

ZUSAMMENFASSUNG

Möglicherweise können bestimmte Membranlipide die Proteinsortierung während der Exo- und Endocytose auf verschiedenen Ebenen regulieren. Dies könnte z.B. durch die Formierung sog. Membranmikrodomänen aber auch durch Veränderung in der Membrangestalt, induziert durch die Bindung peripherer Proteine, geschehen. In dieser Arbeit wurden beide Mechanismen durch zwei verschiedene experimentelle Systeme untersucht: 1) Recycling synaptischer Vesikel an Nervenendigung und 2) Membranveränderungen an der Golgi/Endosomen-Grenze.

Synaptische Vesikel im zentralen Nervensystem werden nach Stimulierung einem schnellen, Calcium-induzierten, exo- und endocytischen Zyklus unterworfen. Dieser hängt zumindest teilweise von Komponenten der Clathrin und Dynamin-abhängigen Endocytose-Maschinerie ab. Wie die Vesikelfusion und die Aufnahme zeitlich und räumlich koordiniert werden ist ungewiss. Eine Möglichkeit ist, dass spezialisierte Membrandomänen, die durch einen hohen Gehalt an Cholesterin charakterisiert sind, die räumliche Voraussetzung schaffen, um synaptische Membranproteine aufzunehmen. Quantitative Proteinanalysen von Detergenz-resistenten Lipidmikrodomänen (DRMs) aus Rattengehirnsynapsen oder aus Cholesterin depletierten Kontrollen, ergaben nach massenspektroskopischen Untersuchungen 159 Proteine. Darunter waren 122 Proteine als Cholesterin-abhängige DRM oder DRM-assoziierte Proteine aufgeführt, viele davon mit bewiesener Funktion im exo- und endocytischen Vesikelkreislauf. Darunter waren Clathrin, der Clathrin Adaptor Komplex AP-2 und verschiedene synaptische Vesikelproteine. In Übereinstimmung damit sind Vesikelmembranproteine und endocytisierte Proteine gegenüber einer Extraktion mit kaltem Triton in kultivierten Rattenhippocampus-Neuronen resistent. Hier kolokalisieren sie mit markiertem Choleratoxin B, einem Protein das spezifisch für cholesterinhaltige DRMs ist. Darüberhinaus formen Vesikelproteine Cholesterin abhängige Komplexe in CHAPS extrahierten Membranlysaten.

Membranverkehr an der Golgi/endosomalen Grenze benötigt ARFs (ADP ribosylation factors), NH₂- terminal myristoylierte Proteine, die zur Ras Superfamilie kleiner GTP-bindender Proteine gehören. Wir zeigen Normales und nicht myristoyliertes rekombinantes Arf1 und Arf6 können an Liposomen binden und sie zu tubulären Strukturen krümmen, wie man im Elektronen und Videomikroskop sehen konnte. Mutationen hydrophober Bestandteile der amphipathischen Helix zerstörten die Fähigkeit Liposomen zu krümmen. Überexpression

von Arf1-EGFP und FAPP-PH, einem PI(4)P bindenden Proteinbaustein, in COS7 Zellen ergab enorme tubuläre Strukturen aus einem perinukleärem Kompartiment. Dagegen zeigten Arf1 Mutanten deren NH₂ terminale hydrophobische Bestandteile verändert wurden, eine zytosolische Lokalisation, die ähnlich der GDP-gesperrten Arf1 Mutante T31N war. Die NH₂ terminale amphipathische Helix selbst genügt, um bei Überexpression in Cos7 Zellen Membrankrümmung zu erreichen.

Diese Daten identifizieren einen neuen GTP-kontrollierten Schalter, der die Membrandeformation während der Vesikelausknospung an der Golgi/endosomalen Grenze regulieren kann.

SUMMARY

Specific membrane lipids have been proposed to regulate protein sorting during the exo- and endocytic pathways at multiple stages. This includes the formation of membrane microdomains, and membrane shape changes induced by recruitment of peripheral proteins. Here we have addressed both mechanisms in two distinct experimental systems: (1) the recycling of synaptic vesicles (SVs) at nerve terminals and (2) membrane deformation at the Golgi/endosomal boundary.

SVs in the central nervous system upon stimulation undergo rapid calcium-triggered exo-endocytic cycling within the nerve terminal which at least in part depends on components of the clathrin- and dynamin-dependent endocytosis machinery. How exocytic SV fusion and endocytic retrieval are temporally and spatially coordinated is still an open question. One possibility is that specialized membrane microdomains characterized by their high content in membrane cholesterol may assist in the spatial coordination of synaptic membrane protein recycling. Quantitative proteomic analysis of detergent-resistant lipid microdomains (DRMs) isolated from rat brain synapses or cholesterol-depleted control samples by liquid chromatography tandem mass spectrometry identified a total of 159 proteins. Among these 122 proteins were classified as cholesterol-dependent DRM or DRM-associated proteins, many of which with proven or hypothesized functions in exo-endocytic vesicle cycling including clathrin, the clathrin adaptor complex AP-2, and a variety of SV proteins. In agreement with this SV membrane and endocytic proteins display a partial resistance to extraction with cold Triton X-100 in cultured rat hippocampal neurons where they co-localize with labeled cholera toxin B, a marker for cholesterol-enriched DRMs. Moreover, SV proteins form cholesterol-dependent complexes in CHAPS-extracted synaptic membrane lysates.

Membrane traffic at the Golgi/endosomal boundary requires the action of Arfs (ADP ribosylation factors), NH₂-terminal myristoylated proteins that belong to the Ras superfamily of small GTP binding proteins. We demonstrate that both wild type myristoylated and non-myristoylated recombinant Arf1 and Arf6 can bind to liposomes and bend them into tubular structures as observed by electron and video microscopy. Mutations of hydrophobic residues within the amphipathic helices abolish their liposome binding or tubulation capacity. Co-overexpression of Arf1-EGFP and FAPP-PH domain, a PI4P-binding protein module, in COS7 cells produces enormous tubules from a perinuclear compartment. In comparison, Arf1

NH₂-terminal hydrophobic residue mutants show a cytosolic localization similar to GDP-locked Arf1 T31N. The NH₂-terminal amphipathic helix itself is sufficient to drive membrane curvature generation when overexpressed in COS7 cells.

These data identify a novel GTP-controlled switch that regulates membrane deformation during budding of coated vesicles and tubules at the Golgi/endosomal boundary.