

**Untersuchungen zur Beeinflussung der Interaktion von AP 2 mit
cytoplasmatischen Rezeptordomänen durch die Phosphorylierung
und Dephosphorylierung von AP 2**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch - Naturwissenschaftlichen Fakultäten

der Georg - August - Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Anja Fingerhut

aus Schweinfurt

Göttingen 1999

D 7

Referent: Prof. Dr. Kurt von Figura

Korreferent: Prof. Dr. Gerhard Gottschalk

Tag der mündlichen Prüfung: 26.1.2000

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1 Vesikulärer Proteintransport über Clathrin beschichtete Vesikel | 1 |
| 1.1.1 Clathrin | 1 |
| 1.1.2 Adaptor - Komplexe | 2 |
| 1.2 Andere beschichtete Vesikel | 4 |
| 1.3 Interaktion von Adaptor - Komplexen mit Sortierungssignalen | 5 |
| 1.3.1 Tyrosin - haltige Signale | 5 |
| 1.3.2 Leucin - haltige Signale | 6 |
| 1.4 Andere Sortierungssignale | 7 |
| 1.5 Interaktion von AP 1 und AP 2 mit dem MPR 46 - Rezeptor | 7 |
| 1.6 Rezeptorvermittelte Endozytose | 8 |
| 1.6.1 Rekrutierung von AP 2 | 8 |
| 1.6.2 Rekrutierung von Clathrin und Bildung von coated pits | 9 |
| 1.6.3 Einschnürung der coated pits | 9 |
| 1.6.4 Abschnürung von CCV's | 10 |
| 1.7 Regulation der CCV - Bildung | 10 |
| 1.7.1 Regulation der Rekrutierung von AP 1 | 10 |
| 1.7.2 Regulation der Rekrutierung von AP 2 | 11 |
| 1.7.3 weitere Regulationsmechanismen | 12 |
| 2. Problemstellung | 13 |
| 3. Material und Methoden | 14 |
| 3.1 Material | 14 |
| 3.1.1 Geräte | 14 |
| 3.1.2 Säulen für FPLC und SMART | 15 |
| 3.1.3 Gebrauchsmaterial | 15 |

3.1.4 Chemikalien

16

| | |
|---------------------------------|----|
| 3.1.5 Molekulargewichtstandards | 18 |
| 3.1.6 Proteinaseinhibitoren | 19 |
| 3.1.7 Phosphataseinhibitoren | 19 |
| 3.1.8 Zelllinien | 19 |
| 3.1.9 Antikörper | 20 |
| 3.1.9.1 Primärantikörper | 20 |
| 3.1.9.2 Sekundärantikörper | 20 |
| 3.1.10 EDV | 21 |
| 3.1.10.1 Hardware | 21 |
| 3.1.10.2 Software | 21 |

3.2 Methoden

22

| | |
|---|----|
| 3.2.1 Zellbiologische Methoden | 22 |
| 3.2.1.1 Kultivieren von Zellen | 22 |
| 3.2.1.2 Trypsinieren von Zellen | 22 |
| 3.2.1.3 Einfrieren von Zellen | 22 |
| 3.2.1.4 Revitalisierung von Zellen | 23 |
| 3.2.2 Biochemische Methoden | 23 |
| 3.2.2.1 Fällung von Proteinen aus wässriger Lösung | 23 |
| 3.2.2.1.1 TCA - Fällung | 23 |
| 3.2.2.1.2 Wessel - Flüge - Fällung | 23 |
| 3.2.2.2 Proteinbestimmung nach Bradford | 24 |
| 3.2.2.3 Diskontinuierliche SDS - Polyacrylamid - Gelelektrophorese (SDS - Page) | 24 |
| 3.2.2.4 Isoelektrische Fokussierung (IEF) | 26 |
| 3.2.2.5 SDS - Harnstoff - Gelelektrophorese | 27 |
| 3.2.2.6 Coomassiefärbung von Polyacrylamidgelen | 29 |
| 3.2.2.7 Westernblot | 29 |
| 3.2.2.7.1 Elektrophoretischer Proteintransfer von SDS - Gelen durch das Naßblotverfahren | 29 |
| 3.2.2.7.2 Elektrophoretischer proteintransfer von IEF - Gelen durch das Semi- | 30 |

| | |
|--|-----------|
| Dry-Verfahren | |
| 3.2.2.7.3 Immunodetektion | 31 |
| 3.2.2.8 Präparation von AP 1 und AP 2 aus Schweinehirn | 32 |
| 3.2.2.8.1 Präparation von Clathrin beschichteten Vesikeln | 32 |
| 3.2.2.8.2 Ablösen von Clathrin und Adaptoren | 33 |
| 3.2.2.8.3 Gelfiltration über Superose 6 Säule | 34 |
| 3.2.2.8.4 Hydroxyapatit - Chromatographie | 34 |
| 3.2.2.9 MDBK - Zellfraktionierung | 36 |
| 3.2.2.9.1 Extraktion der membranen mit 0,5 M Tris | 36 |
| 3.2.2.9.2 Gelfiltration über eine Superdex 200 Säule | 36 |
| 3.2.2.10 Präparation von NRK - Membranen | 37 |
| 3.2.2.11 Dephosphorylierung von Adaptor - Komplexen mit alkalischer Phosphatase | 37 |
| 3.2.2.12 Inkubation von gereinigtem AP 2 mit ATP | 38 |
| 3.2.2.13 Rekrutierung von gereinigtem AP 2 an NRK - Membranen | 38 |
| 3.2.2.14 <i>in vitro</i> Phosphorylierung von AP 2 mit $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP | 39 |
| 3.2.3 Messung von Interaktionen zwischen Adaptorproteinen und Peptiden mit einem Biosensor | 39 |
| 3.2.3.1 Synthese von Peptiden | 40 |
| 3.2.3.2 Kopplung von Peptiden an einen Sensorchip | 40 |
| 3.2.3.2.2 Kopplung über Aminogruppen | 40 |
| 3.2.3.2.3 Kopplung über Streptavidin - Biotin | 41 |
| 3.2.3.2.2.1 Biotinylierung von Peptiden | 42 |
| 3.2.3.2.2.2 Reinigung von Peptiden über eine C 18 - Cartridge | 42 |
| 3.2.3.2.2.3 Kopplung des biotinylierten Peptids | 43 |
| 3.2.3.2.3 Messung der Interaktion | 43 |
| 3.2.3.2.4 Auswertung der gemessenen Interaktion | 44 |
| 4. Ergebnisse | 46 |
| 4.1 Präparation von AP 1 und AP 2 | 46 |

| | |
|---|----|
| 4.2 Einfluß der Adaptordephosphorylierung auf ihre Interaktion mit den cytoplasmatischen Tail des MPR 46 - Rezeptors | 51 |
| 4.2.1 Kopplung der MPR 46 - Peptide 49 - 67 und 2 - 16 an den Sensorchip | 52 |
| 4.2.2 Einfluß von alkalischer Phosphatase auf die Interaktion von AP 1 und AP 2 mit dem MPR 46 - Peptid 49 - 67 | 54 |
| 4.2.3 Dosisabhängigkeit der AP 2 - Dephosphorylierung | 58 |
| 4.2.4 Inhibierung der Dephosphorylierung von AP 2 durch verschiedene Inhibitoren | 59 |
| 4.2.5 Untersuchungen zum Phosphorylierungszustand aufgereinigter AP 2 - Komplexe | 61 |
| 4.3 Interaktionsanalyse von AP 2 aus MDBK-Zellen mit dem MPR 46 Peptid 2 - 16 | 63 |
| 4.3.1 Präparation von Cytosol und Membranen aus MDBK - Zellen | 63 |
| 4.3.2 Untersuchungen zum Phosphorylierungszustand von AP 2 aus Cytosol und Membran - Trisextrakt | 64 |
| 4.3.3 Messung der Interaktion von Cytosol - und Membranfraktion mit dem MPR 46 Peptid 2 - 16 | 65 |
| 4.4 Rekrutierung von AP 2 an NRK - Membranen | 67 |
| 4.4.1 Rekrutierung von dephosphoryliertem AP 2 | 67 |
| 4.4.2 Rekrutierung von phosphoryliertem AP 2 | 69 |
| 4.4.3 <i>in vitro</i> Phosphorylierung von AP 2 mit $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP | 70 |
| 5. Diskussion | 73 |
| 5.1 Interaktionsanalysen von AP 1 und AP 2 mit MPR 46 - Rezeptor Tail - Peptiden | 74 |
| 5.1.1 Dephosphorylierung von AP 1 | 75 |
| 5.1.2 Dephosphorylierung von AP 2 | 75 |
| 5.1.3 Isoelektrische Fokussierung | 76 |
| 5.2 <i>in vitro</i> Phosphorylierung | 77 |
| 5.3 Interaktionsanalyse von AP 2 aus Cytosol - und Membranfraktion mit dem MPR 46 Rezeptor Tail - Peptid 2 - 16 | 78 |

| | |
|--|----|
| 5.3.1 Isoelektrische Fokussierung | 78 |
| 5.3.2 Interaktionsanalyse mit dem MPR 46 Peptid 2 - 16 | 78 |
| 5.4 Rekrutierungsexperimente | 79 |
| 5.5 Schlußfolgerung | 80 |
| 5.6 Ausblick | 81 |
| | |
| 6. Zusammenfassung | 83 |
| | |
| 7. Literaturverzeichnis | 84 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------------|--|
| Abb. | Abbildung |
| ADP | Adenosindiphosphat |
| alk.Phosphatase | alkalische Phosphatase |
| AP1 | Adaptorkomplex 1 |
| AP2 | Adaptorkomplex 2 |
| AP3 | Adaptorkomplex 3 |
| AP4 | Adaptorkomplex 4 |
| APS | Ammoniumperoxodisulfat |
| ARF1 | ADP - Ribosylierungsfaktor 1 |
| ARF6 | ADP - Ribosylierungsfaktor 6 |
| ATCC | <u>A</u> merican <u>t</u> ype <u>c</u> ulture <u>c</u> ollection |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| COP | <u>c</u> oat of <u>o</u> ther <u>P</u> rotein |
| DMEM | <u>D</u> ulbecco's <u>M</u> odified <u>E</u> agle <u>M</u> edium |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DTT | Dithiothreitol |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| et. al. | Et alii (lat.: und andere) |
| FKS | fötales Kälberserum |
| Hepes | N-2-Hydroxyethylenpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure |
| HRP | Meerrettich - Peroxidase |
| kDa | Kilo Dalton |
| MES | 2 - [N-morpholino] ethanschwefelsäure |
| min | Minute |
| MPR | Mannose 6 - phosphat - Rezeptor |
| OD | optische Dichte |
| p. a. | pro analysi (lat.: zur Analyse) |
| PBS | Phosphat - gepufferte Kochsalzlösung |
| Pen / Strep | Penicillin / Streptomycin |

| | |
|---------|---------------------------------|
| PMSF | Phenylmethylsulfonylfluorid |
| PNS | Post Nukleärer Überstand |
| rpm | Umdrehung pro Minute |
| RT | Raumtemperatur |
| RU | resonance units |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| sek (s) | Sekunde |
| Tab. | Tabelle |
| TCA | Trichloressigsäure |
| TGN | Trans - Golgi Netzwerk |
| Tris | Tris(hydroxymethyl) aminomethan |
| U | Unit |
| w / v | Gewicht zu Volumen |
| v / v | Volumen zu Volumen |
| xg | - fache Erdbeschleunigung |

1. Einleitung

1.1 Vesikulärer Proteintransport über Clathrin beschichtete Vesikel

Der Proteintransport zwischen Zellorganellen erfolgt durch Transportvesikel, die sich von einer Donormembran abschnüren und mit einer Akzeptormembran fusionieren.

Die am längsten bekannten und am besten charakterisierten Vesikel sind die Clathrin beschichteten Vesikel (CCV). Die Hülle dieser Vesikel besteht aus Clathrin, welches das Gerüst des Vesikels bildet und aus Adaptorproteinen, die bestimmen welche Membranproteine in ein Vesikel gelangen, indem sie mit Sortierungssignalen in den cytoplasmatischen Domänen ausgewählter Transmembranproteine interagieren.

1.1.1 Clathrin

Clathrinmoleküle sind in der Lage durch einen „Selbstassemblierungsprozeß“ ein polyedrisches Gerüst zu bilden. Jedes einzelne Clathrinmolekül besteht aus 3 schweren Ketten mit einem Molekulargewicht von 192 kDa sowie 3 leichten Ketten von etwa 30 kDa (Ungewickel und Branton 1981, Kirchhausen und Harrison 1981). Diese Struktur-einheit wird als Triskelion bezeichnet und bildet die „Assemblierungseinheit“

(Abb.1.1). Da es zwei verschiedene leichte Ketten gibt (LCa und LCb) sind diese Triskelien strukturell heterogen, da die Verteilung der beiden leichten Ketten zufällig ist (Kirchhausen et al. 1983).

Unter unphysiologischen Bedingungen in schwach sauren, Ca^{2+} enthaltenden Puffern geringer Ionenstärke bilden Triskelien *in vitro* spontan heterogene, geschlossene, polyedrische Strukturen, die als „Clathrin - cages“ bezeichnet werden. In Anwesenheit von Adaptor - Komplexen polymerisiert Clathrin *in vitro* unter physiologischen Bedingungen zu einer homologen Population von „Clathrin - cages“, die aus Hexagonen und Pentagonen bestehen (Pearse 1975, Kirchhausen and Harrison 1981).

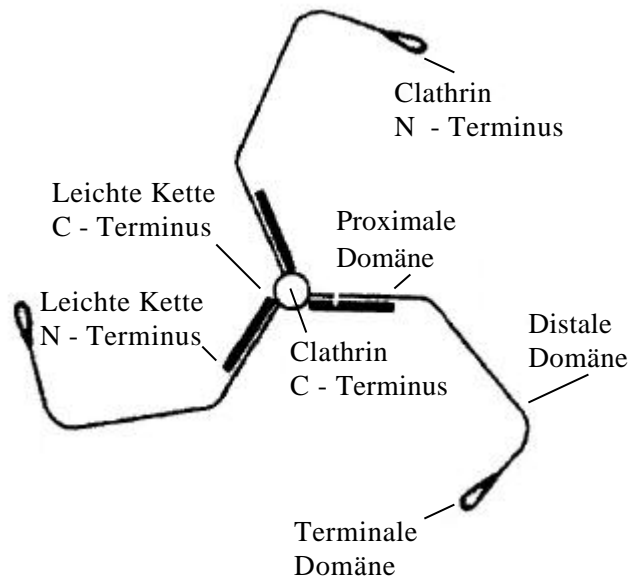


Abb. 1.1 Struktur eines Clathrin - Triskelion

1.1.2 Adaptor - Komplexe

Die Adaptor - Komplexe AP 1 und AP 2 binden einerseits an Clathrin und fördern dessen Polymerisation, andererseits interagieren sie mit den cytoplasmatischen Domänen bestimmter Transmembranproteine und sorgen auf diese Weise für die Ankonzentrierung dieser Proteine in den CCV's.

AP 1 ist beteiligt an der Bildung von CCV's am Trans - Golgi Netzwerk (TGN) und vermittelt dort die Sortierung von Proteinen zur Plasmamembran und / oder den Endosomen. AP 2 dagegen ist beteiligt an der Bildung von CCV's an der Plasma-membran und ermöglicht so durch rezeptorvermittelte Endozytose die Aufnahme von Membranrezeptoren in die Zelle (Seaman et al. 1993, Reaves und Banting 1994).

Neben diesen beiden Adaptor - Komplexen sind noch zwei weitere Adaptorproteine AP 3 und AP 4 bekannt. AP 3 ist ubiquitär exprimiert und wurde sowohl am TGN als auch an

Endosomen lokalisiert (Hirst and Robinson 1998, Odorizzi et al.1998). Dem Komplex wird eine Beteiligung am Transport von Proteinen zu den Lysosomen und Lysosomverwandten Organellen wie Melanosomen und Pigmentgranula (Ooi et al. 1997, Simpson et al. 1997) sowie der Hefevakuole zugeschrieben (Cowles et al.1997). Eine mögliche Assoziation von AP 3 mit Clathrin ist nach wie vor umstritten. In vitro Daten zeigen zwar, daß Clathrin an die β - hingee Region von AP 3 binden kann (Dell' Angelica et al. 1998), jedoch ist in CCV - Präparationen kein AP 3 enthalten (Simpson et al. 1996). Desweiteren haben genetische Studien bei Hefe gezeigt, daß AP 3 und Clathrin an verschiedenen, nicht überlappenden Transportwegen beteiligt sind (Panek et al. 1997, Vowels and Payne 1998).

Über den vierten Adaptor - Komplex AP 4 ist noch sehr wenig bekannt. AP 4 ist ebenfalls ubiquitär exprimiert, wenn auch in relativ geringem Ausmaß. Durch Immunogold - Elektronenmikroskopie wurde gezeigt, daß AP 4 im Bereich des TGN lokalisiert ist und offenbar nicht mit Clathrin assoziiert ist (Hirst et al. 1999, Dell' Angelica et al. 1999a).

Die Struktur der 4 Adaptor - Komplexe ist recht ähnlich. Alle 4 Adaptorproteine bilden einen heterotetrameren Komplex bestehend aus zwei großen Untereinheiten, einer mittleren und einer kleinen Untereinheit.

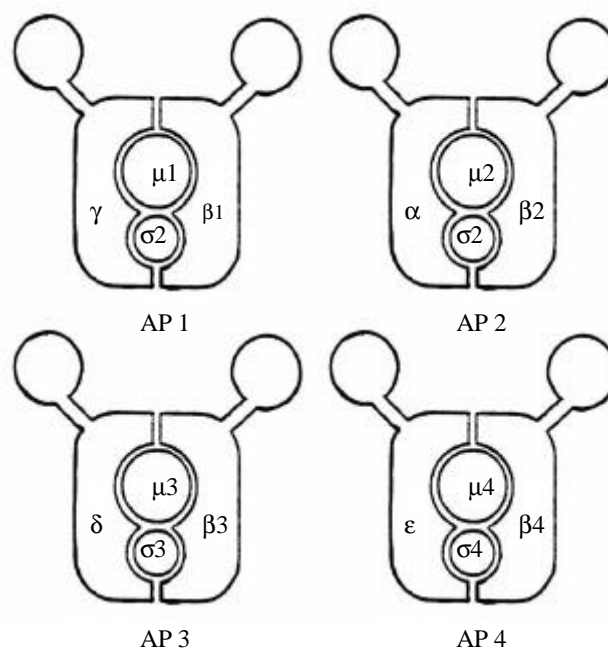


Abb. 1.2 Struktur der 4 Adaptorkomplexe

| AP 1 | AP 2 | AP 3 | AP 4 |
|---------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------|----------------------|
| $\beta 1$ - Adaptin: ≈ 100 kD | $\beta 2$ - Adaptin: ≈ 100 kD | $\beta 3$ - Adaptin: 140 kD | $\beta 4$ - Adaptin |
| γ - Adaptin: ≈ 100 kD | α - Adaptin: ≈ 100 kD | δ - Adaptin: 160 kD | ϵ - Adaptin |
| $\mu 1$: 47 kD | $\mu 2$: 50 kD | $\mu 3$: 47 kD | $\mu 4$ |
| $\sigma 1$: 19 kD | $\sigma 2$: 17 kD | $\sigma 3$: 22 kD | $\sigma 4$ |

Tab.1.1 Zusammensetzung der einzelnen Adaptor-Komplexe

Die einzelnen Untereinheiten erfüllen verschiedene Funktionen. Die β - Untereinheiten von AP 1 und AP 2 binden im Bereich der „hinge“ - Region an Clathrin (Ahle und Ungewickel 1989, Gallusser und Kirchhausen 1993), während die γ - bzw. α - Unter-einheit die selektive Assoziation dieser Adaptorkomplexe mit der TGN - Membran bzw. der Plasmamembran vermitteln (Robinson 1993) und ebenfalls an Clathrin binden können (Prasad und Keen 1991). Untersuchungen mit dem Yeast - Two - Hybridsystem zeigten, daß die μ -Kette aller 4 Adaptorkomplexe in der Lage sind an Tyrosinmotive in den cytoplasmatischen Domänen bestimmter Transmembranproteine zu binden (Ohno et al. 1995, Ohno et al.1996, Boll et al.1996, Dell'Angelica et al. 1999). Die Funktion der σ - Untereinheit ist dagegen noch weitgehend unbekannt.

1.2 Andere beschichtete Vesikel

Neben den Clathrin beschichteten Vesikel sind noch zwei weitere Arten von beschichteten Vesikeln, die in früheren Stationen des sekretorischen Transportweges agieren bekannt. Zum einen COP I beschichtete Vesikel, die den retrograden Transport vom Golgi Apparat zum Endoplasmatischen Retikulum (ER) vermitteln (Übersichts -

artikel: Cosson und Letourneur 1997), zum anderen COP II beschichtete Vesikel , die am anterograden Transport vom ER zum Golgi Apparat und zwischen den einzelnen Golgi - Zisternen beteiligt sind (Übersichtsartikel: Kühn und Schekman 1997).

1.3 Interaktion von Adaptor - Komplexen mit Sortierungssignalen

Die Adaptorproteine sind in der Lage an bestimmte Sortierungssignale in den cytoplasmatischen Domänen von Membranproteinen zu binden. Diese Sortierungssignale bestehen aus einer genau definierten Aminosäuresequenz.

1.3.1 Tyrosin - haltige Signale

Tyrosin - Motive bestehen aus 4 bis 6 Aminosäuren und weisen als charakteristisches Merkmal eine essentiellen Tyrosinrest auf. Bis jetzt sind zwei verschiedene Typen von Tyrosin - Motiven NPXY und YXXØ bekannt, wobei x eine beliebige Aminosäure darstellt und Ø eine Aminosäure mit einer großen, hydrophoben Seitenkette, die sich in der 4. Position befindet (Leucin, Isoleucin, Phenylalanin, Methionin oder Valin). Diese Tyrosin - Motive vermitteln den Transport zu einer Vielzahl von Kompartimenten, wie zum Beispiel zu den Endosomen, den Lysosomen, dem TGN oder zur basolateralen Membran in polarisierten Zellen. An der Plasmamembran fungieren Tyrosin - Motive als Signal für die rezeptorvermittelte Endozytose. Der genaue Transportweg wird durch die jeweilige Aminosäuresequenz innerhalb des Tyrosin - Motivs sowie durch den Abstand des Tyrosinrestes zur Transmembran Domäne bzw. zum C - Terminus der cytoplasmatischen Domäne festgelegt.

| | |
|----------------------|------------------------------|
| Lamp 1 | <u>Y</u> GT <u>I</u> |
| LAP | PG <u>Y</u> R <u>H</u> V |
| Transferrin Rezeptor | <u>Y</u> TR <u>F</u> |
| LDL Rezeptor | <u>N</u> P <u>V</u> <u>Y</u> |

Tab. 1.2 Beispiele verschiedener Tyrosin - haltiger Motive**1.3.2 Leucin - haltige Signale**

Diese Motive bestehen entweder aus zwei aufeinanderfolgenden Leucinresten oder aus einem essentiellen Leucinrest in der ersten Position und einer zweiten, strukturell ähnlichen Aminosäure, wie zum Beispiel Isoleucin, Methionin oder Valin in der zweiten Position (Sandoval und Bakke 1994). Leucin - haltige Motive vermitteln wie auch die zuvor beschriebenen Tyrosin - haltigen Sortierungssignale die Sortierung zu den verschiedensten intrazellulären Kompartimenten, unter anderem die rezeptorvermittelte Endozytose.

Bei einigen Leucin - haltigen Sortierungssignalen erwiesen sich noch weitere flankierende Aminosäuren als wichtig für die Sortierungsfunktion. So spielen saure Reste in der Position -4 und / oder -5 relativ zum essentiellen Leucinrest, wie zum Beispiel für Limp II gezeigt, eine wichtige Rolle bei der Sortierung zum Lysosom (Sandoval et al. 1994).

| | |
|---------------|--|
| Limp II | <u>D</u> ER <u>A</u> PL <u>I</u> RT |
| Glut 4 | RRTP <u>S</u> LL <u>E</u> Q |
| inv. Kette | <u>D</u> D <u>Q</u> R <u>D</u> LL <u>S</u> N |
| CD3- γ | DK <u>Q</u> T <u>L</u> L |

Tab. 1.3 Beispiele verschiedener Leucin - haltiger Motive

Die Adaptorproteine binden an Tyrosin - haltige - Motive und an Leucin - haltige Motive (Heilker et al. 1996, Dell'Angelica et al. 1997b, Höning et al. 1998).

Durch Untersuchungen mit dem Yeast Two Hybrid System konnte eine Interaktion der μ - Untereinheiten von AP1, AP 2 und AP 3 mit Tyrosin - , jedoch nicht mit Leucin - haltigen -

Motiven gezeigt werden (Ohno et al. 1995, Ohno et al. 1996, Boll et al. 1996, Dell' Angelica et al. 1998). Jedoch konnte durch Koimmunopräzipitation eine Interaktion von μ 1 und μ 2 mit Leucin - haltigen Motiven gezeigt (Rodionov und Bakke 1998) werden. Desweiteren konnte für AP 1 durch cross - linking Experimente eine Interaktion von Leucin - haltigen Motiven mit der β 1 - Untereinheit nachgewiesen werden (Rapoport et al. 1998). Einige Membranproteine besitzen in ihren cytoplasmatischen Domänen verschiedene Sortierungssignale, die je nach Kompartiment und „ Sortierungsweg “ von unterschiedlichen Adaptorproteinen erkannt werden. So binden sowohl AP 1 als auch AP 2 an den MPR 46 - Rezeptor (siehe 1.5) während für Lamp I sowohl eine Interaktion mit AP 1 und AP 2 (Höning et al. 1996) als auch mit AP 3 nachgewiesen wurde (Le Borgne et al. 1998).

1.4 Andere Sortierungssignale

Neben den zuvor beschriebenen existieren noch weitere Sortierungssignale, die nicht der Klasse der Tyrosin - oder Leucin - haltigen Motive zugeordnet werden können. So enthält der MPR 46 - Rezeptor in seiner cytoplasmatischen Domäne 3 verschiedene Internalisierungssignale. Neben einem Tyrosin - Motiv und einem C - terminalen Leucin - haltigen Motiv wurde noch eine weitere Aminosäuresequenz (Aminosäuren 7 bis 13) mit einem essentiellen Phenylalanin in Position 13 als Internalisierungssignal identifiziert. Durch Deletionsstudien konnte gezeigt werden, daß eine Deletion von mindestens 2 der insgesamt 3 Signale die Internalisierungsrate des Rezeptors auf unter 50 % senkt. Die Deletion von nur einem Motiv hat dagegen nur einen geringen Effekt auf die Internalisierungseffizienz (Denzer et al. 1997).

Neben diesen 3 Internalisierungssignalen konnten noch weitere kritische Aminosäurereste identifiziert werden. So ist die Phosphorylierung eines Serinrestes in Position 57 eine Voraussetzung für den Transport des Rezeptors zur Plasmamembran (Breuer et al. 1997). Desweiteren beinhalten die Aminosäuren Phenylalanin 18 und Tryptophan 19 ein lysosomales Vermeidungssignal, da eine Deletion dieser Aminosäuren zu einem Fehltransport des Rezeptors ins Lysosom mit anschließender Degradation führt. Zusätzlich sind die Aminosäuren 34 bis 39 mit einer essentiellen Palmitoylierung des Cysteins 34 wichtig für die Erkennung dieses Vermeidungssignals (Rohrer et al.).

1.5 Interaktion von AP 1 und AP 2 mit dem MPR 46 - Rezeptor

In verschiedenen Studien wurde gezeigt, daß sowohl AP 1 als auch AP 2 mit der cytoplasmatischen Domäne des MPR 46 - Rezeptors interagieren können (Sosa et al. 1996). Die Analyse von Interaktionen zwischen AP 1 bzw. AP 2 mit verschiedenen MPR 46 - Rezeptor Tail - Peptiden mit einem Biosensor konnte zeigen, daß drei Sequenzbereiche AP 1 und AP 2 binden (Höning et al. 1997). Sowohl AP 1 als auch AP 2 sind in der Lage mit einem Peptid, das die Aminosäuren 49 bis 67 umfaßt, zu interagieren. An das Peptid 2 - 16 bindet jedoch nur AP 2 und an Peptid 27 - 43 nur AP 1. Während das Peptid 49 - 67 das Leucin - haltige Motiv enthält, ist im Peptid 2 - 16 das Internalisierungssignal mit dem kritischen Phenylalaninrest enthalten. In Peptid 27 - 43 ist das zuvor beschriebene lysosomale Vermeidungssignal lokalisiert. Jedoch enthält keines der 3 Peptide das Tyrosinmotiv.

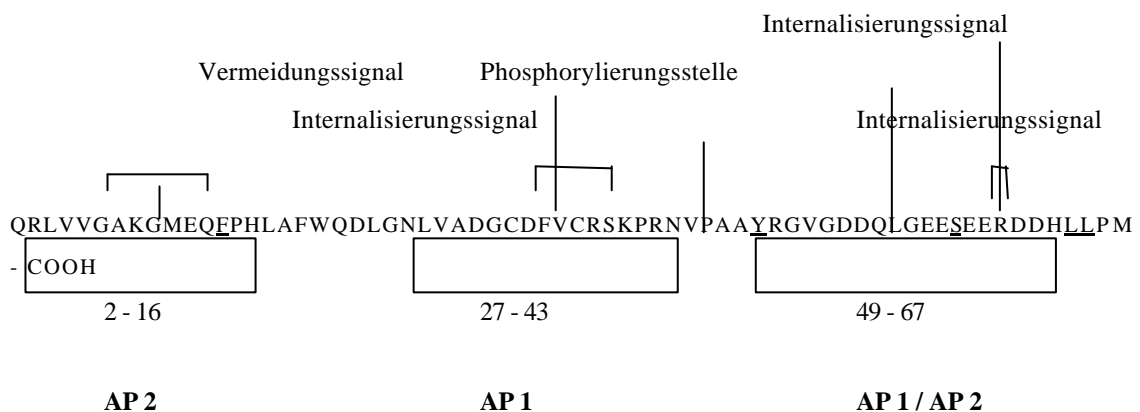


Abb.1.3 Aminosäuresequenz der cytoplasmatischen Domäne des MPR 46 - Rezeptors

1.6 Rezeptorvermittelte Endozytose

Durch die rezeptorvermittelte Endozytose können Membranproteine, wie zum Beispiel Rezeptoren und an diese gebundene Liganden in die Zelle aufgenommen werden, um beispielsweise über das endosomale Kompartiment zu den Lysosomen transportiert zu werden.

Die Endozytose wird durch den Zyklus der Assemblierung und Deassemblierung von CCV's angetrieben.

1.6.1 Rekrutierung von AP 2

Die Bildung von CCV's an der Plasmamembran wird durch die Rekrutierung von AP 2 an hochaffine, sättigbare und proteasesensitive Bindungsstellen initiiert (Peeler et al. 1993, Mahaffey et al. 1990). Obwohl AP 2 direkt mit Sortierungssignalen in den cyto-plasmatischen Domänen von Plasmamembran lokalisierten Rezeptoren interagieren kann, wird die Existenz eines spezifischen Bindungsproteins für AP 2 an der Plasmamembran angenommen. Neuere Untersuchungen deuten darauf hin, daß in neuronalen Zellen Synaptotagmin, einem häufigen Protein in der synaptischen Plasmamembran und in synaptischen Vesikeln als Bindungsprotein fungieren kann (Zhang et al. 1996, Hauke et al. 1999).

1.6.2 Rekrutierung von Clathrin und Bildung von „ coated pits²

Nach der Rekrutierung von AP 2 an die Plasmamembran und einer eventuellen Vernetzung von AP 2 - Komplexen durch Selbstassoziation (Kirchhausen 1993) fördert das gebundene AP 2 die Rekrutierung und Assemblierung von Clathrin an der Plasma-membran. Die fortschreitende Assemblierung von Clathrin zu einem polyedrischen Gerüst führt zu einer Einkrümmung der Plasmamembran. Diese Struktur wird als „ coated pit ” bezeichnet.

1.6.3 Einschnürung der „ coated pits²

Dieses „ coat assembly ” ist jedoch für die Abschnürung von voll ausgebildeten CCV's nicht ausreichend. Für die folgenden Schritte der Vesikelbildung sind zusätzliche cytosolische Proteine sowie die ATP - und GTP - Hydrolyse notwendig (Marks et al. 1996, Prasad und Keen 1991). Zunächst bilden sich tief eingestülpte „ coated pits ”, die noch mit der Plasmamembran verbunden sind. Bei diesem Vorgang spielt die GTPase Dynamin eine wichtige Rolle. Die Rekrutierung von Dynamin an das Clathrin - Gerüst erfolgt in der GDP gebundenen Form und wird vermutlich durch Amphiphysin vermittelt (Takei et al. 1999). Die

Bindung von GTP bewirkt eine Selbstassemblierung von Dynamin zu helikalen Ringstrukturen, die den Einschnürungsprozeß der „coated pits“ bewirken (Kosaka und Ikeda 1983).

1.6.4 Abschnürung von CCV's

Für die abschließende Abschnürung von CCV's wird ATP - Hydrolyse benötigt, so daß davon ausgegangen werden muß, daß neben Dynamin noch weitere Proteine, zum Beispiel Inositolpolyphosphate an diesem Prozeß beteiligt sind (Beck und Keen 1991, Timerman et al. 1992, Voglmair et al. 1992, Gaidarov et al. 1996).

Nachdem sich die CCV's von der Plasmamembran abgeschnürt haben, werden sowohl Clathrin als auch AP 2 vom Vesikel entfernt. Das Ablösen der Clathrin - Hülle („un-coating“) wird vermutlich durch Hsc70, der sogenannten „uncoating ATPase“ vermittelt (Green et al. 1990).

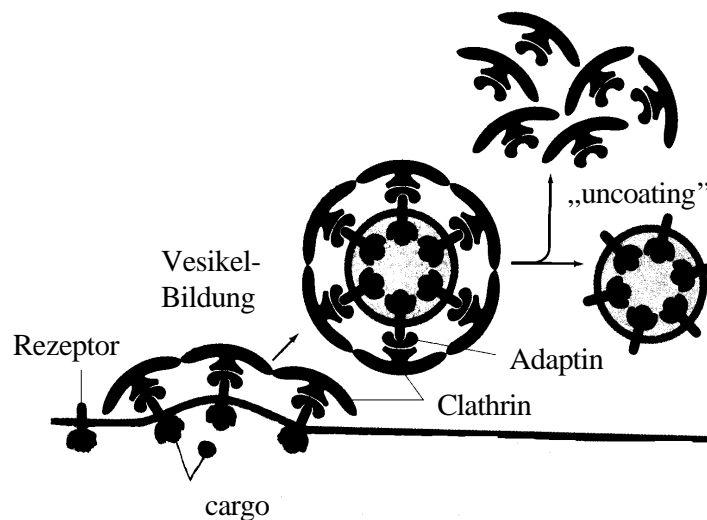


Abb. 1.4 Schematische Darstellung zur Abschnürung von Clathrin beschichteten Vesikeln (aus Alberts et al. 1995)

1.7 Regulation der CCV - Bildung

1.7.1 Regulation der Rekrutierung von AP 1

Obwohl AP 1 und AP 2 strukturell sehr ähnlich sind und beide die Bildung von CCV's vermitteln, üben sie diese Funktion an verschiedenen Kompartimenten aus. Während AP 2 spezifisch mit der Plasmamembran assoziiert, bindet AP 1 an die TGN – Membran sowie an TGN - verwandte Kompartimente wie unreife sekretorische Granula (Dittie et al. 1996) und in gewissem Ausmaß an ein frühes endosomales Kompartiment (Le Borgne et al. 1993).

Die Rekrutierung von AP 1 an die TGN - Membran wird in permeabilisierten Zellen durch den Zusatz von GTP γ S stimuliert. Dagegen verhindert in lebenden Zellen der Einsatz von Brefeldin A (BFA) die AP 1 Rekrutierung und bewirkt eine Umverteilung von AP 1 ins Cytosol (Robinson und Kreis 1992, Wong und Brodsky 1992). Da beide Substanzen auf ARF - Proteine, eine Familie von kleinen GTP bindenden Proteinen wirken, nimmt man an daß ARF 1 an der Rekrutierung von AP 1 beteiligt ist, indem es die Bindung von AP 1 an die TGN - Membran ermöglicht. Da jedoch ARF 1 auch bei der Bindung von Coatomeren an der Membran des Intermediärkompartiments beteiligt ist (Stamnes und Rothman 1993) sowie bei der Rekrutierung von AP 3 an Membranen eine Rolle spielt (Ooi et al. 1998), kann ARF 1 selbst nicht zur Spezifizierung der Membranbindung von AP 1 beitragen..

1.7.2 Regulation der Rekrutierung von AP 2

Die Assoziation von AP 2 mit der Plasmamembran wird dagegen nicht von Brefeldin A beeinflusst, so daß ARF 1 an diesem Prozeß nicht beteiligt ist (Seaman et al. 1996, Wong und Brodsky 1992, Seaman et al. 1993). Jedoch bewirkt GTP γ S eine „Fehlrekrutierung“ von AP 2 an ein endosomales Kompartiment (Seaman et al. 1993) und an Lysosomen (Traub et al. 1996). Desweiteren inhibiert GTP γ S *in vitro* die Bildung von CCV's an der Plasmamembran (Carter et al. 1993).

Dies könnte darauf hindeuten daß möglicherweise ein anderes Mitglied der ARF - Familie, wie zum Beispiel ARF 6, das insensitiv gegenüber Brefeldin A ist, eine Rolle bei der Rekrutierung von AP 2 spielt (Cavenagh et al. 1996, Peters et al. 1995).

Ebenso verhindert Neomycin, das Phospholipase D durch Bindung an dessen Kofaktor PIP₂ inhibiert, die Bindung von AP 2 an die Plasmamembran (West et al. 1997).

1.7.3 Weitere Regulationsmechanismen

Neben Clathrin und den cytoplasmatischen Rezeptordomänen interagieren AP 1 und AP 2 noch mit weiteren Proteinen, die ebenfalls an der Regulation der CCV - Bildung beteiligt sein können (siehe Tabelle 1.4).

So ist eine Regulation der CCV - Bildung durch Phosphorylierung von beteiligten Proteinen denkbar. Die Phosphorylierung von Dynamin 1 und Synaptojanin 1, einem weiteren am Endozytoseprozeß beteiligten Protein, inhibiert ihre Bindung an Amphiphysin. Dessen Phosphorylierung wiederum verhindert die Bindung dieses Proteins an AP 2 und Clathrin (Slepnev et al. 1998).

Ebenso ist auch die Regulation der Funktion der Adaptor - Komplexe durch ihre Phosphorylierung denkbar. So verhindert die Phosphorylierung der β - Untereinheit von cytosolischem AP 1 und AP 2 ihre Bindung an Clathrin (Wilde und Brodsky 1996).

| Adaptor - Komplex | interagierendes Protein | Referenz |
|-------------------|-------------------------|---------------------|
| AP 1 | γ - Synergine | Sowerby et al. 1996 |
| AP 2 | EPS 15 | Bemerah et al. 1995 |
| AP 2 | Dynamin | Wong et al. 1995 |
| AP 2 | Synaptotagmin | Zhang et al. 1994 |
| AP 2 | Epsin | Chen et al. 1998 |

Tab.1.4 AP 1 und AP 2 interagierende Proteine

2. Problemstellung

Die Adaptor - Komplexe binden an spezifische Sequenzmotive (= Sortierungssignale) in den cytoplasmatischen Domänen von Rezeptoren und Transmembranproteinen. Da verschiedene Adaptorproteine an ein und dasselbe Sortierungssignal binden können, muß die Interaktion mit den Rezeptoren und Transmembranproteinen reguliert werden, damit eine korrekte Sortierung gewährleistet ist. Als mögliche Regulationsmechanismen sind Modifikationen , zum Beispiel in Form von Phosphorylierung, Sialylierung oder auch Palmitoylierung sowohl der Adaptor - Komplexe als auch der cytoplasmatischen Domänen denkbar.

Bereits publizierte Arbeiten anderer Arbeitsgruppen haben die Phosphorylierung von AP 1 und AP 2 nachgewiesen, außerdem ist bekannt daß eine Phosphorylierung der β - Untereinheit *in vitro* die Bindung an Clathrin inhibiert (Wilde und Brodsky 1996). Jedoch ist die Bedeutung einer Adaptor - Phosphorylierung für die Interaktion mit Sortierungssignalen bislang nicht bekannt. In dieser Arbeit sollte zunächst untersucht werden, ob der Phosphorylierungszustand der Adaptor - Komplexe die Interaktion mit den cytoplasmatischen Domänen von Rezeptoren beeinflusst. Diese Experimente sollten mit aus Schweinehirn aufgereinigtem AP 1 und AP 2 sowie synthetischen Peptiden aus dem MPR 46 - Rezeptor - Tail als Bindungspartner durchgeführt werden. Da ebenfalls bereits bekannt ist, daß AP 2 im Cytosol in phosphorylierter Form vorliegt während an Membranen gebundenes AP 2 dephosphoryliert ist, sollte diese Interaktionsanalyse auch mit AP 2 aus Cytosol von MDBK - Zellen sowie mit AP 2, das von den Membranen durch 0,5 M Tris abgelöst wurde, durchgeführt werden.

Desweiteren sollte untersucht werden, welche der 4 Untereinheiten der Adaptor-Komplexe *in vitro* phosphoryliert werden können.

Mit Hilfe von Rekrutierungsexperimenten sollte zudem untersucht werden, ob eine Adaptor - Phosphorylierung die Rekrutierung an isolierte Membranen beeinflusst.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

| | |
|---|---------------------------------------|
| Analysenwaagen Typ 1602 MP u. M5P | Sartorius, Göttingen |
| BIAcore | Biacore AB, Uppsala, Schweden |
| CO ₂ -Brutschrank Typ 2771 | Heraeus, Osterode |
| Dounce Homogenisator, 50ml | Braun, Melsungen |
| Drehrad für Eppendorfgefäße | Eigenbau, Werkstatt des Instituts |
| Eismaschine | Ziegra, Isernhagen |
| Elektrophoresesystem für Minigele, Mini-V 8.10 mit Gelkammer und Blotmodul | GibcoBRL, Eggenstein |
| FPLC - Anlage | Pharmacia, Freiburg |
| Kühlanlage für FPLC: Minicoldlab 2023 | UKB, Brooma |
| Geltrockner | Biorad, Hercules, CA, USA |
| Heizblock, Thermostat 5320 | Eppendorf, Hamburg |
| Homogenisator Waring, elektrisch | Bender + Hobein, Zürich |
| Magnetrührer | Heidolph, Kehlheim |
| Mikrowellenherd | Bosch, Stuttgart |
| Netzgerät Power Supply 2197 für Elektrophorese | LKB, Bromma, Schweden |
| Netzgerät ST 305 Power Supply für Elektrophorese | GibcoBRL, Eggenstein |
| pH - Meßgerät Knick 647 | Schütt, Göttingen |
| Semi Dry Blot System | cti GmbH, Idstein |
| SMART-HPLC-System | Pharmacia, Freiburg |
| Spektralphotometer Uvikon 932 | Kontron, Eching |
| Sterilbank SG 400 | Baker Company. INC., Stanford, USA |
| Vortex Genie-Mixer | Bender & Hobein, Schweiz |

Zentrifugen:

| | |
|---------------------|--------------------|
| Kühlzentrifuge 5402 | Eppendorf, Hamburg |
|---------------------|--------------------|

| | |
|-----------------------|--------|
| Mikrozentrifuge MC-13 | Amicon |
|-----------------------|--------|

| | |
|-----------------------------|------------------|
| Ultrazentrifuge Optima L-80 | Beckman, München |
|-----------------------------|------------------|

Rotoren für Ultrazentrifuge:

| | |
|-----------------|--|
| Ti-45 und Ti-50 | |
|-----------------|--|

| | |
|------------------------|------------------|
| Ultrazentrifuge TL-100 | Beckman, München |
|------------------------|------------------|

Rotoren:

| | |
|---------------------|--|
| TLA-45 und TL-100.3 | |
|---------------------|--|

| | |
|-------------------------|----------------|
| Zentrifuge Megafuge 1.0 | Heraeus, Hanau |
|-------------------------|----------------|

| | |
|------------------|------------------|
| Zentrifuge J-21C | Beckman, München |
|------------------|------------------|

Rotoren:

| | |
|-----------------|--|
| JA-10 und JA-20 | |
|-----------------|--|

3.1.2 Säulen für FPLC und SMART

| | |
|---|---------------------|
| Leersäule HiLoad 16/60 für Superose-6-Füllung | Pharmacia, Freiburg |
|---|---------------------|

| | |
|---|---------------------|
| Leersäule HiLoad 5/10 für Hydroxyapatit-Füllung | Pharmacia, Freiburg |
|---|---------------------|

| | |
|----------------------------|---------------------|
| Superdex 200 SMART - Säule | Pharmacia, Freiburg |
|----------------------------|---------------------|

3.1.3 Gebrauchsmaterial

| | |
|-----------------|---------------------------------|
| Cellophanfolien | Pütz Folien, Traunusstein Wehen |
|-----------------|---------------------------------|

| | |
|-----------------------------------|-----------------|
| Dialyseschlauch (cut of 50 kDa) | Biomol, Hamburg |
|-----------------------------------|-----------------|

| | |
|----------------|---------------------|
| Einfrierkästen | National Lab, Mölln |
|----------------|---------------------|

| | |
|------------------|-----------------|
| Einfrierröhrchen | Nunc, Wiesbaden |
|------------------|-----------------|

| | |
|-------------------|------------------|
| Einmalkanülen G22 | Braun, Melsungen |
|-------------------|------------------|

| | |
|--------------------|------------------|
| Einmalspritzen 2ml | Braun, Melsungen |
|--------------------|------------------|

| | |
|--|--------------------|
| Gewebekulturflaschen 25cm ² | Greiner, Nürtingen |
|--|--------------------|

| | |
|-------------------------------------|--------------------|
| Gewebekulturschalen Ø 10 und 14,5cm | Greiner, Nürtingen |
|-------------------------------------|--------------------|

| | |
|-----------------------------------|---------------------------------------|
| Konzentratoren Microcon 10 und 50 | Amicon, Osterode |
| Nitrozellulose Blot-Membran | Sartorius, Göttingen |
| Parafilm® | American National Can™, Neeah, USA |
| Reaktionsgefäße 0,5, 1,5 und 2ml | Sarstedt, Braunschweig |
| sterile Plastikröhrchen 10ml | Greiner, Nürtingen |
| sterile Plastikröhrchen 50ml | Sarstedt, Braunschweig |
| <u>Sterilfilter:</u> | |
| Minisart 0.2µm Nitrozellulose | Sartorius, Göttingen |
| Durapore® Membran Filter 0.22µm | Millipore, Eschborn |
| Whatman GB 003 Papier | Schleicher und Schüll, Dassel |
| <u>Zentrifugenbecher:</u> | |
| JA-10 Polycarbonat, Polypropylen | SCI Science Service, München |
| JA-20 Polycarbonat, Teflon | SCI Science Service, München |
| Ti-45 Polycarbonat mit Deckel | Beckman, München |
| Ti-50 Polycarbonat mit Deckel | Beckman, München |
| TL-100 Ultrazentrifugenröhrchen | Beckman, München |

3.1.4 Chemikalien

Alle Chemikalien wiesen, sofern nicht anders angegeben, den Reinheitsgrad pro analysi auf.

| | |
|---------------------------------------|----------------------|
| Acrylamid 30% / Bisacrylamid 0,8 % | Roth, Karlsruhe |
| Ammoniumperoxodisulfat (APS) | Pierce, St. Augustin |
| Biotin LC - NHS | |
| Bradford-Reagenz für Proteinassay | BioRad, München |
| Bromphenolblau | BioRad, München |
| Chloroform | Merck, Darmstadt |
| Coomassie, Serva Blue R | Serva, Heidelberg |
| Dikaliumhydrogensulfat (K_2HPO_4) | Merck, Darmstadt |
| Dimethylsulfoxid, ultrarein (DMSO) | Merck, Darmstadt |

| | |
|--|-------------------------------|
| Dithiotreitol, ultrarein (DTT) | Serva, Heidelberg |
| Essigsäure | Merck, Darmstadt |
| Ethanol | Merck, Darmstadt |
| Ethanolaminhydrochlorid | |
| Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz (EDTA) | Merck, Darmstadt |
| Ethylenglycol-bis-(β -aminoethylether)-NNN'N'- tetraessigsäure | Sigma, Deisenhofen |
| Flüssigstickstoff | Messer Griesheim, Siegen |
| Ficoll 400 | Pharmacia, Freiburg |
| Glycerin, wasserfrei | Merck, Darmstadt |
| Hydroxyapatit, Macro-Prep-Ceramic-grade | BioRad, München |
| N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2ethansulfonsäure (HEPES) | Serva, Heidelberg |
| H ₂ O, für Chromatographie | Merck, Darmstadt |
| Kaliumacetat (KAc) | Merck, Darmstadt |
| Kaliumchlorid (KCl) | Merck, Darmstadt |
| Magnesiumacetat (MgAc) | Merck, Darmstadt |
| Magnesiumchlorid (MgCl ₂) | Merck, Darmstadt |
| Manganchlorid (MgCl ₂) | |
| β -Mercaptoethanol (β -MSE) | Merck, Darmstadt |
| Natriumacetat (NaAc) | Merck, Darmstadt |
| Natriumazid (NaN ₃) | Merck, Darmstadt |
| Natriumchlorid (NaCl) | Merck, Darmstadt |
| Natriumlaurylsulfat (SDS) | Sigma, Deisenhofen |
| Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃) | Merck, Darmstadt |
| Natriumhydroxid (NaOH) | Merck, Darmstadt |
| N-ethyl-N'-(dimethylaminopropyl) carbo- diimid (EDC) | BIAcore AB, Uppsala, Schweden |
| N . hydroxysucciniimid (NHS) | BIAcore AB, Uppsala, Schweden |
| Rinderserumalbumin (BSA) | Serva, Heidelberg |
| Saccharose | Merck, Darmstadt |

| | |
|---|---------------------|
| Superose-6-Säulenmaterial | Pharmacia, Freiburg |
| NNN'N'Tetramethylethylendiamin (TEMED) | Serva, Heidelberg |
| Trichloressigsäure (TCA) | Merck, Darmstadt |
| Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) | ICN, Eschwege |
| Triton X-100 | Sigma, Deisenhofen |
| Tween 20 | Serva, Heidelberg |

3.1.5 Molekulargewichtstandards

| | |
|-----------------------------|-----------------------|
| Prestain Marker, High range | Calbiochem, Bad Soden |
|-----------------------------|-----------------------|

| Proteine | MW (kDa) |
|------------------------|------------|
| Myosin, H-Kette | 200 |
| Phosphorylase b | 97 |
| BSA | 68 |
| Ovalbumin | 43 |
| Carbonic Anhydrase | 29 |
| β -Lactoglobulin | 18 |
| Lysozym | 14 |

| | |
|--------------|--------------------|
| HMW - Marker | Sigma, Deisenhofen |
|--------------|--------------------|

| Protein | MW (kDa) |
|-------------------------------------|------------|
| Myosin, Kaninchenmuskel | 205 |
| Galactosidase, E.coli | 116 |
| Phosphorylase b, Kaninchenmuskel | 97 |
| Fructose 6 phosphat Kinase | 84 |
| Albumin, Rinderserum | 66 |
| Glutamat Dehydrogenase, Rinderleber | 55 |
| Ovalbumin, Hühnerei | 45 |

| | |
|--|----|
| Glycerinaldehyd 3 phosphat Dehydrogenase | 36 |
|--|----|

3.1.6 Proteinaseinhibitoren

| | |
|------------------------------------|--------------------|
| Aprotinin | Sigma, Deisenhofen |
| Leupeptin | Sigma, Deisenhofen |
| Jodacetamid | Serva, Heidelberg |
| Pepstatin A | Sigma, Deisenhofen |
| PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) | Serva, Heidelberg |
| Proteinase-Inhibitor-Cocktail | Sigma, Deisenhofen |

3.1.7 Phosphataseinhibitoren

| | |
|--|--------------------|
| <u>Phosphataseinhibitor-Cocktail 1</u> | Sigma, Deisenhofen |
| Microcystin LR | |
| Cantharidin | |
| (-)-p-Bromotetramisol | |
| in DMSO | |
| <u>Phosphataseinhibitor-Cocktail 2</u> | Sigma, Deisenhofen |
| Natriumorthovanadat | |
| Natriummolybdat | |
| Natriumtartrat | |
| Imidazol | |
| in wässriger Lösung, pH 10,0 | |

3.1.8 Zelllinien

NRK 49 F (Fibroblastenzelllinie aus der Niere)

MDBK (adhärenzte Zelllinie aus der Niere)

3.1.9 Antikörper

3.1.9.1 Primärantikörper

| Antigen | Immunisierte Spezies, Ig-Klasse, Bezeichnung | Aufbereitung | Referenz |
|---|---|---------------------|--|
| α -Adaptin, Maus N- terminales Peptid | Maus monoklonal, IgG1, Klon 8 | Affinitätsgereinigt | Transduction Laboratories, Lexington, Kentucky, USA |
| α -Adaptin aus Rinderhirn | Maus monoklonal, IgG 2a, Klon 100/1 | Ascites | Sigma, Deisenhofen |
| β/β' -Adaptin | Maus monoklonal, IgG1, Klon 74 | Affinitätsgereinigt | Transduction Laboratories, |
| γ -Adaptin aus Rinderhirn | Maus monoklonal, IgG 2a, Klon 100/3 | Ascites | Sigma, Deisenhofen |
| μ 2 | Kaninchen | Affinitätsgereinigt | M. Robinson |
| σ 2 | Kaninchen | Affinitätsgereinigt | M. Robinson |

3.1.9.2 Sekundärantikörper

| | |
|------------------------------------|--|
| Kaninchen anti Maus Ig | Dako Diagnostika, Hamburg |
| Ziege anti Kaninchen, HRP-Konjugat | Jackson Inc. Baltimore, USA (Vertrieb Dianova, Hamburg) |
| Ziege anti Maus, HRP-Konjugat | Jackson Inc. Baltimore, USA (Vertrieb Dianova, Hamburg) |

3.1.10 EDV

3.1.10.1 Hardware

| | |
|--------------------------|-------------------------------------|
| CCD-Kamera Cybertech CSC | Cybertech, Berlin |
| Scanner Scan Jet 4c/T | Hewlett Packard, Palo Aalto, USA |
| Laser Writer 16 / 600 PS | |

3.1.10.2 Software

| | |
|-----------------------------------|-------------------------------|
| Windows 95 | Microsoft, USA |
| Adobe Photoshop 3.0 | Adobe Systems Inc. |
| Windows Powerpoint 95 | Microsoft, USA |
| Word 7.0 | Microsoft, USA |
| Exel 7.0 | Microsoft, USA |
| Software WinCam 2.2 für PC | Cybertech, Berlin |
| BIAcore Evaluation - Software 2.1 | Biacore AB, Uppsala, Schweden |

3.2 Methoden

3.2.1 Zellbiologische Methoden

3.2.1.1 Kultivieren von Zellen

Die Zellen wurden in wassergesättigter Atmosphäre unter 5% CO₂ bei 37°C kultiviert. Medien und Lösungen wurden auf 37°C vorgewärmt, wenn nicht anders angegeben.

3.2.1.2 Trypsinieren von Zellen

Trypsin-EDTA-Lösung: 0,05% (w/v) Trypsin
 0,02% (w/v) EDTA in modifizierter Puck's Salzlösung

Die konfluenten Zellen wurden mit PBS gespült, um inhibierende Einflüsse von Serumbestandteilen auf die Aktivität des Trypsins zu verhindern. Nach dem Absaugen des PBS wurden die Zellen solange mit Trypsin-EDTA bei 37°C inkubiert, bis sich die Zellen ablösten. Die Trypsin-Reaktion wurde durch Zugabe von serumhaltigem Medium gestoppt, die Zellen durch mehrfaches Aufsaugen mit der Pipette vereinzelt und anschließend die Zellen in der gewünschten Dichte ausgesät.

3.2.1.3 Einfrieren von Zellen

Einfriermedium: 10% DMSO im jeweiligen Zellkulturmedium, sofort verbrauchen oder einfrieren, da oxidiertes DMSO als Zellgift wirkt.

Die Zellen wurden trypsiniert, in Medium aufgenommen und die Suspension in der Labofuge sedimentiert (5 Minuten, 1000 x g). Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in 1ml Einfriermedium aufgenommen und in beschriftete und vorgekühlte Einfrier-röhrchen überführt. Die Zellen wurden zunächst bei -80°C eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

3.2.1.4 Revitalisierung von Zellen

Nach der Entnahme des Einfrierröhrchens aus dem Stickstofftank wurde es 1 Minute in der Hand angewärmt und anschließend im Ethanolbad bei 37°C aufgetaut, bis nur noch ein kleiner Eiskern zu sehen war. Die Zellsuspension wurde entnommen, in 4ml kaltem PBS (4°C) überführt und in der Labofuge 5 Minuten bei 1000 x g sedimentiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet in 5ml kaltem Medium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt, um restliches DMSO, tote Zellen und Zelltrümmer zu entfernen.

3.2.2 Biochemische Methoden

3.2.2.1 Fällung von Proteinen aus wässriger Lösung

3.2.2.1.1 TCA - Fällung

Die Proteinlösungen wurden mit einer 100% TCA - Lösung auf eine TCA-Endkonzentration von 10% gebracht, durch vortexen gemischt und entweder über Nacht bei 4°C oder 2 Stunden auf Eis gefällt. Anschließend wurden die gefällten Proteine 15 Minuten bei 13000 rpm

pelletiert und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde mit 2% NaCH₃COO - Lösung in Ethanol gewaschen und anschließend in Probenpuffer aufgenommen.

3.2.2.1.2 Wessel-Flügge-Fällung

(Wessel und Flügge, 1984)

In einem 15 ml Röhrchen wurden zu 4 Probenvolumen Methanol die zu fällende Probe gegeben, gevortext und 10 s bei 9000xg zentrifugiert. Dann wurde 1 Probenvolumen Chloroform zugegeben, durch vortexen gemischt und wie oben zentrifugiert. Nachdem 3 Probenvolumen H₂O bidest zugesetzt worden waren, bildeten sich 2 Phasen, welche mehrmals kräftig ausgeschüttelt wurden. Nach der anschließenden Zentrifugation für 2 Minuten bei 9000xg wurde die obere Phase vorsichtigst abgenommen. Anschließend wurden 3 Probenvolumen Methanol zugegeben und die gefällten Proteine bei 9000xg 5 Minuten abzentrifugiert. Nachdem der Überstand abgenommen worden war, wurde das Pellet auf Eis luftgetrocknet und in Probenpuffer aufgenommen.

3.2.2.2 Proteinbestimmung nach Bradford

(Bradford, 1976)

Lösungen:

1. RotiQuant®, Bradford-Reagenz
2. BSA - Standard 1.0 mg/ml BSA in H₂O bidest

Das Standardprotein wurde zusammen mit einem Leerwert in definierten Proteinmengen von 2, 4, 8 und 10 µg eingesetzt und wie die Proben auf 800 µl Gesamtvolumen H₂O bidest aufgefüllt. Anschließend wurden 200 µl RotiQuant®-Bradford-Reagenz zugegeben und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Absorption des Farbstoffs wurde bei $\lambda = 595$ nm gemessen und die Proteinkonzentration anhand einer Eichgeraden ermittelt.

3.2.2.3 Diskontinuierliche SDS - Polyacrylamid - Gelelektrophorese (SDS - Page)

(LAEMMLI et al. 1970)

Lösungen:

- | | |
|----------------------------------|---|
| 1. Trenngelpuffer | 1,5 M Tris - HCL pH 8,8 0,4 % (w/v) SDS |
| 2. Sammelgelpuffer | 0,5 M Tris - HCL pH 6,8 0,4% (w/v) SDS |
| 3. Acrylamidlösung (Roth) | 30% (w/v) Acrylamid 0,8% (w/v) Bisacrylamid in H ₂ O |
| 4. APS | 10% (w/v) Ammoniumperoxidisulfat in H ₂ O |
| 5. TEMED | 99% (v/v) gebrauchsfertige Lösung |
| 6. Agarose - Lösung | 1% (w/v) Agarose in H ₂ O |
| 7. Elektrophoresepuffer | 25 mM Tris - HCL, pH 8,6 19 mM Glycin 0,1% (w/v) SDS |
| 8. 6 x Probenpuffer, reduzierend | 24 ml 2 M Tris/HCL, pH 6,8 12 g SDS 45 ml 100 % Glycerin 60 mg Bromphenolblau ad 88 ml H ₂ O bidest 12 ml β-Mercaptoethanol |

Pipettierschema für 2 Minigele (Angabe in ml):

| | Trenngel | | | | Sammelgel |
|-------------------------|----------|------|-------|------|-----------|
| | 7,5% | 10% | 12,5% | 15% | 4,5% |
| AA / BA 30%/0,8% | 2 | 2,67 | 3,33 | 4 | 0,45 |
| 1,5 M Tris 0,4% SDS | 2 | 2 | 2 | 2 | - |
| 0,5 M Tris 0,4% SDS | - | | | | 0,45 |
| H ₂ O bidest | 3,9 | 3,3 | 2,62 | 1,95 | 2 |
| TEMED | 8 µl | | | | 4 µl |
| 10% APS | 80 µl | | | | 40 µl |

Die Elektrophorese wurde im Minigelsystem von Gibco, BRL mit vertikal ausgerichteten Gelen durchgeführt. Die Größe des Gels betrug 56 x 86 x 0,75 mm.

Das Gießen der Gele erfolgte zwischen zwei Glasplatten, die durch zwei Abstandshalter („Spacer“) in definiertem Abstand voneinander getrennt wurden. Die Unterseite der Gele wurde mit 1 % Agarose abgedichtet. Die Trenngellösung wurde zügig zwischen die Glasplatten gegossen und sofort mit Butanol (mit H₂O bidest gesättigt) überschichtet. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde das Butanol entfernt, die Sammelgel-Lösung eingefüllt und der Probenkamm eingesetzt. Nach der Polymerisation des Sammelgels wurde der Kamm vorsichtig entfernt und die Taschen mit H₂O bidest gespült. Das Gel wurde in die Elektrophoresekammer eingesetzt und mit Elektro-phoresepuffer überschichtet. Anschließend wurden die Proben mit einer Hamilton-Spritze in die Taschen gefüllt. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von zunächst 50 mA. Diese wurde auf 100 mA erhöht, sobald die Lauffront das Trenngel erreicht hatte.

3.2.2.4 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Lösungen:

Kathodenpuffer 20 mM NaOH

| | |
|---------------|---|
| Anodenpuffer | 10 mM Phosphorsäure |
| IEF-Gellösung | 9 M Harnstoff 4 % Acrylamid / Bisacrylamid 2 % (w/v) NP-40 3 % (v/v) Ampholine pH 5-8 1 % (v/v) Ampholine pH 3,5-10 |
| Lysispuffer | 9,6 M Harnstoff 2 % NP-40 (w/v) 4 % (v/v) Ampholine pH 5-8 1 % (v/v) Ampholine pH 3,5-10 7,15 M 2-Mercaptoethanol |
| Overlaypuffer | 8 M Harnstoff 2 % (v/v) Ampholine pH 5-8 0,5 % (v/v) Ampholine pH 3,5-10 |

Für die Herstellung eines IEF-Gels (14cm x 10 cm x 1 cm) wurden 30 ml Gellösung unter leichtem Erwärmen hergestellt. Nach Zugabe von 60 µl 10 % Ammoniumper-sulfatlösung sowie 42 µl TEMED wurde der Ansatz zügig zwischen zwei Glasplatten, die am unterem Ende mit einer 1 % igen Agaroselösung abgedichtet wurden gegossen und anschließend vorsichtig der Kamm eingesetzt.

Nachdem das Gel polymerisiert war, wurde der Kamm sowie die Agaroseabdichtung entfernt und das Gel in eine Elektrophoresekammer eingespannt, deren untere Kammer mit Anodenpuffer gefüllt wurde. In jede Tasche wurden 60 µl Lysispuffer eingefüllt und anschließend vorsichtig mit Kathodenpuffer überschichtet.

Der Vorlauf erfolgte für 15 Minuten bei 200 V, 30 Minuten bei 300 V und eine weitere halbe Stunde bei 400 V.

Nach dem Vorlauf wurde der Kathodenpuffer entfernt und die Taschen vollständig entleert. Nun wurden die Proben in die Taschen eingefüllt und mit Kathodenpuffer überschichtet. Die anschließende Fokussierung erfolgte für 12-15 Stunden bei 500 V.

3.2.2.5 SDS - Harnstoff - Gelelektrophorese

Durch eine SDS - Harnstoff - Gelelektrophorese können die großen Untereinheiten der Adaptor - Komplexe voneinander getrennt werden.

Lösungen:

1. Trenngelpuffer
1,5 M Tris - HCl, pH 8,8
0,4 % (w / v) SDS
6 M Harnstoff
EDTA
2. Sammelgelpuffer
0,5 M Tris - HCl, pH 6,8
0,4 % (w / v)
6 M Harnstoff
3. Acrylamidlösung (Roth)
30 % (w / v / Acrylamid
0,8 % (w / v) Bisacrylamid in H₂O
4. APS
10 % (w / v) Ammoniumperoxidisulfat
in H₂O
5. TEMED
99% (v/v) gebrauchsfertige Lösung
6. Agarose - Lösung
1% (w/v) Agarose in H₂O
7. Elektrophoresepuffer
25 mM Tris - HCL, pH 8,6
19 mM Glycin
0,1% (w/v) SDS
8. 6 x Probenpuffer, reduzierend
24 ml 2 M Tris/HCL, pH 6,8
12 g SDS
45 ml 100 % Glycerin
60 mg Bromphenolblau

ad 88 ml H₂O bidest

12 ml β-Mercaptoethanol

Für die Herstellung eines SDS - Harnstoff - Gels (14 cm x 10 cm x 1 cm) wurden 30 ml Trenngellösung unter leichtem Erwärmen hergestellt. Nach der Zugabe von 250 µl APS sowie 25 µl TEMED wurde die Lösung zügig zwischen zwei Glasplatten, die mit Agarose am unteren Ende abgedichtet wurden bis etwa 3 cm unter dem oberen Rand gegossen und mit Wasser überschichtet. Nachdem das Trenngel auspolymerisiert war, wurde das Wasser entfernt, der Kamm eingesetzt und anschließend mit Sammelgellösung (10 ml Lösung mit 100 µl APS und 10 µl TEMED) aufgefüllt. Nach dem Poly-merisieren des Sammelgels wurde der Kamm vorsichtig entfernt und die Taschen mit Elektrophoresepuffer ausgespült. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 50 mA.

3.2.2.6 Coomassiefärbung von Polyacrylamidgelen

Lösungen:

- | | |
|----------------------------|----------------------------------|
| 1. Coomassie - Färbelösung | 0,5 % (w/v) Coomassie Blau R |
| | 50 % (v/v) Methanol, technisch |
| | 10 % (v/v) Essigsäure, technisch |
| | in H ₂ O bidest |
| 2. Entfärbelösung | 50 % (v/v) Methanol, technisch |
| | 10 % (v/v) Essigsäure, technisch |
| | in H ₂ O bidest |

Nach der Elektrophorese wurde das Gel für eine Stunde bei Raumtemperatur oder für 30 Minuten bei 37°C auf einem Horizontalschüttler in Coomassie - Färbelösung inkubiert. Nachdem das Gel vollständig durchgefärbt war, wurde die Färbelösung abgenommen und das Gel solange auf dem Schüttler in Entfärber inkubiert, bis der Gelhintergrund vollständig entfärbt war. Dazu wurde die Entfärbelösung mehrfach gewechselt. Anschließend wurde das Gel

zweimal 15 Minuten gewässert. Das Trocknen des Gels erfolgte in einem Umlufttrockner, nachdem das Gel luftblasenfrei zwischen zwei nasse Cellophanfolien eingespannt worden war.

3.2.2.7 Westernblot

3.2.2.7.1 Elektrophoretischer Proteintransfer von SDS-Gelen durch das Naßblotverfahren (Minigele)

Nach der Elektrophorese wurde das Gel 5 - 10 Minuten in Transferpuffer äquilibriert. Inzwischen wurde pro Gel eine Nitrozellulosemembran sowie zwei Whatman-Filter-papiere auf die Größe des Gels zurechtgeschnitten und ebenfalls in Transferpuffer äqui-libriert. Für den Proteintransfer wurden die einzelnen Bestandteile in den Bloteinsatz luftblasenfrei nach folgendem Schema aufeinander geschichtet:

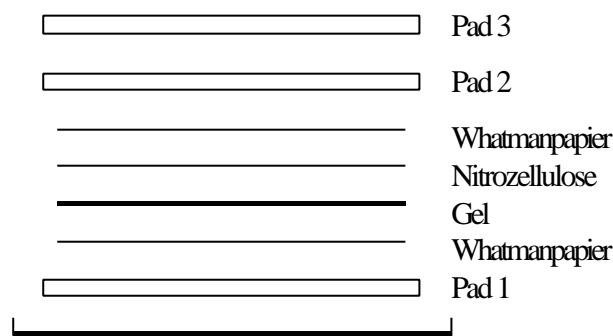


Abb.3.1: schematischer Aufbau eines Naßblots

Der Bloteinsatz wurde anschließend in die Elektrophoresekammer eingesetzt und mit Transferpuffer überschichtet. Um ein zu starkes Erwärmen der Elektrophorese-kammer zu verhindern, wurde diese in ein Eisbad gestellt. Der Transfer wurde für eine Stunde bei 150 V durchgeführt.

3.2.2.7.2 Elektrophoretischer Proteintransfer von IEF-Gelen durch das Semi-Dry-Verfahren

Lösungen:

1. Kathodenpuffer
 - 25 mM Tris/HCl, pH 9,0
 - 40 mM ϵ -Aminocaprinsäure
 - 20 % (v/v) Methanol p.a.

2. Anodenpuffer
 - 300 mM Tris/HCl, pH 7,4
 - 20 % (v/v) Methanol p.a.

Nach Beendigung der Fokussierung wurde das Fokussierungsgel 10 Minuten in Kathodenpuffer + 0,01 % SDS äquilibriert. In der Zwischenzeit wurde eine Nitrozellulosemembran, sowie 6 Whatmanfilterpapiere auf die Größe des Gels zurecht geschnitten. Die einzelnen Bestandteile wurden anschließend luftblasenfrei nach folgendem Schema aufeinander geschichtet:

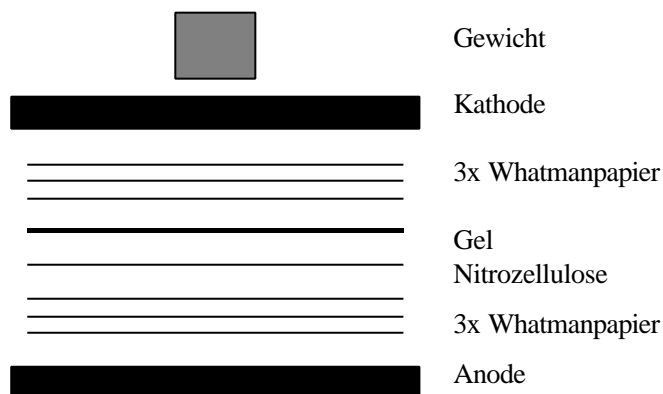


Abb.3.2: schematischer Aufbau eines Semi-Dry-Blots

Der Transfer erfolgte 30 Minuten bei einer konstanten Stromstärke von 1 mA/cm^2 .

3.2.2.7.3 Immunodetektion:

Lösungen:

1. PBS
 - 140 mM NaCl

3.2.2.8.1 Präparation von Clathrin beschichteten Vesikel

Lösungen (alle 4°C):

- | | |
|-----------------|---|
| 1. Mes - Puffer | 0,1 M Mes, pH 6,5 |
| | 1 mM EGTA |
| | 0,5 mM MgCl ₂ |
| | 0,02% NaN ₃ |
| 2. Dichtemedium | 12,5% (w/v) Saccharose |
| | 12,5% (w/v) Ficoll® 400 in Mes - Puffer |

Um im Blut enthaltene Proteasen zu entfernen, wurden die Hirnhäute mit einer Pinzette entfernt und das Gewebe gründlich mit VS - Wasser gespült. Die so vorbereiteten Schweinehirne wurden in Portionen von ca. 300g bei - 80°C gelagert. Für eine Präparation wurde eine Portion über Nacht im Kühlschrank aufgetaut. Das Hirngewebe wurde mit ca. 500 ml Mes - Puffer im Mixer dreimal für 10 s homogenisiert. Anschließend wurde mit Puffer auf ein Endvolumen von 1 l aufgefüllt und noch einmal homogenisiert. Das Homogenat wurde zunächst für 30 Minuten bei 9000 rpm zentrifugiert (JA 10-Rotor) und anschließend der Überstand vorsichtig abgenommen und für eine Stunde bei 100000xg zentrifugiert (Ti 45-Rotor). Die Sedimente aus dieser Ultrazentrifugation (Gesamtmembranen) wurden mit jeweils 5ml Mes-Puffer versetzt und mit Hilfe eines Glasstabes vom Boden der Zentrifugenröhrchen gelöst (ca. 60 ml Gesamtvolumen). Die gelösten Sedimente wurden in einem 50ml Dounce-Glashomogenisator homogenisiert. Das Homogenat wurde mit gleichem Volumen Saccharose-Ficoll®-Dichtemedium vermischt und 40 Minuten bei 15000 rpm (JA 20-Rotor) zentrifugiert. Der Überstand wurde äußerst vorsichtig abgenommen, mit Mes-Puffer verdünnt und bei 100000xg für eine Stunde zentrifugiert (Ti 45-Rotor). Anschließend wurden die Sedimente mit jeweils einem ml Mes-Puffer vom Boden gelöst (ca. 8ml Gesamtvolumen) und in einem 10ml Dounce-Glashomogenisator homogenisiert. Das Homogenat wurde 15 Minuten bei 10000 rpm zentrifugiert und der Überstand, der die Clathrin beschichteten Vesikel enthielt wurde abgenommen.

3.2.2.8.2 Ablösen von Clathrin und Adaptoren

Lösungen: 2 M Tris/HCL pH 7,5

Der Überstand wurde mit 2 M Tris/HCL auf eine Endkonzentration von 0,5 M Tris/HCL eingestellt. Dieses Gemisch wurde ca. eine Stunde bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert. Anschließend wurde 30 Minuten bei 100000xg zentrifugiert (Ti 50-Rotor). Der klare Überstand (Tris-Extrakt) wurde abgenommen und zur weiteren Aufreinigung über Gelfiltrationschromatographie eingesetzt.

3.2.2.8.3 Gelfiltration über Superose 6â -Säule

Lösungen:

Trennungspuffer 0,5 M Tris/HCL. pH 7,0
1 mM DTT
0,02 % NaN₃

Der Trennungspuffer wurde vor Gebrauch durch einen 0,2µm Millipore-Filter sterilfiltriert. Die Superose 6®-Säule (Bettvolumen 130ml) wurde in Trennungspuffer äquilibriert bis eine stabile Basislinie vorhanden war. Anschließend wurden 5 - 6ml Tris-Extrakt (ca. 10 bis 15mg Gesamtprotein) aufgeladen. Die Trennung der Proteine erfolgte mit einer FPLC-Anlage bei 4°C. Folgende Parameter wurden angewandt:

Flußrate: 0,3 ml/min
Schreiber: 0,1 cm/min
OD: 0,2
Fraktionssammler: 5 min (1,5 ml Vol.)

Nach Beendigung des Laufs wurde anhand eines coomassiegefärbten SDS-Gels diejenigen Fraktionen ermittelt, die AP1 und AP2 enthielten. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt und über eine Hydroxyapatit-Säule weiter aufgereinigt.

3.2.2.8.4 Hydroxyapatit-Chromatographie

(Manfredi und Bazari, 1987)

Lösungen:

| | |
|----------------------|----------------------------|
| 1. Niedrigsalzpuffer | 10 mM K_2HPO_4 , pH 8,2 |
| | 10% Glycerin |
| | 100 mM NaCl |
| | 1 mM DTT |
| | 0,02% NaN_3 |
| 2. Hochsalzpuffer | 500 mM K_2HPO_4 , pH 8,2 |
| | 10% Glycerin |
| | 100 mM NaCl |
| | 1 mM DTT |
| | 0,02% NaN_3 |

Packen der Säule:

Zum Packen der Säule wurde zunächst etwa zwei große Spatelspitzen Hydroxyapatit in 20 ml Hochsalzpuffer resuspendiert und der Überstand nach dem Absetzen der Partikel vorsichtig dekantiert. Dieser Vorgang wurde nochmals wiederholt, bevor die Hydroxyapatit-Suspension in eine Leersäule für FPLC (5 mm Durchmesser, 10 cm Länge) gefüllt wurde. Die Säule wurde an die FPLC angeschlossen, und solange mit Niedrigsalzpuffer äquilibriert, bis eine stabile Basislinie vorlag.

(Da die Proben in einem 0,5 M Tris-Puffer über die Säule gegeben wurden, mußte diese nach etwa 5-6 Durchgängen neu gepackt werden.)

Pro Säulenlauf wurden ca 10 - 12 ml AP - Pool aufgeladen. Folgende Parameter wurden angewandt:

| | |
|-------------------|------------------------|
| Flußrate: | 0,2 ml/min |
| Schreiber: | 0,1 cm/min |
| OD: | 0,2 |
| Fraktionssammler: | 5 min (1 ml Vol.) |
| Gradient: | drei Stunden (36 ml) |

Nach Beendigung des Laufs wurden pro Fraktion 90 µl Probe entnommen und eine TCA-Fällung durchgeführt. Die Proben wurde anschließend auf einem SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt.

3.2.2.9 MDBK - Zellfraktionierung

Lösungen:

| | |
|--------------|--------------------------|
| MES - Puffer | 100 mM Mes, pH 6,8 |
| | 1 mM EGTA |
| | 0,5 mM MgCl ₂ |
| | 0,2 mM DTT |

Als Ausgangsmaterial dienten konfluent bewachsenen 15 cm Platten. Soweit möglich erfolgten alle Präparationsschritte auf Eis.

Zur Präparation wurde das Medium abgenommen und die Zellen zweimal mit jeweils 2 ml kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml Mes - Puffer abgeschabt. Um die Zellen aufzubrechen wurde die Zellsuspension mit einer 2 ml Spritze 20x durch eine 22xg Kanüle gezogen. Durch eine Zentrifugation für 10 Minuten bei 1000xg wurden die Zellkerne, unlysierte Zellen sowie größere Zelltrümmer abzentrifugiert. Der Überstand wurde

anschließend 30 Minuten bei 100000xg zentrifugiert, wodurch die Membranbestandteile pelletiert wurden und die cytosolischen Bestandteile im Überstand verblieben.

3.2.2.9.1 Extraktion der Membranen mit 0,5 M Tris

Um die Adaptor - Komplexe von den Membranen abzulösen, wurde das Membranpellet 1 Stunde mit 0,5 M Tris, pH 7,5 auf einem Drehrad bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde durch eine Ultrazentrifugation bei 100000xg die abgelösten Proteine von den Membranen getrennt.

3.2.2.9.2 Gelfiltration über eine Superdex 200 - Säule

Lösungen:

| | |
|-----------------------|------------------------|
| Superdex - Laufpuffer | 20 mM Hepes, pH 7,0 |
| | 150 mM NaCl |
| | 10 mM KCl |
| | 2 mM MgCl ₂ |
| | 0,2 mM DTT |

Die an ein SMART - HPLC - System angeschlossene Superdex 200 - Säule wurde mit dem Laufpuffer äquilibriert und anschließend jeweils 50 µl Cytosol bzw. Membranextrakt aufgeladen. Die Elution erfolgte bei einer Flußrate von 40 µl / min wobei jeweils 50 µl Fraktionen gesammelt wurden.

3.2.2.10 Präparation von NRK - Membranen

NRK - Zellen wurden auf 15 cm Platten ausplattiert und so lange kultiviert bis sie konfluent waren. Alle Präparationsschritte erfolgten bei 4°C.

Zur Präparation wurde das Medium abgesaugt und die Zellen pro Platte 2x mit jeweils 2 ml kaltem PBS gespült. Anschließend wurden die Zellen in Bindungspuffer abgeschabt und mit Hilfe einer 22xg Kanüle lysiert. Durch eine Zentrifugation für 10 Minuten bei 1000xg wurden die Kerne sowie noch intakte Zellen pelletiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen

und 30 Minuten bei 100000xg zentrifugiert. Nachdem das Cytosol (= Überstand) vollständig abgenommen worden war, wurde das Membranpellet in 500 µl 0,5 M Tris, pH 7,5 sorgfältig mit einer ausgezogenen Pasteurpipette resuspendiert und für eine Stunde bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert, um die endogenen Adaptor - Komplexe abzulösen. Anschließend wurden die Membranen 30 Minuten bei 100000xg abzentrifugiert und in Bindungspuffer aufgenommen. Das Resuspendieren des Pellets erfolgte wiederum mit einer ausgezogenen Pasteurpipette.

3.2.2.11 Dephosphorylierung von Adaptor - Komplexen mit alkalischer Phosphatase

Lösungen:

Bindungspuffer 25 mM Hepes - Koh, pH 7,2
 125 mM KAc
 5 mM MgAc

Als Phosphatase wurde calf intestinale alkaline Phosphatase von Boehringer, Mannheim verwendet.

Für die Dephosphorylierung der über Hydroxyapatit aufgereinigten AP 1 - und AP 2 - Komplexe wurden diese zunächst gegen einen geeigneten Puffer dialysiert (BIA - Puffer bzw. Bindungspuffer). Pro Dephosphorylierungsansatz wurde die entsprechende Menge an alkalischer Phosphatase (0,01 bis 2 U) zugesetzt und für 30 bis 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben sofort auf Eis gestellt, um die Aktivität der alkalischen Phosphatase zu minimieren.

3.2.2.12 Inkubation von gereinigtem AP 2 mit ATP

Lösungen:

Bindungspuffer 25 mM Hepes - KOH, pH 7,2
 125 mM KAc
 5 mM MgAc

Für die Behandlung von AP 2 mit ATP wurde das über Hydroxyapatit aufgereinigte AP- 2 gegen Bindungspuffer dialysiert und anschließend die entsprechende Menge an AP 2 mit 2 mM ATP (Enkonzentration) versetzt. Die Reaktion erfolgte für 15 Minuten bei 37°C und wurde nach Beendigung der Inkubationszeit auf Eis abgestoppt. Als Negativkontrolle wurde der gleiche Ansatz ohne ATP für 15 Minuten inkubiert. Im Anschluß daran wurden die behandelten Adaptor - Komplexe in einem Rekrutierungs-assay eingesetzt.

3.2.2.13 Rekrutierung von gereinigtem AP 2 an NRK - Membranen

Die über Chromatographie aufgereinigten Adaptoren wurden gegen Bindungspuffer dialysiert und anschließend auf eine Konzentration von 0,02 µg / µl eingestellt und bei -70°C gelagert.

Pro Rekrutierungsansatz wurden 100 bzw. 200 µl dialysiertes AP2, das je nach Experiment vorbehandelt wurde (Dephosphorylierung etc.) mit NRK - Membranen vermischt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Membranen 15 Minuten bei 100000xg sedimentiert und in 2x Probenpuffer + SH resuspendiert und anschließend für 10 s mit Ultraschall behandelt. Die weitere Auswertung erfolgte anhand eines Westernblots.

3.2.2.14 *in vitro* Phosphorylierung von AP 2 mit γ^{32} P - ATP

Lösungen:

| | |
|-------------------------|---------------------------|
| Phosphorylierungspuffer | 50 mM Hepes - KOH, pH 7,4 |
| | 5mM MgCl ₂ |
| | 2 mM MnCl ₂ |

Die über Hydroxyapatit aufgereinigten AP 2 - Komplexe wurden mehrere Stunden gegen Phosphorylierungspuffer dialysiert. Für die Phosphorylierungsreaktion wurde das AP 2 mit γ^{32} P - ATP versetzt und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Phosphorylierungsreaktion durch Zugabe von SDS - Probenpuffer abgestoppt und die Proben auf einem SDS - Gel aufgetragen und durch ein Autoradiogramm sichtbar gemacht.

3.2.3 Messung von Interaktionen zwischen Adaptorproteinen und Peptiden mit einem Biosensor (BIAcore)

Der Biosensor verwendet das optische Phänomen der „ surface plasmon resonance “ (SPR) um Interaktionen zwischen Biomolekülen zu untersuchen. Die Detektion beruht auf Veränderungen in der Massenkonzentrationen von Makromolekülen auf der Oberfläche des Sensorchips. Diese Veränderungen der Massenkonzentration bewirken eine Ablenkung des reflektierten Lichts (= „ resonance angle “). Das Ausmaß dieser Ablenkung hängt von verschiedenen Faktoren ab, unter anderem vom Refraktionsindex des Mediums, das sich nahe der unbestrahlten Seite des Metallfilms befindet. Der Refraktionsindex korreliert direkt mit der Konzentration von gelösten Molekülen im Medium. Durch das Konstanthalten der anderen Faktoren ist es möglich durch SPR Veränderungen in der Konzentration von Molekülen in der Lösung, die sich im Kontakt mit der Sensoroberfläche befindet zu messen.

Durch die Verwendung eines kontinuierlichen Flusses ist es möglich Interaktionen in „ Real - Zeit “ zu beobachten. Eine der beiden interagierenden Komponenten wird auf der Sensoroberfläche immobilisiert und die andere in einem kontinuierlichen Fluß über die Sensoroberfläche geleitet. Aus dem Binden von Molekülen aus der Lösung an die immobilisierte Komponente resultiert eine Ablenkung des Lichtstrahls, das als „ response “ registriert wird.

Die Auswertung der Messung erfolgt durch das BIAcore - Evaluierungsprogramm in Form eines Sensogramms, in welchem die Veränderung des Resonanzwinkels (= Resonanzsignal) gegen die Zeit aufgetragen ist. Die Veränderung des Resonanzsignals wird durch Resonanzeinheiten (RU) dargestellt. Eine Veränderung des Resonanz-signals um 1000 RU korrespondiert mit einer Zunahme der Oberflächenkonzentration auf dem Sensorchip um etwa $1 \text{ ng} / \text{mm}^2$.

3.2.3.1 Synthese von Peptiden

Die für die Synthese verwendeten Aminosäuren waren durch N - (9 fluorenyl) methoxycarbonyl (Fmoc) geschützt und wurden durch Benzotriazol-1-yl oxy-tripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphat aktiviert. Als Synthesegerät wurde der Peptid Synthesizer von Millipore verwendet. Nach dem Abspalten des Syntheseprodukts von der Trägermatrix und den Schutzgruppen wurden die Peptide über Reverse Phase HPLC gereinigt (Delta Pac C-18 - Säule, Millipore). Der Elutionsgradient erstreckte sich über 0-50%

Acetonitril in 0,1% Trifluoressigsäure/Wasser in 50 Minuten. Die Reinheit der Peptide wurde durch HPLC, UV-Spektrometrie und Massenspektrometrie überprüft.

3.2.3.2 Kopplung von Peptiden an einen Sensorchip

Der Sensorchip besteht aus einem Glasträger dessen eine Seite mit einem dünnen Goldfilm beschichtet ist. An diesem Goldfilm ist eine Oberflächenmatrix kovalent gebunden.

3.2.3.2.1 Kopplung über Aminogruppe (pI über 3,5)

Lösungen: N-hydroxysuccinimid (NHS)
 N-ethyl-N'-(dimethylaminopropyl) carbodiimid (EDC)
 1 M Ethanolaminhydrochlorid, pH 8,5
 HBS-EP-Puffer

verwendeter Chip Sensorchip CM 5

1. Aktivierung

Zunächst wurde die Sensorchipoberfläche durch eine Modifikation der Carboxylgruppen mit einer Mischung aus N-hydroxysuccinimid (NHS) und N-ethyl-N'-(dimethyl-amino-propyl)-carbodiimid (EDC) aktiviert. Dadurch wurden diese Carboxylgruppen in reaktive Ester überführt, die spontan mit Aminen und anderen nukleophilen Gruppen reagieren und kovalente Bindungen ausbilden.

Um diese Aktivierung durchzuführen wurde bei einer Flußrate von 5 µl/min insgesamt 35µl 0,05M NHS / 0,2M EDC injiziert.

2. Kopplung des Peptids

Da bei einer Kopplungsreaktion die Aminogruppen des Peptids ungeladen sein müssen, wurde die Reaktion bei einem hohen pH durchgeführt. Der optimale pH-Bereich der Ligandenlösungen hängt von der Beschaffenheit des Peptids ab.

Die Kopplungsreaktion wurde ebenfalls bei einer Flußrate von 5 µl/min durchgeführt, wobei insgesamt 35µl Ligandenlösung (Peptidkonzentration = 200 µg/ml) injiziert wurde.

3. Deaktivierung

Durch die Deaktivierung wurden überschüssige reaktive Ester entfernt, sowie durch die hohe Ionenstärke der Deaktivierungslösung nicht-kovalent gebundenes Material entfernt. Für die Deaktivierung wurden 35µl 1M Ethanolaminhydrochloridlösung pH 8,5 für 7 Minuten injiziert.

3.2.3.2.2 Kopplung über Streptavidin - Biotin (pI unter 3,5)

Da der isoelektrische Punkt des MPR 46 - Peptids 49-67 unter 3,5 liegt, mußte dieses über Streptavidin-Biotin an einen speziellen Sensorchip (Sensorchip SA mit immobilisiertem Streptavidin) gekoppelt werden, da eine Kopplung des Peptids über Aminokopplung nicht möglich war. Dazu mußte zunächst das Peptid biotinyliert werden.

3.2.3.2.2.1 Biotinylierung von Peptiden

Lösungen: 0,1 M NaHCO₃, pH 8,5
 Biotin-LC-NHS 10 mg/ml

Für die Biotinylierung von Peptiden wurde entweder wasserlösliches oder in DMSO gelöstes Biotin verwendet, das jeweils vor Gebrauch frisch angesetzt wurde. In die Biotinylierungsreaktion wurde Biotin im Verhältnis von 1:10 zur Peptidkonzentration eingesetzt.

Folgendes Beispiel zeigt einen solchen Reaktionsansatz:

1 mg Peptid (0,5 µmol) in H₂O bidest gelöst
220 µl NaHCO₃
227 µl Biotin-LC-NHS (5 µmol)
ad 1000 µl NaHCO₃

Der Biotinylierungsansatz wurde 90 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Drehrad inkubiert und anschließend 15 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert. Das freie Biotin sowie das nicht gekoppelte Peptid wurde über eine C 18 - Cartridge gereinigt und anschließend durch Massenspektrometrie überprüft.

3.2.3.2.2.2 Reinigung von Peptiden über eine C 18 - Cartridge

Lösungen: Methanol p.a.
 0,1% Trifluoressigsäure in Wasser
 30-70 % Acetonitril, 0,1% TFA in Wasser

Zunächst wurde die Cartridge mit 2ml Methanol, 5 ml Wasser und anschließend mit 5ml 0,1% TFA vorgespült. Die Spülflüssigkeit wurde mit einer 5ml Plastikspritze durch die Cartridge gepresst. Für alle folgenden Schritte wurde eine Spritze als Reservoir auf die Cartridge gesetzt, in welche die Probe und anschließend der Elutionspuffer mit einer Pasteurpipette gefüllt wurde. Das Spülen der Cartridge mit diesen Lösungen erfolgte durch Schwerkraft.

Zunächst wurde die Cartridge mit bis zu 10 mg Peptid in 1ml 0,1% TFA beladen und anschließend mit 30ml 0,1% TFA gewaschen und der Durchfluß in 1,5ml Fraktionen gesammelt. Danach erfolgte die Elution mit 30 - 70% (gewählt nach dem Elutionsprofil der HPLC) in 0,1% TFA, wobei der Durchfluß in 10x0,5ml Fraktionen gesammelt wurde. Nach Beendigung der Elution wurden die Eluatfraktionen bei OD_{280nm} gegen 0,1% TFA gemessen und diejenigen Fraktionen, die das Peptid enthalten wurden auf ca. 0,1ml in der Speedvac eingengt, um das Acetonitril zu entfernen. Anschließend wurden die Proben auf 1ml mit bidest Wasser aufgefüllt, lyophilisiert, noch einmal in 1ml bidest Wasser aufgenommen und erneut lyophilisiert. Die Lagerung des getrockneten Peptids erfolgte bei $-20^{\circ}C$.

3.2.3.2.2.3 Kopplung des biotinylierten Peptids

Verwendeter Sensorchip

Sensorchip SA

Für die Immobilisierung des biotinylierten Peptids wurde dieses in einer Konzentration von 50 µg/ml bei einer Flußrate von 5 µl/min für 7 Minuten injiziert(insgesamt 35 µl).

3.2.3.2.3 Messung der Interaktion

Lösungen:

BIA-Puffer: 20 mM Hepes-NaOH, pH 7,0
 150 mM NaCl
 10 mM KCl
 2mM MgCl₂
 0,2 mM DTT

Regenerationslösung: 10 mM NaOH
 0,5 % SD

Die zu untersuchenden Proben wurden gegen BIA - Puffer dialysiert und kurz vor Verwendung für 15 Minuten bei 13000xg zentrifugiert.

Die Injektion der Proben erfolgte bei einer Flußrate von 10 - 20 µl/min. Nach einer Assoziation von 2 Minuten erfolgte eine zweiminütige Dissoziation, wobei die Probenlösung durch BIA - Puffer verdrängt wurde.

Anschließend wurden gebundene Proteine durch eine kurze Injektion (15 Sekunden) von Regenerationslösung entfernt, wodurch die Ausgangsbasislinie wieder erreicht wurde.

Die Auswertung erfolgte über das BIA - Evaluierungsprogramm 2.1.

3.2.3.2.4 Auswertung der gemessenen Interaktionen

Die Berechnung der Assoziationskonstante k_a , der Dissoziationskonstante k_d sowie der Gleichgewichtskonstante K_D erfolgte mit der Hilfe des BIA - Evaluierungsprogramms. Für die Berechnung wurden folgende Parameter festgelegt:

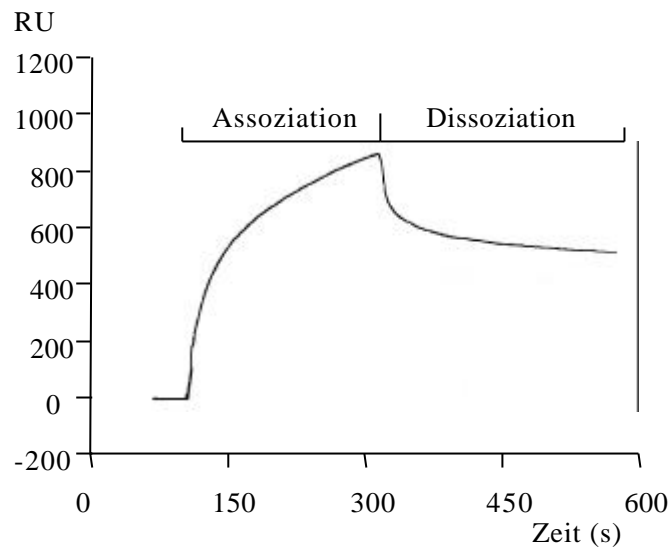
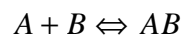


Abb. 3.3 Sensogramm: Bindung eines Proteins an ein immobilisiertes Peptid.

Assoziation: Der Beginn der Assoziationsphase wurde als der Zeitpunkt 15 bis 20s nachdem der Wechsel von der Pufferlösung auf die Probenlösung erfolgt ist festgelegt, um Effekte, welche durch den „Puffershift“ verursacht werden auszuschließen.

Dissoziation: Als Beginn der Dissoziationsphase wurde der Zeitpunkt nach der Rückkehr zur Pufferlösung festgelegt. Um die Adaptorkonzentration zu berechnen wurde eine molekulare Masse von jeweils 280 kDa angenommen.

Desweiteren wurde eine Kinetik 1. Ordnung für die Berechnung zugrunde gelegt.



Die Assoziationskonstante k_a die Dissoziationskonstante k_d sowie die Gleichgewichtskonstante K_D wurden nach folgenden Formeln berechnet.

Berechnung der Gleichgewichtskonstanten K_D :

$$K_D \Leftrightarrow \frac{k_d}{k_a}$$

Berechnung der Assoziationskonstante k_a :

$$R = R_{eq} (1 - e^{-(k_a c N + k_d)(t - t_0)})$$

t = Zeit (in Sekunden)

R_{eq} = „ steady state response level ”

c = molare Konzentration der Adaptoren in der injizierten Lösung

N = sterischer Interferenzfaktor (beschreibt die Wertigkeit der Interaktion zwischen den Adaptorproteinen und dem MPR 64 Tail Peptid, gleich 1 gesetzt)

Berechnung der Dissoziationskonstante k_d :

$$R = R_0 e^{-k_d(t - t_0)}$$

R_0 = „ response level ” zum Zeitpunkt $t = 0$ (= Beginn der Dissoziationsphase)

4. Ergebnisse

4.1 Präparation von AP 1 und AP 2

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluß des Phosphorylierungszustandes der Adaptor - Komplexe auf ihre Interaktion mit cytoplasmatischen Rezeptordomänen zu untersuchen. Für die Analyse dieser Interaktionen wurden Adaptorproteine verwendet, die aus Schweinehirn aufgereinigt wurden. Untenstehendes Schema zeigt die einzelnen Schritte dieser Aufreinigung.

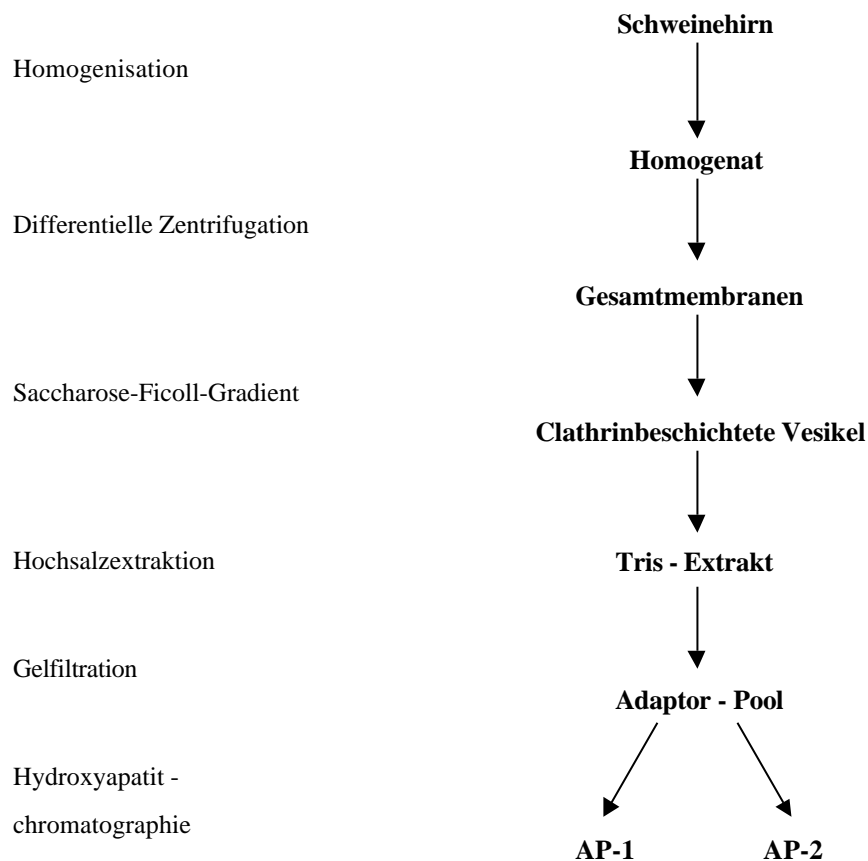


Abb. 4.1: Schematische Darstellung der Adaptorpräparation.

Von den aus Schweinehirn aufgereinigten Clathrin beschichteten Vesikel wurde ein „Tris-Extrakt“ gewonnen und daraus AP 1 und AP 2 durch eine Gelfiltration und anschließender Hydroxyapatitchromatographie aufgereinigt.

Aus jeweils 300 g Schweinehirn wurde durch differentielle Zentrifugation und anschließender Extraktion der präparierten Clathrinbeschichteten Vesikel (CCV) mit 0,5 M Tris 5 ml „Tris-Extrakt“ mit einer Proteinkonzentration von 2 - 3 mg / ml gewonnen.

Um die Adaptoren von Clathrin und niedermolekularen Proteinen zu trennen, wurde zunächst eine Gelfiltration mit einer Superose 6 Säule (Säulengröße = 1,6 cm x 55cm, Bettvolumen = 130 ml) durchgeführt. Abbildung 4.2 zeigt das Elutionsprofil dieser Gelfiltration.

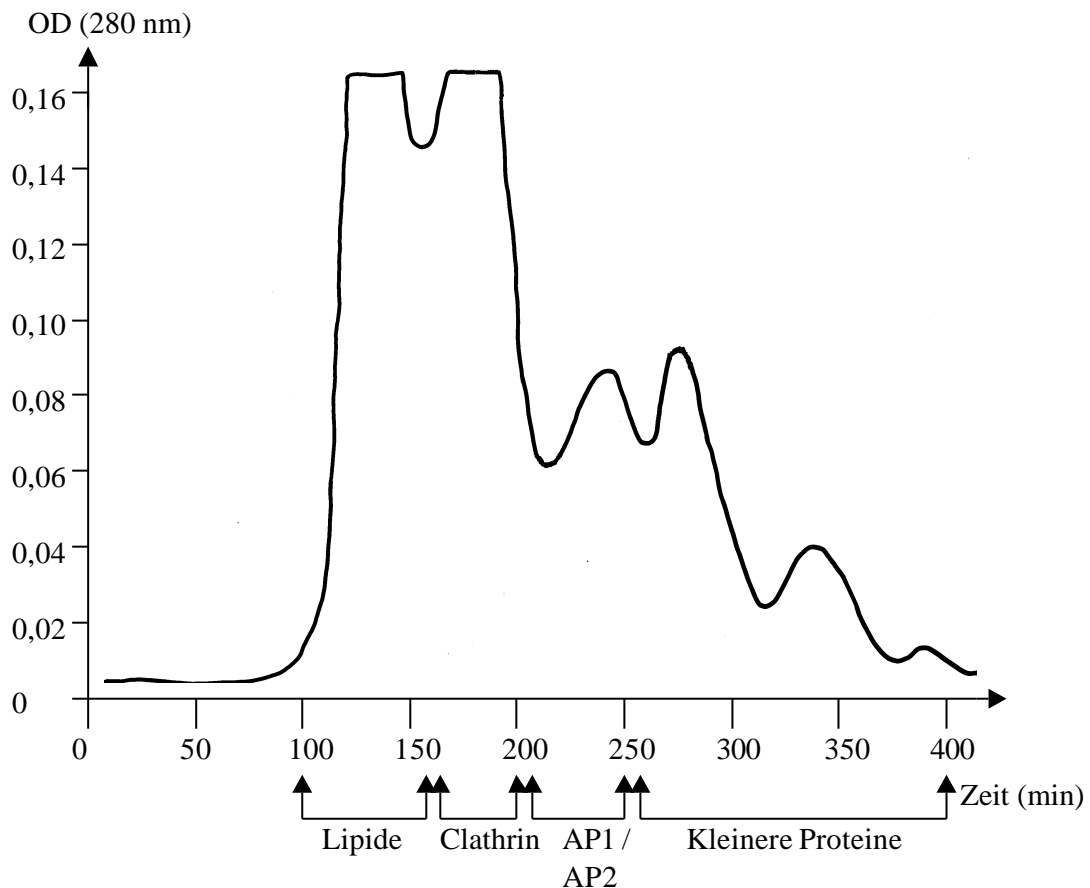


Abb. 4.2: Gelfiltration von CCV's.

Die durch differentielle Zentrifugation aufgereinigten CCV wurden mit 0,5 M Tris, pH 7,5 extrahiert, bei 100000xg abzentrifugiert und der Adaptor - haltige Überstand über eine Superose 6 Säule aufgetrennt. Die Elution erfolgte bei einer Flußrate von 0,3 ml / min in 0,5 M Tris und einer Fraktionsgröße von 1,5 ml.

Auf der X-Achse ist der zeitliche Verlauf der Elution aufgetragen. Die Pfeile markieren die zu den angegebenen Zeiten eluierten Proteine.

Die Y-Achse zeigt die Absorption der Proteine bei OD_{280nm} .

Der erste Peak des Elutionsprofils ($t_{min} = 100-160$) beinhaltete vorwiegend Lipide. Im weiteren Verlauf der Gelfiltration erfolgte die Elution von Clathrin ($t_{min} = 160-200$), gefolgt von den Adaptorproteinen ($t_{min} = 200-250$) und danach niedermolekulare, nicht näher

bestimmte Proteine ($t_{\min} = 250-400$). Da die beiden Adaptor - Komplexe ein sehr ähnliches Molekulargewicht aufweisen, ermöglicht die Gelfiltration keine Trennung zwischen AP 1 und AP 2 sondern lediglich eine Anreicherung.

Die Adaptor - haltigen Fraktionen wurden mittels SDS - Gelelektrophorese und anschließender Coomassiefärbung der aufgetrennten Proteine ermittelt. Positive Fraktionen wurden für die weitere Aufreinigung vereinigt . Das Volumen des AP - Pools betrug 12 ml und wies in der Regel eine Proteinkonzentration von 0,1 - 0,2 mg / ml auf.

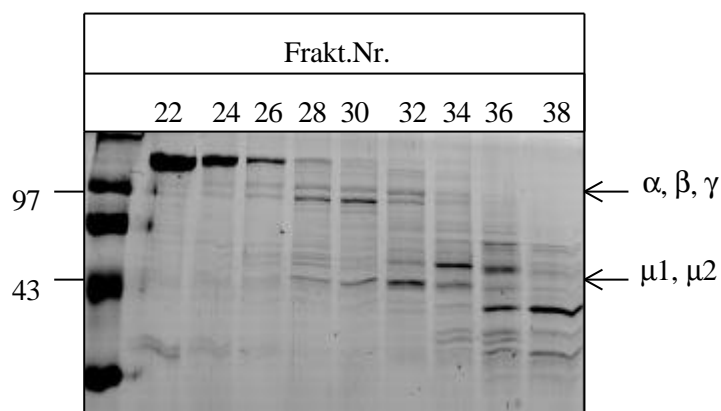


Abb. 4.3: Coomassie - gefärbtes SDS - Gel verschiedener Superose-Fractionen.

Es wurden jeweils 20 μ l pro Fraktion auf einem 10 % SDS - Gel aufgetragen und mit Coomassie angefärbt. Die Pfeile markieren die großen - und mittleren Untereinheiten der beiden Adaptor-Komplexe. In den Fraktionen 22 - 26 befindet sich vorwiegend Clathrin, während sich die beiden Adaptorkomplexe vor allem in den Fraktionen 28 - 32 befinden.

Die weiteren Fraktionen enthalten niedermolekulare Proteine.

Die abschließende Trennung von AP1 und AP2 wurde mit Hilfe einer Hydroxyapatitchromatographie durchgeführt. Da AP1 bzw. AP2 bei unterschiedlichen Phosphatkonzentrationen eluieren, erfolgte die Trennung der beiden Komplexe durch einen K_2HPO_4 -Salzgradienten. Die Adaptor-haltigen Fraktionen (26 - 32) wurden vereinigt und auf die Hydroxyapatitsäule geladen (Säulengröße = 0,5 cm x 5 cm, Bettvolumen der Säule = 1 ml)
Abbildung 4.4. zeigt das Elutionsprofil dieser Hydroxyapatitchromatographie.

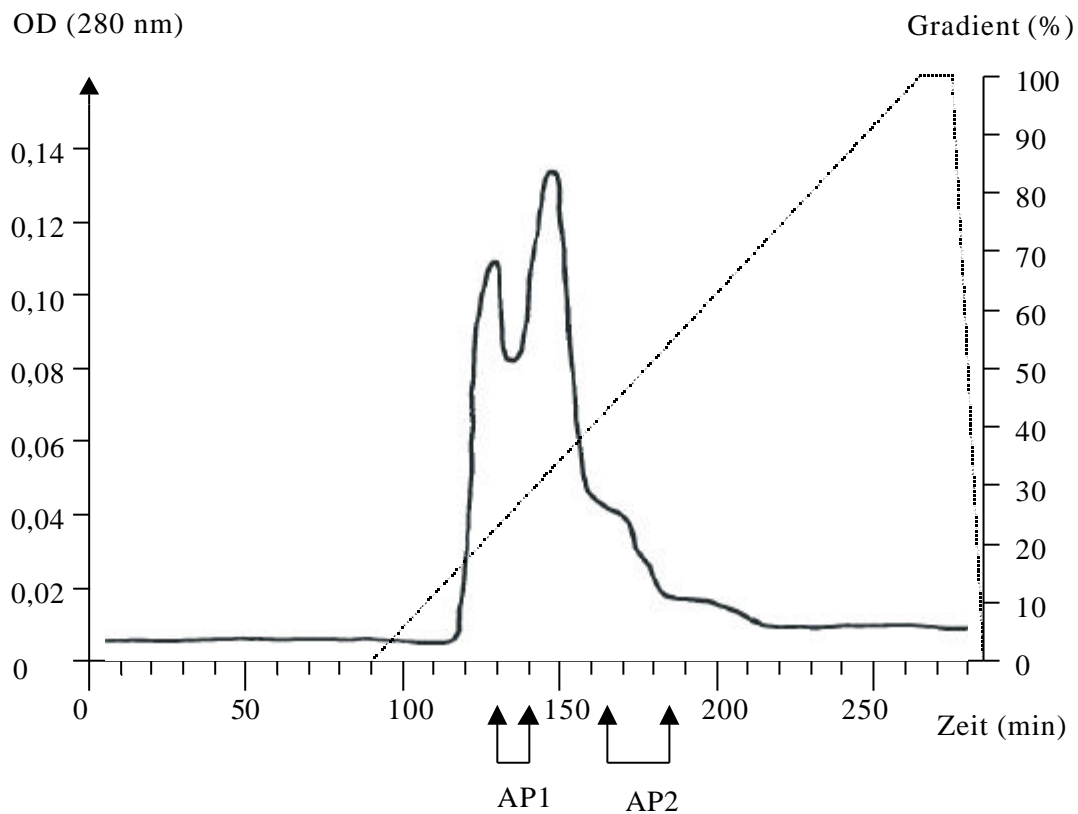


Abb. 4.4: Elutionsprofil der Hydroxyapatitchromatographie.

12 ml eines AP - Pools wurden auf einer mit 10 mM K_2HPO_4 äquilibrierten HA - Säule mit einer Flußrate von 0,2 ml/min aufgetragen. Nachdem die Säule bei gleicher Flußrate weitere 90 Minuten mit dem Auftragspuffer gespült worden war, erfolgte die Elution innerhalb von 3 Stunden mit einem Gradienten von 10 mM bis 500 mM K_2HPO_4 bei einer Flußrate von 0,2 ml/min. Während der Elution wurden 1 ml Fraktionen gesammelt.

Durch die gestrichelte Linie ist der Salzgradient dargestellt. Die X-Achse zeigt den zeitlichen Verlauf der Chromatographie. Die Pfeile markieren die Fraktionen, welche AP 1 bzw. AP 2 enthalten.

Auf der linken Y-Achse ist die Absorption der Proteine dargestellt und auf der rechten Y-Achse der Salzgradient.

Die anschließende Analyse der einzelnen Fraktionen erfolgte durch eine SDS - Gelelektrophorese mit anschließender Coomassiefärbung der aufgetrennten Proteine.

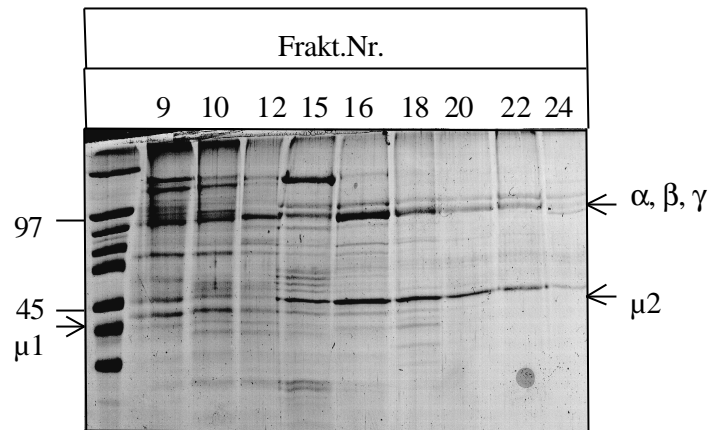


Abb. 4.5: Coomassie-gefärbtes SDS - Gel von Fraktionen der HA - Chromatographie.

90 μ l pro Fraktion wurden mit 10 % TCA gefällt, auf einem 10 % SDS - Gel aufgetrennt und anschließend durch Coomassie angefärbt.

Die beiden Pfeile markieren die mittlere Untereinheit des AP 1 - sowie des AP 2 - Komplexes. Diese mittleren Untereinheiten lassen sich im Gegensatz zu den großen Untereinheiten aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe (50 bzw. 47 kDa) im Gel leicht voneinander unterscheiden.

AP 1 ist in den Fraktionen 9 und 10 enthalten während AP 2 vorwiegend in den Fraktionen 15 bis 24 zu finden ist. Auf die Weise konnten ca 0,2 mg AP 1 sowie ca 0,8 mg AP 2 aufgereinigt werden.

Für die nachfolgenden Experimente war eine saubere Trennung von AP 1 und AP 2 von großer Wichtigkeit. Aus diesem Grund sollte eine eventuelle Kontamination von AP 1 - haltigen Fraktionen mit AP 2 bzw. eine Kontamination von AP 2 - haltigen Fraktionen mit AP 1 durch eine Westernblotanalyse ausgeschlossen werden. Von den Fraktionen 10, 14, 17 und 18 wurden jeweils zwei Proben auf einem SDS - Gel aufgetrennt und anschließend ein Westernblot durchgeführt. Die Immunodetektion erfolgte mit einem monoklonalen Antikörper gegen die γ - und die α - Untereinheit.

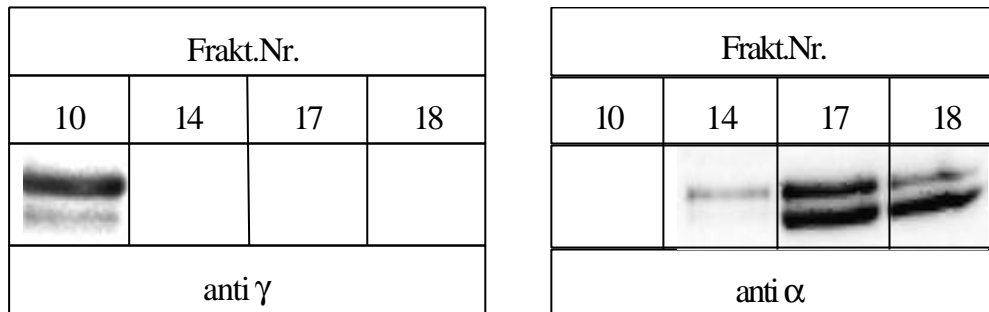


Abb.4.6: Westernblot von Fraktionen der HA - Chromatographie.

Pro Fraktion wurden 2 x 100 μ l Probenvolumen nach der Methode von Wessel und Flügge gefällt, auf einem 10 % SDS - Gel aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Für die Immunodetektion wurden monoklonale Antikörper (Sigma) gegen die γ - und die α - Untereinheit in einer Verdünnung von 1:2000 eingesetzt.

Die Westernblotanalyse mit dem Antikörper gegen die γ - Untereinheit zeigt, daß lediglich bei Fraktion 10 und nicht bei den weiteren Fraktionen (14, 17 und 18) ein Signal detektierbar ist. Die Immunodetektion mit dem Antikörper gegen die α - Untereinheit zeigt dagegen ein schwaches Signal bei Fraktion 14 sowie ein starkes Signal bei Fraktion 17 und 18. Diese Analyse zeigt, daß die AP 1 - Fraktionen 9 und 10 kein AP 2 enthalten und daß in den AP 2 - Fraktionen (15 bis 24) kein AP 1 enthalten ist.

Demzufolge kann bei den nachfolgenden Interaktionsanalysen von AP 1 und AP 2 mit cytoplasmatischen Rezeptordomänen eine Konkurrenz der beiden Adaptorkomplexe um die Bindung an das Peptid oder eine gegenseitige Beeinflussung ausgeschlossen werden.

4.2 Einfluß der Adaptordephosphorylierung auf ihre Interaktion mit den cytoplasmatischen Tail des MPR 46 - Rezeptor

Ziel dieser Arbeit war es den Einfluß des Phosphorylierungsgrades der Adaptoren auf ihre Interaktion mit cytoplasmatischen Rezeptordomänen zu untersuchen. Mit Hilfe eines Biosensors läßt sich die (*in vitro*) Interaktion zwischen Adaptoren und Rezeptor Tail - Peptiden schnell und mit geringen Probenmengen analysieren. Als Rezeptor Tail - Peptide wurden zwei bereits in früheren Studien verwendete MPR 46 - Peptide (Peptid 49 - 67 und Peptid 2 - 16) verwendet (siehe Einleitung).

4.2.1 Kopplung der MPR 46 Peptide 49 - 67 und 2 - 16 an den Sensorchip

Zunächst wurde das Peptid 49 - 67 in den Interaktionsanalysen eingesetzt, da bereits bekannt war, daß sowohl AP 1 als auch AP 2 an dieses Peptid binden können. Das Peptid enthält eine Casein Kinase II Phosphorylierungsstelle und ein Di - Leucinmotiv, das eines der drei Internalisierungssignale darstellt.

G D D Q C G E E S E E R D D H L L P M - C O O H

Abb. 4.7: Aminosäuresequenz des MPR 46 - Peptids 49 - 67

Die unterstrichenen Bereiche zeigen die Casein Kinase II Phosphorylierungsstelle (Serin 57) sowie das Di - Leucin - Motiv (Leucin 64 und 65).

Als zweites Peptid wurde das Peptid 2 - 16 verwendet, das nur mit AP 2 interagiert. Dieses Peptid enthält ebenfalls ein Internalisierungssignal, das jedoch nicht der Klasse der Tyrosinhaltigen - oder Leucin - haltigen Motive zugerechnet werden kann.

R L V V G A K G M E Q F P H L

Abb.4.8: Aminosäuresequenz des MPR 46 Peptids 2 - 16

Die unterstrichenen Aminosäuren markieren das Internalisierungssignal. Das essentielle Phenylalanin ist fett dargestellt.

Da der isoelektrische Punkt des Peptids 49 - 67 unter 3,5 lag, war eine Kopplung an den Sensorchip CM5 über Aminogruppen nicht möglich. Deshalb erfolgte die Immobilisierung an einen mit Streptavidin derivatisierten Sensorchip. Das Peptid wurde nach der Synthese mit Biotin - LC - NHS biotinyliert, anschließend über eine C 18 Cartridge aufgereinigt und die Biotinylierung sowie die Reinheit des Peptids über Reverse Phase - HPLC und Massenspektrometrie analysiert. Für die Kopplung des biotinylierten Peptids wurde der Sensorchip zunächst 3 x mit NaOH aktiviert und anschließend 35 µl Peptidlösung (Konzentration = 50 µg / ml) injiziert.

Im Gegensatz zum Peptid 49 - 67 lag der isoelektrische Punkt des Peptids 2 -16 über 3,5 so daß die Immobilisierung des Peptids an den Sensorchip CM5 über Aminogruppen erfolgen konnte.

Nach der Synthese wurde das Peptid über Reverse Phase HPLC aufgereinigt und die Reinheit des Peptids durch Reverse Phase HPLC, UV - Spektrometrie und Massen-spektrometrie überprüft.

Für die Kopplung des Peptids wurde der Sensorchip CM5 zunächst durch 0,05 M NHS / 0,2 M EDC aktiviert und anschließend die Peptidlösung (200 µg / ml) injiziert. Abschließend erfolgte die Deaktivierung des Sensorchips durch Injektion von 1 M Ethanolaminhydrochloridlösung.

Der gesamte Kopplungsvorgang kann während der Ausführung über das Sensorgramm kontrolliert werden. Untenstehende Abbildung zeigt als Beispiel die Kopplung des Peptids 2 - 16.

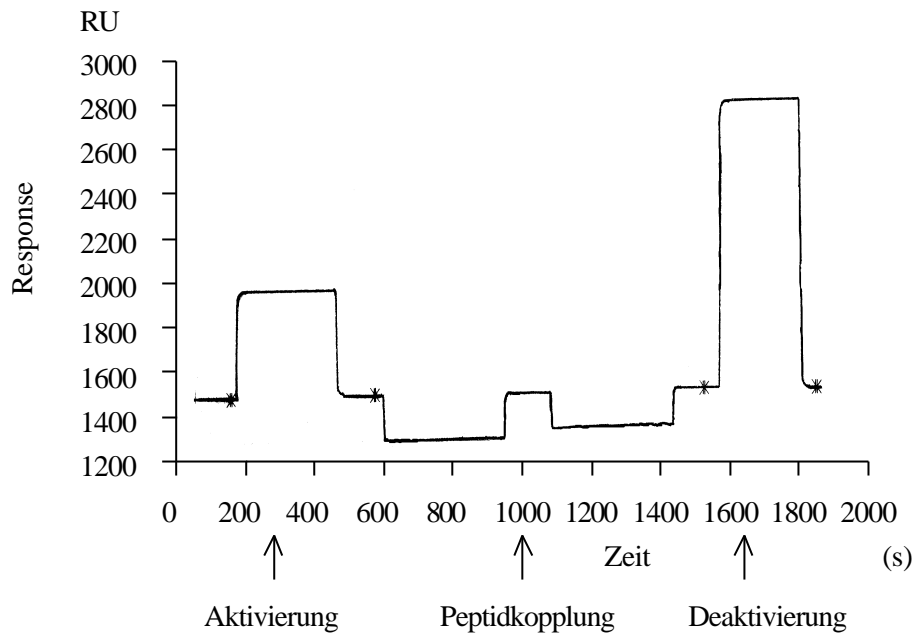


Abb. 4. 9: Kopplung des MPR 46 Peptids 2 - 16 an den Sensorchip CM5

Durch die Injektion von 35 μ l 0,05 M NHS / 0,2 M EDC bei einer Flußrate von 5 μ l / min wurde der Sensorchip aktiviert und anschließend bei derselben Flußrate 35 μ l der Peptidlösung (200 μ g / ml) injiziert. Die abschließende Deaktivierung erfolgte durch die Injektion von 35 μ l 1 M Ethanolaminhydrochloridlösung.

Die X-Achse zeigt den zeitlichen Verlauf der Kopplungsreaktion und die Y-Achse die Änderung des SPR - Signals.

4.2.2 Einfluß von alkalischer Phosphatase auf die Interaktion von AP 1 und AP 2 mit dem MPR 46 - Peptid 49 - 67

Für die Dephosphorylierungsreaktion wurden die beiden Adaptorkomplexe gegen BIA-Puffer dialysiert und anschließend jeweils AP 1 bzw. AP 2 mit 2 Units alkalischer Phosphatase inkubiert. Das Abstoppen der Dephosphorylierungsreaktion erfolgte durch Abkühlen der Proben auf Eis. Als Kontrolle wurde der gleiche Ansatz ohne Phosphatase inkubiert und

anschließend die Interaktion der jeweiligen AP - haltigen Ansätze mit dem Peptid 49 - 67 gemessen.

Die Auswertung der Messung erfolgte durch das BIAcore - Evaluierungsprogramm 2.1 anhand eines Sensorgramms (siehe Abbildung 4.10 und 4.11). In diesem Sensorgramm wird die Änderung des SPR - Signals (siehe Material und Methoden) in Abhängigkeit von der Zeit aufgenommen. Da die Änderung des SPR - Signals der Veränderung der Massenkonzentration auf der Sensorchipoberfläche entspricht, läßt sich anhand der Kurve die Interaktion (Assoziation und Dissoziation) der injizierten Probe mit dem gekoppelten Rezeptor-Peptid verfolgen.

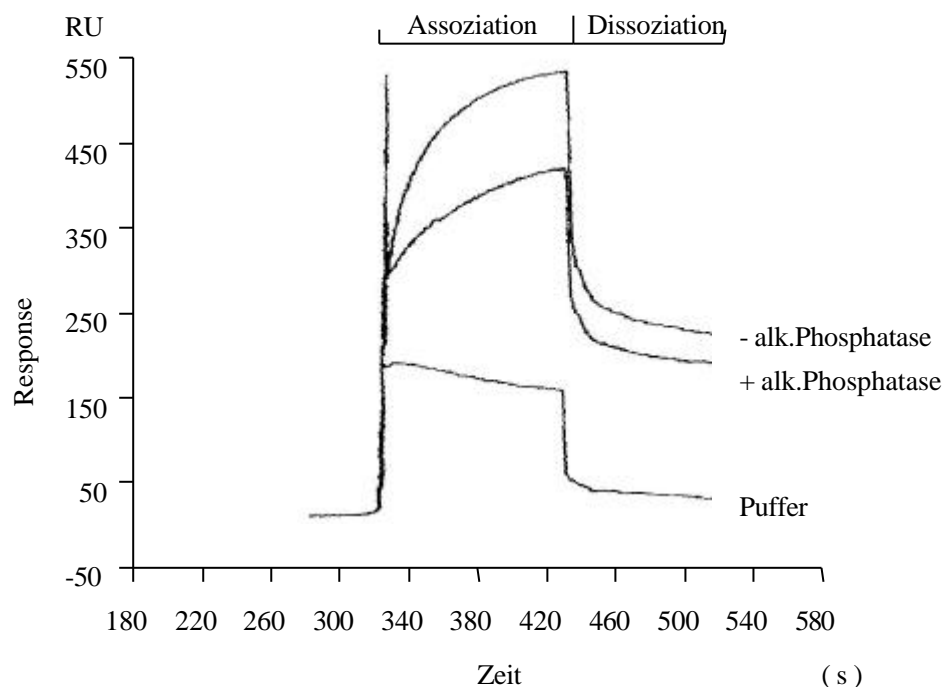


Abb.4.10 Sensorgramm: Einfluß der Dephosphorylierung von AP1 auf die Bindung an das MPR 46 - Peptid 49 - 67.

AP 1 (100 $\mu\text{g} / \text{ml}$) wurde mit 2 U alkalischer Phosphatase bzw. als Kontrolle ohne Phosphatase 30 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend die Interaktion mit dem MPR 46 - Peptid 49 - 67 gemessen. Die Injektion der Proben erfolgte bei einer Flußrate von 20 $\mu\text{l} / \text{min}$ (Konzentration = 2,5

μg). Nach einer Assoziation von zwei Minuten erfolgte eine zweiminütige Dissoziation wobei die Probenlösung durch Puffer verdrängt wurde.

Auf der X - Achse ist der zeitliche Verlauf der Messung (in Sekunden) dargestellt und auf der Y - Achse die Änderung des SPR - Signals („ response units “).

Die Interaktionsanalyse der unbehandelten AP 1 - Komplexe (= ohne Phosphatase) zeigte erwartungsgemäß eine Bindung an das MPR 46 Peptid 49 - 67. Durch die Vorinkubation von AP1 mit alkalischer Phosphatase wurde diese Bindung nur geringfügig vermindert.

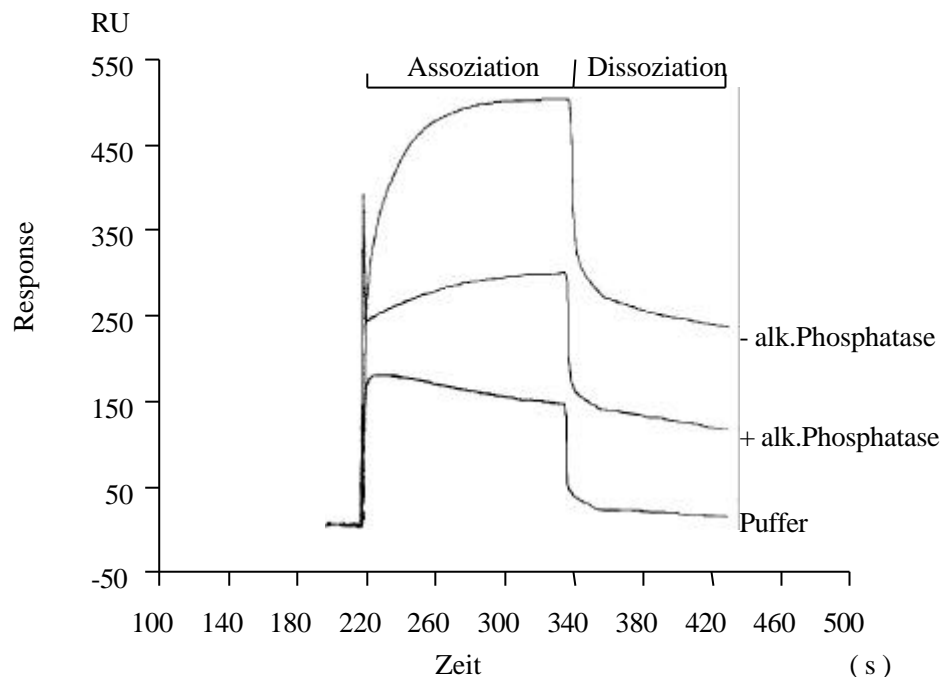


Abb. 4.11 Sensorgramm: Einfluß der alkalischen Phosphatase auf die Bindung von AP 2 an das MPR 46 - Peptid 49-67.

AP 2 ($100 \mu\text{g} / \text{ml}$) wurde mit 2 U alkalischer Phosphatase bzw. als Kontrolle ohne Phosphatase 30 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend die Interaktion mit dem MPR 46 - Peptid 49 - 67 gemessen. Siehe Abb. 4.

Auf der X - Achse ist der zeitliche Verlauf der Messung dargestellt und auf der Y - Achse die Änderung des SPR - Signals.

Auch bei AP 2 zeigte sich eine Bindung an das MPR 46 Peptid 49 - 67. Jedoch resultierte im Vergleich zu AP 1 aus der Vorinkubation von AP 2 mit Phosphatase eine signifikante

Abnahme der Bindung an das Peptid. Aus diesem Grund konzentrierte sich die weiteren Untersuchung auf AP 2.

Mit der Hilfe des BIAcore Evaluierungsprogramms wurden für AP1 und AP 2 die jeweiligen Assoziations (k_a) - und Dissoziationskonstanten (k_d) sowie die Gleichgewichtskonstanten (K_D) errechnet (siehe Material und Methoden).

| AP 1 | | | |
|-----------------|-------------------|----------------------|-----------------------|
| alk.Phosphatase | k_a [1/M x s] | k_d [1/s] | $K_D = k_a/k_d$ [nM] |
| - | 15×10^4 | $3,9 \times 10^{-3}$ | 26 |
| + | $8,9 \times 10^4$ | $3,4 \times 10^{-3}$ | 38 |

Tab. 4.1: Berechnung der Assoziations -, Dissoziations - sowie der Gleichgewichtskonstante von Phosphatase behandeltem und unbehandeltem AP 1

Bei AP 1 resultierte aus der Phosphatase - Behandlung nur eine geringe Abnahme der Assoziationskonstante, während die Dissoziationskonstante nahezu gleich blieb. Ebenso zeigt die Gleichgewichtskonstante nur eine geringe Abnahme der Bindungsaffinität.

| AP 2 | | | |
|-----------------|-------------------|----------------------|-----------------------|
| alk.Phosphatase | k_a [1/M x s] | k_d [1/s] | $K_D = k_a/k_d$ [nM] |
| - | 25×10^4 | $4,1 \times 10^{-3}$ | 16 |
| + | $1,5 \times 10^4$ | $5,5 \times 10^{-3}$ | 366 |

Tab. 4.2: Berechnung der Assoziations -, Dissoziations - sowie der Gleichgewichtskonstante von Phosphatase behandeltem und unbehandeltem AP 2.

Bei AP 2 dagegen nahm die Assoziationskonstante bei der Phosphatase behandelten Probe im Vergleich zur Kontrolle um das 15 - fache ab, während die Dissoziationskonstante wie bei AP 1 ungefähr gleich blieb. Die Berechnung der Gleichgewichtskonstante ergab eine deutliche Verminderung der Bindungsaffinität.

Somit wird durch die Inkubation von AP 2 mit Phosphatase die Assoziation an das MPR 46 Rezeptor Tail - Peptid beeinflusst , während die Dissoziation der AP 2 - Komplexe nahezu unverändert bleibt.

4.2.3 Dosisabhängigkeit der AP 2 - Dephosphorylierung

Als nächstes wurde die Dosisabhängigkeit der Dephosphorylierung von AP 2 mit alkalischer Phosphatase untersucht. Zu diesem Zweck wurde AP 2 mit jeweils unterschiedlichen Mengen an alkalischer Phosphatase inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung der Interaktion der dephosphorylierten Adaptoren mit dem MPR 46 - Peptid 49 - 67 am BIAcore 2000. Als Kontrolle wurden unbehandelte Adaptoren analysiert.

Die Auswertung erfolgte wiederum mit dem BIAcore - Evaluierungsprogramm. Zur besseren Veranschaulichung sind die einzelnen Kurven des Sensogramms zu einer Graphik zusammengefaßt. Untenstehende Graphik zeigt die für die jeweils eingesetzten Mengen an Phosphatase nach einer 2 minütigen Assoziations - und Dissoziationsphase gemessene Restbindung in Abhängigkeit von der Negativkontrolle (AP 2 ohne Phosphatase).

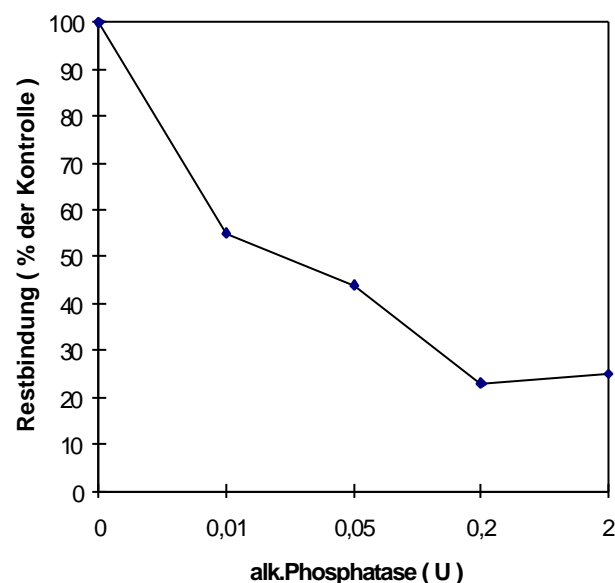


Abb. 4.12: Dosisabhängigkeit der AP 2 - Dephosphorylierung.

AP 2 (60 $\mu\text{g} / \text{ml}$) wurden mit verschiedenen Mengen (0.01, 0.05, 0.2 und 2 U) an alkalischer Phosphatase bzw. als Kontrolle ohne Phosphatase für 30 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend jeweils die Interaktion mit dem MPR 46 - Peptid 49 - 67 gemessen. Die Injektion der Proben (0,3 μg) erfolgte bei einer Flußrate von 10 $\mu\text{g} / \mu\text{l}$.

Auf der X-Achse sind die eingesetzten Mengen (in Units) an alkalischer Phosphatase aufgetragen. Die Y-Achse zeigt die jeweiligen gemessenen Restbindungen in Abhängigkeit (%) von der Negativkontrolle (= ohne Phosphatase).

Die Bindung der dephosphorylierten AP 2 - Komplexe an das MPR 46 - Peptid 49-67 nahm mit zunehmender Phosphatasekonzentration beständig ab. Ab einer Konzentration von 0,2 Units war die Bindung an das Peptid jedoch nicht weiter inhibierbar. Dies läßt darauf schließen, daß neben der durch Phosphatasebehandlung beeinflußbaren Bindung noch eine weitere, Phosphatase - insensitive „ Bindungskomponente “ vorhanden ist.

Mit Hilfe des BIAcore - Evaluierungsprogramms wurden zusätzlich die jeweiligen Gleichgewichtskonstanten (K_D - Werte) errechnet. Sie zeigen ebenfalls, daß mit zunehmender Phosphatasekonzentration die Bindungsaffinität kontinuierlich abnimmt. Jedoch ließen sich die Werte für 0,2 und 2 Units Phosphatase nicht berechnen.

| alk.Phosphatase [U] | K_D [nM] |
|-----------------------|--------------|
| 0 | 12 |
| 0,01 | 60 |
| 0,05 | 260 |
| 0,2 | n. ber. |
| 2 | n. ber. |

Tabelle 4.3: Berechnung der Gleichgewichtskonstanten

In der ersten Spalte sind die eingesetzten Mengen an alkalischer Phosphatase in Units aufgetragen. Die zweite Spalte enthält die jeweiligen errechneten K_D - Werte. Für 0,2 und 2 Units ließen sich die Werte nicht berechnen.

4.2.4 Inhibierung der Dephosphorylierung von AP 2 durch verschiedene Inhibitoren

Die vorausgegangenen Experimente zeigten eine Beeinflussung der Bindung von AP 2 an das MPR 46 - Peptid 49-67 durch eine Vorinkubation von AP 2 mit alkalischer Phosphatase. Im folgenden Experiment sollte nun durch den Einsatz von Phosphataseinhibitoren überprüft werden, ob die beobachteten Effekte tatsächlich auf die Aktivität der Phosphatase zurückzuführen sind. Daher wurde AP 2 mit 0,05 U alkalischer Phosphatase in Gegenwart von NaF (10 mM), Natriumpyrophosphat (1mM) oder Natriumvanadat (1 mM) inkubiert. Zur Kontrolle wurde AP 2 ohne Inhibitoren bzw. ohne Phosphatase jedoch mit Inhibitoren inkubiert. Die in diesem Experiment eingesetzte Menge an Phosphatase wurde so gewählt, daß daraus eine etwa 50 %ige Abnahme der Bindung an das Peptid resultierte und somit inhibitorische Effekte der Phosphataseinhibitoren gut zu analysieren waren.

Für die Messung der Interaktion der jeweiligen Ansätze wurde das MPR 46 - Peptid 2 - 16 verwendet, an das nur AP 2 und nicht AP 1 binden kann. Wie schon im vorausgegangenen Experiment wurde auch hier die mittels Sensorgramm gemessene Restbindung in einem Balkendiagramm zusammengefaßt.

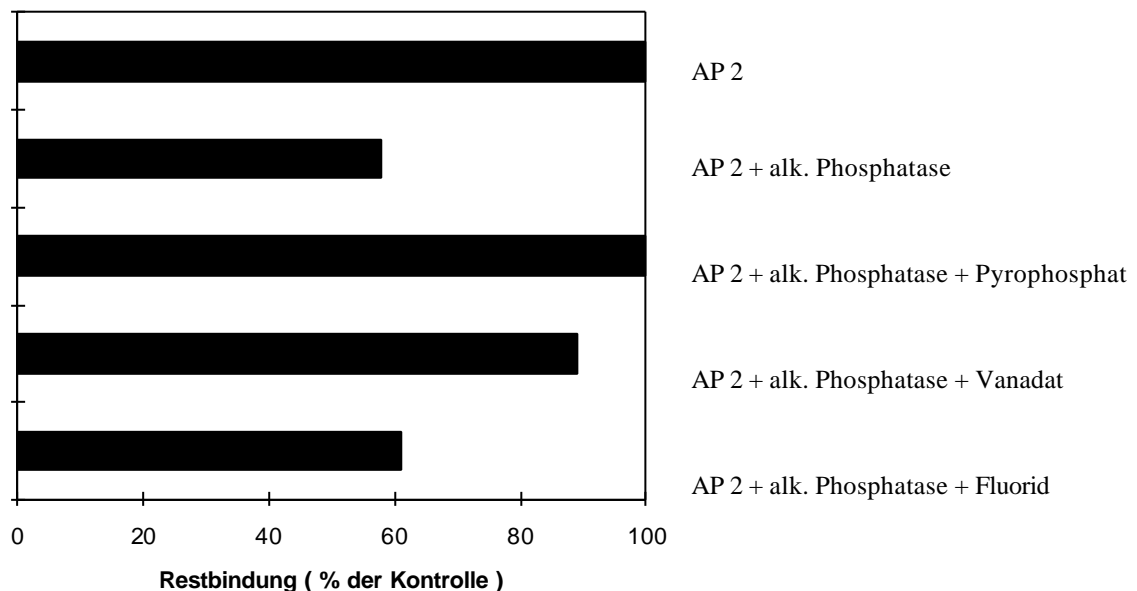


Abb.4.13: Inhibierung der AP 2 Dephosphorylierung durch verschiedene Inhibitoren

AP 2 (70 µg / ml) wurde mit 0,05 U alkalischer Phosphatase und entweder 10 mM NaF, 1 mM NaP₂O₇ oder 1 mM Na₃VO₄ für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Ebenso wurde als Negativ - bzw. Positivkontrolle AP 2 ohne

jede Zusätze oder nur mit Phosphatase inkubiert und anschließend die Interaktion mit dem MPR 46 - Peptid 2 - 16 gemessen. Die Injektion der Proben (jeweils 0,35 µg) erfolgte bei einer Flußrate von 10 µl / min. Es sind die jeweiligen Restbindungen in Abhängigkeit (%) von der unbehandelten Probe (= ohne Phosphatase und Inhibitoren) aufgetragen.

Durch den Einsatz von Natriumpyrophosphat konnte die Aktivität der alkalischen Phosphatase vollständig inhibiert werden, so daß im Vergleich zur Kontrolle (= Ansatz ohne Phosphatase) die Bindung von AP 2 an das Peptid nicht abnahm. Die inhibierende Wirkung von Natriumvanadat war schwächer und lag im Vergleich dazu bei 89 %, wohingegen Natriumfluorid unter diesen experimentellen Bedingungen keinen inhibitorischen Effekt zeigte. Die Ergebnisse zeigen, daß die durch Phosphatasebehandlung beobachteten Effekte auf die AP 2 - Bindung tatsächlich durch die Aktivität der alkalischen Phosphatase hervorgerufen wurden.

4.2.1.5 Untersuchungen zum Phosphorylierungszustand aufgereinigter AP 2 - Komplexe

Im folgenden Experiment sollte untersucht werden, ob die Inkubation mit Phosphatase tatsächlich zu einer Dephosphorylierung der AP 2 - Komplexe führt. Die Analyse erfolgte durch eine isoelektrische Fokussierung, bei der eine Proteindephosphorylierung durch eine Verschiebung des Bandenmusters sichtbar wird („Shift“). Dementsprechend müßte die Dephosphorylierung von AP 2 und der damit verbundene Verlust negativer Ladung zu einer Verschiebung des Bandenmusters zum basischen hin führen. Nach der isoelektrischen Fokussierung der mit alkalischer Phosphatase behandelten bzw. unbehandelten AP 2 - Komplexe wurde anhand eines Westernblots untersucht, welche der 4 Untereinheiten eine Verschiebung des Bandenmusters zeigten, also phosphoryliert waren.

Die Immunodetektion erfolgte mit einem monoklonalen Antikörper gegen die α - und β - Untereinheit, sowie mit affinitätsgereinigten Antikörpern gegen die $\mu 2$ - und $\sigma 2$ - Untereinheit.

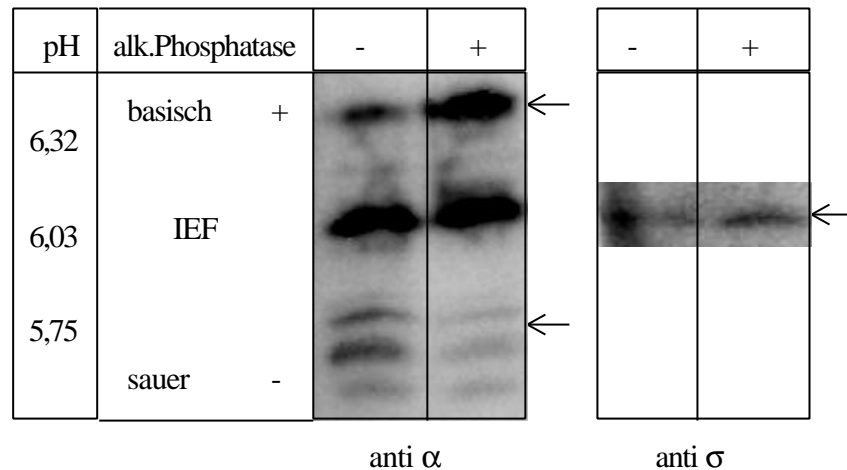


Abb. 4.14a: Westernblot nach isoelektrischen Fokussierung

Jeweils 20 μg AP 2 wurde mit 2 U Phosphatase sowie als Kontrolle ohne Phosphatase 30 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend die Proteine nach Wessel und Flügge gefällt. Nach der Fokussierung der Proben für 15 Stunden bei 500 wurden diese auf Nitrozellulose transferiert. Die Immunodetektion erfolgte mit einem Antikörper gegen die α - und σ - Untereinheit.

Obenstehende Abbildung (Abb. 4.14a) zeigt den Westernblot für die α - und die σ - Untereinheit. Der Westernblot für die α - Kette zeigt im Bandenmuster einen deutlichen Unterschied zwischen Kontrolle und der Phosphatase - behandelten Probe. So ist die Intensität der drei untersten Banden bei der Kontrolle wesentlich stärker als bei der Probe (= mit Phosphatase). Dagegen ist die Intensität der obersten Bande bei der Probe wesentlich intensiver als die entsprechende Bande bei der Kontrolle. Somit hat in diesem Fall eine Verschiebung zum Basischen hin stattgefunden, verursacht durch einen Verlust von negativen Ladungen infolge der Phosphataseinkubation. Beim Westernblot für die σ - Kette ist dagegen sowohl bei der Kontrolle als auch bei der Probe nur eine Bande zu sehen, die sich zudem auf gleicher Höhe befinden, so daß in diesem Fall die Inkubation mit Phosphatase keine Veränderung der Ladung zur Folge hatte. Ebenso zeigte der Westernblot für die β - und μ - Kette (Abb. 4.14b) bei der Probe bzw. der Kontrolle ein unterschiedliches Bandenmuster.

Die MDBK – Zellen wurden mit Mes – Puffer abgeschabt und mit einer Spritze durch eine 22 xg Kanüle gepreßt. Die Zellkerne, unlysierte Zellen sowie größere Zelltrümmer wurden durch eine Zentrifugation bei 1000 xg entfernt und abschließend durch eine Ultrazentrifugation bei 100000 xg Cytosol und Membranpellet gewonnen. Die Ablösung der AP 2 - Komplexe von den Membranen erfolgte durch Extraktion des Membranpellets mit 0,5 M Tris für 1 Stunde bei 4°C. Anschließend wurden die abgelösten Proteine durch Ultrazentrifugation von den Membranen abgetrennt (= Membran - Trisextrakt).

4.3.2 Untersuchung zum Phosphorylierungszustand von AP 2 im Cytosol und Membran - Trisextrakt

Die Überprüfung des Phosphorylierungszustandes von AP 2 im Cytosol und dem Membran - Trisextrakt erfolgte durch isoelektrische Fokussierung. Dazu wurde zunächst das cytosolische AP 2 bzw. Membranextrahierte AP 2 durch eine Gelfiltrationschromatographie angereichert.

Die Gelfiltration erfolgte über eine Superdex 200 - Säule, die an ein SMART - HPLC - System angeschlossen wurde. Die Säule wurde mit BIA - Puffer äquilibriert und anschließend jeweils 50 µl Cytosol bzw. Membran - Trisextrakt aufgeladen. Die Elution erfolgte bei einer Flußrate von 40 µl / min.

Anschließend wurden die AP 2 - haltigen Fraktionen mittels Westernblot ermittelt (nicht dargestellt) und jeweils die positiven Fraktionen vereinigt.

Von der Cytosol - und Membranfraktion wurden jeweils gleiche Proteinmengen auf ein Fokussierungsgel aufgetragen, nach Beendigung der Fokussierung die Proteine auf Nitrozellulose transferiert und eine Immunodetektion mit einem monoklonalen Antikörper gegen die α - Untereinheit durchgeführt.

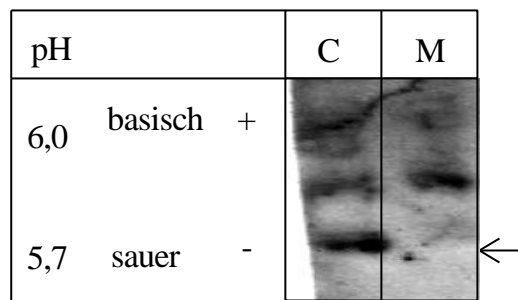


Abb.4.15: Westernblot nach isoelektrischer Fokussierung

Jeweils 18 µg Gesamtprotein von Cytosol - und Membranfraktion wurden nach Wessel und Flügge gefällt und auf einem Fokussierungsgel aufgetragen. Nach der Fokussierung für 15 Stunden bei 500 V wurden die Proteine auf Nitrozellulose transferiert und eine Immunodetektion mit einem Antikörper gegen die α - Untereinheit durchgeführt.

C = Cytosolfraktion, M = Membranfraktion

Der Westernblot (Abb.4.15) zeigte einen deutlichen Unterschied im Bandenmuster zwischen der Cytosol - und der Membranfraktion. Somit konnte davon ausgegangen werden, daß die AP 2 - Komplexe in der Cytosol- und Membranfraktion einen unterschiedlichen Phosphorylierungsgrad aufweisen.

4.3.3 Messung der Interaktion von Cytosol - und Membranfraktion mit dem MPR 46 Peptid 2 - 16

Da die Fraktionen neben AP 2 auch AP 1 enthalten, wurde für die Interaktionsanalyse das MPR 46 Peptid 2 - 16 verwendet, das nur mit AP 2, jedoch nicht mit AP 1 interagiert. Anhand eines Westernblots mit gereinigtem AP 2 als Standard wurde die AP 2 - Konzentration in der Cytosol - und der Membranfraktion ermittelt, die beiden Proben auf die gleiche AP 2 - Konzentration eingestellt und anschließend die Interaktion mit dem MPR 46 Peptid 2 - 16 gemessen. Die Auswertung erfolgte über das BIA - Evaluierungsprogramm 2.1 anhand eines Sensorgramms.

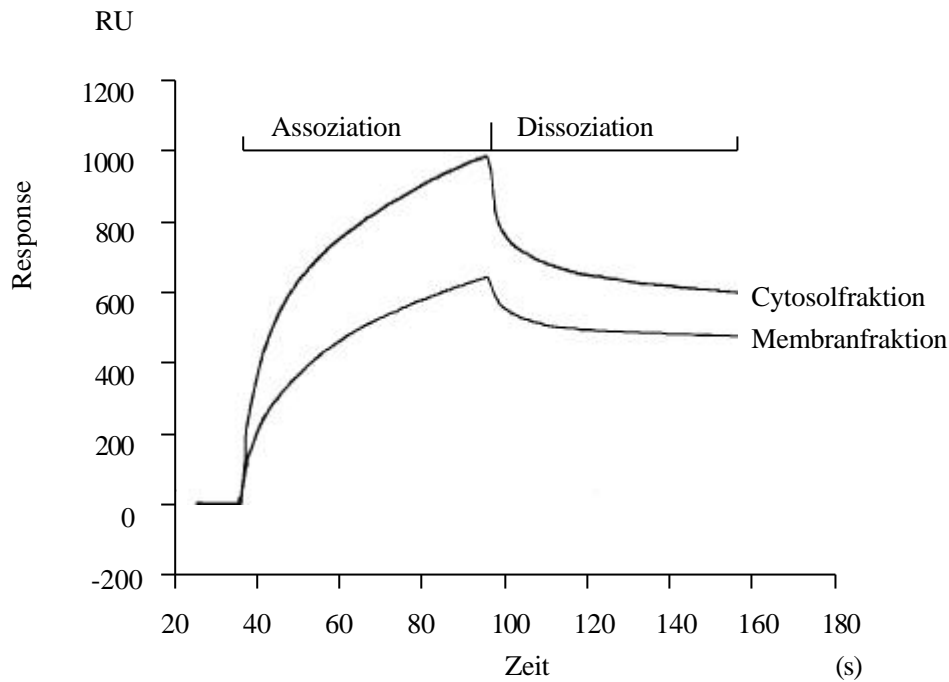


Abb.4.16 Sensorgramm: Interaktionsanalyse der Cytosol - und Membranfraktion mit dem MPR 46 - Peptid 2 - 16.

Die Cytosol - und Membranfraktion wurde auf die gleiche AP 2 - Konzentration eingestellt (Konzentration an AP 2 in der injizierten Probe jeweils 10 nM) und die Interaktion mit dem MPR 46 - Peptid 2 - 16 bei einer Flußrate von 10 µl / min gemessen.

Auf der X-Achse ist der zeitliche Verlauf der Messung (in Sekunden) dargestellt und auf der Y-Achse die Änderung des SPR-Signals (in „ response units “).

Die Interaktionsanalyse sowohl der Cytosol - als auch der Membranfraktion zeigt jeweils eine Bindung von AP 2 an das MPR 46 Peptid 2 - 16. Jedoch ist die Bindung bei der Membranfraktion schwächer als bei der Cytosolfraction.

Zusätzlich wurden mit dem BIAcore - Evaluierungsprogramm 2.1 die jeweiligen Assoziations - , Dissoziations - und Gleichgewichtskonstanten berechnet.

| | k_a [1/M x s] | k_d [1/s] | $K_D = k_a/k_d$ [nM] |
|-----------------|-------------------|-----------------------|------------------------|
| Cytosolfraction | 2.8×10^5 | $3,09 \times 10^{-3}$ | 11 |
| Membranfraktion | $2,3 \times 10^4$ | $1,4 \times 10^{-3}$ | 61 |

Tab. 4.4: Berechnung der Assoziations - , Dissoziations - und Gleichgewichts-konstanten der Cytosol - und Membranfraktion.

Die Berechnung der Konstanten ergab für die Membranfraktion eine um den Faktor 10 geringere Assoziationskonstante, während sich die Dissoziationskonstante bei der Membran- und Cytosolfraktion nur geringfügig unterschied. Ebenso ist die Gleichgewichtskonstante bei der Cytosolfraktion um das 6 x fache erhöht gegenüber der Membranfraktion.

Somit zeigt auch diese Interaktionsanalyse wie die vorherigen Experimente (4.2) eine schwächere Bindung von dephosphoryliertem AP 2 gegenüber phosphoryliertem AP 2 sowie einen Unterschied in der Assoziation an das Peptid jedoch nicht bei der Dissoziation. Die für die Cytosolfraktion errechnete Gleichgewichtskonstante entspricht in etwa der Gleichgewichtskonstante, die für die Bindung von aufgereinigtem AP 2 an das MPR 46 – Peptid ermittelt wurde.

4.4 Rekrutierung von AP 2 an NRK - Membranen

4.4.1. Rekrutierung von dephosphoryliertem AP 2

Durch die vorausgegangenen Experimente mit dem Biosensor konnte gezeigt werden, daß mit alkalischer Phosphatase behandelte AP 2 - Komplexe eine verminderte Bindung an die MPR 46 - Tail - Peptide zeigten und daß dieser Effekt durch die Aktivität der Phosphatase hervorgerufen wurde. Desweiteren konnte durch isoelektrische Fokussierung mit anschließendem Westernblot gezeigt werden, daß von den 4 Untereinheiten 3 (α , $\beta 2$ und $\mu 2$) in einem phosphorylierten Zustand vorliegen.

In dem folgenden Experiment sollte nun der Einfluß der Dephosphorylierung von AP 2 auf die Rekrutierung der AP 2 - Komplexe an isolierte NRK - Membranen untersucht werden. Um eine Beeinflussung der Rekrutierung durch endogenes AP 2 zu vermeiden, wurde das endogene AP 2 mit 0,5 M Tris von den NRK - Membranen entfernt.

AP 2 (in Bindungspuffer) wurde mit alkalischer Phosphatase bei 37°C inkubiert und anschließend die Dephosphorylierungsreaktion durch Zugabe eines Phosphatase-inhibitorcocktails gestoppt. Auf die gleiche Weise erfolgte die Inkubation eines Kontrollansatzes ohne Phosphatase. Die anschließende Rekrutierung erfolgte durch Inkubation der jeweiligen Ansätze mit den NRK - Membranen auf Eis. Als weitere Kontrolle wurden NRK - Membranen mit Bindungspuffer inkubiert. Anschließend wurden die Membranen

sedimentiert, auf einem 10 % SDS - Gel aufgetrennt und anschließend auf Nitrozellulose transferiert. Die Immunodetektion von rekrutiertem AP 2 erfolgte mit einem Antikörper gegen die α - Untereinheit.

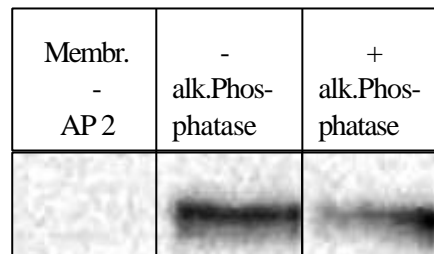


Abb.4.17: Rekrutierung von Phosphatase behandelten und unbehandelten AP 2 an NRK - Membranen.

3 μ g AP 2 wurde 1 Stunde bei 37°C mit 2 U alkalischer Phosphatase bzw. als Kontrolle ohne Phosphatase inkubiert. Anschließend erfolgte die Rekrutierung an NRK - Membranen (10 μ g) für 30 Minuten auf Eis. Die Auswertung erfolgte durch einen Westernblot mit einem monoklonalen Antikörper gegen die α - Untereinheit.

Die Auswertung des Westernblots (Abb. 4.17) zeigte, daß bei der mit Phosphatase vorinkubierten Probe ein schwächeres Signal detektierbar ist als bei der Kontrolle (ohne Phosphatase). Desweiteren ist bei der Negativkontrolle (= NRK - Membranen ohne Adaptor - Inkubation) erwartungsgemäß kein Signal detektierbar, da die endogenen Adaptoren durch die Behandlung der Membranen mit 0,5 M Tris weitgehend entfernt worden waren. Die Quantifizierung der jeweiligen Banden von verschiedenen, unabhängig voneinander durchgeführten Rekrutierungsexperimenten ergab eine Verminderung der Rekrutierungseffizienz von dephosphoryliertem AP 2 zwischen 20 und 50 %.

Aus diesem Experiment läßt sich schließen, daß die Rekrutierung dephosphorylierter AP 2 - Komplexe weniger effizient erfolgt als die Rekrutierung unbehandelter AP 2 - Komplexe.

4.4.2 Rekrutierung von phosphoryliertem AP 2

Wie zuvor gezeigt resultiert aus einer Dephosphorylierung von gereinigtem AP 2 durch alkalische Phosphatase eine verminderte Bindung an MPR 46 - Tail - Peptide. Darüberhinaus binden mit Phosphatase behandelte AP 2 - Komplexe mit geringerer Effizienz an NRK - Membranen als unbehandelte. Mit den folgenden Experimenten sollte nun untersucht werden, ob eine Inkubation mit ATP zu einer verstärkten Rekrutierung an NRK - Membranen führt.

Für den Rekrutierungsassay wurde AP 2 mit ATP (Endkonzentration 2 mM) und parallel als Kontrolle ohne ATP bei 37°C vorinkubiert. Nach Beendigung der Inkubation erfolgte die Rekrutierung an NRK - Membranen während einer Inkubation für 30 Minuten auf Eis. Die Analyse dieser Rekrutierung erfolgte wie oben beschrieben durch einen Westernblot mit einem monoklonalen Antikörper gegen die α - Untereinheit.

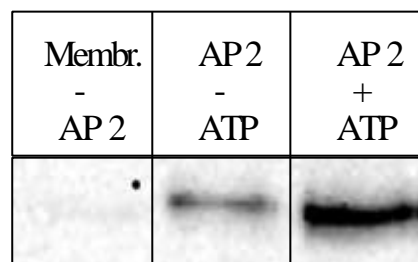


Abb.4.18: Einfluß von ATP auf die Rekrutierung von AP 2 an NRK - Membranen.

AP 2 (3 μ g) wurde mit bzw. ohne ATP (Endkonzentration 2 mM) für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Rekrutierung an NRK - Membranen (10 μ g) für 30 Minuten auf Eis. Die Auswertung erfolgte durch einen Westernblot (10 % SDS - Gel) mit einem monoklonalen Antikörper gegen die α - Untereinheit.

Die Auswertung dieses Westernblots zeigte eine wesentlich intensivere Bande bei der mit ATP vorinkubierten Probe als bei der Probe ohne ATP - Zusatz. Ebenso ist auch in diesem Fall bei der Negativkontrolle kein Signal detektierbar. Die Quantifizierung der entsprechenden Banden ergab eine Steigerung der Rekrutierungseffizienz um das Doppelte.

Aus diesem Experiment läßt sich schließen, daß eine Behandlung von AP 2 - Komplexen mit ATP die Rekrutierung an NRK - Membranen stimuliert.

Als Kontrolle zu den beiden vorausgegangenen Experimenten wurde eine Rekrutierung von AP 2 in Gegenwart von alkalischer Phosphatase bzw. ATP auf Eis durchgeführt. Anschließend erfolgte die Auswertung anhand eines Westerblots mit einem Antikörper gegen die α - Untereinheit.

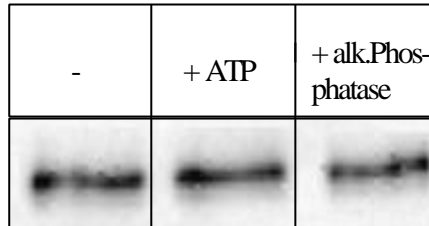


Abb.4.19: Kontrolle der Rekrutierung

3 μ g AP 2 wurden mit 2 U alkalischer Phosphatase bzw. ATP in einer Endkonzentration von 2 mM sowie als Kontrolle ohne jeden Zusatz in Gegenwart von 10 μ g NRK - Membranen 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Beendigung der Inkubation wurden die Membranen sedimentiert, auf einem 10 % SDS - Gel aufgetrennt und anschließend auf Nitrozellulose transferiert. Die Immunodetektion erfolgte mit einem Antikörper gegen die α - Untereinheit

Sowohl bei der Kontrolle als auch bei der mit ATP bzw. Phosphatase inkubierten Probe war ein in etwa gleich starkes Signal detektierbar. Somit konnte davon ausgegangen werden, daß während der Rekrutierung auf Eis die Phosphatase sowie Prozesse, die ATP als Substrat benötigen, gehemmt wurden und eine Beeinflussung der Rekrutierung oder eine Dephosphorylierung der Membranen selbst ausgeschlossen werden konnte.

4.4.3 *In vitro* Phosphorylierung von AP 2 mit γ^{32} P - ATP

Wie das vorausgegangene Experiment zeigte, führt eine Vorinkubation der AP 2 - Komplexe mit ATP zu einer verstärkten Rekrutierung an die NRK - Membranen. In diesem Zusammenhang sollte nun analysiert werden, ob diese Inkubation mit ATP eine Phosphorylierung der gereinigten AP 2 - Komplexe bewirkt. Dazu wurden die Adaptorproteine gegen Phosphorylierungspuffer dialysiert und dann mit γ^{32} P - ATP inkubiert.

Nachdem die Phosphorylierungsreaktion durch Zugabe von Probenpuffer abgestoppt worden war, wurde der Ansatz auf einem 7,5 % igen SDS - Gel mit 6 M Harnstoff aufgetrennt und dieses anschließend durch Autoradiographie analysiert. Durch die Auftrennung der Proben auf einem SDS - Harnstoff - Gel wird eine Trennung der α - und β - Untereinheit ermöglicht. Gleichzeitig wurde ein Westernblot durchgeführt, um die einzelnen Banden des Autoradiograms zu identifizieren. Die Immunodetektion erfolgte mit monoklonalen Antikörpern gegen die α - und β - Untereinheit, sowie mit einem affinitätsgereinigten Antikörper gegen die μ - Untereinheit.

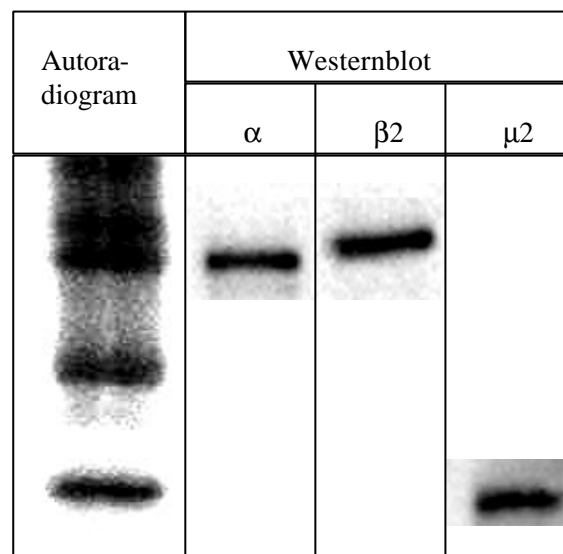


Abb.4.20a: Phosphorylierung von AP-2 mit γ^{32} P - ATP.

0,5 μ g AP 2 wurden mit γ^{32} P - ATP 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das phosphorylierte AP 2 wurde auf einem 7,5 % SDS-Gel mit 6 M Harnstoff unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

Abb.4.20b: Westernblot von AP 2

3 μ g AP 2 wurde auf einem 7,5 % SDS - Gel mit 6 M Harnstoff aufgetrennt und anschließend ein Westernblot mit monoklonalen Antikörpern gegen die α - und β - Untereinheit, sowie einem Affeninitätsgereinigtem Antikörper gegen die μ - Untereinheit durchgeführt.

Durch die Inkubation von AP 2 mit γ^{32} P - ATP wurden die beiden großen Untereinheiten (α und $\beta 2$), sowie die μ - Kette phosphoryliert.

Desweiteren zeigt diese *in vitro* Phosphorylierung, daß in der AP 2 - Präparation eine Kinaseaktivität vorhanden ist.

5. Diskussion

Bei vielen zellulären Prozessen spielt eine Regulation durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung beteiligter Proteine eine wichtige Rolle. So wird bei der Desensibilisierung und Internalisierung von G - Protein - gekoppelten Rezeptoren die Phosphorylierung von β - Arrestin, das als Adaptorprotein fungiert, sowie die Phosphorylierung des Rezeptors als bedeutend für die Regulation angesehen. β - Arrestin bindet sowohl an die G - Protein - gekoppelten Rezeptoren, wie zum Beispiel an den β - adrenergen Rezeptor, als auch an Clathrin und vermittelt auf diese Weise die Internalisierung der desensibilisierten Rezeptoren durch Clathrin beschichtete Vesikel Goodman et al. 1996, Goodman et al. 1997).

Durch die Bindung eines Agonisten werden die G - Protein - gekoppelten Rezeptoren durch eine spezielle G - Protein - gekoppelte Rezeptor - Kinase phosphoryliert und dadurch die Rekrutierung von cytosolischem, phosphorylierten β - Arrestin an die Plasmamembran veranlaßt. Die Bindung des phosphorylierten β - Arrestins an den Rezeptor bewirkt eine Entkopplung des Rezeptors von seinem assoziierten heterotrimeren G - Protein (Kuhn et al. 1984). An der Plasmamembran erfolgt die Dephosphorylierung des β - Arrestins, wodurch dessen Interaktion mit Clathrin und die anschließende Internalisierung durch Clathrin beschichtete Vesikel ermöglicht wird. Die Resensibilisierung des Rezeptors erfolgt in den späten Endosomen durch Dephosphorylierung des Rezeptors, der daraufhin zur Plasmamembran zurückkehrt. Der exakte Zeitpunkt und der Ort an dem sich das β - Arrestin vom Rezeptor löst und erneut phosphoryliert wird ist noch unbekannt (Lin et al. 1997).

Die Funktion von β - Arrestin weist viele Parallelen mit der Funktion des Adaptorkomplexes AP 2 auf. Dies läßt vermuten, daß zumindest einige Funktionen dieser beiden Adaptorkomplexe durch Phosphorylierung reguliert werden können. Untersuchungen mehrerer Arbeitsgruppen haben gezeigt, daß AP 1 und AP 2 *in vitro* und *in vivo* phosphoryliert werden (Bar-Zwi et al. 1988, Morris et al.1990, Schröder und Ungewickel 1991, Pauloin und Thuriéau 1993, Wilde und Brodsky 1996). In der Arbeitsgruppe von F. Brodsky wurde gezeigt, daß ebenso wie bei β - Arrestin die cytosolische Formen des AP 1 und AP 2 phosphoryliert sind, während membrangebundenes AP1 und AP 2 dephosphoryliert ist. Ebenso konnte auch bei phosphoryliertem AP 1 und AP 2 eine Inhibierung der *in vitro* Bindung an Clathrin nachgewiesen werden (Wilde und Brodsky 1996).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun untersucht werden, ob der Phosphorylierungszustand der Adaptor - Komplexe auch ihre Interaktion mit cytoplasmatischen Rezeptordomänen beeinflusst.

5.1 Interaktionsanalysen von AP 1 und AP 2 mit MPR 46 - Rezeptor Tail - Peptiden

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde mit einem Biosensor die Interaktion von phosphoryliertem und dephosphoryliertem AP 1 und AP 2 mit einem MPR 46 - Rezeptor Tail - Peptid als Bindungspartner analysiert. Um genügend Material für die Interaktionsanalysen zu erhalten, wurde AP 1 und AP 2 aus Schweinehirn aufgereinigt, da diese Methode gut etabliert war und auf diese Weise ausreichende Mengen an AP 1 und AP 2 gewonnen werden konnten. Durch Westernblotanalysen wurde sichergestellt, daß keine gegenseitige Kontamination der AP 1 - bzw. AP 2 - Präparation vorlag. Somit konnte bei den Interaktionsanalysen eine Konkurrenz zwischen AP 1 und AP 2 um die Bindung an das Peptid sowie eine mögliche gegenseitige Beeinflussung ausgeschlossen werden.

Als Bindungspartner wurden zwei bereits in früheren Studien verwendete MPR 46 - Rezeptor Tail - Peptide eingesetzt, von denen bekannt war, daß sie mit AP 1 und AP 2 interagieren (Höning et al. 1997). Zunächst wurde das Peptid 49 - 67 eingesetzt, da an dieses AP 1 und AP 2 binden. Dieses Peptid enthält neben dem Leucin - Motiv eine Kasein Kinase II Phosphorylierungsstelle (EESEER) (Mauxion et al. 1996), die aus einem Serinrest in Position 57, der *in vivo* phosphoryliert werden kann (Hemer et al. 1993, Körner et al. 1994), sowie flankierende saure Aminosäuren besteht. Interaktionsanalysen mit dem BIAcore haben gezeigt, daß die Phosphorylierung des Serinrestes die Bindung von AP 1 und AP 2 nur wenig erhöht, jedoch die sauren Reste wichtig für die AP - Bindung sind (eigene, unveröffentlichte Daten). Als zweites Peptid wurde das Peptid 2 - 16 verwendet, das ein Internalisierungssignal (Aminosäuren 7 - 13) mit einem essentiellen Phenylalanin enthält (Denzer et al. 1997) und nur mit AP 2 interagiert.

5.1.1 Dephosphorylierung von AP 1

Durch die Vorinkubation von AP 1 mit alkalischer Phosphatase wurde die Bindung an das MPR 46 Peptid 49 - 67 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nur wenig vermindert. Die

Tatsache, daß in verschiedenen Veröffentlichungen eine *in vivo* und *in vitro* Phosphorylierung von AP 1 nachgewiesen wurde (Bar-Zvi et al. 1988, Morris et al. 1990, Schröder und Ungewickel 1991, Wilde und Brodsky 1996), läßt folgende Möglichkeiten zu:

1. AP 1 lag nach der Aufreinigung bereits in einem vollkommen dephosphoryliertem Zustand vor.

Da dies jedoch für AP 2 nicht bzw. nur in begrenztem Umfang zutraf, ist diese Möglichkeit relativ unwahrscheinlich, da AP 1 und AP 2 gemeinsam aufgereinigt wurden.

2. Alkalische Phosphatase ist nicht in der Lage AP 1 zu dephosphorylieren.

Da alkalische Phosphatase eine relativ unspezifische Phosphatase ist und zudem AP 2 durch diese dephosphoryliert wurde, ist diese Möglichkeit ebenso recht unwahrscheinlich.

3. Unter den gewählten experimentellen Bedingungen konnte eine Beeinflussung der AP 1 - Bindung nicht entsprechend nachgewiesen werden.

4. Der Phosphorylierungszustand von AP 1 spielt bei der Interaktion mit cytoplasmatischen Rezeptordomänen keine Rolle.

Da jedoch mit dephosphoryliertem AP 1 nur zwei Interaktionsanalysen mit dem Biosensor durchgeführt wurden, kann letztendlich keine allgemein gültige Aussage über die Rolle der Phosphorylierung von AP 1 bei der Interaktion von AP 1 mit cytoplasmatischen Rezeptordomänen getroffen werden.

5.1.2 Dephosphorylierung von AP 2

Bei AP 2 dagegen konnte durch die Dephosphorylierung mit Phosphatase eine signifikante Abnahme der Bindung im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen werden. Aus diesem Grund konzentrierte sich die weitere Untersuchung auf AP 2. Die Berechnung der Assoziations-, Dissoziations- und der Gleichgewichtskonstanten zeigte, daß die Assoziation von AP 2 an das Peptid durch die Dephosphorylierung beeinflusst wurde, während die Dissoziation unverändert blieb.

Durch die Verwendung verschiedener Mengen an Phosphatase konnte ein Dosiseffekt auf die AP 2 - Bindung gezeigt werden, jedoch war die Bindung auch durch den Einsatz höherer Phosphatasekonzentrationen nicht vollständig inhibierbar. Offenbar trägt zu der durch den

Phosphorylierungszustand von AP 2 modulierbaren Bindung noch eine weitere, Phosphatase insensitive „ Bindungskomponente “ bei.

Dies läßt vermuten, daß entweder weitere Modifikationen von AP 2 oder Modifikationen des Rezeptor Tails zur Modulierung der Bindung zwischen AP 2 und dem Rezeptor - Peptid beitragen. Wie bereits zuvor erwähnt, enthält das hier eingesetzte Peptid nicht nur das Leucin - Motiv, sondern auch für die AP - Bindung als wichtig identifizierten flankierende saure Reste.

Um sicherzustellen, daß die beobachteten Effekte tatsächlich durch das Wirken der Phosphatase hervorgerufen werden, wurde die Dephosphorylierungsreaktion in Gegenwart verschiedener Phosphataseinhibitoren durchgeführt. Die in diesem Experiment eingesetzte Menge an Phosphatase wurde so gewählt, daß eine etwa 50 %ige Abnahme der Bindung an das Peptid 2 - 16 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle vorlag und somit inhibitorische Effekte der Phosphataseinhibitoren gut zu analysieren waren. Hierbei erwies sich Natriumpyrophosphat, das mit AP 2 als Substrat konkurriert als besonders geeignet, um die Dephosphorylierung von AP 2 zu inhibieren. Während Natriumvanadat weniger effizient war, konnte Natriumfluorid die Wirkung der alkalischen Phosphatase nicht inhibieren.

Somit konnte durch diese Kontrollexperimente sichergestellt werden, daß hier ein spezifischer, durch Dephosphorylierung von AP 2 ausgelöster Effekt auf die Bindung an das MPR 46 - Rezeptor - Peptid vorlag.

5.1.3 Isoelektrische Fokussierung

Durch die isoelektrische Fokussierung konnte zum einen nachgewiesen werden, daß die Inkubation von AP 2 mit Phosphatase eine Dephosphorylierung von AP 2 verursacht, zum anderen ergaben die Westernblotanalysen eine Phosphorylierung der α -, β - und der μ - Untereinheit, jedoch keine Phosphorylierung der σ - Untereinheit. Diese Befunde stehen im Einklang mit bereits publizierten Arbeiten, die eine *in vivo* Phosphorylierung der großen Untereinheiten sowie der μ - Kette zeigen (Bar-Zwi 1988, Wilde und Brodsky 1996).

Die Westernblotanalysen der α -, β - und μ - Kette zeigen im Gegensatz zur Analyse der σ - Untereinheit sowohl bei der Kontrolle als auch bei der Phosphatase behandelten Probe mehrere Banden. Dies könnte folgende Ursachen haben:

1. Es liegt weder bei der Kontrolle noch bei der mit Phosphatase behandelten Probe eine vollständige Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung vor, so daß durch die Phosphatase -

Inkubation lediglich das Verhältnis von phosphoryliertem AP 2 zu dephosphoryliertem AP 2 verändert wurde.

2. Es sind weitere Modifikationen, die ebenfalls den isoelektrischen Punkt verändern vorhanden.

3. Durch Carbamatbildung wurde der isoelektrische Punkt verändert, so daß die spezifische Bande in mehrere Unterbanden fokussierte. Da dies jedoch für den σ - Westernblot nicht zutrifft, ist diese Möglichkeit eher unwahrscheinlich.

5.2 *In vitro* Phosphorylierung

Durch die *in vitro* Phosphorylierung von AP 2 mit γ^{32} P - ATP konnten die Resultate der isoelektrischen Fokussierung bestätigt werden. Auch in diesem Fall trat eine Phosphorylierung der großen Untereinheiten und der μ - Kette auf. Das Resultat dieser *in vitro* Phosphorylierung steht ebenfalls im Einklang mit bereits publizierten Arbeiten (Pauloin et al. 1982, Morris et al. 1990, Schröder und Ungewickel 1990).

Zudem zeigt die *in vitro* Phosphorylierung, daß mit AP 2 eine Kinaseaktivität aufgereinigt wurde. Dies wurde bereits in früheren Veröffentlichungen verschiedener Arbeitsgruppen nachgewiesen. So haben sowohl die Arbeiten von Morris et al. 1990 als auch von Pauloin und Thureau 1982 eine Kinaseaktivität nachgewiesen, die speziell die μ - Kette phosphoryliert. Im Gegensatz zu den hier gewonnenen Daten postulieren Pauloin und Thureau jedoch eine Assoziation dieser Kinaseaktivität mit AP 1.

Ebenso wie zuvor die isoelektrische Fokussierung zeigt auch die *in vitro* Phosphorylierung, daß das aufgereinigte AP 2 sowohl mit Phosphatase dephosphoryliert als auch durch ein Angebot an ATP als Substrat phosphoryliert werden kann. Aus diesem Grund muß davon ausgegangen werden, daß in der AP 2 - Präparation sowohl phosphoryliertes als auch dephosphoryliertes AP 2 enthalten ist. Durch die Inkubation mit Phosphatase bzw. ATP wird also jeweils der Anteil an dephosphoryliertem bzw. phosphoryliertem AP 2 erhöht. Da jedoch die Vollständigkeit der Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung nicht überprüft werden konnte, lassen die Experimenten zur Zeit nur qualitative, jedoch keine quantitativen Aussagen zu.

5.3 Interaktionsanalyse von AP 2 aus Cytosol - und Membranfraktion mit dem MPR 46 Rezeptor Tail - Peptid 2 - 16

Wie bereits zuvor erwähnt wurde in der Arbeitsgruppe von F. Brodsky gezeigt, daß AP 2 im Cytosol in phosphorylierter Form vorliegt, während membrangebundenes AP 2 dephosphoryliert ist. Aus diesem Grund wurde die Interaktion von AP 2 aus MDBK - Cytosol sowie von AP 2, das von Membranen durch 0,5 M Tris abgelöst worden war mit dem MPR 46 Rezeptor Tail - Peptid 2 - 16 analysiert.

5.3.1 Isoelektrische Fokussierung

Die Untersuchung des Phosphorylierungszustandes von AP 2 in der Cytosol - bzw. Membranfraktion durch isoelektrische Fokussierung zeigte einen Unterschied im Bandenmuster zwischen diesen beiden Proben. Jedoch war bei der Cytosolfraction wie bei den vorherigen Fokussierungsexperimenten mehrere Banden vorhanden. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, daß das AP 2 in der Cytosolfraction durch Phosphatasen teilweise dephosphoryliert worden war. Somit zeigt diese isoelektrische Fokussierung lediglich ein unterschiedlichen Grad an Phosphorylierung von AP 2 in der Cytosol - bzw. Membranfraktion. Jedoch wurde diese Analyse nur für eine Untereinheit durchgeführt.

5.3.2 Interaktionsanalyse mit dem MPR 46 Peptid 2 - 16

Da aufgrund des ähnlichen Molekulargewichts von AP 1 und AP 2 beide Adaptor - Komplexe in der Cytosol - bzw. Membranfraktion enthalten sind, wurde für die Interaktionsanalyse mit dem Biosensor das MPR 46 Peptid 2 - 16 verwendet.

Sowohl die Messung mit der Cytosolfraction als auch die Messung mit der Membranfraktion zeigte eine Bindung an das Peptid 2 - 16. Jedoch war die Bindung von AP 2 in der Membranfraktion schwächer als von AP 2 in der Cytosolfraction. Somit stehen diese Befunde mit den vorherigen Interaktionsanalysen im Einklang. Auch in diesem Fall war die Bindung von dephosphoryliertem AP 2 (= Membranfraktion) an das Peptid schwächer als die Bindung von phosphoryliertem AP 2 (= Cytosolfraction). Ebenso zeigt die Berechnung der

Konstanten einen Unterschied in der Assoziation an das Peptid, jedoch nicht bei der Dissoziation der gebundenen AP 2 - Komplexe vom Peptid.

5.4 Rekrutierungsexperimente

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Rekrutierung von gereinigtem AP 2 an isolierte Membranen durch eine Dephosphorylierung von AP 2 mit Phosphatase, bzw. eine Phosphorylierung von AP 2 durch ATP - Zusatz beeinflusst wird.

Die Membranen wurden aus NRK - Zellen präpariert, da der verwendete Antikörper, der die α - Untereinheit von AP 2 erkennt, speziesspezifisch AP 2 aus Schwein sehr viel besser detektiert als AP 2 aus Ratte. Somit wurde die Auswertung sehr erleichtert. Zusätzlich wurde endogenes AP 2 durch 0,5 M Tris entfernt, um eine Beeinträchtigung der Rekrutierung durch bereits gebundenes, endogenes AP 2 auszuschließen.

Die Durchführung der Rekrutierung erfolgte auf Eis, um eine Dephosphorylierung der Membranen bzw. eine Beeinträchtigung der Rekrutierung durch Prozesse, die ATP benötigen, zu verhindern.

Durch Dephosphorylierung von AP 2 mit Phosphatase verminderte sich die Rekrutierungseffizienz im Vergleich zur Kontrolle während die Rekrutierung durch die Phosphorylierung von AP 2 mit ATP stimuliert wurde. Somit stehen diese Befunde mit den zuvor durch Interaktionsanalysen erzielten Ergebnissen im Einklang.

Jedoch sollte nicht unerwähnt bleiben, daß das Ausmaß der Verminderung der Rekrutierungseffizienz durch die Behandlung von AP 2 mit alkalischer Phosphatase unterschiedlich war und zwischen 20 und 50 % lag. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, daß der Anteil an phosphoryliertem und dephosphoryliertem AP 2 von Präparation zu Präparation unterschiedlich war.

Zudem muß bei diesen Rekrutierungsexperimenten berücksichtigt werden, daß für die Rekrutierung Gesamtmembranen verwendet wurden. Diese enthalten neben Plasmamembranen auch TGN - Membranen, Endosomen, Lysosomen sowie größere Vesikel. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, daß durch die Dephosphorylierung von AP 2 eine „Fehlrekrutierung“ an andere Membranen stattgefunden hat.

Deweiteren darf bei der Bewertung dieser Resultate nicht außer Acht gelassen werden, daß an der Rekrutierung von AP 2 an Membranen sicherlich noch weitere Proteine beteiligt sind. So

wird die Existenz eines spezifischen „docking proteins“ für AP 2 an der Plasmamembran postuliert. Neuere Veröffentlichungen deuten darauf hin, daß in neuronalen Zellen Synaptotagmin als docking protein fungiert (Haucke et al. 1999). Desweiteren wird postuliert, daß in nicht neuronalen Zellen ein Synaptotagminhomologes Protein die Funktion eines „docking proteins“ für AP 2 ausübt.

Zudem wird angenommen, daß an der Bindung von AP 2 an Membranen neben Membranproteinen auch Lipide beteiligt sind (Matsuoka et al. 1998, Takei et al. 1998, Gaidarov et al. 1998). Daneben wird auch eine Beteiligung von Inositolpolyphosphate an der Rekrutierung von AP 2 diskutiert, da die Rekrutierung durch Phospholipase D stimuliert werden kann (West et al. 1997, Haucke et al. 1999).

Somit stellt die Rekrutierung von AP 2 an die Plasmamembran ein multifaktorielles Ereignis dar an dem mehrere Proteine entweder in kooperativer oder sequentieller Weise beteiligt sind. Daher stellt die Modulierung der Interaktion von AP 2 mit den cytoplasmatischen Rezeptordomänen durch den Phosphorylierungszustand von AP 2 sicherlich lediglich ein Teilaspekt des gesamten Regulationsmechanismus dar.

5.5 Schlußfolgerung

Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten sprechen dafür, daß die Phosphorylierung und Dephosphorylierung von AP 2 zur Regulation der Interaktion mit cytoplasmatischen Rezeptordomänen beiträgt. Diese Aussage wird von den Rekrutierungsexperimenten gestützt. Jedoch sollte hierbei bedacht werden, daß die Interaktion von AP 2 mit cytoplasmatischen Rezeptordomänen nur einen Teilaspekt des gesamten Rekrutierungsvorgangs darstellt.

Zusätzlich konnte die Existenz einer Kinaseaktivität nachgewiesen werden, die offenbar mit AP 2 assoziiert ist und die Rekrutierung bzw. Tail - Interaktion beeinflussen kann.

5.6 Ausblick

Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten ziehen eine Reihe weiterer Fragestellungen nach sich:

1. Welche der drei phosphorylierbaren Untereinheit(en) ist (sind) für die beobachteten Effekte verantwortlich ?

Wie bereits zuvor erwähnt konnte eine Inhibierung der *in vitro* Bindung an Clathrin durch die Phosphorylierung der β - Untereinheit nachgewiesen werden (Wilde und Brodsky 1996). Dies schließt jedoch nicht aus, daß die Phosphorylierung dieser Untereinheit nicht auch an der Regulation der Interaktion mit cytoplasmatischen Rezeptordomänen beteiligt ist. So wurde von Rapoport et al. durch Protein - Protein - Interaktion eine Interaktion der β - Untereinheit mit Leucin - Motiven gezeigt.

Da eine Interaktion der μ - Untereinheit mit Tyrosin - Motiven in mehreren Studien nachgewiesen wurde, sollten sich die weiteren Untersuchungen vor allem auf diese Untereinheit konzentrieren.

2. Gibt es in den jeweiligen Untereinheiten mehrere Phosphorylierungsstellen? In welchem Bereich der Untereinheit(en) befinden sich diese? Um welche Art von Phosphorylierungsstellen (Serin, Threonin oder Tyrosin) handelt es sich hierbei?

Für die α - und β - Untereinheit wurde eine Phosphorylierung von Serinresten in der hinge - Region gezeigt (Wilde und Brodsky 1996 , Schröder und Ungewickel 1991), während bei der μ - Kette die Existenz einer einzigen Phosphorylierungsstelle (Threonin 156) postuliert wurde (Pauloin und Thurieau 1987).

3. Handelt es sich bei der assoziierten Kinaseaktivität um eine spezifische Kinase? Zu welcher Familie gehört diese?

Da die Kinaseaktivität während der Aufreinigung über Gelfiltration und Hydroxyapatitchromatographie mit AP2 assoziiert bleibt, sollte es sich um eine spezifische, mit dem CCV - coat assoziierte Kinase handeln. Um diese weiter zu charakterisieren soll als nächstes die *in vitro* Phosphorylierung in Gegenwart spezifischer Kinaseinhibitoren durchgeführt werden. Desweiteren soll die AP 2 - Präparation nach der Hydroxyapatitchromatographie weiter aufgereinigt werden. Auf diese Weise soll untersucht werden, ob dadurch die Kinaseaktivität entfernt werden kann oder eventuell eine

Autophosphorylierung der AP 2 - Untereinheiten vorliegt bzw. eine der Untereinheiten selbst eine Kinaseaktivität besitzt.

4. Welche weiteren Faktoren / Proteine sind an der Rekrutierung von AP 2 an Membranen beteiligt?

Um andere am Rekrutierungsvorgang beteiligte Proteine bzw. weitere modulierende Einflüsse zu identifizieren sollen weitere Rekrutierungsexperimente durchgeführt werden. So soll zum Beispiel untersucht werden, ob die Inkubation von AP 2 mit Peptiden oder einem Synaptotagmin - GST - Fusionsprotein die Rekrutierung an Membranen durch Absättigung von Bindungsstellen am AP 2 - Komplex inhibiert.

6. Zusammenfassung

Bei vielen zellulären Prozessen spielt die Phosphorylierung von beteiligten Proteinen eine wichtige Rolle als Regulationsmechanismus. Da eine Reihe verschiedener Veröffentlichungen eine *in vivo* und *in vitro* Phosphorylierung von AP 1 und AP 2 nachgewiesen haben, lag die Vermutung nahe, daß die Phosphorylierung der Adaptor - Komplexe eine Rolle bei der Regulation ihrer Funktion spielt. Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob der Phosphorylierungszustand der Adaptor - Komplexe die Interaktion mit cytoplasmatischen Rezeptordomänen beeinflusst. Dazu wurde mit einem Biosensor die *in vitro* Interaktion von phosphorylierten und dephosphorylierten AP 1 - und AP 2 - Komplexen mit einem MPR 46 - Rezeptor Tail - Peptid als Bindungspartner analysiert. Die Dephosphorylierung von AP 2 mit alkalischer Phosphatase führte zu einer signifikanten Abnahme der Bindung an das Peptid. Bei AP 1 dagegen konnte durch Dephosphorylierung unter den gewählten experimentellen Bedingungen keine bedeutende Veränderung der Bindung nachgewiesen werden, so daß sich die weitere Analyse auf AP 2 konzentrierte. Der Effekt der alkalischen Phosphatase war abhängig von der Enzymkonzentration und durch Inhibitoren der alkalischen Phosphatase blockierbar. Desweiteren konnte gezeigt werden, daß AP 2 aus Cytosol, das in phosphorylierter Form vorliegt, stärker an das MPR 46 - Peptid 2 - 16 bindet, als von Membranen abgelöstes AP 2, das dephosphoryliert ist.

Mit Hilfe der isoelektrischen Fokussierung sowie der *in vitro* Phosphorylierung von AP 2 mit $\gamma^{32}\text{P}$ - ATP wurde eine Phosphorylierung der α -, β - und der μ - Kette gezeigt. Die *in vitro* Phosphorylierung lieferte zudem Hinweise auf das Vorhandensein einer Kinaseaktivität, die mit AP 2 aufgereinigt wird.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die Beeinflussung der Rekrutierung von aufgereinigtem AP 2 an isolierte Membranen durch Dephosphorylierung und Phosphorylierung von AP 2 untersucht. Die Vorinkubation von AP 2 mit Phosphatase führte zu einer Verminderung der Rekrutierung von AP 2 an die Membranen während die Vorinkubation mit ATP eine Stimulation zur Folge hatte.

Somit sprechen die bisher gewonnenen Daten für eine Modulation der Interaktion von AP 2 mit den cytoplasmatischen Rezeptordomänen durch die Phosphorylierung und Dephosphorylierung von AP 2.

7. Literaturverzeichnis

- Ahle, S., Ungewickell, E. (1989): Identification of a Binding Subunit in the HA2 Adaptor Protein Complex. *J. Biol. Chem.* 264, 20089 - 20093.
- Bar-Zvi, D., Mosley, S.T., Branton, D. (1988): In Vivo Phosphorylation of Clathrin-coated Vesicle Proteins from Rat Reticulocytes. *J. Biol. Chem.* 263, 4408 - 4415.
- Benmerah, A., Gagnon, J., Begue, B., Mergabane, B., Dautry-Versat, A., Cerf-Bensussan, N. (1995): The tyrosine kinase substrate Eps 15 is constitutively associated with the plasmamembrane adaptor AP-2. *J. Cell Biol.* 131, 1831 - 1838.
- Boll, W., Ohno, H., Songyang, Z., Rapoport, I., Cantley, L.C., Bonifacino, J.S., Kirchhausen, T. (1996): Sequence requirements for the recognition of tyrosine - based endocytic signals by clathrin AP-2 complexes. *EMBO J.* 15, 5789 - 5795.
- Bradford, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgramm quantities of proteins utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248 - 252.
- Breuer, P., Körner, C., Böker, C., Herzog, A., Pohlmann, R., Bräulke, T. (1997): Serine Phosphorylation Site of the 46-kDa Mannose 6-phosphate Receptor is required for Transport to the Plasma Membrane in Madin - Darby Canine Kidney and Mouse Fibroblast Cells. *Mol. Biol. Cell* 8, 567 - 576.
- Carter, L.L., Redelmeier, T.E., Woollenweber, L.A., Schmid, S.L. (1993): Multiple GTP binding proteins participate in clathrin coated vesicle mediated endocytosis. *J. Cell Biol.* 120, 37 - 45.

- Cavenagh, M.M., Whitney, J.A., Carroll, K., Zhang, C., Bowman, A.L., Rosenwald, A.G., Mellman, I., Kahn, R. (1996): Intracellular distribution of Arf proteins in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 271, 21767 - 21774.
- Cosson, P., Letourneur, F. (1997): Coatamer (COP1)-coated vesicles: role in intracellular transport and protein sorting. *Curr. Opin. In Cell Biol.* 9, 484 - 487.
- Cowles, C.R., Odorizzi, G., Paynes, G.S., Emr, S.D. (1997): The AP-3 Adaptor Complex is Essential for Cargo - Selective transport to the Yeast Vacuole. *Cell* 91, 109 - 118.
- David, C., McPherson, P.S., Mundigl, P., De-Camilli, P.(1996): A role of amphiphysin in synaptic vesicle endocytosis suggested by its binding to dynamin in nerve terminals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93, 331 - 335.
- Dell'Angelica, E.C., Ooi, C.E., Bonifacino, J.S.(1997a): β 3A - Adaptin, a Subunit of the Adaptor - like Complex AP-3. *J. Biol. Chem.* 272, 15078 - 15084.
- Dell'Angelica, E.C., Ohno, H., Ooi, C.E., Rabinovich, E., Roche, K.W., Bonifacino, J.S. (1997b): AP-3: an adaptor-like protein complex with ubiquitous expression. *EMBO J.* 16, 917 - 928.
- Dell'Angelica, E.C., Klumpermann, J., Stoorvogel, W., Bonifacino, J.S. (1998): Association of the AP-3 Adaptor Complex with Clathrin. *Science* 280, 431 - 434.
- Dell'Angelica, E.C., Mullins, C., Bonifacino, J.S. (1999a): AP-4, a Novel Protein Complex Related to Clathrin Adaptors. *J. Biol. Chem.* 274, 7278 - 7285.
- Denzer, K., Weber, B., Hille-Rehfeld, A., von Figura, K., Pohlmann, R. (1997): Identification of three internalization sequences in the cytoplasmic tail of the 46- kDa mannose 6 - phosphate receptor. *Biochem. J.* 326, 497 - 505.

- Dittie, A.S., Hajibagheri, N., Tooze, S.A. (1996): The AP-1 adaptor complex binds to immature secretory granules from PC12 cells, and is regulated by ADP-ribosylationfactor. *J. Cell Biol.* 132, 523- 536.
- Gaidarov, I., Chen, Q., Falck, J.R., Reddy, K.K., Keen, J.H. (1996): A functional phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate/phosphoinositide binding domain in the clathrin adaptor AP-2 alpha subunit. Implications for the endocytic pathway. *J. Biol. Chem.* 271, 20922 - 20929.
- Gallusser, A., Kirchhausen, T. (1993): The β 1 and β 2 subunits of the AP complexes are the clathrin coat assembly components. *EMBO J.* 12, 5237 - 5244.
- Goodman, O.B., Krupnick, J.G., Santini, F., Gurevich, V.V., Penn, R.B., Gagnon, A.W., Keen, J.H., Benovic, J.L. (1996): β -Arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the β 2-adrenergic receptor. *Nature* 383, 447 - 450.
- Goodman, O.B., Krupnick, J.G., Gurevich, V.V., Benovic, J.L., Keen, J.H. (1997): Arrestin/Clathrin Interaction. *J. Biol. Chem.* 272, 15017 - 15022.
- Green, L.E., Eisenberg, E. (1990): Dissociation of clathrin from coated vesicles by the uncoating ATPase. *J. Biol. Chem.* 265, 6682 - 6687.
- Haucke, V., DeCamilli, P. (1999): AP-2 recruitment to Synaptotagmin Stimulated by Tyrosine-Based Endocytic Motifs. *Science* 285, 1268 - 271.
- Heilker, R., Manning-Krieg, U., zuber, J.F., Spiess, M. (1996): in vitro binding of clathrin adaptors to sorting signals correlates with endocytosis and basolateral sorting. *EMBO J.* 15, 2893 - 899.
- Hirst, J., Robinson, M.S. (1998): Clathrin and adaptors. *Biochim. Biophys. Acta.* 1404, 173 - 193.

- Hirst, J., Bright, N.A., Rous, B., Robinson, M.S. (1999): Characterization of a Fourth Adaptor related Protein Complex. *Mol. Biol. Of the Cell* 10, 2787 - 2802.
- Höning, S., Griffith, J., Geuze, H.J., Hunziker, W. (1996): The tyrosine-based lysosomal targeting signal in lamp-1 mediates sorting into Golgi-derived clathrin-coated vesicles. *EMBO J.* 15, 5230 - 5239.
- Höning, S., Sosa, M., Hille-Rehfeld, A., von Figura, K. (1997): The 46-kDa Mannose 6-Phosphate Receptor Contains Multiple Binding Sites for Clathrin Adaptors. *J. Biol. Chem.* 272, 19884 - 19890.
- Höning, S., Sandoval, I.V., von Figura, K. (1998): A di-leucine-based motif in the cytoplasmic tail of LIMP II and tyrosinase mediates selective binding of AP-3. *EMBO J.* 5, 1305 - 1314.
- Kirchhausen, T. (1993): Coated pits and coated vesicles-sorting it all out. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3, 182 - 188.
- Kirchhausen, T., Harrison, S.C. (1981): Protein organization in clathrin trimers. *Cell* 23, 755 - 766
- Kirchhausen, T., Harrison, S.C., Parham, P., Brodsky, F.M. (1983): Location and distribution of the lightchains in clathrin trimers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 2481 - 2485.
- Kosaka, T., Ikeda, K. (1983): Reversible blockage of membrane retrieval and endocytosis in the garland cell of the temperature-sensitive mutant of *Drosophila melanogaster*, *shibire*. *J. Cell Biol.* 97, 499 - 507.
- Kuehn, M.J., Schekman, R. (1997): COPII and secretory cargo capture into transport vesicles. *Curr. Opin. In Cell Biol.* 9, 477 - 483.

- Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680 - 685.
- LeBorgne, R., Schmidt, A., Mauxion, F., Griffiths, G., Hoflack, B. (1993): Binding of AP-1 Golgi adaptors to membranes requires phosphorylated cytoplasmic domains of the mannose 6-phosphate / insulin-like growth factor II receptor. *J. Biol. Chem.* 268, 22552 - 22556.
- LeBorgne, R., Hoflack, B. (1998): Mechanisms of protein sorting and coat assembly: insights from the clathrin-coated vesicle pathway. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10, 499 - 503.
- Lin, F.T., Krüger, K.M., Kendall, H.E., Daaka, Y., Fredericks, Z.L., Pitcher, J.A., Lefkowitz, R.J. (1997): Clathrin-mediated Endocytosis of the β -Adrenergic Receptor is Regulated by Phosphorylation/Dephosphorylation of β -Arrestin 1. *J. Biol. Chem.* 272, 31051 - 31057.
- Mahaffey, D.T., Peeler, J.S., Brodsky, F.M., Anderson, R.G.W. (1990): Clathrin-coated pits contain an integral membrane protein that binds the AP-2 subunit with high affinity. *J. Biol. Chem.* 265, 16514 - 16520.
- Mallet, W.G., Brodsky, F.M. (1996): A membrane-associated protein complex with selective binding to the clathrin coat adaptor AP1. *J. Cell Sci.* 109, 3059 - 3068.
- Manfredi, J.J., Bazari, W.L. (1987): Purification and Characterization of two Distinct Complexes of Assembly Polypeptides from Calf Brain coated Vesicles That Differ in Their Polypeptide Composition and Kinase Activities. *J. Biol. Chem.* 262, 12182 - 12188.
- Marks, M.S., Woodruff, L., Ohno, H., Bonifacino, J.S. (1996): Protein targeting by tyrosine- and di-leucine-based signals: evidence for a distinct saturable components. *J. Cell Biol.* 135, 341 - 354.

- Morris, S.A., Mann, A., Ungewickell, E. (1990): Analysis of 100-180 kDa phosphoproteins in Clathrin-coated Vesicles from Bovine Brain. *J. Biol. Chem.* 265, 3354 - 3357.
- Odorizzi, G., Cowles, C.R., Emr, S.D. (1998): The AP-3 complex: a coat of many colours. *Trends. Cell Biol.* 8, 282 - 288.
- Ohno, H., (1995): Interaction of tyrosine-based sorting signals with clathrin-associated proteins. *Science* 269, 1872 - 1875.
- Ohno, H., Fournier, M.C., Poy, G., Bonifacino, J.S. (1996): Structural determinants of interaction of tyrosine-based sorting signals with the adaptor medium chains. *J. Biol. Chem.* 271, 29009 - 29015.
- Ooi, C.E., Moreira, J.E., Dell'Angelica, E.C., Poy, G., Wassarman, D.A., Bonifacino, J.S. (1997): Altered expression of a novel adaptin leads to defective pigmentgranule biogenesis in the drosophila eye color mutant garnet. *EMBO J.* 16, 4508 - 4518.
- Ooi, C.E., Dell'Angelica, E.C., Bonifacino, J.S. (1998): ADP-Ribosylation Factor 1 (ARF 1) Regulates Recruitment of the AP-3 Adaptor Complex to Membranes. *J. Cell Biol.* 142, 391 - 402.
- Panek, H.R., Stepp, J.D., Engle, H.M., Marks, K.M., Tan, P., Lemmon, S.K., Robinson, L.C. (1997): Suppressors of YCK-encoded yeast casein kinase 1 define the four subunits of a novel clathrin AP-like complex. *EMBO J.* 16, 4194 - 4204.
- Pauloin, A., Thuriéau, C. (1993): The 50 kDa protein subunit of assembly polypeptide (AP) AP-2 adaptor from clathrin-coated vesicles is phosphorylated on threonine-156 by AP-1 and a soluble AP50 kinase which co-purifies with the assembly polypeptides. *Biochem. J.* 296, 409 -415.
- Pearse, B.M.F. (1975): Coated vesicles from pig brain: purification and biochemical characterization. *J. Mol. Biol.* 97, 93 -98.

- Peeler, J.S., Donzell, W.C., Anderson, R.G.W. (1993): The appendage domain of the AP-2 subunit is not required for assembly or invagination of clathrin-coated pits. *J. Cell. Biol.* 120, 47 - 54.
- Peters, P.J., Hsu, V.W., Eng Ooi, C., Finazzi, D., Teal, S.B., Oorschot, V., Donaldson, J.G., Klausner, R.D. (1995): Overexpressions of wild-type and mutant ARF 1 and ARF 6: distinct perturbations of nonoverlapping membrane compartments. *J. Cell Biol.* 128, 1003 - 1017.
- Prasad, K., Keen, J.H. (1991): Interaction of assembly protein AP-2 and its isolated subunits with clathrin. *Biochemistry* 30, 5590 - 5597.
- Rapoport, I., Chen, Y.C., Cupers, P., Shoelson, S.E., Kirchhausen, T. (1998) Dileucine-based sorting signals bind to the beta chain of AP-1 at a site distinct and regulated differently from the tyrosine-based motif-binding site. *EMBO J.* 17, 2148 - 2155.
- Reaves, B., Banting, G. (1994): Overexpression of TGN 38/41 leads to mislocation of γ - Adaptin. *FEBS letters* 351, 448 - 456.
- Robinson, M.S. (1993): Assembly and targeting of adaptin chimeras in transfected cells *J. Cell Biol.* 123, 67 - 77.
- Robinson, M.S., Kreis, T.E. (1992): Recruitment of coat proteins onto Golgi membranes in intact and permeabilized cells: effects of brefeldin A and G protein activators. *Cell* 69, 129 - 138.
- Rohrer, J., Schweizer, A., Johnson, K.F., Kornfeld, S. (1995): A Determinant in the Cytoplasmic Tail of the Cation-dependent Mannose 6-phosphate receptor Prevents Trafficking to Lysosomes. *J. Cell Biol.* 130, 1297 - 1306.
- Saito, T., Gallusser, A., Kirchhausen, T., Bonifacino, J.S. (1995): Interaction of Tyrosine-based Sorting Signals with Clathrin-Associated Proteins. *Science* 269, 1872 - 1875.

- Sandoval, I.V., Bakke, O. (1994): Targetting of membrane proteins to endosomes and lysosomes. *Trends Cell Biol.* 4, 292 - 297.
- Sandoval, I.V., Arredondo, J.J., Alcalde, J., Noriega, A.G., Vandekerckhov, J., Jimenez, M.A., Rico, M. (1994): The residues Leu(Ile)(475)-Ile(Leu,Val,Ala)(476), contained in the extended carboxyl cytoplasmic tail, are critical for targetting of the resident lysosomal membrane protein LimpII to lysosomes. *J. Biol. Chem.* 269, 6622 - 6631.
- Schröder, S., Ungewickell, E. (1991): Subunit interaction and function of clathrin coated vesicle adaptors from the Golgi and the plasmamembrane. *J. Biol. Chem.* 266, 7910 - 7918.
- Seaman, M.N.J., Sowerby, P.J., Robinson, M.S. (1996): Cytosolic and Membrane-associated Proteins Involved in the Recruitment of AP-1 Adaptors onto the Trans-Golgi Network. *J. Biol. Chem.* 271, 25446 - 25451.
- Seaman, M.N.J., Ball, C.L., Robinson, M.S. (1993): Targeting and mistargeting of plasma membrane adaptors in vitro. *J. Cell Biol.* 123, 1093 - 1105.
- Simpson, F., Bright, N.A., West, M.A., Newman, L.S., Darnell, R.B., Robinson, M.S. (1996): A novel adaptor-related protein complex. *J. Cell Biol.* 133, 749 - 760.
- Simpson, F., Peden, A.A., Christopoulou, L., Robinson, M.S. (1997): Characterization of the adaptor-related protein complex AP-3. *J. Cell Biol.* 137, 835 - 845.
- Slepnev, V.I., Ochoa, G-C., Butler, M.H., Grabs, D., DeCamilli, P. (1998): Role of Phosphorylation in Regulation of the Assembly of Endocytic Coat Complexes. *Science* 281, 821 - 824.

- Sosa, M.A., Schmidt, B., von Figura, K., Hille-Rehfeld, A. (1993): In Vitro Binding of Plasma Membrane-coated Vesicle Adaptors to the Cytoplasmic Domain of Lysosomal Acid Phosphatase. *J. Biol. Chem.* 268, 12537 - 12543.
- Sowerby, P.J., Robinson, M.S. (1996): Cytosolic and peripheral membrane proteins involved in AP-1 adaptor recruitment onto the TGN. *Mol. Biol. Cell.* 7,
- Stammes, M.A., Rothman, J.E. (1993): The Binding of AP-1 Clathrin Adaptor Particles to Golgi Membranes Requires ADP-Ribosylation Factor, a Small GTP-Binding Protein. *Cell* 73, 999 -1005.
- Takei, K., Slepnev, V.I., Haucke, V., deCamilli, P. (1999): Functional partnership between amphiphysin and dynamin in clathrin-mediated endocytosis. *Nat. Cell Biol.* 1, 33 - 38.
- Timmerman, A.P., Mayrleitner, M.M., Lukas, T.J., Chadwick, C.C., Saito, A., Watterson, D.M., Schindler, H., Fleischer, S. (1992): Inositol polyphosphate receptor and clathrin assembly protein AP-2 are related proteins that form potassium-selective ion channels in planar lipid bilayers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 8976 - 8980.
- Traub, L.M., Ostrom, J.A., Kornfeld, S. (1993): Biochemical dissection of AP-1 recruitment onto Golgi membranes. *J. cell Biol.* 123, 561 - 573.
- Voglmaier, S.M., Keen, J.H., Murphy, J.E., Ferris, C.D., Prestwich, G.D., Snyder, S.H., Theibert, A.B. (1992): Inositol hexakisphosphate receptor identified as the clathrin assembly protein AP-2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 187, 158 - 163.
- Vowels, J.J., Payne, G.S. (1998): A dileucine-like sorting signal directs transport into an AP-3-dependent, clathrin-independent pathway to the Yeast vacuole. *EMBO J.* 17, 2482 - 2493.
- West, M.A., Bright, N.A., Robinson, M.S. (1997): The role of ADP-ribosylation factor and phospholipase D in adaptor recruitment. *J. Cell Biol.* 138, 1239 - 1254.

- Wilde, A., Brodsky, F.M. (1996): In vitro Phosphorylation of Adaptors Regulates Their Interaction with Clathrin. *J. Cell Biol.* 135, 635 - 645.
- Wong, D.H., Brodsky, F.M. (1992): 100.kD Proteins of Golgi - and trans - Golgi network - associated coated vesicles have related but distinct membrane binding properties. *J. Cell. Biol.* 117, 1171 - 1179.
- Ungewickell, E., Branton, D. (1981): Assembly units of clathrin coats. *Nature* 298, 420 - 422.
- Zhang, J.Z., Davletov, B.A., Südhof, T.C. Anderson, R.G.W. (1994): Synaptotagmin I is a high affinity receptor for clathrin AP-2: implications for membrane recycling. *Cell*, 78, 751 - 760.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Kurt von Figura möchte ich für seine stete Gesprächsbereitschaft und sein Interesse am Fortgang dieser Arbeit danken.

Herrn Dr. Stefan Höning danke ich besonders für die Betreuung dieser Arbeit und seiner stetigen Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. Gerhard Gottschalk danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Weiter danke ich allen Mitarbeitern des Instituts Biochemie II für die freundliche Aufnahme und Hilfsbereitschaft, vor allem Bettina Trotte , Jutta Moschner und Nadine Nolte.

Inbesondere bedanke ich mich bei Chris Mühlhausen, Christian Körner, Torben Lübke und Christina Kiecke für die nette Laboratmosphäre. Vor allem aber danke ich Dir, liebe Steffi, für Deine stete Hilfsbereitschaft und moralische Unterstützung.

Ein herzlicher Dank gebührt auch meiner Schwester Christiane Fingerhut, die mir wie immer mit guten Tips weitergeholfen hat, sowie meinem Schwager Bray Stühler für die Überlassung seines Computers.

Bei meinen Eltern, die mich wie immer auch in dieser Phase unterstützt haben, möchte ich mich ganz besonders bedanken.

Lebenslauf

Am 7.2.1971 wurde ich, Anja Fingerhut, als viertes Kind meiner Eltern, Martha Fingerhut, geborene Schneider und Manfred Fingerhut in Schweinfurt geboren.

Von 1977 bis 1981 besuchte ich die Grundschule in Gochsheim und von 1981 bis 1990 das Alexander-von-Humboldt-Gymnasium in Schweinfurt. Dort legte ich im Mai 1990 mein Abitur ab.

Im November des gleichen Jahres begann ich mein Biologiestudium an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg. Meine Vordiplomsprüfung erfolgte im Jahr 1993. Die Diplomarbeit fertigte ich unter der Leitung von Prof. Dr. U. Scheer im Institut für Zell - und Entwicklungsbiologie der Universität Würzburg mit dem Titel: „Sequenzanalyse eines pupalen Kutikulaproteingens“ an. Ich beendete das Studium im Mai 1996 mit dem Diplom.

Im August 1996 begann ich am Institut für Biochemie II der Georg-August-Universität Göttingen unter der Leitung von Prof. Dr. K. von Figura in der Arbeitsgruppe von Dr. S. Höning die hier vorliegende Dissertation mit dem Titel „Untersuchungen zur Beeinflussung der Interaktion von AP 2 mit cytoplasmatischen Rezeptordomänen durch die Phosphorylierung und Dephosphorylierung von AP 2“.