

**Signalbindung und Membraninteraktion  
von  
heterotetrameren Adaptorprotein-Komplexen**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten  
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von  
Kira Luise Späte  
aus Karlsburg

Göttingen 2007

D7

Referent: Prof. Dr. Dr. Kurt von Figura

Koreferent: Prof. Dr. Ivo Feußner

Tag der mündlichen Prüfung: 05. Juli 2007

## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1.</b>	<b>Vesikulärer Transport</b>	<b>1</b>
<b>1.2.</b>	<b>Clathrin-umhüllte Vesikel</b>	<b>3</b>
<b>1.3.</b>	<b>Heterotetramere Adaptorprotein-Komplexe (APs)</b>	<b>5</b>
1.3.1.	Struktur der APs	7
1.3.2.	Lokalisierung und Funktion von APs	10
<b>1.4.</b>	<b>Sortierungssignale von Transmembranproteinen</b>	<b>12</b>
1.4.1.	Tyrosin-haltige Sortierungssignale (YXX $\Phi$ )	14
1.4.2.	Leucin-haltige Sortierungssignale ([D/E]XXXL[L/I])	16
<b>1.5.</b>	<b>Sortierung von lysosomalen Membran-Glykoproteinen</b>	<b>17</b>
<b>1.6.</b>	<b>Model der Funktion von AP2</b>	<b>19</b>
<b>1.7.</b>	<b>Fragestellung</b>	<b>23</b>
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>24</b>
<b>2.1.</b>	<b>Material</b>	<b>24</b>
2.1.1.	Geräte	24
2.1.2.	Verbrauchsmaterial	26
2.1.3.	Chemikalien	27
2.1.4.	Lipide	29
2.1.5.	Reagenzien und Fertiglösungen	29
2.1.6.	Zelllinien	30
2.1.7.	Molekularbiologische Materialien	30
2.1.7.1.	Antibiotika	30
2.1.7.2.	Bakterien	30
2.1.7.3.	Kits	30
2.1.7.4.	Plasmide	31
2.1.7.5.	Expressionsvektoren	32
2.1.7.6.	Enzyme + Nukleotide	33
2.1.7.7.	cDNA	33
2.1.7.8.	Oligonukleotide	33

2.1.8.	Biochemische Materialien	34
2.1.8.1.	Säulen	34
2.1.8.2.	Peptide	35
2.1.8.3.	Proteine	36
2.1.9.	Standard-Puffer für Messungen am Biacore 3000	37
2.1.10.	EDV	37
2.1.10.1.	Software	37
2.1.10.2.	Hardware	38
<b>2.2.</b>	<b>Methoden</b>	<b>38</b>
2.2.1.	Molekularbiologische Methoden	38
2.2.1.1.	Kultivierung von E. coli	38
2.2.1.2.	Herstellung kompetenter Zellen	39
2.2.1.2.1.	Herstellung elektrokompetenter E. coli Zellen	39
2.2.1.2.2.	Herstellung chemokompetenter E. coli Zellen (CaCl <sub>2</sub> -Methode)	40
2.2.1.3.	Transformation von E. coli mit DNA	41
2.2.1.3.1.	Elektroporation	41
2.2.1.3.2.	Transformation in chemokompetente E. coli Zellen	41
2.2.1.4.	Isolierung von DNA aus E. coli	42
2.2.1.5.	Anlegen einer Glycerinkultur	42
2.2.1.6.	Konzentrationsbestimmung von DNA	42
2.2.1.7.	Agarose-Gelelektrophorese	42
2.2.1.8.	DNA-Extraktion aus Agarosegelen	43
2.2.1.9.	Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen	43
2.2.1.10.	Ligation von DNA-Fragmenten	44
2.2.1.11.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	45
2.2.1.12.	DNA Sequenzierung	46
2.2.1.13.	Reinigung von DNA-Fragmenten	46
2.2.1.14.	Präparation von Gesamt-RNA	46
2.2.1.15.	Reverse Transkription	47
2.2.2.	Biochemische Methoden	47
2.2.2.1.	Bestimmung der Proteinkonzentration	47
2.2.2.2.	SDS-PAGE	48
2.2.2.3.	Fällung von Proteinen aus wässriger Lösung	50
2.2.2.4.	Expression und Reinigung von Hexa-His-Proteinen	50

2.2.2.5.	Erhöhung der Konzentration von Proteinlösungen	53
2.2.2.6.	Dialyse	53
2.2.2.7.	CD-Spektroskopie von His- $\mu$ 1-4	54
2.2.2.8.	$\mu$ 2 Gelfiltration analytisch	54
2.2.2.9.	Reinigung von Peptiden	54
2.2.2.10.	Lyophilisation von Peptiden	56
2.2.2.11.	Kopplung von Peptiden an MPB-PE	56
2.2.2.12.	Liposomenpräparation	57
2.2.2.13.	Darstellung von Liposomen durch Negativkontrastierung in der Elektronenmikroskopie	59
2.2.3.	Biacore Biosensor (SPR)	60
2.2.3.1.	Voraussetzungen für die Messung von kinetischen Daten	63
2.2.3.2.	Informationen in einem Sensorgramm	65
2.2.3.3.	Auswertung der Biacore-Daten	69
2.2.3.4.	Messungen mit CM5 Chipoberflächen	72
2.2.3.5.	Messungen mit L1 Chipoberflächen	74
2.2.3.6.	Messungen mit NTA Chipoberflächen	75
2.2.3.7.	Lagerung benutzter Sensoroberflächen	77
2.2.3.8.	Test von Massentransport-Effekten	77
2.2.3.9.	TwoState Interaktionstest	77
2.2.3.10.	Elektronenmikroskopische Darstellung von Liposomen auf einer L1 Sensor-Oberfläche	78
2.2.3.11.	Fluoreszenzmikroskopische Darstellung von Liposomen auf einer L1 Sensor-Oberfläche	79
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>80</b>
<b>3.1.</b>	<b>Interaktion der heterotetrameren Adaptorprotein-Komplexe 1-4 mit Tyrosin-haltigen Sortierungssignalen</b>	<b>80</b>
3.1.1.	Klonierung, bakterielle Expression und Reinigung von c- $\mu$ 1-4	80
3.1.2.	Verwendete Tyrosin-haltige Sortierungssignale	81
3.1.3.	<i>In vitro</i> Interaktionsmessung mit c- $\mu$ 1-4 als Analyt (Biacore 3000)	82
3.1.3.1.	Optimierung der Pufferbedingungen	83
3.1.3.2.	Optimierung der Ligandendichte	86

3.1.4.	<i>In vitro</i> Interaktionsmessung mit c- $\mu$ 2 als Ligand (Biacore T100)	88
3.1.5.	Abweichung der Bindung vom 1:1 Bindungsmodell	89
3.1.5.1.	Ausschluss einer Konformationsänderung	89
3.1.5.2.	Ausschluss der Dimerisierung von c- $\mu$ 2 bei Peptidbindung	90
3.1.5.3.	Heterogenität der Bindung	92
<b>3.2.</b>	<b>Membran- und Signalbindung von AP2</b>	<b>96</b>
3.2.1.	Biacore-basierter <i>in vitro</i> Assay	96
3.2.1.1.	Präparation und Immobilisierung der Liposomen	96
3.2.1.2.	Nachweis der Bindungsfähigkeit der in Liposomen integrierten Phosphatidylinositole	99
3.2.1.3.	Rekombinante AP2 Komplexe	101
3.2.2.	<i>In vitro</i> Analyse der AP2 Membran- und Signalbindung	104
3.2.2.1.	Bindung von AP2 an Tyrosin-haltige Sortierungssignale in Membranumgebung	104
3.2.2.1.1.	Bindungseigenschaften der isolierten c- $\mu$ 2-Kette	105
3.2.2.1.2.	Interaktion des AP2 Core Komplexes mit Tyrosin-haltigen Sortierungssignalen in Membranumgebung	107
3.2.2.2.	Bindung von AP2 an Leucin-haltige Sortierungssignale in Membranumgebung	117
3.2.2.3.	Rolle von ARF6 bei der Membranrekrutierung von AP2	120
3.2.2.3.1.	Erweiterung des Biacore-basierten <i>in vitro</i> Assays	120
3.2.2.3.2.	Bindung von AP2 an ARF6 in Membranumgebung	123
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>128</b>
<b>4.1.</b>	<b>Methodische Verfahren zur <i>in vitro</i> Analyse der AP-Bindung an Sortierungssignale und Membranlipide</b>	<b>128</b>
<b>4.2.</b>	<b>In-vitro Analyse der Interaktion von AP1-4 mit Tyrosin-haltigen Sortierungssignalen</b>	<b>131</b>
4.2.1.	Abweichung der Interaktion zwischen c- $\mu$ -Ketten und Signalpeptiden vom 1:1 Bindungsmodell	131
4.2.1.1.	Optimierung der Versuchsbedingungen	132
4.2.1.2.	Einfluss von positiv-geladenen Aminosäuren auf die Interaktion zwischen c- $\mu$ -Ketten und Signalpeptiden	133

4.2.1.3.	Suche nach einem passenden Bindungsmodell	135
4.2.1.4.	Bedeutung des Einflusses der positiven Reste <i>in vivo</i>	136
4.2.1.5.	Optimaler Versuchsaufbau für die $\mu$ -YXX $\Phi$ -Interaktionsmessung	138
4.2.2.	Tyrosinsignal-Bindung von AP1-4	139
<b>4.3.</b>	<b>Membran- und Signalbindung von AP2</b>	<b>151</b>
4.3.1.	Einfluss von Phosphatidylinositolen auf die Membranbindung von AP2	152
4.3.2.	Einfluss von ARF6 auf die Membranbindung von AP2	154
4.3.3.	Phosphorylierungs-unterstützte AP2-Bindung an Tyrosin-haltige Signale	155
4.3.4.	AP2-Bindung an Leucin-haltige Signale	156
4.3.5.	AP2-Membranbindung <i>in vivo</i>	157
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>160</b>
<b>6.</b>	<b>Literatur</b>	<b>162</b>

## Abkürzungsverzeichnis

# 1. Einleitung

Die eukaryotische Zelle ist ein kompartimentiertes und zugleich dynamisches System. Um den komplexen Austausch zwischen den Kompartimenten und gleichzeitig die Homöostase der Kompartimente zu gewährleisten, ist ein hochspezifischer und koordinierter Transport von Makromolekülen notwendig. Der Proteintransport zwischen verschiedenen Kompartimenten wird durch drei verschiedene Mechanismen vermittelt. Durch den Transmembran-Transport werden Proteine aus dem Zytosol in membranumschlossene Organellen transloziert; der Schleusen-Transport, auch *gated transport* genannt, reguliert den Proteinaustausch zwischen Zytosol und Kern und beim vesikulären Transport werden Proteine mit Hilfe von kleinen, membranumschlossenen Bläschen, den sogenannten Transportvesikeln, von einem Kompartiment zum nächsten befördert.

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stehen sogenannte heterotetramere Adaptorprotein-Komplexe, die eine zentrale Rolle beim vesikulären Transport von membranständigen Proteinen spielen.

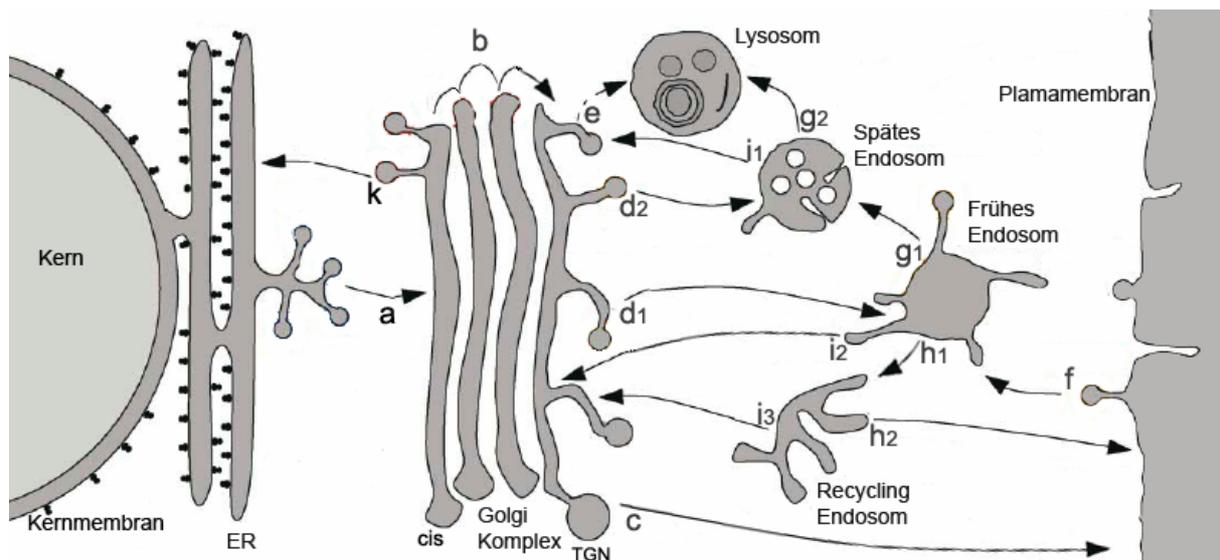
## 1.1. Vesikulärer Transport

(Alberts *et al.*, 2002; Bonifacino und Glick, 2004; Bonifacino und Traub, 2003)

Der vesikuläre Transport vermittelt den Austausch von Membranproteinen, Lipiden und im Lumen befindlichen Molekülen zwischen einigen membranumschlossenen Kompartimenten der Zelle. Diese Kompartimente sind das Endoplasmatische Retikulum (ER), der Golgi-Apparat sowie das endosomale-lysosomale System. Für den Transport werden membranumhüllte Transporteinheiten, meist sphärische Vesikel mit einem Durchmesser von 60 - 100 nm, von der Ursprungsmembran abgeschnürt und durch die Zelle transportiert, um dann mit der Zielmembran zu verschmelzen.

Durch den vesikulären Transport werden wichtige zelluläre Prozesse reguliert, wie die Aufnahme, die Abgabe und der Abbau von Stoffen, die Verteilung von Proteinen nach ihrer Synthese und die Homöostase von Organellen. Beispielsweise wird die Aufnahme von Transferrin und LDL in die Zelle oder die Sortierung von neu-synthetisierten lysosomalen Proteinen zu ihrem Zielorganell durch vesikulären Transport vermittelt.

Transmembranproteine werden mit Hilfe von Vesikeln über zwei bedeutende Transportwege durch die Zelle befördert, die biosynthetische und die endozytotische Route. Auf dem Weg von Organell zu Organell müssen immer wieder wichtige Sortierungsentscheidungen getroffen werden. Verbleibt das Protein in einem Kompartiment oder wird der Transport in ein nächstes initiiert? Und in welche Richtung erfolgt der weitere Transport? In Abb. 1-1 sind die verschiedenen, postulierten Transportschritte dargestellt und mit (a) bis (j) gekennzeichnet. In der biosynthetischen Route werden die Transmembranproteine nach ihrer Synthese am rauhen ER zunächst zur Cis-Seite des Golgi-Apparates (a), dann durch die Golgi-Zisternen und anschliessend zur Trans-Golgi-Seite, dem Trans-Golgi-Netz (TGN) transportiert (b). Am TGN erfolgt entweder eine Sortierung in Richtung Plasmamembran, durch konstitutive oder regulierte Exozytose (c), oder in das endosomale-lysosomale System ( $d_1+d_2+e$ ).



**Abbildung 1-1: Vesikulärer Transport in einer eukaryotischen Zelle.** Die Transportwege sind durch Pfeile gekennzeichnet. Erklärung siehe Text. Die Lumina der membranumschlossenen Kompartimente entspricht topologisch dem extrazellulären Raum. (verändert nach Bonifacino und Glick, 2004).

Das endosomale-lysosomale System besteht aus verschiedenen Subkompartimenten, den frühen Endosomen (*early endosomes* = EE), den späten Endosomen (*late endosomes* = LE oder *multivesicular bodies* = MVB), den Recycling Endosomen (RE) und den Lysosomen. Diese werden durch verschiedene Eigenschaften, wie pH-Wert im Lumen des Organells, unterschiedliche Morphologie

und spezifische Membranproteine charakterisiert (Stoorvogel *et al.*, 1996; Stoorvogel, 1998). Der Transport vom TGN aus kann in frühe ( $d_1$ ) oder späte Endosomen ( $d_2$ ) erfolgen. Der Transportschritt vom TGN direkt zu den Lysosomen ist umstritten (e). In der endozytotischen Route können Transmembranproteine von der Plasmamembran aus durch Endozytose in frühe Endosomen befördert werden (f). Von frühen Endosomen aus ist ein Transport über späte Endosomen zu den Lysosomen ( $g_1+g_2$ ) oder über Recycling Endosomen zur Plasmamembran möglich ( $h_1+h_2$ ). Ein Rücktransport der Proteine von endosomalen Kompartimenten zum Golgi ( $i_{1-3}$ ) sowie vom Golgi zum ER findet ebenfalls statt (k).

Für die Regulation des Transportgeschehens und der damit verbundenen komplexen Sortierung ist ein koordiniertes System von spezifischen, zytosolischen Proteinen notwendig, die sich an die Ursprungsmembran anlagern und die Bildung der Transportvesikel vermitteln. Diese Proteine sorgen für die spezifische Erkennung und Rekrutierung der zu sortierenden Moleküle, sowie für die Einstülpung der Membran und die Abschnürung des Vesikels. Viele Vesikel erhalten durch die Proteinanlagerung eine regelrechte Hülle und werden daher als *coated vesicle* (*coated* = beschichtet) bezeichnet. Mehrere Typen von beschichteten Vesikeln sind bekannt, die jeweils einen spezifischen Transportweg zwischen Organellen vermitteln (Kirchhausen, 2000; Aridor und Traub, 2002). Dabei ist die Gruppe der Clathrin-umhüllten Vesikel eine der am besten beschriebenen Vesikelfamilien.

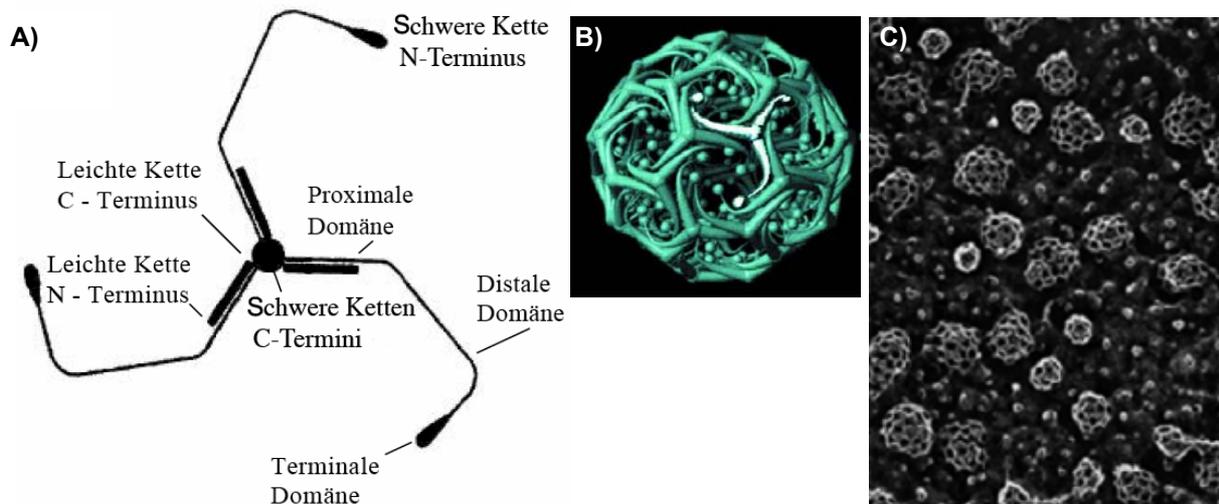
## 1.2. Clathrin-umhüllte Vesikel

(Alberts *et al.*, 2002; Kirchhausen, 2000; Owen *et al.*, 2004)

Die Clathrin-umhüllten Vesikel (*Clathrin-coated vesicle* = CCV) verdanken ihren Namen dem Hauptprotein der Proteinhülle, dem Clathrin. Clathrin besteht aus drei schweren (192 kDa) und drei leichten Polypeptidketten (30 kDa), die gemeinsam ein sogenanntes Triskelion bilden (Abb. 1-2 A). Triskelions besitzen die Eigenschaft sich selbst zu einer käfigartigen Struktur aus Fünf- und Sechsecken zusammenlagern zu können, welche sich als Hülle zunächst um den abzuschnürenden Membranbereich (*Clathrin-coated pit* = CCP) und später um das gesamte Vesikel legt (Abb.1-2).

Clathrin selbst ist nicht in der Lage mit Membranlipiden oder Transmembranproteinen zu interagieren, deshalb verbinden sogenannte Clathrin-Adaptorproteine die Clathrin-Hülle mit den Membrankomponenten. Mehr als 20

Clathrin-Adaptoren sind bereits bekannt, die in mehrere Klassen eingeteilt werden können. Einige binden an Lipide, wie z.B. *clathrin assembly lymphoid myeloid leukemia protein* (CALM), als gehirnspezifisches Homolog auch Adaptorprotein 180 (AP180) genannt und Amphiphysine. Andere interagieren mit Membranproteinen und manche davon zusätzlich mit Lipiden, wie z.B. heterotetramere Adaptorprotein-Komplexe (APs); *Golgi-localized,- $\gamma$ -ear-containing,-ARF-binding proteins* (GGAs); Epsin 1-3;  $\beta$ -Arrestin, um nur die wichtigsten zu nennen. Eine ausführliche Zusammenfassung findet sich in Owen *et al.*, 2004).



**Abbildung 1-2: Clathrin.** A) Schematische Abbildung eines Clathrin-Triskelions (verändert nach Fingerhut, 2000) B) Model eines aus Triskelions zusammengesetzten Clathrin-Käfigs. (Kirchhausen, 2000) C) Elektronenmikroskopische Aufnahme Clathrin-umhüllter Pits und Vesikel an der Innenseite der Plasmamembran (Heuser, 1980).

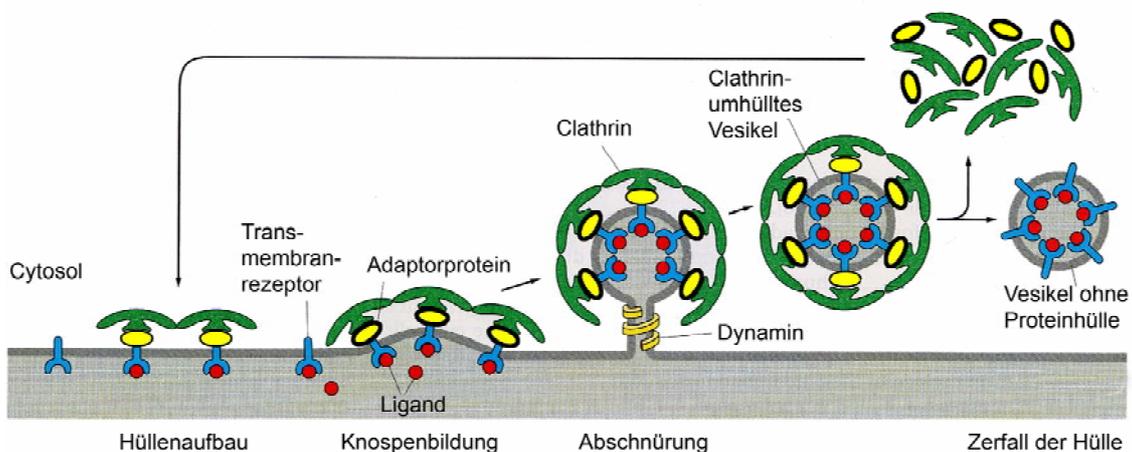
Ausser Clathrin und Clathrin-Adaptoren beinhalten CCVs akzessorische und regulatorische Proteine, die ebenfalls mit den Adaptorproteinen interagieren und wichtige Aufgaben bei der Vesikelbildung, aber auch beim späteren Abstreifen der Vesikelhülle, bei der Anbindung ans Zytoskelett und bei der Interaktion mit der Zielmembran erfüllen.

Durch die Vielzahl der Bindungen zwischen Adaptorproteinen, Membranproteinen- und -lipiden, akzessorischen und regulatorischen Proteinen und natürlich Clathrin entsteht ein Netzwerk aus Protein-Protein- und Protein-Lipid-Interaktionen, welches für die korrekte Bildung von CCVs notwendig ist (siehe auch Abb. 4-5).

Je nach vorhandenen Adaptorproteinen entstehen Subtypen von CCVs, die unterschiedliche Transportprozesse in der Zelle vermitteln. Clathrin selbst dient dabei immer als äussere, mechanische Hülle und spielt für verschiedene Transportschritte

eine Rolle, z.B. bei der Clathrin-vermittelten Endozytose an der Plasmamembran und bei Transportvorgängen am TGN und den Endosomen.

Das Zusammenspiel aller Hüllproteine gewährleistet schliesslich die spezifische und regulierte Ansammlung von zu transportierenden Transmembranproteinen im *Clathrin-coated Pit*, die weitere Einstülpung dieses Membranbereiches bis zur Vesikelentstehung sowie die Abschnürung des Vesikels (Abb. 1-3). Im Zytosol wird die Vesikelhülle abgestreift. Die Hüllproteine liegen wieder zytoplasmatisch vor und können erneut zur Vesikelbildung an die Membran rekrutiert werden. Das Vesikel wandert ohne Proteinumhüllung an Zytoskelettstrukturen entlang zu seiner Zielmembran, mit der es spezifisch interagiert und letztlich verschmilzt.



**Abbildung 1-3: Bildung eines Clathrin-umhüllten Vesikels.** CCVs bestehen aus einer inneren Schicht: Membran und Transmembranproteine; einer mittleren Schicht: Clathrin-Adaptorproteine, akzessorische und regulatorische Proteine; sowie einer äusseren Clathrin-Schicht. Weitere Erklärungen siehe Text. (verändert nach Alberts *et al.*, 2002)

### 1.3. Heterotetramere Adaptorprotein-Komplexe (APs)

Vier verschiedene heterotetramere Adaptorproteinkomplexe sind identifiziert worden, AP1 (Ahle *et al.*, 1988), AP2 (Ahle und Ungewickell, 1989), AP3 (Dell'Angelica *et al.*, 1997a; Panek *et al.*, 1997; Simpson *et al.*, 1997) und AP4 (Dell'Angelica *et al.*, 1999a; Hirst *et al.*, 1999). AP1, AP2 und AP3 werden in allen eukaryotischen Zellen expremiert, während AP4 nur in höheren Eukaryoten, jedoch nicht in *Saccharomyces cerevisiae*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* und *Schizosaccharomyces pombe* vorkommt (Boehm und Bonifacino, 2001). Zusätzlich

gibt es zwei zelltypspezifische Adaptorkomplex-Varianten AP1B in Epithelzellen und AP3B in neuronalen Zellen. Die jeweiligen  $\mu$ -Untereinheiten ( $\mu$ 1B bzw.  $\mu$ 3B) dieser Komplexe und im Fall von AP3B eine  $\beta$ 3B-Untereinheit ( $\beta$ -neuronal adaptor protein =  $\beta$ -NAP) werden nur gewebespezifisch expremiert. Ausserdem wurden mehrere Gen- sowie Splicevarianten von Adaptor-Untereinheiten identifiziert, deren Funktion derzeit unklar ist (Boehm und Bonifacino, 2001).

Die heterotetrameren Adaptorkomplexe AP1 und AP2 waren die ersten bekannten Clathrin-Adaptoren und sind die Haupt-Adaptoren in CCVs an Plasmamembran und TGN. Ursprünglich nahm man an, dass ohne diese Adaptoren eine Polymerisierung von Clathrin unter physiologischen Bedingungen unmöglich ist. Jedoch konnte bei Untersuchungen an Hefe-Zell-Mutanten, denen funktionelles AP2 bzw. AP1 fehlt, trotzdem eine CCV-Bildung beobachtet werden (Rad *et al.*, 1995). Den gleichen Phänotyp zeigten mit AP2-siRNA behandelte HeLa-Zellen. Die CCV-Bildung war zwar um etwa 90 % vermindert, konnte aber stattfinden (Motley *et al.*, 2003; Hinrichsen *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2004; Conner und Schmid, 2003).

Selbst wenn alle bekannten AP-Untereinheiten in Hefezellen gleichzeitig fehlten, wurden weiterhin CCVs gebildet (Huang *et al.*, 1999; Yeung *et al.*, 1999). Die Vitalität dieser Zellen war allerdings stark beeinflusst. Wie bereits in Abschnitt 1.3 beschrieben, ist heute klar, dass es eine Vielzahl von anderen Adaptoren gibt, die Clathrin binden und damit die Bildung von CCVs vermitteln können. Trotzdem haben die AP-Komplexe eine zentrale Rolle bei der CCV-Bildung. Auf zellulärer Ebene ist der Verlust von AP-Komplexen zwar tolerierbar, aber er führt zu ausgeprägten Störungen beim Transport von Membranproteinen. Das Fehlen von APs in multizellulären Organismen hat noch weitreichendere Konsequenzen. Der *Knock-out* von AP1, AP2 oder AP4 in Mäusen ist letal (AP1: Zizioli *et al.*, 1999; Meyer *et al.*, 2000; AP2: Mitsunari *et al.*, 2005; AP4: unpublizierte Daten von J.S. Bonifacino), wie auch der Verlust von AP2 in *Drosophila melanogaster* (Gonzalez-Gaitan und Jackle, 1997) und von AP1 bzw. AP2 in *Caenorhabditis elegans* (Shim *et al.*, 2000; Shim und Lee, 2000). Die Existenz natürlicher AP3-Mutanten in Fliege, Maus und Mensch zeigen, dass in diesem Fall der funktionelle Verlust des AP-Komplexes nicht letal ist (Ooi *et al.*, 1997; Sevrioukov *et al.*, 1999; Mullins *et al.*, 1999; Kretzschmar *et al.*, 2000; Kantheti *et al.*, 1998; Feng *et al.*, 1999). Jedoch entstehen durch den gestörten, vesikulären Transport klinische Symptome, wie oculocutaner Albinismus, hämorrhagische Diathese und Lungenfibrose, die unter dem Krankheitsbild

hereditäres, autosomalrezessives Hermansky-Pudlak-Syndrom Typ 2 (HPS-2) zusammengefasst werden (Huizing *et al.*, 2000).

### 1.3.1. Struktur der APs

(Collins *et al.*, 2002; Owen *et al.*, 2004; Heldwein *et al.*, 2004)

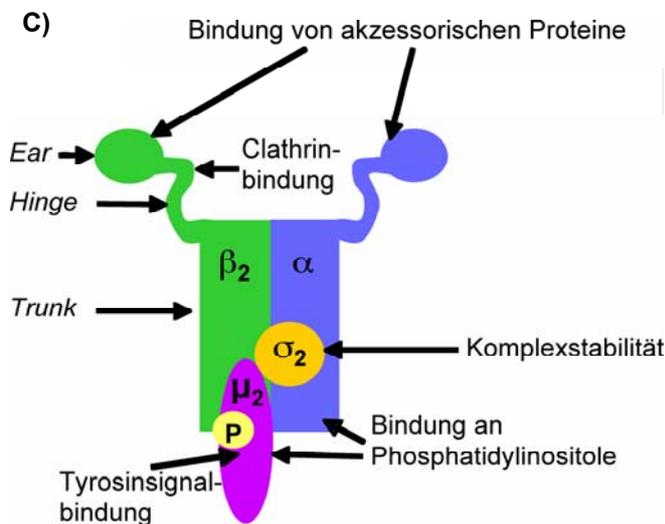
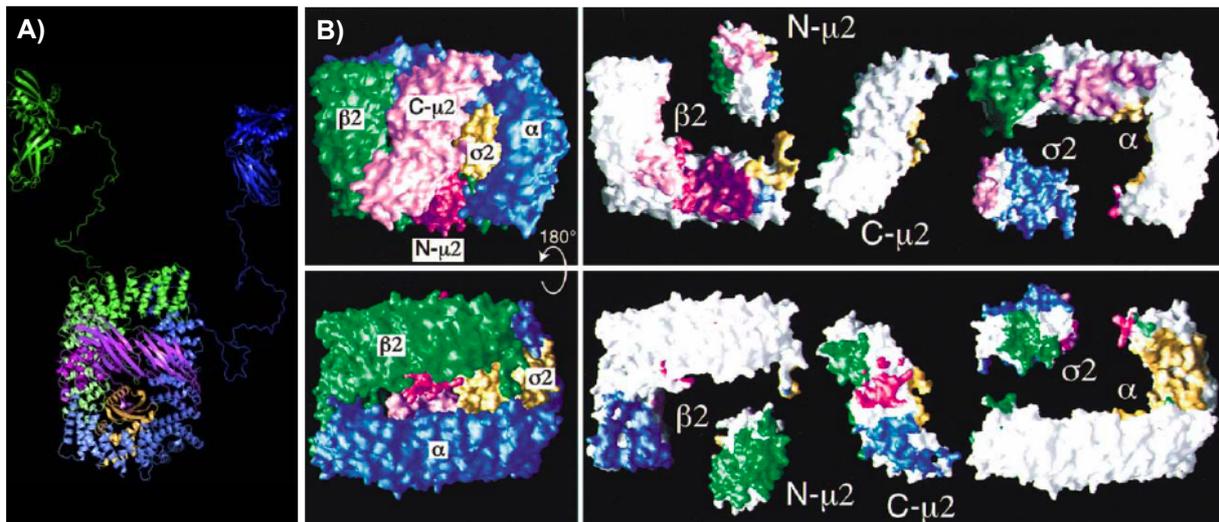
Alle heterotetrameren AP-Komplexe bestehen aus zwei grossen ( $\beta$ 1-4 und  $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  oder  $\epsilon$ ; 100-120 kDa), einer mittleren ( $\mu$ 1-4; ~ 50 kDa) und einer kleinen Untereinheit ( $\sigma$ 1-4; 15-20 kDa) (siehe auch Tab. 1-1). Die analogen Untereinheiten der vier Komplexe weisen lediglich eine Aminosäuresequenzidentität zwischen 21 und 83 % auf, trotzdem ist der Aufbau der vier APs homolog und es zeigen sich viele funktionelle Gemeinsamkeiten (Boehm und Bonifacio, 2001; Collins *et al.*, 2002; Ghosh und Kornfeld, 2003a).

**Tabelle 1-1: Heterotetramere Adaptor-Komplexe.** (verändert nach Chapuy, 2005)

	AP1A	AP1B	AP2	AP3A	AP3B	AP4
Untereinheiten						
klein	$\sigma$ 1	$\sigma$ 1	$\sigma$ 2	$\sigma$ 3	$\sigma$ 3	$\sigma$ 4
mittel	$\mu$ 1A	$\mu$ 1B	$\mu$ 2	$\mu$ 3A	$\mu$ 3B	$\mu$ 4
gross konserviert	$\beta$ 1	$\beta$ 1	$\beta$ 2	$\beta$ 3	$\beta$ 3B	$\beta$ 4
gross variabel	$\gamma$	$\gamma$	$\alpha$	$\delta$	$\delta$	$\epsilon$
Lokalisation	TGN/E	E	PM	TGN/E	E	TGN
Postulierte Funktion	TGN $\rightleftharpoons$ EE EE $\rightleftharpoons$ TGN	baso-laterale Sortierung in Epithelzellen	Endozytose	TGN $\rightleftharpoons$ LE EE $\rightleftharpoons$ LE TGN/E $\rightleftharpoons$ LRO	Bildung synaptischer Vesikel	baso-laterale Sortierung in Epithelzellen
Clathrinbindung	+	+	+	+/-	-	-

Da das an der Rezeptor-vermittelten Endozytose beteiligte AP2 am besten untersucht worden ist, soll im folgenden die Adaptor-Struktur und die Bindungsstellen für Proteine und Lipide anhand von AP2 dargestellt werden.

Die grossen Untereinheiten des Komplexes können in eine C-terminale *Ear*- (auch *Appendage*-Domäne genannt), eine proteolytisch sensitive *Hinge*-, und eine N-terminale *Trunk*-Domäne unterteilt werden (Abb. 1-4 A). Der N-terminale Teil der beiden grossen Untereinheiten, sowie die  $\sigma$ 2- und die  $\mu$ 2- Untereinheit bilden den sogenannten Adaptor-Core-Komplex, der bereits kristallisiert worden ist und eine Ausdehnung von 100 x 80 Å hat.



**Abbildung 1-4:** Struktur des AP2-Komplexes.

Die  $\alpha$ -Untereinheit ist blau,  $\beta_2$  grün,  $\mu_2$  lilafarben und  $\sigma_2$  goldfarben dargestellt. A) Modell des AP2-Komplexes zusammengesetzt aus der Kristallstruktur der  $\alpha$ -Ear-Domäne (Owen *et al.*, 1999), der  $\beta_2$ -Ear-Domäne (Owen *et al.*, 2000) und des AP2-Core's (Collins *et al.*, 2002). Die *hinge*-Regionen sind anhand der Sequenz am Computer modelliert worden. Die Abbildung wurde freundlicherweise von Dr. David Owen zur Verfügung gestellt. B) Darstellung der Kontaktstellen zwischen den Untereinheiten.

Auf der linken Seite: Der AP2-Core-Komplex aus zwei verschiedenen Perspektiven. Auf der rechten Seite: Die Untereinheiten sind weiss dargestellt. Die Kontaktstellen mit einer anderen Untereinheit sind durch die jeweilige Farbe dieser Untereinheit gekennzeichnet. (verändert nach Collins *et al.*, 2002) C) Schematische Darstellung der Struktur und der Bindungsstellen des AP2-Komplexes.

Der N-Terminus von  $\mu_2$  (N- $\mu_2$ ) ähnelt strukturell der  $\sigma_2$ -Untereinheit, die  $\alpha$ -Trunk- der  $\beta_2$ -Trunk-Domäne.  $\alpha$  und  $\sigma_2$  sowie  $\beta_2$  und  $\mu_2$  bilden je ein festes Heterodimer. Dabei sitzen N- $\mu_2$  und  $\sigma_2$  jeweils an der Innenseite der gekrümmten, grossen Untereinheiten (Abb. 1-4). Zwischen den beiden  $\alpha/\sigma_2$  und  $\beta_2/\mu_2$  Heterodimeren entsteht eine flache Mulde, in welche sich der C-terminale Teil von  $\mu_2$  (C- $\mu_2$ ) legt. Der N- und C-Terminus von  $\mu_2$  sind durch einen flexiblen Linker (AS 135-158) verbunden. Jede Untereinheit interagiert im komplex mit allen anderen (Abb. 1-4 C).

Die  $\sigma 2$  und die N- $\mu 2$  Untereinheit werden für die Stabilisierung des Komplexes verantwortlich gemacht.

Am N-Terminus der  $\alpha$ - und am C-terminalen Teil der  $\mu$ -Untereinheit konnten Bindungsstellen für Membranlipide (Phosphatidylinositole (PIs)) nachgewiesen werden (Gaidarov *et al.*, 1996; Rohde *et al.*, 2002). Die Details der Bindung wurden durch die Strukturaufklärung des Core-Komplexes in Anwesenheit von Inositol-(1,2,3,4,5,6)-hexakisphosphat (InsP<sub>6</sub> = PI-Analogon) auf molekularer Ebene beschrieben (Collins *et al.*, 2002). Beide Interaktionen werden durch die Phosphatgruppen der Phosphatidylinositole und im wesentlichen durch basische Aminosäureseiten-Ketten des Komplexes vermittelt (involvierte Aminosäuren:  $\alpha$ -Untereinheit: Gly12, Arg11, Asn39, Lys43, Tyr53, Lys57, Tyr58, Lys61;  $\mu$ -Untereinheit: Lys341, Lys343, Lys345, Lys354, Lys356). Dabei erfolgt die Bindung nicht in einer Bindungstasche, sondern über die Enden der Aminosäureseiten-Ketten, wie bei einem Ball der auf den Fingerspitzen einer halb-geschlossenen Hand balanciert wird (Collins *et al.*, 2002).

Die Bindung von AP2 an Membranproteine wird über lineare Sortierungssignale im zytoplasmatischen Teil der Proteine vermittelt (siehe auch 1.4.). Die Interaktion zwischen Tyrosin-haltigen Sortierungssignalen und dem C-terminalen Teil der  $\mu 2$ -Untereinheit ist bereits vielfach belegt und bis auf die Strukturebene aufgeklärt worden (Owen und Evans, 1998). Eine detaillierte Beschreibung der Signal-Bindung durch  $\mu 2$  erfolgt in Abschnitt 1.4.1. Durch die Kristallisierung des AP2-Core-Komplexes hat sich gezeigt, dass die Signal-Bindungsstelle im Komplex durch die Interaktion zwischen  $\mu 2$  und  $\beta 2$  blockiert ist. Eine Bindung von AP2 an Tyrosin-haltige Signale ist in dieser Konformation deshalb nicht möglich. Collins *et al.*, 2002 hat daher ein Model zur Konformationsänderung von AP2 postuliert, welches in Abschnitt 1.6. näher erläutert wird.

Die Bindung von AP2 an Leucin-haltige Signale ist im Gegensatz zu Tyrosin-haltigen Signalen weniger gut charakterisiert. Während einige Daten auf eine Interaktion mit der  $\beta 2$ -Untereinheit hinweisen (Greenberg *et al.*, 1998; Rapoport *et al.*, 1998), deuten andere auf eine Bindung an die  $\mu 2$ -Untereinheit hin (Rodionov und Bakke, 1998). Janvier *et al.*, 2003 postuliert, dass AP2 gar nicht an Leucin-haltige Signale bindet.

Die Kristallstruktur der beiden Ear-Domänen ist unabhängig vom Rest des Komplexes aufgeklärt worden (Owen *et al.*, 1999; Owen *et al.*, 2000). Beide haben eine homologe Struktur und binden akzessorische Proteine und andere Clathrin-

Adaptoren. Die  $\beta$ 2-*Ear*-Domäne bindet zusätzlich Clathrin und  $\beta$ -Arrestin. Die *Ear*-Domänen sind durch lange, unstrukturierte Bereiche, den *hinge*-Regionen, mit dem Core-Komplex verbunden. Die *hinge*-Regionen haben vermutlich eine Ausdehnung bis zu 200-300 Å und ermöglichen dadurch eine hohe Flexibilität der *Ear*-Domänen (Collins *et al.*, 2002). Ausserdem enthalten sie lineare Bindungsmotive für verschiedene an der Endozytose beteiligte Proteine. Darunter auch die Konsensussequenz (L[LI][DEN][LF][DE]), die sich im  $\beta$ 2-*hinge* befindet (Dell'Angelica *et al.*, 1998; Kirchhausen, 2000) und für die Bindung an Clathrin zuständig ist. Zusätzlich enthalten diese Domänen mehrere, potentielle Phosphorylierungsstellen (Newman *et al.*, 1995; Wilde und Brodsky, 1996; Dell'Angelica *et al.*, 1997b; Faundez und Kelly, 2000), die für die funktionelle Regulation eine Rolle spielen könnten.

Trotz struktureller Gemeinsamkeiten der vier Adaptorkomplexe soll hier nochmal ausdrücklich darauf hingewiesen werden, dass die Adaptoren in ihrer Bindungsspezifität für Proteine und Lipide und in ihrer Lokalisation differieren. Besonders Bereiche mit geringer Sequenz-Homologie eignen sich für Adaptor-spezifische Aufgaben, dies betrifft vor allem die *hinge*- und die *ear*-Domänen, sowie die variablen, grossen Untereinheiten  $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  und  $\epsilon$  (Boehm und Bonifacino, 2001).

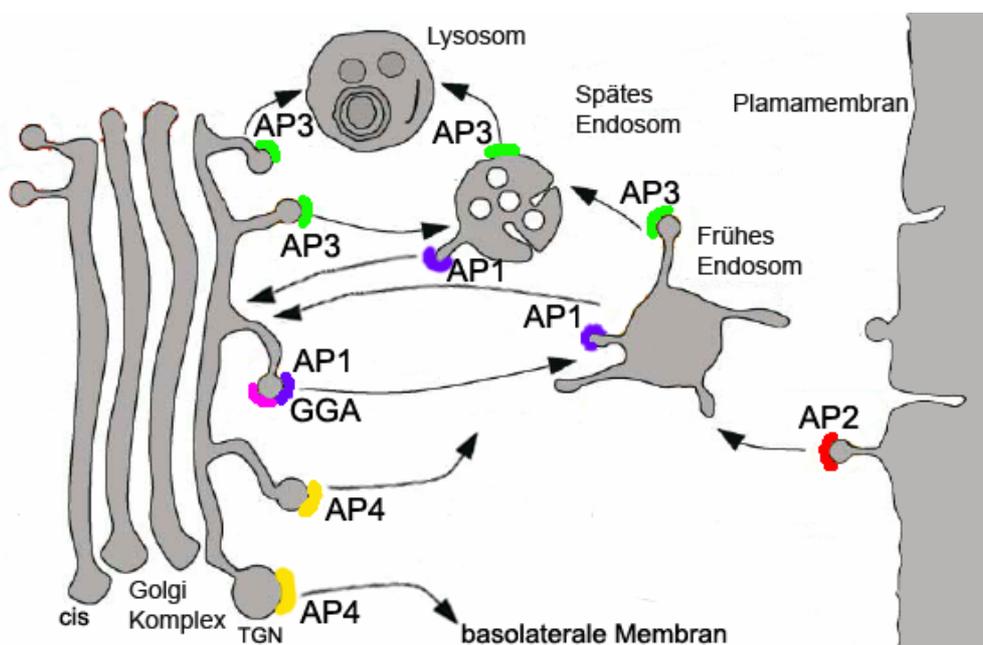
### 1.3.2. Lokalisierung und Funktion von APs

Die Rolle der AP-Komplexe beim Vesikeltransport konnte bisher nur für AP2 eindeutig nachgewiesen werden (postulierte Lokalisation und Funktion siehe auch Tab. 1-1). AP2 ist ausschliesslich an der Clathrin-vermittelte Endozytose ausgehend von der Plasmamembran beteiligt, während AP1, AP3 und AP4 verschiedene, noch nicht klar belegte, Sortierfunktionen am TGN und/oder den Endosomen inne haben (Abb. 1-5).

AP1A konnte sowohl am TGN als auch an den Endosomen lokalisiert werden. Die Bildung von Clathrin-haltigen Vesikeln durch AP1A findet vermutlich an beiden Kompartimenten statt. Am TGN vermittelt AP1A wahrscheinlich den Transport zu den frühen Endosomen (Le Borgne *et al.*, 1993; Le Borgne *et al.*, 1996; Lewin und Mellman, 1998, Chapuy, 2005). Neuere Erkenntnisse deuten dabei auf eine Kooperation mit den monomeren GGA-Proteinen, hin (Puertollano *et al.*, 2001; Doray *et al.*, 2002, Puertollano *et al.*, 2003; Ghosh und Kornfeld, 2003b). Auch der Rücktransport von Proteinen aus dem endosomalen Kompartiment zum TGN scheint

über AP1A-haltige Vesikel möglich zu sein (Mallard *et al.*, 1998; Meyer *et al.*, 2000; Falguieres *et al.*, 2001).

In polarisierten Epithelzellen wird zusätzlich ein AP1B-Komplex mit der epithelspezifischen Untereinheit  $\mu$ 1B exprimiert (Fölsch *et al.*, 2001). Dieser ist vermutlich am basolateralen Transport ausgehend von frühen Endosomen beteiligt (Gan *et al.*, 2002).



**Abbildung 1-5: Mögliche Transportfunktionen von AP1, AP2, AP3 und AP4.** Erklärung siehe Text. (Verändert nach Bonifacino und Glick, 2004).

AP3A konnte ebenfalls am TGN und an Endosomen nachgewiesen werden (Dell'Angelica *et al.*, 1999b; Simpson *et al.*, 1997; Peden *et al.*, 2004). Die Interaktion des Komplexes mit Clathrin ist jedoch trotz vorhandenem Clathrin-Bindungsmotiv umstritten (Dell'Angelica *et al.*, 1998; Peden *et al.*, 2002; Peden *et al.*, 2004). AP3A wird eine Teilnahme an der Sortierung in Richtung Lysosom und Lysosomenverwandte Organellen (*lysosomal related organelles* = LRO), wie z.B. den Melanosomen, zugeschrieben (Zhen *et al.*, 1999; Honing *et al.*, 1998; Le Borgne *et al.*, 1998; Cowles *et al.*, 1997; Stepp *et al.*, 1997; Kantheti *et al.*, 1998; Dell'Angelica *et al.*, 1999b; Yang *et al.*, 2000; Rous *et al.*, 2002; Daugherty *et al.*, 2001; Mullins *et al.*, 2000). Die meisten dieser Studien beziehen sich dabei entweder auf eine Analyse der Sortierung von Membranproteinen in AP3 defizienten Zellen bzw. Organismen oder auf einen Nachweis der Bindung zwischen dem Adaptorkomplex und dem Sortierungssignal der entsprechenden Proteine. Welche Schritte auf dem

Weg dieser Proteine in der Zelle durch AP3A vermittelt werden, ist allerdings immer noch umstritten. Einige Hinweise deuten auf eine Beteiligung an der Sortierung innerhalb endosomaler Kompartimente hin, andere sprechen für eine Funktion bei der direkten Sortierung vom TGN zu den Lysosomen bzw. LROs (Odorizzi *et al.*, 1998; Le Borgne *et al.*, 1998; Cowles *et al.*, 1997; Stepp *et al.*, 1997; Dell'Angelica *et al.*, 1999b; Yang *et al.*, 2000; Rous *et al.*, 2002). Zusätzlich gibt es auch Anhaltspunkte für eine Beteiligung von AP3A an der Biogenese von sekretorischen Vesikeln (Daugherty *et al.*, 2001).

Für die gehirnspezifische Variante AP3B konnte *in vitro* gezeigt werden, dass der Komplex an der Genese von synaptischen Vesikeln an Endosomen beteiligt ist (Faundez *et al.*, 1998; Blumstein *et al.*, 2001).

Der AP4-Komplex, welcher erst vor relativ kurzer Zeit erstmals beschrieben wurde (Dell'Angelica *et al.*, 1999a; Hirst *et al.*, 1999), ist der bisher am wenigsten untersuchte Adaptor. Die bislang veröffentlichten Daten sprechen für eine Lokalisierung am TGN und deuten auf eine Funktion bei der basolateralen Sortierung in Epithelzellen hin (Simmen *et al.*, 2002). Zusätzlich gibt es Hinweise auf eine Funktion von AP4 in der lysosomalen Sortierung (Hirst *et al.*, 1999; Aguilar *et al.*, 2001). AP4 enthält kein Clathrin-Bindungsmotiv und ist wahrscheinlich Teil einer Vesikelhülle ohne Clathrinbeteiligung (Lafer, 2002).

#### **1.4. Sortierungssignale von Transmembranproteinen**

Transmembranproteine müssen eine Markierung oder ein Signal mit einer Transportinformation enthalten, damit ihre Erkennung durch Adaptoren und ihre korrekte Sortierung gewährleistet werden kann. Die Sortierungssignale befinden sich meist im zytoplasmatischen Teil der Membranproteine. Dies konnte durch die Entfernung des zytoplasmatischen Teils bzw. den Austausch selbigens durch einen Lipidanker gezeigt werden (Matter und Mellman, 1994; Simons und Ikonen, 1997). Transportinformationen in der Transmembran- bzw. der luminalen Domäne kommen ebenfalls vor, spielen aber in den untersuchten Fällen eine untergeordnete Rolle (Reaves *et al.*, 1998).

Verschiedene Arten von zytoplasmatischen Sortierungssignalen sind beschrieben worden (Tab. 1-2). Am häufigsten kommen Signale vor, die aus einer kurzen, linearen Aminosäuresequenz bestehen und durch den Einbuchstabencode der

involvierten AS dargestellt werden. Dazu gehören die Konsensusmotive NPXY, YXX $\Phi$ , [D/E]XXXL[L/I] und das DXXLL-Motiv. Die mit X bezeichneten AS können dabei von Protein zu Protein variieren. Das  $\Phi$  im YXX $\Phi$ -Signal steht für eine Aminosäure mit einer grossen, hydrophoben Seitenkette: Valin, Leucin, Isoleucin, Methionin oder Phenylalanin.

**Tabelle 1-2: Sortierungssignale.** Verschiedene Sortierungssignale von Transmembranproteinen und die nach dem heutigen Stand der Forschung mit ihnen interagierenden Adaptorproteine sind aufgeführt. Ausserdem ist der durch die Interaktion vermittelte Transportschritt angegeben, sowie einige Transmembranproteine, die das entsprechende Signal beinhalten. (zusammengefasst in Bonifacino und Traub, 2003)

Sortierungssignal-Typ	interagierende Adaptoren	Transportschritt	Beispiele für Membranproteine
NPXY	Dab2 +ARH	Internalisierung	LDL-Rezeptorfamilie, Integrin $\beta$ -Familie
YXX $\Phi$	$\mu$ -Untereinheiten von AP-Komplexen	Internalisierung, lysosomaler + basolateraler Transport	Transferrin-Rezeptor, CI- und CD-MPR, Lamp1, Lamp2, LAP, TGN38
[D/E]XXXL[L/I]	AP-Komplexe	Internalisierung, lysosomaler + basolateraler Transport	LimpII, Tyrosinase, TRP1, CD4, CD3 $\gamma$ -Kette
DXXLL	GGAs	TGN $\Rightarrow$ E	CI- und CD-MPR, Sortilin, GGAs
Diaromatisch (FW)	(TIP47)	E $\Rightarrow$ TGN	CD-MPR
Saure Cluster	PACS 1	E $\Rightarrow$ TGN	Furin, HIV-nef, VMAT1, VMAT2
Mono-Ubiquitin	Epsins, Hrs/Vps27p, (GGAs)	Internalisierung, Transport in MVBs	EGF-R, GH-R, MET, Notch-Ligand delta, E-Cadherin

Eine andere Möglichkeit der Erkennung von Transmembranproteinen ist die Interaktion des zytosolischen Teils einer bestimmten Proteinfamilie mit einem für sie spezifischen Adaptorprotein, z.B. die Bindung des Adaptors  $\beta$ -Arrestin an G-Proteingekoppelte Rezeptoren. Oligomerisierung sowie post-translationale Modifikationen eines Membranproteins, wie Mono-Ubiquitylierung und Phosphorylierung können ebenfalls zu veränderter Adaptorbindung und damit zur Beeinflussung der intrazellulären Sortierung führen (Marsh *et al.*, 1995; Wolins *et al.*, 1997; Bonifacino und Traub, 2003; Shiratori *et al.*, 1997; Zhang und Allison, 1997; Pitcher *et al.*, 1999; Madrid *et al.*, 2001).

Darüberhinaus sind auch Proteine mit mehr als einem potentiellen Sortierungssignal für einen Sortierungsschritt bekannt, z.B. CI-MPR, invariante Kette des MHCII-

Komplexes und Furin. Jedoch ist bisher noch nicht klar, in wie weit die Nutzung dieser mehrfachen Signale *in vivo* eine Rolle spielt (Bremnes *et al.*, 1994; Molloy *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 1993).

Wird die Interaktion des Clathrin-Adaptors mit dem Sortierungssignal durch Mutation des Adaptors oder des Membranproteins verhindert, kommt es zur Fehlsortierung des Proteins.

Für die vorliegende Arbeit sind vor allem zwei Typen von linearen Sortierungsmotiven, die Tyrosin-haltigen-YXX $\Phi$  und die Leucin-haltigen-[D/E]XXX[L/I] Signale von Wichtigkeit, auf die in Abschnitt 1.4.1. und 1.4.2. daher näher eingegangen werden soll.

#### **1.4.1. Tyrosin-haltige Sortierungssignale (YXX $\Phi$ )**

Tyrosin-haltige Sortierungssignale vom Typ YXX $\Phi$  werden für unterschiedliche Sortierungsprozesse, wie die Internalisierung, den lysosomalen und basolateralen Transport und den Transport zu LROs genutzt. Das Signal eines Proteins kann die Sortierung an verschiedenen Membranen vermitteln, so wird z.B. die Sortierung des lysosomalen Membranproteins LAMP-1 am TGN, im endosomalen System und an der Plasmamembran über sein lineares YXX $\Phi$ -Signal (YQTI) vermittelt (Harter und Mellman, 1992; Honing und Hunziker, 1995). YXX $\Phi$ -Signale kommen in Typ I-(z.B. LAMP-1/-2), in Typ II- (z.B. Transferinrezeptor) und in Proteinen mit mehreren Transmembran-Domänen (z.B. LAMP-3) vor.

Alle vier heterotetrameren Adaptoren binden mit ihrer  $\mu$ -Untereinheit an Tyrosin-haltige-YXX $\Phi$  Signale (Ohno *et al.*, 1995; Boll *et al.*, 1996; Ohno *et al.*, 1996; Hirst *et al.*, 1999). Dabei sind der Tyrosinrest und die grosse hydrophobe Aminosäure essentiell für eine effektive Bindung an das Signal (Ohno *et al.*, 1995; Boll *et al.*, 1996; Ohno *et al.*, 1996). Durch die Kristallisierung des C-terminalen Teils von  $\mu$ 2 in Anwesenheit eines Peptides, welches das Sortierungssignale von TGN38 bzw. des EGF-Rezeptors enthält, konnte gezeigt werden, dass für den Y- und den  $\Phi$ -Rest je eine hydrophobe Bindungstasche in  $\mu$ 2 existiert (Owen und Evans, 1998). Der aromatische Ring und die Hydroxylgruppe des Tyrosins haben einen erheblichen Anteil an der Interaktion mit der Tyrosinbindungstasche. Dies erklärt, warum selbst der Austausch des Tyrosins zu einem Phenylalanin die Bindung an  $\mu$ 2 *in vitro* unterdrückt (Ohno *et al.*, 1996) und eine Phosphorylierung des Tyrosinrestes im

Signal des Co-stimulatorischen T-Zell Rezeptors (CTLA-4) zur Inhibition der Bindung an AP2 führt (Shiratori *et al.*, 1997; Zhang und Allison, 1997; Chuang *et al.*, 1997). Zusätzlich bildet  $\mu 2$  auch Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Signalpeptid (Owen und Evans, 1998).

Die Sequenzen von  $\mu 1$ ,  $\mu 2$ ,  $\mu 3$  und  $\mu 4$  sind homolog und die an der Signalbindung beteiligten Aminosäuren sind konserviert, daher darf eine generelle Signal-Bindungsstruktur aller vier Adaptoren als gesichert gelten (Bonifacino und Dell'Angelica, 1999). Durch die Kristallisation des AP1-Core-Komplexes konnte bereits bestätigt werden, dass die Struktur von  $\mu 1$  der von  $\mu 2$  entspricht (Heldwein *et al.*, 2004).

Trotzdem wurde durch *Yeast-Two-Hybrid*-Analysen der  $\mu$ -Signalbindung festgestellt, dass jede  $\mu$ -Untereinheit bestimmte Tyrosinsignale besser und andere schlechter oder gar nicht zu erkennen scheint (Ohno *et al.*, 1998). Die Identität der grossen hydrophoben Aminosäure und der Reste vor und nach dem Tyrosin definieren die Unterschiedlichkeit der Signale und beeinflussen wahrscheinlich die Affinität und Spezifität der  $\mu$ -Ketten (Ohno *et al.*, 1998; Aguilar *et al.*, 2001).  $\mu 2$  bindet YXX $\Phi$ -Signale am stärksten und mit einer breiten Spezifität (Ohno *et al.*, 1996).  $\mu 1$ ,  $\mu 3$  und  $\mu 4$  zeigen generell eine geringere Bindungsstärke und sind sensitiver bei Veränderungen in der Aminosäure-Sequenz (Ohno *et al.*, 1998; Aguilar *et al.*, 2001; Ohno *et al.*, 1999). Mutationen im oder um das Signal von LAMP-1 beeinträchtigen zum Beispiel die lysosomale Sortierung, aber nicht die Endozytoserate des Proteins (Harter und Mellman, 1992; Rohrer *et al.*, 1996).

Auch die Position des Signals in der zytoplasmatischen Domäne ist für die Erkennung wichtig. Bei lysosomalen Proteinen befindet sich das Tyrosin-haltige Signal meist 6-9 Reste von der Transmembran-Domäne entfernt und am Ende der zytosolischen Domäne. Wird diese Position verändert, ist die lysosomale Sortierung beeinträchtigt (Rohrer *et al.*, 1996). Rein endozytotische Signale liegen oft mitten in der zytoplasmatischen Domäne und haben einen grösseren Abstand (10-40 AS) von der Membran (Bonifacino und Traub, 2003).

Die Phosphorylierung eines Serins in Signalnähe kann ebenfalls Auswirkung auf die Signalbindung haben. Madrid *et al.*, 2001 konnten zeigen, dass bei Aquaporin 4 (AQP4; Sortierungssignal: -SYMEV) der Serinrest durch die Caseinkinase II phosphoryliert wird. Dadurch erfolgt eine Erkennung des Signals durch  $\mu 3A$  und die lysosomale Sortierung des Proteins.

Welche Signalsequenzen durch welche  $\mu$ -Untereinheit präferiert werden, ist bisher vor allem durch *Yeast-Two-Hybrid*-Analysen untersucht worden und noch nicht vollständig geklärt. In wie weit diese Ergebnisse die *in vivo* Situation wieder spiegeln, ist in den meisten Fällen ebenfalls noch nicht ausreichend belegt. Auch die strukturellen Unterschiede, die zu einer Bindungsdifferenz der verschiedenen  $\mu$ -Untereinheiten führen könnten, sind bisher unklar.

#### 1.4.2. Leucin-haltige Sortierungssignale ([D/E]XXXL[L/I])

Wie die zuvor beschriebenen Tyrosin-haltigen Signale spielen auch die Leucin-haltigen Motive des Typs [D/E]XXXL[L/I] bei der Internalisierung sowie dem endosomal-lysosomalen und basolateralen Transport von verschiedensten Proteinen eine Rolle (zusammengefasst in Bonifacino und Traub, 2003). Essentiell für den korrekten Transport sind zwei aufeinanderfolgende Leucinreste. Das zweite Leucin ist bei einigen Signalen durch eine strukturell ähnliche AS, wie Isoleucin, Methionin oder Valin ersetzt (Letourneur und Klausner, 1992; Dietrich *et al.*, 1996; Sandoval und Bakke, 1994). Ausserdem befinden sich meist hydrophobe oder saure Reste 4 und/oder 5 AS proximal vom ersten Leucin, die ebenfalls für die Funktionalität des Motives unabdingbar sind. Die Position der Leucin-haltigen Motive in der zytoplasmatischen Domäne scheint für die Sortierung ebenso wichtig zu sein (Geisler *et al.*, 1998).

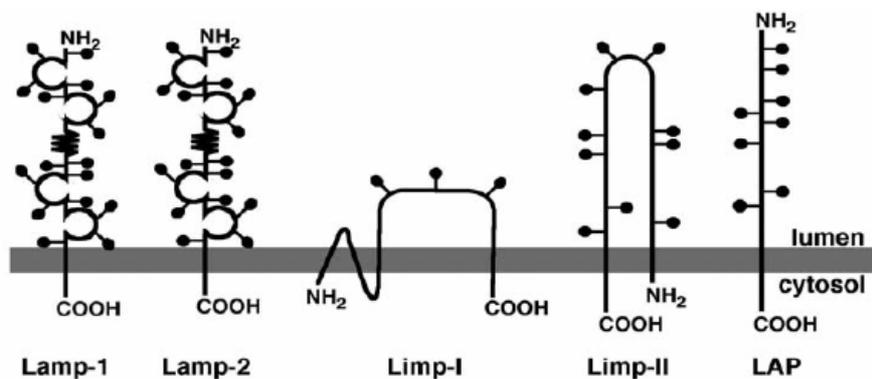
Die Leucin-haltigen Signale der CD3  $\gamma$ -Kette und des CD4-Moleküls stellen eine aktivierbare Sonderform des Signaltyps dar. Beide enthalten 5 AS proximal vom ersten Leucin ein Serin, welches phosphorylierbar ist. Durch die Phosphorylierung an den Serin-Resten wird das Signal aktiviert und die Endozytose und lysosomale Degradation der Proteine initiiert (Dietrich *et al.*, 1994; Dietrich *et al.*, 1997; von Essen *et al.*, 2002; Pitcher *et al.*, 1999).

Die Bindung der heterotetrameren Adaptorkomplexe an Leucin-haltige Sortierungssignale ist bereits durch viele *in vitro* Experimente gezeigt worden (Bresnahan *et al.*, 1998; Heilker *et al.*, 1996; Dietrich *et al.*, 1997; Honing *et al.*, 1998; Rodionov und Bakke, 1998; Rapoport *et al.*, 1998). Die Bindung von AP2 an diese Signale konnte jedoch noch nicht widerspruchslös belegt werden (Greenberg *et al.*, 1998; Rapoport *et al.*, 1998; Rodionov und Bakke, 1998, Janvier *et al.*, 2003). Ob eine Bindung stattfindet und, wenn ja, an welcher Untereinheit, war daher zu Beginn

dieser Arbeit nach wie vor strittig (siehe auch 1.3.1). Der Charakter des Leucin-haltigen Signals wird, wie bei Tyrosin-haltigen Signalen, durch die Aminosäuren definiert, die die LL/LI-Reste umgeben. Jeder Adaptor scheint dabei unterschiedliche Präferenzen für verschiedene Leucin-haltige Signale zu zeigen (Hofmann *et al.*, 1999; Honing *et al.*, 1998; Le Borgne *et al.*, 1998; Huizing *et al.*, 2001; Caplan *et al.*, 2000; Kongsvik *et al.*, 2002).

### 1.5. Sortierung von lysosomalen Membran-Glykoproteinen

Die lysosomale Membran enthält Proteine, die in ihrer luminalen Domäne stark glykosyliert sind (Abb. 1-6). Die genaue Funktion dieser Proteine ist unklar, jedoch scheint der hohe Grad an Glykolysierung dem Schutz der Membran vor der Degradation durch die lysosomalen, hydrolytischen Enzyme in den Lysosomen zu dienen (Hunziker und Geuze, 1996; Eskelinen *et al.*, 2003). Die Mitwirkung der lysosomalen Membranproteine beim Molekültransport aus dem Zytoplasma in das Lumen von Lysosomen (Cuervo und Dice, 1996) wird ebenfalls postuliert. Weitere Hinweise sprechen für eine Beteiligung an der Autophagozytose (Tanaka *et al.*, 2000; Nishino *et al.*, 2000).



**Abbildung 1-6: Schematische Darstellung der Struktur lysosomaler Membranproteine.** Die schwarzen Punkte symbolisieren die Glykosylierungsstellen in der luminalen Domäne (zusammengefasst in Hunziker und Geuze, 1996).

Zur Gruppe der lysosomalen Membran-Glykoproteine gehören LAMP-1 (*lysosomal associated membrane protein*), LAMP-2A, LAMP-2B, LAMP-2C, CD 63 (Limp I/ LAMP-3), Limp-II (*lysosomal integral membraneproteine*) und LAP (*lysosomal acid phosphatase*) (zusammengefasst in Eskelinen *et al.*, 2003, Nomenklatur nach Eskelinen *et al.*, 2005).

Der kurze zytoplasmatische Teil (10-20 AS) der Proteine enthält das für den intrazellulären Transport erforderliche Sortierungssignal. Im Fall von Limp-II handelt es sich um ein Leucin-haltiges, bei allen anderen um ein Tyrosin-haltiges Motiv (Abb. 1-7). Vor dem kritischen Tyrosinrest befindet sich ein Glycin, das für die lysosomale Sortierung wichtig ist. Die Mutation dieses Glycins zu einem Alanin vermindert die Effektivität des intrazellulären Transports der Proteine vom TGN zu den Lysosmen, beeinflusst aber nicht die Endozytose und den basolateralen Transport (Harter und Mellman, 1992; Honing und Hunziker, 1995). Abgesehen vom LAP-Signal sind alle diese Signale am Ende der zytoplasmatischen Domäne lokalisiert, dies spielt vermutlich ebenfalls eine Rolle bei der korrekten Sortierung zu den Lysosomen (Rohrer *et al.*, 1996).

Die lysosomale Hydrolase LAP wird als Transmembranprotein in die Lysosomen transportiert und im Lysosom durch Proteolyse freigesetzt. Die Sortierung von LAP

LAMP-1	-RKRSHAGYQTI
LAMP-2A	-LKHHHAGYEQF
LAMP-2B	-RRKSYAGYQTL
LAMP-2C	-RRKSRTGYQSV
CD63	-KSIRSGYEVV

**Abbildung 1-7: Sortierungssignale von lysosomalen Membran-Glykoproteinen.** Aminosäuresequenz der zytoplasmatischen Domäne von lysosomalen Membran-Glykoproteinen (human). Das Sortierungssignal ist grau unterlegt. (Nomenklatur nach Eskelinen *et al.*, 2005).

erfolgt indirekt über die Plasmamembran und nach einigen Recycling-Zyklen schliesslich über späte Endosomen zu den Lysosomen (Braun *et al.*, 1989). Diese Sortierung ist vom GYRHV-Signal des Proteins, genauer von den AS an Position 2 und 3 nach dem Y-Rest abhängig (Obermuller *et al.*, 2002). Das LAP-Signal wird *in vitro* weder von AP1 noch von AP3, wohl aber von AP2 gebunden (Sosa *et al.*, 1993).

Die anderen lysosomalen Membran-Glykoproteine werden vorwiegend intrazellulär, also vom TGN aus direkt ins endosomale-lysosomale System transportiert (Barriocanal *et al.*, 1986; Green *et al.*, 1987; Carlsson und Fukuda, 1992; Harter und Mellman, 1992; Honing und Hunziker, 1995). Gelangen die Proteine an die Plasmamembran werden sie durch AP2

endozytiert und anschliessend nicht recycelt, sondern zum Lysosom weiter transportiert. Vor allem AP3 wird für den Transport in die Lysosomen vom TGN und/oder den Endosomen aus verantwortlich gemacht (siehe auch Abschnitt 1.3.). In AP3 defizienten Zellen werden die Proteine LAMP-1, LAMP-2, CD63 und Limp-II an die Plasmamembran fehlsortiert (Le Borgne *et al.*, 1998; Dell'Angelica *et al.*, 1999b; Dell'Angelica *et al.*, 2000; Rous *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2000; Peden *et al.*, 2002; Peden *et al.*, 2004). Die Interaktion von LAMP-1 und Limp-II mit AP3 konnte *in vitro* nachgewiesen werden (Aguilar *et al.*, 2001; Stephens und Banting, 1998; Honing *et al.*, 1998). Allerdings gibt es auch Hinweise auf eine Beteiligung von AP1 an der Sortierung der lysosomalen Membran-Glykoproteine. In LAMP-1-überexprimierenden Zellen konnte eine Colokalisation von LAMP-1 mit AP1 in vesikulären Strukturen nachgewiesen werden und die Bindung des Adaptors an das LAMP-1-Sortierungssignal *in vitro* wurde gezeigt (Honing *et al.*, 1996). Jedoch wird LAMP-1 in AP1A defizienten Zellen nicht fehlsortiert (Meyer *et al.*, 2000). Für AP4 wurde ebenfalls eine Funktion beim lysosomalen Transport vermutet (Aguilar *et al.*, 2001).

Welches Adaptorprotein an welcher zellulären Sortierstation wirklich am Transport der Proteine beteiligt ist, bleibt daher zu klären.

## 1.6. Model der Funktion von AP2

Im AP2-Core-Komplex ist die Bindungsstelle für Tyrosin-haltige Signale im C-terminalen Teil von  $\mu 2$  durch die Interaktion mit der  $\beta 2$ -Untereinheit blockiert (Collins *et al.*, 2002). Die Aminosäure Valin 365 der  $\beta$ -Untereinheit interagiert mit der hydrophoben Bindungstasche für die  $\Phi$ -Reste des YXX $\Phi$ -Signals und  $\beta$ Tyr405 blockiert die Bindungsstellen für das Peptidrückrad (Abb. 1-8 B).

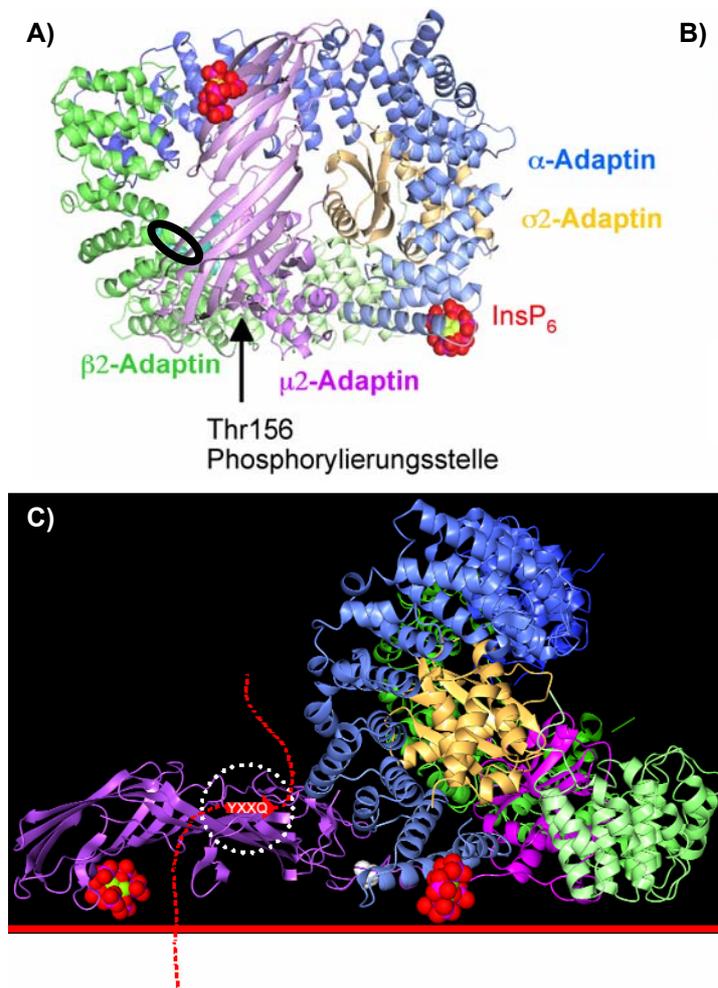
Ausserdem ist eine gleichzeitige Interaktion der beiden Phosphatidylinositol-Bindungstaschen in der  $\alpha$ - und der  $\mu$ -Untereinheit mit der Membran nicht möglich, da beide in verschiedene Richtungen ausgerichtet sind (Abb. 1-8 A). In Collins *et al.*, 2002 wurde deshalb eine Konformationsänderung von AP2 postuliert. Dabei entfernt sich der C-terminale Teil von  $\mu 2$  um  $90^\circ$  vom Komplex, zusätzlich wird die obere Seite von  $\mu 2$  nach unten gekehrt. Nur so könnte eine effektive Bindung an Tyrosin-haltige Signale und gleichzeitig die Lipidbindung durch beide PI-Bindungsstellen ermöglicht werden (Abb. 1-8 C). Als Auslöser dieser weitreichenden

Konformationsänderung wird eine bereits beschriebene Phosphorylierung von  $\mu 2$  angenommen. Die Phosphorylierung findet in der flexiblen *Linker*-Region zwischen N- und C-terminalem Teil von  $\mu 2$  am Threonin 156 statt (Pauloin und Thuriéau, 1993; Olusanya *et al.*, 2001) und wird durch die Serin/Threonin-Kinase AAK1 (*Adaptor-associated kinase 1*) vermittelt (Conner und Schmid, 2002; Ricotta *et al.*, 2002). Ein Einfluss der Phosphorylierung auf die Signalbindung des Adaptors konnte bereits durch unsere Arbeitsgruppe nachgewiesen werden. Diese Vorarbeiten konnten zeigen, dass an  $\mu 2$  phosphorylierte Adaptoren eine grössere Affinität für Tyrosin-haltige Sortierungssignale haben (Ricotta *et al.*, 2002; Fingerhut *et al.*, 2001). Unsere *in vitro* erhobenen Daten werden durch Arbeiten anderer Arbeitsgruppen unterstützt. Durch die Überexpression eines im Thr156 mutierten  $\mu 2$ s konnten sie zeigen, dass die Phosphorylierung auch *in vivo* für die Endozytose eines Tyrosinsignal-haltigen Transmembranproteins, des Transferrin-Rezeptors, nötig ist (Conner und Schmid, 2002, Olusanya *et al.*, 2001).

Die Colokalisation von AAK1 mit AP2 in CCPs und CCVs (Conner und Schmid, 2002) sowie die Stimulation von AAK1 durch assembliertes Clathrin (Conner und Schmid, 2003; Jackson *et al.*, 2003), weisen auf eine Phosphorylierung von bereits an die Membran gebundenem AP2 hin. Wie die Rekrutierung von AP2 an seinen Funktionsort die Plasmamembran vermittelt wird, ist allerdings noch unklar. Beim vesikulären Transport sind nach dem heutigen Stand der Forschung zwei Arten von flexiblen Rekrutierungsfaktoren für zytosolische Proteine bekannt; kleine, aktivierbare G-Proteine der ARF/Arl/Sar-Familie und der Rab-Familie sowie kurzlebige Phospholipide, die Phosphatidylinositole (PI) (Munro, 2002; Owen *et al.*, 2004, Behnia und Munro, 2005). Beide sind wichtige Determinanten der Membranidentität, deren Anwesenheit in der Membran räumlich und zeitlich reguliert ist. Im Fall von G-Proteinen erfolgt die Regulation durch *GTP exchange factors* (GEF) und *GTPase activating proteins* (GAP), bei PIs durch spezifische Kinasen und Phosphatasen.

Als Rekrutierungsfaktor für AP2 wird vor allem das Phosphatidylinositol PtdIns4,5P<sub>2</sub> (Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat) diskutiert. PtdIns4,5P<sub>2</sub> befindet sich hauptsächlich an der Plasmamembran und ist durch die Interaktion mit einer Vielzahl von endozytotischen Proteinen z.B. Epsin, AP180/CALM, Dab2 und Dynamin an der Clathrin-vermittelten Endozytose beteiligt (Owen *et al.*, 2004). PtdIns4,5P<sub>2</sub> interagiert mit der  $\alpha$ - und der  $\mu$ -Untereinheit von AP2 (siehe auch 1.4., Gaidarov *et al.*, 1996 (PIP3), Beck und Keen, 1991, Rohde *et al.*, 2002) und spielt eine Rolle bei der

Lokalisation von AP2 an der Plasmamembran (Chang *et al.*, 1993, Gaidarov und Keen, 1999, Collins *et al.*, 2002).



**Abbildung 1-8: Die Phosphorylierung von  $\mu 2$  am Thr156 ermöglicht die Signal- und Membranbindung von  $\mu 2$ .**  $\alpha 2$  ist blau,  $\beta 2$  grün,  $\mu 2$  lilafarben und  $\sigma 2$  goldfarben dargestellt.

A) Kristallstruktur des AP2-Core-Komplexes. Das mit dem Komplex kristallisierte D-myo-Inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisphosphat ( $\text{InsP}_6$ ) ist in rot/gelb dargestellt. Die Bindungsstellen für Phosphatidylinosole in  $\alpha 2$  und  $\mu 2$  zeigen in verschiedene Richtungen. Die Phosphorylierungsstelle von AAK1 am

Thr156 ist in der Kristallstruktur nicht erkennbar, ihre ungefähre Lage ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. B) Die  $\mu$  YXX $\Phi$ -Bindungsstelle wird im Core Komplex durch die  $\beta 2$ -Untereinheit blockiert. Das YXX $\Phi$ -Signal ist an der Stelle, an der es binden soll, in grau dargestellt. C) Postulierte AP2-Konformation nach Phosphorylierung von  $\mu 2$ . Eine gleichzeitige Bindung von PI durch  $\mu 2$  und  $\alpha 2$  und von YXX $\Phi$ -Signalen durch  $\mu 2$  ist möglich. (A+C wurden freundlicherweise von Herrn Dr. David Owen zur Verfügung gestellt. B verändert nach Honing *et al.*, 2005)

Das ebenfalls an der Plasmamembran lokalisierte kleine G-Protein ARF6 (*ADP-ribosylation factor 6*) ist ein weiterer, diskutierter Rekrutierungsfaktor für AP2 (Donaldson, 2003; Randazzo *et al.*, 2000). Eine Beteiligung von ARF6 an der Clathrin-vermittelten Endozytose konnte bereits gezeigt werden (Krauss *et al.*, 2003). Krauss *et al.*, 2003 wiesen nach, dass ARF6 über eine Aktivierung der PI4P-5-Kinase die  $\text{PtdIns}4,5\text{P}_2$ -Produktion beeinflusst und damit indirekt auf die Rekrutierung von endozytotischen Proteinen einwirken kann. Paleotti *et al.*, 2005

postulieren hingegen eine Rekrutierung von AP2 durch direkte Interaktion mit ARF6 GTP, allerdings konnte eine ARF6 Bindungsstelle bisher nicht identifiziert werden. Die präzise Rolle von ARF6 bei der Clathrin-vermittelten Endozytose ist daher fraglich.

Aus den strukturellen Informationen über Art und Lage der Bindungsstellen, den funktionellen Daten über die Phosphorylierung von  $\mu 2$  und den Hinweisen zur Rekrutierung von AP2 wurde durch Collins *et al.*, 2002 ein Model der AP2-Funktion aufgestellt:

Der AP2-Komplex liegt in zwei verschiedenen Konformationen, einer geschlossenen, nicht-phosphorylierten und einer offenen, phosphorylierten Form vor.

Zunächst wird AP2 durch die Bindung an  $\text{PtdIns}4,5\text{P}_2$  über die  $\alpha 2$ -Untereinheit, bzw. durch ARF6 GTP oder andere bisher unbekannte Faktoren an endozytotisch aktive Plasmamembranbereiche rekrutiert. Bevor AP2 an Tyrosin-haltige Sortierungssignale binden kann, wird es durch die AAK1 am  $\mu\text{Thr}156$  phosphoryliert. Dadurch wird die Loslösung von c- $\mu 2$  vom Komplex gefördert und eine Konformationsänderung kann stattfinden. Die offene Konformation des Komplexes wird durch die nun mögliche Interaktion von c- $\mu 2$  mit dem Tyrosin-haltigen Signal und mit  $\text{PtdIns}4,5\text{P}_2$  zusätzlich stabilisiert. Der Abbau von  $\text{PtdIns}4,5\text{P}_2$  sowie die Dephosphorylierung von  $\mu 2$  begünstigt die Dissoziation des Signals und ist damit wahrscheinlich nötig für das Abstreifen der Vesikelhülle nach der Abschnürung des Vesikels von der Ursprungsmembran.

## 1.7. Fragestellung

In den zytoplasmatischen Domänen von Transmembranproteinen befinden sich spezifische Aminosäuresequenz-Motive (Sortierungssignale), die darüber bestimmen, wie die Proteine in der Zelle transportiert werden. Tyrosin-haltige Sortierungssignale können von vier verschiedenen heterotetrameren Adaptorprotein-Komplexen (APs) erkannt werden. Verschiedene APs binden ein und dasselbe Tyrosin-haltige Signal mit unterschiedlicher Affinität. Da jedes AP vermutlich einen anderen Transportweg in der Zelle vermittelt, kann die Affinität eines APs für ein spezifisches Signal entscheidend für die Transportroute des Proteins sein. Im ersten Teil dieser Arbeit sollte deshalb die Spezifität und die Affinität der Bindung zwischen den vier APs und unterschiedlichen Tyrosin-haltigen Sortierungssignalen *in vitro* verglichen werden.

Der zweite Teil der Arbeit befasst sich mit dem an der Clathrin-vermittelten Endozytose beteiligten AP2. Zum einen sollte die Rekrutierung von AP2 an seinen Funktionsort, die Plasmamembran, untersucht werden. Zum anderen war es Ziel ein in Collins *et al.*, 2002 postuliertes Model der AP2-Bindung an Tyrosin-haltige Sortierungssignale experimentell zu überprüfen. Laut dieses Models liegt der AP2-Komplex in einer Konformation vor, in der die Bindung an Tyrosin-haltige Sortierungssignale nicht möglich ist. Nach initialer Bindung von AP2 an die Plasmamembran, wahrscheinlich durch PtdIns4,5P<sub>2</sub>, erfolgt deshalb eine Phosphorylierung des Threonin 156 in  $\mu 2$ . Die Phosphorylierung induziert eine Konformationsänderung des Komplexes und ermöglicht so die Bindung an die Signale. Durch den Einsatz eines Biacore-basierten *in vitro* Assays sollte die Membranbindung von AP2 simuliert und die Phosphorylierungs-abhängige Bindung von Tyrosin-haltigen Signalen überprüft werden. Die zur Zeit noch umstrittene Bindung von AP2 an Leucin-haltige Signale sollte zusätzlich untersucht werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Geräte

Autoklav	Varioklav®	H+P Labortechnik
Chemilumineszenz-Detektionssystem	DIANAIII	Raytest
Chromatographie Systeme	ÄKTAexplorer™	GE Healthcare
	SMART™ System	GE Healthcare
	BioCad Vision	Perseptive Biosystems
DNA-Sequenzierer	373	Applied Biosystem Inc.
Drehrad für Reaktionsgefäße	Eigenbau	Werkstatt des Instituts
Eismaschine		Ziegra
Elektroporationsgerät	GenePulser®II	Biorad
Extruder	LiposoFast™	Avestin
Feinwaage	CP225D	Satorius
Gelapperatur für Agarosegele	Eigenbau	Werkstatt des Instituts
Gelapperatur für Polyacrylamid-Gele	Mini-V 8.10	GibcoBRL
Geltrockner	Model 583	Biorad
Heizblock	Thermostat 5320	Eppendorf
Homogenisator		Waring
Inkubator	Incubator C60	Labotect
Kühlschrank	Profi Line	Liebherr
Magnetrührgerät	MR 3001	Heidolph
Mikroliterspritzen		Hamilton
Mikroskop		
Lichtmikroskop	Eclipse TS100	Nikon
<i>Laser Scanning Microscope</i>	TCS-2 AOBS	Leica
Transmissionselektronenmikroskop	CM120	Philips
Mikrowellenherd	HF 12023	Siemens
Multikanal Photometer	Sunrise	Tecan
PCR Gerät	Mastercycler	Eppendorf
pH-Meter		InoLab
Pipetten	Pipetman	Gilson
Reinstwasseranlage	Optilab®	MembraPure

Rein-Werkbank	HeraGuard	Heraeus
Rotoren		
Kühlzentrifuge	JA-10	Beckmann
	JA-20	Beckmann
Ultrazentrifuge	TLA-100.3	Beckmann
	TLA-45	Beckmann
Schüttelinkubator	Innova™4230	NewBrunswickScientific
Schüttelplattform	KS 260 basic	IKA
Sicherheitswerkbank	Telstar Bio II-A	Labotect
Spannungsgerät	PowerPack 4000	Biometra
Spektralphotometer	SmartSpec™3000	Biorad
SPR basierte Biosensor Systeme	Biacore®3000	Biacore
	Biacore®T100	Biacore
Stickstofftank für Zellagerung	Locator4Plus	LabTrader™
Thermoschüttler	Thermomixer5436	Eppendorf
Tiefkühlschrank –20°C	Comfort	Liebherr
Tiefkühlschrank –80°C	VIP™ Ultra low	Sanyo
Transilluminator	Model TFM-20	UVP
Ultraschallgeräte	Sonifier 450	Branson
	Transsonic 570	Elma
	UP200S	Dr.Hielscher GmbH
Vortexer	Genie2	Bender+Hobein AG
Waage	BP610	Sartorius
Wasserbad	MP	Julabo
Wipptisch	PlatformRockerStr6	Stuart
Zentrifugen		
Kühlzentrifugen	Biofuge fresco	Heraeus
	Megafuge 1.0 R	Heraeus
	RC5Cplus	Sorvall
Tischzentrifuge	5415D	Eppendorf
Ultrazentrifugen	Optima™L-70K	Beckman
	Optima™TLX	Beckman
Vakuumbzentrifuge	DNAplus	Heto

### 2.1.2. Verbrauchsmaterial

Aluminiumfolie		Roth
Cellophanfolie		Pütz Folien
Dialyseschläuche	Spectra/Por <sup>®</sup>	Labomatic AG
Einfrierröhrchen	CryoTube <sup>™</sup> Vials	Nunc
Einmalspritzen	Discardit <sup>™</sup> II	Beckton Dickinson
Einwegkanülen	Sterican	Braun
Elektroporationsküvette		Molecular BioProducts
ELISA-Platten, 96 Loch	PS Microplatte	Greiner Bio-one
Extruder-Membranen, 100 nm	PC Membrane	Avestin
Handschuhe	Nitril 3000	Meditrade
Konzentratoren	Amicon <sup>®</sup> Ultra	Millipore
Küvetten	PS 1,5 ml halbmikro	Plastibrand <sup>®</sup>
Parafilm <sup>®</sup>		AmericanNationalCan <sup>™</sup>
Pasteur-Pipetten		Roth
Petrischalen		Sarstedt
pH-Indikatorstreifen, pH 0-14	Universalindikator	MERCK
Pipettenspitzen 10+1000 µl	Diamond D10+1000	Gilson
Pipettenspitzen 200 µl		Sarstedt
Pipettierhilfen-Filtereinsatz, 0,45 µm		Integra Biosciences
Reaktionsgefäße 0,5+1,5+2 ml		Sarstedt
Sensorchips		
für das Biacore <sup>®</sup> 3000:	CM5, <i>research grade</i>	Biacore
	L1	Biacore
	NTA	Biacore
für das Biacore <sup>®</sup> T100, Series S:	CM5	Biacore
	L1	Biacore
	NTA	Biacore
Skalpelle, steril		Braun
Sterilfilter:		
<i>Bottle-top</i> -Filter, 0,2 µm		Sarstedt
Pufferfilter, 0,2 µm		Millipore
Spritzenaufsatz, 0,2 µm	Minisart <sup>®</sup>	Sartorius
Sterile Plastikröhrchen 10+50 ml		Sarstedt

UV-Küvetten	trUView™	Biorad
Whatmanpapier GB 003		Schleicher&Schüll
Zahnstocher		Haushaltsbedarf
Zentrifugengefäße, Polyallomer	Microfuge®Tube	Beckman

### 2.1.3. Chemikalien

Die Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben im Reinheitsgrad *pro analysis* bezogen:

Acetonitril	Roth
Agar	Roth
Agarose	Roth
Ammoniumperoxodisulfat	Roth
Bromphenolblau	Biorad
Butanol	Roth
Calciumchlorid	Roth
CHAPS	Roth
Chloroform	Roth
Coomassie Blau R 250	Serva
Dimethylformamid	Roth
di-Natriumhydrogenphosphat	Roth
DTT	Roth
EDC	Biacore
EDTA	Roth
Epon	Roth
Essigsäure	Roth
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	Roth
Glutaraldehyd	Roth
Glycerin	Roth
Glycin	Roth
GDP	Sigma
GTP	Sigma

---

Hefe-Extrakt	Roth
HEPES	Roth
HPLC-Wasser	J.T.Baker
Imidazol	Roth
IPTG	Roth
Kaliumacetat	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth
Kaliumchlorid	Roth
Kaliumhydroxid	Roth
L-Cystein	Roth
Lysozym	Merck
Magnesiumchlorid	Roth
2-Mercaptoethanol	Roth
Methanol	Roth
MOPS	Roth
Natriumacetat	Roth
Natriumborat	Roth
Natriumcacodylat	Roth
Natriumchlorid	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Natriumformiat	Roth
Natriumhydroxid	Roth
Natriumsulfat	Roth
NHS	Biacore
Osmiumtetroxid	Roth
PDEA	Biacore
PMSF	Sigma
Rinderserumalbumin	Roth
Rubidiumchlorid	Roth
Saccharose	Roth
Salzsäure	Roth
Stickstoff, flüssig	Messer Griesheim
Stickstoff, gasförmig	Linde Gas
Sulforhodamin B	Sigma

TEMED	Serva
Trichloressigsäure	Roth
Trifluoressigsäure	Fluka
Tris	Roth
Trypton	Roth

#### 2.1.4. Lipide

Cholesterin	Sigma
MPB-PE	Avanti
Ni-NTA-Lipid (DOGS-NTA-Ni)	Avanti
Phosphatidylcholin	Sigma
Phosphatidylethanolamin	Sigma
Phosphatidylserin	Sigma
PtdIns3,5P <sub>2</sub> (syntethisch, dipalmitoyl)	Calbiochem
PtdIns3P (synthetisch, dipalmitoyl)	Calbiochem
PtdIns4,5P <sub>2</sub> (aus Schweinehirn)	Avanti
PtdIns4P (aus Scweinehirn)	Avanti

#### 2.1.5. Reagenzien und Fertiglösungen

Acrylamid-Lösung, Rotiphorese®Gel30 (30 % Acrylamid; 0,8 % Bisacrylamid)	Roth
Amine-Kopplungskit	Biacore
Biacore <i>Maintenance Kit, type 2</i>	Biacore
<i>BIAdesinfectant solution</i>	Biacore
BIAmaintenance Kit	Biacore
Bradford-Lösung	Biorad
DNA-Größenstandard	Invitrogen
HBS-EP Puffer	Biacore
HBS-N Puffer	Biacore
HBS-P Puffer	Biacore
Proteinase Inhibitor Cocktail (für bakteriell expremierte His-Tag Proteine)	Sigma

---

Protein-Größenstandard (Precision Plus Protein™ Standard)	Biorad
Surfactant P20	Biacore
Thiol-Kopplungskit	Biacore

### 2.1.6. Zelllinien

Hela-Zellen

(humane Epithelzellen des Zervixkarzinoms der Patientin **Henrietta Lacks**)

### 2.1.7. Molekularbiologische Materialien

#### 2.1.7.1. Antibiotika

Kanamycin	Sigma
Ampicillin	Serva

#### 2.1.7.2. Bakterien

Als Bakterienstämme wurden die *E. coli* Stämme *DH5 $\alpha$*  und *BL21 DH3* kultiviert.

#### 2.1.7.3. Kits

ProofStart™ DNA Polymerase Kit	Qiagen
QIA-Plasmid Midi Kit	Qiagen
QIA-Plasmid Mini Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
RNeasy Mini Kit	Qiagen
TOPO® Cloning Kit	Invitrogen
Omniscript™-Reverse Transkriptase-Kit	Qiagen

### 2.1.7.4. Plasmide

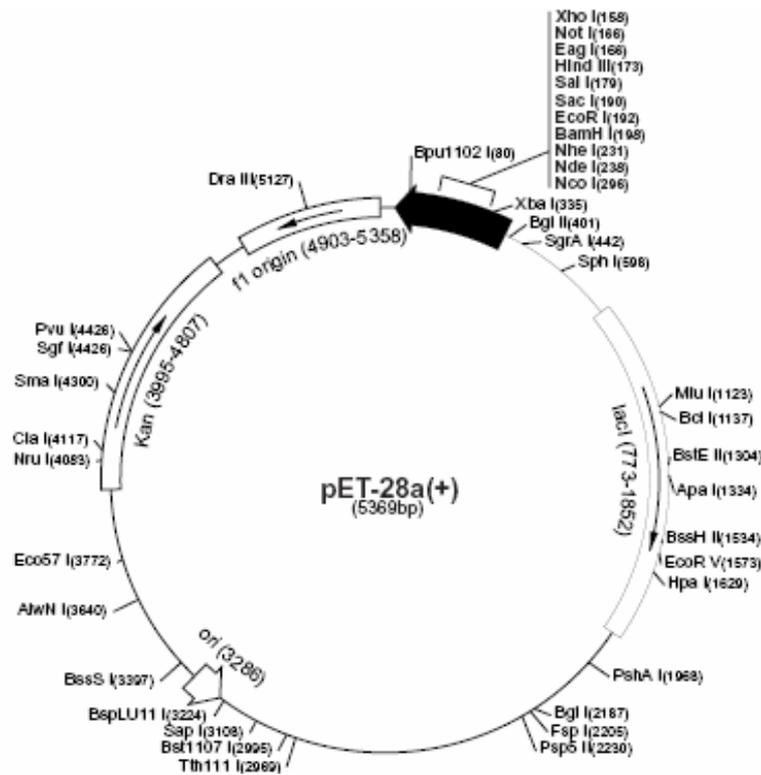
pCR<sup>®</sup>4-TOPO<sup>®</sup>

Invitrogen

pET 28a+b

Novagen

A)



B)

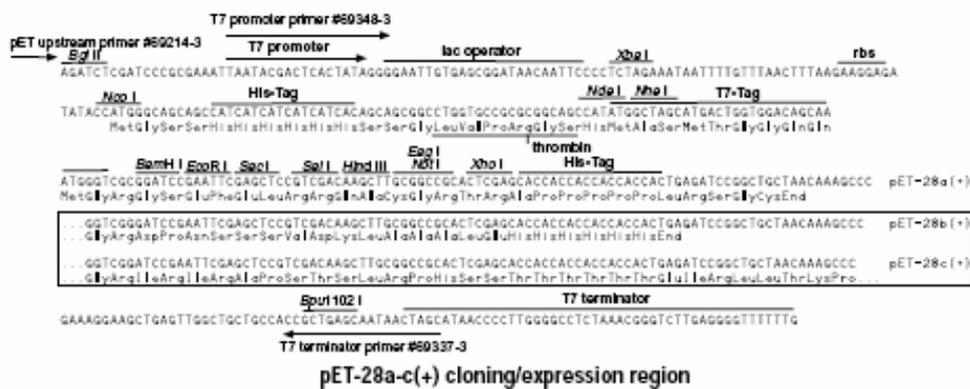
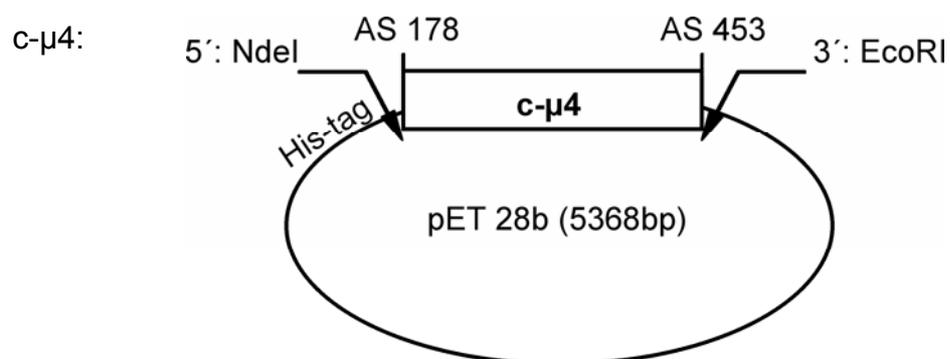
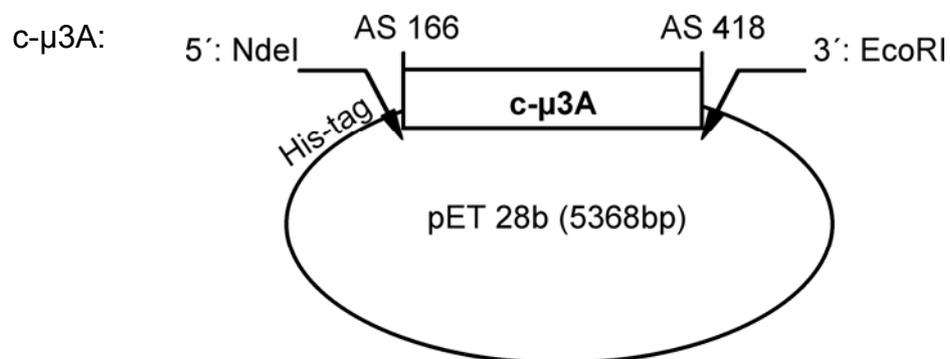
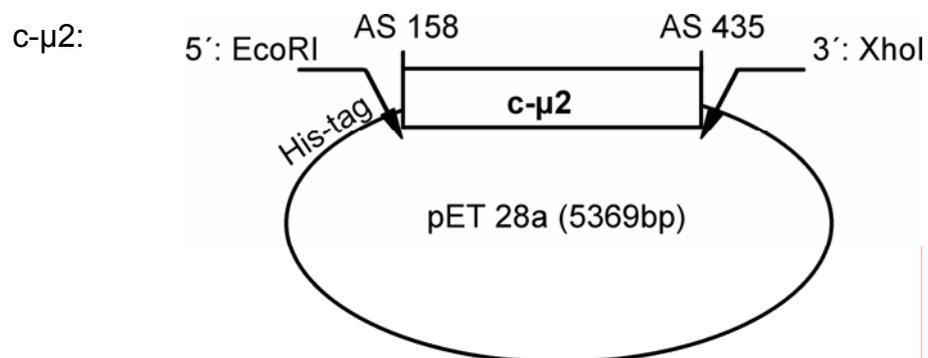
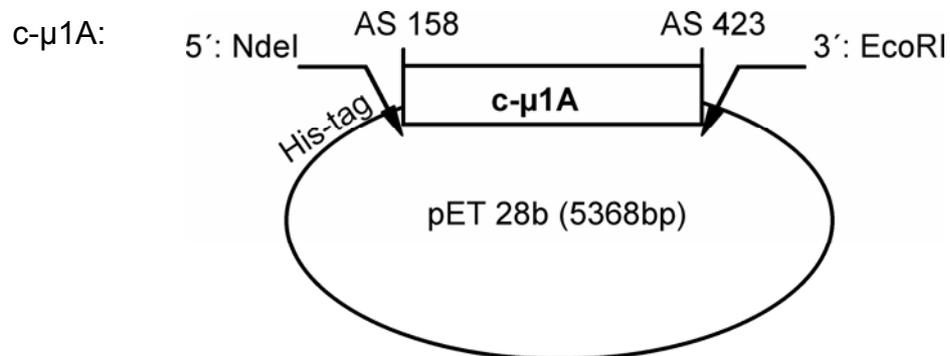


Abbildung 2-1: A) Vektorkarte und B) Multi Cloning Site der pET 28a-b Vektoren von Novagen.

### 2.1.7.5. Expressionsvektoren



### 2.1.7.6. Enzyme + Nukleotide

Bei den enzymatischen Reaktionen wurden die vom Hersteller mitgelieferten Puffer verwendet.

#### Restriktionsendonukleasen

NdeI (CA_TATG)	NEB
EcoRI (G_AATTC)	NEB
XhoI (C_TCGAG)	NEB
XbaI (T_CTAGA)	NEB
T4-DNA-Ligase	NEB
T4-DNA-Ligase Puffer (10x)	NEB
dNTP, <i>Deoxynucleotide Solution Set</i>	NEB

### 2.1.7.7. cDNA

Folgende cDNA wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt:

μ1a, Maus	PD Dr. Peter Schu
μ2 158-435, Ratte	Prof. Dr. Volker Haucke
μ3a, Ratte	Prof. Dr. Stefan Höning
ARF6 Δ1-13 (Q67L) GTP Form	Dr. David Owen
ARF6 Δ1-13 (T27N) GDP Form	Dr. David Owen

### 2.1.7.8. Oligonukleotide

Oligo-dt-Primer

*Primer für Klonierungen:*

μ4	5'Primer AGGCCCGACTTTTCGCCG (SH 236)
	3'Primer ACAAACTGCCACCTTGGCC (SH 237)
μ1a 158-423:	5'Primer ACCAACCATATGTCCTGGCGGTCCGAAGG (SH 243)
	3'Primer CTGCGAATTCCCCTCAGTGGGTCCGG (SH 244)

μ3a 166-418: 5'Primer CTGTCCCATATGCCATGGCGTCGGGCAGG (SH 241)

3'Primer CTGAGGAATTCTGGCCTCTTCTCATGTCC (SH 242)

μ4 178-453: 5'Primer GTCCTGCATATGCGCTCTGACCAGAGCCAA (SH 238)

3'Primer GTTTGGGAATTCTCAGATCCGAATGAC (SH 239)

*Primer für Sequenzierungen:*

pET28: 5'Primer: AGATCTCGATCCCGCGAAA (SH 245)

3'Primer: TTATTGCTCAGCGGTGGCA (SH 246)

T7 Primer

T7 Terminator

Die Primersynthese erfolgte bei Invitrogen.

## **2.1.8. Biochemische Materialien**

### **2.1.8.1. Säulen**

C18 Säule, Delta Pac

Millipore

HiLoad 16/60 Superdex 200

GE-Healthcare

His Trap FF, crude 1 ml

GE-Healthcare

PD 10 Säulen, Entsalzungsäulen

Pharmacia

Superdex G75 SMART-Säule

Pharmacia

### 2.1.8.2. Peptide

Alle Peptide wurden von Jerini synthetisiert. Einige Peptide hatten einen Reinheitsgrad von > 95 %, andere wurden vor der Verwendung, wie unter 2.2.2.9. beschrieben, aufgereinigt. Mutierte Aminosäuren sind in rot dargestellt.

Name	Spezies	Sequenz	Molekulargewicht (in g/mol)
TGN38	Ratte	CKVTRRPKASDYQRL	1819,96
TGN38m		CKVTRRPKASD <b>A</b> QRL	1727,94
TGN38 kurz	Ratte	DYQRLN	807,80
LAMP-1	Human	CRKRSHAGYQTI	1418,70
LAMP-2A	Huhn	CKKHHNTGYEQF	1490,65
LAMP-2B (Lamp2c)	Human	CRRKSYAGYQTL	1444,70
LAMP3 (CD63)	Human	<b>CK</b> *KSIRSGYEVN	1399,66
AQP4	Human	CKAAQQTKGSYMEVE	1671,74
AQP4(P)		CKAAQQTKG <b>D</b> **YMEVE	1699,74
CD4-P	Human	CHRRRQAERMpS QIKRLLSEK	2604,40
CD8-CD3 $\gamma$ Chimere	Human	RRQRKSRRTI-DKQTLL	2055,40
CD8-CD3 $\gamma$ Chimere AA		RRQRKSRRTI-DKQT <b>AA</b>	1971,20
CI MPR LL	Human	CSSTKLVSFHDDSDDLLHI	2261,40
CI MPR AA		CSSTKLVSFHDDSS <b>EDAA</b> HI	2149,20
Synaptotagmin1	Human	CGKRLKKKKTTIKK	1660,10
Tyrosinase	Maus	CKKQPQEERQPLLMDKDDYHSLLYQSHL	

\* Das LAMP-3-Peptid wurde fälschlicherweise mit einem zusätzlichen K synthetisiert.

\*\* Durch den Austausch der AS Serin zu Aspartat im AQP4-Peptid wird eine Phosphorylierung des Serins imitiert.

### 2.1.8.3. Proteine

#### *rekombinante Proteine:*

Folgende rekombinante Proteine wurden von Herrn Dr. David Owen (Cambridge, England) expremiert, gereinigt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt:

ARF1 $\Delta$ 1-17 (Q71L) GTP Form	Human
ARF1 $\Delta$ 1-17 (T31N) GDP Form	Human
PH-Domäne von FAPP1 (1-98)	Human
PH-Domäne von OSBP (87-185)	Human
Snx1	Human
ENTH-Domäne von Epsin1 (1-163)	Human
AP2-Core	
$\alpha$ -GST (1-621)	Maus
6xHis- $\beta$ (1-591)	Human
$\mu$ 2	Ratte
$\sigma$ 2	Maus
AP2-P-Core (wie Core, $\mu$ 2 Thr156 phosphoryliert)	
AP2-c $\mu$ 2-Core (wie Core, $\mu$ 2 $\Delta$ 158-435)	
AP2- $\alpha^{\text{PI}}$ Core (wie Core, $\alpha$ Lys57Glu, $\alpha$ Tyr58Glu)	
AP2- $\mu^{\text{PI}}$ Core (wie Core, $\mu$ 2 Lys341Glu, $\mu$ 2 Lys343Glu, $\mu$ 2 Lys345Glu)	
AP2- $\mu^{\text{Y}}$ Core (wie Core, $\mu$ 2 Phe174Ala, $\mu$ 2 Asp176Ser)	

#### *aus Gewebe isolierte Proteine:*

Die Adaptorproteine AP1 und AP2 wurden von Herrn Dominic Teichert (Institut für Biochemie, Universität Köln), wie in Fingerhut, 2000 beschrieben, aus Schweinehirn gereinigt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

### 2.1.9. Standard-Puffer für Messungen am Biacore 3000

AP1-Puffer	10 mM HEPES; pH 7,4 300 mM NaCl
Core-Puffer	10 mM Tris; pH 8,7 250 mM NaCl (1 mM MgCl <sub>2</sub> )
HBS-EP Puffer (Biacore)	10 mM HEPES; pH 7,5 150 mM NaCl 3 mM EDTA 0,005 % Surfactant
HBS-N Puffer (Biacore)	10 mM HEPES; pH 7,5 150 mM NaCl
HBS-P Puffer (Biacore)	10 mM HEPES; pH 7,5 150 mM NaCl 0,005 % Surfactant
μ-Puffer	10 mM HEPES; pH 7,4 500 mM NaCl 10 mM 2-Mercaptoethanol

### 2.1.10. EDV

#### 2.1.10.1. Software

Adobe Photoshop	Adobe Systems Inc.
Adobe Reader 7.0	Adobe Systems Inc.
AIDA Image Analyzer	Raytest
ÄKTA-Unicorn	GE Healthcare
Biacore 3000 BIAevaluation 4.1	Biacore
Biacore 3000 Control Software 4.1	Biacore
Biacore T100 Control Software	Biacore
Biacore T100 Evaluation Software	Biacore





**2.2.1.2.2. Herstellung chemokompetenter *E. coli* Zellen (CaCl<sub>2</sub>-Methode)**

Lösungen:

Puffer I:	100 mM RbCl
	50 mM KCl
	30 mM KAc
	15 % (v/v) Glycerin
	pH 5,8 mit Essigsäure einstellen
Puffer II:	10 mM MOPS; pH 7
	10 mM RbCl
	75 mM CaCl <sub>2</sub>
	15 % (v/v) Glycerin

Die Lösungen wurden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert und vor Gebrauch sterilfiltriert.

Zur Herstellung chemokompetenter *E. coli* Zellen wurden 6 ml LB-Medium mit *E. coli* Zellen des Stammes *DH5 $\alpha$*  aus einer Glycerinkultur (2.2.1.5.) angeimpft und über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. 2 ml dieser Startkultur wurden in 100 ml LB-Medium überführt und bei  $37^{\circ}\text{C}$  bis zu einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,5 wachsen gelassen. Anschliessend erfolgte die Abkühlung der Kultur unter Schwenken für 10 min auf Eis und die Sedimentation der Bakterien für 5 min bei 1000 g und  $4^{\circ}\text{C}$ . Das Pellet wurde in 2 ml Puffer I aufgenommen, kurz gevortext und 90 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  inkubiert.

Dann erfolgte erneut eine Pelletierung der Bakterien für 5 min bei 1000 g und  $4^{\circ}\text{C}$ . Das Bakterienpellet wurde in 2 ml Puffer II aufgenommen.

Die chemokompetenten Zellen wurden in 100  $\mu\text{l}$  Aliquots in sterile Eppendorf-Gefässe pipettiert und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei  $-80^{\circ}\text{C}$ .



#### 2.2.1.4. Isolierung von DNA aus *E. coli*

Die Isolierung von DNA aus Bakterien erfolgte mit Hilfe des QIA-Plasmid Mini Kits sowie des QIA-Plasmid Midi Kits von Qiagen nach Angaben des Herstellers.

#### 2.2.1.5. Anlegen einer Glycerinkultur

Zur langfristigen Lagerung von Bakterienkulturen wurden 750 µl der Bakteriensuspension mit 250 µl sterilem, 80 %igem Glycerin versetzt und in Einfrierröhrchen pipettiert. Die Glycerinkultur wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### 2.2.1.6. Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von DNA wurde photometrisch bestimmt. Dazu wurde die DNA-Lösung 1:100 mit A. bidest verdünnt und die Extinktion bei 260 nm gegen den Leerwert (A. bidest) gemessen. Für die Messung wurde eine Quarzküvette verwendet. Eine Absorptionsänderung um eine Einheit bei einer Wellenlänge von 260 nm entspricht einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml.

Der Quotient  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  ist ein Mass für die Reinheit der DNA. DNA ohne Proteinverunreinigung hat einen Quotienten zwischen 1,8 und 2,0 (Mülhardt, 2000).

#### 2.2.1.7. Agarose-Gelelektrophorese

Lösungen:

TAE:	40 mM Tris 2 mM EDTA pH 8,0 mit Eisessig einstellen
DNA-Probenpuffer 5x:	0,25 % (w/v) Bromphenolblau 40 % (w/v) Saccharose in 1x TAE

---

Agarose-Gel:	1% (w/v) Agarose in 1x TAE aufkochen und abkühlen lassen 42 µl Ethidiumbromid
--------------	--

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA in einem Agarosegel kann präparativ oder analytisch erfolgen. Die analytische Auftrennung dient zur Grössen- und Mengenabschätzung der aufgetrennten DNA-Fragmente anhand eines ebenfalls im Gel aufgetrennten DNA-Grössenstandards.

Durch die präparative Auftrennung kann man DNA-Fragmente reinigen. Dazu erfolgt nach der elektrophoretischen Auftrennung die Extraktion der entsprechenden DNA-Bande aus dem Agarosegel (siehe 2.2.1.8.).

Die DNA wurde mit 5-fach DNA-Probenpuffer versetzt und der Ansatz wurde mit sterilem A. bidest auf 10 µl aufgefüllt. Die Probe wurde auf ein 1 %iges Agarose-Gel aufgetragen und bei 4 V/cm in TAE-Puffer aufgetrennt. Der im Gel enthaltene, fluoreszierende Farbstoff Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und markiert dadurch die DNA-Banden im Gel. Diese wurden auf einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und photographisch dokumentiert.

#### **2.2.1.8. DNA-Extraktion aus Agarosegelen**

Die Extraktion von DNA aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit von Qiagen nach Angaben des Herstellers.

#### **2.2.1.9. Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen**

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die spezifische DNA-Sequenzen erkennen und die DNA an diesen Stellen schneiden können. Dabei entstehen je nach verwendetem Enzym DNA-Fragmente mit Basenüberhängen (*sticky-ends*) oder mit glatten Enden (*blunt-ends*).

Die Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen kann zur Überprüfung von DNA-Sequenzen genutzt werden (Restriktionsanalyse) oder präparativ erfolgen. Die präparative Spaltung dient zur Vorbereitung der DNA auf die Ligation (siehe 2.2.1.10.). Die Aktivität von Restriktionsendonukleasen wird in Units (U) angegeben.

Ein Unit entspricht per Definition der Menge Enzym, die benötigt wird, um 1 µg λ-DNA in einer Stunde bei 37°C zu verdauen.

Für die Restriktionsanalyse wurden 1 µg DNA, 2 Units Enzym (NEB) und 2 µl enzymespezifischer 10x Puffer (NEB) verwendet. Einige Enzyme benötigten ausserdem den Zusatz von Rinderserumalbumin. Bei einem Doppelverdau mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen wurde ein Puffer gewählt, in dem beide Enzyme eine ausreichende Aktivität zeigen. Angaben über die verschiedenen Pufferspezifitäten der Enzyme findet man beim Hersteller.

Der Restriktionsansatz wurde mit sterilem A. bidest auf 20 µl aufgefüllt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Spaltung durch elektrophoretische Auftrennung der DNA in einem Agarosegel überprüft (2.2.1.7.).

Für den präparativen Verdau wurden mindestens 5 µg DNA und ein entsprechend grösserer Restriktionsansatz verwendet. Die präparativ geschnittene DNA wurde anschliessend aus dem Gel extrahiert (siehe 2.2.1.8.).

#### **2.2.1.10. Ligation von DNA-Fragmenten**

Bei der Ligation werden lineare DNA-Fragmente unter ATP-Verbrauch von einer DNA-Ligase verbunden. Zur Herstellung von Expressionsvektoren wurde geschnittener Vektor und Insert im molaren Verhältnis 1:5 verwendet.

Bei einem typischen Ligationsansatz wurden

x µl Vektor-DNA

y µl Insert

1 µl T4-DNA-Ligase (80 NEB Einheiten/µl)

1 µl T4-DNA-Ligase Puffer (10x)

eingesetzt. Der Ansatz wurde mit autoklaviertem HPLC-Wasser auf 10 µl aufgefüllt und 2 h bei Raumtemperatur bzw. über Nacht bei 16°C inkubiert.

### 2.2.1.11. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mittels PCR kann man spezifische DNA-Fragmente *in vitro* amplifizieren.

Die Methode basiert auf der enzymatischen Vermehrung eines DNA-Abschnittes zwischen zwei Oligonukleotid-Primern, die gegenläufig an komplementäre DNA-Stränge gebunden sind. Die Amplifikation erfolgt mit Hilfe von thermostabilen DNA-Polymerasen z.B. der *Taq*-Polymerase des thermophilen Bakteriums *Thermophilus aquaticus*.

Für eine exponentielle Vermehrung der DNA-Matrize müssen folgende Schritte wiederholt durchgeführt werden:

1. Denaturierung: Trennung der Ausgangs-DNA in die zwei Einzelstränge durch Erhitzen
2. *Annealing*: Anlagerung der spezifischen Oligonukleotid-Primer bei einer für die Primer spezifischen *Annealing*-Temperatur
3. Elongation: Synthese komplementärer DNA-Sequenzen ausgehend von den 3'OH-Enden der Primer durch eine thermostabile DNA-Polymerase

Die optimale *Annealing*-Temperatur ist abhängig von Länge, potentiellen Sekundärstrukturen und Cystein- und Guanin-Gehalt der Primer. Sie liegt theoretisch 2°C unter der Schmelztemperatur der Primer, die nach folgender Formel berechnet wird: Schmelztemperatur = 4 x (Anzahl G+C) + 2 x (Anzahl A+T).

Die PCR Reaktion erfolgte mit Hilfe des ProofStart™DNA Polymerase Kits von Qiagen.

Ein PCR-Ansatz enthielt:

- 10 µl 10x PCR-Puffer
- 2 µl PCR-dNTP-Mix (je 12,5 mM)
- 40 pmol Primer 1
- 40 pmol Primer 2
- 1-20 ng Ausgangs-DNA
- 1 µl ProofStart™DNA Polymerase

und wurde mit sterilem A. bidest auf 100 µl aufgefüllt.

Folgendes PCR-Programm wurde verwendet:

1. Initiale Denaturierung: 5 min 95°C
2. Denaturierung: 30 sec 94°C
3. Primer-*Annealing*: 30 sec 56°C
4. Elongation: 3 min 72°C
5. 45 Zyklen (Wiederholung von Schritt 2-4)
6. finale Elongation: 6 min 72°C
7. Kühlen ∞ 4°C

Die PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese (2.2.1.7.) analysiert. Die Reinigung der relevanten Fragmente erfolgte durch Extraktion aus dem Agarose-Gel (2.2.1.8.) oder mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kits von Qiagen (2.2.1.13.).

#### **2.2.1.12. DNA Sequenzierung**

Die Sequenzierung von DNA wurde von den Servicelaboren des Göttinger Zentrums für Biochemie und Molekulare Zellbiologie und des Zentrums für Molekulare Medizin Köln (ZMMK) durchgeführt.

#### **2.2.1.13. Reinigung von DNA-Fragmenten**

Um DNA nach einer PCR (2.2.1.11.) bzw. Ligation (2.2.1.10.) von den entsprechenden Reaktionsenzymen zu trennen, erfolgte mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kits (Qiagen) ein Reinigungsschritt nach Angaben des Herstellers.

#### **2.2.1.14. Präparation von Gesamt-RNA**

Die Präparation von Gesamt-RNA aus Hela-Zellen erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit (Quiagen) nach Angaben des Herstellers.

### **2.2.1.15. Reverse Transkription**

Die Reverse Transkriptase ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die an einer RNA-Matrize eine komplementäre DNA (cDNA) herstellt. Dabei wurde ein Oligo-dT-Primer verwendet, der mit dem poly(A)-Schwanz am 3`-Ende der mRNA hybridisiert. Zur cDNA-Synthese wurden 2 µg Gesamt-RNA aus HeLa-Zellen (2.2.1.14.) eingesetzt, die mit 2 µl 10x RT-Puffer, 2 µl dNTP Mix (je 5 mM), 1 µl Reverse Transkriptase (4 U), 2 µl Oligo-dt-Primer (1:100, Endkonzentration 1 µM) versetzt und anschliessend mit RNase freiem A. bidest auf ein Volumen von 20 µl aufgefüllt wurden. Der Ansatz musste für 60 min bei 37°C inkubiert und für 5 min bei 95°C inaktiviert werden.

Die gewonnene einzelsträngige cDNA wurde bis zur Verwendung als PCR-Matrize (2.2.1.11.) bei – 20°C aufbewahrt.

## **2.2.2. Biochemische Methoden**

### **2.2.2.1. Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die Konzentration von Proteinlösungen wurde mit der Bradford-Methode (Bradford, 1976) bestimmt. Das dabei verwendete Coomassie brilliant blue G250 weist ein Absorptionsmaximum von 465 nm auf. Nach Bildung stabiler, ionischer Farbkomplexe mit Proteinen zeigt der Farbstoff ein Absorptionsmaximum von 595 nm.

Zur Erstellung der Eichgerade wurde Rinderserumalbumin-Lösung (1 mg/ml in A. bidest) verwendet. Die Standardproben und 1-20 µl, der zu bestimmenden Proteinlösung wurden mit 800 µl A. bidest und 200 µl Bradford-Reagenz (Biorad) versetzt. Durch mehrmaliges Schwenken erfolgte eine Vermischung der Ansätze. Die Extinktion wurde bei einer Wellenlänge von 595 nm mit Hilfe eines Multikanal Photometer (Sunrise, Tecan) gemessen. Eine lineare Regressionsgerade diente zur Ermittlung der Proteinkonzentration der Probe.

**2.2.2.2. SDS-PAGE**

Lösungen:

Trenngelpuffer:	1,5 M Tris pH 8,8 0,4 % (w/v) SDS in A. bidest
Sammelgelpuffer:	0,5 M Tris pH 6,8 0,4 % (w/v) SDS in A. bidest
APS:	10 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat in A. bidest
10x SDS-Lauf-Puffer:	1 % SDS 250 mM Tris/HCl pH 8,6 190 mM Glycin in A. bidest
Protein-Probenpuffer 6x:	24 ml 2 M Tris/HCl, pH 6,8 12 g SDS 45 ml 100 % Glycerin 60 mg Bromphenolblau 12 ml 2-Mercaptoethanol 88 ml A. bidest
Coomassie-Färbelösung:	0,25 % (w/v) Coomassie Blau R 250 45 % (v/v) Ethanol 10 % (v/v) Essigsäure 45 % (v/v) A. bidest
Coomassie-Entfärbelösung:	50 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure 40 % (v/v) A. bidest

## Trenngel+Sammelgel:

für 2 Minigele:	Trenngel				Sammelgel
	7,5 %	10 %	12,5 %	15 %	4,5 %
Acrylamidlösung (Roth)	2 ml	2,67 ml	3,33 ml	4 ml	0,45 ml
1,5 M Tris 0,4 % SDS	2 ml				-
0,5 M Tris 0,4 % SDS	-				0,45 ml
H <sub>2</sub> O	3,9 ml	3,3 ml	2,62 ml	1,95 ml	2 ml
TEMED	8 µl				4 µl
10 % APS	80 µl				40 µl

Zur Auftrennung eines Proteingemisches nach dem Molekulargewicht der Proteine wurde die denaturierende, diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) verwendet (Laemmli, 1970).

Das anionische Detergenz SDS (Sodiumdodecylsulfat) bildet mit den Proteinen negative geladene Komplexe mit konstantem Ladung/Masse-Verhältnis. Im elektrischen Feld wandern die SDS-Protein-Komplexe zur Anode und werden durch die Siebwirkung der porösen Polyacrylamidmatrix nach ihren Stokes-Radien aufgetrennt.

Zunächst wurde das Trenngel gegossen, wobei die Acrylamidkonzentration im Gel der Molekülgröße der zu trennenden Proteine angepasst wurde. Je höher die Konzentration, desto kleiner werden die Poren der Polyacrylamidmatrix und desto besser werden kleine Proteine aufgetrennt.

Vor der Polymerisierung wurde die Trenngel-Lösung mit wassergesättigtem Butanol überschichtet, um eine gerade Gelkante zu erhalten. Nach dem Auspolymerisieren wurde das Trenngel mit A. bidest gespült, mit Sammelgellösung überschichtet und ein Probenkamm eingefügt. Die nach dem Auspolymerisieren des Sammelgels entstandenen Probenaschen wurden mit A. bidest gespült.

Die Proteinproben wurden mit Protein-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95°C gekocht. Die Gele wurden in die Gelappertemperatur eingesetzt, die Kammer mit SDS-Laufpuffer gefüllt und dann mit den Proben beladen. Zur Molekulargewichtsbestimmung wurde ein Proteinstandard mitgeführt.

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte zunächst bei 50 mA bis die Proben in das Trenngel eingelaufen waren. Dann wurde die Stromstärke auf 100-150 mA

erhöht. Durch die Diskontinuität der Acrylamid-Konzentration in Trenn- und Sammelgel wurden die Proben zunächst zwischen Trenn- und Sammelgel aufkonzentriert, dadurch wurden schärfere Proteinbanden erzielt.

Kurz vor dem Herauslaufen der Bromphenolblaufront wurden die Gele aus der Kammer entnommen und für 2 h bei Raumtemperatur in Coomassie-Färbelösung geschüttelt. Die Entfärbung des Hintergrund erfolgte in Entfärbelösung, die mehrfach erneuert wurde. Anschliessend wurden die Gele gewässert. Zur Dokumentation wurden die Gele mit Hilfe eines Durchlichtscanners (Perfection 4990 Photo, Epson) eingescannt. Um die Gele längere Zeit aufzubewahren, wurden sie zwischen zwei Cellophanfolien mit einem Vakuum-Trockner unter Wärmezufuhr 2 h getrocknet.

### 2.2.2.3. Fällung von Proteinen aus wässriger Lösung

Lösungen:

Na-Acetat-Waschlösung: 2 % NaAcetat in Ethanol

Zum Füllen von Proteinen wurde die Proteinlösung mit Hilfe einer 100 %igen TCA-Lösung auf 10% TCA eingestellt und 2 h auf Eis inkubiert. Anschliessend musste die Probe 10 min bei 4°C mit 12.500 g zentrifugiert und der Überstand abgesaugt werden. Das präzipitierte Protein wurde kurz mit 2 %iger NaAcetat-Lösung in Ethanol gewaschen und unter dem Abzug vollständig getrocknet.

### 2.2.2.4. Expression und Reinigung von Hexa-His-Proteinen

Allgemeine Lösungen:

IPTG: 500 mM IPTG  
in A. bidest  
steril filtrieren

Imidazol: 5 M Imidazol; pH 7,5  
in A. bidest

CHAPS 10 %: 10 % CHAPS  
in A. bidest

**Tabelle 2-1: Expression und Reinigung von rekombinanten Hexa-His-Proteinen.**

Proteinspezifische, optimierte Reinigungsbedingungen für die Proteine His- $\mu$ 1A (AS 158-423), His- $\mu$ 2 (AS 158-435), His- $\mu$ 3A (AS 166-418), His- $\mu$ 4 (AS 178-453), His-ARF6 GTP Form (AS 14-175), His-ARF6 GDP Form (AS 14-175).

Reinigung von:	His-c- $\mu$ -Untereinheiten: His- $\mu$ 1A (AS 158-423) His- $\mu$ 2 (AS 158-435) His- $\mu$ 3A (AS 166-418) His- $\mu$ 4 (AS 178-453)	His-ARF6 GTP (AS 14-175)	His-ARF6 GDP (AS 14-175)
Antibiotikum	Kanamycin 50 $\mu$ g/ml	Ampicilin 100 $\mu$ g/ml	
Volumina der Bakterienkulturen	500 ml Hauptkultur mit 10 ml Vorkultur animpfen	200 ml Hauptkultur mit 5 ml Vorkultur animpfen	
Induktionstemperatur	30°C	37°C	
IPTG	Endkonzentration: 0,5 mM	Endkonzentration: 0,2 mM	
Expressions- temperatur und -dauer	His- $\mu$ 1A: 25°C, über Nacht His- $\mu$ 2: 30°C, 4 h His- $\mu$ 3A: 30°C, 4 h His- $\mu$ 4: 30°C, 6 h	22°C, über Nacht	
Reinigungs- puffer	PBS+1 M NaCl:  140 mM NaCl 2,7 mM KCl 8,1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,5 +1 M NaCl  Das Pellet einer 500 ml Bakterienkultur wurde in 15 ml Reinigungspuffer aufgenommen.	50 mM Tris pH8 1 mM MgCl <sub>2</sub> 1 mM DTT 0,25 mM PMSF	50 mM HEPES 100 mM KCl 1 mM MgCl <sub>2</sub> 1 mM DTT 5 $\mu$ M GDP pH7.5
Probenzusatz vor Ni-NTA-Säulen-Lauf	+ 10 mM Imidazol + PBS pH 7,5	+ 20 mM Imidazol	+ 20 mM Imidazol + 10 % Glycerin
Ni-NTA Laufpuffer	500 mM NaCl 10 mM Imidazol in PBS pH 7,5 steril filtrieren, entgasen	Reinigungspuffer + 10 mM Imidazol steril filtrieren, entgasen	Reinigungspuffer + 10 mM Imidazol steril filtrieren, entgasen
Ni-NTA Elutionspuffer	500 mM NaCl 300 mM Imidazol in PBS pH 7,5 steril filtrieren, entgasen	Reinigungspuffer + 200 mM Imidazol + 10 % Glycerin steril filtrieren, entgasen	Reinigungspuffer + 400 mM Imidazol + 10 % Glycerin steril filtrieren, entgasen
Gelfiltrations- laufpuffer	10 mM HEPES pH 7,4 500 mM NaCl 10 mM 2-Mercaptoethanol steril filtrieren, entgasen	Reinigungspuffer steril filtrieren entgasen	Reinigungspuffer steril filtrieren entgasen

Die Expression und Reinigung der rekombinanten Hexa-His-Proteine erfolgte nach folgendem Standardprotokoll. Die für die jeweiligen Proteine optimierten Bedingungen sind in Tabelle 2-1 angegeben.

Je 10 ml LB Medium mit Selektionsantibiotikum (Tab. 2-1) wurden mit dem Expressionsvektor-tragenden Bakterienklon aus einer Glycerinkultur angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Diese Vorkultur diente zum Animpfen eines grösseren Mediumvolumens (Tab. 2-1). Die Kultivierung der Bakterien erfolgte bei verschiedenen Temperaturen (Tab. 2-1) bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,8. Durch Zugabe von IPTG (Tab. 2-1) wurde die Expression der Proteine induziert. Die Expression fand bei unterschiedlichen Inkubationszeiten und -temperaturen im Schüttler statt (Tab. 2-1).

Anschliessend wurden die Bakterien 15 min bei 4°C und 5000 g pelletiert. Das Pellet wurde in einem geeigneten Volumen Reinigungspuffer (Tab. 2-1) resuspendiert und mit Proteinase Inhibitor Cocktail (100 µl/ 2 g Bakterienpellet) versetzt. Um die Zellen aufzuschliessen, wurde der Suspension eine Spatelspitze Lysozym zugegeben. Im Anschluss erfolgte 10 minütige Inkubation auf Eis und eine Behandlung mit Ultraschall für zweimal 30 sec (Stufe 4-5, Stabultraschall, UP200S, Dr.Hielscher GmbH). Die Suspension wurde auf 2 % CHAPS eingestellt und 20 min auf Eis inkubiert.

Nachfolgend diente ein Zentrifugationsschritt für 15 min bei 4°C und 15000 g zur Trennung der gelösten Proteine von Zellresten. Der Überstand wurde mit 5 M Imidazol auf eine Imidazol-Konzentration von 10 mM bzw. 20 mM eingestellt (Tab. 2-1). Im Falle der Reinigung von Hexa-His- $\mu$  Untereinheiten musste die Proteinlösung mit PBS pH 7,5 auf eine NaCl-Konzentration von 500 mM verdünnt und bei der ARF6 GDP Reinigung 10 % Glycerin zugesetzt werden.

Die weitere Aufreinigung der Hexa-His-Proteine erfolgte über Ni-NTA-Säulen (His Trap FF crude 1 ml, GE-Healthcare) mit Hilfe des Chromatographiesystems ÄKTAexplorer™ (GE Healthcare) bei einer Flussrate von 1 ml/min.

Zunächst wurde die Ni-NTA-Säule mit fünf Säulenvolumina Laufpuffer äquilibriert, dann die Probe aufgetragen und ungebundene Proteine mit 50 Säulenvolumen Laufpuffer ausgewaschen. Danach erfolgte die Elution der zu reinigenden Proteine mit 10 Säulenvolumina Elutionspuffer (Tab. 2-1), dabei wurden 1 ml Fraktionen gesammelt. Proteinhaltige Fraktionen wurden vereinigt und mittels präparativer Gelfiltration nach dem Molekulargewicht getrennt. Die dazu verwendete

Gelfiltrationssäule (Hiload 16/60 Superdex 200 (Trennbereich: 10.000-600.000 Da) wurde vor dem Probenauftrag mit einem Säulenvolumen Laufpuffer (Tab. 2-1) äquiliert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in Laufpuffer bei einer Flussrate von 1 ml/min. Die während des Laufes gesammelten, proteinhaltigen Fraktionen (je 2 ml) wurden mittels SDS-PAGE (2.2.2.2.) analysiert. Fraktionen, die das gereinigte Fusionsprotein enthielten wurden vereinigt, die Proteinlösung gegebenenfalls ankonzentriert (2.2.2.5.) und bei 4°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

#### **2.2.2.5. Erhöhung der Konzentration von Proteinlösungen**

Um die Konzentration von Proteinlösungen zu erhöhen, wurden Amicon® Ultra Zentrifugenfilter-Gefäße verwendet. Die Ausschlussgrösse des Filters betrug 10.000 Da, so dass beim Zentrifugieren das Protein zurückgehalten und das Probenvolumen eingengt wurde. Vor Gebrauch wurden die Filter dreimal mit Puffer gewaschen, um noch enthaltenes Triethylenglycol zu entfernen. Die zu konzentrierende Proteinlösung wurde bei 4000 g und 4°C solange zentrifugiert, bis das gewünschte Probenvolumen erreicht war.

#### **2.2.2.6. Dialyse**

Die Dialyse dient zur Veränderung der Pufferzusammensetzung einer Proteinlösung. Dabei passieren Pufferbestandteile frei die Dialysemembran, wohingegen das Protein im Dialyseschlauch verbleibt (Ausschlussgrösse: 12.000-14.000 Da). Der Dialyseschlauch wurde vor Gebrauch für einige Minuten in A. bidest gewässert und dann an einer Seite mit einer Dialyseklammer verschlossen. Nach dem Einfüllen der zu dialysierenden Proteinlösung wurde der Schlauch an der anderen Seite ebenfalls verschlossen. Die Dialyse erfolgte bei 4°C unter Rühren gegen das 100fache Volumen der Probe für mindestens 3 h. Der Dialysepuffer wurde dabei stündlich gewechselt. Nach beendeter Dialyse wurde die Proteinlösung aus dem Schlauch entnommen und bei 13.000 g und 4°C für 10 min zentrifugiert, um denaturierte Proteine und grosse Aggregate zu entfernen.

### 2.2.2.7. CD-Spektroskopie von His- $\mu$ 1-4

Die Zirkulardichroismus Spektroskopie (CD-Spektroskopie) dient der Konformationsermittlung von Polypeptiden in Lösung. Grundlage der Methode ist die Wechselwirkung von polarisiertem Licht mit Materie. In der vorliegenden Arbeit diente die CD-Spektroskopie zur Bestimmung des Faltungszustands der rekombinant exprimierten und gereinigten His- $\mu$ 1-4 Proteine (2.2.2.4.). Diese Analyse wurde freundlicherweise von Herrn Dr. David Owen (Cambridge, England) durchgeführt .

### 2.2.2.8. $\mu$ 2 Gelfiltration analytisch

Lösungen:

Laufpuffer: 10 mM HEPES pH 7,4  
300 mM NaCl

Um eine mögliche, durch Peptidbindung vermittelte Dimerisierung von  $\mu$ 2 zu untersuchen, wurden His-c- $\mu$ 2-Peptidgemische durch analytische Gelfiltration mit Hilfe des Chromatographie Systems SMART™ (GE Healthcare) nach dem Molekulargewicht getrennt. Dazu wurde zunächst die Gelfiltrationssäule Superdex G75 mit einem Säulenvolumen Laufpuffer äquilibriert und 50  $\mu$ l Probe aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte in Laufpuffer mit einer Flussrate von 50  $\mu$ l/min. Während der Trennung wurden 50  $\mu$ l-Fractionen gesammelt und die OD bei 280 sowie 214 nm bestimmt. Protein- und Peptidhaltige Fractionen wurden mittels massenspektrometrischer Analyse (Matrix-unterstützter Laserdesorptions-/Ionisations-Massenspektrometrie, Servicelabor des Zentrum für Molekulare Medizin Köln) untersucht.

### 2.2.2.9. Reinigung von Peptiden

Lösungen:

Peptidpuffer: 5 % Acetonitril  
0,1 % TFA  
in HPLC-Wasser

Puffer A: 0,1 % TFA  
in HPLC-Wasser

Puffer B: 90 % Acetonitril  
0,1 % TFA  
in HPLC-Wasser

Die präparative Reinigung von synthetischen Peptiden erfolgte durch *Reverse Phase*-Chromatographie mit einer C18 Säule mit Hilfe des Chromatographiesystems BioCad Vision (Perseptive Biosystems).

Zunächst wurden 20 mg des zu reinigenden Peptides in 5 ml Peptidpuffer aufgenommen, gut gevortext und 5 min im Ultraschallbad inkubiert. Anschliessend wurde nicht gelöstes Peptid durch 10 min Zentrifugation bei 16000 g entfernt.

Der Lauf der C18 Säule erfolgte in folgenden Schritten:

Reinigungsschritt	Konzentration von Puffer B	Länge des Reinigungsschrittes
1. Äquilibration der Säule	5 %	1 Säulenvolumen
2. Probenauftrag		
3. Waschschrift	5 %	1 Säulenvolumen
4. Elution	5-50 %	Steigung von 1 %/ min
	50-90 %	0,5 Säulenvolumina
5. Waschschrift	90 %	1 Säulenvolumen
6. Re-Äquilibration	90-5 %	5 Säulenvolumina
7. Waschschrift	5 %	1 Säulenvolumen

Während des gesamten Laufes mit einer Flussrate von 17 ml/min wurden 8 ml Fraktionen gesammelt und die OD bei 214 nm gemessen. Peptidhaltige Fraktionen wurden mittels massenspektrometrischer Analyse (Matrix-unterstützter Laserdesorptions-/Ionisations-Massenspektrometrie, Servicelabor des Göttinger Zentrums für Biochemie und Molekulare Zellbiologie) untersucht. Fraktionen ohne Verunreinigungen wurden vereinigt und lyophilisiert (2.2.2.10.). Die Lagerung des gereinigten Peptids erfolgte bei -20°C.

### 2.2.2.10. Lyophilisation von Peptiden

Die Gefriertrocknung von Peptiden findet im Hochvakuum durch Sublimation des Wassers statt. Dazu wurde das Gefäss mit den gelösten Peptiden (z.B. Eppendorfgefäss 1,5 ml) mit Parafilm verschlossen und dieser mit einer Kanüle mehrfach durchlöchert. Die Probe wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschliessend über Nacht unter Vakuum lyophilisiert.

### 2.2.2.11. Kopplung von Peptiden an MPB-PE

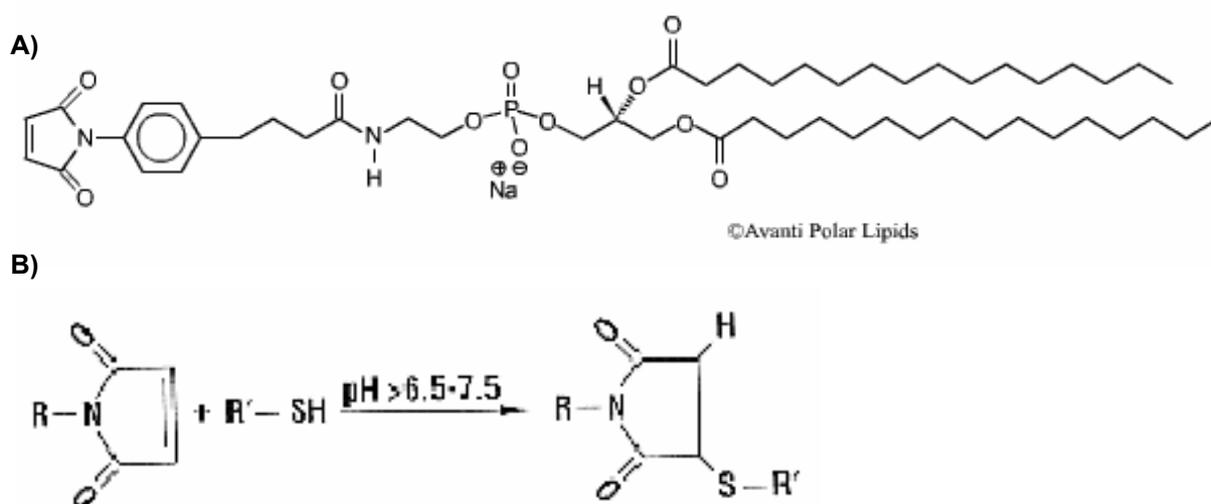
Lösungen:

Peptidlösung:	5 mM Peptid
	10 mM MOPS-KOH pH 7,5
	50 % DMF

Um synthetische Peptide von einer Länge von 10-20 Aminosäuren in Liposomen zu integrieren, wurden diese durch eine Maleimidkopplung kovalent an entsprechend modifizierte Lipide gekoppelt. Alle zu koppelnden Peptide verfügten N-terminal über ein Cystein. Das verwendete Lipid MPB-PE (1,2-Dipalmitoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphoethanolamine-N-[4-(*p*-maleimidophenyl)butyramide]) enthält an seiner polaren Kopfgruppe eine Maleimidgruppe, die unter Ausbildung einer Thioetherbindung mit der Thiolgruppe des Cysteins der Peptide reagieren kann (siehe Abb. 2-2). Entscheidend für die Reaktion ist der pH-Wert der Lösung. Liegt der pH-Wert zwischen 6,5 und 7,5 reagiert die Maleimidgruppe spezifisch mit den Sulfhydrylgruppen der Peptide, bei einem pH Wert über 8,5 läuft die Kopplungsreaktion jedoch mit primären Aminen ab.

Für die Kopplung wurde 1 ml Peptidlösung mit 1 ml MPB-PE (5 mg/ml in Chloroform = 5,2 mM) versetzt und für 2 h bei Raumtemperatur auf dem Drehrad inkubiert. Anschliessend wurde die Lösung auf 10 mM 2-Mercaptoethanol eingestellt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, um das ungekoppelte Lipid zu blockieren. Zur Trennung der Lipide von ungebundenem Peptid diente eine Chloroform-Methanol-Extraktion. Dazu wurden 2 ml Chloroform und 1 ml Methanol zur Lipidlösung pipettiert, kurz gevortext und 15 min bei 5000 g zentrifugiert. Die untere, organische Phase wurde vorsichtig mit einer Pasteurpipette entnommen. Zur oberen Phase wurde 1 ml Chloroform pipettiert, wiederum gevortext und 15 min bei 5000 g

zentrifugiert. Die nun entstandene untere, organische Phase wurde ebenfalls vorsichtig mit einer Pasteurpipette entnommen und mit der vorherigen vereinigt. Dieser Schritt wurde noch zweimal wiederholt. Die gepoolten organischen Phasen wurden unter einem Stickstoffstrom getrocknet und in 1 ml Chloroform/Methanol (2+1) resuspendiert. Unter der Annahme einer vollständigen Kopplung konnte so 1 ml Peptido-Lipid mit einer Konzentration von 5 mg/ml hergestellt werden. Das Peptido-Lipid wurde mit Stickstoff überschichtet und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.



**Abbildung 2-2: A) Strukturformel des MPB-PE.** Durch die Maleimidgruppe auf der polaren Seite des MBP-PE besteht die Möglichkeit zur Kopplung eines Peptides an dieses Lipid. **B) Maleimid-Kopplungsreaktion.** Die Kopplung der Maleimidgruppe des Lipids mit dem Cystein des Peptids erfolgt bei einem pH-Wert zwischen 6,5 und 7,5. Weitere Erklärungen siehe Text.

### 2.2.2.12. Liposomenpräparation

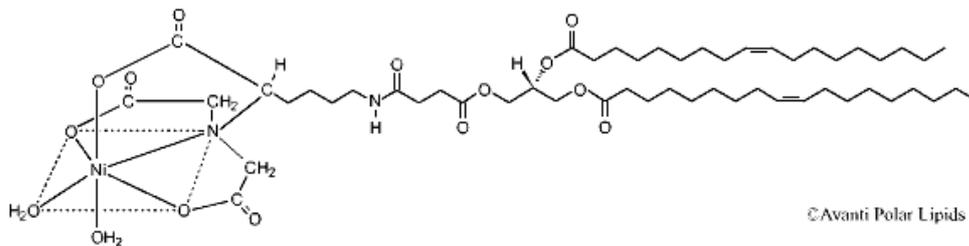
Lösungen:

Saccharose-Lösung: 0,3 M Saccharose  
In A. bidest

HEPES-Puffer: 20 mM HEPES; pH 7,4  
In A. bidest

Um die Interaktion zwischen Proteinen und Lipiden sowie zwischen Proteinen und Peptiden in Membranumgebung mit Hilfe eines Biacore Biosensors (siehe 2.2.3.)

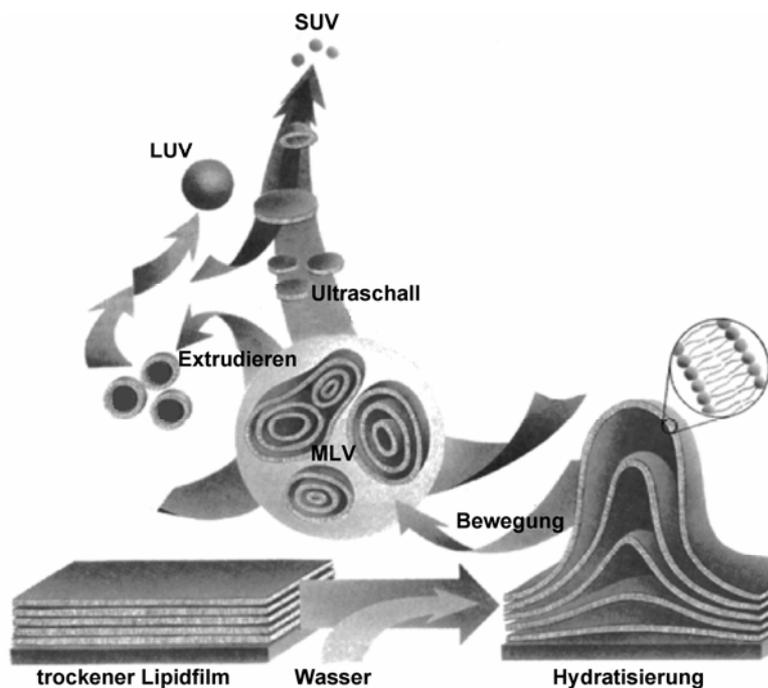
messen zu können, wurden Liposomen mit unterschiedlicher Lipidzusammensetzung präpariert. Für die Präparation wurde pro Ansatz 1 mg Gesamt-Lipid verwendet. Alle Liposomen enthielten 20 % PE. Weitere, je nach Experiment eingesetzte, Lipide waren 10 % Phosphatidylinositole (PI), 10 % Ni-NTA-Lipid (Abb. 2-3) sowie 10 % Peptido-Lipide (Kopplung siehe 2.2.2.11.). Die restlichen 50-80 % Lipid bestanden aus Phosphatidylcholin (PC).



**Abbildung 2-3: Ni-NTA-Lipid (DOGS-NTA-Ni).** Durch die Integration des Nickel-beladenen NTA-Lipids in Liposomen wird die Bindung von His-modifizierten Proteinen an diese Liposomen ermöglicht.

Die Lipide wurden zunächst in Chloroform/Methanol (2:1) aufgenommen und mit Hilfe einer Hamilton-Spritze in den benötigten Mengen in ein Reagenzglas überführt. Das Lipidgemisch musste unter leichter Stickstoffbegasung als dünner, gleichmässiger Film an der Glaswand des Reagenzgefässes getrocknet werden, dazu wurde das Reagenzglas langsam gedreht. Die Hydratisierung des Lipidfilms erfolgte ebenfalls unter langsamen Drehbewegungen in 150  $\mu$ l Saccharose-Lösung. Für die Liposomenbildung musste die Lösung 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und währenddessen mehrmals schwach gevortext werden. Anschliessend wurden 850  $\mu$ l A. bidest hinzugegeben und 1 h in der Ultrazentrifuge mit 17500 g bei 4°C zentrifugiert. Die pelletierten, fertigen Liposomen, sogenannte *large multilamellar vesicles* (MLV), wurden in 500  $\mu$ l HEPES-Puffer aufgenommen und fünfzehnmal durch einen Extruder gegeben. Die verwendete Porengrösse der Membran betrug 100 nm. Dadurch erhielten die Liposomen einen durchschnittlichen Durchmesser von 120-140 nm (avanti polar lipids [www.avantilipids.com](http://www.avantilipids.com)) und wurden in *large unilamellar vesicles* (LUV) umgewandelt (Abb. 2-4).

Die Liposomenlösung hatte eine Konzentration von 2 mg Lipid/ ml. Die Lagerung erfolgte bei 4°C für 7-10 Tage.



**Abbildung 2-4: Liposomenbildung durch Hydratisierung eines Lipidfilms.** Liposomen vor dem Extrudieren haben oft mehrschichtige Membranen (MLV *large multilamellar vesicles*). Durch das Extrudieren mit einem 100 nm Filter entstehen LUV *large unilamellar vesicles* mit einer durchschnittlichen Größe von 120-140nm. Wenn frisch präparierte Liposomen mit Ultraschall behandelt werden, entstehen kleinere Liposomen (30–100 nm) - SUV *small unilamellar vesicles*. (Verändert nach Lasic *et al.*, 1997)

### 2.2.2.13. Darstellung von Liposomen durch Negativkontrastierung in der Elektronenmikroskopie

Das Prinzip der Negativkontrastierung beruht auf in Wasser lösliche Schwermetalle, die in amorpher Form um das abzubildende Objekt auf einer Trägerfolie eintrocknen. Dadurch bleibt das Objekt gut durchstrahlbar, während seine Umgebung im Elektronenmikroskop dunkel erscheint. Frisch präparierte Liposomen wurden auf ein mit Formvarfilm beschichtetes und Kohle bedampftes Kupfergrid aufgetragen. Die Fixierung mit Glutaraldehyd, die Nachkontrastierung mit Uranylacetat und die Betrachtung der Liposomen am Transmissionselektronenmikroskop (Philips CM120) wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Dirk Wenzel am MPI für biophysikalische Chemie, Göttingen durchgeführt.

### 2.2.3. Biacore Biosensor (SPR)

(BiacoreAB, 2003a; BiacoreAB, 2003b; BiacoreAB, 1996; BiacoreAB, 1994)

Mit Hilfe eines Biacore Biosensors ist es möglich die Interaktion zwischen Molekülen nachzuweisen und die Bindungsparameter der Interaktion zu messen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Interaktion zwischen Proteinen, zwischen Proteinen und Peptiden sowie zwischen Proteinen und Lipiden gemessen. Die Messung der Bindungsstärke mittels eines Biacore Biosensors erfolgt in Echtzeit und ohne spezielle Markierung der Interaktionspartner.

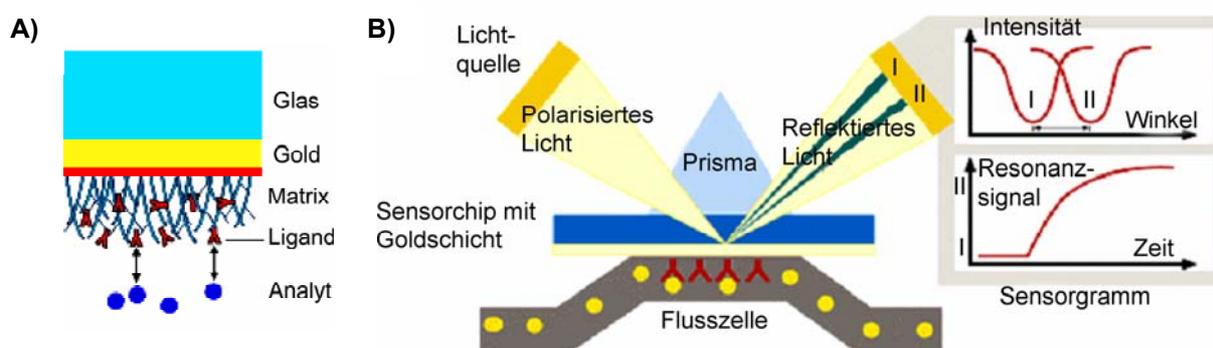
Ein Interaktionspartner, der sogenannte Ligand, muss an die Oberfläche eines Sensor Chips gekoppelt werden. Ein Sensorchip besteht aus Glas als Trägermaterial, welches mit einer Goldschicht überzogen ist. Darauf befindet sich in der Regel Dextran als Oberflächenmatrix. Je nach Art des Chips ist diese Matrix unterschiedlich derivatisiert, um verschiedene Möglichkeiten der Ligandenkopplung zu ermöglichen. In dieser Arbeit wurden folgende Kopplungsstrategien angewendet: die kovalente Kopplung an einen CM5-Chip über Thioetherbindungen (2.2.3.4.), die Bindung von His-modifizierten Proteinen an eine Ni-NTA-Oberfläche (2.2.3.6.) sowie die Bindung von Liposomen an eine L1-Oberfläche durch hydrophobe Wechselwirkungen (2.2.3.5.).

Der Analyt ist der potentielle Bindungspartner für den Liganden. Er befindet sich in Lösung und wird in kontinuierlichem Fluss über das bereits an die Oberfläche gebundene Protein geleitet. Erfolgt eine Bindung zwischen den Interaktionspartnern wird eine Veränderung des Resonanz-Signals gemessen (Abb. 2-5).

Die Messung beruht auf einem optischen Phänomen, die Oberflächen Plasmon Resonanz (*Surface Plasmon Resonanz*, Abkürzung: SPR). Gemessen wird hierbei die Änderung des Brechungsindex an der Oberfläche des Chips, welcher bei Messungen mit Proteinen linear zur Massenzunahme auf der Chipoberfläche ist. Monochromatisches, p-polarisiertes Licht fällt im Winkel der totalen internen Reflektion auf die Chipoberfläche. Das Licht trifft auf die elektrisch-leitfähige Goldschicht an der Grenze zwischen Medien mit unterschiedlichen Brechungsindizes. Die Glasschicht des Chips hat einen hohen Brechungsindex und die Flüssigkeit über dem Sensorchip einen niedrigeren. Unter diesen Bedingungen tritt eine elektromagnetische Feldkomponente, die sogenannte evaneszente Welle auf. Durch die Interaktion der evaneszenten Welle mit der Elektronenwolke der Goldschicht entsteht das optische Phänomen SPR und führt zu einer

Energieabnahme im reflektierten Licht. Der daraus resultierende Intensitätsabfall im reflektierten Lichtstrahl, ist in seiner Position abhängig von der Änderung des Brechungsindex der oberflächennahen Schicht. Wenn also ein Molekül an der Chipoberfläche bindet, verändert sich die gebundene Masse und damit der Brechungsindex. Dadurch verändert sich der sogenannte Resonanzwinkel, also der Winkel, bei dem der "Schatten" im reflektierten Licht von einem Diodenarray Detektor gemessen werden kann. (siehe Abb. 2-5)

Die Änderung des Resonanzwinkels wird in einem Sensorgramm als Resonanzeinheitenveränderung angegeben und gegen die Zeit aufgetragen. Ein Zuwachs von 1000 Resonanzeinheiten (RU) entspricht im Durchschnitt einer Zunahme von 1 ng Protein pro Quadratmillimeter Chipoberfläche.

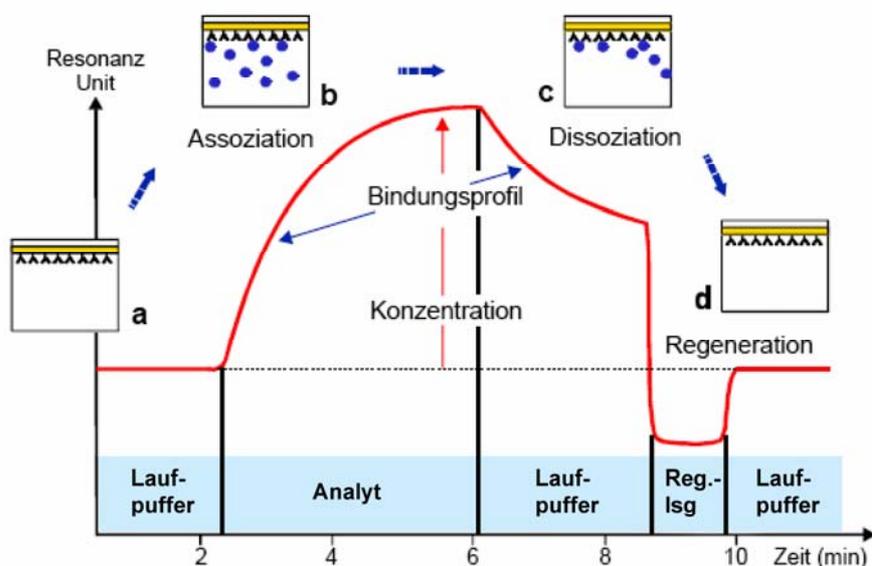


**Abbildung 2-5: Messprinzip eines SPR Biosensors.** A) Aufbau eines Sensorchips B) Durch die Oberflächen Plasmon Resonanz entsteht ein Intensitätsabfall im reflektierten Licht. Bindet ein Analyt an einen immobilisierten Liganden, ändert sich der Brechungsindex an der Chipoberfläche und der Schatten im reflektierten Licht verändert seine Position. Die Winkeländerung des Schattens wird im Sensorgramm als Resonanzsignal dargestellt.

Eine Interaktionsmessung besteht aus mehreren Phasen (siehe Abb. 2-6). Wenn gerade keine Interaktion gemessen wird, fließt Laufpuffer über die Oberfläche (a). Die Assoziationsphase (b) beginnt mit der Injektion eines definierten Volumens von Analyt. Dieser bindet an den immobilisierten Liganden und dissoziiert auch wieder. Durch den kontinuierlichen Fluss über die Oberfläche bleibt die Analytkonzentration während der Assoziationsphase konstant. Durch Beenden der Injektion des Analyten beginnt die Dissoziationsphase (c). Es wird nur noch Laufpuffer über die Oberfläche geleitet. Der noch gebundene Analyt dissoziiert vom Liganden und wird vom kontinuierlichen Laufpufferfluss über der Oberfläche weggespült. Im Idealfall sollten nach der Interaktion wieder alle Liganden unbesetzt und aktiv vorliegen. Bei einer kleinen Dissoziationsrate kann dies mehrere Stunden dauern. Auch durch

unerwünschte Effekte, wie z.B. unspezifische Bindung an die Oberfläche oder *rebinding* (siehe 2.2.3.1.) kann eine unvollständige Dissoziation auftreten. Daher wird eine geeignete Regenerationslösung (z.B. 100 mM HCl, 50 mM NaOH, 10 mM Glycin pH2) über die Oberfläche geleitet, um am Ende der Interaktion die Basislinie, die vor der Messung vorlag, wieder zu erreichen (d).

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Biacore 3000 sowie ein Biacore T100 verwendet. Beide Geräte verfügen über ein integriertes Flusssystem mit vier seriellen Flusszellen. Jede Flusszelle ist einzeln anwählbar, der Fluss kann aber auch nacheinander durch die Flusszellen geleitet werden. Das bedeutet, dass es möglich ist, vier verschiedene Liganden auf die verschiedenen Oberflächen zu koppeln und alle Liganden durch eine einmalige Injektion von Analytlösung zu erreichen.



**Abbildung 2-6: Phasen eines Sensorgramms.** a) Vor der Interaktion wird Laufpuffer über die an der Chipoberfläche gebundenen Liganden gespült. Das Sensorgramm zeigt eine stabile Basislinie. b) Während der Assoziationsphase wird der Analyt in kontinuierlichem Fluss über die Oberfläche geleitet. Erfolgt eine Bindung an den Liganden steigt das Resonanzsignal. c) Mit dem Beenden der Analytinjektion beginnt die Dissoziationsphase, in der Laufpuffer über die Chipoberfläche fließt. Der Komplex dissoziiert und das Resonanzsignal fällt. d) Um die Ausgangsbasislinie wieder zu erreichen, wird eine Regenerationslösung (Reg.lsg) injiziert. Alle Bindungsstellen des Liganden sollten nach beendeter Regeneration wieder frei und aktiv vorliegen.

### 2.2.3.1. Voraussetzungen für die Messung von kinetischen Daten

Um eine gute Qualität der Interaktionsdaten zu gewährleisten, müssen bei allen Biacore-Messungen einige Voraussetzungen erfüllt werden:

1. Ein wichtiger Ausgangspunkt für kinetische Messungen ist die grösstmögliche Reinheit aller eingesetzten Protein-, Peptid- oder Lipidkomponenten. Dadurch werden durch Verunreinigungen auftretende, unspezifische Interaktionen verhindert.
2. Alle Proteinlösungen sind vor der Verwendung für 10 min bei 16000 g zu zentrifugieren, um präzipitiertes Protein zu entfernen. Die Konzentration von Proteinlösungen ist mittels Doppelbestimmung zu bestimmen.
3. Alle verwendeten Puffer müssen steril filtriert (0,2 µm Filter) und entgast werden. Letzteres entfällt bei Messungen am Biacore T100, da dieses Gerät über ein integriertes Entgasungssystem verfügt.
4. Alle Probenlösungen, die injiziert werden sollen, müssen Luftblasen frei sein. Dies ist nötig, da injizierte Luft sich als starke Störung im Sensorgramm bemerkbar macht und unter Umständen Ligandenoberflächen zerstört, z.B. bei Liposomen als Ligand.
5. Der Analyt sollte in Laufpuffer gelöst sein, da Unterschiede in der Pufferzusammensetzung zwischen Laufpuffer und Analytpuffer in einer Veränderung des Brechungsindex resultieren. Dies macht sich im Sensorgramm als "Puffersprung" bemerkbar und erschwert die Auswertung der Kurven.
6. Um geringfügige Unterschiede zwischen Lauf- und Analytpuffer und gleichzeitig unspezifische Interaktionen mit der Chipoberfläche zu korrigieren, wird eine Referenzierung durchgeführt. Das bedeutet, dass eine der vier Flusszellen als Referenzoberfläche genutzt wird. Je nach Messung wird diese Oberfläche gar nicht verändert, aktiviert und wieder deaktiviert oder mit einem bindungsdefizienten Liganden belegt. Das Signal der Referenzoberfläche wird von dem Signal der aktiven Oberfläche abgezogen.
7. Für die sogenannte doppelte Referenzierung erfolgt zusätzlich eine Laufpufferinjektion. Dazu wird Puffer über alle Oberflächen geleitet und das entstehende Signal wird von allen Analyt-Liganden Interaktionen abgezogen. Dies dient dem Ausgleich von kleineren Geräte-spezifischen Störungen im Sensorgramm und von Schwankungen der Basislinie.
8. Ein weiterer, für die quantitative Analyse wichtiger Punkt ist die Belegungsdichte des Liganden auf der Oberfläche. Als Mass für die Ligandendichte dient die

maximale Bindungskapazität (R<sub>max</sub>-Wert), welche sich aus folgender Formel berechnet:

$$R_{\max} = \frac{\text{Molekulargewicht des Analyten}}{\text{Molekulargewicht des Liganden}} \times \text{gekoppelter Ligand (in RU)} \times n$$

n = Zahl der Bindungsstellen des Liganden

Der R<sub>max</sub>-Wert gibt an, wieviel RU durch Bindung des Analyten an die vorliegende Zahl von Liganden maximal erreicht werden können. Die optimale maximale Bindungskapazität liegt zwischen 20 und 100 RU. Aufgrund dieser sehr geringen Dichte werden *rebinding*-Effekte minimiert. *Rebinding* bedeutet, dass gerade dissoziierte Analyten nicht durch den Pufferstrom weggespült werden, sondern sofort wieder an einen freien, benachbarten Liganden binden. Dieser unerwünschte Nebeneffekt führt zu veränderten Messwerten bei der Dissoziation. Die gemessene Dissoziation wäre langsamer als die eigentlich für die Interaktion spezifische. Zusätzlich wirkt eine niedrige Ligandendichte Massentransport-Limitationen (siehe 2.2.3.8.) entgegen.

9. Die Basislinie während einer Messreihe muss konstant bleiben, um zu gewährleisten, dass für jede Messung die gleiche Anzahl Bindungspartner vorliegt. Daher darf nach beendeter Interaktion und Regeneration kein Verlust und kein Zuwachs der Basislinie zu verzeichnen sein.

10. Die Messungen sollten bei einer Flussrate durchgeführt werden, bei der keine Massentransporteffekte (siehe 2.2.3.8.) auftreten. Die von Biacore daher empfohlene Flussrate ist 30 µl/min.

11. Die Interaktionsmessungen an einem Biacore 3000 Gerät sollten mit dem Injektionsmodus *Kinject* erfolgen. Dies stellt sicher, dass keine Vermischung zwischen Laufpuffer und Probe stattfindet. Vor der Injektion wird zweimal eine kleine Menge Probe von der Injektionsnadel aufgesogen. Diese Probensegmente sind durch Luftsegmente voneinander getrennt und dienen zum Spülen der Nadel und der Verschlauchung mit Probe (Abb. 2-7).

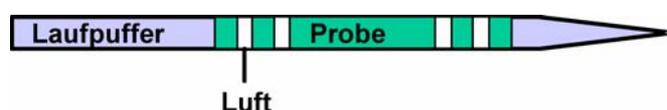
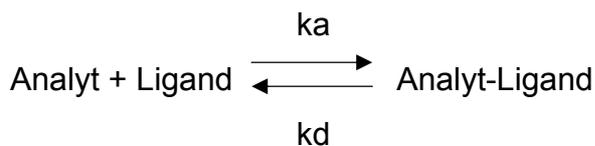


Abbildung 2-7: Probenaufnahme durch die Injektionsnadel im Injektionsmodus *Kinject*. Erklärung siehe Text.

Beim Injektionsmodus *Inject*, der für Injektion von Regenerationslösungen verwendet wird, geht nur ein spülendes Probensegment der eigentlichen Probe voraus. Zusätzlich wird beim *Kinject*-Modus die Probenschleife erst nach Beenden der Dissoziationsphase gewaschen, um Störungen im Sensorgramm zu vermeiden. Das Biacore T100 stellt im manuellen Modus die Befehle "Injizieren von Probe" und "Injizieren von Regenerationslösung" zur Auswahl. Diese Befehle entsprechen den oben genannten Injektionsmodi.

### 2.2.3.2. Informationen in einem Sensorgramm

Mit Hilfe des Biacore Biosensors ist es möglich die Interaktion zwischen einem auf der Oberfläche gebundenen Liganden und einem löslichen Analyten zu messen. Im einfachsten Fall reagieren Analyt und Ligand im Verhältnis 1:1 miteinander und es entsteht dabei der Analyt-Liganden-Komplex.



Die Bindung des Analyten an den Liganden hat eine Massenzunahme auf der Chipoberfläche zur Folge, die als Resonanzsignal messbar wird (siehe auch 2.2.3.). Im Sensorgramm wird das Resonanzsignal gegen die Zeit aufgetragen.

Die Differenz zwischen Basislinie und absolutem Resonanzsignal entspricht der Menge des Analyt-Liganden-Komplexes (AB).

In der Assoziationsphase wird der Analyt mit konstanter Konzentration über die Oberfläche geleitet. Die Änderung der Konzentration von AB ist in dieser Phase abhängig von Bildung aber auch vom Zerfall des Komplexes. Assoziation und Dissoziation finden gleichzeitig statt.

Die Konzentration von AB steigt so lange bis sich das Gleichgewicht der Reaktion eingestellt hat. Im Gleichgewicht ändert sich die Konzentration von AB nicht mehr, die Geschwindigkeit von Komplexbildung und Zerfall sind gleich. Die RU im Sensorgramm steigen nicht weiter an.

In der Dissoziationsphase wird wieder Laufpuffer über die Oberfläche des Chips geleitet, somit steht kein Analyt für die Bindung zur Verfügung. Die Analyt-Liganden-Komplexe dissoziieren und der frei gewordene Analyt wird vom Pufferstrom weggespült. In der Dissoziationsphase spielt daher im Idealfall nur der Zerfall des Komplexes eine Rolle (siehe auch *Rebinding* 2.2.3.1.).

Für die Zerfallsreaktion

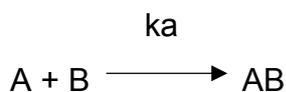


lässt sich die momentane Reaktionsgeschwindigkeit d.h. die Zerfallsgeschwindigkeit mit folgender Gleichung beschreiben:

$$-\Delta[\text{AB}] / \Delta t = k_d [\text{AB}]$$

Das bedeutet, dass die Änderung der Konzentration von AB in einer bestimmten Zeit abhängig ist von der Ausgangskonzentration von AB und der Geschwindigkeitskonstante  $k_d$ . Die Dissoziationsratenkonstante  $k_d$  gibt also die Zerfallsrate von AB pro Zeiteinheit an [ $\text{s}^{-1}$ ].

Betrachtet man im Gegensatz dazu nur die Komplexbildung kann man folgende Gleichung für die momentane Geschwindigkeit formulieren:



$$\Delta[\text{AB}] / \Delta t = k_a [\text{A}] [\text{B}]$$

Die Formation des Komplexes ist also abhängig von der Konzentration des Analyten, der Konzentration des Liganden und der Geschwindigkeitskonstante  $k_a$ . Dabei gibt die Assoziationsratenkonstante  $k_a$  die Bildungsrate von AB pro Zeiteinheit an [ $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]. Hat sich das Reaktionsgleichgewicht eingestellt, verändert sich die Konzentration von AB nicht mehr. Die Geschwindigkeit von Komplexbildung und -zerfall sind gleich.

$$k_a [\text{A}] [\text{B}] = k_d [\text{AB}]$$

Durch umstellen der Gleichung erhält man die Dissoziations- bzw. Assoziations-Gleichgewichtskonstante:

$$K_D = k_d / k_a = [A] [B] / [AB] \quad \text{bzw.} \quad K_A = k_a / k_d = [AB] / [A] [B]$$

Die Dissoziationsgleichgewichtskonstante  $K_D$  gibt das Verhältnis zwischen freien und gebundenen Molekülen im Reaktionsgleichgewicht an.  $K_D$  beschreibt also wieviel Komplex sich bei bestimmten Ausgangskonzentrationen von A + B formiert und gibt damit die Stärke der Bindung an.

Für die verschiedenen Phasen einer Biacore Interaktion gelten also verschiedene Gleichungen für die momentane Geschwindigkeit der Reaktion:

Assoziationsphase: Assoziation und Dissoziation nehmen Einfluss auf die Konzentrationsänderung von AB

$$\Delta[AB] / \Delta t = \underbrace{k_a [A] [B]}_{\text{Bildung}} - \underbrace{k_d [AB]}_{\text{Zerfall}}$$

Im Gleichgewicht: Assoziation und Dissoziation sind gleich. Die Konzentration von AB verändert sich nicht.

$$\Delta[AB] / \Delta t = 0$$

Dissoziationsphase: Nur die Dissoziation beeinflusst die Konzentration von AB.

$$\Delta[AB] / \Delta t = - k_d [AB]$$

Die Gleichungen für die momentane Geschwindigkeit lassen sich in Biacore-spezifische Gleichungen umformen. Dazu werden [A], [B] und [AB] in den Gleichungen ersetzt. [A] entspricht der Analytkonzentration, die bei der Messung eingesetzt wurde. Da während der Assoziationsphase der Analyt in kontinuierlichem

Fluss über die Oberfläche geleitet wird, bleibt die Analytkonzentration während der Messung konstant:  $[A] = \text{konstant} = c_{\text{Analyt}}$

AB stellt den Komplex zwischen Ligand und Analyt dar. Die Differenz zwischen der Basislinie und dem gemessenen Resonanzsignal entspricht der Konzentration von AB:  $[AB] = \text{relative RU}$

$[B]$  ist die Anzahl noch freier Bindungsstellen. Die Konzentration an generell verfügbarem, aktivem Ligand bleibt während der Messung konstant. Sie entspricht dem  $R_{\text{max}}$ -Wert. Durch den aktuellen Wert für  $[AB]$  ist ausserdem bekannt, wieviel Ligand bereits durch Analyt gebunden ist.  $[B]$  kann daher durch  $R_{\text{max}} - \text{RU}$  angegeben werden.

Durch den Einsatz von  $[A] = c_{\text{Analyt}}$ ;  $[B] = R_{\text{max}} - \text{RU}$  und  $[AB] = \text{RU}$  ergeben sich folgende Biacore-spezifische Terme:

$$\begin{aligned} \text{Assoziationsphase: } \Delta[AB] / \Delta t &= k_a [A] [B] - k_d [AB] \\ \Delta \text{RU} / \Delta t &= k_a c_{\text{Analyt}} (R_{\text{max}} - \text{RU}) - k_d \text{RU} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Im Gleichgewicht: } \Delta[AB] / \Delta t &= 0 \\ k_a c_{\text{Analyt}} (R_{\text{max}} - \text{RU}) &= k_d \text{RU} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Dissoziationsphase: } \Delta[AB] / \Delta t &= -k_d [AB] \\ \Delta \text{RU} / \Delta t &= -k_d \text{RU} \end{aligned}$$

Die Gleichungen für die momentane Reaktionsgeschwindigkeit beschreiben die Steigung der Sensorgrammkurve an einem bestimmten Punkt des Sensorgramms, d.h. die Änderung der Konzentration von AB über der Zeit wird durch die Steigung des gemessenen Sensorgramms beschrieben.

Möchte man die Änderung der Konzentration von AB in Abhängigkeit von der Zeit darstellen, benutzt man die Geschwindigkeitsgleichungen. Diese Gleichungen beschreiben den Verlauf des Sensorgramms und sind Grundlage der kinetischen Auswertung von Biacore-Daten (siehe 2.2.3.3.). Sie lassen sich mathematisch (durch Integration) von den Gleichungen für die momentane Reaktionsgeschwindigkeit herleiten.

Die Geschwindigkeitsgleichungen lauten:

Assoziationsphase:  $RU(t) = \frac{ka[A] + kd}{kd} \times R_{max} (1 - e^{-(ka[A] + kd)t})$

Im Gleichgewicht:  $R_{eq} = \frac{ka \times c \times R_{max}}{ka \times c + kd}$   
( $R_{eq} = RU$  im Gleichgewicht)

Dissoziationsphase:  $RU(t) = R_0 e^{-k_{dt}}$   
( $R_0 = RU$  zum Beginn der Dissoziationsphase)

Mit den Geschwindigkeitsgleichungen ist es möglich die Konzentration von AB zu jedem Zeitpunkt zu berechnen, wenn die Ausgangskonzentration des Analyten und des Liganden sowie die Geschwindigkeitskonstanten bekannt sind. Bei der kinetischen Auswertung von gemessenen Interaktionskurven ist die Konzentrationsänderung von [AB] in Abhängigkeit von der Zeit durch den Kurvenverlauf bekannt. Die eingesetzte Konzentration des Analyten ist ebenfalls bekannt. Die Werte  $ka$ ,  $kd$  und  $R_{max}$  dagegen sind zu bestimmen (siehe auch 2.2.3.2. Kinetik).

### 2.2.3.3. Auswertung der Biacore-Daten

In der vorliegenden Arbeit wurden drei Möglichkeiten der Auswertung von Biosensordaten eingesetzt. Je nach experimenteller Fragestellung und Qualität der Daten konnte ermittelt werden, ob Moleküle überhaupt miteinander interagieren (ja/nein-Antwort; Spezifität), wie stark die Interaktion ist (Affinität) bzw. wie die Bindungskinetik der Komplexbildung lautet.

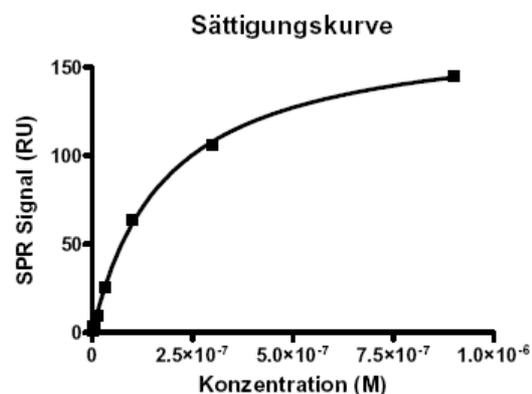
**Spezifität:** Ein Vergleich der Bindungsstärke verschiedener Analyten ist möglich, indem die erreichten RU zu einem bestimmten Zeitpunkt der Assoziation z.B. nach 60 sec bei gleicher Analyt-Konzentration gegenübergestellt werden. Dabei muss darauf geachtet werden, dass diese RU-Werte vom Molekulargewicht des Analyten abhängig sind. Analyten mit höherem Molekulargewicht rufen einen stärkeren RU Anstieg hervor. Daher müssen die RU-Werte für das Molekulargewicht normiert werden. Beim direkten Vergleich zwischen verschiedenen Oberflächen muss

zusätzlich die Anzahl an möglichen Bindungsstellen auf der Oberfläche identisch sein. Das bedeutet, dass  $R_{max}$  gleich sein muss bzw. dass die Werte auch für  $R_{max}$  normiert werden müssen.

Die **Affinität** (latein: *affinitas*: Schwägerschaft) ist definiert als das Mass der Bindungsstärke zwischen Bindungspartnern und setzt sich aus der Summe der anziehenden und abstossenden nicht-kovalenten Bindungskräfte zusammen.

Mit Hilfe des Evaluierungsprogramm von Biacore (BIAevaluation 4.1) war es möglich Affinitätsdaten, das heisst die Gleichgewichtskonstanten einer Interaktion, zu bestimmen. Dazu müssen mindestens 5 verschiedene Analyt-Konzentrationen vermessen werden, die alle das Reaktionsgleichgewicht erreichen sollten. Die Analytkonzentrationen sollten so gewählt werden, dass ein Bereich von 20-80 % der maximalen Sättigung abgedeckt wird.

Um die Gleichgewichtskonstante zu bestimmen, werden mit Hilfe des Evaluationsprogramms die Req-Werte (erreichte RU im Gleichgewicht) bei verschiedenen Konzentrationen gegen die jeweilige Konzentration aufgetragen (Abb. 2-8). Die entstehende Kurve nähert sich dem  $R_{max}$  der Interaktion. Die Konzentration, die 50 %  $R_{max}$  zuzuordnen ist, entspricht dem  $K_D$ -Wert.



**Abbildung 2-8: Graphische Bestimmung des  $K_D$ -Wertes.** Werden die im Gleichgewicht gemessenen Resonanzeinheiten (Req) gegen die eingesetzte Analytkonzentration aufgetragen entsteht eine Sättigungskurve. Bei hoher Analytkonzentration nähert sich die Zahl der Analyt-Liganden-Komplexe an die Gesamtzahl aller Bindungsstellen ( $R_{max}$ ) an. Der  $K_D$ -Wert ist diejenige Konzentration, bei der eine halbmaximale Sättigung der vorhandenen Bindungsstellen eintritt.

Dies lässt sich anhand der momentanen Geschwindigkeit der Reaktion nachvollziehen:

$$\Delta RU / \Delta t = k_a c (R_{\max} - RU) - k_d RU \quad | \text{ im Gleichgewicht} = 0$$

$$\rightarrow 0 = k_a c (R_{\max} - RU) - k_d RU \quad | \text{ wenn } c = K_D$$

$$\rightarrow 0 = k_a K_D (R_{\max} - RU) - k_d RU \quad | \text{ umstellen nach } RU$$

$$R = 1/2 R_{\max}$$

**Kinetik:** Die chemische Reaktionskinetik ist die Lehre vom zeitlichen Ablauf thermodynamisch möglicher Reaktionen. Durch Biacore-Messungen kann die Bindungskinetik, das heißt die Geschwindigkeitskonstanten einer Interaktion bestimmt werden. Dazu muss eine Mindestmenge an Interaktionsdaten vorliegen. Daher wurden für kinetisch auszuwertende Interaktionen mindestens 5 verschiedene Analyt-Konzentrationen gemessen. Davon mussten mindestens 1-2 so hoch sein, dass sie innerhalb der Injektionszeit zur Erreichung des Reaktionsgleichgewichtes führen. Der Konzentrationsbereich wurde möglichst breit gewählt (~0,1-10 facher  $K_D$ -Wert). Zusätzlich wurde eine Analytkonzentration zweimal injiziert, um die Reproduzierbarkeit der Interaktion zu überprüfen.

Mit Hilfe des Evaluierungsprogrammes von Biacore konnten die kinetischen Daten anhand des Langmuir-Modells (1:1 Bindung) bestimmt werden. Durch die gemessenen Interaktionskurven war die Konzentrationsänderung des Analyt-Liganden-Komplexes in Abhängigkeit von der Zeit bei verschiedenen Analytkonzentrationen bekannt (siehe auch 2.2.3.2.). Zu Beginn der Auswertung wurden nun initiale Werte für die unbekanntenen Werte  $k_a$ ,  $k_d$  und  $R_{\max}$  angenommen und daraus eine Evaluationskurve generiert. Durch einen mathematischen Algorithmus (Marquardt-Levenberg Algorithmus) wurde die Summe der Abstände zwischen den gemessenen Original-Kurven und den berechneten Kurven minimiert, dadurch erfolgte eine Annäherung an optimale Werte für  $k_a$ ,  $k_d$  und  $R_{\max}$ .

Die Berechnung des  $K_D$ -Wertes erfolgte über die Gleichung  $K_D = k_d/k_a$ .

#### 2.2.3.4. Messungen mit CM5 Chipoberflächen

Lösungen:

EDC	0,4 M EDC in HPLC-Wasser
NHS	0,1 M NHS in HPLC-Wasser
Boratpuffer	100 mM Natriumborat; pH 8,5
PDEA	1,7 mg PDEA in 100 µl Boratpuffer
Peptidlösung	benötigte Peptidkonzentration in 10 mM NaAcetat pH je nach Kopplung
Cystein/NaCl	6 mg/ml L-Cystein 5 M NaCl 100 mM NaFormiat (HCOONa)

Die Dextranmatrix eines CM5 Sensorchips ist carboxymethyliert. Mittels geeigneter Kopplungschemie können Liganden kovalent an die Carboxylgruppen gekoppelt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden Peptide mit Hilfe der Liganden-Thiolkopplung kovalent mit der CM5 Oberfläche verknüpft.

Durch zwei aufeinanderfolgende Aktivierungsschritte entstehen reaktive Disulfid-Brücken auf der Chipoberfläche, die mit N-terminal am Peptid befindlichen Thiolgruppen interagieren können. Durch den ersten Aktivierungsschritt mit NHS (N-Hydroxysuccinimid) und EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethyl-amino-propyl)-carbodiimid-hydrochlorid) werden die Carboxylgruppen auf der Oberfläche mit einer Maleimidgruppe verestert. In einem zweiten Aktivierungsschritt reagiert diese mit PDEA (2-(2-Pyridinyldithio)ethanamin-hydrochlorid) unter Bildung der reaktiven Disulfid-Brücken. Durch die Vielzahl an vorhandenen Carboxylgruppen ist die

Dextranmatrix auch nach der Aktivierung negativ geladen, solange der pH-Wert der Lösung über dem pK-Wert der Carboxylgruppen liegt. Dies macht man sich für eine effektive Präkonzentrierung des Liganden zu nutze. Es wird ein pH-Wert gewählt, bei dem die Carboxylgruppen negativ und die Peptide positiv vorliegen. Der pH muss also über dem pK-Wert der Carboxylgruppen und unterhalb des isoelektrischen Punkts der Peptide liegen. Die elektrostatischen Wechselwirkungen führen dann zu einer räumlichen Annäherung des Peptids an die Oberfläche und dadurch zu einer verbesserten Kopplungseffizienz. Der optimale pH-Wert muss für jedes Peptid neu ermittelt werden.

Die Injektionsdauer der einzelnen Kopplungsschritte und die Konzentration der Ligandenlösung ist abhängig von der gewünschten Ligandendichte.

Die Deaktivierung von überschüssigen, freien Bindungsstellen erfolgt mit Cystein in einer Lösung mit hoher Ionenstärke, um zusätzlich nicht-gebundenes Material zu entfernen (siehe Abb. 2-9).

Nachfolgend das bisherige Standardprotokoll unserer Arbeitsgruppe für die Liganden-Thiolkopplung, mit dem eine hohe Ligandendichte (circa 1000 RU) erzeugt wurde:

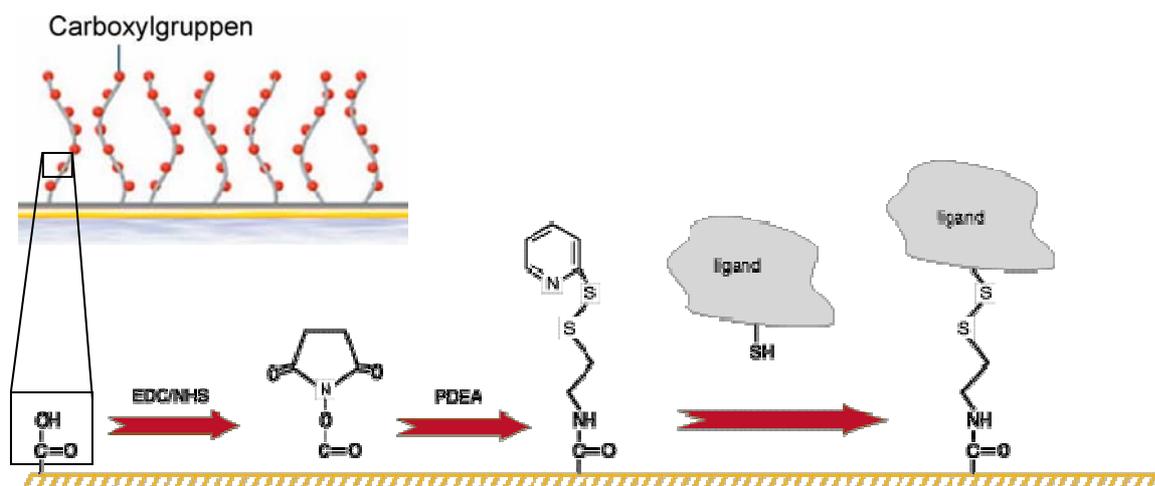
Kopplungsschritt	Injektionszeit in min	Flussrate in $\mu\text{l}/\text{min}$
EDC/NHS 1:1	6	10
PDEA	6	10
Peptid (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in NaAcetat, pH 3,5)	7	5
Cystein	3	20

Um die Ligandendichte auf Werte um 100 RU zu verringern, wurden einige Kopplungsschritte optimiert:

Kopplungsschritt	Injektionszeit in min	Flussrate in $\mu\text{l}/\text{min}$
EDC/NHS 1:1	2	10
PDEA	2	10
Peptid (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in NaAcetat, pH 4,5)	1	5
Cystein	3	20

Alle Kopplungen erfolgten in HBS-EP-Puffer.

In der vorliegenden Arbeit wurden entsprechend präparierte Chip-Oberflächen für die Messung der Interaktion zwischen Peptiden und rekombinanten His-c- $\mu$ -Untereinheiten verwendet. Die Messungen erfolgten in einem für die Interaktion optimierten Puffer (siehe 2.1.9.) bei einer Flussrate von 30  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Der Analyt wurde 1 min lang injiziert und nach einer Dissoziationszeit von 2 min erfolgte die Regeneration mit einer Injektion von 50 mM NaOH bei einer Flussrate von 20  $\mu\text{l}/\text{min}$  für 30 sec.



**Abbildung 2-9: Kopplungschemie der Liganden-Thiolkopplung an einen CM5 Chip.** Die Carboxylgruppen auf der Oberfläche eines CM5 Chips werden durch Injektion von NHS/EDC und PDEA aktiviert. Dann erfolgt die Kopplung eines Liganden mit Sulfhydrylgruppe über eine Disulfidbrücke an die Oberfläche. Weitere Erläuterungen siehe Text.

### 2.2.3.5. Messungen mit L1 Chipoberflächen

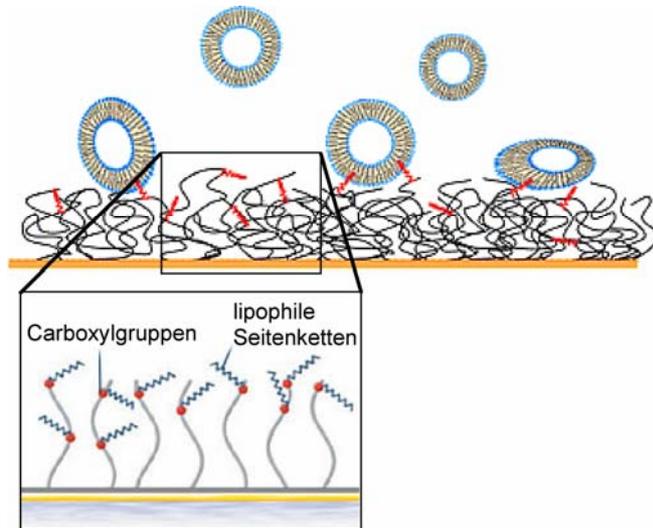
Lösung:

Laufpuffer: 10 mM Tris; pH 8,7  
250 mM NaCl

Der L1-Chip dient zur Immobilisierung von Liposomen an eine SPR-Oberfläche. Die Dextranmatrix des Chips enthält aliphatische Kohlenwasserstoffketten ("lipophile Anker"), an die sich die Liposomen anlagern können.

Zunächst erfolgte die Äquilibrierung des Chips in Laufpuffer. Dann wurde ein Sensorgramm gestartet und die Flusszellen durch zwei Injektionen von 10  $\mu\text{l}$  20 mM CHAPS gewaschen (Flussrate 10  $\mu\text{l}/\text{min}$ ). Die zuvor präparierten Liposomen

(2.2.2.12.) wurden mit Laufpuffer auf eine Endkonzentration von 0,3 mg/ml verdünnt und mit einer Flussrate von 5  $\mu\text{l}/\text{min}$  für 5 min injiziert. Die Kopplung der Liposomen resultierte in einem Anstieg des Messsignals um circa 10.000 RU. Um lose angeheftete Liposomen zu entfernen, wurde die Oberfläche zweimal für 30 sec mit 50 mM NaOH (Flussrate 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ ) gewaschen.



**Abbildung 2-10: Immobilisierung von Liposomen auf einem L1 Sensorchip.** Die Chipoberfläche des L1 Chips ist mit Kohlenwasserstoffketten derivatisiert. Diese dienen als hydrophobe Anker, um Liposomen an der Oberfläche zu immobilisieren.

Die Messung der Interaktionen erfolgte bei einer Flussrate von 30  $\mu\text{l}/\text{min}$  für 1 min in einem für die Interaktion optimierten Puffer (siehe 2.1.9.). Nach einer Dissoziationszeit von 2 min wurde die Oberfläche für 30 sec mit 50 mM NaOH (Flussrate 10  $\mu\text{l}/\text{min}$ ) gewaschen, dann war eine erneute Interaktionsmessung möglich. Nach Beenden der Messreihe wurde die L1 Oberfläche durch zweifache Injektion von 20 mM CHAPS für je 1 min (Flussrate 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ ) vollständig von Liposomen gereinigt werden.

### 2.2.3.6. Messungen mit NTA Chipoberflächen

Lösungen:

Laufpuffer:

10 mM HEPES pH 7,4  
300 mM NaCl  
50  $\mu\text{M}$  EDTA  
0,05 % Surfactant

$\text{Ni}^{2+}$  Lösung:

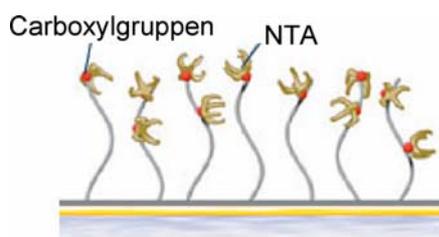
500  $\mu\text{M}$   $\text{NiSO}_4$   
in Laufpuffer

Ligandenlösung:

50-200 nM  $\mu 2$  in Laufpuffer

Analytlösung:	Peptid in der gewünschten Konzentration in Laufpuffer
Regenerationslösung 1:	10 mM HEPES pH 8,3 300 mM NaCl 350 mM EDTA 0,05 % Surfactant
Regenerationslösung 2:	50 mM NaOH

Zur Kopplung von His-modifizierten Proteinen steht eine NTA-Sensorchip-Oberfläche zur Verfügung (Abb. 2-10). In der vorliegenden Arbeit wurde die Interaktion zwischen der His-modifizierten c- $\mu$ 2 Kette (Ligand) und Peptiden (Analyt) auf dieser Oberfläche untersucht. Die Messungen erfolgten an einem Biacore T100.



**Abbildung 2-11: Oberfläche eines mit NTA derivatisierten Sensorchips.** Zur Kopplung von His-modifizierten Proteinen werden Nickel beladene NTA-Chips verwendet. Weitere Erklärungen siehe Text.

Nach der Äquilibrierung des Sensorchip in Laufpuffer wurde die Oberfläche dreimal mit 50 mM NaOH gewaschen (0,25 min; 30  $\mu$ l/min).

Anschliessend folgte ein Zyklus mit verschiedenen Injektionen, der für jede Analytkonzentration erneut durchgeführt wurde. Zunächst musste die Chipoberfläche durch eine Injektion von  $\text{Ni}^{2+}$ -Lösung für 1 min bei 10  $\mu$ l/min mit  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen beladen werden. Dann wurde der Ligand c- $\mu$ 2 für 1 min bei 10  $\mu$ l/min an die Oberfläche gekoppelt und die Analytlösung injiziert (1 min; 30  $\mu$ l/min). Die Dissoziationszeit

des Analyten betrug 10 min bei einer Flussrate von 30  $\mu$ l/min. Danach wurde die Chipoberfläche mit Hilfe von 350 mM EDTA (Regenerationslösung 1) für 3 min bei 30  $\mu$ l/min gewaschen. Zusätzlich erfolgte ein zweiter Regenerationsschritt durch Injektion von NaOH (Regenerationslösung 2; 0,25 min; 30  $\mu$ l/min). Zur Stabilisierung der Basislinie lief das Sensorgramm anschliessend für 20 min bei 30  $\mu$ l/min. Danach konnte ein neuer Kopplungszyklus mit der nächsten zu testenden Analytkonzentration gestartet werden.

### **2.2.3.7. Lagerung benutzter Sensoroberflächen**

Nach abgeschlossener Messung konnte der verwendete Chip aus dem Gerät entnommen und in HPLC-Wasser bei 4°C gelagert werden. Vor der Wiederverwendung wurde die Oberfläche des Chips unter einem Stickstoffstrom getrocknet. Teilweise war nach einer solchen Lagerung die Aktivität und Qualität des Chips jedoch eingeschränkt.

### **2.2.3.8. Test von Massentransport-Effekten**

Ein zu beachtendes, da unerwünschtes Problem bei kinetischen Biacoremessungen sind mögliche Massentransport-Effekte. Die Flussgeschwindigkeit in einer Flusszelle nimmt zum Rand hin ab. Der Transport des Analyten zur Chipoberfläche ist in der Randzone von der Diffusion der Moleküle abhängig. Liegt eine schnelle Assoziation des Analyten an den Liganden vor, kann der Massentransport zur Oberfläche zum limitierenden Faktor für die Bindung werden. Die Assoziation wird nicht mehr von der eigentlich schnelleren Bindungskinetik, sondern nur noch von der Diffusion des Analyten im Randbereich der Flusszelle beeinflusst. Um festzustellen, ob Massetransport-Limitationen vorliegen, wurde die zu testende Interaktion bei drei unterschiedlichen Flussraten (10, 20 und 75  $\mu\text{l}/\text{min}$ ) gemessen. Wenn dabei die initiale Bindungsrate (RU/sec beim Beginn der Interaktion) nicht mehr als 5-10 % ansteigt, können die Effekte des Massetransports vernachlässigt werden. Eine geringe Oberflächendichte ( $\leq 100$  RU) und hohe Flussrate (30  $\mu\text{l}/\text{min}$ ) beugen Massetransport-Limitationen vor, da dadurch ein besserer Transport an der Oberfläche gewährleistet wird.

### **2.2.3.9. *TwoState* Interaktionstest**

Bei der kinetischen Analyse von Interaktionsdaten wurde in der vorliegenden Arbeit eine 1:1 Interaktion angenommen. Bei Abweichungen vom Model war es möglich zu testen, ob während der Interaktion eine Konformationsveränderung stattfindet. Verlangsamt sich die Dissoziation bei längerer Assoziationszeit kann davon ausgegangen werden, dass eine stabilisierende Konformationsveränderung vorliegt.





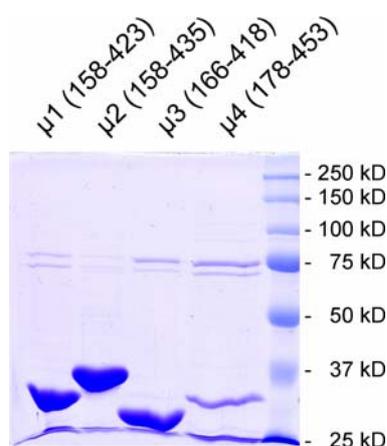
### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Interaktion der heterotetrameren Adaptorprotein-Komplexe 1-4 mit Tyrosin-haltigen Sortierungssignalen

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollte die Affinität zwischen verschiedenen Tyrosin-haltigen Signalen vom Typ YXX $\Phi$  und den vier APs *in vitro* gemessen werden. Dazu wurden die C-terminalen Fragmente der vier  $\mu$ -Untereinheiten (c- $\mu$ ) kloniert, expremiert und gereinigt. Die Interaktionsmessung zwischen den gereinigten c- $\mu$ -Untereinheiten und synthetischen, Sortierungssignal-haltigen Peptiden erfolgte mit Hilfe von Biacore Biosensoren.

##### 3.1.1. Klonierung, bakterielle Expression und Reinigung von c- $\mu$ 1-4

Alle vier APs interagieren über ihre jeweilige  $\mu$ -Untereinheit mit Tyrosin-haltigen Sortierungssignalen vom YXX $\Phi$ -Typ. Da sich die Bindungstasche für die YXX $\Phi$  im C-terminalen Teil der  $\mu$ -Untereinheit befindet und die kompletten  $\mu$ -Untereinheiten nicht als lösliche Proteine expremierbar sind (persönliche Mitteilung von Herrn Dr. David Owen), wurden nur verkürzte  $\mu$ -Untereinheiten kloniert und expremiert. Diese umfassten die gesamte C-terminale Domäne, nicht aber den N-terminalen Anteil und den verbindenden, unstrukturierten Bereich zwischen N-terminaler und C-terminaler Domäne.



**Abbildung 3-1: Coomassie-gefärbtes SDS-Gel der gereinigten c- $\mu$ 1-4 Untereinheiten.** Die Reinigung der  $\mu$ -Ketten erfolgte über den N-terminalen Hexa-His-tag mit Hilfe einer Ni-NTA-Säule und anschliessender Gelfiltration. Auf das dargestellte SDS-Gel wurden je Spur 10  $\mu$ g Protein aufgetragen. Die Proteine haben die erwartete Grösse von etwa 33 kDa für  $\mu$ 1 (158-423) und  $\mu$ 4 (178-453), 35 kDa für  $\mu$ 2 (158-435) sowie 31 kDa für  $\mu$ 3 (166-418). In allen vier Spuren sind zwei zusätzliche Banden bei etwa 75 kDa zu erkennen, die vermutlich eine Verunreinigung durch bakterielle Chaperone darstellen.

Die Klonierung des C-terminalen Teils der  $\mu$ -Untereinheiten (c- $\mu$ 1 (AS 158-423), c- $\mu$ 3 (AS 166-418) und c- $\mu$ 4 (AS 178-453)) erfolgte in den pET28b-Vektor mit N-

terminalem Hexa-His-*tag* (Vektorkarte siehe 2.1.7.4. und 2.1.7.5.). Der entsprechende Teil von  $\mu 2$  (AS 158-435) in pET28a mit N-terminalem Hexa-His-*tag* wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Volker Haucke zur Verfügung gestellt. Die vier  $\mu$ -Ketten wurden, wie in 2.2.2. beschrieben, in *E. coli* expremiert und über den His-*tag* gereinigt. Die Proteinausbeute der Reinigung lag für c- $\mu 1$  bei  $\sim 3$  mg, für c- $\mu 2$  bei  $\sim 6$  mg, für c- $\mu 3$  bei  $\sim 3,5$  mg und für c- $\mu 4$  bei  $\sim 1$  mg pro 500 ml Bakterienkultur. Die Reinheit der Proben wurde mittels SDS-PAGE und anschliessender Coomassie-Färbung überprüft (Abb. 3-1). In allen vier Proteinlösungen wurden bakterielle Verunreinigungen bei etwa 75 kDa detektiert. Im Falle von c- $\mu 4$  betrug der Anteil der Verunreinigung trotz Optimierung der Reinigung fast 50 % (Quantifizierung der SDS-Gel-Banden mit AIDA Image Analyzer, Raytest). Bei c- $\mu 1$ , c- $\mu 2$  und c- $\mu 3$  lag der Anteil hingegen nur bei 5 - 20 %.

Die korrekte Faltung der gereinigten Proteine wurde mit Hilfe der CD-Spektroskopie durch unseren Kooperationspartner Herrn Dr. David Owen untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass die für die  $\mu$ -Untereinheiten erwartete Sekundärstruktur mit ausschliesslich  $\beta$ -Faltblättern tatsächlich vorlag.

### 3.1.2. Verwendete Tyrosin-haltige Sortierungssignale

Für die Bindungsstudien zwischen verschiedenen Tyrosin-haltigen Signalen und den

TGN38	-CKVTRRPKASDY <b>QRL</b>
TGN38m	-CKVTRRPKASDA <b>QRL</b>
LAMP-1	-CRKRSHAGY <b>QTI</b>
LAMP-2A	-CKKHHNTGY <b>EQF</b>
LAMP-2B	-CRRKSYAGY <b>QTL</b>
CD63	-CK*KSIRSGY <b>EVM</b>

**Abbildung 3-2: Sequenzen der verwendeten Peptide mit Tyrosin-haltigem Signal.** Die YXX $\Phi$ -Signale sind fett hervorgehoben. \*Das CD63-Peptid wurde fälschlicherweise mit einem zusätzlichen K synthetisiert.

gereinigten c- $\mu 1-4$  Untereinheiten mit Hilfe eines Biacore Biosensors, wurden synthetische Peptide verwendet, deren Sequenz der cytoplasmatischen Domäne von Transmembranproteinen bzw. einem Teil dieser Domäne entsprach (Abb. 3-2).

Alle Peptide wurden C-terminal mit einem Cystein synthetisiert, um sie über die Thiolgruppe an einen CM5-Senorchip sowie an Lipide koppeln zu können (2.2.3.4. und 2.2.2.11.).

Verwendet wurden der komplette cytoplasmatische Anteil der lysosomalen Membranproteine LAMP-1 (Human), LAMP-2A (Huhn), LAMP-2B (Human) und der c-terminale, cytoplasmatische Teil von

CD63 (Human) (Nomenklatur nach Eskelinen *et al.*, 2005). Das darin enthaltene YXX $\Phi$ -Signal ist für die gesamte intrazelluläre Sortierung der Proteine verantwortlich (siehe Abschnitt 1.5.).

Desweiteren wurde ein Teil der cytoplasmatischen Domäne von TGN38 (Ratte) verwendet. TGN38 ist hauptsächlich im TGN lokalisiert, wird aber ständig zur Plasmamembran und von dort über frühe Endosomen zurück ins TGN transportiert (zusammengefasst in Banting und Ponnambalam, 1997). TGN38 spielt vermutlich bei der Sekretion von Proteinen eine Rolle (Banting und Ponnambalam, 1997; Hilary, *et al.*, 2001; Lee und Banting, 2002; McNamara *et al.*, 2004). Die gesamte cytosolische Domäne enthält 34 AS. Das YXX $\Phi$ -Signal befindet sich nahezu am Ende der Domäne, weiter C-terminal folgen nur noch die Reste NLKL (Luzio *et al.*, 1990; Sequenz siehe Abb. 4-2). Durch *in vitro* Analysen wurde die Interaktion des YXX $\Phi$ -Signals mit  $\mu$ 1,  $\mu$ 2,  $\mu$ 3 und  $\mu$ 4 bereits nachgewiesen (Ohno *et al.*, 1995; Ohno *et al.*, 1996; Stephens *et al.*, 1997; Stephens und Banting, 1998). Das YXX $\Phi$ -Signal ist für die Internalisierung von der Plasmamembran und den effizienten Rücktransport zum TGN verantwortlich (Bos *et al.*, 1993; Wong und Hong, 1993; Humphrey *et al.*, 1993). Als negative Kontrolle für alle Interaktionsmessungen diente das TGN38-Peptid mit mutiertem Tyrosin-Rest (TGN38m; Y zu A). Durch den Austausch des Tyrosins zu einem Alanin ist *in vitro* die Bindung an Adaptoren nicht mehr möglich (Ohno *et al.*, 1996).

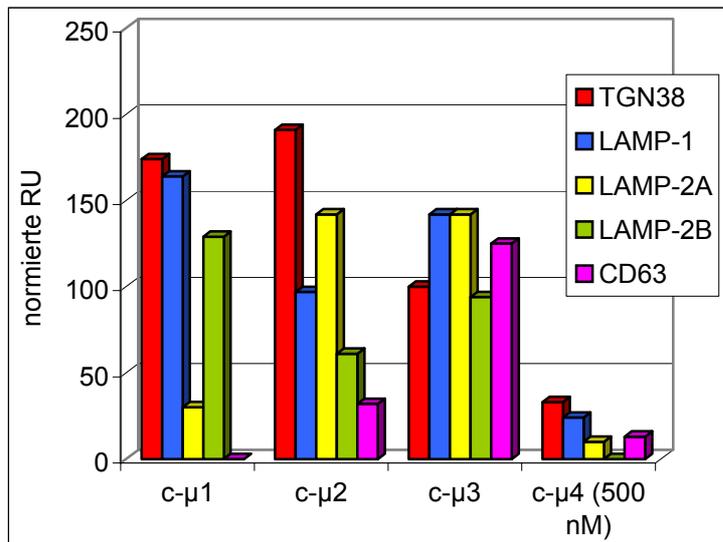
### 3.1.3. *In vitro* Interaktionsmessung mit c- $\mu$ 1-4 als Analyt (Biacore 3000)

Die unter 3.1.2. beschriebenen Tyrosinsignal-haltigen Peptide wurden über das N-terminale Cystein an einen CM5-Chip gekoppelt. Die Kopplung erfolgte nach dem Standardprotokoll unserer Arbeitsgruppe für die Liganden-Thiolkopplung (2.2.3.4.). Die Ligandendichte betrug circa 1000 RU. Die Interaktion mit den gereinigten c- $\mu$ 1-4 Untereinheiten wurde an einem Biacore Biosensor 3000 in HBS-EP-Puffer gemessen (2.2.3.4.). Flusszelle 1 diente als Referenzoberfläche, hier wurde immer TGN38m gekoppelt.

Die gemessenen Bindungskurven entsprachen nicht den erwarteten Kurven für eine 1:1 Interaktion. Eine kinetische Auswertung der Kurven mit dem Biacore Evaluationsprogramm war deshalb nicht möglich. Daher wurde zunächst nur die Signalthöhe der Interaktion bei einer Analytkonzentration von 250 nM ( $\mu$ 4 500nM)

nach 60 sec Assoziationszeit verglichen. Die gemessene Signalhöhe wurde für die Menge an gekoppeltem Liganden und für das Molekulargewicht des Analyten normiert (2.2.3.3.). Dann erfolgte ein Abzug der Signalwerte für TGN38m von allen anderen Werten.

Der normierte RU-Wert für die gemessenen Interaktionen ist in Abb. 3-3 dargestellt.



**Abbildung 3-3: Relative Bindungsstärke der c-μ1-4 Ketten an Tyrosin-haltige Signale.** Die Interaktionen zwischen c-μ1-4 (250 nM; ausser μ4 500 nM) und den gekoppelten Peptiden wurden in HBS-EP-Puffer gemessen. Dargestellt wird die für Ligandendichte und Molekulargewicht des Analyten normierte Signalhöhe nach 60 sec Assoziation nach Abzug der normierten Signalhöhe für TGN38m.

Auffällig war, dass c-μ1 nicht an CD63 und nur sehr schwach an LAMP-2A band und dass c-μ3 mit allen Peptiden in etwa gleich stark interagierte. Im Fall von c-μ4 war bei einer Konzentration von 250 nM keine Bindung an die Signale messbar. Daher wurden 500 nM c-μ4 zur Messung eingesetzt. C-μ4 interagierte sehr schwach mit TGN38, LAMP-1, CD63 und LAMP-2A. Zur Diskussion dieser Ergebnisse im Rahmen bereits publizierter Daten siehe 4.2.2.

Um eine Bestimmung der kinetischen Parameter der Interaktionen zu ermöglichen, erfolgte eine Optimierung der Messbedingungen anhand der Interaktion zwischen c-μ2 und TGN38. Zur Verbesserung der Qualität der Messdaten wurden die Pufferbedingungen optimiert (3.1.3.1.) und die Ligandendichte herabgesetzt (3.1.3.2.).

### 3.1.3.1. Optimierung der Pufferbedingungen

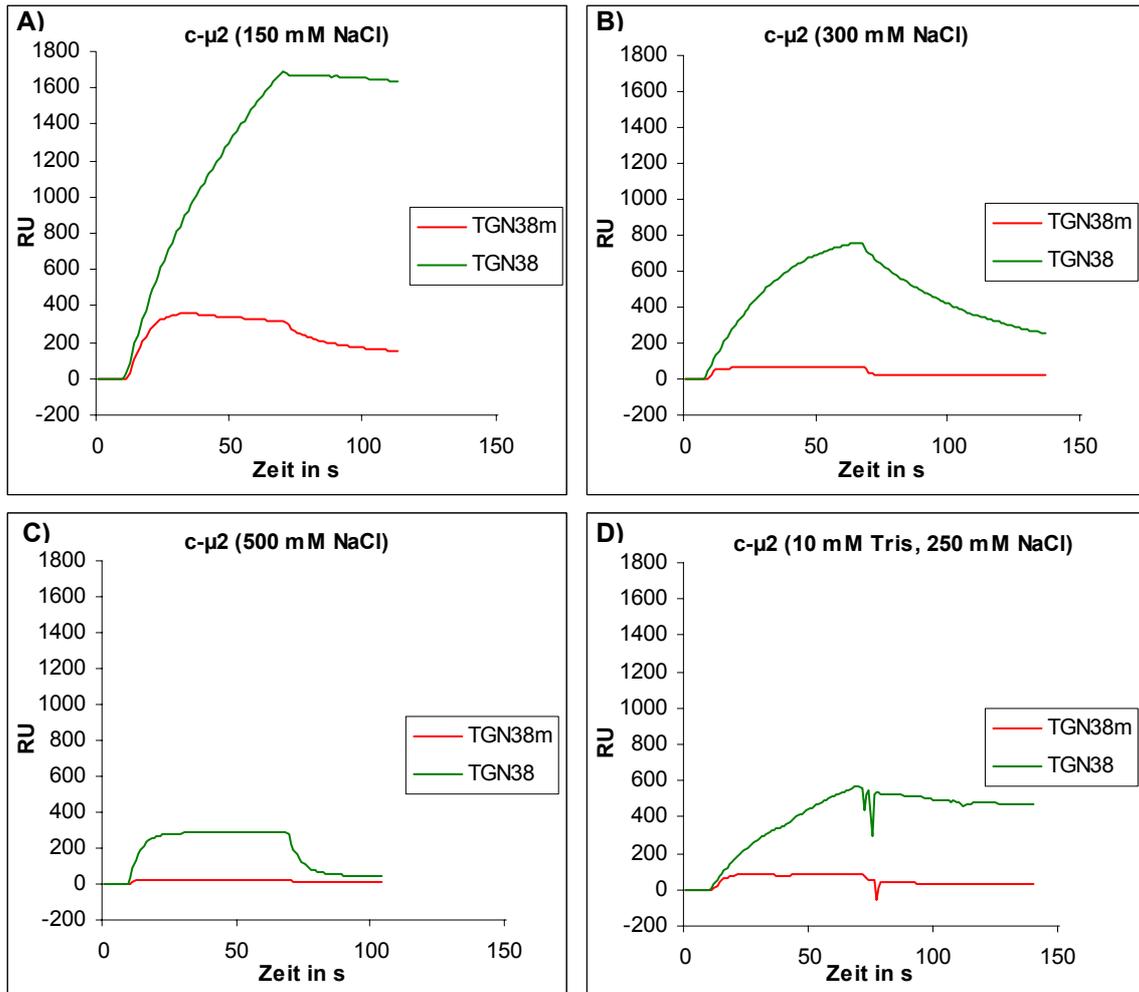
Je nach Art der Bindung zwischen zwei Molekülen können die Pufferbedingungen bei der Messung der Interaktion eine entscheidende Rolle spielen. Eine hohe

Salzkonzentration im Puffer kann z.B. ionische Wechselwirkungen unterdrücken bzw. hydrophobe Wechselwirkungen verstärken. Daher ist es wichtig die optimalen Pufferbedingungen für eine Interaktion zu testen und bei einem Vergleich zwischen verschiedenen Interaktionen die Pufferbedingungen zu beachten.

Für die Interaktion zwischen c- $\mu$ 2 und TGN38 wurden folgende Puffer getestet:

HBS-N-Puffer	10 mM HEPES; pH 7,5 150 mM NaCl
HBS-EP-Puffer	10 mM HEPES; pH 7,5 150 mM NaCl 3 mM EDTA 0,005 % Surfactant
AP1-Puffer	10 mM HEPES; pH 7,4 300 mM NaCl
Core-Puffer	10 mM Tris; pH 8,7 250 mM NaCl
$\mu$ -Puffer	10 mM HEPES; pH 7,4 500 mM NaCl 10 mM 2-Mercaptoethanol

Bei der Verwendung von HBS-N-Puffer (150 mM NaCl) trat eine starke Interaktion mit der Kontrolloberfläche (TGN38m) auf. Diese wurde durch den Zusatz von 0,005 % Surfactant (Tween 20; HBS-EP-Puffer) minimiert, war aber trotzdem noch deutlich messbar (Abb. 3-4 A). Hingegen war die Erhöhung der Salzkonzentration auf 300 mM im AP1-Puffer ausreichend, um die Bindung an die Kontrolloberfläche zu minimieren (Abb. 3-4 B). Eine weitere Erhöhung der Salzkonzentration auf 500 mM ( $\mu$ -Puffer) hatte zur Folge, dass die Interaktion zwischen dem TGN38-Peptid und c- $\mu$ 2 bei der verwendeten Analytkonzentration sehr rasch ins Gleichgewicht kam. Die Bindung von c- $\mu$ 2 an die Kontrolloberfläche war ebenfalls minimal (Abb. 3-4 C). Das für den Puffertest verwendete Interaktionspaar c- $\mu$ 2 und TGN38 weist von allen in 3.1.3. getestet Interaktionen die höchste Affinität auf. Der letztlich verwendete Puffer sollte für alle Interaktionspaare möglichst optimal sein, also auch für niedrig-affine Interaktionen. Die Verwendung des Puffers mit 500 mM NaCl könnte dazu führen, dass eine schwache Bindung an die Tyrosin-haltigen Peptide nicht mehr messbar ist.



**Abbildung 3-4: Optimierung der Pufferbedingungen für die Interaktion zwischen 500 nM  $\mu 2$  (158-435) und dem immobilisiertem TGN38-Peptid.** A) HBS-EP Puffer B) AP1-Puffer C)  $\mu$ -Puffer D) Core-Puffer.

Die Verwendung von Tris als Puffersubstanz (Core-Puffer) hatte Auswirkungen auf Assoziation und Dissoziation, die beide verlangsamt waren. Die unspezifischen Interaktionen mit der Kontrolloberfläche waren jedoch ebenfalls gering (Abb. 3-4 D). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für die weiteren Interaktionsmessungen zwischen  $\mu$ -Ketten und Sortierungssignal-haltigen Peptiden AP1-Puffer verwendet, da nur geringe Wechselwirkungen mit der TGN38m-Oberfläche messbar waren. Zusätzlich wies die Bindung zwischen TGN38 und c- $\mu 2$  in AP1-Puffer eine gute Dissoziation auf, was wiederum für geringe unspezifische Bindungen spricht.

### 3.1.3.2. Optimierung der Ligandendichte

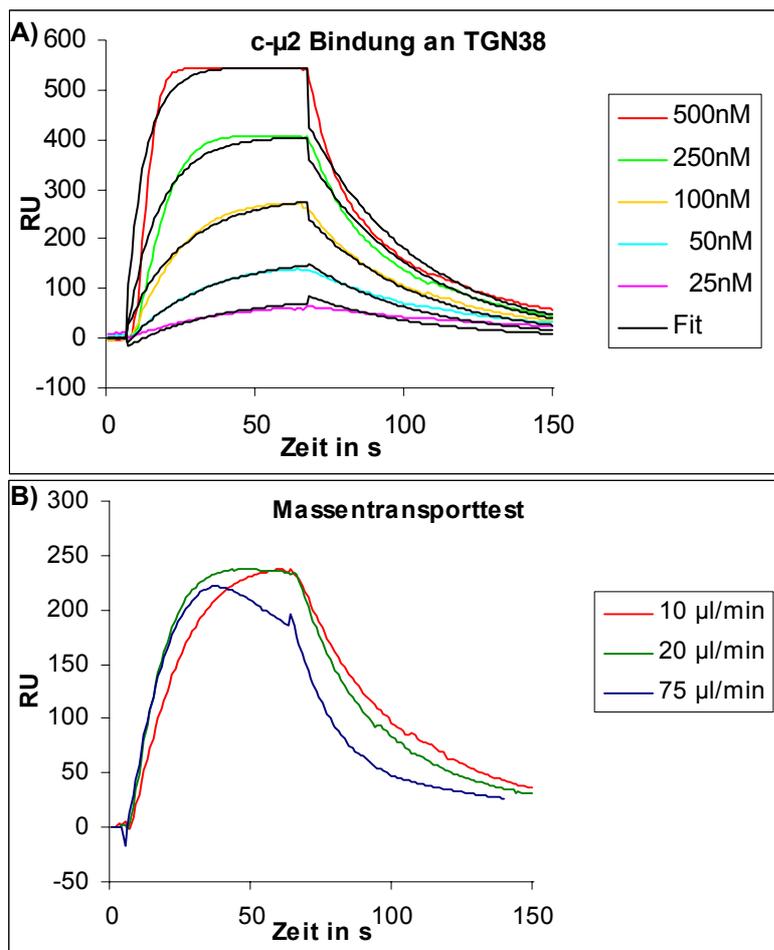
Durch eine zu hohe Ligandendichte treten vermehrt *rebinding*-Effekte und Limitationen des Massentransports auf (siehe auch 2.2.3.1.). Dadurch entsprechen die gemessenen Interaktionsdaten nicht mehr der realen Reaktionskinetik. Die maximale, theoretische Bindungskapazität  $R_{max}$  dient als Maß der Ligandendichte und sollte bei  $\leq 100$  RU liegen (2.2.3.1.). Der  $R_{max}$ -Wert gibt an, wieviele Resonanzeinheiten (RU) durch Bindung des Analyten an die vorliegende Zahl von Liganden theoretisch maximal erreicht werden können und lässt sich nach folgender Formel berechnen:

$$R_{max} = \frac{\text{Molekulargewicht des Analyten}}{\text{Molekulargewicht des Liganden}} \times \text{gekoppelter Ligand (in RU)} \times n$$

Im Fall der Interaktion zwischen c- $\mu$ 2 und TGN38-Peptid ist die Zahl der Bindungsstellen des Liganden ( $n$ ) = 1; das Molekulargewicht des Analyten c- $\mu$ 2 = 35 kDa und das Molekulargewicht des Liganden TGN38 = 1820 Da. Damit wären bei einem angestrebten  $R_{max}$  von 100 RU theoretisch 5 RU gekoppelter Ligand optimal für die Messung.

Um die Ligandendichte zu minimieren wurde das Kopplungsprotokoll der Peptidkopplung optimiert (2.2.3.4.). Die Aktivierung der Sensoroberfläche wurde verkürzt, die Ligandenkonzentration herabgesetzt und der pH-Wert der Ligandenlösung erhöht. Dadurch konnte die Ligandendichte von ursprünglich 1000 RU auf 200 RU verringert werden; der  $R_{max}$ -Wert betrug dem entsprechend nun statt etwa 19000 RU in etwa 4000 RU. Eine weitere Reduzierung der Ligandendichte war nicht möglich, da dann die Reproduzierbarkeit nicht mehr gegeben war. Die Ligandendichte schwankte trotz identischer Kopplungsbedingungen stark. Im Extremfall konnte nach erfolgter Kopplung gar keine Interaktion gemessen werden.

Die, bei der verringerten Ligandendichte von etwa 200 RU, gemessenen Interaktionskurven konnten nun mit Hilfe des Evaluationsprogramms von Biacore ausgewertet werden. Allerdings zeigten sich nach wie vor Abweichungen von einer 1:1 Kinetik (Abb. 3-5 A). Je höher die eingesetzte Analytkonzentration war, desto stärker wurde die Abweichung vom 1:1 Bindungsmodell.



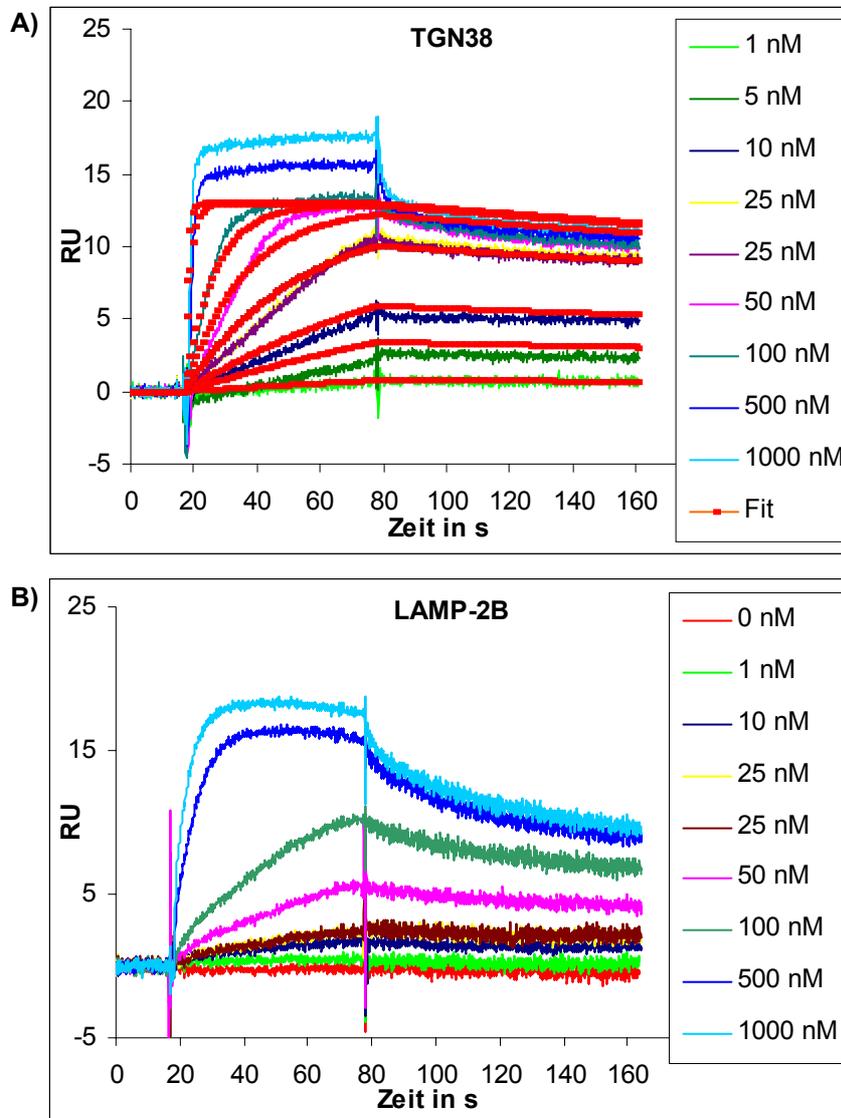
**Abbildung 3-5: c-μ2 Interaktion mit dem TGN38-Peptid nach Optimierung der Ligandendichte.** A) c-μ2 Konzentrationsreihe. Die Messung erfolgte in AP1-Puffer. Von den gemessenen Signalen wurde das Signal der Interaktion mit der Referenzoberfläche (TGN38m) abgezogen. Der Fit erfolgte nach dem 1:1 Langmuir-Modell mit Hilfe des Biacore Evaluationsprogramms Version 4.1. Die gefitteten Kurven sind in schwarz dargestellt. B) Test von Massentransport-Effekten. Die Interaktion von 100 nM c-μ2 mit der TGN38-Oberfläche wurde bei drei verschiedenen Flussraten gemessen (10, 20 und 75 μl/min). Assoziation und Dissoziation sind durch Limitationen des Massentransports beeinflusst.

Um festzustellen, ob die Interaktion trotz verringerter Ligandendichte durch Massentransporteffekte beeinflusst wird und deshalb eine Abweichung vom 1:1 Model auftritt, wurde ein Massentransport-Test durchgeführt. Dazu wurden die initialen Bindungsraten der Interaktion bei drei verschiedenen Flussraten 10, 20 und 75 μl/min gemessen (2.2.3.8.). Wenn sich diese nicht mehr als 5-10 % voneinander unterscheiden, können die Effekte des Massetransports vernachlässigt werden. Die initialen Bindungsraten betragen zwischen 1,4 und 2,8 RU/sec und wichen somit mehr als 10 % voneinander ab. Die Ligandendichte hätte daher weiter reduziert werden müssen. Dies war jedoch aufgrund des oben beschriebenen Verlustes der Reproduzierbarkeit nicht möglich.

Da dieser Versuchsansatz nicht weiter optimierbar war, wurde der Versuchsaufbau umgedreht. C-μ2 sollte an die Sensoroberfläche immobilisiert werden und die Sortierungssignal-haltigen Peptide als Analyt injiziert werden (3.1.4.).

### 3.1.4. *In vitro* Interaktionsmessung mit c- $\mu$ 2 als Ligand (Biacore T100)

In Abwandlung des zuvor verwendeten Versuchsaufbaus wurden c- $\mu$ 2 als Ligand und die Tyrosinsignal-haltigen-Peptide als Analyt eingesetzt.



**Abbildung 3-6: Interaktion zwischen c- $\mu$ 2 als Ligand und Sortierungssignal-haltigen Peptiden.** c- $\mu$ 2 wurde als Ligand auf eine Ni-NTA-Oberfläche gekoppelt. A) TGN38-Konzentrationsreihe. Die nach dem 1:1-Modell gefitteten Kurven sind in rot dargestellt. B) LAMP-2B-Konzentrationsreihe.

Die Immobilisierung von c- $\mu$ 2 erfolgte über den His-*tag* des Proteins an einen Ni-NTA-Chip (2.2.3.6.). Die Interaktion wurde in 10 mM HEPES pH 7,4; 300 mM NaCl; 50  $\mu$ M EDTA; 0,05 % Surfactant am Biacore T100 gemessen. Die Messung erfolgte an diesem Gerät, da zum einen die Empfindlichkeit für kleine Moleküle, also auch kurze Peptide, gegenüber des Biacore 3000 verbessert ist. Zum anderen ist der Prozess der Daten Aufbereitung und Evaluierung mit dem T100 deutlich verbessert. Als Referenzoberfläche diente eine Liganden-freie Oberfläche. Die Ligandendichte betrug in etwa 400 RU. Die Bindung des His-modifizierten c- $\mu$ 2s an die Ni-NTA-Oberfläche war bei dieser Ligandendichte stabil. Der theoretischen Rmax-Wert lag

für die Bindung von Peptiden bei 20 RU. Die gemessenen Signalkurven der Interaktion des TGN38-Peptids mit c- $\mu$ 2 sind in Abb. 3-6 A dargestellt. Obwohl nun optimale  $R_{max}$ -Werte vorlagen, kaum unspezifische Wechselwirkungen mit der Oberfläche zu verzeichnen waren und eine doppelte Referenzierung durchgeführt wurde (2.2.3.1.), wichen die gemessenen Kurven immernoch vom 1:1 Bindungsmodell ab (Abb. 3-6 A). Vor allem bei höheren Konzentration wird dies deutlich. Auch die Interaktionskurven für c- $\mu$ 2 mit anderen YXX $\Phi$ -Signalen z.B. LAMP-2B (Abb. 3-6 B) zeigten keine 1:1 Kinetik. Die beste kinetische Auswertung konnte durch das sogenannte *Two-State*-Bindungsmodell erreicht werden. Dieses Modell simuliert eine Konformationsänderung bei Ausbildung des Analyt-Liganden-Komplexes, die eine Erhöhung der Affinität zur Folge hat. Woher die Abweichungen vom 1:1 Modell stammen und ob eine Konformationsänderung für die Bindung zwischen  $\mu$ -Untereinheiten und YXX $\Phi$ -Signalen eine Rolle spielt, sollte daher näher untersucht werden (3.1.5.).

### 3.1.5. Abweichung der Bindung vom 1:1 Bindungsmodell

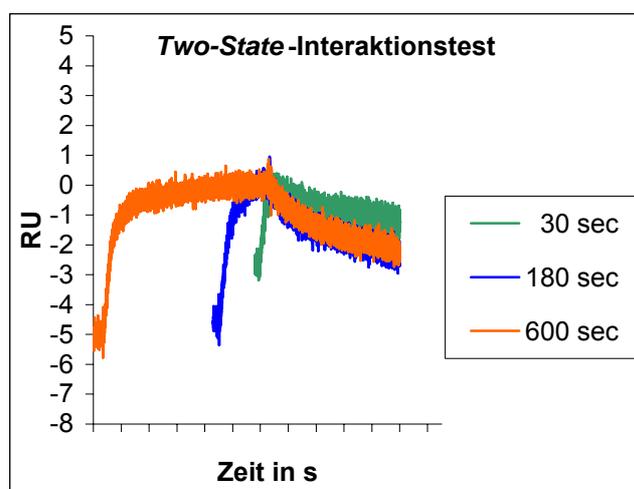
Da trotz verschiedener Optimierungen am Versuchsaufbau (3.1.3. und 3.1.4.) die Interaktion zwischen c- $\mu$ 2 und TGN38 nicht, wie erwartet, dem Modell der 1:1 Bindung folgt, sollte untersucht werden, ob diese Abweichung durch die Interaktion an sich bedingt ist oder ob unspezifische Wechselwirkungen bzw. methodische Probleme zugrunde liegen.

#### 3.1.5.1. Ausschluss einer Konformationsänderung

Wie bereits oben beschrieben (3.1.4.), konnten die Interaktionsdaten zwischen c- $\mu$ 2 als Ligand und TGN38 als Analyt mit dem sogenannten *two-state*-Bindungsmodell am besten ausgewertet werden. Dieses Modell geht davon aus, dass nach erfolgter Bindung die Konformation des Analyt-Liganden-Komplex verändert und dadurch die Dissoziation des Analyten erschwert wird. Bei der kinetischen Auswertung mit Hilfe dieses Evaluations-Modells wird dieser zusätzliche Schritt in die Berechnung mit einbezogen:  $A + B \leftrightarrow AB \leftrightarrow AB^*$

Der Komplex AB wird zu  $AB^*$ , welcher nicht direkt wieder zu  $A+B$  dissoziieren kann, dadurch spielen zwei  $k_a$ - und zwei  $k_d$ -Werte bei der Auswertung eine Rolle. Durch

diese zusätzliche Komplexität besteht die Gefahr, dass das Model sich auch bei Interaktionen ohne Konformationsänderung anwenden lässt (Karlsson und Falt, 1997). Da also allein durch einen guten *Fit* nicht auf eine Konformationsänderung geschlossen werden kann, wurde ein *Two-State*-Interaktionstest durchgeführt (2.2.3.9.). Wenn tatsächlich eine Konformationsänderung der Bindung vorliegt, dann müsste nach einer verlängerten Assoziationsphase eine verlangsamte Dissoziationsrate des Analyten messbar sein, da bereits mehr Analyt-Liganden-Komplexe in der "festeren" Konformation vorliegen.



**Abbildung 3-7: Two-State-Interaktionstest.**

Die Interaktion von 250 nM TGN38-Peptid mit dem über den His-tag gekoppeltem c- $\mu$ 2 wurde mit drei verschiedenen Assoziationszeiten getestet. Anschliessend wurde die Dissoziationsrate bestimmt.

Durch den Two-State-Interaktionstest konnte gezeigt werden, dass keine Konformationsänderung des Analyt-Liganden-Komplexes stattfindet. Nach einer verlängerten Assoziationszeit von 30 sec auf 180 sec sowie auf 600 sec konnte keine veränderte Dissoziation festgestellt werden (Abb. 3-7). Die kinetische Auswertung der Dissoziationsphasen ergab für alle drei Interaktionsmessungen einen  $k_d$ -Wert um  $8 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ .

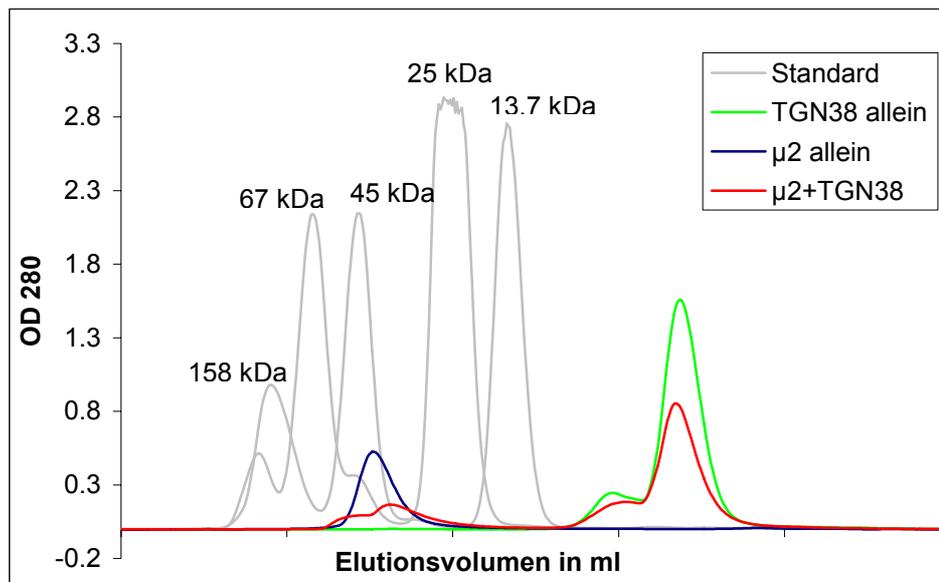
### 3.1.5.2. Ausschluss der Dimerisierung von c- $\mu$ 2 bei Peptidbindung

Die Dimerisierung oder Oligomerisierung von Molekülen beeinflusst die Kinetik von Bindungen und kann daher ebenfalls zu Abweichungen vom erwarteten Bindungsmodell führen (Narayan und Lemmon, 2006). Bei der Strukturaufklärung von c- $\mu$ 2 in Anwesenheit von YXX $\Phi$ -Signalen ist eine Dimerisierung von  $\mu$ 2 beschrieben worden (Owen und Evans, 1998). Unter den Kristallisationsbedingungen formen sich aus zwei c- $\mu$ 2/Peptid-Komplexen Dimere, deren Kontakt zu 17 % durch die beiden

beteiligten Signalpeptide gebildet wird (Owen und Evans, 1998). Die Dimerisierung wird daher wahrscheinlich durch Peptidbindung gefördert.

Ob unter unseren Versuchsbedingungen eine Dimerisierung von c- $\mu$ 2 stattfindet und/oder ob die Peptidbindung an c- $\mu$ 2 eine Dimerisierung fördert, sollte daher mittels analytischer Gelfiltration näher beleuchtet werden.

Die Untersuchung der Bindung zwischen c- $\mu$ 2 und TGN38 mittels analytischer Gelfiltration (2.2.2.8.) wurde unter den gleichen Pufferbedingungen, wie die Biacore-Messungen durchgeführt. Zunächst wurde die verwendete Superdex 75 Gelfiltrationssäule durch die Auftrennung von fünf Standardproteinen mit bekanntem Molekulargewicht kalibriert (Abb. 3-8). Anschliessend wurden c- $\mu$ 2 allein, TGN38-Peptid allein sowie c- $\mu$ 2 in Gegenwart von TGN38-Peptid analysiert. Die Lösungen wurden jeweils vor der Analyse für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Bei c- $\mu$ 2 (45  $\mu$ M in AP1-Puffer) wurde ein proteinhaltiger Peak zwischen den Kalibrierungspeaks von 25 kDa und 45 kDa gemessen. Dieser Peak entsprach also der erwarteten Grösse von monomerem c- $\mu$ 2 von 35 kDa (Abb. 3-8). Die Chromatographie der TGN38-Peptidlösung (4,5 mM in AP1-Puffer) ergab einen Doppelpeak bei sehr geringem Molekulargewicht (Abb. 3-8). Das TGN38-Peptid hat ein Molekulargewicht von 1,8 kDa und eluiert von der Gelfiltrationssäule daher erst kurz vor dem Ende des Gelfiltrationslaufs. Die massenspektrometrische Analyse (Matrix-unterstützter Laserdesorptions-/Ionisations-Massenspektrometrie, Service-labor des Zentrum für Molekulare Medizin Köln) ergab für beide Peaks ein nahezu identisches Massenspektrum, daher ist die Ursache für die Auftrennung in zwei Peaks unklar. Auch die Auftrennung des c- $\mu$ 2-TGN38-Gemisches (45  $\mu$ M  $\mu$ 2 + 4,5 mM TGN38 in AP1-Puffer) ergab zwei TGN38-Peaks. Zusätzlich konnte ein Doppelpeak im Elutionsbereich von c- $\mu$ 2 detektiert werden (Abb. 3-8). Dabei stellt der Peak mit etwas höherem Molekulargewicht vermutlich c- $\mu$ 2 mit gebundenem Peptid und der Peak mit geringerem Molekulargewicht c- $\mu$ 2 ohne gebundenes Peptid dar. In der Grössenordnung von einem c- $\mu$ 2-Dimer (70 kDa) konnte weder bei der Analyse von c- $\mu$ 2 noch beim c- $\mu$ 2-TGN38-Gemisch ein Peak nachgewiesen werden. Unter den getesteten Versuchs- und Pufferbedingungen findet also keine Dimerisierung von c- $\mu$ 2 statt.



**Abbildung 3-8: Analytische Gelfiltration.** Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei Raumtemperatur wurden die Proben c- $\mu$ 2, TGN38-Peptid sowie das c- $\mu$ 2-TGN38-Gemisch durch analytische Gelfiltration unter Verwendung einer Superdex 75 Säule und eines SMART™ FPLC-Chromatographiesystems nach Molekulargewicht aufgetrennt. Ein Proteinpeak in der Grössenordnung eines c- $\mu$ 2-Dimers war nicht nachweisbar.

Da alle eingesetzten Signalpeptide über ein N-terminales Cystein verfügen, ist ausserdem eine Dimerisierung der Peptide durch Disulfidbrückenbildung denkbar. Werden die Peptide als Analyt eingesetzt könnten entweder Peptidmonomere oder Peptiddimere an die  $\mu$ -Untereinheit binden und so eine unterschiedliche Signalzunahme verursachen. Die massen-spektrometrische Analyse von frisch in AP1-Puffer gelöstem TGN38-Peptid konnte allerdings keine Dimerisierung nachweisen. Die massen-spektrometrische Analyse der TGN38-Fractionen nach analytischer Gelfiltration mit und ohne c- $\mu$ 2 ergab ebenfalls keinen Massenpeak bei doppelter TGN38-Masse.

### 3.1.5.3. Heterogenität der Bindung

Die gemessenen Bindungskurven weichen vom 1:1 Bindungsmodell ab. Vor allem bei höheren Konzentrationen wurden Kurven gemessen, die einen "Buckel" aufwiesen (siehe Abb. 3-6). Dies könnte auf eine Heterogenität der Bindung hindeuten. Mehrere Bindungsereignisse scheinen gleichzeitig abzulaufen. Wenn zwei verschiedene Bindungsvorgänge mit unterschiedlicher Affinität stattfinden, ist bei geringeren Analytkonzentrationen zunächst eher die hoch-affine Interaktion messbar. Wird die

eingesetzte Konzentration erhöht, spielt der schwach-affine Bindungsvorgang eine grössere Rolle. Eine solche Heterogenität der Bindung könnte durch die spezifische Interaktion der Bindungspartner bedingt oder unspezifisch sein.

In letzter Zeit wurden Anhaltspunkte für eine physiologische Bedeutung von basischen Resten bei Internalisierungsprozessen publiziert. Diese basischen Sortierungssignale werden für die Internalisierung von verschiedenen multimeren Membranrezeptoren verantwortlich gemacht (Lee *et al.*, 2002; Kastning *et al.*, 2007; Diviani *et al.*, 2003; Fache *et al.*, 2004). AP2 soll über die  $\mu$ 2-Untereinheit mit den basischen Motiven interagieren und die Sortierung der Proteine vermitteln. In der C2B-Domäne von Synaptotagmin ist ebenfalls ein solches aus 8 basischen Resten bestehendes,  $\mu$ 2-bindendes Signal identifiziert worden (Chapman *et al.*, 1998). Der Austausch von nur zwei dieser positiv geladenen Reste in der C2B-Domäne von Synaptotagmin inhibiert *in vitro* die Bindung an  $\mu$ 2 (Haucke *et al.*, 2000).

TGN38	CKVTRRRPKASDYQRL
TGN38m	CKVTRRRPKASDAQRL
LAMP1	CRKRSHAGYQTI
CD63	CK*KSIRSGYEVN
LAMP-2A	CKKHHNTGYEQF
LAMP-2B	CRRKSYAGYQTL
TGN38 kurz	DYQRLN
Synaptotagmin1	CGKRLKKKKTIIKK

**Abbildung 3-9: Basischer Anteil der verwendeten Peptide.** Basische AS sind blau, saure AS rot, die Tyrosin-haltigen Sortierungssignale fett dargestellt.

Da alle in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Peptide über 2-4 positiv geladene Reste proximal des Tyrosin-haltigen Sortierungssignals verfügen (Abb. 3-9), sollte festgestellt werden, ob die positiven Ladungen Einfluss auf das Bindungsgeschehen zwischen den  $\mu$ -Ketten und den Peptiden nehmen.

Dazu wurden Interaktionsmessungen mit einem kurzen TGN38-Peptid (DYQRLN) ohne basischen Anteil durchgeführt. Dieses Peptid wurde bereits für die

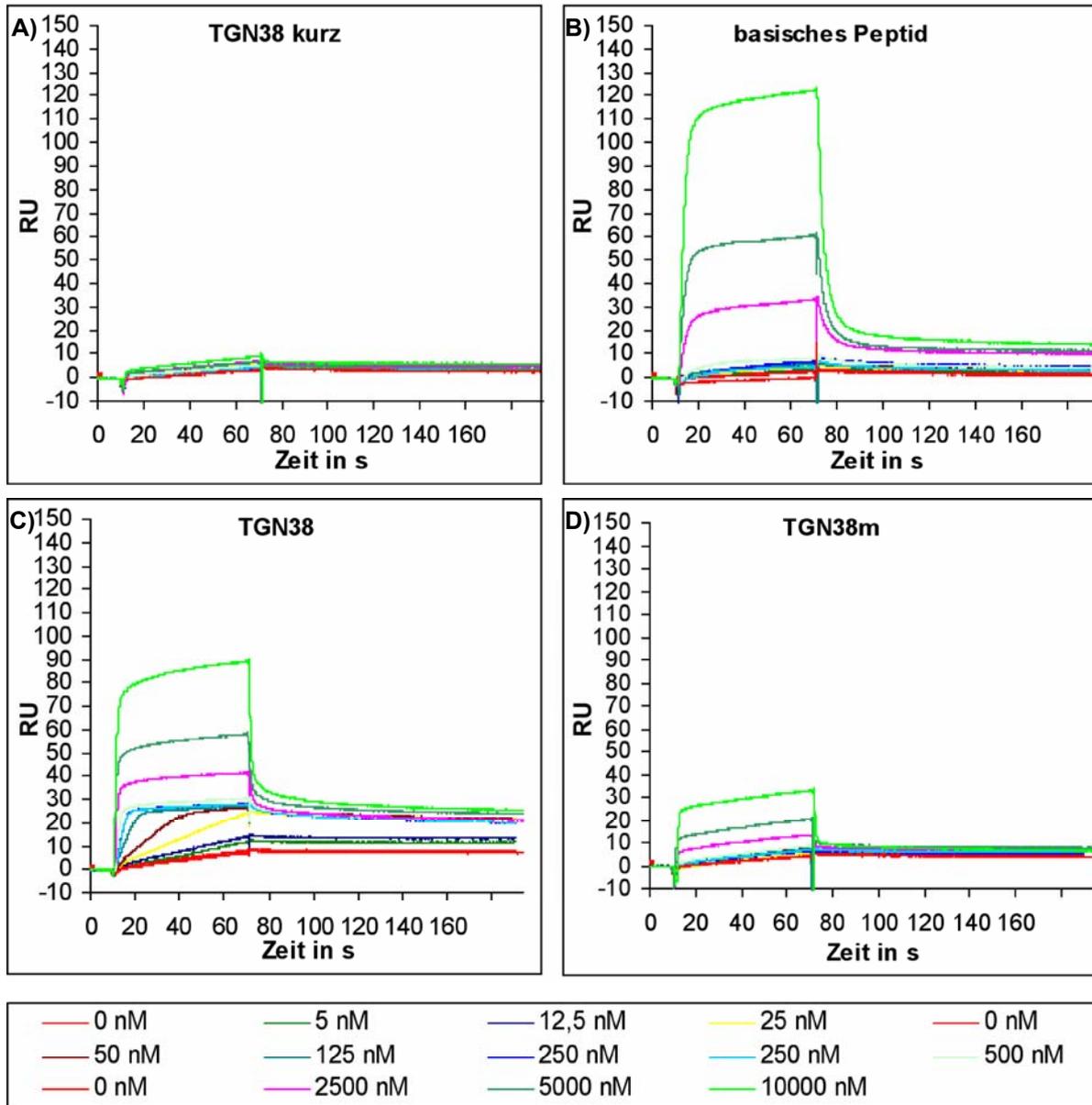
Aufklärung der Kristallstruktur von  $\mu$ 2 verwendet (Owen und Evans, 1998). Zusätzlich wurde auch die Interaktion eines aus der C2B-Domäne von Synaptotagmin stammenden,  $\mu$ 2-bindenden, basischen Peptides mit c- $\mu$ 2 getestet (Abb. 3-9). Als Kontrolle wurden die Interaktionen zwischen c- $\mu$ 2 und TGN38 bzw. TGN38m gemessen. Die Interaktionsmessung erfolgte wie in Abschnitt 3.1.4. Die eingesetzte Peptid-Konzentration lag allerdings etwas höher, zwischen 5 und 10000 nM, um auch schwach-affine Bindungsanteile zu erfassen.

Widererwartend konnte bei der Verwendung des kurzen TGN38-Peptids keine Bindung an c- $\mu$ 2 gemessen werden (Abb. 3-10 A). Dies begründete sich zum einen auf eine zu niedrige Ligandendichte und zum anderen auf eine schwächere Interaktion zwischen dem kurzen TGN38-Peptid und c- $\mu$ 2. Die Versuchsbedingungen, also die Pufferbedingungen, die eingesetzte Konzentration und die Ligandendichte, waren für die Interaktion zwischen c- $\mu$ 2 und dem längeren TGN38-Peptid optimiert worden. Das kurze TGN38-Peptid hat ein Molekulargewicht von nur etwa 800 Da, daraus ergibt sich bei der verwendeten Ligandendichte ein sehr niedriger Rmax-Wert von nur 9 RU für die gemessene Interaktion. Die Erhöhung der Ligandendichte war jedoch nicht problemlos möglich. Wurde mehr c- $\mu$ 2 als Ligand an die Ni-NTA-Oberfläche gekoppelt, war die Immobilisierung nicht mehr stabil. Ein starker Abfall der Basislinie war die Folge. Die unter diesen Bedingungen detektierte Interaktion zwischen dem kurzen TGN38-Peptid und c- $\mu$ 2 war schwach und nicht kinetisch auswertbar. Die schwache Bindungsstärke des kurzen Peptids im Vergleich zum längeren TGN38-Peptid könnte durch die fehlenden basischen Reste im Peptid verursacht worden sein.

Bei der Interaktion zwischen c- $\mu$ 2 und dem langen TGN38-Peptid wurde die Abweichung vom 1:1 Model bei hohen Peptidkonzentrationen am deutlichsten (Abb. 3-10 C). Trotz des mutierten Tyrosins war auch eine Interaktion zwischen c- $\mu$ 2 und dem TGN38m-Peptid messbar, allerdings wiederum nur bei Analytkonzentrationen  $\geq 1000$  nM (Abb. 3-10 D). Diese Interaktion ist demnach schwächer-affin als die Interaktion mit dem TGN38-Peptid und unabhängig vom Tyrosin-Rest. Dies spricht für die Theorie, dass eine heterogene Interaktion vorliegt.

Desweiteren war auch unter unseren Versuchsbedingungen eine Bindung von c- $\mu$ 2 an das basische Signal aus Synaptotagmin nachweisbar, dabei war ebenfalls eine höhere Peptid-Konzentration (über 500 nM) erforderlich (Abb. 3-10 B).

Diese Ergebnisse sprechen für einen Einfluss des basischen Teils der verwendeten Peptide auf das Bindungsgeschehen. Vermutlich sind die basischen Reste Ursache der festgestellten Heterogenität der Bindungskurven. Ob die Interaktion zwischen den  $\mu$ -Ketten und den basischen Resten spezifischer oder unspezifischer Natur ist, bleibt allerdings zu diskutieren (4.1.1.).



**Abbildung 3-10: Anteil der basischen Reste an der Bindung zwischen  $c\text{-}\mu 2$  und TGN38.** A) kurzes TGN38-Peptid B) Synaptotagmin1 C) TGN38-Peptid D) TGN38m-Peptid.

Um die Kinetik der Bindung zwischen verschiedenen  $\mu$ -Ketten und Tyrosin-haltigen Signalen bestmöglich bestimmen zu können, müsste eine weitere Optimierung der Interaktion erfolgen (siehe 4.2.1.5.). Im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit waren die entsprechenden Experimente nicht mehr durchzuführen.

## 3.2. Membran- und Signalbindung von AP2

Ein zweiter Schwerpunkt dieser Arbeit war die Rekonstitution der Bindung von AP2 an die Plasmamembran unter *in vitro* Bedingungen. Die Rekrutierung von AP2 an die Membran, das in Collins *et al.*, 2002 veröffentlichte Model der AP2-Bindung an Tyrosin-haltige Sortierungssignale (siehe 1.6.) und die Bindung von AP2 an Leucin-haltige Signale sollte unter möglichst genau definierten Bedingungen analysiert werden. Dazu wurde ein Biacore-basierter *in vitro* Assay etabliert, der es ermöglichte die Membranbindung von AP2 *in vitro* zu simulieren und zu testen, ob verschiedene Lipid- bzw. Proteinkomponenten mit AP2 interagieren.

### 3.2.1. Biacore-basierter *in vitro* Assay

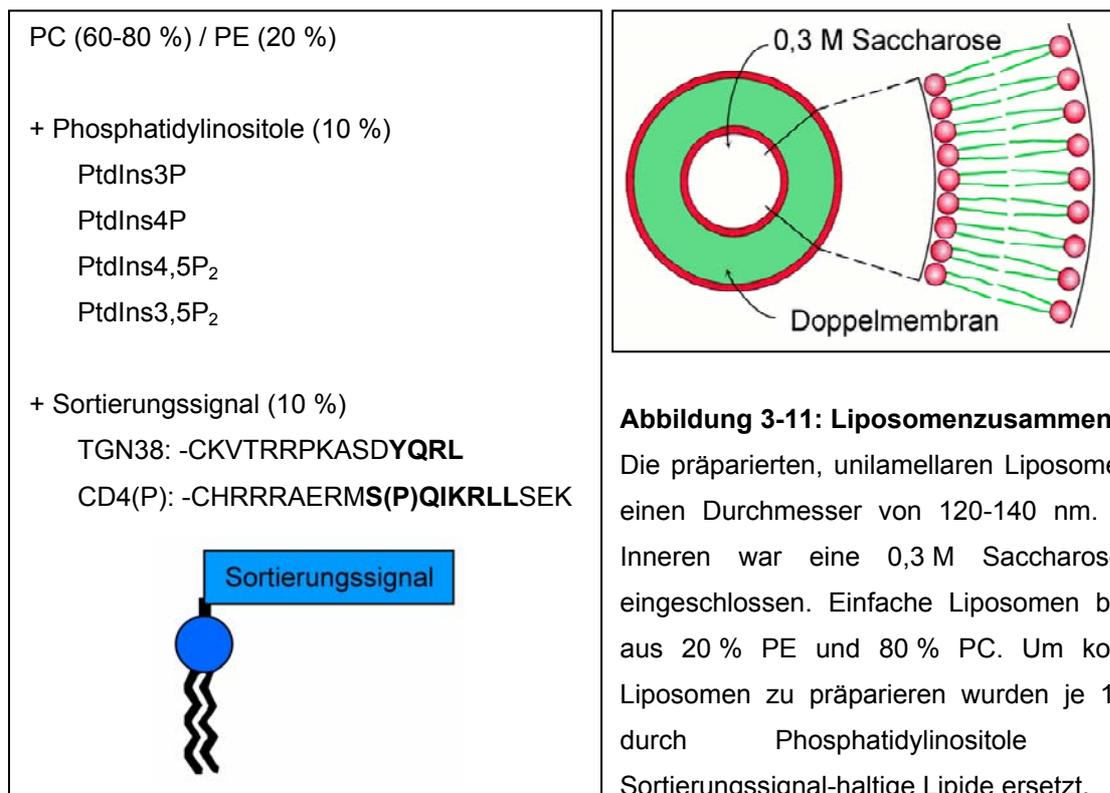
Um die Bindung von AP2 an Lipide und an Sortierungssignale in Membranumgebung messen zu können, wurde ein Biacore-basierter *in vitro* Assay etabliert. Dafür wurden Liposomen mit einer definierten Lipidzusammensetzung und integriertem Sortierungssignal präpariert und auf einem Biacore Biosensorchip immobilisiert. Die Interaktionsmessung zwischen der Liposomenoberfläche und rekombinanten Adaptorkomplexen erfolgte an einem Biacore 3000. Ein Maßstab-gerechtes Model des Assays ist in Abb. 3-13 dargestellt.

#### 3.2.1.1. Präparation und Immobilisierung der Liposomen

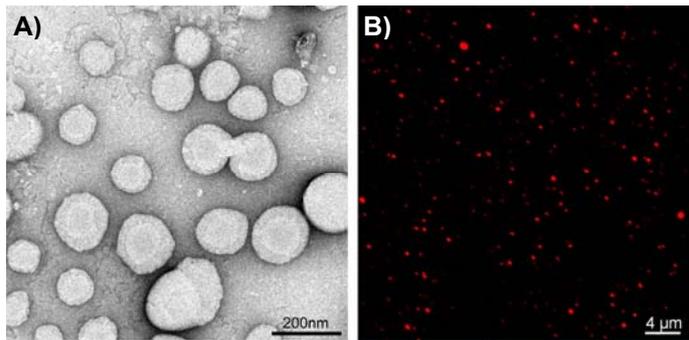
Zunächst war es erforderlich, Liposomen definierter Zusammensetzung zu präparieren (Abb. 3-11). Einfache Liposomen bestanden aus den Phospholipiden Phosphatidylethanolamin (PE; 20 %) und Phosphatidylcholin (PC; 80 %). Diese Lipide haben keine Nettoladung und erzeugen kaum unspezifische Bindungen. Daher wurden einfache Liposomen während den Messungen als Referenzoberfläche verwendet, um einen möglichen Puffersprung und unspezifische Reaktionen mit der Chipoberfläche von der eigentlichen Bindung an die Lipid- bzw. Peptidkomponenten unterscheiden zu können. (siehe auch 2.2.3.1.).

Für die Präparation von komplexeren Liposomen wurden die einfachen PC / PE-Liposomen als Grundlage verwendet, je 10 % PC wurden durch Phosphatidylinositole (PtdIns4P, PtdIns3P, PtdIns4,5P<sub>2</sub> oder PtdIns3,5P<sub>2</sub>) und/oder

Sortierungssignal-haltige Lipide ersetzt (Abb. 3-11). Die Verknüpfung der Sortierungssignale mit den Lipiden erfolgte durch kovalente Kopplung von Sortierungssignal-haltigen, synthetischen Peptiden an ein MPB-Lipid (Abb. 3-11; Abschnitt 2.2.2.11.). Da die Adaptorbindung an Tyrosin-haltige sowie Leucin-haltige Signale gemessen werden sollte, wurden als "Prototypen" dieser Signale die entsprechenden Sequenzabschnitte von TGN38 und CD4(P) verwendet. Für beide war eine Interaktion mit AP2 bereits publiziert (Ohno *et al.*, 1995; Ohno *et al.*, 1996; Stephens *et al.*, 1997; Stephens und Banting, 1998; Pitcher *et al.*, 1999).



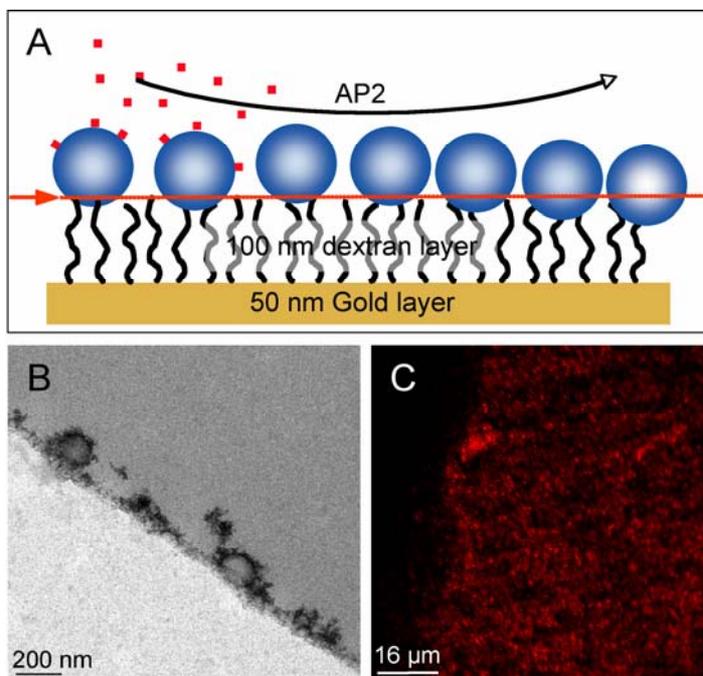
Die verwendeten Liposomen hatten durch das extrudieren mit einer Membran von 100 nm Porengröße einen durchschnittlichen Durchmesser von 120-140 nm und waren unilamellar. Die Integrität und Größe der Liposomen wurde mittels Elektronenmikroskopie überprüft (Abb. 3-12 A; 2.2.2.13.). Zusätzlich konnte durch die Inkorporation von wasserlöslichem Fluorochrom (Sulforhodamin B) in Liposomen (2.2.3.11.) auch mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops nachgewiesen werden, dass die Präparation erfolgreich und die Liposomen intakt waren (Abb. 3-12 B).



**Abbildung 3-12: Überprüfung der Liposomenintegrität und -größe.**

A) Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme von unilamellaren Liposomen B) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Fluorochrom-gefüllten, unilamellaren Liposomen.

Zur Interaktionsmessung mit dem Biacore 3000 mussten die fertigen Liposomen wie in Abschnitt 2.2.3.5. beschrieben auf einem L1 Sensorchip immobilisiert werden (Abb. 3-13).



**Abbildung 3-13: Immobilisierung von intakten Liposomen auf einer L1 Sensorchip Oberfläche.**

A) Maßstabgerechtes Modell des Biacore-basierten *in vitro* Assays. Die Dextranmatrix des L1 Chips ist mit Kohlenwasserstoffketten derivatisiert, mit deren Hilfe Liposomen auf die Oberfläche immobilisiert werden können. Die verschiedenen rekombinanten Adaptorkomplexe wurden zur Bindungsmessung in einem kontinuierlichen Fluss über die Oberfläche geleitet.

B) Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme des Querschnitts einer Chip-Oberfläche mit gekoppelten Liposomen. Nach der Kopplung von Liposomen auf einem L1 Chip wurde dieser aus dem Gerät entnommen, sofort fixiert und in Epon eingebettet (2.2.3.10.). Die Dextranmatrix des Sensorchips konnte während der Präparation nicht erhalten werden, daher sind nur die Teile der Liposomen erkennbar, die sich ausserhalb der Matrix befanden. Liposomenteile die sich oberhalb der roten Linie in A) befinden sind in der elektronenmikroskopischen Abbildung sichtbar. C) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Liposomen auf einem L1 Chip. Fluorochrom-gefüllte Liposomen wurden auf der L1 Oberfläche immobilisiert, der Chip aus dem Gerät entnommen und die Oberfläche sofort mit PBS überschichtet. Einzelne Liposomen und nur wenige grössere fluoreszierende Strukturen sind im mikroskopischen Bild zu erkennen. Die Fluorochromlösung befindet sich noch immer im Inneren der intakten Liposomen.

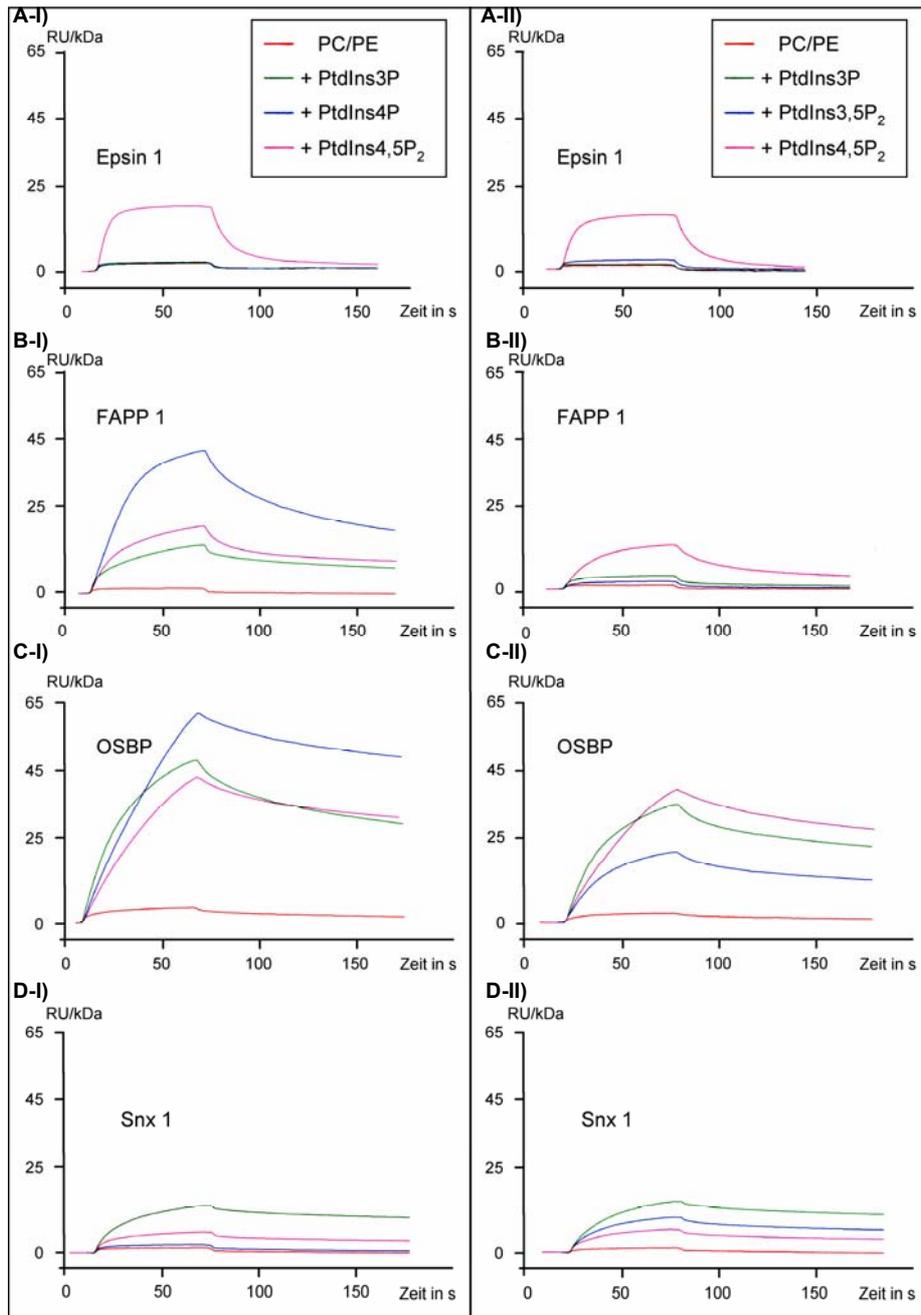
Nach der Immobilisierung der Liposomen auf der L1-Oberfläche wurde eine elektronenmikroskopische sowie eine fluoreszenzmikroskopische Analyse der Oberfläche durchgeführt (2.2.3.10. und 2.2.3.11.). Beide Verfahren zeigten zweifelsfrei die Integrität distinkter Liposomen auf der L1-Oberfläche (Abb. 3-13 B und C). Das von der Firma Biacore beschriebene Verschmelzen zu einer Doppelmembran findet demnach unter unseren Versuchsbedingungen nicht statt.

### **3.2.1.2. Nachweis der Bindungsfähigkeit der in Liposomen integrierten Phosphatidylinositole**

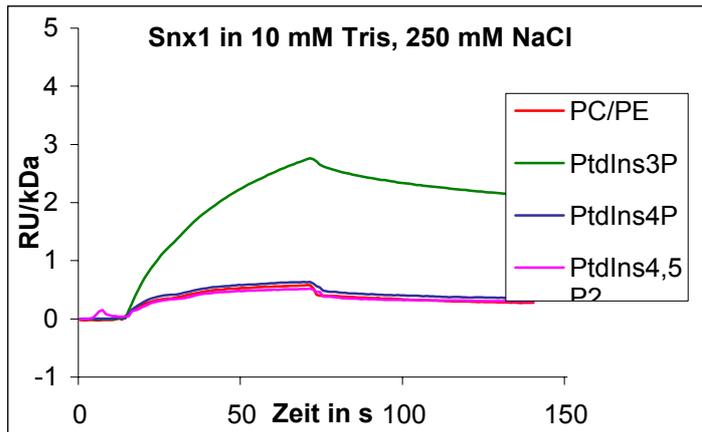
Um nachzuweisen, dass die für den Assay in Liposomen integrierten Phosphatidylinositole intakt und bindungsfähig vorlagen, wurde ihre Interaktion mit bekannten Phosphatidylinositol-bindenden Proteinen getestet.

Wie erwartet band die ENTH-Domäne des an der Endozytose beteiligten Epsin1 nur an PtdIns4,5P<sub>2</sub>-haltige Liposomen, die PH-Domänen der Golgi-lokalisierten Proteine FAPP1 und OSBP banden präferentiell an PtdIns4P, aber auch an andere Phosphatidylinositole, während das endosomale Markerprotein Snx1 am stärksten an PtdIns3P band (Abb. 3-14; zusammengefasst in Roth, 2004; Hurley, 2006). Dabei war die Bindungsstärke an die verschiedenen Phospholipide deutlich abhängig von der verwendeten Pufferzusammensetzung. Vergleicht man zum Beispiel die Interaktion von Snx1 in HBS-N-Puffer (10 mM HEPES pH 7,4; 100 mM NaCl) (Abb. 3-14) mit der in Core-Puffer (10 mM Tris pH 8,7; 250 mM NaCl) (Abb. 3-15), so wird deutlich, dass bei höherer Salzkonzentration die Bindung von Snx1 an PtdIns4,5P<sub>2</sub> unterdrückt wird.

Durch die Messungen konnte die Identität und die Bindungsfähigkeit der verwendeten Phosphatidylinositole bestätigt werden.



**Abbildung 3-14: Phosphatidylinositol-bindende Proteine.** Die Identität und Bindungsfähigkeit, der in den Liposomen befindlichen Phosphatidylinositole wurde durch die Messung der Interaktion mit spezifischen Phosphatidylinositol-bindenden Proteinen überprüft. Alle Messungen erfolgten in 10 mM Hepes pH 7,4; 100 mM NaCl. Die Bindungskurven wurden für das Molekulargewicht des Analyten normiert, um die Vergleichbarkeit der erreichten RU zu gewährleisten. A I+II) Die BAR-Domäne von Epsin1 band ausschliesslich an PtdIns4,5P<sub>2</sub>. Es erfolgte keine Bindung an andere Phosphatidylinositole. B I+II) Die PH-Domäne von FAPP1 band hochaffin an PtdIns4P. Eine schwächere Bindung an PtdIns3P sowie PtdIns4,5P<sub>2</sub> war jedoch auch detektierbar. C I+II) Unter den verwendeten Pufferbedingungen interagierte die PH-Domäne von OSBP am stärksten mit PtdIns4P, aber auch mit allen anderen getesteten Phosphatidylinositolen. D I+II) Snx1 interagierte präferenziell mit PtdIns3P. Eine schwächere Interaktion erfolgte mit PtdIns3,5P<sub>2</sub> und PtdIns4,5P<sub>2</sub> (vergleiche auch mit Abb. 3-15).

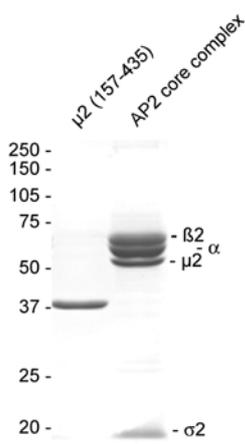


**Abbildung 3-15: Puffer-abhängigkeit der Lipidbindung von Snx1.** Wird die Interaktion von Snx1 mit Phosphatidylinositolen in 10 mM Tris pH 8,7; 250 mM NaCl getestet, ist nur noch eine Bindung an PtdIns3P messbar (siehe auch Abb. 3-14).

### 3.2.1.3. Rekombinante AP2 Komplexe

Während bislang alle Bindungsstudien mit Adaptoren auf mehr oder weniger saubere Proteinpräparationen aus Geweben (Plazenta, Leber, Hirn) angewiesen waren, sollte hier erstmals rekombinantes AP2 zum Einsatz kommen.

Rekombinantes AP2 kann durch den Einsatz von Affinitäts-*Tags* mit viel grösserer Reinheit präpariert werden. Die Präparation ist frei von Verunreinigungen durch andere an der Endozytose beteiligten Proteine und Enzyme (z.B. Kinasen und Phosphatasen), die die Bindungseigenschaften von AP2 modulieren könnten. Desweiteren ist es möglich von AP2 Mutanten zu erzeugen, wodurch die Durchführung von Struktur-Funktions-Analysen ermöglicht wird.



**Abbildung 3-16:** Coomassie-gefärbtes SDS-Gel der gereinigten c- $\mu$ 2-Untereinheit (20  $\mu$ g) und des AP2 Core Komplexes (60  $\mu$ g).

Die Klonierung, Expression und Reinigung der rekombinanten Komplexe aus *E. coli* erfolgte durch unseren Kooperationspartner Herrn Dr. David Owen (Abb. 3-16; Honing *et al.*, 2005).

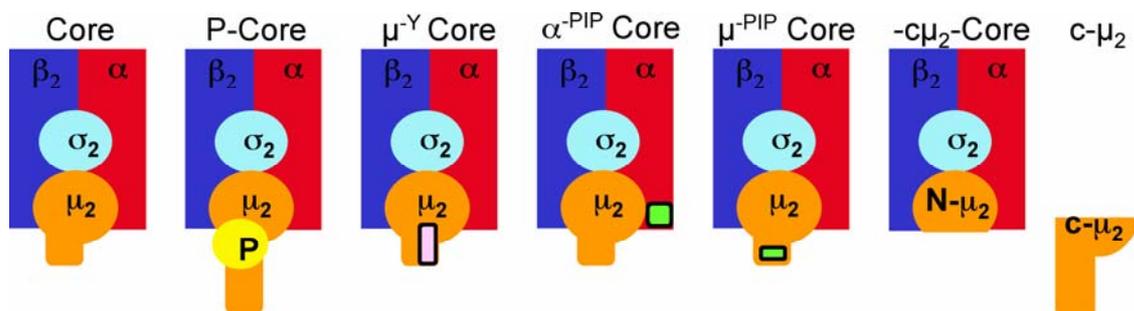
Die beiden grossen Untereinheiten,  $\alpha$  und  $\beta$ 2, waren beim rekombinanten AP2-Komplex um die c-terminale *ear*- und die *hinge*-Region verkürzt. Dies

war erforderlich, da die unstrukturierten *hinge*-Regionen sehr Protease-sensitiv sind und eine Reinigung ohne Verlust der *ear*- und *hinge*-Region nicht möglich ist. Das

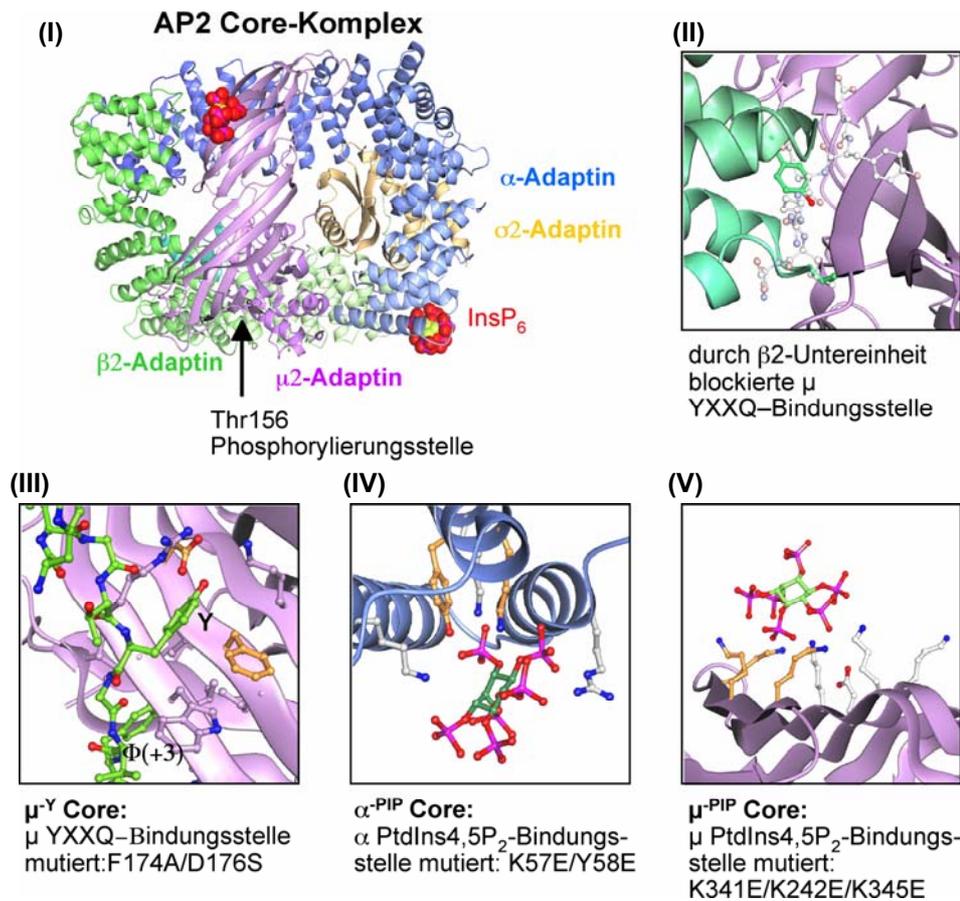
rekombinante AP2 enthielt, neben den Fragmenten von  $\alpha$  und  $\beta_2$ , die komplette  $\mu_2$ - und  $\sigma_2$ -Untereinheit und wird im folgenden als Core bezeichnet (2.1.8.3.).

Durch die Co-Expression der Kinasedomäne von AAK1 war es möglich den Core-Komplex stöchiometrisch am Threoninrest 156 der  $\mu_2$ -Untereinheit zu phosphorylieren. Der phosphorylierte Komplex wird im weiteren als P-Core bezeichnet.

Darüberhinaus wurden Core und P-Core Mutanten erzeugt und gereinigt. Die Komplexe waren in der Phosphatidylinositol-Bindungsstelle der  $\alpha$ -Untereinheit ( $\alpha^{\text{PIP}}$  Core) und/oder der  $\mu_2$ -Untereinheit ( $\mu^{\text{PIP}}$  Core) bzw. in der Bindungsstelle für Tyrosin-haltige Sortierungssignale ( $\mu^{\text{Y}}$  Core) mutiert. Weiterhin wurde ein Core Komplex verwendet, der um den c-terminalen Teil von  $\mu_2$  verkürzt war (-c $\mu_2$ -Core). Eine Übersicht über die Varianten des rekombinanten AP2 Komplexes sind in den nachfolgenden Abbildung zu finden (Abb. 3-17 und Abb. 3-18).



**Abbildung 3-17: Schematische Darstellung der rekombinanten AP2 Komplexe.** Allen rekombinanten AP2 Komplexen fehlen die *Ear*- und *Hinge*-Region der grossen Untereinheiten, sie werden daher als **Core**-Komplexe bezeichnet. Der **P-Core** ist durch die Co-Expression der Kinase Domäne von AAK1 stöchiometrisch am Thr156 der  $\mu$ -Untereinheit phosphoryliert. Durch den Austausch von 2 Aminosäuren in der  $\mu$ -Untereinheit (Phe174Ala; Asp176Ser) wird die Bindungsstelle für Tyrosin-haltige Sortierungssignale zerstört und es entsteht der  $\mu^{\text{Y}}$  **Core**. Der  $\alpha^{\text{PIP}}$  **Core** hat eine defiziente Phosphatidylinositol-Bindungsstelle in der  $\alpha$ -Untereinheit (Lys57Glu; Tyr58Glu), analog ist beim  $\mu^{\text{PIP}}$  **Core** die Phosphatidylinositol-Bindungsstelle in der  $\mu$ -Untereinheit mutiert (Lys341Glu; Lys343Glu; Lys345Glu). Dem **-c $\mu_2$ -Core** fehlt der C-terminale Teil der  $\mu_2$  Untereinheit ( $\mu_2 \Delta 158-435$ ). Zusätzlich wurde die isolierte C-terminale Domäne (AS 158-435) der  $\mu$ -Untereinheit für die Messungen verwendet (**c- $\mu_2$** ).



**Abbildung 3-18: Kristallstruktur der rekombinanten AP2 Komplexe.**  $\alpha$ -Adaptin ist blau,  $\beta 2$ -Adaptin grün,  $\mu 2$ -Adaptin lilafarben und  $\sigma 2$  goldfarben dargestellt. Die Abbildung wurde freundlicherweise von Herrn Dr. David Owen zur Verfügung gestellt. B-I) Das mit dem Komplex kristallisierte D-myoinositol-1,2,3,4,5,6-hexakisphosphat (InsP<sub>6</sub>) ist in rot/gelb dargestellt und dient als Polyphosphatidylinositol-Analogon. Die Phosphorylierungsstelle von AAK1 am Thr156 ist in der Kristallstruktur nicht erkennbar, ihre ungefähre Lage ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. B-II) Die  $\mu 2$ -YXX $\Phi$ -Bindungsstelle wird im Core Komplex durch die  $\beta 2$ -Untereinheit blockiert. Das YXX $\Phi$ -Signal ist an der Stelle, an der es binden soll, in grau dargestellt. B-III-V) Details der mutierten Bindungsstellen. Mutierte Reste im  $\mu^Y$  Core,  $\alpha$ -PIP Core und  $\mu$ -PIP Core sind goldfarben dargestellt, das YXX $\Phi$  Signal grün und InsP<sub>6</sub> grün/lila.

Mit dem Biacore-basierten *in vitro* Assay ist es möglich, die Adaptorbindung an Phospholipide und Sortierungssignale in Membranumgebung zu messen. Durch die Verwendung von Liposomen mit definierter Zusammensetzung und den Einsatz von AP2 Mutanten können Bindungsereignisse voneinander separiert und auf ihren molekularen Ursprung zurückgeführt werden. Damit ist dieser *in vitro* Assay ein wichtiges methodisches Werkzeug, um die Rekrutierung und Signalbindung von AP2 näher zu beleuchten.

### 3.2.2. *In vitro* Analyse der AP2 Membran- und Signalbindung

Die Funktion von AP2 als wichtigster Clathrin-Adaptor bei der Endocytose und die damit verbundene Lokalisation von AP2 an der Plasmamembran ist unstrittig. Welche Faktoren für die Rekrutierung von AP2 verantwortlich sind, ist allerdings immernoch unklar. Dem in der Plasmamembran angereicherten PtdIns4,5P<sub>2</sub> wird im Zusammenspiel mit Sortierungssignalen von Membranproteinen eine Funktion bei der Rekrutierung zugeschrieben. Als weiterer Rekrutierungsfaktor wird das kleine G-Protein ARF6 diskutiert.

Während eine AP2-Bindungsstelle für ARF6 noch nicht identifiziert werden konnte, wurden durch die Aufklärung der Kristallstruktur von AP2 in Anwesenheit von InsP<sub>6</sub> (Polyphosphatidylinositol-Analogon) zwei Phosphatidylinositol-Bindungsstellen, in der  $\alpha$ - sowie in der  $\mu$ 2-Untereinheit, nachgewiesen und charakterisiert (Collins *et al.*, 2002). Allerdings sind die beiden Phosphatidylinositol-Bindungsstellen im kristallisierten AP2-Komplex in verschiedene Richtungen ausgerichtet, wodurch eine gleichzeitige Bindung an eine planare Membran nicht möglich ist (Abb. 3-18). Darüberhinaus stellten Collins *et al.*, 2002 fest, dass im kristallisierten Komplex die Bindungstasche für Tyrosin-haltige Sortierungssignale durch die  $\beta$ -Untereinheit blockiert ist. Die Interaktion von AP2 mit einem Tyrosin-haltigen Signal sowie gleichzeitig mit Phosphatidylinositolen über beide Bindungsstellen in  $\mu$ 2 und  $\alpha$  ist daher laut des von Collins *et al.*, 2002 publizierten Modells erst nach einer Konformationsänderung möglich, die durch die Phosphorylierung von  $\mu$ 2 am Thr156 favorisiert wird (siehe auch 1.6.).

Eine weitere diskutierte Frage ist, ob und wo die Bindung von AP2 an Leucin-haltige Signale von Membranproteinen stattfindet.

Eine Antwort auf die angesprochenen Unklarheiten zur Membran-Rekrutierung und Sortierungssignal-Bindung von AP2 sollte der von uns etablierte *in vitro* Assay liefern.

#### 3.2.2.1. Bindung von AP2 an Tyrosin-haltige Sortierungssignale in Membrenumgebung

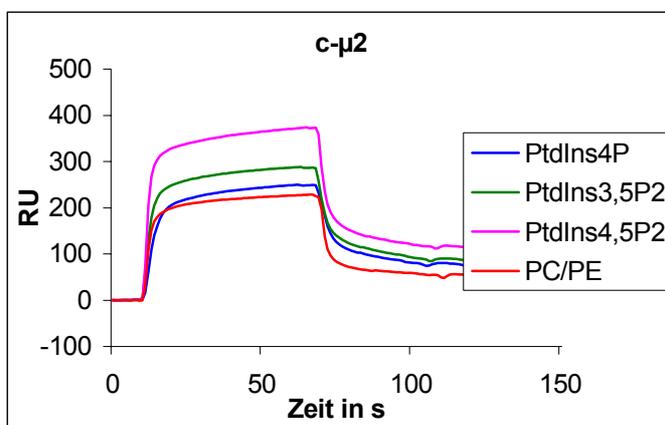
Ausgehend von dem Model, dass die Rekrutierung von AP2 an die Membran durch das Zusammenspiel von Sortierungssignalen und PtdIns4,5P<sub>2</sub> vermittelt wird, sollte die Bindung von AP2 an Tyrosin-haltige Sortierungssignale in Anwesenheit von

Phosphatidylinositolen untersucht werden. Dabei war es Ziel, die Bedeutung der einzelnen Bindungsstellen ( $\mu$ 2-Tyrosinsignal-,  $\mu$ 2-Phosphatidylinositol- und  $\alpha$ -Phosphatidylinositol-Bindungsstelle) und den Einfluss der Phosphorylierung von  $\mu$ 2 für die Rekrutierung und Signalbindung von AP2 näher zu beleuchten.

### 3.2.2.1.1. Bindungseigenschaften der isolierten c- $\mu$ 2-Kette

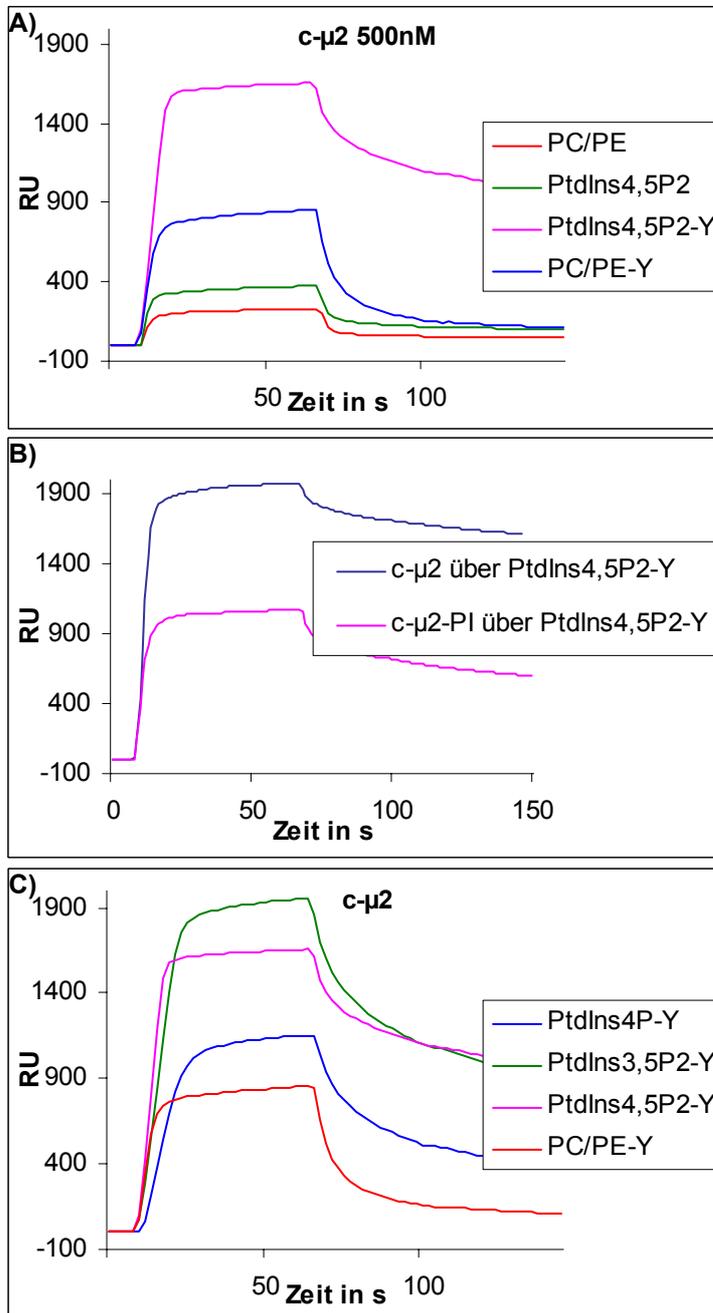
Die  $\mu$ 2-Untereinheit von AP2 ist für die Funktion des Komplexes von wesentlicher Bedeutung. Der hier isoliert verwendete c-terminale Anteil ist bis in die atomare Struktur bekannt (Owen und Evans, 1998) und stellt als einzelnes Protein im Gegensatz zum Gesamtkomplex ein einfaches experimentelles System dar. Daher sind nachfolgend zuerst die Bindungseigenschaften der isolierten c- $\mu$ 2-Kette beschrieben. In c- $\mu$ 2 befindet sich die Bindungstasche für Tyrosin-haltige Sortierungssignale und eine Phosphatidylinositol-Bindungsstelle.

Zunächst wurde die Bindung von c- $\mu$ 2 an Phosphatidylinositol-haltige Liposomen getestet (Abb. 3-19). Die stärkste Interaktion konnte dabei mit PtdIns4,5P<sub>2</sub> gemessen werden, während die Bindung an das zweite getestete Phosphatidylinositol-Diphosphat, PtdIns3,5P<sub>2</sub>, deutlich schwächer war. Die Bindung an Phosphatidylinositol-Monophosphate war nur wenig stärker als die unspezifische Interaktion mit der PC/PE-Kontrollmembran. Da die Bindung von c- $\mu$ 2 an Phosphatidylinositole aufgrund von elektrostatischen Wechselwirkungen durch 5 Lysin-Reste vermittelt wird (Collins *et al.*, 2002), ist erklärbar, dass c- $\mu$ 2 an verschiedene, vor allem aber an zweifach negativ geladene Phosphatidylinositole bindet.



**Abbildung 3-19: Bindung von c- $\mu$ 2 an Phosphatidylinositole.** Die isolierte c- $\mu$ 2 Kette bindet mit höchster Affinität an PtdIns4,5P<sub>2</sub>. Eine schwächere Bindung an PtdIns3,5P<sub>2</sub> und PtdIns4P ist ebenfalls messbar.

Die anschliessenden Messungen betrafen die Bindung von c- $\mu$ 2 an Sortierungssignal-haltige Liposomen unter der Berücksichtigung der Rolle von Phosphatidylinositolen.



**Abbildung 3-20: Die c- $\mu$ 2 Bindung an Tyrosin-haltige Signale wird durch die Anwesenheit von Phosphatidylinositolen stabilisiert.** A) C- $\mu$ 2 interagiert spezifisch mit PCPE-Y. Die Bindung wird durch die Anwesenheit von PtdIns4,5P<sub>2</sub> stabilisiert. B) Die Mutation der PI-Bindungsstelle in c- $\mu$ 2 führt zu einer deutlich schlechteren Bindung an PtdIns4,5P<sub>2</sub>-Y. C) Alle getesteten Phosphatidylinositole verstärken die Bindung von c- $\mu$ 2 an das Tyrosin-haltige Signal.

Dabei konnte, wie erwartet, eine starke Bindung von c- $\mu$ 2 an das Tyrosin-haltige Signal von TGN38 in PC/PE-Liposomen gemessen werden (Abb. 3-20 A). Wurde das Signal zusammen mit dem in der Plasmamembran angereicherten PtdIns4,5P<sub>2</sub> präsentiert, war eine stärkere Interaktion messbar. Vor allem die Dissoziation von c- $\mu$ 2 wurde durch die zusätzliche Anwesenheit von Phosphatidylinositolen langsamer (Abb. 3-20 A). Diese Beobachtung wurde durch den Einsatz einer c- $\mu$ 2 Mutante mit

defekter Phosphatidylinositol-Bindungsstelle ( $c\text{-}\mu 2^{\text{-PI}}$ ) bestätigt. Die Bindung der Mutante an  $\text{PtdIns}4,5\text{P}_2\text{-Y}$  entsprach in etwa der Interaktion von  $c\text{-}\mu 2$  mit dem Tyrosinsignal-haltigen Peptid alleine (Abb. 3-20 B). Die Bindung von  $c\text{-}\mu 2$  an Tyrosin-haltige Signale wird also durch die Anwesenheit von  $\text{PtdIns}4,5\text{P}_2$  unterstützt. Die Anwesenheit von anderen Phosphatidylinositolen stabilisiert ebenfalls die Bindung von isoliertem  $c\text{-}\mu 2$  an Tyrosin-haltige Signale, wie in Abb. 3-20 C gezeigt. Vor allem Phosphatidylinositol-Diphosphate ( $\text{PtdIns}4,5\text{P}_2$  und  $\text{PtdIns}3,5\text{P}_2$ ), aber auch Phosphatidylinositol-Monophosphate verstärken die Bindung von  $c\text{-}\mu 2$  an Tyrosin-haltige Signale. Demnach zeigen diese Experimente, dass die Interaktion mit Phosphatidylinositolen sich stabilisierend auf die Bindung von  $c\text{-}\mu 2$  an Tyrosin-haltige Signale auswirkt,  $\mu 2$  aber keine ausgeprägte Selektivität für ein spezifisches Phosphatidylinositol besitzt.

#### **3.2.2.1.2. Interaktion des AP2 Core Komplexes mit Tyrosin-haltigen Sortierungssignalen in Membrenumgebung**

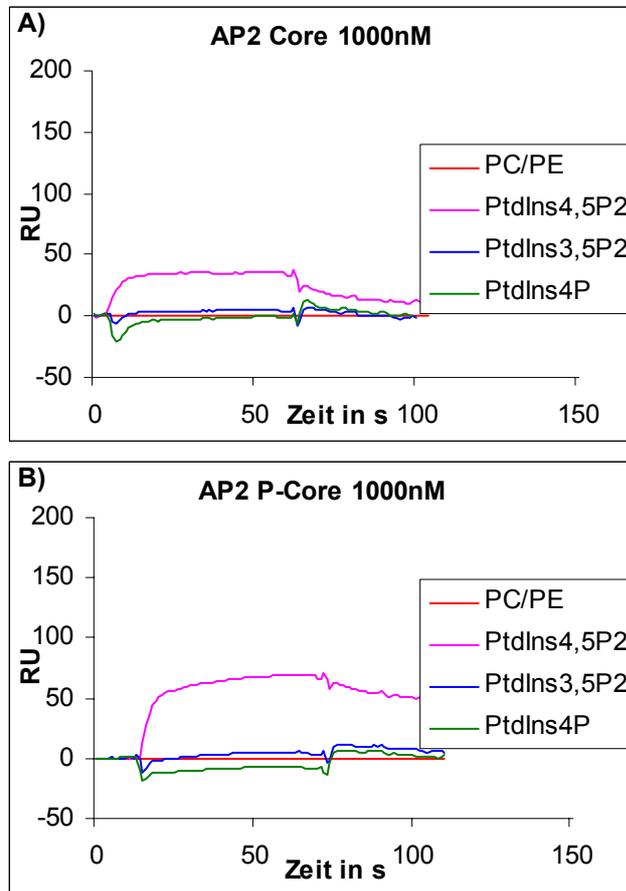
Durch die bisher beschriebenen Untersuchungen konnten wir zeigen, dass die isolierte  $c\text{-}\mu 2$ -Kette hoch-affin mit einem Tyrosin-haltigen Signal in Phosphatidylinositol-Umgebung interagiert. Im folgenden sollte nun die Interaktion des gesamten AP2-Komplexes mit Phosphatidylinositolen und Tyrosin-haltigen Signalen näher beleuchtet werden. Dabei ist zu beachten, dass  $c\text{-}\mu 2$  ein Molekulargewicht von 35 kDa hat, der AP2-Core Komplex hingegen von 200 kDa. Dieser Größenunterschied hat Auswirkungen auf die Bindungsmessung. Durch die Interaktion eines AP2-Core-Komplexes mit der Oberfläche wird mehr Raum eingenommen, als durch die wesentlich kleinere  $c\text{-}\mu 2$ -Kette. Dadurch können andere Bindungsstellen blockiert werden, so dass weniger AP2 an die Liposomenoberfläche binden kann als theoretisch möglich. Zusätzlich zum Größenunterschied hat ein an AP2 gebundenes  $\mu 2$  weniger Freiheitsgrade als eine isolierte  $c\text{-}\mu 2$ -Kette, was zu Veränderungen der Bindungseigenschaften führen kann. Ein direkter Vergleich der Bindungsstärke von  $c\text{-}\mu 2$  und des AP2-Komplexes ist deshalb unzulässig. Aus diesem Grund sind die dargestellten Abbildungen auch nicht für das Molekulargewicht des jeweiligen Analyten normiert worden und daher keinesfalls direkt vergleichbar.

Um die Interaktion des phosphorylierten und nicht-phosphorylierten AP2 Komplexes mit Phosphatidylinositolen und Tyrosin-haltigen Signalen zu verstehen, muss man sich verdeutlichen, welche Interaktionen an einem Bindungsereignis beteiligt sein können. Im AP2-Komplex befindet sich in der  $\alpha$ -Untereinheit eine Phosphatidylinositol-Bindungsstelle. Zusätzlich befinden sich in der  $\mu$ 2-Untereinheit die Bindungstasche für das Tyrosin-haltige Signal und eine zweite Phosphatidylinositol-Bindungsstelle (siehe auch Abb. 3-18). Ausserdem muss berücksichtigt werden, dass die  $\mu$ 2 Untereinheit mit der  $\beta$ 2-Untereinheit interagieren kann (Collins *et al.*, 2002) und dass unter diesem Umstand die  $\mu$ 2-Bindungsstelle für Tyrosin-haltige Signale blockiert ist. Im phosphorylierten Komplex (P-Core) wird vermutlich (laut des Modells) die Loslösung der  $\mu$ 2-Kette von  $\beta$ 2 durch die Phosphorylierung begünstigt und dadurch eine Bindung von  $\mu$ 2 an Tyrosin-haltige Signale und Phosphatidylinositole favorisiert. Bei einer Interaktion von AP2 mit einer Membran, die Phosphatidylinositole und Tyrosin-haltige Signale enthält, haben alle beschriebenen Wechselwirkungen Einfluss auf die Bindungsstärke an die Membran. Im folgenden soll durch den Einsatz von verschiedenen zusammengesetzten Liposomen, von phosphoryliertem und nicht-phosphoryliertem Core sowie von AP2 Mutanten versucht werden, die Bedeutung der Teil-Interaktionen besser zu verstehen.

#### *Bindung von AP2 an Phosphatidylinositole*

Wie im Falle von c- $\mu$ 2 wurde zunächst die Bindung des AP2-Cores an Phosphatidylinositole untersucht. Dabei konnten wir feststellen, dass AP2 spezifisch an PtdIns4,5P<sub>2</sub> und nicht an die anderen getesteten Phosphatidylinositole bindet (Abb. 3-21 A). Allerdings ist diese Bindung im Vergleich zu Proteinen mit spezialisierten Phosphatidylinositol-bindenden Domänen, wie z.B. der PtdIns4,5P<sub>2</sub>-bindenden ENTH-Domäne von Epsin, sehr schwach (siehe Abb. 3-14). Bei einem direkten Vergleich der Abb. 3-14 und 3-21 ist zu beachten, dass nur die in Abb. 3-14 dargestellten Interaktionen für das Molekulargewicht des Analyten optimiert worden sind. Die Bindung des AP2-Cores an PtdIns4,5P<sub>2</sub> ist daher in Abb. 3-21 im Vergleich zur Abb. 3-14 stark überrepräsentiert.

Die Bindung von AP2-Core an weitere Phosphatidylinositole war nicht nachweisbar, weder an Phosphatidylinositol-Monophosphate noch an das getestete Phosphatidylinositol-Diphosphat PtdIns3,5P<sub>2</sub> (Abb. 3-21 A).



**Abbildung 3-21: AP2 bindet spezifisch an PtdIns4,5P<sub>2</sub>.** Bindung von AP2 Core und P-Core an die Phosphatidylinositole PtdIns4P, PtdIns3,5P<sub>2</sub> und PtdIns4,5P<sub>2</sub>. A) Der Core Komplex bindet schwach-affin, aber spezifisch an PtdIns4,5P<sub>2</sub>. B) Der am Thr156 in  $\mu$ 2 phosphorylierte P-Core bindet mit höherer Affinität an PtdIns4,5P<sub>2</sub> als der nicht-phosphorylierte Core.

Auch für den an  $\mu$ 2 phosphorylierten P-Core war nur eine Bindung an PtdIns4,5P<sub>2</sub> detektierbar (Abb. 3-21 B), allerdings war diese Interaktion stärker als die Bindung von Core. Dies spricht für eine Phosphorylierungs-favorisierte Konformationsänderung: In der nicht-phosphorylierten, "geschlossenen" Konformation stehen die Phosphatidylinositol-Bindungsstellen rechtwinklig zueinander, so dass eine Membranbindung über beide Untereinheiten gleichzeitig auszuschliessen ist (Abb. 3-18). Durch die Phosphorylierung am Thr156 in der flexiblen Region von  $\mu$ 2 wird die Loslösung des c-terminalen  $\mu$ 2-Anteils vom Komplex favorisiert. Dies erlaubt eine Umorientierung von  $\mu$ 2 und damit eine Interaktion von P-Core mit PtdIns4,5P<sub>2</sub> über beide Phosphatidylinositol-Bindungsstellen. Diese gleichzeitige PtdIns4,5P<sub>2</sub>-Bindung über die  $\alpha$ - und die  $\mu$ -Phosphatidylinositol-Bindungsstelle verursacht die stärkere Interaktion mit PtdIns4,5P<sub>2</sub>. In der nicht-phosphorylierten, "geschlossenen" Form kann AP2 nur über eine der beiden

Phosphatidylinositol-Bindungsstellen an PtdIns4,5P<sub>2</sub> binden, da die in  $\mu$ 2-Kette durch die  $\mu$ 2- $\beta$ 2-Wechselwirkung in einer orthogonalen Position zur  $\alpha$ -Bindungsstelle gehalten wird.

Unterstützt wurde diese Interpretation durch Untersuchungen mit AP2 Komplexen, die in der  $\mu$ -Phosphatidylinositol-Bindungsstelle mutiert waren ( $\mu$ <sup>-PIP</sup>). Bei der Interaktion von  $\mu$ <sup>-PIP</sup> Core und  $\mu$ <sup>-PIP</sup> P-Core mit PtdIns4,5P<sub>2</sub> waren keine Unterschiede in der Bindungsstärke detektierbar. Bei beiden Komplexen wird die Bindung an PtdIns4,5P<sub>2</sub> nur noch über die  $\alpha$ -Untereinheit vermittelt, welche Phosphorylierungs-unabhängig erfolgt.

Widererwartend zeigte die anschließende Analyse der AP2-Mutante, die in der  $\alpha$ -Phosphatidylinositol-Bindungsstelle mutiert war ( $\alpha$ <sup>-PIP</sup>), keine Bindung an PtdIns4,5P<sub>2</sub>. Dies war unabhängig davon, ob die Mutante in phosphorylierter Form oder nicht-phosphorylierter Form vorlag. Obwohl durch die Aufklärung der Kristallstruktur von AP2 bekannt ist, dass die  $\mu$ -Phosphatidylinositol-Bindungsstelle auch im nicht-phosphorylierten, also "geschlossenen" Zustand von AP2 an der Oberfläche exponiert ist und zusätzlich auch die isolierte c- $\mu$ 2-Kette an Phosphatidylinositole bindet, wird im Komplex durch diese Bindungsstelle alleine keine PtdIns4,5P<sub>2</sub>-Bindung vermittelt.

Wie oben beschrieben befindet sich im nicht-phosphorylierten Core die  $\mu$ -Phosphatidylinositol-Bindungsstelle orthogonal zur  $\alpha$ -Phosphatidylinositol-Bindungsstelle. Eine Bindung an PtdIns4,5P<sub>2</sub> über  $\mu$ 2 in dieser Konformation würde bedeuten, dass der Komplex in einer anderen Orientierung an die Membran bindet, als bei Bindung über die  $\alpha$ -Phosphatidylinositol-Bindungsstelle. Eine Oberfläche des Komplexes, die sonst nicht Membran-zugewandt ist, stellt jetzt die Umgebung der  $\mu$ -Phosphatidylinositol-Bindungsstelle dar. Bei einer Bindung über  $\mu$ 2 in dieser um 90° gedrehten Orientierung des Komplexes könnten also die anderen Untereinheiten des AP2-Komplexes einer Bindung an PtdIns4,5P<sub>2</sub>-haltige Membranen entgegenwirken, z.B. durch eine unpassende Oberflächen-Ladung. Warum aber kann dann der phosphorylierte P-Core mit mutierter  $\alpha$ -Phosphatidylinositol-Bindungsstelle nicht über  $\mu$ 2 an PtdIns4,5P<sub>2</sub> binden, obwohl durch die Phosphorylierung am Thr156 der  $\mu$ 2-Kette zusätzliche Flexibilität verliehen wird? Eine denkbare Erklärung wäre, dass im Rahmen des Gesamtkomplexes die Bindungsstärke der  $\mu$ -Bindungsstelle nicht ausreicht, um den Komplex an die Membran zu rekrutieren. Vor allem da die

Interaktion zwischen Phosphatidylinositolen und der  $\mu$ -Bindungsstelle nur durch elektrostatische Wechselwirkung vermittelt wird (Collins *et al.*, 2002).

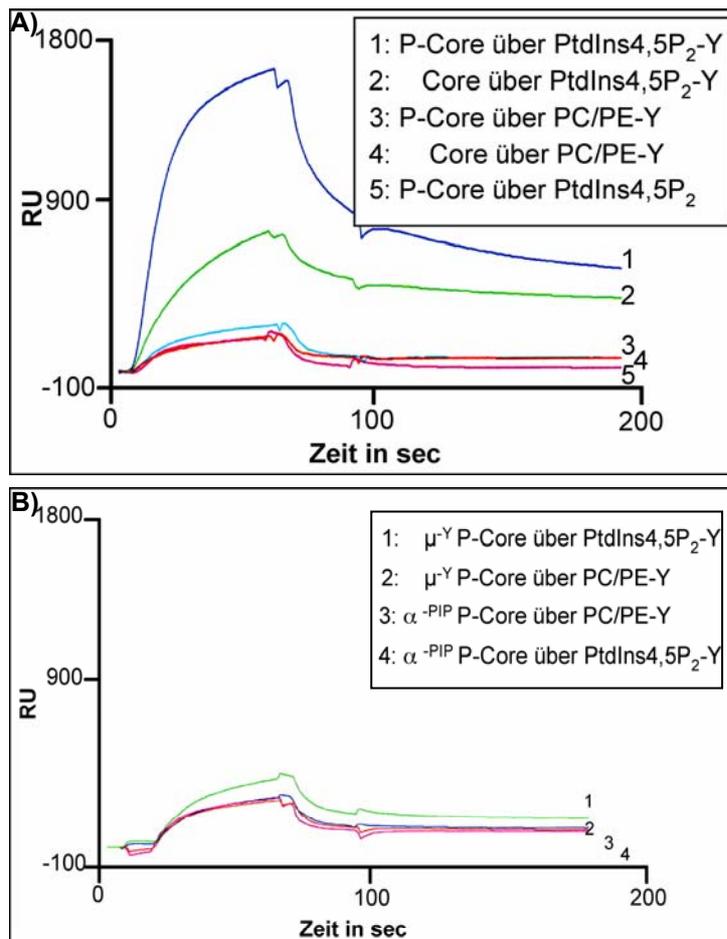
Zusätzlich zur geringen Bindungsstärke der  $\mu$ -Bindungsstelle könnte die Art der Mutation der  $\alpha$ -Bindungsstelle dazuführen, dass gar keine Interaktion des mutierten P-Cores mit PtdIns4,5P<sub>2</sub> stattfindet. Eine positiv- und eine un-geladene Aminosäure wurden zu je einem negativ-geladenem Rest mutiert (Lys57Glu; Tyr58Glu), was zu Abstossungseffekten mit den negativ-geladenen Liposomen führen kann. In Kombination mit der schwach-affinen PtdIns4,5P<sub>2</sub>-Bindung durch  $\mu$ 2 resultiert daraus vermutlich der Verlust der Bindung von P-Core an die PtdIns4,5P<sub>2</sub>-Liposomen.

#### *Bindung von AP2 an Tyrosin-haltige Signale*

Die Bindung von AP2-Komplexen an Membranprotein-Sortierungssignale ist von zentraler Bedeutung für die Sortierung der Proteine in Zellen. Dass eine effektive AP2-Bindung an die Signale erst durch die Gegenwart von Phosphatidylinositolen ermöglicht wird, zeigten die folgenden Experimente.

Wir testeten die Interaktion von Core und P-Core mit dem Tyrosin-haltigen Sortierungssignal von TGN38 in PC/PE-Liposomen. Die Interaktion von unphosphoryliertem und damit laut Model in "geschlossener" Form vorliegendem AP2 mit dem Tyrosin-haltigen Signal war schwach (Abb. 3-22 A). Zu unserer Überraschung stellten wir fest, dass auch die Bindung des phosphorylierten P-Cores an PC/PE-Y schwach war, obwohl die Phosphorylierung laut des Models eine, für die Signalbindung-förderliche, "offene" Konformation unterstützen sollte. Die Interaktion beider Komplexe an PC/PE-Y war nur wenig stärker als die Bindung an rein PtdIns4,5P<sub>2</sub>-haltige Liposomen (Abb. 3-22 A).

Wurde das Tyrosin-haltige Sortierungssignal hingegen in PtdIns4,5P<sub>2</sub>-haltigen Liposomen präsentiert, war eine hoch-affine Bindung von Core und eine nochmals stärkere Bindung von P-Core nachweisbar (Abb. 3-22 A). Die Gegenwart von PtdIns4,5P<sub>2</sub> ist also notwendige Voraussetzung für eine effektive Bindung von AP2 an Sortierungssignale in einer Membran.



**Abbildung 3-22: PtdIns4,5P<sub>2</sub> ist für die effektive Bindung von Tyrosin-haltigen Signalen nötig.** A) Der AP2 P-Core Komplex bindet schwach-affin an PtdIns4,5P<sub>2</sub>-Liposomen und an PC/PE-Y Liposomen. Erst wenn das Signalpeptid in der Umgebung von PtdIns4,5P<sub>2</sub> präsentiert wird, findet eine effektive Bindung statt. B) Mutation der YXX $\Phi$ -Bindungsstelle im P-Core ( $\mu^Y$  Mutante) verhindert eine hoch-affine Bindung an die gleiche Oberfläche (PtdIns4,5P<sub>2</sub>-Y). Die Rest-Bindung entspricht in etwa der Interaktion des Wildtyp P-Cores mit einer rein PtdIns4,5P<sub>2</sub>-haltigen Membran. Die Mutation der PtdIns4,5P<sub>2</sub>-Bindungsstelle in der  $\alpha$ -Untereinheit des P-Cores ( $\alpha^{PIP}$ ) unterdrückt die Bindung an die Membran nahezu vollständig, obwohl eine Interaktion mit dem YXX $\Phi$ -Signal zu erwarten wäre.

Um die beschriebenen Bindungsvorgänge näher zu beleuchten und den Einfluss der verschiedenen Bindungsstellen am Bindungsprozess besser zu verstehen, wurden in weiteren Experimenten AP2 Komplexe eingesetzt, die an den entsprechenden Stellen mutiert waren.

Die Mutation der Tyrosinsignal-Bindungstasche in  $\mu^Y$  führte dazu, dass Core und P-Core nur noch schwach mit einem Tyrosin-haltigen Signal in PtdIns4,5P<sub>2</sub>-Liposomen interagierten (gezeigt für P-Core in Abb. 3-22 B). Die Bindungsstärke dieser  $\mu^Y$ -Komplexe war vergleichbar mit der Bindung der Wildtyp-Komplexe an Liposomen mit PtdIns4,5P<sub>2</sub> aber ohne Signal. Dies ist ein guter Beleg dafür, dass die Bindung an Tyrosin-haltige Signale tatsächlich über die hier mutierte Bindungstasche erfolgt.

Wurden für die gleichen Messungen Komplexe verwendet, die in der  $\mu^2$ -Phosphatidylinositol-Bindungsstelle mutiert waren ( $\mu^{PIP}$ ), konnte nach wie vor eine effektive Tyrosinsignal-Bindung in PtdIns4,5P<sub>2</sub>-Umgebung detektiert werden. Diese

war allerdings schwächer als die Bindung der Wildtyp-Komplexe und durch eine schnellere Dissoziation gekennzeichnet. Der Effekt der Mutation der PtdIns4,5P<sub>2</sub>-Bindungsstelle in  $\mu$ 2 war also deutlich schwächer als der Effekt der Mutation der Tyrosinsignal-Bindungsstelle.

Die Mutation der Phosphatidylinositol-Bindungsstelle in der  $\alpha$ -Untereinheit ( $\alpha^{\text{PIP}}$  Mutante) führte im Gegensatz zur Mutation der  $\mu$ -PtdIns4,5P<sub>2</sub>-Bindungsstelle zu einem drastischen Verlust der Bindungsstärke. Die Interaktion der  $\alpha$ -Untereinheit mit PtdIns4,5P<sub>2</sub> hat also eine wichtige Bedeutung für die effektive Interaktion mit Tyrosin-haltigen Signalen.

Allerdings wäre zumindest eine schwach-affine Interaktion der  $\alpha^{\text{PIP}}$  Mutante mit dem Tyrosin-haltigen Signal zu erwarten gewesen, da zwischen dem Wildtyp-Komplex und dem Tyrosin-haltigen Signal in PC/PE-Liposomen eine schwache Bindung detektierbar war (Abb. 3-22 A) und die Tyrosinsignal-Bindungsstelle sowie die  $\mu$ 2-Phosphatidylinositol-Bindungsstelle in der  $\alpha^{\text{PIP}}$  Mutante intakt waren. An dieser Stelle sei nochmals daran erinnert, dass die  $\alpha^{\text{PIP}}$ -Mutanten durch den Austausch einer positiv-geladenen und einer ungeladenen Aminosäure in zwei negativ geladene Reste (Lys57Glu; Tyr58Glu) generiert worden sind, was zu Abstossungseffekten mit den negativ-geladenen Liposomen führen kann.

Der völlige Verlust der Bindung ist also damit zu erklären, dass die Bindung der  $\alpha^{\text{PIP}}$ -Mutante an Tyrosin-haltige Signale sehr schwach ist und das zusätzlich durch die Art der Mutation Abstossungseffekte mit PtdIns4,5P<sub>2</sub> auftreten.

Um die bemerkenswerten Ergebnisse zur Membranbindung von AP2 erklären zu können, müssen, wie bereits erwähnt, eine ganze Reihe einzelner Bindungsereignisse berücksichtigt werden: 1. Die Bindung von AP2 an PtdIns4,5P<sub>2</sub> durch die grosse  $\alpha$ -Untereinheit; 2. die Bindung von AP2 sowohl an das Tyrosin-haltige Signal als auch an PtdIns4,5P<sub>2</sub> durch die  $\mu$ 2-Untereinheit; 3. die Modulation dieser Ereignisse durch Phosphorylierung am Thr156 von  $\mu$ 2 und 4. die intermolekularen Bindungen zwischen  $\mu$ 2 und  $\beta$ 2.

In einem sehr einfachen Erklärungsmodell kann man die hoch-affine Bindung von AP2 an Tyrosin-haltige Signale in Gegenwart von PtdIns4,5P<sub>2</sub> als die Avidität aus drei schwach-affinen Einzelinteraktionen (PtdIns4,5P<sub>2</sub>-Bindung an  $\alpha$ ; PtdIns4,5P<sub>2</sub>-Bindung an  $\mu$ 2; Tyrosinsignal-Bindung an  $\mu$ 2) betrachten, auf die die

Phosphorylierung von  $\mu 2$  einen modulierenden Einfluss hat. Dies wird den tatsächlichen Bindungsvorgängen allerdings nicht gerecht.

Zum einen ist aufgrund der Kristallstruktur von AP2 bekannt, dass die Bindungstasche für Tyrosin-haltige Signale durch die Bindung von  $\mu 2$  an  $\beta 2$  blockiert ist und daher nicht frei interagieren kann. Zum anderen gehen wir davon aus, dass sowohl die  $\alpha$ - als auch die  $\mu$ -Untereinheit mit sehr viel niedrigerer Affinität an PtdIns4,5P<sub>2</sub> bindet als  $\mu 2$  an das Peptidsignal. Diese Annahme wird durch die Tatsachen gestützt, dass 1. AP2 (egal ob Core oder P-Core) im Gegensatz zu einem Phosphatidylinositol-Bindungsspezilisten, wie Epsin, nur mit äusserst geringer Affinität an PtdIns4,5P<sub>2</sub> bindet und dass es 2. erforderlich war das Phosphatidylinositol-Analogon InsP<sub>6</sub> im 10000-fachen molaren Überschuss zu verwenden, um es überhaupt im Komplex mit AP2 kristallisieren zu können (David Owen, persönliche Mitteilung).

Unter Beachtung dieser Voraussetzungen sollen im folgenden die wesentliche Befunde der *in vitro* Experimente erklärt und zu einem Bindungsmodell zusammengefügt werden.

Die isolierte  $\mu 2$ -Kette bindet schwach-affin an PtdIns4,5P<sub>2</sub>, aber mit deutlich höherer Affinität an Tyrosin-haltige Signale. Durch die Anwesenheit von PtdIns4,5P<sub>2</sub> wird die Tyrosinsignal-Bindung von  $\mu 2$  stabilisiert. Da beide Bindungsstellen räumlich eng benachbart sind, bilden sie in ihrer Funktion vermutlich eine Einheit.

Während die isolierte  $\mu 2$ -Untereinheit mit hoher Affinität an ein Tyrosin-haltiges Signal in PC/PE-Umgebung bindet, ist dies für den AP2-Core nicht der Fall, da die  $\mu 2$ -Untereinheit durch die Bindung an  $\beta 2$  an den Komplex gebunden und nicht flexibel ist. Die Phosphorylierung des Komplexes hat nur einen geringen, verstärkenden Effekt auf die Bindung an ein Tyrosin-haltiges Signal in PC/PE-Umgebung. Sie fungiert demnach nicht wie ein Schalter, der eine Konformationsänderung in AP2 induziert, sondern unterstützt nur die Loslösung der  $\mu 2$ -Kette vom Komplex.

Erst die Gegenwart von PtdIns4,5P<sub>2</sub> führt zu einer dramatischen Steigerung der Affinität.

Wir postulieren daher das Model, dass AP2 durch die schwach-affine Bindung über die  $\alpha$ -PtdIns4,5P<sub>2</sub>-Bindungsstelle an die Membran rekrutiert wird. Dadurch befindet sich der Komplex in räumlicher Nähe und richtiger Orientierung zur Membran und die Wahrscheinlichkeit, dass  $\mu 2$  sich nach dem Loslösen von  $\beta 2$  in eine für die Bindung

an die Membran günstige Lage ausrichtet steigt. Es findet eine Konformationsänderung statt und die zuvor orthogonal angeordneten bzw. blockierten Bindungsstellen für PtdIns4,5P<sub>2</sub> und das Tyrosin-haltige Signal werden zur Membran hin orientiert. Durch die Phosphorylierung am Thr156 wird die Loslösung von β2 zusätzlich begünstigt und eine Öffnung von AP2 favorisiert. Erst durch die Konformationsänderung sind alle drei Bindungsstellen zugänglich und AP2 bindet mit der beobachteten hohen Affinität an das in einer PtdIns4,5P<sub>2</sub>-Umgebung präsentierte Tyrosin-haltige Signal.

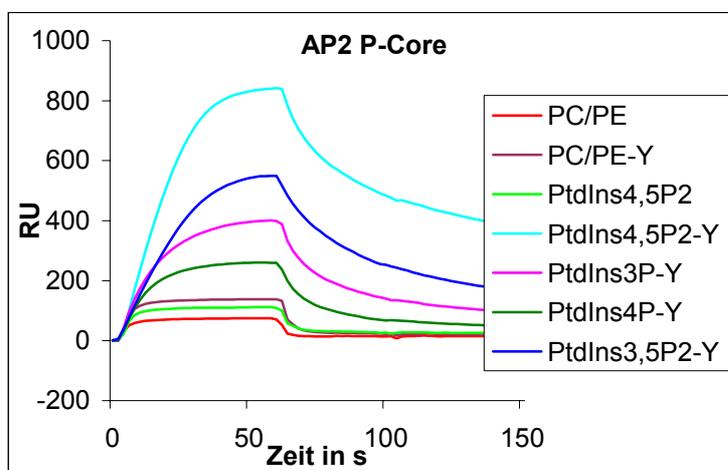
Die Tatsache, dass die Mutation der PtdIns4,5P<sub>2</sub>-Bindungsstelle in μ2 die Bindung an die Membran nur graduell sinken lässt, der Verlust der α-PtdIns4,5P<sub>2</sub>-Bindungsstelle aber zum nahezu völligen Verlust der Membranbindung führt, werten wir als wichtiges Indiz dafür, dass der PtdIns4,5P<sub>2</sub>-Bindung über die α-Untereinheit eine wichtige Bedeutung in der AP2 Orientierung zur und Bindung an die Membran zukommt (für eine Betrachtung der Verhältnisse *in vivo* siehe 4.3.5.).

In der Summe zeigen diese Ergebnisse zur Membranbindung von AP2, dass 1. die Bindung an PtdIns4,5P<sub>2</sub> sehr schwach, aber spezifisch ist; dass 2. die Bindung an Tyrosin-haltige Signale allein keine effiziente Membranbindung ermöglicht; dass aber 3. die Interaktion von AP2 mit Tyrosin-haltigen Signalen und PtdIns4,5P<sub>2</sub> zu einer effektiven Membranbindung führt; dass 4. dafür hauptsächlich die Interaktion zwischen der α-Phosphatidylinositol-Bindungsstelle und PtdIns4,5P<sub>2</sub> verantwortlich ist; dass 5. die, für die Bindung an Tyrosin-haltigen Signale und PtdIns4,5P<sub>2</sub> erforderliche, "offene" Konformation von AP2 durch die Phosphorylierung von μ2 begünstigt wird und dass dadurch 6. die Bindung an Tyrosin-haltigen Signale zusätzlich verstärkt wird und dass schlussendlich daher 7. für eine hoch-affine Interaktion von AP2 mit Tyrosin-haltigen Signalen die Anwesenheit von PtdIns4,5P<sub>2</sub> und die Phosphorylierung von μ2 erforderlich sind.

### Tyrosinsignal-Bindung in Anwesenheit verschiedener Phosphatidylinositole

Wie zuvor dargestellt, bindet AP2 mit sehr geringer Affinität an PtdIns4,5P<sub>2</sub> (Abb. 3-21). Allerdings ist die Gegenwart von PtdIns4,5P<sub>2</sub> Voraussetzung für eine effektive Bindung von Tyrosin-haltigen Sortierungssignalen (Abb. 3-22). In der Zelle befinden sich Tyrosin-haltige Signale auch an intrazellulären Membranen, in denen andere Phosphatidylinositole vorherrschend sind. Im folgenden sollte daher der Einfluss weiterer Phosphatidylinositole auf die Tyrosinsignal-Bindung getestet werden.

Dabei zeigte sich, dass auch die Gegenwart von anderen Phosphatidylinositolen einen positiven Einfluss auf die Tyrosinsignal-Bindung von AP2 hatte (Abb. 3-23). Sowohl in Gegenwart der getesteten Phosphatidylinositol-Diphosphate, PtdIns3,5P<sub>2</sub> und PtdIns4,5P<sub>2</sub>, als auch in Anwesenheit von Phosphatidylinositol-Monophosphaten, PtdIns3P und PtdIns4P, war eine deutliche Affinitätssteigerung messbar. Wobei in Gegenwart von PtdIns4,5P<sub>2</sub> die Steigerung der Affinität am grössten war. AP2 zeigt also nicht die spezifische Selektivität, die andere Phosphatidylinositol-bindende Proteine wie z.B. Epsin zeigen. Für die Situation in der Zelle muss allerdings berücksichtigt werden, dass AP2 bei der Bildung eines Clathrin-umhüllten Vesikels an der Plasmamembran im Zentrum eines Netzwerks zahlreicher Protein-Protein- und Protein-Lipid-Interaktionen steht. An diesem Interaktionsnetzwerk sind weitere PtdIns4,5P<sub>2</sub>-bindende Proteine beteiligt, darunter auch Epsin, so dass die bevorzugte Bindung von AP2 an Tyrosin-haltige Signale in PtdIns4,5P<sub>2</sub>-haltigen Membranen durch dieses Netzwerk noch weiter unterstützt wird.



**Abbildung 3-23: Bindung von AP2 an das Tyrosin-haltige Sortierungssignal von TGN38 in Gegenwart verschiedener Phosphatidylinositole.** AP2 band schwach-affin an das Tyrosin-haltige Signal in PC/PE-Umgebung und an rein PtdIns4,5P<sub>2</sub>-haltige Liposomen. Wurde das Signal in Gegenwart von verschiedenen Phosphatidylinositolen präsentiert,

war eine Affinitätssteigerung detekrierbar. Die stärkste Interaktion konnte bei Bindung von AP2 an das Tyrosin-haltige Signal in Kombination mit PtdIns4,5P<sub>2</sub> gemessen werden.

### 3.2.2.2. Bindung von AP2 an Leucin-haltige Sortierungssignale in Membranumgebung

Eine weitere Fragestellung im Zusammenhang mit der Membranbindung von AP2 war die Interaktion mit Leucin-haltigen Signalen.

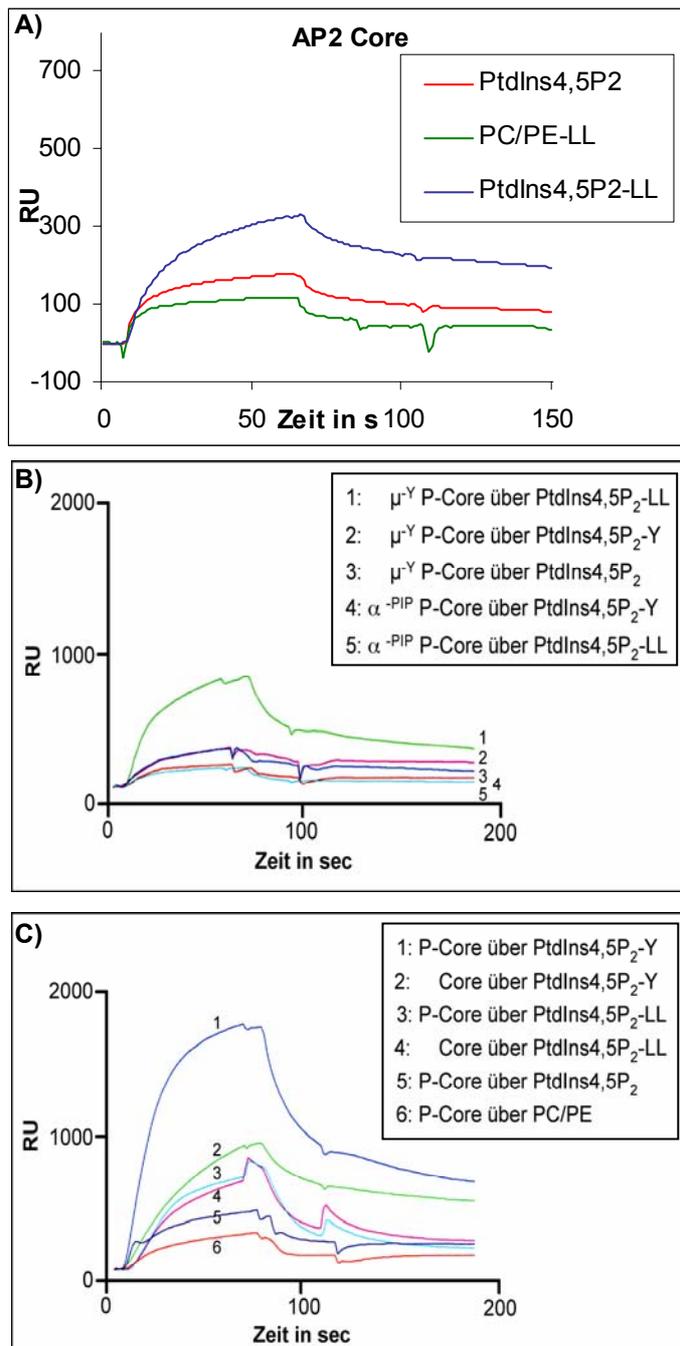
Während in manchen Publikationen postuliert wird, dass AP2 über die  $\mu$ 2-Untereinheit an Leucin-haltige Signale bindet, wird in anderen Arbeiten eine Interaktion an die  $\beta$ -Untereinheit gezeigt. (Rodionov und Bakke, 1998; Rapoport *et al.*, 1998; Coleman *et al.*, 2005). Janvier *et al.*, 2003 konnten gar keine Interaktion mit AP2 detektieren.

Der von uns entwickelte *in vitro* Assay wurde daher auch zur Untersuchung der AP2-Bindung an Leucin-haltige Sortierungssignale in Membranumgebung genutzt. Dabei wurde zunächst das Leucin-haltige Signal von CD4 (-QIKRLL-) zum Interaktionstest verwendet. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden auch die Signale von CD3- $\gamma$  (-DKQTLL-) und Tyrosinase (-EKQPLL-) getestet, um die Bindung von AP2 an weitere Leucin-haltige Signale zu beleuchten.

Analog zur Bindung an Tyrosin-haltige Signale war die Bindung von P-Core an das Leucin-haltige Signal von CD4 in PC/PE-Umgebung (PC/PE-LL) schwach. Erst in Kombination mit PtdIns4,5P<sub>2</sub> erfolgte eine effektive Bindung an das Leucin-haltige Signal (Abb. 3-24 A). In Übereinstimmung damit führte die Mutation der PtdIns4,5P<sub>2</sub>-Bindungsstelle in der  $\alpha$ -Untereinheit ( $\alpha$ <sup>-PIP</sup> P-Core) zum Verlust der Leucin-Signalbindung (Abb. 3-24 B). Dies entspricht dem Bindungsverhalten dieses Mutante mit der PtdIns4,5P<sub>2</sub>-Y Oberfläche (weitere Erklärung siehe 3.2.2.1.). PtdIns4,5P<sub>2</sub> spielt somit bei der Bindung von Tyrosin-haltigen und Leucin-haltigen Signalen eine entscheidende Rolle.

Die Mutation der Tyrosinsignal-Bindungsstelle ( $\mu$ <sup>-Y</sup> P-Core) hatte hingegen nur Auswirkung auf die Bindung an das Tyrosin-haltige Signal. Die Bindung an das Leucin-haltige Signal wurde nicht beeinträchtigt (Abb. 3-24 B). Dies kann als Beleg dafür betrachtet werden, dass beide Signaltypen an verschiedenen Stellen im Komplex binden.

Bei einem Vergleich der AP2-Interaktion mit einem Tyrosin-haltigen Signal (TGN38) und einem Leucin-haltigen Signal (CD4) jeweils in PtdIns4,5P<sub>2</sub>-haltigen Liposomen, zeigte sich eine deutlich schwächere Affinität für das Leucin-haltige Signal (Abb. 3-24 C).

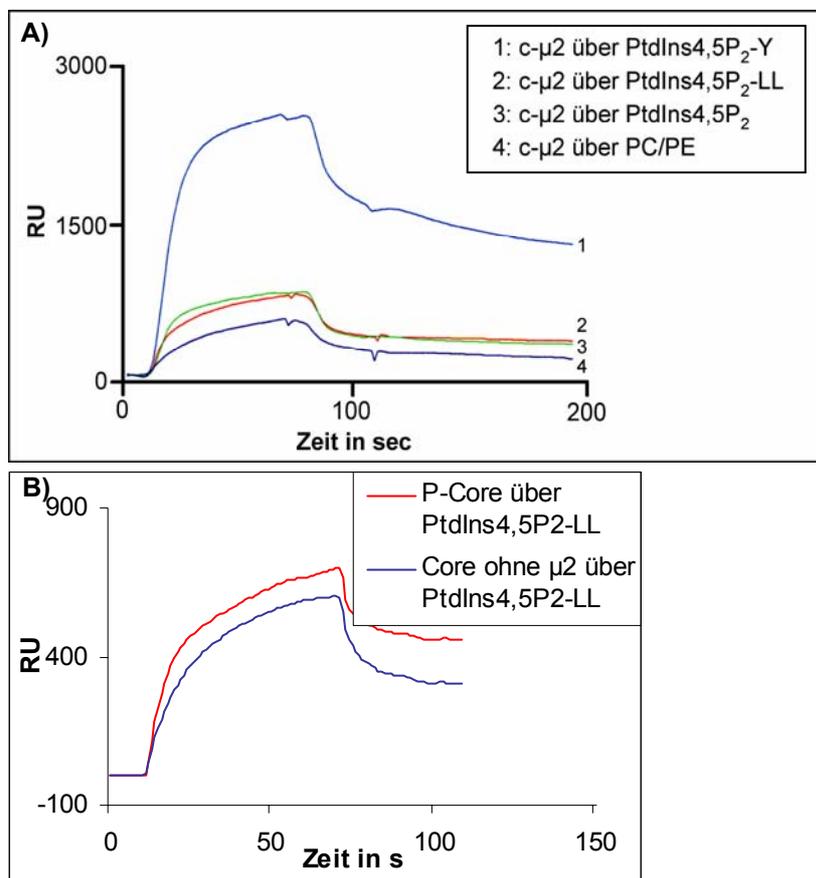


**Abbildung 3-24: Bindung von AP2 an Leucin-haltige Signale.** A) Der AP2 Core bindet nur schwach an Leucin-haltige Signale in PC/PE-Umgebung. In Anwesenheit von PtdIns4,5P<sub>2</sub> findet eine effektive Bindung statt. B) Die Mutation in der Tyrosin-Bindungsstelle von  $\mu$ 2 beeinträchtigt die Bindung des P-Cores an Leucin-haltige Signale nicht. Die Mutation in der Phosphatidylinositol-Bindungsstelle von  $\alpha$  verhindert hingegen die Bindung des P-Cores an das Tyrosin-haltige und das Leucin-haltige Signal. C) Die Phosphorylierung von  $\mu$ 2 am Thr156 hat einen Einfluss auf die Bindung von Tyrosin-haltigen Signalen, während die Bindung des Leucin-haltigen Signals unbeeinflusst bleibt.

Interessanterweise unterschied sich die Affinität des nicht-phosphorylierten Cores und des in  $\mu$ 2-phosphorylierten P-Cores für Leucin-haltige Signale in PtdIns4,5P<sub>2</sub>-Liposomen (PtdIns4,5P<sub>2</sub>-LL) im Gegensatz zu Tyrosin-haltigen Signalen nicht voneinander (Abb. 3-24 C). Die Phosphorylierung von  $\mu$ 2 am Thr156 hat also keinen Einfluss auf die Leucinsignal-Bindung.

Die Unabhängigkeit der Bindungsstärke von der  $\mu$ 2-Phosphorylierung lässt vermuten, dass die Bindungsstelle für Leucin-haltige Signale nicht im blockierten Bereich des Core-Komplexes, also nicht an der Interaktionsfläche zwischen der  $\mu$ - und der  $\beta$ -Untereinheit, liegt.

Diese Vermutung konnte durch weitere Beobachtungen unterstützt werden: Zum einen zeigte der isolierte, C-terminale, YXX $\Phi$ -Signal-bindende Teil von  $\mu$ 2 keine Interaktion mit dem Leucin-haltigen Signal (Abb. 3-25 A). Zum anderen konnte die AP2-Mutante, der der c-terminale Teil von  $\mu$ 2 fehlt, nach wie vor effektiv mit einem Leucin-haltigen Signal (in diesem Fall das Signal von CD3- $\gamma$ ) interagieren (Abb. 3-25 B). Das c-terminale Fragment von  $\mu$ 2 vermittelt also nicht die Bindung an Leucin-haltige Signale. Da der N-Terminale Teil von  $\mu$ 2 weitgehend im Komplex eingebettet ist und daher wenig Interaktionsfläche für eine Signalbindung bietet, ist anzunehmen, dass Leucin-haltige Signale nicht durch die  $\mu$ 2 Untereinheit gebunden werden. Analoge Experimente zur Interaktion von AP2 und c- $\mu$ 2 mit dem Leucin-haltigen Signal von Tyrosinase konnten die beschriebenen Ergebnisse ebenfalls bestätigen.



**Abbildung 3-25: Die Interaktion von AP2 mit Leucin-haltigen Signalen erfolgt unabhängig vom c-terminalen  $\mu$ 2-Anteil.** A) Der C-terminale Teil von  $\mu$ 2 bindet schwach an PtdIns4,5P<sub>2</sub> und mit hoher Affinität an PtdIns4,5P<sub>2</sub>-Y. Die Bindung an die PtdIns4,5P<sub>2</sub>-LL Oberfläche entspricht dem Niveau der Bindung an PtdIns4,5P<sub>2</sub>. Eine Bindung an das Leucin-haltige Signal ist nicht nachweisbar. B) Die AP2-Mutante, der der c-terminale Anteil von  $\mu$ 2 fehlt, bindet hochaffin an das Leucin-Signal in PtdIns4,5P<sub>2</sub>-Umgebung.

Alle Untersuchungen zur Leucinsignal-Bindung von AP2 zeigen übereinstimmend, dass AP2 in der Tat mit Leucin-haltigen Signalen interagiert. An welcher Untereinheit die Bindung stattfindet, bleibt jedoch in weiteren Experimenten zu klären (siehe auch Diskussion 4.3.4.).

Durch die bisher beschriebenen Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass PtdIns4,5P<sub>2</sub> ein wesentlicher Faktor zur Bindung von AP2 an die Plasmamembran ist/darstellt. Ohne die Anwesenheit von PtdIns4,5P<sub>2</sub> erfolgt nur eine schwache Bindung an Tyrosin-haltige und Leucin-haltige Sortierungssignale. Trotzdem können wir nicht ausschliessen, dass noch weitere Faktoren an der Rekrutierung von AP2 an die Membran beteiligt sind. Ein direkter Einfluss von ARF6 auf die Rekrutierung von AP2 ist erst vor kurzem durch Paleotti et al. 2005 beschrieben worden und sollte daher ebenfalls mit Hilfe unseres *in vitro* Assays untersucht werden (3.2.1.2.).

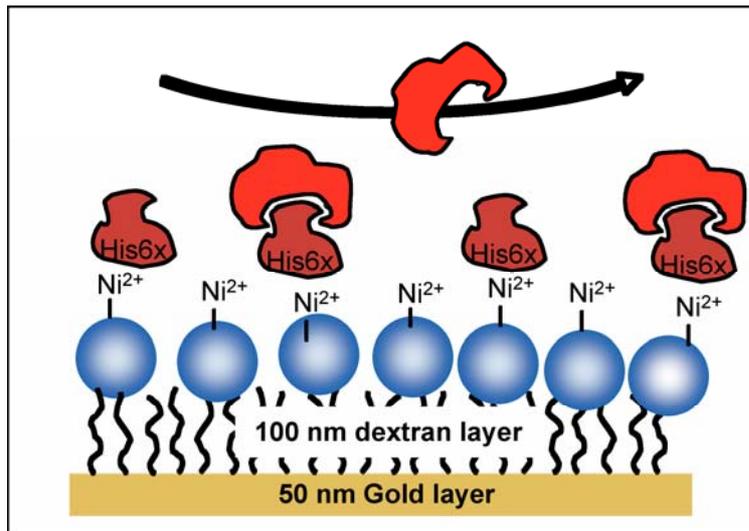
### **3.2.2.3. Rolle von ARF6 bei der Membranrekrutierung von AP2**

Die bisher beschriebenen Ergebnisse konnten zeigen, dass Sortierungssignale von Membranproteinen in Kombination mit PtdIns4,5P<sub>2</sub> eine effektive Interaktion mit AP2 vermitteln und daher zur Rekrutierung von AP2 an die Membran ausreichend sein könnten.

Als weiterer möglicher Rekrutierungsfaktor für AP2 ist die kleine GTPase ARF6 bereits in der Literatur beschrieben worden (Paleotti *et al.*, 2005). Eine Bindungsstelle für ARF6 in AP2 ist allerdings bislang nicht identifiziert. Unser Ziel war es daher, ARF6 in unseren *in vitro* Bindungsassay zu integrieren, um seine Bedeutung für die Rekrutierung von AP2 zu verifizieren.

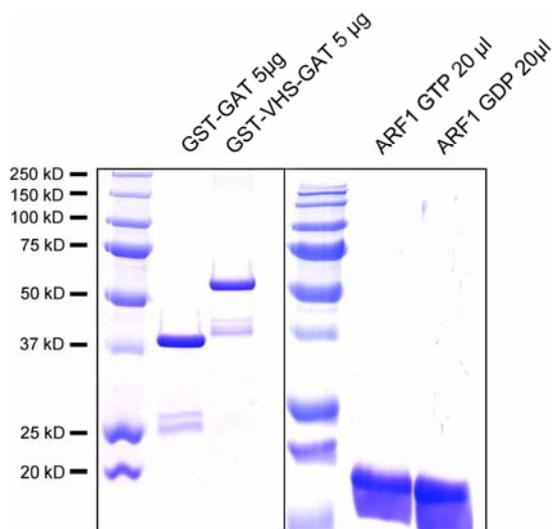
#### **3.2.2.3.1. Erweiterung des Biacore-basierten *in vitro* Assays**

Die Proteine der ARF-Familie tragen N-terminal eine Myristoylierung. Dieser Lipidanker vermittelt *in vivo* gemeinsam mit einer N-terminalen amphipatischen Helix die reversible Membranassoziation der Proteine (zusammengefasst in Behnia und Munro, 2005). Da die Reinigung von stöchiometrisch myristoyliertem Protein sehr aufwendig und häufig schlecht reproduzierbar ist, haben wir versucht einen methodischen Trick anzuwenden, um rekombinantes ARF6 an Liposomen zu binden. Dazu wurde die N-terminale amphipatische Helix deletiert (ARF6 $\Delta$ 1-13) und durch einen Hexa-His-Tag ersetzt. Durch die Verwendung von Liposomen mit inkorporiertem Ni-NTA-Lipid wurde die Immobilisierung des His-modifizierten Proteins und dadurch eine Intergration in unseren Assay ermöglicht (Abb. 3-26).



**Abbildung 3-26: Erweiterung des Biacore-basierten *in vitro* Assays durch die Verwendung von Ni-NTA-Lipiden.** His-modifizierte Proteine wurden über Ni-NTA-Lipide an bestehende Liposomenoberflächen gekoppelt. Dadurch war es möglich die Bindung an die His-modifizierten Proteine in Membrenumgebung zu testen.

Ob die Bindung zwischen einem Hexa-His-modifizierten ARF-Protein und den Ni-NTA-Liposomen stabil und eine Interaktion mit derart gekoppelten Liganden messbar

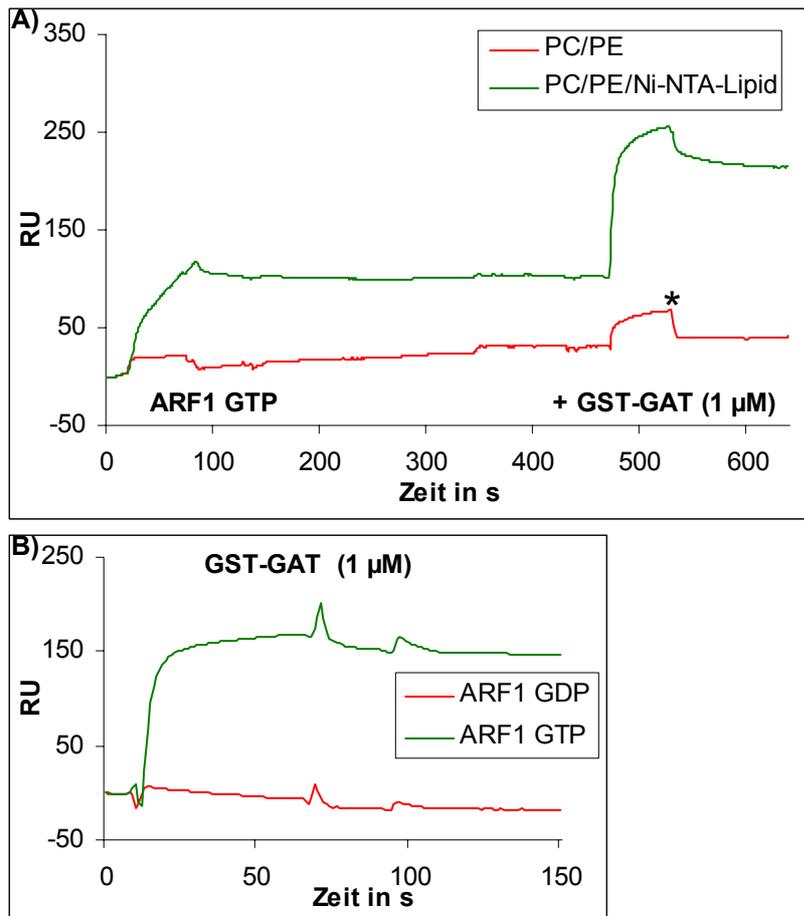


**Abbildung 3-27: Coomassie-gefärbtes SDS-Gel der rekombinanten Proteine GST-GAT, GST-VHS-GAT, ARF1 $\Delta$ 1-13 GTP und GDP.** Die Expression und Reinigung wurde von Herrn Dr. David Owen durchgeführt.

ist, sollte anhand der bereits bis in die Kristallstruktur aufgeklärten Interaktion zwischen der GAT-Domäne des monomeren Adaptors GGA1 und ARF1 GTP getestet werden (Collins *et al.*, 2003). Die GGA-GAT-Domäne bindet nicht an ARF1 GDP, daher diente ARF1 GDP als negative Kontrolle. Bei der Klonierung von ARF1 in der GTP (Q71L) bzw. GDP (T31N) Form wurde ebenfalls ein N-terminaler Hexa-His-tag eingeführt. Freundlicherweise wurden uns His-ARF1 GTP, His-ARF1 GDP sowie die GAT-Domäne als GST-Fusionsprotein von Herrn Dr. David Owen bereits gereinigt zur Verfügung gestellt (Abb. 3-27).

Wie in nachfolgender Abbildung (Abb. 3-28 A) dargestellt, konnten ARF1 GTP und GDP erfolgreich und spezifisch an die PC/PE-Ni-NTA-Oberfläche gekoppelt werden. Es war keine Bindung an die Kontrolloberfläche (PCPE-Liposomen) detektierbar. Die Dissoziation der ARF-Moleküle von den Ni-NTA-Liposomen war erfreulicherweise sehr schwach, so dass eine stabile Oberfläche generiert werden konnte. Die

nachfolgende Injektion von GST-GAT über beide Oberflächen hatte die Bindung an ARF1 GTP zur Folge. Während der Injektion von GST-GAT über die PC/PE-Oberfläche ist zwar ebenfalls ein Signal messbar, dieses wird jedoch durch Unterschiede in der Pufferzusammensetzung zwischen Laufpuffer und Analytpuffer hervorgerufen, ist also ein "Puffersprung". (Abb. 3-28 A). Eine Bindung von GST-GAT an ARF1 GDP konnte nicht detektiert werden (Abb. 3-28 B).



**Abbildung 3-28: Bindung von GST-GAT an ARF1 GTP.**

A) ARF1 $\Delta$ 1-13 GTP wurde über den N-terminalen His-tag an immobilisierte Ni-NTA-Liposomen gekoppelt. Eine unspezifische Bindung an die PC/PE-Liposomen fand nicht statt. Das anschliessend injizierte GST-GAT band an die ARF1 GTP-haltige Oberfläche.

\* Sogenannter "Puffersprung", der durch Unterschiede in der Pufferzusammensetzung zwischen Laufpuffer und Analytpuffer hervorgerufen wird. B) GST-GAT band nur an ARF1-GTP nicht an die GDP-Form.

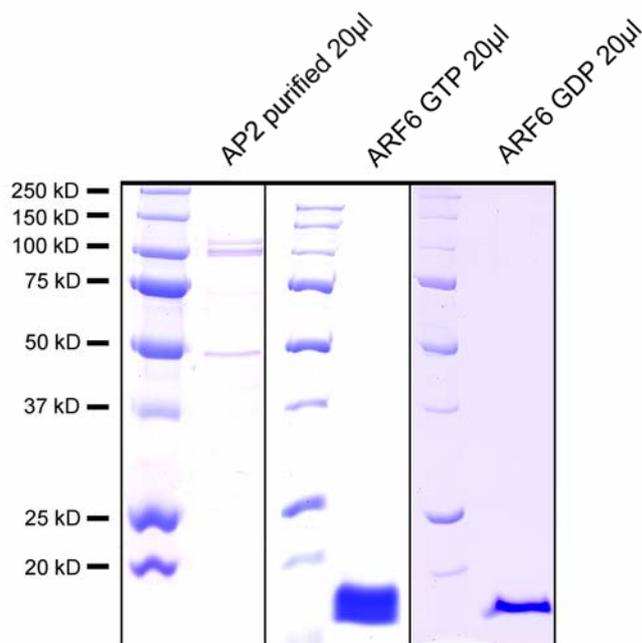
Leider war es nicht möglich das gebundene GST-GAT unter milden Regenerationsbedingungen (50 mM NaCl, 20 mM HCl oder 100 mM Imidazol) von der Oberfläche zu entfernen. Nach solch einer Regeneration konnte weder eine erneute Bindung an ARF1 gemessen werden, noch war es möglich nochmals ARF1 an die Liposomen zu koppeln. Für jede neue Interaktionsmessung musste daher zunächst die gesamte Lipid-Oberfläche mit Detergenz regeneriert werden, bevor erneut Liposomen und anschliessend ARF1 gekoppelt werden konnten.

Die Pilot-Experimente zeigen, dass das über den His-tag an Liposomen gekoppelte ARF1 stabil und bindungsfähig war. Damit eröffnet sich eine weitere Möglichkeit, zusätzliche Komponenten in unseren *in vitro* Assay zu integrieren und weitere

Rekrutierungs-relevante Faktoren zu testen. Der Einsatz von Ni-NTA-Lipiden erlaubt somit eine Untersuchung der Funktion von ARF6 bei der Rekrutierung von AP2 in Kombination mit Sortierungssignal-haltigen Lipiden und Phosphatidylinositolen.

### 3.2.2.3.2. Bindung von AP2 an ARF6 in Membranumgebung

Um die Rolle von ARF6 bei der Rekrutierung von AP2 an die Plasmamembran näher zu beleuchten wurde ARF6 in der GTP (Q67L) und GDP (T27N) Form mit deletierter N-terminaler Helix und einem Hexa-His-tag kloniert, bakteriell expremiert und bis zur Homogenität aufgereinigt (Abb. 3-29; siehe 2.2.2.4.).



**Abbildung 3-29: Coomassie-gefärbtes SDS-Gel des aus Schweinehirn-CCVs gereinigten AP2 Komplexes und der rekombinanten Proteine ARF6 $\Delta$ 1-13 GTP und GDP.** Die Reinigung von AP2 erfolgte durch Tris-Extraktion von Schweinehirn-CCVs, Gelfiltration des Extraktes und anschliessender Auftrennung durch eine Hydroxyapatit-Säule. ARF6 $\Delta$ 1-13 GTP und GDP wurden über den N-terminalen His-tag mit Hilfe einer Ni-NTA-Säule und anschliessender Gelfiltration gereinigt. Auf das dargestellte SDS-Gel wurden je Spur 20  $\mu$ l Protein aufgetragen. Wie erwartet sind

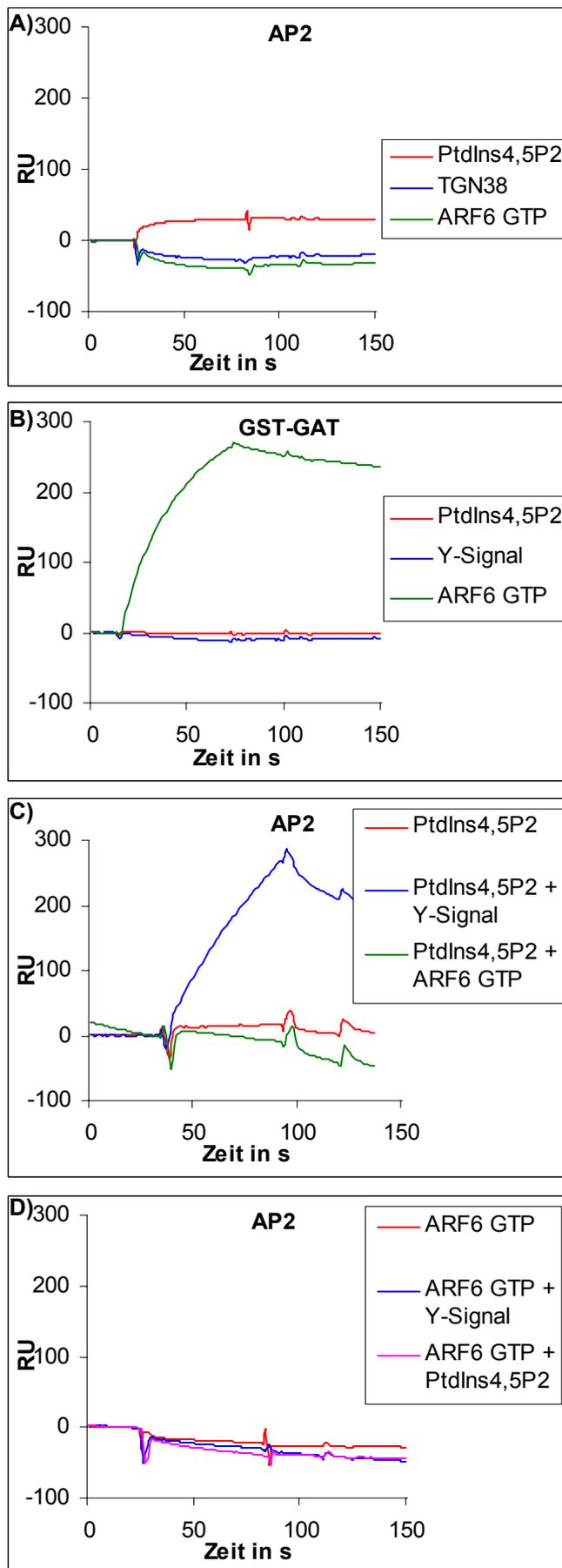
die  $\alpha$ 2 (~100 kDa),  $\beta$ 2 (~100 kDa) und  $\mu$ 2-Untereinheit (~50 kDa) von AP2 detektierbar.  $\sigma$ 2 (17 kDa) ist nicht erkennbar. ARF6 $\Delta$ 1-13 GTP und GDP haben die erwartete Grösse von etwa 19 kDa.

Die rekombinanten AP2-Komplexe konnten für den anstehenden Bindungstest nicht verwendet werden, da sich an der  $\alpha$ -Untereinheit ein N-terminaler His-tag befindet. Dieser ist zur Aufreinigung der Komplexe unabdingbar, würde aber nun dazu führen, dass das rekombinante AP2 mit den Ni-NTA-Lipiden interagiert. Daher wurde aus Schweinehirn-CCVs aufgereinigtes AP2 eingesetzt. Die Reinigung erfolgte nach dem in Fingerhut *et al.*, 2001 beschriebenen Protokoll und wurde freundlicherweise durch Herrn Dominic Teichert durchgeführt. Leider war die Proteinausbeute gering (1,5 mg/600 g Schweinehirn) und die Stabilität des Proteins nicht sehr hoch, so dass die Bindungsaktivität innerhalb weniger Tage deutlich abnahm. Hinzu kommt, dass

bei einem Vergleich der Bindung von rekombinanten AP2 (3.2.2.1.) und aus Gewebe aufgereinigtem AP2 (dieser Abschnitt) Unterschiede im Phosphorylierungszustand und Reinheitsgrad der Proteine berücksichtigt werden müssen. Es ist unklar, ob und wo aus Schweinehirn gereinigtes AP2 phosphoryliert ist und ob endosomale Proteine in Spuren in der Präparation enthalten sind. Zusätzlich kann aus Schweinehirn gereinigtes AP2 nicht mutiert werden und damit ist auch keine nähere Untersuchung von einzelnen Bindungsstellen möglich. Ausserdem enthält aus Gewebe gereinigtes AP2 im Gegensatz zu den rekombinanten Komplexen die *Ear*- und *Hinge*-Domänen, die ebenfalls eine Rolle bei der Interaktion mit der Liposomenoberfläche spielen könnten. Bei der Verwendung von aus Gewebe gereinigtem AP2 muss daher klar sein, dass verschiedene Faktoren die Bindung beeinflussen können und dass eine klare Trennung von verschiedenen Bindungsereignissen nicht möglich ist.

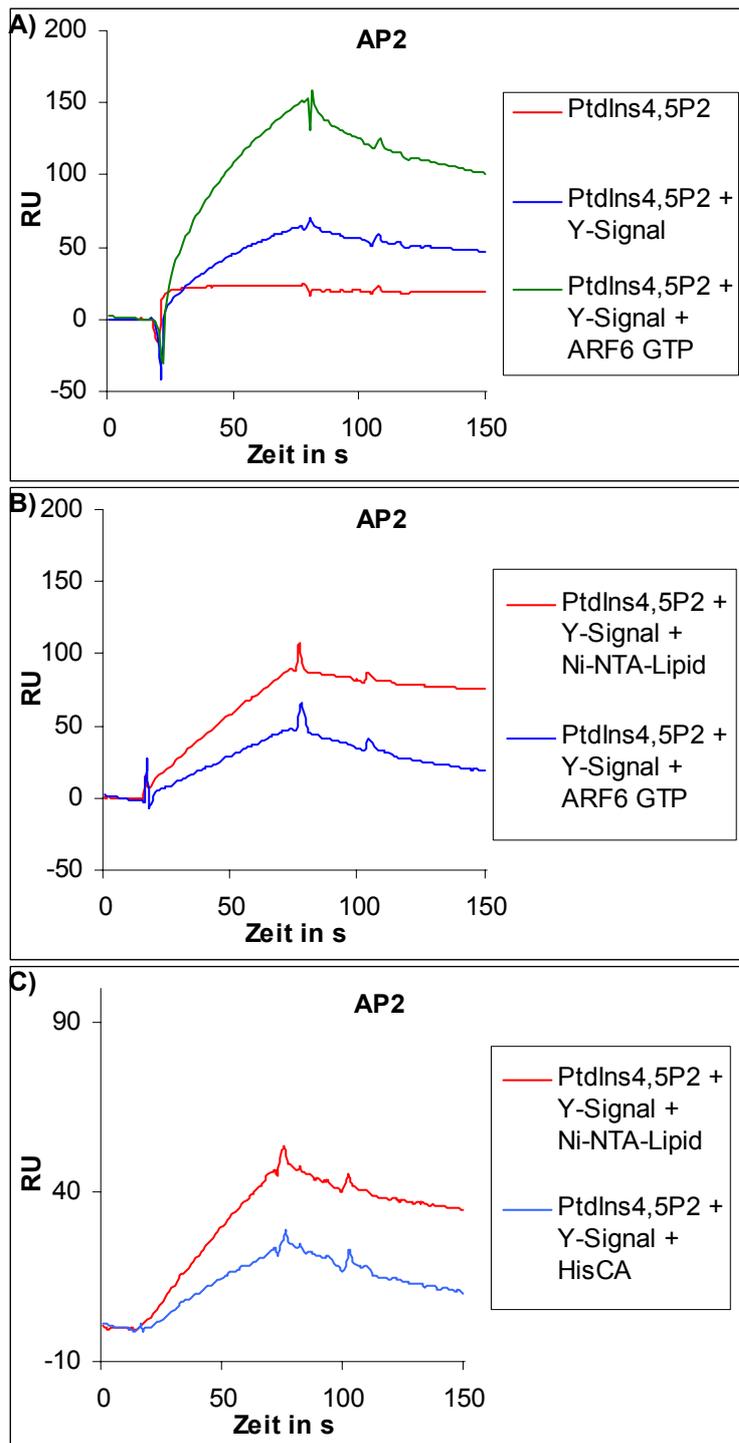
Da wir erstaunlicherweise feststellten, dass die GGA1-GAT Domäne nicht nur, wie in 3.2.2.3.1. beschrieben, an die GTP Form von ARF1 sondern ebenfalls an ARF6 GTP band, fungierte GST-GAT als positive Kontrolle für die Funktionalität von ARF6 GTP. Die beiden ARF-Moleküle haben in der GTP-Form eine sehr ähnliche Konformation (Pasqualato *et al.*, 2001), was die Bindung von GST-GAT an beide Moleküle erklären kann.

Das aus Schweinehirn gereinigte AP2 konnte, wie erwartet, schwach an PtdIns4,5P<sub>2</sub>-haltige Liposomen binden (Abb. 3-30 A). Es war keine Bindung an ein Tyrosin-haltiges Signal in PC/PE-Umgebung detektierbar. Nach Immobilisierung von ARF6Δ1-13 GTP an Ni-NTA-haltige PC/PE-Liposomen war ebenfalls keine Bindung detektierbar, trotzdem wir durch die Interaktion zwischen GST-GAT und ARF6 GTP zeigen konnten, dass ARF6 GTP bindungsfähig war (Abb. 3-30 B). Ebenso konnte die Funktionalität von AP2 nachgewiesen werden, da erwartungsgemäss eine Bindung an das Tyrosin-haltige Sortierungssignal in Kombination mit PtdIns4,5P<sub>2</sub> stattfand (Abb. 3-30 C). Demgegenüber konnte keine Bindung an Liposomen detektiert werden, die sowohl PtdIns4,5P<sub>2</sub> als auch ARF6 GTP enthielten (Abb. 3-30 C). Auch eine Bindung an Liposomen mit Tyrosin-haltigem Signal und ARF6 GTP war nicht nachweisbar (Abb. 3-30 D). Nur das in Kombination mit PtdIns4,5P<sub>2</sub> präsentierte Tyrosin-haltige Signal ermöglichte eine starke Bindung von AP2 an die Liposomen.



**Abbildung 3-30: Bindung von gereinigtem AP2 an ARF6 GTP.** A) Schweinehirn AP2 bindet schwach an PtdIns4,5P<sub>2</sub>-haltige Membranen, nicht aber an solche die nur das Tyrosin-haltige Signal von TGN38 oder ARF6 GTP enthalten. B) Positiv-Kontrolle zum Nachweis der Bindungsfähigkeit von ARF6 GTP. Die GGA1-GAT-Domäne interagiert mit ARF6 GTP. C) Erwartungsgemäß interagiert AP2 effektiv mit Tyrosin-haltigen Sortierungssignalen in PtdIns4,5P<sub>2</sub>-Umgebung. Eine Bindung an Liposomen, die ARF6 GTP und PtdIns4,5P<sub>2</sub> enthalten ist nicht detektierbar. Die Bindung an PtdIns4,5P<sub>2</sub>-haltige Liposomen ist bei diesem Versuch nur sehr schwach ausgeprägt. D) AP2 zeigt keine Wechselwirkungen mit Liposomen, die ARF6 GTP, ARF6 GTP in Kombination mit Tyrosin-haltigem Signal oder ARF6 GTP und PtdIns4,5P<sub>2</sub> enthalten.

Überraschender Weise band AP2 am stärksten an Liposomen, die PtdIns4,5P<sub>2</sub>, ein Tyrosin-haltiges Signal und ARF6 GTP enthielten (Abb. 3-31 A). Allerdings zeigten weitere Kontrolllexperimente, dass dies nicht auf die Anwesenheit von ARF6 GTP zurückzuführen war, sondern auf unspezifische Wechselwirkungen mit Ni-NTA-Lipiden. War ein His-modifiziertes Protein an die freien Ni-NTA-Bindungsstellen gekoppelt, interagierte AP2 schwächer mit der Oberfläche (Abb. 3-31 B).



**Abbildung 3-31: Unspezifische Bindung von gereinigtem AP2 an Ni-NTA-Lipide.** A) AP2 bindet schwach-affin an PtdIns4,5P<sub>2</sub> und mit deutlich höherer Affinität an PtdIns4,5P<sub>2</sub> in Kombination mit einem Tyrosin-haltigen Signal. Die nochmals stärkere Bindung an die Oberfläche mit PtdIns4,5P<sub>2</sub>, Tyrosin-haltigem Signal und ARF6 GTP wird durch unspezifische Bindung an Ni-NTA-Lipide verursacht. B+C) Wird ein Teil der Ni-NTA-Lipide durch Bindung eines His-modifizierten Proteins, wie z.B. ARF6 GTP (B) oder HIV-GAG/CA (C), abgeschirmt, verringert sich die unspezifische Bindung von AP2. Die Bindungsstärke in A), B) und C) ist nicht direkt vergleichbar, da die Interaktionen an verschiedenen Tagen gemessen worden sind und die Bindungsaktivität des aus Schweinehirn-CCVs aufgereinigten AP2s innerhalb weniger Tage deutlich abnahm.

Dabei war unerheblich, welches Protein an die Liposomen gekoppelt wurde, da His-ARF6 GTP, His-ARF6 GDP wie auch die His-modifizierte CA-Domäne des HIV-GAG-Proteins, die als unspezifische Kontrolle fungierte, den gleichen Effekt hatten (Abb. 3-31 C). Die gereinigte CA-Domäne wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Maarten van den Hurk zur Verfügung gestellt.

Es ist wichtig zu betonen, dass die unspezifische Interaktion von AP2 mit unbelegten Ni-NTA-Lipiden nur stattfand, wenn AP2 aufgrund anderer Wechselwirkungen bereits in räumliche Nähe der Liposomen kam. Wir konnten keine unspezifische Bindung an PC/PE/Ni-NTA bzw. PtdIns4,5P<sub>2</sub>/Ni-NTA Liposomen beobachten, wohl aber wenn ein Tyrosin-haltiges Signal und PtdIns4,5P<sub>2</sub> in den Liposomen vorhanden waren. Vermutlich führen die Ladungen der freien Ni<sup>2+</sup>-Ionen zu zusätzlichen elektrostatischen Wechselwirkungen, wenn der AP2 Komplex sich bereits durch Bindung an Tyrosin-haltige Signale in Kombination mit PtdIns4,5P<sub>2</sub> in räumlicher Nähe befindet. Die Ni-NTA-Lipide tragen also nur dann unspezifisch zur Bindung bei, wenn AP2 bereits durch PtdIns4,5P<sub>2</sub>-Y an die Liposomenoberfläche rekrutiert wurde. Zusammenfassend zeigen unsere Analysen, dass aus Schweinehirn gereinigtes AP2 unter unseren Versuchsbedingungen nicht an ARF6 GTP bindet und dass auch eine Kombination aus PtdIns4,5P<sub>2</sub> und ARF6 GTP sowie Tyrosin-haltigem Signal und ARF6 GTP nicht ausreichend ist, um AP2 an Membranen zu binden. Nur Liposomen mit Tyrosin-haltigem Signal in Kombination mit PtdIns4,5P<sub>2</sub> werden durch AP2 hoch-affin gebunden. Leider war es uns nicht möglich zu testen, ob eine Kombination aus allen drei Faktoren die Bindung beeinflusst, da unspezifische Wechselwirkungen mit der von uns verwendeten Liposomenoberfläche auftraten. Um diese Unspezifitäten zu umgehen, muss eine andere Möglichkeit gefunden werden, um ARF6 in den Assay zu integrieren. ARF6 könnte z.B. kovalent an ein modifizierbares Lipid gekoppelt werden oder eben doch als myristoyliertes Protein eingesetzt werden. Beides konnte im Zeitrahmen dieser Arbeit nicht mehr experimentell durchgeführt werden.

## 4. Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden *in vitro* Untersuchungen zur Tyrosinsignal-Bindung der vier heterotetrameren Clathrin-assoziierten Adaptorkomplexe sowie zur Sortierungssignal- und Membranbindung von AP2 durchgeführt.

### 4.1. Methodische Verfahren zur *in vitro* Analyse der AP-Bindung an Sortierungssignale und Membranlipide

Unsere Arbeit steht im Zusammenhang mit Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen, die bereits *in vitro* Analysen zum Vergleich von Signalpräferenzen der Adaptorkomplexe durchgeführt haben. Diese Interaktionsstudien fanden meist mit Hilfe des *Yeast-Two-Hybrid*-System unter Verwendung der gesamten  $\mu$ -Untereinheit der AP-Komplexe statt oder wurden durch *Surface Plasmon Resonance* Analysen mit aus Gewebe gereinigten AP-Komplexen durchgeführt (Ohno *et al.*, 1995; Boll *et al.*, 1996; Aguilar *et al.*, 2001; Ohno *et al.*, 1998; Gough *et al.*, 1999; Heilker *et al.*, 1996). Durch die Verwendung von vollständigen  $\mu$ -Ketten wird das Risiko von falsch positiven und falsch negativen Ergebnissen erhöht, da die kompletten  $\mu$ -Untereinheiten in physiologischen Pufferbedingungen nicht als lösliche Proteine expremierbar sind (persönliche Mitteilung von Herrn Dr. David Owen). Aus Gewebe gereinigte AP-Komplexe haben den Nachteil, dass auch in Spuren vorhandene Unreinheiten die Messungen verfälschen können.

Ohno *et al.*, 1998 und Aguilar *et al.*, 2001 *et al* führten zusätzlich ein Sequenz-Screening mit einer Signalsequenz-Bibliothek, welche alle möglichen Varianten eines XXXYXX $\Phi$ -Peptids beinhaltet, im *Yeast-Two-Hybrid*-System durch, um die Präferenzen verschiedener APs zu testen. Dabei stellte sich heraus, dass  $\mu$ 3 vorwiegend Tyrosin-haltige Signale mit sauren Resten vor und nach dem Tyrosin-Rest bindet; während  $\mu$ 4 aromatische Reste an der  $\Phi$ -Position bevorzugt (Ohno *et al.*, 1998; Aguilar *et al.*, 2001). Für  $\mu$ 1 konnten bisher kaum Präferenzen beschrieben werden, dagegen favorisiert  $\mu$ 2 positive Reste in den X-Positionen. Ein Glycinrest an der Position vor dem Tyrosin-haltigen Signal scheint optimal für Bindung an  $\mu$ 3 zu sein und ist häufig bei lysosomalen Proteinen zu finden (Ohno *et al.*, 1998; Rous *et al.*, 2002). Alle diese Präferenzen sagen allerdings kaum etwas über die Interaktion der  $\mu$ -Ketten mit natürlich vorkommenden Signalen aus.

In der von uns durchgeführten *in vitro* Analyse war es ebenfalls Ziel, die Präferenzen der vier verschiedenen Adaptoren für unterschiedliche Tyrosin-haltige Sortierungssignale zu untersuchen. Dafür verwendeten wir verkürzte und damit lösliche, in *E. coli* expremierte  $\mu$ -Ketten und testeten deren Interaktion mit den Signalsequenzen von verschiedenen Transmembranproteinen. Die Interaktion wurde mit Hilfe von Biacore Biosensoren, also mittels *Surface Plasmon Resonance* gemessen. Die SPR-Analyse ist zur Zeit die Methode der Wahl, um die Spezifität und die Affinität von Protein-Protein-Interaktionen *in vitro* zu messen. Gleiches gilt für *in vitro* Bindungsstudien zwischen Lipiden und Proteinen (Narayan und Lemmon, 2006). SPR-Analysen vereinen viele Vorteile. Die Messungen erfolgen in Echtzeit und sind sehr sensitiv, so dass auch niedrig-affine Bindungsvorgänge erfasst werden. Kein Interaktionspartner benötigt eine Markierung. Im Gegensatz zur *Isothermalen Titrations Calorimetrie* (ITC), bei der für eine Messung mehrere mg der gereinigten Bindungspartner zur Verfügung stehen müssen, sind für die SPR-Analyse Proteinmengen im  $\mu$ g-Bereich ausreichend.

Ein weiterer Pluspunkt der SPR-Analyse ist, dass neben der Bindungsstärke einer Interaktion auch die Kinetik eines Bindungsereignisses bestimmt werden kann. Da trotz gleicher Affinität (gleicher Dissoziationsgleichgewichtskonstante  $K_D$ ) die Kinetik (Ratenkonstanten  $k_a$  und  $k_d$ ) von zwei Interaktionen unterschiedlich sein kann, erhält man durch die zeitaufgelöste Betrachtung zusätzliche Informationen über das Bindungsereignis.

Alternativ könnte für die Messung von Protein-Lipid-Interaktionen der sogenannte *Dot-* oder *Fat-Blot* eingesetzt werden. Hierbei werden die zu untersuchenden Lipide auf eine Nitrocellulose-Membran aufgetropft. Nach der Inkubation des Blots mit potentiell interagierenden Proteinen wird der Blot gewaschen und gebundene Proteine werden nach dem Prinzip des *Western Blots* detektiert. Die Lipide liegen dabei jedoch nicht als Doppelschicht und daher nicht in physiologisch relevanter Membran-ähnlicher Umgebung vor und sind hoch-konzentriert. Dadurch werden oft falsch positive Signale gemessen. Eine quantitative Analyse der Bindung in Form eines  $K_D$ -Wertes kann nicht vorgenommen werden. Der Liposomen-*pull-down* ist eine weitere häufig eingesetzte Methode, die für Protein-Lipid-Interaktionsstudien in Frage kommt, dabei findet die Interaktion zwischen Saccharose-gefüllten Lipid-Vesikeln (Liposomen) und Proteinen in Lösung statt. Gebundenes Protein wird durch Pelletierung der Liposomen von ungebundenem getrennt und mittels *Western Blot*

nachgewiesen. Die zu untersuchenden Lipide befinden sich beim Liposomen-*pull-down* in Membranumgebung. Die Analyse von schwach-affinen Bindungen ist jedoch schwierig, da die Trennung von gebundenem und freiem Protein durch Zentrifugation und damit relativ langsam verläuft. Zusätzlich besteht die Gefahr, dass präzipitiertes Protein pelletiert und dadurch als positives Signal fehlinterpretiert wird. Ausserdem ist eine relativ grosse Menge der Interaktionspartner nötig, um eine Interaktion nachweisen zu können.

Auch mittels ITC kann die Interaktion zwischen Lipiden in Membranumgebung (Liposomen) und Proteinen analysiert werden. Gemessen wird dabei die bei der Bindung frei werdende Reaktionsenergie. Für die ITC-Messung ist jedoch eine noch grössere Menge an Probe erforderlich als beim Liposomen-*pull-down* (Protein im mg-Bereich).

Aufgrund der genannten Vorteile von SPR basierten Interaktionsanalysen (siehe auch Tab. 4-1) wurden alle *in vitro* Untersuchungen zur Signal- und Membranbindung von APs in dieser Arbeit mit Biacore Biosensoren (Biacore 3000, Biacore T100) durchgeführt.

**Tabelle 4-1: Vorteile der SPR-basierten Interaktionsanalyse.**

Probleme bei:		Vorteile von SPR
ITC	grosser Probenbedarf (mg-Bereich)	wenig Probe nötig ( $\mu\text{g}$ -Bereich)
FRET	Fluorochromierung der Probe nötig	keine Markierung
<i>Fat-Blot</i>	Quantifizierbarkeit fraglich	quantifizierbar mit Erhebung von kinetischen Daten
	unphysiologische Lipidumgebung	Verwendung von Liposomen, Membran-Monolayern möglich
	viele falsch-positive Ergebnisse	
Liposomen- <i>pull-down</i>	geringe Sensitivität	hohe Sensitivität
	bei Proteinpräzipitation Gefahr von falsch positiven Ergebnissen	

## **4.2. *In-vitro* Analyse der Interaktion von AP1-4 mit Tyrosin-haltigen Sortierungssignalen**

Heterotetramere Adaptorprotein-Komplexe interagieren über ihre  $\mu$ -Untereinheit mit Tyrosin-haltigen Signalen (YXX $\Phi$ ) von Transmembranproteinen (Ohno *et al.*, 1995; Boll *et al.*, 1996; Ohno *et al.*, 1996; Hirst *et al.*, 1999) und vermitteln dadurch den Transport und die subzelluläre Lokalisation der Proteine in der Zelle. Da jeder der vier AP-Komplexe mit unterschiedlicher Affinität mit den Tyrosin-haltigen Signalen verschiedener Transmembranproteine interagiert, sollte es möglich sein durch *in vitro* gemessenen Affinitäten eines APs für ein spezifisches Signal, Hinweise über die mögliche intrazelluläre Sortierung des Signal-beinhaltenen Membranproteins zu erhalten. Daher sollten in dieser Arbeit die Affinitäten aller vier Adaptor Komplexe (AP1-4) für verschiedene Tyrosin-haltige Signale bestimmt werden.

Bei der kinetischen Auswertung unserer Interaktionsdaten stellten wir allerdings fest, dass die Interaktion zwischen dem c-terminalen Teil der  $\mu$ -Ketten und den Sortierungssignal-haltigen Peptiden nicht, wie angenommen, auf einer 1:1 Bindung, also auf einer einfachen Bindung zwischen YXX $\Phi$ -Signal und seiner Bindungstasche, beruht. Daher wurde zunächst diese Abweichung näher untersucht.

### **4.2.1. Abweichung der Interaktion zwischen c- $\mu$ -Ketten und Signalpeptiden vom 1:1 Bindungsmodell**

Die kinetische Auswertung von Biacore-generierten Daten erfolgt durch die Anpassung von berechneten Kurven an die gemessenen Original-Kurven mit Hilfe eines mathematischen Algorithmus (Marquardt-Levenberg Algorithmus). Die berechneten Kurven werden aufgrund eines Bindungsmodells erstellt. Das einfachste Bindungsmodell (Langmuir-Modell), das für die theoretische Kurvenberechnung verwendet wird, geht von einer 1:1 Bindung zwischen Analyt und Ligand aus. Weitere in der Evaluations-Software enthaltene Modelle beziehen kleinere Messstörungen, wie Massentransporteffekte und Basislinienabfall in die Berechnungen mit ein. Andere Modelle sind für die Auswertung von komplexeren Bindungen geeignet z.B. können durch das Modell für bivalente Analyten die Daten einer Antikörper-Antigen-Interaktion kinetisch ausgewertet werden.

Wenn bei einer gemessenen Interaktion Abweichungen vom 1:1 Bindungsmodell festgestellt werden, was nicht selten der Fall ist, muss zunächst die Ursache dafür

ermittelt werden. Prinzipiell können die Ursachen für eine solche Abweichung in drei Gruppen eingeteilt werden: 1. Die Abweichung kann instrumentell bedingt sein; 2. durch nicht optimale experimentelle Bedingungen verursacht werden (Unspezifische Interaktionen durch Verunreinigungen, Massentransport-limitierte Bindung, *Rebinding* des Analyten) oder 3. durch eine komplexere Bindungsreaktion an sich begründet sein (Konformationsänderung, Two-state-Reaktion, Dimerisierung, heterogene Bindungsstellen) (Khalifa *et al.*, 2001).

Eine Abweichung vom 1:1 Model durch Geräte-spezifische Probleme wurde bereits durch Karlsson und Falt, 1997 und Witz, 1999 erörtert und generell für Biacore-Anwendungen ausgeschlossen. Daher konzentrierte sich die Suche nach der Ursache der Abweichung zunächst auf möglicherweise nicht optimale Versuchsbedingungen.

#### **4.2.1.1. Optimierung der Versuchsbedingungen**

Grundsätzlich sei noch einmal erwähnt, dass einige generelle Voraussetzungen beim Versuchsaufbau und eine sorgfältige Durchführung der Analyse gewährleistet sein müssen, um qualitativ hochwertige Daten zu generieren. Die zu berücksichtigenden Punkte sind unter 2.2.3.1. erläutert und während der Arbeit beachtet worden.

Um bestmögliche experimentelle Bedingungen zu schaffen, erfolgte eine Optimierung der Pufferbedingungen (3.1.3.1.) und der Ligandendichte (3.1.3.2.).

Da beim ursprünglichen Versuchsaufbau die erforderliche, niedrige Ligandendichte nicht erreicht werden konnte, wurde der Versuchsaufbau grundsätzlich verändert. Statt wie bis dahin, Tyrosinsignal-haltige Peptide auf die Chipoberfläche zu koppeln, wurde c- $\mu$ 2 als Ligand auf der Oberfläche immobilisiert und das Tyrosinsignal-haltige Peptid als Analyt eingesetzt (3.1.5.).

Durch die Optimierung der Pufferbedingungen, den "umgedrehten" Versuchsaufbau mit optimaler Ligandendichte und die Beachtung von, für die korrekte Versuchsdurchführung wichtigen Punkten waren bestmögliche Interaktionsbedingungen gegeben. Trotzdem wichen die gemessenen Interaktionen zwischen den c- $\mu$ -Ketten und Tyrosinsignal-haltigen Peptiden noch immer vom erwarteten 1:1 Bindungsmodell ab. Daher war davon auszugehen, dass eine komplexere Bindungssituation als ursprünglich angenommen vorliegt.

#### **4.2.1.2. Einfluss von positiv-geladenen Aminosäuren auf die Interaktion zwischen c- $\mu$ -Ketten und Signalpeptiden**

Wenn die kinetischen Daten einer Interaktion nicht einer 1:1-Kinetik folgen, kann dies durch eine komplexere Bindungsreaktion begründet sein. Dazu zählen z.B. Konformationsänderung bei Bindung, Dimerisierung oder die Beteiligung von mehreren Bindungsereignissen (heterogene Bindung).

Auf die von uns gemessenen Daten lies sich das in der Biacore Evaluierungs-Software integrierte Model für eine sogenannte Two-State-Interaktion anwenden. Dieses Bindungsmodel bezieht bei der Berechnung der theoretischen Kurven eine Konformationsänderung nach Komplexbildung mit ein.

Durch eine gute Anpassung zwischen gemessenen und theoretischen Kurven allein, kann allerdings nicht unmittelbar auf die zu Grunde liegenden Bindungs-Mechanismen geschlossen werden (siehe auch 3.1.5.1.), da bei einem komplexeren Bindungsmodel mehr Variablen in die Kurvenberechnung einfließen. Dadurch steigt die Gefahr, dass sich ein Model auch auf Interaktionen anwenden lässt, denen ganz andere Bindungsereignisse zu Grunde liegen (Karlsson und Falt, 1997). Aufgrunddessen wurde zunächst getestet, ob eine Two-State-Interaktion wirklich stattfindet (3.1.5.1.), dies war allerdings nicht der Fall.

Auch durch Dimerisierung können Abweichungen vom 1:1 Model auftreten. Durch analytische Gelfiltration wurde gezeigt, dass keine Dimerisierung der Komponenten zu Grunde liegt (3.1.5.2.).

Eine weitere bekannte Ursache für Model-Abweichungen kann eine heterogene Interaktion sein, d.h. ein Bindungsvorgang wird durch mehrere verschiedene Bindungsereignisse beeinflusst. Dies kann z.B. durch zwei unterschiedlich affine, aber physiologische Interaktionen oder durch unspezifische Wechselwirkungen hervorgerufen werden. Da alle verwendeten Tyrosinsignal-haltigen Peptide proximal des Tyrosin-Restes 2-4 positiv geladene Reste enthielten (Abb. 3-9) und einige Veröffentlichungen die Interaktion zwischen  $\mu_2$  und einem aus zwei positiv geladenen Aminosäuren bestehenden, basischen Sortierungssignal postulieren, stellte sich die Frage, ob die entsprechenden Reste in unseren Peptiden Einfluss auf das Bindungsgeschehen zwischen den  $\mu$ -Ketten und den Peptiden nehmen.

Der erste Hinweis auf ein aus zwei positiven Resten bestehendes Sortierungssignal wurde durch Kappler *et al.*, 1994 publiziert. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden,

dass die Mutation zweier Lysine im cytoplasmatischen Teil eines Membranproteins, in diesem Fall des im *ER-Golgi intermediate compartment* lokalisierten Proteins ERGIC-53, zur Inhibition der Endocytose des Proteins führt. In neueren Veröffentlichungen wurde der Einfluss von zwei aufeinanderfolgenden positiven Aminosäuren auf die Endocytose von multimeren Membranproteinen beschrieben. Dies betrifft z.B. den Glutamatrezeptor vom AMPA-Typ (Lee *et al.*, 2002; Kastning *et al.*, 2007), den  $\alpha_{1B}$ -adrenergen Rezeptor (Diviani *et al.*, 2003), den GABA<sub>A</sub>-Rezeptor (Kittler *et al.*, 2005) und spannungs-abhängige Natriumkanäle (Fache *et al.*, 2004). Auch die bereits beschriebene Interaktion von  $\mu_2$  mit dem an der Endozytose beteiligten Protein Synaptotagmin beruht auf zwei basischen Resten (Zhang *et al.*, 1994; Chapman *et al.*, 1998; Haucke *et al.*, 2000).

Um der Vermutung nachzugehen, dass eine Interaktion zwischen c- $\mu_2$  und dem basischen Teil der Peptide stattfinden kann, testeten wir die Interaktion von c- $\mu_2$  mit dem wtTGN38-Peptid und dem TGN38m-Peptid, dessen Tyrosin durch ein Alanin ausgetauscht war sowie mit einem kurzen TGN38-Peptid (DYQRLN) ohne den proximalen basischen Anteil. Ausserdem testen wir die Interaktion mit einem aus Synaptotagmin stammenden, basischen Peptid, welches als  $\mu_2$ -bindend beschrieben worden ist. Die entsprechenden Experimente zeigten, dass die positiven Ladungen in der Tat die Bindung von c- $\mu_2$  an die Tyrosinsignal-haltigen Peptide beeinflussen können (3.1.5.3.).

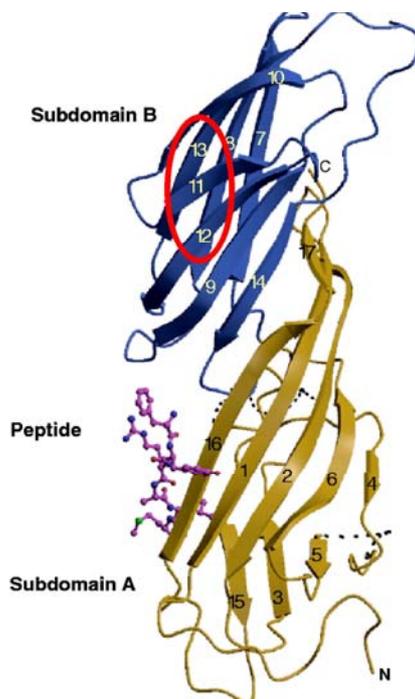
Ein weiterer Hinweis für die Beteiligung basischer Reste an der Bindung von c- $\mu_2$  an das TGN38m-Peptid lieferten die bei der Pufferoptimierung durchgeführten Experimente in Niedrigsalz-Puffer und in Hochsalz-Puffer (3.1.3.1.). Die Erhöhung der Salzkonzentration verminderte die Interaktion mit TGN38m. Die schwächer-affine, Tyrosin-unabhängige Wechselwirkung zwischen c- $\mu_2$  und TGN38m wird also vermutlich durch elektrostatische Wechselwirkungen - über die basischen Reste im Peptid - vermittelt.

Der Einfluss der basischen Reste auf die Interaktion zwischen den c- $\mu$ -Ketten und Tyrosin-haltigen Signalen scheint demnach in unserem *in vitro* System gegeben zu sein. Diese zusätzliche Interaktionsmöglichkeit könnte somit die Abweichung der gemessenen Kurven vom 1:1 Model verursachen. Fraglich bleibt allerdings, wo genau die Bindung an die  $\mu$ -Ketten stattfindet und ob sie physiologisch relevant ist.

#### 4.2.1.3. Suche nach einem passenden Bindungsmodell

Die positiven Ladungen der Peptide könnten mit der in c- $\mu$ 2 befindlichen Synaptotagmin Bindungsstelle interagieren (Haucke *et al.*, 2000), unspezifisch mit  $\mu$ 2 in Wechselwirkung treten oder die Bindung könnte in räumlicher Nähe des Tyrosin-haltigen Signals stattfinden.

Die durch Haucke *et al.*, 2000 beschriebene Bindungsstelle für Synaptotagmin befindet sich im c-terminalen Anteil der  $\mu$ 2-Untereinheit, genauer in der Subdomäne B. Die Bindungsstelle für YXX $\Phi$ -Signale befindet sich hingegen in der Subdomäne A (Owen und Evans, 1998, Abb. 4-1). Vorstellbar ist, dass ein Signalpeptid-Molekül über die positiven Reste mit der Synaptotagmin-Bindungsstelle interagieren kann und ein weiteres Peptid-Molekül mit der YXX $\Phi$ -Bindungsstelle. Damit wäre eine gleichzeitige Bindung von zwei Peptid-Molekülen an eine c- $\mu$ 2-Kette möglich, allerdings mit unterschiedlicher Affinität. Ein für diese Interaktion passendes Bindungsmodell müsste demnach zwei konkurrierende Bindungen an ein und denselben Liganden mit unterschiedlicher Affinität beinhalten.



**Abbildung 4-1: Kristallstruktur des C-terminalen Teils von  $\mu$ 2.** In Haucke *et al.*, 2000 wurde postuliert, dass sich die Synaptotagmin-Bindungsstelle in der Subdomäne B der  $\mu$ 2-Untereinheit befindet, hier durch einen roten Kreis gekennzeichnet ( $\beta$ -Strang 11, 12, 13). Die Bindungsstelle für Tyrosin-haltige Signale befindet sich in Subdomäne A (Verändert nach Owen und Evans, 1998).

Eine andere Interaktionsmöglichkeit zwischen positiven Resten und der c- $\mu$ 2-Kette, wäre die Bindung in unmittelbarer Nähe des YXX $\Phi$ -Signals.

Für das Zelladhäsionsprotein P-Selektin wurde bereits nachgewiesen, dass neben dem Tyrosin-haltigen Signal eine weitere Aminosäure für die Bindung an  $\mu$ 2 verantwortlich ist (Owen *et al.*, 2001). Dies betrifft einen Leucin-Rest drei Reste proximal des Tyrosins, der mit einer weiteren hydrophoben Bindungstasche in  $\mu$ 2

interagiert. Aus der Struktur der Bindungstasche war ersichtlich, dass sowohl eine Interaktion mit hydrophoben als auch mit positiven Aminosäuren an der Y-3 Position möglich ist.

Eine solche zusätzliche Interaktion mit c- $\mu$ 2 in der Nähe der YXX $\Phi$ -Bindungsstelle ist auch im Falle von anderen positiven Resten denkbar. Bei dieser Interaktion würde jede c- $\mu$ 2-Kette nur ein Peptid-Molekül binden und die beiden unterschiedlich affinen Bindungsereignisse würden nicht konkurrieren, sondern sich gegenseitig stabilisieren. Für beide Interaktionsmöglichkeiten existiert in der Biacore Evaluierungssoftware zur Zeit allerdings kein Bindungsmodell, so dass eine kinetische Auswertung der Interaktion auf diesem Wege nicht möglich war.

#### **4.2.1.4. Bedeutung des Einflusses der positiven Reste *in vivo***

Die Frage, ob die schwach-affine, auf basischen Resten basierende Interaktion mit den  $\mu$ -Ketten *in vivo* Bedeutung hat, konnte durch unsere Analyse nicht geklärt werden. Vergleicht man die Sortierungssignal-Sequenzen verschiedener Membranproteine fällt auf, dass 2-3 aufeinanderfolgende positiv-geladene Reste häufig direkt an der Transmembrandomäne befindlich sind (Abb. 4-2). Dies könnte *in vivo* in Anbetracht der negativen Ladung der inneren Membranseite für eine Ausrichtung des cytoplasmatischen Teils der Proteine ins Cytoplasma wichtig sein. Bei unserem optimierten, "umgedrehten" Versuchsaufbau sind die Peptide allerdings frei in Lösung. Dadurch könnte der Einfluss der sonst dicht an der Membran befindlichen positiv-geladenen Reste überbewertet sein, da eine Interaktion mit sonst nicht "erreichbaren" Bindungsstellen der  $\mu$ -Ketten möglich ist.

Allerdings gibt es auch vor dem getesteten Tyrosin-haltigen Signal von TGN38 vier positiv-geladene Reste, die einen Einfluss auf die Bindung an die  $\mu$ -Ketten haben, sich aber nicht unmittelbar an der Membran befinden. Ähnliche Beispiele für Proteine mit positiven Resten nicht direkt im Anschluss an die Transmembrandomäne sind das *Cytotoxic T-lymphocyte Protein 4* (CTLA) und der MPR300 (Abb. 4-2). Berücksichtigt werden muss dabei jedoch, dass bei unserer Interaktionsmessung nur mit einem Teilstück des gesamten cytoplasmatischen Anteils von TGN38 gearbeitet wurde (Abb. 3-2). Die Lage, mögliche Sekundärstrukturen und die Interaktion mit anderen Proteinen und der Membran könnten daher die Interaktion der basischen Reste mit Adaptorproteinen *in vivo* beeinflussen.

LAMP1	Human	TM-RKRSHAGYQTI
LAMP-2A	Human	TM-KKHHNTGYEQF
LAMP-2B	Human	TM-RRKSYAGYQTL
LAMP-2C	Human	TM-RRKSRTGYQSV
CD63	Human	TM-KSIRSGYEVN
CD68	Human	TM-RRRPSAYQAL
CD1b	Human	TM-RRRSYQNIP
CD1c	Human	TM-KKHCSYQDIL
CD1d	Maus	TM-RRRSAYQDIR
GMP-17	Human	TM-HCGGPRPGYETL
Endolyn	Ratte	TM-KFCKSKERNYHTL
TSC403	Human	TM-KIRLRCSSGYQRI
Cystinosin	Human	TM-HFCLYRKRPGYDQLN
Putative solute carrier	Human	TM-12-SLSRGSYKEI
TRP-2	Human	TM-RRLRKGYTPLMET-11
HLA-DM $\beta$	Human	TM-RRAGHSSYTPLPGS-9
LmpA	Dictyostelium	TM-KKLRQQKQQGYQAIINNE
putative lysosomal protein	Dictyostelium	TM-RSKSNQNQSYNLIQL
LIMP-II	Dictyostelium	TM-RKTFYNNNQYNGYNIIN
Transferrin-Rezeptor	Human	9-SNLFGGELPSYTRFSLA-35-TM
Asialoglycoprotein receptor H1	Human	MTKEYQDLQHL-29-TM
CI-MPR	Human	TM-15-CRRSSNVSYKYSKVNKE
CD-MPR	Human	TM-33-RSKPRNVPAAYRGGVDD-16
CTLA-4	Human	TM-3-KKRSPLTTGVYVKMPPT-16
Furin	Human	TM-10-VYTMDRGLISYKGLPPE-29
TGN38	Ratte	TM-16-KVTRRPKASDYQRLNLKL
gp41	HIV-1	TM-6-LSIINRVRQGYSPLSFQT
Acid phosphatase	Human	TM-RMQAQPPGYRHVADGEDHA

**Abbildung 4-2: Tyrosin-haltige Sortierungssignale von verschiedenen Transmembranproteinen.** Das Tyrosin-haltige Sortierungssignal ist fett, basische Reste sind rot und saure blau dargestellt. Die Position der Transmembrandomäne (TM) ist angegeben. (Verändert nach Bonifacino und Traub, 2003.)

#### 4.2.1.5. Optimaler Versuchsaufbau für die $\mu$ -YXX $\Phi$ -Interaktionsmessung

Um möglichst störungsfrei nur die "isolierte" Affinität zwischen den  $\mu$ -Ketten und den verschiedenen YXX $\Phi$ -Signalen bestimmen zu können, sollte idealerweise folgender Versuchsaufbau verwendet werden: Für die Messung der eigentlichen Bindung zwischen  $\mu$ -Ketten und YXX $\Phi$ -Signal würde es ausreichen, wenn die verwendeten Signalpeptide den jeweiligen Signal-Sequenz-Bereich XXYXX $\Phi$  umfassen und sich sonst nicht unterscheiden. Je mehr Aminosäuren im Peptid variieren, desto eher können Affinitätsunterschiede auf nicht zum YXX $\Phi$ -Signal gehörenden Aminosäuren beruhen. Daher sollten Peptid-Chimeren mit einem allgemeinen, gut löslichen N-terminalen Teil und der jeweiligen XXYXX $\Phi$ -Sequenz eingesetzt werden. Als Kontrollpeptid könnte dann nur der erste Teil der Chimere ohne YXX $\Phi$ -Signal verwendet werden, da die Referenzoberfläche den gleichen Grad an unspezifischen Bindungen, wie die aktive Oberfläche aufweisen sollte (Karlsson und Falt, 1997). Da die Signale *in vivo* an der Membran "fixiert" und nicht frei beweglich sind, ist es am günstigsten die Peptide als Ligand zu verwenden, also an der Chipoberfläche zu immobilisieren. Um die Situation *in vivo* am besten zu repräsentieren, ist ausserdem eine Membrenumgebung für die Peptide am geeignetsten. Dazu könnten die Peptide an Lipide gekoppelt und dann in Liposomen intergriert werden (2.2.2.11.). Um eine gute Auswertbarkeit zu gewährleisten, sollten die Liposomen nur aus Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin bestehen, zwei Lipide, die nur geringe unspezifische Wechselwirkungen hervorrufen. Weitere zusätzliche Membranlipide würden die natürliche Membrenumgebung besser widerspiegeln, z.B. könnte durch den Zusatz von Phosphatidylserin die negative Ladung der Membranen besser repräsentiert werden. Jedoch würden dadurch wieder erneute Interaktionsmöglichkeiten geschaffen, die die Auswertung verkomplizieren. Unter den genannten Voraussetzungen sollte eine störungsfreie kinetische Analyse der Bindung zwischen den  $\mu$ -Ketten und unterschiedlichen YXX $\Phi$ -Signalen möglich sein.

### 4.2.2. Tyrosinsignal-Bindung von AP1-4

Aufgrund der zuvor beschriebenen, heterogenen Interaktion zwischen den c- $\mu$ -Ketten und den Tyrosinsignal-haltigen Peptiden war die Erhebung von kinetischen Daten nicht möglich. Um eine vergleichende Analyse der Bindungsstärke der vier c- $\mu$ -Ketten mit den YXX $\Phi$ -Signalen dennoch durchführen zu können, wurden die gemessenen Signalhöhen bei gleicher Analytkonzentration (normiert für die Grösse des Analyten und die Ligandendichte) gegenübergestellt (Abb. 3-3).

Bei dem für diese Analyse verwendeten Kontrollpeptid TGN38m ist nur der Tyrosinrest zu einem Alaninrest mutiert, ansonsten entspricht die Sequenz der des TGN38-Peptids. Wie bereits erläutert, stellte sich heraus, dass gerade unter den für die Analyse verwendeten Pufferbedingungen (150 mM NaCl) dieses Referenzpeptid nicht optimal ist, da die hydrophobe Aminosäure in Y+3 Position und der basische Anteil des TGN38-Peptids noch enthalten sind. Daher können die aus der Analyse erhaltenen Daten Tendenzen aufzeigen, kleinere Affinitätsunterschiede sind allerdings nicht interpretierbar. Die Tendenz der gemessenen Bindungsstärken der vier lysosomalen Proteine LAMP-1, LAMP-2A, LAMP-2B und CD63 sowie des hauptsächlich im Golgi-Apparat lokalisierten TGN38 mit den c- $\mu$ -Ketten ist vergleichend in Tab. 4-2 aufgeführt.

**Tabelle 4-2: Interaktion zwischen Tyrosin-haltigen Sortierungssignalen und dem c-terminalen Teil der  $\mu$ -Ketten.** Die gemessene Bindungsstärke zwischen TGN38 und c- $\mu$ 2 wurde gleich eins, alle anderen Werte ins Verhältnis dazu gesetzt. Dabei ist zu beachten, dass die Interaktionen im Fall von c- $\mu$ 4 mit doppelter Analytkonzentration gemessen wurden. (siehe auch Abb. 3-3)

	TGN38 (-ASDYQRL)	LAMP-1 (-HAGYQTI)	LAMP-2A (-NTGYEQF)	LAMP-2B (-YAGYQTL)	CD63 (-RSGYEVN)
c- $\mu$ 1	0,9	0,9	0,2	0,7	0
c- $\mu$ 2	1	0,5	0,7	0,3	0,2
c- $\mu$ 3	0,5	0,7	0,7	0,5	0,7
c- $\mu$ 4	0,2	0,1	0,05	0	0,05

Eine wichtige Ausgangsvermutung für diese Arbeit war die Überlegung, dass eine vergleichende Analyse der Sortierungssignal-Bindung an die  $\mu$ -Ketten der 4 Adaptor-Komplexe Präferenzen aufzeigt, welche im besten Fall die Vorhersage ermöglichen, ob ein Signal von einem AP-Komplex erkannt wird oder nicht.

Diese Annahme muss zum gegenwärtigen Zeitpunkt als zu simpel verworfen werden. Beim Vergleich der Bindung aller getesteten Signale mit den vier  $\mu$ -Ketten fällt auf, dass alle Signale c- $\mu$ 4 mit niedrigster Affinität binden (Tab. 4-2). Trotzdem erlaubt dies nicht unmittelbar eine Rolle von AP4 in der Sortierung der betreffenden Proteine auszuschliessen. Dies sei am Beispiel der Bindung der Signale an c- $\mu$ 2 erläutert. TGN38 und LAMP-2A binden c- $\mu$ 2 mit der höchsten Bindungsstärke (1 und 0,7), während LAMP-1 schon weniger stark (0,5) gebunden wird und nur eine schwache Bindung von c- $\mu$ 2 an LAMP-2B (0,3) und CD63 (0,2) zu detektieren war (Tab. 4-2). Angesichts der sehr schwachen Bindung von c- $\mu$ 2 an LAMP-2B und CD63 könnte man versucht sein, diese beiden Proteine als nicht an AP2 bindend zu beschreiben. Allerdings ist für alle getesteten Proteine eindeutig belegt, dass sie von der Plasmamembran endocytiert werden können (Eskelinen *et al.*, 2003; Banting, 1996). Und es ist davon auszugehen, dass dies durch das jeweilige YXX $\Phi$ -Signal und zwar durch die Interaktion des Signals mit AP2 vermittelt wird. Trotzdem ist die *in vitro* Analyse nicht "nutzlos", da die gemessene Bindung eben keine entweder-oder-Antwort liefert, sondern nach wie vor ein Mass für die Affinität zum jeweiligen Adaptor ist. Demnach wären die Werte für die Bindung an c- $\mu$ 2 in der Weise zu interpretieren, dass die Endocytose von TGN38 deutlich effizienter sein sollte, als die von CD63. Allerdings steht ein solcher, direkter Vergleich von *in vitro* Daten und zellulärem Geschehen noch aus. Für AP2 ist dieses wichtige Experiment relativ leicht zu verwirklichen, da der Nachweis von Endocytose sehr einfach ist, sich leicht quantifizieren lässt und mit keinem anderen Sortierungsschritt interferiert. Dies sieht bei den intrazellulären Adaptorkomplexen AP1, AP3 und AP4 ganz anders aus. Kein intrazellulärer Sortierungsschritt im endosomalen-lysosomalen System ist experimentell direkt zugänglich und auch eine Quantifizierung ist schwer umzusetzen. In Adaptor-defizienten Zellen oder bei Überexpression von Transmembranproteinen ist eine Fehlsortierung der zu untersuchenden Proteine in andere Transportwege möglich, aber nur schwer nachzuweisen. Vor allem da sowohl AP1 als auch AP3 dafür sorgen, dass die zu sortierenden Proteine vorwiegend intrazellulär bleiben. Es ist daher nach wie vor schwierig, die Bedeutung eines intrazellulären AP-Komplexes bei der Sortierung eines bestimmten Proteins zu definieren. Diese Probleme spiegeln auch die zahlreichen *in-vitro*-Interaktionsanalysen und Untersuchungen an Zellen, darunter auch Adaptor-defizienter Zellen, wider, deren

Gegenstand die zelluläre Sortierung aller hier untersuchten Membranproteine war. Die Ergebnisse dieser Studien stimmen im Grundtenor überein, im Detail weisen sie aber Diskrepanzen auf. Daher ist die Frage, welches Lamp-Protein welchen Adaptor-Komplex nutzt bzw. nutzen kann, um den Ort seiner Funktion zu erreichen, immernoch offen.

#### *Bindung der Tyrosin-haltigen Signale an AP4*

Vor dem Hintergrund der Tatsache, dass die an der YXX $\Phi$ -Bindung beteiligten Reste bei allen  $\mu$ s konserviert sind, ist die sehr schwache Bindung von c- $\mu$ 4 mit allen getesteten Signalen überraschend (Tab 4-2). Allerdings entspricht dies den bereits mittels *Yeast-Two-Hybrid*-Analyse gewonnenen Daten anderer Arbeitsgruppen über die *in vitro* Interaktion von c- $\mu$ 4 mit Tyrosin-haltigen Signalen. Stephens und Banting, 1998 konnten keine Interaktion der cytoplasmatischen Domäne von TGN38 mit  $\mu$ 4 nachweisen. Eine spezifische, aber sehr schwache Interaktion von  $\mu$ 4 mit dem Tyrosin-haltigen Signal von CD63 wurde durch Hirst *et al.*, 1999 gefunden. Auch die Interaktion zwischen  $\mu$ 4 und LAMP-1 sowie LAMP-2 wurde als spezifisch, aber schwächer als die Interaktion mit  $\mu$ 2 und  $\mu$ 3 charakterisiert (Stephens und Banting, 1998; Aguilar *et al.*, 2001).

Keine der in unserem Labor bislang getesteten Tyrosin-haltigen Signale besitzt eine Bindungsstärke für  $\mu$ 4, die mit  $\mu$ 1- $\mu$ 3 vergleichbar ist. Dies mag daran liegen, dass  $\mu$ 4 andere bisher unbekannte oder unbeachtete Sortierungssignale bindet. Simmen *et al.*, 2002 postulieren zum Beispiel eine Beteiligung von AP4 bei der basolateralen Sortierung von Proteinen über die Bindung an Sortierungssignale, die nicht dem YXX $\Phi$ -Typ angehören. Welche Funktion AP4 in der Zelle inne hat, bleibt durch weitere Experimente zu überprüfen. Unsere Biacore-basierte Bindungsanalyse bietet dabei eine geeignete Plattform, um die Affinität von AP4 für entsprechende Signalsequenzen in Zukunft nachzuweisen.

#### *Bindung von TGN38 an AP1-3*

Betrachtet man die Interaktion der c- $\mu$ -Ketten mit dem Tyrosin-haltigen Signal von TGN38, fällt auf, dass das Signal von allen  $\mu$ -Ketten relativ stark gebunden wird

(siehe Tab. 4-2). Die stärkste Interaktion war mit c- $\mu$ 2 (1) und mit c- $\mu$ 1 (0,9) sowie eine starke Interaktion mit c- $\mu$ 3 (0,5) messbar (Tab. 4-2).

Stephens und Banting, 1998 zeigten mittels *Yeast-Two-Hybrid-Analyse*, dass die komplette cytoplasmatische Domäne von TGN38 mit hoher Affinität mit  $\mu$ 2, jedoch nur schwach mit  $\mu$ 1 und  $\mu$ 3 interagiert. Ausserdem konnten sie zeigen, dass der Kontext in dem das Signal präsentiert wird wichtig für die Signalerkennung durch die  $\mu$ -Untereinheiten ist. Ohne die vier vom Tyrosin-haltigen Signal aus weiter c-terminal gelegenen Reste konnte eine stärkere Bindung aller  $\mu$ -Ketten an das Signal nachgewiesen werden (Sequenz siehe Abb. 4-2). Auch bei dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Signalpeptid handelt es sich nur um einen Teilabschnitt der cytoplasmatischen Domäne, C- wie auch N-terminal nach dem Tyrosin-haltigen Signal befinden sich *in vivo* weitere Reste, die die Bindung an die  $\mu$ -Untereinheiten beeinflussen könnten.

TGN38 ist ein hauptsächlich am TGN lokalisiertes Protein, dass ständig zur Plasmamembran und über frühe Endosomen wieder zurück zum TGN transportiert wird (zusammengefasst in Banting und Ponnambalam, 1997). Sowohl die *steady-state* Lokalisation von TGN38, als auch die Internalisierung des Proteins wird durch das SDYQRL-Signals vermittelt (Wong und Hong, 1993, Bos *et al.*, 1993). Welche Adaptorinteraktion für die "Transportrunden" wichtig sind, ist nicht eindeutig belegt.

Diese und weitere Arbeiten zeigen, dass AP2 stark mit dem Tyrosin-haltigen Signal von TGN38 interagiert (Ohno *et al.*, 1995; Stephens und Banting, 1998; diese Arbeit). Die effiziente Interaktion mit AP2 ist vermutlich für eine schnelle Internalisierung von TGN38 erforderlich, welche wiederum für die "Transportrunden" des Proteins notwendig ist.

Der Weitertransport von TGN38 von frühen Endosomen zurück zum TGN könnte durch AP1 vermittelt werden, da Daten verschiedener Arbeitsgruppen für eine Funktion von AP1 beim retrograden Transport sprechen (Mallard *et al.*, 1998; Meyer *et al.*, 2000; Falguieres *et al.*, 2001) und wir eine gute Interaktion zwischen c- $\mu$ 1 und TGN38 detektieren konnten. Falls AP1 tatsächlich den Rücktransport zum TGN vermittelt, ist allerdings verwunderlich, dass kaum ein Unterschied zwischen der c- $\mu$ 1-Bindung von TGN38 und LAMP-1 messbar ist, obwohl beide eine unterschiedliche Sortierung in der Zelle erfahren müssen, da TGN38 im TGN und LAMP-1 im Lysosom lokalisiert ist. Wenn TGN38 durch die Interaktion mit AP1 vom

endosomalen Kompartiment zum TGN transportiert werden würde, sollte keine bzw. nur eine schwache Bindung von c- $\mu$ 1 an LAMP-Proteine detektierbar sein.

Da allerdings die subzelluläre Lokalisation von AP1 und AP3 äusserst umstritten ist, ebenso wie die Route, in welche die Sortierung durch die beiden Adaptoren erfolgt (E zum TGN; EE zum LE oder LE zum Lys), kann und soll hier keine abschliessende Bewertung der intrazellulären Verhältnisse bei der Sortierung von TGN38 und den LAMP-Proteinen erfolgen.

### *Bindung lysosomaler Membranproteine an AP1-3*

Die lysosomalen Membranproteine LAMP-1, LAMP-2 und CD63, deren Sortierungssignalbindung an  $\mu$ -Ketten hier analysiert wurde, stellen mehr als 50 % aller Proteine der lysosomalen Membran dar (Eskelinen *et al.*, 2003). Der Transport von neu synthetisiertem LAMP-1, LAMP-2 und CD63 erfolgt hauptsächlich intrazellulär, vom TGN in das endosomale-lysosomale System (Barriocanal *et al.*, 1986; D'Souza und August, 1986; Green *et al.*, 1987; Carlsson und Fukuda, 1992; Akasaki *et al.*, 1995; Akasaki *et al.*, 1996; Gough *et al.*, 1999; Rous *et al.*, 2002; Ihrke *et al.*, 2004). Dass das Tyrosin-haltige Signal im cytoplasmatischen Teil der Proteine für den intrazellulären Transport und die lysosomale Lokalisierung verantwortlich ist, wurde bereits durch mehrere Studien belegt. Durch Mutation der im Signal enthaltenen G-, Y- und/oder  $\Phi$ -Reste werden LAMP-1 (Williams und Fukuda, 1990; Harter und Mellman, 1992; Guarnieri *et al.*, 1993; Honing und Hunziker, 1995; Rohrer *et al.*, 1996); die LAMP-2 Isoformen (Gough und Fambrough, 1997; Gough *et al.*, 1999) und CD63 (Rous *et al.*, 2002) vermehrt an der Plasmamembran exponiert. Trotz dieser Gemeinsamkeiten unterscheiden sich die intrazelluläre Lokalisation und die Transportrouten der Proteine in Nuancen. Beispielsweise sind Lamp-2A, -2B und -2C alternative Spliceformen ein und des selben Genes mit unterschiedlicher Transmembran- und cytosolischer Domäne (Gough *et al.*, 1995; Hatem *et al.*, 1995; Konecki *et al.*, 1995), deren subzelluläre *steady-state* Verteilung sich durch eine mehr oder weniger starke Plasmamembran-Expression unterscheidet (Gough und Fambrough, 1997). Auch ist noch ungeklärt, welcher Adaptorprotein-Komplex, an welcher zellulären Transportstation für die intrazelluläre Sortierung der einzelnen Proteine verantwortlich ist.

Die beiden zurzeit im Zusammenhang mit der intrazellulären, lysosomalen Sortierung hauptsächlich diskutierten Adaptoren sind AP1 und AP3. Bei unserer Interaktionsanalyse konnte eine starke Interaktion von c- $\mu$ 3 (0,5-0,7) mit allen getesteten lysosomalen Signalsequenzen detektiert werden. Die Bindung von c- $\mu$ 1 an die Signale von LAMP-1 (0,9) und LAMP-2B (0,7) entsprach in etwa der Bindung von c- $\mu$ 3 an diese Signale. Allerdings interagierte c- $\mu$ 1 nicht mit dem CD63-Peptid und kaum mit dem LAMP2A-Peptid (0,2) (Tab. 4-2). Wie lassen sich unsere *in vitro* Daten mit der Situation in der Zelle korrelieren? Mit anderen Worten beeinflusst die niedrigere Affinität des LAMP-2A-Signals und des CD63-Signals für AP1, die subzelluläre Lokalisation und den Sortierungsweg der Proteine.

Um dieser Frage näher zu kommen, wäre eine Analyse der Sortierung der Proteine auf zellulärer Ebene nötig. Wie oben bereits erläutert, ist die intrazelluläre Sortierung jedoch schwer untersuchbar.

Die Arbeiten, die bereits die Sortierung von lysosomalen Proteinen in AP-defizienten Zellen untersucht haben, beschränken sich daher leider meist auf eine Beschreibung der *steady-state* Verteilung der Proteine oder auf eine Quantifizierung des über die Plasmamembran erfolgenden Transports. Im folgenden sollen die Arbeiten zur Sortierung von lysosomalen Proteinen in AP-defizienten Zellen näher beleuchtet werden.

#### *Sortierung von lysosomalen Proteinen in AP-defizienten Zellen*

Bevor eine nähere Betrachtung der bisher in AP-defizienten Zellen durchgeführten Untersuchungen erfolgt, soll zunächst kurz auf ein Problem eingegangen werden, welches allen diesen Studien gemein ist. Sowohl bei den natürlichen Mutanten, bei RNAi-Zellen und bei Zellen, die aus Knock-out-Mäusen stammen, wird jeweils nur eine Adaptoruntereinheit des betreffenden Komplexes nicht expremiert. Dies führt nicht zum völligen Verlust der Komplexe, sondern es werden Adaptor-Teilkomplexe in der Zelle expremiert (Peden *et al.*, 2002). Diese sind zwar deutlich instabiler und werden schneller abgebaut als ein aus allen vier Untereinheiten bestehender Komplex (Peden *et al.*, 2002), trotzdem wäre es möglich, dass die Restkomplexe in der Lage sind mit den entsprechenden Membranen zu assoziieren. Daher ist nicht auszuschliessen, dass durch eine Restaktivität der Teilkomplexe die Sortierung in der Zelle beeinflusst wird. Bei RNAi-Zellen ist zusätzlich oft keine vollständige

Herunter-Regulation der Untereinheit zu gewährleisten, so dass das Risiko des Auftretens noch funktioneller Komplexe in der Zelle erhöht ist.

Da alle vier getesteten lysosomalen Proteine in etwa die gleiche Affinität für AP3 zeigen, zwei der Proteine (LAMP-1 und LAMP-2B) ebenfalls gut mit AP1, zwei der Proteine (LAMP-2A und CD63) allerdings kaum mit AP1 interagieren, stellt sich die Frage, ob sich das Fehlen von AP3 auf die Sortierung aller Proteine gleich auswirkt. Oder ob im Fall von LAMP-1 und LAMP-2B die Fähigkeit AP1 zu binden, die Sortierung in AP3-defizienten Zellen verändert.

In AP3-defizienten Zellen konnte ein über die Plasmamembran fehlgeleiteter Transport von LAMP-1, LAMP-2 und CD63 nachgewiesen werden ((Le Borgne *et al.*, 1998; Dell'Angelica *et al.*, 1999; Dell'Angelica *et al.*, 2000; Rous *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2000; Peden *et al.*, 2002; Peden *et al.*, 2004, Kantheti *et al.*, 1998; Zhen *et al.*, 1999). Ob es bei der Sortierung der verschiedenen Proteine jedoch Unterschiede in der Menge an fehlsortiertem Protein gibt, ist bisher nur in einer Arbeit untersucht worden.

Peden *et al.*, 2004 postulieren, dass LAMP-1 und CD63 in AP3 defizienten Zellen der natürlichen Mausmutante *mocha* unterschiedlich stark an der Plasmamembran expremiert werden. CD63, welches in unserer Bindungsanalyse nicht mit c- $\mu$ 1 interagierte, wurde in diesen Zellen, ohne funktionstüchtiges AP3, sehr viel stärker an der Plasmamembran expremiert als LAMP-1, welches in unserer Studie gut mit c- $\mu$ 1 interagierte (Peden *et al.*, 2004). Hier deutet sich also ein möglicher Zusammenhang zwischen Bindungsfähigkeit an AP1 und Plasmamembran-Expression der lysosomalen Proteine an. Allerdings sollte nicht unbeachtet bleiben, dass in dieser Studie die Expression des endogenen LAMP-1 mit der eines transfizierten, humanen CD63 verglichen wurde.

Da LAMP-1 und LAMP-2B gut mit AP1 interagieren, sollte ein Verlust dieses Adaptors sich stärker auf die Sortierung der Proteine auswirken, als auf LAMP2A und CD63. Auch hierzu gibt es noch keine vergleichenden Analysen. Allerdings zeigte die Untersuchung von LAMP-1 in AP1-defizienten Zellen keine veränderte *steady-state* Verteilung des Proteins (Meyer *et al.*, 2000), obwohl eine Interaktion zwischen LAMP-1 und AP1 *in vitro* in dieser und in anderen Arbeiten nachgewiesen werden konnte (Honing *et al.*, 1996; Crottet *et al.*, 2002). Im Gegensatz dazu wurden die

durch AP1 transportierten MPRs in AP1-defizienten Zellen an die Plasmamembran fehlsortiert (Meyer *et al.*, 2000).

Der Unterschied bei der Beeinflussung der *steady-state*-Verteilung von lysosomalen Proteinen in AP1- und AP3-defizienten Zellen spricht für eine hauptsächlich durch AP3 vermittelte intrazelluläre Sortierung von lysosomalen Proteinen.

Allerdings konnte weder bei AP1- noch bei AP3-Defizienz beobachtet werden, dass die Proteine gar nicht mehr ins Lysosom kommen.

Dass eine Sortierung ins Lysosom auch ohne funktionelles AP3 und AP1 stattfinden kann, zeigen die Studien von Reusch *et al.*, 2002 und Janvier und Bonifacino, 2005. In der Studie von Reusch wurde festgestellt, dass LAMP-Proteine in AP-1 und AP-3 defizienten Fibroblasten, zwar stärker an der Plasmamembran expremiert wurden, aber trotzdem weitgehend eine normale lysosomale Verteilung aufwiesen.

Janvier und Bonifacino, 2005 nutzten RNAi-behandelte Zellen, um den Einfluss von AP1-4 auf die lysosomale Sortierung zu untersuchen. Wurden die  $\mu$ -Untereinheiten von AP1, AP3 oder AP4 nicht mehr expremiert, war die Plasmamembrankonzentration von lysosomalen Proteinen erhöht. In jedem Fall wurden jedoch weiterhin lysosomale Proteine ins Lysosom transportiert. Auch bei kombinierter RNAi von zwei der drei Adaptoren wurde der gleiche Phänotyp festgestellt. Eine erhöhte Plasmamembranexpression der Proteine war messbar, der Transport ins Lysosom fand also weniger intrazellulär statt. RNAi-Zellen, denen alle intrazellulären Adaptoren AP1, AP3 und AP4 fehlten, konnten leider nicht generiert werden, da dies letal für die Zellen war. Ein knock-out aller drei intrazellulären Adaptoren ist also nicht tolerierbar. Dies könnte dafür sprechen, dass die Funktion eines Adaptors durch einen anderen zumindest teilweise ersetzbar ist. In AP2-RNAi-Zellen war die *steady-state* Akkumulation im Lysosom am geringsten. Die Autoren schlussfolgern daraus, dass für eine effiziente Sortierung zu den Lysosomen AP2 notwendig ist und dass der Transport von neu-synthetisierten, lysosomalen Proteinen zu einem beträchtlichen Teil über die Plasmamembran erfolgt. Allerdings waren die RNAi-Zellen einige Tage in Kultur, bevor sie untersucht worden sind. Alle Proteine die während dieser Zeit an die Plasmamembran gelangt sind, sammeln sich ohne funktionelles AP2 dort. Zum Beispiel ist es möglich, dass Proteine der intrazellulären Sortierung entgehen und mit dem normalen Membranfluss an die Oberfläche gebracht werden oder durch Verschmelzung von Lysosomen mit der Plasmamembran dorthin gelangen (Reddy *et al.*, 2001). Wenn kein AP2 mehr in der

Zelle vorhanden ist, sind die an der Plasmamembran befindlichen Proteine dort "gefangen" und gelangen nicht mehr ins Lysosom.

Die Studie zeigt, dass die Sortierung von lysosomalen Proteinen mehrere Sortierungsprozesse beinhalten kann. Ausserdem wird nochmals klar, wie schwierig die Untersuchung des intrazellulären Transports ist. Stellt man die Fehlsortierung in einer AP-defizienten Zelle fest, ist es schwerlich möglich zu unterscheiden, an welcher zellulären Sortierstation der Transport gestört ist und ob bzw. in wie weit ein anderer Adaptor eventuell an einer anderen Sortierungsstation das Fehlen kompensiert.

### *Sortierung von CD63*

Eine nähere Untersuchung der intrazellulären CD63-Sortierung in AP3-defizienten Zellen erfolgte durch Rous *et al.*, 2002. In Übereinstimmung mit unserer *in vitro* Bindungsanalyse und den Ergebnissen von Hirst *et al.*, 1999 konnte auch in dieser Studie eine schwache Interaktion des Tyrosin-haltigen Signals von CD63 mit  $\mu 2$  und eine starke mit  $\mu 3$  detektiert werden (*Yeast-Two-Hybrid-Analyse*). Die Bindung an  $\mu 1$  und  $\mu 4$  wurde allerdings nicht untersucht. Zusätzlich zum wtCD63 wurde ein mutiertes CD63-Signal (GYEVM zu GYEVI) verwendet, welches nicht mehr mit  $\mu 2$  interagiert, aber stärker mit  $\mu 3$ . Wiederum wurde die Bindungsfähigkeit an  $\mu 1$  und  $\mu 4$  nicht untersucht. Bei Expression des mutierten CD63 in NRK-Zellen, zeigte sich im Vergleich zum wtCD63 eine verstärkte, intrazelluläre Sortierung. Die CD63-Mutante war aufgrund der verstärkten  $\mu 3$ -Bindung und der dadurch resultierenden verstärkten intrazellulären Sortierung nahezu nicht mehr an der Plasmamembran detektierbar. In AP3 defizienten Zellen wurde, in Übereinstimmung mit anderen Analysen an AP3-defizienten Zellen, das wtCD63 trotz fehlendem AP3 in die Lysosomen transportiert, allerdings mit deutlich erhöhter Plasmamembran-Expression. Wurde hingegen die Mutante, die nicht in der Lage war  $\mu 2$  zu binden, in AP3 defizienten Zellen expremiert, fand überhaupt kein Transport zu den Lysosomen mehr statt.

In dieser Studie konnte also gezeigt werden, dass CD63 ohne AP3 nicht mehr intrazellulär sondern über die Plasmamembran sortiert wird und dass bei zusätzlicher Bindungsunfähigkeit an AP2 kein Transport ins Lysosom möglich ist. Leider wurde weder die Interaktion des wtCD63-Moleküls noch der Mutante mit  $\mu 1$  oder  $\mu 4$  untersucht. Allerdings zeigen unsere Biacore-Interaktionsanalysen sowie *Yeast-Two-*

*Hybrid*-Analysen von Hirst *et al.*, 1999, dass das wtCD63-Molekül nicht mit  $\mu$ 1 und sehr schwach mit  $\mu$ 4 interagiert. Unter der Voraussetzung, dass das mutierte CD63 sich in Bezug auf die Bindung an  $\mu$ 1 und  $\mu$ 4 wie das wt-Protein verhält, kann man schlussfolgern, dass AP1 und AP4 beim intrazellulären Transport von CD63 im biosynthetischen Transportweg keine Rolle spielen. Betrachtet man den Weitertransport von wtCD63 in AP3 defizienten Zellen zum Lysosom nach der Internalisierung durch AP2, stellt sich die Frage mit welchem Mechanismus dieser Transport erfolgt. Geht man davon aus, dass AP1 nicht an CD63 bindet und AP3 nicht vorhanden ist, kommen für den Transport nach der Internalisierung ein "genereller Membran-Fluss" zum Lysosom, der Transport durch den Einfluss von AP4 oder weitere unbekannte Adaptoren in Frage.

#### *Sortierung von LAMP-2 Isoformen*

Eine Untersuchung der LAMP-2 Isoformen ist in nicht-transfizierten Zellen nicht möglich, da sich nur in der Transmembran- und cytosolischen Domäne unterscheiden und die verfügbaren Antikörper gegen die luminalen Domäne gerichtet sind. Die Sortierung und Lokalisation von endogenen LAMP-2 Isoformen in Zellen kann also nicht so einfach analysiert werden. Gough und Fambrough 97 haben daher Chimeren mit der luminalen Domäne von LAMP-1 und der Transmembran- sowie cytosolischen Domäne von LAMP-2A, -2B oder -2C in L Zellen expremiert. Dadurch konnten sie zeigen, dass LAMP-2B vorwiegend lysosomal lokalisiert ist, während die Formen LAMP-2A (17 %) und LAMP-2C (25 %) vermehrt an der Plasmamembran expremiert werden (Gough und Fambrough, 1997). Die zelluläre Verteilung beruht auf die Identität des Tyrosin-haltigen Signals (Gough und Fambrough, 1997). In unserer Analyse wird LAMP-2A (YEQF-Motiv) schlecht durch c- $\mu$ 1 erkannt, LAMP-2B (YQTL-Motiv) hingegen gut. Betrachtet man die Ergebnisse unserer Analyse und die der LAMP-2-Lokalistionsstudie von Gough und Fambrough, 1997 im Zusammenhang, könnte die erhöhte Plasmamembranexpression durch die fehlende AP1-Bindung bedingt sein. LAMP-2A, welches nur schwach mit AP1 interagiert, hat eine höhere Plasmamembranexpression als LAMP-2B, welches mit AP1 interagiert. Auch das Signal von LAMP-1 (YQTI) wird in unserer Studie durch AP1 gut erkannt und hat laut der Studie von Gough und Fambrough, 1997, wie Lamp2B, nur eine sehr geringe Oberflächenexpression. Im Einklang damit steht,

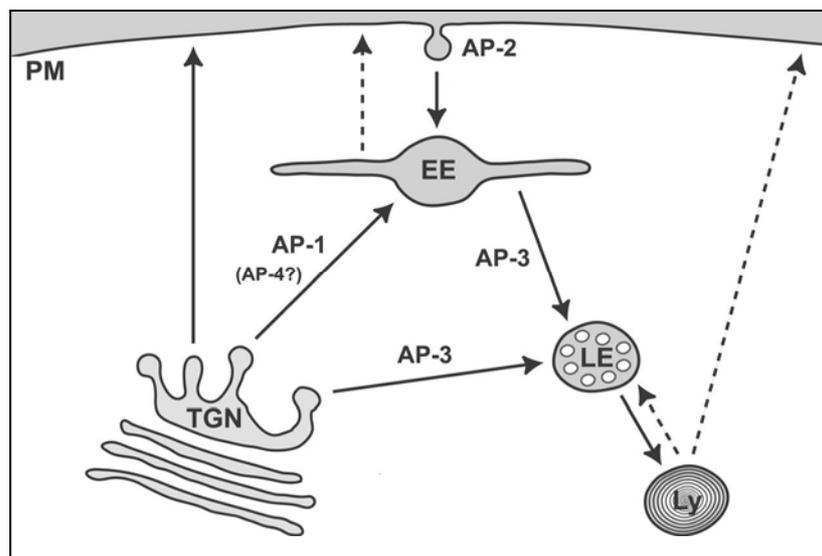
dass das in unserer Analyse nicht untersuchte LAMP-2C (YQSV), welches wie LAMP-2A stärker an der Oberfläche expremiert wird als LAMP-2B (Gough und Fambrough, 1997), in einer *Yeast-Two-Hybrid*-Analyse nicht mit  $\mu 1$  interagiert (Gough *et al.*, 1999). Allerdings interagiert LAMP-2B auch nicht mit  $\mu 2$  und nur schwach mit  $\mu 3$  und Gough *et al.*, 1999 begründeten die erhöhte Plasmamembranexpression vor allem mit einer schlechten Internalisierung des Proteins. In unserer Studie war die Bindung von LAMP-2A mit  $\mu 1$ , wie bereits erwähnt schwach, allerdings zeigte sich eine gleichstarke Bindung von  $\mu 2$  und  $\mu 3$ , so dass zumindest in diesem Falle die erhöhte Plasmamembrankonzentration nicht durch eine verminderte Internalisierung aufgrund geringer AP2-Bindung erklärt werden kann. Daher könnte die erhöhte Plasmamembranexpression tatsächlich etwas mit fehlender AP1 Bindung zu tun haben.

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt konnte die Interaktion zwischen Adaptoren und Tyrosin-haltigen Signalen vor allem in *in vitro* Studien belegt werden. Entsprechende zelluläre Analysen zum intrazellulären Transport sind zum einen aufgrund von eventuell expremierten Restkomplexen ungenauer, zum anderen wurden nie alle lysosomalen Proteine im Vergleich untersucht, sondern immer nur der Transport von einzelnen Proteinen.

Trotzdem wird aus der Summe der dargestellten Studien und unserer Untersuchungen deutlich, dass die Sortierung von lysosomalen Proteinen mehrere Sortierungsprozesse beinhalten kann. Der Transport der meisten lysosomalen Proteine ins Lysosom kann von mehreren Zellorganellen aus und durch mehrere Adaptoren stattfinden. Beim Verlust eines Adaptorproteins wird der fehlende Transport zumindest teilweise durch andere Transportwege und andere Adaptoren kompensiert. In einer gesunden Zelle kann man sich die Sortierung daher vielleicht eher als dynamisches Gleichgewicht vorstellen. Nach einem in Ihrke *et al.* aufgestellten Model werden lysosomale Proteine am TGN durch AP3 in Richtung Spätes Endosom/Lysosom transportiert (siehe Abb. 4-3). Hat ein Protein, wie LAMP-2B, zusätzlich die Möglichkeit mit AP1 zu interagieren, werden Moleküle die an der Sortierung von AP3 "vorbeigerutscht" sind, durch AP1 ins Frühe Endosom sortiert. Interagiert ein Protein nicht mit AP1, wie LAMP-2A, erfolgt die Sortierung, der an der AP3-Sortierung "vorbeigerutschen" Moleküle, mit dem normalen Sortierungsfluss in Richtung Plasmamembran. Dies könnte auch die Erklärung sein, warum LAMP-2A

häufiger an der Oberfläche detektiert wird als LAMP-2B (Gough und Fambrough, 1997). An der Plasmamembran erfolgt dann ein Weitertransport der Proteine durch Endocytose in die Frühen Endosomen. Auch von hier aus wird AP3 eine Sortierung in Richtung Späte Endosomen/Lysosomen zugeschrieben (Faundez *et al.*, 1998; Peden *et al.*, 2004). Allerdings scheint auch ein AP3-unabhängiger Transport nach der Internalisierung von der Plasmamembran möglich zu sein, wie die Lokalisation von lysosomalen Proteinen in AP3-defizienten Zellen zeigt. Ob dieser Transport durch normalen Membranfluss, durch noch unbekannte Sortierungsfaktoren oder AP1 bzw. AP4 vermittelt wird bleibt zu untersuchen.

Eine solche Flexibilität beim Proteintransport scheint sinnvoll, da eine Zelle auf verschiedene physiologische Situationen und auch Störungen reagieren muss.



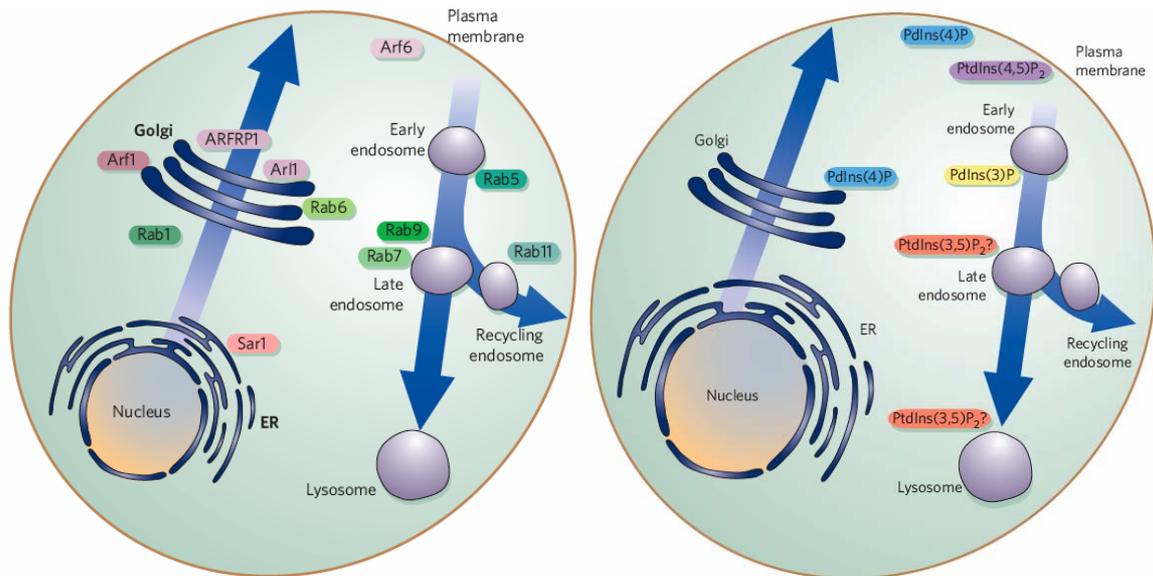
**Abbildung 4-3: Model für die Funktion der AP-Komplexe bei der Sortierung von lysosomalen Membranproteinen.** Erklärung siehe Text. (verändert nach Ihrke *et al.*, 2004)

### 4.3. Membran- und Signalbindung von AP2

Über Bindungspartner, Konformation und generelle Funktion von AP2 ist durch die Aufklärung der Kristallstruktur (Collins *et al.*, 2002) und durch zahlreiche vorangegangene Studien bereits viel bekannt (siehe Einleitung). Welche Faktoren allerdings dafür verantwortlich sind, dass AP2 ausschliesslich an der Plasmamembran lokalisiert ist, steht im Mittelpunkt aktueller Forschung.

Die Interaktion von AP2 mit einem Sortierungssignal kann allein nicht ausreichend für die exclusive Plasmamembran-Lokalisierung des Adaptors sein, da AP2-interagierende Sortierungssignale an verschiedenen Organellen in der Zelle vorkommen. So ist das YXX $\Phi$ -Signal von LAMP-1, wie oben bereits erwähnt, für die korrekte Sortierung am TGN, für die Endocytose von der Plasmamembran und die Sortierung im Endosom notwendig. Zudem stellten Nesterov *et al.*, 1999 fest, dass AP2-Komplexe mit einer defekten YXX $\Phi$ -Bindungsstelle trotzdem an die Plasmamembran rekrutiert wurden. Die Bindung an die Tyrosin-haltigen Signale war für die Plasmamembran-Lokalisation also nicht zwingend nötig.

Es muss daher andere Plasmamembran-spezifische Determinanten geben, die sicherstellen, dass AP2 nur an dieser Membran mit den zu sortierenden Proteinen interagiert. Da die Identität einer Membran durch die jeweiligen Membranlipide, integrale Membranproteine und kleine, aktivierbare GTPasen bestimmt wird, kommen alle diese Faktoren für eine Membran-spezifische Interaktion in Frage (Abb. 4-4). Beim vesikulären Transport wird vor allem zwei Arten von flexiblen Rekrutierungsfaktoren eine entscheidende Rolle zugeschrieben: den kleinen, aktivierbaren G-Proteinen der ARF/Arf/Sar- und der Rab-Familie sowie kurzlebigen Phospholipiden, den Phosphatidylinositolen (Munro, 2002; Roth, 2004; Owen *et al.*, 2004; Behnia und Munro, 2005). Im Gegensatz zu einem integralen Membranprotein, das am ER in die Membran integriert werden muss und von dort aus zur Zielmembran transportiert wird, können PIs und GTPasen an ihrem Wirkort direkt synthetisiert bzw. aus dem Cytosol rekrutiert und nach dem Erfüllen ihrer Aufgabe wieder entfernt werden, da ihre Membranpräsenz durch Kinasen/Phosphatasen bzw. GEFs/GAPs flexibel reguliert wird. Somit vereinbaren diese Moleküle eine Organell-spezifische Lokalisierung mit der Möglichkeit einer flexiblen Regulierung (Simonsen *et al.*, 2001; Behnia und Munro, 2005).



**Abbildung 4-4: Membran-spezifische Lokalisation verschiedener GTPasen und Phosphatidylinositole in der Zelle (Behnia 05).**

Da  $\text{PtdIns}4,5\text{P}_2$  und  $\text{ARF6}$  beide hauptsächlich an der Plasmamembran gebildet bzw. dorthin rekrutiert werden und für beide bereits eine Interaktion mit AP2 publiziert worden ist, war es Ziel unserer Untersuchungen, den Einfluss der  $\text{PtdIns}4,5\text{P}_2^-$ , der  $\text{ARF6}$ - und der Sortierungssignal-Bindung auf die Rekrutierung von AP2 an Membranen *in vitro* zu testen.

#### 4.3.1. Einfluss von Phosphatidylinositolen auf die Membranbindung von AP2

Viele Studien weisen bereits darauf hin, dass die Membraninteraktion von AP2 durch das hauptsächlich an der Plasmamembran lokalisierte  $\text{PtdIns}4,5\text{P}_2$  reguliert wird. Zum Beispiel führt die Überexpression der Inositol-5-Phosphat-Phosphatase Domäne von Synaptojanin in Cos-Zellen zu einer Verminderung der  $\text{PtdIns}4,5\text{P}_2^-$  Konzentration an der Plasmamembran, mit der Folge, dass weniger AP2 an der Plasmamembran lokalisiert ist (Krauss *et al.*, 2003). Nach Überexpression einer  $\text{PtdIns}4,5\text{P}_2^-$ -spezifischen PH-Domäne in Zellen wurde ebenfalls eine Inhibition der AP2-abhängigen Endocytose festgestellt (Jost *et al.*, 1998). Andererseits führt eine gesteigerte  $\text{PtdIns}4,5\text{P}_2^-$  Konzentration an der Plasmamembran durch Überexpression von Isoformen der Phosphatidylinositol-Phosphat-5-Kinase (PIP5KI

Isoform  $\alpha$ ,  $\beta$  oder  $\gamma$ ) zu einer erhöhten Plasmamembran-Lokalisation von AP2 und gesteigerter Endocytose (Padron *et al.*, 2003).

Weitere Befunde stärken ebenfalls die Vermutung, dass eine PtdIns4,5P<sub>2</sub>-vermittelte Plasmamembran-Rekrutierung von AP2 stattfindet und dass diese auf eine Interaktion zwischen der  $\alpha$ -Untereinheit von AP2 mit PtdIns4,5P<sub>2</sub> zurückzuführen ist (Chang *et al.*, 1993; Page und Robinson, 1995; Rapoport *et al.*, 1997; Gaidarov und Keen, 1999; Padron *et al.*, 2003). Die dabei wohl wichtigste Untersuchung zeigte, dass eine in Zellen expremierte AP2-Mutante mit defekter  $\alpha$ -Phosphatidylinositol-Bindungsstelle nicht mehr an die Plasmamembran lokalisiert wird (Gaidarov und Keen, 1999, siehe auch 4.3.5.). Rohde *et al.*, 2002 identifizierten zusätzlich noch eine Phosphatidylinositol-Bindungsstelle in  $\mu$ 2 und konnten zeigen, dass die Expression einer  $\mu$ 2-Untereinheit mit mutierter Bindungsstelle in CHO-Zellen die Clathrin-vermittelte Endocytose vermindert (siehe auch 4.3.5.). Durch die Strukturaufklärung von AP2 in Anwesenheit des Phosphatidylinositol-Analogon InsP<sub>6</sub> konnten die Einzelheiten der  $\alpha$ - als auch der  $\mu$ 2-Bindungsstelle auf atomarer Ebene aufgeklärt werden (Owen *et al.*, 2001).

Unter Verwendung unseres *in vitro* Assays konnten wir zeigen, dass sowohl die AP2-Bindung an PtdIns4,5P<sub>2</sub> allein, als auch die alleinige Bindung an Sortierungssignale sehr schwach ist. Wenn allerdings PtdIns4,5P<sub>2</sub> und gleichzeitig ein Sortierungssignal in der Membran vorliegen, erfolgt eine effektive Bindung (3.2.2.1.2.).

Dabei konnten wir durch die Verwendung eines in der  $\mu$ 2-Phosphatidylinositol-Bindungsstelle mutierten AP2 Komplexes feststellen, dass die Interaktionen von  $\alpha$  mit PtdIns4,5P<sub>2</sub> und  $\mu$ 2 mit dem Tyrosin-haltigen Signal bereits ausreichend für eine affine Membranbindung war. Die Bindung von PtdIns4,5P<sub>2</sub> über die  $\mu$ 2-Phosphatidylinositol-Bindungsstelle hat also eher stabilisierenden Charakter auf die Tyrosinsignal-Bindung. Die für die Membraninteraktion wichtigere Rolle kommt der  $\alpha$ -Phosphatidylinositol-Bindungsstelle zu. Nach Mutation dieser Bindungsstelle ist keine effektive Signalbindung möglich (3.2.2.1.2.; siehe auch 4.3.5.).

Damit haben wir eine Bedeutung der AP2-PtdIns4,5P<sub>2</sub>-Interaktion für die Signalbindung erstmals direkt experimentell nachgewiesen.

Wir konnten jedoch keine ausschliessliche Selektivität von AP2 für PtdIns4,5P<sub>2</sub> messen, da auch eine starke Bindung von AP2 an Tyrosin-haltige Signale in Anwesenheit von anderen Phosphatidylinositolen messbar war (3.2.2.1.2.). In diesem Zusammenhang sei erwähnt, dass in den ersten Arbeiten zur

Phosphatidylinositol-Bindung von AP2 eine PtdIns3,4,5P<sub>3</sub>-Interaktion beschrieben worden ist (Gaidarov *et al.*, 1996; Gaidarov und Keen, 1999; Gaidarov *et al.*, 2001). Da PtdIns3,4,5P<sub>3</sub> zum Zeitpunkt der Messungen nicht zur Verfügung stand, konnte der Einfluss dieses Phosphatidylinositols nicht getestet werden.

An der Endozytose sind neben AP2 noch eine Reihe anderer PtdIns4,5P<sub>2</sub>-bindender Proteine beteiligt (z.B. Amphiphysin, Epsin, AP180/CALM,  $\beta$ -Arrestin, Dab2, ARH, Synaptotagmin), die zum Teil sehr spezifisch und affin an PtdIns4,5P<sub>2</sub> binden und gleichzeitig mit AP2 interagieren. Es ist anzunehmen, dass aus der Summe der vielen einzelnen PtdIns4,5P<sub>2</sub>-Interaktionen eine PtdIns4,5P<sub>2</sub>-Spezifität des endocytotischen Netzwerks entsteht. In diesem Kontext ist ebenfalls interessant, dass die  $\mu$ 2-Untereinheit von AP2 auch mit der Phosphatidylinositol-4-Phosphat-5-Kinase Typ I (PIPKI) interagiert (Krauss *et al.*, 2006). Dies könnte nach Bindung von AP2 an die Membran die PtdIns4,5P<sub>2</sub>-Produktion an endocytotisch aktiven Membranbereichen noch steigern und dadurch weitere an der Vesikelbildung beteiligte, PtdIns4,5P<sub>2</sub>-bindende Proteine rekrutieren und so die Bildung eines Chlathrin-umhüllten Vesikels fördern.

#### **4.3.2. Einfluss von ARF6 auf die Membranbindung von AP2**

ARF6 gehört mit fünf weiteren Ras-ähnlichen, GTP-bindenden ARF-Proteinen zur ARF/Arf/Sar-Proteinfamilie in Säugetierzellen. ARF-Proteine sind in die Bildung von Transportvesikeln, in die Aktivierung von Lipid-modifizierenden Enzymen und in die Reorganisation des Aktin-Cytoskeletts involviert (zusammengefasst in D'Souza-Schorey und Chavrier, 2006). ARF6 wurde bereits mit der Regulation der Endocytose von der apikalen (Altschuler *et al.*, 1999), wie auch der basolateralen (Palacios *et al.*, 2001) Membran von MDCK-Zellen in Verbindung gebracht. Ein weiterer, allerdings indirekter Hinweis auf die Mitwirkung von ARF6 bei der AP2 Rekrutierung ist, dass GTP $\gamma$ S - ein nicht-hydrolysierbares Analogon von GTP - eine Fehlrekrutierung von AP2 an ein endosomales Kompartiment bewirkt (Seaman *et al.*, 1993; Traub *et al.*, 1996) und *in vitro* die Bildung von CCVs an der Plasmamembran inhibiert (Carter *et al.*, 1993). Krauss *et al.*, 2003 postulierten, dass ARF6 indirekt, durch einen Einfluss auf die Regulation des PtdIns4,5P<sub>2</sub>-Haushaltes, an der AP2-Membranbindung und der Bildung von CCVs beteiligt ist. Die Autoren konnten zeigen, dass ARF6 durch Aktivierung der Phosphatidylinositol-4-Phosphat-5-Kinase

Typ I die PtdIns4,5P<sub>2</sub>-Produktion steigert und damit indirekt auf die Rekrutierung von endozytotischen Proteinen einwirken kann.

Paleotti et al zeigten eine Interaktion von AP2 mit ARF6 und postulieren, dass ARF6 einen direkten Einfluss auf die Rekrutierung von AP2 an die Plasmamembran hat.

Unter unseren Versuchsbedingungen konnten wir keine Interaktion zwischen ARF6 und AP2 detektieren (3.2.2.3.). Dies steht im Widerspruch zu der von Paleotti *et al.*, 2005 veröffentlichten Studie, welcher bei gegenwärtiger Datenlage nicht zu lösen ist und daher durch weitere Analysen aufgeklärt werden muss.

### 4.3.3. Phosphorylierungs-unterstützte AP2-Bindung an Tyrosin-haltige Signale

Die  $\mu$ -Untereinheit von AP2 kann mit der  $\beta$ -Untereinheit interagieren, wodurch die Bindungsstelle für YXX $\Phi$ -Signale in  $\mu$ 2 blockiert wird. Unserer Arbeitshypothese zufolge (Model siehe 1.6.; Collins *et al.*, 2002) ermöglicht die Phosphorylierung von  $\mu$ 2 am Thr156 eine Loslösung der Untereinheit vom Komplex und favorisiert dadurch eine für die Signalbindung notwendige Konformationsänderung. Durch den Einsatz von nicht-phosphoryliertem und stöchiometrisch phosphoryliertem AP2 in unserem Bindungsassay konnten wir zeigen, dass ein an  $\mu$ 2Thr156 phosphorylierter AP2-Komplex mit höherer Affinität an die Tyrosin-haltigen Signale in PtdIns4,5P<sub>2</sub>-haltigen Membranen bindet. Die Bindung des phosphorylierten Komplexes an das Tyrosin-haltige Signale ohne die Anwesenheit eines Phosphatidylinositols war hingegen nur wenig schwächer als die Bindung des nicht-phosphorylierten Cores (3.2.2.1.2.).

. Dies zeigt zunächst nochmals die Wichtigkeit der AP2-PtdIns4,5P<sub>2</sub>-Interaktion, da erst durch eine zusätzliche Interaktion mit PtdIns4,5P<sub>2</sub> die Phosphorylierung des Komplexes eine positive Wirkung entfalten kann. Zum anderen zeigen die Ergebnisse, dass die Phosphorylierung nicht als "Schalter" wirkt, der eine Konformationsänderung induziert. Das Loslösen der  $\mu$ -Untereinheit vom Komplex wird durch die Phosphorylierung nur begünstigt. Wenn der Komplex sich über eine schwache Interaktion mit PtdIns4,5P<sub>2</sub> bereits in Membrannähe befindet, kann im phosphorylierten Zustand die benachbarte Membran besser nach Sortierungssignalen "gescannt" werden (weitere Erläuterungen siehe auch 3.2.2.1.2.).

Die hier für AP2-beschriebenen Vorgänge der Bindung an Tyrosin-haltige Signale gelten in ähnlicher Weise auch für den an der intrazellulären Sortierung beteiligten AP1-Komplex. Auch die Bindung von AP1 an YXX $\Phi$ -Signale wird durch die Phosphorylierung von  $\mu$ 1 verstärkt (Ghosh und Kornfeld, 2003). Die 2004 publizierte Strukturanalyse von AP1 zeigt, dass die YXX $\Phi$ -Bindungsstelle im AP1-Komplex ebenfalls durch die Interaktion mit der  $\beta$ 1-Untereinheit blockiert ist. Die Phosphorylierung findet, wie bei  $\mu$ 2, im Linkerbereich zwischen dem N-terminalen und dem C-terminalen Anteil von  $\mu$ 1 am Thr154 statt. Als involvierte Kinase ist GAK (*Cyclin-G-associated Kinase*, auch Auxilin-2 genannt) beschrieben worden. GAK zählt, wie die für die Phosphorylierung von  $\mu$ 2 verantwortliche AAK1, zur Familie der Ser/Thr-Kinasen (Umeda *et al.*, 2000; Korolchuk und Banting, 2002).

Obwohl Hinweise auf eine Abhängigkeit der AP1-Rekrutierung an das im Golgi-Apparat angereicherte PtdIns4P publiziert worden sind (Wang *et al.*, 2003), konnte AP1 allerdings nicht wie AP2 mit einem Phosphatidylinositol bzw. einem Phosphatidylinositol-Analogon (InsP<sub>6</sub>) ko-kristallisiert werden. Einzig aus Analogie zu AP2 lässt sich auf eine Phosphatidylinositol-Bindungsstelle in der  $\gamma$ -Untereinheit schließen, die allerdings deutlich weniger Ladung trägt als die  $\alpha$ -Untereinheit von AP2. Interessanterweise ist die Häufung positiver Ladungen, die die  $\mu$ 2 Bindung an PtdIns4,5P<sub>2</sub> ermöglicht in AP1 nicht konserviert. Mutation der positiven Reste in der AP1  $\gamma$ -Untereinheit führten zu einer erniedrigten Bindung des Komplexes an die Membran, dessen Rekrutierung allerdings die Anwesenheit von ARF1 erforderte (Heldwein *et al.*, 2004).

#### 4.3.4. AP2-Bindung an Leucin-haltige Signale

Im Gegensatz zur bis auf die Strukturebene aufgeklärten Bindung von AP2 an Tyrosin-haltige Signale wird die AP2-Bindung an Leucin-haltige Signale kontrovers diskutiert. Während einige Arbeiten zeigten, dass die Bindung an Leucin-haltige Signale über die  $\mu$ 2-Untereinheit vermittelt wird (Rodionov und Bakke, 1998; Hofmann *et al.*, 1999; Craig *et al.*, 2000), postulieren andere eine Bindung an die  $\beta$ 2-Untereinheit (Rapoport *et al.*, 1998; Greenberg *et al.*, 1998; Geyer *et al.*, 2002; Schmidt *et al.*, 2006). Janvier *et al.*, 2003 konnten gar keine Interaktion von AP2 mit den getesteten Leucin-haltigen Signalen nachweisen und auch eine Co-

Kristallisierung des Signals mit dem AP2-Komplex ist trotz intensiver Bemühungen bisher nicht gelungen (David Owen, persönliche Mitteilung).

Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass AP2 mit Leucin-haltigen Signalen verschiedener Membranproteine interagiert und dass diese Interaktion nicht über den c-terminalen Anteil von  $\mu 2$  (AS 158-435), welcher die Bindungsstelle für YXX $\Phi$ -Signale beinhaltet, vermittelt wird (3.2.2.2.). Unsere Befunde wurden unterstützt durch Ergebnisse unserer Kooperationspartnerin Frau Dr. Alison Motley, die zeigen konnte, dass die Internalisierung von Leucinsignal-haltigen Proteinen in transfizierten HeLa-Zellen AP2- und Clathrin-abhängig stattfindet (Honing *et al.*, 2005).

Auch zwei weitere, erst kürzlich veröffentlichte Arbeiten zeigen eine Interaktion von AP2 mit Leucin-haltigen Signalen (Doray *et al.*, 2007; Chaudhuri *et al.*, 2007). In der Arbeit von Doray *et al.*, 2007 wird ebenfalls bestätigt, dass die Bindung dieser Signale nicht über die  $\mu 2$ -Untereinheit erfolgt. Unter Verwendung von  $\alpha/\sigma 2$ - bzw.  $\beta 2/\mu 2$ -Hemikomplexen zeigen die Autoren, dass die Leucin-haltigen Signale an die  $\alpha/\sigma 2$ -Hemikomplexe binden, wobei eine weitere Eingrenzung der Bindungsstelle ebenfalls nicht möglich war.

#### 4.3.5. AP2-Membranbindung *in vivo*

Erst kürzlich wurde der Einfluss der in der vorliegenden Arbeit verwendeten, mutierten AP2 Formen auf die Membranbindung von AP2 und die Internalisierung des TfR in Zellen untersucht (Motley *et al.*, 2006). Dafür wurde die Expression der endogenen  $\mu 2$ - oder  $\alpha$ -Untereinheit durch RNAi ausgeschaltet und die Untereinheiten wurden durch Expression einer mutierten Variante ersetzt.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen unseres *in vitro* Systems hatte die Expression von phosphorylierungs-defizientem bzw. in der YXX $\Phi$ -Bindungsstelle mutiertem  $\mu 2$  eine erheblich gestörte TfR-Internalisierung zur Folge. Was die Bedeutung der Phosphorylierung von  $\mu 2$  bei der YXX $\Phi$ -Signalerkennung weiter belegt. Die Plasmamembran-Lokalisation der so mutierten Adaptoren war wie erwartet unbeeinflusst.

Zur Überraschung der Autoren hatte hingegen die Expression der  $\alpha$ -Untereinheit oder der  $\mu 2$ -Untereinheit mit mutierter Phosphatidylinositol-Bindungsstelle keinen Einfluss auf die Rekrutierung von AP2 an die Plasmamembran und auf die

Endocytose des TfR. In früheren Publikationen wurde eine Fehl-Lokalisation von AP2 sowohl durch die Mutation der  $\alpha$ -Bindungsstelle (Gaidarov und Keen, 1999) als auch durch die Mutation der  $\mu$ 2-Bindungsstelle (Rohde *et al.*, 2002) beschrieben. In diesen Arbeiten wurden jedoch die AP2-Mutanten nicht auf der Basis der Kristallstruktur von AP2 generiert, da diese zum gegebenen Zeitpunkt noch nicht bekannt war, so dass die Funktion der Proteine durch Fehlfaltung eingeschränkt sein könnte.

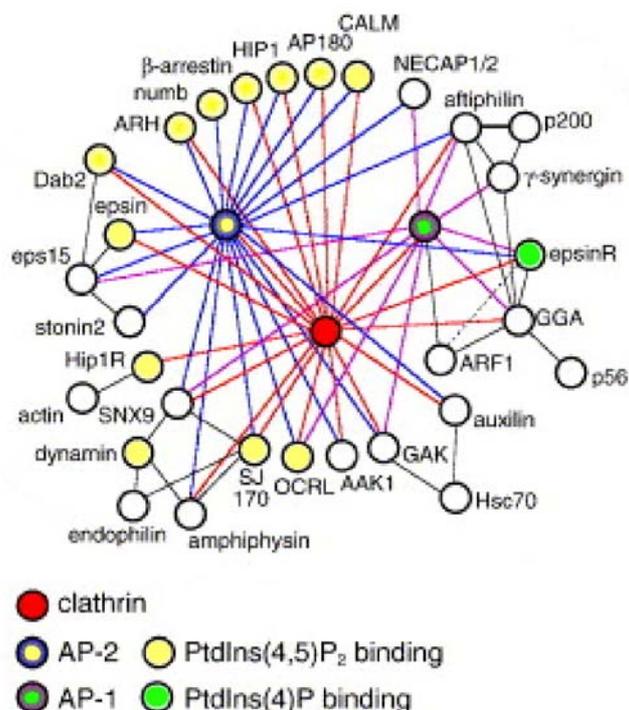
In unserem *in vitro* Assay konnten wir eine stabilisierende Wirkung der  $\mu$ 2-PtdIns4,5P<sub>2</sub>-Bindung für die YXX $\Phi$ -Signalbindung nachweisen. Der Verlust der  $\mu$ 2-PtdIns4,5P<sub>2</sub>-Bindungsstelle hatte nur einen geringen Effekt auf die Bindung an Tyrosin-haltige Signale in PtdIns4,5P<sub>2</sub>-Liposomen (3.2.2.1.). Durch die Arbeit von Motley *et al.*, 2006 wurde diese Feststellung zur Bedeutung der  $\mu$ 2-PtdIns4,5P<sub>2</sub>-Bindungsstelle unterstützt.

Die Bedeutung der  $\alpha$ -Phosphatidylinositol-Bindungsstelle bei der Rekrutierung von AP2 hingegen wurde relativiert. Vor dem Hintergrund, dass AP2 in Zellen auch trotz mutierter  $\alpha$ -PtdIns4,5P<sub>2</sub>-Bindungsstelle an der Plasmamembran lokalisiert ist (Motley *et al.*, 2006), erscheint der Verlust der Membranbindung der gleichen Mutante in unserem *in vitro* System zunächst unverständlich. Hier sollte jedoch berücksichtigt werden, dass wir *in vitro* das Zusammenspiel von drei ausgewählten Faktoren (PtdIns4,5P<sub>2</sub>, Sortierungssignal und AP2) analysiert haben, während die Situation an der Plasmamembran der Zelle deutlich komplexer ist. AP2 ist Teil des komplizierten, endocytotischen Netzwerks aus Protein-Protein- und Protein-Lipid-Interaktionen (Abb. 4-5). Da AP2 ausser mit PtdIns4,5P<sub>2</sub> und Sortierungssignalen auch mit einer Vielzahl weiterer, an der Endocytose beteiligter Proteine interagiert, wird der Ausfall eines Bindungsereignisses toleriert und AP2 ist in der Lage trotzdem mit endocytotisch aktiven Membranbereichen zu interagieren. Was biologisch durchaus Sinn macht, um den essentiellen Vorgang von Endocytose störungsunanfälliger zu machen.

Die Vielzahl von koordinierten Interaktionen zwischen Protein- und Lipidkomponenten während der CCV-Genese macht es ausgesprochen schwierig Einzelereignisse oder Phasen der CCV-Bildung zu definieren.

Hierzu kann der von uns etablierte *in vitro* Assay einen wichtigen Beitrag leisten, durch den es möglich ist, gezielt die Interaktion von einzelnen Bindungspartnern zu testen und auch verschiedene Bindungspartner zu kombinieren. Der Vergleich der Membranassoziation der  $\alpha$ -PtdIns4,5P<sub>2</sub>-Mutante von AP2 *in vitro* (diese Arbeit) und

in Zellen (Motley *et al.*, 2006) zeigt aber nochmals deutlich, dass nur eine gleichzeitige *in vitro* und *in vivo* Analyse einen besseren Einblick in die tatsächlichen Verhältnisse liefern kann.



**Abbildung 4-5: Interaktionsnetzwerk bei der CCV-Bildung.** Graphische Darstellung einiger Protein-Protein- und Protein-Lipid-Interaktionen die an der Bildung von CCVs an der Plasmamembran und am Golgi-Apparat beteiligt sind. (Traub, 2005)

Abschliessend bleibt festzustellen, dass AP2 Tyrosin-haltige Sortierungssignale in einer PtdIns4,5P<sub>2</sub>-haltigen Membran binden kann und dies in Abhängigkeit der Phosphorylierung von  $\mu 2$  geschieht. die Bindung von Leucin-haltigen Signalen erfolgt an anderer Stelle im Komplex ( $\alpha/\sigma 2$ ) und ist unabhängig von der Phosphorylierung der  $\mu 2$ -Untereinheit. In welcher zeitlichen Abfolge die  $\mu 2$ -Phosphorylierung, die Membranassoziation sowie die Signalbindung von AP2 erfolgt, ist nach wie vor Gegenstand aktiver Forschung.

## 5. Zusammenfassung

Die heterotetrameren Adaptorprotein-Komplexe AP1, AP2, AP3 und AP4 sind an der Sortierung von Transmembranproteinen in der Zelle beteiligt. APs interagieren mit den Sortierungssignalen der Transmembranproteine und vermitteln dadurch die Aufnahme der Proteine in Transportvesikel.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Spezifität der vier APs für die Tyrosin-haltigen Signale (YXX $\Phi$ ) der lysosomalen Proteine LAMP-1, LAMP-2A, LAMP-2B, CD63 und des am TGN-lokaliserten Proteins TGN38 mittels SPR-Analyse *in vitro* untersucht.

Dazu wurde die Interaktion der C-terminalen Anteile der  $\mu$ -Ketten (c- $\mu$ ), welche die Bindungstasche für YXX $\Phi$ -Signale beinhalten, mit Sortierungssignal-haltigen Peptiden gemessen, deren Sequenz der cytoplasmatischen Domäne von Transmembranproteinen entsprach. Alle getesteten Signale interagierten kaum mit AP4, aber gut mit AP3. Die Bindung an AP1 und AP2 war deutlich heterogener. Am auffälligsten dabei war, dass die lysosomalen Proteine LAMP-1 und LAMP-2B gut an AP1 banden, wohingegen die beiden anderen lysosomalen Proteine LAMP-2A und CD63 kaum bzw. gar nicht mit AP1 interagierten.

Entgegen der ursprünglichen Annahme folgte die Bindung der c- $\mu$ -Ketten an YXX $\Phi$ -haltige Peptide nicht einer 1:1 Kinetik. Als Ursache kommt eine zusätzliche Interaktion zwischen den  $\mu$ -Ketten und 2-4 basischen Aminosäuren, die sich in allen verwendeten cytoplasmatischen Sequenzen proximal des YXX $\Phi$ -Signals befinden, in Frage. Ob diese Interaktion *in vivo* eine Bedeutung hat, müssen weitere Analysen zeigen.

Im Mittelpunkt des zweiten Teils der Arbeit stand der an der Endocytose beteiligte AP2-Komplex, dessen Rekrutierung an die Plasmamembran und Bindung an Sortierungssignale mit Hilfe eines Biacore-basierten Assays für Membranbindung *in vitro* simuliert wurde. Um einzelne Bindungsereignisse analysieren zu können, wurden Liposomen mit einer einfachen Lipid-Zusammensetzung verwendet und rekombinante, phosphorylierte bzw. nicht-phosphorylierte, Wildtyp- oder mutierte AP2-Komplexe eingesetzt. Unsere Daten zeigen eine von ARF6-unabhängige, aber von Phosphatidylinositolen-abhängige Rekrutierung von AP2. Vor allem die Phosphatidylinositol-Bindungsstelle in der  $\alpha$ -Untereinheit ist für die PtdIns4,5P<sub>2</sub>-Interaktion von AP2 verantwortlich. Durch den Vergleich von phosphoryliertem und nicht-phosphoryliertem AP2 konnte bestätigt werden, dass die Interaktion mit Tyrosin-haltigen Signalen durch die Phosphorylierung der  $\mu$ 2-Untereinheit unterstützt

---

wird. Die Bindung an Dileucin-haltige Signale erfolgt hingegen Phosphorylierungs-unabhängig an eine bislang unbekannte Bindungsstelle, die nicht im flexiblen, C-terminalen Anteil von  $\mu 2$  liegt.

Diese Arbeit hat die notwendigen Voraussetzungen geschaffen, um Bindungsereignisse, die zur Membranassoziation von Proteinen beitragen, unter definierten Bedingungen zu analysieren.

## 6. Literatur

Aguilar, R.C., Boehm, M., Gorshkova, I., Crouch, R.J., Tomita, K., Saito, T., *et al.* (2001) Signal-binding specificity of the mu4 subunit of the adaptor protein complex AP-4. *J Biol Chem.* 276: 13145-13152.

Ahle, S. und Ungewickell, E. (1989) Identification of a clathrin binding subunit in the HA2 adaptor protein complex. *J Biol Chem.* 264: 20089-20093.

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

Akasaki, K., Michihara, A., Fujiwara, Y., Mibuka, K. und Tsuji, H. (1996) Biosynthetic transport of a major lysosome-associated membrane glycoprotein 2, lamp-2: a significant fraction of newly synthesized lamp-2 is delivered to lysosomes by way of early endosomes. *J Biochem (Tokyo).* 120: 1088-1094.

Akasaki, K., Michihara, A., Mibuka, K., Fujiwara, Y. und Tsuji, H. (1995) Biosynthetic transport of a major lysosomal membrane glycoprotein, lamp-1: convergence of biosynthetic and endocytic pathways occurs at three distinctive points. *Exp Cell Res.* 220: 464-473.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. und Walter, P. (2002) *Molecular Biology of the Cell.* New York. Garland science.

Altschuler, Y., Liu, S., Katz, L., Tang, K., Hardy, S., Brodsky, F., *et al.* (1999) ADP-ribosylation factor 6 and endocytosis at the apical surface of Madin-Darby canine kidney cells. *J Cell Biol.* 147: 7-12.

Aridor, M. und Traub, L.M. (2002) Cargo selection in vesicular transport: the making and breaking of a coat. *Traffic.* 3: 537-546.

Banting, G. (1996) Localization signals in proteins internalized from the cell surface. *Biochem Soc Trans.* 24: 531-534.

Banting, G. und Ponnambalam, S. (1997) TGN38 and its orthologues: roles in post-TGN vesicle formation and maintenance of TGN morphology. *Biochim Biophys Acta.* 1355: 209-217.

Barriocanal, J.G., Bonifacino, J.S., Yuan, L. und Sandoval, I.V. (1986) Biosynthesis, glycosylation, movement through the Golgi system, and transport to lysosomes by an N-linked carbohydrate-independent mechanism of three lysosomal integral membrane proteins. *J Biol Chem.* 261: 16755-16763.

- Beck, K.A. und Keen, J.H. (1991) Interaction of phosphoinositide cycle intermediates with the plasma membrane-associated clathrin assembly protein AP-2. *J Biol Chem.* 266: 4442-4447.
- Behnia, R. und Munro, S. (2005) Organelle identity and the signposts for membrane traffic. *Nature.* 438: 597-604.
- Biacore\_AB (1994) BIAApplications Handbook. Uppsala. Biacore AB.
- Biacore\_AB (1996) BIASimulation Software. Uppsala. Biacore AB.
- Biacore\_AB (2003a) Sensor Surface Handbook. Uppsala. Biacore AB.
- Biacore\_AB (2003b) BIAevaluation Software Handbook. Uppsala. Biacore AB.
- Blumstein, J., Faundez, V., Nakatsu, F., Saito, T., Ohno, H. und Kelly, R.B. (2001) The neuronal form of adaptor protein-3 is required for synaptic vesicle formation from endosomes. *J Neurosci.* 21: 8034-8042.
- Boehm, M. und Bonifacino, J.S. (2001) Adaptins: the final recount. *Mol Biol Cell.* 12: 2907-2920.
- Boll, W., Ohno, H., Songyang, Z., Rapoport, I., Cantley, L.C., Bonifacino, J.S. und Kirchhausen, T. (1996) Sequence requirements for the recognition of tyrosine-based endocytic signals by clathrin AP-2 complexes. *Embo J.* 15: 5789-5795.
- Bonifacino, J.S. und Dell'Angelica, E.C. (1999) Molecular bases for the recognition of tyrosine-based sorting signals. *J Cell Biol.* 145: 923-926.
- Bonifacino, J.S. und Glick, B.S. (2004) The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell.* 116: 153-166.
- Bonifacino, J.S. und Traub, L.M. (2003) Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Biochem.* 72: 395-447.
- Bos, K., Wraight, C. und Stanley, K.K. (1993) TGN38 is maintained in the trans-Golgi network by a tyrosine-containing motif in the cytoplasmic domain. *Embo J.* 12: 2219-2228.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254.
- Braun, M., Waheed, A. und von Figura, K. (1989) Lysosomal acid phosphatase is transported to lysosomes via the cell surface. *Embo J.* 8: 3633-3640.

- Bremnes, B., Madsen, T., Gedde-Dahl, M. und Bakke, O. (1994) An LI and ML motif in the cytoplasmic tail of the MHC-associated invariant chain mediate rapid internalization. *J Cell Sci.* 107 (Pt 7): 2021-2032.
- Bresnahan, P.A., Yonemoto, W., Ferrell, S., Williams-Herman, D., Geleziunas, R. und Greene, W.C. (1998) A dileucine motif in HIV-1 Nef acts as an internalization signal for CD4 downregulation and binds the AP-1 clathrin adaptor. *Curr Biol.* 8: 1235-1238.
- Caplan, S., Dell'Angelica, E.C., Gahl, W.A. und Bonifacino, J.S. (2000) Trafficking of major histocompatibility complex class II molecules in human B-lymphoblasts deficient in the AP-3 adaptor complex. *Immunol Lett.* 72: 113-117.
- Carlsson, S.R. und Fukuda, M. (1992) The lysosomal membrane glycoprotein lamp-1 is transported to lysosomes by two alternative pathways. *Arch Biochem Biophys.* 296: 630-639.
- Carter, L.L., Redelmeier, T.E., Woollenweber, L.A. und Schmid, S.L. (1993) Multiple GTP-binding proteins participate in clathrin-coated vesicle-mediated endocytosis. *J Cell Biol.* 120: 37-45.
- Chang, M.P., Mallet, W.G., Mostov, K.E. und Brodsky, F.M. (1993) Adaptor self-aggregation, adaptor-receptor recognition and binding of alpha-adaptin subunits to the plasma membrane contribute to recruitment of adaptor (AP2) components of clathrin-coated pits. *Embo J.* 12: 2169-2180.
- Chapman, E.R., Desai, R.C., Davis, A.F. und Tornehl, C.K. (1998) Delineation of the oligomerization, AP-2 binding, and synprint binding region of the C2B domain of synaptotagmin. *J Biol Chem.* 273: 32966-32972.
- Chapuy, B. (2005) Analyse der putativen AP-3-Funktion für die Vesikelbildung am Trans-Golgi-Netzwerk. Dissertation. Universität Göttingen.
- Chaudhuri, R., Lindwasser, O.W., Smith, W.J., Hurley, J.H. und Bonifacino, J.S. (2007) Downregulation of CD4 by human immunodeficiency virus type 1 Nef is dependent on clathrin and involves direct interaction of Nef with the AP2 clathrin adaptor. *J Virol.* 81: 3877-3890.
- Chen, H.J., Remmler, J., Delaney, J.C., Messner, D.J. und Lobel, P. (1993) Mutational analysis of the cation-independent mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor. A consensus casein kinase II site followed by 2 leucines near the carboxyl terminus is important for intracellular targeting of lysosomal enzymes. *J Biol Chem.* 268: 22338-22346.
- Chuang, E., Alegre, M.L., Duckett, C.S., Noel, P.J., Vander Heiden, M.G. und Thompson, C.B. (1997) Interaction of CTLA-4 with the clathrin-associated protein AP50 results in ligand-independent endocytosis that limits cell surface expression. *J Immunol.* 159: 144-151.

- Coleman, S.H., Van Damme, N., Day, J.R., Noviello, C.M., Hitchin, D., Madrid, R., *et al.* (2005) Leucine-specific, functional interactions between human immunodeficiency virus type 1 Nef and adaptor protein complexes. *J Virol.* 79: 2066-2078.
- Collins, B.M., McCoy, A.J., Kent, H.M., Evans, P.R. und Owen, D.J. (2002) Molecular architecture and functional model of the endocytic AP2 complex. *Cell.* 109: 523-535.
- Collins, B.M., Watson, P.J. und Owen, D.J. (2003) The structure of the GGA1-GAT domain reveals the molecular basis for ARF binding and membrane association of GGAs. *Dev Cell.* 4: 321-332.
- Conner, S.D. und Schmid, S.L. (2002) Identification of an adaptor-associated kinase, AAK1, as a regulator of clathrin-mediated endocytosis. *J Cell Biol.* 156: 921-929.
- Conner, S.D. und Schmid, S.L. (2003) Differential requirements for AP-2 in clathrin-mediated endocytosis. *J Cell Biol.* 162: 773-779.
- Cowles, C.R., Odorizzi, G., Payne, G.S. und Emr, S.D. (1997) The AP-3 adaptor complex is essential for cargo-selective transport to the yeast vacuole. *Cell.* 91: 109-118.
- Craig, H.M., Reddy, T.R., Riggs, N.L., Dao, P.P. und Guatelli, J.C. (2000) Interactions of HIV-1 nef with the mu subunits of adaptor protein complexes 1, 2, and 3: role of the dileucine-based sorting motif. *Virology.* 271: 9-17.
- Crottet, P., Meyer, D.M., Rohrer, J. und Spiess, M. (2002) ARF1.GTP, tyrosine-based signals, and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate constitute a minimal machinery to recruit the AP-1 clathrin adaptor to membranes. *Mol Biol Cell.* 13: 3672-3682.
- Cuervo, A.M. und Dice, J.F. (1996) A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. *Science.* 273: 501-503.
- Daugherty, B.L., Straley, K.S., Sanders, J.M., Phillips, J.W., Disdier, M., McEver, R.P. und Green, S.A. (2001) AP-3 adaptor functions in targeting P-selectin to secretory granules in endothelial cells. *Traffic.* 2: 406-413.
- Dell'Angelica, E.C., Aguilar, R.C., Wolins, N., Hazelwood, S., Gahl, W.A. und Bonifacino, J.S. (2000) Molecular characterization of the protein encoded by the Hermansky-Pudlak syndrome type 1 gene. *J Biol Chem.* 275: 1300-1306.
- Dell'Angelica, E.C., Klumperman, J., Stoorvogel, W. und Bonifacino, J.S. (1998) Association of the AP-3 adaptor complex with clathrin. *Science.* 280: 431-434.

- Dell'Angelica, E.C., Mullins, C. und Bonifacino, J.S. (1999a) AP-4, a novel protein complex related to clathrin adaptors. *J Biol Chem.* 274: 7278-7285.
- Dell'Angelica, E.C., Ohno, H., Ooi, C.E., Rabinovich, E., Roche, K.W. und Bonifacino, J.S. (1997a) AP-3: an adaptor-like protein complex with ubiquitous expression. *Embo J.* 16: 917-928.
- Dell'Angelica, E.C., Ooi, C.E. und Bonifacino, J.S. (1997b) Beta3A-adaptin, a subunit of the adaptor-like complex AP-3. *J Biol Chem.* 272: 15078-15084.
- Dell'Angelica, E.C., Shotelersuk, V., Aguilar, R.C., Gahl, W.A. und Bonifacino, J.S. (1999) Altered trafficking of lysosomal proteins in Hermansky-Pudlak syndrome due to mutations in the beta 3A subunit of the AP-3 adaptor. *Mol Cell.* 3: 11-21.
- Dietrich, J., Hou, X., Wegener, A.M. und Geisler, C. (1994) CD3 gamma contains a phosphoserine-dependent di-leucine motif involved in down-regulation of the T cell receptor. *Embo J.* 13: 2156-2166.
- Dietrich, J., Hou, X., Wegener, A.M., Pedersen, L.O., Odum, N. und Geisler, C. (1996) Molecular characterization of the di-leucine-based internalization motif of the T cell receptor. *J Biol Chem.* 271: 11441-11448.
- Dietrich, J., Kastrop, J., Nielsen, B.L., Odum, N. und Geisler, C. (1997) Regulation and function of the CD3gamma DxxxLL motif: a binding site for adaptor protein-1 and adaptor protein-2 in vitro. *J Cell Biol.* 138: 271-281.
- Diviani, D., Lattion, A.L., Abuin, L., Staub, O. und Cotecchia, S. (2003) The adaptor complex 2 directly interacts with the alpha 1b-adrenergic receptor and plays a role in receptor endocytosis. *J Biol Chem.* 278: 19331-19340.
- Donaldson, J.G. (2003) Multiple roles for Arf6: sorting, structuring, and signaling at the plasma membrane. *J Biol Chem.* 278: 41573-41576.
- Doray, B., Ghosh, P., Griffith, J., Geuze, H.J. und Kornfeld, S. (2002) Cooperation of GGAs and AP-1 in packaging MPRs at the trans-Golgi network. *Science.* 297: 1700-1703.
- Doray, B., Lee, I., Knisely, J., Bu, G. und Kornfeld, S. (2007) The  $\{\gamma\}\{\sigma\}1$  and  $\{\alpha\}\{\sigma\}2$  Hemicomplexes of Clathrin Adaptors AP-1 and AP-2 Harbor the Dileucine Recognition Site. *Mol Biol Cell.* 18: 1887-1896.
- D'Souza, M.P. und August, J.T. (1986) A kinetic analysis of biosynthesis and localization of a lysosome-associated membrane glycoprotein. *Arch Biochem Biophys.* 249: 522-532.

D'Souza-Schorey, C. und Chavrier, P. (2006) ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7: 347-358.

Eskelinen, E.L., Cuervo, A.M., Taylor, M.R., Nishino, I., Blum, J.S., Dice, J.F., *et al.* (2005) Unifying nomenclature for the isoforms of the lysosomal membrane protein LAMP-2. *Traffic.* 6: 1058-1061.

Eskelinen, E.L., Tanaka, Y. und Saftig, P. (2003) At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins. *Trends Cell Biol.* 13: 137-145.

Fache, M.P., Moussif, A., Fernandes, F., Giraud, P., Garrido, J.J. und Dargent, B. (2004) Endocytotic elimination and domain-selective tethering constitute a potential mechanism of protein segregation at the axonal initial segment. *J Cell Biol.* 166: 571-578.

Falguieres, T., Mallard, F., Baron, C., Hanau, D., Lingwood, C., Goud, B., *et al.* (2001) Targeting of Shiga toxin B-subunit to retrograde transport route in association with detergent-resistant membranes. *Mol Biol Cell.* 12: 2453-2468.

Faundez, V., Horng, J.T. und Kelly, R.B. (1998) A function for the AP3 coat complex in synaptic vesicle formation from endosomes. *Cell.* 93: 423-432.

Faundez, V.V. und Kelly, R.B. (2000) The AP-3 complex required for endosomal synaptic vesicle biogenesis is associated with a casein kinase I $\alpha$ -like isoform. *Mol Biol Cell.* 11: 2591-2604.

Feng, L., Seymour, A.B., Jiang, S., To, A., Peden, A.A., Novak, E.K., *et al.* (1999) The beta3A subunit gene (Ap3b1) of the AP-3 adaptor complex is altered in the mouse hypopigmentation mutant pearl, a model for Hermansky-Pudlak syndrome and night blindness. *Hum Mol Genet.* 8: 323-330.

Fingerhut, A. (2000) Untersuchungen zur Beeinflussung der Interaktion von AP2 mit cytoplasmatischen Rezeptordomänen durch die Phosphorylierung und Dephosphorylierung von AP2. Dissertation. Universität Göttingen.

Fingerhut, A., von Figura, K. und Honing, S. (2001) Binding of AP2 to sorting signals is modulated by AP2 phosphorylation. *J Biol Chem.* 276: 5476-5482.

Fölsch, H., Pypaert, M., Schu, P. und Mellman, I. (2001) Distribution and function of AP-1 clathrin adaptor complexes in polarized epithelial cells. *J Cell Biol.* 152: 595-606.

Gaidarov, I. und Keen, J.H. (1999) Phosphoinositide-AP-2 interactions required for targeting to plasma membrane clathrin-coated pits. *J Cell Biol.* 146: 755-764.

- Gaidarov, I., Chen, Q., Falck, J.R., Reddy, K.K. und 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.
- Gaidarov, I., Smith, M.E., Domin, J. und Keen, J.H. (2001) The class II phosphoinositide 3-kinase C2alpha is activated by clathrin and regulates clathrin-mediated membrane trafficking. *Mol Cell.* 7: 443-449.
- Gan, Y., McGraw, T.E. und Rodriguez-Boulan, E. (2002) The epithelial-specific adaptor AP1B mediates post-endocytic recycling to the basolateral membrane. *Nat Cell Biol.* 4: 605-609.
- Geisler, C., Dietrich, J., Nielsen, B.L., Kastrop, J., Lauritsen, J.P., Odum, N. und Christensen, M.D. (1998) Leucine-based receptor sorting motifs are dependent on the spacing relative to the plasma membrane. *J Biol Chem.* 273: 21316-21323.
- Geyer, M., Fackler, O.T. und Peterlin, B.M. (2002) Subunit H of the V-ATPase involved in endocytosis shows homology to beta-adaptins. *Mol Biol Cell.* 13: 2045-2056.
- Ghosh, P. und Kornfeld, S. (2003) AP-1 binding to sorting signals and release from clathrin-coated vesicles is regulated by phosphorylation. *J Cell Biol.* 160: 699-708.
- Ghosh, P. und Kornfeld, S. (2003b) Phosphorylation-induced conformational changes regulate GGAs 1 and 3 function at the trans-Golgi network. *J Biol Chem.* 278: 14543-14549.
- Gonzalez-Gaitan, M. und Jackle, H. (1997) Role of Drosophila alpha-adaptin in presynaptic vesicle recycling. *Cell.* 88: 767-776.
- Gough, N.R. und Fambrough, D.M. (1997) Different steady state subcellular distributions of the three splice variants of lysosome-associated membrane protein LAMP-2 are determined largely by the COOH-terminal amino acid residue. *J Cell Biol.* 137: 1161-1169.
- Gough, N.R., Hatem, C.L. und Fambrough, D.M. (1995) The family of LAMP-2 proteins arises by alternative splicing from a single gene: characterization of the avian LAMP-2 gene and identification of mammalian homologs of LAMP-2b and LAMP-2c. *Dev Cell Biol.* 14: 863-867.
- Gough, N.R., Zweifel, M.E., Martinez-Augustin, O., Aguilar, R.C., Bonifacino, J.S. und Fambrough, D.M. (1999) Utilization of the indirect lysosome targeting pathway by lysosome-associated membrane proteins (LAMPs) is influenced largely by the C-terminal residue of their GYXXphi targeting signals. *J Cell Sci.* 112 ( Pt 23): 4257-4269.

- Green, S.A., Zimmer, K.P., Griffiths, G. und Mellman, I. (1987) Kinetics of intracellular transport and sorting of lysosomal membrane and plasma membrane proteins. *J Cell Biol.* 105: 1227-1240.
- Greenberg, M., DeTulleo, L., Rapoport, I., Skowronski, J. und Kirchhausen, T. (1998) A dileucine motif in HIV-1 Nef is essential for sorting into clathrin-coated pits and for downregulation of CD4. *Curr Biol.* 8: 1239-1242.
- Guarnieri, F.G., Arterburn, L.M., Penno, M.B., Cha, Y. und August, J.T. (1993) The motif Tyr-X-X-hydrophobic residue mediates lysosomal membrane targeting of lysosome-associated membrane protein 1. *J Biol Chem.* 268: 1941-1946.
- Harter, C. und Mellman, I. (1992) Transport of the lysosomal membrane glycoprotein lgp120 (lgp-A) to lysosomes does not require appearance on the plasma membrane. *J Cell Biol.* 117: 311-325.
- Hatem, C.L., Gough, N.R. und Fambrough, D.M. (1995) Multiple mRNAs encode the avian lysosomal membrane protein LAMP-2, resulting in alternative transmembrane and cytoplasmic domains. *J Cell Sci.* 108 ( Pt 5): 2093-2100.
- Haucke, V., Wenk, M.R., Chapman, E.R., Farsad, K. und De Camilli, P. (2000) Dual interaction of synaptotagmin with mu2- and alpha-adaptin facilitates clathrin-coated pit nucleation. *Embo J.* 19: 6011-6019.
- Heilker, R., Manning-Krieg, U., Zuber, J.F. und Spiess, M. (1996) In vitro binding of clathrin adaptors to sorting signals correlates with endocytosis and basolateral sorting. *Embo J.* 15: 2893-2899.
- Heldwein, E.E., Macia, E., Wang, J., Yin, H.L., Kirchhausen, T. und Harrison, S.C. (2004) Crystal structure of the clathrin adaptor protein 1 core. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101: 14108-14113.
- Heuser, J. (1980) Three-dimensional visualization of coated vesicle formation in fibroblasts. *J Cell Biol.* 84: 560-583.
- Hilary, J., McLauchlan, John, J., Lucucq, J.M. und Ponnambalam, S. (2001) Characterization and regulation of constitutive transport intermediates involved in Trafficking from thr trans-golgi network. *Cell Biology International.* 25: 705-713.
- Hinrichsen, L., Harborth, J., Andrees, L., Weber, K. und Ungewickell, E.J. (2003) Effect of clathrin heavy chain- and alpha-adaptin-specific small inhibitory RNAs on endocytic accessory proteins and receptor trafficking in HeLa cells. *J Biol Chem.* 278: 45160-45170.
- Hirst, J., Bright, N.A., Rous, B. und Robinson, M.S. (1999) Characterization of a fourth adaptor-related protein complex. *Mol Biol Cell.* 10: 2787-2802.

- Hofmann, M.W., Honing, S., Rodionov, D., Dobberstein, B., von Figura, K. und Bakke, O. (1999) The leucine-based sorting motifs in the cytoplasmic domain of the invariant chain are recognized by the clathrin adaptors AP1 and AP2 and their medium chains. *J Biol Chem.* 274: 36153-36158.
- Honing, S. und Hunziker, W. (1995) Cytoplasmic determinants involved in direct lysosomal sorting, endocytosis, and basolateral targeting of rat Igp120 (lamp-I) in MDCK cells. *J Cell Biol.* 128: 321-332.
- Honing, S., Griffith, J., Geuze, H.J. und 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.
- Honing, S., Ricotta, D., Krauss, M., Spate, K., Spolaore, B., Motley, A., *et al.* (2005) Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate regulates sorting signal recognition by the clathrin-associated adaptor complex AP2. *Mol Cell.* 18: 519-531.
- Honing, S., Sandoval, I.V. und 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.* 17: 1304-1314.
- Huang, F., Khvorova, A., Marshall, W. und Sorkin, A. (2004) Analysis of clathrin-mediated endocytosis of epidermal growth factor receptor by RNA interference. *J Biol Chem.* 279: 16657-16661.
- Huang, K.M., D'Hondt, K., Riezman, H. und Lemmon, S.K. (1999) Clathrin functions in the absence of heterotetrameric adaptors and AP180-related proteins in yeast. *Embo J.* 18: 3897-3908.
- Huizing, M., Anikster, Y. und Gahl, W.A. (2000) Hermansky-Pudlak syndrome and related disorders of organelle formation. *Traffic.* 1: 823-835.
- Huizing, M., Sarangarajan, R., Strovel, E., Zhao, Y., Gahl, W.A. und Boissy, R.E. (2001) AP-3 mediates tyrosinase but not TRP-1 trafficking in human melanocytes. *Mol Biol Cell.* 12: 2075-2085.
- Humphrey, J.S., Peters, P.J., Yuan, L.C. und Bonifacino, J.S. (1993) Localization of TGN38 to the trans-Golgi network: involvement of a cytoplasmic tyrosine-containing sequence. *J Cell Biol.* 120: 1123-1135.
- Hunziker, W. und Geuze, H.J. (1996) Intracellular trafficking of lysosomal membrane proteins. *Bioessays.* 18: 379-389.
- Hurley, J.H. (2006) Membrane binding domains. *Biochim Biophys Acta.* 1761: 805-811.
- Ihrke, G., Kytala, A., Russell, M.R., Rous, B.A. und Luzio, J.P. (2004) Differential use of two AP-3-mediated pathways by lysosomal membrane proteins. *Traffic.* 5: 946-962.

- Jackson, A.P., Flett, A., Smythe, C., Huffton, L., Wetthey, F.R. und Smythe, E. (2003) Clathrin promotes incorporation of cargo into coated pits by activation of the AP2 adaptor micro2 kinase. *J Cell Biol.* 163: 231-236.
- Janvier, K. und Bonifacino, J.S. (2005) Role of the endocytic machinery in the sorting of lysosome-associated membrane proteins. *Mol Biol Cell.* 16: 4231-4242.
- Janvier, K., Kato, Y., Boehm, M., Rose, J.R., Martina, J.A., Kim, B.Y., *et al.* (2003) Recognition of dileucine-based sorting signals from HIV-1 Nef and LIMP-II by the AP-1 gamma-sigma1 and AP-3 delta-sigma3 hemicomplexes. *J Cell Biol.* 163: 1281-1290.
- Jost, M., Simpson, F., Kavran, J.M., Lemmon, M.A. und Schmid, S.L. (1998) Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate is required for endocytic coated vesicle formation. *Curr Biol.* 8: 1399-1402.
- Kantheti, P., Qiao, X., Diaz, M.E., Peden, A.A., Meyer, G.E., Carskadon, S.L., *et al.* (1998) Mutation in AP-3 delta in the mocha mouse links endosomal transport to storage deficiency in platelets, melanosomes, and synaptic vesicles. *Neuron.* 21: 111-122.
- Kappeler, F., Itin, C., Schindler, R. und Hauri, H.P. (1994) A Dual Role for COOH-terminal Lysine Residues in pre-Golgi Retention and Endocytosis of ERGIC-53. *J Biol Chem.* 269: 6279-6281.
- Karlsson, R. und Falt, A. (1997) Experimental design for kinetic analysis of protein-protein interactions with surface plasmon resonance biosensors. *J Immunol Methods.* 200: 121-133.
- Kastning, K., Kukhtina, V., Kittler, J.T., Chen, G., Pechstein, A., Enders, S., *et al.* (2007) Molecular determinants for the interaction between AMPA receptors and the clathrin adaptor complex AP-2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104: 2991-2996.
- Khalifa, M.B., Choulier, L., Lortat-Jacob, H., Altschuh, D. und Vernet, T. (2001) BIACORE data processing: an evaluation of the global fitting procedure. *Anal Biochem.* 293: 194-203.
- Kirchhausen, T. (2000) Clathrin. *Annu Rev Biochem.* 69: 699-727.
- Kittler, J.T., Chen, G., Honing, S., Bogdanov, Y., McAinsh, K., Arancibia-Carcamo, I.L., *et al.* (2005) Phospho-dependent binding of the clathrin AP2 adaptor complex to GABAA receptors regulates the efficacy of inhibitory synaptic transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102: 14871-14876.
- Konecki, D.S., Foetisch, K., Zimmer, K.P., Schlotter, M. und Lichter-Konecki, U. (1995) An alternatively spliced form of the human lysosome-associated membrane protein-2 gene is expressed in a tissue-specific manner. *Biochem Biophys Res Commun.* 215: 757-767.

- Kongsvik, T.L., Honing, S., Bakke, O. und Rodionov, D.G. (2002) Mechanism of interaction between leucine-based sorting signals from the invariant chain and clathrin-associated adaptor protein complexes AP1 and AP2. *J Biol Chem.* 277: 16484-16488.
- Korolchuk, V.I. und Banting, G. (2002) CK2 and GAK/auxilin2 are major protein kinases in clathrin-coated vesicles. *Traffic.* 3: 428-439.
- Krauss, M., Kinuta, M., Wenk, M.R., De Camilli, P., Takei, K. und Haucke, V. (2003) ARF6 stimulates clathrin/AP-2 recruitment to synaptic membranes by activating phosphatidylinositol phosphate kinase type Igamma. *J Cell Biol.* 162: 113-124.
- Krauss, M., Kukhtina, V., Pechstein, A. und Haucke, V. (2006) Stimulation of phosphatidylinositol kinase type I-mediated phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate synthesis by AP-2mu-cargo complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103: 11934-11939.
- Kretschmar, D., Poeck, B., Roth, H., Ernst, R., Keller, A., Porsch, M., *et al.* (2000) Defective pigment granule biogenesis and aberrant behavior caused by mutations in the Drosophila AP-3beta adaptin gene ruby. *Genetics.* 155: 213-223.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685.
- Lafer, E.M. (2002) Clathrin-protein interactions. *Traffic.* 3: 513-520.
- Le Borgne, R., Alconada, A., Bauer, U. und Hoflack, B. (1998) The mammalian AP-3 adaptor-like complex mediates the intracellular transport of lysosomal membrane glycoproteins. *J Biol Chem.* 273: 29451-29461.
- Le Borgne, R., Griffiths, G. und Hoflack, B. (1996) Mannose 6-phosphate receptors and ADP-ribosylation factors cooperate for high affinity interaction of the AP-1 Golgi assembly proteins with membranes. *J Biol Chem.* 271: 2162-2170.
- Le Borgne, R., Schmidt, A., Mauxion, F., Griffiths, G. und 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.
- Lee, S.H., Liu, L., Wang, Y.T. und Sheng, M. (2002) Clathrin adaptor AP2 and NSF interact with overlapping sites of GluR2 and play distinct roles in AMPA receptor trafficking and hippocampal LTD. *Neuron.* 36: 661-674.

- Lee, S.S. und Banting, G. (2002) Characterisation of the luminal domain of TGN38 and effects of elevated expression of TGN38 on glycoprotein secretion. *Eur J Cell Biol.* 81: 609-621.
- Letourneur, F. und Klausner, R.D. (1992) A novel di-leucine motif and a tyrosine-based motif independently mediate lysosomal targeting and endocytosis of CD3 chains. *Cell.* 69: 1143-1157.
- Lewin, D.A. und Mellman, I. (1998) Sorting out adaptors. *Biochim Biophys Acta.* 1401: 129-145.
- Luzio, J.P., Brake, B., Banting, G., Howell, K.E., Braghetta, P. und Stanley, K.K. (1990) Identification, sequencing and expression of an integral membrane protein of the trans-Golgi network (TGN38). *Biochem J.* 270: 97-102.
- Madrid, R., Le Maout, S., Barrault, M.B., Janvier, K., Benichou, S. und Merot, J. (2001) Polarized trafficking and surface expression of the AQP4 water channel are coordinated by serial and regulated interactions with different clathrin-adaptor complexes. *Embo J.* 20: 7008-7021.
- Mallard, F., Antony, C., Tenza, D., Salamero, J., Goud, B. und Johannes, L. (1998) Direct pathway from early/recycling endosomes to the Golgi apparatus revealed through the study of shiga toxin B-fragment transport. *J Cell Biol.* 143: 973-990.
- Marsh, E.W., Leopold, P.L., Jones, N.L. und Maxfield, F.R. (1995) Oligomerized transferrin receptors are selectively retained by a luminal sorting signal in a long-lived endocytic recycling compartment. *J Cell Biol.* 129: 1509-1522.
- Matter, K. und Mellman, I. (1994) Mechanisms of cell polarity: sorting and transport in epithelial cells. *Curr Opin Cell Biol.* 6: 545-554.
- McNamara, J.O., 2nd, Grigston, J.C., VanDongen, H.M. und VanDongen, A.M. (2004) Rapid dendritic transport of TGN38, a putative cargo receptor. *Brain Res Mol Brain Res.* 127: 68-78.
- Meyer, C., Zizioli, D., Lausmann, S., Eskelinen, E.L., Hamann, J., Saftig, P., *et al.* (2000) mu1A-adaptin-deficient mice: lethality, loss of AP-1 binding and rerouting of mannose 6-phosphate receptors. *Embo J.* 19: 2193-2203.
- Mitsunari, T., Nakatsu, F., Shioda, N., Love, P.E., Grinberg, A., Bonifacino, J.S. und Ohno, H. (2005) Clathrin adaptor AP-2 is essential for early embryonal development. *Mol Cell Biol.* 25: 9318-9323.
- Molloy, S.S., Anderson, E.D., Jean, F. und Thomas, G. (1999) Bi-cycling the furin pathway: from TGN localization to pathogen activation and embryogenesis. *Trends Cell Biol.* 9: 28-35.

- Motley, A., Bright, N.A., Seaman, M.N. und Robinson, M.S. (2003) Clathrin-mediated endocytosis in AP-2-depleted cells. *J Cell Biol.* 162: 909-918.
- Motley, A.M., Berg, N., Taylor, M.J., Sahlender, D.A., Hirst, J., Owen, D.J. und Robinson, M.S. (2006) Functional analysis of AP-2 alpha and mu2 subunits. *Mol Biol Cell.* 17: 5298-5308.
- Mülhardt, C. (2000) Der Experimentator: Molekularbiologie. Heidelberg, Berlin. Spektrum Akademischer Verlag.
- Mullins, C., Hartnell, L.M. und Bonifacino, J.S. (2000) Distinct requirements for the AP-3 adaptor complex in pigment granule and synaptic vesicle biogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Mol Gen Genet.* 263: 1003-1014.
- Mullins, C., Hartnell, L.M., Wassarman, D.A. und Bonifacino, J.S. (1999) Defective expression of the mu3 subunit of the AP-3 adaptor complex in the *Drosophila* pigmentation mutant carmine. *Mol Gen Genet.* 262: 401-412.
- Munro, S. (2002) Organelle identity and the targeting of peripheral membrane proteins. *Curr Opin Cell Biol.* 14: 506-514.
- Narayan, K. und Lemmon, M.A. (2006) Determining selectivity of phosphoinositide-binding domains. *Methods.* 39: 122-133.
- Nesterov, A., Carter, R.E., Sorkina, T., Gill, G.N. und Sorkin, A. (1999) Inhibition of the receptor-binding function of clathrin adaptor protein AP-2 by dominant-negative mutant mu2 subunit and its effects on endocytosis. *Embo J.* 18: 2489-2499.
- Newman, L.S., McKeever, M.O., Okano, H.J. und Darnell, R.B. (1995) Beta-NAP, a cerebellar degeneration antigen, is a neuron-specific vesicle coat protein. *Cell.* 82: 773-783.
- Nishino, I., Fu, J., Tanji, K., Yamada, T., Shimojo, S., Koori, T., *et al.* (2000) Primary LAMP-2 deficiency causes X-linked vacuolar cardiomyopathy and myopathy (Danon disease). *Nature.* 406: 906-910.
- Obermuller, S., Kiecke, C., von Figura, K. und Honing, S. (2002) The tyrosine motifs of Lamp 1 and LAP determine their direct and indirect targeting to lysosomes. *J Cell Sci.* 115: 185-194.
- Odorizzi, G., Cowles, C.R. und Emr, S.D. (1998) The AP-3 complex: a coat of many colours. *Trends Cell Biol.* 8: 282-288.

- Ohno, H., Aguilar, R.C., Yeh, D., Taura, D., Saito, T. und Bonifacino, J.S. (1998) The medium subunits of adaptor complexes recognize distinct but overlapping sets of tyrosine-based sorting signals. *J Biol Chem.* 273: 25915-25921.
- Ohno, H., Fournier, M.C., Poy, G. und Bonifacino, J.S. (1996) Structural determinants of interaction of tyrosine-based sorting signals with the adaptor medium chains. *J Biol Chem.* 271: 29009-29015.
- Ohno, H., Stewart, J., Fournier, M.C., Bosshart, H., Rhee, I., Miyatake, S., *et al.* (1995) Interaction of tyrosine-based sorting signals with clathrin-associated proteins. *Science.* 269: 1872-1875.
- Ohno, H., Tomemori, T., Nakatsu, F., Okazaki, Y., Aguilar, R.C., Foelsch, H., *et al.* (1999) Mu1B, a novel adaptor medium chain expressed in polarized epithelial cells. *FEBS Lett.* 449: 215-220.
- Olusanya, O., Andrews, P.D., Swedlow, J.R. und Smythe, E. (2001) Phosphorylation of threonine 156 of the mu2 subunit of the AP2 complex is essential for endocytosis in vitro and in vivo. *Curr Biol.* 11: 896-900.
- Ooi, C.E., Moreira, J.E., Dell'Angelica, E.C., Poy, G., Wassarman, D.A. und Bonifacino, J.S. (1997) Altered expression of a novel adaptin leads to defective pigment granule biogenesis in the Drosophila eye color mutant garnet. *Embo J.* 16: 4508-4518.
- Owen, D.J. und Evans, P.R. (1998) A structural explanation for the recognition of tyrosine-based endocytotic signals. *Science.* 282: 1327-1332.
- Owen, D.J., Collins, B.M. und Evans, P.R. (2004) Adaptors for clathrin coats: structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 20: 153-191.
- Owen, D.J., Setiadi, H., Evans, P.R., McEver, R.P. und Green, S.A. (2001) A third specificity-determining site in mu 2 adaptin for sequences upstream of Yxx phi sorting motifs. *Traffic.* 2: 105-110.
- Owen, D.J., Vallis, Y., Noble, M.E., Hunter, J.B., Dafforn, T.R., Evans, P.R. und McMahon, H.T. (1999) A structural explanation for the binding of multiple ligands by the alpha-adaptin appendage domain. *Cell.* 97: 805-815.
- Owen, D.J., Vallis, Y., Pearse, B.M., McMahon, H.T. und Evans, P.R. (2000) The structure and function of the beta 2-adaptin appendage domain. *Embo J.* 19: 4216-4227.
- Padron, D., Wang, Y.J., Yamamoto, M., Yin, H. und Roth, M.G. (2003) Phosphatidylinositol phosphate 5-kinase Ibeta recruits AP-2 to the plasma membrane and regulates rates of constitutive endocytosis. *J Cell Biol.* 162: 693-701.

- Page, L.J. und Robinson, M.S. (1995) Targeting signals and subunit interactions in coated vesicle adaptor complexes. *J Cell Biol.* 131: 619-630.
- Palacios, F., Price, L., Schweitzer, J., Collard, J.G. und D'Souza-Schorey, C. (2001) An essential role for ARF6-regulated membrane traffic in adherens junction turnover and epithelial cell migration. *Embo J.* 20: 4973-4986.
- Paleotti, O., Macia, E., Luton, F., Klein, S., Partisani, M., Chardin, P., *et al.* (2005) The small G-protein Arf6GTP recruits the AP-2 adaptor complex to membranes. *J Biol Chem.* 280: 21661-21666.
- Panek, H.R., Stepp, J.D., Engle, H.M., Marks, K.M., Tan, P.K., Lemmon, S.K. und Robinson, L.C. (1997) Suppressors of YCK-encoded yeast casein kinase 1 deficiency define the four subunits of a novel clathrin AP-like complex. *Embo J.* 16: 4194-4204.
- Pasqualato, S., Menetrey, J., Franco, M. und Cherfils, J. (2001) The structural GDP/GTP cycle of human Arf6. *EMBO Rep.* 2: 234-238.
- Pauloin, A. und 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 ( Pt 2): 409-415.
- Peden, A.A., Oorschot, V., Hesser, B.A., Austin, C.D., Scheller, R.H. und Klumperman, J. (2004) Localization of the AP-3 adaptor complex defines a novel endosomal exit site for lysosomal membrane proteins. *J Cell Biol.* 164: 1065-1076.
- Peden, A.A., Rudge, R.E., Lui, W.W. und Robinson, M.S. (2002) Assembly and function of AP-3 complexes in cells expressing mutant subunits. *J Cell Biol.* 156: 327-336.
- Pitcher, C., Honing, S., Fingerhut, A., Bowers, K. und Marsh, M. (1999) Cluster of differentiation antigen 4 (CD4) endocytosis and adaptor complex binding require activation of the CD4 endocytosis signal by serine phosphorylation. *Mol Biol Cell.* 10: 677-691.
- Puertollano, R., Aguilar, R.C., Gorshkova, I., Crouch, R.J. und Bonifacino, J.S. (2001) Sorting of mannose 6-phosphate receptors mediated by the GGAs. *Science.* 292: 1712-1716.
- Puertollano, R., van der Wel, N.N., Greene, L.E., Eisenberg, E., Peters, P.J. und Bonifacino, J.S. (2003) Morphology and dynamics of clathrin/GGA1-coated carriers budding from the trans-Golgi network. *Mol Biol Cell.* 14: 1545-1557.

- Rad, M.R., Phan, H.L., Kirchrath, L., Tan, P.K., Kirchhausen, T., Hollenberg, C.P. und Payne, G.S. (1995) *Saccharomyces cerevisiae* Apl2p, a homologue of the mammalian clathrin AP beta subunit, plays a role in clathrin-dependent Golgi functions. *J Cell Sci.* 108 ( Pt 4): 1605-1615.
- Randazzo, P.A., Nie, Z., Miura, K. und Hsu, V.W. (2000) Molecular aspects of the cellular activities of ADP-ribosylation factors. *Sci STKE.* 2000: RE1.
- Rapoport, I., Chen, Y.C., Cupers, P., Shoelson, S.E. und 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.
- Rapoport, I., Miyazaki, M., Boll, W., Duckworth, B., Cantley, L.C., Shoelson, S. und Kirchhausen, T. (1997) Regulatory interactions in the recognition of endocytic sorting signals by AP-2 complexes. *Embo J.* 16: 2240-2250.
- Reaves, B.J., Banting, G. und Luzio, J.P. (1998) Lumenal and transmembrane domains play a role in sorting type I membrane proteins on endocytic pathways. *Mol Biol Cell.* 9: 1107-1122.
- Reddy, A., Caler, E.V. und Andrews, N.W. (2001) Plasma membrane repair is mediated by Ca<sup>2+</sup>-regulated exocytosis of lysosomes. *Cell.* 106: 157-169.
- Reusch, U., Bernhard, O., Koszinowski, U. und Schu, P. (2002) AP-1A and AP-3A lysosomal sorting functions. *Traffic.* 3: 752-761.
- Ricotta, D., Conner, S.D., Schmid, S.L., von Figura, K. und Honing, S. (2002) Phosphorylation of the AP2 mu subunit by AAK1 mediates high affinity binding to membrane protein sorting signals. *J Cell Biol.* 156: 791-795.
- Rodionov, D.G. und Bakke, O. (1998) Medium chains of adaptor complexes AP-1 and AP-2 recognize leucine-based sorting signals from the invariant chain. *J Biol Chem.* 273: 6005-6008.
- Rohde, G., Wenzel, D. und Haucke, V. (2002) A phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate binding site within mu2-adaptin regulates clathrin-mediated endocytosis. *J Cell Biol.* 158: 209-214.
- Rohrer, J., Schweizer, A., Russell, D. und Kornfeld, S. (1996) The targeting of Lamp1 to lysosomes is dependent on the spacing of its cytoplasmic tail tyrosine sorting motif relative to the membrane. *J Cell Biol.* 132: 565-576.
- Roth, M.G. (2004) Phosphoinositides in constitutive membrane traffic. *Physiol Rev.* 84: 699-730.

- Rous, B.A., Reaves, B.J., Ihrke, G., Briggs, J.A., Gray, S.R., Stephens, D.J., *et al.* (2002) Role of adaptor complex AP-3 in targeting wild-type and mutated CD63 to lysosomes. *Mol Biol Cell*. 13: 1071-1082.
- Sandoval, I.V. und Bakke, O. (1994) Targeting of membrane proteins to endosomes and lysosomes. *Trends Cell Biol*. 4: 292-297.
- Schmidt, U., Briese, S., Leicht, K., Schurmann, A., Joost, H.G. und Al-Hasani, H. (2006) Endocytosis of the glucose transporter GLUT8 is mediated by interaction of a dileucine motif with the beta2-adaptin subunit of the AP-2 adaptor complex. *J Cell Sci*. 119: 2321-2331.
- Seaman, M.N., Ball, C.L. und Robinson, M.S. (1993) Targeting and mistargeting of plasma membrane adaptors in vitro. *J Cell Biol*. 123: 1093-1105.
- Sevrioukov, E.A., He, J.P., Moghrabi, N., Sunio, A. und Kramer, H. (1999) A role for the deep orange and carnation eye color genes in lysosomal delivery in *Drosophila*. *Mol Cell*. 4: 479-486.
- Shim, J. und Lee, J. (2000) Molecular genetic analysis of *apm-2* and *aps-2*, genes encoding the medium and small chains of the AP-2 clathrin-associated protein complex in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Mol Cells*. 10: 309-316.
- Shim, J., Sternberg, P.W. und Lee, J. (2000) Distinct and redundant functions of mu1 medium chains of the AP-1 clathrin-associated protein complex in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biol Cell*. 11: 2743-2756.
- Shiratori, T., Miyatake, S., Ohno, H., Nakaseko, C., Isono, K., Bonifacino, J.S. und Saito, T. (1997) Tyrosine phosphorylation controls internalization of CTLA-4 by regulating its interaction with clathrin-associated adaptor complex AP-2. *Immunity*. 6: 583-589.
- Simmen, T., Honing, S., Icking, A., Tikkanen, R. und Hunziker, W. (2002) AP-4 binds basolateral signals and participates in basolateral sorting in epithelial MDCK cells. *Nat Cell Biol*. 4: 154-159.
- Simons, K. und Ikonen, E. (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature*. 387: 569-572.
- Simonsen, A., Wurmser, A.E., Emr, S.D. und Stenmark, H. (2001) The role of phosphoinositides in membrane transport. *Curr Opin Cell Biol*. 13: 485-492.
- Simpson, F., Peden, A.A., Christopoulou, L. und Robinson, M.S. (1997) Characterization of the adaptor-related protein complex, AP-3. *J Cell Biol*. 137: 835-845.

- Sosa, M.A., Schmidt, B., von Figura, K. und 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.
- Stephens, D.J. und Banting, G. (1998) Specificity of interaction between adaptor-complex medium chains and the tyrosine-based sorting motifs of TGN38 and Igp120. *Biochem J.* 335 ( Pt 3): 567-572.
- Stephens, D.J., Crump, C.M., Clarke, A.R. und Banting, G. (1997) Serine 331 and tyrosine 333 are both involved in the interaction between the cytosolic domain of TGN38 and the mu2 subunit of the AP2 clathrin adaptor complex. *J Biol Chem.* 272: 14104-14109.
- Stepp, J.D., Huang, K. und Lemmon, S.K. (1997) The yeast adaptor protein complex, AP-3, is essential for the efficient delivery of alkaline phosphatase by the alternate pathway to the vacuole. *J Cell Biol.* 139: 1761-1774.
- Stoorvogel, W. (1998) Analysis of the endocytic system by using horseradish peroxidase. *Trends Cell Biol.* 8: 503-505.
- Stoorvogel, W., Oorschot, V. und Geuze, H.J. (1996) A novel class of clathrin-coated vesicles budding from endosomes. *J Cell Biol.* 132: 21-33.
- Tanaka, Y., Guhde, G., Suter, A., Eskelinen, E.L., Hartmann, D., Lullmann-Rauch, R., *et al.* (2000) Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice. *Nature.* 406: 902-906.
- Traub, L.M. (2005) Common principles in clathrin-mediated sorting at the Golgi and the plasma membrane. *Biochim Biophys Acta.* 1744: 415-437.
- Traub, L.M., Bannykh, S.I., Rodel, J.E., Aridor, M., Balch, W.E. und Kornfeld, S. (1996) AP-2-containing clathrin coats assemble on mature lysosomes. *J Cell Biol.* 135: 1801-1814.
- Umeda, A., Meyerholz, A. und Ungewickell, E. (2000) Identification of the universal cofactor (auxilin 2) in clathrin coat dissociation. *Eur J Cell Biol.* 79: 336-342.
- von Essen, M., Menne, C., Nielsen, B.L., Lauritsen, J.P., Dietrich, J., Andersen, P.S., *et al.* (2002) The CD3 gamma leucine-based receptor-sorting motif is required for efficient ligand-mediated TCR down-regulation. *J Immunol.* 168: 4519-4523.
- Wang, Y.J., Wang, J., Sun, H.Q., Martinez, M., Sun, Y.X., Macia, E., *et al.* (2003) Phosphatidylinositol 4 phosphate regulates targeting of clathrin adaptor AP-1 complexes to the Golgi. *Cell.* 114: 299-310.

- Wilde, A. und Brodsky, F.M. (1996) In vivo phosphorylation of adaptors regulates their interaction with clathrin. *J Cell Biol.* 135: 635-645.
- Williams, M.A. und Fukuda, M. (1990) Accumulation of membrane glycoproteins in lysosomes requires a tyrosine residue at a particular position in the cytoplasmic tail. *J Cell Biol.* 111: 955-966.
- Witz, J. (1999) Kinetic analysis of analyte binding by optical biosensors: hydrodynamic penetration of the analyte flow into the polymer matrix reduces the influence of mass transport. *Anal Biochem.* 270: 201-206.
- Wolins, N., Bosshart, H., Kuster, H. und Bonifacino, J.S. (1997) Aggregation as a determinant of protein fate in post-Golgi compartments: role of the luminal domain of furin in lysosomal targeting. *J Cell Biol.* 139: 1735-1745.
- Wong, S.H. und Hong, W. (1993) The SXYQRL sequence in the cytoplasmic domain of TGN38 plays a major role in trans-Golgi network localization. *J Biol Chem.* 268: 22853-22862.
- Yang, W., Li, C., Ward, D.M., Kaplan, J. und Mansour, S.L. (2000) Defective organellar membrane protein trafficking in Ap3b1-deficient cells. *J Cell Sci.* 113 ( Pt 22): 4077-4086.
- Yeung, B.G., Phan, H.L. und Payne, G.S. (1999) Adaptor complex-independent clathrin function in yeast. *Mol Biol Cell.* 10: 3643-3659.
- Zhang, J.Z., Davletov, B.A., Sudhof, T.C. und Anderson, R.G. (1994) Synaptotagmin I is a high affinity receptor for clathrin AP-2: implications for membrane recycling. *Cell.* 78: 751-760.
- Zhang, Y. und Allison, J.P. (1997) Interaction of CTLA-4 with AP50, a clathrin-coated pit adaptor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94: 9273-9278.
- Zhen, L., Jiang, S., Feng, L., Bright, N.A., Peden, A.A., Seymour, A.B., *et al.* (1999) Abnormal expression and subcellular distribution of subunit proteins of the AP-3 adaptor complex lead to platelet storage pool deficiency in the pearl mouse. *Blood.* 94: 146-155.
- Zizioli, D., Meyer, C., Guhde, G., Saftig, P., von Figura, K. und Schu, P. (1999) Early embryonic death of mice deficient in gamma-adaptin. *J Biol Chem.* 274: 5385-5390.

## Abkürzungsverzeichnis

A. bidest	Aqua bidestillata
AAK1	Adaptor-assoziierte Kinase 1
ADP	Adenosindiphosphat
AP	Heterotetramerer Adaptorprotein-Komplex
AP180	Adaptorprotein 180
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AQP4	Aquaporin 4
ARF	ADP-Ribosylierungsfaktor
ARH	Autosomal recessive hypercholesterolemia
Arl	Arf-like proteins
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BAR-Domäne	Bin-Amphiphysin-Rvs-Domäne
c- $\mu$	C-terminaler Anteil der $\mu$ -Kette
CA-Domäne	Capsid-Domäne
CALM	Clathrin assembly lymphoid myeloid leukemia protein
CCP	Clathrin-coated pit
CCV	Clathrin-coated vesicle
CD	Cluster of differentiation
CD-MPR	Cation-dependent mannose-6-phosphate receptor
cDNA	Komplementäre DNA
CD-Spektroskopie	Zirkulardichroismus Spektroskopie
CHAPS	3-(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio-1-propansulfonat
CI-MPR	Cation-independent mannose-6-phosphate receptor
Dab2	Disabled-2
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2-Desoxynucleosid-5'-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol

## Abkürzungsverzeichnis

---

E	Endosome
E. coli	Escherichia coli
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethyl-amino-propyl)-carbodiimid-hydrochlorid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDV	Elektronische Datenverarbeitung
EE	Early endosome
EGF-R	Epidermal-growth-factor-receptor
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
ENTH-Domäne	Epsin N-terminal homology domain
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et. al.	et alteri
FAPP	Four-phosphate adaptor proteins
FPLC	Fast protein liquid chromatography
GAP	GTPase activating protein
GAT-Domäne	GGA protein and Tom1
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	GTP exchange factors
GGA	Golgi-localized,- $\gamma$ -ear-containing,-ARF-binding protein
GH-R	Growth-hormon-receptor
GST	Glutathionyl-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
HBS	HEPES buffered saline
HeLa-Zellen	Epithelzellen eines Zervixkarzinoms von Henrietta Lacks
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HIV-nef	HIV-negative factor
HPLC	High performance liquid chromatography
Hrs/Vps27p	Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate/ Vacuolar protein sorting
InsP <sub>6</sub>	Inositol-(1,2,3,4,5,6)-hexakisphosphat
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
ITC	Isothermale Titrations Calorimetrie

## Abkürzungsverzeichnis

---

ka	Assoziationsratenkonstante
KD	Dissoziationsgleichgewichtskonstante
kd	Dissoziationsratenkonstante
LAMP	Lysosomal associated membrane protein
LAP	Lysosomal acid phosphatase
LB	Luria Bertani Bakterien-Medium
LDL	Low-density lipoprotein
LE	Late endosome
Limp	Lysosomal integral membrane protein
LRO	Lysosomal related organelle
LUV	Large unilamellar vesicles
MET	MET-Rezeptor (hepatocyte growth factor receptor)
MHCII	Major histocompatibility complex II
MLV	Large multilamellar vesicles
MOPS	3-N-Morpholinopropansulfonsäure
MPB-PE	1,2-Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-Phospho-ethanolamine-N-[4-(p-maleimidophenyl)-butyramide])
MPR	Mannose-6-Phosphat-Rezeptor
mRNA	Messenger RNA
MVB	Multivesicular bodies
NHS	N-Hydroxysuccinimid
Ni-NTA	Nickel-Nitril-Tri-Essigsäure
OD	Optische Dichte
OSBP	Oxysterol-binding protein
PACS	Phosphofurin acidic cluster sorting protein
PBS	Phosphate buffered saline
PC	Phosphatidylcholin
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDEA	2-(2-Pyridinyldithio)-ethanamin-hydrochlorid
PE	Phosphatidylethanolamin
PH-Domäne	Pleckstrin-homologe Domäne
PI	Phosphatidylinositol
PI4P-Kinase	Phosphatidylinositol- 4-Phosphat Kinase

## Abkürzungsverzeichnis

---

PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol bisphosphat
PM	Plasmamembran
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PtdIns3,5P <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-3, 5-bisphosphat
PtdIns3P	Phosphatidylinositol-3-phosphat
PtdIns4,5P <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PtdIns4P	Phosphatidylinositol-4-phosphat
Rab	Ras-like protein from rat brain
RE	Recycling Endosomen
Req	RU im Gleichgewicht
Rmax	Maximale Bindungskapazität
RNA	Ribonucleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
RU	Resonanzeinheiten
Sar	Secretion-associated and RAS-related
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
siRNA	Small interfering RNA
Snx1	Sorting nexin 1
SOC-Medium	"Salt-optimized + carbon"-medium
SPR	Surface plasmon resonanz
β-NAP	Beta-3B neuronal adaptin
SUV	Small unilamellar vesicles
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	Thermophilus aquaticus
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TGN	Trans-Golgi-Netz
TGN38	Trans-Golgi-Netz Protein 38
TIP47	Tail interacting protein of 47kD
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRP1	Tyrosinase-related protein-1

## Abkürzungsverzeichnis

---

U	Units
UV	Ultraviolett
VHS	Vps27p, Hrs and STAM
VMAT	Vesikulärer Monoamintransporter

Aminosäuren wurden im Ein- bzw. Drei-Buchstaben-Code angegeben:

<b>Aminosäure</b>	<b>Ein-Buchstaben-Code</b>	<b>Drei-Buchstaben-Code</b>
Alanin	A	Ala
Arginin	R	Arg
Asparagin	N	Asn
Asparaginsäure	D	Asp
Cystein	C	Cys
Glutamin	Q	Gln
Glutaminsäure	E	Glu
Glycin	G	Gly
Histidin	H	His
Isoleucin	I	Ile
Leucin	L	Leu
Lysin	K	Lys
Methionin	M	Met
Phenylalanin	F	Phe
Prolin	P	Pro
Serin	S	Ser
Threonin	T	Thr
Tryptophan	W	Trp
Tyrosin	Y	Tyr
Valin	V	Val
Grosse hydrophobe Aminosäure	Φ	
Irgendeine Aminosäure	X	

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. Kurt von Figura und Herrn Prof. Dr. Ivo Feußner danke ich für die offizielle Betreuung und Begutachtung meiner Dissertation.

Besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Stefan Höning für die hervorragende Betreuung, die vielen Tipps und Anregungen in allen Fragen des wissenschaftlichen Alltags und das freundschaftliche Arbeitsverhältnis.

Bei Herrn Dr. David Owen möchte ich mich für die humorvolle und fruchtbare Zusammenarbeit, für die bereichernden Diskussionen und für die Unmengen an "happy proteins" bedanken.

Andrea Rüger danke ich herzlich dafür, dass sie mir im Labor immer mit Rat und Tat beiseite gestanden hat. Wir haben zusammen so manche Laborhürde gemeistert und sind darüber Freunde geworden.

Meiner Göttinger Arbeitsgruppe, Anna, Magda, Caro, Jens und Björn, danke ich für die Unterstützung und die freundschaftliche Laboratmosphäre.

Beim Kölner Team, Anke, Maarten, Thomas und Dominic, möchte ich mich für die schöne Zeit mit Bergen an Süßigkeiten und den tausend "dummen" Sprüchen bedanken. Aber auch dafür, dass ich nie das Gefühl hatte eine Frage sei Ihnen zu viel oder zu blöd.

Bei allen anderen Göttinger und Kölner Kollegen bedanke ich mich herzlich für die Unterstützung bei vielen fachlichen und alltäglichen Problemen.

Allen meine Greifswalder, Göttinger und Kölner Freunde ein Dankeschön fürs Mitfiebern und Daumendrücken.

Dabei geht ein ganz besonderes Dankeschön an meine Mitbewohnerin Judith, die in der letzten stressigen Phase so manch riesigen Abwaschberg ertragen und mich immer unterstützt und zum Durchhalten ermutigt hat.

Bei meiner Schwester, meinen Eltern und meinen Grosseltern möchte ich von Herzen dafür bedanken, dass sie immer für mich da waren und es immer sein werden.

Vor allem bei Tillmann möchte ich mich für die andauernde Unterstützung ganz besonders bedanken. Er hat mich immer wieder daran erinnert, wozu man fähig ist, wenn man sich etwas zutraut und mir die Kraft dafür gegeben.

## Lebenslauf

20. Mai 1979 Geboren in Karlsburg als Tochter von Renit Späte,  
geborene Fleckeisen und Dr. Lothar Späte
- 1985 - 1991 Besuch der Erwin-Fischer-Schule in Greifswald
- 1991 - 1997 Besuch des Friedrich-Ludwig-Jahn-Gymnasiums in Greifswald
20. Juni 1997 Erwerb der Hochschulreife
- 1997 - 2003 Studium an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald  
Studiengang : Humanbiologie  
Hauptfach : Biochemie/Molekularbiologie  
Nebenfach 1 : Mikrobiologie/Virologie  
Nebenfach 2 : Funktionelle Morphologie
- Dezember 2001-  
November 2002 Diplomarbeit angefertigt in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof.  
Dr. Walther am Institut für Medizinische Biochemie und  
Molekularbiologie der Medizinischen Fakultät an der Ernst-  
Moritz-Arndt-Universität Greifswald  
  
Thema der Diplomarbeit: Proteomanalyse von  
Rattenhirnproben nach PTZ-induzierten epileptischen Anfällen
18. November 2002 Erlangung des akademischen Grades Diplom-Humanbiologin
- Mai 2003-  
März 2005 Promotion am Zentrum für Molekulare Zellbiologie und  
Biochemie der Georg-August-Universität Göttingen in der  
Abteilung Biochemie II von Herrn Prof. Dr. Kurt von Figura, in  
der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Stefan Höning
- seit April 2005 Weiterführung der Promotion am Institut für Biochemie I der  
Medizinischen Fakultät an der Universität zu Köln aufgrund der  
Berufung von Herrn Prof. Dr. Stefan Höning an dieses Institut