c) und Rab 10 zu erkennen und stellt einen weiteren Hinweis des Einflusses der AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz auf das synaptische Vesikelrecycling dar.

In der Elektronenmikroskopie sowie durch biochemische Untersuchungen wurde eine Veränderung des späten endosomalen Abbauweges festgestellt. Lediglich 12% der Proteine, die diesem und weiteren Proteinabbauwegen zugeordnet werden können,

sind verändert. Dies weist neben den biochemischen Ergebnissen darauf hin, dass es in der Fraktion E5 zu keiner grundlegenden differentiellen Veränderung dieses Protein-sortierungsweges kommt.

Der Transport und das Recycling synaptischer Vesikel findet unter der Beteiligung des Zytoskelettes statt. Synaptische Vesikel, die nicht unmittelbar für die Exocytose vorgesehen sind, befinden sich in Speicherpools, in denen die synaptischen Vesikel mit dem Zytoskelett verankert sind. Proteine des Zytoskelettes wurden in zwei Gruppen unterteilt, Proteine des Neurofilaments und von Mikrotubuli. Von ersteren sind 19% und von letzteren sind 52% der Proteine verändert. Eine einheitliche Hoch- oder Runterregulation ist nicht zu erkennen. Auffällig ist, dass Aktin- und Tubulinproteine durchweg reduziert sind. In Proteomanalysen von CCVs [Blondeau *et al.* 2004] und synaptischen Vesikeln [Takamori *et al.* 2006] wurden sowohl Aktine als auch Tubuline identifiziert und als Bestandteil der entsprechenden Vesikel betrachtet. Während des Recyclings synaptischer Vesikel interagieren diese mit dem Zytoskelett und synaptische Vesikel, die nach ihrer Endozytose nicht wieder direkt exozytiert werden, verbleiben mit dem Aktinzytoskelett verankert. Die in dieser Fraktion beobachtete Reduktion von Aktin- und Tubulinproteinen könnte auf eine verringerte Anzahl synaptischer Vesikel zurückzuführen sein, da durch die Reduktion letzterer die Anzahl an Zytoskelettproteinen reduziert würde, die sich auf ihnen befinden. Darüber hinaus ist auch eine höhere Mobilität von SV möglich, was für die Fraktion D4 später noch ausführlich diskutiert wird (vgl. 5.8.2). Die Reduktion der Aktin- und Tubulinproteine könnte darüber hinaus auch durch eine geringere Anzahl von nicht filamentösen Zytoskelettproteinen hervorgerufen werden, was auf eine Reduktion des Zytoskelettes hindeuten könnte. Filamentöse Proteine des Zytoskelettes, die nicht mit Organellen und Vesikeln verbunden sind, können in dieser Fraktion als Kontamination angesehen werden, da der Hauptbestandteil des Zytoskelettes in vorangegangenen Fraktionierungsschritten abgetrennt wurde. Bei einer Reduktion des Zytoskelettes wäre jedoch vermutlich ein deutlich ausgeprägter Phänotyp zu erwarten, da dieses eine zentrale Rolle bei einer Vielzahl von Transportwegen spielt.

Folglich unterstützt die Reduktion von Aktin- und Tubulinproteinen die Beobachtungen einer verringerten Anzahl synaptischer Vesikel. In Abb. 5-14 sind alle Proteingruppen und der Anteil an veränderten Proteinen dargestellt, die vermutlich direkt am neuronalen, endosomalen Recycling beteiligt sind.



**Abb. 5-14: Proteingruppen der Fraktion E5, die möglicherweise direkt am neuronalen, endosomalen Recycling beteiligt sind.**

Dargestellt ist die Gesamtanzahl der Mitglieder einer Proteingruppe sowie der prozentuale Anteil veränderter Proteine □.

In der Fraktion E5 ist durch die AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz eine Reduktion der überwiegenden Zahl von veränderten Proteinen zu erkennen. Die Reduktion von Proteinen, die auf synaptischen Vesikeln lokalisiert und die am synaptischen Vesikelrecycling beteiligt sind, bestätigt die Beobachtungen eines beeinträchtigten synaptischen Vesikelrecyclings. Im Gegensatz zu Proteomanalysen von CCVs und synaptischen Vesikeln wurden frühe endosomale Proteine identifiziert, von denen die des endosomalen Transports zum Teil verändert sind. Dies ist ein Hinweis auf eine Beteiligung endosomaler Strukturen am synaptischen Vesikelrecycling. Die Erhöhung von transkriptionalen und translatorischen Proteinen könnte eine Antwort auf die zelluläre Stresssituation sein, die durch die AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz hervorgerufen wird.

### 5.8 Proteom der neuronalen, endosomalen Fraktionen D4

Die neuronale, endosomale Fraktion D4 ist aus der Reinigung der Fraktion D hervorgegangen und besteht im Vergleich zur Fraktion E5 aus Bestandteilen geringerer Dichte. Sie setzt sich aus 516 Proteinen oder Proteinisoformen zusammen, von denen 111 (22%) verändert sind. Analog zur Fraktion E5 wurden die identifizierten Proteine zu vier Gruppen, die sich aus den darunter dargestellten funktionellen Gruppen zusammensetzen, zusammengefasst. In Abb. 5-15 sind diese funktionellen Gruppen sowie deren Anteil an der identifizierten Gesamtproteinanzahl dieser Fraktion dargestellt (siehe auch Anhang Tab. A-1).



### 5.8.1 Veränderungen von nicht endosomalen oder SV-Proteinen

32% der Proteine dieser Fraktion sind vermutlich nicht direkt am neuronalen, endosomalen Recycling beteiligt und wurden der Gruppe des Energiestoffwechsels, Protein Ab- und Aufbau, zugeordnet von denen insgesamt 20% verändert sind. Von den Proteinen der Untergruppe des Energiestoffwechsels sind 10% verändert und deren Proteinmenge ist differentiell erhöht. Insgesamt kann für diese Proteingruppe keine Veränderung festgestellt werden.

Von transkriptionalen und translatorischen Proteinen sind 29% verändert und deren Proteinmenge ist differentiell erhöht. Wie bereits in der Fraktion E5 zu erkennen war, sind vor allem ribosomale Proteine verändert, was die Hypothese einer gesteigerten Proteinbiosynthese in defizienten Neuronen untermauert.

Die Veränderungen von Proteinen des frühen sekretorischen Weges sind gleichmäßig um den Mittelwert verteilt und von dieser Gruppe sind 19% verändert. Dies ist eine zusätzliche Bestätigung der biochemischen Ergebnisse, dass die AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz zu keinen strukturellen Veränderungen dieser Organellen führt.

Proteine der Proteolyse sind zu 67% differentiell verändert und erhöht. Auch die übrigen Proteine dieser Gruppe sind tendenziell erhöht. Dieser Anstieg könnte einen Hinweis auf den erhöhten Abbau möglicherweise fehlsortierter Proteine sein.

Proteine der Gruppen sonstige neuronale, zelluläre Proteine und Hitzeschockproteine, Kinasen und Phosphatasen beinhalten die funktionellen Gruppen an Proteinen, die möglicherweise indirekt am endosomalen und vesikulären Transport beteiligt sein könnten. Im Gegensatz zur Fraktion E5 wurden sie um die Gruppe sonstige Kanal- und Transportproteine erweitert, da ihr Anteil an der Gesamtproteinzahl über 1% liegt.

Von Hitzeschockproteinen, Kinasen und Phosphatasen sind 18% verändert. Es handelt sich hierbei um HSP 90 $\alpha$  und HSP 90 $\beta$ , von denen beide erhöht sind. Insgesamt ist für diese Proteingruppe tendenziell keine Veränderung zu erkennen.

Neben den Kanal- und Transportproteinen, die direkt am synaptischen Vesikelrecycling beteiligt sind, wurden Untereinheiten von ATP-verbrauchenden Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-Pumpen, anionenselektive mitochondriale Kanalproteine und ATP-Synthasen identifiziert. Von ihnen sind 23% verändert, jedoch ist keine Tendenz der Veränderung zu erkennen.

Sonstige GTP-Interaktionsproteine sind nur zu einem geringen Anteil von 10% verändert, was darauf hinweist, dass die AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz auch in dieser Fraktion keine signifikanten Veränderungen für Mitglieder dieser Gruppe hervorruft.

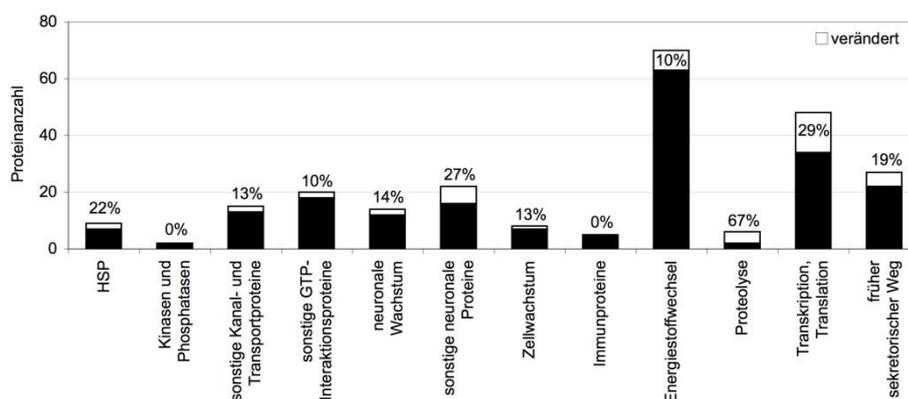
Von Proteinen, die an der Regulation des neuronalen Wachstums beteiligt sind, sind 14% verändert. Es wurden insgesamt lediglich 14 Proteine dieser Gruppe identifiziert,

sodass aufgrund dieser geringen Zahl nicht zwangsläufig auf das neuronale Wachstum im Ganzen geschlossen werden kann.

27% der sonstigen neuronalen Proteine sind verändert. Von ihnen weisen die Myelinproteine die größten Veränderungen auf. Myelin ist ein sehr häufiges Protein des Gehirns und umgibt die axonalen Bereiche. 67% der identifizierten Proteine sind verändert und insgesamt sind diese differentiell reduziert. Dies deutet neben den neuronalen Veränderungen auch auf Veränderungen in Gliazellen hin. In Proteomanalysen von CCVs wurden ebenfalls Myelinproteine gefunden [Blondeau *et al.* 2004], welche als Kontamination eingestuft wurden. Die differentielle Bestimmung der Proteinmenge wäre in diesem Fall nicht zwangsläufig aussagekräftig.

Von den Zellwachstumsproteinen sind 13% und von den Immunproteinen sind keine verändert. Für beide Proteingruppen ist keine Tendenz der Veränderung zu erkennen. Insgesamt beträgt ihr Anteil an der Fraktion D4 2% und sie können daher als Kontamination betrachtet werden.

In Abb. 5-16 sind die Anzahl und der Anteil der veränderten nicht endosomalen oder synaptischen Vesikelproteine dargestellt.



**Abb. 5-16: Proteingruppen der Fraktion D4, die nicht direkt am neuronalen, endosomalen Recycling beteiligt sind.**

Dargestellt ist die Gesamtanzahl der Mitglieder einer Proteingruppe sowie der prozentuale Anteil veränderter Proteine □.

### 5.8.2 Veränderungen von endosomalen oder SV-Proteinen

47% der identifizierten Proteine der Fraktion D4 sind am endosomalen, vesikulären Transport beteiligt. Um den Einfluss der AP-1/σ1B-Defizienz zu charakterisieren, wurde analog zur Fraktion E5 eine Einteilung in funktionelle Gruppen vorgenommen. Da viele der identifizierten Proteine funktionell nicht ausschließlich einer dieser Gruppen zugeordnet werden konnten, sind sie in mehrere Gruppen aufgenommen worden.

Das Proteom dieser Fraktion wurde mit dem von synaptischen Vesikeln verglichen [Takamori *et al.* 2006]. Von den 105 Proteinen, die Takamori *et al.* dem SV Proteom

zugeordnet haben, wurden 88 Proteine auch in der D4 Fraktion identifiziert. Proteine, die von Takamori *et al.* als Bestandteil synaptischer Vesikel angesehen wurden und die nach neueren Erkenntnissen diesen wahrscheinlich nicht zugeordnet werden können, sind hier nicht als Proteine synaptischer Vesikel gewertet worden [Tribl *et al.* 2008, Pavlos und Jahn 2010, Volkmandt und Karas 2012]. Der Anteil an veränderten Proteinen liegt bei 42%, von denen, bis auf drei, alle reduziert sind. Dies ist eine weitere Bestätigung des beeinträchtigten synaptischen Vesikelrecyclings sowie der beobachteten Reduktion von synaptischen Vesikeln. Neben der V-ATPase sind vor allem Proteine, die die Exozytose synaptischer Vesikel vermitteln, wie Synaptotagmin 1, 2 und 12, und solche, die an der Auffüllung mit Neurotransmittern beteiligt sind, wie VGlut 1 und dem GABA-Transporter, reduziert. Diese Veränderungen deuten darauf hin, dass in dieser neuronalen Fraktion in erster Linie Kompartimente des synaptischen Vesikelrecyclings verändert sind. Die nicht signifikanten Erhöhungen von Dynamin und dem Endophilin-3-interagierenden Protein (SGIP1) sowie die signifikante Erhöhung von AP-2 deuten alle auf Verzögerungen im endozytotischen Weg hin. Neben den iTRAQ™-Ergebnissen weisen das vermehrte Auftreten von clathrinumhüllten Strukturen sowie die erhöhte Zahl endosomaler Strukturen auf einen Recyclingdefekt in AP-1/σ1B-defizienten Neuronen hin.

Um einen möglicherweise spezifischen Einfluss der AP-1/σ1B-Defizienz auf einen Teil des synaptischen Vesikelrecyclings zu bestimmen, wurden die Proteine des vesikulären Transports folgenden Gruppen zugewiesen:

- synaptischer Vesikeltransport
- Endozytose synaptischer Vesikel
- CCV/AP-1/2/3-uncoating
- endosomales synaptisches Vesikelrecycling
- V-ATPase
- Exozytose synaptischer Vesikel
- 14-3-3-Proteine

Insgesamt wurden 100 Proteine identifiziert, die dem vesikulären Transport zugeordnet werden konnten. Von ihnen sind 36 % verändert und sie sind im Mittel reduziert.

Von Proteinen des synaptischen vesikulären Transports sind 45% verändert. Der überwiegende Teil (82%) von ihnen ist reduziert.

Proteine der Endozytose sind zu 28% verändert. Für diese Proteingruppe ist insgesamt keine einheitliche Tendenz einer Veränderung zu erkennen. Wie oben bereits erwähnt, liefern die Ergebnisse einen Hinweis auf eine gesteigerte AP-2 vermittelte Endozytose. An die Endozytose clathrinumhüllter Vesikel schließt sich deren Abstreifung der Hülle

(*uncoating*) an, woran die hier identifizierten Proteine Hsc 70 und Auxilin beteiligt sind. Für beide Proteine ist eine Reduktion zu erkennen, wobei sie aber nur für Auxilin signifikant ist. Die in der Elektronenmikroskopie beobachtete erhöhte Anzahl clathrinumhüllter Strukturen könnte folglich auf ein beeinträchtigtes *uncoating* dieser Strukturen in defizienten Neuronen zurückzuführen sein.

An die Endozytose synaptischer Vesikel und die Wiederherstellung ihrer Membranproteinzusammensetzung schließt sich die Wiederbeladung mit Neurotransmittern an. Glyvuk *et al.* konnten eine endosomale Beteiligung hieran, zumindest für bestimmte synaptische Vesikel-Pools, zeigen. 3% der Proteine dieser Fraktion sind endosomale Proteine. Zusammen mit denen, die an einem endosomalen vesikulären Recycling beteiligt sein könnten, stellen sie 7% des Proteoms dar, von denen 47% verändert sind. Insgesamt ist eine Reduktion dieser Proteine zu erkennen, welche überwiegend von Proteinen des vesikulären Transports hervorgerufen wird. Es wurden vier Proteine identifiziert, die auf frühen endosomalen Strukturen lokalisiert sind. Hierbei handelt es sich um Rab 4, Rab 5, Rab 31 und EEA 1. Während die Proteinmengen von Rab 5, Rab 31 signifikant und die von Rab 4 nicht signifikant reduziert sind, ist der frühe endosomale Marker EEA 1 erhöht.

Einen weiteren Hinweis auf eine Beeinträchtigung des synaptischen Vesikelrecyclings stellen die veränderten Proteinmengen der V-ATPase dar, die für die Azidifizierung von synaptischen Vesikeln und Endosomen notwendig ist. Es wurden 12 von 22 Untereinheiten [Miranda *et al.* 2010] identifiziert, von denen 58% signifikant und die übrigen nicht signifikant reduziert sind.

14-3-3-Proteine stellen eine weitere Proteingruppe dar, die an einer Vielzahl von Transportprozessen und möglicherweise auch am synaptischen Vesikelrecycling [Deery *et al.* 2009] beteiligt ist. Für diese Proteingruppe konnten keine Veränderungen festgestellt werden, was nicht auf deren direkte Beteiligung am synaptischen Vesikelrecycling in dieser Fraktion hinweist, an dem der AP-1/ $\sigma$ 1B-Komplex beteiligt ist.

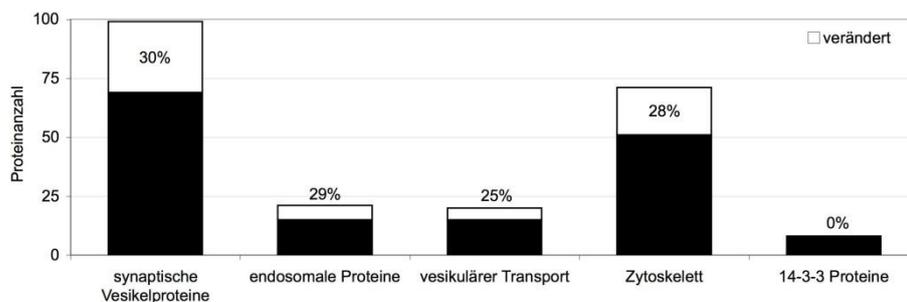
Von den kleinen GTPasen und verwandten Proteinen sind 24% verändert und sie sind alle reduziert. Bis auf Rab 2, welches u. a. an der Phagosomenbildung und am Transportweg zwischen dem endoplasmatischen Retikulum und dem Golgi-Apparat beteiligt ist, können alle veränderten GTPasen dem synaptischen Vesikeltransport (Rab 10 und Rabphilin 3) oder dem frühen endosomalen Sortierungsweg (Rab5, Rab 14 und Rab 31) zugeordnet werden. Dies unterstützt die Vermutung, dass der AP-1/ $\sigma$ 1B-Komplex vor allem an neuronalen, endosomalen Vesikelrecycling beteiligt ist.

Von Proteinen des degradativen Sortierungsweges sind 43% verändert, wobei sie im Mittel differentiell erhöht sind. Anhand der Proteine des späten, endo-lysosomalen Ab-

bauweges (Syntaxin 12, Vamp 3, Sorting Nexin 3, Rab 7 und Vamp 3) kann auf keine Veränderung geschlossen werden. Nur Vamp 3 ist verändert und erhöht. Von der Proteingruppe des Abbauweges sind vor allem Mitglieder der Proteinqualitätskontrolle erhöht. Dies könnte einen Hinweis auf den erhöhten Abbau möglicherweise fehlsortierter Proteine darstellen.

Zytoskelettsproteine wurden zu Proteingruppen des Neurofilaments und von Mikrotubuli zusammengefasst, da diese Zytoskelettstrukturen einen unterschiedlichen Einfluss auf den Transport und die Endo- und Exocytose synaptischer Vesikel besitzen. 22% bzw. 26% dieser Proteine sind verändert, wobei für keine Gruppe dieser Proteine eine einheitliche Tendenz der Veränderung zu erkennen ist. Im Vergleich zum Proteom der Fraktion E5 wurden in der Fraktion D4 etwa nur halb so viele Aktin-Proteine identifiziert. Während diese in der Fraktion E5 reduziert sind, ist in der Fraktion D4 keine Veränderung zu erkennen. Die Anzahl der Tubulinproteine ist in beiden Fraktionen etwa gleich, jedoch ist im Gegensatz zur Fraktion E5 hier keine Veränderung zu erkennen. Ein geringerer Anteil an Aktin-Proteinen am Proteom der Fraktion D4 könnte auf eine Population von synaptischen Vesikeln hinweisen, die weniger mit dem Aktin-Zytoskelett verbunden sind. Dies wiederum könnte ein Hinweis auf eine erhöhte Mobilität der Restvesikelpopulation defizienter Synapsen sein, welche aktiver am Recycling beteiligt ist als die synaptische Vesikelpopulation der Fraktion E5.

In Abb. 5-17 sind alle Proteingruppen und der Anteil an veränderten Proteinen dargestellt, die vermutlich direkt am neuronalen, endosomalen Transport beteiligt sind.



**Abb. 5-17: Proteingruppen der Fraktion D4, die möglicherweise direkt am neuronalen, endosomalen Transport beteiligt sind.**

Dargestellt ist die Gesamtanzahl der Mitglieder einer Proteingruppe sowie der prozentuale Anteil veränderter Proteine □.

## 5.9 Rab-Proteine als Marker endosomaler Populationen

Die iTRAQ™-Massenspektrometrie der Fraktionen D4 und E5 lieferte keine Informationen zu mehreren Proteinen des frühen endosomalen Sortierungsweges, welche zuvor durch Western-Blots in diesen Fraktionen nachgewiesen worden waren. Hierbei han-

delt es sich um Rabex 5 sowie die Mitglieder des SNARE-Komplexes früher Endosomen: Syntaxin 6, Syntaxin 13 und Vti1a.

Diese endosomalen Markerproteine sind periphere Membranproteine. Bei ihnen besteht die erhöhte Gefahr, dass der Aufreinigungsprozess der Fraktionen D4 und E5 zu einer zumindest teilweisen Ablösung dieser Proteine von deren Membran und folglich zu deren Abreicherung in den Membranfraktionen führt. EEA 1, das Markerprotein für frühe Endosomen, konnte in Western-Blot-Quantifizierungen in allen Membranfraktionen eindeutig nachgewiesen werden. So wiesen auch Western-Blots der Fraktionen D4 und E5 nicht auf eine Abreicherung von EEA 1 hin. Mit steigendem Anteil eines Proteins an einer Probe geht im Allgemeinen in der Massenspektrometrie eine Zunahme der Sequenzabdeckung einher, sodass diese ein grobes Maß für den Anteil eines Proteins an einer Probe darstellt. In der iTRAQ™-Massenspektrometrie wurde EEA 1 jedoch nur mit einer Sequenzabdeckung von 6% bzw. 3% in den Fraktionen D4 und E5 identifiziert, was eine Diskrepanz zu den Western-Blot-Quantifizierungen darstellt. Eine mögliche Ursache hierfür könnte in der Probenaufarbeitung von Proteinen mit einem hohen Molekulargewicht für diese iTRAQ™-Massenspektrometrie liegen. Das Gel zur Auftrennung der Proben trennte vor allem den molekularen Massenbereich über 100 kDa nur wenig auf. Daraus resultierte eine erhöhte Proteinmenge in den Gelstücken dieses Massenbereiches und führt wahrscheinlich zu einer unvollständigen Verdauung einiger dieser Proteine. Auch in der Shotgun-Methode war keine signifikant höhere Sequenzabdeckung von endosomalen Proteinen mit einer Masse über 100 kDa zu erkennen. Möglicherweise könnte dieses Problem durch eine Auftrennung der Proben über zwei Gele mit unterschiedlichen Vernetzungsgraden, die den Massenbereich über bzw. unter 100 kDa auftrennen, und die anschließende Zusammenführung beider Ergebnisse minimiert werden. Folglich könnte die Identifizierung von einigen Proteinen mit einem Molekulargewicht von etwa mehr als 100 kDa sowie von einigen peripheren Membranproteinen in der iTRAQ™-Massenspektrometrie durch eine Optimierung der Probenaufarbeitung vermutlich erhöht werden.

Rabex 5 ist der GTP-Austauschfaktor (*guanine nucleotide exchange factor*, GEF) von Rab 5. Die aktivierte, GTP-gebundene Form von Rab 5 rekrutiert den Komplex der Kinasen hVps 34/hVps 15 an die Membran früher Endosomen. Dieser Komplex ist für die Bildung von PI-3-P essentiell [Schu *et al.* 1993, Stack und Emr 1994, Christoforidis *et al.* 1999, Jovic *et al.* 2010] und sollte somit ebenfalls Bestandteil einer endosomalen Fraktion sein.

Mori *et al.* haben die Lokalisierung der Rab-Proteine 1 bis 43 in hippocampalen Neuronen untersucht [Mori *et al.* 2012]. Sie konnten zeigen, dass etwa ein Drittel der Rab-Proteine spezifisch in axonalen oder dendritischen Kompartimenten lokalisiert sind.

Über einen Vergleich der mit der iTRAQ™-Massenspektrometrie identifizierten Rab-Proteine mit den Ergebnissen von Mori *et al.* kann möglicherweise auf den axonalen oder dendritischen Anteil der Fraktionen D4 und E5 geschlossen werden.

Um sicherzustellen, dass endosomale Proteine sowie Rab-Proteine aus den oben genannten Gründen nicht nur aufgrund der Quantifizierungsmethode der iTRAQ™-Massenspektrometrie nicht detektiert wurden, wurden die Massenspektrometriedaten gegen eine eigene Datenbank mit endosomalen Proteinen und Rab-Proteinen durchgeführt (Tab. 5-1). Zur Erhöhung der Identifizierungssensitivität wurde hierbei auf die Identifizierung der iTRAQ™-Signale dieser Proteine verzichtet.

**Tab. 5-1: Proteineinträge der endosomalen/Rab-Datenbank.**

hVps 34	Rab 9A	Rab 27A
hVps 15	Rab 10	Rab 28
AP-1 $\gamma$ 1	Rab 11A	Rab 29
AP-1 $\gamma$ 2	Rab 12	Rab 30
AP-1 $\sigma$ 1A	Rab 13	Rab 32
Sgsm 3	Rab 14	Rab 33A
Rabex 5	Rab 15	Rab 34
Syntaxin 6	Rab 17	Rab 35
EEA 1	Rab 18	Rab 36
Rab 1A	Rab 19	Rab 37
Rab 2A	Rab 20	Rab 38
Rab 3A	Rab 21	Rab 39A
Rab 4A	Rab 22B	Rab 40B
Rab 5A	Rab 23	Rab 41
Rab 6A	Rab 24	Rab 42
Rab 7A	Rab 25	Rab 43
Rab 8A	Rab 26	

Dieser Datenbankvergleich zeigte, dass in den Fraktionen D4 und E5 einige weitere Proteine vorhanden sind, die bei der iTRAQ™-Quantifizierung nicht identifiziert wurden. In beiden Fraktionen wurden zusätzlich die frühen endosomalen Proteine hVps 34 und deren regulatorische Untereinheit hVps 15 sowie Rabex 5 identifiziert. Syntaxin 6 konnte in der Fraktion E5 identifiziert werden. Aufgrund zu geringer Signalintensitäten waren für diese Proteine keine iTRAQ™-Quantifizierungen möglich. Die Identifizierung dieser frühen endosomalen Proteine bestätigt, dass es sich bei den Fraktionen D4 und E5 um neuronale, frühe endosomale Fraktionen handelt.

Neben den oben diskutierten Problemen der Aufarbeitung von endosomalen Proteinen könnten die geringen Sequenzabdeckungen sowie die Schwierigkeit der Quantifizierung von frühen endosomalen Proteinen darüber hinaus folgende Ursache haben: Die Zahl überwiegend mit frühen Endosomen assoziierten Proteinen sowie deren Kopiezahlen sind im Vergleich zu Proteinen anderer Kompartimente, wie z. B. dem Pool sy-

naptischer Vesikel oder der Mitochondrien, gering. In den Fraktionen D4 und E5 wurden Proteine des endosomalen SNARE-Komplexes durch Western-Blot-Quantifizierungen nur mit geringer Intensität identifiziert. Sowohl die iTRAQ™-Quantifizierung als auch der Abgleich gegen die endosomal/Rab-Datenbank lieferten, bis auf Syntaxin 6 in der Fraktion E5, keinen Hinweis auf Mitglieder dieses SNARE-Komplexes, was auf einen sehr geringen Anteil von ihnen an den Fraktionen hinweist oder durch einen unvollständigen Trypsinverdau hervorgerufen wurde.

Durch den Abgleich der iTRAQ™-Massenspektrometriedaten gegen die endosomale/Rab-Datenbank konnten im Vergleich zur iTRAQ™-Quantifizierung weitere Rab-Proteine identifiziert werden. In Tab. 5-2 sind alle Rab-Proteine aufgelistet, die in den Fraktionen D4 und E5 identifiziert wurden.

**Tab. 5-2: Identifizierte Rab-Proteine in den Fraktionen D4 und E5 und deren Lokalisierung nach Mori *et al.***

Rab-Proteine, die weder axonal noch dentritisch lokalisiert sind, sind mit N. D. (not detectable) gekennzeichnet.

D4	E5	Lokalisierung (Mori <i>et al.</i> )
Rab 1A	Rab 1A	axonal und dentritisch
Rab 2A	Rab 2A	N. D.
Rab 3A	Rab 3A	axonal
Rab 4A	Rab 4A	axonal und dentritisch
Rab 5A	Rab 5A	axonal und dentritisch
Rab 6A	Rab 6A	axonal und dentritisch
Rab 7A	Rab 7A	axonal und dentritisch
Rab 9A	Rab 9A	axonal und dentritisch
Rab 10	Rab 10	axonal und dentritisch
Rab 11A	Rab 11A	axonal und dentritisch
---	Rab 12	axonal und dentritisch
---	Rab 13	N. D.
Rab 14	Rab 14	axonal und dentritisch
Rab 15	---	axonal
Rab 17	---	dentritisch
Rab 18	---	axonal
---	Rab 19	axonal und dentritisch
Rab 21	---	axonal und dentritisch
Rab 22B	Rab 22B	N. D.
---	Rab 23	axonal
---	Rab 24	N. D.
Rab 25	---	axonal und dentritisch
---	Rab 26	axonal und dentritisch
Rab 27A	Rab 27A	axonal
---	Rab 28	N. D.
Rab 29	Rab 29	axonal
Rab 33A	Rab 33A	axonal und dentritisch
Rab 34	---	axonal
Rab 35	Rab 35	axonal und dentritisch

## 5.9 Rab-Proteine als Marker endosomaler Populationen

D4	E5	Lokalisierung (Mori <i>et al.</i> )
---	Rab 36	axonal
---	Rab 37	axonal und dentritisch
Rab 39A	Rab 39A	axonal
Rab 40B	---	N. D.
---	Rab 43	axonal und dentritisch

Mori *et al.* haben gezeigt, dass 21 der Rab-Proteine hippocampaler Neuronen sowohl axonal als auch dentritisch lokalisiert sind: Sieben konnten nicht detektiert werden und zwölf sind nur axonal lokalisiert und eines (Rab 17) ist ausschließlich dentritisch zu finden [Mori *et al.* 2012]. In den Fraktionen D4 und E5 wurden 24 Rab-Proteine identifiziert, die sowohl axonal als auch dentritisch lokalisiert sind bzw. in hippocampalen Neuronen nicht detektierbar waren. Neun der Rab-Proteinen sind axonal oder dentritisch lokalisiert. Aufgrund dieser Verteilung der Rab-Proteine kann keine eindeutige Aussage über eine axonale oder dentritische Zuordnung der Fraktionen getroffen werden.

Rab-Proteine können als Marker für bestimmte endosomale Populationen verwendet werden. Während 17 der Rab-Proteine der endosomal/Rab-Datenbank in den Fraktionen D4 und E5 identifiziert wurden, wurden sieben ausschließlich in der Fraktion D4 und zehn ausschließlich in der Fraktion E5 identifiziert. Rab-Proteine, die in beiden Fraktionen identifiziert wurden, sind neben dem vesikulären Transport zwischen dem Golgi-Apparat und dem Endoplasmatischen Retikulum sowie dem vesikulären Transport sekretorischer Vesikel vor allem am frühen und späten endosomalen Transport beteiligt. Spezifische Rab-Proteine der Fraktion D4 sind überwiegend an frühen Endosomen bzw. Recyclingendosomen lokalisiert. Im Unterschied dazu sind die spezifischen Rab-Proteine der Fraktion E5 vor allem an späten Endosomen sowie dem Transport des endolysosomalen Weges beteiligt. In Tab. 5-3 sind alle massenspektrometrisch identifizierten Rab-Proteine und deren neuronale Funktionen, entsprechend der Fraktion, in der sie identifiziert wurden, aufgelistet.

**Tab. 5-3: Funktionen der in den Fraktionen D4 und E5 massenspektrometrisch identifizierten Rab-Proteine der endosomal/Rab-Datenbank.**

<b>D4 &amp; E5</b>	<b>Funktion</b>	<b>Referenz</b>
Rab 1A	Neuritwachstum, ER zu Golgi Transport	Maier <i>et al.</i> 2009, Stenmark 2009
Rab 2A	neuronale Zelladhäsion und Neuritwachstum, Golgi zu ER Transport, Phagosomenbildung	Ng und Tang 2008, Stenmark 2009, Thi und Reiner 2012
Rab 3A	Exozytose synaptischer Vesikel	Stenmark 2009
Rab 4A	frühe Endosomen	Huotari and Helenius 2011
Rab 5A	frühe Endosomen	Huotari and Helenius 2011
Rab 6A	endosomale Sortierung und axonaler retrograder Transport	Ng und Tang 2008
Rab 7A	späte Endosomen	Stenmark 2009
Rab 9A	späte Endosomen zu TGN Transport	Stenmark 2009
Rab 10	Glut 4 Vesikel Transport	Stenmark 2009
Rab 11A	Recyclingendosomen, späte Endosomen	Stenmark 2009, Huotari and Helenius 2011
Rab 14	Glut 4-Vesikel Transport, intermediäre Endosomen zwischen frühen und späten	Stenmark 2009, Linford <i>et al.</i> 2012
Rab 22B	TGN, früher endosomaler Transport	Stenmark 2009
Rab 27A	Fusion später Endosomen mit der Plasmamembran	Huotari and Helenius 2011
Rab 29	---	Stenmark 2009
Rab 33A	(Synaptisches Vesikel-Proteom)	Takamori <i>et al.</i> 2006
Rab 35	Recyclingendosomen	Stenmark 2009
Rab 39A	Phagosomen-Azidifizierung	Seto <i>et al.</i> 2011
<b>D4</b>	<b>Funktion</b>	<b>Referenz</b>
Rab 15	frühe Endosomen zu Recyclingendosomen Transport, apicaler Recyclingendosomen zu Plasmamembrantransport	Stenmark 2009
Rab 17	apicaler Recyclingendosomen zu Plasmamembrantransport, Dendritwachstum	Stenmark 2009, Mori <i>et al.</i> 2012
Rab 18	sekretorische Granulas, negative Regulation der Sekretion	Matsui <i>et al.</i> 2011
Rab 21	frühe Endosomen, Integrinendozytose	Stenmark 2009
Rab 25	apicaler Recyclingendosomen zu Plasmamembrantransport	Stenmark 2009
Rab 34	Micropinocytose	Stenmark 2009
Rab 40B	Wnt Signalweg (u. a. Zielfindung der Axone, axon guidance)	Hollis and Zou 2012, Lee <i>et al.</i> 2007

<b>E5</b>	<b>Funktion</b>	<b>Referenz</b>
Rab 12	Recyclingendosomen zu Lysosomen Transport	Matsui <i>et al.</i> 2011
Rab 13	Neuritwachstum	Ng und Tang 2008
Rab 19	Golgi-Transport	Sinka <i>et al.</i> 2008
Rab 23	Cilium/ZNS-Entwicklung	Stenmark 2009
Rab 24	Autophagosomen	Stenmark 2009
Rab 26	späte Endosomen, Exozytose	Sinka <i>et al.</i> 2008
Rab 28	interagiert mit dem ESCRT- und Retromer-Transport	Lumb <i>et al.</i> 2011
Rab 36	assoziiert mit späten Endosomen und Lysosomen, nicht mit frühen Endosomen	Chen <i>et al.</i> 2010b
Rab 37	Exozytose, Transport sekretorischer Vesikel	Masudaa <i>et al.</i> 2000, Mori <i>et al.</i> 2011
Rab 43	retrograder Transport von der Endozytose zum Golgi	Haas <i>et al.</i> 2007

Neben einer weiteren Unterstützung der Hinweise darauf, dass es sich bei den Fraktionen D4 und E5 um endosomale Fraktionen handelt, liefern diese Ergebnisse ein detaillierteres Bild der Zusammensetzung beider Fraktionen. In der Fraktion D4 sind vor allem frühe Endosomen sowie Proteine des endosomal, exocytotischen Wegs und Proteine sekretorischer Granulas angereichert. In der Fraktion E5 sind neben frühen endosomal Populationen, welche ebenfalls in der Fraktion D4 vorhanden sind, Proteine später Endosomen, des endolysosomal Weges, des degradativen Weges und sekretorischer Granulas angereichert. Dies liefert einen Hinweis darauf, dass in der Fraktion D4 endosomale Populationen vor allem des frühen endosomal Recycling und in der Fraktion E5 endosomale Populationen des späten endosomal und degradativen Transportes vermehrt angereichert sind.

## 5.10 Hinweise auf eine endosomale Beteiligung am SV-Recycling

Die iTRAQ™-Analyse der beiden Fraktionen des endosomal, vesikulären Transports D4 und E5 lieferte ein detailliertes Bild der Proteinveränderungen, welche durch die AP-1/σ1B-Defizienz hervorgerufen werden. Trotz der geringen Zahl von Proteinen (14,2%), die in beiden Fraktionen gleichzeitig identifiziert wurden, konnte eine Reihe von übereinstimmenden Beobachtungen gemacht werden. Diese betreffen vor allem neuronale Funktionen, die nicht direkt mit dem endosomal, vesikulären Transport in Verbindung stehen.

Der deutliche Anstieg von ribosomalen Proteinen im defizienten Gewebe deutet auf eine gesteigerte Biosynthese hin, welche eine neuronale Antwort auf das beeinträchtigte SV-Recycling sein könnte. In der Fraktion E5 sind deutlich mehr Proteine der Pro-

teinbiosynthese identifiziert worden. Möglicherweise ist die Konzentration von kofraktionierenden RNA-Granulas [Blondeau *et al.* 2004] in dieser Fraktion am höchsten. Veränderungen des Energiestoffwechsels sind nur in der Fraktion E5 ausgeprägt und könnten mit einem reduzierten Energiebedarf in Folge des beeinträchtigten SV-Recyclings in Zusammenhang stehen. Die Reduktion neuronaler Wachstumsproteine könnte die Folge einer reduzierten neuronalen Signalübertragung sein [Cline und Haas 2008], in deren Folge es auch zu einer Veränderung von Gliazellen kommt. Hier kann jedoch auch ein direkter Einfluss der AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz auf diese Zellen nicht ausgeschlossen werden. Kein feststellbarer Einfluss ist den iTRAQ™-Ergebnissen zufolge auf den frühen sekretorischen Weg zu erkennen, was durch die Western-Blot Untersuchungen und den milden Phänotyp unterstützt wird. Darüber hinaus sind ebenfalls die sonstigen GTP-Interaktionsproteine unverändert.

Den Hauptbestandteil von Proteinen des vesikulären Transports bilden SV Proteine. Mitglieder sowohl der Exozytose als auch des Recyclingwegs sind mehrheitlich reduziert, was stark auf eine Beeinträchtigung des gesamten SV Zykluses hindeutet und eine Bestätigung der mikroskopischen Daten darstellt, die eine Reduktion der Anzahl von SV sowie eine Beeinträchtigung deren Recyclings gezeigt haben [Glyvuk *et al.* 2010]. Die Reduktion von V-ATPasen könnte eine Folge der geringeren Anzahl an SV sein. Eine reduzierte Anzahl der identifizierten Aktinproteine in der Fraktion E5 könnte auf eine mobilere SV Population hinweisen, die weniger mit dem Zytoskelett in Verbindung steht und auf diese Weise einen Teil des Recyclingdefekts kompensiert. Auf unterschiedliche SV Populationen in beiden Fraktionen deuten u. a. die voneinander abweichenden Veränderungen von Aktinen und Tubulinen hin. Von der Gruppe der kleinen GTPasen sind Rab-Proteine (z. B. Rab5, Rab 14 und Rab 31) reduziert, die an einem endosomalen Recyclingweg beteiligt sind. Dies unterstützt die vorangegangenen Hinweise auf eine Beteiligung des AP-1/ $\sigma$ 1B-Komplexes am SV-Recycling und durch endosomale Strukturen. Keine grundlegenden Veränderungen von späten endosomalen Proteinen könnten auf eine Beschränkung der Beteiligung des AP-1/ $\sigma$ 1B-Komplexes auf die Proteinsortierung durch frühe endosomale Populationen hinweisen. Veränderungen früher endosomaler Proteine sind überwiegend in der Fraktion D4 identifiziert worden, was einen Hinweis auf unterschiedliche endosomale Populationen in beiden Fraktionen darstellt. Möglicherweise handelt es sich bei denen in der Fraktion E5 um späte endosomale Populationen. Diese Vermutung wurde durch eine gezielte Identifizierung von Rab-Proteinen, welche hier als Marker endosomaler Kompartimente dienen (vgl. 5.9), unterstützt. Einen weiteren Hinweis auf unterschiedliche vesikuläre Populationen stellen die fraktionsspezifischen Veränderungen von 14-3-3-Proteinen dar.

Bei den Fraktionen D4 und E5 handelt es sich den Ergebnissen zufolge um verschiedene endosomale Populationen. Aufgrund der unterschiedlichen Dichte beider Fraktionen werden diese im Folgenden auch als leichte endosomale Fraktion (*light density endosomal fraction*, ldE) bzw. schwere endosomale Fraktion (*hight density endosomal fraction*, hdE) bezeichnet.

Mit Hilfe der iTRAQ™-Quantifizierungen konnte gezeigt werden, dass die Fraktionen D4 und E5 reich an SV Proteinen sowie Proteinen des vesikulären synaptischen Transports sind. Während diese Proteine präsynaptisch lokalisiert sind, konnten nur sehr wenige, fünf in der Fraktion D4 und acht in Fraktion E5, identifiziert werden, die für die Postsynapse charakteristisch sind. Dies weist sehr stark darauf hin, dass es sich bei den Fraktionen D4 und E5 um präsynaptische Fraktionen handelt und folglich die endosomalen Veränderungen in diesen Fraktionen präsynaptischen Ursprungs sind.

### **5.11 WB-Verifikation von iTRAQ™-Ergebnissen**

Die Ergebnisse der iTRAQ™-Quantifizierungen der endosomalen Fraktionen D4 (hdE) und E5 (ldE) beziehen sich auf die Präparation eines Cortex je Genotyp. Zur Überprüfung der differentiellen Veränderungen von Proteinmengen, die durch die iTRAQ™-Methode identifiziert und anhand von internen Kontrollen als signifikant erachtet wurden, sollten diese durch eine unabhängige Methode in weiteren Individuen analysiert werden. Hierzu wurden Western-Blot (WB) Quantifizierungen von ausgewählten Proteinen unterschiedlicher Proteingruppen durchgeführt. Es wurden die differentiellen Mengen von Proteinen bestimmt, die der iTRAQ™-Analyse zufolge verändert und vermutlich direkt am endosomalen, vesikulären Transport beteiligt sind. Da nicht für all diese Proteine Antikörper verfügbar waren bzw. einige der verfügbaren Antikörper Proteine nicht spezifisch erkannten, konnten die differentiellen Veränderungen der Proteinmengen nur von etwa zwei Dritteln dieser Proteine überprüft werden. Die Überprüfung der differentiellen Proteinveränderungen wurde für 41 Proteine durchgeführt. Theoretisch hätten für diese Proteine 82 Veränderungen in der hdE und ldE überprüft werden können. Da jedoch nicht für jedes Protein für die ldE und die hdE signifikante iTRAQ™- und Western-Blot-Daten zur Verfügung stehen, die eine differentielle Veränderung anzeigen, konnten insgesamt nur 46 Veränderungen überprüft werden, die zunächst durch die iTRAQ™-Quantifizierung angezeigt wurden. Die Western-Blot-Quantifizierungen wurden von unabhängigen Gradientenpräparationen durchgeführt. Aufgrund der sehr geringen Gesamtproteinmengen in den Fraktionen D4 und E5 wurden die Quantifizierungen aus den nicht weiter aufgereinigten Fraktionen D und E durchgeführt. Zur Überprüfung einer möglichen An- bzw. Abreicherung in Synaptosomen im Vergleich zum Cortex sowie für die Identifizierung von spezifischen Verände-

rungen in den Fraktionen des endosomalen, vesikulären Transports D4 und E5, wurden darüber hinaus die differentiellen Proteinmengen im Cortex sowie in Synaptosomen ermittelt.

### **5.11.1 Korrelation von iTRAQ™ und WB-Quantifizierungen**

Für die Validierung der differentiellen Veränderungen von Proteinmengen, die durch die iTRAQ™-Methode identifiziert wurden, wurden die Western-Blot-Quantifizierungen in Form von Boxplot-Diagrammen dargestellt und nach funktionellen Proteingruppen geordnet. Diese funktionellen Gruppen wurden um die Proteine erweitert, für die Western-Blot-Quantifizierungen durchgeführt wurden, jedoch keine iTRAQ™-Daten zur Verfügung stehen. Die Validierung der iTRAQ™-Resultate erfolgte anhand der folgenden drei Kriterien: 1) Bestätigung der differentiellen Proteinmengenveränderung, die durch die iTRAQ™-Methode angezeigt wird. 2) Eine Validierung ist aufgrund einer unsignifikanten Tendenz der Western-Blot-Signale bezüglich einer differentiellen Proteinveränderung nicht möglich. 3) Die Tendenz der Western-Blot-Signale ist bezüglich einer differentiellen Proteinmengenveränderung konträr zu der des iTRAQ™-Experiments.

Nachfolgend sind die Boxplot-Diagramme der Western-Blot-Quantifizierungen dargestellt und in jedem Diagramm ist der jeweilige Validierungsstatus der iTRAQ™-Quantifizierung angegeben.

## 5.11 WB-Verifikation von iTRAQ™-Ergebnissen

### Proteine des CCV-Transports:

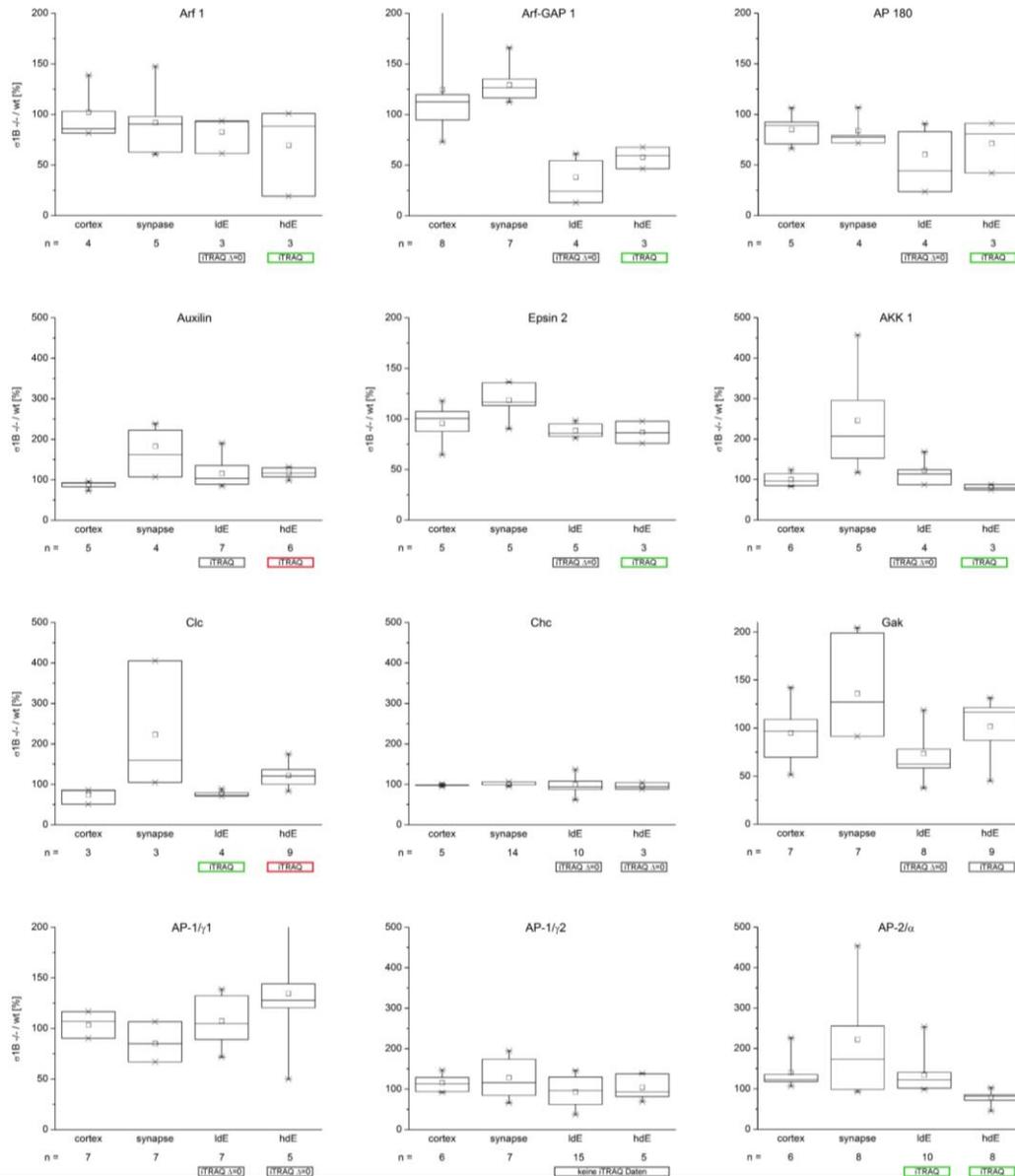
#### Legende:

##### Boxplot-Diagramme:

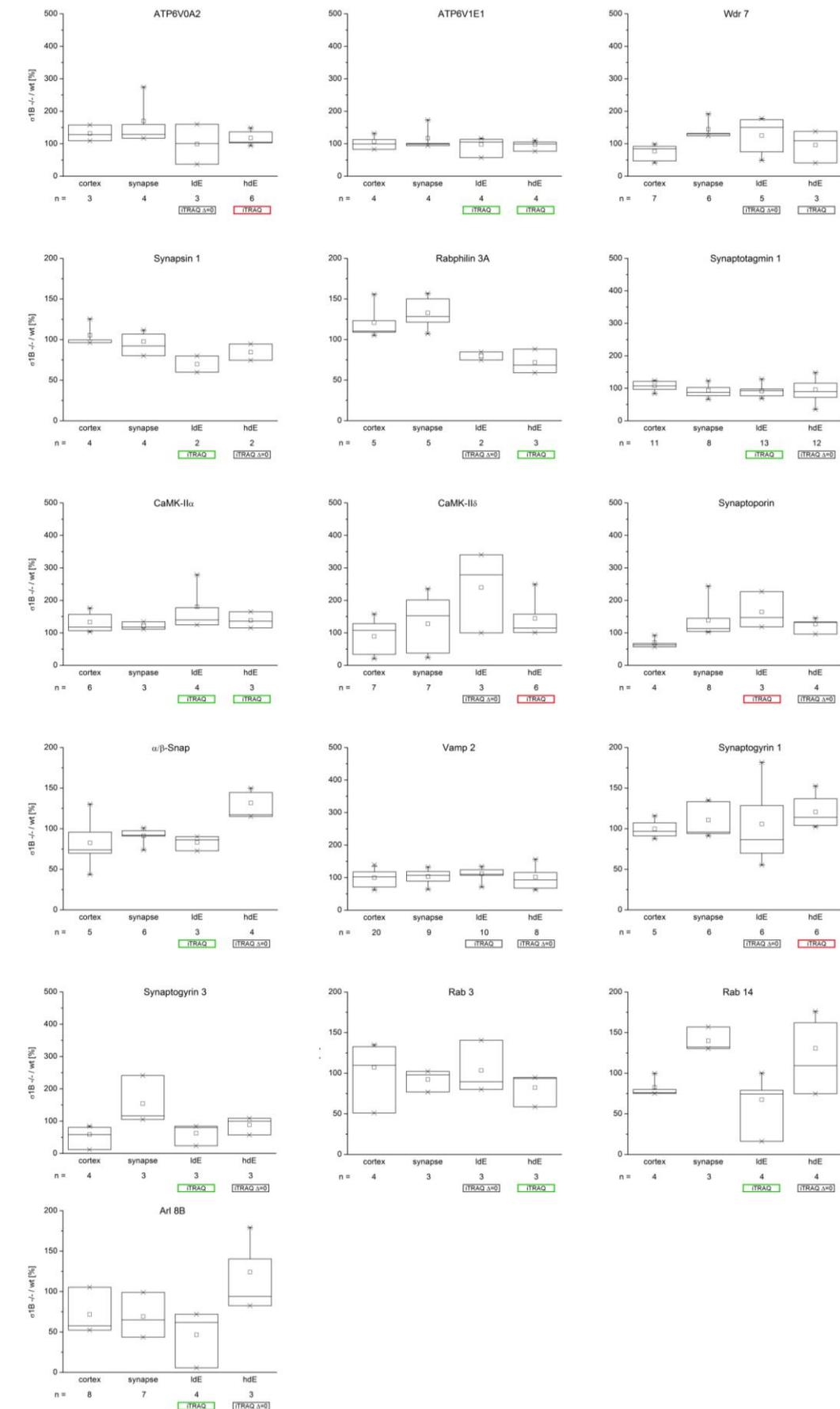
- statistischer Mittelwert
- arithmetisches Mittel
- X kleinster bzw. größter Datenwert
- ▭ Wertebereich in dem sich 50% der Datenwerte befinden

##### iTRAQ™-Validierung:

- keine iTRAQ Daten
- iTRAQ iTRAQ Tendenz bestätigt
- iTRAQ iTRAQ Tendenz nicht bestätigt
- iTRAQ WB konträr zur iTRAQ Tendenz
- iTRAQ  $\Delta=0$  keine signifikante iTRAQ Tendenz

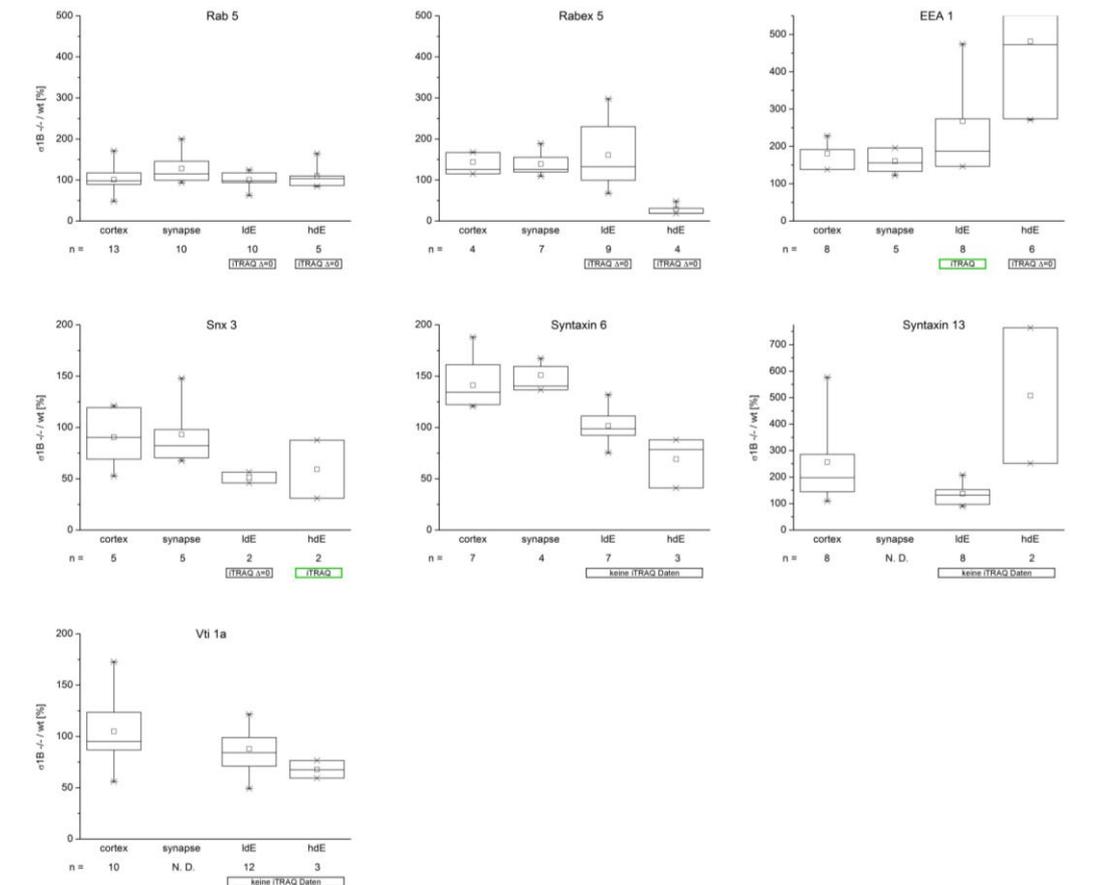


Proteine synaptischer Vesikel:

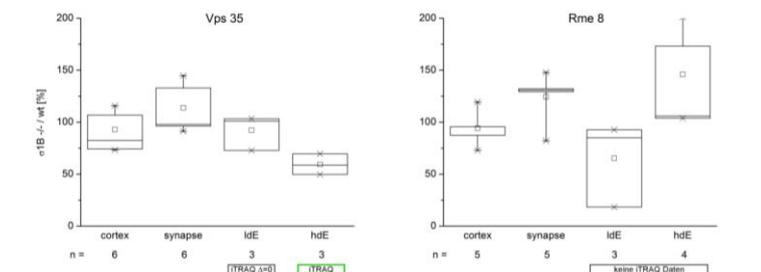


## 5.11 WB-Verifikation von iTRAQ™-Ergebnissen

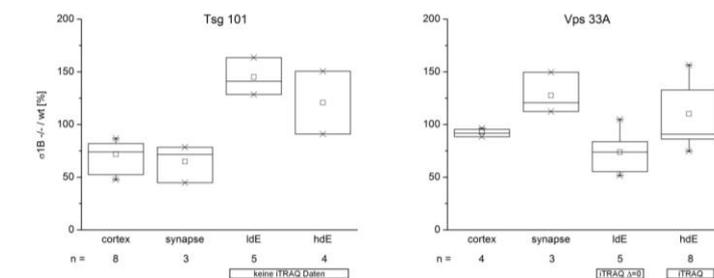
### Frühe endosomale Proteine:



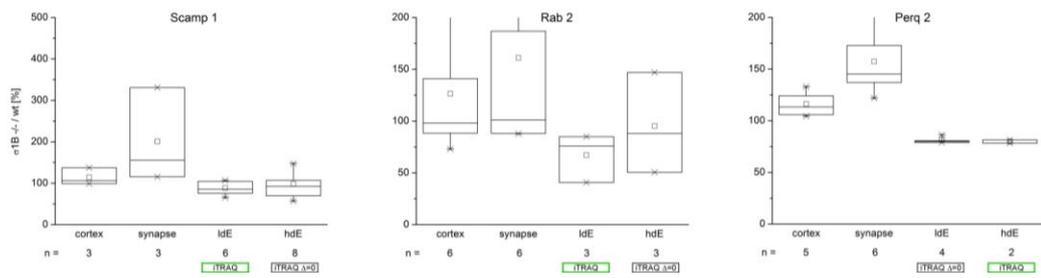
### Proteine des Retromertransports von frühen Endosomen:



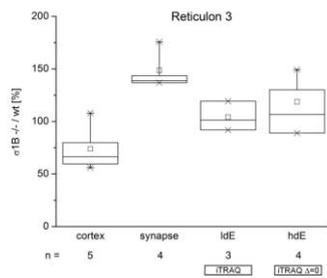
### Späte endosomale Proteine:



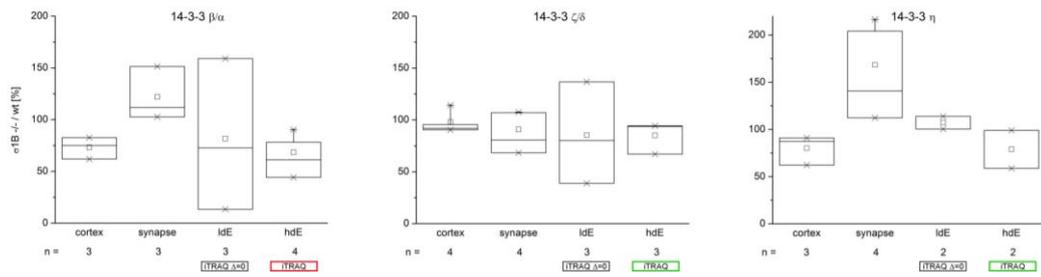
Dense Core Vesicle Proteine:



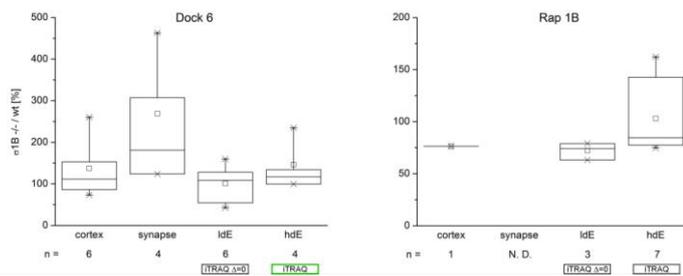
Proteine des sekretorischen Wegs:



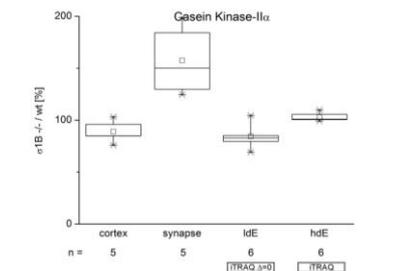
14-3-3 Proteine:



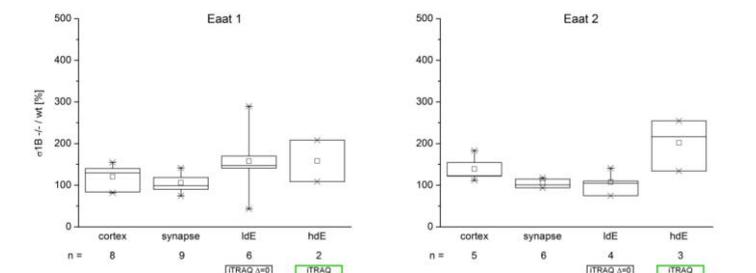
GTPasen und mit GTP interagierende Proteine:



**Kinasen:**



**Gilaproteine:**



**Abb. 5-18: Western-Blot-Quantifizierungen zur Verifikation der iTRAQ™-Ergebnisse.**

Dargestellt sind die Proteinmengen des KO relativ zum WT des Cortex, von Synaptosomen sowie der IdE und hdE in Boxplot-Diagrammen. n gibt die Anzahl an unabhängigen WB-Experimenten an. Der Verifikationsstatus der iTRAQ™-Ergebnisse ist unterhalb jedes Diagramms dargestellt (siehe Legende in der ersten Proteingruppe). N. D.: im WB nicht nachweisbar (not detectable).

Mit Hilfe der Western-Blot-Quantifizierungen konnte eine Vielzahl der überprüften iTRAQ™-Tendenzen bestätigt werden. In der nachfolgenden Tabelle sind die Ergebnisse zusammengefasst.

**Tab. 5-4: Validierung von signifikant veränderten Proteinen der iTRAQ™-Quantifizierung, die vermutlich direkt am endosomalen, vesikulären Transport beteiligt sind.**

46 Proteine wurden untersucht, von denen:

- 31 durch WB Quantifizierungen bestätigt wurden.
- 8 keine signifikante Veränderung im WB zeigten.
- 7 eine signifikant konträre Veränderung im WB im Vergleich zu iTRAQ™-Quantifizierung zeigten.

iTRAQ™-Veränderungen dieser Proteine wurden zu:

- 67,4% bestätigt.
- 17,4% nicht bestätigt aufgrund von nicht signifikanten WB Resultaten.
- 15,2% nicht bestätigt und im WB wurde eine konträre Veränderung angezeigt.

Mit 15,2% ist der Anteil von Proteineveränderungen gering, welche in den iTRAQ™- und Western-Blot-Quantifizierungen konträr identifiziert wurden. Dies spricht dafür, dass die iTRAQ™-Resultate in der Summe eine sehr hohe Aussagekraft bezüglich der differentiellen Proteinveränderung besitzen. Für ein einzelnes Protein kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, dass die durch die iTRAQ™-Analyse identifizierte Veränderung einer Proteinmenge auch durch eine unabhängige Kontrollen bestätigt werden könnte. Ist jedoch für eine Gruppe von Proteinen eine eindeutige Veränderung zu erkennen, so bedarf diese folglich nicht zwangsläufig einer weiteren Überprüfung.

Mit Hilfe der Western-Blot-Quantifizierungen konnte keine generelle Korrelation zwischen den durch die AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz hervorgerufenen Veränderungen in den Cortexfraktionen, den synaptosomalen Fraktionen und den endosomalen Fraktionen D4 und E5 festgestellt werden. Dies könnte darauf hinweisen, dass die AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz einen speziellen Einfluss auf die Umverteilung von Proteinen des vesikulären, endosomalen Transports besitzt.

### **5.11.2 WB-Ergebnisse in Bezug auf iTRAQ™-Daten**

Durch die Western-Blot-Quantifizierungen konnte eine Vielzahl von Proteinveränderungen des synaptisch-vesikulären, endosomalen Transports bestätigt werden. Darüber hinaus lieferten die Western-Blot-Quantifizierungen unterstützende Hinweise zu den iTRAQ™-Ergebnissen für die Proteine, für die nur in einer Fraktion signifikante Abweichungen identifiziert wurden.

Von den Proteinen, die an der Dynamik von CCVs beteiligt sind, konnten mit Hilfe von Western-Blots Reduktionen für Arf 1, Arf-GAP 1, AP 180, Gak und Epsin 2 differentielle Reduktionen in beiden Fraktionen gezeigt werden. Dies weist auf eine defizient reduzierte SV Bildung hin. Im Besonderen die Reduktion von Arf 1 und deren GAP könnten auf einen speziellen Defekt in der AP-1 vermittelten Vesikelbildung hinweisen. Der Anstieg des AP-2/ $\alpha$  konnte nur in der IdE gezeigt werden.

Eine Reduktion von Proteinen die an der SV Biogenese sowie deren Transport beteiligt sind, konnte mehrheitlich durch Western-Blots bestätigt werden. SV Proteine sind überwiegend reduziert, wobei diese in der Fraktion D4 stärker ausgeprägt ist. Auffällig ist, dass die differentiellen Reduktionen der iTRAQ™-Analyse alle bis auf die der CaMK-II $\alpha$  und  $\delta$  bestätigt werden konnten, welche voraussichtlich beide differentiell erhöht sind. In der IdE und hdE sind die Proteine  $\alpha$ / $\beta$ -Snap, Rab 14 und Arl 8B unterschiedlich reguliert. Dies unterstützt die Hinweise auf unterschiedliche endosomale, vesikuläre Pools. Sowohl Rab 14 als auch Arl 8B sind an späten endosomalen Pools

lokalisiert [Linford *et al.* 2012, Donaldson und Jackson 2011], wodurch die Hypothese einer vorwiegend späten endosomalen Fraktion E5 gestützt wird.

In der iTRAQ™-Analyse wurden nur wenige Proteine identifiziert, die vornehmlich auf endosomalen Kompartimenten lokalisiert sind und es ist keine einheitliche Veränderungen in Folge der AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz zu erkennen. Durch Western-Blot und iTRAQ™-Quantifizierungen konnte ein differentieller Anstieg der EEA 1 und Syntaxin 13 Menge gezeigt werden, während weitere endosomale Proteine reduziert sind. Auffällig ist darüber hinaus eine gleichförmige Veränderung in der IdE und hdE der Proteine Rabex 5, Syntaxin 6 und Vti1a sowie EEA 1 und Syntaxin 13. Dies weist unterstützend darauf hin, dass die AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz Veränderungen früher Endosomen hervorruft, wobei EEA 1-positive Kompartimente vermutlich vermehrt auftreten und späte endosomale Strukturen mehrheitlich nicht verändert werden.

Regulatorische, neuronale Proteine wie GTPasen, GTP-interagierende Proteine und Kinasen, die vermutlich nicht direkt an der vesikulären, endosomalen Sortierung beteiligt sind, sind den iTRAQ™- und Western-Blot-Quantifizierungen zufolge, wenn überhaupt, nur geringfügig verändert.

Die Western-Blot-Quantifizierungen liefern unterstützende Hinweise darauf, dass Proteine von *Dense Core Vesicles* (DCV) durch die Defizienz differentiell reduziert werden. Dies steht im Einklang mit Beobachtung von elektronendichten Strukturen der Elektronenmikroskopie, welche auf eine Veränderung dieser Strukturen hinweisen könnte.

Für Perq 2 wurde gezeigt, dass es in der Folge von äußerem zellulären Stress in Stressgranulas umverteilt wird und dort mit einer Vielzahl von Proteinen interagieren kann. Stressgranula sind zytoplasmatische, mRNA-haltige Zusammenschlüsse, welche unter Zellstress vermehrt gebildet werden. Ash *et al.* haben gezeigt, dass Perq 2 mit auf Stressgranulas angereicherten Proteinen interagiert [Ash *et al.* 2010]. Von diesen wurden Pabp 1, Fxr 1, G3bp 1 und Elav 1 auch in der Fraktion E5 identifiziert, jedoch keines in D4. Nur Fxr 1 ist verändert und erhöht. Durch Western-Blot-Quantifizierungen konnte gezeigt werden, dass Perq 2 im Cortex und im Besonderen in Synaptosomen differentiell erhöht ist, während es in den Fraktionen D4 und E5 reduziert ist. Diese Ergebnisse könnten einerseits auf einen Einfluss der AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz auf, möglicherweise indirekte, zelluläre Sortierungsmechanismen abseits der späten sekretorischen Sortierung hinweisen. Andererseits weisen sie auf eine neuronale Funktion von Perq 2 hin. Die ausschließliche Identifikation der mit Perq 2 interagierenden Stressgranulaproteine in der Fraktion E5 steht im Einklang mit der Vermutung zweier deutlich voneinander verschiedener Fraktionen D4 und E5 und ist ein starker Hinweis auf eine hohe

Trennschärfe der Gradientenzentrifugationen. Vermutlich stellt E5 nicht die Fraktion dar, in der die Stressgranula hauptsächlich angereichert sind. Eine differentielle Erhöhung von Perq 2, wie sie in Synaptosomen beobachtet wurde, wäre vermutlich nur in der Fraktion zu erkennen, in der die Stressgranula angereichert sind.

In der iTRAQ™-Quantifizierung wurde nur eine geringe Zahl an Proteinen identifiziert, die vor allem für frühe Endosomen charakteristisch sind. Die Veränderungen vieler Proteine weisen jedoch sehr stark auf veränderte frühe endosomale Strukturen in defizienten Neuronen hin. PI-3-P ist ein Phosphoinositolphosphat, welches charakteristisch für frühe Endosomen ist. Dessen mögliche differentielle Veränderungen wurden in den endosomalen Fraktionen zur Überprüfung des Hinweises auf veränderte frühe Endosomen quantifiziert.



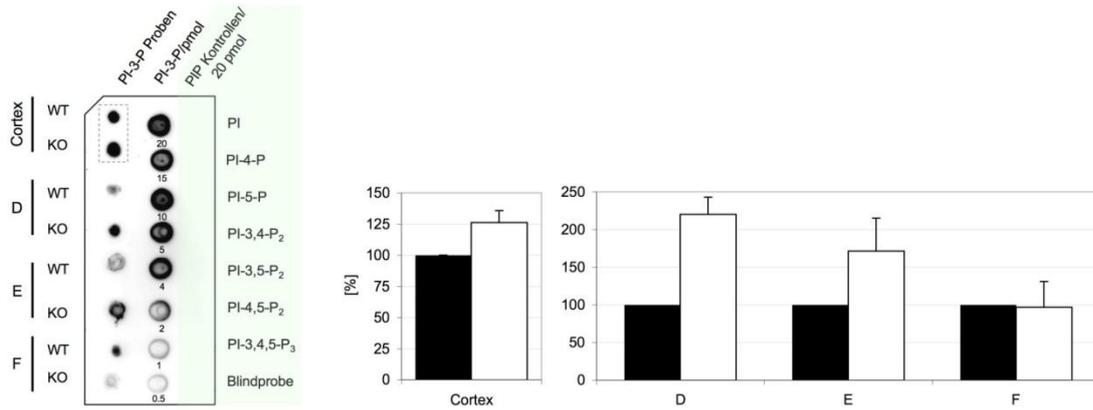
## 6. Einfluss der AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz auf die PI-Mengen

Durch elektronenmikroskopische, iTRAQ™-massenspektroskopische und biochemische Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz eine Veränderung von endosomalen Strukturen hervorruft. Insbesondere die biochemischen Ergebnisse weisen auf eine Veränderung von frühen Endosomen hin. Da kein Strukturprotein oder ein integrales Membranproteine als Immunoblotmarker für frühe Endosomen bekannt ist, wurden die biochemischen Untersuchungen mit dem etablierten Marker EEA 1, dem peripheren Membranprotein früher Endosomen, durchgeführt. Nachdem die iTRAQ™-Quantifizierungen die zuvor beobachteten endosomalen Veränderungen zumindest nicht direkt bestätigen konnten, wurden weitere biochemische Untersuchungen durchgeführt.

EEA 1 ist an der homotypischen Fusion früher Endosomen beteiligt [Takeshi *et al.* 2009]. Über eine Rab-Bindungsdomäne und eine FYVE-Domäne wird seine Membranbindung bewerkstelligt [Backer 2008]. So bindet EEA 1 über die Rab-Bindungsdomäne an Rab 5 und über die FYVE-Domäne an Phosphoinositol-3-phosphat (PI-3-P). Die Western-Blot-Quantifizierungen des Cortex sowie die der Fraktionen der 65 000 g Zentrifugation zeigten keine differentiellen Veränderungen der Rab 5 Konzentrationen. Der in Western-Blot-Quantifizierungen beobachtete differentielle Anstieg von Rab 5 in den Fraktionen D4 und E5 konnte durch die iTRAQ™-Quantifizierungen nicht bestätigt werden; hier wurde eine differentielle Reduktion von Rab 5 in D4 und eine nichtsignifikante Reduktion in E5 festgestellt. Dies weist darauf hin, dass die AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz auch in den Fraktionen D4 und E5 zu keiner signifikanten Veränderung der Rab 5 Konzentrationen führt. Möglicherweise werden die Veränderungen der EEA 1 Mengen durch Veränderungen der PI-3-P-Konzentrationen auf frühen endosomalen Kompartimenten hervorgerufen. Um dies zu überprüfen, wurden die PI-3-P Konzentrationen im Cortex und den Fraktionen D, E und F bestimmt. Eine Bestimmung in den weiter aufgereinigten Fraktionen D4 und E5 war aufgrund der Unterschreitung der Detektionsgrenze der verwendeten Quantifizierungsmethode nicht möglich.

### 6.1 Differentielle Veränderungen von PI-3-P

Um zu überprüfen, ob die Veränderung der EEA 1 Konzentrationen mit einer Veränderung der PI-3-P-Konzentration einhergeht, wurde letztere im Cortex sowie in den Fraktionen D, E und F bestimmt.



**Abb. 6-1: Differentielle PI-3-P Verteilung.**

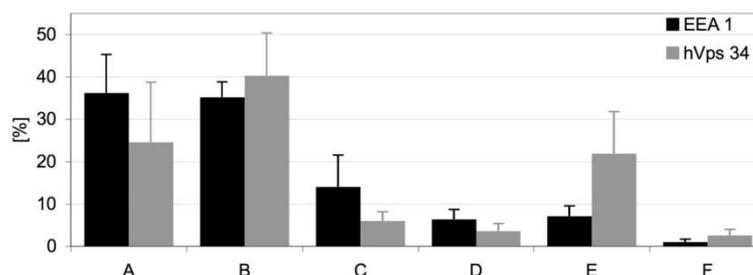
Im Cortex (n=3) und den Fraktionen D, E und F (n=3). Links ist ein repräsentativer Blot gezeigt (die Signale des Cortex stammen von einem anderen Blot) und rechts ist die Quantifizierung über drei unabhängige Experimente dargestellt.

Durch die AP-1/σ1B-Defizienz wird im Cortex ein differentieller Anstieg um etwa 25% an PI-3-P hervorgerufen. Die differentiellen Veränderungen der PI-3-P-Konzentrationen sind in den Fraktionen D und E am stärksten ausgeprägt und die Konzentration beträgt hier im Mittel im KO mehr als das Doppelte von dem des WT. Diese durch die AP-1/σ1B-Defizienz hervorgerufene Veränderung liegt in der Größenordnung der EEA 1 Anreicherung, was auf eine gemeinsame Regulation oder eine wechselseitige Abhängigkeit der EEA 1- und PI-3-P-Konzentrationen hindeutet.

PI-3-P ist überwiegend auf frühen Endosomen angereichert [Vanhaesebroeck *et al.* 2010], sodass dessen differentielle Veränderung ein weiterer deutlicher Hinweis auf die Veränderung früher Endosomen darstellt.

## 6.2 Einfluss der AP-1/σ1B-Defizienz auf hVps 34

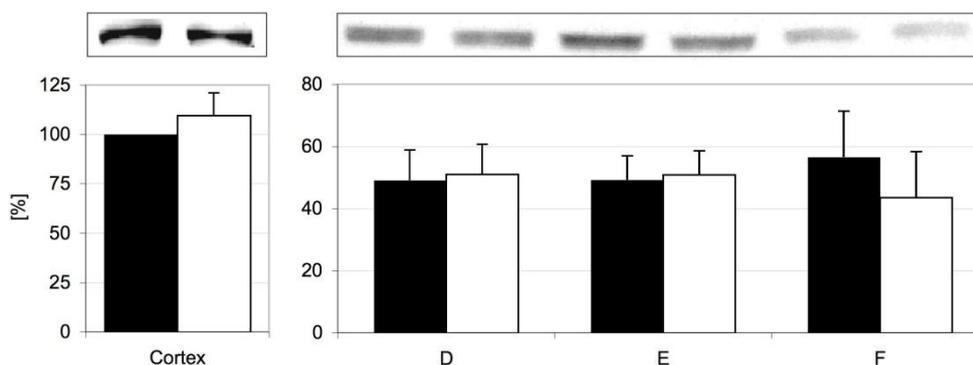
In der Literatur wird die Klasse III PI-3-Kinase hVps 34, die über ihre regulatorische Untereinheit hVps 15 an die Zielmembran bindet, als die Kinase beschrieben, die auf Endosomen überwiegend für die Bildung von PI-3-P verantwortlich ist. Jedoch kann darüber hinaus eine Bildung von PI-3-P durch die Klasse II PI-3-Kinasen und Phosphatasen, wie die PI-3-Phosphatase Myotubularin 6 (MTM-6), nicht ausgeschlossen werden [Vanhaesebroeck *et al.* 2010].



**Abb. 6-2: Verteilung von EEA 1 und hVps34 des WT im 65 000 g-Gradienten.**

EEA 1: n=5, hVps 34: n=4

Wie in Abb. 6-2 dargestellt, konnte durch Western-Blot Analysen gezeigt werden, dass sich die Verteilungen der Proteinprofile von EEA 1 und hVps 34 durchaus ähnlich sind. In den gereinigten Fraktionen D4 und E5 wurden ebenfalls sowohl hVps 34 als auch hVps 15 gemeinsam mit EEA 1 und Rab 5 identifiziert. Dies weist stark auf eine co-Fraktionierung von hVps 34 mit frühen endosomalen Membranfraktionen hin und könnte einen Hinweis auf die Notwendigkeit ihrer Kinaseaktivität in diesen Fraktionen darstellen. Um zu Überprüfen ob die AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz, wie bereits für EEA 1 und PI-3-P, zu einer Veränderung der hVps 34-Konzentration führt, wurde deren differentielle Verteilung im Cortex und den Membranfraktionen des Gradienten biochemisch bestimmt.



**Abb. 6-3: Verteilung zwischen WT und KO von hVps 34.**

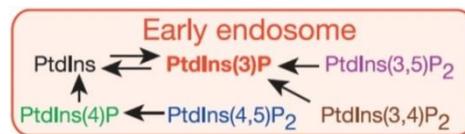
Im Cortex (n=7) und den Fraktionen D, E und F (n=5).

Im Cortexextrakt und in den Fraktionen D und E, in denen die deutlichsten Unterschiede der EEA 1- und PI-3-P-Konzentrationen zu beobachten sind, wird durch die AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz keine Veränderung von hVps 34 hervorgerufen: Sowohl die Proteinkonzentrationen im Cortex als auch die differentielle Verteilungen im Gradienten sind nicht verändert. Die Veränderungen der PI-3-P-Konzentrationen und möglicherweise auch die von EEA 1, werden folglich nicht durch eine Veränderung der hVps 34-Konzentration hervorgerufen. Die erhöhten PI-3-P-Konzentrationen könnten durch eine veränderte Regulation des PI-3-P-Metabolismus und möglicherweise durch eine erhöhte hVps 34-Aktivität hervorgerufen werden. Ob die AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz zu einer Verän-

derung der hVps 34-Aktivität führt, müsste in weiteren Experimenten untersucht werden.

### 6.3 Quantifizierung weiterer endosomaler PIs und PI-4-P

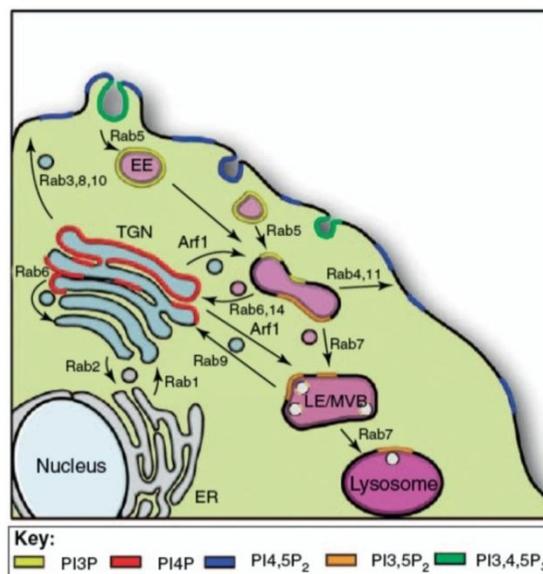
Der Auf- und Abbau von Phosphoinositolen findet über ein Netzwerk von voneinander abhängigen Syntheseschritten statt und wird von einer Vielzahl an Kinasen und Phosphatasen bewerkstelligt. Das auf frühen Endosomen angereicherte Phosphoinositol PI-3-P wird vor allem von der Kinase hVps 34 aus PI gebildet, jedoch ist dies nicht der einzige Biosyntheseschritt. PI-3-P wird im frühen endosomalen Sortierungsweg darüber hinaus auch durch Dephosphorylierung von PI-3,4-P<sub>2</sub> und PI-3,5-P<sub>2</sub> gebildet [Paolo und Camilli 2006].



**Abb. 6-4: PIP-Metabolismus in frühen Endosomen [Paolo und Camilli 2006].**

Möglicherweise ruft die AP-1/σ1B-Defizienz folglich auch Veränderungen dieser PIP-Konzentrationen hervor, was durch deren Konzentrationsbestimmungen analysiert werden sollte. Antikörper gegen PI-3,4-P<sub>2</sub> und PI-3,5-P<sub>2</sub> zeigten eine sehr geringe Spezifität, sodass für beide PIPs keine differentiellen Quantifizierung durchgeführt werden konnte. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Konzentration von PI-3,5-P<sub>2</sub> im Cortex etwa zehnfach geringer ist als die von PI-3-P und die Konzentrationen von PI-4,5-P<sub>2</sub> unterhalb der Detektionsgrenze der Quantifizierungsmethode lagen. Diese Geringen Anteile der PI-3,4-P<sub>2</sub>- und PI-3,5-P<sub>2</sub>-Konzentrationen im Vergleich zu der von PI-3-P könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Veränderungen der PI-3-P-Konzentrationen vor allem durch Veränderungen der PI Phospho- und PI-3-P Dephosphorylierung hervorgerufen werden.

PI-4-P ist das charakteristische PIP des *trans*-Golgi-Netzwerks (TGN). Gemeinsam mit Arf 1 spielt es eine zentrale Rolle bei der Rekrutierung von AP-1 an die Membran des TGN und somit beim AP-1-vermittelten vesikulären Transport [Santiago-Tirado und Bretscher 2011]. Darüber hinaus ist PI-4-P Bestandteil von Membranen des endozytischen Clathrin-vermittelten vesikulären Transports. Nach der Abspaltung von clathrinumüllten Vesikeln (CCV) von der Plasmamembran spielt die Phosphatase Synaptojanin 1 eine zentrale Rolle bei der Abstreifung der Clathrinhülle. Die CCVs sind reich an PI-4,5-P<sub>2</sub>. Die Rekrutierung von Synaptojanin 1 an CCVs führt zu einer Dephosphorylierung von PI-4,5-P<sub>2</sub> zu PI-4-P, wodurch die Abstreifung der Clathrinhülle eingeleitet wird [Pechstein *et al.* 2010].

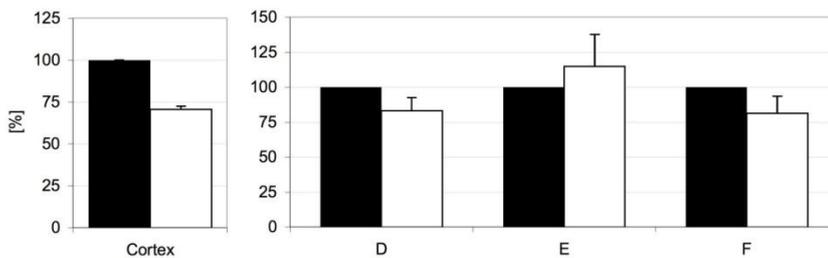


**Abb. 6-5: Anreicherung von PIPs auf Organellmembranen des späten sekretorischen Weges. [Santiago-Tirado und Bretscher 2011].**

Im Cortex sowie in den Fraktionen D und F ist eine signifikante differentielle Reduktion der PI-4-P-Konzentrationen zu erkennen (Abb. 6-6). Die biochemischen und mikroskopischen Analysen lieferten keinen Hinweis auf strukturelle Veränderungen des Golgi-Apparates sowie des TGN, die durch die AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz hervorgerufen werden. Dies deutet darauf hin, dass Veränderungen der PI-4-P-Konzentrationen durch Veränderungen des vesikulären Recyclings hervorgerufen werden könnten. Die Verringerung der PI-4-P-Konzentration in der an Transportvesikeln reichen Fraktion D, könnte durch die Reduktion von synaptischen Vesikeln hervorgerufen werden. Eine Verringerung deren Zahl führt zu einer Erniedrigung der Membranoberfläche, auf der durch Synaptotagmin 1 PI-4-P gebildet wird.

In der Fraktion E sind keine signifikanten Unterschiede der PI-4-P-Konzentration zu erkennen. Durch die Proteomanalyse konnte gezeigt werden, dass der Anteil von Proteinen des vesikulären Transports an der Fraktion E5 deutlich geringer ist als der an der Fraktion D4. Die Reduktion von PI-4-P in der Fraktion D, jedoch nicht in der Fraktion E, könnte auf einen gestörten PI-4-P-Metabolismus in vesikulären Transportweg hindeuten.

Die um etwa 30% deutlich größere differentielle Reduktion von PI-4-P im Cortex als in den Fraktionen D und F könnte darüber hinaus auf Veränderungen des AP-1-vermittelten vesikulären Transports vom TGN hinweisen.



**Abb. 6-6: Differentielle PI-4-P Verteilung.**

Im Cortex (n=2) und den Fraktionen D, E und F (n=3).

Der AP-1-Komplex benötigt für eine hochaffine Membrananbindung PI-4-P. Die Reduktion an PI-4-P könnte daher auch in einem direkten Zusammenhang mit dem Fehlen des AP-1/ $\sigma$ 1B-Komplexes stehen.

Mit Hilfe der PI-3-P Quantifizierungsmethode, die von den bis hierher verwendeten Methoden unabhängigen ist, konnte ein differentieller Anstieg im Cortex sowie in den endosomalen Fraktionen dieses Phosphoinositolphosphats gezeigt werden. Dies stellt einen weiteren deutlichen Hinweis auf eine Veränderung früher Endosomen da, die durch die AP-1/ $\sigma$ 1B-Denfizienz hervorgerufen wird. Der differentielle Anstieg ist in der Fraktion D am deutlichsten ausgeprägt, was die Hinweise auf eine frühe endosomale Fraktion D untermauert.

## 7. Diskussion

Im Gegensatz zu den ubiquitären AP-1-Adaptinen, wie beispielsweise  $\gamma 1$  und  $\mu 1A$ , deren Ausschalten letal ist, besitzt der AP-1/ $\sigma 1B$ -Komplex wichtige, jedoch nicht für das Überleben von höheren Säugetieren essentielle neuronale Funktionen. In  $\sigma 1B$ -defizienten Mäusen konnte von J. Baltes in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass der AP-1/ $\sigma 1B$ -Komplex eine zentrale Rolle für deren Motorkoordination sowie deren räumliches Gedächtnis spielt [Baltes 2008]. Ausgehend von diesem Phänotyp haben Glyvuk *et al.* eine Beeinträchtigung des synaptischen Vesikelrecyclings in primären hippocampalen Neuronen festgestellt. Elektronenmikroskopische (EM) Aufnahmen defizienter Neuronen zeigten eine reduzierte Anzahl an synaptischen Vesikeln (SV) sowie vermehrt clathrinumhüllte und endosomale Strukturen, die im Vergleich zum WT vergrößert waren, und vermehrt multivesikulärer Körper (multivesicular bodies, MVB) in der Präsynapse [Glyvuk *et al.* 2012].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden endosomale Strukturen aus dem Cortex von Mäusen zur biochemischen und massenspektrometrischen Charakterisierung von Unterschieden der endosomalen Proteinzusammensetzung zwischen den Genotypen mit Hilfe von Dichtezentrifugationen angereichert. Das Ziel war die Charakterisierung der durch die AP-1/ $\sigma 1B$ -Defizienz hervorgerufenen Ursachen des beeinträchtigten SV-Recyclings, der Veränderung neuronaler Endosomen sowie die Identifikation möglicher AP-1/ $\sigma 1B$ -Interaktionspartner.

### 7.1 Anreicherung endosomaler Strukturen des Cortex

Biochemische Untersuchungen des Cortex sowie von Synaptosomen haben gezeigt, dass die AP-1/ $\sigma 1B$ -Defizienz nur zur Veränderungen von bestimmten endosomalen Markern führt. Während für die endosomalen Marker Appl 1, Appl 2 und auch für Rab 5 keine spezifischen Veränderungen festgestellt wurden, sind die frühen endosomalen Proteine wie Rabex 5 und EEA 1 differentiell erhöht. Die Veränderungen endosomaler Proteine ist in den Synaptosomen am deutlichsten ausgeprägt (vgl. 3.3). Dies lieferte einen starken Hinweis auf eine Veränderung von bestimmten endosomalen Pools, deren Ausprägung vom jeweiligen neuronalen Kompartiment abhängig ist. Durch differentielle Zentrifugationen von Cortexextrakten konnte gezeigt werden, dass Veränderungen früher endosomaler Markerproteine auf Membranstrukturen am deutlichsten ausgeprägt sind (vgl. 4.1). Für eine detaillierte Untersuchung dieser Veränderungen wurde eine Methode zur Anreicherung von endosomalen Membranfraktionen etabliert. Hierzu wurde in Anlehnung an ein etabliertes Protokoll [McCaffrey *et al.* 2009] eine Sedimentationsdichtegradientenzentrifugation entwickelt (vgl. 4.2). Zur Identifikation von endo-

somalen Fraktionen wurden die Proteinprofile von endosomalen sowie weiteren Markerproteinen des sekretorischen Transports über die Gradientenfraktionen bestimmt und mögliche differentielle Unterschiede zwischen den Fraktionen ermittelt. Hierzu wurden semiquantitative Western-Blots durchgeführt, für die in Abhängigkeit der Konzentration des jeweiligen zu detektierenden Proteins sowie der Spezifität des Antikörpers die Menge einer Probe so gewählt wurde, dass sich die Signalintensitäten in einem linearen Bereich befanden (vgl. 2.3.14). Diese Quantifizierungsmethode wurde angesichts der Tatsache der zu erwartenden moderaten Proteinveränderungen gewählt, die aufgrund des milden Phänotyps der Mäuse nicht im Bereich von ganzzahligen Vielfachen Konzentrationsänderung zu erwarten waren. Diese Gradientenzentrifugation wurde mit drei unterschiedlichen Puffersystemen durchgeführt, mit dem Ziel, das System mit der höchsten Stabilisierung von membrangebundenen endosomalen Proteinen zu identifizieren. Puffer A zeigte diesbezüglich den höchsten stabilisierenden Effekt, sodass dieser den Puffer der Wahl darstellte (vgl. 4.2.1). Endosomale Veränderungen sind in Synaptosomen stärker ausgeprägt als im Cortex. Aus experimentellen Gründen wurde von einer Anreicherung von Endosomen aus Synaptosomen abgesehen, da die Gesamtproteinmenge einer Synaptosomenisolation pro Gehirn so gering war, dass für die semiquantitative Quantifizierung eines Markerproteins in einer gereinigten Gradientenfraktion dessen Proteinmenge nicht ausreichend gewesen wäre. In Abhängigkeit eines Markerproteins hätte jede Gradientenzentrifugation mit vier bis zehn Gehirnen durchgeführt werden müssen, was einerseits zu Lasten der Reproduzierbarkeit gegangen wäre und andererseits eine erhebliche Erhöhung der Fehleranfälligkeit hervorgerufen hätte. Darüber hinaus hätte der zeitliche Mehraufwand nicht im Verhältnis zu den Vorteilen gestanden, welche möglicherweise zu erwarten gewesen wären (vgl. 4.2.3).

Über den Vergleich der Proteinprofile sowie die differentiellen Veränderungen endosomaler Proteine konnten zwei endosomale Fraktionen, D und E, identifiziert werden, in denen das Markerprotein EEA 1, nicht aber Rab 5, differentiell verändert und erhöht ist (vgl. 4.2.4). Quantifizierungen des Phosphatidylinositol-3-phosphats (PI-3-P) zeigten ebenfalls, dass es sich hierbei um endosomale Fraktionen handelt (vgl. 6.1). Markerproteine des Golgi-Apparats und des *trans*-Golgi-Netzwerks (TGN) sind nicht in den Fraktionen D und E angereichert, was ein Hinweis auf relativ reine endosomale Fraktionen darstellt. Die hohe Signifikanz der Western-Blot-Quantifizierungen weist auf eine hohe Reproduzierbarkeit der Gradientenzentrifugationsmethode hin (vgl. 4.2.3).

Eine Charakterisierung der durch die AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz hervorgerufenen Veränderungen im synaptischen, endosomalen Transportweg sollte in diesen Fraktionen mit biochemischen und massenspektrometrischen Methoden durchgeführt werden. Zur

Quantifizierung möglicher differentieller Unterschiede von Proteinmengen wurde die iTRAQ™-Methode gewählt, für die die Fraktionen D und E in einer zweiten Flotationsdichtegradientenzentrifugation zu den Fraktionen D4 und E5 weiter aufgereinigt wurden (vgl. 4.3).

## 7.2 iTRAQ™-Analyse der endosomalen Fraktionen

In der aufgereinigten Fraktion D4 wurden durch die iTRAQ™-Massenspektrometrie 516 und in der Fraktion E5 618 Proteine identifiziert. Von dieser Methode ist bekannt, dass sie ein umfassendes Bild des Proteomes einer Probe liefert. Das Maß der Vollständigkeit der iTRAQ™-Quantifizierung wurde durch eine unabhängige Methode, die Shotgun-Methode, überprüft (vgl. 5.6.2). Hierfür wurde exemplarisch die D4 Fraktion gewählt. Durch die Shotgun-Methode konnten 30,6% der Proteine identifiziert werden, die über die iTRAQ™-Methode bereits identifiziert wurden. Bezogen auf alle identifizierten Proteine dieser Fraktion aus beiden Methoden wurden durch die Shotgun-Methode 9,9% neue Proteine identifiziert. Unter diesen Proteinen befanden sich keine, die einer neuen Proteingruppe zugeordnet werden konnten und keine neuen Proteine des endosomalen, vesikulären Transports. Der überwiegende Teil der neu identifizierten Proteine sind Isoformen von den Proteinen, die bereits durch die iTRAQ™-Methode identifiziert wurden. Mit 30,6% ist der Anteil der Proteine, die mit der Shotgun-Methode identifiziert wurden, an den 516 Proteinen der iTRAQ™-Methode deutlich geringer als er mit etwa 50% zu erwarten gewesen wäre [persönliche Informationen, O. Jahn]. Aufgrund dieser Kontrolle kann davon ausgegangen werden, dass mit Hilfe der iTRAQ™-Methode nicht nur das Proteom der Fraktionen D4, sondern auch das der Fraktion E5, welches eine vergleichbare Komplexität aufweist, umfassend identifiziert wurde.

Die Auswertung der iTRAQ™-Analyse hat gezeigt, dass bezogen auf alle identifizierten Proteine der Fraktionen D4 und E5, 35,6% dieser nur in D4, 50,2% nur in E5 und 14,2% in beiden Fraktionen zu finden sind (vgl. 5.6). Die geringe Schnittmenge von 14,2% an Proteinen zeigt, dass zum einen die Proteinzusammensetzungen beider Fraktionen deutlich unterschiedlich sind und zum anderen die Gradientenzentrifugationen eine hohe Trennschärfe besitzen. Eine hohe Trennschärfe der Gradientenzentrifugationen konnte darüber hinaus dadurch gezeigt werden, dass es bereits in der Sedimentationszentrifugation zu einer weitgehenden Auftrennung aller Bestandteile der Ladefraktion kommt (vgl. 4.3).

Das vorangige Ziel der iTRAQ™-Analyse war die Quantifizierung von differentiell veränderten Proteinen. Die Signifikanz einer Veränderung wurde durch interne Kontrollen überprüft. In der D4 Fraktion sind dieser Analyse zufolge 22% und in der E5 Fraktion

23% der Proteine oder Proteinisoformentypen signifikant verändert. Mit 44% ist der Anteil von diesen veränderten Proteinen, die vermutlich direkt am endosomalen, vesikulären Transport beteiligt sind, hoch, was einen starken Einfluss der AP-1/σ1B-Defizienz auf Proteine dieser funktionellen Gruppe und eben auch auf Proteine dieser Organellen anzeigt (vgl. 5.6). Die Aussagefähigkeit der identifizierten Proteinveränderungen wurde mit Hilfe von semiquantitativen Western-Blot-Quantifizierungen von 46 durch die iTRAQ™-Analyse als verändert angesehenen Proteinen überprüft. Mit 15,2% ist der Anteil der Proteinveränderungen, der auf diesem Weg nicht bestätigt werden konnte, gering (vgl. 5.11.1). Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass die iTRAQ™-Methode, neben der oben diskutierten Vollständigkeit des Proteoms, auch bezüglich der differentiellen Veränderungen von Proteinmengen, robuste Ergebnisse lieferte. Durch die Betrachtung der tendenziellen Veränderungen der Proteinmengen in einer funktionellen Proteingruppe, welche möglichst gleichförmig ausfällt, kann die Verlässlichkeit der iTRAQ™-Ergebnisse bezüglich dieser Veränderungen noch deutlich gesteigert werden.

Mit dieser iTRAQ™-Quantifizierung konnten je Fraktion zwischen 500 und 600 Proteine identifiziert werden. Schmidt und Urlaub, die die hier verwendete Durchführung dieser iTRAQ™-Methode etablierten, haben vorausgesagt, dass mit ihr nur Proben einer moderaten Komplexität (300 bis 400 Proteine) umfassend analysiert werden können [Schmidt und Urlaub 2009]. Durch die hier beschriebene iTRAQ™-Analyse konnte gezeigt werden, dass auch deutlich komplexere Proben, welche bis zu 500 bis 600 Proteine umfassen, problemlos analysiert werden können.

Die iTRAQ™-Methode wurde für diese Arbeit vor allem wegen ihrer Möglichkeit gewählt, mehr als zwei unterschiedliche Proteinproben markieren zu können, was für die Durchführung von internen Kontrollen essentiell war. Darüber hinaus war die Möglichkeit einer *in vitro* Markierung aus ökonomischen Gründen zwingend erforderlich. Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse, welche auf die Robustheit der iTRAQ™-Resultate hinweisen, werden durch Untersuchungen von Pütz *et al.* untermauert. Von ihnen wurde ein Vergleich der 2D-PAGE-, SILAC- und iTRAQ™-Proteinquantifizierungsmethoden durchgeführt. Sie konnten zeigen, dass mit der iTRAQ™-Methode mehr als 1000 Proteine einer Probe identifiziert werden können und mehrere iTRAQ™-Experimente derselben Probe eine hohe Konvergenz bezüglich deren Proteoms und deren jeweiligen Proteinveränderungen zeigen. Im Vergleich zur 2D-PAGE- und SILAC-Methode konnten mit der iTRAQ™-Methode annähernd alle Proteine (99%) eines Proteoms, welches mit Hilfe aller drei Methoden identifiziert wurde, detektiert werden. Von allen veränderten Proteinen wurden 92% der Proteinveränderungen durch die iTRAQ™-Methode festgestellt, wobei die iTRAQ™-Methode diesbe-

zöglich die geringste Fehleranfälligkeit aufwies. Der Zeitaufwand, der für eine iTRAQ™-Quantifizierung benötigt wird, ist im Vergleich zur 2D-PAGE- und SILAC-Methode am geringsten [Pütz *et al.* 2012]. Gemeinsam mit den Resultaten von Pütz *et al.* weisen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit auf eine hohes Maß an Vollständigkeit und Robustheit von Ergebnissen einer iTRAQ™-Quantifizierung, bezüglich des Proteoms und der Identifikation von Veränderungen hinsichtlich der Proteinmenge, hin. Für eine Proteomanalyse bei gleichzeitiger Quantifizierung von Proteimengenunterschieden stellt eine iTRAQ™-Quantifizierung diesen Ergebnissen zufolge die Methode der Wahl dar. Die Tatsache, dass weitaus mehr als 500 bis 600 Proteine pro iTRAQ™-Analyse identifiziert werden können, weist stark darauf hin, dass im Rahmen dieser Arbeit nicht aufgrund des Erreichens der Detektionsobergrenze der iTRAQ™-Methode Proteine des Proteoms der Fraktionen D4 bzw. E5 nicht identifiziert werden konnten.

### 7.3 Spezifität von Veränderungen für ein Zellkompartiment

Zur Verifikation von differentiellen Proteinveränderungen des iTRAQ™-Experiments wurde dies mit einer unabhängigen Methode überprüft. Von 51 Proteinen, die wahrscheinlich direkt am endosomal, vesikulären Transport beteiligt sind, wurden deren differentiellen Mengenunterschiede in der Fraktion D4 und der Fraktion E5 mit Western-Blot-Quantifizierungen bestimmt. Zusätzlich wurden diese Quantifizierungen im Cortex und in Synaptosomen durchgeführt, um festzustellen, für welches neuronale Kompartiment – den Cortex, die Synaptosomen oder die endosomal, vesikulären Fraktionen – diese Veränderungen spezifisch sind (vgl. 5.11.1). Unterschiedliche Veränderungen zwischen dem Cortex und den Synaptosomen sind vor allem für Proteine des CCV-Transports, aber auch für solche des sekretorischen und des retromeren Weges sowie für DCV-Proteine zu erkennen. Dies weist darauf hin, dass diese Transportwege im Besonderen in Synaptosomen durch die AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz beeinflusst werden und ist ein Hinweis auf eine synaptosomale Lokalisation dieses AP-Komplexes. Western-Blot-Quantifizierungen des Cortex und von Synaptosomen zeigen nur in letzteren eine Reduktion des AP-1-Komplexes. Dies stellt einen weiteren starken Hinweis auf eine synaptosomale Lokalisierung des AP-1/ $\sigma$ 1B-Komplexes dar (vgl. 3.2). Da der AP-1-Komplex in diesem Kompartiment präsynaptisch lokalisiert ist [Glyvuk *et al.* 2010], ist davon auszugehen, dass auch die beobachteten Effekte des AP-1/ $\sigma$ 1B-Komplexes präsynaptische sind.

Ein direkter Zusammenhang zwischen den differentiellen Veränderungen im Cortex bzw. in Synaptosomen und den Fraktionen D4 und E5 ist nicht zu erkennen. Für nur 16 der 51 (31,4%) Proteine zeigte sich, dass die differentiellen Veränderungen in allen vier Fraktionen tendenziell gleich sind. Dies ist in der Gruppe von SV-Proteinen sowie der

von endosomalen Proteinen am deutlichsten ausgeprägt. Während der geringe Anteil an gleichförmig veränderten Proteinen darauf hinweist, dass es sich bei den beobachteten Effekten um spezifische der Fraktionen D4 und E5 handelt, könnten die gleichförmigen Veränderungen damit erklärt werden, dass vor allem SV-Proteine zum überwiegenden Teil synaptosomal lokalisiert sind. In diesem Fall führt eine Anreicherung von Synaptosomen nicht zu einer Veränderung der im Cortex beobachteten differentiellen Unterschiede von SV-Proteinen. Die Tatsache, dass diese Veränderungen auch in den Fraktionen D4 und E5 nicht grundlegend anders ausfallen als in Synaptosomen, liefert einen Hinweis darauf, dass es sich bei ihnen um synaptosomale Fraktionen handelt. Vor allem die Fraktion D4, aber auch die Fraktion E5 ist reich an SV-Proteinen, wie durch Western-Blot-, iTRAQ™- und zum Teil auch durch elektronenmikroskopische Experimente (vgl. 4.2.3, 5.6 und 5.1) gezeigt werden konnte. Durch einen Vergleich des Proteoms dieser beiden Fraktionen mit dem der Aktiven Zone sowie dem von postsynaptischen Strukturen zeigte sich, dass sie weitgehend frei von postsynaptischen Proteinen sind (vgl. 5.10). Beispielsweise wurden keine Glutamatrezeptoren, wie die NMDA- oder AMPA-Rezeptoren, identifiziert, welche für die Postsynapse charakteristisch sind [Jordan *et al.* 2004, Dosemeci *et al.* 2006, Chua *et al.* 2010, Volkmandt und Karas 2012, Dean *et al.* 2012, Pavlos und Jahn 2011]. In Western-Blot-Quantifizierungen der aufgereinigten Fraktionen D und E war zu erkennen, dass nur hier eine differentielle Reduktion von SV-Markern auftritt (vgl. 4.3.1). Darüber hinaus sind in den Fraktionen D4 und E5 endosomale Proteine angereichert, die hier spezifisch differentiell verändert sind (vgl. 4.2.4). Durch die Summe all dieser Experimente konnte gezeigt werden, dass es sich bei den Fraktionen D4 und E5 um synaptosomale Fraktionen handelt, in denen endosomale Kompartimente angereichert sind und auf die der AP-1/ $\sigma$ 1B-Komplexes einen spezifischen Einfluss hat. Aufgrund der unterschiedlichen Dichte beider Fraktionen werden diese im Folgenden auch als leichte endosomale Fraktion (*light density endosomal fraction*, IdE) bzw. schwere endosomale Fraktion (*hight density endosomal fraction*, hdE) bezeichnet.

## 7.4 Zusammensetzung der IdE und hdE

Biochemische und massenspektrometrische Methoden, die zur Analysierung der Proteinzusammensetzungen der IdE und hdE im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, lieferten eine Vielzahl von Hinweisen darauf, dass es sich bei ihnen um unterschiedliche Fraktionen handelt. Die wichtigsten Hinweise hierauf sind nachfolgend zusammengefasst.

Erste Hinweise darauf, dass es sich bei der IdE und der hdE um Fraktionen mit einer stark voneinander abweichenden Proteinzusammensetzung handelt, lieferten coomas-

siegefärbte SDS-Gele. Hier waren deutliche Unterschiede des Proteinbandenmusters zwischen beiden Fraktionen erkennbar. Einen weiteren deutlichen Anhaltspunkt auf zwei unterschiedliche Fraktionen lieferten EM-Aufnahmen: In der IdE sind überwiegend vesikuläre und in der hdE vor allem elektronendichte Strukturen vorhanden. Die deutlichsten Unterschiede hinsichtlich der Proteinzusammensetzung beider Fraktionen waren in den iTRAQ™-Ergebnissen zu erkennen. Lediglich 14,2% der Proteine, die insgesamt in beiden endosomalen Fraktionen identifiziert wurden, sind sowohl Bestandteil der IdE als auch der hdE (vgl. 5.6). Bei der IdE und der hdE handelt es sich diesen Ergebnissen zufolge um zwei Fraktionen, die sich in ihrem Proteom deutlich voneinander unterscheiden.

In Western-Blot- und iTRAQ™-Quantifizierungen von Proteinen oder Proteingruppen beider Fraktionen zeigte sich, dass mehrere differentielle Veränderungen in der IdE und hdE unterschiedlich ausgeprägt sind. Bezüglich der Zytoskelettproteine war zu erkennen, dass diese nur in der hdE differentiell reduziert sind und in der IdE etwa halb so viele Aktin-Proteine wie in der hdE vorhanden sind. 14-3-3-Proteine, die an vielen regulatorischen Prozessen beteiligt sind, sind nur in der hdE differentiell reduziert. Im Gegensatz zu den nicht weiter aufgereinigten Fraktionen D und E konnte in den Fraktionen D4 und E5 eine Reduktion von SV-Proteinen festgestellt werden. Diese ist in der IdE deutlich stärker ausgeprägt als in der hdE (vgl. 5.8.2). Darüber hinaus ist der Anteil an SV-Proteinen an der IdE mit 21% deutlich höher als er mit 9% an der hdE ist, was darauf hinweist, dass vor allem mit der IdE synaptische Vesikel oder SV-Proteine kofraktionieren. Die spezifische differentielle Reduktion von PI-4-P in der IdE könnte darauf hinweisen, dass der AP-1/ $\sigma$ 1B-Komplex möglicherweise hier im Besonderen einen Einfluss auf die Bildung von Vesikeln besitzt.

Unterschiedliche, durch voneinander unabhängige Methoden bestätigte, differentielle Veränderungen in der IdE und hdE konnten für die Proteine AP-2/ $\alpha$ , Rabex 5, welche in der IdE differentiell erhöht und in der hdE differentiell reduziert sind, sowie für Rab 14 und Arl 8B, diese sind in der IdE differentiell reduziert und in der hdE differentiell erhöht, gezeigt werden. Stressgranula-Proteine konnten massenspektrometrisch nur in der hdE identifiziert werden.

Durch die Verwendung von Rab-Proteinen als Marker für verschiedene endosomale Populationen konnte gezeigt werden, dass in der IdE vor allem frühe Endosomen sowie Proteine des endosomalen, exozytotischen Wegs und Proteine sekretorischer Granulas und in der hdE neben frühen Endosomen vor allem Proteine später Endosomen, des endolysosomalen Weges, des degradativen Weges und sekretorischer Granulas angereichert sind (vgl. 5.10).

Durch diese umfassenden Untersuchungen der IdE und hdE konnte gezeigt werden, dass es sich bei ihnen um Fraktionen handelt, die nur geringe Übereinstimmungen hinsichtlich ihrer Proteinzusammensetzung aufweisen. Folglich besitzt die hier etablierten 65 000 g-Sedimentationszentrifugation eine sehr hohe Trennschärfe, mit der eine hohe Anreicherung von Zellbestandteilen möglich ist. Die IdE stellt die endosomale Fraktion dar, in der überwiegend frühe und die hdE die, in der vornehmlich späte endosomale Kompartimente angereichert sind.

### 7.5 Veränderungen funktioneller Proteingruppen

Durch Western-Blot-, Phosphatidylinositolphosphat- und iTRAQ™-Quantifizierungen von neuronalen Extrakten konnten, durch die AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz hervorgerufenen, Proteinveränderungen nachgewiesen werden. Diese sind in bestimmten funktionellen Proteingruppen besonders ausgeprägt. Im Folgenden werden die funktionellen Gruppen diskutiert, die aller Voraussicht nach am synaptischen Vesikelrecycling beteiligt sind.

#### 7.5.1 Veränderungen früher endosomaler Proteine

Biochemische Untersuchungen des Cortex haben gezeigt, dass die AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz hier und im Besonderen auch in Synaptosomen zu einer Erhöhung früher endosomaler Marker führt. In den endosomalen Fraktionen IdE und hdE (welche D/D4 bzw. E/E5 entsprechen) wurde vor allem eine differentielle Erhöhung des Markers EEA 1 nachgewiesen. Dies zeigt neben der generellen Erhöhung eine Umverteilung von EEA 1 auf Membranstrukturen in defizienten Neuronen. Während Western-Blot-Quantifizierungen einen differentiellen Anstieg vor allem von EEA 1 in beiden endosomalen Fraktionen gezeigt haben, konnte dieser durch die iTRAQ™-Methode nur in der IdE gezeigt werden. Ein Grund hierfür könnte, wie unter 5.9 bereits diskutiert, an einer nur unvollständigen Detektion des 180 kD großen EEA 1 durch die iTRAQ™-Methode liegen. Ein weiterer könnte in der Schwäche der iTRAQ™-Methode liegen, dass differentielle Proteinveränderungen geringer angezeigt werden. Generell ist festgestellt worden, dass differentielle Veränderungen in der Regel größer sind, als sie durch ein iTRAQ™-Experiment angezeigt werden [Elliott *et al.* 2009]. Hierdurch wird die Detektion einer EEA 1 Erhöhung zusätzlich erschwert.

Einen weiteren Hinweis auf vermehrte frühe endosomale Strukturen in den endosomalen Fraktionen lieferten Phosphatidylinositolphosphat-Quantifizierungen (vgl. 6.1). PI-3-P ist vor allem in diesen Fraktionen differentiiell erhöht, wobei diese Erhöhung in der IdE am stärksten ausgeprägt ist. Dies deutet darauf hin, dass sich vor allem hier frühe Endosomen befinden, auf die die AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz einen Einfluss besitzt. Da

die absolute Menge an PI-3-P im Cortex und den endosomalen Fraktionen deutlich höher ist als die von PI-3,4-P<sub>2</sub> und PI-3,5-P<sub>2</sub>, aus denen es auch gebildet werden kann, könnte dies hier auf die Bildung von PI-3-P direkt aus Phosphoinositol (PI) hinweisen. Nach heutigem Kenntnisstand wird PI-3-P, neben Klasse II PI-3-Kinasen, vor allem von der Klasse III PI-3-Kinase hVps 34 aus PI gebildet [Vanhaesebroeck *et al.* 2012]. Eine veränderte Proteinmenge von hVps 34 konnte nicht gezeigt werden (vgl. 6.1), was auf eine Veränderung von deren Regulation oder einen veränderten PI-3-P-Metabolismus in defizienten Neuronen hinweist. Ob der AP-1/σ1B-Komplex hierauf einen direkten oder indirekten Einfluss hat, müsste durch weitere Experimente untersucht werden. Einen weiteren Hinweis auf eine Veränderung früher Endosomen lieferten die biochemisch identifizierten differentiellen Veränderungen von Mitgliedern des frühen endosomalen SNARE-Komplexes (vgl. 4.2.5). Da Bethani *et al.* gezeigt haben, dass eine deutliche Reduktion eines SNARE-Proteins keinen erkennbaren Phänotyp hervorruft [Bethani *et al.* 2007], kann anhand der differentiellen Veränderung eines endosomalen SNARE-Proteins nicht zwangsläufig auf die Tendenz einer möglichen Veränderung von einem Organell geschlossen werden. Die Summe dieser Resultate zeigt, dass die AP-1/σ1B-Defizienz eine Veränderung sowie einen Anstieg von frühen Endosomen hervorruft.

Unter Berücksichtigung der Resultate aller Quantifizierungen konnten für das frühe endosomale Markerprotein Rab 5 keine oder keine einheitlichen Veränderungen identifiziert werden. Auch für Appl-positive Endosomen konnten keine Veränderungen festgestellt werden. Dies weist darauf hin, dass die AP-1/σ1B-Defizienz möglicherweise eine selektive Veränderung einer frühen endosomalen Population hervorruft. Darüber hinaus bestätigen die in dieser Arbeit beschriebenen endosomalen Veränderungen die, die bereits von Glyvuk *et al.* mikroskopisch festgestellt worden waren, und liefern einen Hinweis darauf, dass es sich bei deren elektronenmikroskopischen Beobachtungen um veränderte frühe endosomale Strukturen handeln könnte.

Durch die iTRAQ™-Quantifizierungen konnten keine weiteren Proteine identifiziert werden, die spezifisch für frühe Endosomen sind. Die größte Schwierigkeit bei der Identifikation von endosomalen Proteinen liegt voraussichtlich zum einen an deren peripheren Membranassoziation, was eine Abreicherung dieser Proteine während des Aufreinigungsprozesses begünstigt, sowie an deren geringen Anzahl. Die Komposition bestimmter Rab-Proteine ist spezifisch für bestimmte endosomale Populationen. Aufgrund der geringen Menge an detektierbaren Rab-Proteinen in den iTRAQ™-Experimenten war eine aussagekräftige Bestimmung von deren Proteinveränderungen durchweg nicht möglich. Eine Analyse dieser Proteine, die mit der iTRAQ™-Methode identifiziert wurden (vgl. 5.9), konnte jedoch die Existenz von frühen endosomalen

Strukturen in der IdE sowie der hdE bestätigen und lieferte einen Hinweis auf weitere, späte endosomale Populationen, die vor allem in der IdE zu finden sind.

### 7.5.2 Veränderungen später endosomaler Proteine

Im Cortex, in Synaptosomen sowie in den endosomalen Fraktionen zeigten Western-Blot-Quantifizierungen eine differentielle Reduktion von Tsg 101 (vgl. 3.3 und 4.2.4), einem Mitglied der ESCRT-I-Maschinerie. Teile dieser Maschinerie sind bereits auf frühen Endosomen zu finden [Raiborg *et al.* 2002, Sachse *et al.* 2002]. Die Reduktion von Tsg 101 könnte neben dem Hinweis auf eine Steigerung von Teilen des degradativen Weges auch einer auf die Veränderung von frühen Endosomen sein. Darüber hinaus ist Syntaxin 16 verändert (vgl. 4.2.5), welches sowohl an frühen Endosomen als auch an Recyclingendosomen lokalisiert ist. Dies liefert einen Hinweis auf die Veränderungen zumindest von Teilen des späten endosomalen Weges und eine Hochregulation des degradativen Weges. Die iTRAQ™-Quantifizierung lieferte jedoch keinen Hinweis auf eine grundlegende Veränderung des späten endosomalen Weges, was eine spezifische Beteiligung des AP-1/ $\sigma$ 1B-Komplexes an der frühen endosomalen Sortierung unterstützt. Im Vergleich zur Menge an PI-3-P ist die des auf späten Endosomen angereicherten PI-3,5-P<sub>2</sub> in den endosomalen Fraktionen signifikant geringer. Gemeinsam mit der geringen Zahl an massenspektrometrisch identifizierten späten endosomalen Proteinen liefern diese Beobachtungen einen Hinweis darauf, dass in den endosomalen Fraktionen mehr frühe als späte Endosomen angereichert sind.

Zusammen mit der spezifischen Identifikation von Rab-Proteinen später Endosomen sowie des endolysosomalen, degradativen Weges weisen diese Beobachtungen im Ganzen darauf hin, dass vor allem in der hdE Proteine dieser Transportwege angereichert sind. Bei der IdE handelt es sich um eine Fraktion, in der Proteine des frühen und bei der hdE um eine, in der Proteine des späten endosomalen Weges angereichert sind. Diese Erkenntnisse untermauern die Ergebnisse, die auf zwei unterschiedliche Proteinzusammensetzungen der Fraktionen D4 und E5 hinweisen.

Biochemisch konnten keine Veränderungen Appl-positiver Endosomen gezeigt werden. Auch die iTRAQ™-Analyse lieferte keinen Hinweis auf die Veränderung weiterer endosomaler Populationen. Dies unterstützt die Vermutung eines vornehmlichen Einflusses des AP-1/ $\sigma$ 1B-Komplexes auf eine bestimmte frühe, Appl-negative endosomale Population.

### 7.5.3 Veränderungen von Hüllenproteinen

Hervorgerufen durch die AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz wurden Veränderungen von Hüllenproteinen (*coat proteins*) des AP-1 oder AP-2 vermittelten Transports beobachtet. Trotz des

Ausschaltens des  $\sigma$ 1B-Adaptins ist im Cortex keine signifikante differentielle Veränderung der AP-1-Menge zu erkennen. In Synaptosomen ist diese differentiel reduziert, dies ist ein starkes Indiz für die synaptosomale Lokalisierung des AP-1/ $\sigma$ 1B-Komplexes. Die Proteinmenge des AP-2-Komplexes ist im Cortex und in Synaptosomen differentiel erhöht, wobei auch diese Veränderung für Synaptosomen besonders ausgeprägt ist (vgl. 3.2). Mit Hilfe der iTRAQ™-Analyse wurden in der IdE vier AP-2 Adaptine ( $\alpha$ ,  $\beta$ 2,  $\mu$ 2 und  $\sigma$ 2) und in der hdE nur eines ( $\mu$ 2) identifiziert. Dies bedeutet, dass in der hdE die AP-2-Menge insgesamt geringer ist als in der IdE und dass das  $\mu$ 2-Adaptin, welches ein Teil der Kerndomäne dieses AP-Komplexes ist, mit dieser Methode am besten detektiert werden kann (vgl. 5.7 und 5.8). Der AP-2-Komplex bindet nicht an Endosomen und vermittelt auch keine Vesikelbildung von diesen Kompartimenten. Eine Kofraktionierung des AP-2-Komplexes mit den endosomalen Fraktionen ist von daher nicht ohne weiteres naheliegend. Möglicherweise findet die Abstreifung der Vesikelhülle (*uncoating*) in räumlicher Nähe zu endosomalen Kompartimenten statt, was zu einer Kofraktionierung führt. Durch Western-Blot- und iTRAQ™-Quantifizierungen konnte gezeigt werden, dass der AP-2-Komplex in der IdE differentiel erhöht und in der hdE differentiel reduziert ist. Gemeinsam mit dem differentiellen Anstieg der AP-2-Menge im Besonderen in Synaptosomen weist dies auf eine Erhöhung der clathrinvermittelten Endozytose (*clathrin mediated endocytosis*, CME) im Speziellen in Synaptosomen hin. Der differentielle Anstieg von AP-2 nur in der IdE, nicht aber in der hdE, weist gemeinsam mit der Tatsache, dass in der IdE mehr AP-2-Komplexe als in der hdE identifiziert wurden, darauf hin, dass zumindest Teile des AP-2-vermittelten Transportweges vorwiegend mit der IdE kofraktionieren.

Durch die iTRAQ™-Quantifizierung konnten in der IdE drei ( $\beta$ 1,  $\gamma$ 1 und  $\sigma$ 1A) und in der hdE vier ( $\beta$ 1,  $\gamma$ 1,  $\mu$ 1 und  $\sigma$ 1A) AP-1-Adaptine identifiziert werden, was auf eine Beteiligung des AP-1 an der endosomalen Sortierung in beiden Fraktionen hinweist. Weder durch diese Quantifizierung noch durch Western-Blot-Quantifizierungen konnten signifikante differentielle Veränderungen in der IdE oder hdE gezeigt werden. Die Nichtidentifikation des  $\sigma$ 1C Adaptins steht im Einklang mit den gewebsspezifischen Expressionsprofilen der  $\sigma$ 1-Adaptine [Riel 2004] (vgl. Abb. 1-18). Da die Menge des  $\sigma$ 1A-Adaptins, genauso wie die weiterer AP-1-Adaptine, durch die  $\sigma$ 1B-Defizienz nicht signifikant verändert wird, weist dies darauf hin, dass es in den endosomalen Fraktionen zu keiner Kompensation des  $\sigma$ 1B durch das  $\sigma$ 1A-Adaptin kommt. Aufgrund des neuronalen Phänotyps AP-1/ $\sigma$ 1B-defizienter Mäuse kann eine vollständige Kompensation der Funktionen des  $\sigma$ 1B- durch die des  $\sigma$ 1A-Adaptins im Gehirn ausgeschlossen werden. Der Hinweis, dass die Funktionen des  $\sigma$ 1B-Adaptins in den endosomalen Fraktionen nicht kompensiert werden können, weist hier auf dessen spezifischen Einfluss auf

die differentiellen Proteinveränderungen hin. Darüber hinaus weisen diese Ergebnisse indirekt darauf hin, dass das  $\sigma$ 1A-Adaptin die essentielle Isoform in den endosomalen Fraktionen ist, da sie hier den iTRAQ™-Resultaten zufolge die vorherrschende des heterotetrameren AP-1-Komplexes in  $\sigma$ 1B-defizienten Neuronen ist.

Neben dem AP-1- und AP-2-Komplex wurden mehrere weitere Hüllenproteine identifiziert, die differentiell verändert sind. Borner *et al.* haben die im Zuge einer Proteomanalyse von clathrinumhüllten Vesikeln (*clathrin coated vesicles*, CCVs) identifizierten Proteine in zwei Gruppen unterteilt, eine mit endozytotischen, AP-2-haltigen Vesikeln assoziierte und eine mit intrazellulären, AP-1-haltigen Vesikeln assoziierte Gruppe [Borner *et al.* 2012]. Von den veränderten Hüllenproteinen konnten nach Borner *et al.* Aak 1, Epsin 2 und AP 180 endozytotischen, Arf 1 und Arf-GAP 1 intrazellulären und Clc, Chc, Auxilin und Gak beiden Vesikelpools zugeordnet werden. Bis auf das Protein Chc, für welches es voraussichtlich zu einer Umverteilung zwischen einem zytoplasmatischen und einem vesikulären Pool kommt (vgl. 3.2), sind alle diese Hüllenproteine reduziert (vgl. 5.11.1 und Anhang, Abb. A-1). Arf 1 und sein regulatorisches GAP Arf-GAP 1 sind für die Rekrutierung und Anbindung von AP-1 an Membranen essentiell. Die differentiellen Reduktionen dieser beiden Proteine wiesen auf einen speziellen Defekt des AP-1 vermittelten vesikulären Transports hin, der durch die AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz hervorgerufen wird. Aak 1, Epsin 2 und AP 180 wurden der Hülle von endozytotischen Vesikeln zugeordnet, jedoch weist der Anstieg des AP-2-Komplexes auf eine gesteigerte CME hin, was im Widerspruch zu einer Reduktion dieser Proteine gesehen werden kann. Der überwiegende Teil der Erkenntnisse über die Zusammensetzung von Hüllenproteinen stammt aus der Analyse der AP-2 vermittelten CME, jedoch wurden erheblich weniger Untersuchungen und Charakterisierungen von Vesikeln des intrazellulären AP-1 vermittelten Transports durchgeführt. Die differentielle Reduktion von Aak 1, Epsin 2 und AP 180 könnte folglich darauf hinweisen, dass diese Proteine auch am AP-1 vermittelten Transport beteiligt sind. Möglicherweise führt die AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz zu einer Umverteilung von diesen Proteinen auf CCVs der AP-2 vermittelten Endozytose. Die differentielle Reduktion könnte damit erklärt werden, dass diese CCVs möglicherweise nicht in den endosomalen Fraktionen angereichert sind. Eine Beteiligung von Proteinen an der AP-1 vermittelten Vesikelbildung, für die bis heute von einer Assoziation mit endozytotischen AP-2-haltigen Vesikeln ausgegangen wird, sollte diesen Beobachtungen zufolge nicht ausgeschlossen werden.

Neuronauxilin sowie die ubiquitäre Gak (*cyclin-G-dependent kinase*) fungieren als Kochaperone und unterstützen die Hsc 70 abhängige Clathrinhüllenabstreifung (*uncoating*) [Guan *et al.* 2010, Yim *et al.* 2010]. In Synapsen besitzt Auxilin eine spezifische Funktion am SV-Recycling. Das Ausschalten von Auxilin führt zu einer Beeinträch-

tigung der CME und führt zu einer Anreicherung von CCVs und leeren Clathrinkäfigstrukturen [Yim *et al.* 2010]. Auch ein Ausschalten der Gak führt zu einer Beeinträchtigung der CME und darüber hinaus wird die Membrananbindung von AP-1 und AP-2 deutlich beeinträchtigt [Lee *et al.* 2005]. Im Gegensatz zu Synaptosomen sind in der ldE und der hdE sowohl Auxilin als auch GAK differenziell reduziert. Dies deutet stark auf eine beeinträchtigte Bildung von bestimmten CCVs hin. Aufgrund der gesteigerten AP-2 vermittelten CME sowie der Spezifität der Auxilin- und GAK-Reduktionen in der ldE und hdE ist deren Reduktion voraussichtlich ein Hinweis auf die AP-1/ $\sigma$ 1B vermittelte CCV-Bildung in diesen Fraktionen und somit aller Voraussicht nach von endosomalen Kompartimenten. Die differentielle Reduktion im Besonderen von Auxilin liefert einen Hinweis auf die molekulare Ursache des elektronenmikroskopisch beobachteten vermehrten Auftretens von clathrinumhüllten Strukturen in defizienten Synapsen.

Während Auxilin an der Abstreifung der Clathrinhülle beteiligt ist, vermittelt Synaptojanin 1 die Ablösung von AP-Komplexen von Vesikeln [Yim *et al.* 2010]. Dies steht im Einklang mit den biochemischen und massenspektrometrischen Ergebnissen dieser Arbeit: Eine Reduktion von Auxilin und GAK führt zu einer Beeinträchtigung der CCV-Bildung. Synaptojanin 1 sowie der AP-1-Komplex sind in den vesikulären Fraktionen differentiell nicht verändert, was bei einer Beeinträchtigung der AP-Komplexablösung von Membranstrukturen zu erwarten gewesen wäre. Ob die Reduktionen von Auxilin und GAK jedoch zu einer differentiellen Veränderung der AP-1-Menge auf CCVs führt, müsste in weiteren Experimenten untersucht werden.

Sorting Nexin 3 (Snx 3) ist ein Mitglied der Proteinfamilie der Snx-Proteine, die eine BAR-Domäne aufweisen, über welche sie bevorzugt an gekrümmte Membranbereiche anbinden oder eine Membrankrümmung vermitteln. Snx 3 ist an der frühen endosomalen Sortierung beteiligt und ist an frühen Endosomen lokalisiert. Unter der Beteiligung von Clathrin findet eine Anbindung von Snx 3 und weiteren Proteinen, die eine Membrankrümmung vermitteln, statt [Johannes und Wunder 2011]. Ziel dieser Proteinrekrutierungen ist die Bildung von Vesikeln des retrograden Transports. An dieser Vesikelbildung sowie der Rekrutierung von Transportproteinen ist, wie in vorangegangenen Arbeiten unserer Forschungsgruppe gezeigt werden konnte, aller Voraussicht nach der AP-1-Komplex beteiligt [Meyer *et al.* 2001, Medigeshi und Schu 2003]. Im AP-1/ $\sigma$ 1B-defizienten Cortex ist Snx 3 reduziert. Diese Reduktion ist in Synaptosomen differentiell stärker ausgeprägt. Am deutlichsten ist die Reduktion in den endosomalen Fraktionen ldE und hdE (vgl. 5.11.1). Diese Reduktion liefert einen weiteren Hinweis auf die Veränderung synaptosomaler, endosomaler Strukturen sowie auf eine Beeinträchtigung der möglicherweise AP-1/ $\sigma$ 1B vermittelten CCV-Bildung von synaptosomalen frühen Endosomen.

### 7.5.4 Veränderungen von SV und deren Transport

Von Glyvuk *et al.* konnte in vorangegangenen Experimenten gezeigt werden, dass das Ausschalten des  $\sigma 1B$ -Adaptins zu einer Reduktion der SV-Anzahl führt und ein beeinträchtigt SV-Recycling hervorruft [Glyvuk *et al.* 2010]. Im Cortex, in Synaptosomen sowie in den Fraktionen D und E waren keine signifikanten Veränderungen synaptischer Markerproteine zu erkennen (vgl. 5.11.1), jedoch zeigen Western-Blot-Analysen der aufgereinigten Fraktionen D und E für diese Markerproteine eine tendenzielle Reduktion (vgl. 4.3.1). Durch die iTRAQ™-Analyse konnte gezeigt werden, dass von der ldE 45% und der hdE 38% aller identifizierten Proteine dem vesikulären Transport zugeordnet werden können. Der überwiegende Anteil dieser Proteine sind solche von SV oder des SV-Transports, was neben der Anreicherung von Endosomen auf eine von SV in diesen beiden Fraktionen schließen lässt. Im Mittel sind die SV-Proteine differenziell reduziert, wobei die iTRAQ™-Daten keinen Hinweis auf die Veränderung eines bestimmten Bereichs des SV-Zyklus zeigten, wie beispielsweise die Endo- oder die Exozytose. Dies bestätigt die zuvor gewonnenen Resultate eines beeinträchtigten SV-Zyklus in defizienten Neuronen [Glyvuk *et al.* 2010].

Wie erst kürzlich wieder durch hochauflösende 3D-Echtzeitfluoreszenzmikroskopie gezeigt werden konnte, können SV entsprechend ihrer Fusions- und Recyclingskinetik in verschiedene Pools unterteilt werden. So findet die transiente Fusion (*kiss-and-run*) überwiegend im Zentrum und eine vollständige Fusion von SV (*full-collapse fusion*) überwiegend an der Peripherie der Aktiven Zone statt. Vesikel, die eine transiente Fusion durchlaufen, stammen zumeist aus dem *readily releasable pool* (RRP) und befinden sich in unmittelbarer Nähe zur Aktiven Zone [Park *et al.* 2012]. Vesikel des Recycling-Pools, der sich in der Nähe der Aktiven Zone befindet, werden vorwiegend über die AP-2 vermittelte CME recycelt [Voglmaier und Edwards 2007].

Während der überwiegende Teil synaptischer Vesikelproteine differenziell reduziert oder nicht signifikant verändert ist, sind die Calcium/Calmodulin-abhängigen Kinasen CaMK-II $\alpha$  und  $\delta$  erhöht. Postsynaptisch spielen sie eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung und der Regulation der Langzeitpotentierung (*long-term potentiation*, LTP) [Lisman *et al.* 2012]. Aufgrund des verschwindend geringen Anteils an postsynaptischen Proteinen in den Fraktionen D4 und E5, so konnten hier beispielsweise keine NMDAR- oder AMPAR-Proteine identifiziert werden (vgl. 5.10), ist die Veränderung der CaMK-II-Proteine möglicherweise auf präsynaptische Effekte zurückzuführen. Von Hojjati *et al.* wurden mehrere präsynaptische Funktionen von CaMK-II $\alpha$  beschrieben. Unabhängig von ihrer Kinaseaktivität ist CaMK-II $\alpha$  an der Modulation der kurzzeitigen präsynaptischen Plastizität beteiligt, indem sie die Zahl der mit der Aktiven Zone ver-

ankerten SV (*docked SV*) reguliert [Hojjati *et al.* 2007]. Der Anstieg von CaMK-II $\alpha$ , und möglicherweise auch der von CaMK-II $\delta$  im Zuge der AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz, könnte eine regulatorische Antwort auf die Reduktion des SV-Pools sein. Hojjati *et al.* haben festgestellt, dass die CaMK-II $\alpha$  an der Regulierung der „synaptischen Augmentierung“ (die sich durch eine erhöhte und verlängerte Wirkungskraft einer synaptischen Reizübertragung auszeichnet) beteiligt ist [Hojjati *et al.* 2007]. Mit einer Steigerung der synaptischen Augmentierung geht eine Erhöhung der Exozytoseeffizienz synaptischer Vesikel einher, die sich in der Nähe der Aktiven Zone befinden [Stevens und Wesseling 1999]. In AP-1/ $\sigma$ 1B-defizienten Neuronen wurde keine Veränderung der Anzahl an *docked SV* beobachtet [Glyvuk *et al.* 2010]. Die differentielle Erhöhung von CaMK-II $\alpha$  und möglicherweise auch von CaMK-II $\delta$  kann vermutlich im Zusammenhang mit einer effizienteren SV Verankerung und SV Fusion mit der Aktiven Zone gesehen werden. Dies wäre ein Hinweis auf die, zumindest teilweise, Kompensation der Reduktion der SV Anzahl in AP-1/ $\sigma$ 1B-defizienten Neuronen, wie diese bereits von Glyvuk *et al.* postuliert wurde [Glyvuk *et al.* 2010].

Neben den Veränderungen der CaMK-II-Proteine liefert auch die differentielle Veränderung des AP-2-Komplexes einen Hinweis auf die Veränderung des SV-Recyclings. Während SV, die über einen AP-1 abhängigen Weg unter der Beteiligung einer endosomalen Sortierung gebildet werden, voraussichtlich in den Reservepool gelangen, gelangen SV, die über die AP-2 abhängige CME gebildet werden, in den Recyclingpool [Voglmaier und Edwards 2007, Hua *et al.* 2011]. Die differentielle Erhöhung von AP-2/ $\alpha$  in Synptosomen sowie der IdE weist auf eine Steigerung der CME hin, welche möglicherweise im Zuge des beeinträchtigten AP-1 vermittelten SV-Recyclings hochreguliert wird und vermutlich zu einer Veränderung der SV-Pools führt. Auf Veränderungen der SV-Recyclingpools weist zusätzlich die Reduktion von Aktinproteinen hin, die auf eine mobilere Vesikelpopulation in defizienten Neuronen schließen lässt (vgl. 5.7.2). Neben einer effizienteren SV Anbindung und Fusion mit der Aktiven Zone wäre eine Erhöhung der Anzahl an mobilen SV eine weitere Möglichkeit, wie die Reduktion der SV Anzahl kompensiert werden könnte.

Eine Reduktion von SV-Proteinen konnte durch Western-Blot- und iTRAQ™-Quantifizierungen nur in den aufgereinigten endosomalen, vesikulären Fraktionen gezeigt werden. Haberman *et al.* haben kürzlich den Einfluss einer Vamp 2-Defizienz auf die synaptische Sortierung beschrieben. Der Verlust des SV-SNARE-Proteins Vamp 2, welches darüber hinaus mit dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten SV-Marker Synaptotagmin 1 kolokalisiert, ruft eine langsame neuronale Degeneration hervor, die unabhängig von der Neurotransmitterfreisetzung ist. Sie konnten zeigen, dass Vamp 2 über die SV-Lokalisation hinaus mit dem synaptosomalen endolysosomalen System,

und hier vor allem mit frühen Endosomen, kolokalisiert. Die Vamp 2-Defizienz führt zu einer leichten SV Reduktion und einer Anhäufung von endosomalen vesikulären Strukturen. Darüber hinaus ist der Transport von Proteinen, die am degradativen Weg beteiligt sind, wie V-ATPasen, gestört [Haberman *et al.* 2012]. Dies zeigt einen Einfluss zumindest dieses SV-SNARE-Proteins (Vamp 2) auf neuronale Transportwege abseits der SV-Fusion. Möglicherweise besitzen auch weitere Proteine, denen bis heute eine ausschließliche Beteiligung an der Exozytose zugeschrieben wird, weitere bis heute noch unbekannt neuronale Funktionen. So konnte beispielsweise für Synaptotagmin 1 eine unabhängige Funktion an der Exo- und Endozytose gezeigt werden. Während beide Prozesse  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen sind, verlaufen sie doch mechanistisch jeweils unterschiedlich [Yao *et al.* 2012]. Die Beobachtungen von Haberman *et al.* können mit denen der AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz in Verbindung gebracht werden, die ebenfalls eine Reduktion von SV sowie eine Veränderung und einen teilweisen Anstieg des endolysosomalen Weges hervorruft. Vermutlich führt das durch die AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz verursachte beeinträchtigte SV-Recycling zu Veränderungen des endolysosomalen Weges oder umgekehrt. Auch ein direkter Einfluss des AP-1/ $\sigma$ 1B-Komplexes auf beide Wege ist nicht ausgeschlossen. Während Haberman *et al.* einen Anstieg von SV und Veränderungen des endolysosomalen Weges zeigen konnten, die durch eine Vamp 2-Defizienz hervorgerufen werden, konnten sie keine signifikanten Veränderungen von SV-Markern feststellen [Haberman *et al.* 2012]. Auch in dieser Arbeit waren in den nicht weiter aufgereinigten Fraktionen keine Veränderungen von SV-Markern zu erkennen, obwohl sowohl mikroskopisch als auch massenspektrometrisch in defizienten Neuronen eine Reduktion von SV festgestellt wurde. Möglicherweise führt sowohl die Defizienz von Vamp 2 als auch die von AP-1/ $\sigma$ 1B zu einer Fehlsortierung von SV-Proteinen durch endosomale Kompartimente, in deren Folge es zu einer Umverteilung von diesen Proteinen in den endolysosomalen Weg kommt. Dies würde eine Erklärung dafür liefern, dass keine differentiellen Veränderungen der SV-Proteinmengen in den nicht weiter aufgereinigten endosomalen Fraktionen zu erkennen sind. Darüber hinaus liefert dies ein Hinweis darauf, dass es sich bei den SV-Recyclingwegen und endolysosomalen Wegen um verwandte Wege handelt, die im Dichtegradienten kofraktionieren. Wäre dies nicht der Fall, so hätte eine differentielle Veränderung der SV-Markerproteine zu erkennen gewesen sein sollen.

Zusammenfassend konnte bezüglich des synaptischen, vesikulären Pools festgestellt werden, dass mit Ausnahme der Endozytose alle übrigen Bereiche des SV Zyklus durch die AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz beeinträchtigt werden. Die Folge hiervon ist eine Reduktion der SV Anzahl. (vgl. auch [Glyvuk *et al.* 2010]). Während es voraussichtlich zu einer Steigerung des SV-Zyklus durch den Recyclingpool und möglicherweise zu

einer effizienteren SV-Fusion mit der Aktiven Zone kommt, ist der AP-1/ $\sigma$ 1B vermittelte, endosomale Recyclingweg beeinträchtigt.

In den endosomalen Fraktionen gehört ein Drittel bis zu einer Hälfte der Anzahl von allen identifizierten Proteinen der Proteingruppe des Energiestoffwechsels an, welche in erster Linie als Kontamination angesehen werden muss. Überraschenderweise ist diese Proteingruppe sowohl in der IdE als auch der hdE im Mittel differentiell reduziert (vgl. 5.10). Aufgrund des hohen Anteils dieser Proteine am Proteom der endosomalen Fraktionen können sehr wahrscheinlich experimentelle Fehlerquellen ausgeschlossen werden, die zu dieser Reduktion führen. Möglicherweise steht diese Reduktion im Zusammenhang mit der Reduktion des SV-Recyclings, welches gemeinsam mit der Reduktion von weiteren AP-1/ $\sigma$ 1B-vermittelten Recyclingwegen zu einem verringerten synaptischen Energiebedarf führt.

Darüber hinaus könnte auch die differentielle Reduktion der V-ATPase-Untereinheiten ein weiterer Hinweis auf eine Reduktion der SV-Anzahl sein, da in diesem Fall weniger Kopien dieser ATPasen für die Azidifizierung der SV vonnöten wären [Takamori *et al.* 2006].

Des Weiteren konnte durch PI-4-P-Quantifizierungen gezeigt werden, dass dieses Phosphoinositolphosphat in der IdE reduziert ist (vgl. 6.3). Auf SV ist PI-4,5-P<sub>2</sub> angereichert und wird durch die Phosphatase Synaptojanin 1 in PI-4-P umgewandelt, wodurch die Abstreifung von AP-2-Komplexen von der Vesikelhülle eingeleitet wird [Cremona *et al.* 1999, Yim *et al.* 2010]. Die differentielle Reduktion von PI-4-P in der IdE stellt einen weiteren Hinweis auf eine SV-Reduktion dar, da es die Membrananbindung des AP-1-Komplexes vermittelt. Möglicherweise wird versucht, die SV-Reduktion durch ein gesteigertes SV-Recycling, abseits des AP-1/ $\sigma$ 1B-vermittelten Weges, und eine effizientere Vesikelfusion des RRP sowie des Recyclingpools zu kompensieren. Neben anderen Beobachtungen liefern die SV-Marker, die nur in den aufgereinigten Fraktionen verändert sind, einen Hinweis auf eine Veränderung des endolysosomalen Weges und eine Beteiligung dieses am SV-Recycling. Eine mehrheitliche Erhöhung von Proteinen des degradativen Weges könnte auf einen gesteigerten Abbau von möglicherweise fehlsortierten Proteinen des AP-1/ $\sigma$ 1B vermittelten SV-Recyclings hinweisen (vgl. 5.8.1).

### 7.5.5 Veränderungen von ‚dense core vesicle‘ Proteinen

Mit Hilfe der iTRAQ<sup>TM</sup>-Analyse wurden nur wenige Proteine identifiziert, die auf bzw. in *dense core vesicles* (DCV) angereichert sind, was auf einen geringen Anteil dieser Strukturen an der IdE und hdE hinweist. Gemeinsam mit Western-Blot-Quantifizierungen konnte gezeigt werden, dass diese Proteine in der Tendenz reduziert

sind (vgl. 5.11.1). DCVs sind Träger von sekretorischen Proteinen, wie Hormonen oder Neurotransmittern, welche sie auf dem exozytotischen Weg freisetzen können. Hieran ist das *secretory carrier membrane protein* (Scamp 1) beteiligt [Liao *et al.* 2008, Zhang und Castle 2011]. Während die neuronalen Funktionen von Rab 2 lange Zeit unbekannt waren, konnte in den vergangenen Jahren u. a. eine Beteiligung an der Bildung von DCVs gezeigt werden. Rab 2 verhindert, dass DCV-Proteine in den endolysosomalen Weg übergehen und vermittelt darüber hinaus die Fusion von DCVs mit frühen Endosomen. Mutationen von Rab 2 führen zu vergrößerten DCVs und einem Anstieg von frühen Endosomen sowie Recyclingendosomen [Edwards *et al.* 2009, Sumakovic *et al.* 2009]. Die Reduktion von Scamp 1 und Rab 2 (vgl. 5.11.1) weisen darauf hin, dass die AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz zu einer Veränderung von DCVs führt, welche auch im Zusammenhang mit der Veränderung endosomaler Strukturen stehen könnte. Elektronenmikroskopische Aufnahmen der IdE zeigten vermehrt elektronendichte Strukturen (vgl. 5.1), was gemeinsam mit dem differentiellen Anstieg von DCV-Proteinen, insbesondere in Synptosomen (vgl. 5.11.1), ein Hinweis auf einen möglichen Anstieg von DCVs in synptosomalen Bereichen sein könnte.

### 7.5.6 Stressgranula

Stressgranula sind mRNA-haltige Zusammenschlüsse, die in der Folge von zellulärem Stress gebildet werden [Ash *et al.* 2010]. Neben dem in Stressgranula angereicherten Protein Perq 2 wurden massenspektrometrisch in der hdE weitere Stressgranulaproteine identifiziert. Darüber hinaus wurde in dieser Fraktion eine Vielzahl von ER-Proteinen identifiziert, was auf eine Kofraktionierung von RNA-Granula mit dieser Fraktion hindeuten könnte (vgl. 5.7), wie diese von Blondeau *et al.* beschrieben wurden [Blondeau *et al.* 2004]. Ob es sich bei diesen beiden genannten Granula-Populationen um eng miteinander verwandte Strukturen handelt, ist nicht bekannt. Ein differentieller Anstieg von Perq 2-positiven Strukturen ist vor allem in Synptosomen zu erkennen (vgl. 5.11.1). Dies weist auf einen, möglicherweise indirekten, Einfluss der AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz auf zelluläre Sortiermechanismen abseits der späten sekretorischen Sortierung hin oder könnte eine unspezifische zelluläre Stressantwort auf diese Defizienz sein. Darüber hinaus weisen die Beobachtungen stark auf eine neuronale Funktion von Perq 2 hin, was mit dessen möglicher Beteiligung an der Entwicklung der Parkinson-Krankheit steht [Wang *et al.* 2010, Tan und Schapira 2010].

Ein möglicherweise direkter oder indirekter Zusammenhang zwischen dem Anstieg von Stressgranula und dem von DCVs kann nicht ausgeschlossen werden. Ob der Anstieg von elektronendichten Strukturen in der Elektronenmikroskopie möglicherweise auf

Stressgranula, DCVs oder weitere Strukturen zurückgeführt werden kann, müsste beispielsweise über eine Immunogold-Färbung geklärt werden.

## 7.6 Synaptosomale Funktionen des AP-1/ $\sigma$ 1B-Komplexes

Durch Western-Blot-Quantifizierungen konnte gezeigt werden, dass die AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz im Cortex keine differentiellen Veränderungen von Markerproteinen des Golgi-Apparats (GM 130) sowie des TGN (TGN 38) hervorruft (vgl. 3.1). Im Proteom von axonalen Wachstumskegeln (*growth cone*) wurden Strukturproteine des Golgi und des TGN identifiziert [Estrada-Bernal *et al.* 2012]. In den aufgereinigten Fraktionen D4 und E5 konnten in der iTRAQ™-Analyse jedoch keine Strukturproteine des endoplasmatischen Retikulums (ER), des Golgi-Apparats sowie des TGN nachgewiesen werden. Der Anteil von Proteinen des frühen sekretorischen vesikulären Transports war darüber hinaus gering und es zeigten sich hier keine differentiellen Veränderungen (vgl. 5.7 und 5.8). Die AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz führt folglich zu keinen funktionellen Veränderungen des frühen sekretorischen Weges, sodass ein direkter Einfluss des AP-1/ $\sigma$ 1B-Komplexes auf diese Kompartimente sehr wahrscheinlich ausgeschlossen werden kann.

Mit Hilfe der iTRAQ™-Analyse wurden, neben anderen, Hinweise auf vermutlich indirekte Effekte der AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz auf Synaptosomen festgestellt. Neuronale Wachstumsproteine sind im Mittel differentiell reduziert und darüber hinaus konnten Veränderungen von Gliaproteinen gezeigt werden. Diese Veränderungen könnten eine Folge des reduzierten synaptischen Vesikelrecyclings sein, mit dem wahrscheinlich eine Reduktion der synaptischen Reizübertragung einhergeht. Die Intensität der Reizübertragung ist entscheidend für die Ausbildung und Aufrechterhaltung von synaptischen Kontakten und hat somit auch einen Einfluss auf die neuronale Entwicklung [Cline und Haas 2008]. Eine Reduktion der synaptischen Aktivität führt möglicherweise zu einem reduzierten neuronalen Wachstum, in dessen Folge es auch zu Veränderungen von Gliazellen kommt, wobei ein direkter Einfluss der AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz auf Gliazellen nicht ausgeschlossen werden kann (vgl. 5.10). Sonstige GTPasen und neuronale regulatorische Proteine sind kaum verändert.

Ob der AP-1/ $\sigma$ 1B-Komplex darüber hinaus an der Entstehung von DCVs und Stressgranula beteiligt ist oder ob es sich bei dessen differentieller Veränderung um indirekte Effekte der AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz handelt, kann nicht mit Sicherheit gesagt werden.

Neben diesen vermutlich indirekten Effekten konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit viele starke Hinweise auf eine direkte Beteiligung des AP-1/ $\sigma$ 1B-Komplexes an der synaptosomalen, vesikulären, endosomalen Sortierung gewonnen werden, welche nachfolgend detailliert beschrieben werden. Jedoch soll an dieser Stelle erwähnt wer-

den, dass es sich hierbei noch nicht um endgültige Beweise handelt. Diese müssten durch weitere Experimente erbracht werden.

In den Fraktionen, in denen sich vor allem membrangebundene Proteine befinden (hdE und ldE), ist eine Reduktion von Proteinen, die an der AP-1-Membranrekrutierung beteiligt sind, wie Arf 1 und Arf-GAP 1, genauso zu erkennen wie die von Auxilin und Gak, welche an der Hüllenabstreifung von CCVs beteiligt sind. Darüber hinaus wurden in AP-1/ $\sigma$ 1B-defizienten Synapsen vermehrt clathrinumhüllte Strukturen beobachtet, was auf eine beeinträchtigte Hüllenabstreifung (*uncoating*) hindeutet [Glyvuk *et al.* 2010]. Dies weist darauf hin, dass der AP-1/ $\sigma$ 1B-Komplex zumindest an der Rekrutierung dieser Proteine beteiligt ist, die für die CCV-Bildung und deren *uncoating* von zentraler Bedeutung sind. Die Reduktion von PI-4-P in der ldE könnte ein Hinweis darauf sein, dass der AP-1/ $\sigma$ 1B-Komplex nicht nur an der CCV-Entstehung, sondern auch an der Regulation der PI-4-P beteiligt ist, welche ihrerseits für die Anbindung des AP-1/ $\sigma$ 1B-Komplexes entscheidend ist. Darüber hinaus weist die differentielle Snx 3-Reduktion auf eine Funktion des AP-1/ $\sigma$ 1B-Komplexes am retrograden Transport von frühen Endosomen hin.

Für die Biogenese des endolysosomalen Systems spielt Rab 5 eine zentrale Rolle [Zeigerer *et al.* 2012]. Im Zuge der AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz konnten keine Hinweise auf Veränderungen des frühen endosomaln Markers Rab 5 oder grundlegende Veränderungen von Appl-positiven frühen Endosomen gefunden werden. Gemeinsam mit den iTRAQ<sup>TM</sup>-Daten ist dies ein Anzeichen dafür, dass die Defizienz zu keinen generellen Veränderungen des gesamten endolysosomalen Systems führt und der AP-1/ $\sigma$ 1B-Komplex voraussichtlich nur an der Proteinsortierung an einer bestimmten endosomalen Population beteiligt ist.

Durch Rab 5 wird der Klasse-III PI-Kinase-Komplex hVps 34/hVps 15 rekrutiert, welcher PI-3-P bildet [Huotari und Helenius 2011]. PI-3-P ist differentiell erhöht, während Rab 5 und hVps 34 differentiell nicht verändert werden. Dies weist auf eine regulatorische Funktion des AP-1/ $\sigma$ 1B-Komplexes hin, welche im Zuge der AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz zu einer Erhöhung der PI-3-P-Menge führt. Die Menge an PI-3-P auf frühen Endosomen kontrolliert deren Umwandlung in späte Endosomen [Huotari und Helenius 2011] und könnte somit ein Hinweis auf einen indirekten Effekt des AP-1/ $\sigma$ 1B-Komplexes auf den späten endosomalen Weg sein. Veränderungen dieses Weges konnten durch die differentielle Reduktion von Tsg 101 gezeigt werden. Sie steht vermutlich im Zusammenhang mit einer Steigerung des degradativen, ESCRT-vermittelten Weges, welcher an der endosomalen Sortierung in Synapsen beteiligt ist [Uytterhoeven *et al.* 2011]. Diese Steigerung könnte eine Antwort auf die reduzierte AP-1/ $\sigma$ 1B-vermittelte Vesikelbildung von frühen Endosomen sein. Fehlsortierte Proteine könnten über diesen endo-

lysosomalen Weg abgebaut werden. Dies wäre ein Hinweis darauf, dass der AP-1/ $\sigma$ 1B-Komplex auf die Überführung von Proteinen aus der frühen endosomalen Sortierung in den degradativen Weg einen Einfluss besitzt.

Im Gegensatz zu anderen frühen endosomalen Markern ist EEA 1 in defizienten Neuronen erhöht. In synaptosomalen Kompartimenten ist die deutlichste Umverteilung dieses Markers auf Membranstrukturen zu erkennen, was hier auf eine entscheidende Funktion des AP-1/ $\sigma$ 1B-Komplexes hinweist. Zusammen mit frühen Endosomen fraktionieren synaptische Vesikel, deren Recycling gestört und deren Anzahl reduziert ist. Erste Hinweise auf eine Beteiligung von membranumschlossenen Kompartimenten am SV-Recycling wurden von Heuser und Reese beschrieben [Heuser und Reese 1973]. Später konnte eine Beteiligung von endosomalen Strukturen am SV-Recycling festgestellt werden [Fischer von Mollard *et al.* 2004, Takei *et al.* 1996]. Rizzoli *et al.* zeigten, dass ein Teil der endozytierten SV homotypisch fusionieren können oder mit frühen endosomalen Intermediaten fusionieren. Dies warf die Frage auf, ob eine frühe endosomale SV-Recyclingroute obligatorisch ist, nur zum Teil benötigt wird oder den Eintritt von SV in einen degradativen Weg darstellt. Durch den Einfluss von BFA auf das SV-Recycling wurde auf die Notwendigkeit des AP-3 am SV-Recycling durch endosomale Strukturen geschlossen, welches vor allem unter einer starken neuronalen Stimulation der Fall ist [Voglmaier *et al.* 2006, Voglmaier und Edwards 2007]. BFA blockiert ebenfalls die AP-1 vermittelte Vesikelbildung, sodass bei den Beobachtungen von Voglmaier *et al.* sowie von Voglmaier und Edwards eine Beteiligung des AP-1-Komplexes am SV-Recycling auf keinen Fall ausgeschlossen werden sollte. Diese Beobachtungen können dann im Zusammenhang mit dem SV-Recyclingdefekt in AP-1/ $\sigma$ 1B-defizienten Neuronen gesehen werden, welcher ebenfalls unter einer starken Stimulation am signifikantesten ist [Glyvuk *et al.* 2010]. Dies lieferte einen Hinweis darauf, dass die Beteiligung früher Endosomen einerseits und des AP-1/ $\sigma$ 1B-Komplexes andererseits unter einer starken Stimulation am SV-Recycling entscheidend ist. Weitere Hinweise auf eine direkte Beteiligung des AP-1-Komplexes am SV-Recycling lieferten AP-2 „knock-down“ Experimente [Kim und Ryan 2009]. Von Hoopmann *et al.* konnte nicht nur eine endosomale Beteiligung am SV-Recycling untermauert werden, sie zeigten auch, dass dieser Recyclingweg mit einer ähnlichen Geschwindigkeit wie der über die CME verläuft [Hoopmann *et al.* 2009]. Die Tatsache, dass auf synaptischen Vesikeln Proteine angereichert sind, welche für frühe Endosomen charakteristisch sind, weist zusätzlich stark auf eine endosomale Beteiligung am SV-Recycling hin [Pavlos und Jahn 2011].

Die Reduktion der SV-Anzahl in defizienten Synapsen zeigt, dass der AP-1/ $\sigma$ 1B-Komplex eine entscheidende Funktion bei der Wiederauffüllung zumindest von bestimmten SV-Pools besitzt. Die Hinweise auf eine Beeinträchtigung der Hüllenabstrei-

fung (*uncoating*) von Vesikeln, die über einen Clathrin und AP-1/ $\sigma$ 1B vermittelten Weg von frühen Endosomen gebildet werden, könnten eine Ursache für die Veränderung dieser Pools in defizienten Neuronen sein. Die Defizienz führt darüber hinaus vermutlich zu einer Erhöhung eines vesikulären Pools, welcher weniger mit dem Aktinzytoskelett verknüpft ist. Dies ist ein Hinweis darauf, dass der AP-1/ $\sigma$ 1B-Komplex die Sortierung von SV in einen stationären SV-Pool, möglicherweise den *Resting-Pool*, vermittelt, wie dies ebenfalls von Hua *et al.* vorgeschlagen wurde [Hua *et al.* 2011]. Die Spezifität der beschriebenen Funktionen des AP-1/ $\sigma$ 1B-Komplexes wird durch die gleichzeitige Identifikation des ubiquitären  $\sigma$ 1A-Adaptins in den endosomalen Fraktionen erhöht, da auf diese Weise eine mögliche Kompensation der Funktionen des  $\sigma$ 1B-Adaptins durch ein homologes Adaptin ausgeschlossen werden kann. Aufgrund der beschriebenen Funktionen des AP-1/ $\sigma$ 1B-Komplexes sowie des Phänotyps AP-1/ $\sigma$ 1B-defizienter Mäuse kann die von Rizzoli *et al.* aufgeworfene Frage dahingehend beantwortet werden, dass die endosomale Sortierung obligatorisch für ein fehlerfreies SV-Recycling ist.

Frühe endosomale Strukturen in Synapsen sind aller Voraussicht nach eigenständige Sortierungsorganellen, deren Anzahl in Abhängigkeit zur synaptischen Aktivität steht [Uytterhoeven *et al.* 2011]. Der Anstieg früher Endosomen in AP-1/ $\sigma$ 1B-defizienten Synapsen steht wahrscheinlich im Zusammenhang mit einer beeinträchtigten SV-Bildung von diesen Organellen, an der der AP-1/ $\sigma$ 1B-Komplex entscheidend beteiligt ist. Vermutlich sind frühe Endosomen auch an der Qualitätskontrolle der Proteinzusammensetzung von SV beteiligt und sorgen beispielsweise für den Ausschluss von Proteinen der Plasmamembran. Proteine, die nicht in SV sortiert werden, werden vermutlich in den späten degradativen Weg überführt, worauf die differentielle Reduktion von Tsg 101 in defizienten Neuronen hinweist.

Durch den Einfluss der AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz auf Synaptosomen sowie synaptosomale, endosomale Fraktionen konnte gezeigt werden, dass das SV-Recycling unter der Beteiligung von frühen endosomalen Kompartimenten vollzogen wird und der AP-1/ $\sigma$ 1B-Komplex mit höchster Wahrscheinlichkeit direkt an dieser endosomalen Sortierung sowie der SV-Bildung beteiligt ist.

Über welche Proteininteraktionen die beschriebenen Funktionen des AP-1/ $\sigma$ 1B-Komplexes vermittelt werden und ob es sich bei ihnen um direkte Funktionen handelt, müsste mit Hilfe von weiteren Experimenten, wie beispielsweise Proteininteraktionsstudien, untersucht werden, wofür diese Arbeit einen Ausgangspunkt bietet.

## 7.7 Ausblick

Veränderungen von frühen Endosomen wurden in Synaptosomen identifiziert und biochemisch und massenspektrometrisch charakterisiert. Die exakte Lokalisierung dieser Kompartimente sowie die Frage, ob der beobachtete Anstieg des frühen endosomalen Markers durch eine Vergrößerung oder ein vermehrtes Auftreten dieser Organellen hervorgerufen wird, konnte mit den verwendeten Methoden nicht geklärt werden. Hierzu müssten diese Organellen in WT- und KO-Synapsen immunologisch markiert werden und elektronenmikroskopische (EM) Aufnahmen durchgeführt werden. Durch eine Markierung von SV für EM-Aufnahmen könnten möglicherweise morphologische Hinweise auf die Ursachen der beeinträchtigten SV-Bildung gewonnen werden. Ob es sich bei der differentiellen Veränderung der PI-3-P-Menge um einen sekundären Effekt handelt, der durch die endosomalen Veränderungen hervorgerufen wird, oder diese durch einen Einfluss des AP-1/ $\sigma$ 1B-Komplexes auf die hVps 34-Kinaseaktivität hervorgerufen wird, müsste *in vivo* und *in vitro* mit Hilfe von Kinaseaktivitätstests und Proteininteraktionsexperimenten untersucht werden.

Biochemische und massenspektrometrische Untersuchungen haben eine Umverteilung von einer Vielzahl von Proteinen zwischen verschiedenen neuronalen Kompartimenten gezeigt. In sich an die vorliegende Arbeit anschließenden Experimente müsste untersucht werden, in welche bzw. aus welchen Kompartimenten es im Zuge der AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz zu einer Umverteilung dieser Proteine kommt. Es konnte gezeigt werden, dass es zu Veränderungen der clathrinvermittelten Endozytose (CME) im Zuge der Defizienz kommt. Eine Proteomanalyse clathrinumhüllter Vesikel (CCVs) würde möglicherweise Hinweise auf Proteinumverteilungen in diesen vesikulären Pool liefern.

Von besonderem Interesse wäre eine detaillierte Charakterisierung der Ursachen der mit Hilfe der iTRAQ™-Quantifizierungen identifizierten differentiellen Proteinveränderungen, die vermutlich durch Veränderungen des endosomalen, vesikulären Transports hervorgerufen werden. Beispielsweise durch Protein-Protein-Interaktionsstudien zwischen diesen Proteinen und dem AP-1/ $\sigma$ 1B-Komplex könnten wahrscheinlich Beweise für eine direkte Beteiligung dieses AP-Komplexes an der Regulation von den im Rahmen dieser Arbeit diskutierten und weiteren Transportwegen gewonnen werden. Von besonderem Interesse wären Untersuchungen, die Beweise für eine direkte Beteiligung des AP-1/ $\sigma$ 1B-Komplexes an der frühen endosomalen Sortierung liefern würden. Auf diese Weise könnte aller Voraussicht nach ein detailliertes Modell über die Funktionen des AP-1/ $\sigma$ 1B-Komplexes am SV-Recycling entwickelt werden.

## **7.8 Modell des defizienten SV-Recyclings**

Die zentralen Veränderungen, die die AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz im Bezug auf das SV-Recycling herruft und bis heute bekannt sind, sind in Abb. 7-1 zusammenfassend dargestellt. Es wurden nur die Transportwege schematisch dargestellt, die aller Voraussicht nach in einem direkten Zusammenhang mit dem SV-Recycling stehen.

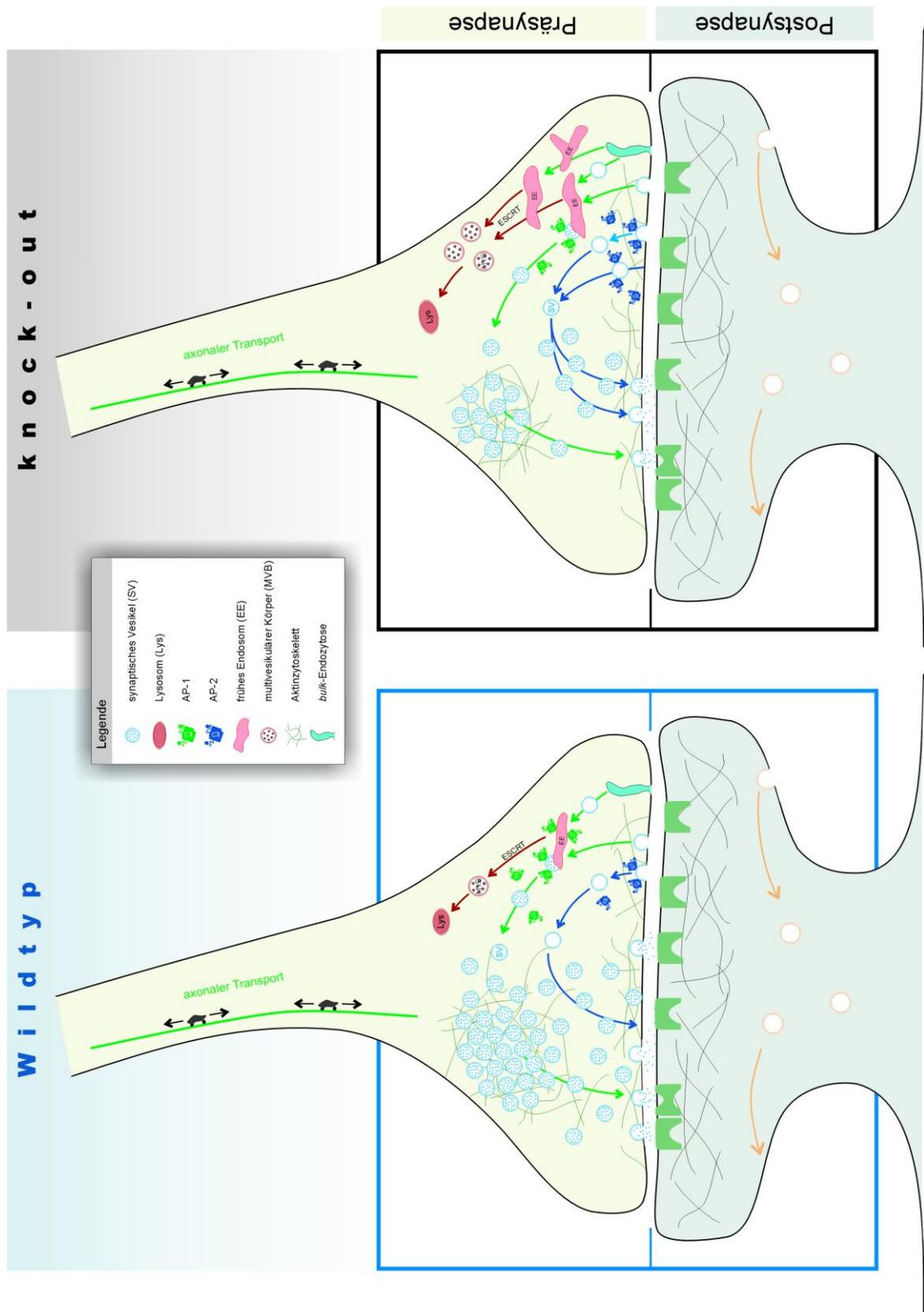


Abb. 7-1: Einfluss der AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz auf das SV-Recycling.



## 8. Zusammenfassung

Der heterotetramere AP-1-Komplex ist am *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) und an frühen Endosomen lokalisiert und ist essentiell für spezifische clathrinabhängige Transportwege. Vom  $\sigma$ 1-Adaptin sind drei Isoformen bekannt, von denen nur  $\sigma$ 1B und  $\sigma$ 1C gewebsspezifisch exprimiert werden. Die höchste Expression im Gehirn dieser Adaptine zeigt  $\sigma$ 1B. Ausgehend vom Phänotyp AP-1/ $\sigma$ 1B-defizienter Mäusen wurden neuronale Funktionen dieses AP-Komplexes vorausgesagt. Glyvuk *et al.* konnten ein beeinträchtigt synaptisches Vesikel (SV) Recycling und eine Erhöhung der Anzahl von endosomalen Strukturen zeigen [Glyvuk *et al.* 2010]. Ausgehend von diesen Beobachtungen wurden, zur Charakterisierung der Funktionen des AP-1/ $\sigma$ 1B-Komplexes an der endosomalen Sortierung sowie dem SV-Recycling, endosomale Strukturen angereichert.

Im Cortex und in Synaptosomen waren durch die AP-1/ $\sigma$ 1B-Defizienz keine strukturellen Veränderungen des Golgi-Apparats und des TGN zu erkennen, jedoch zeigte sich hier ein Anstieg von frühen endosomalen Strukturen. Mit Hilfe von Dichtegradientenzentrifugationen konnten zwei voneinander verschiedene endosomale, vesikuläre Fraktionen gewonnen werden, in denen die differentiellen Veränderungen von frühen Endosomen stark ausgeprägt sind und darüber hinaus eine Reduktion von synaptischen Vesikeln festgestellt wurde. Durch iTRAQ™-Experimente dieser Fraktionen, in denen deutlich mehr Proteine quantifiziert werden konnten als dies in vorherigen Studien der Fall war, konnte der Einfluss des AP-1/ $\sigma$ 1B-Komplexes auf die frühe endosomale Sortierung sowie auf weitere Proteine und Sortierungswege festgestellt werden. Wie bereits für den Cortex und die Synaptosomen gezeigt werden konnte, sind auch in den endosomalen Fraktionen deutliche differentielle endosomale Veränderungen zu erkennen. In defizienten Neuronen werden vermutlich frühe, Appl-negative Endosomen spezifisch verändert, welche aller Voraussicht nach präsynaptisch lokalisiert sind. Grundlegende Veränderungen weiterer endosomaler Kompartimente waren nicht zu erkennen, jedoch lieferten unabhängige Quantifizierungen deutliche Hinweise auf eine Steigerung zumindest von Teilen des endosomalen degradativen Weges, was möglicherweise eine Folge von fehlsortierten Proteinen des frühen endosomalen Weges ist. Mit den Veränderungen früher Endosomen geht eine Reduktion von SV einher, was zusammen mit dem beeinträchtigten SV-Recycling einen frühen endosomalen Sortierungsschritt bei der Regenerierung von SV anzeigt. Das  $\sigma$ 1B-Adaptin ist für ein korrektes SV-Recycling durch frühe Endosomen unerlässlich. In AP-1/ $\sigma$ 1B-defizienten Neuronen ist neben dem AP-1/ $\sigma$ 1B-vermittelten Transport aller Voraussicht nach auch die AP-2 und clathrinvermittelte Endozytose verändert, welche gesteigert ist. Dies weist

u. a. auf eine Veränderung von SV-Pools und damit auf die Beteiligung des AP-1/ $\sigma$ 1B-Komplexes an der SV-Sortierung in einen bestimmten SV-Pool hin, möglicherweise den *Resting-Pool*. Neben Funktionen an der endosomalen Sortierung von SV kann durch den Anstieg in defizienten Neuronen von Strukturen hoher Dichte, wie DCVs und Stressgranula, auch auf mögliche weitere Funktionen geschlossen werden. Ob diese jedoch direkt oder indirekt sind, konnte nicht geklärt werden.

In Neuronen besitzt der AP-1/ $\sigma$ 1B-Komplex zentrale Funktionen, welche vor allem in der Präsynapse charakterisiert wurden. Hier ist er an der frühen endosomalen Sortierung beteiligt und besitzt spezifische Funktionen bei der Sortierung und Bildung von synaptischen Vesikeln.

## 9. Literaturverzeichnis

- Aguilar, R. C., Boehm, M., Gorshkova, I., Crouch, R. J., Tomita, K., Saito, T., Ohno, H. und Bonifacino, J. S.; Signal-binding specificity of the  $\mu$ 4 subunit of the adaptor protein complex AP-4. *J Biol Chem* **2001**, *276*, 13145.
- Anitei, M., Stange, C., Parshina, I., Baust, T., Schenck, A., Raposo, G., Kirchhausen, T. und Hoflack, B.; Protein complexes containing CYFIP/Sra/PIR121 coordinate Arf1 and Rac1 signalling during clathrin-AP-1-coated carrier biogenesis at the TGN. *Nat Cell Biol* **2010**, *12*, 520.
- Ash, M. R., Faelber, K., Kosslick, D., Albert, G. I., Roske, Y., Kofler, M., Schuemann, M., Krause, E. und Freund, C.; Conserved beta-hairpin recognition by the GYF domains of Smy2 and GIGYF2 in mRNA surveillance and vesicular transport complexes. *Structure* **2010**, *18*, 944.
- Augustine, G. J., Morgan, J. R., Villalba-Galea, C. A., Jin, S., Prasad, K. und Lafert, E. M.; Clathrin and synaptic vesicle endocytosis: studies at the squid giant synapse. *Biochem Soc Trans* **2006**, *34*, 68.
- Backer, J. M.; The regulation and function of Class III PI3Ks: novel roles for Vps34. *Biochem J* **2008**, *410*, 1.
- Bai, H., Doray, B. und Kornfeld, S.; GGA1 Interacts with the Adaptor Protein AP-1 through a WNSF Sequence in Its Hinge Region. *J Biol Chem* **2004**, *279*, 17411.
- Baltes, J.; Etablierung und Analyse von „knock-out“ Mausmodellen der  $\sigma$ 1-Untereinheiten des AP-1 Komplexes. Doktorarbeit **2008**, Georg-August-Universität, Göttingen.
- Bantinga, G. und Ponnambalam, S.; TGN38 and its orthologues: roles in post-TGN vesicle formation and maintenance of TGN morphology. *Biochim Biophys Acta* **1997**, *1355*, 209.
- Barr, F. und Lambright, D. J.; Rab GEFs and GAPs. *Cell Biol* **2010**, *22*, 461.
- Barysch, S. V., Aggarwalm S., Jahn, R. und Rizzoli, S.O.; Sorting in early endosomes reveals connections to docking- and fusion-associated factors. *Proc Natl Acad Sci USA* **2009**, *16*, 9697.
- Baust, T., Czupalla, C., Krause, E., Bourel-Bonnet, L. und Hoflack, B.; Proteomic analysis of adaptor protein 1A coats selectively assembled on liposomes. *Proc Natl Acad Sci USA* **2006**, *103*, 3159.
- Beck, R., Rawet, M., Wieland, F. T. und Cassel, D.; The COPI system: Molecular mechanisms and function. *FEBS Letters* **2009**, *583*, 2701.
- Benhra, N., Lallet, S., Cotton, M., Le Bras, S., Dussert, A. und Le Borgne, R.; AP-1 controls the trafficking of Notch and Sanpodo toward E-cadherin junctions in sensory organ precursors. *Curr Biol* **2011**, *21*, 87.

- Bethani, I., Lang, T., Geumann, U., Sieber, J. J., Jahn, R. und Rizzoli, S. O.; The specificity of SNARE pairing in biological membranes is mediated by both proof-reading and spatial segregation. *EMBO J* **2007**, *26*, 3981.
- Blondeau, F., Ritter, B., Allaire, P. D., Wasiak, S., Girard, M., Hussain, N. K., Angers, A., Legendre-Guillemain, V., Roy, L., Boismenu, D., Kearney, R. E., Bell, A. W., Bergeron, J. J. und McPherson, P. S.; Tandem MS analysis of brain clathrin-coated vesicles reveals their critical involvement in synaptic vesicle recycling. *Proc Natl Acad Sci USA* **2004**, *101*, 3833.
- Boehm, M. und Bonifacino, J. S.; Adaptins: the final recount. *Mol Biol Cell* **2001**, *12*, 2907.
- Boman, A. L., Zhang, C., Zhu, X. und Kahn, R. A.; A family of ADP-ribosylation factor effectors that can alter membrane transport through the trans-Golgi. *Mol Biol Cell* **2000**, *11*, 1241.
- Bonanomi, D., Benfenati, F. und Valtorta, F.; Protein sorting in the synaptic vesicle life cycle. *Prog Neurobiol* **2006**, *80*, 177.
- Bonifacino, J. S. und Lippincott-Schwartz, J.; Coat proteins: shaping membrane transport. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2003**, *4*, 409.
- Bonifacino, J. S. und Traub, L. M.; Signals for Sorting of Transmembrane Proteins to Endosomes and Lysosomes. *Annu Rev Biochem* **2003**, *72*, 395.
- Bonifacino, J. S.; The GGA proteins: adaptors on the move. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2004**, *5*, 23.
- Bonifacino, J. S. und Glick, B. S.; The Mechanisms of Vesicle Budding and Fusion. *Cell* **2004**, *116*, 153.
- Borner, G. H., Harbour, M., Hester, S., Lilley, K. S. und Robinson, M. S.; Comparative proteomics of clathrin-coated vesicles. *J Cell Biol* **2006**, *4*, 571.
- Borner, G. H., Rana, A. A., Forster, R., Harbour, M., Smith, J.C. und Robinson, M. S.; CVAK104 is a novel regulator of clathrin-mediated SNARE sorting. *Traffic* **2007**, *8*, 893.
- Borner, G. H., Antrobus, R., Hirst, J., Bhumbra, G. S., Kozik, P., Jackson, L. P., Sahlender, D. A. und Robinson, M. S.; Multivariate proteomic profiling identifies novel accessory proteins of coated vesicles. *J Cell Biol* **2012**, *197*, 141.
- Bradford, M.; A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem* **1976**, *72*, 248.
- Brandhorst, D., Zwillig, D., Rizzoli, S.O., Lippert, U., Lang, T. und Jahn, R.; Homotypic fusion of early endosomes: SNAREs do not determine fusion specificity. *Proc Natl Acad Sci USA* **2006**, *103*, 2701.

- Braulke, T. und Bonifacino, J. S.; Sorting of lysosomal proteins. *Biochim Biophys Acta* **2009**, *1793*, 605.
- Brodsky, F. M., Chen, C. Y., Knuehl, C., Towler, M. C. und Wakeham, D. E.; Biological basket weaving: formation and function of clathrin-coated vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol* **2001**, *17*, 517.
- Budzinski, K. L., Zeigler, M., Fujimoto, B. S., Bajjalieh, S. M. und Chiu, D. T.; Measurements of the Acidification Kinetics of Single Synaptotagmin Vesicles. *Biophysical J* **2011**, *101*, 1580.
- Chang-Ileto, B., Frere, S. G., Chan, R. B., Voronov, S. V., Roux, A. und Di Paolo, G.; Synaptotagmin 1-Mediated PI(4,5)P<sub>2</sub> Hydrolysis Is Modulated by Membrane Curvature and Facilitates Membrane Fission. *Dev Cell* **2011**, *20*, 206.
- Chaudhuri, R., Lindwasser, O. W., Smith, W. J., Hurley, J. H. und Bonifacino, J. S.; Downregulation of CD4 by Human Immunodeficiency Virus Type 1 Nef Is Dependent on Clathrin and Involves Direct Interaction of Nef with the AP2 Clathrin Adaptor. *J Virol* **2007**, *81*, 3877.
- Chen, Y., Gan, B. Q. und Tang, B. L.; Syntaxin 16: unraveling cellular physiology through a ubiquitous SNARE molecule. *J Cell Physiol* **2010a**, *225*, 326.
- Chen, L., Hu, J., Yun, Y. und Wang, T.; Rab36 regulates the spatial distribution of late endosomes and lysosomes through a similar mechanism to Rab34. *Mol Membr Biol* **2010b**, *27*, 24.
- Cheung, G., Jupp, O. J. und Cousin, M. A.; Activity-Dependent Bulk Endocytosis and Clathrin-Dependent Endocytosis Replenish Specific Synaptic Vesicle Pools in Central Nerve Terminals. *J Neurosci* **2010**, *30*, 8161.
- Christoforidis, S., Miaczynska, M., Ashman, K., Wilm, M., Zhao, L., Yip, S. C., Waterfield, M. D., Backer, J. M. und Zerial, M.; Phosphatidylinositol-3-OH kinases are Rab5 effectors. *Nat Cell Biol* **1999**, *1*, 249.
- Chua, J. J. E., Kindler, S., Boyken, J. und Jahn, R.; The architecture of an excitatory synapse. *J Cell Sci* **2010**, *123*, 819.
- Clayton, E. L., Evans, G. J. O. und Cousin, M. A.; Bulk Synaptic Vesicle Endocytosis Is Rapidly Triggered during Strong Stimulation. *J Neurosci* **2008**, *28*, 6627.
- Cline, H. und Haas, K.; The regulation of dendritic arbor development and plasticity by glutamatergic synaptic input: a review of the synaptotrophic hypothesis. *J Physiol* **2008**, *586*, 1509.
- Collins, B. M., McCoy, A. J., Kent, H. M., Evans, P. R. und Owen, D. J.; Molecular Architecture and Functional Model of the Endocytic AP2 Complex. *Cell* **2002**, *109*, 523.
- Compton, S. J. und Jones, C. G.; Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal Biochem* **1985**, *151*, 369.

- Cremona, O., Di Paolo, G., Wenk, M. R., Lüthi, A., Kim, W. T., Takei, K., Daniell, L., Nemoto, Y., Shears, S. B., Flavell, R. A., McCormick, D. A. und De Camilli, P.; Essential role of phosphoinositide metabolism in synaptic vesicle recycling. *Cell* **1999**, *99*, 179.
- Crottet, P., Meyer, D. M., Rohrer, J. und Spiess, M.; ARF1GTP, Tyrosine-based Signals, and Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate Constitute a Minimal Machinery to Recruit the AP-1 Clathrin Adaptor to Machinery to Recruit the AP-1 Clathrin Adaptor to Membranes. *Mol Biol Cell* **2002**, *13*, 3672.
- Danglot, L. und Galli, T.; What is the function of neuronal AP-3? *Biol Cell* **2007**, *99*, 349.
- Danino, D. und Hinshaw, J. E.; Dynamin family of mechanoenzymes. *Curr Opin Cell Biol* **2001**, *13*, 454.
- De Matteis, M. A. und Godi, A.; PI-loting membrane traffic. *Nat Cell Biol* **2004**, *6*, 487.
- Dean, C., Dunning, F. M., Liu, H., Bomba-Warczak, E., Martens, H., Bharat, V., Ahmed, S. und Chapman, E. R.; Axonal and dendritic synaptotagmin isoforms revealed by a pHluorin-syt functional screen. *Mol Biol Cell* **2012**, *23*, 1715.
- Deborde, S., Perret, E., Gravotta, D., Deora, A., Salvarezza, S., Schreiner, R. und Rodriguez-Boulan, E.; Clathrin is a key regulator of basolateral polarity. *Nature* **2008**, *452*, 719.
- Deery, M. J., Maywood, E. S., Chesham, J. E., Sládek, M., Karp, N. A., Green, E. W., Charles, P. D., Reddy, A. B., Kyriacou, C. P., Lilley, K. S. und Hastings, M. H.; Proteomic Analysis Reveals the Role of Synaptic Vesicle Cycling in Sustaining the Suprachiasmatic Circadian Clock. *Curr Biol* **2009**, *19*, 2031.
- Dell' Angelica, E. C. Mullins, C. und Bonifacino, J. S.; AP-4, a novel protein complex related to clathrin adaptors. *J Biol Chem* **1999**, *274*, 7278.
- Di Pietro, S. M. und Dell'Angelica, E. C.; The cell biology of Hermansky-Pudlak syndrome: recent advances. *Traffic* **2005**, *6*, 525.
- Di Paolo, G. und De Camilli, P.; Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* **2006**, *443*, 651.
- Donaldson, G. J. und Jackson, C. L.; ARF family G proteins and their regulators: roles in membrane transport, development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2011**, *12*, 362.
- Doray, B. und Kornfeld, S.;  $\gamma$  Subunit of the AP-1 Adaptor Complex Binds Clathrin: Implications for Cooperative Binding in Coated Vesicle Assembly. *Mol Biol Cell* **2001**, *12*, 1925.
- Doray, B., Lee, I., Knisely, J., Bu, G. und Kornfeld, S.; The  $\gamma/\sigma 1$  and  $\alpha/\sigma 2$  Hemicomplexes of Clathrin Adaptors AP-1 and AP-2 Harbor the Dileucine Recognition Site. *Mol Biol Cell* **2007**, *18*, 1887.

- Dosemeci, A., Tao-Cheng, J. H., Vinade, L. und Jaffe, H.; Preparation of postsynaptic density fraction from hippocampal slices and proteomic analysis. *Biochem Biophys Res Commun* **2006**, 339, 687.
- Dowler, S., Kular, G. und Alessi, D. R.; Protein Lipid Overlay Assay. *Sci STKE* **2002**, 129, pl6
- Dunkley, P. R., Jarvie, P. E. und Robinson, P. J.; A rapid Percoll gradient procedure for preparation of synaptosomes. *Nat Protoc* **2008**, 3, 1718.
- Edwards, S. L., Charlie, N. K., Richmond, J. E., Hegermann, J., Eimer, S. und Miller, K. G.; Impaired dense core vesicle maturation in *Caenorhabditis elegans* mutants lacking Rab2. *J Cell Biol* **2009**, 186, 881.
- Elliott, M. H., Smith, D. S., Parker, C. E. und Borchers, C.; Current trends in quantitative proteomics. *J Mass Spectrom* **2009**, 44, 1637.
- Eskelinen, E.L., Meyer, C., Ohno, H., von Figura, K. und Schu, P.; The polarized epithelia-specific mu 1B-adaptin complements mu 1A-deficiency in fibroblasts. *EMBO Rep* **2002**, 3, 471.
- Estrada-Bernal, A., Sanford, S. D., Sosa, L. J., Simon, G. C., Hansen, K. C. und Pfeningner, K. H.; Functional Complexity of the Axonal Growth Cone: A Proteomic Analysis. *PLoS One* **2012**, 7, e31858.
- Evans, G. J. und Cousin, M. A.; Activity-dependent control of slow synaptic vesicle endocytosis by cyclin-dependent kinase 5. *J Neurosci* **2007**, 27, 401.
- Faúndez, V., Horng, J.-T. und Kelly, R. B.; ADP Ribosylation Factor 1 Is Required for Synaptic Vesicle Budding in PC12 Cells. *J Cell Biol* **1997**, 138, 505.
- Fazekas de St Groth, S., Webster, R. G. und Datyner, A.; Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoretic strips. *Biochim Biophys Acta* **1963**, 71, 377.
- Ferguson, S. M. und De Camilli, P.; Dynamin, a membrane-remodelling GTPase. *Mol Biol Cell* **2012**, 13, 75.
- Fischer von Mollard, G., Stahl, B., Walch-Solimena, C., Takei, K., Daniels, L., Khoklatchev, A., De Camilli, P., Südhof, T. C. und Jahn, R.; Localization of Rab5 to synaptic vesicles identifies endosomal intermediate in synaptic vesicle recycling pathway. *Eur J Cell Biol* **1994**, 65, 319.
- Fölsch, H., Ohno, H., Bonifacino, J.S. und Mellman, I.; A novel clathrin adaptor complex mediates basolateral targeting in polarized epithelial cells. *Cell* **1999**, 99, 189.
- Fölsch, H., Pypaert, M., Schu, P. und Mellman, I.; Distribution and Function of AP-1 Clathrin Adaptor Complexes in Polarized Epithelial Cells. *J Cell Biol* **2001**, 152, 595.

- Fölsch, H.; The building blocks for basolateral vesicles in polarized epithelial cells. *Trends Cell Biol* **2005**, *15*, 222.
- Ghosh, P. und Kornfeld, S.; AP-1 binding to sorting signals and release from clathrin-coated vesicles is regulated by phosphorylation. *J Cell Biol* **2003**, *160*, 699.
- Gillingham, A. K. und Munro, S.; The Small G Proteins of the Arf Family and Their Regulators. *Annu Rev Cell Dev Biol* **2007**, *23*, 579.
- Glyvuk, N., Tsytsyura, Y., Geumann, C., D'Hooge, R., Hüve, J., Kratzke, M., Baltes, J., Boening, D., Klingauf, J. und Schu, P.; AP-1/ $\sigma$ 1B-adaptin mediates endosomal synaptic vesicle recycling, learning and memory. *EMBO J* **2010**, *29*, 1318.
- Govero, J., Doray, B., Bai, H. und Kornfeld, S.; Analysis of Gga null mice demonstrates a non-redundant role for mammalian GGA2 during development. *PLoS One* **2012**, *7*, e30184.
- Goarani, O.; PIP Strip/Array Protocol. **2011**, *Stanford University*.
- Granseth, B., Odermatt, B., Royle, S. J. und Lagnado, L.; Clathrin-mediated endocytosis is the dominant mechanism of vesicle retrieval at hippocampal synapses. *Neuron* **2006**, *51*, 773.
- Gravotta, D., Carvajal-Gonzalez, J. M., Mattera, R., Deborde, S., Banfelder, J. R., Bonifacio, J. S. und Rodriguez-Boulan, E.; The Clathrin Adaptor AP-1A Mediates Basolateral Polarity. *Dev Cell* **2012**, *22*, 811.
- Grigliatti, T. A., Hall, L., Rosenbluth, R. und Suzuki, D.T.; Temperature-sensitive mutations in *Drosophila melanogaster*. XIV. A selection of immobile adults. *Mol Gen Genet* **1973**, *120*, 107.
- Grimes, M. L., Zhou, J., Beattie, E. C., Yuen, E. C., Hall, D. E., Valletta, J. S., Topp, K. S., LaVail, J. H., Bunnett, N. W. und Mobley, W. C.; Endocytosis of Activated TrkA: Evidence that Nerve Growth Factor Induces Formation of Signaling Endosomes. *J Neurosci* **1996**, *16*, 7950.
- Gu, M., Schuske, K., Watanabe, S., Liu, Q., Baum, P., Garriga, G. und Jorgensen, E. M.; Mu2 adaptin facilitates but is not essential for synaptic vesicle recycling in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol* **2008**, *183*, 881.
- Guan, R., Dai, H., Harrison, S. C. und Kirchhausen, T.; Structure of the PTEN-like region of auxilin, a detector of clathrin-coated vesicle budding. *Structure* **2010**, *18*, 1191.
- Haas, A. K., Yoshimura, S., Stephens, D. J., Preisinger, C., Fuchs, E. und Barr, F. A.; Analysis of GTPase-activating proteins: Rab1 and Rab43 are key Rabs required to maintain a functional Golgi complex in human cells. *J Cell Sci* **2007**, *120*, 2997.
- Haberman, A., Williamson, W. R., Epstein, D., Wang, D., Rina, S., Meinertzhagen, I. A. und Hiesinger, P. R.; The synaptic vesicle SNARE neuronal Synaptobrevin pro-

- motes endolysosomal degradation and prevents neurodegeneration. *J Cell Biol* **2012**, *196*, 261.
- Hannan, L.A., Newmyer, S.L. und Schmid, S.L.; ATP- and cytosoldependent release of adaptor proteins from clathrin-coated vesicles: A dual role for Hsc70. *Mol Biol Cell* **1998**, *9*, 2217.
- Haucke, V., Neher, E. und Sigrist, S. J.; Protein scaffolds in the coupling of synaptic exocytosis and endocytosis. *Nat Rev Neurosci* **2011**, *12*, 127.
- Heidebrecht, F., Heidebrecht, A., Schulz, I., Behrens, S. E. und Bader, A.; Improved semiquantitative Western-Blot technique with increased quantification range. *J Imm Meth* **2009**, *40*, 345.
- Heldwein, E.E., Macia, E., Wang, J., Yin, H.L., Kirchhausen, T. und Harrison, S.C.; Crystal structure of the clathrin adaptor protein 1 core. *Proc Natl Acad Sci USA* **2004**, *101*, 14108.
- Heuser, J. E. und Reese, T. S.; Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J Cell Biol* **1973**, *57*, 315.
- Hinrichsen, L., Meyerholz, A., Groos, S. und Ungewickell, E. J.; Bending a membrane: how clathrin affects budding. *Proc Natl Acad Sci USA* **2006**, *103*, 8715.
- Hirst, J., Bright, N.A., Rous, B. und Robinson, M.S.; Characterization of a fourth adaptor-related protein complex. *Mol Biol Cell* **1999**, *10*, 2787.
- Hirst, J., Barlow, L. D., Francisco, G. C., Sahlender, D. A., Seaman, M. N., Dacks, J. B. und Robinson, M. S.; The Fifth Adaptor Protein Complex. *PLoS Biol* **2011**, *9*, e1001170.
- Hojjati, M.R., van Woerden, G. M., Tyler, W. J., Giese, K. P., Silva, A. J., Pozzo-Miller, L. und Elgersma, Y.; Kinase activity is not required for alphaCaMKII-dependent presynaptic plasticity at CA3-CA1 synapses. *Nat Neurosci* **2007**, *10*, 1125.
- Hollis, E. R. 2nd und Zou, Y.; Expression of the Wnt signaling system in central nervous system axon guidance and regeneration. *Front Mol Neurosci* **2012**, *5*, 5.
- Hoopmann, P., Punge, A., Barysch, S. V., Westphal, V., Bückers, J., Opazo, F., Bethani, I., Lauterbach, M. A., Hell, S. W. und Rizzoli, S. O.; Endosomal sorting of readily releasable synaptic vesicles. *Proc Natl Acad Sci USA* **2009**, *107*, 19055.
- Hua, Z., Leal-Ortiz, S., Foss, S. M., Waites, C. L., Garner, C. C., Voglmaier, S. M. und Edwards, R. H.; v-SNARE composition distinguishes synaptic vesicle pools. *Neuron* **2011**, *71*, 474.
- Huotari, J. und Helenius, A.; Endosome maturation. *EMBO J* **2011**, *30*, 3481.

- Huttner, W. B., Schiebler, W., Greengard, P. und De Camilli, P.; Synapsin I (Protein I), a Nerve Terminal-Specific Phosphoprotein. III. Its Association with Synaptic Vesicles Studied in a Highly Purified Synaptic Vesicle Preparation. *J Cell Biol* **1983**, *96*, 1374.
- Jahn, R. und Scheller, R. H.; SNAREs - engines for membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2006**, *7*, 631.
- Janvier, K., Kato, Y., Boehm, M., Rose, J. R., Martina, J. A., Kim, B. Y., Venkatesan, S., und Bonifacino, J. S.; Recognition of dileucine-based sorting signals from HIV-1 Nef and LIMP-II by the AP-1  $\gamma$ - $\sigma$ 1 and AP-3  $\delta$ - $\sigma$ 3 hemicomplexes. *J Cell Biol* **2003**, *163*, 1281.
- Johannes, L. und Wunder, C.; The SNXy flavours of endosomal sorting. *Nat Cell Biol* **2011**, *13*, 884.
- Jordan, B. A., Fernholz, B. D., Boussac, M., Xu, C., Grigorean, G., Ziff, E. B. und Neubert, T. A.; Identification and verification of novel rodent postsynaptic density proteins. *Mol Cell Proteomics* **2004**, *3*, 857.
- Jovic, M., Sharma, M., Rahajeng, J. und Caplan, S.; The early endosome: a busy sorting station for proteins at the crossroads. *Histol Histopathol* **2010**, *25*, 99.
- Jung, N. und Haucke, V.; Clathrin-Mediated Endocytosis at Synapses. *Traffic* **2007**, *8*, 1129.
- Kennedy, M. J. und Ehlers, M. D.; Organelles and Trafficking Machinery for Postsynaptic Plasticity. *Annu Rev Neurosci* **2006**, *29*, 325.
- Kim, S. H. und Ryan, R. A.; Synaptic Vesicle Recycling at CNS Synapses without AP-2. *J Neurosci* **2009**, *29*, 3865.
- Kirchhausen, T. und Harrison, S. C.; Protein organization in clathrin trimers. *Cell* **1981**, *23*, 755.
- Kirchhausen, T.; Clathrin. *Annu Rev Biochem* **2000**, *69*, 699.
- Klose, J.; Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis in mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik* **1975**, *26*, 231.
- Krauß, M. und Haucke, V.; Phosphoinositides: Regulators of membrane traffic and protein function. *FEBS Lett* **2007**, *581*, 2105.
- Kyhse-Andersen, J.; Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* **1984**, *10*, 203.
- Laemmli, U. K.; Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **1970**, *227*, 680.

- Lee, J., Jongeward, G. D. und Sternberg, P. W.; unc-101, a gene required for many aspects of *Caenorhabditis elegans* development and behavior, encodes a clathrin-associated protein. *Genes Dev* **1994**, *8*, 60.
- Lee, D. W., Zhao, X., Zhang, F., Eisenberg, E. und Greene, L. E.; Depletion of GAK/auxilin 2 inhibits receptor-mediated endocytosis and recruitment of both clathrin and clathrin adaptors. *J Cell Sci* **2005**, *118*, 4311.
- Lee, R. H., Iioka, H., Ohashi, M., Iemura, S., Natsume, T. und Kinoshita, N.; XRab40 and XCullin5 form a ubiquitin ligase complex essential for the noncanonical Wnt pathway. *EMBO J* **2007**, *26*, 3592.
- Lee, I., Doray, B., Govero, J. und Kornfeld, S.; Binding of cargo sorting signals to AP-1 enhances its association with ADP ribosylation factor 1 – GTP. *J Cell Biol* **2008**, *180*, 467.
- Lewin, A. D., Sheff, D., Ooi, C. E., Whitney, J. A., Yamamoto, E., Chicione, M. L., Webster, P., Bonifacino J. S. und Mellman, I.; Cloning, expression, and localization of a novel  $\gamma$ -adaptin-like molecule. *FEBS Lett* **1998**, *435*, 263.
- Li, W., Rusiniak, M. E., Chintala, S., Gautam, R., Novak, E. K. und Swank, R. T.; Murine Hermansky-Pudlak syndrome genes: regulators of lysosomerelated organelles. *BioEssays* **2004**, *26*, 616.
- Liao, H., Zhang, J., Shestopal, S., Szabo, G., Castle, A. und Castle, D.; Nonredundant function of secretory carrier membrane protein isoforms in dense core vesicle exocytosis. *Am J Physiol Cell Physiol* **2008**, *294*, C797.
- Linford, A., Yoshimura, S., Bastos, R., N., Langemeyer, L., Gerondopoulos, A., Rigden, D. J. und Barr, F. A.; Rab14 and Its Exchange Factor FAM116 Link Endocytic Recycling and Adherens Junction Stability in Migrating Cells. *Dev Cell* **2012**, *22*, 952.
- Link, A. J., Eng, J., Schieltz, D. M., Carmack, E., Mize, G. J., Morris, D. R., Garvik, B. M. und Yates, J. R. 3rd.; Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nat Biotechnol* **1999**, *17*, 676.
- Lisman, J., Yasuda, R. und Raghavachari, S.; Mechanisms of CaMKII action in long-term potentiation. *Nat Rev Neurosci* **2012**, *13*, 169.
- Lu, M., Holliday, L. S., Zhang, L., Jr., Dunn, W. A. und Gluck, S. L.; Interaction between Aldolase and Vacuolar H-ATPase. *J Biol Chem* **2001**, *276*, 30407.
- Lucho, S., Santoni, V. und Rabilloud, T.; Evaluation of nonionic and zwitterionic detergents as membrane protein solubilizers in two-dimensional electrophoresis. *Proteomics* **2003**, *3*, 249.
- Lumb, J. H., Leung, K. F., Dubois, K. N. und Field, M. C.; Rab28 function in trypanosomes: interactions with retromer and ESCRT pathways. *J Cell Sci* **2011**, *124*, 3771.

- Maier, S., Reiterer, V., Ruggiero, A. M., Rothstein, J. D., Thomas, S., Dahm, R., Sitte, H. H. und Farhan, H.; GTRAP3-18 serves as a negative regulator of Rab1 in protein transport and neuronal differentiation. *J Cell Mol Med* **2009**, *13*, 114.
- Maritzen, T., Podufall, J. und Haucke, V.; Stonins – Specialized Adaptors for Synaptic Vesicle Recycling and Beyond? *Traffic* **2010**, *11*, 8.
- Masuda, E. S., Luo, Y., Young, C., Shen, M., Rossi, A. B., Huang, B. C., Yu, S., Bennett, M. K., Payan, D. G. und Scheller, R. H.; Rab37 is a novel mast cell specific GTPase localized to secretory granules. *FEBS Letters* **2000**, *470*, 61.
- Matsuda, S., Miura, E., Matsuda, K., Kakegawa, W., Kohda, K., Watanabe, M. und Yuzaki, M.; Accumulation of AMPA receptors in autophagosomes in neuronal axons lacking adaptor protein AP-4. *Neuron* **2008**, *57*, 730.
- Matsui, T., Itoh, T. und Fukuda, M.; Small GTPase Rab12 Regulates Constitutive Degradation of Transferrin Receptor. *Traffic* **2011**, *12*, 1432.
- Mattera, R., Boehm, M., Chaudhuri, R., Prabhu, Y. und Bonifacino, J. S.; Conservation and Diversification of Dilucine Signal Recognition by Adaptor Protein (AP) Complex Variants. *J Biol Chem* **2011**, *286*, 2022.
- Maycox, P. R., Link, E., Reetz, A., Morris, S. A. und Jahn, R.; Clathrin-coated Vesicles in Nervous Tissue Are Involved Primarily in Synaptic Vesicle Recycling. *J Cell Biol* **1992**, *188*, 1379.
- McCaffrey, G., Welker, J., Scott, J., van der Salm, L. und Grimes, M. L.; High-Resolution Fractionation of Signaling Endosomes Containing Different Receptors. *Traffic* **2009**, *10*, 938.
- McMahon, H. T. und Boucrot, E.; Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2011**, *12*, 517.
- McPherson, P. S.; Proteomic analysis of clathrin-coated vesicles. *Proteomics* **2010**, *10*, 4025.
- McPherson, P. S. und Ritter, B.; Peptide Motifs. *Mol Neurobiol* **2005**, *32*, 73.
- Medigeshi, G. R. und Schu, P.; Characterization of the in vitro retrograde transport of MPR46. *Traffic* **2003**, *4*, 802.
- Mesmin, B., Drin, G., Levi, S., Rawet, M., Cassel, D., Bigay, J. und Antony, B.; Two lipid-packing sensor motifs contribute to the sensitivity of ArfGAP1 to membrane curvature. *Biochemistry* **2007**, *46*, 1779.
- Meyer, C., Zizioli, D., Lausmann, S., Eskelinen, E.L., Hamann, J., Saftig, P., von Figura, K. und Schu, P.;  $\mu$ 1A-adaptin-deficient mice: lethality, loss of AP-1 binding and rerouting of mannose 6-phosphate receptors. *EMBO J* **2000**, *19*, 2193.

- Meyer, C., Eskelinen, E.L., Guruprasad, M.R., von Figura, K. und Schu, P.;  $\mu$ 1A deficiency induces a profound increase in MPR300/IGF-II receptor internalization rate. *J Cell Biol* **2001**, *114*, 4469.
- Mills, I. G.; The interplay between clathrin-coated vesicles and cell signalling. *Semin Cell Dev Biol* **2007**, *18*, 459.
- Miranda, K. C., Karet, F. E. und Brown, D.; An Extended Nomenclature for Mammalian V-ATPase Subunit Genes and Splice Variants. *PLoS One* **2010**, *5*, e9531.
- Mitsunari, T., Nakatsu, F., Shioda, N., Love, P. E., Grinberg, A., Bonifacino, J. S. und Ohno, H.; Clathrin adaptor AP-2 is essential for early embryonal development. *Mol Cell Biol* **2005**, *25*, 9318.
- Morgenthal, K., Wienkoop, S., Wolschin, F. und Weckwerth, W.; Integrative Profiling of Metabolites and Proteins. *Methods Mol Biol* **2007**, *358*, 57.
- Mori, R., Ikematsu, K., Kitaguchi, T., Kim, S. E., Okamoto, M., Chiba, T., Miyawaki, A., Shimokawa, I. und Tsuboi, T.; Release of TNF- $\alpha$  from macrophages is mediated by small GTPase Rab37. *Eur J Immunol* **2011**, *41*, 3230.
- Mori, Y., Matsui, T., Furutani, Y., Yoshihara, Y. und Fukuda, M.; Small GTPase Rab17 Regulates the Dendritic Morphogenesis and Postsynaptic Development of Hippocampal Neurons. *J Biol Chem* **2012**, *286*, 8963.
- Mukherjee, D., Hanna, C. B. und Aguilar, R. C.; Artificial Neural Network for the Prediction of Tyrosine-Based Sorting Signal Recognition by Adaptor Complexes. *J Biomed Biotechnol* **2012**, *2012*, 498031.
- Nakatsu, F. und Ohno, H.; Adaptor protein complexes as the key regulators of protein sorting in the post-Golgi network. *Cell Struct Funct* **2003**, *25*, 419.
- Neuhoff, V., Stamm, R. und Eibl, H.; Clear background and highly sensitive protein staining with Coomassie Blue dyes in polyacrylamide gels: A systematic analysis. *Electrophoresis* **1985**, *6*, 427.
- Newell-Litwa, K., Seong, E., Burmeister, M. und Faundez, V.; Neuronal and non-neuronal functions of the AP-3 sorting machinery. *J Cell Sci* **2007**, *120*, 531.
- Newell-Litwa, K., Salazar, G., Smith, Y. und Faundez, V.; Roles of BLOC-1 and adaptor protein-3 complexes in cargo sorting to synaptic vesicles. *Mol Biol Cell* **2009**, *20*, 1441.
- Newell-Litwa, K., Chintala, S., Jenkins, S., Pare, J.-F., McGaha, L., Smith, Y. und Faundez, V.; Hermansky-Pudlak Protein Complexes, AP-3 and BLOC-1, Differentially Regulate Presynaptic Composition in the Striatum and Hippocampus. *J Neurosci* **2010**, *30*, 820.
- Ng, E. L. und Tang, B. L.; Rab GTPases and their roles in brain neurons and glia. *Brain Res Rev* **2008**, *58*, 236.

- Nie, Z. und Rundazzo, P. A.; Arf GAPs and membrane traffic. *Journal of Cell Science* **2006**, *119*, 1203.
- O'Farrell, P. H.; High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* **1975**, *250*, 4007.
- Ohno, H., Aguilar, R. C., Yeh, D., Taura, D., Saito, T. und Bonifacino J. S.; The medium subunits of adaptor complexes recognize distinct but overlapping sets of tyrosine-based sorting signals. *J Biol Chem* **1998**, *273*, 25921.
- Ohno, H., Tomemori, T., Nakatsu, F., Okazaki, Y., Aguilar, R.C., Foelsch, H., Mellman, I., Saito, T., Shirasawa, T. und Bonifacino, J.S.; Mu1B, a novel adaptor medium chain expressed in polarized epithelial cells. *FEBS Lett* **1999**, *449*, 215.
- Ohya, T., Miaczynska, M., Coskun, U., Lommer, B., Runge, A., Drechsel, D., Kalaidzidis, Y. und Zerial, M.; Reconstitution of Rab- and SNARE-dependent membrane fusion by synthetic endosomes. *Nature* **2009**, *459*, 1091.
- Pagano, A., Crottet, P., Prescianotto-Baschong, C. und Spiess, M.; In Vitro Formation of Recycling Vesicles from Endosomes Requires Adaptor Protein-1/Clathrin and Is Regulated by Rab4 and the Connector Rabaptin-5. *Mol Biol Cell* **2004**, *15*, 4990.
- Palade, G.; Intracellular Aspects of the Process of Protein Synthesis. *Science* **1975**, *189*, 347.
- Palmer, C. L., Lim, W., Hastie, P. G., Toward, M., Korolchuk, V. I., Burbidge, S. A., Banting, G., Collingridge, G. L., Isaac, J. T. und Henley, J. M.; Hippocampin Functions as a Calcium Sensor in Hippocampal LTD. *Neuron* **2005**, *47*, 487.
- Park, H., Li, Y. und Tsien, R. W.; Influence of synaptic vesicle position on release probability and exocytotic fusion mode. *Science* **2012**, *335*, 1362.
- Pastalkova, E., Serrano, P., Pinkhasova, D., Wallace, E., Fenton, A. A. und Sacktor, T. C.; Storage of Spatial Information by the Maintenance Mechanism of LTP. *Science* **2006**, *373*, 1141.
- Pavlos, N. J., Grønborg, M., Riedel, D., Chua, J. J., Boyken, J., Kloepper, T. H., Urlaub, H., Rizzoli, S. O. und Jahn, R.; Quantitative analysis of synaptic vesicle Rabs uncovers distinct yet overlapping roles for Rab3a and Rab27b in Ca<sup>2+</sup>-triggered exocytosis. *J Neurosci* **2010**, *30*, 13441.
- Pavlos, N. J. und Jahn, R.; Distinct yet overlapping roles of Rab GTPases on synaptic vesicles. *Small Gtpases* **2011**, *2*, 77.
- Pearse, B. M. und Robinson, M. S.; Purification and properties of 100-kd proteins from coated vesicles and their reconstitution with clathrin. *EMBO J* **1984**, *3*, 1951.
- Pechstein, A., Bacetic, J., Vahedi-Faridi, A., Gromova, K., Sundborger, A., Tomlin, N., Krainer, G., Vorontsova, O., Schäfer, J. G., Owe, S. G., Cousin, M. A., Saenger, W., Shupliakov, O. und Haucke, V.; Regulation of synaptic vesicle recycling by

- complex formation between intersectin 1 and the clathrin adaptor complex AP2. *Proc Natl Acad Sci USA* **2010**, *107*, 4206.
- Peden, A.A., Oorschot, V., Hesser, B.A., Austin, C.D., Scheller, R.H. und Klumperman, J.; Localization of the AP-3 adaptor complex defines a novel endosomal exit site for lysosomal membrane proteins. *J Cell Biol* **2004**, *164*, 1065.
- Perdew, G. H., Schaup, H.W., Selivonchick, D. P.; The use of a zwitterionic detergent in two-dimensional gel electrophoresis of trout liver microsomes. *Anal Biochem* **1983**, *135*, 453.
- Pevsner, J., Volkmundt, W., Wong, B.R. und Scheller, R.H.; Two rat homologs of clathrin-associated adaptor proteins. *Gene* **1994**, *146*, 279.
- Pucadyil, T. J. und Schmid, S. L.; Conserved Functions of Membrane Active GTPases in Coated Vesicle Formation. *Science* **2009**, *325*, 1217.
- Puertollano, R., Rundazzo, P. A., Presley, J. F., Hartnell, L. M. und Bonifacino, J. S.; The GGAs promote ARF-dependent recruitment of clathrin to the TGN. *Cell* **2001**, *105*, 93.
- Pütz, S. M., Boehm, A. M, Stiewe, T. und Sickmann, A.; iTRAQ analysis of a cell culture model for malignant transformation, including comparison with 2D-PAGE and SILAC. *J Proteome Res* **2012**, *11*, 2140.
- Raiborg, C., Bache, K. G., Gillooly, D. J., Madshus, I. H., Stang, E. und Stenmark, H.; Hrs sorts ubiquitinated proteins into clathrin-coated microdomains of early endosomes. *Nat Cell Biol* **2002**, *4*, 394.
- Raiborg, C. und Stenmark, H.; The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature* **2009**, *458*, 445.
- Ramakrishnan, N. A., Drescher, M. J. und Drescher, D. G.; The SNARE complex in neuronal and sensory cells. *Mok Cell Neurosci* **2012**, *50*, 58.
- Raposo, G. und Marks, M. S.; Melanosomes—dark organelles enlighten endosomal membrane transport. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2007**, *8*, 786.
- Rawet, M., Levi-Tal, S., Szafer-Glusman, E., Parnis, A. und Cassel, D.; ArfGAP1 interacts with coat proteins through tryptophan-based motifs. *Biochem Biophys Res Commun* **2010**, *394*, 553.
- Reisner, A. H., Nemes, P. und Bucholtz, C.; The use of Coomassie Brilliant Blue G250 perchloric acid solution for staining in electrophoresis and isoelectric focusing on polyacrylamide gels. *Anal Biochem* **1975**, *64*, 509.
- Reumann, S., Babujee, L., Ma. C., Wienkoop, S., Siemsen, T., Antonicelli, G. E., Rasche, N., Lüder, F., Weckwerth, F. und Jahn, O.; Proteome Analysis of Arabidopsis Leaf Peroxisomes Reveals Novel Targeting Peptides, Metabolic Pathways, and Defense Mechanisms. *Plant Cell* **2007**, *19*, 3170.

- Reusch, U., Bernhard, O., Koszinowski, U. und Schu, P.; AP-1A and AP-3A lysosomal sorting functions. *Traffic* **2002**, 3, 752.
- Richards, D. A., Guatimosim, C. und Betz, W. J.; Two endocytic recycling routes selectively fill two vesicle pools in frog motor nerve terminals. *Neuron* **2000**, 27, 551.
- Ricotta, D., Hansen, J., Preiss, C., Teichert, D. und Höning, S.; Characterization of a protein phosphatase 2A holoenzyme that dephosphorylates the clathrin adaptors AP-1 and AP-2. *J Biol Chem* **2008**, 283, 5510.
- Riel, C.;  $\sigma$ 1-adaptin - the Small Subunit of the Clathrin Adaptor Complex AP-1. Doktorarbeit **2004**, *Georg-August-Universität, Göttingen*.
- Rizzoli, S. O., Bethani, I., Zwilling, D., Wenzel, D., Siddiqui, T. J., Brundhorst, D. und Jahn, R.; Evidence for early endosome-like fusion of recently endocytosed synaptic vesicles. *Traffic* **2006**, 7, 1163.
- Robinson, D. G., Ehlers, U., Herken, R., Herrmann, B., Mayer, F. und Schürmann, F.-W.; Präparationsmethodik in der Elektronenmikroskopie. Springer-Verlag **1985**, 71-76.
- Robinson, M. S. und Bonifacino, J. S.; Adaptor-related proteins. *Curr Opin Cell Biol* **2001**, 13, 444.
- Robinson, M. S.; Adaptable adaptors for coated vesicles. *Trends Cell Biol* **2004**, 14, 167.
- Rosenfeld, J., Capdevielle, J., Guillemot, J. C. und Ferrara, P.; In-Gel Digestion of Proteins for Internal Sequence Analysis after One- or Two-Dimensional Gel Electrophoresis. *Anal Biochem* **1992**, 203, 173.
- Ross, P. L., Huang, Y. N., Marchese, J. N., Williamson, B., Parker, K., Hattan, S., Khainovski, N., Pillai, S., Dey, S., Daniels, S., Purkayastha, S., Juhasz, P., Martin, S., Bartlet-Jones, M., He, F., Jacobson, A. und Pappin, D. J.; Multiplexed Protein Quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* Using Amine-reactive Isobaric Tagging Reagents. *Mol Cell Proteomics* **2004**, 3, 1154.
- Royle, S. und Lagnado, L.; Endocytosis at the synaptic terminal. *J Physiol (Lond)* **2003**, 553, 345.
- Sachse, M., Urbe, S., Oorschot, V., Strous, G. J. und Klumperman, J.; Bilayered clathrin coats on endosomal vacuoles are involved in protein sorting toward lysosomes. *Mol Biol Cell* **2002**, 13, 1313.
- Santiago-Tirado, F. H. und Bretscher, A.; Membrane-trafficking sorting hubs: cooperation between PI4P and small GTPases at the trans-Golgi network. *Trends Cell Biol* **2011**, 21, 515.
- Schmidt, C. und Urlaub, H.; iTRAQ-Labeling of In-Gel Digested Proteins for Relative Quantification. *Proteomics* **2009**, 564, 207.

- Schu, P. V., Takegawa, K., Fry, M. J., Stack, J. H., Waterfield, M. D. und Emr, S. D.; Phosphatidylinositol 3-Kinase Encoded by Yeast VPS34 Gene Essential for Protein Sorting. *Science* **1993**, *260*, 88.
- Schu, P. V.; Vesicular protein transport. *Pharmacogenomics J* **2001**, *1*, 262.
- Sedmack, J. J. und Grossberg, S. E.; A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250. *Anal Biochem* **1977**, *79*, 544.
- Selak, S., Braun, J. E. und Fritzler, M. J.; Characterization of early endosome antigen 1 in neural tissues. *Biochem Biophys Res Commun* **2004**, *323*, 1334.
- Seto, S., Tsujimura, K. und Koide, Y.; Rab GTPases Regulating Phagosome Maturation Are differentially Recruited to Mycobacterial Phagosomes. *Traffic* **2011**, *12*, 407.
- Setty, S. R., Tenza, D., Truschel, S. T., Chou, E., Sviderskaya, E. V., Theos, A. C., Lamoreux, M. L., Di Pietro, S. M., Starcevic, M., Bennett, D. C., Dell'Angelica, E. C., Raposo, G. und Marks, M. S.; BLOC-1 is required for cargo-specific sorting from vacuolar early endosomes toward lysosome-related organelles. *Mol Biol Cell* **2007**, *18*, 768.
- Setty, S. R., Tenza, D., Sviderskaya, E. V., Bennett, D. C., Raposo, G. und Marks, M. S.; Cell-specific ATP7A transport sustains copper-dependent tyrosinase activity in melanosomes. *Nature* **2008**, *454*, 1142.
- Shafaq-Zadah, M., Brocard, L., Solari, F. und Michaux, G.; AP-1 is required for the maintenance of apico-basal polarity in the *C. elegans* intestine. *Development* **2012**, *139*, 2061.
- Sinka, R., Gillingham, A. K., Kondylis, V. und Munro, S.; Golgi coiled-coil proteins contain multiple binding sites for Rab family G proteins. *J Cell Biol* **2008**, *183*, 607.
- Sluchanko, N. N. und Gusev, N. B.; 14-3-3 proteins and regulation of cytoskeleton. *Biochemistry (Mosc)* **2010**, *75*, 1528.
- Spector, T.; Refinement of the coomassie blue method of protein quantitation. A simple and linear spectrophotometric assay for less than or equal to 0.5 to 50 microgram of protein. *Anal Biochem* **1978**, *86*, 142.
- Stack, J. H. und Emr, S. D.; Vps34p Required for Yeast Vacuolar Protein Sorting Is a Multiple Specificity Kinase That Exhibits BotPhrotein Kinase and Phosphatidylinositol-specific PI 3-Kinase Activities. *J Biol Chem* **1994**, *269*, 31552.
- Stenmark, H.; Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nature Reviews* **2009**, *10*, 513.
- Stevens, C. F. und Wesseling, J. F.; Augmentation Is a Potentiation of the Exocytotic Process. *Neuron* **1999**, *22*, 139.

- Su, Y., Zhou, A., Al-Lamki, R. S. und Karet, F. E.; The  $\alpha$ -Subunit of the V-type H-ATPase Interacts with Phosphofruktokinase-1 in Humans. *J Biol Chem* **2003**, *278*, 20013.
- Südhof, T. C.; The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci* **2004**, *27*, 509.
- Sumakovic, M., Hegermann, J., Luo, L., Husson, S. J., Schwarze, K., Olendrowitz, C., Schoofs, L., Richmond, J. und Eimer, S.; UNC-108/RAB-2 and its effector RIC-19 are involved in dense core vesicle maturation in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol* **2009**, *186*, 897.
- Takahashi, D., Hase, K., Kimura, S., Nakatsu, F., Ohmae, M., Mandai, Y., Sato, T., Date, Y., Ebisawa, M., Kato, T., Obata, Y., Fukuda, S., Kawamura, Y. I., Dohi, T., Katsuno, T., Yokosuka, O., Waguri, S. und Ohno, H.; The epithelia-specific membrane trafficking factor AP-1B controls gut immune homeostasis in mice. *Gastroenterology* **2011**, *141*, 621.
- Takamori, S., Holt, M., Stenius, K., Lemke, E. A., Grønborg, M., Riedel, D., Urlaub, H., Schenck, S., Brügger, B., Ringler, P., Müller, S. A., Rammner, B., Gräter, F., Hub, J. S., De Groot, B. L., Mieskes, G., Moriyama, Y., Klingauf, J., Grubmüller, H., Heuser, J., Wieland, F. und Jahn, R.; Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell* **2006**, *127*, 831.
- Takatsu, H., Sakurai, M., Shin, H.W., Murakami, K. und Nakayama, K.; Identification and characterization of novel clathrin adaptor-related proteins. *J Biol Chem* **1998**, *273*, 24693.
- Takatsu, H., Futatsumori, M., Yoshino, K., Yoshida, Y., Shin, H.W. und Nakayama, K.; Similar subunit interactions contribute to assembly of clathrin adaptor complexes and COPI complex: analysis using yeast threehybrid system. *Biochem Biophys Res Commun* **2001**, *284*, 1083.
- Takei, K., Mundigl, O., Daniell, L. und De Camilli, P.; The synaptic vesicle cycle: a single vesicle budding step involving clathrin and dynamin. *J Cell Biol* **1996**, *133*, 1237.
- Tan, E. K. and Schapira, A. H.; Summary of GIGYF2 studies in Parkinson's disease: the burden of proof. *Eur J Neurol* **2010**, *17*, 175.
- Tarpey, P. S., Stevens, C., Teague, J., Edkins, S., O'Meara, S., Avis, T., Barthorpe, S., Buck, G., Butler, A., Cole, J., Dicks, E., Gray, K., Halliday, K., Harrison, R., Hills, K., Hinton, J., Jones, D., Menzies, A., Mironenko, T., Perry, J., Raine, K., Richardson, D., Shepherd, R., Small, A., Tofts, C., Varian, J., West, S., Widaa, S., Yates, A., Catford, R., Butler, J., Mallya, U., Moon, J., Luo, Y., Dorkins, H., Thompson, D., Easton, D. F., Wooster, R., Bobrow, M., Carpenter, N., Simonsen, R. J., Schwartz, C. E., Stevenson, R. E., Turner, G., Partington, M., Gecz, J., Stratton, M. R., Futreal, P. A. und Raymond, F. L.; Mutations in the gene encod-

- ing the Sigma 2 subunit of the adaptor protein 1 complex, AP1S2, cause X-linked mental retardation. *Am J Hum Genet* **2006**, *79*, 1119.
- ter Haar, E., Harrison, S.C. und Kirchhausen, T.; Peptide-in-groove interactions link target proteins to the beta-propeller of clathrin. *Proc Natl Acad Sci USA* **2000**, *97*, 1096.
- Thi, E. P. und Reiner, N. E.; Phosphatidylinositol 3-kinases and their roles in phagosome maturation. *JLB* **2012**, (*Epub ahead of print*).
- Thiede, B., Lamer, S., Mattow, J., Siejak, F., Dimmler, C., Rudel, T. und Jungblut, P. R.; Analysis of missed cleavage sites, tryptophan oxidation and N-terminal pyroglutamylation after in-gel tryptic digestion. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2000**, *14*, 496.
- Tribl, F., Meyer, H. E. und Marcus, K.; Analysis of organelles within the nervous system: impact on brain and organelle functions. *Expert Rev Proteomics* **2008**, *5*, 333.
- Ungewickell, E. J. und Hinrichsen, L.; Endocytosis: clathrin-mediated membrane budding. *Curr Opin Cell Biol* **2007**, *19*, 417.
- Urbanska, A., Sadowski, L., Kalaidzidis, Y. und Miaczynska, M.; Biochemical Characterization of Appl Endosomes: The Role of Annexin A2 in Appl Membrane Recruitment. *Traffic* **2011**, *12*, 1227.
- Uytterhoeven, V., Kuenen, S., Kasprovicz, J., Miskiewicz, K. und Verstreken, P.; Loss of skywalker reveals synaptic endosomes as sorting stations for synaptic vesicle proteins. *Cell* **2011**, *145*, 11.
- Vanhaesebroeck, B., Guillermet-Guibert, J., Graupera, M. und Bilanges, B.; The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2010**, *11*, 329.
- Vanhaesebroeck, B. Stephens, L. und Hawkins, P.; PI3K signalling: the path to discovery and understanding. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2012**, *13*, 195.
- Voglmaier, S. M. und Edwards, R. H.; Do different endocytic pathways make different synaptic vesicles? *Curr Opin Neurobiol* **2007**, *17*, 374.
- Voglmaier, S. M., Kam, K., Yang, H., Fortin, D. L., Hua, Z., Nicoll, R. A. und Edwards, R. H.; Distinct endocytic pathways control the rate and extent of synaptic vesicle protein recycling. *Neuron* **2006**, *51*, 71.
- Volkandt, W. und Karas, M.; Proteomic analysis of the presynaptic active zone. *Exp Brain Res* **2012**, *217*, 449.
- Wang, Y.J., Wang, J., Sun, H.Q., Martinez, M., Sun, Y.X., Macia, E., Kirchhausen, T., Albanesi, J.P., Roth, M.G. und Yin, H.L.; Phosphatidylinositol 4 phosphate regulates targeting of clathrin adaptor AP-1 complexes to the Golgi. *Cell* **2003**, *114*, 299.

- Wang, J., Sun, H. Q., Macia, E., Kirchhausen, T., Watson, H., Bonifacino, J. S. und Yin, H. L.; PI4P promotes the recruitment of the GGA adaptor proteins to the trans-Golgi network and regulates their recognition of the ubiquitin sorting signal. *Mol Biol Cell* **2007**, *18*, 2646.
- Wang, L., Guo, J. F., Zhang, W. W., Xu, Q., Zuo, X., Shi, C. H., Luo, L. Z., Liu, J., Hu, L., Hu, Y. C., She, L., Jiang, H., Yan, X. X., Xia, K., Pan, Q. und Tang, B. S.; Novel GIGYF2 gene variants in patients with Parkinson's disease in Chinese population. *Neurosci Lett* **2010**, *473*, 131.
- Wessel, D. und Flügge, U. I.; A Method for the Quantitative Recovery of Protein in Dilute Solution in the Presence of Detergents and Lipids. *Anal Biochem* **1984**, *138*, 141.
- Whitehead, T. P., Kricka, L. J., Carter, T. J. und Thorpe, G. H.; Analytical Luminescence: Its Potential in the Clinical Laboratory. *Clin Chem* **1979**, *25*, 1531.
- Wilde, A. und Brodsky, F.M.; In vivo phosphorylation of adaptors. *J Cell Biol* **1996**, *135*, 635.
- Wilson, J. M., de Hoop, M., Zorzi, N., Toh, B. H., Dotti, C. G. und Parton, R. G.; EEA1, a tethering protein of the early sorting endosome, shows a polarized distribution in hippocampal neurons, epithelial cells, and fibroblasts. *Mol Biol Cell* **2000**, *11*, 2657.
- Wu, X., Zhao, X., Puertollano, R., Bonifacino, J. S., Eisenberg, E. und Greene, L. E.; Adaptor and Clathrin Exchange at the Plasma Membrane and trans-Golgi Network. *Mol Biol Cell* **2003**, *14*, 516.
- Wu, L.-G., Ryan, T. A. und Lagnado, L.; Modes of vesicle retrieval at ribbon synapses, calyx-type synapses, and small central synapses. *J Neurosci* **2007**, *27*, 11793.
- Yao, J., Kwon, S. E., Gaffaney, J. D., Dunning, F. M. und Chapman, E. R.; Uncoupling the roles of synaptotagmin I during endo- and exocytosis of synaptic vesicles. *Nat Neurosci* **2012**, *15*, 243.
- Yeung, B. G., Phan, H. L. und Payne, G. S.; Adaptor complex-independent clathrin function in yeast. *Mol Biol Cell* **1999**, *10*, 3643.
- Yim, Y. I., Sun, T., Wu, L. G., Raimondi, A., De Camilli, P., Eisenberg, E. und Greene, L. E.; Endocytosis and clathrin-uncoating defects at synapses of auxilin knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2010**, *107*, 4412.
- Young, A.; Structural insights into the clathrin coat. *Semin Cell Dev Biol* **2007**, *18*, 448.
- Yuan, J. P., Lee, K. P., Hong, J. H. und Muallem, S.; The closing and opening of TRPC channels by Homer1 and STIM1. *Acta Physiol (Oxf)* **2012**, *204*, 238.
- Zeigerer, A., Gilleron, J., Bogorad, R. L., Marsico, G., Nonaka, H., Seifert, S., Epstein-Barash, H., Kuchimanchi, S., Peng, C. G., Ruda, V. M., Del Conte-Zerial, P., Hengstler, J. G., Kalaidzidis, Y., Kotliansky, V. und Zerial, M.; Rab5 is neces-

- sary for the biogenesis of the endolysosomal system in vivo. *Nature* **2012**, *485*, 465.
- Zhang, J. und Castle, D.; Regulation of Fusion Pore Closure and Compound Exocytosis in Neuroendocrine PC12 Cells by SCAMP1. *Traffic* **2011**, *12*, 600.
- Zhang, H., Kim, A., Abraham, N., Khan, L. A., Hall, D. H., Fleming, J. T. und Gobel, V.; Clathrin and AP-1 regulate apical polarity and lumen formation during *C. elegans* tubulogenesis. *Development* **2012**, *139*, 2071.
- Zhao, X., Greener, T., Al-Hasani, H., Cushman, S. W., Eisenberg, E. und Greene, L. E.; Expression of auxilin or AP180 inhibits endocytosis by mislocalizing clathrin: evidence for formation of nascent pits containing AP1 or AP2 but not clathrin. *J Cell Biol* **2001**, *114*, 353.
- Zhu, Y., Xu, J. und Heinemann, S.F.; Two pathways of synaptic vesicle retrieval revealed by single-vesicle imaging. *Neuron* **2009**, *61*, 397.
- Zieske, L. R.; A perspective on the use of iTRAQ(TM) reagent technology for protein complex and profiling studies. *J Exp Bot* **2006**, *57*, 1501.
- Zizioli, D., Meyer, C., Guhde, G., Saftig, P., von Figura, K. und Schu, P.; Early embryonic death of mice deficient in gamma-adaptin. *J Biol Chem* **1999**, *274*, 5385.
- Zizioli, D., Forlanelli, E., Guarienti, M., Nicoli, S., Fanzani, A., Bresciani, R., Borsani, G., Preti, A., Cotelli, F., und Schu, P.; Characterization of the AP-1  $\mu$ 1A and  $\mu$ 1B Adaptins in Zebrafish (*Danio rerio*). *Dev Dynam* **2010**, *239*, 2404.
- Zoncu, R., Perera, R. M., Balkin, D. M., Pirruccello, M., Toomre, D. und De Camilli, P.; A Phosphoinositide Switch Controls the Maturation and Signaling Properties of Appl Endosomes. *Cell* **2009**, *136*, 1110.
- Zuber, B., Nikonenko, I., Klauser, P., Muller, D. und Dubochet, J.; The mammalian central nervous synaptic cleft contains a high density of periodically organized complexes. *Proc Natl Acad Sci USA* **2005**, *102*, 19192.



## Abkürzungen

° C	Grad Celsius
μ	Micro
A	Ampere
Abb.	Abbildung
AP-Komplex	Adaptorproteinkomplex
Arf	<i>ADP-ribosylation factor</i>
BFA	Brefeldin A
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
<i>budding</i>	Vesikelabknospung
<i>cargo</i>	zu transportierende Proteine
CCV	clathrinumhülltes Vesikel ( <i>clathrin coated vesicle</i> )
cDNA	komplementäre DNA
Chc	Clathrin schwere Ketten ( <i>clathrin heavy chain</i> )
CLASPs	clathrin-assoziierte Sortierungs-Proteine
Clc	Clathrin leichte Kette ( <i>clathrin light chain</i> )
CME	clathrinvermittelte Endozytose ( <i>clathrin mediated endocytosis</i> )
COP	<i>coat protein</i>
c-terminal	carboxyterminal
Da	Dalton
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>docking</i>	Vesikelanbindung an Zielmembran
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EEA 1	<i>early endosome antigen 1</i>
EM	Elektronenmikroskopie
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESCRT	<i>endosomal sorting complex required for transport</i>
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (lat.: und andere)
FKS	fötales Kälberserum
g	Gramm
<i>g</i>	Erdschwerebeschleunigung
GAP	GTPase aktivierendes Protein ( <i>GTP hydrolysis activating protein</i> )
GDI	GDP Dissoziationsinhibitor ( <i>GDP dissociation inhibitor</i> )
GDP	Guanosintriphosphat

## Abkürzungen

---

GEF	GDP-GTP Austauschfaktor ( <i>GDP-GTP exchange factor</i> )
GGA	<i>Golgi-localised, γ-ear-containing, ARF-binding protein</i>
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HRP	Meerrettichperoxidase ( <i>horseradish peroxidase</i> )
Hsc	<i>heat shock cognate protein</i>
IgG	Immunglobulin G
iTRAQ™	<i>isobaric tags for relative and absolute quantitation</i>
k	Kilo
KO	<i>knock-out</i>
L	Liter
LC	Flüssigchromatographie ( <i>liquid chromatography</i> )
M	Molar
m	Milli
<i>m</i>	Masse
MEF	Maus embryonale Fibroblasten
min	Minute
MPR	Mannose-6-Phosphat Rezeptor
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MVB	multivesikuläre Körper ( <i>multivesicular bodies</i> )
n	Nano
N. D.	nicht detektierbar ( <i>not detectable</i> )
NTD	N-terminale Domäne
n-terminal	aminoterminal
PAGE	<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
pH	negativer dekadische Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
PI	Phosphatidylinositol
PI-3,4-P	Phosphatidylinositol-3,4-phosphat
PI-3,5-P	Phosphatidylinositol-3,5-phosphat
PI-3-P	Phosphatidylinositol-3-phosphat
PI-4,5-P	Phosphatidylinositol-4,5-phosphat
PI-4-P	Phosphatidylinositol-4-phosphat
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Rab	<i>Ras-related in brain</i>

---

Rabex 5	Rab 5 exchange factor
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RRP	<i>readily releasable pool</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SNARE	<i>N</i> -ethylmaleimide-sensitive factor attachment receptor
SV	synaptisches Vesikel
Tab.	Tabelle
<i>tethering</i>	Annäherung eines Vesikels an die Akzeptormembran
TFA	Trifluoressigsäure
TGN	<i>trans</i> -Golgi-Netzwerk
TOF	<i>time of flight</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
<i>uncoating</i>	Abstreifung der Vesikelhülle
<i>v</i>	Geschwindigkeit
<i>v/v</i>	Volumenverhältnis
vgl.	vergleiche
<i>w/v</i>	Gewicht zu Volumen
WT	Wildtyp
<i>z</i>	Ladungszahl



## Danksagung

Für die zu jeder Zeit gute und konstruktive Zusammenarbeit und die Bereitstellung meines sehr interessanten Promotionsthemas möchte ich mich ganz besonders herzlich bei meinem Betreuer Prof. Peter Schu bedanken. Er stand mir immer in wissenschaftlichen Fragen zur Seite und war mir eine sehr große Hilfe bei der Lösung von Fragen und Herausforderungen, die sich vor allem zu Beginn meiner Arbeit durch meinen Wechsel in die Welt der Biochemie ergeben haben. Natürlich möchte ich mich bei ihm auch für die Gespräche abseits der Wissenschaft und das hohe Maß an Vertrauen, welches er mir stets entgegengebracht hat, bedanken.

Ein großer Dank geht an meine Koreferentin, Prof. Claudia Steinem, die mich bereits während meiner Diplomarbeit betreut hat, auf die immer Verlass war und die mir auch nach der Diplomarbeit, trotz ihrer wenigen Zeit, immer hilfreich zur Seite stand, wenn es nötig war.

Auch an Prof. Wienands geht ein großes Dankeschön für die bereitwillige Teilnahme an meinem Betreuungsausschuss und die konstruktiven Anregungen während der Thesiskomitee-Treffen.

Weiterhin danke ich Dr. Hans Dieter Schmitt, Dr. Oliver Schlüter und Dr. Judith Stegmüller für ihre Teilnahme an meinem Prüfungsausschuss.

Für die Probenpräparationen sowie die Durchführung der iTRAQ-Messungen bedanke ich mich ganz besonders bei Olaf Jahn, Bernhard Schmidt und Olaf Bernhard. Vor allem bei Olaf Bernhard möchte ich mich zum einen für die großartige Einführung in die experimentelle Welt der Biochemie und zum anderen für sein Mauskolonienmanagement und die Tatsache, dass er mir immer mit Rat und Tat bei experimentellen Fragen während seiner Zeit in unserer Arbeitsgruppe zur Seite stand, bedanken.

Einen ganz besonderen Dank möchte ich Sarah aussprechen, die Olafs Aufgaben nach dessen Wechsel in eine andere Arbeitsgruppe schnell gelernt und weitergeführt hat. Darüber hinaus hat sie mit ihrer sozialen und frischen Art das Arbeitsklima in unserem Labor sehr bereichert. Ohne sie wären viele schöne gemeinsame Aktivitäten der Biochemie 2 abseits der Wissenschaft ganz gewiss nicht zustande gekommen.

Natürlich darf ich es nicht vergessen, mich bei Sven, Sasha, Alwaleed, Bettina, JaMo, Ermes und allen Ehemaligen für eine tolle Zeit in unserem Labor zu bedanken, ohne die die Arbeit gewiss viel langweiliger gewesen wäre. Evelyn, Lisa, Peter-III, Marco und Michael danke ich für die vielen schönen Zeiten in der Mensa, ohne sie hätte das Mittagessen höchstens halb so gut geschmeckt. Darüber hinaus möchte ich mich für die wissenschaftliche Hilfsbereitschaft von allen der Biochemie 2 bedanken und insbesondere für all die Gespräche und Aktivitäten, vor allem für unsere tollen Stammtische

nach der Arbeit im Labor, die mir immer wieder Kraft, nicht zuletzt auch für neue Ideen gegeben haben. Und ihr mögt mir bitte verzeihen, dass ich hier nicht zu jedem etwas Persönliches schreiben kann, denn dann würde diese Danksagung erst nach vielen Seiten enden.

Bei der DFG möchte ich mich für die Finanzierung bedanken, welche es mir ermöglicht hat, dieses Projekt durchzuführen. Ein Dank geht auch an das GGNB-Team, welches mir in organisatorischen und administrativen Fragen immer freundlich und kompetent zur Seite stand.

Neben der großartigen Unterstützung von allen Kollegen und Mitarbeitern der Universität Göttingen gilt ein besonderer Dank meinen Freunden, die mich zu jeder Zeit unterstützt haben und immer für mich da waren. Ganz im Besondern muss ich meinen Eltern für die große Unterstützung danken und dafür, dass sie stets ein offenes Ohr für mich hatten und mir auch bei Herausforderungen immer mindestens einen Weg aufgezeigt haben, diese zu meistern. Vielen, vielen Dank für all eure Hilfe!

---

## Lebenslauf

---

Name: Manuel Kratzke  
Geboren: am 18. Oktober 1982 in Kassel

### Schul- und Hochschulbildung

---

seit 9.2.2009 Promotion in der Abteilung für Biochemie 2 der Universität Göttingen bei Prof. P. Schu

Dezember 2008 bis Januar 2009 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen

Januar 2008 bis Oktober 2008 Diplomarbeit: „Fusion von Vesikeln mit nano-BLMs zum Transfer von Membranproteinen“ in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. C. Steinem und Diplomprüfungen

Oktober 2003 bis Januar 2008 Diplomstudium Chemie an der Universität Göttingen

August 2002 bis Mai 2003 Zivildienst

Mai 2002 Erreichen der Allgemeinen Hochschulreife (Abitur)

September 1993 bis Mai 2002 Albert-Schweitzer-Schule (Gymnasium) in Kassel

### Veröffentlichung

---

Glyvuk, N., Tsytsyura, Y., Geumann, C., D'Hooge, R., Hüve, J., **Kratzke, M.**, Baltes, J., Boening, D., Klingauf, J. und Schu, P.; AP-1/ $\sigma$ 1B-adaptin mediates endosomal synaptic vesicle recycling, learning and memory. EMBO J **2010**, 29, 1318.



## Anhang

**Tab. A-1: Die Proteine, die mit Hilfe der iTRAQ™-Analyse in den Fraktionen D4 und E5 identifiziert wurden, sind nachfolgend aufgelistet.**

Sie wurden zu funktionellen Proteingruppen zusammengefasst. Diese Proteine sind in drei Tabellen (a-c) aufgelistet, entsprechend der Fraktion in der sie identifiziert wurden. In den letzten beiden Tabellen (e und f) sind alle veränderten Proteine der Fraktionen D4 und E5 aufgelistet. a) Proteine, die nur in der Fraktion D4 identifiziert wurden, b) Proteine, die nur in der Fraktion E5 identifiziert wurden, c) Proteine die in D4 und E5 identifiziert wurden d) Proteine des Shotgun-Experiments, e) veränderte Proteine der Fraktion D4 und f) veränderte Proteine der Fraktion E5.

### a) Proteine, die nur in D4 identifiziert wurden

NCBI Nr.	Proteinname	Proteingruppe
gi 194319965	Chain A, Crystal Structure Of Mouse Vps26b	endosomale Proteine
gi 26351059	Clavesin-1 [Mus musculus]	endosomale Proteine
gi 34147513	ras-related protein Rab-7a [Homo sapiens]	endosomale Proteine
gi 74181576	Arl8, ADP-ribosylation factor-like protein 8B [Mus musculus]	endosomale Proteine
gi 74206636	Scamp3 [Mus musculus]	endosomale Proteine
gi 50053824	early endosome antigen 1 [Mus musculus]	endosomale Proteine
gi 148679807	RAB4A, member RAS oncogene family, isoform CRA_a [Mus musculus]	endosomale Proteine
gi 4506371	ras-related protein Rab-5B [Homo sapiens]	endosomale Proteine
gi 6679583	ras-related protein Rab-11B [Mus musculus]	endosomale Proteine
gi 74150282	Rab4b [Mus musculus]	endosomale Proteine
gi 62901101	Ras-related protein Rab-31	endosomale Proteine
gi 31560462	syntaxin-7 [Mus musculus]	endosomale Proteine
gi 6678553	vesicle-associated membrane protein 3 [Mus musculus]	endosomale Proteine
gi 74206784	Syntaxin12 [Mus musculus]	endosomale Proteine
gi 231557	RecName: Full=Apolipoprotein A-I; Short=Apo-AI; Short=ApoA-I; AltName: Full=Apolipoprotein A1; Flags: Precursor	Energiestoffwechsel
gi 6746357	peroxisomal membrane protein 20 [Mus musculus]	Energiestoffwechsel
gi 23821758	RecName: Full=UMP-CMP kinase; AltName: Full=Cytidine monophosphate kinase; AltName: Full=Cytidylate kinase; AltName: Full=Deoxycytidylate kinase; AltName: Full=Uridine monophos- phate kinase; AltName: Full=Uridine monophosphate/cytidine monophosphate kinase	Energiestoffwechsel
gi 148677405	cytochrome b-5, isoform CRA_a [Mus musculus]	Energiestoffwechsel
gi 21313210	thioredoxin-related transmembrane protein 2 precursor [Mus musculus]	Energiestoffwechsel
gi 123244133	enolase 1, alpha non-neuron [Mus musculus]	Energiestoffwechsel
gi 126031446	Chain A, Mouse C14a Glutathione-S-Transferase Mutant In Complex With S-Hexyl Glutathione	Energiestoffwechsel
gi 12844989	Phosphoglycerate mutase 1 [Mus musculus]	Energiestoffwechsel
gi 12846591	NADH-cytochrome b5 reductase 3 [Mus musculus]	Energiestoffwechsel
gi 13385942	citrate synthase, mitochondrial precursor [Mus musculus]	Energiestoffwechsel
gi 13435924	Aldolase C, fructose-bisphosphate [Mus musculus]	Energiestoffwechsel
gi 1372988	cytochrome c oxidase subunit IV [Mus musculus]	Energiestoffwechsel
gi 1401252	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 4 [Mus musculus]	Energiestoffwechsel
gi 148692809	transketolase, isoform CRA_a [Mus musculus]	Energiestoffwechsel
gi 148700325	phosphofructokinase, platelet, isoform CRA_d [Mus musculus]	Energiestoffwechsel
gi 148704281	Epimerase family protein SDR39U1 [Mus musculus]	Energiestoffwechsel
gi 158148945	long-chain acyl-CoA synthetase [Mus musculus]	Energiestoffwechsel
gi 159162521	Mitochondrial fission 1 protein [Mus musculus]	Energiestoffwechsel
gi 16580128	dihydroliipoamide S-acetyltransferase precursor [Mus musculus]	Energiestoffwechsel
gi 16716343	cytochrome c oxidase subunit 6C [Mus musculus]	Energiestoffwechsel
gi 187956864	Ogdhl protein [Mus musculus]	Energiestoffwechsel
gi 2078522	dihydroliipoamide dehydrogenase [Mus musculus]	Energiestoffwechsel
gi 23956140	glycerophosphodiester phosphodiesterase domain-containing protein 1 [Mus musculus]	Energiestoffwechsel
gi 254553344	6-phosphofructokinase, muscle type [Mus musculus]	Energiestoffwechsel
gi 26326599	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase gamma [Mus musculus]	Energiestoffwechsel

## Anhang

NCBI Nr.	Proteinname	Proteingruppe
gij26329883	Neutral cholesterol ester hydrolase 1 [Mus musculus]	Energiestoffwechsel
gij26344335	Carbonic anhydrase 2 [Mus musculus]	Energiestoffwechsel
gij26353026	Cytochrome c, somatic [Mus musculus]	Energiestoffwechsel
gij297342902	Chain A, Crystal Structure Of Mouse Mitochondrial Aspartate AminotransferaseKYNURENINE AMINOTRANSFERASE IV	Energiestoffwechsel
gij308387818	D-dopachrome decarboxylase [Mus musculus]	Energiestoffwechsel
gij309265176	PREDICTED: alpha-enolase-like isoform 7 [Mus musculus]	Energiestoffwechsel
gij309266468	PREDICTED: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-like isoform 1 [Mus musculus]	Energiestoffwechsel
gij37360022	mKIAA0631 protein [Mus musculus]	Energiestoffwechsel
gij405985	caritine palmitoyltransferase II [Mus musculus]	Energiestoffwechsel
gij51267	Fatty acid-binding protein, heart [Mus musculus]	Energiestoffwechsel
gij56206141	oxoglutarate dehydrogenase (lipoamide) [Mus musculus]	Energiestoffwechsel
gij6671549	peroxiredoxin-6 [Mus musculus]	Energiestoffwechsel
gij6678674	lactate dehydrogenase B [Mus musculus]	Energiestoffwechsel
gij6753810	fatty acid-binding protein, heart [Mus musculus]	Energiestoffwechsel
gij6754086	glutathione S-transferase Mu 5 [Mus musculus]	Energiestoffwechsel
gij6754976	peroxiredoxin-1 [Mus musculus]	Energiestoffwechsel
gij6755911	thioredoxin [Mus musculus]	Energiestoffwechsel
gij7305027	enolase 2, gamma neuronal [Mus musculus]	Energiestoffwechsel
gij74188189	Aconitate hydratase, mitochondrial [Mus musculus]	Energiestoffwechsel
gij74204028	OGDC-E2 [Mus musculus]	Energiestoffwechsel
gij74204388	L-lactate dehydrogenase [Mus musculus]	Energiestoffwechsel
gij74214155	Cytochrome b5 type B [Mus musculus]	Energiestoffwechsel
gij74219103	Phosphoglycerate kinase 1 [Mus musculus]	Energiestoffwechsel
gij7710012	thiomorpholine-carboxylate dehydrogenase [Mus musculus]	Energiestoffwechsel
gij902008	adenine nucleotide translocase-1 [Mus musculus]	Energiestoffwechsel
(gij54311137)	RAB2A/B, member RAS oncogene family [Mus musculus]	früher sekretorischer Weg
gij10946940	ras-related protein Rab-2A [Mus musculus]	früher sekretorischer Weg
gij148684518	RAB6, member RAS oncogene family, isoform CRA_d [Mus musculus]	früher sekretorischer Weg
gij21313162	ras-related protein Rab-1B [Mus musculus]	früher sekretorischer Weg
gij4758988	ras-related protein Rab-1A isoform 1 [Homo sapiens]	früher sekretorischer Weg
gij114589841	PREDICTED: selenoprotein T [Pan troglodytes]	früher sekretorischer Weg
gij123235430	signal recognition particle 14 [Mus musculus]	früher sekretorischer Weg
gij12842750	PRA1 family protein 3 [Mus musculus]	früher sekretorischer Weg
gij148674283	ribophorin II [Mus musculus]	früher sekretorischer Weg
gij148677735	Sec11-like 3 (S, cerevisiae), isoform CRA_c [Mus musculus]	früher sekretorischer Weg
gij19264103	Copz1 protein [Mus musculus]	früher sekretorischer Weg
gij21218066	reticulon 1A [Mus musculus]	früher sekretorischer Weg
gij26344758	Reticulon-3 (a,b) [Mus musculus]	früher sekretorischer Weg
gij26350783	Transitional endoplasmic reticulum ATPase [Mus musculus]	früher sekretorischer Weg
gij26389719	Sec23A [Mus musculus]	früher sekretorischer Weg
gij30519971	atlastin-1 [Mus musculus]	früher sekretorischer Weg
gij38327592	Reticulon-3, Alt=TPA_inf: RTN3-A2 [Mus musculus]	früher sekretorischer Weg
gij53569	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 [Mus musculus]	früher sekretorischer Weg
gij557878	SKD2 [Mus musculus]	früher sekretorischer Weg
gij56090141	reticulon-1 isoform RTN1-C [Mus musculus]	früher sekretorischer Weg
gij58037395	secretory carrier-associated membrane protein 1 [Mus musculus]	früher sekretorischer Weg
gij6806903	sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2 isoform b [Mus musculus]	früher sekretorischer Weg
gij74140904	Vesicle-trafficking protein SEC22b [Mus musculus]	früher sekretorischer Weg
gij74190592	Wolframin [Mus musculus]	früher sekretorischer Weg
gij74192931	Calnexin [Mus musculus]	früher sekretorischer Weg
gij74207654	Vps45 [Mus musculus]	früher sekretorischer Weg
gij13277753	Heat shock protein 4 [Mus musculus]	HSP
gij148666718	chaperonin subunit 7 (eta), HSP60, isoform CRA_c [Mus musculus]	HSP
gij148675478	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 5, isoform CRA_b [Mus musculus]	HSP
gij247494234	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 13 [Mus musculus]	HSP

NCBI Nr.	Proteinname	Proteingruppe
gi 6680309	10 kDa heat shock protein, mitochondrial [Mus musculus]	HSP
gi 74178174	HSP90 b1 [Mus musculus]	HSP
gi 124286805	complement C1q subcomponent subunit A precursor [Mus musculus]	Immunproteine
gi 20071437	Igsf8, Immunoglobulin superfamily member 8 [Mus musculus]	Immunproteine
gi 28972249	Sorting nexin-27 [Mus musculus]	Immunproteine
gi 74220604	Clptm1: Cleft lip and palate transmembrane protein 1 homolog [Mus musculus]	Immunproteine
gi 109731942	Cadm3 protein [Mus musculus]	neuronales Wachstum
gi 12836784	Cnd1 [Mus musculus]	neuronales Wachstum
gi 12837563	Transmembrane protein 35 [Mus musculus]	neuronales Wachstum
gi 13195648	reticulon-4 isoform C [Mus musculus]	neuronales Wachstum
gi 148696833	Neurocan core protein [Mus musculus]	neuronales Wachstum
gi 148696833	Neurocan core protein [Mus musculus]	neuronales Wachstum
gi 148709214	synuclein, beta, isoform CRA_a [Mus musculus]	neuronales Wachstum
gi 1915913	Ulip2 protein [Mus musculus]	neuronales Wachstum
gi 19911152	drebrin A2 [Mus musculus]	neuronales Wachstum
gi 9903607	protein canopy homolog 2 precursor [Mus musculus]	neuronales Wachstum
gi 27692965	Psmd2, 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2 protein [Mus musculus]	Proteolyse
gi 148705825	UCH-L1, ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1, isoform CRA_a [Mus musculus]	Proteolyse
gi 16716569	protease, serine, 1 [Mus musculus]	Proteolyse
gi 20072543	Fbxo2 protein [Mus musculus]	Proteolyse
gi 148678839	RAB8(A), member RAS oncogene family, isoform CRA_c [Mus musculus]	sonstige GTP-Interaktionsproteine
gi 23463313	ras-related protein Rab-8(B) [Rattus norvegicus]	sonstige GTP-Interaktionsproteine
gi 93279750	Chain C, Structure Of Rab8 In Complex With Mss4	sonstige GTP-Interaktionsproteine
gi 74196240	GTPase KRas [Mus musculus]	sonstige GTP-Interaktionsproteine
gi 13386338	ras-related protein Rap-2b precursor [Mus musculus]	sonstige GTP-Interaktionsproteine
gi 13592039	ras-related protein Ral-A precursor [Rattus norvegicus]	sonstige GTP-Interaktionsproteine
gi 13937391	Gnb2, guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-2 [Mus musculus]	sonstige GTP-Interaktionsproteine
gi 148709593	Gnaq, guanine nucleotide binding protein, alpha q polypeptide [Mus musculus]	sonstige GTP-Interaktionsproteine
gi 164607137	Gnao1, guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha isoform B [Mus musculus]	sonstige GTP-Interaktionsproteine
gi 27805887	Gnai-1, guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-1 [Bos taurus]	sonstige GTP-Interaktionsproteine
gi 56800496	NME1, Nucleoside diphosphate kinase A [Mus musculus]	sonstige GTP-Interaktionsproteine
gi 6754020	guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-2 precursor [Mus musculus]	sonstige GTP-Interaktionsproteine
gi 74138117	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-4 [Mus musculus]	sonstige GTP-Interaktionsproteine
gi 7768785	H-ras [Mus musculus]	sonstige GTP-Interaktionsproteine
gi 9625037	rho-related GTP-binding protein RhoG precursor [Mus musculus]	sonstige GTP-Interaktionsproteine
gi 6753138	sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-1 [Mus musculus]	sonstige Kanal- und Transportproteine
gi 6755963	VDAC1, voltage-dependent anion-selective channel protein 1 [Mus musculus]	sonstige Kanal- und Transportproteine
gi 6755965	VDAC2, voltage-dependent anion-selective channel protein 2 [Mus musculus]	sonstige Kanal- und Transportproteine
gi 7242138	sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-2 [Mus musculus]	sonstige Kanal- und Transportproteine
gi 11321166	Ryr2, cardiac Ca2+ release channel [Mus musculus]	sonstige Kanal- und Transportproteine
gi 16307541	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1 [Mus musculus]	sonstige Kanal- und Transportproteine
gi 148705386	solute carrier family 30 (zinc transporter, ZnT-3), member 3, isoform CRA_b [Mus musculus]	sonstige Kanal- und Transportproteine
gi 1763380	ZnT-3, zinc transporter [Mus musculus]	sonstige Kanal- und Transportproteine
gi 26333521	Probable phospholipid-transporting ATPase IA [Mus musculus]	sonstige Kanal- und Transportproteine
gi 27697104	Atp1a2, Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-2 [Mus musculus]	sonstige Kanal- und Transportproteine
gi 30725780	protein MAL2 [Mus musculus]	sonstige Kanal- und Transportproteine
gi 44890693	Cntn1 protein [Mus musculus]	sonstige neuronale Proteine
gi 4512261	neurochondrin-2 [Mus musculus]	sonstige neuronale Proteine
gi 12852348	Alpha-synuclein [Mus musculus]	sonstige neuronale Proteine
gi 148687862	HCNP: Phosphatidylethanolamine-binding protein 1 [Mus musculus]	sonstige neuronale Proteine
gi 148707401	tenascin R [Mus musculus]	sonstige neuronale Proteine
gi 168983833	annexin A2 [Mus musculus]	sonstige neuronale Proteine
gi 18656627	EAAT3 glutamate transporter regulator GTRAP3-18 [Mus musculus]	sonstige neuronale Proteine
gi 192005	apolipoprotein E [Mus musculus]	sonstige neuronale Proteine
gi 19483938	Gpm6a: Neuronal membrane glycoprotein M6-a protein [Mus musculus]	sonstige neuronale Proteine
gi 209862927	dipeptidyl aminopeptidase-like protein 6 isoform 1 [Mus musculus]	sonstige neuronale Proteine

## Anhang

NCBI Nr.	Proteinname	Proteingruppe
gij2497313	RecName: Full=Myelin-oligodendrocyte glycoprotein; Flags: Precursor	sonstige neuronale Proteine
gij34996479	phospholemman isoform b precursor [Mus musculus]	sonstige neuronale Proteine
gij387515	Myelin proteolipid protein [Mus musculus]	sonstige neuronale Proteine
gij55926127	spectrin beta chain, brain 2 [Mus musculus]	sonstige neuronale Proteine
gij69885049	myelin basic protein isoform 3 [Mus musculus]	sonstige neuronale Proteine
gij69885073	myelin basic protein isoform 6 [Mus musculus]	sonstige neuronale Proteine
gij74220199	Transmembrane protein 132A [Mus musculus]	sonstige neuronale Proteine
gij26328339	CaMK II d, Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit delta [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gij33356998	Chain A, Crystal Structure Of CalciumCALMODULIN-Dependent Protein Kinase	synaptische Vesikelproteine
gij50417	CaMK II a, Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit alpha [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gij6978593	CaMK II a, calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit alpha [Rattus norvegicus]	synaptische Vesikelproteine
gij38259194	putative tyrosine-protein phosphatase auxilin isoform c [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gij148702256	NSF, N-ethylmaleimide sensitive fusion protein, isoform CRA_a [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gij7106257	probable phospholipid-transporting ATPase IA isoform b [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gij148686490	RAB3C, member RAS oncogene family, isoform CRA_c [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gij148693866	DmX-like protein 2 [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gij152031595	Rabconnectin-3	synaptische Vesikelproteine
gij30841008	ras-related protein Rab-18 [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gij20070422	PRA1 family protein 2 [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gij148696442	synaptosomal-associated protein 25, isoform CRA_a [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gij168984393	vesicle-associated membrane 2 [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gij17225417	syntaxin binding protein 1 [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gij27261824	SV2B, synaptic vesicle glycoprotein 2B [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gij29789104	beta-soluble NSF attachment protein [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gij31543797	synaptotagmin-2 [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gij31543940	vesicle-associated membrane protein-associated protein B [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gij12963799	V-type proton ATPase subunit D [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gij14318722	ATPase, H+ transporting, lysosomal V1 subunit H [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gij148671925	ATPase, H+ transporting, lysosomal V0 subunit A1, isoform CRA_i [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gij16758754	V-type proton ATPase subunit F [Rattus norvegicus]	synaptische Vesikelproteine
gij168983990	ATPase, H+ transporting, lysosomal V1 subunit G2 [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gij26390051	V-type proton ATPase 16 kDa proteolipid subunit, Atp6v0c [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gij26390051	V-type proton ATPase 16 kDa proteolipid subunit, Atp6v0c [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gij31560731	V-type proton ATPase catalytic subunit A [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gij31981304	V-type proton ATPase subunit d 1 [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gij340007377	V-type proton ATPase 116 kDa subunit a isoform 1 [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gij45504359	V-type proton ATPase subunit E 1 [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gij74142419	V-type proton ATPase catalytic subunit A [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gij74183858	V-type proton ATPase catalytic subunit A [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gij74186750	V-type proton ATPase 116 kDa subunit a isoform 1 [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gij74191447	V-type proton ATPase subunit B, brain isoform [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gij74219390	V-type proton ATPase subunit S1 [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gij74220409	V-type proton ATPase subunit G 1 [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gij74220440	V-type proton ATPase subunit B, brain isoform [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gij74220560	V-type proton ATPase catalytic subunit A [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gij74223066	V-type proton ATPase subunit B, brain isoform [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gij148677501	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, alpha subunit, isoform 1, isoform CRA_e [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gij10181206	GABA(A) receptor-associated protein-like 1 [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gij110625902	gamma-soluble NSF attachment protein [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gij11528516	neurogranin [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gij11528518	SV2A, synaptic vesicle glycoprotein 2A [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gij116283843	Slc6a17 protein [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gij123702073	vesicle-associated membrane protein 1 isoform b [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gij148686724	dynein cytoplasmic 1 heavy chain 1, isoform CRA_b [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gij148689761	synaptotagmin I, isoform CRA_b [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine

NCBI Nr.	Proteinname	Proteingruppe
gi 148706349	Vesicle-associated membrane protein-associated protein A [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gi 18087731	dynein light chain 2, cytoplasmic [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gi 189339262	V-type proton ATPase subunit C 1 [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gi 19527400	synaptotagmin-12 [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gi 218156282	vesicular glutamate transporter 1 [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gi 26347065	Synaptoporin [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gi 26347065	Synaptoporin [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gi 26665359	vesicular GABA transporter a form [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gi 28076935	dynactin subunit 2 isoform 3 [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gi 28502901	Stx1a protein [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gi 28972375	SV2B, Synaptic vesicle glycoprotein 2B [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gi 409226	brain beta spectrin [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gi 5031569	alpha-centractin [Homo sapiens]	synaptische Vesikelproteine
gi 55715891	Vat1 protein [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gi 56205529	clathrin, heavy polypeptide (Hc) [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gi 56205529	clathrin, heavy polypeptide (Hc) [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gi 6678197	synaptotagmin-1 [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gi 6754240	neuron-specific calcium-binding protein hippocalcin [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gi 6755588	SNAP-25: synaptosomal-associated protein 25 [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gi 74186656	VGLUT1 [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gi 74211135	Synaptotagmin-1 [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gi 98960798	SV2A, Synaptic vesicle glycoprotein 2A [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gi 9937988	Scamp5: secretory carrier-associated membrane protein 5 [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gi 6679803	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP1A [Mus musculus]	Transkription, Translation
gi 168984527	histidine triad nucleotide binding protein [Mus musculus]	Transkription, Translation
gi 118601011	secretory carrier-associated membrane protein 3 [Mus musculus]	Transkription, Translation
gi 148678284	Ribosomal_S13 [Mus musculus]	Transkription, Translation
gi 148699419	mCG116065 [Mus musculus]	Transkription, Translation
gi 148704835	mCG125660 [Mus musculus]	Transkription, Translation
gi 149258678	PREDICTED: 40S ribosomal protein S12-like [Mus musculus]	Transkription, Translation
gi 149259080	PREDICTED: 60S acidic ribosomal protein P1-like isoform 1 [Mus musculus]	Transkription, Translation
gi 149263818	PREDICTED: 60S ribosomal protein L35a-like [Mus musculus]	Transkription, Translation
gi 15029927	Rps13 protein [Mus musculus]	Transkription, Translation
gi 154550710	ubiquitin A-52 residue ribosomal protein fusion product 1 [Mus musculus]	Transkription, Translation
gi 26353478	Rpl12 [Mus musculus]	Transkription, Translation
gi 309264869	PREDICTED: 40S ribosomal protein S20-like, partial [Mus musculus]	Transkription, Translation
gi 34784540	Gcn11 protein [Mus musculus]	Transkription, Translation
gi 52078405	Rps16 protein [Mus musculus]	Transkription, Translation
gi 74142927	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 13 [Mus musculus]	Transkription, Translation
gi 12848861	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1 [Mus musculus]	Transkription, Translation
gi 1542845	eRF1 [Mus musculus]	Transkription, Translation
gi 1583224	RNA polymerase II elongation factor	Transkription, Translation
gi 1583224	RNA polymerase II elongation factor	Transkription, Translation
gi 220938210	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 2 [Mus musculus]	Transkription, Translation
gi 347839	T-complex protein 1 subunit gamma [Mus musculus]	Transkription, Translation
gi 38328278	Hnrpa3 protein [Mus musculus]	Transkription, Translation
gi 38511951	Eef2 protein [Mus musculus]	Transkription, Translation
gi 40807498	ribonuclease UK114 [Mus musculus]	Transkription, Translation
gi 60551056	Nucleophosmin, Npm1 protein [Mus musculus]	Transkription, Translation
gi 6679805	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP2 precursor [Mus musculus]	Transkription, Translation
gi 74191492	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase [Mus musculus]	Transkription, Translation
gi 74191674	T-complex protein 1 subunit alpha [Mus musculus]	Transkription, Translation
gi 74144160	AP-3 complex subunit beta-2 [Mus musculus]	vesikulärer Transport
gi 116283284	Arfaptin-2 [Mus musculus]	vesikulärer Transport
gi 148706549	ADP-ribosylation factor-like 6 interacting protein 2, isoform CRA_b [Mus musculus]	vesikulärer Transport
gi 6679809	flotillin-1 [Mus musculus]	vesikulärer Transport

## Anhang

NCBI Nr.	Proteinname	Proteingruppe
gij74206687	Rogdi [Mus musculus]	Zellwachstum
gij2506073	ERK2 [Mus musculus]	Zellwachstum
gij6677839	protein S100-B [Mus musculus]	Zellwachstum
gij148667416	CD9 antigen, isoform CRA_b [Mus musculus]	Zellwachstum
gij148706176	mCG50936 [Mus musculus]	Zellwachstum
gij50823	Hemomucin [Mus musculus]	Zellwachstum
gij116283387	Nefl protein [Mus musculus]	Zytoskelett
gij117606375	neuronal-specific septin-3 [Mus musculus]	Zytoskelett
gij124504386	Nefm protein [Mus musculus]	Zytoskelett
gij13516471	beta-actin FE-3 [Rattus norvegicus]	Zytoskelett
gij144719132	Fscn1 protein [Mus musculus]	Zytoskelett
gij148539957	alpha-internexin [Mus musculus]	Zytoskelett
gij148693354	septin 7, isoform CRA_b [Mus musculus]	Zytoskelett
gij149255823	PREDICTED: cofilin-1-like [Mus musculus]	Zytoskelett
gij33244031	Arpc4 protein, Arp2/3 subunit 4 [Mus musculus]	Zytoskelett
gij48237757	beta-actin [Mus musculus]	Zytoskelett
gij49868	put, beta-actin (aa 27-375) [Mus musculus]	Zytoskelett
gij51261360	Tln2 protein [Mus musculus]	Zytoskelett
gij51709421	Transforming protein RhoA [Mus musculus]	Zytoskelett
gij62871628	Sept5 protein [Mus musculus]	Zytoskelett
gij6671746	cofilin-2 [Mus musculus]	Zytoskelett
gij7288857	neural tropomodulin N-Tmod [Mus musculus]	Zytoskelett
gij74184369	Septin-7 [Mus musculus]	Zytoskelett
gij74226714	T-complex protein 1 subunit delta [Mus musculus]	Zytoskelett
gij9790219	destrin [Mus musculus]	Zytoskelett
gij122889356	microtubule-associated protein tau [Mus musculus]	Zytoskelett
gij148682709	mCG49614, isoform CRA_a [Mus musculus]	Zytoskelett
gij19353679	Actr1b protein [Mus musculus]	Zytoskelett
gij209447523	Cell division control protein 42 homolog (Cdc42)	Zytoskelett
gij28913745	Prkar2b protein [Mus musculus]	Zytoskelett
gij32015	alpha-tubulin [Homo sapiens]	Zytoskelett
gij6272692	short microtubule-associated protein 1A [Mus musculus]	Zytoskelett
gij6272693	long microtubule-associated protein 1A [Mus musculus]	Zytoskelett
gij74181454	Tubulin alpha-1B chain [Mus musculus]	Zytoskelett
gij17978023	nonmuscle heavy chain myosin II-A [Mus musculus]	Zytoskelett
gij227523	myosin H	Zytoskelett
gij124249058	tectonin beta-propeller repeat-containing protein 1 [Mus musculus]	keiner Gruppe zugeordnet
gij13879482	2900073G15Rik protein [Mus musculus]	keiner Gruppe zugeordnet
gij148683374	hyaluronan and proteoglycan link protein 2, isoform CRA_a [Mus musculus]	keiner Gruppe zugeordnet
gij21362277	CDP-diacylglycerol--inositol 3-phosphatidyltransferase isoform 2 [Mus musculus]	keiner Gruppe zugeordnet
gij44890689	Hyaluronan and proteoglycan link protein 1 [Mus musculus]	keiner Gruppe zugeordnet
gij74139418	Membrane-associated progesterone receptor component 1 [Mus musculus]	keiner Gruppe zugeordnet
gij123173728	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP1B [Mus musculus]	keiner Gruppe zugeordnet
gij12846963	Hemoglobin subunit alpha [Mus musculus]	keiner Gruppe zugeordnet
gij12857720	unnamed protein product, C6orf174 homolog [Mus musculus]	keiner Gruppe zugeordnet
gij13385270	histidine triad nucleotide-binding protein 3 [Mus musculus]	keiner Gruppe zugeordnet
gij148675531	mCG121696 [Mus musculus]	keiner Gruppe zugeordnet
gij148684742	hemoglobin Z, beta-like embryonic chain, isoform CRA_a [Mus musculus]	keiner Gruppe zugeordnet
gij148695714	COMM domain containing 9, isoform CRA_c [Mus musculus]	keiner Gruppe zugeordnet
gij148696638	abhydrolase domain containing 12, isoform CRA_b [Mus musculus]	keiner Gruppe zugeordnet
gij148697407	RIKEN cDNA 0910001A06, isoform CRA_b [Mus musculus]	keiner Gruppe zugeordnet
gij148697982	complement component 1, q subcomponent, beta polypeptide, isoform CRA_b [Mus musculus]	keiner Gruppe zugeordnet
gij148705830	transmembrane protein 33, isoform CRA_a [Mus musculus]	keiner Gruppe zugeordnet
gij148709441	transmembrane protein 109, isoform CRA_a [Mus musculus]	keiner Gruppe zugeordnet
gij15341776	Receptor accessory protein 5 [Mus musculus]	keiner Gruppe zugeordnet
gij156257643	beta-globin [Mus musculus]	keiner Gruppe zugeordnet

NCBI Nr.	Proteinname	Proteingruppe
gi 159163325	Chain A, Solution Structure Of Mouse Ubiquitin-Like 3 Protein	keiner Gruppe zugeordnet
gi 17647499	hemoglobin, beta adult minor chain [Mus musculus]	keiner Gruppe zugeordnet
gi 18017602	SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein 3 [Mus musculus]	keiner Gruppe zugeordnet
gi 191765	alpha-fetoprotein	keiner Gruppe zugeordnet
gi 193209	phosphoprotein	keiner Gruppe zugeordnet
gi 193761	alpha-globin [Mus musculus]	keiner Gruppe zugeordnet
gi 21312460	uncharacterized protein C10orf35 homolog [Mus musculus]	keiner Gruppe zugeordnet
gi 220938248	ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1 [Mus musculus]	keiner Gruppe zugeordnet
gi 223462890	Spna2 protein [Mus musculus]	keiner Gruppe zugeordnet
gi 226443091	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0 [Mus musculus]	keiner Gruppe zugeordnet
gi 241913509	Chain B, Crystal Structure Of Hemoglobin From Mouse (Mus Musculus)at 2,8	keiner Gruppe zugeordnet
gi 259090165	Chain A, Structural Basis Of Pp2a And Sgo Interaction	keiner Gruppe zugeordnet
gi 26325356	SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein 2 [Mus musculus]	keiner Gruppe zugeordnet
gi 27369996	hypothetical protein LOC230085 [Mus musculus]	keiner Gruppe zugeordnet
gi 28077021	TLD domain-containing protein KIAA1609 [Mus musculus]	keiner Gruppe zugeordnet
gi 30519931	receptor expression-enhancing protein 1 [Mus musculus]	keiner Gruppe zugeordnet
gi 31981350	protein FAM49A [Mus musculus]	keiner Gruppe zugeordnet
gi 31982300	hemoglobin, beta adult major chain [Mus musculus]	keiner Gruppe zugeordnet
gi 32484336	Otub1 protein [Mus musculus]	keiner Gruppe zugeordnet
gi 553919	alpha-1-globin [Mus musculus]	keiner Gruppe zugeordnet
gi 74149659	Protein disulfide-isomerase [Mus musculus]	keiner Gruppe zugeordnet
gi 74204138	Protein disulfide-isomerase A3 [Mus musculus]	keiner Gruppe zugeordnet

## b) Proteine, die nur in E5 identifiziert wurden

UniProtKB Nr.	Proteinname	Proteingruppe
PLEC_MOUSE	Plectin OS=Mus musculus GN=Plec PE=1 SV=2	Zytoskelett
ACTC_MOUSE	Actin, alpha cardiac muscle 1 - Mus musculus (Mouse)	Zytoskelett
ACTG_MOUSE	Actin, cytoplasmic 2 - Mus musculus (Mouse)	Zytoskelett
ACTN2_MOUSE	Alpha-actinin-2 OS=Mus musculus GN=Actn2 PE=1 SV=1	Zytoskelett
AIX_MOUSE	Alpha-internexin OS=Mus musculus GN=Ina PE=1 SV=2	Zytoskelett
ARP10_MOUSE	Actin-related protein 10 OS=Mus musculus GN=Actr10 PE=1 SV=2	Zytoskelett
ARP3_MOUSE	Actin-related protein 3 OS=Mus musculus GN=Actr3 PE=1 SV=3	Zytoskelett
ARPC2_MOUSE	Actin-related protein 2/3 complex subunit 2 OS=Mus musculus GN=Arpc2 PE=1 SV=3	Zytoskelett
ARPC4_MOUSE	Actin-related protein 2/3 complex subunit 4 OS=Mus musculus GN=Arpc4 PE=1 SV=3	Zytoskelett
CAP1_MOUSE	Adenylyl cyclase-associated protein 1 OS=Mus musculus GN=Cap1 PE=1 SV=4	Zytoskelett
CAZA2_MOUSE	F-actin-capping protein subunit alpha-2 OS=Mus musculus GN=Capza2 PE=1 SV=3	Zytoskelett
COF1_MOUSE	Cofilin-1 OS=Mus musculus GN=Cfl1 PE=1 SV=3	Zytoskelett
COR1C_MOUSE	Coronin-1C OS=Mus musculus GN=Coro1c PE=1 SV=2	Zytoskelett
DEST_MOUSE	Destrin OS=Mus musculus GN=Dstn PE=1 SV=3	Zytoskelett
E41L3_MOUSE	Band 4,1-like protein 3 OS=Mus musculus GN=Epb41l3 PE=1 SV=1	Zytoskelett
NEB2_MOUSE	Neurabin-2 OS=Mus musculus GN=Ppp1f9b PE=1 SV=1	Zytoskelett
TCPB_MOUSE	T-complex protein 1 subunit beta - Mus musculus (Mouse)	Zytoskelett
TCPZ_MOUSE	T-complex protein 1 subunit zeta OS=Mus musculus GN=Cct6a PE=1 SV=3	Zytoskelett
TMOD2_MOUSE	Tropomodulin-2 OS=Mus musculus GN=Tmod2 PE=1 SV=2	Zytoskelett
TPM3_MOUSE	Tropomyosin alpha-3 chain OS=Mus musculus GN=Tpm3 PE=1 SV=2	Zytoskelett
SEP11_MOUSE	Septin-11 OS=Mus musculus GN=Sept11 PE=1 SV=4	Zytoskelett
SEPT2_MOUSE	Septin-2 OS=Mus musculus GN=Sept2 PE=1 SV=2	Zytoskelett
SEPT3_MOUSE	Neuronal-specific septin-3 OS=Mus musculus GN=Sept3 PE=1 SV=2	Zytoskelett
SEPT5_MOUSE	Septin-5 OS=Mus musculus GN=Sept5 PE=1 SV=2	Zytoskelett
SEPT6_MOUSE	Septin-6 - Mus musculus (Mouse)	Zytoskelett
SEPT7_MOUSE	Septin-7 OS=Mus musculus GN=Sept7 PE=1 SV=1	Zytoskelett
ACTY_MOUSE	Beta-centractin OS=Mus musculus GN=Actr1b PE=1 SV=1	Zytoskelett
ACTZ_MOUSE	Alpha-centractin OS=Mus musculus GN=Actr1a PE=2 SV=1	Zytoskelett
MAP1S_MOUSE	Microtubule-associated protein 1S OS=Mus musculus GN=Map1s PE=1 SV=2	Zytoskelett
MAP6_MOUSE	Microtubule-associated protein 6 OS=Mus musculus GN=Map6 PE=1 SV=2	Zytoskelett

# Anhang

UniProtKB Nr.	Proteinname	Proteingruppe
MLP3B_MOUSE	Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B OS=Mus musculus GN=Map1lc3b PE=1 SV=3	Zytoskelett
NDEL1_MOUSE	Nuclear distribution protein nudE-like 1 OS=Mus musculus GN=Ndel1 PE=1 SV=2	Zytoskelett
TBB2B_MOUSE	Tubulin beta-2B chain OS=Mus musculus GN=Tubb2b PE=1 SV=1	Zytoskelett
TPPP_MOUSE	Tubulin polymerization-promoting protein OS=Mus musculus GN=Tppp PE=1 SV=1	Zytoskelett
DCTN2_MOUSE	Dynactin subunit 2 OS=Mus musculus GN=Dctn2 PE=1 SV=3	Zytoskelett
DCTN3_MOUSE	Dynactin subunit 3 OS=Mus musculus GN=Dctn3 PE=2 SV=2	Zytoskelett
MYO1H_MOUSE	Myosin-Ih OS=Mus musculus GN=Myo1h PE=2 SV=2	Zytoskelett
MYO5A_MOUSE	Myosin-Va OS=Mus musculus GN=Myo5a PE=1 SV=2	Zytoskelett
NCKP1_MOUSE	Nck-associated protein 1 OS=Mus musculus GN=Nckap1 PE=2 SV=2	Zytoskelett
VP33A_MOUSE	Vacuolar protein sorting-associated protein 33A OS=Mus musculus GN=Vps33a PE=1 SV=2	endosomale Proteine
VPS11_MOUSE	Vacuolar protein sorting-associated protein 11 homolog OS=Mus musculus GN=Vps11 PE=1 SV=3	endosomale Proteine
VPS16_MOUSE	Vacuolar protein sorting-associated protein 16 homolog OS=Mus musculus GN=Vps16 PE=1 SV=3	endosomale Proteine
VPS18_MOUSE	Vacuolar protein sorting-associated protein 18 homolog - Mus musculus (Mouse)	endosomale Proteine
WAHS7_MOUSE	WASH complex subunit 7 OS=Mus musculus GN=Kiaa1033 PE=2 SV=2	endosomale Proteine
EEA1_MOUSE	Early endosome antigen 1 OS=Mus musculus GN=Eea1 PE=2 SV=2	endosomale Proteine
IST1_MOUSE	IST1 homolog OS=Mus musculus GN=Ist1 PE=2 SV=1	endosomale Proteine
VAMP3_MOUSE	Vesicle-associated membrane protein 3 OS=Mus musculus GN=Vamp3 PE=1 SV=1	endosomale Proteine
CLVS1_MOUSE	Clavesin-1 OS=Mus musculus GN=Civs1 PE=2 SV=1	endosomale Proteine
CLVS2_MOUSE	Clavesin-2 OS=Mus musculus GN=Civs2 PE=2 SV=1	endosomale Proteine
ARL8A_MOUSE	ADP-ribosylation factor-like protein 8A OS=Mus musculus GN=Arf8a PE=2 SV=1	endosomale Proteine
ARL8B_MOUSE	ADP-ribosylation factor-like protein 8B OS=Mus musculus GN=Arf8b PE=2 SV=1	endosomale Proteine
SHLB1_MOUSE	Endophilin-B1 OS=Mus musculus GN=Sh3glb1 PE=1 SV=1	endosomale Proteine
VP26A_MOUSE	Vacuolar protein sorting-associated protein 26A OS=Mus musculus GN=Vps26a PE=2 SV=1	endosomale Proteine
VP26B_MOUSE	Vacuolar protein sorting-associated protein 26B OS=Mus musculus GN=Vps26b PE=1 SV=1	endosomale Proteine
SNX27_MOUSE	Sorting nexin-27 OS=Mus musculus GN=Snx27 PE=1 SV=2	endosomale Proteine
STRUM_MOUSE	Strumpellin OS=Mus musculus GN=Kiaa0196 PE=2 SV=2	endosomale Proteine
TOM1_MOUSE	Target of Myb protein 1 OS=Mus musculus GN=Tom1 PE=1 SV=1	endosomale Proteine
TRIM3_MOUSE	Tripartite motif-containing protein 3 OS=Mus musculus GN=Trim3 PE=1 SV=1	endosomale Proteine
VPS41_MOUSE	Vacuolar protein sorting-associated protein 41 homolog OS=Mus musculus GN=Vps41 PE=2 SV=1	endosomale Proteine
ATIF1_MOUSE	ATPase inhibitor, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Atpf1 PE=2 SV=1	Energiestoffwechsel
ATPA_MOUSE	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Atp5a1 PE=1 SV=1	Energiestoffwechsel
ATPO_MOUSE	ATP synthase subunit O, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Atp5o PE=1 SV=1	Energiestoffwechsel
NDUA4_MOUSE	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 4 OS=Mus musculus GN=Ndufa4 PE=1 SV=2	Energiestoffwechsel
NDUAD_MOUSE	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 13 OS=Mus musculus GN=Ndufa13 PE=1 SV=3	Energiestoffwechsel
NDUBA_MOUSE	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 10 OS=Mus musculus GN=Ndufb10 PE=1 SV=3	Energiestoffwechsel
NDUS3_MOUSE	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Ndufs3 PE=1 SV=2	Energiestoffwechsel
GPX41_MOUSE	Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Gpx4 PE=2 SV=4	Energiestoffwechsel
PRDX1_MOUSE	Peroxiredoxin-1 OS=Mus musculus GN=Prdx1 PE=1 SV=1	Energiestoffwechsel
PRDX3_MOUSE	Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Prdx3 PE=1 SV=1	Energiestoffwechsel
PRDX5_MOUSE	Peroxiredoxin-5, mitochondrial precursor - Mus musculus (Mouse)	Energiestoffwechsel
ADT1_MOUSE	ADP/ATP translocase 1 OS=Mus musculus GN=Slc25a4 PE=1 SV=4	Energiestoffwechsel
ADT2_MOUSE	ADP/ATP translocase 2 OS=Mus musculus GN=Slc25a5 PE=1 SV=3	Energiestoffwechsel
AUHM_MOUSE	Methylglutaconyl-CoA hydratase, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Auh PE=2 SV=1	Energiestoffwechsel
CISY_MOUSE	Citrate synthase, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Cs PE=1 SV=1	Energiestoffwechsel
COX2_MOUSE	Cytochrome c oxidase subunit 2 OS=Mus musculus GN=Mtco2 PE=1 SV=1	Energiestoffwechsel
COX41_MOUSE	Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Cox4i1 PE=1 SV=2	Energiestoffwechsel
COX6C_MOUSE	Cytochrome c oxidase subunit 6C OS=Mus musculus GN=Cox6c PE=1 SV=3	Energiestoffwechsel
CYC_MOUSE	Cytochrome c, somatic - Mus musculus (Mouse)	Energiestoffwechsel
DECR_MOUSE	2,4-dienoyl-CoA reductase, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Decr1 PE=1 SV=1	Energiestoffwechsel
DHSA_MOUSE	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Sdha PE=1 SV=1	Energiestoffwechsel
DLDH_MOUSE	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Did PE=1 SV=2	Energiestoffwechsel
ECHA_MOUSE	Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Hadha PE=1 SV=1	Energiestoffwechsel
ECHM_MOUSE	Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Echs1 PE=1 SV=1	Energiestoffwechsel
FIS1_MOUSE	Mitochondrial fission 1 protein OS=Mus musculus GN=Fis1 PE=1 SV=1	Energiestoffwechsel

UniProtKB Nr.	Proteinname	Proteingruppe
FKB1A_MOUSE	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP1A OS=Mus musculus GN=Fkbp1a PE=2 SV=2	Energiestoffwechsel
FKBP2_MOUSE	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP2 OS=Mus musculus GN=Fkbp2 PE=1 SV=1	Energiestoffwechsel
G3P_MOUSE	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase - Mus musculus (Mouse)	Energiestoffwechsel
GSTP2_MOUSE	Glutathione S-transferase P 2 OS=Mus musculus GN=Gstp2 PE=2 SV=2	Energiestoffwechsel
HMGCL_MOUSE	Hydroxymethylglutaryl-CoA lyase, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Hmgcl PE=1 SV=2	Energiestoffwechsel
IDH3A_MOUSE	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondrial OS=Mus musculus GN=ldh3a PE=1 SV=1	Energiestoffwechsel
ISC2A_MOUSE	Isochormatase domain-containing protein 2A, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Isoc2a PE=2 SV=1	Energiestoffwechsel
M2OM_MOUSE	Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein OS=Mus musculus GN=Slc25a11 PE=1 SV=3	Energiestoffwechsel
MTCH2_MOUSE	Mitochondrial carrier homolog 2 OS=Mus musculus GN=Mtch2 PE=1 SV=1	Energiestoffwechsel
ODO1_MOUSE	2-oxoglutarate dehydrogenase, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Ogdh PE=1 SV=3	Energiestoffwechsel
ODP2_MOUSE	Dihydropolyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mitochondrial precursor - Mus musculus (Mouse)	Energiestoffwechsel
PARK7_MOUSE	Protein DJ-1 OS=Mus musculus GN=Park7 PE=1 SV=1	Energiestoffwechsel
PDK3_MOUSE	[Pyruvate dehydrogenase [lipoamide]] kinase isozyme 3, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Pdk3 PE=2 SV=1	Energiestoffwechsel
QCR2_MOUSE	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial precursor - Mus musculus (Mouse)	Energiestoffwechsel
QCR9_MOUSE	Cytochrome b-c1 complex subunit 9 OS=Mus musculus GN=Uqcr10 PE=1 SV=1	Energiestoffwechsel
QORL2_MOUSE	Quinone oxidoreductase-like protein 2 OS=Mus musculus PE=2 SV=1	Energiestoffwechsel
SAHH2_MOUSE	Putative adenosylhomocysteinase 2 OS=Mus musculus GN=Ahcy1 PE=1 SV=1	Energiestoffwechsel
SAHH3_MOUSE	Putative adenosylhomocysteinase 3 OS=Mus musculus GN=Ahcy2 PE=1 SV=1	Energiestoffwechsel
SCOT1_MOUSE	Succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase 1, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Oxct1 PE=1 SV=1	Energiestoffwechsel
SODM_MOUSE	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial OS=Mus musculus GN=Sod2 PE=1 SV=3	Energiestoffwechsel
SUCA_MOUSE	Succinyl-CoA ligase [ADP/GDP-forming] subunit alpha, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Sucg1 PE=1 SV=4	Energiestoffwechsel
THIKA_MOUSE	3-ketoacyl-CoA thiolase A, peroxisomal OS=Mus musculus GN=Acaa1a PE=2 SV=1	Energiestoffwechsel
THIO_MOUSE	Thioredoxin OS=Mus musculus GN=Txn PE=1 SV=3	Energiestoffwechsel
TM1L2_MOUSE	TOM1-like protein 2 OS=Mus musculus GN=Tom1l2 PE=1 SV=1	Energiestoffwechsel
USMG5_MOUSE	Up-regulated during skeletal muscle growth protein 5 OS=Mus musculus GN=Usmg5 PE=1 SV=1	Energiestoffwechsel
VIGLN_MOUSE	Vigilin OS=Mus musculus GN=Hdlbp PE=1 SV=1	Energiestoffwechsel
CALR_MOUSE	Calreticulin OS=Mus musculus GN=Calr PE=1 SV=1	früher sekretorischer Weg
ENPL_MOUSE	Endoplasmic reticulum protein OS=Mus musculus GN=Hsp90b1 PE=1 SV=2	früher sekretorischer Weg
RAB1A_MOUSE	Ras-related protein Rab-1A OS=Mus musculus GN=Rab1A PE=1 SV=3	früher sekretorischer Weg
RAB1B_MOUSE	Ras-related protein Rab-1B OS=Mus musculus GN=Rab1b PE=1 SV=1	früher sekretorischer Weg
ASNA_MOUSE	ATPase Asna1 OS=Mus musculus GN=Asna1 PE=1 SV=2	früher sekretorischer Weg
COPA_MOUSE	Coatamer subunit alpha OS=Mus musculus GN=Copa PE=1 SV=2	früher sekretorischer Weg
COPB_MOUSE	Coatamer subunit beta - Mus musculus (Mouse)	früher sekretorischer Weg
COPD_MOUSE	Coatamer subunit delta OS=Mus musculus GN=Arcn1 PE=2 SV=2	früher sekretorischer Weg
COPE_MOUSE	Coatamer subunit epsilon OS=Mus musculus GN=Cope PE=2 SV=3	früher sekretorischer Weg
COPG2_MOUSE	Coatamer subunit gamma-2 OS=Mus musculus GN=Copg2 PE=2 SV=1	früher sekretorischer Weg
ERP29_MOUSE	Endoplasmic reticulum resident protein 29 OS=Mus musculus GN=Erp29 PE=1 SV=2	früher sekretorischer Weg
NACA_MOUSE	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha OS=Mus musculus GN=Naca PE=1 SV=1	früher sekretorischer Weg
PHB2_MOUSE	Prohibitin-2 OS=Mus musculus GN=Phb2 PE=1 SV=1	früher sekretorischer Weg
SC23A_MOUSE	Protein transport protein Sec23A OS=Mus musculus GN=Sec23a PE=1 SV=2	früher sekretorischer Weg
SRP14_MOUSE	Signal recognition particle 14 kDa protein OS=Mus musculus GN=Srp14 PE=1 SV=1	früher sekretorischer Weg
SRP68_MOUSE	Signal recognition particle 68 kDa protein OS=Mus musculus GN=Srp68 PE=2 SV=2	früher sekretorischer Weg
TERA_MOUSE	Transitional endoplasmic reticulum ATPase OS=Mus musculus GN=Vcp PE=1 SV=4	früher sekretorischer Weg
TPC2L_MOUSE	Trafficking protein particle complex subunit 2-like protein OS=Mus musculus GN=Trappc2l PE=2 SV=1	früher sekretorischer Weg
TPPC1_MOUSE	Trafficking protein particle complex subunit 1 OS=Mus musculus GN=Trappc1 PE=1 SV=1	früher sekretorischer Weg
TPPC2_MOUSE	Trafficking protein particle complex subunit 2 OS=Mus musculus GN=Trappc2 PE=1 SV=1	früher sekretorischer Weg
TPPC4_MOUSE	Trafficking protein particle complex subunit 4 OS=Mus musculus GN=Trappc4 PE=1 SV=1	früher sekretorischer Weg
TPPC5_MOUSE	Trafficking protein particle complex subunit 5 OS=Mus musculus GN=Trappc5 PE=1 SV=1	früher sekretorischer Weg
USO1_MOUSE	General vesicular transport factor p115 OS=Mus musculus GN=Uso1 PE=2 SV=2	früher sekretorischer Weg
VP13A_MOUSE	Vacuolar protein sorting-associated protein 13A OS=Mus musculus GN=Vps13a PE=1 SV=1	früher sekretorischer Weg
PDIA3_MOUSE	Protein disulfide-isomerase A3 OS=Mus musculus GN=Pdia3 PE=1 SV=2	HSP
CH60_MOUSE	60 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Hspd1 PE=1 SV=1	HSP

## Anhang

UniProtKB Nr.	Proteinname	Proteingruppe
DNJA1_MOUSE	DnaJ homolog subfamily A member 1 OS=Mus musculus GN=Dnaja1 PE=1 SV=1	HSP
DNJA2_MOUSE	DnaJ homolog subfamily A member 2 OS=Mus musculus GN=Dnaja2 PE=2 SV=1	HSP
DNJB6_MOUSE	DnaJ homolog subfamily B member 6 OS=Mus musculus GN=Dnjb6 PE=1 SV=4	HSP
DNJC5_MOUSE	DnaJ homolog subfamily C member 5 OS=Mus musculus GN=Dnaja5 PE=1 SV=1	HSP
HS105_MOUSE	Heat shock protein 105 kDa OS=Mus musculus GN=Hsph1 PE=1 SV=2	HSP
HSP72_MOUSE	Heat shock-related 70 kDa protein 2 OS=Mus musculus GN=Hspa2 PE=1 SV=2	HSP
HSP7C_MOUSE	Heat shock cognate 71 kDa protein OS=Mus musculus GN=Hspa8 PE=1 SV=1	HSP
K1045_MOUSE	Protein KIAA1045 OS=Mus musculus GN=Kiaa1045 PE=1 SV=2	HSP
C1QA_MOUSE	Complement C1q subcomponent subunit A OS=Mus musculus GN=C1qa PE=1 SV=1	Immunproteine
C1QB_MOUSE	Complement C1q subcomponent subunit B OS=Mus musculus GN=C1qb PE=1 SV=1	Immunproteine
C1QBP_MOUSE	Complement component 1 Q subcomponent-binding protein, mitochondrial OS=Mus musculus GN=C1qbp PE=1 SV=1	Immunproteine
C1QC_MOUSE	Complement C1q subcomponent subunit C OS=Mus musculus GN=C1qc PE=2 SV=1	Immunproteine
CYFP2_MOUSE	Cytoplasmic FMR1-interacting protein 2 OS=Mus musculus GN=Cyfp2 PE=1 SV=2	Immunproteine
FKBP3_MOUSE	FK506-binding protein 3 - Mus musculus (Mouse)	Immunproteine
ILF2_MOUSE	Interleukin enhancer-binding factor 2 OS=Mus musculus GN=Ilf2 PE=1 SV=1	Immunproteine
LYZ1_MOUSE	Lysozyme C-1 OS=Mus musculus GN=Lyz1 PE=1 SV=1	Immunproteine
NPM_MOUSE	Nucleophosmin OS=Mus musculus GN=Npm1 PE=1 SV=1	Immunproteine
KAP0_MOUSE	cAMP-dependent protein kinase type I-alpha regulatory subunit OS=Mus musculus GN=Pkar1a PE=1 SV=3	Kinase und Phosphatasen
KAP1_MOUSE	cAMP-dependent protein kinase type I-beta regulatory subunit OS=Mus musculus GN=Pkar1b PE=2 SV=2	Kinase und Phosphatasen
CSK21_MOUSE	Casein kinase II subunit alpha OS=Mus musculus GN=Csnk2a1 PE=1 SV=2	Kinase und Phosphatasen
CSK2B_MOUSE	Casein kinase II subunit beta OS=Mus musculus GN=Csnk2b PE=1 SV=1	Kinase und Phosphatasen
DGKB_MOUSE	Diacylglycerol kinase beta OS=Mus musculus GN=Dgkb PE=2 SV=2	Kinase und Phosphatasen
DGKZ_MOUSE	Diacylglycerol kinase zeta OS=Mus musculus GN=Dgkz PE=1 SV=2	Kinase und Phosphatasen
INP4A_MOUSE	Type I inositol-3,4-bisphosphate 4-phosphatase OS=Mus musculus GN=Inpp4a PE=2 SV=1	Kinase und Phosphatasen
PP2AB_MOUSE	Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit beta isoform OS=Mus musculus GN=Ppp2cb PE=1 SV=1	Kinase und Phosphatasen
PP2BA_MOUSE	Serine/threonine-protein phosphatase 2B catalytic subunit alpha isoform OS=Mus musculus GN=Ppp3ca PE=1 SV=1	Kinase und Phosphatasen
PRPS2_MOUSE	Ribose-phosphate pyrophosphokinase 2 OS=Mus musculus GN=Prps2 PE=1 SV=4	Kinase und Phosphatasen
DCLK1_MOUSE	Serine/threonine-protein kinase DCLK1 OS=Mus musculus GN=Dclk1 PE=1 SV=1	neuronales Wachstum
CDC42_MOUSE	Cell division control protein 42 homolog OS=Mus musculus GN=Cdc42 PE=1 SV=2	neuronales Wachstum
CSRP1_MOUSE	Cysteine and glycine-rich protein 1 OS=Mus musculus GN=Csrp1 PE=1 SV=3	neuronales Wachstum
ENOG_MOUSE	Gamma-enolase - Mus musculus (Mouse)	neuronales Wachstum
FGF12_MOUSE	Fibroblast growth factor 12 OS=Mus musculus GN=Fgf12 PE=2 SV=1	neuronales Wachstum
GD1L1_MOUSE	Ganglioside-induced differentiation-associated protein 1-like 1 OS=Mus musculus GN=Gdap111 PE=2 SV=1	neuronales Wachstum
LIN7C_MOUSE	Protein lin-7 homolog C OS=Mus musculus GN=Lin7c PE=1 SV=2	neuronales Wachstum
NCS1_MOUSE	Neuronal calcium sensor 1 OS=Mus musculus GN=Ncs1 PE=2 SV=3	neuronales Wachstum
NDKA_MOUSE	Nucleoside diphosphate kinase A OS=Mus musculus GN=Nme1 PE=1 SV=1	neuronales Wachstum
NDRG1_MOUSE	Protein NDRG1 OS=Mus musculus GN=Ndr1 PE=1 SV=1	neuronales Wachstum
NDRG2_MOUSE	Protein NDRG2 OS=Mus musculus GN=Ndr2 PE=1 SV=1	neuronales Wachstum
NDRG3_MOUSE	Protein NDRG3 OS=Mus musculus GN=Ndr3 PE=1 SV=1	neuronales Wachstum
NDRG4_MOUSE	Protein NDRG4 OS=Mus musculus GN=Ndr4 PE=1 SV=1	neuronales Wachstum
SERA_MOUSE	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase OS=Mus musculus GN=Phgdh PE=1 SV=3	neuronales Wachstum
HINT3_MOUSE	Histidine triad nucleotide-binding protein 3 OS=Mus musculus GN=Hint3 PE=2 SV=1	Proteolyse
STALP_MOUSE	AMSH-like protease OS=Mus musculus GN=Stamp1 PE=2 SV=1	Proteolyse
PSA6_MOUSE	Proteasome subunit alpha type-6 OS=Mus musculus GN=Psm6 PE=1 SV=1	Proteolyse
PSB3_MOUSE	Proteasome subunit beta type-3 OS=Mus musculus GN=Psm3 PE=1 SV=1	Proteolyse
RUN3A_MOUSE	RUN domain-containing protein 3A OS=Mus musculus GN=Rundc3a PE=1 SV=1	sonstige GTP-Interaktionsproteine
DOCK6_MOUSE	Dedicator of cytokinesis protein 6 OS=Mus musculus GN=Dock6 PE=1 SV=4	sonstige GTP-Interaktionsproteine
NGEF_MOUSE	Ephexin-1 OS=Mus musculus GN=Ngef PE=1 SV=1	sonstige GTP-Interaktionsproteine
KBRS1_MOUSE	NF-kappa-B inhibitor-interacting Ras-like protein 1 OS=Mus musculus GN=Nkiras1 PE=2 SV=1	sonstige GTP-Interaktionsproteine
RAB2A_MOUSE	Ras-related protein Rab-2A OS=Mus musculus GN=Rab2a PE=1 SV=1	sonstige GTP-Interaktionsproteine
RAB2B_MOUSE	Ras-related protein Rab-2A/B OS=Mus musculus GN=Rab2b PE=2 SV=1	sonstige GTP-Interaktionsproteine
RAB37_MOUSE	Ras-related protein Rab-37 OS=Mus musculus GN=Rab37 PE=1 SV=2	sonstige GTP-Interaktionsproteine

UniProtKB Nr.	Proteinname	Proteingruppe
RHG01_MOUSE	Rho GTPase-activating protein 1 OS=Mus musculus GN=Arhgap1 PE=1 SV=1	sonstige GTP-Interaktionsproteine
ARHG2_MOUSE	Rho guanine nucleotide exchange factor 2 OS=Mus musculus GN=Arhgef2 PE=1 SV=4	sonstige GTP-Interaktionsproteine
DIRA1_MOUSE	GTP-binding protein Di-Ras1 OS=Mus musculus GN=Diras1 PE=2 SV=1	sonstige GTP-Interaktionsproteine
DRG1_MOUSE	Developmentally-regulated GTP-binding protein 1 OS=Mus musculus GN=Drg1 PE=1 SV=1	sonstige GTP-Interaktionsproteine
GBB2_MOUSE	Guanine nucleotide-binding protein G(i)/G(S)/G(T) subunit beta-2 OS=Mus musculus GN=Gnb2 PE=1 SV=3	sonstige GTP-Interaktionsproteine
GBLP_MOUSE	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1 OS=Mus musculus GN=Gnb2l1 PE=1 SV=3	sonstige GTP-Interaktionsproteine
GNAI1_MOUSE	Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-1 OS=Mus musculus GN=Gnai1 PE=2 SV=1	sonstige GTP-Interaktionsproteine
GNL1_MOUSE	Guanine nucleotide-binding protein-like 1 OS=Mus musculus GN=Gnl1 PE=1 SV=4	sonstige GTP-Interaktionsproteine
RAC3_MOUSE	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 3 OS=Mus musculus GN=Rac3 PE=1 SV=1	sonstige GTP-Interaktionsproteine
RAP2B_MOUSE	Ras-related protein Rap-2b OS=Mus musculus GN=Rap2b PE=1 SV=1	sonstige GTP-Interaktionsproteine
RASN_MOUSE	GTPase NRas OS=Mus musculus GN=Nras PE=2 SV=1	sonstige GTP-Interaktionsproteine
RG6_MOUSE	Regulator of G-protein signaling 6 OS=Mus musculus GN=Rgs6 PE=1 SV=2	sonstige GTP-Interaktionsproteine
RHG30_MOUSE	Rho GTPase-activating protein 30 OS=Mus musculus GN=Arhgap30 PE=2 SV=3	sonstige GTP-Interaktionsproteine
RRAGA_MOUSE	Ras-related GTP-binding protein A - Mus musculus (Mouse), Rrag A	sonstige GTP-Interaktionsproteine
RRAGB_MOUSE	Ras-related GTP-binding protein B - Mus musculus (Mouse), Rrag B	sonstige GTP-Interaktionsproteine
VISL1_MOUSE	Visinin-like protein 1 OS=Mus musculus GN=Vsnl1 PE=1 SV=2	sonstige neuronale Proteine
MINK1_MOUSE	Misshapen-like kinase 1 OS=Mus musculus GN=Mink1 PE=1 SV=3	sonstige neuronale Proteine
GBRAP_MOUSE	Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein OS=Mus musculus GN=Gabarap PE=1 SV=2	sonstige neuronale Proteine
GLNA_MOUSE	Glutamine synthetase OS=Mus musculus GN=Glul PE=1 SV=6	sonstige neuronale Proteine
GRM6_MOUSE	Metabotropic glutamate receptor 6 OS=Mus musculus GN=Grm6 PE=2 SV=1	sonstige neuronale Proteine
EAA1_MOUSE	Excitatory amino acid transporter 1 OS=Mus musculus GN=Slc1a3 PE=1 SV=2	sonstige neuronale Proteine
HOME1_MOUSE	Homer protein homolog 1 OS=Mus musculus GN=Homer1 PE=1 SV=2	sonstige neuronale Proteine
FUBP2_MOUSE	Far upstream element-binding protein 2 OS=Mus musculus GN=Khsrp PE=1 SV=2	sonstige neuronale Proteine
HPCA_MOUSE	Neuron-specific calcium-binding protein hippocalcin OS=Mus musculus GN=Hpca PE=1 SV=2	sonstige neuronale Proteine
HPCL1_MOUSE	Hippocalcin-like protein 1 OS=Mus musculus GN=Hpcal1 PE=2 SV=2	sonstige neuronale Proteine
KPCG_MOUSE	Protein kinase C gamma type OS=Mus musculus GN=Prkcg PE=1 SV=1	sonstige neuronale Proteine
MYEF2_MOUSE	Myelin expression factor 2 OS=Mus musculus GN=Myef2 PE=1 SV=1	sonstige neuronale Proteine
NCALD_MOUSE	Neurocalcin-delta OS=Mus musculus GN=Ncald PE=1 SV=4	sonstige neuronale Proteine
NCDN_MOUSE	Neurochondrin OS=Mus musculus GN=Ncdn PE=1 SV=1	sonstige neuronale Proteine
NIPS1_MOUSE	Protein NipSnap homolog 1 OS=Mus musculus GN=Nipsnap1 PE=1 SV=1	sonstige neuronale Proteine
NIPS2_MOUSE	Protein NipSnap homolog 2 OS=Mus musculus GN=Gbas PE=2 SV=1	sonstige neuronale Proteine
PP1G_MOUSE	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-gamma catalytic subunit OS=Mus musculus GN=Ppp1cc PE=1 SV=1	sonstige neuronale Proteine
ARFG1_MOUSE	ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein 1 OS=Mus musculus GN=Arfgap1 PE=1 SV=2	synaptische Vesikelproteine
VPP1_MOUSE	V-type proton ATPase 116 kDa subunit a isoform 1 OS=Mus musculus GN=Atp6v0a1 PE=1 SV=3	synaptische Vesikelproteine
VA0D1_MOUSE	Vacuolar proton pump subunit d 1 OS=Mus musculus GN=Atp6v0d1 PE=1 SV=2	synaptische Vesikelproteine
VATA_MOUSE	Vacuolar ATP synthase catalytic subunit A OS=Mus musculus GN=Atp6v1a PE=1 SV=2	synaptische Vesikelproteine
VATB2_MOUSE	V-type proton ATPase subunit B, brain isoform OS=Mus musculus GN=Atp6v1b2 PE=1 SV=1	synaptische Vesikelproteine
VATC1_MOUSE	V-type proton ATPase subunit C 1 OS=Mus musculus GN=Atp6v1c1 PE=1 SV=4	synaptische Vesikelproteine
VATD_MOUSE	Vacuolar proton pump subunit D OS=Mus musculus GN=Atp6v1d PE=1 SV=1	synaptische Vesikelproteine
VATE1_MOUSE	Vacuolar proton pump subunit E 1 OS=Mus musculus GN=Atp6v1e1 PE=1 SV=2	synaptische Vesikelproteine
VATF_MOUSE	V-type proton ATPase subunit F OS=Mus musculus GN=Atp6v1f PE=1 SV=2	synaptische Vesikelproteine
VATG2_MOUSE	V-type proton ATPase subunit G 2 OS=Mus musculus GN=Atp6v1g2 PE=2 SV=1	synaptische Vesikelproteine
VATH_MOUSE	V-type proton ATPase subunit H OS=Mus musculus GN=Atp6v1h PE=1 SV=1	synaptische Vesikelproteine
KCC2A_MOUSE	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II alpha chain OS=Mus musculus GN=Camk2a PE=1 SV=2	synaptische Vesikelproteine
KCC2D_MOUSE	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II delta chain OS=Mus musculus GN=Camk2d PE=1 SV=1	synaptische Vesikelproteine
SPTA2_MOUSE	Spectrin alpha chain, brain - Mus musculus (Mouse)	synaptische Vesikelproteine
SPTB2_MOUSE	Spectrin beta chain, brain 1 OS=Mus musculus GN=Sptbn1 PE=1 SV=2	synaptische Vesikelproteine
RPGF4_MOUSE	Rap guanine nucleotide exchange factor 4 OS=Mus musculus GN=Rapgef4 PE=1 SV=1	synaptische Vesikelproteine
DC1I2_MOUSE	Cytoplasmic dynein 1 intermediate chain 2 OS=Mus musculus GN=Dync1i2 PE=2 SV=1	synaptische Vesikelproteine
DYL1_MOUSE	Dynein light chain 1, cytoplasmic OS=Mus musculus GN=Dynll1 PE=1 SV=1	synaptische Vesikelproteine
DYL2_MOUSE	Dynein light chain 2, cytoplasmic OS=Mus musculus GN=Dynll2 PE=1 SV=1	synaptische Vesikelproteine
RAB3C_MOUSE	Ras-related protein Rab-3C OS=Mus musculus GN=Rab3c PE=1 SV=1	synaptische Vesikelproteine

## Anhang

UniProtKB Nr.	Proteinname	Proteingruppe
NSF_MOUSE	Vesicle-fusing ATPase OS=Mus musculus GN=Nsf PE=1 SV=2	synaptische Vesikelproteine
PACN1_MOUSE	Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons protein 1 - Mus musculus (Mouse)	synaptische Vesikelproteine
SH3L2_MOUSE	SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein 2 OS=Mus musculus GN=Sh3bgrt2 PE=1 SV=1	synaptische Vesikelproteine
SNAB_MOUSE	Beta-soluble NSF attachment protein OS=Mus musculus GN=Napb PE=1 SV=2	synaptische Vesikelproteine
SNAG_MOUSE	Gamma-soluble NSF attachment protein OS=Mus musculus GN=Napg PE=1 SV=1	synaptische Vesikelproteine
SNP25_MOUSE	Synaptosomal-associated protein 25 OS=Mus musculus GN=Snap25 PE=1 SV=1	synaptische Vesikelproteine
SNP47_MOUSE	Synaptosomal-associated protein 47 OS=Mus musculus GN=Snap47 PE=1 SV=1	synaptische Vesikelproteine
STX1A_MOUSE	Syntaxin-1A OS=Mus musculus GN=Stx1a PE=1 SV=3	synaptische Vesikelproteine
SYN2_MOUSE	Synapsin-2 OS=Mus musculus GN=Syn2 PE=1 SV=2	synaptische Vesikelproteine
SYNJ1_MOUSE	Synaptojanin-1 OS=Mus musculus GN=Synj1 PE=1 SV=3	synaptische Vesikelproteine
TPRGL_MOUSE	Tumor protein p63-regulated gene 1-like protein OS=Mus musculus GN=Tprg1l PE=1 SV=1	synaptische Vesikelproteine
RL10_MOUSE	60S ribosomal protein L10 OS=Mus musculus GN=Rpl10 PE=2 SV=3	Transkription, Translation
RL10A_MOUSE	60S ribosomal protein L10a OS=Mus musculus GN=Rpl10a PE=1 SV=3	Transkription, Translation
RL12_MOUSE	60S ribosomal protein L12 OS=Mus musculus GN=Rpl12 PE=1 SV=2	Transkription, Translation
RL13_MOUSE	60S ribosomal protein L13 OS=Mus musculus GN=Rpl13 PE=2 SV=3	Transkription, Translation
RL13A_MOUSE	60S ribosomal protein L13a OS=Mus musculus GN=Rpl13a PE=1 SV=4	Transkription, Translation
RL14_MOUSE	60S ribosomal protein L14 OS=Mus musculus GN=Rpl14 PE=2 SV=3	Transkription, Translation
RL15_MOUSE	60S ribosomal protein L15 OS=Mus musculus GN=Rpl15 PE=2 SV=4	Transkription, Translation
RL17_MOUSE	60S ribosomal protein L17 OS=Mus musculus GN=Rpl17 PE=2 SV=3	Transkription, Translation
RL18_MOUSE	60S ribosomal protein L18 OS=Mus musculus GN=Rpl18 PE=2 SV=3	Transkription, Translation
RL18A_MOUSE	60S ribosomal protein L18a OS=Mus musculus GN=Rpl18a PE=1 SV=1	Transkription, Translation
RL19_MOUSE	60S ribosomal protein L19 OS=Mus musculus GN=Rpl19 PE=1 SV=1	Transkription, Translation
RL21_MOUSE	60S ribosomal protein L21 OS=Mus musculus GN=Rpl21 PE=2 SV=3	Transkription, Translation
RL23_MOUSE	60S ribosomal protein L23 OS=Mus musculus GN=Rpl23 PE=1 SV=1	Transkription, Translation
RL24_MOUSE	60S ribosomal protein L24 OS=Mus musculus GN=Rpl24 PE=2 SV=2	Transkription, Translation
RL26_MOUSE	60S ribosomal protein L26 OS=Mus musculus GN=Rpl26 PE=2 SV=1	Transkription, Translation
RL27_MOUSE	60S ribosomal protein L27 OS=Mus musculus GN=Rpl27 PE=2 SV=2	Transkription, Translation
RL27A_MOUSE	60S ribosomal protein L27a OS=Mus musculus GN=Rpl27a PE=2 SV=5	Transkription, Translation
RL28_MOUSE	60S ribosomal protein L28 OS=Mus musculus GN=Rpl28 PE=1 SV=2	Transkription, Translation
RL3_MOUSE	60S ribosomal protein L3 OS=Mus musculus GN=Rpl3 PE=2 SV=3	Transkription, Translation
RL30_MOUSE	60S ribosomal protein L30 OS=Mus musculus GN=Rpl30 PE=2 SV=2	Transkription, Translation
RL31_MOUSE	60S ribosomal protein L31 OS=Mus musculus GN=Rpl31 PE=2 SV=1	Transkription, Translation
RL34_MOUSE	60S ribosomal protein L34 OS=Mus musculus GN=Rpl34 PE=3 SV=2	Transkription, Translation
RL35_MOUSE	60S ribosomal protein L35 OS=Mus musculus GN=Rpl35 PE=2 SV=1	Transkription, Translation
RL35A_MOUSE	60S ribosomal protein L35a OS=Mus musculus GN=Rpl35a PE=2 SV=2	Transkription, Translation
RL36A_MOUSE	60S ribosomal protein L36a OS=Mus musculus GN=Rpl36a PE=3 SV=2	Transkription, Translation
RL37_MOUSE	60S ribosomal protein L37 OS=Mus musculus GN=Rpl37 PE=2 SV=3	Transkription, Translation
RL37A_MOUSE	60S ribosomal protein L37a OS=Mus musculus GN=Rpl37a PE=2 SV=2	Transkription, Translation
RL38_MOUSE	60S ribosomal protein L38 OS=Mus musculus GN=Rpl38 PE=2 SV=3	Transkription, Translation
RL39_MOUSE	60S ribosomal protein L39 OS=Mus musculus GN=Rpl39 PE=2 SV=2	Transkription, Translation
RL4_MOUSE	60S ribosomal protein L4 OS=Mus musculus GN=Rpl4 PE=1 SV=3	Transkription, Translation
RL5_MOUSE	60S ribosomal protein L5 OS=Mus musculus GN=Rpl5 PE=1 SV=3	Transkription, Translation
RL6_MOUSE	60S ribosomal protein L6 OS=Mus musculus GN=Rpl6 PE=1 SV=3	Transkription, Translation
RL7_MOUSE	60S ribosomal protein L7 OS=Mus musculus GN=Rpl7 PE=2 SV=2	Transkription, Translation
RL7A_MOUSE	60S ribosomal protein L7a OS=Mus musculus GN=Rpl7a PE=2 SV=2	Transkription, Translation
RL8_MOUSE	60S ribosomal protein L8 OS=Mus musculus GN=Rpl8 PE=2 SV=2	Transkription, Translation
RL9_MOUSE	60S ribosomal protein L9 OS=Mus musculus GN=Rpl9 PE=2 SV=2	Transkription, Translation
RLA0_MOUSE	60S acidic ribosomal protein P0 OS=Mus musculus GN=Rplp0 PE=1 SV=3	Transkription, Translation
RLA1_MOUSE	60S acidic ribosomal protein P1 OS=Mus musculus GN=Rplp1 PE=1 SV=1	Transkription, Translation
RLA2_MOUSE	60S acidic ribosomal protein P2 OS=Mus musculus GN=Rplp2 PE=1 SV=3	Transkription, Translation
RRBP1_MOUSE	Ribosome-binding protein 1 OS=Mus musculus GN=Rrbp1 PE=2 SV=2	Transkription, Translation
RS11_MOUSE	40S ribosomal protein S11 OS=Mus musculus GN=Rps11 PE=2 SV=3	Transkription, Translation
RS12_MOUSE	40S ribosomal protein S12 OS=Mus musculus GN=Rps12 PE=1 SV=2	Transkription, Translation
RS13_MOUSE	40S ribosomal protein S13 OS=Mus musculus GN=Rps13 PE=1 SV=2	Transkription, Translation
RS16_MOUSE	40S ribosomal protein S16 OS=Mus musculus GN=Rps16 PE=2 SV=4	Transkription, Translation
RS17_MOUSE	40S ribosomal protein S17 OS=Mus musculus GN=Rps17 PE=1 SV=2	Transkription, Translation

UniProtKB Nr.	Proteinname	Proteingruppe
RS18_MOUSE	40S ribosomal protein S18 OS=Mus musculus GN=Rps18 PE=2 SV=3	Transkription, Translation
RS2_MOUSE	40S ribosomal protein S2 OS=Mus musculus GN=Rps2 PE=1 SV=3	Transkription, Translation
RS20_MOUSE	40S ribosomal protein S20 OS=Mus musculus GN=Rps20 PE=1 SV=1	Transkription, Translation
RS21_MOUSE	40S ribosomal protein S21 OS=Mus musculus GN=Rps21 PE=2 SV=1	Transkription, Translation
RS23_MOUSE	40S ribosomal protein S23 OS=Mus musculus GN=Rps23 PE=2 SV=3	Transkription, Translation
RS24_MOUSE	40S ribosomal protein S24 OS=Mus musculus GN=Rps24 PE=1 SV=1	Transkription, Translation
RS25_MOUSE	40S ribosomal protein S25 OS=Mus musculus GN=Rps25 PE=2 SV=1	Transkription, Translation
RS26_MOUSE	40S ribosomal protein S26 OS=Mus musculus GN=Rps26 PE=2 SV=3	Transkription, Translation
RS27_MOUSE	40S ribosomal protein S27 OS=Mus musculus GN=Rps27 PE=1 SV=3	Transkription, Translation
RS27A_MOUSE	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a OS=Mus musculus GN=Rps27a PE=1 SV=2	Transkription, Translation
RS27L_MOUSE	40S ribosomal protein S27-like OS=Mus musculus GN=Rps27l PE=2 SV=3	Transkription, Translation
RS29_MOUSE	40S ribosomal protein S29 OS=Mus musculus GN=Rps29 PE=2 SV=2	Transkription, Translation
RS3_MOUSE	40S ribosomal protein S3 OS=Mus musculus GN=Rps3 PE=1 SV=1	Transkription, Translation
RS30_MOUSE	40S ribosomal protein S30 OS=Mus musculus GN=Fau PE=3 SV=1	Transkription, Translation
RS4X_MOUSE	40S ribosomal protein S4, X isoform OS=Mus musculus GN=Rps4x PE=2 SV=2	Transkription, Translation
RS5_MOUSE	40S ribosomal protein S5 OS=Mus musculus GN=Rps5 PE=2 SV=3	Transkription, Translation
RS6_MOUSE	40S ribosomal protein S6 OS=Mus musculus GN=Rps6 PE=1 SV=1	Transkription, Translation
RS7_MOUSE	40S ribosomal protein S7 OS=Mus musculus GN=Rps7 PE=2 SV=1	Transkription, Translation
RS8_MOUSE	40S ribosomal protein S8 OS=Mus musculus GN=Rps8 PE=1 SV=2	Transkription, Translation
RS9_MOUSE	40S ribosomal protein S9 OS=Mus musculus GN=Rps9 PE=2 SV=3	Transkription, Translation
RSSA_MOUSE	40S ribosomal protein SA OS=Mus musculus GN=Rpsa PE=1 SV=4	Transkription, Translation
ABCF1_MOUSE	ATP-binding cassette sub-family F member 1 OS=Mus musculus GN=Abcf1 PE=1 SV=1	Transkription, Translation
BTF3_MOUSE	Transcription factor BTF3 OS=Mus musculus GN=Btf3 PE=2 SV=3	Transkription, Translation
CELF2_MOUSE	CUG-BP- and ETR-3-like factor 2 OS=Mus musculus GN=Cugbp2 PE=1 SV=1	Transkription, Translation
CIRBP_MOUSE	Cold-inducible RNA-binding protein OS=Mus musculus GN=Cirbp PE=1 SV=1	Transkription, Translation
CN166_MOUSE	UPF0568 protein C14orf166 homolog OS=Mus musculus PE=2 SV=1	Transkription, Translation
CNOT1_MOUSE	CCR4-NOT transcription complex subunit 1 OS=Mus musculus GN=Cnot1 PE=1 SV=2	Transkription, Translation
CNOT7_MOUSE	CCR4-NOT transcription complex subunit 7 OS=Mus musculus GN=Cnot7 PE=1 SV=1	Transkription, Translation
DDX17_MOUSE	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17 OS=Mus musculus GN=Ddx17 PE=2 SV=1	Transkription, Translation
DDX3X_MOUSE	ATP-dependent RNA helicase DDX3X OS=Mus musculus GN=Ddx3x PE=1 SV=3	Transkription, Translation
DDX5_MOUSE	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5 OS=Mus musculus GN=Ddx5 PE=1 SV=2	Transkription, Translation
DDX6_MOUSE	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX6 OS=Mus musculus GN=Ddx6 PE=2 SV=1	Transkription, Translation
DHX29_MOUSE	Putative ATP-dependent RNA helicase DHX29 OS=Mus musculus GN=Dhx29 PE=2 SV=1	Transkription, Translation
DHX30_MOUSE	Putative ATP-dependent RNA helicase DHX30 OS=Mus musculus GN=Dhx30 PE=2 SV=1	Transkription, Translation
DHX36_MOUSE	Probable ATP-dependent RNA helicase DHX36 OS=Mus musculus GN=Dhx36 PE=2 SV=1	Transkription, Translation
DHX9_MOUSE	ATP-dependent RNA helicase A OS=Mus musculus GN=Dhx9 PE=1 SV=2	Transkription, Translation
DTD1_MOUSE	D-tyrosyl-tRNA(Tyr) deacylase 1 OS=Mus musculus GN=Dtd1 PE=1 SV=2	Transkription, Translation
EDF1_MOUSE	Endothelial differentiation-related factor 1 OS=Mus musculus GN=Edf1 PE=1 SV=1	Transkription, Translation
EF1B_MOUSE	Elongation factor 1-beta OS=Mus musculus GN=Eef1b PE=1 SV=5	Transkription, Translation
EF1D_MOUSE	Elongation factor 1-delta OS=Mus musculus GN=Eef1d PE=1 SV=3	Transkription, Translation
EF2_MOUSE	Elongation factor 2 OS=Mus musculus GN=Eef2 PE=1 SV=2	Transkription, Translation
EFTU_MOUSE	Elongation factor Tu, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Tufm PE=1 SV=1	Transkription, Translation
EIF2A_MOUSE	Eukaryotic translation initiation factor 2A OS=Mus musculus GN=Eif2a PE=2 SV=2	Transkription, Translation
EIF3A_MOUSE	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A OS=Mus musculus GN=Eif3a PE=1 SV=5	Transkription, Translation
EIF3B_MOUSE	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B OS=Mus musculus GN=Eif3b PE=1 SV=1	Transkription, Translation
EIF3D_MOUSE	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit D OS=Mus musculus GN=Eif3d PE=1 SV=2	Transkription, Translation
EIF3E_MOUSE	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E OS=Mus musculus GN=Eif3e PE=1 SV=1	Transkription, Translation
EIF3F_MOUSE	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit F OS=Mus musculus GN=Eif3f PE=1 SV=2	Transkription, Translation
EIF3G_MOUSE	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit G OS=Mus musculus GN=Eif3g PE=1 SV=2	Transkription, Translation
EIF3H_MOUSE	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit H OS=Mus musculus GN=Eif3h PE=1 SV=1	Transkription, Translation
EIF3I_MOUSE	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I OS=Mus musculus GN=Eif3i PE=1 SV=1	Transkription, Translation
EIF3J_MOUSE	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit J OS=Mus musculus GN=Eif3j PE=2 SV=1	Transkription, Translation
EIF3K_MOUSE	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit K OS=Mus musculus GN=Eif3k PE=1 SV=1	Transkription, Translation
EIF3M_MOUSE	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit M OS=Mus musculus GN=Eif3m PE=2 SV=1	Transkription, Translation
ELAV1_MOUSE	ELAV-like protein 1 OS=Mus musculus GN=Elav1 PE=1 SV=2	Transkription, Translation
ELAV2_MOUSE	ELAV-like protein 2 OS=Mus musculus GN=Elav2 PE=2 SV=1	Transkription, Translation

## Anhang

UniProtKB Nr.	Proteinname	Proteingruppe
ELAV4_MOUSE	ELAV-like protein 4 OS=Mus musculus GN=Elav4 PE=1 SV=1	Transkription, Translation
FMR1_MOUSE	Fragile X mental retardation protein 1 homolog OS=Mus musculus GN=Fmr1 PE=1 SV=1	Transkription, Translation
FUS_MOUSE	RNA-binding protein FUS OS=Mus musculus GN=Fus PE=2 SV=1	Transkription, Translation
FXR1_MOUSE	Fragile X mental retardation syndrome-related protein 1 OS=Mus musculus GN=Fxr1 PE=1 SV=2	Transkription, Translation
FXR2_MOUSE	Fragile X mental retardation syndrome-related protein 2 OS=Mus musculus GN=Fxr2 PE=1 SV=1	Transkription, Translation
G3BP1_MOUSE	Ras GTPase-activating protein-binding protein 1 OS=Mus musculus GN=G3bp1 PE=1 SV=1	Transkription, Translation
H2AV_MOUSE	Histone H2A,V OS=Mus musculus GN=H2avf PE=1 SV=3	Transkription, Translation
HNRDL_MOUSE	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like OS=Mus musculus GN=Hnrpdl PE=1 SV=1	Transkription, Translation
HNRH1_MOUSE	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H OS=Mus musculus GN=Hnrph1 PE=1 SV=3	Transkription, Translation
HNRH2_MOUSE	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2 OS=Mus musculus GN=Hnrph2 PE=1 SV=1	Transkription, Translation
HNRL1_MOUSE	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 1 OS=Mus musculus GN=Hnmpu1 PE=1 SV=1	Transkription, Translation
HNRL2_MOUSE	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 2 OS=Mus musculus GN=Hnmpu2 PE=1 SV=1	Transkription, Translation
HNRPD_MOUSE	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0 OS=Mus musculus GN=Hnrpd PE=1 SV=2	Transkription, Translation
HNRPK_MOUSE	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K OS=Mus musculus GN=Hnrpk PE=1 SV=1	Transkription, Translation
HNRPM_MOUSE	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M OS=Mus musculus GN=Hnrpm PE=1 SV=3	Transkription, Translation
HNRPQ_MOUSE	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q OS=Mus musculus GN=Syncrip PE=1 SV=2	Transkription, Translation
HNRPU_MOUSE	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U OS=Mus musculus GN=Hnrpu PE=1 SV=1	Transkription, Translation
IF2A_MOUSE	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1 OS=Mus musculus GN=Eif2s1 PE=1 SV=3	Transkription, Translation
IF2G_MOUSE	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 3, X-linked OS=Mus musculus GN=Eif2s3x PE=1 SV=2	Transkription, Translation
IF4A2_MOUSE	Eukaryotic initiation factor 4A-II OS=Mus musculus GN=Eif4a2 PE=2 SV=2	Transkription, Translation
IF4A3_MOUSE	Eukaryotic initiation factor 4A-III OS=Mus musculus GN=Eif4a3 PE=2 SV=3	Transkription, Translation
IF6_MOUSE	Eukaryotic translation initiation factor 6 OS=Mus musculus GN=Eif6 PE=1 SV=2	Transkription, Translation
KPRB_MOUSE	Phosphoribosyl pyrophosphate synthase-associated protein 2 OS=Mus musculus GN=Prpsap2 PE=1 SV=1	Transkription, Translation
LSM12_MOUSE	Protein LSM12 homolog OS=Mus musculus GN=Lsm12 PE=1 SV=1	Transkription, Translation
MATR3_MOUSE	Matrin-3 OS=Mus musculus GN=Matr3 PE=1 SV=1	Transkription, Translation
MGNR_MOUSE	Protein mago nashi homolog 1-related OS=Mus musculus GN=Magoh-rs1 PE=2 SV=1	Transkription, Translation
MK01_MOUSE	Mitogen-activated protein kinase 1 OS=Mus musculus GN=Mapk1 PE=1 SV=3	Transkription, Translation
MLF2_MOUSE	Myeloid leukemia factor 2 OS=Mus musculus GN=Mlf2 PE=1 SV=1	Transkription, Translation
MTA70_MOUSE	N6-adenosine-methyltransferase 70 kDa subunit - Mus musculus (Mouse)	Transkription, Translation
NH2L1_MOUSE	NHP2-like protein 1 OS=Mus musculus GN=Nhp2l1 PE=2 SV=4	Transkription, Translation
NONO_MOUSE	Non-POU domain-containing octamer-binding protein OS=Mus musculus GN=Nono PE=1 SV=3	Transkription, Translation
NUCL_MOUSE	Nucleolin - Mus musculus (Mouse)	Transkription, Translation
ODPX_MOUSE	Pyruvate dehydrogenase protein X component, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Pdhx PE=2 SV=1	Transkription, Translation
PABP1_MOUSE	Polyadenylate-binding protein 1 OS=Mus musculus GN=Pabpc1 PE=1 SV=2	Transkription, Translation
PAIRB_MOUSE	Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein OS=Mus musculus GN=Serbp1 PE=1 SV=2	Transkription, Translation
PCBP2_MOUSE	Poly(rC)-binding protein 2 - Mus musculus (Mouse)	Transkription, Translation
PPIA_MOUSE	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A OS=Mus musculus GN=Ppia PE=1 SV=2	Transkription, Translation
PRKRA_MOUSE	Interferon-inducible double stranded RNA-dependent protein kinase activator A OS=Mus musculus GN=Prkra PE=1 SV=1	Transkription, Translation
PSPC1_MOUSE	Paraspeckle component 1 OS=Mus musculus GN=Pspc1 PE=1 SV=1	Transkription, Translation
RBMXL_MOUSE	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G-like 1 OS=Mus musculus GN=Rbxl1 PE=2 SV=1	Transkription, Translation
RENT1_MOUSE	Regulator of nonsense transcripts 1 OS=Mus musculus GN=Upf1 PE=1 SV=2	Transkription, Translation
RFOX3_MOUSE	RNA binding protein fox-1 homolog 3 OS=Mus musculus GN=Rbfox3 PE=2 SV=2	Transkription, Translation
ROA1_MOUSE	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 OS=Mus musculus GN=Hnmpa1 PE=1 SV=2	Transkription, Translation
ROA2_MOUSE	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 OS=Mus musculus GN=Hnmpa2b1 PE=1 SV=2	Transkription, Translation
ROA3_MOUSE	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 OS=Mus musculus GN=Hnmpa3 PE=1 SV=1	Transkription, Translation
ROAA_MOUSE	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B OS=Mus musculus GN=Hnrmpab PE=1 SV=1	Transkription, Translation
RTC1_MOUSE	RNA 3'-terminal phosphate cyclase OS=Mus musculus GN=Rtcd1 PE=2 SV=2	Transkription, Translation
RTCB_MOUSE	tRNA-splicing ligase RtcB homolog OS=Mus musculus GN=D10Wsu52e PE=2 SV=1	Transkription, Translation
SAP18_MOUSE	Histone deacetylase complex subunit SAP18 OS=Mus musculus GN=Sap18 PE=2 SV=1	Transkription, Translation
SCAI_MOUSE	Protein SCAI OS=Mus musculus GN=Scal PE=1 SV=2	Transkription, Translation
SFPQ_MOUSE	Splicing factor, proline- and glutamine-rich OS=Mus musculus GN=Sfpq PE=1 SV=1	Transkription, Translation
SIN3B_MOUSE	Paired amphipathic helix protein Sin3b OS=Mus musculus GN=Sin3b PE=1 SV=2	Transkription, Translation
SKP1_MOUSE	S-phase kinase-associated protein 1 OS=Mus musculus GN=Skp1 PE=1 SV=3	Transkription, Translation
SMD2_MOUSE	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D2 OS=Mus musculus GN=Snrpd2 PE=2 SV=1	Transkription, Translation

UniProtKB Nr.	Proteinname	Proteingruppe
SMD3_MOUSE	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D3 OS=Mus musculus GN=Snrdp3 PE=1 SV=1	Transkription, Translation
SND1_MOUSE	Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1 OS=Mus musculus GN=Snd1 PE=1 SV=1	Transkription, Translation
SRPK2_MOUSE	Serine/threonine-protein kinase SRPK2 OS=Mus musculus GN=Sprk2 PE=1 SV=2	Transkription, Translation
SRSF1_MOUSE	Serine/arginine-rich splicing factor 1 OS=Mus musculus GN=Srsf1 PE=1 SV=3	Transkription, Translation
SRSF3_MOUSE	Serine/arginine-rich splicing factor 3 OS=Mus musculus GN=Srsf3 PE=1 SV=1	Transkription, Translation
SRSF5_MOUSE	Serine/arginine-rich splicing factor 5 OS=Mus musculus GN=Srsf5 PE=1 SV=1	Transkription, Translation
SYFA_MOUSE	Phenylalanyl-tRNA synthetase alpha chain OS=Mus musculus GN=Farsa PE=2 SV=1	Transkription, Translation
SYFB_MOUSE	Phenylalanyl-tRNA synthetase beta chain OS=Mus musculus GN=Farsb PE=2 SV=2	Transkription, Translation
SYK_MOUSE	Lysyl-tRNA synthetase OS=Mus musculus GN=Kars PE=1 SV=1	Transkription, Translation
SYMC_MOUSE	Methionyl-tRNA synthetase, cytoplasmic OS=Mus musculus GN=Mars PE=2 SV=1	Transkription, Translation
TADBP_MOUSE	TAR DNA-binding protein 43 OS=Mus musculus GN=Tardbp PE=1 SV=1	Transkription, Translation
TCP4_MOUSE	Activated RNA polymerase II transcriptional coactivator p15 OS=Mus musculus GN=Sub1 PE=1 SV=3	Transkription, Translation
THOC4_MOUSE	THO complex subunit 4 OS=Mus musculus GN=Thoc4 PE=1 SV=3	Transkription, Translation
TUT4_MOUSE	Terminal uridylyltransferase 4 OS=Mus musculus GN=Zchc11 PE=1 SV=2	Transkription, Translation
WIBG_MOUSE	Partner of Y14 and mago OS=Mus musculus GN=Wibg PE=1 SV=2	Transkription, Translation
YTHD1_MOUSE	YTH domain family protein 1 OS=Mus musculus GN=Ythdf1 PE=2 SV=1	Transkription, Translation
ZMAT4_MOUSE	Zinc finger matrin-type protein 4 OS=Mus musculus GN=Zmat4 PE=2 SV=1	Transkription, Translation
EPN4_MOUSE	Clathrin interactor 1 OS=Mus musculus GN=Clint1 PE=1 SV=2	vesikulärer Transport
AP180_MOUSE	Clathrin coat assembly protein AP180 - Mus musculus (Mouse)	vesikulärer Transport
EP15R_MOUSE	Epidermal growth factor receptor substrate 15-like 1 OS=Mus musculus GN=Eps15l1 PE=1 SV=3	vesikulärer Transport
EPN2_MOUSE	Epsin-2 OS=Mus musculus GN=Epn2 PE=1 SV=1	vesikulärer Transport
NECP1_MOUSE	Adaptin ear-binding coat-associated protein 1 OS=Mus musculus GN=Necap1 PE=1 SV=2	vesikulärer Transport
AP1G1_MOUSE	AP-1 complex subunit gamma-1 OS=Mus musculus GN=Ap1g1 PE=1 SV=3	vesikulärer Transport
AUX1_MOUSE	Putative tyrosine-protein phosphatase auxilin OS=Mus musculus GN=Dnajc6 PE=2 SV=2	vesikulärer Transport
GAK_MOUSE	Cyclin-G-associated kinase OS=Mus musculus GN=Gak PE=1 SV=2	vesikulärer Transport
CLCA_MOUSE	Clathrin light chain A OS=Mus musculus GN=Cita PE=1 SV=1	vesikulärer Transport
HIP1_MOUSE	Huntingtin-interacting protein 1 OS=Mus musculus GN=Hip1 PE=1 SV=2	vesikulärer Transport
HIP1R_MOUSE	Huntingtin-interacting protein 1-related protein OS=Mus musculus GN=Hip1r PE=1 SV=2	vesikulärer Transport
ITSN1_MOUSE	Intersectin-1 OS=Mus musculus GN=Itsn1 PE=1 SV=1	vesikulärer Transport
ROGDI_MOUSE	Protein rogd1 homolog OS=Mus musculus GN=Rogdi PE=2 SV=2	Zellwachstum
GRP75_MOUSE	Stress-70 protein, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Hspa9 PE=1 SV=2	Zellwachstum
LTOR3_MOUSE	Ragulator complex protein LAMTOR3 OS=Mus musculus GN=Lamtor3 PE=1 SV=1	Zellwachstum
MTOR_MOUSE	Serine/threonine-protein kinase mTOR OS=Mus musculus GN=Mtor PE=1 SV=2	Zellwachstum
MUC4_MOUSE	Mucin-4 OS=Mus musculus GN=Muc4 PE=2 SV=1	Zellwachstum
MYOG_MOUSE	Myogenin OS=Mus musculus GN=Myog PE=2 SV=2	Zellwachstum
PA2G4_MOUSE	Proliferation-associated protein 2G4 - Mus musculus (Mouse)	Zellwachstum
PHB_MOUSE	Prohibitin OS=Mus musculus GN=Phb PE=1 SV=1	Zellwachstum
VDAC1_MOUSE	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1 OS=Mus musculus GN=Vdac1 PE=1 SV=3	keiner Gruppe zugeordnet
AT1B1_MOUSE	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-1 OS=Mus musculus GN=Atp1b1 PE=1 SV=1	keiner Gruppe zugeordnet
AMPM1_MOUSE	Methionine aminopeptidase 1 OS=Mus musculus GN=Metap1 PE=2 SV=1	keiner Gruppe zugeordnet
CACO1_MOUSE	Calcium-binding and coiled-coil domain-containing protein 1 OS=Mus musculus GN=Calcoo1 PE=1 SV=2	keiner Gruppe zugeordnet
CC124_MOUSE	Coiled-coil domain-containing protein 124 OS=Mus musculus GN=Ccdc124 PE=2 SV=1	keiner Gruppe zugeordnet
CCD22_MOUSE	Coiled-coil domain-containing protein 22 OS=Mus musculus GN=Ccdc22 PE=2 SV=1	keiner Gruppe zugeordnet
CG043_MOUSE	Uncharacterized protein C7orf43 homolog OS=Mus musculus PE=1 SV=1	keiner Gruppe zugeordnet
COMD2_MOUSE	COMM domain-containing protein 2 OS=Mus musculus GN=Commd2 PE=2 SV=1	keiner Gruppe zugeordnet
COMD3_MOUSE	COMM domain-containing protein 3 OS=Mus musculus GN=Commd3 PE=2 SV=1	keiner Gruppe zugeordnet
COMD4_MOUSE	COMM domain-containing protein 4 OS=Mus musculus GN=Commd4 PE=2 SV=1	keiner Gruppe zugeordnet
COMD5_MOUSE	COMM domain-containing protein 5 OS=Mus musculus GN=Commd5 PE=2 SV=1	keiner Gruppe zugeordnet
CP062_MOUSE	UPF0505 protein C16orf62 homolog OS=Mus musculus PE=2 SV=2	keiner Gruppe zugeordnet
DESP_MOUSE	Desmoplakin OS=Mus musculus GN=Dsp PE=3 SV=1	keiner Gruppe zugeordnet
ENOB_MOUSE	Beta-enolase - Mus musculus (Mouse)	keiner Gruppe zugeordnet
FA98A_MOUSE	Protein FAM98A OS=Mus musculus GN=Fam98a PE=2 SV=1	keiner Gruppe zugeordnet
FA98B_MOUSE	Protein FAM98B OS=Mus musculus GN=Fam98b PE=2 SV=1	keiner Gruppe zugeordnet
FRIH_MOUSE	Ferritin heavy chain OS=Mus musculus GN=Fth1 PE=1 SV=2	keiner Gruppe zugeordnet
HBA_MOUSE	Hemoglobin subunit alpha OS=Mus musculus GN=Hba PE=1 SV=2	keiner Gruppe zugeordnet
HBB1_MOUSE	Hemoglobin subunit beta-1 - Mus musculus (Mouse)	keiner Gruppe zugeordnet

## Anhang

UniProtKB Nr.	Proteinname	Proteingruppe
HBB2_MOUSE	Hemoglobin subunit beta-2 - Mus musculus (Mouse)	keiner Gruppe zugeordnet
HEMH_MOUSE	Ferrochelatase, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Fech PE=1 SV=2	keiner Gruppe zugeordnet
IMA7_MOUSE	Importin subunit alpha-7 OS=Mus musculus GN=Kpa6 PE=1 SV=2	keiner Gruppe zugeordnet
NAA20_MOUSE	N-alpha-acetyltransferase 20 OS=Mus musculus GN=Naa20 PE=2 SV=1	keiner Gruppe zugeordnet
NAA30_MOUSE	N-alpha-acetyltransferase 30 OS=Mus musculus GN=Naa30 PE=2 SV=2	keiner Gruppe zugeordnet
NPRL3_MOUSE	Nitrogen permease regulator 3-like protein OS=Mus musculus GN=Nprl3 PE=2 SV=1	keiner Gruppe zugeordnet
PERQ2_MOUSE	PERQ amino acid-rich with GYF domain-containing protein 2 OS=Mus musculus GN=Gigyf2 PE=1 SV=2	keiner Gruppe zugeordnet
PGAM1_MOUSE	Phosphoglycerate mutase 1 OS=Mus musculus GN=Pgam1 PE=1 SV=3	keiner Gruppe zugeordnet
PGK1_MOUSE	Phosphoglycerate kinase 1 OS=Mus musculus GN=Pgk1 PE=1 SV=4	keiner Gruppe zugeordnet
PURG_MOUSE	Purine-rich element-binding protein gamma OS=Mus musculus GN=Purg PE=1 SV=1	keiner Gruppe zugeordnet
UBXN6_MOUSE	UBX domain-containing protein 6 OS=Mus musculus GN=Ubxn6 PE=1 SV=1	keiner Gruppe zugeordnet
VAC14_MOUSE	Protein VAC14 homolog OS=Mus musculus GN=Vac14 PE=2 SV=1	keiner Gruppe zugeordnet
WDFY3_MOUSE	WD repeat and FYVE domain-containing protein 3 OS=Mus musculus GN=Wdfy3 PE=2 SV=1	keiner Gruppe zugeordnet
NMT1_MOUSE	Glycylpeptide N-tetradecanoyltransferase 1 OS=Mus musculus GN=Nmt1 PE=1 SV=1	keiner Gruppe zugeordnet
VANG1_MOUSE	Vang-like protein 1 OS=Mus musculus GN=Vangl1 PE=1 SV=2	keiner Gruppe zugeordnet
WDR61_MOUSE	WD repeat-containing protein 61 OS=Mus musculus GN=Wdr61 PE=2 SV=1	keiner Gruppe zugeordnet

### c) Gemeinsame Proteine D4 und E5

UniProtKB Nr.	Proteinname	Proteingruppe
1433B_MOUSE	14-3-3 protein beta/alpha OS=Mus musculus GN=Ywhab PE=1 SV=3	14-3-3 Proteine
1433E_MOUSE	14-3-3 protein epsilon - Mus musculus (Mouse)	14-3-3 Proteine
1433F_MOUSE	14-3-3 protein eta OS=Mus musculus GN=Ywhah PE=1 SV=2	14-3-3 Proteine
1433G_MOUSE	14-3-3 protein gamma OS=Mus musculus GN=Ywhag PE=1 SV=2	14-3-3 Proteine
1433T_MOUSE	14-3-3 protein theta OS=Mus musculus GN=Ywhaq PE=1 SV=1	14-3-3 Proteine
1433Z_MOUSE	14-3-3 protein zeta/delta OS=Mus musculus GN=Ywhaz PE=1 SV=1	14-3-3 Proteine
ACTB_MOUSE	Actin, cytoplasmic 1 - Mus musculus (Mouse)	Zytoskelett
ACTN1_MOUSE	Alpha-actinin-1 OS=Mus musculus GN=Actn1 PE=2 SV=1	Zytoskelett
ARP2_MOUSE	Actin-related protein 2 OS=Mus musculus GN=Actr2 PE=1 SV=1	Zytoskelett
ARP5L_MOUSE	Actin-related protein 2/3 complex subunit 5-like protein OS=Mus musculus GN=Arpc5l PE=1 SV=1	Zytoskelett
CAPZB_MOUSE	F-actin-capping protein subunit beta OS=Mus musculus GN=Capzb PE=1 SV=3	Zytoskelett
COTL1_MOUSE	Coactosin-like protein OS=Mus musculus GN=Cotl1 PE=1 SV=3	Zytoskelett
NFL_MOUSE	Neurofilament light polypeptide OS=Mus musculus GN=Nefl PE=1 SV=5	Zytoskelett
NFM_MOUSE	Neurofilament medium polypeptide OS=Mus musculus GN=Nefm PE=1 SV=4	Zytoskelett
PROF1_MOUSE	Profilin-1 OS=Mus musculus GN=Pfn1 PE=1 SV=2	Zytoskelett
PROF2_MOUSE	Profilin-2 OS=Mus musculus GN=Pfn2 PE=1 SV=3	Zytoskelett
MAP1A_MOUSE	Microtubule-associated protein 1A OS=Mus musculus GN=Map1a PE=1 SV=2	Zytoskelett
MAP1B_MOUSE	Microtubule-associated protein 1B OS=Mus musculus GN=Map1b PE=1 SV=2	Zytoskelett
MAP2_MOUSE	Microtubule-associated protein 2 OS=Mus musculus GN=Map2 PE=1 SV=2	Zytoskelett
MARE3_MOUSE	Microtubule-associated protein RP/EB family member 3 OS=Mus musculus GN=Mapre3 PE=1 SV=1	Zytoskelett
MLP3A_MOUSE	Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3A OS=Mus musculus GN=Map1lc3a PE=2 SV=1	Zytoskelett
TBA1A_MOUSE	Tubulin alpha-1A chain OS=Mus musculus GN=Tuba1a PE=1 SV=1	Zytoskelett
TBA1C_MOUSE	Tubulin alpha-1C chain OS=Mus musculus GN=Tuba1c PE=1 SV=1	Zytoskelett
TBA4A_MOUSE	Tubulin alpha-4A chain OS=Mus musculus GN=Tuba4a PE=1 SV=1	Zytoskelett
TBB2A_MOUSE	Tubulin beta-2A chain OS=Mus musculus GN=Tubb2a PE=1 SV=1	Zytoskelett
TBB2C_MOUSE	Tubulin beta-2C chain OS=Mus musculus GN=Tubb2c PE=1 SV=1	Zytoskelett
TBB3_MOUSE	Tubulin beta-3 chain OS=Mus musculus GN=Tubb3 PE=1 SV=1	Zytoskelett
TBB4_MOUSE	Tubulin beta-4 chain OS=Mus musculus GN=Tubb4 PE=1 SV=3	Zytoskelett
TBB5_MOUSE	Tubulin beta-5 chain OS=Mus musculus GN=Tubb5 PE=1 SV=1	Zytoskelett
DCTN1_MOUSE	Dynactin subunit 1 OS=Mus musculus GN=Dctn1 PE=1 SV=3	Zytoskelett
SNX3_MOUSE	Sorting nexin-3 OS=Mus musculus GN=Snx3 PE=1 SV=3	endosomale Proteine
RAB5A_MOUSE	Ras-related protein Rab-5A OS=Mus musculus GN=Rab5a PE=1 SV=1	endosomale Proteine
RAB5C_MOUSE	Ras-related protein Rab-5C OS=Mus musculus GN=Rab5c PE=1 SV=2	endosomale Proteine
VPS29_MOUSE	Vacuolar protein sorting-associated protein 29 OS=Mus musculus GN=Vps29 PE=1 SV=1	endosomale Proteine
VPS35_MOUSE	Vacuolar protein sorting-associated protein 35 OS=Mus musculus GN=Vps35 PE=1 SV=1	endosomale Proteine
AT5F1_MOUSE	ATP synthase subunit b, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Atp5f1 PE=1 SV=1	Energiestoffwechsel

UniProtKB Nr.	Proteinname	Proteingruppe
ATP5H_MOUSE	ATP synthase subunit d, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Atp5h PE=1 SV=3	Energiestoffwechsel
ATPD_MOUSE	ATP synthase subunit delta, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Atp5d PE=1 SV=1	Energiestoffwechsel
ATPK_MOUSE	ATP synthase subunit f, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Atp5j2 PE=1 SV=3	Energiestoffwechsel
PRDX2_MOUSE	Peroxisredoxin-2 OS=Mus musculus GN=Prdx2 PE=1 SV=3	Energiestoffwechsel
AATM_MOUSE	Aspartate aminotransferase, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Got2 PE=1 SV=1	Energiestoffwechsel
ACBG1_MOUSE	Long-chain-fatty-acid-CoA ligase ACSBG1 OS=Mus musculus GN=Acsbg1 PE=1 SV=1	Energiestoffwechsel
ALDOA_MOUSE	Fructose-bisphosphate aldolase A OS=Mus musculus GN=Aldoa PE=1 SV=2	Energiestoffwechsel
CN37_MOUSE	2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase OS=Mus musculus GN=Cnp PE=1 SV=3	Energiestoffwechsel
GABT_MOUSE	4-aminobutyrate aminotransferase, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Abat PE=1 SV=1	Energiestoffwechsel
GSTM1_MOUSE	Glutathione S-transferase Mu 1 OS=Mus musculus GN=Gstm1 PE=1 SV=2	Energiestoffwechsel
HXK1_MOUSE	Hexokinase-1 OS=Mus musculus GN=Hk1 PE=1 SV=3	Energiestoffwechsel
KPYM_MOUSE	Pyruvate kinase isozymes M1/M2 OS=Mus musculus GN=Pkm2 PE=1 SV=4	Energiestoffwechsel
MDHC_MOUSE	Malate dehydrogenase, cytoplasmic OS=Mus musculus GN=Mdh1 PE=1 SV=3	Energiestoffwechsel
MGST3_MOUSE	Microsomal glutathione S-transferase 3 OS=Mus musculus GN=Mgst3 PE=1 SV=1	Energiestoffwechsel
ODPB_MOUSE	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Pdhb PE=1 SV=1	Energiestoffwechsel
THIL_MOUSE	Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Acat1 PE=1 SV=1	Energiestoffwechsel
TPIS_MOUSE	Triosephosphate isomerase OS=Mus musculus GN=Tpi1 PE=1 SV=4	Energiestoffwechsel
TPPC3_MOUSE	Trafficking protein particle complex subunit 3 OS=Mus musculus GN=Trappc3 PE=1 SV=1	früher sekretorischer Weg
HS90A_MOUSE	Heat shock protein HSP 90-alpha OS=Mus musculus GN=Hsp90aa1 PE=1 SV=4	HSP
HS90B_MOUSE	Heat shock protein HSP 90-beta OS=Mus musculus GN=Hsp90ab1 PE=1 SV=3	HSP
EFHD2_MOUSE	EF-hand domain-containing protein D2 OS=Mus musculus GN=Efh2 PE=1 SV=1	Immunproteine
KAPCB_MOUSE	cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit beta OS=Mus musculus GN=Prkacb PE=1 SV=2	Kinase und Phosphatasen
2AAA_MOUSE	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha isoform OS=Mus musculus GN=Ppp2r1a PE=1 SV=3	Kinase und Phosphatasen
DPYL2_MOUSE	Dihydropyrimidinase-related protein 2 OS=Mus musculus GN=Dpysl2 PE=1 SV=2	neuronales Wachstum
DREB_MOUSE	Drebrin OS=Mus musculus GN=Dbn1 PE=1 SV=4	neuronales Wachstum
LANC2_MOUSE	LanC-like protein 2 OS=Mus musculus GN=Lanc2 PE=1 SV=1	neuronales Wachstum
TENR_MOUSE	Tenascin-R OS=Mus musculus GN=Tnr PE=1 SV=2	neuronales Wachstum
PSB2_MOUSE	Proteasome subunit beta type-2 OS=Mus musculus GN=Psb2 PE=1 SV=1	Proteolyse
PSB5_MOUSE	Proteasome subunit beta type-5 OS=Mus musculus GN=Psb5 PE=1 SV=3	Proteolyse
GNAO_MOUSE	Guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha OS=Mus musculus GN=Gnao1 PE=1 SV=3	sonstige GTP-Interaktionsproteine
RAP1B_MOUSE	Ras-related protein Rap-1b OS=Mus musculus GN=Rap1b PE=2 SV=2	sonstige GTP-Interaktionsproteine
RHOA_MOUSE	Transforming protein RhoA OS=Mus musculus GN=Rhoa PE=1 SV=1	sonstige GTP-Interaktionsproteine
EAA2_MOUSE	Excitatory amino acid transporter 2 OS=Mus musculus GN=Slc1a2 PE=1 SV=1	sonstige neuronale Proteine
GPM6A_MOUSE	Neuronal membrane glycoprotein M6-a OS=Mus musculus GN=Gpm6a PE=1 SV=1	sonstige neuronale Proteine
MBP_MOUSE	Myelin basic protein OS=Mus musculus GN=Mbp PE=1 SV=2	sonstige neuronale Proteine
ARF1_MOUSE	ADP-ribosylation factor 1 OS=Mus musculus GN=Arf1 PE=1 SV=2	synaptische Vesikelproteine
CALM_MOUSE	Calmodulin OS=Mus musculus GN=Calm1 PE=1 SV=2	synaptische Vesikelproteine
CAMKV_MOUSE	CaM kinase-like vesicle-associated protein OS=Mus musculus GN=Camkv PE=1 SV=2	synaptische Vesikelproteine
DYHC1_MOUSE	Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1 OS=Mus musculus GN=Dync1h1 PE=1 SV=2	synaptische Vesikelproteine
RAB3A_MOUSE	Ras-related protein Rab-3A OS=Mus musculus GN=Rab3a PE=1 SV=1	synaptische Vesikelproteine
RAB3B_MOUSE	Ras-related protein Rab-3B OS=Mus musculus GN=Rab3b PE=1 SV=1	synaptische Vesikelproteine
DHE3_MOUSE	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Glud1 PE=1 SV=1	synaptische Vesikelproteine
DMXL2_MOUSE	DmX-like protein 2 OS=Mus musculus GN=Dmxl2 PE=1 SV=3	synaptische Vesikelproteine
DYN1_MOUSE	Dynamamin-1 OS=Mus musculus GN=Dnm1 PE=1 SV=2	synaptische Vesikelproteine
RP3A_MOUSE	Rabphilin-3A - Mus musculus (Mouse)	synaptische Vesikelproteine
SGIP1_MOUSE	SH3-containing GRB2-like protein 3-interacting protein 1 OS=Mus musculus GN=Sgip1 PE=1 SV=1	synaptische Vesikelproteine
SNAAP_MOUSE	Alpha-soluble NSF attachment protein OS=Mus musculus GN=Napa PE=1 SV=1	synaptische Vesikelproteine
SNG1_MOUSE	Synaptogyrin-1 OS=Mus musculus GN=Syng1 PE=1 SV=2	synaptische Vesikelproteine
SNG3_MOUSE	Synaptogyrin-3 OS=Mus musculus GN=Syng3 PE=1 SV=1	synaptische Vesikelproteine
STX1B_MOUSE	Syntaxin-1B OS=Mus musculus GN=Stx1b PE=1 SV=1	synaptische Vesikelproteine
STXB1_MOUSE	Syntaxin-binding protein 1 OS=Mus musculus GN=Stxbp1 PE=1 SV=2	synaptische Vesikelproteine
SYN1_MOUSE	Synapsin-1 OS=Mus musculus GN=Syn1 PE=1 SV=2	synaptische Vesikelproteine
SYPH_MOUSE	Synaptophysin OS=Mus musculus GN=Syp PE=1 SV=2	synaptische Vesikelproteine
VAMP2_MOUSE	Vesicle-associated membrane protein 2 OS=Mus musculus GN=Vamp2 PE=1 SV=2	synaptische Vesikelproteine
VAT1_MOUSE	Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog OS=Mus musculus GN=Vat1 PE=1 SV=3	synaptische Vesikelproteine

## Anhang

UniProtKB Nr.	Proteinname	Proteingruppe
RL11_MOUSE	60S ribosomal protein L11 OS=Mus musculus GN=Rpl11 PE=1 SV=4	Transkription, Translation
RL22_MOUSE	60S ribosomal protein L22 OS=Mus musculus GN=Rpl22 PE=2 SV=2	Transkription, Translation
RL22L_MOUSE	60S ribosomal protein L22-like 1 OS=Mus musculus GN=Rpl22l1 PE=1 SV=1	Transkription, Translation
RS10_MOUSE	40S ribosomal protein S10 OS=Mus musculus GN=Rps10 PE=1 SV=1	Transkription, Translation
RS14_MOUSE	40S ribosomal protein S14 OS=Mus musculus GN=Rps14 PE=2 SV=3	Transkription, Translation
RS15A_MOUSE	40S ribosomal protein S15a OS=Mus musculus GN=Rps15a PE=2 SV=2	Transkription, Translation
RS19_MOUSE	40S ribosomal protein S19 OS=Mus musculus GN=Rps19 PE=1 SV=3	Transkription, Translation
RS28_MOUSE	40S ribosomal protein S28 OS=Mus musculus GN=Rps28 PE=2 SV=1	Transkription, Translation
RS3A_MOUSE	40S ribosomal protein S3a OS=Mus musculus GN=Rps3a PE=1 SV=3	Transkription, Translation
DDX1_MOUSE	ATP-dependent RNA helicase DDX1 OS=Mus musculus GN=Ddx1 PE=2 SV=1	Transkription, Translation
EF1A1_MOUSE	Elongation factor 1-alpha 1 OS=Mus musculus GN=Eef1a1 PE=1 SV=3	Transkription, Translation
EF1G_MOUSE	Elongation factor 1-gamma OS=Mus musculus GN=Eef1g PE=1 SV=3	Transkription, Translation
EIF3L_MOUSE	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit L OS=Mus musculus GN=EIF3L PE=1 SV=1	Transkription, Translation
G3BP2_MOUSE	Ras GTPase-activating protein-binding protein 2 OS=Mus musculus GN=G3bp2 PE=1 SV=2	Transkription, Translation
IF1AX_MOUSE	Eukaryotic translation initiation factor 1A, X-chromosomal OS=Mus musculus GN=EIF1AX PE=2 SV=3	Transkription, Translation
PPIB_MOUSE	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B OS=Mus musculus GN=Ppib PE=2 SV=2	Transkription, Translation
PURA_MOUSE	Transcriptional activator protein Pur-alpha OS=Mus musculus GN=Pura PE=1 SV=1	Transkription, Translation
PURB_MOUSE	Transcriptional activator protein Pur-beta OS=Mus musculus GN=Purb PE=1 SV=3	Transkription, Translation
RBM3_MOUSE	Putative RNA-binding protein 3 OS=Mus musculus GN=Rbm3 PE=1 SV=1	Transkription, Translation
AP2A1_MOUSE	AP-2 complex subunit alpha-1 OS=Mus musculus GN=Ap2a1 PE=1 SV=1	vesikulärer Transport
AP2A2_MOUSE	AP-2 complex subunit alpha-2 OS=Mus musculus GN=Ap2a2 PE=1 SV=2	vesikulärer Transport
AAK1_MOUSE	AP2-associated protein kinase 1 OS=Mus musculus GN=Aak1 PE=1 SV=2	vesikulärer Transport
AP1B1_MOUSE	AP-1 complex subunit beta-1 OS=Mus musculus GN=Ap1b1 PE=1 SV=2	vesikulärer Transport
AP2B1_MOUSE	AP-2 complex subunit beta OS=Mus musculus GN=Ap2b1 PE=1 SV=1	vesikulärer Transport
AP1M1_MOUSE	AP-1 complex subunit mu-1 OS=Mus musculus GN=Ap1m1 PE=1 SV=3	vesikulärer Transport
AP2M1_MOUSE	AP-2 complex subunit mu OS=Mus musculus GN=Ap2m1 PE=1 SV=1	vesikulärer Transport
AP1S1_MOUSE	AP-1 complex subunit sigma-1A OS=Mus musculus GN=Ap1s1 PE=1 SV=1	vesikulärer Transport
AP2S1_MOUSE	AP-2 complex subunit sigma OS=Mus musculus GN=Ap2s1 PE=1 SV=1	vesikulärer Transport
AP3S2_MOUSE	AP-3 complex subunit sigma-2 OS=Mus musculus GN=Ap3s2 PE=1 SV=1	vesikulärer Transport
SNX12_MOUSE	Sorting nexin-12 OS=Mus musculus GN=Snx12 PE=2 SV=1	vesikulärer Transport
CLCB_MOUSE	Clathrin light chain B	vesikulärer Transport
CLH_MOUSE	Clathrin heavy chain 1 OS=Mus musculus GN=Cltc PE=1 SV=3	vesikulärer Transport
LTOR2_MOUSE	Ragulator complex protein LAMTOR2 OS=Mus musculus GN=Lamtor2 PE=1 SV=1	Zellwachstum
KAD1_MOUSE	Adenylate kinase isoenzyme 1 OS=Mus musculus GN=Ak1 PE=1 SV=1	Zellwachstum
MGLL_MOUSE	Monoglyceride lipase OS=Mus musculus GN=Mgll PE=1 SV=1	keiner Gruppe zugeordnet
AT1A3_MOUSE	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-3 OS=Mus musculus GN=Atp1a3 PE=1 SV=1	keiner Gruppe zugeordnet
RAB10_MOUSE	Ras-related protein Rab-10 OS=Mus musculus GN=Rab10 PE=1 SV=1	keiner Gruppe zugeordnet
RAB14_MOUSE	Ras-related protein Rab-14 OS=Mus musculus GN=Rab14 PE=1 SV=3	keiner Gruppe zugeordnet
ANXA5_MOUSE	Annexin A5 OS=Mus musculus GN=Anxa5 PE=1 SV=1	keiner Gruppe zugeordnet
KCRB_MOUSE	Creatine kinase B-type OS=Mus musculus GN=Ckb PE=1 SV=1	keiner Gruppe zugeordnet
KCRU_MOUSE	Creatine kinase U-type, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Ckmt1 PE=1 SV=1	keiner Gruppe zugeordnet
NAA25_MOUSE	N-alpha-acetyltransferase 25, NatB auxiliary subunit OS=Mus musculus GN=Naa25 PE=1 SV=1	keiner Gruppe zugeordnet
TOLIP_MOUSE	Toll-interacting protein OS=Mus musculus GN=Tollip PE=1 SV=1	keiner Gruppe zugeordnet
WDR7_MOUSE	WD repeat-containing protein 7 OS=Mus musculus GN=Wdr7 PE=1 SV=3	keiner Gruppe zugeordnet

### d) Proteine des Shotgun-Experiments

UniProtKB Nr.	Proteinname	Proteingruppe
1433B_MOUSE	14-3-3 protein beta/alpha OS=Mus musculus GN=Ywhab PE=1 SV=3	14-3-3 Proteine
1433E_MOUSE	14-3-3 protein epsilon - Mus musculus (Mouse)	14-3-3 Proteine
1433F_MOUSE	14-3-3 protein eta OS=Mus musculus GN=Ywhaf PE=1 SV=2	14-3-3 Proteine
1433G_MOUSE	14-3-3 protein gamma OS=Mus musculus GN=Ywhag PE=1 SV=2	14-3-3 Proteine
1433T_MOUSE	14-3-3 protein theta OS=Mus musculus GN=Ywhaq PE=1 SV=1	14-3-3 Proteine
1433Z_MOUSE	14-3-3 protein zeta/delta OS=Mus musculus GN=Ywhaz PE=1 SV=1	14-3-3 Proteine
RB11A/B_MOUSE	Ras-related protein Rab-11A/B OS=Mus musculus GN=Rab11a PE=1 SV=3	endosomale Proteine
RAB7A_MOUSE	Ras-related protein Rab-7a OS=Mus musculus GN=Rab7a PE=1 SV=2	endosomale Proteine

UniProtKB Nr.	Proteinname	Proteingruppe
SCAM1_MOUSE	Secretory carrier-associated membrane protein 1 OS=Mus musculus GN=Scamp1 PE=1 SV=1	endosomale Proteine
SCAM3_MOUSE	Secretory carrier-associated membrane protein 3 OS=Mus musculus GN=Scamp3 PE=1 SV=3	endosomale Proteine
SNX27_MOUSE	Sorting nexin-27 OS=Mus musculus GN=Snx27 PE=1 SV=2	endosomale Proteine
SNX3_MOUSE	Sorting nexin-3 OS=Mus musculus GN=Snx3 PE=1 SV=3	endosomale Proteine
UCHL1_MOUSE	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1 OS=Mus musculus GN=Uchl1 PE=1 SV=1, UCH-L1	endosomale Proteine
VP26B_MOUSE	Vacuolar protein sorting-associated protein 26B OS=Mus musculus GN=Vps26b PE=1 SV=1	endosomale Proteine
VPS35_MOUSE	Vacuolar protein sorting-associated protein 35 OS=Mus musculus GN=Vps35 PE=1 SV=1	endosomale Proteine
VAMP3_MOUSE	Vesicle-associated membrane protein 3 OS=Mus musculus GN=Vamp3 PE=1 SV=1	endosomale Proteine
CN37_MOUSE	2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase OS=Mus musculus GN=Cnp PE=1 SV=3	Energiestoffwechsel
THIL_MOUSE	Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Acat1 PE=1 SV=1	Energiestoffwechsel
ACON_MOUSE	Aconitate hydratase, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Aco2 PE=1 SV=1	Energiestoffwechsel
ADT1_MOUSE	ADP/ATP translocase 1 OS=Mus musculus GN=Slc25a4 PE=1 SV=4	Energiestoffwechsel
ENOA_MOUSE	Alpha-enolase - Mus musculus (Mouse)	Energiestoffwechsel
AATC_MOUSE	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic OS=Mus musculus GN=Got1 PE=1 SV=3	Energiestoffwechsel
ATPA_MOUSE	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Atp5a1 PE=1 SV=1	Energiestoffwechsel
ATPB_MOUSE	ATP synthase subunit beta, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Atp5b PE=1 SV=2	Energiestoffwechsel
CAH2_MOUSE	Carbonic anhydrase 2 - Mus musculus (Mouse)	Energiestoffwechsel
CPT2_MOUSE	Camitine O-palmitoyltransferase 2, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Cpt2 PE=1 SV=2	Energiestoffwechsel
CISY_MOUSE	Citrate synthase, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Cs PE=1 SV=1	Energiestoffwechsel
CYC_MOUSE	Cytochrome c, somatic - Mus musculus (Mouse)	Energiestoffwechsel
ALDOA_MOUSE	Fructose-bisphosphate aldolase A OS=Mus musculus GN=Aldoa PE=1 SV=2	Energiestoffwechsel
ENOG_MOUSE	Gamma-enolase - Mus musculus (Mouse)	Energiestoffwechsel
GSTM1_MOUSE	Glutathione S-transferase Mu 1 OS=Mus musculus GN=Gstm1 PE=1 SV=2	Energiestoffwechsel
GSTP1_MOUSE	Glutathione S-transferase P 1 OS=Mus musculus GN=Gstp1 PE=1 SV=2	Energiestoffwechsel
GSTP2_MOUSE	Glutathione S-transferase P 2 OS=Mus musculus GN=Gstp2 PE=2 SV=2	Energiestoffwechsel
G3P_MOUSE	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase - Mus musculus (Mouse)	Energiestoffwechsel
HXK1_MOUSE	Hexokinase-1 OS=Mus musculus GN=Hk1 PE=1 SV=3	Energiestoffwechsel
ACBG1_MOUSE	Long-chain-fatty-acid-CoA ligase ACSBG1 OS=Mus musculus GN=Acsbg1 PE=1 SV=1	Energiestoffwechsel
MDHC_MOUSE	Malate dehydrogenase, cytoplasmic OS=Mus musculus GN=Mdh1 PE=1 SV=3	Energiestoffwechsel
MDHM_MOUSE	Malate dehydrogenase, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Mdh2 PE=1 SV=3	Energiestoffwechsel
PRDX2_MOUSE	Peroxisredoxin-2 OS=Mus musculus GN=Prdx2 PE=1 SV=3	Energiestoffwechsel
MPCP_MOUSE	Phosphate carrier protein, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Slc25a3 PE=1 SV=1	Energiestoffwechsel
PGK1_MOUSE	Phosphoglycerate kinase 1 OS=Mus musculus GN=Pgk1 PE=1 SV=4	Energiestoffwechsel
PGAM1_MOUSE	Phosphoglycerate mutase 1 OS=Mus musculus GN=Pgam1 PE=1 SV=3	Energiestoffwechsel
KPYM_MOUSE	Pyruvate kinase isozymes M1/M2 OS=Mus musculus GN=Pkm2 PE=1 SV=4	Energiestoffwechsel
GRP75_MOUSE	Stress-70 protein, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Hspa9 PE=1 SV=2	Energiestoffwechsel
TMX2_MOUSE	Thioredoxin-related transmembrane protein 2 OS=Mus musculus GN=Tmx2 PE=2 SV=1	Energiestoffwechsel
TECR_MOUSE	Trans-2,3-enoyl-CoA reductase OS=Mus musculus GN=Tecr PE=1 SV=1	Energiestoffwechsel
TPIS_MOUSE	Triosephosphate isomerase OS=Mus musculus GN=Tpi1 PE=1 SV=4	Energiestoffwechsel
RTN1_MOUSE	Reticulon-1 OS=Mus musculus GN=Rtn1 PE=1 SV=1	früher sekretorischer Weg
HS90A_MOUSE	Heat shock protein HSP 90-alpha OS=Mus musculus GN=Hsp90aa1 PE=1 SV=4	HSP
HS90B_MOUSE	Heat shock protein HSP 90-beta OS=Mus musculus GN=Hsp90ab1 PE=1 SV=3	HSP
PDIA3_MOUSE	Protein disulfide-isomerase A3 OS=Mus musculus GN=Pdia3 PE=1 SV=2	HSP
C1QB_MOUSE	Complement C1q subcomponent subunit B OS=Mus musculus GN=C1qb PE=1 SV=1	Immunproteine
IGSF8_MOUSE	Immunoglobulin superfamily member 8 OS=Mus musculus GN=Igsf8 PE=1 SV=2	Immunproteine
LYZ1_MOUSE	Lysozyme C-1 OS=Mus musculus GN=Lyz1 PE=1 SV=1	Immunproteine
KAPCA_MOUSE	cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit alpha OS=Mus musculus GN=Prkaca PE=1 SV=3	Kinase und Phosphatasen
KAP3_MOUSE	cAMP-dependent protein kinase type II-beta regulatory subunit OS=Mus musculus GN=Prkar2b PE=1 SV=3	Kinase und Phosphatasen
PP2BA_MOUSE	Serine/threonine-protein phosphatase 2B catalytic subunit alpha isoform OS=Mus musculus GN=Ppp3ca PE=1 SV=1	Kinase und Phosphatasen
BASP1_MOUSE	Brain acid soluble protein 1 OS=Mus musculus GN=Basp1 PE=1 SV=3	neuronales Wachstum
DPYL2_MOUSE	Dihydropyrimidinase-related protein 2 OS=Mus musculus GN=Dpysl2 PE=1 SV=2	neuronales Wachstum
DREB_MOUSE	Drebrin OS=Mus musculus GN=Dbrn1 PE=1 SV=4	neuronales Wachstum
NEUM_MOUSE	Neuromodulin OS=Mus musculus GN=Gap43 PE=1 SV=1	neuronales Wachstum

## Anhang

UniProtKB Nr.	Proteinname	Proteingruppe
NPTN_MOUSE	Neuroplastin OS=Mus musculus GN=Nptn PE=1 SV=3	neuronales Wachstum
TENR_MOUSE	Tenascin-R OS=Mus musculus GN=Tnr PE=1 SV=2	neuronales Wachstum
THY1_MOUSE	Thy-1 membrane glycoprotein OS=Mus musculus GN=Thy1 PE=1 SV=1	neuronales Wachstum
GNAI1_MOUSE	Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-1 OS=Mus musculus GN=Gnai1 PE=2 SV=1	sonstige GTP-Interaktionsproteine
GNAI2_MOUSE	Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-2 OS=Mus musculus GN=Gnai2 PE=1 SV=5	sonstige GTP-Interaktionsproteine
GBB2_MOUSE	Guanine nucleotide-binding protein G(i)/G(S)/G(T) subunit beta-2 OS=Mus musculus GN=Gnb2 PE=1 SV=3	sonstige GTP-Interaktionsproteine
GNAO_MOUSE	Guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha OS=Mus musculus GN=Gnao1 PE=1 SV=3	sonstige GTP-Interaktionsproteine
NDKA_MOUSE	Nucleoside diphosphate kinase A OS=Mus musculus GN=Nme1 PE=1 SV=1	sonstige GTP-Interaktionsproteine
RAC3_MOUSE	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 3 OS=Mus musculus GN=Rac3 PE=1 SV=1	sonstige GTP-Interaktionsproteine
RAB2A_MOUSE	Ras-related protein Rab-2A OS=Mus musculus GN=Rab2a PE=1 SV=1	sonstige GTP-Interaktionsproteine
GDIR1_MOUSE	Rho GDP-dissociation inhibitor 1 OS=Mus musculus GN=Arhgdia PE=1 SV=3	sonstige GTP-Interaktionsproteine
AT8A1_MOUSE	Probable phospholipid-transporting ATPase IA OS=Mus musculus GN=Atp8a1 PE=1 SV=1	sonstige Kanal- und Transportproteine
MAL2_MOUSE	Protein MAL2 OS=Mus musculus GN=Mal2 PE=1 SV=1	sonstige Kanal- und Transportproteine
NPT1_MOUSE	Sodium-dependent phosphate transport protein 1 OS=Mus musculus GN=Slc17a1 PE=1 SV=2	sonstige Kanal- und Transportproteine
APOE_MOUSE	Apolipoprotein E OS=Mus musculus GN=ApoE PE=1 SV=2	sonstige neuronale Proteine
EAA2_MOUSE	Excitatory amino acid transporter 2 OS=Mus musculus GN=Slc1a2 PE=1 SV=1	sonstige neuronale Proteine
MBP_MOUSE	Myelin basic protein OS=Mus musculus GN=Mbp PE=1 SV=2	sonstige neuronale Proteine
NCDN_MOUSE	Neurochondrin OS=Mus musculus GN=Ncdn PE=1 SV=1	sonstige neuronale Proteine
GPM6A_MOUSE	Neuronal membrane glycoprotein M6-a OS=Mus musculus GN=Gpm6a PE=1 SV=1	sonstige neuronale Proteine
PEBP1_MOUSE	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1 OS=Mus musculus GN=Pebp1 PE=1 SV=3	sonstige neuronale Proteine
AT2B2_MOUSE	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 2 OS=Mus musculus GN=Atp2b2 PE=1 SV=2	sonstige neuronale Proteine
SNAA_MOUSE	Alpha-soluble NSF attachment protein OS=Mus musculus GN=Napa PE=1 SV=1	synaptische Vesikelproteine
SNAB_MOUSE	Beta-soluble NSF attachment protein OS=Mus musculus GN=Napb PE=1 SV=2	synaptische Vesikelproteine
KCC2A_MOUSE	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II alpha chain OS=Mus musculus GN=Camk2a PE=1 SV=2	synaptische Vesikelproteine
KCC2G_MOUSE	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II gamma chain OS=Mus musculus GN=Camk2g PE=1 SV=1	synaptische Vesikelproteine
AP180_MOUSE	Clathrin coat assembly protein AP180 - Mus musculus (Mouse)	synaptische Vesikelproteine
DMXL2_MOUSE	DmX-like protein 2 OS=Mus musculus GN=Dmxl2 PE=1 SV=3	synaptische Vesikelproteine
DYN1_MOUSE	Dynamin-1 OS=Mus musculus GN=Dnm1 PE=1 SV=2	synaptische Vesikelproteine
DYN3_MOUSE	Dynamin-3 OS=Mus musculus GN=Dnm3 PE=1 SV=1	synaptische Vesikelproteine
SNAG_MOUSE	Gamma-soluble NSF attachment protein OS=Mus musculus GN=Napg PE=1 SV=1	synaptische Vesikelproteine
DHE3_MOUSE	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Glud1 PE=1 SV=1	synaptische Vesikelproteine
RP3A_MOUSE	Rabphilin-3A - Mus musculus (Mouse)	synaptische Vesikelproteine
RAB3C_MOUSE	Ras-related protein Rab-3C OS=Mus musculus GN=Rab3c PE=1 SV=1	synaptische Vesikelproteine
RAB3D_MOUSE	Ras-related protein Rab-3D OS=Mus musculus GN=Rab3d PE=1 SV=1	synaptische Vesikelproteine
RAB5C_MOUSE	Ras-related protein Rab-5C OS=Mus musculus GN=Rab5c PE=1 SV=2	synaptische Vesikelproteine
SCAM5_MOUSE	Secretory carrier-associated membrane protein 5 OS=Mus musculus GN=Scamp5 PE=2 SV=1	synaptische Vesikelproteine
SGIP1_MOUSE	SH3-containing GRB2-like protein 3-interacting protein 1 OS=Mus musculus GN=Sgip1 PE=1 SV=1	synaptische Vesikelproteine
SPTB2_MOUSE	Spectrin beta chain, brain 1 OS=Mus musculus GN=Sptbn1 PE=1 SV=2	synaptische Vesikelproteine
SYN1_MOUSE	Synapsin-1 OS=Mus musculus GN=Syn1 PE=1 SV=2	synaptische Vesikelproteine
SYN2_MOUSE	Synapsin-2 OS=Mus musculus GN=Syn2 PE=1 SV=2	synaptische Vesikelproteine
SV2A_MOUSE	Synaptic vesicle glycoprotein 2A OS=Mus musculus GN=V2a PE=1 SV=1	synaptische Vesikelproteine
SV2B_MOUSE	Synaptic vesicle glycoprotein 2B OS=Mus musculus GN=V2b PE=1 SV=1	synaptische Vesikelproteine
VAT1_MOUSE	Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog OS=Mus musculus GN=Vat1 PE=1 SV=3	synaptische Vesikelproteine
SNG1_MOUSE	Synaptogyrin-1 OS=Mus musculus GN=Syngr1 PE=1 SV=2	synaptische Vesikelproteine
SNG3_MOUSE	Synaptogyrin-3 OS=Mus musculus GN=Syngr3 PE=1 SV=1	synaptische Vesikelproteine
SYPH_MOUSE	Synaptophysin OS=Mus musculus GN=Syp PE=1 SV=2	synaptische Vesikelproteine
SNP25_MOUSE	Synaptosomal-associated protein 25 OS=Mus musculus GN=Snap25 PE=1 SV=1	synaptische Vesikelproteine
SYT1_MOUSE	Synaptotagmin-1 OS=Mus musculus GN=Sytn1 PE=1 SV=1	synaptische Vesikelproteine
SYT2_MOUSE	Synaptotagmin-2 OS=Mus musculus GN=Sytn2 PE=1 SV=1	synaptische Vesikelproteine
STX1A_MOUSE	Syntaxin-1A OS=Mus musculus GN=Stx1a PE=1 SV=3	synaptische Vesikelproteine

UniProtKB Nr.	Proteinname	Proteingruppe
STX1B_MOUSE	Syntaxin-1B OS=Mus musculus GN=Stx1b PE=1 SV=1	synaptische Vesikelproteine
STXB1_MOUSE	Syntaxin-binding protein 1 OS=Mus musculus GN=Stxbp1 PE=1 SV=2	synaptische Vesikelproteine
VATA_MOUSE	Vacuolar ATP synthase catalytic subunit A OS=Mus musculus GN=Atp6v1a PE=1 SV=2	synaptische Vesikelproteine
VAOD1_MOUSE	Vacuolar proton pump subunit d 1 OS=Mus musculus GN=Atp6v0d1 PE=1 SV=2	synaptische Vesikelproteine
VATD_MOUSE	Vacuolar proton pump subunit D OS=Mus musculus GN=Atp6v1d PE=1 SV=1	synaptische Vesikelproteine
VATE1_MOUSE	Vacuolar proton pump subunit E 1 OS=Mus musculus GN=Atp6v1e1 PE=1 SV=2	synaptische Vesikelproteine
VAMP1_MOUSE	Vesicle-associated membrane protein 1 OS=Mus musculus GN=Vamp1 PE=1 SV=1	synaptische Vesikelproteine
VAMP2_MOUSE	Vesicle-associated membrane protein 2 OS=Mus musculus GN=Vamp2 PE=1 SV=2	synaptische Vesikelproteine
VAPA_MOUSE	Vesicle-associated membrane protein-associated protein A OS=Mus musculus GN=Vapa PE=1 SV=2	synaptische Vesikelproteine
VAPB_MOUSE	Vesicle-associated membrane protein-associated protein B OS=Mus musculus GN=Vapb PE=2 SV=3	synaptische Vesikelproteine
NSF_MOUSE	Vesicle-fusing ATPase OS=Mus musculus GN=Nsf PE=1 SV=2	synaptische Vesikelproteine
VPP1_MOUSE	V-type proton ATPase 116 kDa subunit a isoform 1 OS=Mus musculus GN=Atp6v0a1 PE=1 SV=3	synaptische Vesikelproteine
VATB2_MOUSE	V-type proton ATPase subunit B, brain isoform OS=Mus musculus GN=Atp6v1b2 PE=1 SV=1	synaptische Vesikelproteine
VATC1_MOUSE	V-type proton ATPase subunit C 1 OS=Mus musculus GN=Atp6v1c1 PE=1 SV=4	synaptische Vesikelproteine
VATF_MOUSE	V-type proton ATPase subunit F OS=Mus musculus GN=Atp6v1f PE=1 SV=2	synaptische Vesikelproteine
VATG1_MOUSE	V-type proton ATPase subunit G 1 OS=Mus musculus GN=Atp6v1g1 PE=2 SV=3	synaptische Vesikelproteine
VATG2_MOUSE	V-type proton ATPase subunit G 2 OS=Mus musculus GN=Atp6v1g2 PE=2 SV=1	synaptische Vesikelproteine
VATH_MOUSE	V-type proton ATPase subunit H OS=Mus musculus GN=Atp6v1h PE=1 SV=1	synaptische Vesikelproteine
RS19_MOUSE	40S ribosomal protein S19 OS=Mus musculus GN=Rps19 PE=1 SV=3	Transkription, Translation
RS3_MOUSE	40S ribosomal protein S3 OS=Mus musculus GN=Rps3 PE=1 SV=1	Transkription, Translation
RS4X_MOUSE	40S ribosomal protein S4, X isoform OS=Mus musculus GN=Rps4x PE=2 SV=2	Transkription, Translation
RS5_MOUSE	40S ribosomal protein S5 OS=Mus musculus GN=Rps5 PE=2 SV=3	Transkription, Translation
RS6_MOUSE	40S ribosomal protein S6 OS=Mus musculus GN=Rps6 PE=1 SV=1	Transkription, Translation
RS8_MOUSE	40S ribosomal protein S8 OS=Mus musculus GN=Rps8 PE=1 SV=2	Transkription, Translation
RSSA_MOUSE	40S ribosomal protein SA OS=Mus musculus GN=Rpsa PE=1 SV=4	Transkription, Translation
RL14_MOUSE	60S ribosomal protein L14 OS=Mus musculus GN=Rpl14 PE=2 SV=3	Transkription, Translation
RL15_MOUSE	60S ribosomal protein L15 OS=Mus musculus GN=Rpl15 PE=2 SV=4	Transkription, Translation
RL18_MOUSE	60S ribosomal protein L18 OS=Mus musculus GN=Rpl18 PE=2 SV=3	Transkription, Translation
RL26_MOUSE	60S ribosomal protein L26 OS=Mus musculus GN=Rpl26 PE=2 SV=1	Transkription, Translation
RL3_MOUSE	60S ribosomal protein L3 OS=Mus musculus GN=Rpl3 PE=2 SV=3	Transkription, Translation
RL6_MOUSE	60S ribosomal protein L6 OS=Mus musculus GN=Rpl6 PE=1 SV=3	Transkription, Translation
RL7_MOUSE	60S ribosomal protein L7 OS=Mus musculus GN=Rpl7 PE=2 SV=2	Transkription, Translation
RL8_MOUSE	60S ribosomal protein L8 OS=Mus musculus GN=Rpl8 PE=2 SV=2	Transkription, Translation
ATLA1_MOUSE	Atlastin-1 OS=Mus musculus GN=Atl1 PE=1 SV=1	Transkription, Translation
CALR_MOUSE	Calreticulin OS=Mus musculus GN=Calr PE=1 SV=1	Transkription, Translation
EF1G_MOUSE	Elongation factor 1-gamma OS=Mus musculus GN=Eef1g PE=1 SV=3	Transkription, Translation
ENDD1_MOUSE	Endonuclease domain-containing 1 protein OS=Mus musculus GN=Endod1 PE=1 SV=2	Transkription, Translation
NPM_MOUSE	Nucleophosmin OS=Mus musculus GN=Npm1 PE=1 SV=1	Transkription, Translation
PPIA_MOUSE	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A OS=Mus musculus GN=Ppia PE=1 SV=2	Transkription, Translation
SAHH2_MOUSE	Putative adenosylhomocysteinase 2 OS=Mus musculus GN=Ahcy1 PE=1 SV=1	Transkription, Translation
RTN3_MOUSE	Reticulon-3 OS=Mus musculus GN=Rtn3 PE=1 SV=2	Transkription, Translation
AT2A2_MOUSE	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2 OS=Mus musculus GN=Atp2a2 PE=1 SV=2	Transkription, Translation
PURA_MOUSE	Transcriptional activator protein Pur-alpha OS=Mus musculus GN=Pura PE=1 SV=1	Transkription, Translation
RL40_MOUSE	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40 OS=Mus musculus GN=Uba52 PE=1 SV=2	Transkription, Translation
NECP1_MOUSE	Adaptin ear-binding coat-associated protein 1 OS=Mus musculus GN=Necap1 PE=1 SV=2	vesikulärer Transport
AP2A1_MOUSE	AP-2 complex subunit alpha-1 OS=Mus musculus GN=Ap2a1 PE=1 SV=1	vesikulärer Transport
AP2A2_MOUSE	AP-2 complex subunit alpha-2 OS=Mus musculus GN=Ap2a2 PE=1 SV=2	vesikulärer Transport
AP2B1_MOUSE	AP-2 complex subunit beta OS=Mus musculus GN=Ap2b1 PE=1 SV=1	vesikulärer Transport
AP2M1_MOUSE	AP-2 complex subunit mu OS=Mus musculus GN=Ap2m1 PE=1 SV=1	vesikulärer Transport
AAK1_MOUSE	AP2-associated protein kinase 1 OS=Mus musculus GN=Aak1 PE=1 SV=2	vesikulärer Transport
CLH_MOUSE	Clathrin heavy chain 1 OS=Mus musculus GN=Cltc PE=1 SV=3	vesikulärer Transport
PRAF2_MOUSE	PRA1 family protein 2 OS=Mus musculus GN=Praf2 PE=2 SV=1	vesikulärer Transport
ROGDI_MOUSE	Protein rogd1 homolog OS=Mus musculus GN=Rogdi PE=2 SV=2	Zellwachstum
ACTC_MOUSE	Actin, alpha cardiac muscle 1 - Mus musculus (Mouse)	Zytoskelett
ACTB_MOUSE	Actin, cytoplasmic 1 - Mus musculus (Mouse)	Zytoskelett
AINX_MOUSE	Alpha-internexin OS=Mus musculus GN=Ina PE=1 SV=2	Zytoskelett

## Anhang

UniProtKB Nr.	Proteinname	Proteingruppe
ANK2_MOUSE	Ankyrin-2 OS=Mus musculus GN=Ank2 PE=1 SV=2	Zytoskelett
E41L3_MOUSE	Band 4,1-like protein 3 OS=Mus musculus GN=Epb41l3 PE=1 SV=1	Zytoskelett
COR1C_MOUSE	Coronin-1C OS=Mus musculus GN=Coro1c PE=1 SV=2	Zytoskelett
DEST_MOUSE	Dextrin OS=Mus musculus GN=Dstn PE=1 SV=3	Zytoskelett
CAZA1_MOUSE	F-actin-capping protein subunit alpha-1 OS=Mus musculus GN=Capza1 PE=1 SV=4	Zytoskelett
MAP1A_MOUSE	Microtubule-associated protein 1A OS=Mus musculus GN=Map1a PE=1 SV=2	Zytoskelett
MAP1B_MOUSE	Microtubule-associated protein 1B OS=Mus musculus GN=Map1b PE=1 SV=2	Zytoskelett
MAP2_MOUSE	Microtubule-associated protein 2 OS=Mus musculus GN=Map2 PE=1 SV=2	Zytoskelett
MAP6_MOUSE	Microtubule-associated protein 6 OS=Mus musculus GN=Map6 PE=1 SV=2	Zytoskelett
MYO5A_MOUSE	Myosin-Va OS=Mus musculus GN=Myo5a PE=1 SV=2	Zytoskelett
NFH_MOUSE	Neurofilament heavy polypeptide OS=Mus musculus GN=Nefh PE=1 SV=3	Zytoskelett
NFL_MOUSE	Neurofilament light polypeptide OS=Mus musculus GN=Nefl PE=1 SV=5	Zytoskelett
NFM_MOUSE	Neurofilament medium polypeptide OS=Mus musculus GN=Nefm PE=1 SV=4	Zytoskelett
SEPT3_MOUSE	Neuronal-specific septin-3 OS=Mus musculus GN=Sept3 PE=1 SV=2	Zytoskelett
PROF2_MOUSE	Profilin-2 OS=Mus musculus GN=Pfn2 PE=1 SV=3	Zytoskelett
SEP11_MOUSE	Septin-11 OS=Mus musculus GN=Sept11 PE=1 SV=4	Zytoskelett
SEPT6_MOUSE	Septin-6 - Mus musculus (Mouse)	Zytoskelett
SEPT7_MOUSE	Septin-7 OS=Mus musculus GN=Sept7 PE=1 SV=1	Zytoskelett
SPTA2_MOUSE	Spectrin alpha chain, brain - Mus musculus (Mouse)	Zytoskelett
TPM1_MOUSE	Tropomyosin alpha-1 chain OS=Mus musculus GN=Tpm1 PE=1 SV=1	Zytoskelett
TBA1A_MOUSE	Tubulin alpha-1A chain OS=Mus musculus GN=Tuba1a PE=1 SV=1	Zytoskelett
TBA1C_MOUSE	Tubulin alpha-1C chain OS=Mus musculus GN=Tuba1c PE=1 SV=1	Zytoskelett
TBA4A_MOUSE	Tubulin alpha-4A chain OS=Mus musculus GN=Tuba4a PE=1 SV=1	Zytoskelett
TBB2A_MOUSE	Tubulin beta-2A chain OS=Mus musculus GN=Tubb2a PE=1 SV=1	Zytoskelett
TBB3_MOUSE	Tubulin beta-3 chain OS=Mus musculus GN=Tubb3 PE=1 SV=1	Zytoskelett
TBB4A_MOUSE	Tubulin beta-4A chain OS=Mus musculus GN=Tubb4a PE=1 SV=3	Zytoskelett
TBB4B_MOUSE	Tubulin beta-4B chain OS=Mus musculus GN=Tubb4b PE=1 SV=1	Zytoskelett
TBB5_MOUSE	Tubulin beta-5 chain OS=Mus musculus GN=Tubb5 PE=1 SV=1	Zytoskelett
GRP78_MOUSE	78 kDa glucose-regulated protein OS=Mus musculus GN=Hspa5 PE=1 SV=3	keiner Gruppe zugeordnet
AMPH_MOUSE	Amphiphysin OS=Mus musculus GN=Amph PE=1 SV=1	keiner Gruppe zugeordnet
KCRB_MOUSE	Creatine kinase B-type OS=Mus musculus GN=Ckb PE=1 SV=1	keiner Gruppe zugeordnet
DNJC5_MOUSE	DnaJ homolog subfamily C member 5 OS=Mus musculus GN=Dnajc5 PE=1 SV=1	keiner Gruppe zugeordnet
HSP7C_MOUSE	Heat shock cognate 71 kDa protein OS=Mus musculus GN=Hspa8 PE=1 SV=1	keiner Gruppe zugeordnet
HBA_MOUSE	Hemoglobin subunit alpha OS=Mus musculus GN=Hba PE=1 SV=2	keiner Gruppe zugeordnet
HBB1_MOUSE	Hemoglobin subunit beta-1 - Mus musculus (Mouse)	keiner Gruppe zugeordnet
HPLN1_MOUSE	Hyaluronan and proteoglycan link protein 1 OS=Mus musculus GN=Hapln1 PE=2 SV=1	keiner Gruppe zugeordnet
HPLN2_MOUSE	Hyaluronan and proteoglycan link protein 2 OS=Mus musculus GN=Hapln2 PE=1 SV=1	keiner Gruppe zugeordnet
PGRC1_MOUSE	Membrane-associated progesterone receptor component 1 OS=Mus musculus GN=Pgrmc1 PE=1 SV=4	keiner Gruppe zugeordnet
NP1L4_MOUSE	Nucleosome assembly protein 1-like 4 OS=Mus musculus GN=Nap1l4 PE=1 SV=1	keiner Gruppe zugeordnet
CDS2_MOUSE	Phosphatidate cytidyltransferase 2 OS=Mus musculus GN=Cds2 PE=1 SV=1	keiner Gruppe zugeordnet
K1045_MOUSE	Protein KIAA1045 OS=Mus musculus GN=Kiaa1045 PE=1 SV=2	keiner Gruppe zugeordnet
RAB10_MOUSE	Ras-related protein Rab-10 OS=Mus musculus GN=Rab10 PE=1 SV=1	keiner Gruppe zugeordnet
ALBU_MOUSE	Serum albumin precursor - Mus musculus (Mouse)	keiner Gruppe zugeordnet
AT1A1_MOUSE	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1 OS=Mus musculus GN=Atp1a1 PE=1 SV=1	keiner Gruppe zugeordnet
AT1A2_MOUSE	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-2 OS=Mus musculus GN=Atp1a2 PE=1 SV=1	keiner Gruppe zugeordnet
AT1A3_MOUSE	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-3 OS=Mus musculus GN=Atp1a3 PE=1 SV=1	keiner Gruppe zugeordnet
AT1B1_MOUSE	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-1 OS=Mus musculus GN=Atp1b1 PE=1 SV=1	keiner Gruppe zugeordnet
WDR7_MOUSE	WD repeat-containing protein 7 OS=Mus musculus GN=Wdr7 PE=1 SV=3	keiner Gruppe zugeordnet

### e) Veränderte Proteine der Fraktion D4

NCBI Nr.	Proteinname	Proteingruppe
gi 4506371	ras-related protein Rab-5B [Homo sapiens]	endosomale Proteine
gi 50053824	early endosome antigen 1 [Mus musculus]	endosomale Proteine
gi 74219413	Rab5a [Mus musculus]	endosomale Proteine
gi 26344758	Reticulon-3 [Mus musculus]	endosomale Proteine

NCBI Nr.	Proteinname	Proteingruppe
gi 6678553	vesicle-associated membrane protein 3 [Mus musculus]	endosomale Proteine
gi 74181576	ADP-ribosylation factor-like protein 8B [Mus musculus]	endosomale Proteine
gi 126031446	Chain A, Mouse C14a Glutathione-S-Transferase Mutant In Complex With S-Hexyl Glutathione	Energiestoffwechsel
gi 12837652	Malate dehydrogenase, cytoplasmic [Mus musculus]	Energiestoffwechsel
gi 231557	RecName: Full=Apolipoprotein A-I; Short=Apo-AI; Short=ApoA-I; AltName: Full=Apolipoprotein A1; Flags: Precursor	Energiestoffwechsel
gi 254553344	6-phosphofruktokinase, muscle type [Mus musculus]	Energiestoffwechsel
gi 309266468	PREDICTED: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-like isoform 1 [Mus musculus]	Energiestoffwechsel
gi 6678674	lactate dehydrogenase B [Mus musculus]	Energiestoffwechsel
gi 7710012	thiomorpholine-carboxylate dehydrogenase [Mus musculus]	Energiestoffwechsel
gi 21218066	reticulum 1A [Mus musculus]	früher sekretorischer Weg
gi 58037395	Scamp1: secretory carrier-associated membrane protein 1 [Mus musculus]	früher sekretorischer Weg
(gi 54311137)	RAB2A/B, member RAS oncogene family [Mus musculus]	früher sekretorischer Weg
gi 10946940	ras-related protein Rab-2A [Mus musculus]	früher sekretorischer Weg
gi 7304929	TRAPPC3: trafficking protein particle complex subunit 3 [Mus musculus]	früher sekretorischer Weg
gi 40556608	heat shock protein HSP 90-beta [Mus musculus]	HSP
gi 6754254	heat shock protein HSP 90-alpha [Mus musculus]	HSP
gi 148696833	mCG23092; Neurocan core protein (Blast) [Mus musculus]	neuronales Wachstum
gi 1915913	Ulip2 protein [Mus musculus]	neuronales Wachstum
gi 124286805	C1QA, complement C1q subcomponent subunit A precursor [Mus musculus]	Proteolyse
gi 20072543	Fbxo2 protein [Mus musculus]	Proteolyse
gi 26347309	Proteasome subunit beta type [Mus musculus]	Proteolyse
gi 27692965	Psmd2 protein [Mus musculus]	Proteolyse
gi 23463313	ras-related protein Rab-8B [Rattus norvegicus]	sonstige GTP-Interaktionsproteine
gi 62901101	RecName: Full=Ras-related protein Rab-31	sonstige GTP-Interaktionsproteine
gi 6755963	voltage-dependent anion-selective channel protein 1 [Mus musculus]	sonstige Kanal- und Transportproteine
gi 6755965	voltage-dependent anion-selective channel protein 2 [Mus musculus]	sonstige Kanal- und Transportproteine
gi 18656627	EAAT3 glutamate transporter regulator GTRAP3-18 [Mus musculus]	sonstige neuronale Proteine
gi 387515	jimpy mutant proteolipid protein [Mus musculus]	sonstige neuronale Proteine
gi 6754658	Myelin basic protein [Mus musculus]	sonstige neuronale Proteine
gi 69885032	myelin basic protein isoform 1 [Mus musculus]	sonstige neuronale Proteine
gi 69885073	myelin basic protein isoform 6 [Mus musculus]	sonstige neuronale Proteine
gi 44890693	Cntrn1 protein [Mus musculus]	sonstige neuronale Proteine
gi 11528518	synaptic vesicle glycoprotein 2A [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gi 123702073	vesicle-associated membrane protein 1 isoform b [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gi 13385392	alpha-soluble NSF attachment protein [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gi 14318722	ATPase, H+ transporting, lysosomal V1 subunit H [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gi 148668411	synapsin I, isoform CRA_a [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gi 148706349	Vesicle-associated membrane protein-associated protein A [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gi 152031595	RecName: Full=DmX-like protein 2; AltName: Full=Rabconnectin-3	synaptische Vesikelproteine
gi 15928723	synaptophysin [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gi 16758754	V-type proton ATPase subunit F [Rattus norvegicus]	synaptische Vesikelproteine
gi 168983990	ATPase, H+ transporting, lysosomal V1 subunit G2 [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gi 16945962	rabphilin 3A [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gi 19527400	synaptotagmin-12 [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gi 218156282	vesicular glutamate transporter 1 [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gi 2253399	vesicle associated membrane protein 2 [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gi 26347065	Synaptoporin [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gi 26390051	V-type proton ATPase 16 kDa proteolipid subunit [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gi 26665359	vesicular GABA transporter a form [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gi 29789104	beta-SNAP; beta-soluble NSF attachment protein [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gi 38259194	putative tyrosine-protein phosphatase auxilin isoform c [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gi 4731936	synaptogyrin 3 [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gi 6978593	CaMK II a, calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit alpha [Rattus norvegicus]	synaptische Vesikelproteine
gi 7106257	probable phospholipid-transporting ATPase IA isoform b [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gi 74183858	V-type proton ATPase catalytic subunit A [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine

## Anhang

NCBI Nr.	Proteinname	Proteingruppe
gij74186656	VGlut1 [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gij74211135	Synaptotagmin-1 [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gij74212053	Calmodulin [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gij74219390	V-type proton ATPase subunit S1 [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gij74220560	V-type proton ATPase catalytic subunit A [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gij74223066	V-type proton ATPase subunit B, brain isoform [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gij9937988	SCAMP5: secretory carrier-associated membrane protein 5 [Mus musculus]	synaptische Vesikelproteine
gij12848861	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1 [Mus musculus]	Transkription, Translation
gij12963511	40S ribosomal protein S19 [Mus musculus]	Transkription, Translation
gij13399310	40S ribosomal protein S10 [Mus musculus]	Transkription, Translation
gij14165469	40S ribosomal protein S15a [Homo sapiens]	Transkription, Translation
gij148699419	mCG116065 [Mus musculus]	Transkription, Translation
gij149258678	PREDICTED: 40S ribosomal protein S12-like [Mus musculus]	Transkription, Translation
gij149263818	PREDICTED: 60S ribosomal protein L35a-like [Mus musculus]	Transkription, Translation
gij156523248	proline-rich transmembrane protein 2 [Mus musculus]	Transkription, Translation
gij19527256	ATP-dependent RNA helicase DDX1 [Mus musculus]	Transkription, Translation
gij26353478	Rpl12 [Mus musculus]	Transkription, Translation
gij38511951	Eef2 protein [Mus musculus]	Transkription, Translation
gij40807498	ribonuclease UK114 [Mus musculus]	Transkription, Translation
gij52078405	Rps16 protein [Mus musculus]	Transkription, Translation
gij6677775	60S ribosomal protein L22 [Mus musculus]	Transkription, Translation
gij116256510	AP-2 complex subunit alpha-1 isoform b [Mus musculus]	vesikulärer Transport
gij21313640	AP-2 complex subunit beta isoform b [Mus musculus]	vesikulärer Transport
gij56961624	AP-2 complex subunit sigma [Mus musculus]	vesikulärer Transport
gij68799814	AP-2 complex subunit mu1, isoform CRA_a [Mus musculus]	vesikulärer Transport
gij62510439	RecName: Full=Clathrin light chain B; Short=Lcb	vesikulärer Transport
gij148667416	CD9 antigen, isoform CRA_b [Mus musculus]	Zellwachstum
gij116283387	Nefl protein [Mus musculus]	Zytoskelett
gij124244033	microtubule-associated protein 1A isoform 1 [Mus musculus]	Zytoskelett
gij124249058	tectonin beta-propeller repeat-containing protein 1 [Mus musculus]	Zytoskelett
gij13542680	Tubulin, beta 2C [Mus musculus]	Zytoskelett
gij148539957	alpha-intermexin [Mus musculus]	Zytoskelett
gij117978023	nonmuscle heavy chain myosin II-A [Mus musculus]	Zytoskelett
gij39204499	neurofilament light polypeptide [Mus musculus]	Zytoskelett
gij4507729	tubulin beta-2A chain [Homo sapiens]	Zytoskelett
gij51261360	Tin2 protein [Mus musculus]	Zytoskelett
gij51709421	PREDICTED: transforming protein RhoA [Mus musculus]	Zytoskelett
gij56205559	myosin, heavy polypeptide 10, non-muscle [Mus musculus]	Zytoskelett
gij6272692	short microtubule-associated protein 1A [Mus musculus]	Zytoskelett
gij6678469	tubulin alpha-1C chain [Mus musculus]	Zytoskelett
gij74144588	Tubulin beta-2C chain [Mus musculus]	Zytoskelett
gij74151948	Actin, cytoplasmic 1 [Mus musculus]	Zytoskelett
gij74194359	MAP-2 [Mus musculus]	Zytoskelett
gij74200913	Microtubule-associated protein 1A [Mus musculus]	Zytoskelett
gij74211311	Tubulin alpha-1A chain [Mus musculus]	Zytoskelett
gij74213524	Actin, cytoplasmic 1 [Mus musculus]	Zytoskelett
gij74228116	(Neurofilament medium polypeptide) [Mus musculus]	Zytoskelett
gij28077021	hypothetical protein LOC74347 [Mus musculus]	keiner Gruppe zugeordnet
gij63087689	RAB14 protein variant [Mus musculus]	keiner Gruppe zugeordnet
gij7710086	ras-related protein Rab-10 [Mus musculus]	keiner Gruppe zugeordnet
gij117647499	hemoglobin, beta adult minor chain [Mus musculus]	keiner Gruppe zugeordnet
gij241913509	Chain B, Crystal Structure Of Hemoglobin From Mouse (Mus Musculus)at 2,8	keiner Gruppe zugeordnet

## f) Veränderte Proteine der Fraktion E5

UniProtKB Nr.	Proteinname	Proteingruppe
1433B_MOUSE	14-3-3 protein beta/alpha OS=Mus musculus GN=Ywhab PE=1 SV=3	14-3-3
1433F_MOUSE	14-3-3 protein eta OS=Mus musculus GN=Ywhah PE=1 SV=2	14-3-3
1433G_MOUSE	14-3-3 protein gamma OS=Mus musculus GN=Ywhag PE=1 SV=2	14-3-3
1433Z_MOUSE	14-3-3 protein zeta/delta OS=Mus musculus GN=Ywhaz PE=1 SV=1	14-3-3
VP33A_MOUSE	Vacuolar protein sorting-associated protein 33A OS=Mus musculus GN=Vps33a PE=1 SV=2	endosomale Proteine
VPS29_MOUSE	Vacuolar protein sorting-associated protein 29 OS=Mus musculus GN=Vps29 PE=1 SV=1	endosomale Proteine
VPS35_MOUSE	Vacuolar protein sorting-associated protein 35 OS=Mus musculus GN=Vps35 PE=1 SV=1	endosomale Proteine
SNX3_MOUSE	Sorting nexin-3 OS=Mus musculus GN=Snx3 PE=1 SV=3	endosomale Proteine
HXK1_MOUSE	Hexokinase-1 OS=Mus musculus GN=Hk1 PE=1 SV=3	Energiestoffwechsel
ODPA_MOUSE	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Pdha1 PE=1 SV=1	Energiestoffwechsel
PRDX1_MOUSE	Peroxiredoxin-1 OS=Mus musculus GN=Prdx1 PE=1 SV=1	Energiestoffwechsel
VIGLN_MOUSE	Vigilin OS=Mus musculus GN=Hdlbp PE=1 SV=1	Energiestoffwechsel
ATPA_MOUSE	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Atp5a1 PE=1 SV=1	Energiestoffwechsel
ATPB_MOUSE	ATP synthase subunit beta, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Atp5b PE=1 SV=2	Energiestoffwechsel
CYC_MOUSE	Cytochrome c, somatic - Mus musculus (Mouse)	Energiestoffwechsel
DLDH_MOUSE	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Dld PE=1 SV=2	Energiestoffwechsel
ECHA_MOUSE	Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Hadha PE=1 SV=1	Energiestoffwechsel
M2OM_MOUSE	Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein OS=Mus musculus GN=Slc25a11 PE=1 SV=3	Energiestoffwechsel
QCR9_MOUSE	Cytochrome b-c1 complex subunit 9 OS=Mus musculus GN=Uqcrl0 PE=1 SV=1	Energiestoffwechsel
SRP68_MOUSE	Signal recognition particle 68 kDa protein OS=Mus musculus GN=Srp68 PE=2 SV=2	früher sekretorischer Weg
CH60_MOUSE	60 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Hspd1 PE=1 SV=1	HSP
DNJC5_MOUSE	DnaJ homolog subfamily C member 5 OS=Mus musculus GN=Dnajc5 PE=1 SV=1	HSP
HSP7C_MOUSE	Heat shock cognate 71 kDa protein OS=Mus musculus GN=Hspa8 PE=1 SV=1	HSP
K1045_MOUSE	Protein KIAA1045 OS=Mus musculus GN=Kiaa1045 PE=1 SV=2	HSP
CYFP2_MOUSE	Cytoplasmic FMR1-interacting protein 2 OS=Mus musculus GN=Cyfp2 PE=1 SV=2	Immunproteine
LYZ1_MOUSE	Lysozyme C-1 OS=Mus musculus GN=Lyz1 PE=1 SV=1	Immunproteine
CSK21_MOUSE	Casein kinase II subunit alpha OS=Mus musculus GN=Csnk2a1 PE=1 SV=2	Kinase und Phosphatasen
CSK2B_MOUSE	Casein kinase II subunit beta OS=Mus musculus GN=Csnk2b PE=1 SV=1	Kinase und Phosphatasen
KAP0_MOUSE	cAMP-dependent protein kinase type I-alpha regulatory subunit OS=Mus musculus GN=Prkar1a PE=1 SV=3	Kinase und Phosphatasen
CDC42_MOUSE	Cell division control protein 42 homolog OS=Mus musculus GN=Cdc42 PE=1 SV=2	neuronales Wachstum
DPYL2_MOUSE	Dihydropyrimidinase-related protein 2 OS=Mus musculus GN=Dpysl2 PE=1 SV=2	neuronales Wachstum
ENOG_MOUSE	Gamma-enolase - Mus musculus (Mouse)	neuronales Wachstum
LANC2_MOUSE	LanC-like protein 2 OS=Mus musculus GN=Lanc2 PE=1 SV=1	neuronales Wachstum
NDRG1_MOUSE	Protein NDRG1 OS=Mus musculus GN=Ndr1 PE=1 SV=1	neuronales Wachstum
NDRG2_MOUSE	Protein NDRG2 OS=Mus musculus GN=Ndr2 PE=1 SV=1	neuronales Wachstum
SERA_MOUSE	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase OS=Mus musculus GN=Phgdh PE=1 SV=3	neuronales Wachstum
RAP1B_MOUSE	Ras-related protein Rap-1b OS=Mus musculus GN=Rap1b PE=2 SV=2	sonstige GTP-Interaktionsproteine
DOCK6_MOUSE	Dedicator of cytokinesis protein 6 OS=Mus musculus GN=Dock6 PE=1 SV=4	sonstige GTP-Interaktionsproteine
GLNA_MOUSE	Glutamine synthetase OS=Mus musculus GN=Glul PE=1 SV=6	sonstige neuronale Proteine
HPCA_MOUSE	Neuron-specific calcium-binding protein hippocalcin OS=Mus musculus GN=Hpcap PE=1 SV=2	sonstige neuronale Proteine
EAA1_MOUSE	Excitatory amino acid transporter 1 OS=Mus musculus GN=Slc1a3 PE=1 SV=2	sonstige neuronale Proteine
EAA2_MOUSE	Excitatory amino acid transporter 2 OS=Mus musculus GN=Slc1a2 PE=1 SV=1	sonstige neuronale Proteine
ARF1_MOUSE	ADP-ribosylation factor 1 OS=Mus musculus GN=Arf1 PE=1 SV=2	synaptische Vesikelproteine
ARFG1_MOUSE	ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein 1 OS=Mus musculus GN=Arfgap1 PE=1 SV=2	synaptische Vesikelproteine
DMXL2_MOUSE	DmX-like protein 2 OS=Mus musculus GN=Dmxl2 PE=1 SV=3	synaptische Vesikelproteine
DYHC1_MOUSE	Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1 OS=Mus musculus GN=Dync1h1 PE=1 SV=2	synaptische Vesikelproteine
KCC2A_MOUSE	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II alpha chain OS=Mus musculus GN=Camk2a PE=1 SV=2	synaptische Vesikelproteine
KCC2D_MOUSE	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II delta chain OS=Mus musculus GN=Camk2d PE=1 SV=1	synaptische Vesikelproteine
RAB3A_MOUSE	Ras-related protein Rab-3A OS=Mus musculus GN=Rab3a PE=1 SV=1	synaptische Vesikelproteine
RAB3B_MOUSE	Ras-related protein Rab-3B OS=Mus musculus GN=Rab3b PE=1 SV=1	synaptische Vesikelproteine
RAB3C_MOUSE	Ras-related protein Rab-3C OS=Mus musculus GN=Rab3c PE=1 SV=1	synaptische Vesikelproteine
SNAB_MOUSE	Beta-soluble NSF attachment protein OS=Mus musculus GN=Napb PE=1 SV=2	synaptische Vesikelproteine
SNG1_MOUSE	Synaptogyrin-1 OS=Mus musculus GN=Syngr1 PE=1 SV=2	synaptische Vesikelproteine

## Anhang

UniProtKB Nr.	Proteinname	Proteingruppe
TPRGL_MOUSE	Tumor protein p63-regulated gene 1-like protein OS=Mus musculus GN=Tprg11 PE=1 SV=1	synaptische Vesikelproteine
VATC1_MOUSE	V-type proton ATPase subunit C 1 OS=Mus musculus GN=Atp6v1c1 PE=1 SV=4	synaptische Vesikelproteine
VATG2_MOUSE	V-type proton ATPase subunit G 2 OS=Mus musculus GN=Atp6v1g2 PE=2 SV=1	synaptische Vesikelproteine
VATH_MOUSE	V-type proton ATPase subunit H OS=Mus musculus GN=Atp6v1h PE=1 SV=1	synaptische Vesikelproteine
VPP1_MOUSE	V-type proton ATPase 116 kDa subunit a isoform 1 OS=Mus musculus GN=Atp6v0a1 PE=1 SV=3	synaptische Vesikelproteine
ABCF1_MOUSE	ATP-binding cassette sub-family F member 1 OS=Mus musculus GN=Abcf1 PE=1 SV=1	Transkription, Translation
CNOT7_MOUSE	CCR4-NOT transcription complex subunit 7 OS=Mus musculus GN=Cnot7 PE=1 SV=1	Transkription, Translation
DTD1_MOUSE	D-tyrosyl-tRNA(Tyr) deacylase 1 OS=Mus musculus GN=Dtd1 PE=1 SV=2	Transkription, Translation
EIF3G_MOUSE	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit G OS=Mus musculus GN=Elf3g PE=1 SV=2	Transkription, Translation
EIF3H_MOUSE	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit H OS=Mus musculus GN=Elf3h PE=1 SV=1	Transkription, Translation
EIF3K_MOUSE	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit K OS=Mus musculus GN=Elf3k PE=1 SV=1	Transkription, Translation
FXR1_MOUSE	Fragile X mental retardation syndrome-related protein 1 OS=Mus musculus GN=Fxr1 PE=1 SV=2	Transkription, Translation
G3BP2_MOUSE	Ras GTPase-activating protein-binding protein 2 OS=Mus musculus GN=G3bp2 PE=1 SV=2	Transkription, Translation
HNRDL_MOUSE	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like OS=Mus musculus GN=Hnrpdl PE=1 SV=1	Transkription, Translation
HNRH2_MOUSE	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2 OS=Mus musculus GN=Hnrhp2 PE=1 SV=1	Transkription, Translation
HNRPM_MOUSE	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M OS=Mus musculus GN=Hnrmpm PE=1 SV=3	Transkription, Translation
LSM12_MOUSE	Protein LSM12 homolog OS=Mus musculus GN=Lsm12 PE=1 SV=1	Transkription, Translation
MLF2_MOUSE	Myeloid leukemia factor 2 OS=Mus musculus GN=Mlf2 PE=1 SV=1	Transkription, Translation
PAIRB_MOUSE	Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein OS=Mus musculus GN=Serbp1 PE=1 SV=2	Transkription, Translation
PPIB_MOUSE	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B OS=Mus musculus GN=Ppib PE=2 SV=2	Transkription, Translation
PURA_MOUSE	Transcriptional activator protein Pur-alpha OS=Mus musculus GN=Pura PE=1 SV=1	Transkription, Translation
RL10_MOUSE	60S ribosomal protein L10 OS=Mus musculus GN=Rpl10 PE=2 SV=3	Transkription, Translation
RL14_MOUSE	60S ribosomal protein L14 OS=Mus musculus GN=Rpl14 PE=2 SV=3	Transkription, Translation
RL15_MOUSE	60S ribosomal protein L15 OS=Mus musculus GN=Rpl15 PE=2 SV=4	Transkription, Translation
RL17_MOUSE	60S ribosomal protein L17 OS=Mus musculus GN=Rpl17 PE=2 SV=3	Transkription, Translation
RL21_MOUSE	60S ribosomal protein L21 OS=Mus musculus GN=Rpl21 PE=2 SV=3	Transkription, Translation
RL26_MOUSE	60S ribosomal protein L26 OS=Mus musculus GN=Rpl26 PE=2 SV=1	Transkription, Translation
RL27_MOUSE	60S ribosomal protein L27 OS=Mus musculus GN=Rpl27 PE=2 SV=2	Transkription, Translation
RL27A_MOUSE	60S ribosomal protein L27a OS=Mus musculus GN=Rpl27a PE=2 SV=5	Transkription, Translation
RL28_MOUSE	60S ribosomal protein L28 OS=Mus musculus GN=Rpl28 PE=1 SV=2	Transkription, Translation
RL30_MOUSE	60S ribosomal protein L30 OS=Mus musculus GN=Rpl30 PE=2 SV=2	Transkription, Translation
RL31_MOUSE	60S ribosomal protein L31 OS=Mus musculus GN=Rpl31 PE=2 SV=1	Transkription, Translation
RL36A_MOUSE	60S ribosomal protein L36a OS=Mus musculus GN=Rpl36a PE=3 SV=2	Transkription, Translation
RL37_MOUSE	60S ribosomal protein L37 OS=Mus musculus GN=Rpl37 PE=2 SV=3	Transkription, Translation
RL37A_MOUSE	60S ribosomal protein L37a OS=Mus musculus GN=Rpl37a PE=2 SV=2	Transkription, Translation
RL7_MOUSE	60S ribosomal protein L7 OS=Mus musculus GN=Rpl7 PE=2 SV=2	Transkription, Translation
RL7A_MOUSE	60S ribosomal protein L7a OS=Mus musculus GN=Rpl7a PE=2 SV=2	Transkription, Translation
RLA1_MOUSE	60S acidic ribosomal protein P1 OS=Mus musculus GN=Rplp1 PE=1 SV=1	Transkription, Translation
ROAA_MOUSE	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B OS=Mus musculus GN=Hnrpab PE=1 SV=1	Transkription, Translation
RRBP1_MOUSE	Ribosome-binding protein 1 OS=Mus musculus GN=Rrbp1 PE=2 SV=2	Transkription, Translation
RS11_MOUSE	40S ribosomal protein S11 OS=Mus musculus GN=Rps11 PE=2 SV=3	Transkription, Translation
RS2_MOUSE	40S ribosomal protein S2 OS=Mus musculus GN=Rps2 PE=1 SV=3	Transkription, Translation
RS21_MOUSE	40S ribosomal protein S21 OS=Mus musculus GN=Rps21 PE=2 SV=1	Transkription, Translation
RS23_MOUSE	40S ribosomal protein S23 OS=Mus musculus GN=Rps23 PE=2 SV=3	Transkription, Translation
RS24_MOUSE	40S ribosomal protein S24 OS=Mus musculus GN=Rps24 PE=1 SV=1	Transkription, Translation
RS25_MOUSE	40S ribosomal protein S25 OS=Mus musculus GN=Rps25 PE=2 SV=1	Transkription, Translation
RS3_MOUSE	40S ribosomal protein S3 OS=Mus musculus GN=Rps3 PE=1 SV=1	Transkription, Translation
RS30_MOUSE	40S ribosomal protein S30 OS=Mus musculus GN=Fau PE=3 SV=1	Transkription, Translation
RS4X_MOUSE	40S ribosomal protein S4, X isoform OS=Mus musculus GN=Rps4x PE=2 SV=2	Transkription, Translation
RS6_MOUSE	40S ribosomal protein S6 OS=Mus musculus GN=Rps6 PE=1 SV=1	Transkription, Translation
RSSA_MOUSE	40S ribosomal protein SA OS=Mus musculus GN=Rpsa PE=1 SV=4	Transkription, Translation
RTC1_MOUSE	RNA 3'-terminal phosphate cyclase OS=Mus musculus GN=Rtcd1 PE=2 SV=2	Transkription, Translation
SCAI_MOUSE	Protein SCAI OS=Mus musculus GN=Scai PE=1 SV=2	Transkription, Translation
SYMC_MOUSE	Methionyl-tRNA synthetase, cytoplasmic OS=Mus musculus GN=Mars PE=2 SV=1	Transkription, Translation
WIBG_MOUSE	Partner of Y14 and mago OS=Mus musculus GN=Wibg PE=1 SV=2	Transkription, Translation
ZMAT4_MOUSE	Zinc finger matrin-type protein 4 OS=Mus musculus GN=Zmat4 PE=2 SV=1	Transkription, Translation

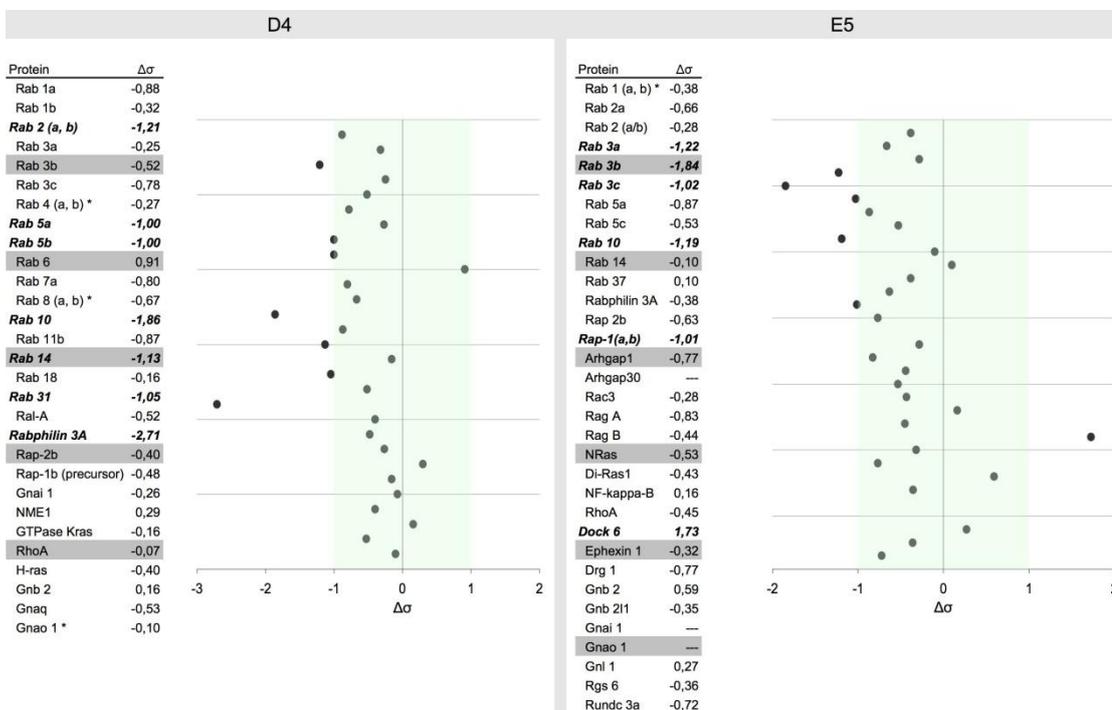
UniProtKB Nr.	Proteinname	Proteingruppe
AAK1_MOUSE	AP2-associated protein kinase 1 OS=Mus musculus GN=Aak1 PE=1 SV=2	vesikulärer Transport
AP180_MOUSE	Clathrin coat assembly protein AP180 - Mus musculus (Mouse)	vesikulärer Transport
AP2M1_MOUSE	AP-2 complex subunit mu OS=Mus musculus GN=Ap2m1 PE=1 SV=1	vesikulärer Transport
EPN2_MOUSE	Epsin-2 OS=Mus musculus GN=Epn2 PE=1 SV=1	vesikulärer Transport
AUX1_MOUSE	Putative tyrosine-protein phosphatase auxilin OS=Mus musculus GN=Dnajc6 PE=2 SV=2	vesikulärer Transport
GAK_MOUSE	Cyclin-G-associated kinase OS=Mus musculus GN=Gak PE=1 SV=2	vesikulärer Transport
CLCB_MOUSE	Clathrin light chain B OS=Mus musculus GN=Cltb PE=2 SV=1	vesikulärer Transport
MUC4_MOUSE	Mucin-4 OS=Mus musculus GN=Muc4 PE=2 SV=1	Zellwachstum
ACTB_MOUSE	Actin, cytoplasmic 1 - Mus musculus (Mouse)	Zytoskelett
ACTC_MOUSE	Actin, alpha cardiac muscle 1 - Mus musculus (Mouse)	Zytoskelett
ACTN2_MOUSE	Alpha-actinin-2 OS=Mus musculus GN=Actn2 PE=1 SV=1	Zytoskelett
ACTY_MOUSE	Beta-centractin OS=Mus musculus GN=Actr1b PE=1 SV=1	Zytoskelett
ARPC4_MOUSE	Actin-related protein 2/3 complex subunit 4 OS=Mus musculus GN=Arpc4 PE=1 SV=3	Zytoskelett
MAP1B_MOUSE	Microtubule-associated protein 1B OS=Mus musculus GN=Map1b PE=1 SV=2	Zytoskelett
MARE3_MOUSE	Microtubule-associated protein RP/EB family member 3 OS=Mus musculus GN=Mapre3 PE=1 SV=1	Zytoskelett
MLP3A_MOUSE	Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3A OS=Mus musculus GN=Map1lc3a PE=2 SV=1	Zytoskelett
MLP3B_MOUSE	Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B OS=Mus musculus GN=Map1lc3b PE=1 SV=3	Zytoskelett
NEB2_MOUSE	Neurabin-2 OS=Mus musculus GN=Ppp1r9b PE=1 SV=1	Zytoskelett
SEPT5_MOUSE	Septin-5 OS=Mus musculus GN=Sept5 PE=1 SV=2	Zytoskelett
SEPT7_MOUSE	Septin-7 OS=Mus musculus GN=Sept7 PE=1 SV=1	Zytoskelett
TBA1A_MOUSE	Tubulin alpha-1A chain OS=Mus musculus GN=Tuba1a PE=1 SV=1	Zytoskelett
TBA1C_MOUSE	Tubulin alpha-1C chain OS=Mus musculus GN=Tuba1c PE=1 SV=1	Zytoskelett
TBA4A_MOUSE	Tubulin alpha-4A chain OS=Mus musculus GN=Tuba4a PE=1 SV=1	Zytoskelett
TBB2A_MOUSE	Tubulin beta-2A chain OS=Mus musculus GN=Tubb2a PE=1 SV=1	Zytoskelett
TBB2B_MOUSE	Tubulin beta-2B chain OS=Mus musculus GN=Tubb2b PE=1 SV=1	Zytoskelett
TBB4_MOUSE	Tubulin beta-4 chain OS=Mus musculus GN=Tubb4 PE=1 SV=3	Zytoskelett
TBB5_MOUSE	Tubulin beta-5 chain OS=Mus musculus GN=Tubb5 PE=1 SV=1	Zytoskelett
PERQ2_MOUSE	PERQ amino acid-rich with GYF domain-containing protein 2 OS=Mus musculus GN=Gigyf2 PE=1 SV=2	keiner Gruppe zugeordnet
COMD2_MOUSE	COMM domain-containing protein 2 OS=Mus musculus GN=Commd2 PE=2 SV=1	keiner Gruppe zugeordnet
COMD3_MOUSE	COMM domain-containing protein 3 OS=Mus musculus GN=Commd3 PE=2 SV=1	keiner Gruppe zugeordnet
COMD4_MOUSE	COMM domain-containing protein 4 OS=Mus musculus GN=Commd4 PE=2 SV=1	keiner Gruppe zugeordnet
HBB_MOUSE	Hemoglobin subunit beta-2 - Mus musculus (Mouse)	keiner Gruppe zugeordnet
TOLIP_MOUSE	Toll-interacting protein OS=Mus musculus GN=Tollip PE=1 SV=1	keiner Gruppe zugeordnet
WDR7_MOUSE	WD repeat-containing protein 7 OS=Mus musculus GN=Wdr7 PE=1 SV=3	keiner Gruppe zugeordnet



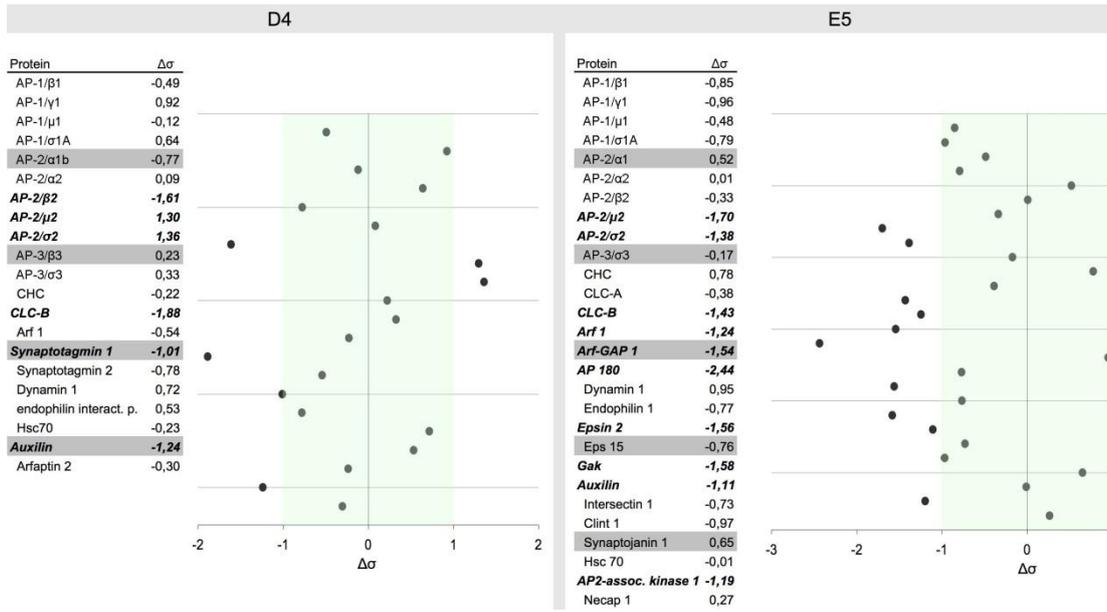
**Abb. A-1: Alle Proteine des iTRAQ™-Experiments wurden zu funktionellen Gruppen zusammengefasst.**

In den Digrammen sind die mit Hilfe der iTRAQ™-Quantifizierung bestimmten differentiellen Veränderungen der jeweiligen Proteinmenge in Vielfachen der Standardabweichung ( $\sigma$ ) dargestellt. Jeder Punkt in den Digrammen entspricht einem Protein, wobei die Abfolge der Punkt der der Proteine in der entsprechenden Liste entspricht. Proteine die sich in dem grün markierten Bereich befinden ( $\pm 1\sigma$ ) wurden nicht als verändert angesehen. In Klammern sind die Abweichungen angegeben, die nicht durch die internen iTRAQ™-Kontrollen bestätigt werden konnten. Veränderte Proteine sind ***kursiv-fett*** hervorgehoben. Mit \* sind die Proteine markiert, bei denen sich die angegebene differentielle Veränderung auf den Mittelwert der angegebenen Isoformen bezieht. Proteinisoformen sind in Klammern durch Kommas getrennt angegeben, z. B. Rab 2 (a, b), wenn die Angegebenen Isoformen nicht spezifisch erkannt wurden und durch einen Schrägstrich getrennt, z. B. Rab 2 (a/b) wenn keine Isoform spezifisch identifiziert wurde. Mit **R** sind ribosomale Proteine Markiert.

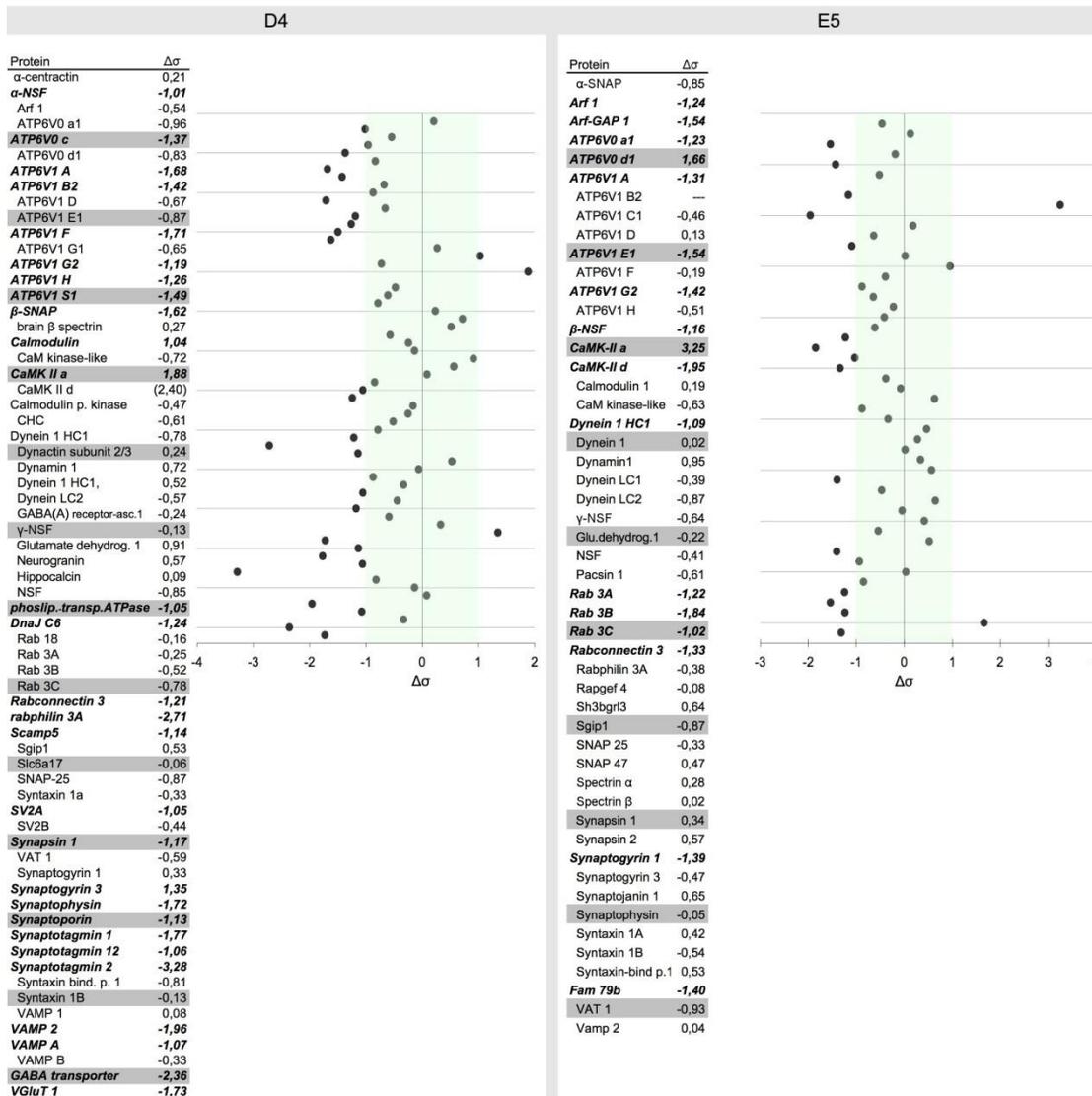
Ras-, Rab-Proteine und GTPasen:



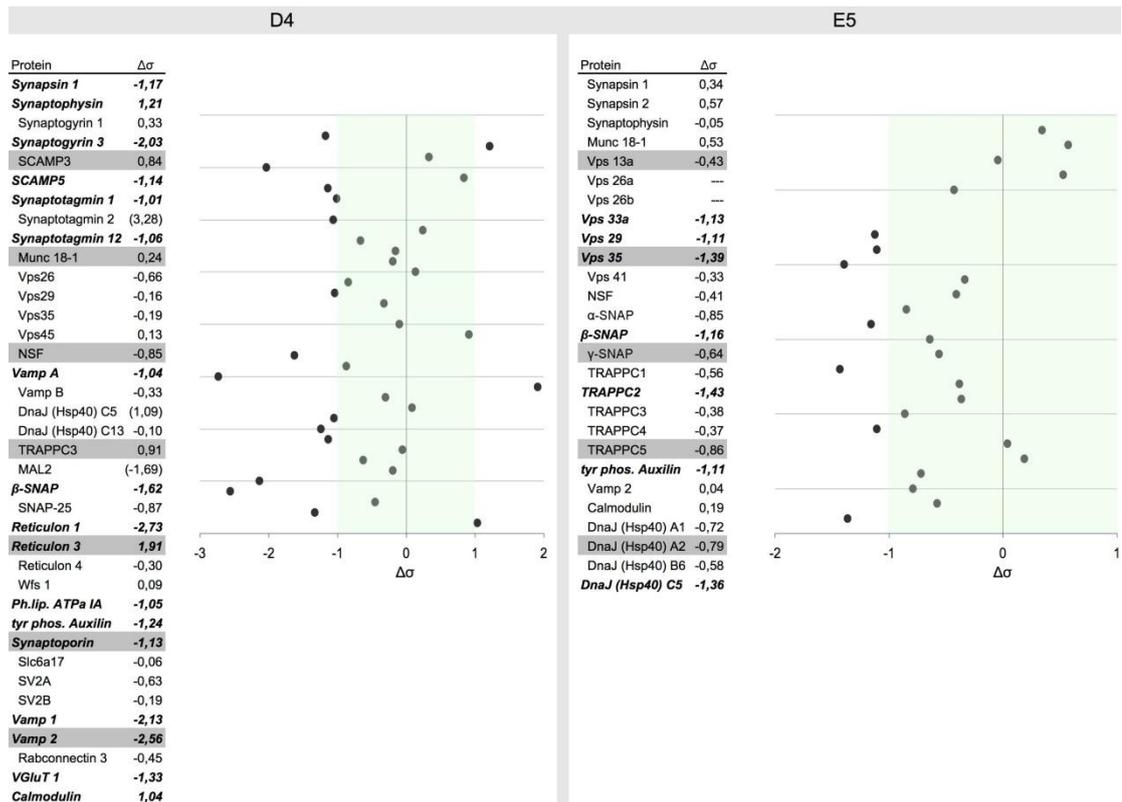
CCV-Proteine, AP-1/2/3, *uncoating*-Proteine:



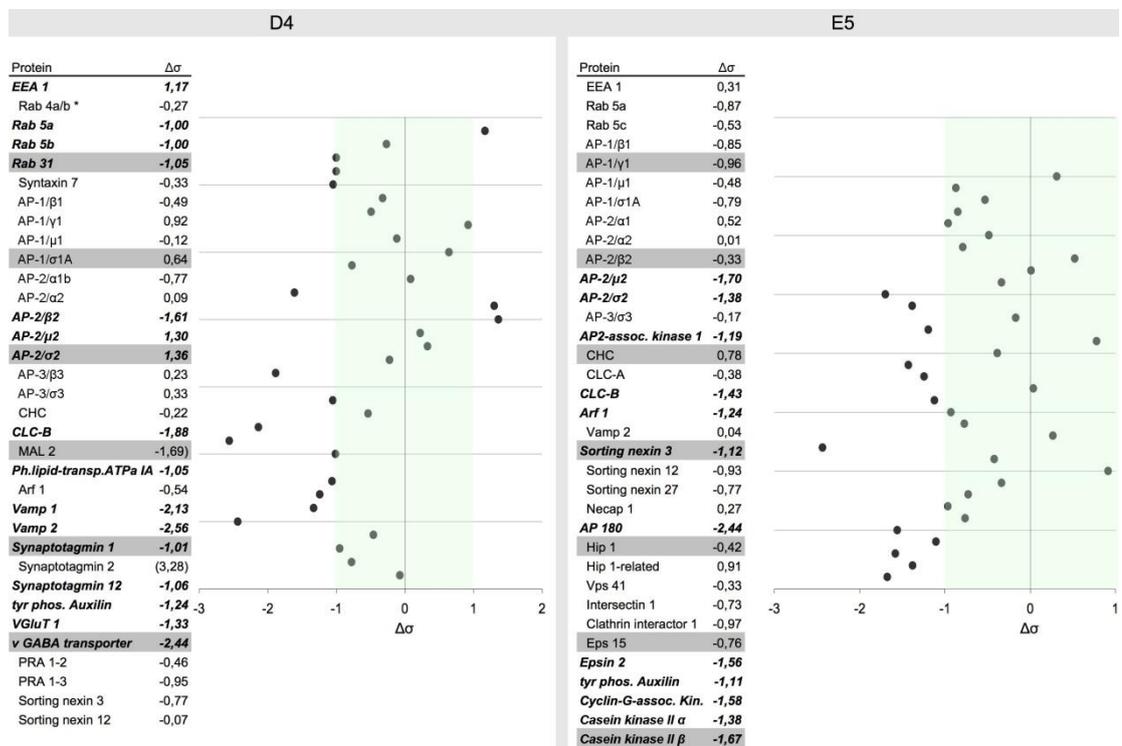
SV-Proteine:



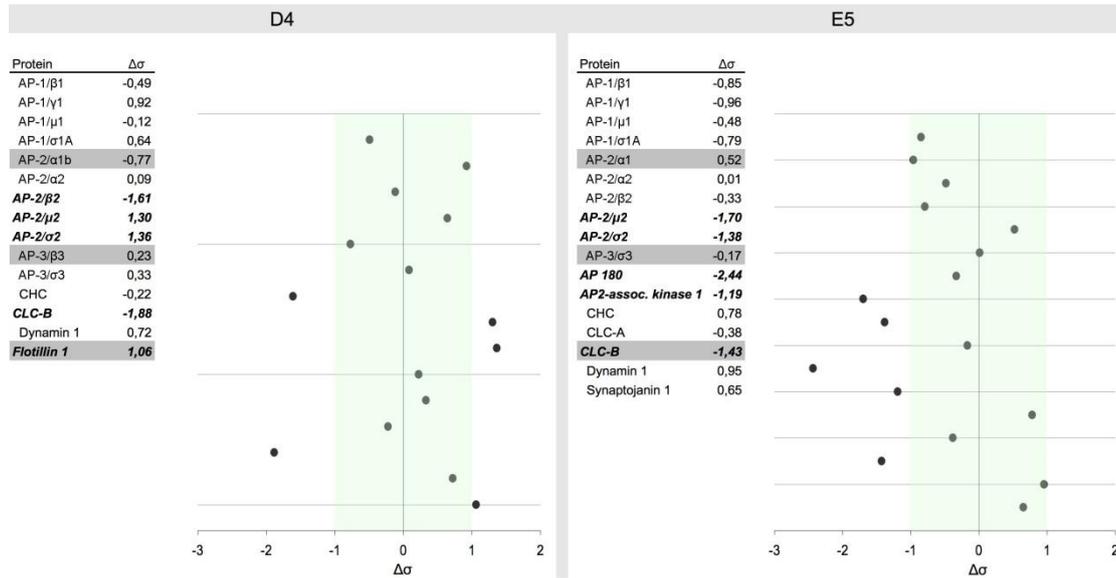
## SV-Membran und SV-Transport:



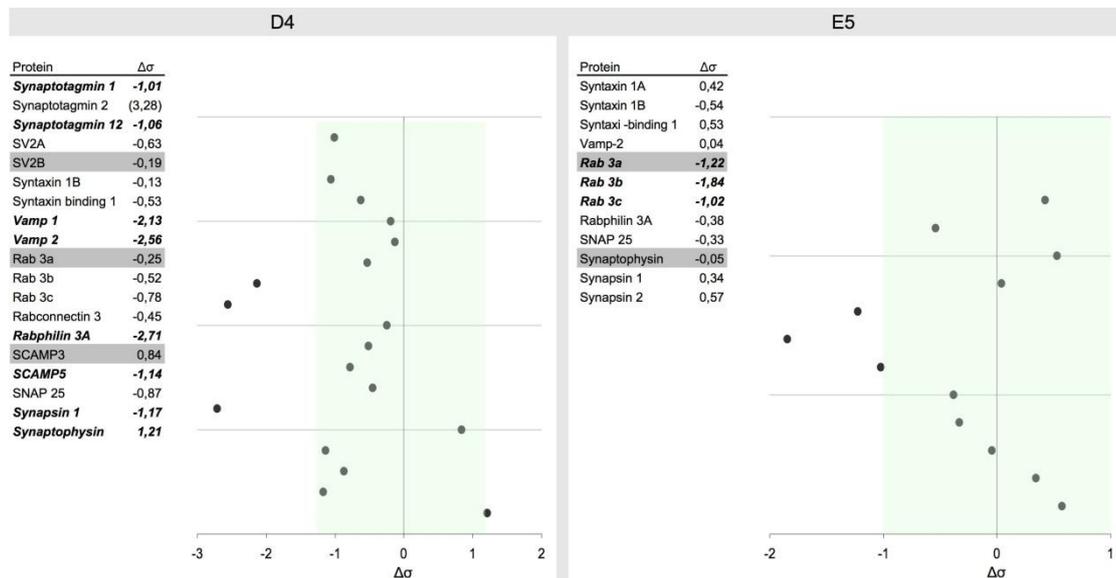
## SV- und endosomales Recycling:



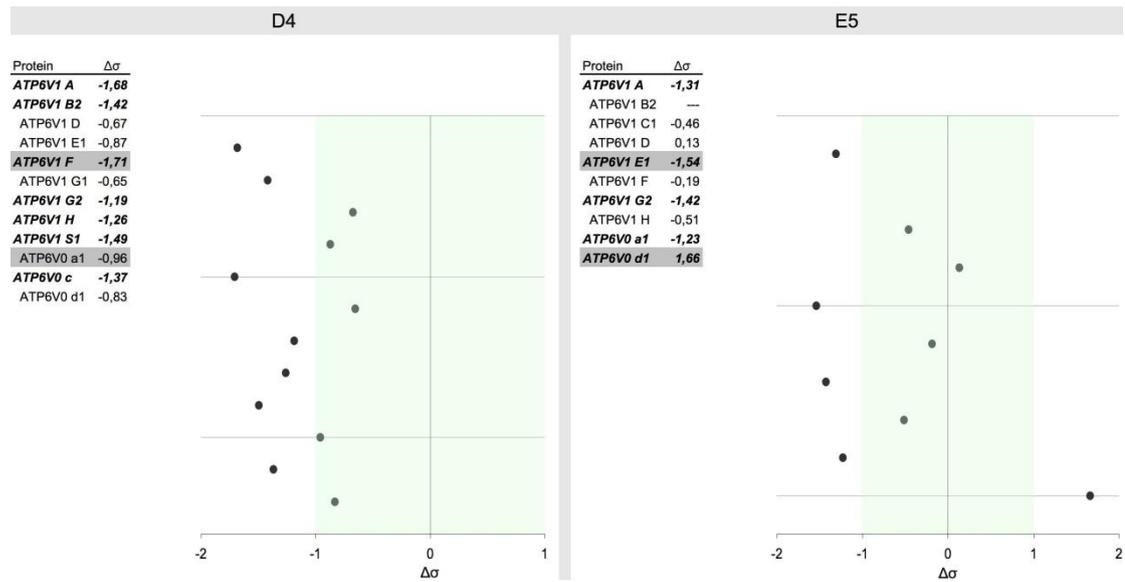
SV-Endozytose:



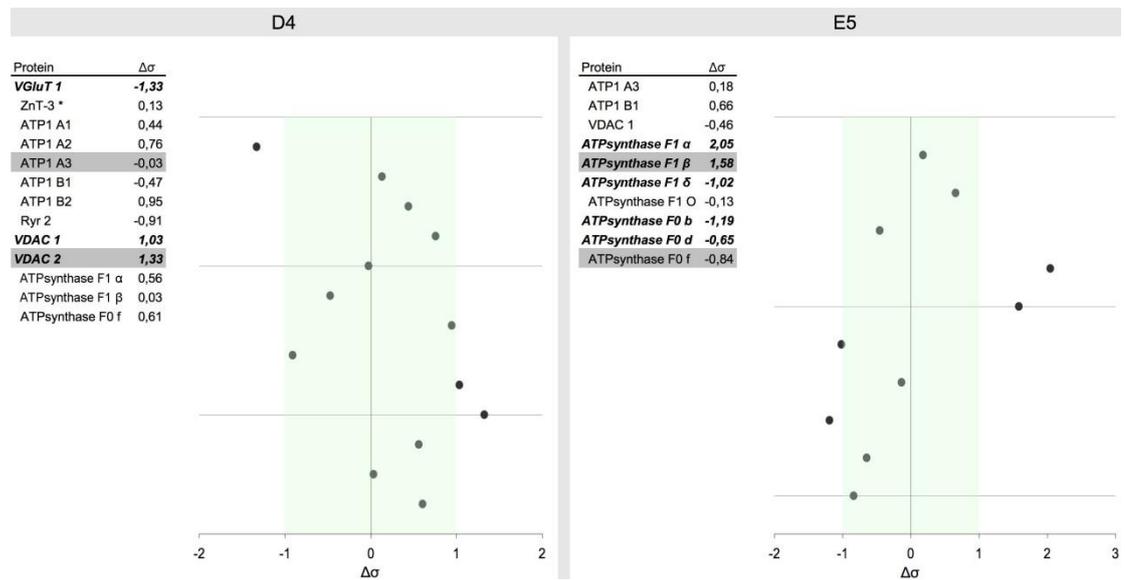
SV-Exozytose:



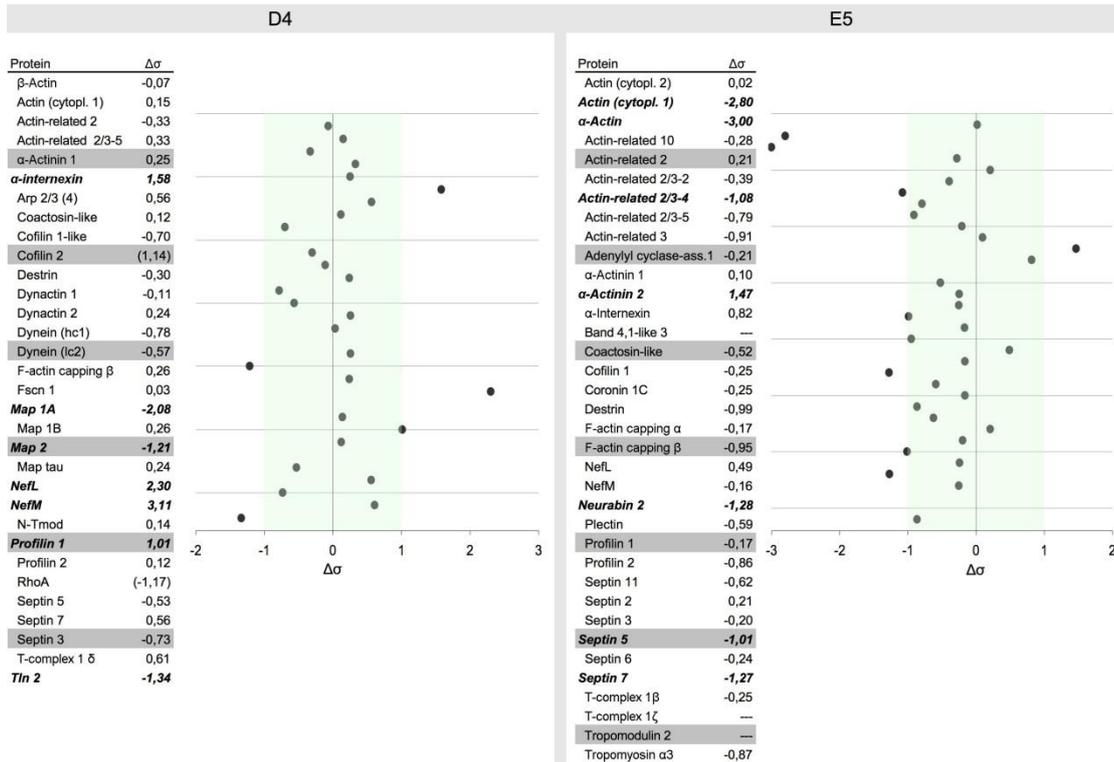
## V-ATPasen:



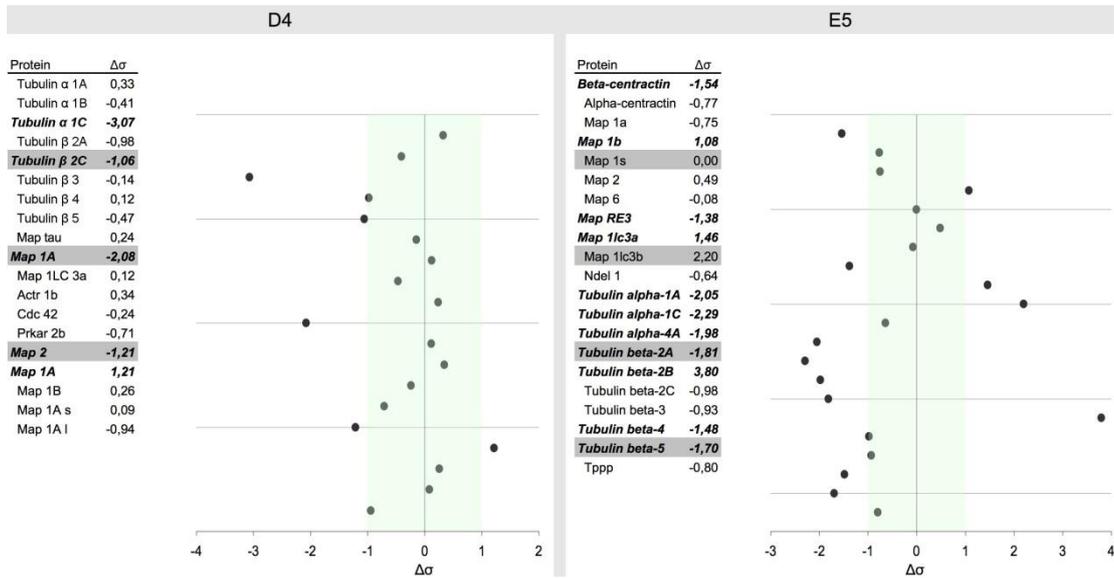
## Transport- und Kanalproteine:



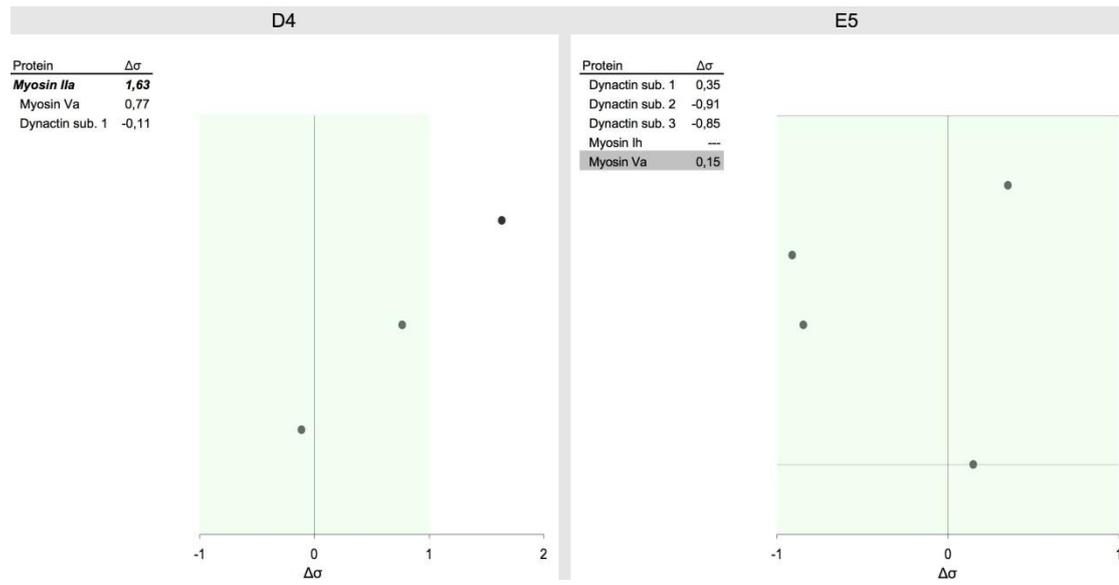
(Neuro-)Filamentproteine:



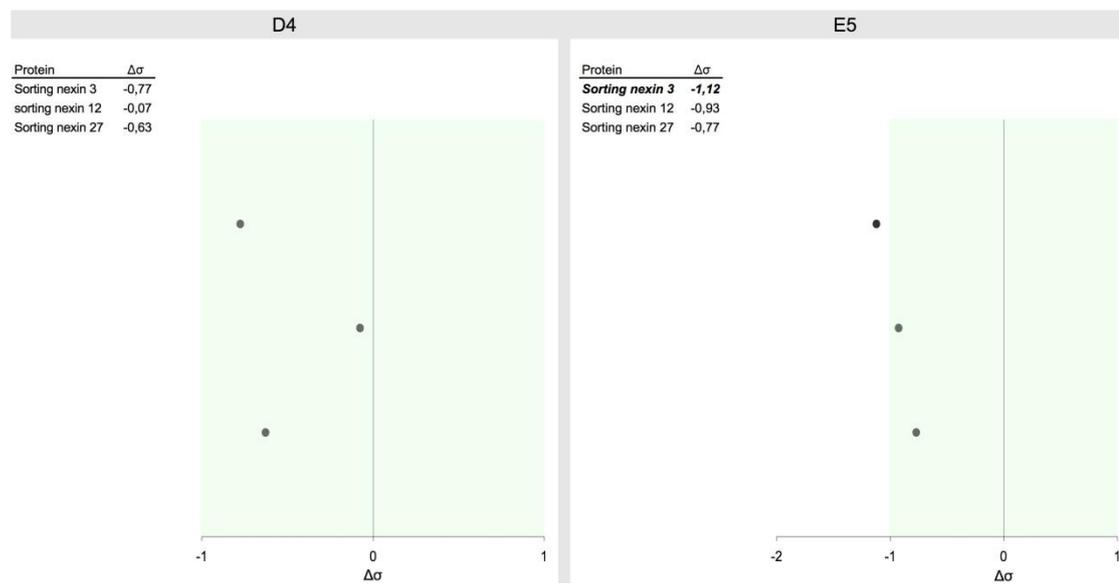
Mikrotubuli-Proteine:



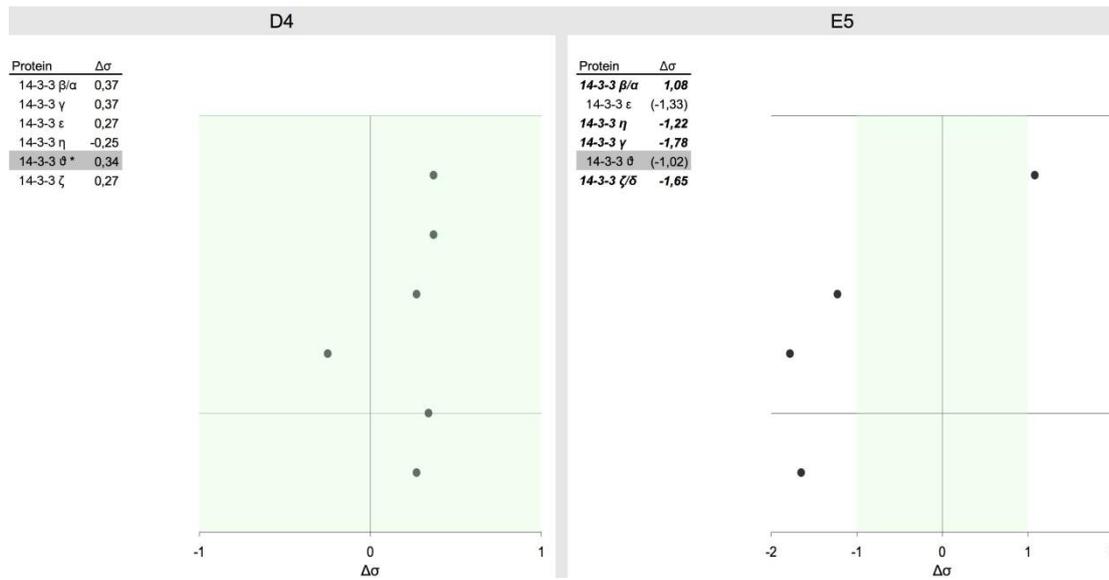
Motorproteine:



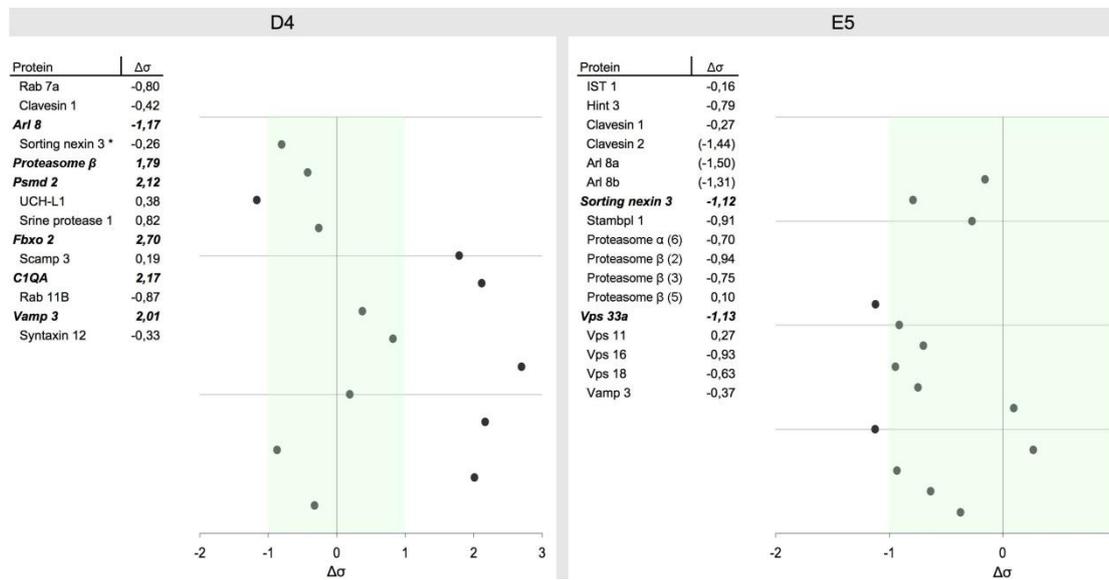
Sorting Nexin Proteine:



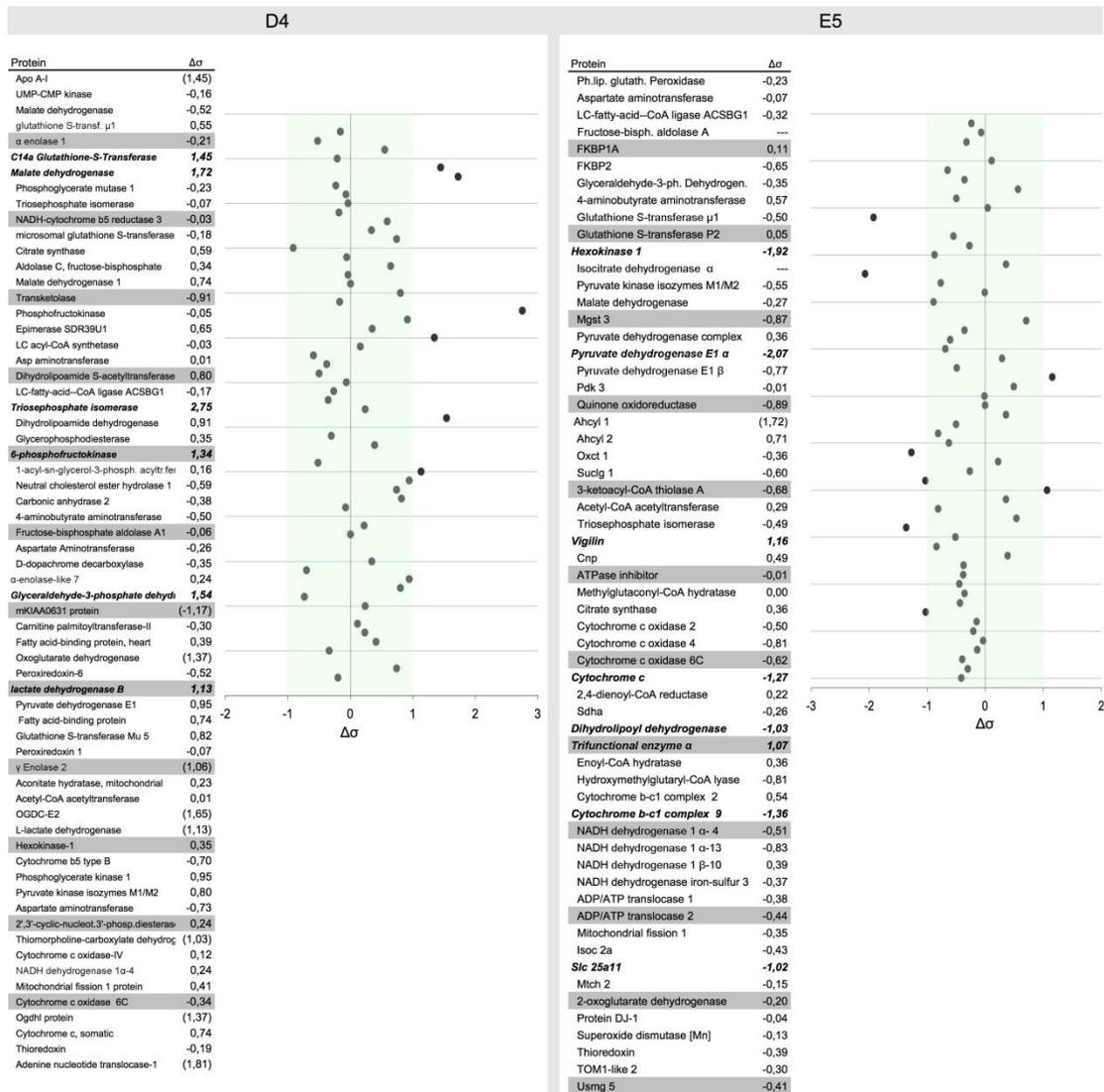
14-3-3-Proteine:



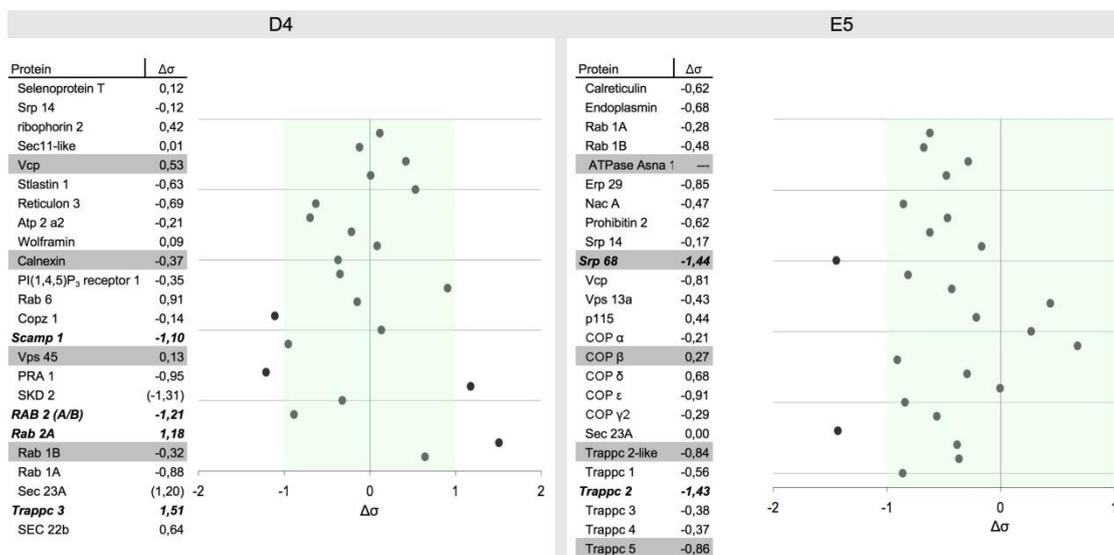
Degradative Proteine:



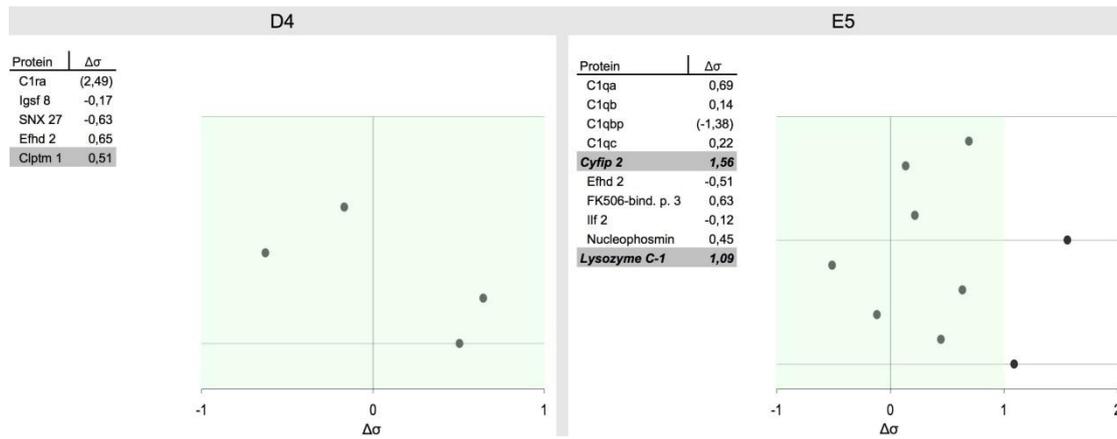
## Metabolismusproteine und mitochondriale Proteine:



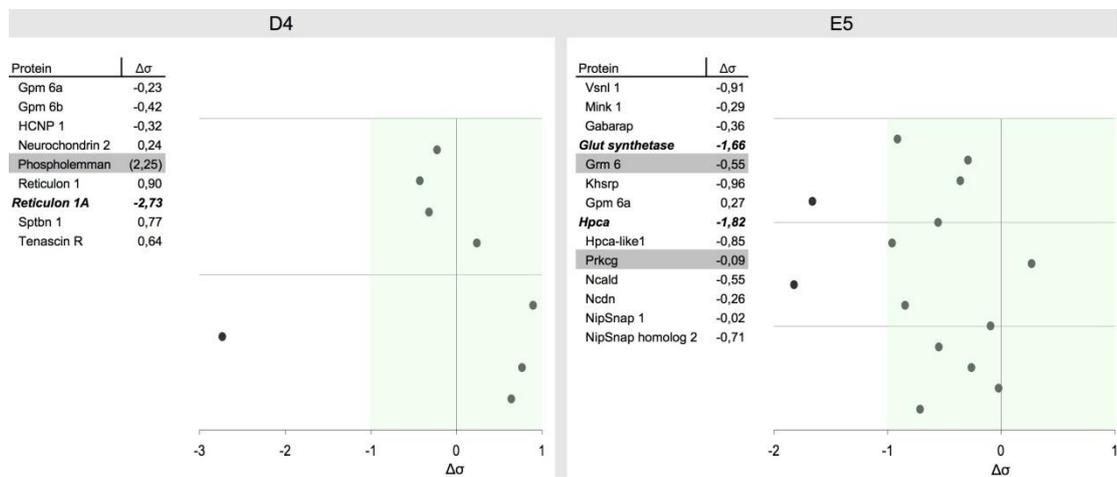
## ER- und Golgi-Proteine:



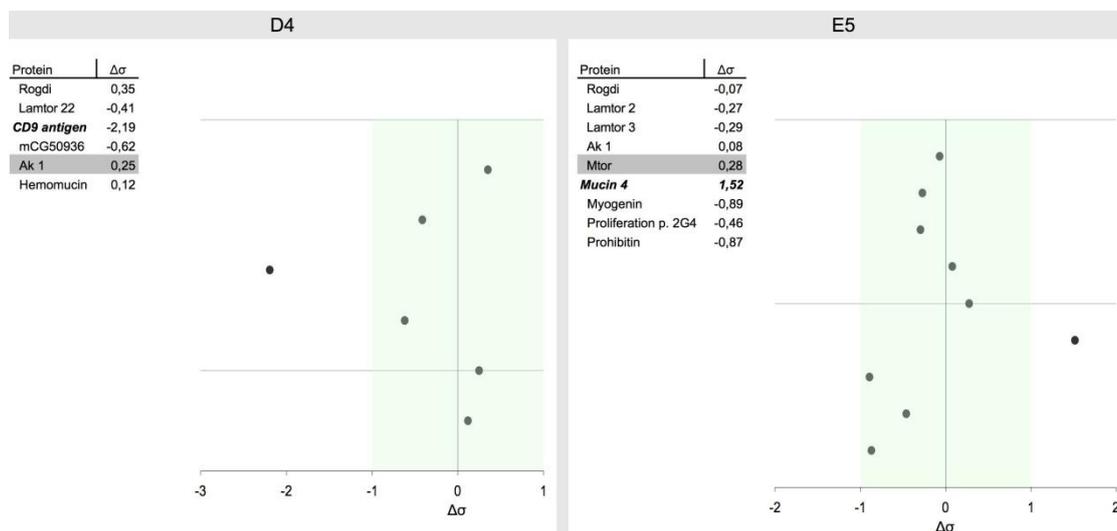
Immunproteine:



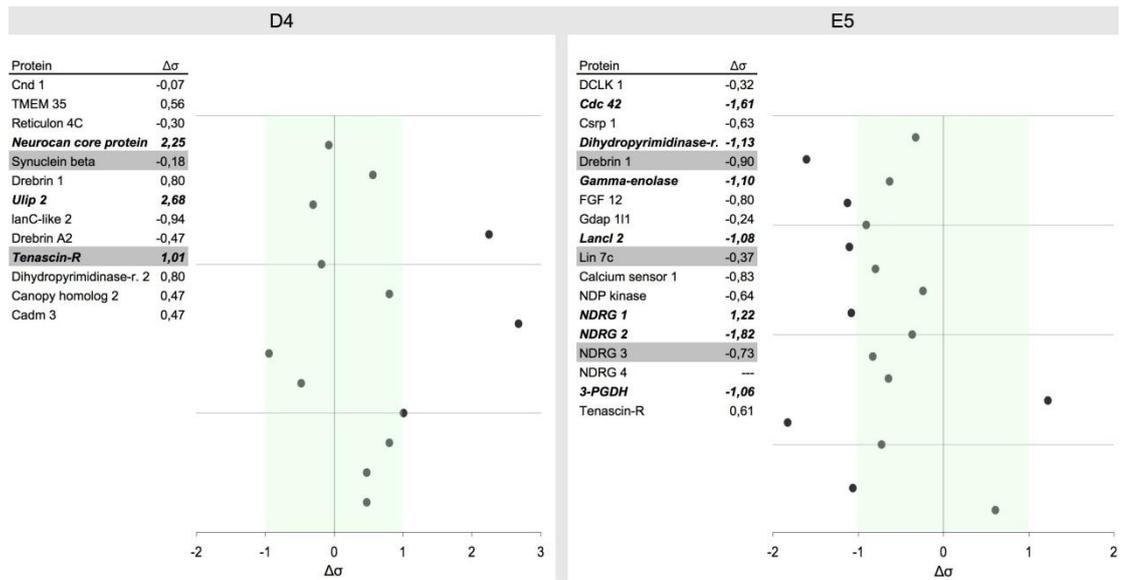
Sonstige neuronale Proteine:



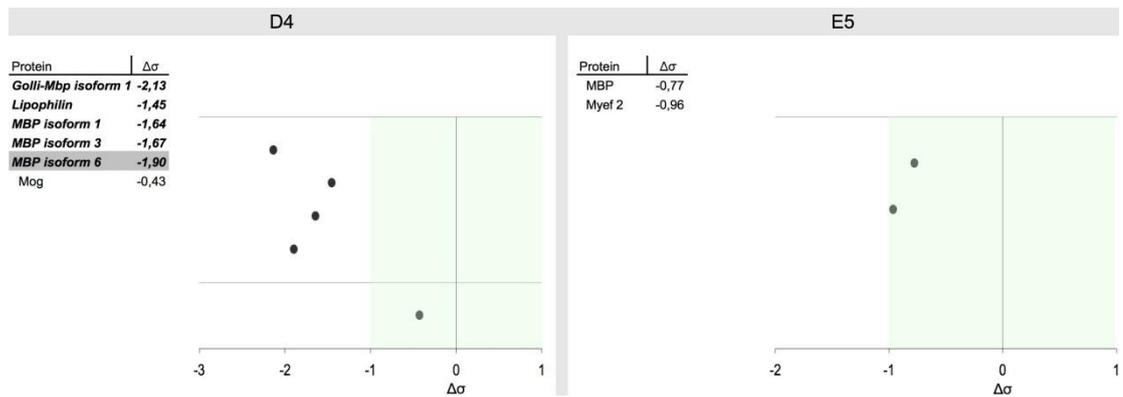
Zellwachstumsproteine:



## Neuronale Wachstumsproteine:



## Myelinproteine:



Transkription-, translatorische- und ribosomale Proteine:

