

3. Identifizierung und Charakterisierung von HIP1-interagierenden Proteinen

3.1 Ergebnisse

3.1.1 Strukturanalyse von HIP1

Um neue Hinweise auf die Funktion des Proteins HIP1 zu erlangen, wurde die Proteindomänenstruktur des Proteins mit Hilfe der Computerprogramme SMART (Simple Modular Architecture Research Tool) und Pfam (collection of protein families and domains) untersucht. Diese Programme findet man im Internet unter der Seite www.expasy.ch in der Rubrik „proteomics tools“ und „pattern and profile searches“. Sie enthalten eine Sammlung von mehr als 500 Domänenfamilien, die bei Signaltransduktionsproteinen und Chromatin-assoziierten Proteinen gefunden wurden.

Am N-Terminus von HIP1 wurde eine hoch konservierte Epsin N-terminale Homologie (ENTH)-Domäne mit etwa 120 Aminosäuren identifiziert (Abbildung 14). Diese Domäne wurde kürzlich in verschiedenen Proteinen entdeckt, die bei der Endocytose und der Regulation des Actin-Cytoskeletts eine Rolle spielen, wie z.B. AP180 (Zhou et al., 1992), CALM (Dreyling et al., 1996) und Epsin (Chen et al., 1998). Ford et al (2001) haben gezeigt, daß die ENTH-Domäne von dem AP180 Homolog CALM das Membranlipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) über ein lysinreiches Motiv bindet. Da die ENTH-Domänen von CALM und HIP1 eine hohe Homologie aufweisen, besonders im Hinblick auf die Lysinreste in dem vorhergesagten PIP₂-Bindemotiv K(X)₉KX(K/R)(H/Y), liegt die Vermutung nahe, daß auch HIP1 mit seinem N-Terminus an PIP₂-enthaltende Membranen bindet. Dieses lysinreiche Motiv kommt nur in einigen ENTH-Domänenproteinen vor, wie AP180, CALM, HIP1, Sla2p und α -Adaptin. In dem Protein Epsin liegt dieses PIP₂-Bindemotiv nicht vor, es kann jedoch mittels einer Tasche aus basischen Aminosäuren, die in allen ENTH-Domänen konserviert ist, an PIP₂ binden (Itoh et al., 2001).

Abwärts der ENTH-Domäne liegen vier Kopien des Sequenzmotivs DxF, in denen x ein R, L, I oder P ist. Gefolgt werden die DxF-Motive von einer zentralen coiled-coil-bildenden Domäne, die ein potentielles Clathrin-Bindemotiv, VDLE, enthält. Ebenso wurden DPF/W-Motive in verschiedenen Proteinen gefunden, die eine funktionelle Rolle bei der Endocytose

spielen, wie z.B. AP180, Amphiphysin, Eps15, Epsin und Auxilin. Dieses Motiv ist bei allen Proteinen an der Bindung an die „Appendage“-Domäne von α -Adaptin beteiligt. α -Adaptin ist eine Komponente des heterotetrameren Adaptorkomplexes AP-2, der in den Clathrin-bedeckten Vesikeln vorhanden ist (Owen et al., 2000), (Owen et al., 1999). Je mehr DPF-Motive ein Protein besitzt, desto stärker bindet es an die „Appendage“-Domäne von α -Adaptin; so bindet Eps15, das 7 DPF-Motive hat, stärker an α -Adaptin als Amphiphysin, AP180 und Auxilin, die nur 1-3 DPF-Motive besitzen.

Eine Talin-ähnliche Actin-bindende Domäne aus etwa 200 Aminosäuren ist am C-Terminus von HIP1 vorhanden und koppelt das Protein vermutlich an F-Actin Filamente (Engqvist-Goldstein et al., 1999).

Die bei der Sequenzanalyse gefundenen Proteindomänen und -motive weisen darauf hin, daß HIP1 an der Endocytose beteiligt ist. Der N-terminale Teil von HIP1 bindet mit hoher Wahrscheinlichkeit an Membrane, während der C-terminale Teil an das Cytoskelett bindet.

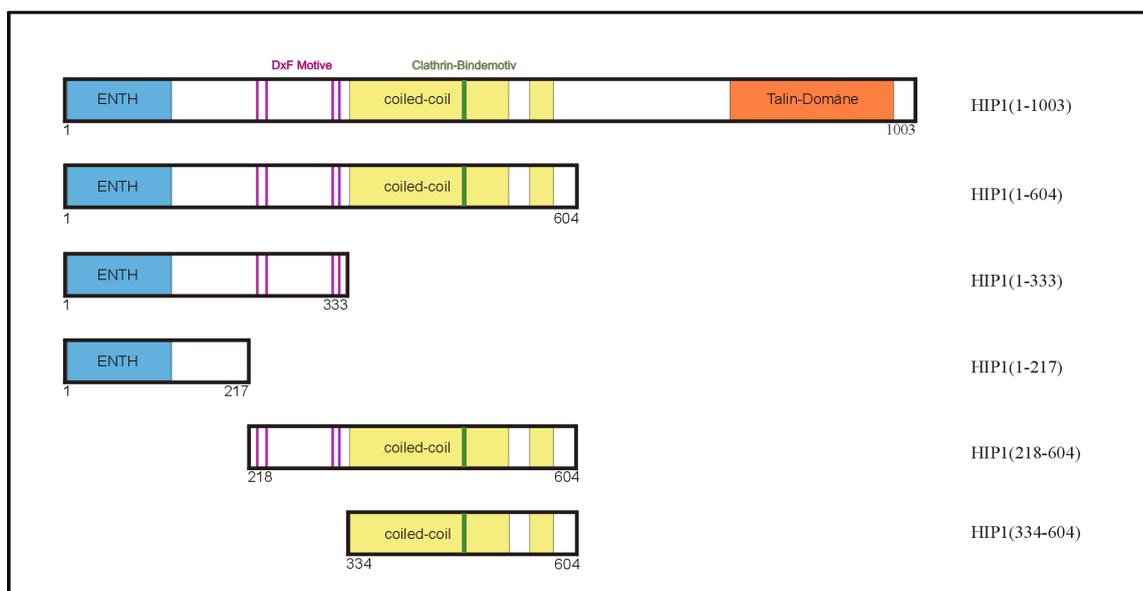


Abbildung 14. Schematische Darstellung der HIP1-Domänen, die in *E.coli* und Säugetierzellen exprimiert wurden.

Die konservierte ENTH-Domäne, die zentrale coiled-coil-bildende Domäne und die C-terminale Talin-Domäne sowie die Positionen der vier DxF-Motive und der potentiellen Clathrin-Bindestelle sind dargestellt.

3.1.2 Affinitätsreinigung von HIP1-interagierenden Proteinen

Proteininteraktionspartner von HIP1 können vielleicht einen Hinweis auf die Funktion von HIP1 geben, wenn deren Funktion bei zellulären Prozessen bereits bekannt ist. Um herauszufinden, mit welchen Proteinen HIP1 spezifisch interagiert, wurde ein verkürztes HIP1 Fragment mit den Aminosäuren 218-604 (siehe Abbildung 14), das die DxF-Motive und die coiled-coil Region enthält, als GST-Fusionsprotein in *E. coli* überexprimiert und über Glutathion Agarose gereinigt. Diese GST-HIP1 (218-604) Affinitätsmatrix wurde dann in Anwesenheit von Proteaseinhibitoren mit einem Proteinextrakt aus menschlichem Cortex inkubiert. Nach ausgiebigem Waschen der Agarose wurden die gebundenen Proteine mit SDS-Probenpuffer von der Agarose eluiert und mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie Färbung analysiert. Abbildung 15 zeigt, daß drei Proteine, die in dem 8%igen SDS-Gel bei ca. 170, 110 und 105 kDa wandern, durch die GST-HIP1 (218-604) Affinitätsmatrix zurückgehalten werden (Spuren 1-3, es wurden ansteigende Mengen an GST-HIP1 (218-604) Affinitätsmatrix eingesetzt), jedoch nicht durch die Kontrollmatrix, an die GST gebunden war (Spur 5) und auch nicht durch die Agarosematrix ohne immobilisiertes Protein (Spur 4). Das als Köder eingesetzte GST-HIP1 (218-604)-Fusionsprotein hat eine molekulare Masse von ca. 75 kDa (Abbildung 15). Die Anreicherung dieser drei HIP1-assoziierten Proteine aus humanem Hirnextrakt mittels Affinitätschromatographie konnte in mindestens drei unabhängigen Pull-Down Experimenten mit verschiedenen Extraktpräparationen reproduzierbar nachgewiesen werden. Proteine derselben Größe wurden auch aus einem Maus Hirnextrakt durch HIP1 (218-604) selektiv angereichert (Daten nicht gezeigt), und das gleiche Ergebnis wurde erhalten, wenn das GST-HIP1 (1-604) Fragment als Köderprotein eingesetzt wurde (Daten nicht gezeigt).

3.1.3 Identifizierung der HIP1-interagierenden Proteine durch Massenspektrometrie und Immunblotting

Um die mittels GST-HIP1 (218-604) Affinitätsmatrix isolierten Proteine zu identifizieren, wurden die Proteinbanden bei 170, 110 und 105 kDa aus dem Coomassie-gefärbten Gel ausgeschnitten, im Gel mit Trypsin verdaut, und die erhaltenen Spaltprodukte mittels der Matrix unterstützten Laser Desorption/Ionisation Massenspektrometrie (MALDI-MS) analysiert. In Abbildung 15 ist als Beispiel die MALDI-MS Peptidkarte des 170 kDa Proteins

gezeigt. Eine Suche der Peptidmassen in der SwissProt Sequenzdatenbank zeigte, daß 35 Peptide mit der errechneten Masse von tryptischen Peptiden der humanen Clathrin schweren Kette 1 (GeneBank Accession Nummer Q00610) übereinstimmten und dabei 30% der Gesamtsequenz abdeckten. Die vollständigen Ergebnisse der MALDI-MS Analysen sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Die den 110 und 105 kDa Banden entsprechenden Proteine wurden jeweils eindeutig als α -Adaptin A und α -Adaptin C identifiziert. Beide Proteine sind ebenso wie die Clathrin schwere Kette 1 Hauptkomponenten der Clathrin-bedeckten Vesikel. Die schwere Kette von Clathrin, Clathrin Heavy Chain, im Folgenden abgekürzt als Clathrin HC, liefert den strukturellen Rahmen für das polyhedrale Gitterwerk, von dem man vermutet, daß es die treibende Kraft für die Membraneinstülpung und die Bildung von CCVs darstellt (Hirst and Robinson, 1998). AP-2 Komplexe interagieren über ihre μ 2-Untereinheit mit dem cytoplasmatisch exponierten Sortiersignal von Proteinen, die für die Internalisierung bestimmt sind, und spielen vermutlich eine direkte Rolle bei der Konzentrierung dieser Frachtmoleküle an den bedeckten Mulden an der Plasmamembran (Schmid, 1997).

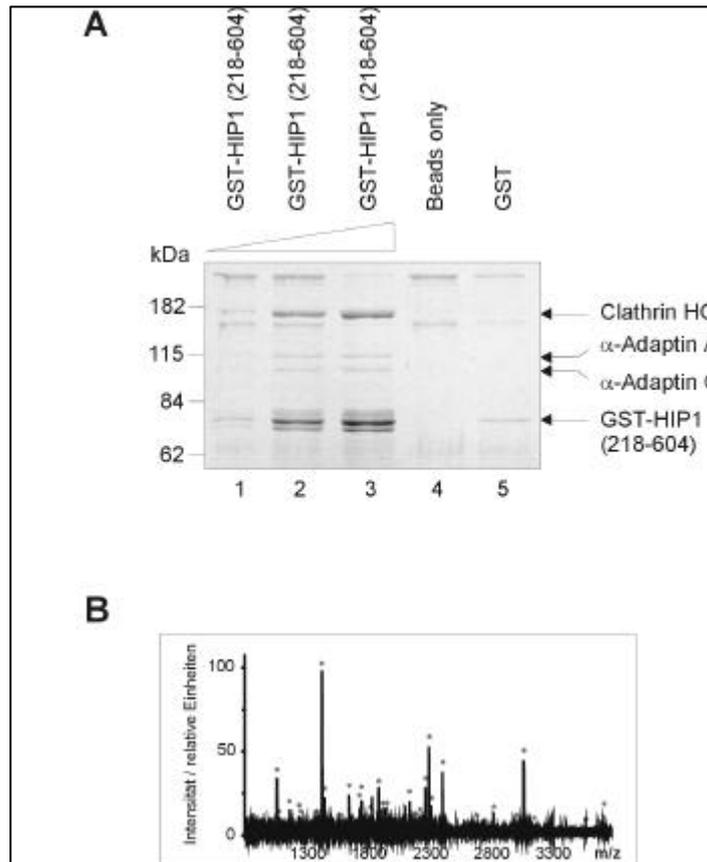


Abbildung 15. Affinitätsreinigung und Identifizierung von HIP1-bindenden Proteinen.

(A) Affinitätsreinigung von GST-HIP1 (218-604)-interagierenden Proteinen. Menschlicher Cortex-extrakt wurde mit 5 (Spur 1), 25 (Spur 2) oder 50 μ g (Spur 3) GST-HIP1 Protein, das an 25 μ l gepackter Glutathion Agarose immobilisiert war, inkubiert. Nach ausgiebigem Waschen der Agarose wurden die gebundenen Proteine mit SDS-Probenpuffer von der Agarose eluiert und mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung analysiert. Als Kontrolle wurde Cortexextrakt mit Glutathion Agarose ohne immobilisiertes Protein (Spur 4) oder mit 50 μ g GST-Protein (Spur 5) inkubiert. (B) Identifizierung von HIP1-gebundenen Proteinen mittels MALDI-MS. Die Karte der Peptidspaltprodukte der prominenten 170 kDa Proteinbande nach dem Verdau mit Trypsin im Gel ist gezeigt. Peptide, die mit einem Sternchen markiert sind, entsprechen berechneten tryptischen Spaltprodukten der Clathrin HC.

Tabelle 1. HIP1-interagierende Proteine identifiziert durch MALDI Massenspektrometrie

Genbank		Molekulare Masse (kDa)		Anzahl der	Sequenz
Accession	Protein	<i>kal</i>	<i>Gel</i>	passenden	Abdeckung
Nr.				Peptide	(%)
Q00610	Clathrin HC	191.5	170	35	30
P17426	α -Adaptin A	107.6	110	12	18
P17427	α -Adaptin C	104.0	105	12	18

kal, kalkuliert aus der DNA Sequenz; *Gel*, abgeschätzt anhand der relativen Mobilität im SDS-Gel

Die Identität der Proteine Clathrin HC, α -Adaptin A und α -Adaptin C wurde durch Immunblotting bestätigt, bei dem spezifisch gegen Clathrin HC und α -Adaptin gerichtete Antikörper verwendet wurden (Abbildung 16). Die Western Blot Analysen ergaben außerdem, daß Huntingtin oder N-terminale Fragmente von Huntingtin sowie das Huntingtin assoziierte Protein HAP1 von der GST-HIP1 (218-604) Affinitätsmatrix zurückgehalten wurden (Spuren 1-3). Keines dieser Proteine wurde von der Kontrollmatrix mit gebundenem GST (Spur 5) oder von der Agarosematrix ohne immobilisiertes Protein (Spur 4) zurückgehalten. In einem anderen Experiment wurde mittels Western Blot Analysen nachgewiesen, daß auch die GTPase Dynamin, die die Freisetzung der CCVs von der Plasmamembran vermittelt, von der GST-HIP1 Affinitätsmatrix spezifisch zurückgehalten wurde (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, daß Huntingtin und seine interagierenden Proteine HIP1 und HAP1, und vermutlich auch Dynamin, alle Teil eines größeren Proteinkomplexes sind, der mit CCVs assoziiert ist.

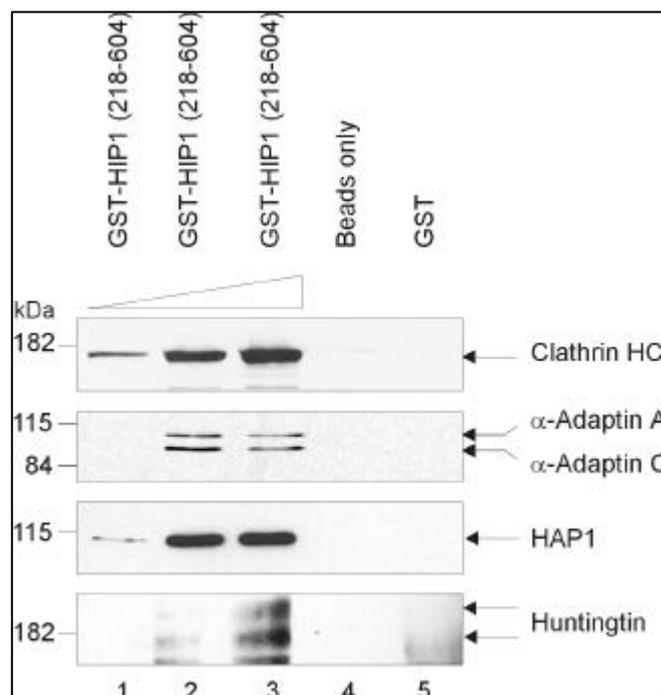


Abbildung 16. Identifizierung von HIP1-gebundenen Proteinen mittels Western blotting.

Nach der Affinitätsreinigung (siehe Abbildung 15) wurden die gebundenen Proteine mit SDS-Probenpuffer von der Agarose eluiert, mittels SDS-PAGE getrennt, auf Nitrocellulose geblottet und mit den Antikörpern anti-Clathrin HC, anti- α -Adaptin, anti-HAP1 und anti-Huntingtin (CAG53b) inkubiert.

3.1.4 HIP1 Fragmente, die DxF-Motive enthalten, assoziieren direkt mit der α -Adaptin „Appendage“-Domäne

In einer früheren Studie wurden mehrere Proteine identifiziert, die spezifisch an die C-terminale „Appendage“-Domäne von α -Adaptin binden, wie z.B. die Amphiphysine, AP180, Auxilin, Eps15 und Epsin (Owen et al., 1999). Das einzige gemeinsame Merkmal dieser Proteinsequenzen ist, daß sie alle entweder ein DxF- oder ein DPW-Motiv enthalten. Um zu testen, ob HIP1, das ein DPF- und drei weitere DxF-Motive enthält, ebenfalls mit der α -Adaptin „Appendage“-Domäne interagieren kann, wurden aus humanem Hirnextrakt Pull-Down Experimente mit der GST-fusionierten α -Adaptin C „Appendage“-Domäne (α C) als Köderprotein durchgeführt. Wie in Abbildung 17 gezeigt wird, wird das vollständige HIP1 von der GST- α C Affinitätsmatrix spezifisch zurückgehalten, ebenso Amphiphysin, das wie HIP1 ein einzelnes DPF-Motiv enthält. Die gleichen Ergebnisse wurden mit der „Appendage“-Domäne von α -Adaptin A erzielt (Daten nicht gezeigt).

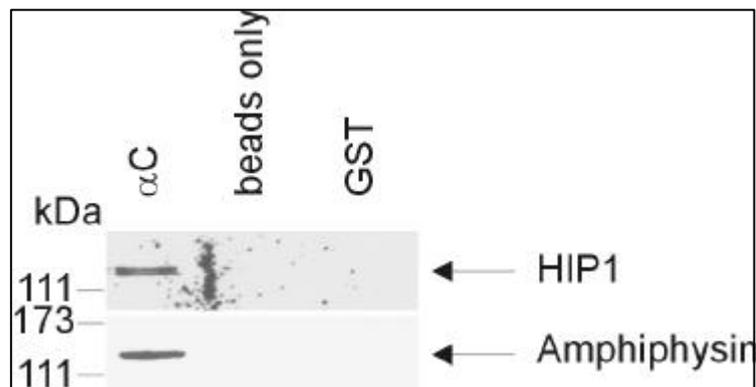


Abbildung 17. Affinitätsreinigung und Identifizierung von α -Adaptin „Appendage“-Domäne bindenden Proteinen.

Menschlicher Cortexextrakt wurde mit 25 μ g GST- α C, das an 15 μ l gepackter Glutathion-Agarose immobilisiert war, inkubiert. Die gebundenen Proteine wurden mittels Western blotting mit den Antikörpern anti-HIP1 und anti-Amphiphysin detektiert. Als Kontrolle wurde Cortexextrakt mit Glutathion-Agarose ohne immobilisiertes Protein (Spur 2) oder mit 25 μ g GST-Protein (Spur 3) inkubiert.

Um herauszufinden, ob es eine direkte Interaktion zwischen HIP1 und der „Appendage“-Domäne von α -Adaptin gibt, oder ob in den Pull-Down Experimenten mit humanem Hirnextrakt die Bindung vielleicht über ein drittes Protein vermittelt wurde, wurden beide Proteine, GST- α C und His-HIP1 (218-604), in *E. coli* überexprimiert. Gereinigtes GST- α C wurde anschließend als Probe in einem Overlay-Assay von auf Nitrocellulose geblottetem

His-HIP1 (218-604) benutzt. Abbildung 18 zeigt, daß GST- α C selektiv an das immobilisierte HIP1 (218-604) bindet, während GST inert ist. Diese α C-HIP1 Interaktion wurde nicht mit dem His-HIP1 (1-217) Fragment detektiert, dem die Region mit den DPF-Motiven fehlt (Daten nicht gezeigt). HIP1 kann somit als direkter Bindungspartner von sowohl α -Adaptin A als auch α -Adaptin C betrachtet werden.

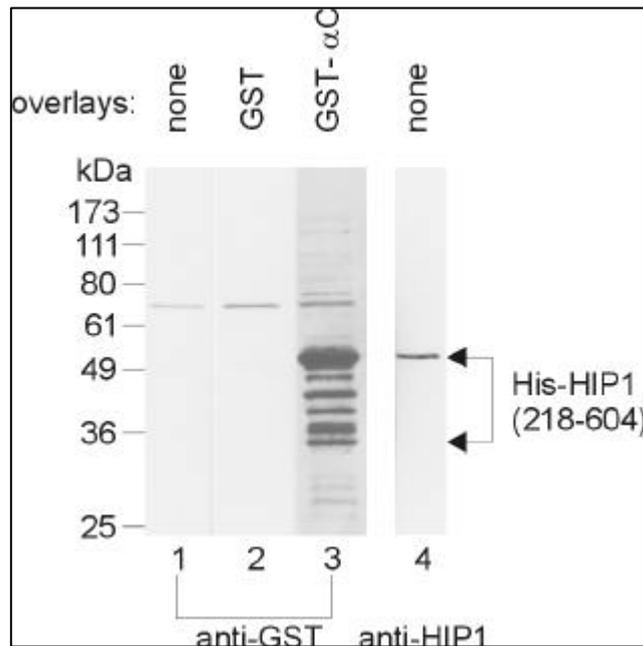


Abbildung 18. Overlay-Assay.

His-HIP1 (218-604) wurde nach der Auftrennung im SDS-Gel mittels ElektrobloTTing auf Nitrocellulose transferiert. Spur 1 wurde ohne Protein inkubiert, Spur 2 mit GST und Spur 3 mit der GST- α C Appendage-Domäne. Die gebundene α C Appendage-Domäne wurde mit einem anti-GST Antikörper nachgewiesen. Der direkte Nachweis von His-HIP1 auf dem Blot mit dem anti-RGS-His Antikörper wird in Spur 4 gezeigt.

Um die Rolle des DPF-Motivs in HIP1 bei der Wechselwirkung mit α -Adaptin näher zu untersuchen, wurden *in vitro* Bindungsexperimente mit rekombinant exprimiertem His-HIP1 (1-604) und GST- α C in An- oder Abwesenheit von kompetitierenden Peptiden durchgeführt. Synthetisch hergestellte Peptide, die der DPF-Region in HIP1 (SSFSSDPFNFS) oder der SH3-Domäne in SH3GL3 (CQLPQPPPQAQPLLQPQ) (Sittler et al., 1998) entsprechen, wurden in dem Konkurrenzexperiment eingesetzt. Wie in Abbildung 19 zu sehen ist, ist nur das DPF-Peptid, nicht jedoch das SH3-Kontrollpeptid in der Lage, die beobachtete HIP1- α -Adaptin Interaktion zu unterbrechen. Dieses Ergebnis zeigt, daß wie bei den anderen an der Endocytose beteiligten Proteinen (Eps15, Epsin, AP180), auch das DPF-Motiv in HIP1 eine

wichtige Rolle bei der Vermittlung der Bindung des Proteins an die α -Adaptin „Appendage“-Domäne spielt.

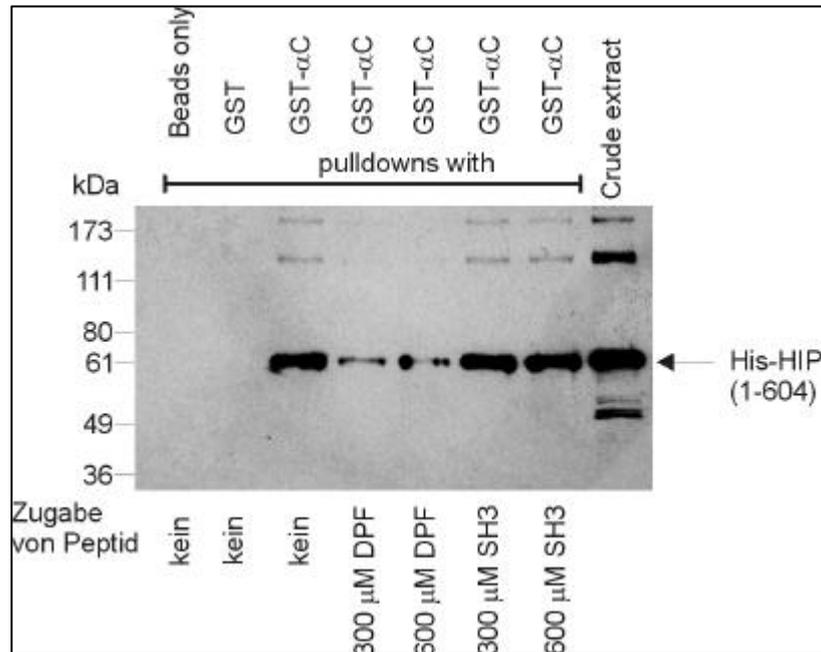


Abbildung 19. Competition der Interaktion zwischen HIP1 und α C mit einem DPF-enthaltenden Peptid.

In Bindungsexperimenten mit GST- α C-Fusionsprotein bzw. GST (Negativkontrolle) und His-HIP1 (1-604) wurden DPF- und SH3-Peptide in der angegebenen Konzentration hinsichtlich ihrer Fähigkeit getestet, die Bindung von HIP1 an die GST- α C Appendage-Domäne zu inhibieren. Das gebundene His-HIP1 (1-604)-Fusionsprotein wurde mittels Immunblotting mit dem Antikörper anti-HIP1 nachgewiesen.

3.1.5 Die coiled-coil-bildende Domäne in HIP1 ist entscheidend für die Bindung an die schwere Kette von Clathrin

Die für die Bindung an die schwere Kette von Clathrin verantwortliche Region in HIP1 wurde in Pull-Down Experimenten aus menschlichem Hirnextrakt mit verschiedenen GST-HIP1-Fusionsproteinen bestimmt. Wie in dem Immunblot in Abbildung 20 gezeigt wird, wird Clathrin HC von den GST-HIP1-Fusionsproteinen 1-604, 218-604 und 334-604 herausgezogen, aber nicht oder nur in geringem Ausmaß von den GST-HIP1-Fusionen 1-333 und 1-217. Dieses Ergebnis zeigt, daß die zentrale coiled-coil-bildende Domäne (Aminosäuren 334-604), aber nicht die benachbarte Region mit den DxF-Motiven (Aminosäuren 218-333) wichtig für die HIP1-Clathrin Wechselwirkung ist. Der gleiche Blot wurde auch mit einem anti- α -Adaptin A Antikörper entwickelt. Wie erwartet banden nur die

GST-HIP1-Fusionen 1-604, 1-333 und 218-604, die die DxF-Motive enthalten, α -Adaptin A, wohingegen die GST-HIP1-Fusionen 1-217 und 334-604, denen diese Sequenzmotive fehlen, nicht an α -Adaptin A binden. Während HIP1 an den Adaptorproteinkomplex wahrscheinlich über die DxF-Motive bindet, scheint die coiled-coil-bildende Domäne entscheidend für die Bindung an Clathrin HC zu sein.

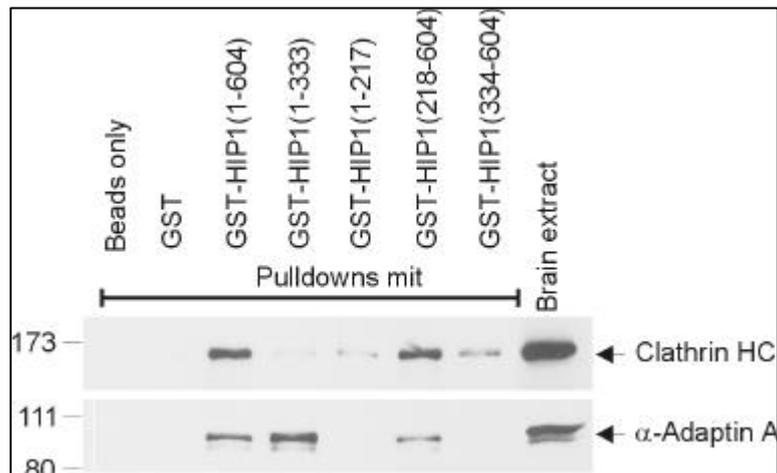


Abbildung 20. Interaktion von HIP1 mit Clathrin HC und α -Adaptin A.

Verschiedene GST-HIP1-Fusionsproteine und GST (Negativkontrolle) wurden in Pull-Down Experimenten aus menschlichem Cortexextrakt daraufhin getestet, ob sie Clathrin HC und α -Adaptin A binden können.

3.1.6 HIP1 ist mit Clathrin-bedeckten Vesikeln assoziiert

In einer früheren Arbeit wurde bereits in einer subzellulären Fraktionierung von humanem Cortex gezeigt, daß HIP1 und Huntingtin in Membran-enthaltenden Fraktionen angereichert sind (Wanker et al., 1997). Um zu untersuchen, ob HIP1 direkt mit CCVs assoziiert ist, wurden nun Vesikel-enthaltende Fraktionen aus menschlichem Cortex gereinigt und mittels SDS-PAGE, Immunblotting und Elektronenmikroskopie analysiert. In einem Coomassie-gefärbten SDS-Gel und in Western Blot Analysen konnte gezeigt werden, daß Clathrin HC, das auf einer Höhe von ca. 170 kDa wandert, in der gereinigten Vesikelfraktion stark angereichert ist (Abbildung 21A und B). Außer Clathrin waren auch die Proteine Huntingtin, HIP1, HAP1 und α -Adaptin A und α -Adaptin C in dieser Fraktion angereichert. BiP, ein Protein, das im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist (Plempner et al., 1997), wurde hingegen nicht selektiv angereichert.

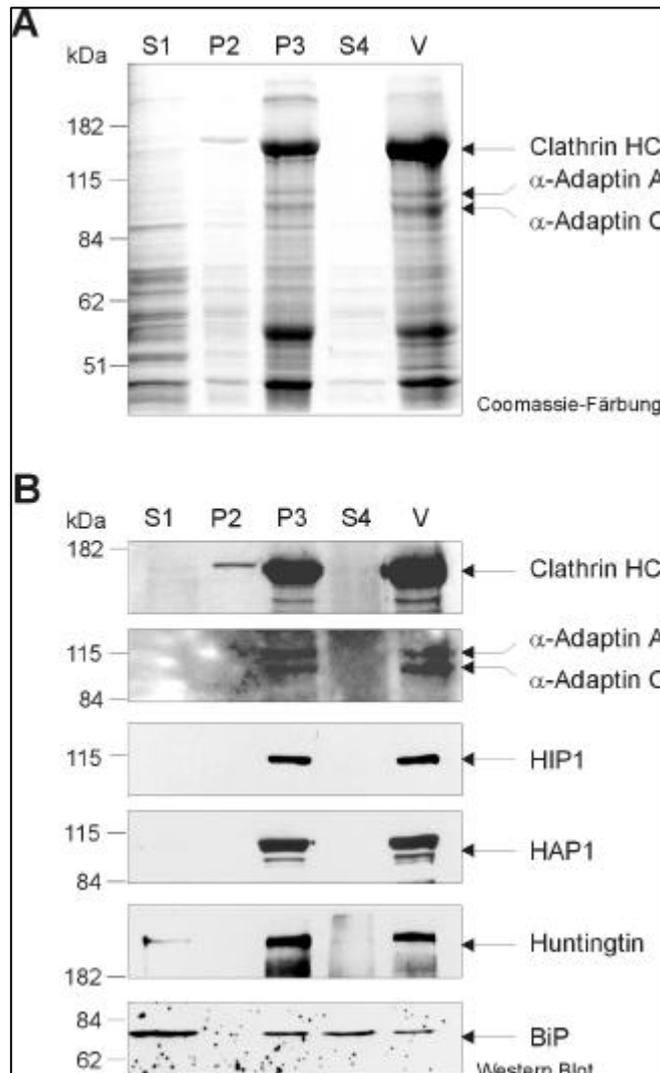


Abbildung 21. Co-Reinigung von HIP1, HAP1 und Huntingtin mit Clathrin-bedeckten Vesikeln. Pellets (P2, P3), Überstände (S1, S4) und eine Clathrin-bedeckte Vesikelfraktion (V), die aus menschlichem Cortex wie beschrieben aufgereinigt wurden, wurden durch SDS-PAGE und Coomassie-Färbung (A) oder Immunblotting mit den Antikörpern anti-Clathrin HC, anti- α -Adaptin, anti-HIP1, anti-HAP1, anti-Huntingtin (CAG53b) und anti-BiP (B) analysiert.

Die gereinigten Membranfraktionen wurden auch mittels der Transmissionselektronenmikroskopie untersucht; es sind zahlreiche CCVs mit der charakteristischen Triskelion Form zu sehen (Abbildung 22 a). Immunfärbung der Vesikel mit spezifischen Antikörpern zeigte, daß zusätzlich zu Clathrin HC (Abbildung 22 c) und α -Adaptin (Abbildung 22 d) auch die Proteine HIP1, HAP1 und Huntingtin (Abbildung 22, b-f) direkt mit den Vesikeln assoziiert sind. Dieses Ergebnis ist in guter Übereinstimmung mit den Western Blot Ergebnissen.

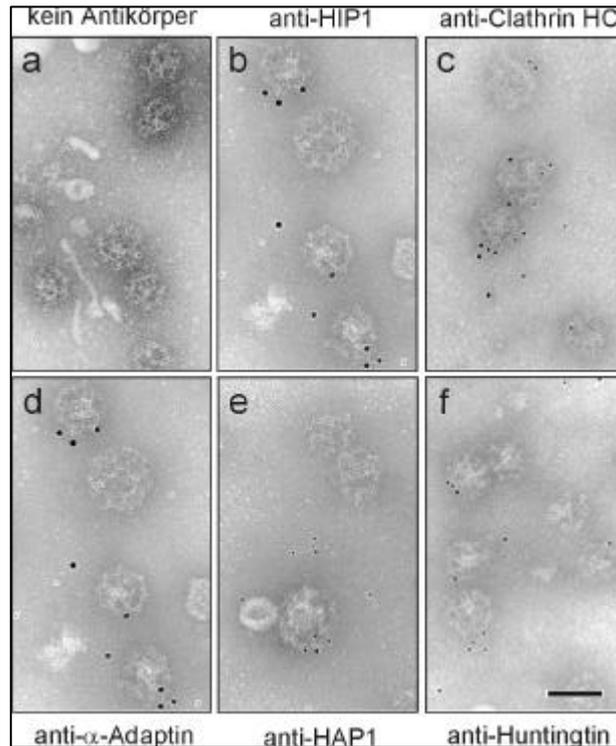


Abbildung 22. Elektronenmikroskopische Untersuchungen der gereinigten Clathrin-bedeckten Vesikel.

Clathrin-bedeckte Vesikel wurden mit den Antikörpern anti-HIP1, anti-Clathrin HC, anti- α -Adaptin, anti-HAP1 und anti-Huntingtin (CAG53b) immunmarkiert. Die Goldpartikel der sekundären Antikörper sind 10 nm (b und d) oder 5 nm (c, e und f) im Durchmesser. Immungold-Markierungen mit dem anti-Clathrin HC und anti- α -Adaptin Antikörper bestätigen die Identität der Clathrin-bedeckten Vesikel (c und d). Querbalken, 100 nm.

3.1.7 Die Überexpression von HIP1 (218-604) in COS-1 Zellen induziert die Bildung von großen vesikelartigen Strukturen

Um zu überprüfen, ob HIP1 und Clathrin auch *in vivo* colokalisieren, wurden menschliche Fibroblasten mittels Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht (Abbildung 23). Nach dem Permeabilisieren wurden die Zellen mit den beiden Antikörpern anti-HIP1 und anti-Clathrin markiert. Die Lokalisation von HIP1 und Clathrin überschneidet sich hauptsächlich in der perinuklearen Region und in punktförmigen, Vesikel-ähnlichen Strukturen, die durch das gesamte Cytoplasma verstreut sind. Es colokalisiert jedoch nur ein Teil der Clathrin-positiven Punkte mit der Färbung von HIP1, was zeigt, daß nicht alle CCVs das HIP1 Protein enthalten (Abbildung 23, a-c). Ähnliche Ergebnisse wurden in nicht transfektierten COS-1 Zellen erhalten, wenn diese mit den beiden Antikörpern anti-HIP1 und anti-Clathrin gefärbt wurden oder wenn das vollständige HIP1 (1-1003) in COS-1 Zellen überexprimiert wurde. Wenn das

HIP1 (218-604) Fragment mit den DxF-Motiven und der coiled-coil Domäne überexprimiert wurde, wurden erstaunlicherweise große, perinukleare, Vesikel-ähnliche Strukturen gesehen. Diese Strukturen enthielten außer HIP1 auch noch endogenes Clathrin HC und Huntingtin, wie Doppelmarkierungen mit den Antikörpern anti-HIP1 und anti-Clathrin HC beziehungsweise anti-HIP1 und anti-Huntingtin (4C8) zeigten (Abbildung 23, d-i). Weiterhin enthielten diese Vesikel-ähnlichen Strukturen endocytotisch aufgenommenes Transferrin (Abbildung 23, j-l), was nahe legt, daß diese Strukturen während des Prozesses der Clathrin-vermittelten Endocytose gebildet werden.

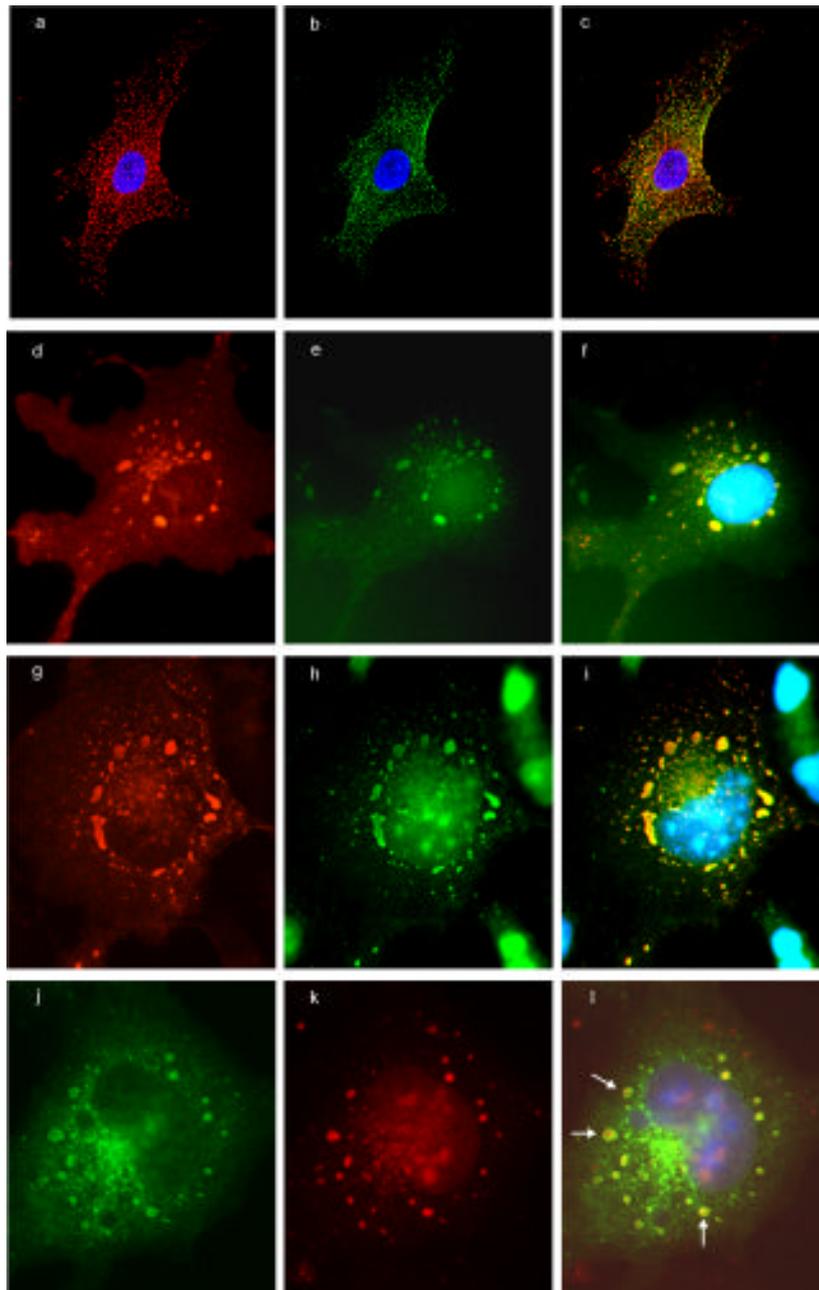


Abbildung 23. Co-Lokalisation von HIP1 mit Clathrin, Huntingtin und endocytotisch aufgenommenem Transferrin in Säugetierzellen.

(a-c) Co-Lokalisation von endogenem HIP1 mit Clathrin HC in kultivierten Fibroblasten. HIP1 wurde mit anti-HIP1 und einem sekundären Texas Rot-markierten Antikörper nachgewiesen (rot, a); Clathrin wurde mit einem anti-Clathrin monoklonalen Antikörper und einem sekundären Alexa-488-markierten Antikörper detektiert (grün, b). Co-Lokalisation von HIP1 und Clathrin HC in vesikulären Strukturen (c). (d-i) Doppelte Immunmarkierung von HIP1 (218-604) exprimierenden COS-1 Zellen mit Antikörpern gegen HIP1/Clathrin HC (d-f) und HIP1/Huntingtin (g-i). HIP1 wurde mit anti-HIP1 und einem sekundären CY3-konjugierten Antikörper markiert (rot); Clathrin HC und Huntingtin wurden mit anti-Clathrin HC (C-20) und anti-4C8 und einem sekundären FITC-konjugierten Antikörper markiert (grün). (j-l) Immunfluoreszenzmikroskopie von HIP1 (218-604)-exprimierenden COS-1 Zellen nach einer 60 minütigen Transferrin Internalisierung aus dem Medium. HIP1 wurde mit anti-HIP1 und einem sekundären FITC-konjugierten Antikörper markiert (grün), Transferrin war mit Texas-Rot markiert. Die Kerne in (a, b, c, f, i, l) wurden mit Hoechst gegengefärbt. Pfeile zeigen die

großen, perinuklearen vesikelähnlichen Strukturen, die endocytotisch internalisiertes Transferrin enthalten (rot).

Dieselben Strukturen wurden auch in 293- und HeLa-Zellen gebildet, wenn HIP1 (218-604) überexprimiert wurde (Abbildung 24). Die Überexpression des verkürzten HIP1 Proteins, dem die N-terminale ENTH-Domäne und die C-terminale Talin-ähnliche Domäne fehlen, stört offensichtlich den normalen Prozeß der Clathrin-vermittelten Endocytose und resultiert in der aberranten Anhäufung von übergroßen, Vesikel-ähnlichen Strukturen in der perinuklearen Region. Daraus kann man schließen, daß HIP1 ein vorwiegend endocytotisches Protein ist und daß seine strukturelle Unversehrtheit für die Erhaltung einer homogenen Vesikelpopulation in der Zelle entscheidend ist.

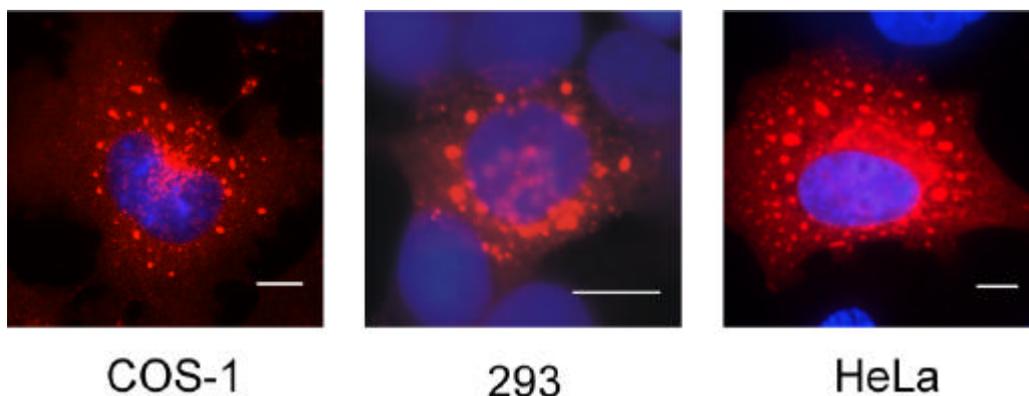


Abbildung 24. Expression von HIP1 (218-604) in verschiedenen Säugetierzellen.

45 Stunden nach der Transfektion wurde HIP1 mit anti-HIP1 und einem sekundären CY3-konjugierten Antikörper nachgewiesen (rot). Kerne wurden mit Hoechst angefärbt. In allen drei Zelllinien sind die gleichen perinuklearen, vesikelartigen Strukturen zu sehen.

3.2 Diskussion

Für Huntingtin und dessen Interaktionspartner HIP1 wurde bereits früher eine Rolle in der Endocytose und beim Vesikeltransport vorhergesagt (Wanker et al., 1997), aber bis heute wurden noch keine experimentellen Hinweise auf ein Zusammenspiel dieser beiden Proteine mit Komponenten der endocytotischen Maschinerie geliefert. Hier wird zum ersten Mal gezeigt, daß HIP1, ein Homolog des Hefeproteins Sla2p, direkt mit Clathrin-bedeckten Vesikeln assoziiert ist. Sequenzvergleiche und Vorhersagen der Domänenstruktur zeigten, daß HIP1 ein multifunktionelles Protein ist, das aus mehreren konservierten Proteindomänen zusammengesetzt ist, die potentiell mit anderen endocytotischen Proteinen interagieren können. Am N-Terminus von HIP1 befindet sich eine hoch konservierte Domäne mit dem Namen ENTH. ENTH-Domänen sind strukturelle Elemente aus durchschnittlich 225

Aminosäuren, die typischerweise in Proteinen gefunden werden, die an der Clathrin-vermittelten Endocytose beteiligt sind, wie zum Beispiel Epsin, AP180 und CALM sowie die entsprechenden Hefehomologa (Kay et al., 1999). Kürzlich haben zwei Gruppen unabhängig voneinander gezeigt, daß CALM, ein AP180 Homolog, und Epsin eine hohe Affinität für das Membranlipid PIP₂ besitzen. Beide Proteine binden über ihre konservierten ENTH-Domänen direkt an Lipidmembranen (Ford et al., 2001), (Itoh et al., 2001). Von AP180 wie auch Epsin ist bekannt, daß sie eine wichtige Rolle bei der Clathrin-vermittelten Endocytose spielen. AP180 bindet neben PIP₂ ebenso an Clathrin und stimuliert den Zusammenbau von Clathrin Käfigen in einem *in vitro* Assay. Dabei begrenzt AP180 die Größenverteilung der neu entstehenden Clathrin Käfige (McMahon, 1999). Die gleichzeitige Bindung von AP180 an PIP₂ und Clathrin kann dazu dienen, Clathrin an Membranvesikel zu binden und dabei die Größe der resultierenden CCVs zu bestimmen. Zur Zeit ist die Funktion der ENTH-Domäne in HIP1 noch nicht bekannt, aber aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeit zu den ENTH-Domänen von AP180 und CALM ist es sehr wahrscheinlich, daß HIP1 ebenfalls über seine N-terminale ENTH-Domäne an Lipidmembranen bindet.

In vitro Bindungsexperimente mit humanem Hirncytosol haben gezeigt, daß HIP1 ebenfalls an α -Adaptin, einer Untereinheit des Clathrin Adapterkomplexes AP-2, binden kann. Die Aminosäuren 218-333 in HIP1 sind für die Assoziation mit α -Adaptin entscheidend (Abbildung 20). Diese Region ist durch die Anwesenheit von drei Kopien der Tripeptidsequenz Dx_xF (in der x R, L oder I ist) und einem einzelnen DPF-Triplet charakterisiert. DPF/W-Motive sind typisch für endocytotische Proteine, die mit der Appendage-Domäne von α -Adaptin interagieren, wie z.B. Eps15, Epsin, AP180 und Auxilin. Daß HIP1 direkt an die α -Adaptin Appendage-Domäne bindet, wurde durch *in vitro* Bindungsexperimente, in denen rekombinant exprimierte und gereinigte Proteine verwendet wurden, bestätigt. Weiterhin wurde gezeigt, daß ein DPF-enhaltendes Peptid von HIP1 (Aminosäuren 319-330) diese Bindung blockiert. Dies weist darauf hin, daß das DPF-Motiv und vielleicht ebenso die Dx_xF-Motive von HIP1 eine wichtige Rolle bei der Interaktion mit der α C Appendage-Domäne spielen (Owen et al., 2000), (Owen et al., 1999). Es sollte erwähnt werden, daß dieselbe Region in HIP1, die die vier Dx_xF-Motive enthält, ebenso vier Nx_xF-Motive, in denen x ein N, L oder K ist, enthält. Die Funktion dieser Tripeptide ist noch unklar, aber es ist bekannt, daß NPF-Motive Liganden für die EH-Domänen des endocytotischen Proteins Eps15 sind (Chen et al., 1998).

Interessanterweise ist dieselbe Region in HIP1, die die Dx_xF- und Nx_xF-Motive enthält, ebenfalls für die Bindung des Proteins an Huntingtin verantwortlich (Wanker et al., 1997).

Der N-Terminus von Huntingtin, an den HIP1 bindet, enthält ein HEAT-Repeat, das wahrscheinlich an der Protein-Protein Interaktion mit HIP1 beteiligt ist. HEAT-Repeats sind Protein-Protein Interaktionselemente, die ausschließlich aus α -Helices bestehen und in einer Vielzahl von Proteinen, die an zellulären Transportprozessen beteiligt sind, vorhanden sind (Andrade and Bork, 1995). Obwohl die Sequenzmotive in HIP1, die für die Bindung an Huntingtin wichtig sind, noch nicht genau bekannt sind, zeigen die vorliegenden Daten eindeutig, daß Huntingtin mit einer GST-HIP1 (218-604) Affinitätsmatrix aus humanem Hirnextrakt angereichert wird. Weiterhin wurde gebundenes Huntingtin an isolierten CCVs gefunden, was anzeigt, daß ein stabiler Proteinkomplex, der aus Huntingtin, HIP1, AP-2 und Clathrin besteht, in neuronalen Zellen existiert. Mit dem Hefe Two-Hybrid System wurde gezeigt, daß die Huntingtin-HIP1 Interaktion invers mit der Länge der Polyglutaminkette in Huntingtin korreliert ist (Kalchman et al., 1997). Daher könnte die Unterbrechung oder Abschwächung der normalen HIP1-Huntingtin Interaktion durch eine verlängerte Polyglutaminkette potentiell zu dem Krankheitsphänotyp von HD Patienten beitragen. Hier sind aber noch zusätzliche Untersuchungen nötig, um zu bestimmen, ob die verlängerten Polyglutaminketten in Huntingtin die Bildung und/oder den Transport der CCVs *in vivo* behindern.

Der Region in HIP1 mit den DxF-Motiven folgt eine mutmaßliche coiled-coil-bildende Domäne (Abbildung 14). Coiled-coils sind α -helikale Motive, die die Oligomerisierung von Untereinheiten bei einer großen Anzahl von cytoskeletalen und Motorproteinen vermitteln (Burkhard et al., 2001). Hier wurde gezeigt, daß die coiled-coil Domäne in HIP1 für dessen Bindung an Clathrin HC benötigt wird. Sequenzvergleiche zeigten, daß dieser Abschnitt von HIP1 ein VDLE Sequenzmotiv enthält, das den Konsensusaminoaciden L (L, I, V)(D, E, G, N)(L, F)(D, E, Q) für eine Bindungsstelle an Clathrin entspricht und daher möglicherweise als Ligand für die Clathrin HC Bindung dienen könnte.

Die „Pull-Down“ Bindungsexperimente mit GST-HIP1 (218-604) zeigten, daß außer Clathrin und α -Adaptin A und C weiterhin das Huntingtin-interagierende Protein HAP1 (Li et al., 1995) selektiv aus Hirncytosol angereichert wurde. Für HAP1 und Huntingtin wurde kürzlich gezeigt, daß sie mit Mikrotubuli und synaptischen Vesikeln assoziiert sind, was nahe legt, daß diese Proteine die Bindung der Vesikel an Mikrotubuli vermitteln. Ebenso gibt es Hinweise, daß HAP1 an p150Glued, eine Untereinheit des Dynactinkomplexes (Li et al., 1998), (Engelender et al., 1997), bindet. Dynactin ist mit cytoplasmatischem Dynein assoziiert, ein ATP-abhängiges Mikrotubuli Motorprotein, das beteiligt ist am retrograden Transport von Vesikeln (Vallee and Sheetz, 1996). So verbindet vielleicht ein Proteinkomplex, der aus

HAP1, Huntingtin und p150Glued besteht, CCVs mit den Dynein Motorproteinen. Es wurden ebenfalls *in situ* schnelle, retrograde Bewegungen von Huntingtin und HAP1 in Axonen beobachtet, was diese Hypothese unterstützt (Block-Galarza et al., 1997). HAP1 besitzt ebenso wie HIP1 ein zentrale, coiled-coil-bildende Domäne (Bertaux et al., 1998), und in genetischen Experimenten mit dem Hefe Two-Hybrid System konnte bereits gezeigt werden, daß HIP1 und HAP1 über ihre zentralen, coiled-coil-bildenden Domänen miteinander interagieren (H. Goehler und E. Wanker, unveröffentlichte Daten). Ein Leuzinzipper, der in der zentralen Region von sowohl HIP1 als auch HAP1 vorhanden ist, erleichtert vermutlich ihre Interaktion.

Kürzlich haben Engqvist-Goldstein et al. (Engqvist-Goldstein et al., 1999) gezeigt, daß das Maushomolog von hHIP1R, mHIP1R, mit seiner C-terminalen Talin-ähnlichen Domäne an F-Actin bindet. Weiterhin zeigten sie Colokalisation des vollständigen mHIP1R's mit punktförmigen, gleich großen CCVs, die durch das gesamte Cytoplasma verteilt waren. Das im Rahmen dieser Arbeit in COS-1 Zellen transient exprimierte vollständige HIP1 zeigte dieselbe Colokalisation, ein Hinweis, daß humanes HIP1 ebenfalls mit normal großen CCVs *in vivo* assoziiert ist. Wenn jedoch ein verkürztes HIP1 Fragment (Aminosäuren 218-604) in COS-1 Zellen überexprimiert wurde, dem sowohl die N-terminale ENTH-Domäne als auch die C-terminale Talin-ähnliche Domäne fehlen, wurden ungewöhnlich große, Vesikel-ähnliche Strukturen in der perinuklearen Region gefunden. Diese Strukturen enthielten neben HIP1 ebenso Huntingtin und Clathrin. Weiterhin ergaben Internalisierungsassays, daß diese übergroßen, vesikelartigen Strukturen aus dem Medium aufgenommenes Texas-Rot markiertes Transferrin enthalten, was darauf hinweist, daß sie im Verlauf der Clathrin-vermittelten Endocytose gebildet werden. Interessanterweise wurden die übergroßen Vesikel nicht nach Überexpression von HIP1 Fragmenten ohne die N-terminale ENTH-Domäne (Aminosäuren 218-1003) oder ohne die C-terminale Talin-Domäne (Aminosäuren 1-604) gebildet, was anzeigt, daß das Vorhandensein von einer diesen beiden Domänen in HIP1 ausreichend ist, um die Produktion der abnormalen perinuklearen Vesikelstrukturen zu verhindern. Ein Grund dafür könnte sein, daß die Fragmente HIP1 (1-604) und HIP1 (218-1003) eine größere Löslichkeit als das kürzere HIP1 (218-604) Fragment aufweisen, welches nach Überexpression in der Zelle eventuell aggregiert.

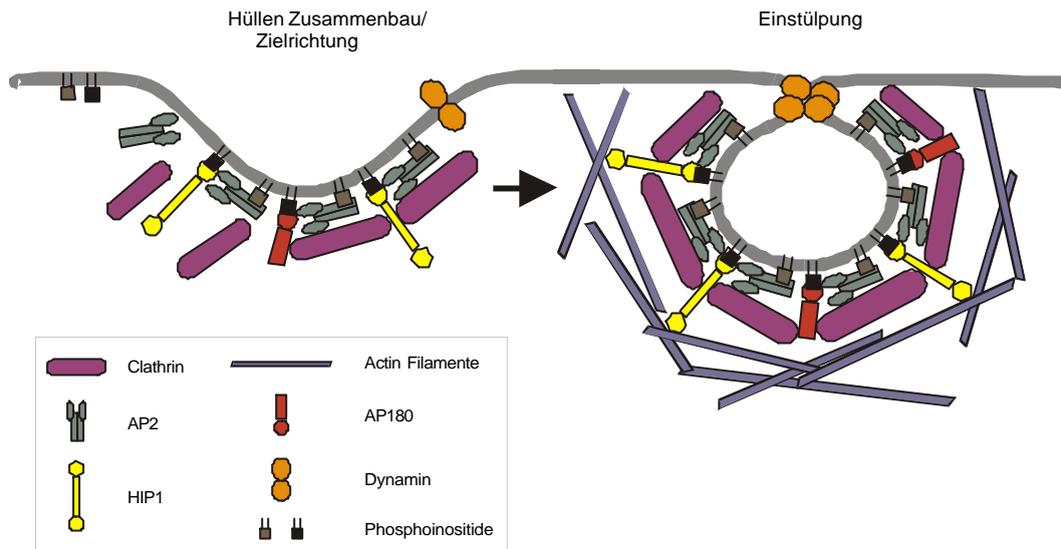


Abbildung 25. Modell für die Funktion von HIP1 bei der Clathrin-vermittelten Endocytose.

HIP1 wird über seine N-terminale ENTH-Domäne, die wahrscheinlich mit Lipidphosphoinositiden interagiert, zur Plasmamembran gebracht. Membrangebundenes HIP1 ist dann zusammen mit dem Adaptorproteinkomplex AP-2 und AP180 am Zusammenbau der Clathrinhülle beteiligt, die die Einstülpung der Clathrin-bedeckten Mulden vorantreibt. Während dieses Prozesses rekrutiert die C-terminale Talin-ähnliche Domäne von HIP1 Actinfilamente zu der Stelle, an der sich der Vesikel abschnürt, und kontrolliert dabei die Größe des entstehenden Clathrin-bedeckten Vesikels.

In Abbildung 25 ist ein Modell gezeigt, in dem die mögliche Rolle von HIP1 bei der Endocytose dargestellt wird. Wie mittels Mikroskopie gezeigt worden ist, beginnt die Endocytose mit der Bildung eines Gerüsts, das sich aus Clathrin Triskelia zusammensetzt, an der cytosolischen Seite der Plasmamembran. Dieses Gerüst rekrutiert Rezeptoren und andere Frachtmoleküle in die Clathrin-bedeckten Mulden, die sich dann als Vesikel von der Plasmamembran abschnüren. Der heterotetramere Clathrin Adapter Komplex AP-2, der aus den Untereinheiten α , β , γ und σ zusammengesetzt ist, und AP180, ein Protein, das eine ENTH-Domäne enthält, stimulieren bekannterweise den Zusammenbau der Clathrinhülle und das nachfolgende Abschnüren des Vesikels (Brodin et al., 2000), (Nonet et al., 1999). AP180 und AP-2 binden jeweils mit hoher Affinität an die Membranlipide Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) und Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃), und die Interaktion dieser Proteine mit Phosphoinositiden scheint wichtig für die Verankerung der Clathrinhülle an die Plasmamembran zu sein (Ford et al., 2001), (Gaidarov and Keen, 1999), (Gaidarov et al., 1996). Ausgehend von den hier gezeigten Daten gehe ich davon aus, daß HIP1 ähnlich wie AP180 und AP-2 ebenfalls an der Rekrutierung der Clathrinhülle zur Lipidmembran beteiligt ist. Wenn Clathrin erst einmal an den aus AP-2, AP180 und HIP1 bestehenden Komplex gebunden hat, beginnt es zu polymerisieren und die Einstülpung der Clathrin-

bedeckten Mulden voranzutreiben. Die Einlagerung von Dynamin in spiralförmige Ketten am Hals bildet zusammengezogene bedeckte Mulden und löst schließlich die vollständige Abschnürung der Vesikel aus (Schmid, 1997). Während dieses Prozesses verbindet HIP1 die Clathrin-bedeckten Vesikel mit dem Actin Cytoskelett und kontrolliert dabei die Größe und räumliche Verteilung der neu entstehenden, endocytotischen Vesikel. In neuronalen Zellen funktioniert HIP1 somit vielleicht als Adapter, der für die räumliche Organisation der Clathrin-bedeckten Vesikel entscheidend verantwortlich ist. Zusätzlich könnte HIP1, vielleicht im Zusammenspiel mit Huntingtin und HAP1, den Transport der endocytotischen Vesikel zu bestimmten Zielorganellen in der Zelle kontrollieren. Ein genaues Verständnis, wie HIP1 an den verschiedenen Schritten des Zusammenbaus der Clathrinhülle, der Vesikelabschnürung, dem Ablösen der neu gebildeten Vesikel und ihrer Bewegung weg von der Plasmamembran in das Cytosol beteiligt ist, kann vielleicht nicht nur dabei helfen, die grundlegenden Schritte der Endocytose und des Vesikelverkehrs besser zu verstehen, sondern kann ebenso neue Hinweise auf die normale Funktion von Huntingtin und seinem interagierenden Protein HAP1 liefern.