

**Studien zu den biochemischen und strukturellen  
Eigenschaften von Snapin und zu seiner Rolle in der  
neuronalen Exozytose**

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

vorgelegt von

Olga Vites

aus Odessa (Ukraine)

Göttingen 2004

D7

Referent: Prof. Dr. R. Jahn

Koreferent: Prof. Dr. R. Ficner

Tag der mündlichen Prüfung: 04.11.2004

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	5
1.1	Membranfusion, Proteine der SNAP-25-Familie und Snapin.....	6
1.2	Sekretorische Lysosomen, BLOC-1 Komplex und Snapin.....	10
1.3	cAMP-Signaling, Adenylatcyclase VI, RGS7 und Snapin.....	12
1.4	Fragestellung.....	15
2	Material und Methoden.....	16
2.1	Material.....	16
2.2	Geräte.....	16
2.3	<i>E. coli</i> Stämme und Zelllinien.....	16
2.4	Antikörper.....	16
2.5	DNS-Konstrukte.....	17
2.6	Expression und Aufreinigung von rekombinanten Fusionsproteinen.....	19
2.7	CD-Spektroskopie.....	21
2.8	Multi-angle laser light scattering (MALLS).....	21
2.9	Kristallisation von Snapin.....	22
2.10	Immunopräzipitationen.....	22
2.11	Subzelluläre Fraktionierungen.....	23
2.12	Gewinnung von Synaptosomen.....	23
2.13	Gewebeextrakte.....	23
2.14	Interaktionsstudien mit GST-Fusionsproteinen und Hirnextrakten.....	24
2.15	Limitierte Proteolyse.....	24
2.16	Biochemische Standardmethoden.....	24
2.17	Computergestützte Sequenzanalyse.....	25
3	Ergebnisse.....	26
3.1	Reinigung von rekombinantem Snapin und Snapinfusionsproteinen.....	26
3.2	Antikörper gegen Snapin und Snapinfragmente.....	29
3.3	Gewebeverteilung und subzelluläre Verteilung von Snapin.....	31
3.4	Untersuchungen zur Struktur von Snapin: von der Primärstruktur zu Kristallen.....	34
3.4.1	Primäre Struktur: Konservierung von Snapin im Tierreich.....	34
3.4.2	Sekundäre Struktur: computergestützte Analyse der Aminosäuren- sequenz von Snapin und Studien mittels CD- Spektroskopie.....	37
3.4.3	Tertiäre Struktur: limitierte Proteolyse.....	40

3.4.4	Quartäre Struktur: Dimerisierung von rekombinantem Snapin.....	41
3.4.5	Snapinkristalle.....	42
3.5	Interaktion zwischen Snapin und SNARE-Proteinen.....	45
3.5.1	Immunopräzipitationen aus Lysaten von PC12 Zellen und Rattenhirnen.....	45
3.5.2	Interaktionsstudien mit GST-Fusionsproteinen und Rattenhirnlysaten.....	47
3.5.3	Untersuchungen mittels CD-Spektroskopie.....	48
3.5.4	Vergleichsstudien mit Wildtyp-Snapin und SnapinsS50D.....	50
4	Diskussion.....	52
4.1	Gewebeverteilung und subzelluläre Lokalisation von Snapin.....	52
4.2	Dimerisierung von Snapin.....	53
4.3	Rolle von Snapin in der neuronalen Exozytose.....	53
4.3.1	Interaktionsstudien mit rekombinanten und nativen Proteinen.....	53
4.3.1.1	Untersuchungen mit Ungleichgewichtsassay.....	53
4.3.1.2	Untersuchungen mit Gleichgewichtsverfahren.....	55
4.3.2	Elektrophysiologische Daten.....	56
4.4	Snapin-Homologe in anderen Organismen.....	59
4.5	Perspektiven.....	60
5	Zusammenfassung/Summary.....	63
6	Literaturverzeichnis.....	65
7	Anhang.....	75
7.1	Abkürzungen.....	75
7.2	Danksagung.....	77
7.3	Publikationen.....	78
7.4	Lebenslauf....	79

## 1 Einleitung

In der postgenomischen Ära liegt einer der wichtigsten Schwerpunkte der biologischen Forschung in der Charakterisierung von Protein-Protein-Interaktionen. Zusammen mit den grundlegenden Daten wie zeitlich und räumlich aufgelöste Expressionsmuster, zelluläre Lokalisation und Domänenstruktur kann das Wissen über Interaktionspartner zum Verständnis der Funktion eines Proteins führen. Zur Identifikation neuer Interaktionspartner werden Verfahren wie massenspektrometrische Analyse von gereinigten Proteinkomplexen (Übersicht bei Aebersold und Mann, 2003), Proteinmikroarrays auf Chip- oder Glasoberflächen (Übersicht bei Phizicky *et al.*, 2003) und Zwei-Hybrid-Verfahren angewandt (Übersicht bei Causier, 2004). Zwei-Hybrid-Verfahren haben zwei entscheidende Vorteile gegenüber anderen Verfahren zur Identifikation von neuen Interaktionspartnern. Erstens sind sie extrem sensitiv und können niedrig affine Interaktionen (bis  $10^{-7}$  M) identifizieren. Zweitens bedarf ihre Durchführung nur einer Standardausstattung eines molekularbiologisch oder biochemisch ausgerichteten Labors. Die Grundlage jedes Zwei-Hybrid-Verfahrens besteht darin, dass zwei Proteine X und Y, deren Interaktion man überprüfen möchte, an zwei sich in ihrer Funktion ergänzende Domänen eines Proteins gebunden sind. Im Standardfall sind es die DNS-bindende und die aktivierende Domäne eines Transkriptionsfaktors. Wenn X und Y miteinander interagieren, kommen die zwei Domänen des Transkriptionsfaktors in räumliche Nähe und können so ihre Funktion ausführen, indem sie ein Reportergen aktivieren. Die hohe Sensitivität dieser Methode rührt daher, dass Proteine *in vivo* überexprimiert werden und zusätzlich durch die Domänen des Transkriptionsfaktors im Nukleus der Zelle lokalisiert sind. Dieser Vorteil konnte nur auf Kosten von falsch positiv detektierten Interaktionen erkaufte werden. Die Anzahl von falsch positiven Interaktionen bei Zwei-Hybrid-Verfahren wurde auf über 50% geschätzt (von Mering *et al.*, 2002). Auch falsch negative Ergebnisse sind möglich, wenn es sich um Membranproteine oder Proteinkomplexe aus mehreren Komponenten handelt.

Unabhängig davon, durch welche Methode eine Protein-Protein-Interaktion ursprünglich gefunden wurde, muss diese Interaktion der Überprüfung auf biologische Signifikanz durch andere Verfahren standhalten. Sowohl indirekte Indizien wie Koexpression im gleichen Zelltyp, Kolokalisation im gleichen Zellkompartiment, Interaktion orthologer Proteine in anderen Spezies, wie auch direkte Interaktionsstudien wie Immunopräzipitationen und andere Koreinigungen aus nativem Material und quantitative Studien an rekombinanten Proteinen sollten mit der neu entdeckten Interaktion konsistent sein.

Diese Studie beschäftigt sich mit einem Protein, das ebenfalls ursprünglich durch ein Zwei-Hybrid-Verfahren identifiziert wurde (Ilardi *et al.*, 1999). In diesem Screen wurde nach Interaktionspartnern von SNAP-25, einem der zentralen Proteine der neuronalen Exozytose gesucht, einem Vorgang, bei dem mit Neurotransmitter gefüllte synaptische Vesikel mit der Zellmembran fusionieren. Als Interaktionspartner von SNAP-25 wurde das gefundene Protein Snapin genannt. Mittlerweile sind noch andere Fachartikel erschienen, die verschiedene ebenfalls über Zwei-Hybrid-Verfahren gefundene Interaktionspartner für Snapin vorschlagen. Dazu zählen an der konstitutiven Exozytose beteiligtes SNAP-23 (Buxton *et al.*, 2003), Regulator von G-Protein gekoppelten Signaltransduktion RGS-7 (Hunt *et al.*, 2003), für die Wahrnehmung von hitze- und entzündungsinduzierten Schmerzen verantwortlicher Vanilloidrezeptor-1 (Morenilla-Palao *et al.*, 2004) und Adenylatcyclase Typ VI (Chou *et al.*, 2004). Außerdem wurde Snapin als eine Komponente des BLOC-1-Komplexes durch Massenspektrometrie identifiziert. Der BLOC-1-Komplex ist an der Biogenese spezialisierter Organellen des endosomal-lysosomalen Systems wie Melanosomen und dichte Granulen der Blutplättchen beteiligt (Starcevic und Dell'Angelica, 2004).

In den folgenden Kapitel der Einleitung soll genau auf die unterschiedlichen biologischen Vorgänge eingegangen werden, mit denen Snapin in Zusammenhang gebracht wurde.

### **1.1 Membranfusion, Proteine der SNAP-25-Familie und Snapin**

Die Membranfusion ist ein in der eukaryontischen Zelle weitverbreitetes Phänomen. Alle Kompartimente sind gegeneinander durch Membranen abgegrenzt, damit sie ihre Funktion ausführen können. Diese basiert auf der einmaligen Struktur und Zusammensetzung von Kompartimenten. Kompartimente stehen miteinander im regen Austausch, der jedoch genau reguliert und kontrolliert werden muss. Der Austausch zwischen den Kompartimenten wird durch Transportvesikel durchgeführt, die ebenfalls von einer Lipidmembran umschlossen sind. So werden zum Beispiel sekretorische Proteine am endoplasmatischen Retikulum synthetisiert, im Golgi-Apparatus modifiziert und in sekretorische Granulen verpackt (Palade, 1975). Sekretorische Granulen fusionieren später mit der Plasmamembran der Zelle, ein Vorgang, der als Exozytose bezeichnet wird. Der umgekehrte Vorgang, bei dem die Zelle Materie (von Molekülen bis einzelligen Organismen) aufnimmt, wird Endozytose genannt (de Duve, 1963). Der klassische endozytotische Weg verläuft über „clathrin-coated“ Vesikel, frühes endosomales Kompartiment, spätes endosomales Kompartiment und Lysosomen (Übersicht bei Maxfield und McGraw, 2004). Dieser Weg ist durch Reifung von einzelnen Komponenten ineinander, Austausch mit dem Trans-Golgi-Netzwerk und Recycling-

Endosomen, homo- und heterotypische Fusion von den endosomalen Kompartimenten mehrfach verzweigt. Außerdem ist auch eine clathrin-unabhängige Endozytose möglich. So wird zum Beispiel diskutiert, dass Recycling von sekretorischen Organellen, wie synaptische Vesikel und dichte Granulen zumindest teilweise nach dem sogenannten „kiss-and-run“ Mechanismus verläuft (Übersicht bei Schneider, 2001). Dabei fusioniert die Vesikelmembran mit der Plasmamembran nur für kurze Zeit ohne zu kollabieren, und die Fusionspore wird schnell wieder verschlossen.

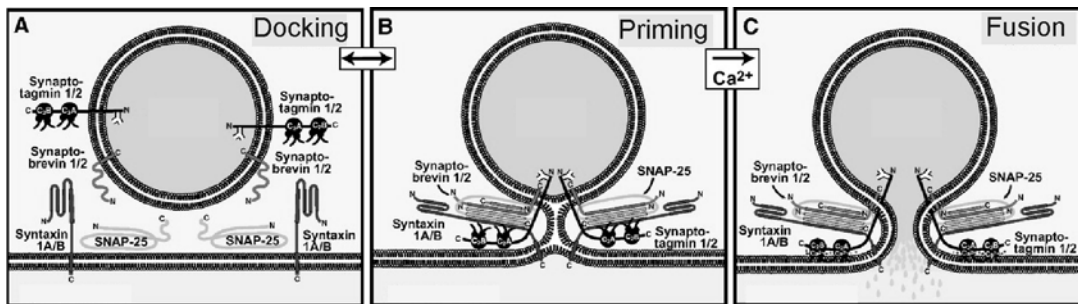
Drei Proteinfamilien scheinen in jeden einzelnen Membranfusionsschritt involviert zu sein. Dies sind Proteine der Rab-Familie, die SM- und die SNARE-Proteine. Rab/ypt-Proteine sind monomere GTPasen, die in ihrer GTP-gebundenen Form aktiv sind. Aktive Rab-Proteine binden an eine Reihe von löslichen Faktoren (so genannte Effektoren), die das Signal von aktivierten Rab-Proteinen auf die Fusionsmaschinerie übertragen (Übersicht bei Zerial & McBride, 2001). Rab-Proteine sind in erster Linie am Docking von Transportvesikeln an ihre Zielmembranen beteiligt und kontrollieren vermutlich die Fusionspezifität. Die Munc/sec-Proteine, auch als SM-Proteine bezeichnet, spielen eine noch nicht ganz geklärte Rolle in einem späteren Stadium der Vesikelfusion (Übersicht bei Gallwitz und Jahn, 2003). Die Deletion von diesen Proteinen in Hefe, Invertebraten oder Säugern führte zur Blockade der Exozytose, was auf die aktivierende Funktion von SM-Proteinen hindeutet. Biochemische Studien zeigten, dass SM-Proteine auf verschiedene Arten mit freien Syntaxinen (einer Familie der SNARE-Proteinen) oder SNARE-Komplexen interagieren können. Besonders im Fall der neuronalen SNAREs scheint sich die Bindung von Munc18 an Syntaxin negativ auf die Formation des SNARE-Komplexes auszuwirken. Dies macht die Aufstellung eines Modells, das eine aktivierende Funktion von Munc18 in der neuronalen Exozytose beschreiben soll, wegen der zentralen Rolle des SNARE-Komplexes in der Membranfusion besonders schwierig. Die SNARE-Hypothese wurde von Rothman und seinen Kollegen 1993 formuliert. Dabei sollten SNAREs die Spezifität des Fusionsschrittes vermitteln (Söllner *et al.*, 1993a) und die ATPase NSF im Komplex mit  $\alpha$ -SNAP die eigentliche Fusion ausführen (Söllner *et al.*, 1993b). Nachfolgende intensive Forschung führte dazu, dass die Rollen unter denselben Hauptdarstellern anders verteilt wurden. Die moderne Version der SNARE-Hypothese besagt, dass die Formation des SNARE-Komplexes zur Membranfusion führt und dass der SNARE-Komplex anschließend von NSF im Komplex mit  $\alpha$ -SNAP in einzelne Proteine zerlegt wird, um sie für eine weitere Fusionsrunde bereitzustellen.

Wie funktioniert dieser Vorgang im einzelnen und auf welche experimentellen Daten stützt sich der vorgeschlagene Fusionsmechanismus? SNAREs sind kleine membrangebundene

Proteine, deren zelluläre Verteilung auf der vesikulären und der „target“ Membran zur ursprünglichen v- und t-SNARE Nomenklatur geführt hat. Sie haben alle die sogenannte SNARE-Domäne gemeinsam, einen nicht sehr stark konservierten Abschnitt aus ungefähr 60 Aminosäuren, der zur Bildung von Coiled-Coil-Interaktion fähig ist und somit für die Heterooligomerisierung von SNARE-Proteinen verantwortlich ist. Die Kristallstruktur des neuronalen SNARE-Komplexes (Sutton *et al.*, 1998) und der Sequenzvergleich von SNARE-Motiven anderer Mitglieder der SNARE-Familie (Fasshauer *et al.*, 1998) zeigten, dass insgesamt 16 Positionen, an denen sich Kontakte zwischen den einzelnen Helices der Coiled-Coil-Struktur ausbilden, stark konserviert sind. Außer dem zentralen „0-layer“ handelt es sich um unpolare Aminosäuren, angeordnet in den a- und d-Positionen aneinander gereihter Heptadwiederholungen. Der „0-layer“ beinhaltet entweder ein Arginin (R) oder ein Glutamin (Q). Dies führte zu einer neuen SNARE-Klassifikation in R- und Q-SNAREs. Man geht davon aus, dass jeder fusogene SNARE-Komplex in der Zelle aus einem R-SNARE und 3 Q-SNAREs besteht. Manchmal, wie im Falle vom neuronalen t-SNARE, SNAP-25, werden zwei Q-SNARE-Motive von einem Protein beigetragen. Monomere SNARE-Motive liegen unstrukturiert vor und die Formation des SNARE-Komplexes verursacht einen enormen Anstieg im  $\alpha$ -helikalen Gehalt (Fasshauer *et al.*, 1997). Der entstandene SNARE-Komplex ist extrem stabil (hohe Schmelztemperatur, SDS-Resistenz) und kann in der Zelle erst unter ATP-Verbrauch durch NSF dissoziiert werden (Söllner *et al.*, 1993b). Zusammengenommen führten diese Eigenschaften des SNARE-Komplexes zu der Vorstellung, dass die vom zytosolischen N-Terminus zum membranständigen C-Terminus hin verlaufende Komplexbildung nach dem Reißverschlussmechanismus gegenüberliegende Membranen zweier Kompartimente in eine räumliche Nähe bringt und eventuell somit eine Fusion verursacht. Es wird immer noch diskutiert, ob zusätzliche Proteine in der Zelle den letzten Schritt katalysieren, der zur Membranfusion nach der Formation des trans-SNARE-Komplexes führt. Aus diesem Grund, und aus der Sicht der strikten Regulation von intrazellulären Membranfusionen, sind mit SNAREs interagierende Proteine von besonderem Interesse.

Die neuronale Exozytose ist die am besten studierte intrazelluläre Membranfusion (s. Abb.1). Der erste kristallisierte SNARE-Komplex bestand aus den neuronalen SNAREs Synaptobrevin 2, Syntaxin 1a und SNAP-25a. Für diese Proteine, in erster Linie für Syntaxin sind über 50 Interaktionspartner beschrieben worden (Jahn, 2004). Nur wenige von diesen Interaktionen sind detailliert und zuverlässig charakterisiert worden.





**Abb.1 Modell der SNARE-vermittelten Fusion von synaptischen Vesikeln an die Plasmamembran.** A, SNARE befinden sich im reaktiven Zustand, Syntaxin und SNAP-25 (t-SNAREs) auf der Plasmamembran und Synaptobrevin (v-SNARE) auf den synaptischen Vesikeln. B, Bildung eines Trans-Komplexes, v-SNAREs und t-SNAREs befinden sich noch auf verschiedenen Membranen. C, Membranfusion und Formation eines Cis-Komplexes, v- und t-SNAREs sind in einer Membran verankert. Verändert nach Südhof, 2004

Zu den etablierten Regulatoren (Übersicht bei Südhof, 2004) gehören der Kalziumsensor Synaptotagmin, die oben beschriebenen SM-Proteine und das kleine zytosolische Protein Complexin, das vermutlich formierte trans-SNARE-Komplexe stabilisiert. Eine andere Regulationsmöglichkeit der SNARE-Funktion besteht in der Modifikation der SNARE-Proteine selber, zum Beispiel durch Phosphorylierung (Nagy *et al.*, 2002 und 2004) oder durch Expression verschiedener Isoformen (Sorensen *et al.*, 2003).

Ilardi *et al.*, 1999 beschrieben die Identifizierung eines neuen SNARE-interagierenden Proteins namens Snapin. Sie beobachteten, dass dieses Protein an ein monomeres SNAP-25 bindet und die Interaktion zwischen Synaptotagmin und dem SNARE-Komplex verstärkt. Die Injektion von Snapin-Fragmenten, die mit den SNAP-25 interagieren können, in Neuronen, verursachte eine transiente Inhibition der Exozytose. Die darauf folgende Arbeit der gleichen Arbeitsgruppe (Chheda *et al.*, 2001) berichtete, dass Snapin ein physiologisches Substrat für die PKA darstellt und dass die Phosphorylierung durch PKA an Ser50 die Interaktion zwischen Snapin und SNAP-25 verstärkt und den SNARE-Synaptotagmin-Komplex zusätzlich stabilisiert. Buxton *et al.*, 2003 zeigten in ihrer Publikation, dass im Widerspruch zu den Daten von Ilardi *et al.*, 1999, Snapin nicht nur spezifisch an SNAP-25 sondern auch an SNAP-23 bindet, eins bei konstitutiver Exozytose beteiligtes SNARE-Protein. Daten von Morenilla-Palao *et al.*, 2003 wiesen auch indirekt darauf hin, dass Snapin an der neuronalen Exozytose beteiligt ist. In ihren Versuchen wurde gezeigt, dass die Koexpression von Snapin und Vanilloidrezeptor, die möglicherweise miteinander interagieren, zu einer Verminderung

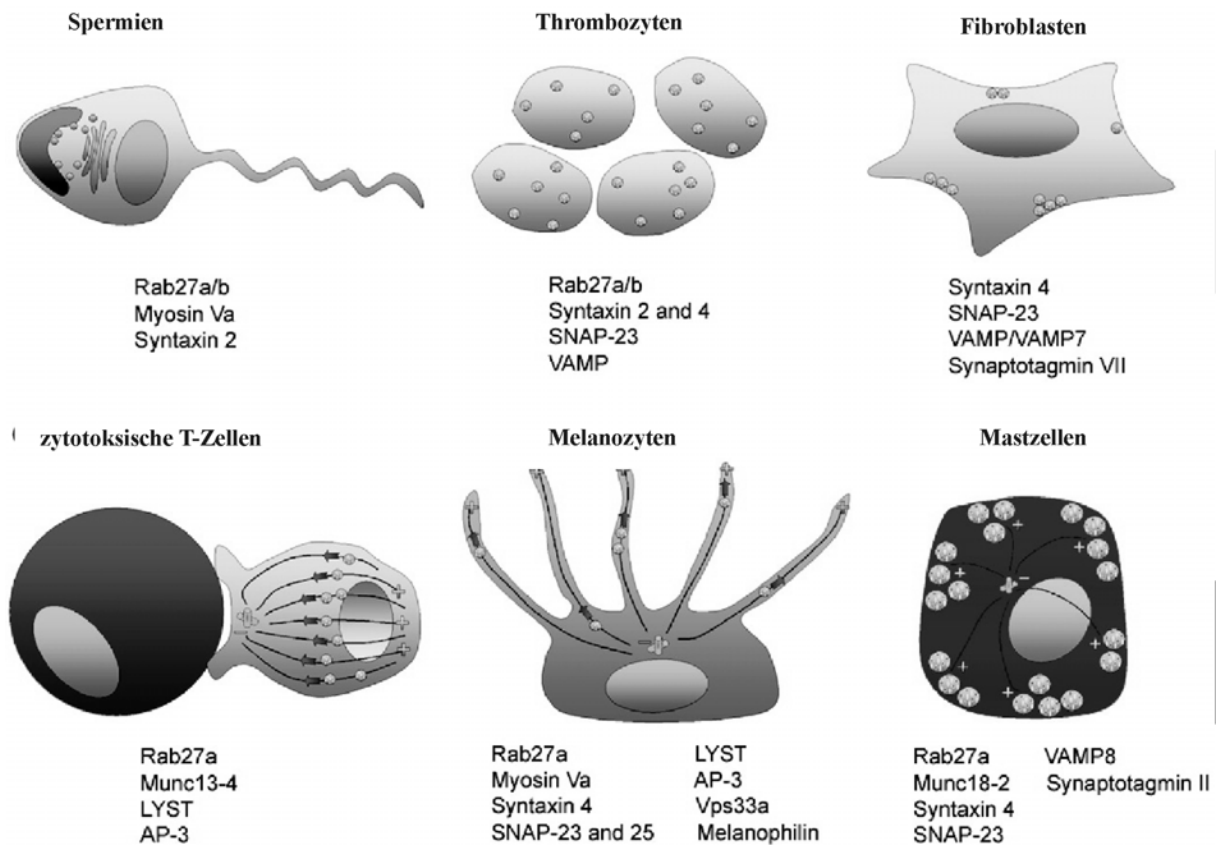
der SNARE-abhängigen Vanilloidrezeptorexpression auf der Zelloberfläche führt, die durch PKC reguliert wird.

## 1.2 Sekretorische Lysosomen, BLOC-1 Komplex und Snapin

Neben den Zellen, die sich auf regulierte Exozytose spezialisieren (Neuronen, Chromazellen, pankreatische  $\beta$ -Zellen) und ihre Mediatoren in sekretorischen Vesikeln oder Granulen lagern, existiert eine Reihe von Zellen, die ihre Sekretionsprodukte in einem endosomal-lysosomalen Kompartiment speichern. Dieses Kompartiment wird oft als sekretorische Lysosomen bezeichnet (Übersicht bei Blott und Griffiths, 2002). Zellen, die solche sekretorische Lysosomen besitzen, stammen meist aus der hämatopoetischen Linie. Dazu zählen zum Beispiel Blutplättchen (Thrombozyten), B- und T-Zellen, Makrophagen, T-Zellen und Osteoklasten. Eine Ausnahme von der Regel stellen Melanozyten dar, die neuronalen Ursprungs sind. Sekretorische und konventionelle Lysosomen unterscheiden sich voneinander durch mehrere Eigenschaften.

1. Morphologie: während konventionelle Lysosomen einheitlich multivesikuläre Strukturen darstellen, können sekretorische Lysosomen außer multivesikulärer Erscheinung auch dichte Granulen oder andere Strukturen wie zum Beispiel Melanosomen haben.
2. Zusammensetzung: beide Lysosomenarten beinhalten degradierende Enzyme wie saure Hydrolasen und andere typische lysosomale Marker wie Proteine der LAMP-Familie. Sekretorische Lysosomen besitzen zusätzlich noch zelltypspezifische Komponenten wie Serotonin, Histamin oder Melanin, die sie sezernieren können.
3. Exozytose: vor einiger Zeit wurde klar, dass auch konventionelle Lysosomen mit der Plasmamembran fusionieren können. Anscheinend benutzen auch nicht exozytotische Zellen diesen Vorgang zur Reparatur von Plasmamembranschäden (Übersicht bei Andrews, 2000). Die zellulären Mechanismen, die der Exozytose der beiden Lysosomenarten zugrunde liegen, müssen zumindest in einigen Komponenten unterschiedlich sein, da genetische Krankheiten bekannt sind, die speziell die Funktion von sekretorischen Lysosomen beeinträchtigen.

Von welchen Schlüsselkomponenten der Membranfusion wurde in Verbindung mit der Exozytose von sekretorischen Lysosomen berichtet? Die Sekretion von spezialisierten Lysosomen wird genauso wie die Sekretion von Neurotransmittervesikeln durch Mitglieder der Rab-, Munc-, Synaptotagmin- und SNARE-Familie (s. Abb.2 und Übersicht bei Stinchcombe *et al.*, 2004) vermittelt.



**Abb.2 An der Sekretion von exozytischen Lysosomen beteiligte Proteine.** Verändert nach Blott und Griffiths (2004).

Auf die Beteiligung von vielen dieser Proteine wiesen Studien von solchen genetischen Krankheiten wie Chediak-Higashi-Syndrom, Girschelli-Syndrom und Hermansky-Podlak-Syndrome hin. Für das Hermansky-Podlak-Syndrom existiert ein gut ausgearbeitetes Maus-Modell (Übersicht bei Li *et al.*, 2004). Dieses Syndrom äußert sich im partiellen Albinismus und Blutungsneigung. Es existieren vier Subtypen, die auf Mutationen in verschiedenen Genen zurückzuführen sind. Sieben mit dieser Krankheit assoziierte Gene wurden beim Menschen (Li *et al.*, 2003) und 16 bei der Maus (Übersicht Swank *et al.*, 1998) identifiziert. Für viele dieser Gene gibt es keine homologen Gene in Hefe, im Gegensatz zu den Genen, die für die Standardausrüstung der Membranfusion kodieren. Mittlerweile ist es klar, dass ihre Genprodukte 3 verschiedene Komplexe ohne gemeinsame Komponenten formieren können. Diese Komplexe heißen BLOC für „biogenesis of lysosomal-related organelle complex“.

Zuerst wurden die Komponenten des BLOC-3 Komplexes entdeckt (Nazarian *et al.*, 2003, Martina *et al.*, 2003, Chiang *et al.*, 2003). Dieser Komplex besteht aus HPS-1 und HPS-4 und

kommt im Zytosol und in kleinen Mengen membranassoziiert vor. Mutationen in einem der Gene führen zu den typischen Syndromen von HPS und auf der zellulärer Ebene zu den Transportdefekten von lysosomalen und endosomalen Vesiklen (Nazarian *et al.*, 2003). Es gibt Hinweise darauf, dass HPS-1 und HPS-4 noch in weiteren Komplexen vorliegen (Chiang *et al.*, 2003). HPS-3, HPS-4 und HPS-6 bilden den BLOC-2 Komplex (di Pietro *et al.*, 2004, Gautam *et al.*, 2004). Mutationen in den Genen des BLOC-2 Komplexes führen zu einer relativ milden Form von HPS (Nguyen *et al.*, 2002), die sich in erhöhter Anzahl von unreifen Melanosomen manifestiert. Der BLOC-1 Komplex (Starcevic und Dell'Angelica, 2004) besteht aus Pallidin, Muted, Cappuccino, Dysbindin, Snapin und BLOS-1, BLOS-2, BLOS-3. Interessanterweise können alle an dem BLOC-1 Komplex beteiligte Proteine Coiled-Coil-Interaktionen eingehen, kommen zytosolisch und membranassoziiert vor und sind konserviert unter Vertebraten und Invertebraten, haben aber keine Homologen in Hefe. Deletion einer der Komplexkomponenten führt zum reduzierten Expressionsniveau anderer Proteine, die an dem Komplex beteiligt sind. Die Funktion dieses Komplexes ist nicht klar, obwohl Mutationen in seinen Komponenten zu stark ausgeprägten HPS-Syndromen führen. Von zwei Komponenten des Komplexes wurde berichtet, dass sie mit SNARE-Proteinen interagieren können. Pallidin interagiert mit Syntaxin 13 und zeigt eine deutliche Kollokalisierung mit ihm in einem vesikulärem Kompartiment (Huang *et al.*, 1999). Syntaxin 13 ist ein SNARE-Protein, das an der Fusion von frühen Endosomen (McBride *et al.*, 1999, Sun *et al.*, 2003) beteiligt ist und auch eine Rolle bei Recycling-Endosomen spielt (Prekeris *et al.*, 1998). SNAP-25 und SNAP-23 wurden als Interaktionspartner von Snapin beschrieben (Ilardi *et al.*, 1999, Buxton *et al.*, 2003). Interessanterweise wird SNAP-23 mit fast allen exozytotischen Lysosomen in Verbindung gebracht (s. Abb.2) und von einem Komplex zwischen SNAP-25, Syntaxin 13 und VAMP2 wurde in zwei Facharbeiten berichtet (Prekeris *et al.*, 1998, Sun *et al.*, 2003).

### **1.3 cAMP-Signaling, Adenylatcyclase VI, RGS7 und Snapin**

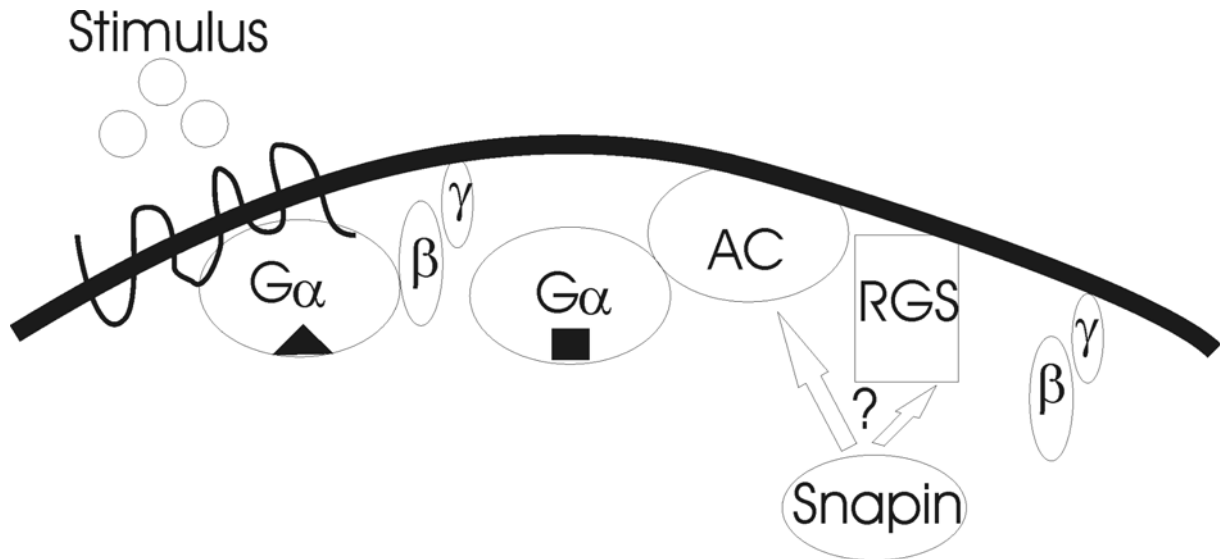
c-AMP dient als „second messenger“ bei der Übertragung vieler Hormonsignale und Sinnesreize. Es wird vom Enzym Adenylatcyclase aus ATP hergestellt. Bei Säugern wurden bis jetzt 9 verschiedene Mitglieder der Adenylatcyclasen-Familie identifiziert (Übersicht bei Chern 2000). Alle Isoformen außer der hodenspezifischen Isoform sind Membranproteine mit 12 Transmembrandomänen und 3 zytoplasmatischen Einheiten N, C1 und C2. C1 und C2 besitzen die katalytische Funktion und sind stark unter den Isoformen konserviert. Die N-terminale Domäne ist variabel und spielt eine regulatorische Rolle. Adenylatcyclasen werden

von verschiedenen G-Proteinen reguliert. Hierbei unterscheidet man einen positiven und einen negativen Regulationsmodus. Nach der Bindung des primären Stimulus (Neurotransmitter, Hormon) an seinen Rezeptor an der Zelloberfläche induziert dieser Rezeptor den GDP-GTP-Austausch in der  $\alpha$ -Untereinheit des Gs-Proteins. In der GTP-gebundenen Form dissoziiert die  $\alpha$ -Untereinheit ab, bindet an die Adenylatcyclase und aktiviert sie. Die Hydrolyse von GTP durch die  $\alpha$ -Untereinheit beendet die Aktivierung. Dies ist der positive Regulationsmodus von Adenylatcyclasen durch G-Proteine. Der negative Modus besteht in einer indirekten Wirkung über die  $\beta\gamma$ -Untereinheit von Gi-Proteinen.

Adenylatcyclase VI stellt einen besonders interessanten Fall dar. Sie ist in mehreren Geweben darunter auch im Hirn exprimiert (Premont *et al.*, 1992). Außergewöhnlich bei dieser Adenylatcyclase ist, dass sie eine 10 bis 15fach niedrigere basale Aktivität als zum Beispiel Adenylatcyclase II hat (Pieroni *et al.*, 1995) und von  $\text{Ca}^{2+}$ , PKA und PKC inhibiert wird (Mons *et al.*, 1994, Chen *et al.*, 1997, Lai *et al.*, 1997). Soweit bekannt, wird sie nur durch die Stimulation des  $\beta_2$  adrenergen Rezeptors aktiviert (Chern, 2000).

Chou *et al.*, 2004 beschrieben einen weiteren Regulator der Adenylatcyclase VI. Sie identifizierten Snapin durch ein Zwei-Hybrid-Verfahren als Protein, das an den regulatorischen N-Terminus der Adenylatcyclase VI bindet. Kolokalisationsstudien und Bindungsexperimente bestätigten die Möglichkeit der *in vivo* Relevanz dieser Interaktion. Allerdings gelang den Autoren keine Koimmunoprecipitation. Interessanterweise wurde die Bindungsdomäne von Snapin nicht der C-terminalen Coiled-Coil-Domäne wie im Falle von SNAP-23 und SNAP-25 Interaktion zugeordnet, sondern einem zentralen Fragment zwischen den Aminosäuren 33 und 51. Koexpression von Snapin und Adenylatcyclase VI modulierte spezifisch die Inhibition der Adenylatcyclase VI durch PKC, aber nicht die basale Aktivität oder die inhibitorischen Effekte von PKA und  $\text{Ca}^{2+}$ .

Hunt *et al.*, 2003 schlugen noch einen weiteren über Zwei-Hybrid-Verfahren gefundenen Snapin-Interaktionspartner vor, der an cAMP-Signaling beteiligt ist. Es handelt sich um RGS7 („regulator of G-protein signaling“), ein hirnspezifisches Mitglied der RGS-Proteinfamilie. RGS-Proteine verstärken die intrinsisch schwache GTPase-Aktivität der  $\alpha$ -Untereinheit von G-Proteinen und deaktivieren sie somit. Außer der RGS-Domäne besitzen RGS-Proteine hauptsächlich N-terminal weitere Domänen, mit denen sie mit anderen Proteinen interagieren können.



**Abb.3 Snapin im Zusammenhang mit G-Protein-Signaling.**  $G\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  – entsprechende Untereinheiten eines G-Proteins, AC – Adenylatcyclase, RGS - „regulator of G-protein signaling“. Das Dreieck in Assoziation mit der  $\alpha$ -Untereinheit des G-Protein bedeutet GDP, das Rechteck bedeutet GTP.

Anhand dieser Domänen werden sie in 5 Unterfamilien eingeteilt (Übersicht bei Ishii und Kurachi, 2003). Die ersten 19 Aminosäuren von RGS2 interagieren mit Adenylatcyclase V (Salim *et al.*, 2003). Grundsätzlich scheint die RGS-Adenylatcyclase-Interaktion nicht auf RGS2 und Adenylatcyclase V beschränkt sein. Sinnarajah *et al.*, 2001 zeigten, dass auch RGS3 und 1, aber nicht 4 und 5 verschiedene Adenylatcyclasen inhibieren können. Die Aktivität von den Adenylatcyclasen III, V und VI, aber nicht I und II konnten durch RGS2 moduliert werden. Hunt *et al.*, 2003 zeigten, dass die N-terminale DEX-Domäne von RGS6 und RGS7 mit Snapin im Zwei-Hybrid-Verfahren interagieren kann. Bei Snapin wurde die Bindungsstelle der Coiled-Coil-Domäne zugeordnet. Physiologische Folgen dieser Interaktion sind in der Arbeit nicht untersucht worden.

Eine schematische Darstellung der Zusammenhänge zwischen Snapin und den an G-Protein-Signaltransduktion beteiligten Proteinen ist auf der Abb. 3 zu sehen.

### **1.4 Fragestellung**

Die Bindung von Snapin an SNAP-25 und im demselben Fachartikel (Ilardi *et al.*, 1999) beschriebene Effekte auf Interaktionen von anderen exozytotischen Proteinen machten Snapin besonders interessant für die Arbeitsgruppe von Professor Jahn, die sich mit Membranfusion in eukaryontischen Zellen und speziell mit der neuronalen Exozytose auseinandersetzt. Das Ziel dieser Arbeit war, zum Verständnis der Funktion von Snapin durch umfassende Charakterisierung von diesem Protein und seinen Interaktionen beizutragen. Zu Beginn dieser Studie war nur die Arbeit von Ilardi *et al.*, 1999 bekannt. Die Qualität der im Fachartikel publizierten Daten veranlasste uns, erneut die Frage nach dem Expressions- und Zellokalisierungsmuster von Snapin zu stellen. Außerdem sollte seine Bindung an SNAP-25 und andere Proteine der neuronalen Exozytose quantitativ erfasst werden, um diese in den Kontext der vermuteten regulatorischen Rolle von Snapin bei der Neurotransmitterfreisetzung zu bringen.

## 2 Matherial und Methoden

### 2.1. Material

Standardchemikalien wurden von den Firmen Sigma, Roth und Merck bezogen. Klonierungsarbeiten (Restriktionsverdau, Dephosphorylierung und Ligation) wurden mit Enzymen von New England Biolabs und von Fermentas durchgeführt und die Plasmid-DNS mit den Kits von Qiagen oder Macherey-Nagel aus Bakterien gewonnen. Für alle PCR-Reaktionen wurde die Pfu-Polymerase von Stratagene verwendet. Materialien und Säulen für die Chromatographie stammen von Qiagen (Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose) und Amersham Pharmacia Biotech (Glutathion-Sepharose-4B, monoS- und monoQ-Säulen, ProteinG- und ProteinA-Sepharose 6B, CNBr-Sepharose 4B). Plasmide für Molekularbiologie wurden bei Amersham Pharmacia Biotech (pGEX-Serie) und Novagen (pET-Serie) bezogen. Medien für die Zellkultur wurde bei Life Technologies bezogen.

### 2.2 Geräte

Ionenaustauschchromatographie: ÄKTA –System, Amersham Pharmacia Biotech

MALLS: Dawn DSP mit Optilab DSP, Wyatt Technology Corporation

CD-Spektroskopie: Spektropolarimeter J-720, Jasco

### 2.3 *E. coli* Stämme und Zelllinien

Für Klonierungen wurde der *E. coli* Stamm XL1blue und für Expressionen der *E. coli* Stamm BL21(DE3) verwendet.

PC12-Zellen (eine Pheochromozytom-Zelllinie aus Rattennebennierenzellen (Greene and Tischler, 1976)) wurden auf kollagenbeschichteten (Kollagenkonzentration ca. 2 µg/cm<sup>2</sup>) Petrischalen in RPMI 1640 Medium (Life Technologies) mit 10% hitzedesalviertem Pferdeserum, 5% FCS, 2 mg/ml L-Glutamin, Penizillin-Streptamyzin-Mischung 60 U/ml kultiviert.

### 2.4 Antikörper

Folgende in dieser Arbeit verwendete Antikörper sind bereits beschrieben: αGDI (monoklonaler Antikörper Cl 81.2 (Chou *et al.*, 2000)), αSynaptophysin (monoklonaler Antikörper Cl 7.2 (Jahn *et al.*, 1985)), αNMDAR (monoklonaler Antikörper Cl 54.2 (Brose *et al.*, 1994)), αSynaptobrevin 2 (monoklonaler Antikörper, Cl 69.1 (Edelmann *et al.*, 1995)), αSNAP-25 (monoklonaler Antikörper Cl 71.1 und Cl 71.2 (Bruns *et al.*, 1997)), αSyntaxin 1a



(monoklonaler Antikörper HPC-1 (Barnstable *et al.*, 1985),  $\alpha$ Complexin I und II (polyklonaler Antikörper 942). Die meisten Antikörper sind bei Synaptic Systems erhältlich. Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei Antiseren gegen Snapin aus *R. norvegicus* in Kaninchen erzeugt. Das erste Antiserum ist gegen die komplette Sequenz von Snapin gerichtet. Das Antigen wurde rekombinant in *E.coli* als 6xHis-Fusionsprotein exprimiert und im ersten Aufreinigungsschritt über  $\text{Ni}^{2+}$ -Affinitätschromatographie angereichert. Nach dem Abschneiden des Tags mit Thrombin wurde das Protein zusätzlich über die Kationenaustauschchromatographie gereinigt.

Das zweite Antiserum ist gegen das C-terminale Peptid gerichtet, das ursprünglich als die Bindungsstelle von SNAP-25 identifiziert worden ist (Ilardi *et al.*, 1999). Dieses Peptid, das den Aminosäuren 117 bis 136 von Snapin entspricht, wurde chemisch mit einem zusätzlichen C-terminalen Cystein synthetisiert. Das Peptid wurde mit MBS an KLH (Calbiochem) gekoppelt.

Das dritte Antiserum ist gegen das Fragment von Ala26 bis Tyr81 gerichtet und interagiert somit nicht mit der putativen Bindungsstelle von SNAP-25. Das Fragment wurde als GST-Fusionsprotein exprimiert, an der Gluthationsepharose gereinigt und zusammen mit dem GST-Tag als Antigen eingesetzt.

Nach der Herstellung wurden die Antigene durch Dialyse in PBS überführt und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Für die ersten zwei Injektionen wurden  $300\ \mu\text{g}$  Protein gemischt mit dem kompletten Freundschens Adjuvant, für alle weiteren  $150\ \mu\text{g}$  Protein gemischt mit dem inkompletten Freundschens Adjuvant verwendet. Das Antiserum gegen das komplette Protein und gegen das C-terminale Peptid sind bei Synaptic Systems erhältlich.

Zur Affinitätsaufreinigung vom Snapin-Antiserum wurden  $10\ \text{mg}$  GST-Snapin an CNBr-Sepharose wie vom Hersteller empfohlen gekoppelt.  $15\ \text{ml}$  Antiserum wurden über Nacht mit dem gekoppelten Antigen inkubiert. Die CNBr Sepharose mit dem gebundenden Antikörper-Antigen-Komplex wurde mehrmals mit PBS ( $40\ \text{mM}$  NaCl  $\text{pH}=7,4$ ,  $150\ \text{mM}$  NaCl) mit  $0,1\%$  Tween20 und anschließend mit PBS gewaschen. Die Antikörper wurden mit  $0,2\ \text{M}$  Glyzin  $\text{pH}=2,3$  in  $150\ \text{mM}$  NaCl eluiert und sofort mit Tris auf den  $\text{pH}$ -Wert zwischen  $7,2$  und  $7,5$  eingestellt. Anschließend wurden die aufgereinigten Antikörper gegen PBS dialysiert und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

## 2.5 DNS-Konstrukte

Folgende Konstrukte stammen aus dem Labor von Prof. Reinhard Jahn und wurden bereits beschrieben:

pGEX-KG: SNAP-23, SNAP-29;

pGEX-1T: Syntaxin 1a, zytoplasmatische Domäne (Aminosäuren 1-264), SNAP-25a;

pET28a: SNAP-25a, in dem alle Cysteine durch Serine ersetzt worden sind (Fasshauer *et al.*, 1999), Syntaxin 1a, zytoplasmatische Domäne (Aminosäuren 1-262), Synaptobrevin 2, zytoplasmatische Domäne (Aminosäuren 1-96). Alle cDNS-Sequenzen stammen aus *R. norvegicus*.

Die Snapin-Sequenz wurde in den pET28a-Vektor mittels NdeI und XhoI, in den pGEX-KG mittels BamHI und XhoI Schnittstellen kloniert.

SNAP-25b wurde aus dem Vektor pQE9 mittels BamHI und XhoI Schnittstellen in den pGEX-KG-Vektor subkloniert.

Zur Einführung einer phosphomimetischen Mutation in Snapin (Chheda *et al.*, 2001) wurde das Serin an der Position 50 durch ein Aspartat ersetzt. Dazu wurde das QuickChange Mutagenesis Kit von Stratagene benutzt. Auf diese Weise sind die Konstrukte pET28a SnapinS50D und pGEX-KG SnapinS50D entstanden.

Alle Konstrukte wurden durch Sequenzierung auf beiden DNS-Strängen verifiziert.

Protein	Aminosäuren	Primer, falls von mir kloniert	Mutation	Vektor
SNAP-25a	1-206		Alle Cysteine durch Serine ersetzt	pET28a
SNAP-25a	1-206		Alle Cysteine durch Serine ersetzt	pET28a
SNAP-25b	1-206	OV18: acgctcgagttaaccacttcccagcat, OV19: cctggatccatggccgaggacgca	Wildtyp	pGEX-KG
SNAP-23	1-210		Wildtyp	pGEX-KG
SNAP-29	1-260		Wildtyp	pGEX-KG
Syntaxin 1a	1-262		Zytoplasmatische Domäne	pET28a
Syntaxin 1a	1-264		Zytoplasmatische Domäne	pGEX-1T

Synaptobrevin	1-96		Zytoplasmatische Domäne	pET28a
Snapin	1-132	OV1: gcgagcatatggccgcggtggtccgctgc, OV10: gcgacctcgagttattgcttggagaaccagg	Wildtyp	pET28a
Snapin	1-132	OV4: gcgacggatccatggccgcggtggtccgctg, OV10: ccggagcactacttggcttctctgaccgc	Wildtyp	pGEX-KG
Snapin	1-132	OV22: gcggtcagagaagaccaagtagagctccgg, OV23: ccggagcactacttggcttctctgaccgc	S50D	pET28a
Snapin	1-132	OV22: gcggtcagagaagaccaagtagagctccgg, OV23: ccggagcactacttggcttctctgaccgc	S50D	pGEX-KG

**Tab. 1 Übersicht der in dieser Studie benutzten Konstrukte**

## 2.6 Expression und Aufreinigung von rekombinanten Fusionsproteinen

Alle Fusionsproteine wurden im *E. coli* Stamm BL21(DE3) exprimiert. Dieser Stamm zeichnet sich durch Deletion von mehreren Proteasen aus und trägt einen  $\lambda$  Prophagen, der für eine T7-Polymerase kodiert. Die T7-Polymerase ist für die Expression von 6xHis-Fusionsproteinen, deren Gene unter der Kontrolle von einem T7-Promotor stehen, zwingend notwendig.

Zuerst wurden elektrokompente Bakterien frisch mit dem entsprechenden Plasmid transformiert und eine Übernachtskultur ausgehend von einer einzelnen Kolonie angeimpft. Am nächsten Tag wurde die Übernachtskultur 1:100 verdünnt und die Bakterien wurden bis zur OD zwischen 0,8 und 1,0 bei 600 nm kultiviert. Danach erfolgte die Induktion der Fusionsproteinexpression mit 0,8 mM IPTG für 3-5 Stunden. Die Bakterien wurden abzentrifugiert, das Pellet in 50 ml Resuspensionspuffer (s. Tab. 2) pro 2 l Ausgangskultur

aufgenommen und bis auf weiteres bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Das Bakterienpellet wurde aufgetaut, mit 4 mg Lysozym pro Liter Ausgangskultur und 0,1 mM PMSF versetzt und 30 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Danach erfolgte der Aufschluß mit einer Ultraschallbehandlung (vier mal 30 sec, *duty cycle* 50% und *level* 7). Die aufgeschlossenen Bakterien wurden erneut mit 0,1 mM PMSF versetzt und 30 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  mit 2 mg DNase pro Liter Ausgangskultur behandelt. Danach wurde entweder 6M Harnstoff für 6xHis-Fusionsproteine oder 0,5% TritonX-100 für GST-Fusionsproteine zugegeben, gut gemischt (eventuell mit einem Handmixer) und die Zelltrümer wurden bei  $4^{\circ}\text{C}$  abzentrifugiert (2x15 min bei 27000 g). Zu dem Überstand wurden dann Kügelchen mit der entsprechenden Affinitätsmatrix hinzugegeben (s. Tab. 2) und 3 Stunden bei  $4^{\circ}\text{C}$  rotierend inkubiert. Danach wurden die Kügelchen in eine Säule gepackt, mit Waschpuffer (s. Tab. 2) gewaschen und in mehreren Fraktionen mit dem entsprechenden Elutionspuffer (s. Tab. 2) eluiert, bis kein Protein mehr im Eluat zu detektieren war.

Für die anschließende Ionenaustauschchromatographie wurden die eluierten Proteine auf Niedrigsalz (50-100 mM NaCl) durch Dialyse gebracht. Während der Dialyse wurde bei Bedarf der Expressionstag abgeschnitten. Die Spaltung des Expressionstags verlief über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$  mit 1-10 U Thrombin (Calbiochem) pro mg rekombinantes Protein.

Alle Proteine wurden anschließend entweder durch Anionen- bzw. Kationenaustauschchromatographie (monoS- bzw. monoQ-Säule von Amersham Pharmacia Biotech) mit dem ÄKTA-System gereinigt. Die Bindung an die Säule erfolgte in Niedrigsalzpuffer (je nach Löslichkeit des Proteins in Salzlösungen wurden unterschiedliche Konzentrationen eingesetzt, immer unter 100 mM NaCl), die Elution erfolgte durch einen von 0 auf 1 M ansteigenden Natriumchloridgradienten in 20 mM Tris mit Zugabe von 1 mM EDTA. Außerdem wurde 1 mM DTT zugesetzt, wenn Cysteine vorhanden waren. Die Peakfraktionen (verfolgt über die UV-Absorption bei 230 und 280 nm) wurden auf einem Coomassie gefärbten SDS-Gel analysiert und die saubersten Fraktionen vereinigt.

	6xHis-Fusionsproteine	GST-Fusionsproteine
Vektor	pET-Serie	pGEX-Serie
Antibiotikum	Kanamycin (100 µg/ml)	Ampizilin (25 µg/ml)
Induktionstemperatur	$37^{\circ}\text{C}$	$25^{\circ}\text{C}$
Nährmedium	TB	LB
Aufschluß	denaturierend mit 6M Harnstoff	Nativ, mit 0,5% TritonX-100

Affinitätsmatrix	Ni <sup>2+</sup> -NTA-Agarose	Glutathion-Sepharose-4B
Resuspensionspuffer	T <sub>20</sub> N <sub>500</sub> I <sub>8</sub> pH=7,4	T <sub>50</sub> N <sub>100</sub> E <sub>1</sub> (D <sub>1</sub> ) pH=7,4
Waschpuffer	T <sub>20</sub> N <sub>500</sub> I <sub>20</sub> pH=7,4	T <sub>20</sub> N <sub>100</sub> E <sub>1</sub> (D <sub>1</sub> ) pH=7,4
Elutionspuffer	T <sub>20</sub> N <sub>500</sub> I <sub>400</sub> pH=7,4	T <sub>50</sub> N <sub>100</sub> E <sub>1</sub> (D <sub>1</sub> )G <sub>100</sub> pH=7,4

**Tab.2 Unterschiede in Expressions- und Aufschlussbedingungen zwischen 6xHis- und GST-Fusionsproteinen.** T- TRIS, N- NaCl, I- Imidazol, E- EDTA, D- DTT (nur bei Proteinen mit vorhandenen Cysteinen dazugegeben), G- Gluthation. Die Zahlen hinter den einzelnen Buchstaben indizieren die Konzentration in mM.

### 2.7 CD-Spektroskopie

Die CD- Spektren zwischen 195 und 250 nm wurden in Quarzküvetten von 0,1 cm Schichtdicke bei 50 nm/min in 0,1 nm Schritten aufgenommen. Jedes Spektrum stellt den Mittelwert von 15 unabhängigen Messungen der gleichen Proteinprobe dar. Für die Messungen wurden Proteinkonzentration von 15 µM in 20 mM TRIS, 300 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT verwendet. Wenn durch Proteininteraktionen entstandene Änderungen in der Sekundärstruktur nachgewiesen werden sollten, wurden die potentiellen Interaktionspartner über Nacht bei 4°C miteinander inkubiert. Um die Änderungen im CD-Spektrum einer Proteininteraktion zuzuordnen, wurden die gemessenen CD-Spektren mit der theoretischen Summe individueller CD-Spektren verglichen. Zur Berechnung dieser Summe wurde die Gleichung

$$[\Theta_{\text{sum}}] = \sum c_i n_i [\Theta_i] / \sum c_i n_i$$

benutzt, mit  $\Theta_i$  - molare Elliptizität pro Aminosäure,  $c_i$  - Proteinkonzentration und  $n_i$  - Anzahl der Aminosäuren im entsprechenden Protein.

Die Schmelzkurven wurden bei 220 nm in 0,5°C-Intervallen mit einem Temperaturanstieg von 60°C pro Stunde aufgenommen. Wegen der starken Temperaturabhängigkeit des pH-Wertes des TRIS-Puffers wurden die Messungen in 40 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 1 mM DTT pH=7,4 vorgenommen.

### 2.8 Multi-angle laser light scattering (MALLS)

60 µM Protein in 20 mM TRIS, 300 mM NaCl, 1 mM DTT pH=7,4 wurde zuerst über die HR-10/30 Superdex-200-Säule bei einer Flußrate von 0,5 ml/min gelfiltriert. Das Elutionsprofil wurde durch die Messungen von der UV-Absorption bei 280 nm, der Lichtstreuung bei 632.8 nm und des Reflektionsindex beobachtet. Die Analyse der

Lichtstreuungsparameter und die Berechnung der daraus resultierenden molekularen Masse wurde mit Asta-Software von Wyatt Technology Corporation durchgeführt. Dazu wurde angenommen, daß die Änderung des Reflektionsindex mit der Änderung der Proteinkonzentration in Lösungen ( $dn/dc$ ) einen konstanten Wert von 0,189 für alle Proteine hat (Wen *et al.*, 1996).

## 2.9 Kristallisation von Snapin

Zur Herstellung von Kristallen wurde Snapin bei einer Konzentration von 2,5 mg/ml in 10 mM Hepes, 300 mM NaCl, 1 mM DTT verwendet. Kristalle wurden durch die „sitting drop“-Methode bei 20°C mittels Dampfdiffusion gebildet. 2 µl der Proteinlösung wurden mit 1 µl Reservoirlösung (0.4 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 100 mM Natriumcitrat pH=5,0) versetzt. Das Reservoirvolumen betrug 500 µl.

Die Beugungsdaten wurden an der Beamline BW6 am DESY (Hamburg, Deutschland; [http://www.hASYLAB.de/facility/experimental\\_stations/stations/BW6.htm](http://www.hASYLAB.de/facility/experimental_stations/stations/BW6.htm)) aufgenommen. Die Analyse der Diffraktionsdaten wurde mit dem Programm DENZO/SCALEPACK durchgeführt.

## 2.10 Immunopräzipitationen

PC12-Zellen oder postnuklearer Überstand eines Rattenhirnhomogenats wurden mit 2% TritonX-100 bei 4°C unter Zugabe von Boehringer Proteaseninhibitorencocktail in 10 mM Hepes, 150 mM NaCl pH=7,0 solubilisiert. Die Proteinkonzentration nach der Proteinbestimmung mit BCA-Assay wurde auf 2 mg/ml eingestellt und das in TritonX-100 unlösliche Material durch die Zentrifugation für 30 min bei 16000 g entfernt. Antikörper wurden während einer Stunde bei 4°C an ProteinG-Sepharose vorgebunden und anschließend mit frisch hergestellten Lysaten inkubiert.

Um SNAP-25 zu immunopräzipitieren, reichte eine zweistündige Inkubation aus, für eine komplette Immunopräzipitation von Snapin war eine Übernachtinkubation mit dem Antikörper nötig. Für 200 µg Lysatprotein wurden 10 µg affinitätsgereinigten Snapinserums bzw. 5 µl SNAP-25-spezifischen monoklonalen 71.1 Antikörpers in Form von Aszites eingesetzt.

Nach drei Waschzyklen mit 1% TritonX-100 in 10 mM Hepes, 150 mM NaCl pH= 7,0 wurde der Antikörper-Antigen-Komplex mit dem Laemmli-Puffer ohne reduzierende Agenzien von der ProteinG-Sepharose eluiert. Das ungebundene Material wurde mit Acetonpräzipitation konzentriert, so dass eine finale Proteinkonzentration von 1mg/ml erreicht wurde. Gleiche Volumina von gebundenem und ungebundenem Material, erhalten aus 20 µg Ausgangsmaterial

(PC12 oder Rattenhirnlysat), wurden mit SDS-PAGE und anschließender Immunodetektion analysiert.

### **2.11 Subzelluläre Fraktionierungen**

Subzelluläre Fraktionierung von Rattenhirnhomogenaten wurde wie beschrieben durchgeführt (Huttner *et al.*, 1983).

TritonX-114-Verteilung erfolgte nach Bordier, 1981. Dazu wurden PC12-Zellen oder Rattenhirnhomogenat in 10 mM HEPES, 150 mM NaCl pH=7,0, Boehringer Proteaseninhibitorencocktail mit 1 % TritonX-114 (Pierce) verwendet. Die Proteinkonzentration betrug 1,5 mg/ml. In TritonX-114 unlösliches Material wurde durch eine Zentrifugation für 5 min bei 13000 g entfernt. Die Trennung von 200 µl Zellysat in die detergentenarme und detergentenreiche Phase, in der Membranproteine angereichert sind, erfolgte wie bei Bordier beschrieben durch Erwärmung der Probe auf 30°C und kurze Zentrifugation bei 1800 g. 20 µl vom Ausgangsmaterial und den beiden Phasen nach der Trennung, die dem Ausgangsvolumen angeglichen worden waren, wurden auf SDS-Gel aufgetragen und anschließend mittels Immunoblot analysiert.

### **2.12 Gewinnung von Synaptosomen**

2 Rattenhirne wurden aus erwachsenen Wistar Ratten isoliert und in eiskalter 320 mM Saccharoselösung aufgenommen. Anschließend wurden sie mit 8 Hüben bei 800 rpm in einem Glasteflonhomogenisierer zerkleinert. Das Homogenat wurde zuerst bei 3000 g für 2 min und dann der Überstand der ersten Zentrifugation bei 14500 g für 12 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 2 ml 320 mM Saccharose, 5 mM HEPES pH=7,4 pro Rattenhirn resuspendiert. Das resuspendierte Pellet wurde auf einen Ficoll-Gradienten (4 ml 13% (w/v), 1 ml 9% (w/v), 4 ml 6% (w/v) Ficoll in 320 mM Saccharose, 5 mM HEPES pH=7,4) geladen und für 35 min bei 87000 g zentrifugiert. Die Synaptosomen flotieren als deutlich sichtbare weiße Doppelbande in der 9% Ficollfraktion. Diese Bande wurde vorsichtig abgenommen, im flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

### **2.13 Gewebeextrakte**

Organe wurden aus erwachsenen männlichen Wistar-Ratten isoliert und im eiskalten 10 mM HEPES-Puffer pH=7,0 mit 150 mM NaCl und Proteaseinhibitoren (1 mM EDTA, 0,1 mM PMSF, 10 µg/ml Aprotinin, 10 µg/ml Leupeptin, 1 µg/ml Pepstatin) aufgenommen. Die Homogenisierung von Geweben erfolgte entweder mit einem Ultratorax-Gerät (Herz,

Skelettmuskel, Unterkieferspeicheldrüse) oder mit einem Glasteflonhomogenisierer mit 10 Hüben bei 800 rpm (alle anderen Gewebe).

#### **2.14 Interaktionsstudien mit GST-Fusionsproteinen und Hirnextrakten**

Rattenhirne von erwachsenen Wistar-Ratten wurden in 10 mM Hepes pH=7,4, 320 mM Saccharose und Proteaseinhibitoren (0,1 mM PMSF, 10 µg/ml Aprotinin, 1 µg/ml Pepstatin) homogenisiert und bei 12000 g für 15 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit 10 mM Hepes pH=7,4 150 mM NaCl, 1% TritronX-100 auf die finale Proteinkonzentration von 1 mg/ml gebracht und solubilisiert. Das nichtlösliche Material wurde bei 100000 g für 1 h abzentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden 15 mg des Überstandes mit 200 µg des potentiellen Bindungspartners als GST-Fusionsprotein inkubiert. Nach 2 h wurde Gluthation-Sepharose dazugegeben und erneut 2 h inkubiert.

Die Elution erfolgte in 1/100 des Ausgangsvolumens mit dem Laemmli-Probenpuffer. Die Proben wurden für 5 min bei 95°C gekocht und gleiche Volumina an Gluthation-Sepharose gebundenen und ungebundenen Materials mit SDS-PAGE und Immunoblot analysiert.

#### **2.15 Limitierte Proteolyse**

Limitierte Proteolyse von Snapin wurde in 10 mM Hepes pH=7.8, 300 mM NaCl, 1 mM DTT bei Raumtemperatur durchgeführt. Dazu wurden folgende Proteasen benutzt: Proteinase K (Sigma), Pronase E (Sigma) und Carboxypeptidase Y (Roche). Angegebene Verhältnisse Snapin zu Protease beziehen sich immer auf Gewichtsanteile. Die proteolytische Reaktion wurde durch Zugabe von Laemmli-Probenpuffer und Inkubation für 5 min bei 95°C gestoppt.

#### **2.16 Biochemische Standardmethoden**

SDS-PAGE (15 %ige Gele) und Immunoblot wurden wie beschrieben durchgeführt (Laemmli, 1970; Towbin *et al.*, 1979). Der Laemmli-Probenpuffer bestand aus 10% w/v SDS, 18 mM TRIS pH=6,8, 30% w/v Glycerin, 0,05 w/v Bromphenolblau.

Proteinkonzentrationen wurden mit dem BCA-Assay (Pierce) bestimmt. Hierbei diente BSA als Proteinstandard. Wenn besonders genaue Konzentrationsangaben nötig waren, wurde der Extinktionskoeffizient des jeweiligen rekombinanten Proteins aus der Aminosäuresequenz mit dem Peptide Calculator (Version 1, <http://www.basic.nwu.edu/biotools/ProteinCalc.html>) ermittelt und die Konzentration aus der Absorption bei 280 nm nach dem Lambert-Beer-Gesetz berechnet.



Acetonpräzipitation von verdünnten Proteinlösungen wurde wie folgt durchgeführt: Die Proteinlösung wurde mit 4 Volumina kalten Acetons vermischt, 1 Stunde bei  $-20^{\circ}\text{C}$  inkubiert und bei 16000 g 10 min präzipitiert. Der Überstand wurde schnell abgesaugt und das Pellet im Laemmli-Probenpuffer aufgenommen. Die DNS-Proben wurden durch Elektrophorese auf einem 1%igen Agarosegel in TAE analysiert.

### **2.17 Computergestützte Sequenzanalyse**

Alle Programme, die zur Strukturvorhersage benutzt wurden (Transmembrandomänen,  $\alpha$ -helikale Strukturen, Coiled-coil-Domänen) sind bei dem Expasy-Server (<http://www.expasy.org/tools/>) erhältlich. Sequenzvergleiche wurden mit ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) mit Standardeinstellungen gemacht. Im Folgenden sind Organismen aufgelistet, von den die benutzte Snapin-homologe Sequenzen mit den dazugehörigen Datenbankidentifikationsnummern abstammen: *Rattus norvegicus* (gi:41017816), *Mus musculus* (gi:4206090), *Bos taurus* (gi:107610), *Sus scrofa* (gi:37798214), *Homo sapiens* (gi:4206088), *Xenopus laevis* (gi:15274523), *Dario rerio* (zfish/TC250152), *Ciona intestinalis* (gi:24821347), *Apis mellifera* (gi:48103117), *Drosophila melanogaster* (gi:17861576), *Caenorhabditis elegans* (gi:17538398).

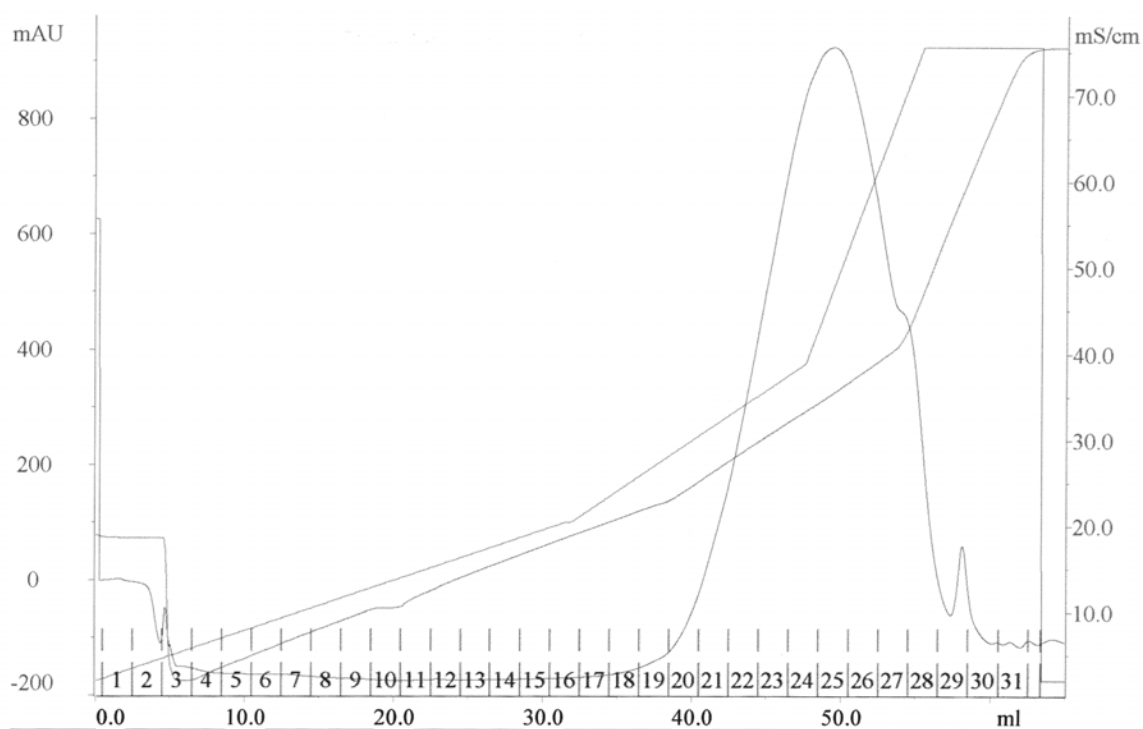
### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Reinigung von rekombinantem Snapin und Snapinfusionsproteinen

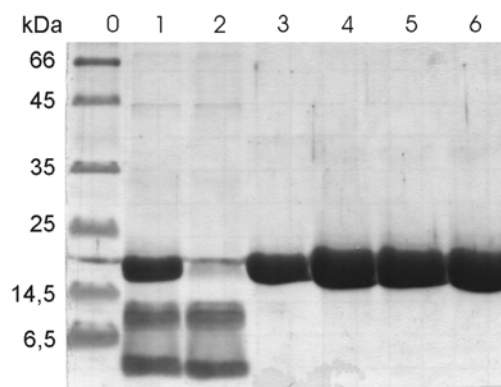
Die meisten in dieser Studie vorgenommenen biochemischen und strukturellen Untersuchungen erforderten rekombinantes Protein vom höchsten Reinheitsgrad und oft in größeren Mengen. Deshalb wurde zunächst ein Überexpressions- und Reinigungsverfahren etabliert, das hochreines Protein in Milligrammengen lieferte. Dazu sollte die Sequenz von Snapin aus *R. norvegicus* in einen Vektor für bakterielle Überexpression kloniert werden. Zu Beginn dieser Studie war nur die Sequenz von Snapin aus *M. musculus* und *H. sapiens* publiziert und lediglich eine homologe Sequenz aus *R. norvegicus* (EST189206) konnte durch BLAST-Search identifiziert werden. Sie zeigte 100% Identität auf Aminosäurenebene zu den Aminosäuren 4 bis 136 von Snapin aus *M. musculus*. Die fehlenden N-terminalen Aminosäuren wurden durch die Aminosäuren aus der Sequenz von *M. musculus* ergänzt. Dieser Bereich scheint unter Säugern konserviert zu sein, weil er 100% Homologie zu humanem Snapin aufweist (Vergl. Abb.11 und Abb.12). Kürzlich ist die komplette Sequenz von Snapin aus *R. norvegicus* publiziert worden. Diese Sequenz (gi:27692724) stimmt mit der von uns erstellten vollkommen überein.

Snapin wurde in *E. coli* als N-terminales 6xHis-Fusionsprotein exprimiert und anschließend in zwei Schritten durch Ni<sup>2+</sup>-Affinitätschromatographie und Ionenaustauschchromatographie gereinigt. Die Ausbeute betrug 30 mg Protein pro Liter Bakterienkultur. Diese hohe Ausbeute konnte erst durch den Aufschluß von Bakterien unter denaturierenden Bedingungen (in 6 M Harnstoff) erreicht werden, da der lösliche Anteil von 6xHis-Snapinfusionsprotein unter 10% lag. Im Gegensatz dazu war das GST-Snapinfusionsprotein vollkommen löslich. Der Harnstoff wurde durch Dialyse entfernt und die Rückfaltung des Proteins durch CD-Studien bestätigt (s. Abschnitt 3.4.2). Nach der Ni<sup>2+</sup>-Affinitätschromatographie wurde Protein erhalten, dessen Reinheit anhand der Coomassie-Färbung auf einem SDS-Gel auf 90% geschätzt wurde. Danach wurde der nun überflüssige 6xHis-Tag mit Thrombin abgeschnitten. Klonierungsbedingt ergaben sich 3 zusätzliche Aminosäuren (GlySerHis) am N-terminus von rekombinantem Snapins nach dem Abschneiden des Expressionstags. Als nächster Reinigungsschritt wurde Ionenaustauschchromatographie eingesetzt. Das typische Reinigungsprofil ist in der Abb. 4 dargestellt.

A



B



**Abb. 4 Reinigung von rekombinantem Snapin.** A, Elutionsprofil von Snapin während Kationenaustauschchromatographie. Glockenförmige Kurve - Absorption bei 280 nm (linke Ordinate), obere geneigte Kurve – Salzgradient von 0 bis 1 M NaCl, untere geneigte Kurve – Leitfähigkeit (rechte Ordinate). Die Abszisse zeigt die Fraktionsnummern und die entsprechende Milliliterzahl. B, Analyse des Elutionsprofils mit Coomassie gefärbtem 15-%igem SDS-Gel. Pro Spur wurden 5  $\mu$ l Probe geladen. 0 - Molekulargewichtsstandard, 1 - Ausgangsmaterial: mit  $\text{Ni}^{2+}$ -Affinitätschromatographie gereinigtes Snapin, geschnitten mit Thrombin, 2 - Säulendurchfluß, 3 - Fraktion 22, 4 – Fraktion 23, 5 – Fraktion 24, 6 – Fraktion 25.

Während der Kationenaustauschchromatographie eluierte Snapin in einem einzelnen symmetrischen Peak, der abgeschnittene Expressionstag befand sich im Durchfluß. Die Reinheit des Proteins lag über 98%, (abgeschätzt von einem mit Coomassie gefärbten Gel).

Neben der monoS-Sepharose von Amersham Pharmacia Biotech wurde auch Carboxymethyl-Kationenaustauscher (CM-Säule von Poros) getestet. Snapin kann auch an diesen schwachen Kationenaustauscher binden und der Reihnheitsgrad nach dem Säulenlauf ist vergleichbar.

Nach der Reinigung wurde die Proteinkonzentration auf 2,5 mg/ml eingestellt. Höher konzentrierte Proteinproben waren metastabil und fielen spätestens nach einem Einfrier-Auftauen-Zyklus aus.

Leicht alkalische pH-Werte (zwischen 7, 8 und 8) und erhöhte Salzkonzentration (300 mM NaCl) stabilisierten das Protein. Zugabe von Detergenz (z. B 0,1%  $\beta$ -Octylglukosid) erlaubte es, Snapin auf die Konzentration von über 10 mg/ml zu bringen, ohne dass sich Präzipitate bildeten.

Denaturierende Bedingungen bei der Reinigung können unter Umständen zu einem komplett oder teilweise denaturiertem Protein führen. Allerdings haben CD-Studien und MALLS-Analyse (s. Abschnitte 3.4.2 bzw. 3.4.4) gezeigt, dass auf diese Weise gereinigtes rekombinantes Snapin einen hohen Anteil an  $\alpha$ -helikalen Strukturen aufweist und zu Protein-Protein-Interaktionen fähig ist, da es als Dimer vorliegt.

Die Reinigung von GST-Snapin verlief nach dem Standardprotokoll für GST-Fusionsproteine (s. Material und Methoden). Das GST-tag verleiht dem Snapin erhöhte Löslichkeit und verhindert die Präzipitation. Der Nachteil dieses Fusionsproteins ist, dass einige C-terminale Abbruchprodukte bei der Expression trotz niedriger Induktionstemperatur und proteasedeffizienten *E. coli* Stammes entstehen. Diese Abbau- oder Abbruchprodukte zeigen ein ähnliches chromatographisches Verhalten in allen Reinigungsschritten wie das komplette GST-Snapin-Fusionsprotein und konnten nicht vollständig von ihm abgetrennt werden. Deshalb wurde GST-Snapin nur für Interaktionsstudien mit Proteinen aus Rattenhirnextrakten benutzt. Für alle weiteren Untersuchungen wie CD-Spektroskopie, MALLS, Kristallisation wurde über die  $\text{Ni}^{2+}$ -Affinitätschromatographie und Kationenaustauschchromatographie gereinigtes Snapin (so wie es auf der Abb. 4 zu sehen ist) benutzt.

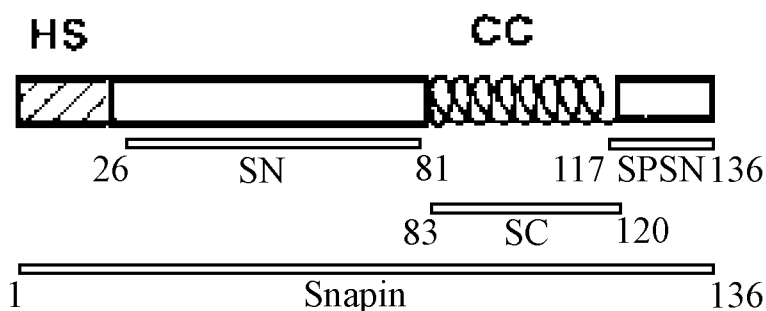
Die Reinigung der phosphomimetischen Mutante Snapin S50D als 6xHis- und GST-Fusionsprotein verlief unter den gleichen Bedingungen und mit ähnlicher Ausbeute. Allerdings musste die Konzentration des tagfreien Proteins weiter verringert werden, damit es nicht aggregierte. Der GST-Tag erhöhte die Löslichkeit der phosphomimetischen Mutante beträchtlich.

### 3.2 Antikörper gegen Snapin und Snapinfragmente

In dem Artikel von Ilardi *et al.*, 1999, in dem Snapin zum ersten mal beschrieben wurde, untersuchten die Autoren auch die Domänenstruktur von Snapin (s. Abb. 5). Laut ihrer Darstellung beinhaltet Snapin eine N-terminale hydrophobe Sequenz, die als eine Transmembrandomäne interpretiert wurde, weiterhin eine Region, die zur Beteiligung an Coiled-coil-Interaktionen fähig ist, und direkt an diese anschließend ein Fragment, das für die Interaktion mit SNAP-25 verantwortlich ist. Basierend auf diesen Daten wurden vier verschiedene Snapinfragmente zum Immunisieren von Kaninchen eingesetzt :

1. **SN** (Ala26-Tyr81) beinhaltet das Fragment zwischen der hydrophoben Region und der Coiled-Coil-Domäne;
2. **SPSN** (Thr117-Lys136) ist die putative SNAP25-Bindungsstelle
3. **SC** (Lys83-Arg120) entspricht der Coiled-coil-Domäne, die für andere Proteininteraktionen außer der mit SNAP-25 verantwortlich sein könnte.
4. **Snapin** entspricht dem Protein in voller Länge.

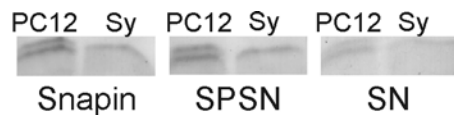
Die Korrelation zwischen diesen Antigenen und der beschriebenen Domänenstruktur von Snapin ist auf der Abb. 5 dargestellt.



**Abb.5 Domänenstruktur von Snapin und als Antigene benutzte Fragmente** (verändert nach Ilardi *et al.*, 1999). HS, hydrophobe Sequenz; CC, putative Coiled-coil-Domäne. Snapin, SN, SC, SPSN sind Antigenbezeichnungen.

Das Serum wurde nach jeder Abnahme (alle 6 Wochen) zuerst auf der LP2-Fraktion (angereicherte synaptische Vesikel) aus Rattenhirn im Immunoblot getestet. Später wurde die LP2-Fraktion durch Synaptosomen ersetzt, weil keine spezifische Anreicherung von Snapin in dieser Fraktion zu finden war (s. Abschnitt 3.3). Zusätzlich wurden die Antikörper auf PC12-

Zellysaten getestet, da diese Zelllinie ein höheres Expressionsniveau von endogenem Snapin aufweist. Das SC-Fragment erwies sich als wenig immunogen und rief in 2 getesteten Kaninchen auch nach mehrmals wiederholten Immunisierungen kaum eine Immunantwort hervor. Die restlichen drei Antiseren erkannten rekombinantes Snapin und eine Bande in der gleichen Größe im nativen Material. Das SN-Serum hatte einen deutlich niedrigeren Titer als das Snapin- und das SPSN-Serum (s. Abb. 6).

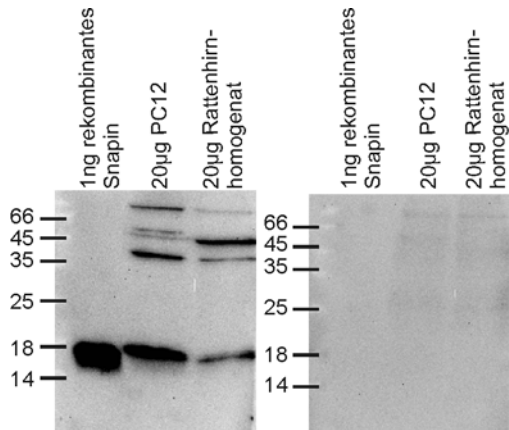


**Abb.6 Immunoblot mit drei verschiedenen Snapin-Antisera.** 30  $\mu$ g PC12-Zellysat (PC12) oder Synaptosomen (Sy) wurden pro Spur auf ein 15%iges SDS-Gel aufgetragen. Die Immunodetektion erfolgte bei der 1:300fachen Verdünnung des jeweiligen Serums (Snapin, SPSN, SN (s. Abb. 5). Die Nachweisreaktion wurde mit der alkalischen Phosphatase durchgeführt. Die Entwicklungszeit betrug 20 min.

Alle Antiseren detektieren eine Bande von der richtigen Größe in Synaptosomen und eine Doppelbande in PC12-Zellen. Diese Doppelbande konnte nur dann deutlich aufgelöst werden, wenn die Nachweisreaktion mit der alkalischen Phosphatase erfolgte. Zur Verstärkung des Signals wurden später HRP-gekoppelte sekundäre Antikörper eingesetzt. Bei diesem Detektionsverfahren ist die Doppelbande nur bedingt sichtbar.

Das SPSN-Serum erkennt noch zusätzliche Banden von einem höheren Molekulargewicht als Snapin. Alle immunreaktiven Banden konnten durch Vorinkubation des Serums mit dem Antigen (SPSN-Peptid) eliminiert werden (s. Abb. 7).

In allen weiteren Experimenten wurde das SPSN-Serum für Immunodetektion von Snapin eingesetzt, für Immunopräzipitationen wurde das affinitätsgereinigte Snapin-Serum benutzt.

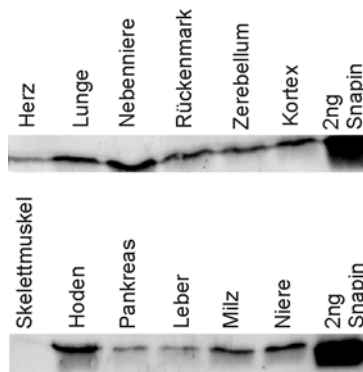


**Abb. 7** **Kompetitionsexperiment mit dem SPSN-Serum und seinem Antigen.** Links, das affinitätsgereinigte SPSN-Antiserum erkennt natives und rekombinantes Snapin. Rechts, das Signal auf dem Immunoblot kann durch Zugabe von löslichem Antigen eliminiert werden.

### 3.3 Gewebeverteilung und subzelluläre Verteilung von Snapin

Mit den nun zur Verfügung stehenden Antikörpern konnte die Verteilung von Snapin im Organismus und in der Zelle ausführlich charakterisiert werden. Die Entdeckung, dass mit dem Snapin-Antikörper auch eine Immunreaktivität in der richtigen Größe in PC12-Zellen zu finden war, ließ die Frage nach der Gewebeverteilung erneut aufkommen, obwohl Iardi und Kollegen Snapin bereits als hirnspezifisches Protein beschrieben hatten.

Snapin erwies sich als ubiquitäres Protein ohne eine spezifische Anreicherung im Hirn (s. Abb.8). Außerdem wurden bei der Datenbanksuche viele zu Snapin homologe Sequenzen gefunden, die als EST aus nicht neuronalem Gewebe (z.B. Lunge, Herz) kloniert worden sind. Auch Buxton *et al.*, 2003 konnten sowohl bei *M. musculus* als auch bei *R. norvegicus* Snapin in mehreren Geweben detektieren. Wie sich aus dem Vergleich der Bandenstärke von rekombinantem (2 ng) und nativem Snapins (10 µg Gesamtprotein) auf der Abb.8 ergibt, scheint das Expressionsniveau von Snapin grundsätzlich niedrig zu sein und unter 0.001 % des Gesamtproteins zu liegen. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass der Antikörper rekombinantes und natives Snapin unterschiedlich gut erkennt oder dass Snapin in der Zelle zusätzlich noch in hochmolekularen oder detergentunlöslichen Proteinkomplexen vorliegt und sich deshalb der Detektion durch Immunoblotting entzieht.



**Abb. 8 Gewebeverteilung von Snapin.** Pro Spur wurden 10  $\mu$ g Gesamtprotein eines Gewebehomogenats aufgetragen. Die jeweils letzten Spuren zeigen 2 ng rekombinantes Snapin als Referenz.

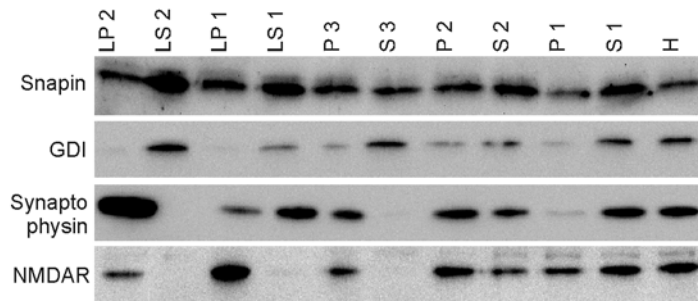
Als nächstes wurde die subzelluläre Verteilung von Snapin im Rattenhirnhomogenat untersucht. Die subzelluläre Fraktionierung nach Huttner *et al.*, 1983 ergibt durch differentielle Zentrifugation folgende wichtige Fraktionen (s. Abb.9):

H – Rattenhirnhomogenat, S1 und P1 – postnuklearer Überstand (S1) mit dem dazugehörigen Pellet (P1), P2 – angereicherte Synaptosomen, LS1 – nach der osmotischen Lyse von Synaptosomen erhaltener Überstand, LP1 – Synaptosomenmembranpellet, LS2 – Synaptosomenzytosol, LP2 – angereicherte synaptische Vesikel, S3 – Zytosol, P3 – Mikrosomenfraktion.

Ilardi und seine Kollegen fanden Snapin ausschließlich auf synaptischen Vesikeln. Unsere subzelluläre Verteilung ergab, dass sich Snapin, im Gegensatz zu Synaptophysin als Markerprotein für synaptische Vesikel, auch auf lösliche Fraktionen verteilt. Auch die Fraktion S3 zeigt eine deutliche Snapinbande, obwohl sie keine Membranen mehr enthält. Dies ist aus der Abwesenheit von NMDAR und Synaptophysin ersichtlich.

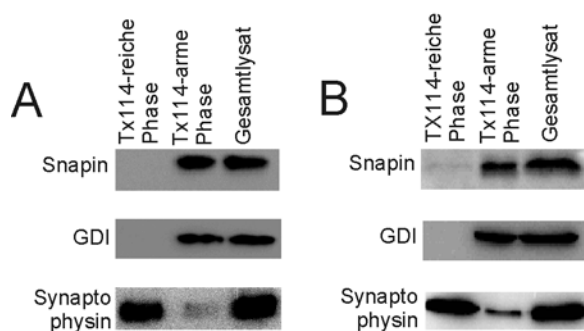
Diese Ergebnisse widersprechen der Behauptung von Ilardi *et al.*, 1999, dass Snapin ein Membranprotein ist. Zur Klärung dieser Frage wurden noch zwei weitere unabhängige Methoden außer der subzellulären Verteilung von Rattenhirnhomogenaten herangezogen: TritonX-114-Verteilung und computergestützte Analyse der Aminosäuresequenz von Snapin.





**Abb. 9 Subzelluläre Verteilung von Snapin.** 10 µg pro Spur subzellulärer Fraktionen (H-Homogenat, S – lösliche Fraktionen, P – angereicherte Membranfraktionen, für Details s. Material und Methoden) wurden mit Antikörpern gegen Snapin, gegen einen zytosolischen Marker (GDI), gegen einen Marker für synaptische Vesikel (Synapto physin) und gegen einen Plasmamembranmarker (NMDAR) analysiert.

1981 beschrieb Bordier eine einfache Methode, die es erlaubt lösliche Proteine von Membranproteinen zu trennen. Sie basiert auf der Eigenschaft von TritonX-114-Lösungen, oberhalb des Detergenzwolkenpunkts, der nur bei 20°C liegt, zwei Phasen zu bilden: eine Mizellenphase und eine detergenzarme Phase. In TritonX-114-Zellysaten verteilen sich Proteine dementsprechend: lösliche Membranproteine bleiben in der detergenzarmen Phase und hydrophobe Membranproteine kondensieren zusammen mit dem Detergenz. Abb. 10 zeigt die TritonX-114-Verteilung von Snapin im Vergleich mit einem zytosolischen Protein und einem Membranprotein.



**Abb.10 TritonX-114-Verteilung von Snapin in PC12-Lysaten (A) und Rattenghirnlysaten (B).** Immunoblot mit 10 µg Gesamtprotein pro Spur zeigt, dass Snapin sich in der TritonX-114-Verteilung wie ein zytosolisches Protein (Koverteilung mit GDI) verhält.

Während das Membranprotein Synaptophysin fast ausschließlich in der detergentenreichen Phase zu finden ist, zeigt Snapin genau so wie das zytosolische Protein GDI eine Anreicherung in der mizellenarmen Phase.

Alle getesteten Programme, die Transmembrandomänen anhand der Aminosäuresequenz vorhersagen, konnten keine putative Transmembrandomäne identifizieren. Und nicht zuletzt weist die Stabilität von rekombinantem Snapin auch in detergentenfreien Lösungen darauf hin, dass dieses Protein keine Transmembrandomäne besitzt. Allerdings zeigt eine erhöhte Löslichkeit von Snapin in 0,1 %  $\beta$ -Octylglukosid, dass dieses Protein hydrophobe Bereiche besitzt, die Aggregation verursachen können.

### **3.4 Untersuchungen zur Struktur von Snapin: von der Primärstruktur zu Kristallen**

#### **3.4.1 Primäre Struktur: Konservierung von Snapin im Tierreich**

Snapin wurde von Ilardi und Kollegen aus *M. musculus* kloniert. Eine Suche nach homologen Sequenzen in Nukleotid- und Proteindatenbanken ergab eine hohe Konservierung von Snapin unter Säugern. Die Snapin-Sequenzhomologie zwischen z.B. *M. musculus* und einem der einfachsten Chordatiere *C. intestinalis* beträgt 72% über einen zentralen Abschnitt von 100 Aminosäuren bei einer Gesamtlänge des Proteins von 136 Aminosäuren. Bis jetzt (Stand 08.2004) wurde Snapin in *H. sapiens*, *R. norvegicus*, *M. musculus*, *B. taurus* und *S. scrofa* gefunden. Die Sequenzkonservierung auf der Aminosäureebene liegt bei Säugern bei fast 100 %. Auch unter den Chordatieren ist sie sehr hoch: (s. Abb. 11).

Bemerkenswerterweise ist das der Sequenzabschnitt zwischen Aminosäuren 117 und 136, der für elektrophysiologische Effekte von Snapin und Bindung an SNAP-25 verantwortlich sein soll (Ilardi *et al.*, 1999), zwischen den aus Säugern stammenden Sequenzen und Snapin-Homolog aus *X. laevis* nicht konserviert ist. Auch bei Fischen (Sequenz von *D. rerio*) ist hier die Konservierung deutlich niedriger als im zentralen Bereich.

Außerdem konnten Snapin-ähnliche Sequenzen in *D. melanogaster*, *A. mellifera* und *C. elegans* gefunden werden. Diese Sequenzen zeigen eine signifikante Homologie zu der Konsensus-Sequenz von Chordatieren (s. Abb 12).

Kürzlich wurde auch im Pflanzenreich eine Sequenz gefunden, die eine signifikante Homologie zu Snapin aufweist (hypothetisches Protein von *A. thaliana* (Datenbanknummer YUP8H12R.31) mit 49 % Homologie über 99 Aminosäuren).

RN	1	-----MAAAGSAAVSGAGTPVAG--PTGRDLFAEGLLEFLRPAVQQLDShVHA
MM	1	-----MAAAGSAAVSGAGTPVAG--PTGRDLFAEGLLEFLRPAVQQLDShVHA
BT	1	-----MAGAGSAAVSGAGTPVAG--PAGRDLFAEGLLEFLRPAVQQLDShVHA
SS	1	-----MAGVGSAAVSGAGTPVAG--PAGRDLFAEGLLEFLRPAVQQLDShVHA
HS	1	-----MAGAGSAAVSGAGTPVAG--PTGRDLFAEGLLEFLRPAVQQLDShVHA
XL	1	-----MAVS-----PGRDVFAEGLLELLKPAVQQLDShVHA
DR	1	LKRTAPCGRLLWSKIAESSQRSVVKMAALAVVETPSGKDALAEGLLDLLRPAVQQLDLHVHS
CI	1	-----SARADSNTDHNTIDGNETASGICGVTKPVVQRIDNQVEA
Kons	1	maaagsaavsgagtpvag ptgrdlfAeGllEflrPaVQqLDshVha
RN	47	VRESQVELREQIDNLATELCRINEDQKVALDLDPYVKKLLNARRRVVLVNNILQNAQ
MM	47	VRESQVELREQIDNLATELCRINEDQKVALDLDPYVKKLLNARRRVVLVNNILQNAQ
BT	47	VRESQVELREQIDNLATELCRINEDQKVALDLDPYVKKLLNARRRVVLVNNILQNA-
SS	47	VRESQVELREQSDNLATELCRINEDQKVALDLDPYVKKLLNARRRVVLVNNILQNAQ
HS	47	VRESQVELREQIDNLATELCRINEDQKVALDLDPYVKKLLNARRRVVLVNNILQNAQ
XL	32	VRESQVDLREHIDNLASELCKINEDQKVALDLDPYVKKLLNARRRVVLVNNILQNAQ
DR	61	VRESQVELREHIDNLASELCRINEHQKVALDLDPYVKKLLNARRRVVLVNNILQNAQ
CI	40	VRKSQLELRVKIEEVSSDLQRISEQQPVNVNFDPYTRRLINSKRRVTLINNIIQNVH
Kons	61	VReSQveLReqidnlateLcrInEdQkValdldPYvkkLlNarRRVvLvNNIlQNaq
RN	104	ERLRLNHSVAKETARRRAMLDSG-VYPPGSPSK----- 136
MM	104	ERLRLNHSVAKETARRRAMLDSG-VYPPGSPSK----- 136
BT	103	ERLRLNHSVAKETARRRAMLDSG-VYPSGSPSK----- 135
SS	104	ERLRLNHSVAKETARRRAMLDSG-VYPPGSPS----- 135
HS	104	ERLRLNHSVAKETARRRAMLDSG-IYPPGSPGK----- 136
XL	89	ERLRLNHSVAKETARRRAMLDSGSHHPPASPnk----- 122
DR	118	ERLRLNHNVAKETARRKIMLEASGAFIPRSPSKP----- 152
CI	97	DRLERLQRSAEQETNRVKTIIVQAESALINVTQVVTSDPs 135
Kons	121	eRL Rrlnhsvaketarrrramldsg vyppgspsk

**Abb. 11 Sequenzvergleich von aus Chordatieren stammenden Sequenzen mit Homologien zu Snapin aus *R. norvegicus*.** Das Sequenzalignment wurde mit dem ClustalW-Programm (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) aufgestellt. RN – *Rattus norvegicus*, MM – *Mus musculus*, BT - *Bos taurus*, SS – *Sus scrofa*, HS - *Homo sapiens*, XL – *Xenopus laevis*, DR – *Dario rerio*, CI – *Ciona intestinalis*. Kons – von ClustalW berechnete Konsensussequenz. Identische Aminosäuren sind schwarz, konservierte Aminosäuren sind grau unterlegt. Die Abbildung wurde mit Boxshade erstellt.

AM	1	MDVDTASDNTSIDDKIDDFCENPTRDALTEGLMSLLKPTVDQLDERIRATRICOIELKQR	
DM	1	MDS--STVTSLEENTENFCINPTRDILAEGITNLFKPTLERLDERVASTIQLOAELRGO	
Chord	1	MAAAG---SAAVSGAGTPVAGPTGRDLFAEGLLEFLRPAVQQLDSHVHAVRESQVELREQ	
CE	1	-----MSSTAGGEVSINS-----GDLLLGLTSTSTITKLEQQIRATQISQKKLNSD	
Kons	1	md d s vtsidga d fctnptrdilaegll llkptvdqLderiratriscieLr q	
AM	61	IESLTEELQRINEALQCPLTDSYVKKLINAKHKITIVSNILOSTQER-----LNKI	
DM	59	LDALAAQLRDIIEKAQSQIPEFADKVKELLNKHKVTVISNVLVTSQER-----LTGL	
Chord	58	IDNLATELCRINEDQKVALDLDPYVKKLLNARRRVVLVNNILQNAQVRESQVELREQ	
CE	46	CETMAEYLRDIS-EYKQPVLLPYVGKLNDSITRVNNTHTKLDLLER-----LTKL	
Kons	61	ieslaeeLr ineaqkqpleldpyVkkLlnakhkvtivsniLqstqeR	Ltkl
AM	113	HQAVEKNTAKRKALLDHSSSYGNTSNIINKEEVEIEQETNISKEHE	158
DM	111	HKLIEKEQRRRQALLDSALS-----TNIS-----	134
Chord	115	IDNLATELCRINEDQKVALDLDPYVKKLLNARRRVVLVNNILQNAQ	160
CE	97	QRQIARETYKKKNSIKEQEP-----PVQPEN-	122
Kons	121	hkn veke rkrnalld als	l i tnis n

**Abb. 12 Sequenzvergleich von tierischen Sequenzen mit Homologien zu Snapin aus *R. norvegicus*.** AM - *Apis mellifera*, DM – *Drosophila melanogaster*, Chord – Konsensussequenz für Chordatiere aus der Abb. 8, CE - *Caenorhabditis elegans*, Kons - Kons – von ClustalW berechnete Konsensussequenz. Identische Aminosäuren sind schwarz, konservierte Aminosäuren sind grau unterlegt. Die Abbildung wurde mit Boxshade erstellt.

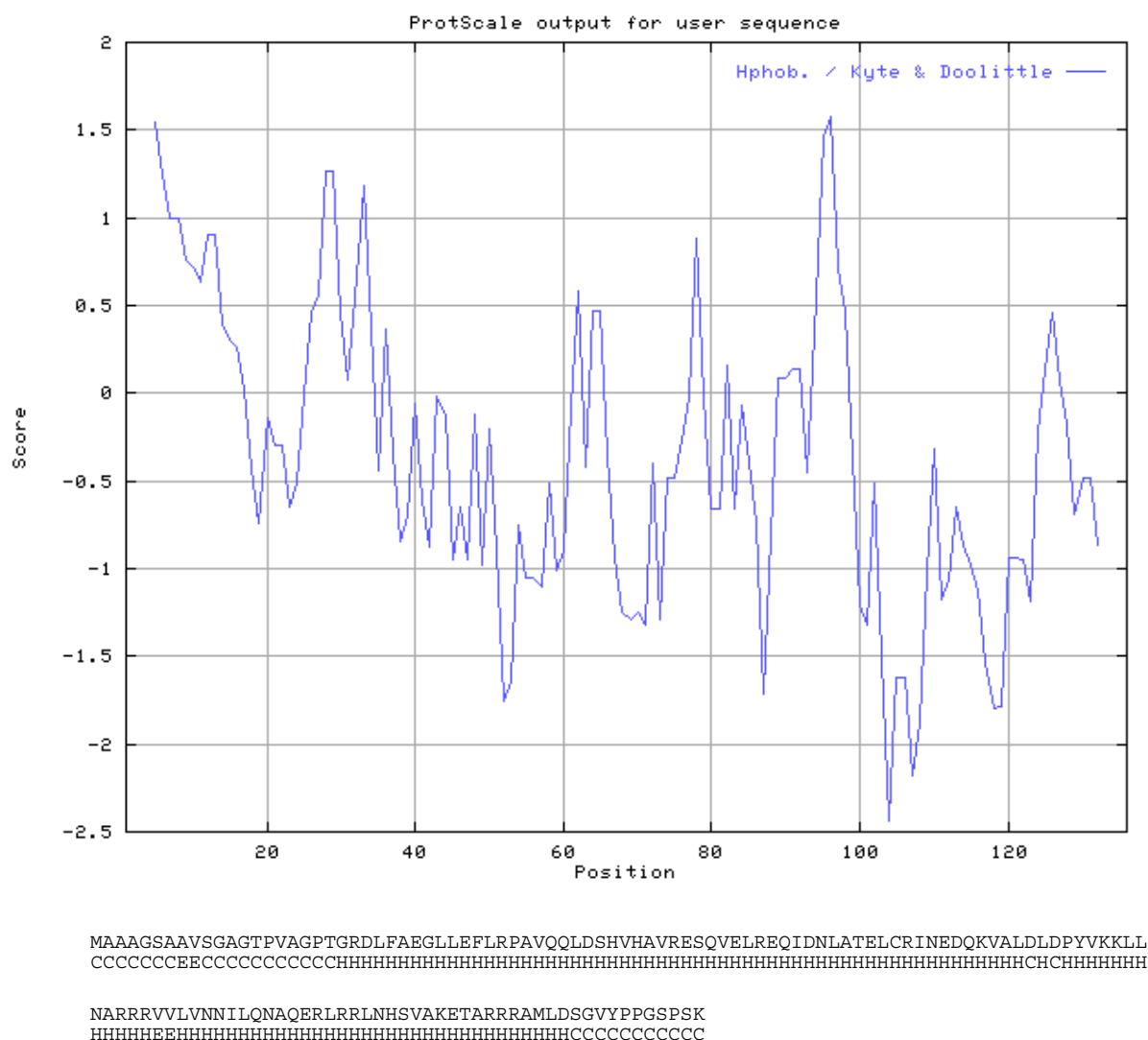
21	GRDLFAEGLLEFLRPAVQQLDSHVHAVRESQVELREQIDNLATELCRINEDQKVALDLDP	
	G + A GL L ++ DS SQ EL +D L EL ++ E+ + +	
33	GGEAMARGLSAMLESVIKDFDSKALDTLNSQDELSGSLDRLVQELDQLLENAPLPFIVQ-	
81	YVKKLLNARRRVVLVNNILQNAQERLRRLNHSVAKETAR	119
	+ ++ + ++RV +N +L++ Q R+ ++H ++ T +	
92	HASRISSVKQRVSSLNVLKSVQRRIDNIDHMLSANTTQ	130

**Abb. 13 Sequenzalignment zwischen Snapin von *R. norvegicus* (obere Sequenz) und einem Protein von *A. thaliana* (untere Sequenz).** Die mittlere Zeile stellt konservierte Aminosäuren dar. Mit entsprechenden Buchstaben werden identische, mit „+“ ähnliche Aminosäuren dargestellt. Die Zahlen indizieren die Position der ersten und letzten Aminosäure aus dem Alignment in der Originalsequenz.

### 3.4.2 Sekundäre Struktur: computergestützte Analyse der Aminosäuresequenz von Snapin und Studien mittels CD-Spektroskopie

Arbeit mit rekombinantem Protein und Auswertung von spektroskopischen und chromatographischen Daten bedarf oft genauer Kenntnisse seiner biophysikalischen Eigenschaften. In diesem Abschnitt wird eine auf der Aminosäuresequenz basierende Charakterisierung von Snapin beschrieben.

Rekombinantes Snapin ist ein verhältnismäßig kleines Protein von 139 Aminosäuren und 15,2 kDa Molekulargewicht. Die ersten 3 Aminosäuren (Gly-Ser-His) sind klonierungsbedingt zur nativen Sequenz hinzugekommen. Das Protein ist stark basisch ( $pI=9,4$ ) und ist deshalb bei physiologischen pH-Werten mehrfach positiv geladen. Es besitzt wenige aromatische Aminosäuren und sein Extinktionskoeffizient beträgt  $3,2 \text{ l}/(\text{mM}\cdot\text{cm})$ . Das Hydrophobizitätsprofil nach Kyte und Doolittle identifiziert am N-Terminus eine durchgehend hydrophobe Sequenz von etwa 18 Aminosäuren (s. Abb. 14). Interessanterweise führt die bakterielle Expression von einem Snapinfragment mit deletierten 20 N-terminalen Aminosäuren zu einem vollkommen unlöslichen Protein. Alle benutzten Programme zur Vorhersage der Sekundärstruktur anhand der Aminosäuresequenz finden in Snapin fast durchgehend  $\alpha$ -helikale Strukturen mit der Fähigkeit, Coiled-coil-Interaktionen einzugehen. Zum Beispiel besitzt Snapin laut der Strukturvorhersage durch das Programm PredictProtein (<http://cubic.bioc.columbia.edu/predictprotein/>) einen hohen Gehalt an  $\alpha$ -Helices von 80%, darunter eine Coiled-coil-Domäne von Leu85 bis Ser126. Allerdings konnten keine für Coiled-coil-Domänen typischen Heptaden-Wiederholung mit hydrophoben Aminosäuren in den Positionen *a* und *d* gefunden werden.



**Abb. 14 Computergestützte Analyse der Aminosäuresequenz von Snapin aus *R. norvegicus*.** A, Hydrophobizitätsplot nach Kyte und Doolittle, erstellt mit der Fenstergröße von 9 Aminosäuren. Werte über 0 bedeuten hydrophobe Bereiche, Werte unter 0 bedeuten hydrophile Bereiche. Unter dem Plot befindet sich die Aminosäuresequenz von Snapin mit der dazugehörigen Sekundärstrukturvorhersage. H – Helix, C – „random coil“, ungefalteter Bereich, E –  $\beta$ -Sheet.

Die Reinigung von rekombinantem Snapin fand unter denaturierenden Bedingungen in 6 M Harnstoff statt. Anschließend wurde Harnstoff durch Dialyse und danach während der Ionenaustauschchromatographie komplett entfernt. Um den Faltungszustand des gereinigten Proteins zu überprüfen, wurde CD-Spektroskopie durchgeführt. Die  $\alpha$ -Helizität eines Peptids kann mit CD-Spektroskopie im nahen UV-Bereich gemessen werden, da  $\alpha$ -helikale Bereiche bei 208 nm und 222 nm negative Absorptionsmaxima von zirkulär polarisiertem Licht aufweisen. Das CD-Spektrum von rekombinantem Snapin ist in der Abb. 12 dargestellt. Snapin zeigt ein für Proteine mit  $\alpha$ -helikalen Bereichen typisches Spektrum (Abb. 10A). Aus diesen Daten lässt sich nach der Formel (Chen *et al.*, 1974)

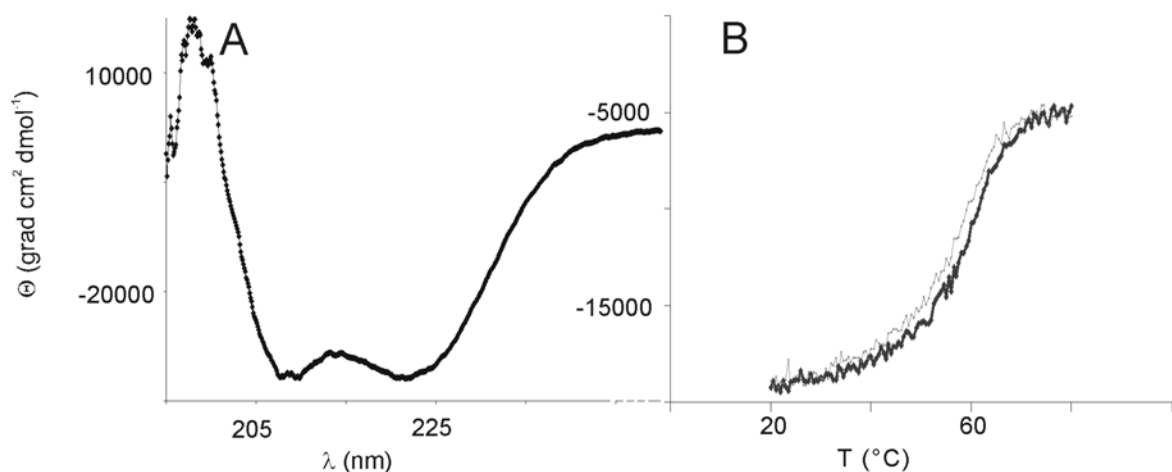
$$[\Theta_{222}]_{\text{snapin}} / [\Theta_{222}]_{\text{max}} = [\Theta_{222}]_{\text{snapin}} / (36300 * (1 - 2,57 / N_{\text{as}}))$$

der Gesamtgehalt an  $\alpha$ -Helix berechnen, mit

$[\Theta_{222}]_{\text{snapin}}$  - molare auf Aminosäurezahl normierte Elliptizität von Snapin bei 222 nm

$[\Theta_{222}]_{\text{max}}$  - molare auf Aminosäurezahl normierte Elliptizität eines zu 100%  $\alpha$ -helikalen Proteins mit Aminosäurezahl  $N_{\text{as}}$ . Somit beläuft sich der Gesamtgehalt an  $\alpha$ -Helix von rekombinantem Snapin auf 64%.

Der neuronale und endosomale SNARE-Komplexe, die auch durch  $\alpha$ -helikale Strukturen gebildet werden, zeigen eine enorme Stabilität (Schmelztemperatur über 80°C) und eine Hysterese im Faltung-Rückfaltungs-Zyklus (Fasshauer *et al.*, 2002). Unter diesem Aspekt wurde die Stabilität von Snapin mit CD-Spektroskopie untersucht. Das Protein wurde thermal denaturiert und anschließend wieder abgekühlt, um die Rückfaltung zu erlauben. Als Äquivalent des Faltungszustandes wurde die Elliptizität bei 222 nm mit einem CD-Spektrometer gemessen. Die  $\alpha$ -helikalen Bereiche können sich nach der thermalen Entfaltung komplett neu bilden. Die Schmelzkurve ist mit der Rückfaltungskurve fast identisch. Sie zeigen beide eine Übergangstemperatur von 58°C, bei der 50% der  $\alpha$ -helikalen Bereiche entfaltet sind (s. Abb.15B).

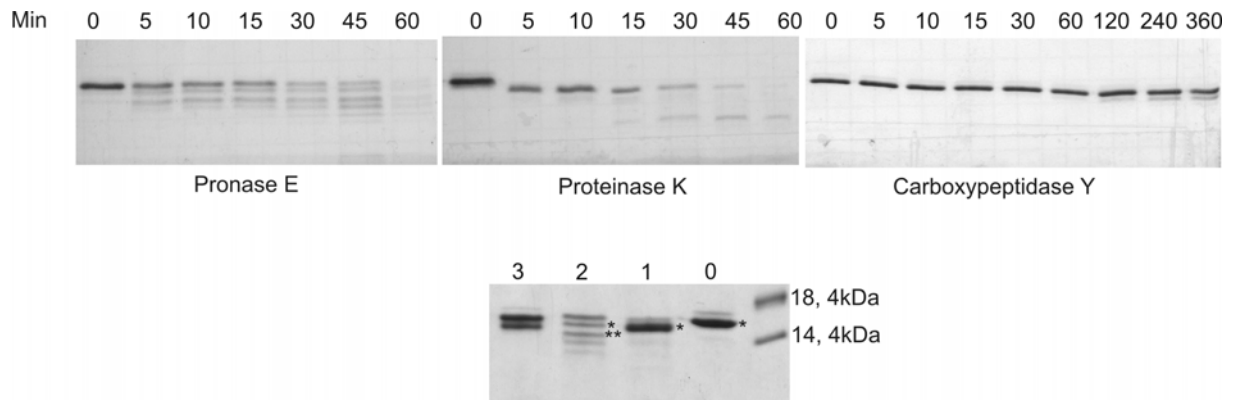


**Abb. 15 CD-Spektroskopie mit rekombinantem Snapin.** A, CD-Spektrum im weiten UV-Bereich. B, thermale Schmelz- (schwarz) und Rückfaltungskurve (grau).  $\Theta$  – molare auf Aminosäurezahl normierte Elliptizität,  $\lambda$  – Wellenlänge, T – Temperatur.

Diese Daten zeigen, dass gereinigtes Snapin stabile  $\alpha$ -helikale Strukturen besitzt, die sich autonom falten können. Der Gesamtgehalt an  $\alpha$ -Helix liegt unter dem von den Computerprogrammen vorhergesagtem Wert von 80%. Möglicherweise werden zusätzliche  $\alpha$ -helikale Strukturen durch seine Bindungspartner induziert oder die bakterielle Expression und denaturierende Reinigungsbedingungen führten teilweise zu einer Proteinfaltung, die nicht mit der nativen Proteinfaltung komplett identisch ist.

### 3.4.3 Tertiäre Struktur: limitierte Proteolyse

Während eines proteolytischen Abbaus stellen ungefaltete, exponierte Bereiche bevorzugte Angriffsstellen für Proteasen dar. Deshalb wird limitierte Proteolyse zur Kartierung von gefalteten Domänen und Bindungsstellen benutzt. Zu diesem Zwecke werden relativ unspezifische Proteasen eingesetzt. Snapin wurde mit Pronase E, Proteinase K, Carboxypeptidase Y und Aminopeptidase M für indizierte Zeiten bei Protease zu Substrat Verhältnis zwischen 1:200 und 1:500 (Gewichtsteile) behandelt. Aminopeptidase M konnte Snapin auch nach einer längeren Zeit nicht proteolytisch abbauen. Auch für Carboxypeptidase Y war Snapin ein schlechtes Substrat. Proteinase K und Pronase E ergaben ein charakteristisches Bandenmuster wie in der Abb. 16 dargestellt.



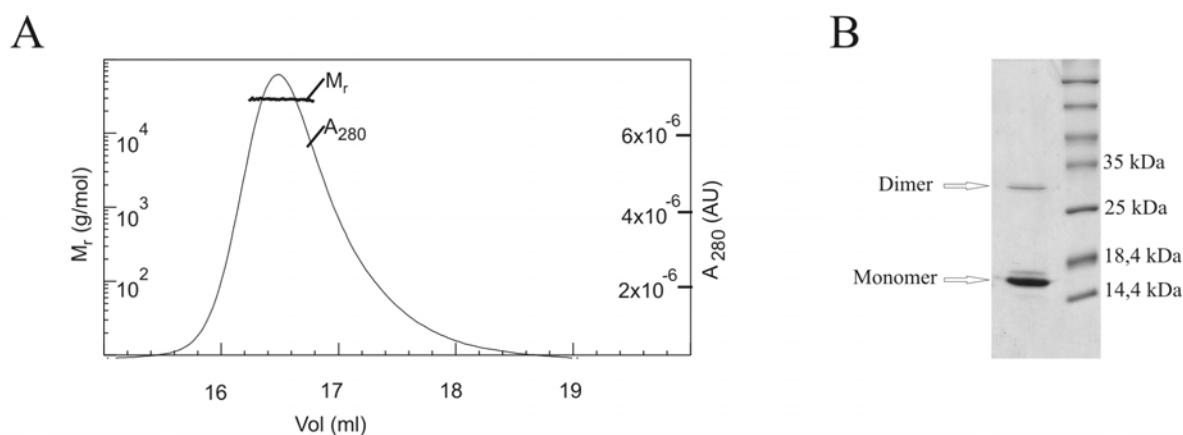
**Abb. 16 Limitierte Proteolyse von rekombinantem Snapin.** Snapin wurde mit Pronase E (im Gewichtsverhältnis 1:200), Proteinase K (1:500) und Carboxypeptidase Y (1:200) für angegebene Zeit behandelt. Der untere Teil der Abbildung zeigt den proteolytischen Abbau in Zusammenfassung: 0 – Snapin unverdaut, 1 – Verdau mit Proteinase K (1:500, 15 min), 2 – Verdau mit Pronase E (1:200, 40 min), 3 – Verdau mit Carboxypeptidase Y (1:200, 120 min). Mit ‚\*‘ sind Banden markiert, die zum N-terminalen Sequenzieren eingesetzt worden sind. Alle Abbildungen zeigen mit Coomassie gefärbte 15%ige SDS-Gele.



Mit Sternchen markierte Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten und N-terminal ansequenziert. Daraus ergab sich, dass Proteinase K Snapin zuerst zwischen Ser10 und Gly11 hydrolysiert. Pronase E spaltet das Protein zwischen Ala8 und Val9 und Pro15 und Val16. Der N-Terminus von nicht behandeltem Snapin wurde zu GSHMA bestimmt. Dies bedeutet, dass das rekombinante Protein nicht schon bereits vorher N-terminal abgebaut war. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß zumindest zwischen Ser10 und Val16 ein ungefalteter Bereich vorliegt. Das stimmt sehr gut mit der Vorhersage der Snapinstruktur überein. Anhand des Hydrophobizitätsprofils nach Kyte-Doolittle ist ersichtlich (Abb.14), dass der N-Terminus hoch hydrophob ist und deshalb nicht auf der Oberfläche exponiert und von Proteasen geschützt sein wird. Unterschiedliche Programme sagen fast durchgehende  $\alpha$ -helikale Struktur für Snapin voraus, die ihre größte Unterbrechung zwischen Ser10 und Leu24 hat. Im guten Einklang mit diesen biochemischen Daten zeigt die limitierte Proteolyse, dass dieser Aminosäureabschnitt die bevorzugte Angriffsstelle für Pronase E und Proteinase K darstellt.

#### **3.4.4 Quartäre Struktur: Dimerisierung von rekombinantem Snapin**

Coiled-coil-Domänen vermitteln oft Homo- und Heterooligomerisierung von Proteinen. Um den Oligomerisationszustand von rekombinantem Snapin zu überprüfen, wurde frisch gereinigtes Protein (s. Abb.4) mit Gelfiltration und anschließender MALLS analysiert. Snapin eluierte von der Säule in einem einzelnen symmetrischen Peak (s. Abb. 17A). Aus den Lichtstreuungsdaten ergab sich, dass Snapin bei der gegebenen Konzentration (60  $\mu$ M) ausschließlich als Dimer vorliegt. Das aus den MALLS-Daten berechnete Molekulargewicht betrug  $29 \pm 1,45$  kDa, während das theoretisch kalkulierte Molekulargewicht für ein Snapindimer bei 30,4 kDa liegt. Interessanterweise konnte eine Dimerisierung von rekombinantem Snapin auch im Gel beobachtet werden (s. Abb.17B). Bei einer längeren Lagerung (über 14 Tage) des Proteins bei 4°C oder bei Raumtemperatur ohne Zugabe von reduzierenden Agenzien (ursprünglich beinhaltet der Puffer, in dem Snapin gelagert wird, 1 mM DTT) entsteht eine zusätzliche Bande, die zwischen 25 und 35 kDa läuft. Wird diese Bande aus dem Gel ausgeschnitten und nach einem tryptischen Verdau in MALDI eingesetzt, zeigt sich, dass sie auch Snapin enthält. Allerdings wird das Peptid Glu49-Arg90, das in der Monomerbande leicht zu detektieren ist, in der Dimerbande nicht mehr gefunden. Dieses Peptid beinhaltet Cys66, das einzige Cystein von Snapin aus *R. norvegicus*. Daraus kann man schließen, dass zumindest diese Art von Dimerisierung über Crosslinking von Cysteinen stattfindet.



**Abb.17 Dimerisierung von Snapin.** A, Die glockenförmige Kurve stellt das Elutionsprofil von Snapin von der Gelfiltrationssäule (siehe rechte Ordinate) dar und die gerade Linie durch den Peak zeigt die Berechnung des Molekulargewichts des eluierenden Proteins (siehe linke Ordinate) aus den MALLS-Daten. B, SDS-resistente Dimerisierung von Snapin unter oxidierenden Bedingungen auf einem 15% SDS-Gel. Vergleiche Abb. 4, auf der Snapin direkt nach der Reinigung dargestellt ist.

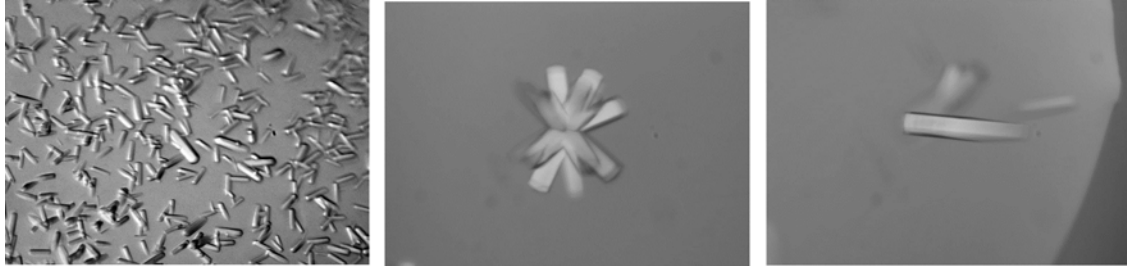
### 3.4.5 Snapinkristalle

Um detaillierte Information über die Struktur von Snapin zu bekommen, wurde eine kristallographische Untersuchung initiiert. Erste Kristallisationsversuche wurden mit kommerziellen „Incomplete Factorial Screens“ (Crystal Screens I und II von Hampton Research) bei 20°C und bei 4°C durchgeführt. Snapin wurde in einer Konzentration von 2 mg/ml, die schon an der Sättigungsgrenze liegt, in 10 mM HEPES pH=7,8, 300 mM NaCl, 1 mM DTT eingesetzt. Je nach Screen und Temperatur bildeten sich in 67% bis 86% Ansätze Präzipitate. Die ersten Mikrokristalle wurden nach ungefähr 2 Wochen unter der folgenden Reservoirbedingung beobachtet: 0,5 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1 M  $\text{Li}_2\text{SO}_4$ , 0,1 M Natriumcitrat pH=5,6, inkubiert bei 20°C. Die anfängliche Kristallisationsbedingung wurde durch die Variation der Temperatur, Salzkonzentration, des pH-Wertes und durch Zugabe unterschiedlicher Additive weiter verfeinert. Im Rasterscreen Ammoniumsulfatkonzentration gegen pH-Wert zeigte sich, dass Kristalle in einem Fenster von nur 0,2 pH-Einheiten unter eher niedrigen Salzkonzentrationen unterhalb von 0,6 M gebildet wurden. Die derzeit besten Reservoirbedingungen für die Kristallisation von Snapin sind:

0,4 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,1 M NaCitrat pH=5,0 (alternativ 0,5 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,1 M NaCitrat pH=5,1 oder 0,6 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,1 M NaCitrat pH=5,1-5,2), 20°C.

Die Anhebung der Proteinkonzentration von 2 auf 2,5 mg/ml wirkte sich günstig auf die Kristallgröße aus. Auf diese Weise entstandene Snapin-Kristalle sind auf der Abb. 18 zu

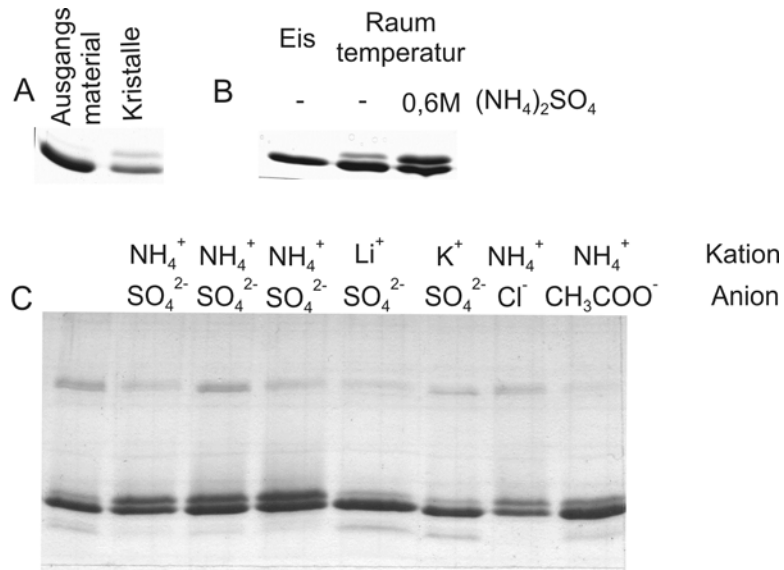
sehen. Kristalle erreichten ihre maximale Größe nach 2-3 Wochen und hatten die Form von hexagonalen Stäbchen.



**Abb.18 Kristalle aus rekombinantem Snapin**

Die größten Kristalle erreichten eine Länge bis zu 200  $\mu\text{m}$ , hatten scharfe Kanten, waren in Wasser stabil und verhielten sich stark doppelbrechend im Polarisationsmikroskop. Obwohl diese optische Aktivität eine anisotrope Materieverteilung anzeigt und damit möglicherweise eine systematische Molekülanordnung im Kristall andeutet, war die beobachtete Beugungskraft der Kristalle nur schwach. Auch an einer starken Synchrotronquelle konnten nur Reflexe bis ca. 5,5  $\text{\AA}$  Auflösung beobachtet werden. Die Auswertung einzelner Beugungsbilder deutet auf eine trigonale oder hexagonale Raumgruppe mit ungefähren Zellkonstanten von 100 $\text{\AA}$ , 100 $\text{\AA}$ , 171 $\text{\AA}$ , 90°, 90°, 120° hin. Diese Indizierung ist gut mit der äußeren hexagonalen Form der Kristalle vereinbar. Nimmt man die höchstmögliche Symmetrie (hexagonal P622) und normale Packungsdichte an, so erwartet man ca. 50 kDa pro asymmetrische Einheit, was 3 bis 4 Snapin-Molekülen entspricht.

Zum Nachweis, dass diese Kristalle wirklich aus Snapin bestanden, wurden 10-12 davon aus der Mutterlauge herausgenommen, mehrmals in Reservoirlösung gewaschen, in Laemmli-Probenpuffer aufgenommen und auf ein SDS-Gel aufgetragen (s. Abb.19).



**Abb.19 Modifikation von Snapin durch Ammoniumsulfat.** A, SDS-Gel zum Vergleich zwischen zur Kristallisation eingesetztem Snapin (Ausgangsmaterial) und Material aus den entstandenen Kristallen. B, Induktion einer Modifikation in Snapin, die sich durch eine zusätzlichen Bande manifestiert, durch Zugabe von Ammoniumsulfat in Lösung. C, Wirkung von verschiedenen Anionen und Kationen auf die Entstehung einer zusätzlichen Bande. Snapin wurde im Verhältnis 2:1 mit entsprechender Salzlösung vermischt und 3 Wochen bei Raumtemperatur inkubiert.

Der direkte Vergleich zwischen dem Ausgangsmaterial und den Kristallen zeigte, dass die Kristalle anscheinend aus zwei verschiedenen Proteinspezies bestanden, während nur eine Proteinbande in einer frischen Snapinpräparation. Diese zweite (obere) Bande konnte alleine durch Zugabe von Ammoniumsulfat induziert werden (Abb. 19B). Andere Sulfate wie z.B. Lithium und Kaliumsulfat hatten diese Wirkung nicht, andere Ammoniumsalze hatten diese Wirkung in abgeschwächter Form (s. Abb.19C). Wie aus der ersten Spur auf der Abb. 19C ersichtlich, kann diese zweite Bande auch ohne Salzzugabe nach einer längeren Inkubation bei Raumtemperatur entstehen. Zwei verschiedene Spezies im Kristall könnten eine Quelle von Unordnung und damit eine Ursache für die geringe Beugungskraft der Kristalle sein. Um diese zwei Proteinspezies zu identifizieren, wurden die Banden ausgeschnitten und entweder direkt oder nach einem tryptischen Verdau mit MALDI-MS charakterisiert. Durch den Vergleich mit Proteindatenbanken konnten beide Banden eindeutig Snapin aus *R. norvegicus* zugeordnet werden. Sie beinhalteten Snapin in voller Länge und keine weiteren Proteine (zumindest nicht in der nr-Datenbank des NCBI-Servers vorhandene, Stand 04.2003). MALD-MS Analysen von unverdaulichem Protein, das aus den Banden extrahiert worden war ergab ein Molekulargewicht von 15185 Da für die untere Bande und ein Molekulargewicht von 15285 Da für die obere Bande. Während das niedrige Molekulargewicht eindeutig dem

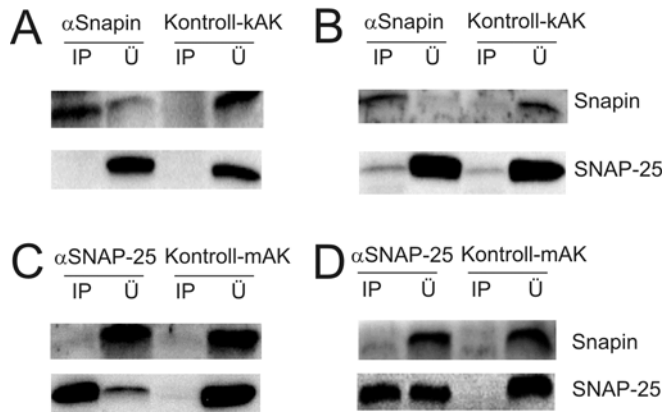
rekombinanten Snapin mit oxidierten Methioninen entspricht, sind die zusätzlichen 100 Da im Molekulargewicht der oberen Bande keiner bekannten Proteinmodifikation zuzuordnen. Die exakte chemische Identität der oberen Bande konnte daher auf diese Weise nicht geklärt werden.

### **3.5 Interaktion zwischen Snapin und SNARE-Proteinen**

Snapin wurde ursprünglich von Ilardi und seinen Kollegen (Ilardi *et. al*, 1999) als ein Protein beschrieben, das spezifisch an SNAP-25 aber nicht an SNAP-23 bindet und außerdem die Bindung des SNARE-Komplexes an Synaptotagmin verstärkt. Diese Interaktionen wurden zunächst nur phänomenologisch beschrieben. Eine genaue Charakterisierung und Klärung ihrer Mechanismen stand noch aus. Dies wurde zu einem der Hauptziele dieser Studie. Es standen gereinigte rekombinante Proteine und Rattenhirn- und PC12-Zellysate als Quelle für native Proteine und eine Reihe von gut etablierten Gleichgewichts- und Ungleichgewichtsmethoden zum Studium von Proteininteraktionen zur Verfügung.

#### **3.5.1 Immunopräzipitationen aus Lysaten von PC12 Zellen und Rattenhirnen**

Die Interaktionsstudien zwischen Snapin und den neuronalen SNARE-Proteinen wurden von Ilardi und seinen Kollegen entweder ausschließlich mit rekombinanten Proteinen (pull downs) oder mit den nativen SNARE-Proteinen aus dem Synaptosomenextrakt und beigemischten rekombinantem Snapin (Immunopräzipitationen) durchgeführt. Somit wurde die Existenz dieser Komplexe *in vivo* nicht endgültig bewiesen. In Vorversuchen hat sich gezeigt, dass das von mir hergestellte Snapin-Antiserum (s. Abschnitt 3.2) Snapin immunpräzipitieren kann. Das Serum wurde affinitätsgereinigt und zu Immunopräzipitationen von Snapin aus Lysaten von PC12-Zellen und Rattenhirnen eingesetzt. Durch den Einsatz eines Überschusses an Snapin-Antiserum und verlängerte Inkubationszeiten (über Nacht bei 4°C) konnte fast das gesamte Snapin immunopräzipitiert werden, was durch den Vergleich von an den Antikörper gebundenen und im Überstand verbliebenen Snapin auf der Abb. 20 zu sehen ist.

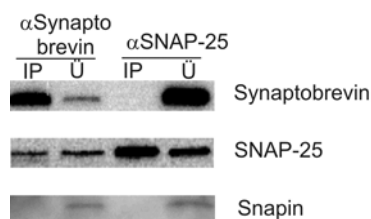


**Abb. 20 Interaktion zwischen Snapin und SNAP-25 analysiert durch Immunpräzipitationen aus Lysaten von PC12-Zellen und Rattenhirnhomogenaten.** A und B, Immunpräzipitationen mit affinitätsgereinigtem Snapin-Serum. C und D, Immunpräzipitationen mit monoklonalem  $\alpha$ SNAP-25 Antikörper. Immunpräzipitationen wurden mit Lysaten von PC12-Zellen (A und C) und Rattenhirnhomogenaten (B und D) durchgeführt. Alle Proben wurden auf gleiches Volumen gebracht und mit SDS-PAGE und Immunoblot analysiert. Ü – Überstand nach der Immunpräzipitation, IP – immunopräzipitiertes Material, Kontroll-kAK – Kontroll-Kaninchenserum ( $\alpha$ Doc), Kontroll-mAK – Kontroll-Ascides (monoklonaler Antikörper 7.2,  $\alpha$ Synaptophysin).

Obwohl Snapin komplett an den Antikörper gebunden wurde, konnte kein SNAP-25 koimmunopräzipitiert werden. Auch bei den Präzipitationen von SNAP-25 wurde kein Snapin in der an den Antikörper gebundenen Fraktion detektiert. Allerdings war es in diesem Falle nicht möglich, trotz eines deutlichen Antikörperüberschusses SNAP-25 komplett zu immunopräzipitieren. Diese Ergebnisse wurde in beiden Fällen mit Lysaten aus PC12-Zellen und Rattenhirn erhalten. Der eingesetzte monoklonale Antikörper 71.1 erkannte nur ein Pool von diesem extrem abundanten Protein (1% des Gesamtproteins im Hirn, Walch-Solimena *et al.*, 1995). Es wurden drei weitere polyklonale  $\alpha$ SNAP-25 Antikörper aus diesem Labor (Casanova, Ying und Yang) für Immunpräzipitationen eingesetzt. Aber auch in diesem Fall wurde keine Koimmunopräzipitation von Snapin beobachtet (Daten nicht gezeigt).

Es ist bekannt, daß der monoklonale Antikörper 71.1 freies SNAP-25 aber nicht SNAP-25 im ternären SNARE-Komplex erkennt (Xu *et al.*, 2000). Um die Möglichkeit auszuschließen, dass Snapin *in vivo* ausschließlich mit dem SNARE-Komplex interagiert und dass dies der Grund dafür ist, dass ich keine Koimmunopräzipitation mit freiem SNAP-25 fand, wurde der ternäre SNARE-Komplex mit dem monoklonalen  $\alpha$ Synaptobrevin-Antikörper 69.1 immunopräzipitiert, von dem bekannt ist, dass seine Bindung an Synaptobrevin keinen Einfluss auf die Formation des SNARE-Komplexes hat. In Abb. 18 ist dargestellt, dass auch in diesem

Fall kein Komplex zwischen Snapin und den SNARE-Proteinen detektiert werden konnte. Synaptobrevin konnte fast komplett an den Antikörper gebunden werden und ein Komplex mit SNAP-25 ist deutlich nachweisbar.



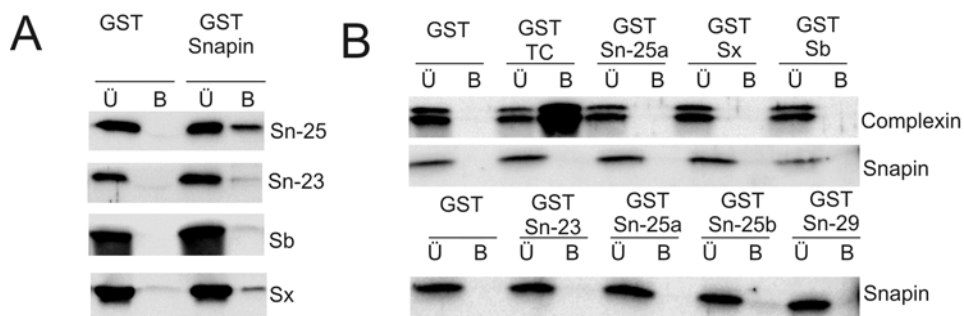
**Abb. 21 Interaktion zwischen Snapin und dem neuronalen SNARE-Komplex analysiert durch Immunopräzipitationen aus Lysaten von Rattenhirnhomogenaten.** Ü – Überstand nach der Immunopräzipitation, IP – immunopräzipitiertes Material.

Diese Ergebnisse zeigen, dass auch durch Immunopräzipitationen keine Assoziation von Snapin mit SNAP-25 oder mit dem neuronalen SNARE-Komplex weder im Hirn noch in PC12-Zellen nachgewiesen werden konnte.

### 3.5.2 Interaktionsstudien mit GST-Fusionsproteinen und Rattenhirnlysaten

Zusätzlich zu Immunopräzipitationen wurde versucht, die Bindung zwischen Snapin und SNAP-25 mit GST-pulldowns nachzuweisen. Dazu wurden folgende Proteine als GST-Fusionsproteine exprimiert: Snapin, SNAP-23, SNAP-25a, SNAP-25b, SNAP-29, Syntaxin 1a (zytosolische Domäne), Synaptobrevin 2 (zytosolische Domäne). Der ternäre SNARE-Komplex wurde aus SNAP-25a, Synaptobrevin 2 und GST-Syntaxin 1a assembliert. Als Quelle für native Proteine diente der TritonX-100-Extrakt aus Rattenhirnhomogenaten. Um auch schwache Interaktionen detektieren zu können, wurden die GST-Fusionsproteine im deutlichen Überschuß eingesetzt und die an die GST-Proteine gebundene Fraktion 100fach gegenüber dem Überstand und dem Ausgangsmaterial ankonzentriert. Zunächst wurde GST-Snapin als Interaktionspartner für Proteine aus dem Rattenhirnextrakt angeboten. Wie in Abb. 22A zu sehen ist, konnte ein Teil von SNAP-25 an GST-Snapin gebunden werden. Auch weitere Proteine SNAP-23, Syntaxin und Synaptobrevin konnten in der gebundenen Fraktion detektiert werden. Dieses Ergebnis und der 100fache Konzentrationsfaktor der gebundenen Fraktion gegenüber dem Überstand mit ungebundenen Proteinen lassen die Frage nach der Spezifität dieser Bindung aufkommen. Das reverse Experiment, in dem natives Snapin aus

dem Rattenhirnextrakt und diverse SNARE-GST-Fusionsproteine und GST-SNARE-Komplex als Interaktionspartner getestet wurden, ergab keine detektierbare Bindung (s. Abb. 22B). Als interne Positivkontrolle wurde die Bindung von nativem Complexin I und II, die selektiv an den SNARE-Komplex aber nicht an einzelne SNARE-Proteine (Pabst *et al.*, 2000) binden, getestet. Die Dissoziation von Complexin vom SNARE-Komplex verläuft extrem schnell (Pabst *et al.*, 2001), deshalb ist die Bindung trotz eines Überschusses am SNARE-Komplex nicht quantitativ.



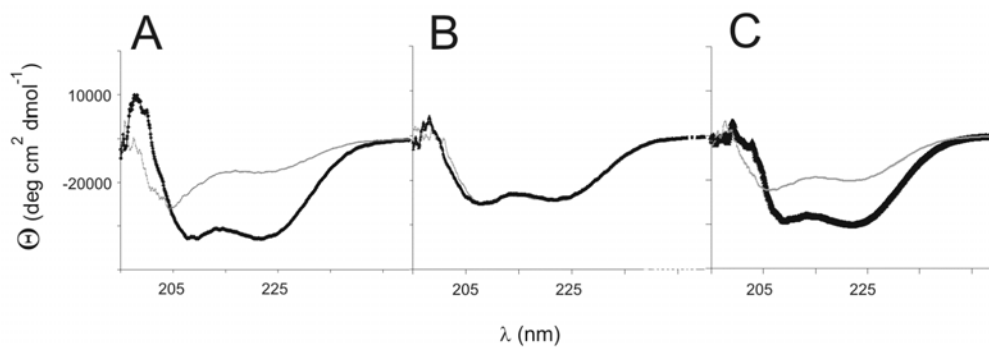
**Abb.22 Interaktionsstudien mit GST-Fusionsproteinen und Rattenhirnlysaten als Quelle für native SNARE-Proteine bzw. natives Snapin.** Die an GST-Fusionsproteine gebundene Fraktion wurde 100fach ankonzentriert und gleiche Volumina des Überstands nach dem Pelletieren der Gluthationsepharose (Ü) und der gebundenen Fraktion (B) wurden mit SDS-PAGE und Immunoblot analysiert. Rechts von jedem Bild steht das detektierte Protein, oberhalb die als Interaktionspartner angebotene GST-Proteine. Sn - SNAP, Sb - Synaptobrevin 2, Sx - Syntaxin 1, TC - ternärer SNARE-Komplex.

### 3.5.3 Untersuchungen mittels CD-Spektroskopie

Immunopräzipitationen und Interaktionsstudien mit GST-Fusionsproteinen gehören beide zu den sogenannten Ungleichgewichtsverfahren. Zum Studium von Interaktionen mit niedriger Affinität eignen sich besser Gleichgewichtsverfahren, bei denen z.B. die Gefahr nicht existiert, das gebundene Protein durch extensives Waschen zu verlieren. CD-Spektroskopie wurde schon mehrmals erfolgreich zum Studium von Interaktion zwischen SNARE-Proteinen und viralen Proteinen, die an der Membranfusion beteiligt sind, eingesetzt. Man macht sich dabei zunutze, dass Proteine durch die Bindung aneinander eine neue Konformation einnehmen. Dies ist besonders leicht mit CD-Spektroskopie zu detektieren, wenn es sich um eine Änderung im  $\alpha$ -helikalen Gehalt handelt. Bei SNARE-Proteinen kommt das Phänomen der Induktion von neuen Konformationen besonders deutlich zum Vorschein. Die neuronalen SNARE-Proteine (außer der N-terminalen Domäne von Syntaxin) sind unstrukturiert, solange



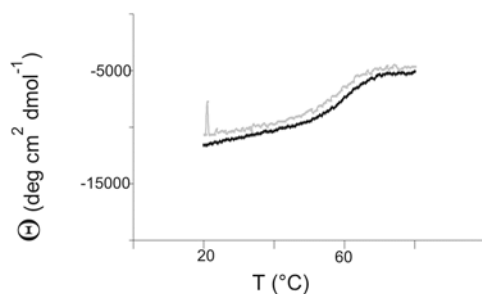
sie einzeln und nicht in Komplexen vorliegen (Fasshauer *et al.*, 1997). Bei der Formation eines SNARE-Komplexes beobachtet man einen massiven Gewinn an  $\alpha$ -Helizität. Diese Methode wurde zur Untersuchung der Interaktion zwischen Snapin und SNAP-25 benutzt. In Abb. 23A sieht man individuelle Spektren von Snapin und SNAP-25 (hier wurde die Isoform SNAP-25a eingesetzt). Im Gegensatz zu Snapin zeigt SNAP-25 keine für  $\alpha$ -helikale Bereiche typischen Absorptionsmaxima bei 208 und 222 nm. Inkubiert man die zwei Proteine im äquimolaren Verhältnis über Nacht, so findet man keine Zunahme in der  $\alpha$ -Helizität der Mischung. Das ist erkennbar durch den Vergleich (Abb. 23B) des gemessenen Spektrums der Mischung aus den beiden Proteinen nach einer Übernachtinkubation und des theoretischen berechneten Spektrums, das durch einfaches Summieren der individuellen Spektren, wie sie in Abb. 20A dargestellt sind, entsteht. Auch mit der anderen Isoform von SNAP-25, SNAP-25b, konnte keine Änderung im  $\alpha$ -helikalen Gehalt nach dem Mischen von Snapin und SNAP25 gefunden werden (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu wurde wie bereits beschrieben (Fasshauer *et al.*, 1997) eine massive Zunahme an  $\alpha$ -Helizität nach der Zugabe von Syntaxin zu SNAP-25 gefunden.



**Abb.23 Interaktionsstudien zwischen Snapin und SNAP-25 mit Hilfe von CD-Spektroskopie.** A, individuelles CD-Spektrum von Snapin (schwarz) und SNAP-25a (grau). B, CD-Spektrum einer äquimolaren Mischung aus Snapin und SNAP-25a nach einer Übernachtinkubation (schwarz). Zum Vergleich wird die theoretische Summe der individuellen Spektren von SNAP-25 und Snapin gezeigt (grau). C, CD-Spektrum einer äquimolaren Mischung aus Syntaxin und SNAP-25a (schwarz). Die theoretische Summe der individuellen Spektren dieser Proteine ist in grau dargestellt.  $\Theta$  – molare auf Aminosäurezahl normierte Elliptizität,  $\lambda$  – Wellenlänge.

Wie es aus den MALLS-Daten und der thermalen Schmelzkurve von Snapin hervorgeht, liegt rekombinantes Snapin in der Lösung als ein extrem stabiles Dimer vor. Ob diese Dimerisierung auch *in vivo* stattfindet, ist nicht erforscht. Wenn das nicht der Fall ist, könnte

sie der Grund dafür sein, dass die Interaktion zwischen Snapin und SNAP-25 *in vitro* blockiert ist. Deshalb wurde als nächstes die thermale Entfaltungs- und Rückfaltungskurve von Snapin in Anwesenheit von SNAP-25 untersucht. Als Äquivalent des Faltungszustandes wurde die Elliptizität bei 222 nm mit einem CD-Spektrometer gemessen. Wie in Abb. 24 zu sehen ist, sind die Entfaltungs- und Rückfaltungskurven fast identisch und der gesamte Vorgang zeigt keine Hysterese auf. Eine Hysterese würde man erwarten, wenn sich nach dem Schmelzen von Snapin bei der Rückfaltung ein neuer Komplex mit SNAP-25 entstehen würde. Der Gesamtgehalt der Proteinmischung an  $\alpha$ -Helix gleicht nach dem Abschluss der Rückfaltung dem Ausgangswert.



**Abb. 24 Denaturierung und Zurückfaltung von Snapin in Anwesenheit von SNAP-25.** Äquimolare Mischung aus Snapin und SNAP-25 wurde thermal entfaltet (schwarze Kurve) und anschließend zurückgefaltet (graue Kurve). Der Vorgang wurde durch die Messung der Elliptizität ( $\Theta$ , molare Elliptizität normiert auf die Aminosäurezahl) bei 220 nm beobachtet.

Zusätzlich zur CD-Spektroskopie wurden Anisotropiemessungen mit an drei verschiedenen Positionen (Cys20, 48 oder 200) markiertem SNAP-25 und Snapin durchgeführt. Auch hier konnten keine Hinweise auf eine Interaktion erhalten werden.

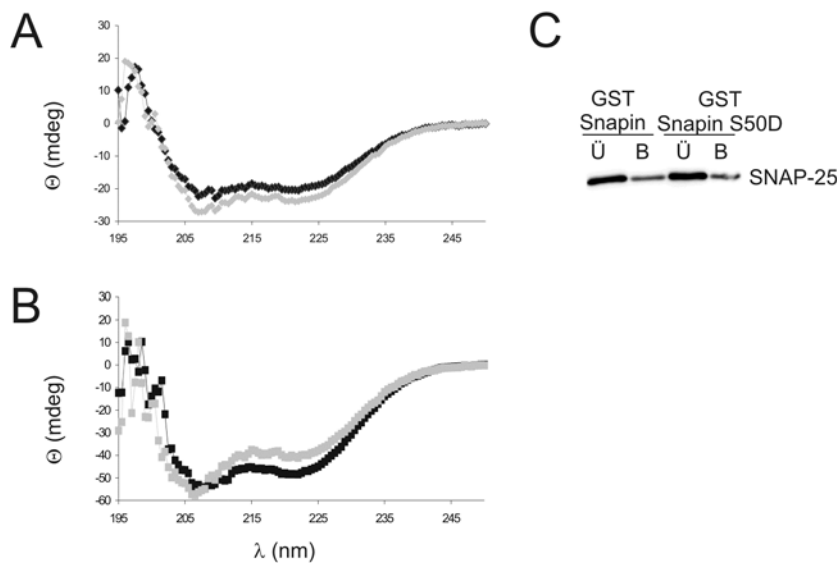
### 3.5.4 Vergleichsstudien mit Wildtyp-Snapin und SnapinsS50D

Chheda und Kollegen publizierten 2001, dass Snapin von der PKA an Ser50 phosphoryliert werden kann, und dass diese Phosphorylierung einen dreifachen Anstieg in der Menge des an Snapin gebundenen SNAP-25 verursacht. Auch die Interaktion zwischen Synaptotagmin und dem SNARE-Komplex soll dadurch verstärkt werden. Allerdings handelt es sich hier um einen Faktor von 1,5. In dieser Arbeit wurde eine phosphomimetische Mutante Ser50Asp beschrieben, die die Eigenschaften des phosphorylierten Snapins widerspiegelt. Ich habe diese

Mutante (weiterhin als SnapinS50D bezeichnet) hergestellt und ihre Bindungseigenschaften im Vergleich zum Wildtyp-Snapin untersucht. Diese Mutante ließ sich unter den gleichen Bedingungen wie Wildtyp-Snapin exprimieren und reinigen.

Als erstes wurde kontrolliert, ob die eingefügten Mutationen die Struktur von Snapin beeinflusste. Soweit man das anhand des CD-Spektrums von SnapinS50D, das sich vom Wildtyp-Spektrum nicht unterscheidet (s. Abb. 25A), beurteilen kann, wurden durch die Mutation keine massiven Störungen in der Sekundärstruktur verursacht.

Genauso wie der Wildtyp induzierte diese Mutante keine Strukturänderung in SNAP-25 (s. Abb. 25B). In den Interaktionsstudien zwischen GST-Fusionsproteinen und Rattenhirnlysaten als Quelle für native SNARE-Proteine konnte kein Unterschied in der Bindung von SNAP-25 und folglich auch des SNARE-Komplexes gefunden werden (s. Abb. 25C)



**Abb.25 Vergleichsstudien mit Wildtyp-Snapin und SnapinsS50D**

A, CD-Spektrum von Snapin (schwarz) und SnapinS50D (grau). B, CD-Spektrum einer äquimolaren Mischung aus SnapinS50D und SNAP-25 nach einer Übernachtinkubation (schwarz). Das theoretisch berechnete Summenspektrum beider Proteine ist in grau dargestellt. C, Interaktion zwischen Snapin und SnapinS50D als GST-Fusionsproteine und SNAP25 aus Rattenhirnhomogenat. Die an GST-Fusionsproteine gebundene Fraktion wurde 100fach ankonzentriert und gleiche Volumina des Überstands nach dem Pelletieren der Gluthationsepharose (Ü) und der gebundenen Fraktion (B) wurden mit SDS-PAGE und Immunoblot analysiert.

## 4 Diskussion

### 4.1 Gewebeverteilung und subzelluläre Lokalisation von Snapin

In dieser Studie wurde gezeigt, dass Snapin ein ubiquitäres Protein ist, das in der Zelle sowohl im Zytosol als auch membranassoziiert vorliegt. Diese Ergebnisse widersprechen den Daten von Ilardi *et al.*, 1999, stimmen aber gut mit allen anderen Publikationen überein, die sich mit der Gewebeverteilung und subzellulärer Lokalisation von Snapin auseinandersetzen. So zeigten Buxton *et al.*, 2003 anhand eines RNS-Blots und Immunoblots, dass Snapin in vielen anderen Geweben das gleiche Expressionsniveau wie im Hirn erreicht. Stracevic und Dell'Angelica, 2004 konnten Snapin als Bestandteil des BLOC-Komplexes aus der Rinderleber isolieren. Mehrmals wurde Snapin als EST oder durch Zwei-Hybrid-Verfahren aus nichtneuronalen Geweben oder Zelllinien kloniert (z.B. Buxton *et al.*, 2003 fanden Snapin in einer cDNS-Bibliothek aus der Adipozyten-Zelllinie 3T3-L1). Die Assoziation von Snapin mit der Membran lässt sich nicht durch eine Transmembrandomäne erklären, wie Ilardi *et al.*, 1999 behaupteten. Buxton *et al.*, 2003 konnten zeigen, dass die Assoziation mit dem Membranpool fast vollständig durch Waschen mit 1 M Harnstoff oder 1 M Natriumchlorid aufgehoben werden kann. Das weist darauf hin, dass Snapin über andere Proteine an die Membran gebunden ist. Interessanterweise sind viele der vorgeschlagenen Interaktionspartner von Snapin membranassoziierte Proteine (SNAP-23, SNAP-25, RGS7) oder Proteine mit eigenen Transmembrandomänen (Vanilloidrezeptor, Adenylatcyclase VI). Snapin scheint nicht nur an die Plasmamembran gebunden zu sein, sondern auch an andere intrazelluläre Membrankompartimente. Das zeigen die in dieser Studie durchgeführte subzelluläre Fraktionierung von Rattenhirnlysaten und konfokale Immunfluoreszenzaufnahmen von Adipozyten und Snapin überexprimierenden COS-7 Zellen (Buxton *et al.*, 2003). In diesen Aufnahmen ist sowohl eine diffuse zytosolische Färbung als auch die Färbung eines perinuklearen Kompartimentes zu sehen. Chou *et al.*, 2004 untersuchten die Expression von Snapin im Hirn. Snapin konnte in mehreren Hirnarealen detektiert werden. Seine Lokalisation in Neuronen war dendritisch und somatisch, auch das Ende des Wachstumskegels war deutlich gefärbt. Die Färbung ergab ein punktiertes Muster und kolokalisierte teilweise mit der Färbung für die Adenylatcyclase VI. Die zelluläre Lokalisation von Snapin änderte sich nicht nach einer Stimulation der Neuronen mit 56 mM Kaliumlösung. Zwar wurden keinen direkten Kolokalisationsstudien zwischen Snapin und SNAP-25 oder SNAP-23 durchgeführt, aber aus den früheren Arbeiten (Chen *et al.*, 1999, Tao-Cheng *et al.*, 2000, Feng *et al.*, 2002) ist bekannt, dass SNAP-23 und SNAP-25 eine deutliche Plasmamembranfärbung zeigen, wobei SNAP-25 an der axonalen und synaptischen

Membran und SNAP-23 an der somatischen Plasmamembran angereichert ist. Außerdem zeigt der SNAP-25-Antikörper die Färbung eines perinukliären Kompartiments.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass diese Daten die Rolle von Snapin in der neuronalen Exozytose nicht komplett ausschließen, weisen aber deutlich darauf hin, dass es kein wichtiger Bestandteil der exozytischen Maschine ist, da es wieder an der Plasmamembran noch auf synaptischen Vesikeln angereichert ist und höchstens eine regulatorische Rolle in der neuronalen oder konstitutiven Exozytose hat.

## **4.2 Dimerisierung von Snapin**

Die im Rahmen dieser Studie durchgeführte MALLS-Analyse zeigte, dass rekombinantes Snapin als Dimer vorliegt. Dabei kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich um ein *in vitro* Artefakt handelt und die Dimerisierung von Snapin Interaktionen mit anderen Proteinen erschwert. In einem Zwei-Hybrid-Screen konnten Starcevic und Dell-Angelica, 2004 keine Interaktion von Snapin mit sich selber feststellen. In derselben Arbeit wurde eine Gelfiltration von Leberzytosol durchgeführt, wobei Snapin in zwei Pools eluierte. Ein hochmolekularer Pool entspricht dem BLOC-1 Komplex, da hier alle Komponenten des Komplexes koeluierten. Der zweite Pool eluiert zwischen den Markerproteinen von 29 kDa und 66 kDa Molekulargewicht. Monomeres Snapin konnte nicht detektiert werden.

## **4.3 Rolle von Snapin in der neuronalen Exozytose**

### **4.3.1 Interaktionsstudien mit rekombinanten und nativen SNARE-Proteinen**

#### **4.3.1.1 Untersuchungen mit Ungleichgewichtsassay**

Diese Studie beschäftigte sich eingehend mit der Interaktion von Snapin und SNARE-Proteinen, insbesondere mit der binären Interaktion zwischen Snapin und SNAP-25. Ilardi *et al.*, 1999 und Buxton *et al.*, 2003 konnten durch Pull-down-Experimente mit rekombinanten Proteinen eine Assoziation zwischen Snapin und SNAP-25 bzw. SNAP-23 finden. Dabei wurde Snapin als 6xHis-getaggtetes Protein eingesetzt. In diesem Zusammenhang ist es wichtig zu erwähnen, dass wir eine deutliche Diskrepanz im Verhalten von 6xHis-Snapin und Snapin ohne 6xHis-Tag beobachtet haben. Das getaggte Protein neigte deutlich stärker zu Aggregation als das Protein, von dem der Tag bereits abgeschnitten wurde. 6xHis-Snapin konnte nur durch Zugabe von Detergenzien und Erhöhung des Salzgehaltes auch bei Konzentrationen unter 1 mg/ml in Lösung gehalten werden. Zwar wirkten diese Bedingungen sich auch auf das Aggregationsverhalten von Snapin ohne 6xHis-Tag günstig aus, jedoch war es möglich, dieses Protein bei physiologischen Salzkonzentrationen und ohne Detergenz bei

Proteinkonzentrationen bis zu 2 mg/ml in Lösung zu halten. Diese starke Neigung zu Aggregationen von 6xHis-Snapin weist auf die auf der Oberfläche exponierten hydrophoben Bereiche und eine partielle Entfaltung des Proteins hin. Deshalb ist es nicht weiter verwunderlich, dass diese exponierten hydrophoben Bereiche eine Affinität zu solchen Proteinen mit Coiled-Coil-Domänen wie SNAP-25 und SNAP-23 besitzen. Obwohl Ilardi und seine Kollegen in ihren Interaktionsstudien (Immunopräzipitationen und „Pull-down“-Experimente) die ungebundene und gebundene Fraktion nicht direkt verglichen, zeigten sie, dass 1 µg (~ 0,4 nmol) GST-SNAP-25 bereits bei 100 nM Snapin (hier wurde die Coiled-Coil-Domäne von Snapin benutzt) abgesättigt ist. Daraus lässt sich schließen, dass das äquimolare Verhältnis bei der Bindung nicht erreicht wird. Protein-Protein-Interaktionen werden aber von der 3-D-Struktur der Interaktionspartner bestimmt und sind stoechiometrisch, solange keine Heterogenität in der Proteinkonformation vorliegt oder die Bindung durch die Immobilization des Proteins oder durch seinen Tag beeinflusst wird. Folglich sollte die Bindung quantitativ sein, solange sie nicht so schwach ist, dass der Ligand durch Waschen verloren geht. Interessanterweise konnte Buxton *et al.*, 2003 im Gegensatz zu Ilardi und seinen Mitarbeitern auch eine Bindung zwischen Snapin und SNAP-23 detektieren. Das einzige Experiment, bei dem wir eine Assoziation zwischen Snapin und den beiden SNAP-Proteinen feststellten, war der „Pull-down“-Versuch mit GST-Snapin und Rattenhirnlysaten als Quelle für native SNARE-Proteine. Obwohl GST-Snapin im deutlichen Überschuss eingesetzt worden ist, musste das gebundene Material gegenüber dem Überstand mit ungebundenen Proteinen 100fach ankonzentriert werden. Die Assoziation zwischen SNAP-25 und Snapin war etwas stärker als die zwischen SNAP-23 und Snapin, was vielleicht die Diskrepanz zwischen den Daten von Ilardi *et al.*, 1999 und Buxton *et al.*, 2003 erklären könnte.

Im reversen Experiment, bei dem verschiedene SNARE-Proteine und der neuronale SNARE-Komplex durch den GST-tag immobilisiert wurden, konnte kein Snapin in der gebundenen Fraktion detektiert werden.

Auch Immunopräzipitationen mit SNAP-25- und Snapin-Antikörpern aus PC12- und Rattenhirnlysaten konnten keinen Komplex zwischen diesen Proteinen detektieren. Ilardi und seine Kollegen führten Immunopräzipitationen mit rekombinanten Proteinen durch und Buxton *et al.*, konnten SNAP-23 und Snapin nicht koimmunopräzipitieren, solange nicht mindestens ein Interaktionspartner überexprimiert war.

Zusammengefasst weisen unsere Daten darauf hin, dass die Interaktion zwischen Snapin und SNARE-Proteinen, falls sie existiert, einen transienten und niedrigaffinen Charakter hat oder unter ganz speziellen Bedingungen stattfindet.

#### 4.3.1.2 Untersuchungen mit Gleichgewichtsverfahren

Mehrere Gründe können dafür verantwortlich sein, dass die oben beschriebenen Bindungsstudien, keinen Komplex zwischen Snapin und SNAP-25 detektieren konnten:

1. Rekombinante Proteine entsprechen in ihrer Konformation nicht dem nativen Zustand und dies könnte zur verminderten Bindungsfähigkeit führen. Dies wurde mit Kontrolle der Proteinfaltung, Bindung von anderen Proteinen und abwechselnden Anbieten von nativen Proteinen als Liganden für rekombinante Proteine ausgeschlossen.

2. Komplexe von Proteinen mit einer niedrigen Abundanz können aus kinetischen Gründen in Pull-down-Versuchen nicht gebunden werden. Snapin stellt so einen Fall dar: seine abgeschätzte Konzentration im Hirn ist mindestens 100fach niedriger als die von SNAP-25. Diese Fehlerquelle konnte zumindest bei Immunoprecipitationen durch quantitative Bindung von Snapin an seinen Antikörper und somit durch komplette Depletierung des Lysats beseitigt werden.

3. Komplexe mit anderen Proteinen, die bereits in der Zelle vorliegen und artifiziell entstehende Komplexe durch Zellsolubilisierung können die Menge des frei verfügbaren Interaktionspartners deutlich herabsetzen.

4. Niedrige Affinität der Interaktion hat zur Folge, dass der Interaktionspartner bei Waschschrinen verloren geht.

Einige dieser Problemen können durch die Messung von Interaktionen unter Gleichgewichtsbedingungen umgangen werden. Zwei Ansätze wurden benutzt, um Hinweise auf die Interaktion zwischen Snapin und SNAP-25 unter Gleichgewichtsbedingungen zu bekommen. Erstens wurde das Anisotropieverhalten von 3 an verschiedenen Stellen positionierten Aminosäuren von SNAP-25 in Anwesenheit von Snapin untersucht. Snapin hatte keinen Einfluß auf die Anisotropie von diesen Aminosäuren. Zweitens wurde in dieser Studie CD-Spektroskopie eingesetzt, die durch eine Komplexbildung eventuell entstandene Änderungen in der Sekundärstruktur detektiert. Für SNAP-23 wie auch für SNAP-25 wurde die C-terminale Coiled-Coil-Domäne von Snapin als die Bindungsdomäne bestimmt (Buxton *et al.*, 2003, Ilardi *et al.*, 1999). SNAP-25 besitzt ebenfalls zwei konservierte Coiled-Coil-Domänen, verbunden durch ein flexibles Linkerfragment (Fasshauer *et al.*, 1998). Coiled-Coil-Proteine bilden miteinander Komplexe durch Heterooligomerisierung ihrer Coiled-Coil-

Domänen (Übersicht bei Burkhard *et al.*, 2001). Alle bis jetzt beschriebenen Komplexe von SNAP-25 oder seinen Homologen stellen tetramere parallele Coiled-Coil-Strukturen dar (Sutton *et al.*, 1998, Misura *et al.*, 2001, Freedman *et al.*, 2003). Fasshauer *et al.*, 1997 konnten mittels CD-Spektroskopie zeigen, dass SNAP-25 in der Lösung als unstrukturiertes Monomer vorliegt und dass die prominenten  $\alpha$ -helikalen Strukturen erst in ausgebildeten Komplexen zustande kommen. Basierend auf diesen Beobachtungen wurde angenommen, dass Snapin beim Binden an SNAP-25 ebenfalls eine Zunahme in der  $\alpha$ -Helizität induzierend sollte. Entgegen diesen Erwartungen wurde nach einer Übernachtinkubation der beiden Proteine miteinander keine Änderung in der Sekundärstruktur festgestellt.

Weder mit Hilfe von CD-Spektroskopie noch Anisotropiemessungen konnten Hinweise auf die Interaktion zwischen Snapin und SNAP-25 gefunden werden. Jedoch kann man die Interaktion auch hier durch die erhaltenen negativen Ergebnisse nicht komplett ausschließen: Bei der Anisotropie zeigt sich erst dann eine deutlich Änderung im Verhalten nach der Bindung des Interaktionspartners, wenn die markierte Aminosäure in der Bindungssequenz liegt oder in einer Sequenz die eine neue Konformation eingenommen hat. Die CD-Spektroskopie detektiert nur eine Änderung in der  $\alpha$ -helikalen Struktur. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass die Bindung über eine andere Struktur oder über ein nicht strukturiertes Peptid verläuft oder dass die Änderung in der Struktur so klein sind, dass wir sie nicht detektieren können.

#### **4.3.2 Elektrophysiologische Daten**

Die Rolle von Snapin in der neuronalen Exozytose wurde mehrmals mit elektrophysiologischen Methoden untersucht. Es wurde der Einfluss von injizierten Snapinfragmenten auf Exozytose in Neuronen (Ilardi *et al.*, 1999) erforscht und Überexpressionstudien von Snapin und seinen Mutanten in Chromaffinzellen (Chheda *et al.*, 2001) und Neuronen (Thakur *et al.*, 2004 und Vites *et al.*, 2004) durchgeführt. Allerdings ergeben diese Daten in einer Zusammenstellung kein einheitliches Bild.

Direkte Injektion von Snapin-Fragmenten, die von Ilardi *et al.*, 1999 als mit SNAP-25 interagierende Domäne (Snapin-CT, AA 80-136) bzw. interagierendes Peptid (W4, AA 117-136) beschrieben wurden, führte zu einer Reduktion der Amplitude von postsynaptischen Potentialen um 30%. Hier sollte angemerkt werden, dass diese Reduktion im Falle von Snapin-CT transient war und die normale Amplitude nach 60-80 Minuten beobachtet wurde. Außerdem konnte ein zweites Peptid von Snapin, W2 (AA 83-92) auch eine 20%ige Reduktion von postsynaptischen Potentialen bewirken, obwohl es nicht mit der Bindung von



Snapin an SNAP-25 wie W4 kompetitiert. Diese Ergebnisse wurden von den Autoren so interpretiert, dass injizierte Snapin-Fragmente die Bindung von nativem Snapin an SNAP-25 verhindern und somit die Exozytose beeinflussen. Daraus würde folgen, dass Snapin außer der C-terminalen Domäne noch N-terminale Domänen hat, die an der Regulation der neuronalen Exozytose beteiligt sind. Aus den biochemischen Daten folgt, dass der N-Terminus für die Snapin-vermittelte Bindung von Synaptotagmin an den SNARE-Komplex notwendig ist.

Im Gegensatz zu hier beobachteten Effekten hatte die Überexpression von Snapin-CT (Vites *et al.*, 2004) in Neuronen keine Auswirkung weder auf die Amplitude noch auf andere Charakteristika der postsynaptischen Antwort wie die Größe von RRP, spontane Neurotransmitterfreisetzung und „short time depression“.

In einer anderen Arbeit (Thakur *et al.*, 2004) wurden Effekte der Überexpression von Snapin (AA 1-136) in Hippocampus-Neuronen untersucht. Hier beobachtete man eine Reduktion der Amplitude von postsynaptischen Potentialen um mehr als 30%. Wenn natives Snapin in einer Mischung aus phosphorylierter und nicht-phosphorylierter Form vorliegt, muss eine der Formen, die durch die Mutanten wiedergegeben werden, für diese Wirkung verantwortlich ist. Erstaunlicherweise hatte keine der in der gleichen Studie eingesetzten Mutanten SnapinS50D (phosphomimetisch) und SnapinS50A (nicht-phosphomimetisch) einen solchen Effekt. Die Überexpression der nicht-phosphomimetischen Mutante zeigte eine leicht verstärkte Antwort auf die hypertonische Saccharoselösung ( $0,72 \pm 0,15$  nC gegenüber  $0,47 \pm 0,1$  nC der Kontrollzellen) die von den Autoren als nicht signifikant eingestuft wurde. Die hypertonische Saccharoselösung stimuliert die Freisetzung von Vesikeln aus dem „ready releasable pool“. Die phosphomimetische Mutante zeigte dagegen eine Reduktion der postsynaptischen Antwort nach der presynaptischen Anwendung der hypertonischen Saccharoselösung ( $0,29 \pm 0,04$  nC gegenüber  $0,48 \pm 0,08$  nC der Kontrollzellen). Die Wirkung der überexprimierten phosphomimetischen Mutante wurde mit der Überexpression des Wildtyp-Proteins unter Zugabe eines PKA-Aktivators verglichen. Hier wurde kein Unterschied in der postsynaptischen Antwort auf die hypertonische Saccharoselösung gefunden. Wildtyp-Snapin und nicht-phosphomimetische Mutante hatten keine weiteren Auswirkungen auf die analysierten Parameter der postsynaptischen Antwort. Die beiden Situationen, die entweder den phosphorylierten Zustand von Snapin mimikrierten (SnapinS50D) oder ihn herbeiführten (Wildtyp mit gleichzeitiger PKA-Aktivierung) verursachten eine Reduktion von mit hypertonischer Saccharoselösung induzierter Exozytose und als Folge davon eine zweifach erhöhte Freisetzungswahrscheinlichkeit von Neurotransmittervesikeln.

Dieselbe Arbeitsgruppe untersuchte die Überexpression von SnapinS50D und SnapinS50A auch in Chromaffinzellen. Im Gegensatz zu Neuronen beobachtete man hier in beiden Fällen eine deutliche Verstärkung in der langsamen Phase der Exozytose. Die phosphomimetische Mutante verstärkte zusätzlich auch leicht die schnelle Phase der Exozytose.

In der folgenden Tabelle sind Ergebnisse dieser Untersuchungen zusammengefasst.

Publikation	Snapin-Fragment	Modellsystem	EPSC/EPSP	RRP
Ilardie <i>et al.</i> , 1999	AS 80-136	Injektion in SCG-Neuronen	Transiente Reduktion um 30%	Nicht untersucht
Ilardie <i>et al.</i> , 1999	AS 83-92	Injektion in SCG-Neuronenn	Reduktion um 20%	Nicht untersucht
Ilardie <i>et al.</i> , 1999	AS 117-136	Injektion in SCG-Neuronen	Reduktion um 30%	Nicht untersucht
Vites <i>et al.</i> , 2004	AS 80-136	Überexpression in Hippocampus-Neuronen	Kein Effekt	Kein Effekt
Chheda <i>et al.</i> , 2001	SnapinS50D AS 1-136	Überexpression in Chromaffinzellen	Nicht untersucht	Schnelle Phase um 25% erhöht, langsame Phase 2fach erhöht
Chheda <i>et al.</i> , 2001	SnapinS50A AS 1-136	Überexpression in Chromaffinzellen	Nicht untersucht	Schnelle Phase um 21% reduziert, langsame Phase 2fach erhöht
Thakur <i>et al.</i> , 2004	AS 1-136	Überexpression in Neuronen	Erhöht um 35%	Kein Effekt
Thakur <i>et al.</i> , 2004	SnapinS50D AS 1-136	Überexpression in Hippocampus-Neuronen	Kein Effekt	Reduktion des gesamten Pools um 40%
Thakur <i>et al.</i> , 2004	SnapinS50A AS 1-136	Überexpression in Hippocampus-Neuronen	Kein Effekt	Kein Effekt bzw. leichte Erhöhung des gesamten Pools

**Tab.3 Einfluß auf Exozytose durch Snapin und seine Mutanten.** EPSC/EPSP – „excitatory postsynaptic current/potential“, RRP- „readily releasable pool“, SCG - „superior cervical ganglion“.

Bei genauer Betrachtung dieser Daten fällt einem auf, dass die in Neuronen und Chromaffinzellen erhaltene Ergebnisse widersprüchlich sind. Die Widersprüchlichkeit der Daten und die geringen Effekte auf unterschiedliche Charakteristika der Exozytose lassen Zweifel an der biologischen Signifikanz dieser Daten aufkommen. Außerdem lässt die von Ilardi *et al.*, 1999 beschriebene Immunopräzipitation eines rekombinanten SNARE-Synaptotagmin-Komplexes zusammen mit rekombinantem Snapin auf eine direkte Interaktion zwischen diesen Proteinen schließen. Die Interaktion zwischen Synaptotagmin und dem SNARE-Komplex zählt zu den späten Schritten in der exozytotischen Reaktionsfolge,

während die beobachteten elektrophysiologischen Effekte auf eine regulatorische Funktion in Priming/Docking schließen lassen.

Eine andere Arbeit (Morenilla-Palao *et al.*, 2004), die sich mit der Interaktion zwischen Snapin und dem Vanilloidrezeptor-1 (TRPV-1) beschäftigt, beschreibt ein anderes Phänomen, dass eine Rolle von Snapin in der regulierten Exozytose impliziert. PKC hatte zwei Effekte auf die Aktivität von TRPV-1. Erstens sensitivierte die PKC-abhängige Phosphorylierung den Rezeptor und zweitens verstärkte die PKC die SNARE-abhängige Exozytose, was zur Erhöhten Expression von TRPV-1 auf der Zelloberfläche führte. Gleichzeitige Überexpression von TRPV-1 und Snapin in Froschoozyten führt teilweise zur Aufhebung der PKC-Wirkung auf den Vanilloidrezeptor, die durch Exozytose vermittelt wird. Den gleichen Effekt hat auch Botulinumneurotoxin A. Dabei scheint Snapin direkt an den N-Terminus von TRPV-1 zu binden und damit die PKC-induzierte Exozytose zu verhindern.

Die Bindung von Snapin an TRPV-1 selbst hat keine Auswirkung auf die Aktivität dieses Rezeptors. Setzt man für Snapin eine direkte Rolle in der Exozytose über die Interaktion mit SNARE-Proteinen voraus, so erscheint Snapin in diesen Versuchen als ebenso potenter Blocker wie Botulinumneurotoxin A. Dies lässt sich aber nicht mit den milden Effekten, die in Neuronen und Chromaffinzellen durch Snapin vermittelt wurden, in Einklang bringen. Eine andere mögliche Erklärung ist, dass Snapin ein Teil der Signaltransduktionskaskade ist, die zur PKC-abhängigen Aktivierung der regulierten Exozytose führt. So zeigten Chou *et al.*, 2004, dass Snapin die PKC-vermittelte Inhibition von Adenylatcyclase VI aufheben kann.

In Anbetracht der von mir vorgelegten Studie und der kritischen Betrachtung anderer Publikationen muß die Rolle von Snapin in der neuronalen Exozytose in Frage gestellt. Snapin scheint nicht der essentielle Bestandteil des Fusionsapparatus zu sein und übernimmt mit Sicherheit andere zusätzliche Aufgaben innerhalb von nicht-neuronalen Zellen.

#### **4.4 Snapin-Homologe in anderen Organismen**

Snapin-homologe Proteine wurden auch in *D. melanogaster* und *C. elegans* gefunden. Über die Funktion von Snapin in diesen Proteinen ist wenig bekannt. In beiden Fällen handelt es sich um Proteine mit zwei Coiled-Coil-Domänen mit moderater Homologie zum Säuger-Snapin.

Snapin aus *D. melanogaster* wurde in einem genomweiten Screen nach synaptischen Proteinen identifiziert (Lloyd *et al.*, 2000). Das Snapingen liegt in dergleichen genomischen Region (22F-23B,160 kB) wie andere Gene, deren Genprodukte wie dynamin-2, synaptotagmin 1 und HRS an Transportvorgängen innerhalb der Zelle beteiligt sind. Snapin

ist verstärkt während der Embryonalentwicklung exprimiert ([http://genome.med.yale.edu/Lifecycle/query\\_gen.php?input1=FBgn0031455](http://genome.med.yale.edu/Lifecycle/query_gen.php?input1=FBgn0031455)). Bei einem Zwei-Hybrid-Screen mit 10623 vorhergesagten Transkripten hat man eine starke Interaktion zwischen Snapin und dem *D. melanogaster* Homolog von BLOS-2 gefunden (Giot *et al.*, 2003). Es wurde keine Interaktion zwischen Snapin und synaptischen Proteinen gefunden, was leicht dadurch zu erklären ist, das Standard-Zwei-Hybrid-Verfahren sich für Membranproteine nicht eignen.

Das Snapin-Homolog in *C.elegans* zeigt eine deutlich verstärkte Expression im embryonalen Stadium (Hill *et al.*, 2000) und eine Anreicherung in Oozyten (Piano *et al.*, 2002). Zwei RNAi-Studien wurden mit dem Snapin-Homolog in *C. elegans* durchgeführt. Ein Verfahren (Kamath *et al.*, 2003) basierte auf dem Füttern von erwachsenen Tieren mit Bakterien, die doppelsträngige RNS exprimierten. In diesem Fall wurde kein Phenotyp gefunden. Piano *et al.*, 2002 injizierten doppelsträngige RNS direkt in die Tiere. Auch hier wurde kein ausgeprägtes Phenotyp gefunden: Eine von neun Platten war zu 60% embryonisch lethal.

Somit lässt sich hier aus diesen Daten keine Funktion für Snapin-Homologe in *C.elegans* und *D. melanogaster* erschliessen.

#### 4.5 Perspektiven

Snapin ist ein ubiquitäres, evolutiv hoch konserviertes Protein. Homologe Proteine wurden in Chordatieren, Invertebrata und Pflanzen, aber nicht in Hefe gefunden. Mehrere Interaktionspartner wurden für Snapin identifiziert. Anhand der bekannten Rollen seiner Interaktionspartner lässt sich Beteiligung von Snapin an drei verschiedenen zellulären Vorgänge vermuten:

1. Kalziumabhängige und konstitutive Exozytose (über Interaktionen mit SNAP-23, SNAP-25)
2. Signaltransduktion über Proteinkinasen und G-Protein gekoppelte Rezeptoren (über Interaktionen mit Adenylatzyklase VI, RGS7 und Vanilloidrezeptor)
3. Biogenese von spezialisierten Organellen des lysosomal-endosomalen Systems (als Komponente des BLOC-1 Komplexes)

Am besten belegt ist die Beteiligung von Snapin am BLOC-1 Komplex. Mutationen in anderen Komponenten des BLOC-1 Komplexes verursachen das Hermansky-Pudlak-Syndrom, eine genetische Krankheit, die mit Hypopigmentation und Blutungsneigung assoziiert ist. Es wäre interessant zu sehen, ob Snapindeletion in einem Mausmodell zum ähnlichen Phänotyp führt. Zwar lässt sich den Mutationen ein Phänotyp zuordnen, aber der

zelluläre Mechanismus, der diesem Phänotyp zugrunde liegt, ist weitgehend unklar. In diesem Zusammenhang ist es wichtig zu erwähnen, dass zwei Komponenten des BLOC-1 Komplexes mit SNARE-Proteinen interagieren können. Eine Interaktion zwischen Pallidin und Syntaxin 13 (Burkhard *et al.*, 2001) und eine Interaktion zwischen Snapin und SNAP-23 (Buxton *et al.*, 2003) wurde berichtet. Deshalb wird ein Zusammenhang zwischen intrazellulären Transportvorgängen und Biogenese der spezialisierten lysosomalen Organellen vermutet. Pallidin und Snapin haben beide wie auch SNARE-Proteine Coiled-coil-Domänen, die für die Protein-Protein-Interaktionen verantwortlich sind. Bedenkt man, dass SNARE-Proteine zu promiskuitiven Interaktionen *in vitro* neigen, sollte die Spezifität auch anderer Interaktionen, die über Coiled-Coil-Domänen vermittelt wird, überprüft werden. Unter diesem Gesichtspunkt sollte man zum Beispiel Interaktion von Pallidin mit anderen Proteinen der Syntaxin-Familie und die von Snapin mit anderen Proteinen der SNAP-25-Familie untersuchen. Ein Zusammenhang zwischen Syntaxin 13 und SNAP-23 ist aus den vorliegenden Daten nicht direkt erkennbar: Syntaxin 13 befindet sich auf frühen und „recycling“ Endosomen (Prekeris *et al.*, 1998) und ist an der homotypischen Fusion von frühen Endosomen (McBride *et al.*, 1999) beteiligt; SNAP-23 ist in die konstitutive Exozytose involviert und zeigt eine starke Plasmamembranlokalization. Kein Komplex zwischen SNAP-23 und Syntaxin 13 wurde bis jetzt beschrieben.

Aus den Experimenten von Starcevic und Dell'Angelica, 2004 lässt sich schließen, dass Snapin in der Leber außer BLOC-1 noch in einem zweiten Komplex vorliegt. Dieser zweite Komplex kofraktioniert nicht mit den restlichen Komponenten des BLOC-1 Komplexes und könnte somit noch einen anderen unbekanntem zytosolischen Interaktionspartner von Snapin beinhalten.

Die Rolle von Snapin in der regulierten Exozytose ist durch diese Arbeit und durch die Widersprüchlichkeit der elektrophysiologischen Daten in Frage gestellt. In diesem Zusammenhang wäre es wichtig, elektrophysiologische Experimente auf dem genetischen Hintergrund eines Snapin Knock-outs zu wiederholen.

Interaktionen von Snapin mit anderen Proteinen wie RGS7 und Vanilloidrezeptor sind nicht ausreichend belegt: Sie basieren auf den Studien mit rekombinanten oder überexprimierten Proteinen. Diese Untersuchungen sollten durch Koloalizationsstudien ergänzt werden und auf andere Isoformen/Familienmitglieder ausgedehnt werden. Snapin und Adenylatcyclase VI zeigen in der Arbeit von Chou *et al.*, 2004 eine Koloalization nicht auf der Plasmamembran, sondern in einem endosomalen-lysosomalen Kompartiment. Es wäre interessant zu überprüfen, ob Snapin an einen endosomal lokalisierten Mitglied der RGS-Familie, RGS-PX1

(Zheng *et al.*, 2001) bindet, das eine Homologie zwischen seiner PX-Domäne und der Snapin-Bindungs-Domäne vor RGS7 (Vites, nicht publizierte Daten) aufweist.

Snapin wird mehrmals in Zusammenhang mit PKA und PKC gebracht. Es konnte gezeigt werden, dass Snapin ein Substrat für PKA darstellt (Chheda *et al.*, 2001). Interaktion von Snapin mit Adenylatcyclase VI hebt die Inhibition dieses Enzyms durch PKC auf (Chou *et al.*, 2004). Koexpression von Snapin und Vanilloidrezeptor führt zur Inhibition der PKC-induzierten und SNARE-abhängigen Expression des Rezeptors auf der Oberfläche. Kenntnisse über den Phosphorylierungszustand von Snapin in verschiedenen Geweben und unter verschiedenen Bedingungen und über die Phosphorylierung von Snapin *in vivo* durch die beiden Proteinkinasen würden zum Verständnis dieser Interaktionen beitragen.

## 5 Zusammenfassung

Snapin wurde ursprünglich von Ilardi *et. al.* 1999 als hirnspezifisches Protein beschrieben, das mit SNAP-25, einem zentralen Protein der neuronalen Exozytose, interagiert. Sowohl biochemische Daten über die Bindung an SNAP-25 und Einfluss von Snapin auf die Interaktion zwischen dem SNARE-Komplex und Synaptotagmin als auch elektrophysiologische Versuche mit Snapinfragmenten ließen für Snapin eine regulatorische Rolle in der neuronalen Exozytose vermuten. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde Snapin biochemisch und in struktureller Hinsicht charakterisiert. Zwei Snapin-Antisera wurden hergestellt, die sowohl rekombinantes wie natives Snapin im gefalteten und denaturierten Zustand erkennen und somit in unterschiedlichen Immunotechniken einsetzbar sind. Mit diesen Antikörpern konnte gezeigt werden, dass Snapin ein ubiquitäres Protein ist, das sowohl im Zytoplasma wie membranassoziiert vorliegt. Die Membranassoziation ist nicht auf eine putative Transmembrandomäne zurückzuführen, wie Computeranalysen, TritonX-114-Verteilung und nicht zuletzt die Löslichkeit des rekombinanten Proteins in detergentenfreien Lösungen zeigen. Rekombinantes Snapin liegt in Lösung als Dimer vor. Das Protein besitzt einen  $\alpha$ -helikalen Gehalt von 64%. Die  $\alpha$ -helikalen Bereiche weisen eine Übergangstemperatur von 58°C und können sich komplett nach einer chemischen oder thermischen Denaturierung zurückfalten. Erste Snapinkristalle in Form von hexagonalen Stäbchen mit scharfen Kanten bis 200  $\mu\text{m}$  Länge wurden erhalten. Allerdings ließ sich die Auflösung wahrscheinlich aufgrund einer intrinsischen Unordnung nicht mehr als auf 5,5 Å verbessern. Die kristallographischen Daten lassen eine trigonale oder hexagonale Raumgruppe vermuten.

Snapin ist ein evolutiv konserviertes Protein. Die Konservierung unter den Chordatieren beträgt 72% über einen mittleren Bereich von 100 Aminosäuren (bei Gesamtlänge von 136 Aminosäuren). Homologe Proteine wurden auch in Invertebraten (*Caenorhabditis elegans* und *Drosophila melanogaster*) und Pflanzen *Arabidopsis thaliana*) gefunden. Die Funktion dieses Proteins ist noch nicht aufgeklärt. Daten aus dieser Studie zeigen, dass eine direkte spezifische Interaktion zwischen Snapin und SNAP-25 sowie eine Assoziation mit dem SNARE-Komplex weder *in vivo* noch *in vitro* nachgewiesen werden konnte. Auch andere Daten wie ubiquitäre Verteilung, fehlende evolutive Konservierung der Aminosäuresequenz, die für die Interaktion mit SNAP-25 und elektrophysiologische Effekte verantwortlich ist, und neu publizierte Interaktionspartner für Snapin, die nicht an der Neurotransmitterfreisetzung beteiligt sind, stellen die Rolle von Snapin in der neuronalen Exozytose in Frage und lassen andere zusätzliche Funktionen für dieses Protein vermuten.

## Summary

Snapin has been originally described by Ilardi *et al.*, 1999 as a brain specific protein that interacts with SNAP-25, one of the central proteins in neuronal exocytosis. Biochemical data on the binding to SNAP-25, its influence on the interaction between the SNARE complex and synaptotagmin and electrophysiological data has led to the conclusion that snapin plays a role neuronal exocytosis. In this PhD thesis, snapin was characterized biochemically and from a structural point of view. Two snapin antisera were raised in rabbits, which can recognize recombinant and native snapin in its unfolded and native form, which make them suitable for a variety of immunotechniques. I could show with these antisera that snapin is an ubiquitously expressed protein which distributes into cytosolic and membrane associated pools. The association with membranes cannot be explained by assuming the presence of a putative transmembrane domain, as shown with computer analysis of the amino acid sequence of snapin, TritonX-114 distribution and the solubility of the recombinant protein in detergent free solutions. Recombinant Snapin forms a dimer with a high  $\alpha$ -helical content of 64%. These  $\alpha$ -helical regions have a single transition point at 58°C and can be completely refolded after chemical or thermal denaturation. First attempts at crystallizing snapin has provided crystals in form of hexagonal rods with sharp edges of 200  $\mu\text{m}$ . Resolution higher than 6 Å could not be achieved so far, perhaps due to an intrinsic disorder in the crystals. Initial crystallographic data indicate a trigonal or hexagonal space group.

Snapin is an evolutionary conserved protein with 72 % homology in chordates over a central stretch of 100 amino acids (the full length of snapin is 136 aminoacides). Homolog proteins can be found in invertebrates (*Caenorhabditis elegans* and *Drosophila melanogaster*) and plants (*Arabidopsis thaliana*) as well. The function of snapin is still unclear. Data from this study based on a variety of methods (pulldown assays, immunoprecipitations and circular dichroism studies) failed to show a specific interaction between snapin and SNAP-25 or any association of snapin with the SNARE complex. Additionally, the poor conservation of the putative SNAP-25 interaction regions that had an effect in electrophysiological studies (Ilardi *et al.*, 1999), and newly published data on snapin interacting proteins that do not participate in neurotransmitter release question the role of snapin in neuronal exocytosis and raise the possibility of alternate functions of snapin.



## 6 Literaturverzeichnis

Aebersold, R., and Mann, M. (2003) Mass spectrometry-based proteomics *Nature* 422, 198-207

Andrews, N. W. (2000) Regulated secretion of conventional lysosomes *Trends Cell Biol* 10, 316-321

Barnstable, C. J., Hofstein, R., and Akagawa, K. (1985) A marker of early amacrine cell development in rat retina *Brain Res* 352, 286-290

Blott, E. J., and Griffiths, G. M. (2002) Secretory lysosomes *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 122-131

Bordier, C. (1981) Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution *J Biol Chem* 256, 1604-1607

Brose, N., Huntley, G. W., Stern-Bach, Y., Sharma, G., Morrison, J. H., and Heinemann, S. F. (1994) Differential assembly of coexpressed glutamate receptor subunits in neurons of rat cerebral cortex *J Biol Chem* 269, 16780-16784

Bruns, D., Engers, S., Yang, C., Ossig, R., Jeromin, A., and Jahn, R. (1997) Inhibition of transmitter release correlates with the proteolytic activity of tetanus toxin and botulinus toxin A in individual cultured synapses of *Hirudo medicinalis* *J Neurosci* 17, 1898-1910

Burkhard, P., Stetefeld, J., and Strelkov, S. V. (2001) Coiled coils: a highly versatile protein folding motif *Trends Cell Biol* 11, 82-88

Buxton, P., Zhang, X. M., Walsh, B., Sriratana, A., Schenberg, I., Manickam, E., and Rowe, T. (2003) Identification and characterization of Snapin as a ubiquitously expressed SNARE-binding protein that interacts with SNAP23 in non-neuronal *Biochem J Pt*

Causier, B. (2004) Studying the interactome with the yeast two-hybrid system and mass spectrometry *Mass Spectrom Rev* 23, 350-367

Chen, Y. H., Yang, J. T., and Chau, K. H. (1974) Determination of the helix and beta form of proteins in aqueous solution by circular dichroism *Biochemistry* 13, 3350-3359

Chen, Y., Harry, A., Li, J., Smit, M. J., Bai, X., Magnusson, R., Pieroni, J. P., Weng, G., and Iyengar, R. (1997) Adenylyl cyclase 6 is selectively regulated by protein kinase A phosphorylation in a region involved in Galphas stimulation *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 14100-14104

Chen, D., Minger, S. L., Honer, W. G., and Whiteheart, S. W. (1999) Organization of the secretory machinery in the rodent brain: distribution of the t-SNAREs, SNAP-25 and SNAP-23 *Brain Res* 831, 11-24

Chern, Y. (2000) Regulation of adenylyl cyclase in the central nervous system *Cell Signal* 12, 195-204

Chiang, P. W., Oiso, N., Gautam, R., Suzuki, T., Swank, R. T., and Spritz, R. A. (2003) The Hermansky-Pudlak syndrome 1 (HPS1) and HPS4 proteins are components of two complexes, BLOC-3 and BLOC-4, involved in the biogenesis of lysosome-related organelles *J Biol Chem* 278, 20332-20337

Chheda, M. G., Ashery, U., Thakur, P., Rettig, J., and Sheng, Z. H. (2001) Phosphorylation of Snapin by PKA modulates its interaction with the SNARE complex *Nat Cell Biol* 3, 331-338

Chou, J. H., and Jahn, R. (2000) Binding of Rab3A to synaptic vesicles *J Biol Chem* 275, 9433-9440

Chou, J. L., Huang, C. L., Lai, H. L., Hung, A. C., Chien, C. L., Kao, Y. Y., and Chern, Y. (2004) Regulation of type VI adenylyl cyclase by snapin, a SNAP25-binding protein *J Biol Chem*

de Duve, C. (1963) Lysosomes. *Ciba Foundation Symposium* edited by A. V. S. de Reuck and M. P. Cameron. London: Churchill, 411-412.

Edelmann, L., Hanson, P. I., Chapman, E. R., and Jahn, R. (1995) Synaptobrevin binding to synaptophysin: a potential mechanism for controlling the exocytotic fusion machine *Embo J* 14, 224-231

Fasshauer, D., Otto, H., Eliason, W.K., Jahn, R. and Brunger, A.T. (1997) Structural changes are associated with soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptor complex formation. *J. Biol. Chem.*, 272, 28036-41.

Fasshauer, D., Sutton, R. B., Brunger, A. T., and Jahn, R. (1998) Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 15781-15786.

Fasshauer, D., Antonin, W., Margittai, M., Pabst, S., and Jahn, R. (1999) Mixed and non-cognate SNARE complexes. Characterization of assembly and biophysical properties *J Biol Chem* 274, 15440-15446

Fasshauer, D., Antonin, W., Subramaniam, V., and Jahn, R. (2002) SNARE assembly and disassembly exhibit a pronounced hysteresis *Nat Struct Biol* 9, 144-151

Feng, D., Crane, K., Rozenvayn, N., Dvorak, A. M., and Flaumenhaft, R. (2002) Subcellular distribution of 3 functional platelet SNARE proteins: human cellubrevin, SNAP-23, and syntaxin 2 *Blood* 99, 4006-4014

Freedman, S. J., Song, H. K., Xu, Y., Sun, Z. Y., and Eck, M. J. (2003) Homotetrameric structure of the SNAP-23 N-terminal coiled-coil domain *J Biol Chem* 278, 13462-13467

Gallwitz, D., and Jahn, R. (2003) The riddle of the Sec1/Munc-18 proteins - new twists added to their interactions with SNAREs *Trends Biochem Sci* 28, 113-116

Gautam, R., Chintala, S., Li, W., Zhang, Q., Tan, J., Novak, E. K., Di Pietro, S. M., Dell'Angelica, E. C., and Swank, R. T. (2004) The Hermansky-Pudlak syndrome 3 (cocoa) protein is a component of the biogenesis of lysosome-related organelles complex-2 (BLOC-2) *J Biol Chem* 279, 12935-12942

Jahn, R. (2004) Principles of exocytosis and membrane fusion *Ann N Y Acad Sci* 1014, 170-178

Giot, L., Bader, J. S., Brouwer, C., Chaudhuri, A., Kuang, B., Li, Y., Hao, Y. L., Ooi, C. E., Godwin, B., Vitols, E., Vijayadamar, G., Pochart, P., Machineni, H., Welsh, M., Kong, Y., Zerhusen, B., Malcolm, R., Varrone, Z., Collis, A., Minto, M., Burgess, S., McDaniel, L., Stimpson, E., Spriggs, F., Williams, J., Neurath, K., Ioime, N., Agee, M., Voss, E., Furtak, K., Renzulli, R., Aanensen, N., Carrolla, S., Bickelhaupt, E., Lazovatsky, Y., DaSilva, A., Zhong, J., Stanyon, C. A., Finley, R. L., Jr., White, K. P., Braverman, M., Jarvie, T., Gold, S., Leach, M., Knight, J., Shimkets, R. A., McKenna, M. P., Chant, J., and Rothberg, J. M. (2003) A protein interaction map of *Drosophila melanogaster* *Science* 302, 1727-1736

Greene, L. A., and Tischler, A. S. (1976) Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor *Proc Natl Acad Sci U S A* 73, 2424-2428

Jahn, R., Schiebler, W., Ouimet, C., and Greengard, P. (1985) A 38,000-dalton membrane protein (p38) present in synaptic vesicles *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 4137-4141

Jahn, R. (2004) Principles of exocytosis and membrane fusion *Ann N Y Acad Sci* 1014, 170-178

Ilardi, J. M., Mochida, S., and Sheng, Z. H. (1999) Snapin: a SNARE-associated protein implicated in synaptic transmission *Nat Neurosci* 2, 119-124

Ishii, M., and Kurachi, Y. (2003) Physiological actions of regulators of G-protein signaling (RGS) proteins *Life Sci* 74, 163-171

Huang, L., Kuo, Y. M., and Gitschier, J. (1999) The pallid gene encodes a novel, syntaxin 13-interacting protein involved in platelet storage pool deficiency *Nat Genet* 23, 329-332

Hunt, R. A., Edris, W., Chanda, P. K., Nieuwenhuijsen, B., and Young, K. H. (2003) Snapin interacts with the N-terminus of regulator of G protein signaling 7 *Biochem Biophys Res Commun* 303, 594-599

Huttner, W. B., Schiebler, W., Greengard, P., and De Camilli, P. (1983) Synapsin I (protein I), a nerve terminal-specific phosphoprotein. III. Its association with synaptic vesicles studied in a highly purified synaptic vesicle preparation *J Cell Biol* 96, 1374-1388

Kamath, R. S., and Ahringer, J. (2003) Genome-wide RNAi screening in *Caenorhabditis elegans* *Methods* 30, 313-321

Lai, H. L., Yang, T. H., Messing, R. O., Ching, Y. H., Lin, S. C., and Chern, Y. (1997) Protein kinase C inhibits adenylyl cyclase type VI activity during desensitization of the A2A-adenosine receptor-mediated cAMP response *J Biol Chem* 272, 4970-4977

Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 *Nature* 227, 680-685

Li, W., Zhang, Q., Oiso, N., Novak, E. K., Gautam, R., O'Brien, E. P., Tinsley, C. L., Blake, D. J., Spritz, R. A., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Amato, D., Roe, B. A., Starcevic, M., Dell'Angelica, E. C., Elliott, R. W., Mishra, V., Kingsmore, S. F., Paylor, R. E., and Swank, R. T. (2003) Hermansky-Pudlak syndrome type 7 (HPS-7) results from mutant dysbindin, a member of the biogenesis of lysosome-related organelles complex 1 (BLOC-1) *Nat Genet* 35, 84-89

Li, W., Rusiniak, M. E., Chintala, S., Gautam, R., Novak, E. K., and Swank, R. T. (2004) Murine Hermansky-Pudlak syndrome genes: regulators of lysosome-related organelles *Bioessays* 26, 616-628

Lloyd, T. E., Verstreken, P., Ostrin, E. J., Phillippi, A., Lichtarge, O., and Bellen, H. J. (2000) A genome-wide search for synaptic vesicle cycle proteins in *Drosophila* *Neuron* 26, 45-50

Martina, J. A., Moriyama, K., and Bonifacino, J. S. (2003) BLOC-3, a protein complex containing the Hermansky-Pudlak syndrome gene products HPS1 and HPS4 *J Biol Chem* 278, 29376-29384

Maxfield, F. R., and McGraw, T. E. (2004) Endocytic recycling *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 121-132

McBride, H. M., Rybin, V., Murphy, C., Giner, A., Teasdale, R., and Zerial, M. (1999) Oligomeric complexes link Rab5 effectors with NSF and drive membrane fusion via interactions between EEA1 and syntaxin 13 *Cell* 98, 377-386

von Mering, C., Krause, R., Snel, B., Cornell, M., Oliver, S. G., Fields, S., and Bork, P. (2002) Comparative assessment of large-scale data sets of protein-protein interactions *Nature* 417, 399-403

Misura, K. M., Scheller, R. H., and Weis, W. I. (2000) Three-dimensional structure of the neuronal-Sec1-syntaxin 1a complex *Nature* 404, 355-362

Mons, N., and Cooper, D. M. (1994) Selective expression of one Ca<sup>2+</sup>-inhibitable adenylyl cyclase in dopaminergically innervated rat brain regions *Brain Res Mol Brain Res* 22, 236-244

Morenilla-Palao, C., Planells-Cases, R., Garcia-Sanz, N., and Ferrer-Montiel, A. (2004) Regulated exocytosis contributes to protein kinase C potentiation of vanilloid receptor activity *J Biol Chem*

Nagy, G., Matti, U., Nehring, R. B., Binz, T., Rettig, J., Neher, E., and Sorensen, J. B. (2002) Protein kinase C-dependent phosphorylation of synaptosome-associated protein of 25 kDa at Ser187 potentiates vesicle recruitment *J Neurosci* 22, 9278-9286

Nagy, G., Reim, K., Matti, U., Brose, N., Binz, T., Rettig, J., Neher, E., and Sorensen, J. B. (2004) Regulation of releasable vesicle pool sizes by protein kinase A-dependent phosphorylation of SNAP-25 *Neuron* 41, 417-429

Nazarian, R., Falcon-Perez, J. M., and Dell'Angelica, E. C. (2003) Biogenesis of lysosome-related organelles complex 3 (BLOC-3): a complex containing the Hermansky-Pudlak syndrome (HPS) proteins HPS1 and HPS4 *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 8770-8775

Nguyen, T., Novak, E. K., Kermani, M., Fluhr, J., Peters, L. L., Swank, R. T., and Wei, M. L. (2002) Melanosome morphologies in murine models of hermansky-pudlak syndrome reflect blocks in organelle development *J Invest Dermatol* 119, 1156-1164

Pabst, S., Hazzard, J. W., Antonin, W., Sudhof, T. C., Jahn, R., Rizo, J., and Fasshauer, D. (2000) Selective interaction of complexin with the neuronal SNARE complex. Determination of the binding regions *J Biol Chem* 275, 19808-19818

Pabst, S., Margittai, M., Vainius, D., Langen, R., Jahn, R., and Fasshauer, D. (2001) Rapid and selective binding to the synaptic SNARE complex suggests a modulatory role of complexins in neuroexocytosis *J Biol Chem* 276, 20000-20006

Palade, G. (1975) Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science*, 189, 347-58.

Piano, F., Schetter, A. J., Morton, D. G., Gunsalus, K. C., Reinke, V., Kim, S. K., and Kemphues, K. J. (2002) Gene clustering based on RNAi phenotypes of ovary-enriched genes in *C. elegans* *Curr Biol* 12, 1959-1964

Pieroni, J. P., Harry, A., Chen, J., Jacobowitz, O., Magnusson, R. P., and Iyengar, R. (1995) Distinct characteristics of the basal activities of adenylyl cyclases 2 and 6 *J Biol Chem* 270, 21368-21373

Di Pietro, S. M., Falcon-Perez, J. M., and Dell'Angelica, E. C. (2004) Characterization of BLOC-2, a complex containing the Hermansky-Pudlak syndrome proteins HPS3, HPS5 and HPS6 *Traffic* 5, 276-283

Phizicky, E., Bastiaens, P. I., Zhu, H., Snyder, M., and Fields, S. (2003) Protein analysis on a proteomic scale *Nature* 422, 208-215

Prekeris, R., Klumperman, J., Chen, Y. A., and Scheller, R. H. (1998) Syntaxin 13 mediates cycling of plasma membrane proteins via tubulovesicular recycling endosomes *J Cell Biol* 143, 957-971

Premont, R. T., Chen, J., Ma, H. W., Ponnappalli, M., and Iyengar, R. (1992) Two members of a widely expressed subfamily of hormone-stimulated adenylyl cyclases Proc Natl Acad Sci U S A 89, 9809-9813

Salim, S., Sinnarajah, S., Kehrl, J. H., and Dessauer, C. W. (2003) Identification of RGS2 and type V adenylyl cyclase interaction sites J Biol Chem 278, 15842-15849

Schneider, S. W. (2001) Kiss and run mechanism in exocytosis J Membr Biol 181, 67-76

Sinnarajah, S., Dessauer, C. W., Srikumar, D., Chen, J., Yuen, J., Yilma, S., Dennis, J. C., Morrison, E. E., Vodyanoy, V., and Kehrl, J. H. (2001) RGS2 regulates signal transduction in olfactory neurons by attenuating activation of adenylyl cyclase III Nature 409, 1051-1055

Sollner, T., Whiteheart, S. W., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempst, P., and Rothman, J. E. (1993a) SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion Nature 362, 318-324

Sollner, T., Bennett, M. K., Whiteheart, S. W., Scheller, R. H., and Rothman, J. E. (1993b) A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion Cell 75, 409-418

Sorensen, J. B., Nagy, G., Varoqueaux, F., Nehring, R. B., Brose, N., Wilson, M. C., and Neher, E. (2003) Differential control of the releasable vesicle pools by SNAP-25 splice variants and SNAP-23 Cell 114, 75-86

Starcevic, M., and Dell'Angelica, E. C. (2004) Identification of Snapin and Three Novel Proteins (BLOS1, BLOS2, and BLOS3/Reduced Pigmentation) as Subunits of Biogenesis of Lysosome-related Organelles Complex-1 (BLOC-1) J Biol Chem 279, 28393-28401

Stinchcombe, J., Bossi, G., and Griffiths, G. M. (2004) Linking albinism and immunity: the secrets of secretory lysosomes Science 305, 55-59

Sudhof, T. C. (2004) The synaptic vesicle cycle Annu Rev Neurosci 27, 509-547



Sun, W., Yan, Q., Vida, T. A., and Bean, A. J. (2003) Hrs regulates early endosome fusion by inhibiting formation of an endosomal SNARE complex *J Cell Biol* 162, 125-137

Sutton RB, Fasshauer D, Jahn R, Brunger AT (1993) Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature*, 1998 Sep 24;395(6700):347-53.

Swank, R. T., Novak, E. K., McGarry, M. P., Rusiniak, M. E., and Feng, L. (1998) Mouse models of Hermansky Pudlak syndrome: a review *Pigment Cell Res* 11, 60-80

Tao-Cheng, J. H., Du, J., and McBain, C. J. (2000) Snap-25 is polarized to axons and abundant along the axolemma: an immunogold study of intact neurons *J Neurocytol* 29, 67-77

Thakur, P., Stevens, D. R., Sheng, Z. H., and Rettig, J. (2004) Effects of PKA-mediated phosphorylation of Snapin on synaptic transmission in cultured hippocampal neurons *J Neurosci* 24, 6476-6481

Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4350-4354

Vites, O., Rhee, J. S., Schwarz, M., Rosenmund, C., and Jahn, R. (2004) Reinvestigation of the role of snapin in neurotransmitter release *J Biol Chem* 279, 26251-26256

Walch-Solimena, C., Blasi, J., Edelmann, L., Chapman, E. R., von Mollard, G. F., and Jahn, R. (1995) The t-SNAREs syntaxin 1 and SNAP-25 are present on organelles that participate in synaptic vesicle recycling *J Cell Biol* 128, 637-645

Wen, J., Arakawa, T., and Philo, J. S. (1996) Size-exclusion chromatography with on-line light-scattering, absorbance, and refractive index detectors for studying proteins and their interactions *Anal Biochem* 240, 155-166

Xu, T., Rammner, B., Margittai, M., Artalejo, A. R., Neher, E., and Jahn, R. (1999) Inhibition of SNARE complex assembly differentially affects kinetic components of exocytosis *Cell* 99, 713-722

Zerial, M., and McBride, H. (2001) Rab proteins as membrane organizers Nat Rev Mol Cell Biol 2, 107-117

Zheng, B., Ma, Y. C., Ostrom, R. S., Lavoie, C., Gill, G. N., Insel, P. A., Huang, X. Y., and Farquhar, M. G. (2001) RGS-PX1, a GAP for GalphaS and sorting nexin in vesicular trafficking Science 294, 1939-1942

## 7 Anhang

### 7.1 Abkürzungen

Abb	Abbildung
BLOC	biogenesis of lysosomal-related organelle complex
BSA	Rinderserumalbumin
CD	circular dichroism
CNBr	cyanogen bromide
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EST	expressed sequence tag
FCS	fetal calf serum
GDI	GDP dissociation inhibitor
GST	Glutathion-S-Transferase)
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl-)piperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
6xHis	Histidin-Tag
HRP	Meerrettichperoxidase
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalaktosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KLH	Keyhole limpet hemocyonin
LB	Luria-Bertani Medium
MALLS	multi-angle laser light scattering
MALDI-MS	matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry
MBS	m-Maleimidobenzoicacid-N-hydroxysuccinimidester
NEM	N-Ethylmaleimid
NMDAR	N-methyl-D-Aspartatrezeptor
NSF	N-ethylmaleimide-sensitive factor
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphate bufferd saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PKA	Proteinkinase A

PKC	Proteinkinase C
PMSF	Phenylmethylylsulfonylfluorid
RGS	regulator of G-protein signaling
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyakrylamidgelelektrophorese
SNAP	soluble NSF attachment protein
SNAP-25	synaptosomal associated protein of 25 kDa
SNAP-23	synaptosomal associated protein of 23 kDa
SNARE	SNAP-receptor
Tab	Tabelle
TB	'terrific broth' Medium
TBS	Tris bufferd saline
TRIS	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminoethan
Vol	Volumen

## 7.2 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Reinhard Jahn, dafür dass er mir die Durchführung der Doktorarbeit in seiner Abteilung ermöglicht hat, für seine jedmögliche Unterstützung und ansteckende Optimismus und Zuversicht.

Beim Professor Ralf Ficner bedanke ich mich für die Übernahme des Korreferats.

Bei dem Graduiertenkolleg 521 bedanke ich mich für die Unterstützung während der ersten drei Jahren meiner Doktorarbeit.

Bei Markus Wahl möchte ich mich für seine Betreuung und seinen Kampfgeist beim Kristallisieren von Snapin bedanken.

Sehr herzlich möchte ich mich bei dem guten Geist dieses Labors, Gottfried Mieskes, bedanken. Für seine enorme Geduld und Hilfsbereitschaft und Erfindungsgeist bei Lösung aller Probleme technischer und seelischer Art.

Ursel Ried danke ich ganz herzlich für die enorme Hilfe bei der Proteinexpression, Gordon Dowe danke ich für die Sequenzierung von unzähligen DNA-Konstrukten und Uwe Pleßmann für die Sequenzierung von Proteinfragmenten. Für die MALDI-MS-Analysen bedanke ich mich ganz herzlich bei Henning Urlaub.

Ich möchte mich bei Dirk Fasshauer für die Hilfe mit Anisotropiemessungen bedanken.

Dorothea Schierding gilt ganz besonderer Dank für die Korrektur dieser Doktorarbeit, die sie um einiges leserlicher gemacht hat.

Ich bedanke mich bei allen meinen Kollegen, alten und neuen, nicht nur aus dieser Abteilung, die mir in diesen Jahren mit viel Hilfsbereitschaft zur Seite gestanden haben.

Ich bedanke mich bei meinen Eltern, Großeltern und Freunden dafür, dass sie mich lieben.

### **7.3 Publikationen**

Teile dieser Studie wurden publiziert in

Vites, O., Rhee, J. S., Schwarz, M., Rosenmund, C., and Jahn, R. (2004) Reinvestigation of the role of snapin in neurotransmitter release *J Biol Chem* 279, 26251-26256

## 7.4 Lebenslauf

Name: Olga Vites  
Geburtsdatum: 09.11.1975  
Geburtsort: Odessa (Ukraine)  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### Schulbildung:

1982-1990 mittlere Schule Nr. 35, Odessa  
1990-1992 naturwissenschaftliches Lyzeum Nr. 36, Odessa  
1992 allgemeine ukrainische Hochschulreife

1993 Studienkolleg Münster,  
Dezember 1993 Fachabitur (Biologie, Medizin)

### Studium:

1994-1999 Studium Diplom Biologie an der Universität zu Köln  
Mai 1999-Nov. 1999 Diplomarbeit an der Universität zu Köln, Institut für Genetik  
Titel der Arbeit „Identifizierung und Charakterisierung *L. monocytogenes* spezifischer Genabschnitte mittels genomischer Subtraktion zwischen *L. monocytogenes* und *L. innocua*“  
Nov. 1999 Diplom in Biologie  
Hauptfach: Genetik, Nebenfächer Biochemie und physikalische Chemie  
Nov.1999-Juli 2000 Tätigkeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Universität zu Köln, Institut für Genetik

### Doktorarbeit:

seit August 2000 Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Abteilung Neurobiologie, Göttingen