



GEORG-AUGUST-UNIVERSITÄT  
GÖTTINGEN

Der Syntaxin 1-*Cluster* –  
Organisation und Dynamik einer supramolekularen  
Struktur der Plasmamembran

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten

der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Jochen Josef Sieber

aus Ochsenfurt am Main

Göttingen 2007

D 7

Referent: *Professor Dr. Reinhard Jahn*

Korreferent: *Professor Dr. Ernst Wimmer*

Tag der mündlichen Prüfung: 04.05.2007

**Eidesstattliche Erklärung:**

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass ich die vorliegende Arbeit:  
„Der Syntaxin 1-*Cluster* – Organisation und Dynamik einer  
supramolekularen Struktur der Plasmamembran“  
selbständig verfasst und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe.

Göttingen, 20.03.2007

Jochen Josef Sieber

**Erklärung:**

Teile dieser Arbeit wurden bereits vorab veröffentlicht.

Sieber, J.J., K.I. Willig, R. Heintzmann, S.W. Hell, und T. Lang. 2006. The SNARE Motif Is Essential for the Formation of Syntaxin Clusters in the Plasma Membrane. *Biophys J.* 90:2843-51.

Ein weiteres Manuskript befindet sich gerade im Begutachtungsprozess.

Sieber, J.J., K.I. Willig, C. Kutzner, C. Gerding-Reimers, B. Harke, G. Donnert, B. Rammner, C. Eggeling, S.W. Hell, H. Grubmüller, und T. Lang. Anatomy and Dynamics of a supramolecular Membrane Protein Cluster. Im Begutachtungsprozess.

# Danksagung

Bei *Prof. Dr. Reinhard Jahn* möchte ich mich für die herzliche Aufnahme in seine Abteilung bedanken.

Bei *Dr. Thorsten Lang* bedanke ich mich für die Überlassung des spannenden Themas, für die intensive Betreuung und seine stete Diskussionsbereitschaft.

Für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens vielen Dank an *Prof. Dr. Ernst Wimmer*. Ferner möchte ich mich bei ihm, wie auch bei *Prof. Dr. Gerhard Braus*, für die Bereitschaft bedanken, mir die Nebenfachprüfung abzunehmen.

Herzlich bedanke ich mich außerdem bei

*Prof. Dr. Stefan Hell, Dr. Katrin I. Willig, Gerald Donnert, Benjamin Harke, Prof. Dr. Helmut Grubmüller* und *Dr. Carsten Kutzner* für die stets gute und produktive Zusammenarbeit und die Bereitstellung einiger der in dieser Arbeit diskutierten Daten.

*Claas Gerding-Reimers* für die Bereitstellung von Daten aus seiner Diplomarbeit. Das Arbeiten mit ihm hat viel Spaß gemacht.

*Dr. Rainer Heintzmann* für die freundliche Hilfe bei der Automatisierung eines Teils der Datenanalyse.

*Dr. Dagmar Schütz, Dr. Felipe E. Zilly* und *Dr. Matthew Holt* für die Bereitstellung von Plasmiden und rekombinanten Proteinen.

*Dr. Thorsten Lang, Dr. Felipe E. Zilly, Alexander Stein* und *Jana Löber* für ihre konstruktiven Anmerkungen zur vorliegenden Arbeit.

*Dr. Matthew Holt* für seine stete Bereitschaft zur Korrektur englischer Texte.

der gesamten Abteilung Neurobiologie und natürlich besonders der alten und neuen Besetzung meines Ecklabors für die gute Arbeitsatmosphäre. Mein spezieller Dank geht an *Dr. Gottfried Mieskes* für seine stets freundliche Art und seine Hilfsbereitschaft bei jedem wissenschaftlichen oder technischen Problem.

der Abteilung NanoBiophotonik, allen voran *Dr. Katrin I. Willig*, für die stets freundliche Aufnahme und eine angenehme und intensive Zusammenarbeit.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie und natürlich *Jana Löber* für ihr Verständnis, ihre Unterstützung und nicht zuletzt ihre Geduld nicht nur während der letzten dreieinhalb Jahre bedanken.

# Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis .....	I
Abkürzungsverzeichnis .....	III
1 Abstract .....	1
2 Kurzfassung .....	3
3 Einleitung .....	5
3.1 Die Organisation der Zellmembran .....	5
3.1.1 Das <i>Davson-Danielli-Robertson</i> -Modell .....	6
3.1.2 Das <i>Benson</i> -Modell .....	7
3.1.3 Das <i>Fluid-Mosaic</i> -Modell .....	8
3.1.4 Die Heterogenität der Zellmembran .....	9
3.1.5 Die <i>Lipid-Raft</i> -Hypothese .....	11
3.1.6 Die <i>Lipid-Shell</i> -Hypothese .....	14
3.1.7 <i>Compartmentalized-Fluid</i> -Modell .....	15
3.1.8 Domänen-Bildung durch <i>Diffusional-Trapping</i> .....	16
3.2 SNAREs .....	18
3.3 Die Syntaxine .....	22
3.4 Syntaxin- <i>Cluster</i> der Plasmamembran .....	24
3.5 Eingesetzte Untersuchungsmethoden .....	26
3.5.1 <i>Membrane-Sheets</i> .....	26
3.5.2 STED-Mikroskopie .....	28
4 Zielsetzung .....	30
5 Materialien und Methoden .....	31
5.1 Materialien .....	31
5.1.1 Verwendete Materialien, Lösungen und Chemikalien ....	31
5.1.2 PC12-Zellkultur-Medium .....	31
5.1.3 BHK-Zellkultur-Medium .....	31
5.1.4 Zytomix .....	32
5.1.5 Ringer-Lösung .....	32
5.1.6 PBS .....	32
5.1.7 Sonifizierungspuffer .....	32
5.1.8 PFA-Lösung .....	32
5.1.9 Lysepuffer .....	32

5.1.10	Rekombinantes Syntaxin 1A .....	33
5.1.11	Antikörper .....	33
5.1.12	Enzyme .....	34
5.2	Methoden .....	35
5.2.1	Plasmide .....	35
5.2.2	Beschichtung der Deckgläser mit Poly-L-Lysin .....	37
5.2.3	PC12-Zellkultur .....	38
5.2.4	BHK-Zellkultur .....	39
5.2.5	Transfektion .....	40
5.2.6	SDS-PAGE- und quantitativer <i>Western-Blot</i> .....	40
5.2.7	Generierung von <i>Membrane-Sheets</i> .....	42
5.2.8	Antikörperfärbung von <i>Membrane-Sheets</i> .....	43
5.2.9	Fluoreszenzmikroskopie von <i>Membrane-Sheets</i> .....	44
5.2.10	<i>Co-Clustering</i> -Experimente .....	45
5.2.11	Beobachtung des Sx1A-GFP-Fluoreszenzmusters .....	46
5.2.12	Konfokale Laser-Rastermikroskopie .....	46
5.2.13	Bestimmung des Durchmesser einer PC12-Zelle .....	47
5.2.14	FRAP-Experimente mit intakten Zellen .....	47
5.2.15	FRAP-Experimente mit <i>Membrane-Sheets</i> .....	49
5.2.16	STED-Mikroskopie .....	50
5.2.17	Analyse der Dichte der Syntaxin 1- <i>Cluster</i> .....	50
5.2.18	Korrelationsanalyse .....	51
5.2.19	Kolokalisationsanalyse .....	52
6	Ergebnisse .....	54
6.1	Verhältnis von Syntaxin 1-Molekülen zu <i>Clustern</i> .....	54
6.1.1	Anzahl der Syntaxin 1-Moleküle pro PC12-Zelle .....	54
6.1.2	Bestimmung der PC12-Zelloberfläche .....	55
6.1.3	Bestimmung der Dichte der Syntaxin 1- <i>Cluster</i> .....	56
6.2	Bestimmung der Größe der Syntaxin 1- <i>Cluster</i> .....	58
6.3	Spezifität des Syntaxin- <i>Clusterings</i> .....	60
6.4	Syntaxin 1- <i>Clustering</i> ist unabhängig von Ko-Faktoren .....	63
6.4.1	Syntaxin 1A-GFP bildet auch in BHK-Zellen <i>Cluster</i> .....	63
6.4.2	Überexpression von Syntaxin 1A in PC12-Zellen .....	64
6.5	Das SNARE-Motiv ist essentiell für korrektes <i>Co-Clustering</i> .....	68

6.5.1	<i>Co-Clustering</i> -Experimente der Syntaxin 1A-Reihe .....	70
6.5.2	<i>Co-Clustering</i> -Experimente der Syntaxin 4-Reihe.....	72
6.6	Untersuchungen zur Mobilität von Syntaxin .....	74
6.6.1	Die Syntaxin-Diffusion in der Zellmembran ist eingeschränkt.....	74
6.6.2	Die eingeschränkte Syntaxin-Diffusion wird durch den <i>Clustering</i> -Mechanismus vermittelt .....	77
6.6.3	Ein großer Teil des SNARE-Motivs wird für die <i>Clustering</i> -Reaktion benötigt .....	79
6.6.4	Syntaxin 1 zeigt das gleiche Diffusionsverhalten in intakten PC12-Zellen und <i>Membrane-Sheets</i> .....	82
6.6.5	Syntaxin 1- <i>Cluster</i> sind stationär.....	84
7	Diskussion .....	87
7.1	Homo-Oligomerisierung der SNARE-Motive ist essentiell für korrektes Syntaxin- <i>Clustering</i> .....	87
7.2	Syntaxin 1- <i>Cluster</i> sind stationäre, dynamische Strukturen ..	89
7.3	Die Mobilität von Syntaxin wird durch den <i>Clustering</i> -Prozess bestimmt.....	90
7.4	Beschreibung des Syntaxin- <i>Clusterings</i> als selbstorganisierenden dynamischen Prozess .....	92
7.5	Physiologische Bedeutung des <i>Clusterings</i> .....	98
7.6	Syntaxin 1- <i>Clustering</i> und Cholesterol .....	101
7.7	Ist der Syntaxin 1- <i>Cluster</i> ist ein <i>Membrane-Raft</i> ? .....	103
7.8	<i>Membrane-Patterning</i> als ein Zusammenspiel von Lipid- und Protein-Interaktionen .....	104
8	Literaturverzeichnis.....	106
9	Anhang .....	115
9.1	Bestimmung der PSF .....	115
9.2	Bestimmung der <i>Cluster</i> -Größe.....	115
9.3	Computer-Simulation.....	116
9.4	<i>In silico</i> Rekonstruktion.....	121
	Lebenslauf .....	122

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Schematische Darstellung von Membranmodellen des Jahres 1966 .....	7
Abb. 2	Das <i>Fluid-Mosaic</i> -Modell .....	9
Abb. 3	Einteilung der Domänen biologischer Membranen anhand ihrer Größe.....	10
Abb. 4	Die <i>Lipid-Raft</i> -Hypothese .....	12
Abb. 5	<i>Fence</i> -Modell und <i>Picket</i> -Modell.....	16
Abb. 6	Diffusion und Domänen-Bildung .....	17
Abb. 7	Die <i>Zipper</i> -Hypothese der SNARE-vermittelten Membranfusion .....	19
Abb. 8	Der neuronale SNARE-Komplex.....	21
Abb. 9	Syntaxin 1 .....	22
Abb. 10	Die Herstellung von <i>Membrane-Sheets</i> .....	26
Abb. 11	Jablonski-Diagramm .....	28
Abb. 12	STED-Mikroskopie .....	29
Abb. 13	Konstrukte.....	36
Abb. 14	Quantitativer <i>Western-Blot</i> für Syntaxin 1 .....	55
Abb. 15	Bestimmung des PC12-Zelldurchmessers.....	56
Abb. 16	STED-Mikroskopie zur Bestimmung der Syntaxin 1- <i>Cluster</i> -Dichte.....	58
Abb. 17	Bestimmung der Größe der Syntaxin 1- <i>Cluster</i> .....	59
Abb. 18	Die Konzentration von Syntaxinen in <i>Clustern</i> ist ein sehr spezifischer Prozess .....	62
Abb. 19	Syntaxin 1A-GFP bildet auch in BHK-Zellen <i>Cluster</i> .....	64
Abb. 20	Überexpression von Syntaxin 1A-GFP in PC12-Zellen.....	65
Abb. 21	Überexpression von Syntaxin 1A in PC12-Zellen und Untersuchung mittels STED-Mikroskopie .....	66
Abb. 22	Korrelation von Syntaxin 1- <i>Level</i> und <i>Cluster</i> -Dichte.....	68
Abb. 23	<i>Co-Clustering</i> -Experimente der Syntaxin 1A-Reihe .....	71
Abb. 24	<i>Co-Clustering</i> -Experimente der Syntaxin 4-Reihe .....	73
Abb. 25	Die Syntaxin-Diffusion innerhalb der Zellmembran ist eingeschränkt.....	76

Abb. 26	<i>Clustering</i> ist der Grund für die eingeschränkte Syntaxin-Diffusion.....	78
Abb. 27	Der größte Teil des SNARE-Motivs wird für das <i>Clustering</i> benötigt.....	80
Abb. 28	Diffusionsgeschwindigkeit und Grad der Überexpression.	82
Abb. 29	Vergleich des Diffusionsverhaltens von Syntaxin 1 in intakten Zellen und <i>Membrane-Sheets</i> .....	83
Abb. 30	Syntaxin 1- <i>Cluster</i> sind stationär .....	86
Abb. 31	Computer-Simulation der lateralen Diffusion von Syntaxin 1 .....	94
Abb. 32	Zwei alternative Modelle für supramolekulares Syntaxin ..	97

## Abkürzungsverzeichnis

2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
Abb.	Abbildung
ATP	Adenosyltriphosphat
BHK	<i>Baby-Hamster-Kidney</i>
BP	<i>Bandpass</i>
BSA	Rinderserumalbumin
CCD	<i>Charge-coupled-Device</i>
CMV	Cytomegalovirus
DDR-Modell	<i>Davson-Danielli-Robertson-Modell</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DRM	<i>Detergent-resistant-Membrane</i>
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)-tetraessigsäure
FFT	Fast-Fourier-Transformation
FRAP	<i>Fluorescence-Recovery-after-Photobleaching</i>
GFP	grün-fluoreszierendes Protein
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GUV	<i>Giant-unilamellar-Vesicle</i>
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure
HRP	Meerrettich-Peroxidase
$l_d$	<i>liquid disordered</i>
$l_o$	<i>liquid ordered</i>
LP	<i>Longpass</i>
MDCK	<i>Madin-Darby-canine-Kidney</i>
mEGFP	monomeres grün-fluoreszierendes Protein
Min.	Minute
MPI	Max-Planck-Institut
NSF	<i>N-ethylmaleimide-sensitive-Factor</i>
N-term.	N-terminal
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PC12	Phaeochromozytom
PFA	Paraformaldehyd
PSF	<i>Point-Spread-Function</i>
RESOLFT	<i>Reversible-saturable-optical-Fluorescence-Transition</i>
ROI	<i>Regions-of-Interest</i>
RT	Raumtemperatur
Sb	Synaptobrevin
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sek.	Sekunde
Sn	SNARE-Motiv von SNAP-25
SNAP	<i>Soluble-NSF-Attachment-Protein</i>
SNAP-25	<i>Synaptosome-associated-Protein of 25 kDa</i>
SNARE	<i>SNAP-Receptor</i>
Std.	Stunde
STED	<i>Stimulated-Emission-Depletion</i>
Sx	Syntaxin
Tab.	Tabelle
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween
TIRF	<i>Total-internal-Reflection-Fluorescence</i>
TMA-DPH	1-(4-Trimethyl-Ammoniumphenyl)-6-Phenyl-1,3,5-Hexatrien-p-Toluolsulfonat
TMR	Transmembranregion
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>Unit</i>
v/v	Volumeneinheit pro Volumeneinheit
w/v	Gewichtseinheit pro Volumeneinheit

# 1 Abstract

The plasma membrane of a eukaryotic cell shows much more lateral heterogeneity as would be expected according to the fluid mosaic model proposed by *Singer* and *Nicolson* in 1972. Many proteins are not uniformly distributed but enrich in so-called membrane domains. How this heterogeneity of the plasma membrane is achieved has not been finally clarified yet, and hypothesis and theories addressing this topic at least partially contradict each other.

The SNARE protein syntaxin 1, that concentrates in so-called clusters, at which secretory vesicles preferentially dock and fuse, is an example of a Type-IV membrane protein that is not uniformly distributed.

In this thesis density and size of Syntaxin 1 clusters were determined by STED microscopy in collaboration with department of NanoBiophotonics (head: *Prof. Dr. Stefan Hell*) of the Max-Planck-Institute (MPI) of biophysical chemistry (Göttingen). On average 20 of these 50 – 60 nm sized structures were found per micrometer of plasma membrane in PC12 cells. Furthermore a ratio of syntaxin molecules to clusters of ca. 90:1 was determined.

Also the mechanism of formation and maintenance of these structures was investigated. Clustering seems to occur in a highly specific manner and to distinguish between closely related syntaxins, as syntaxin 1 and 4 were found in strictly separated clusters within the plasma membrane of PC12 cells. Further the ability to form syntaxin 1 clusters was shown to be intrinsic to the protein itself and most likely independent of further cofactors, besides maybe lipids. In detail the process seems to occur via homo-oligomerisation mediated by the SNARE motifs. This oligomerisation also seems to be the reason for the restricted mobility of the protein within the plasma membrane.

In this context it has to be mentioned that syntaxin 1 clusters appear immobile over 5 min time. Therefore the restricted mobility observed in FRAP experiments at the same time scale is the result of an exchange of single molecules or small oligomers between clusters.

Based on the acquired data a computer simulation of the FRAP experiments was performed in the department of Theoretical and Computational Biophysics (head: *Prof. Dr. Helmut Grubmüller*) at the MPI of Biophysical Chemistry (Göttingen). The obtained results suggest, that in thermodynamic equilibrium 5/6 of the syntaxin 1 molecules are located inside clusters whereas 1/6 is outside of them and freely mobile. The following overall picture regarding organization and dynamics of the syntaxin 1 cluster emerged:

On average 75 syntaxin 1 molecules are temporarily immobilized within a stationary cluster (diffusional trapping). A dynamic exchange of these molecules with freely moving ones, which could be captured by the cluster via homophilic interactions of the SNARE-motifs, takes place. On the other hand it is also possible for cluster-associated proteins to dissociate from this structure. In this scenario clustering of syntaxin 1 represents a dynamic self-organizing process. Finally a speculative model, based on the results of this work is introduced and discussed.

## 2 Kurzfassung

Die Plasmamembran einer eukaryotischen Zelle zeigt weit mehr laterale Heterogenität als man aufgrund des 1972 von *Singer* und *Nicolson* vorgeschlagenen *Fluid-Mosaic*-Modells erwarten würde. Viele Proteine sind nicht uniform verteilt, sondern in sogenannten Membran-Domänen angereichert. Die Frage, wie die Heterogenität der Plasmamembran zustande kommt und über die Zeit erhalten bleibt, ist nicht abschließend geklärt und die diesbezüglich aufgestellten Hypothesen und Theorien sind zum Teil widersprüchlich.

Ein Beispiel eines Typ-IV Membranproteins, das keine uniforme Verteilung zeigt, ist das SNARE-Protein Syntaxin 1, von dem bekannt ist, dass es in sogenannten *Clustern* aufkonzentriert vorkommt, an denen sekretorische Vesikel bevorzugt docken und mit der Plasmamembran verschmelzen.

Mittels STED-Mikroskopie wurde in Zusammenarbeit mit der Abteilung NanoBiophotonik (Leiter: *Prof. Dr. Stefan Hell*) des Max-Planck-Instituts (MPI) für biophysikalische Chemie (Göttingen) die Größe und Dichte des Syntaxin 1-*Clusters* bestimmt und gezeigt, dass sich auf einem Quadratmikrometer PC12-Plasmamembran durchschnittlich etwa 20 dieser im Mittel 50 - 60 nm großen Strukturen befinden. Darüber hinaus wurde ein Verhältnis von Syntaxin-Molekülen zu *Clustern* von ca. 90:1 ermittelt.

Auch wurde der Mechanismus untersucht, über den sich diese Strukturen bilden. Der *Clustering*-Prozess scheint höchst spezifisch abzulaufen und zwischen nahe verwandten Syntaxinen zu unterscheiden. So wurden Syntaxin 1 und Syntaxin 4 in der PC12-Zellmembran in getrennten *Clustern* organisiert gefunden. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Fähigkeit, sich in Syntaxin 1-*Clustern* zu organisieren, eine intrinsische Eigenschaft des Proteins selbst ist, und dass höchstwahrscheinlich keine weiteren Ko-Faktoren, außer vielleicht Lipide, für diesen Prozess benötigt werden. Im Detail scheint der Vorgang durch eine über die SNARE-Motive vermittelte Homo-Oligomerisierung abzulaufen, die auch für die beobachtete

eingeschränkte Mobilität des Proteins in der Plasmamembran verantwortlich ist. In diesem Zusammenhang ist anzumerken, dass Syntaxin 1-*Cluster* über einen Zeitraum von 5 Minuten scheinbar immobil sind. Die in FRAP-Experimenten im selben Zeitrahmen beobachtete eingeschränkte Mobilität ist demnach das Ergebnis eines Austauschs von einzelnen Molekülen oder niedrigen Oligomeren zwischen den *Clustern*.

Eine auf diesen Daten basierende in der Abteilung Theoretische und computergestützte Biophysik (Leiter: *Dr. Helmut Grubmüller*, MPI für biophysikalische Chemie, Göttingen) durchgeführte Computer-Simulation der FRAP-Experimente ergab, dass sich im thermodynamischen Gleichgewicht im Mittel 5/6 der Syntaxin 1-Moleküle innerhalb der stationären *Cluster* befinden und 1/6 außerhalb frei beweglich ist. Es ergibt sich demnach folgendes Gesamtbild der Organisation und Dynamik des Syntaxin 1-*Clusters*:

Im Mittel liegen je etwa 75 Syntaxin 1-Moleküle in einem stationären *Cluster* temporär immobilisiert vor (*Diffusional-Trapping*). Diese Moleküle stehen in einem dynamischen Austausch mit freien (nicht *Cluster*-assoziierten) Molekülen, die vermittelt über homophile Interaktionen der SNARE-Motive vom *Cluster* eingefangen werden können. Im Gegenzug ist es auch möglich, dass sich Moleküle aus dem *Cluster* lösen. Syntaxin 1-*Clustering* stellt in diesem Szenario ein dynamisches selbstorganisierendes System dar. Abschließend wird ein auf den in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnissen basierendes, spekulatives Modell des Syntaxin 1-*Clusters* vorgestellt und diskutiert.

### 3 Einleitung

1839 erkannte Theodor Schwann ausgehend von den Untersuchungen Schleidens, dass Tiere ebenso wie Pflanzen aus Zellen aufgebaut sind (Schwann, 1839). Er postulierte, dass es sich bei der Zelle um ein allgemeines Struktur- und Entwicklungsprinzip der lebenden Materie handele, und gilt als Begründer der Zelltheorie (Wehner, 1995). Die Zelle ist die kleinste, selbstständig lebensfähige Einheit eines Organismus und kann als dessen Grundbausteine betrachtet werden. Die Abgrenzung von der Umgebung durch eine dünne Grenzschicht, die Zellmembran, ist allen lebenden Zellen gemein. Die sogenannte Plasmamembran grenzt nicht nur das intra- vom extrazellulären Milieu ab, sondern stellt auch eine selektiv permeable Barriere dar, an der gerichteter Stoff-, Energie- und Informationsaustausch zwischen Zelle und Umgebung stattfindet (Plattner, 1997; Stryer, 2001; Alberts, 2002).

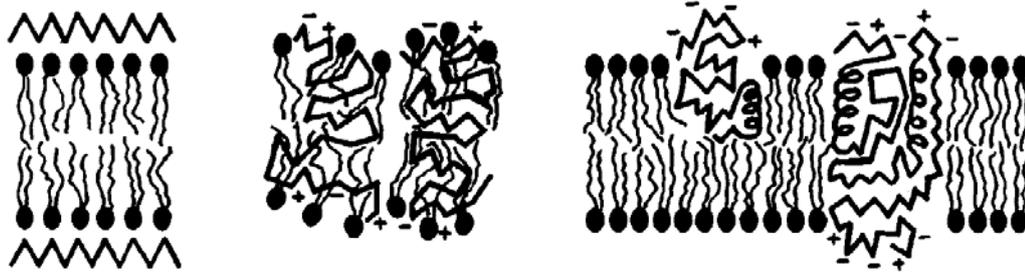
#### 3.1 Die Organisation der Zellmembran

Proteine und Lipide sind die Hauptbestandteile biologischer Membranen, wobei ihre relative Menge je nach Membran- und Zelltyp variiert. So beträgt das Protein/Lipid-Verhältnis der Zellmembran in Thrombozyten 0,7, in HeLa-Zellen dagegen 1,5 (Guidotti, 1972). Es stellt sich die Frage, wie Protein und Lipide organisiert sind, um gemeinsam eine funktionelle Zellmembran mit all ihren biologischen Aufgaben zu bilden. Diese Frage wurde in den 70er Jahren adressiert und führte zum Postulat des *Fluid-Mosaic-Modell* von Singer und Nicolson (Singer und Nicolson, 1972). Zu dieser Zeit bestand noch keine Einigkeit darüber, ob es überhaupt so etwas wie ein grundlegendes Konzept für den Aufbau aller biologischen Membranen gäbe, oder ob jeder Membrantyp als individueller Einzelfall betrachtet werden müsse (Singer, 1971). Es gab eine Vielzahl von Modellen für die Struktur der Zellmembran. Hier werden neben dem *Singer-Nicolson-Modell* zwei zur selben Zeit diskutierte Alternativvorstellungen präsentiert, die aus heutiger Sicht nur noch von historischem Interesse sind. Das *Fluid-Mosaic-Modell* hat sich seinerzeit durchgesetzt und

bestimmt auch heute noch unsere Sicht der Zellmembran. Allerdings haben sich im letzten Jahrzehnt immer mehr Hinweise auf stärkere laterale Heterogenität der Membran ergeben als 1972 von *Singer* und *Nicolson* vorgeschlagen. Im Weiteren werden verschiedene aktuelle Modelle vorgestellt, die versuchen zu erklären, wie die Heterogenität der Zellmembran zu Stande kommt.

### **3.1.1 Das *Davson-Danielli-Robertson-Modell***

Im *Davson-Danielli-Robertson-Modell* (Davson, 1952; Robertson, 1964), auch *Unit-Membrane-Modell* genannt, wird die Membran als durchgängige Phospholipid-Doppelschicht betrachtet, in der sich die hydrophoben Teile der Lipide nach innen orientieren und die polaren Kopfgruppen nach außen gerichtet sind. Die Proteine lagern sich in diesem Modell zum größten Teil im ungefalteten Zustand an der Oberfläche an und bilden so an beiden Seiten der Lipid-Doppelschicht einen Art Proteinfilm (Abb. 1, links). Diese Anordnung ist aus thermodynamischer Sicht ungünstig, da die geladenen Teile der Phospholipide und Proteine zwar miteinander, allerdings kaum mit Wasser in Kontakt stehen und außerdem die nichtpolaren Reste der Aminosäuren nur unvollständig vom Wasser abgeschirmt und diesem so größtenteils ausgesetzt sind (Singer, 1971). Weiter ist es schwierig, die vielen unterschiedlichen Prozesse, die an der Zellmembran in kontrollierter und selektiver Weise ablaufen, mit diesem Modell in Einklang zu bringen.



**Abb. 1** Schematische Darstellung von Membranmodellen des Jahres 1966

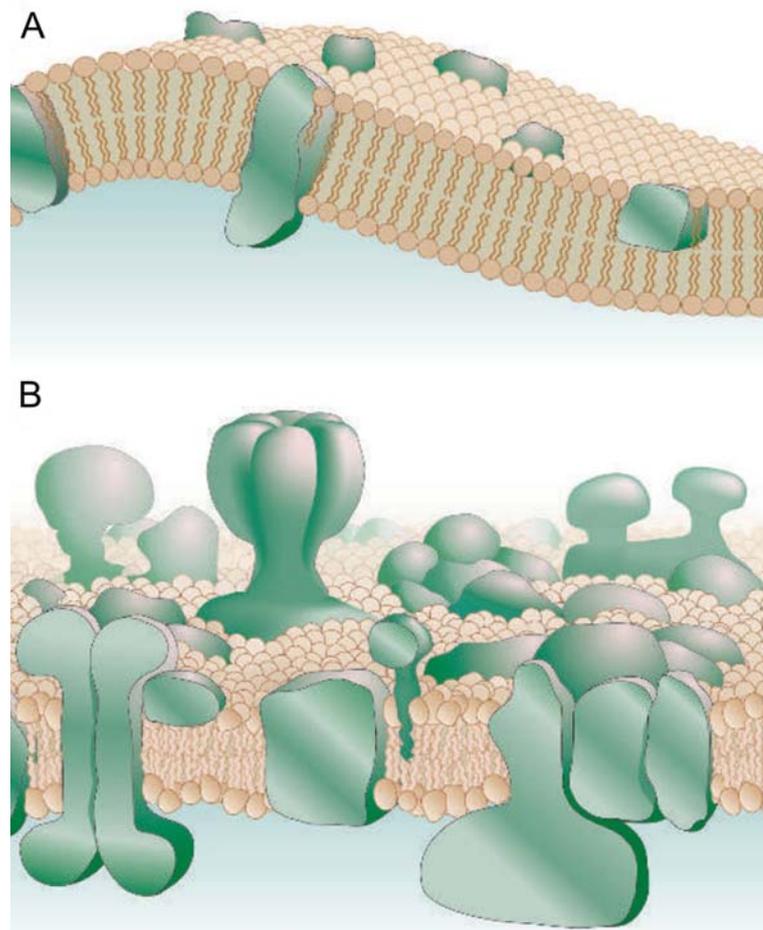
Links ist das *Davson-Danielli-Robertson-Modell*, in der Mitte das *Benson-Modell*, und rechts eine frühe Version des *Lipid-Protein-Mosaik-Modells* schematisch dargestellt. Die Abbildung wurde Singer, 2004 entnommen.

### 3.1.2 Das *Benson-Modell*

Dem *Benson-Modell* (Benson, 1966) nach ist die Membran ein zweidimensionales Lipoprotein-Aggregat, in dem die Proteine zum größten Teil globulär und im Inneren der Membran vorliegen. In diesem Modell sind die Lipide nicht in einer Doppelschicht organisiert, vielmehr stehen ihre Fettsäurereste in Wechselwirkung mit den Aminosäureresten der Proteine und lagern sich an diesen individuell an. Die polaren Kopfgruppen sind dabei an der Oberfläche der Membran zu finden und stehen in Kontakt mit Wasser (Abb. 1, Mitte). Aus energetischer Sicht erscheint dieses Modell wahrscheinlicher als das *Davson-Danielli-Robertson-Modell*, da hier den hydrophoben und hydrophilen Wechselwirkungen eher Rechnung getragen wurde. Allerdings führt der intensive Kontakt der hydrophoben Teile der Proteine und Lipide dazu, dass die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Peptidgruppen hier nicht optimal ausgebildet werden können. Außerdem ist es energetisch ungünstig, dass die Phospholipide keine Doppelschicht bilden, was sowohl im *Davson-Danielli-Robertson-* als auch im *Lipid-Protein-Mosaik-Modell* für eine Maximierung der hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den Fettsäureresten sorgt (Singer, 1971).

### 3.1.3 Das *Fluid-Mosaic-Modell*

Die Anordnung von Proteinen und Lipiden in einer Art Mosaik (Abb. 1, rechts) wurde 1966 in zwei Publikationen unabhängig voneinander vorgeschlagen und 1971 ausführlich aus thermodynamischer Sicht diskutiert (Lenard und Singer, 1966; Wallach und Zahler, 1966; Singer, 1971). Das *Fluid-Mosaic-Modell* (Singer und Nicolson, 1972) baut auf diesen Vorstellungen auf. Proteine und Lipide sind darin thermodynamisch günstig angeordnet. Die Phospholipid-Doppelschicht bildet die flüssige Matrix, in die amphiphatische Proteine eingelagert sind. Die polaren Kopfgruppen der Lipide sowie die hydrophilen Teile der Proteine befinden sich dabei im Kontakt mit Wasser. Die Teile der Proteine, die sich in der Phospholipid-Doppelschicht befinden, sind strukturiert (meist  $\alpha$ -helikal) und können diese unter Umständen vollständig durchspannen. Die Aminosäurereste, die in direktem Kontakt mit den Fettsäureresten stehen, sind dabei überwiegend hydrophob. In diesem Modell können sich Proteine grundsätzlich in lateraler Richtung frei bewegen (Abb. 2A). Diese freie Beweglichkeit ist einer der zentralen Punkte des *Singer-Nicolson-Modells* und wurde stark von dem experimentellen Befund unterstützt, dass sich nach dem Verschmelzen von Zellen deren Oberflächen-Marker rasch durchmischten (Frye und Edidin, 1970).



**Abb. 2** Das *Fluid-Mosaic-Modell*

Das klassische *Singer-Nicolson-Modell* (A) und eine angepasste und aktualisierte Version (B) sind gezeigt. Die Abbildung wurde Engelman, 2005 entnommen.

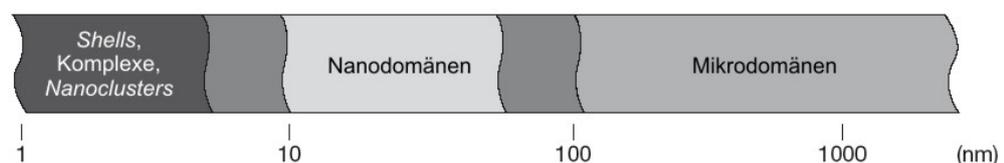
### 3.1.4 Die Heterogenität der Zellmembran

*Singer* und *Nicolson* gingen 1972 davon aus, dass es aufgrund der freien Diffusion in einer nach ihrem Modell aufgebauten Membran im Allgemeinen keine weitere Grobstrukturierung („*long range order*“) gebe, schlossen jedoch Einzelfälle nicht aus, bei denen spezifische Interaktionen die Membran weiter strukturieren könnten. Eingeschränkte Mobilität scheint jedoch eher die Regel als ein Einzelfall zu sein. Die Diffusion der meisten Proteine ist komplizierter als im *Fluid-Mosaic-Modell* vorgeschlagen und weist auf heterogene Proteinverteilung innerhalb der Zellmembran hin (*Jacobson et al.*, 1995). So zeigen unter anderem *Single-Particle-* und *Single-Molecule-*

*Tracking*-Experimente, dass sich zumindest einige Membranproteine, für die die laterale Mobilität von Einzelmolekülen bestimmt wurde, in der Plasmamembran nicht frei bewegen können und transient in definierten Bereichen gefangen sind (Sheets et al., 1997; Dietrich et al., 2002; Fujiwara et al., 2002; Daumas et al., 2003; Douglass und Vale, 2005). In den meisten Darstellungen des *Fluid-Mosaic*-Modells wird die Fläche, die die Lipide einnehmen, übertrieben groß dargestellt (Engelman, 2005). Engelman, der die Ansicht vertritt, dass die Zellmembran eher den Charakter eines Mosaiks als einer Flüssigkeit aufweist, stellte die klassische einer angepassten und aktualisierten Variante des *Fluid-Mosaic*-Modells gegenüber, die dem hohen Proteingehalt und der Heterogenität der Membran Rechnung trägt (Abb. 2).

Da eine Vielzahl unterschiedlicher biologischer Prozesse in kontrollierter Weise an der Membran ablaufen muss, ist eine Segregation bestimmter Proteine aus konzeptioneller Sicht durchaus sinnvoll. Die Frage, wie diese Heterogenität der Zellmembran zustande kommt und über die Zeit erhalten bleibt, steht im Fokus der Arbeit vieler Forschungsgruppen und so existieren unterschiedliche Hypothesen und Modelle.

Anhand der Größe der Anordnungen, die die Proteine und Lipide bilden, können die entstehenden Strukturen als Mikro- bzw. Nanodomänen oder Komplexe, *Shells* bzw. *Nanocluster* eingestuft werden [vgl. Abb. 3 (Jacobson et al., 2007)].



**Abb. 3 Einteilung der Domänen biologischer Membranen anhand ihrer Größe**

Die Protein-Lipid-Zusammenlagerungen können entsprechend ihrer Größe eingeteilt werden. Die Abbildung wurde Jacobson et al., 2007 entnommen und verändert.

Im Folgenden sollen einige zum Teil konkurrierende Modelle vorgestellt werden, die den Versuch unternehmen, die Mechanismen der Feinstrukturierung der Membran zu erklären. Grundsätzlich ist klar, dass Wechselwirkungen von Lipiden und Proteinen unter- und miteinander zur Strukturierung führen. Uneinigkeit herrscht jedoch darüber, welcher dieser Interaktionen bei dem Prozess die ausschlaggebende Rolle zukommt.

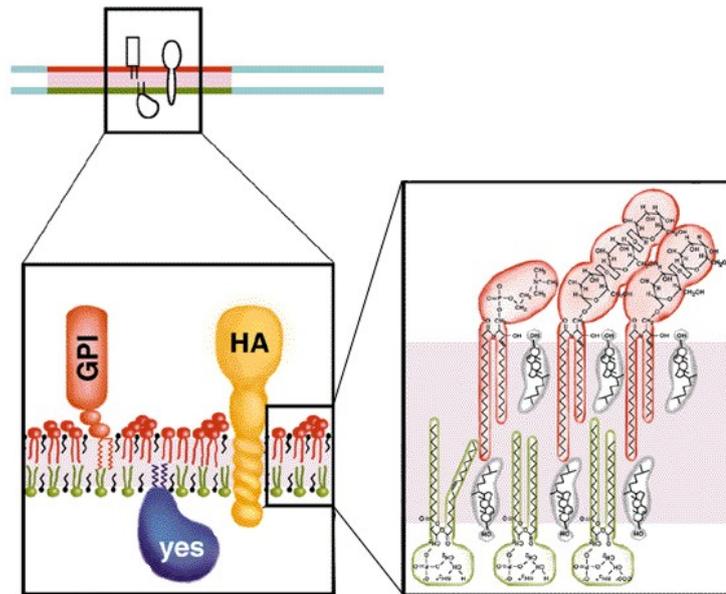
Ein Beispiel ist die *Lipid-Raft*-Hypothese, allerdings wurde in den letzten Jahren der Begriff des *Membrane-Raft* zur Beschreibung dieses Domänen-Typs sehr flexibel eingesetzt, so dass eine präzise Definition nötig wurde. Die auf dem *Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function* gefundene Formulierung kann als kleinster gemeinsamer Nenner im Feld angesehen werden und lautet wie folgt (Pike, 2006):

*„Membrane rafts are small (10 – 200 nm), heterogeneous, highly dynamic, sterol- and sphingolipid-enriched domains that compartmentalize cellular processes. Small rafts can sometimes be stabilized to form larger platforms through protein-protein and protein-lipid interactions.“*

Bemerkenswerterweise wird das ursprüngliche Kriterium für *Raft*-Assoziation (siehe nächsten Abschnitt) nicht mehr als Voraussetzung für die Klassifizierung als *Raft* angesehen.

### **3.1.5 Die *Lipid-Raft*-Hypothese**

Entsprechend der *Lipid-Raft*-Hypothese (Simons und Ikonen, 1997) bilden Sphingolipide und Cholesterol in der Zellmembran Plattformen, sogenannte *Lipid-Rafts*, in denen sich bestimmte Proteine bevorzugt anreichern (Abb. 4).



**Abb. 4 Die Lipid-Raft-Hypothese**

Der *Lipid-Raft*-Hypothese nach assoziieren die Sphingolipide der Plasmamembran über schwache Wechselwirkungen ihrer Kopfgruppen miteinander. Die Kopfgruppen beanspruchen dabei eine größere Fläche als die vorwiegend gesättigten Fettsäurereste dieser Lipide. Die so zustande kommenden Lücken zwischen den Sphingolipiden werden von Cholesterin ausgefüllt. So entstehen enggepackte Sphingolipid-Cholesterin-Cluster, sogenannte *Lipid-Rafts*, in der äußeren Seite der Zellmembran (rot). Zwischen den *Lipid-Clustern* befinden sich ungesättigte Phosphatidylcholin-Moleküle (hellblau). Es wird eine Kopplung der äußeren (rot) und inneren Seite (grün) der Lipid-Doppelschicht angenommen. Durch die Interaktion ihrer Lipid-Anker bzw. Transmembranregionen mit der entsprechenden Lipidumgebung reichern sich in diesem Modell bestimmte Proteine [z.B. Glycosylphosphatidylinositol-(GPI)-verankerte Proteine] selektiv in diesen *Lipid-Rafts* an. Die Abbildung stammt aus Simons und Ikonen, 1997 und wurde verändert.

Es wurde angenommen, dass diese *Lipid-Rafts* gegenüber einer Behandlung mit Detergenz (Triton X-100, 4°C) resistent sind (Simons und Ikonen, 1997). Aufgrund ihres hohen Lipid-Gehalts flotieren die nach dieser Behandlung erhaltenen sogenannten DRMs (*Detergent-*

*resistant-Membranes*) in Dichtegradienten und sind so in den Fraktionen mit niedriger Dichte (den sogenannten *Lipid-Raft*-Fraktionen) zu finden. Wie in Simons und Vaz, 2004 diskutiert, wurde dieses Flotationskriterium in einer großen Anzahl von Veröffentlichungen angewendet, um die Anreicherung von Proteinen in *Lipid-Rafts* zu belegen. Die Interpretation, dass DRMs tatsächlich biologische Strukturen in lebenden Zellen widerspiegeln, wird jedoch sehr kontrovers diskutiert. So wurde gezeigt, dass die Behandlung mit Triton X-100 in Modellmembranen Domänen-Bildung induzieren kann (Heerklotz, 2002). Die Asymmetrie biologischer Membranen lässt außerdem vermuten, dass die beiden Seiten einer Membran unterschiedlich auf das Detergenz reagieren sollten (Munro, 2003). Des Weiteren belegt die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von Zellen nach Triton-Behandlung zweifelsfrei, dass diese eine makroskopische Umstrukturierung der Membran bewirkt (Mayor und Maxfield, 1995). Insgesamt sind die Mechanismen der Bildung von DRMs nur im Ansatz verstanden und es erscheint heute erwiesen zu sein, dass diese nicht die Zusammensetzung von vor der Behandlung in der Zelle existierenden Strukturen widerspiegeln (Edidin, 2001; Munro, 2003; Zurzolo et al., 2003; Simons und Vaz, 2004).

Wie von einigen Verfechtern der *Raft*-Hypothese angeführt, kann die Veränderung des DRM-Anteils eines Proteins im Verlauf eines zellulären Prozesses auf eine Veränderung der Proteininteraktionen hindeuten, z.B. die Anlagerung an die Membranen oder an membrangebundene Interaktionspartner, und so eine durchaus wichtige Informationen darstellen. Über das Flotationsverhalten auf die Strukturierung der Membran vor der Behandlung mit Detergenz zu schließen ist jedoch im besten Fall umstritten, und so wurde auf dem *Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function* die Resistenz gegenüber Detergenzien bewusst nicht in die gemeinsam formulierte Definition für *Membrane-Rafts* aufgenommen (Pike, 2006).

Untersuchungen von Modellmembranen, wie z.B. Liposomen und artifiziellen Lipiddoppelschichten, hat unser Verständnis vom Phasenverhalten einfacher Systeme mit einigen wenigen Komponenten

geprägt. Die Bildung von getrennten *liquid disordered* ( $l_d$ ) und Cholesterol- und Sphingolipid-reichen *liquid ordered* ( $l_o$ ) Phasen in diesen Modellmembranen wird häufig als Argument für die Existenz von *Lipid-Rafts* als *liquid ordered* Phase in lebenden Zellen angeführt. Bei dem Versuch, die in diesen artifiziellen Systemen gewonnenen Erkenntnisse auf biologische Membranen zu übertragen, ist jedoch genau wie bei der Interpretation der DRMs Vorsicht geboten. So weisen Modellmembranen nur einen Bruchteil der Komplexität biologischer Membranen auf, bestehen oft nur aus einigen wenigen Komponenten und beinhalten, wenn überhaupt, nicht die in der Natur vorkommende Fülle unterschiedlicher Proteine (Munro, 2003). Außerdem fehlt ihnen meist die Asymmetrie, die ein essentielles Charakteristikum biologischer Membranen darstellt (Simons und Vaz, 2004). Insgesamt lässt sich sagen, dass die Domänen-Bildung in Modellmembranen einem Satz an Regeln folgt, der sich von dem in intakten Zellen geltenden unterscheidet, jedoch in Teilen durchaus mit diesem überlappen kann (Pike, 2006).

### **3.1.6 Die *Lipid-Shell*-Hypothese**

Die *Lipid-Shell*-Hypothese versucht die Bildung von Komplexen im Nanometerbereich zu erläutern. Dieser Hypothese nach ordnen sich um bestimmte Proteine über verschiedene Mechanismen Schichten spezifischer Lipide mit einem hohen Anteil an Sphingolipiden und Cholesterol an (Anderson und Jacobson, 2002). Diese sogenannten *Lipid-Shells* werden als kleinste Einheiten in der Hierarchie der lateralen Organisation biologischer Membranen angesehen. Es wird angenommen, dass nicht nur integrale sondern auch periphere Membranproteine in der Lage sind, *Lipid-Shells* zu bilden. Weiter wird von diesen Strukturen vermutet, dass sie sehr stabil sind und die „umhüllten“ Proteine aufgrund der Natur der sie umgebenden Lipide bevorzugt in *Lipid-Rafts* sortiert werden. Die Anreicherung bestimmter Proteine bei Flotationsexperimenten in der DRM-Fraktion wird nach dieser Hypothese nicht als direkter Hinweis darauf gewertet, dass diese

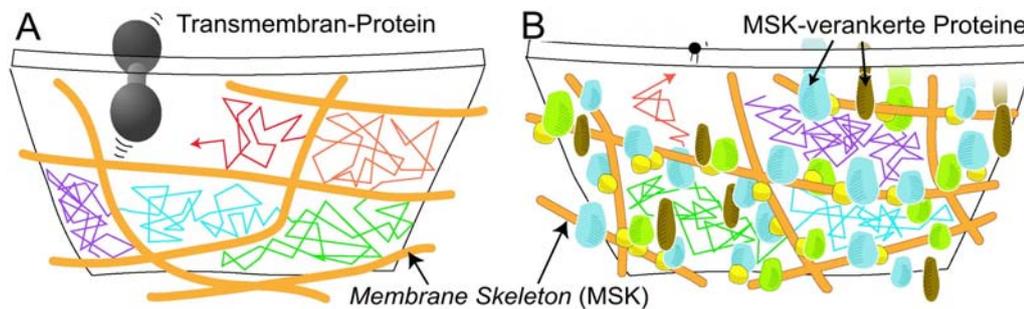
Proteine in *Lipid-Rafts* angereichert sind, sondern dafür, dass diese mit sehr stabilen *Lipid-Shells* umgeben sind, was zu einer niedrigen Dichte und so zu Flotation in der *Lipid-Raft*-Fraktion führt (Anderson und Jacobson, 2002).

### 3.1.7 *Compartmentalized-Fluid-Modell*

Überwiegend basierend auf den Ergebnissen von *Single-Particle*- und *Single-Molecule-Tracking*-Experimenten betrachten Kusumi und Mitarbeiter die Plasmamembran als „*compartmentalized fluid*“ (Kusumi, 2005). Zunächst wurde das *Membrane-Skeleton-Fence*-Modell (Kusumi *et al.*, 1993) vorgeschlagen, demzufolge die Plasmamembran durch das Aktin-Zytoskelett in einzelne Bereiche unterteilt wird. Es wird angenommen, dass sich innerhalb eines solchen Bereichs die Proteine frei bewegen können, dass das Aktin-Zytoskelett jedoch für Proteine mit zytoplasmatischer Domäne eine Barriere zwischen diesen Bereichen darstellt, die diese Proteine nur selten durch *Hop-Diffusion* genannte Ereignisse überwinden und auf diese Weise zwischen benachbarten Bereichen wechseln können (Abb. 5A). Der zytoplasmatische Teil eines Oligomers solcher Proteine ist größer als der eines der Einzelmoleküle, und so ist es für einen Komplex viel schwieriger als für die einzelnen Monomere, die Barriere zu passieren und von einem Kompartiment zum anderen zu wechseln. *Hop-Diffusion*-Ereignisse sind also für Oligomere weit seltener und so werden diese länger in einem entsprechenden Bereich der Membran zurückgehalten. Man spricht von *Oligomerisation-induced-Trapping* (Iino *et al.*, 2001).

Um der Tatsache Rechnung zu tragen, dass teilweise auch Proteine ohne zytoplasmatische Domäne sowie Lipide kein freies Diffusionsverhalten aufweisen, wurde das *Membrane-Skeleton-Fence*-Modell durch das *Anchored-Transmembrane-Picket*-Modell (Abb. 5B) ergänzt (Fujiwara *et al.*, 2002). In diesem wird postuliert, dass einige Proteine mit Transmembrandomänen entweder direkt oder indirekt transient mit dem *Membrane-Skeleton-Fence* assoziiert vorliegen und so eine Art Palisade bilden, die auch für Lipide und Proteine ohne

zytoplasmatische Domäne eine Barriere darstellen und auf diese Weise deren eingeschränktes Diffusionsverhalten erklären kann.

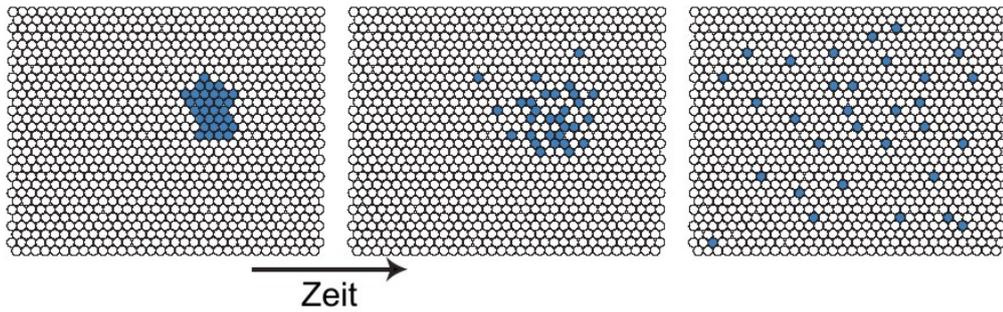
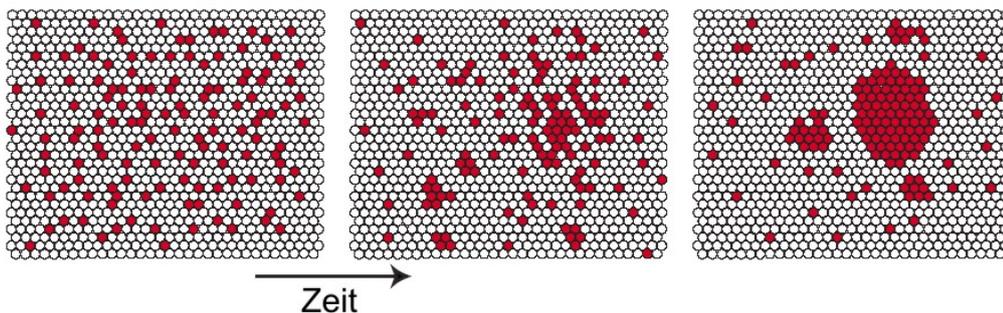


**Abb. 5 Fence-Modell und Picket-Modell**

Es ist das *Membrane-Skeleton-Fence-Modell* (A, auch *Fence-Modell* genannt) und das *Anchored-Transmembrane-Picket-Modell* (B, auch *Picket-Modell* genannt) gezeigt, die dem *Compartmentalized-Fluid-Modell* nach gemeinsam die Mobilität der Membranbestandteile bestimmen. Zytoskeletale Elemente unterteilen dabei unmittelbar bzw. mittelbar die gesamte Zellmembran in kleine Kompartimente, zwischen denen Lipide und Proteine nur gelegentlich durch *Hop-Diffusion* genannte Ereignisse wechseln können. Die Plasmamembran ist vom Zytosol aus gesehen dargestellt. Für beide Modelle ist exemplarisch die Bewegung eines einzelnen Membranbestandteils durch Linien nachgezeichnet. Diesen wurde, um die eingeschränkte Diffusion zu verdeutlichen, nach einem Wechsel zwischen benachbarten Kompartimenten eine neue Farbe zugewiesen. Die Abbildung wurde Kusumi *et al.*, 2005 entnommen und verändert.

### 3.1.8 Domänen-Bildung durch *Diffusional-Trapping*

Brown'sche Molekularbewegung führt in Abwesenheit von spezifischen Wechselwirkungen zwangsläufig zum Verlust von Heterogenität (Abb. 6A). Finden jedoch bevorzugte Interaktionen statt, wechselwirken z.B. in einem aus zwei Komponenten bestehenden System die einzelnen Bestandteile bevorzugt mit ihresgleichen, kommt es durch Diffusion und die selektiven Interaktionen zur Bildung von Domänen (Abb. 6B). Obwohl aus Sicht der Entropie die zufällige Verteilung bevorzugt werden sollte, führt die Minimierung der gesamten freien Energie in diesem Szenario zur teilweisen Trennung der beiden Systemkomponenten und damit zu Heterogenität.

**A Verlust von Heterogenität durch Diffusion****B Bildung von Domänen durch unterschiedliche Wechselwirkungen****Abb. 6 Diffusion und Domänen-Bildung**

Es ist der Effekt von Diffusion auf die Heterogenität eines aus zwei Komponenten bestehenden Systems dargestellt. Herrschen keine unterschiedlichen Wechselwirkungen zwischen den Systembestandteilen, so geht über Zeit die Heterogenität des Systems verloren (A). Interagieren jedoch bevorzugt die gleichen Komponenten miteinander, kommt es zur Bildung von Domänen (B). Die Abbildung ist Marguet *et al.*, 2006 entnommen und wurde verändert.

In der Veröffentlichung, der Abb. 6 entnommen wurde, wurde dies im Zusammenhang mit Lipid-Lipid-Wechselwirkungen und Phasenbildung in der Membran diskutiert (Marguet *et al.*, 2006). Es gibt jedoch keinen Grund diese Gedanken nicht auf Protein-Protein-Wechselwirkungen auszuweiten. Mit Sicherheit herrschen zwischen den vielen unterschiedlichen Proteinen der Plasmamembran zum Teil spezifische Wechselwirkungen, so dass es durchaus vorstellbar ist, dass allein durch Protein-Protein-Wechselwirkungen und Diffusion in der Membran Domänen entstehen können. Basierend auf *Single-Particle-Tracking*-Experimenten wurde für einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor ein Modell vorgeschlagen, in dem das beobachtete eingeschränkte

Diffusionsverhalten allein durch Protein-Protein-Interaktionen und ohne die Notwendigkeit von Barrieren im Sinne des *Fence-* bzw. *Picket-*Modells erklärt wurde (Daumas *et al.*, 2003). Außerdem wurde in Jurkat T-Zellen gezeigt, dass sich vermittelt über spezifische Protein-Protein-Wechselwirkungen unabhängig von *Lipid-Rafts* und Aktin-Interaktionen in der Membran Mikrodomänen bilden können, in denen sich bestimmte Proteine anreichern und von denen andere ausgeschlossen sind (Douglass und Vale, 2005). Dieser Vorgang wird als Domänen-Bildung durch *Diffusional-Trapping* bezeichnet.

### 3.2 SNAREs

Da in der hier vorliegenden Arbeit die Organisation und Dynamik von Syntaxin 1, einem SNARE (*Soluble-N-ethylmaleimide-sensitive-Factor-Attachment-Protein-Receptor*)-Protein, in der Zellmembran untersucht wurde, sollen in diesem Abschnitt die SNAREs vorgestellt werden.

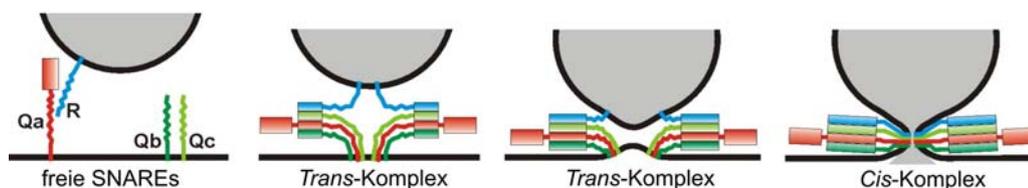
SNAREs spielen bei der Verschmelzung intrazellulärer Membranen eine Schlüsselrolle. Diese kleinen Proteine von meist 100 - 300 Aminosäuren Länge zeichnen sich durch mindestens einen evolutionär konservierten Aminosäureabschnitts von etwa 60 Aminosäuren, das sogenannte SNARE-Motiv, aus und sind an intrazellulären Membranfusionsprozessen beteiligt (Hong, 2005).

Die Proteinsuperfamilie der SNAREs zählt in der Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) 25 und im Menschen 36 Mitglieder, von denen die meisten an ihrem C-terminalen Ende eine einzelne helikale Transmembranregion (TMR) besitzen, die über einen kurzen *Linker* mit dem SNARE-Motiv verbunden ist (Jahn und Scheller, 2006). Die SNARE-Motive von monomeren SNAREs liegen weitgehend unstrukturiert vor (Fasshauer *et al.*, 1997).

Bei den meisten intrazellulären Fusionschritten, abgesehen von der Mitochondrien- und Peroxisomenfusion, wird jeweils ein bestimmter Satz von SNAREs benötigt (Jahn *et al.*, 2003), z.B. interagieren im Fall der neuronalen Exozytose die SNAREs Syntaxin 1 und SNAP-25

(*Synaptosome-associated-Protein of 25 kDa*) der Plasmamembran mit dem Vesikel-assoziiertem SNARE Synaptobrevin 2.

Nach dem Modell der SNARE-vermittelten Membranfusion wird die Fusion einander gegenüberstehender Membranen durch die Energie bewirkt, die frei wird, wenn sich aus vier SNARE-Motiven ein stabiles 4-Helix-Bündel bildet. Entsprechend der *Zipper-Hypothese* (Hanson *et al.*, 1997) muss sich dabei auf den beiden miteinander fusionierenden Membranen je mindestens ein SNARE mit TMR befinden. Die Komplexbildung startet an den N-terminalen Enden der SNARE-Motive in der *Trans*-Konfiguration (die Transmembranregionen befinden sich auf unterschiedlichen Membranen), schreitet dann in Richtung der C-terminalen Membrananker fort und bringt so die Membranen in gegenseitige Nähe. Es wirken mechanische Kräfte auf die Membranen, von denen angenommen wird, dass sie ausreichen, die Energiebarriere der Membranfusion zu überwinden. Schließlich kommt es zur Verschmelzung der Membranen und die beteiligten SNAREs liegen mit ihren Transmembranregionen in derselben Membran parallel angeordnet im sogenannten *Cis*-Komplex vor (vgl. Abb. 7; Brunger, 2005; Jahn und Scheller, 2006).



**Abb. 7 Die Zipper-Hypothese der SNARE-vermittelten Membranfusion**

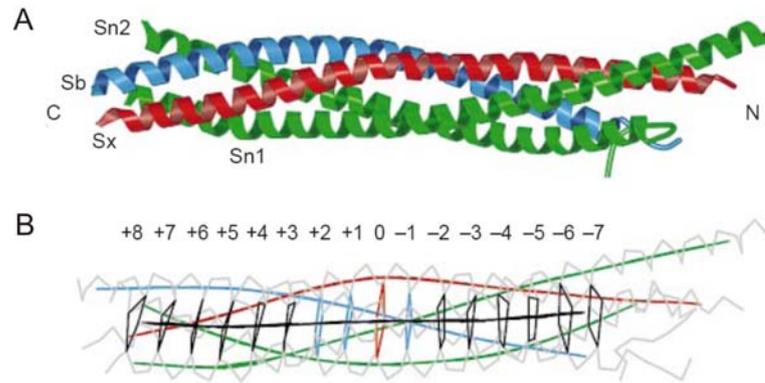
Der *Zipper-Hypothese* nach beginnt die SNARE-Komplex-Bildung am N-Terminus der SNARE-Motive, dabei entsteht zunächst der *Trans*-Komplex, bei dem die Transmembranregionen der beteiligten SNAREs auf unterschiedlichen Membranen vorliegen. Die in Richtung der C-terminalen Membrananker fortschreitende Komplexbildung bringt die beiden Membranen immer stärker in gegenseitige Nähe. Schließlich kommt es zur Membranfusion, nach der die SNAREs im überaus stabilen *Cis*-Komplex vorliegen. Ihre Transmembranregionen sind dabei in derselben Membran angeordnet. Die beteiligten SNAREs können wie später noch im Detail erläutert der  $Q_a$ -,  $Q_b$ -,  $Q_c$ - und R-SNARE-Klasse zugeordnet werden. Die Abbildung stammt aus Jahn *et al.*, 2003 und wurde verändert.

Dieser Komplex ist sehr stabil (Fasshauer *et al.*, 2002) und wird nach seiner Bildung durch NSF (*N-ethylmaleimide-sensitive-Factor*) unter ATP-Verbrauch und Mitwirkung von SNAPs (*Soluble-NSF-Attachment-Proteins*) wieder in die entsprechenden Monomere zerlegt (Sollner *et al.*, 1993).

Die Kristallstruktur des neuronalen SNARE-Core-Komplexes wurde aufgeklärt. Er besteht aus den SNARE-Motiven von Syntaxin 1, SNAP-25 und Synaptobrevin 2 (Sutton *et al.*, 1998). In diesem 4-Helix Bündel werden die Kontakte der Helices überwiegend durch hydrophobe Aminosäureseitenketten vermittelt, die in senkrechten Ebenen zum Helixbündel, sogenannten „*layers of interaction*“, angeordnet sind. Die zentrale Ebene des Komplexes - die sogenannte *Zero-Layer* - stellt, da sie von polaren Aminosäureresten gebildet wird, eine Ausnahme dar und dient als Referenz zur Benennung der 15 weiteren Interaktionsebenen (-7 bis +8, vgl. Abb. 8). Später wurden SNARE-Komplexe kristallisiert, die an anderen Fusionsschritten beteiligt sind. Diese zeigten eine beinahe identische Organisation, was eine stark konservierte, gemeinsame Struktur aller SNARE-Core-Komplexe annehmen lässt (Antonin *et al.*, 2002; Zwilling *et al.*, 2007).

Anhand der zentralen polaren Aminosäure lassen sich die SNARE-Motive in Q-SNAREs (Glutamin) und R-SNAREs (Arginin) einteilen. Die Q-SNAREs können ihrerseits weiter in drei Klassen aufgefächert werden: Die Q<sub>a</sub>-SNAREs (Sytnaxine), die Q<sub>b</sub>-SNAREs und die Q<sub>c</sub>-SNAREs. Funktionelle SNARE-Komplexe bestehen aus je einem Q<sub>a</sub>-Q<sub>b</sub>-, Q<sub>c</sub>- und R-SNARE-Motiv. Dabei kann ein Protein, wie z.B. SNAP-25 im Fall des neuronalen SNARE-Komplexes, auch mehr als ein SNARE-Motiv beitragen (Fasshauer *et al.*, 1998; Bock *et al.*, 2001).

Die SNARE-Proteine zeichnen sich weiter dadurch aus, dass sie in einer Vielfalt von Konfigurationen, Konformationen und oligomeren Zuständen vorkommen können, was es ihnen ermöglicht, in kontrollierter Weise mit den passenden SNARE-Partnern, anderen Proteinen und sich selbst zu interagieren (Brunger, 2005).



**Abb. 8 Der neuronale SNARE-Komplex**

(A) Es ist die Kristallstruktur des neuronalen SNARE-Komplexes, bestehend aus den SNARE-Motiven von Syntaxin 1A (Sx, rot), SNAP-25B (Sn1 und Sn2, grün) und Synaptobrevin 2 (Sb, blau), gezeigt. C und N geben die entsprechenden Enden der SNARE-Motive an. (B) Die *Layers* innerhalb des neuronalen SNARE-Komplexes werden anhand dieser Darstellung deutlich. Die 15 hydrophoben *Layers* sind blau und schwarz, die konservierte polare *Zero-Layer* hingegen rot gezeigt. Die Zahlen bezeichnen die einzelnen Interaktionsebenen, wobei die polare *Zero-Layer* als Bezugspunkt dient. Modifizierte Abbildung aus Sutton *et al.*, 1998.

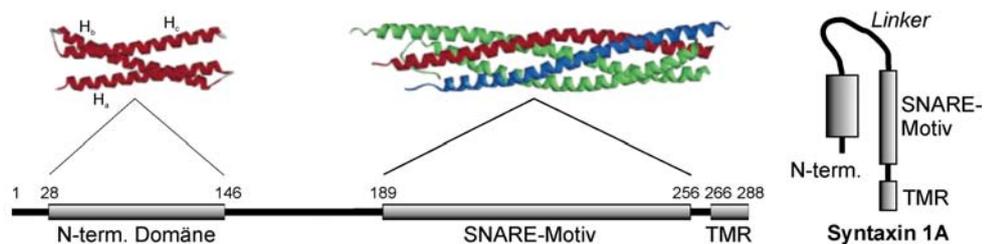
So wurde für die neuronalen SNAREs *in vitro* gezeigt (Fasshauer und Margittai, 2004), dass sich die vier beteiligten SNARE-Motive nicht einfach zufällig zusammenlagern, sondern die SNARE-Komplexbildung in geordneter, sequentieller Weise abläuft. Zunächst lagern sich die SNARE-Motive von Syntaxin 1 und SNAP-25 zum 1:1-Komplex ( $Q_{abc}$ -Komplex) zusammen, mit dem dann das R-SNARE-Motiv Synaptobrevins interagiert und sich so der neuronale SNARE-Core-Komplex bildet. *In vitro* rekrutiert der 1:1-Komplex rasch ein zweites Syntaxin 1 und bildet so den unproduktiven 2:1-Komplex, in dem die Bindungsstelle für Synaptobrevin vom zweiten Syntaxin blockiert wird. Dies wird als der Hauptgrund für die langsame *in vitro* Bildung des neuronalen SNARE-Komplexes angesehen (Fasshauer und Margittai, 2004).

### 3.3 Die Syntaxine

Nach der Beschreibung von Syntaxin 1 (Bennett *et al.*, 1992) wurden rasch auch nicht neuronale Syntaxine identifiziert (Bennett *et al.*, 1993). Mehr als zehn Syntaxine stellen im Menschen die  $Q_a$ -Klasse der SNARE-Proteine und sind an verschiedenen Membranfusionsprozessen beteiligt (Bock *et al.*, 2001; Teng *et al.*, 2001).

Mit Ausnahme von Syntaxin 11 sind alle Syntaxine über eine C-terminale TMR, die sich kurz nach dem SNARE-Motiv anschließt, in der jeweiligen Membran verankert (Teng *et al.*, 2001) und zeigen eine Typ IV-Orientierung, d.h. der N-Terminus und der größte Teil des Proteins liegen im Zytosol vor (Salaun *et al.*, 2004). Eine weitere Gemeinsamkeit aller Syntaxine ist der Besitz einer sich unabhängig faltenden N-terminalen Domäne, die über eine *Linker*-Region mit dem SNARE-Motiv verbunden ist (siehe Abb. 9; Teng *et al.*, 2001).

Genau wie Syntaxin 1 in neuronalen und neuroendokrinen Zellen sind auch Syntaxin 2, 3 und 4 vorwiegend an der Plasmamembran lokalisiert, werden allerdings im Gegensatz zu diesem ubiquitär exprimiert (Bennett *et al.*, 1993).



**Abb. 9**     **Syntaxin 1**

Syntaxin 1A ist ein 288 Aminosäuren großes Transmembranprotein, das sich wie alle Syntaxine durch den Besitz einer unabhängig faltenden N-terminalen Domäne auszeichnet und über sein SNARE-Motiv am neuronalen SNARE-Komplex teilnehmen kann. Rechts ist das in dieser Arbeit verwendete Piktogramm gezeigt. Die Abbildung wurde Margittai *et al.*, 2003 entnommen und modifiziert.

Syntaxin 1 ist als Teil des neuronalen SNARE-Komplexes (vgl. Abb. 8) an der regulierten Exozytose von Granula bzw. synaptischen Vesikeln an der Plasmamembran beteiligt und eines der am intensivsten untersuchten SNARE-Proteine. Hier soll neben der unter 3.2 bereits vorgestellten Bildung des neuronalen SNARE- sowie des 1:1- bzw. 2:1-Komplexes mit SNAP-25 auf weitere Eigenschaften von Syntaxin 1 näher eingegangen werden.

Die über einen flexiblen *Linker* (Margittai *et al.*, 2003) mit dem SNARE-Motiv verbundene N-terminale Domäne von Syntaxin 1 kann auf dieses zurückfalten und Syntaxin so die sogenannte geschlossene Konformation annehmen (Dulubova *et al.*, 1999). Zwei Mutationen in der *Linker*-Region bewirken, dass diese Rückfaltung nicht mehr stattfinden kann und so bevorzugt die offene Konformation des Proteins angenommen wird (Dulubova *et al.*, 1999). Die Struktur der N-terminalen Domäne wurde aufgeklärt (Lerman *et al.*, 2000) und zeigt ein antiparalleles Bündel bestehend aus drei  $\alpha$ -Helices (Abb. 9).

Syntaxin bildet auch Homo-Komplexe. So wurde mit löslichen Proteinen die Homo-Oligomerisierung sowohl des gesamten zytoplasmatischen Teils (Lerman *et al.*, 2000) als auch des SNARE-Motivs von Syntaxin 1 (Margittai *et al.*, 2001; Misura *et al.*, 2001) beobachtet. Unter Verwendung des rekombinant hergestellten Proteins in seiner gesamten Länge bzw. des TMR-Bereichs allein konnte ebenfalls eine Oligomerisierung des Proteins über diesen Bereich festgestellt werden (Laage *et al.*, 2000; Kroch und Fleming, 2006). Inwieweit diese Interaktionen so auch in lebenden Zellen vorkommen, und welche physiologische Bedeutung ihnen beizumessen ist, ist derzeit unklar.

### 3.4 Syntaxin-*Cluster* der Plasmamembran

Syntaxin-*Cluster* wurden zuerst in Lang *et al.*, 2001 beschrieben. In dieser Studie wurde der Syntaxin 1-*Cluster* der Zellmembran von PC12-Zellen (Phaeochromozytom-Zellen) als Struktur von etwa 200 nm Durchmesser charakterisiert, an der sekretorische Granula bevorzugt docken und fusionieren. Auch Syntaxin 4 wurde in der Plasmamembran von *Baby-Hamster-Kidney* (BHK)-Zellen in *Clustern* organisiert gefunden. Diese Eigenschaft scheint allen Syntaxinen der Zellmembran gemein zu sein, da diese nie uniform verteilt, sondern immer in solchen Strukturen vorgefunden wurden (Lang *et al.*, 2001; Ohara-Imaizumi *et al.*, 2004a; Ohara-Imaizumi *et al.*, 2004b; Rickman *et al.*, 2004; Aoyagi *et al.*, 2005; Predescu *et al.*, 2005; Kay *et al.*, 2006; Lopez *et al.*, 2006; Low *et al.*, 2006; Sieber *et al.*, 2006; Vikman *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2006; Taverna *et al.*, 2007)

Im Laufe dieser Doktorarbeit wurde klar, dass die Syntaxine der Plasmamembran (Syntaxin 1-4) trotz ihrer starken Ähnlichkeit [Aminosäureähnlichkeit  $\geq 62\%$  (Bennett *et al.*, 1993)] in separaten *Clustern* vorkommen (Abb. 18, publiziert in Sieber *et al.*, 2006), was zeitgleich auch von einer anderen Arbeitsgruppe veröffentlicht wurde (Low *et al.*, 2006). Unterschiedliche SNARE-vermittelte Membranfusionsprozesse wie die regulierte und konstitutive Exozytose scheinen also an räumlich getrennten Stellen der Zellmembran abzulaufen, die durch Syntaxin-*Cluster* definiert werden. So wurden Syntaxin 4-*Cluster* als die Fusionsstellen für Caveolae mit der basalen Plasmamembran von Endothelzellen beschrieben (Predescu *et al.*, 2005). Weiter docken und fusionieren in verschiedenen Zellen sekretorische Vesikel bevorzugt an Syntaxin 1-*Clustern* der Zellmembran (Lang *et al.*, 2001; Ohara-Imaizumi *et al.*, 2004a; Lopez *et al.*, 2006).

Die räumliche Organisation von Syntaxin 1 hängt vom Cholesterolgehalt der Plasmamembran ab (Chamberlain *et al.*, 2001; Lang *et al.*, 2001; Ohara-Imaizumi *et al.*, 2004a). Eine Absenkung des Cholesterolgehalts durch die Behandlung mit Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin bewirkt einen

teilweisen bzw. vollständigen Zerfall der Syntaxin 1-*Cluster*, was sowohl in PC12-Zellen (Lang *et al.*, 2001) als auch in  $\beta$ -Zellen des Pankreas (Ohara-Imaizumi *et al.*, 2004a) zur Verringerung der regulierten Exozytose führt. Auch wurde die direkte räumliche Nähe von Syntaxin 1 und Cholesterin in Experimenten nachgewiesen, bei denen Syntaxin 1 mit photoaktivierbarem Cholesterin markiert werden konnte (Lang *et al.*, 2001). Diese Experimente suggerieren, dass Cholesterin für die Integrität der Cluster von Bedeutung ist und sich innerhalb dieser befindet.

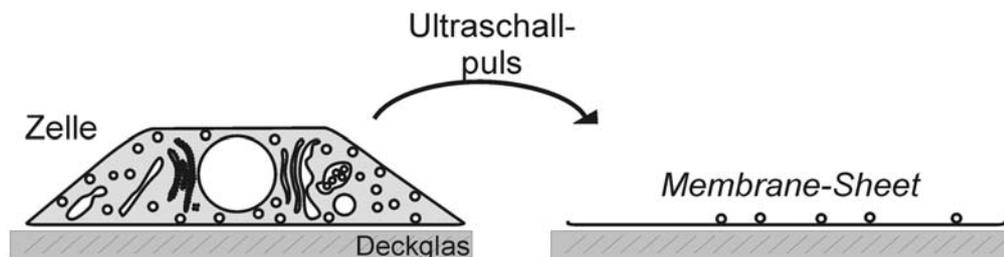
Basierend auf DRM-Experimenten wurde vorgeschlagen, dass die Bildung der Syntaxin 1-Membrandomänen im Sinne der *Lipid-Raft*-Hypothese abläuft (Chamberlain *et al.*, 2001). Neben der unter 3.1.5 bereits erwähnten Frage, inwieweit DRM-Isolationen die Situation in der Zelle widerspiegeln, herrscht im Fall von Syntaxin 1 zusätzlich Uneinigkeit darüber, zu welchem Grad dieses Protein in der *Lipid-Raft*-Fraktion vorkommt. Je nachdem, welche Solubilisierungsbedingungen eingesetzt werden, befindet sich ein kleiner Teil oder kein Syntaxin 1 in der DRM-Fraktion (Chamberlain *et al.*, 2001; Lang *et al.*, 2001; Hering *et al.*, 2003; Aoyagi *et al.*, 2005; Taverna *et al.*, 2007). Daher ist es umstritten, ob Syntaxin 1 den DRMs zugerechnet werden kann. fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zeigen weiter, dass dieses Protein getrennt von den *Lipid-Raft*-Markern Thy1 (Lang *et al.*, 2001) und Flotillin 1 (Ohara-Imaizumi *et al.*, 2004a) vorliegt. Diese Befunde sprechen trotz der unumstrittenen Abhängigkeit von Cholesterin gegen eine Einordnung des Syntaxin 1-*Clusters* als klassisches *Lipid-Raft*.

### 3.5 Eingesetzte Untersuchungsmethoden

In dieser Arbeit wurde der Syntaxin 1-*Cluster* der PC12-Zellmembran näher untersucht. Dabei wurden überwiegend fluoreszenzmikroskopische Methoden und auch quantitative Biochemie angewandt. An dieser Stelle sollen die häufig eingesetzten *Membrane-Sheet*-Proben sowie *Stimulated-Emission-Depletion* (STED)-Mikroskopie - eine neuartige Mikroskopie-Technik, die neben anderen in dieser Arbeit verwendet wurde - näher erläutert werden.

#### 3.5.1 *Membrane-Sheets*

Um *Membrane-Sheet*-Proben herzustellen, wurden in dieser Arbeit auf beschichteten Deckgläsern kultivierte Zellen einem Ultraschallpuls ausgesetzt, der den oberen Teil der Zellen abreißt (viele Zellen werden ganz entfernt). Die zurückbleibenden basalen Plasmamembranen der Zellen, sogenannte *Membrane-Sheets*, stehen dann für weitere Behandlungen zur Verfügung (vgl. Abb. 10; Details sind im Methodenteil unter Punkt 5.2.7 beschrieben).



**Abb. 10** Die Herstellung von *Membrane-Sheets*

Um die in dieser Arbeit häufig verwendeten *Membrane-Sheets* zu erhalten, wurden auf beschichteten Deckgläsern kultivierte Zellen einem Ultraschallpuls ausgesetzt. Dieser entfernt die Zellen vom Deckglas, häufig bleibt jedoch die basale Plasmamembran, das sogenannte *Membrane-Sheet*, zurück und steht für verschiedene Behandlungen und Untersuchungen zur Verfügung. Die Abbildung wurde Lang, 2003 entnommen und verändert.

Die auf die Zellen wirkenden mechanischen Scherkräfte können grundsätzlich auch auf andere Weise als mit einem Ultraschallpuls

erzeugt werden. So wurden auch ein Flüssigkeitsstrom (Clarke *et al.*, 1975; Vacquier, 1975) bzw. das rasche Entfernen eines von zwei Deckgläsern, an denen die Zellen adhärirt sind (Rutter *et al.*, 1986; Fujimoto *et al.*, 1991), eingesetzt. *Membrane-Sheets* wurden bereits in den 70er Jahren in der Elektronenmikroskopie als Proben verwendet (Clarke *et al.*, 1975; Mazia *et al.*, 1975; Vacquier, 1975). Seit Beginn der 90er Jahre wird diese Membran-Präparation auch in fluoreszenzmikroskopischen Studien eingesetzt (Fujimoto *et al.*, 1991; Avery *et al.*, 2000; Lang *et al.*, 2001; Chamberlain und Gould, 2002; Lang *et al.*, 2002; Predescu *et al.*, 2005; Zilly *et al.*, 2006; Taverna *et al.*, 2007).

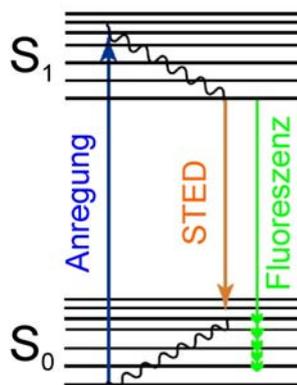
*Membrane-Sheets* stellen eine 100% reine Plasmamembran-Präparation dar, die innerhalb von Sekunden hergestellt werden kann (Lang, 2003). So wird die zytosolische Seite der Zellmembran zugänglich, ohne dass der Einsatz von Detergenzien zur Permeabilisierung der Zelle nötig wäre. Die Membranproteine befinden sich in ihrer natürlichen Umgebung, und frische *Membrane-Sheets* spiegeln so die Situation in der nativen Plasmamembran wider. Es können Behandlungen mit definierten Reaktionsbedingungen durchgeführt werden. Der Effekt der Behandlung kann während dieser oder nach Fixation und falls nötig immunohistochemischer Färbung mit einem Fluoreszenzmikroskop untersucht werden. So können sowohl morphologische als auch quantitative Daten erhalten werden. *Membrane-Sheets* sind durch ihre annähernde Zweidimensionalität sehr gut für derartige Untersuchungen geeignet, da keine Hintergrundfluoreszenz von außerhalb der Fokusebene das eigentliche Signal stört.

In der Abteilung Neurobiologie des MPI für biophysikalische Chemie (Göttingen) wurde die fluoreszenzmikroskopische Analyse von *Membrane-Sheets* bereits eingesetzt, um die Verteilung und Reaktivität von an der Exozytose beteiligten Proteinen (Lang *et al.*, 2001; Lang *et al.*, 2002; Zilly *et al.*, 2006), bestimmte Lipide (Milosevic *et al.*, 2005) und auch die Fusion sekretorischer Vesikeln mit der Plasmamembran (Avery *et al.*, 2000; Holroyd *et al.*, 2002) zu untersuchen.

### 3.5.2 STED-Mikroskopie

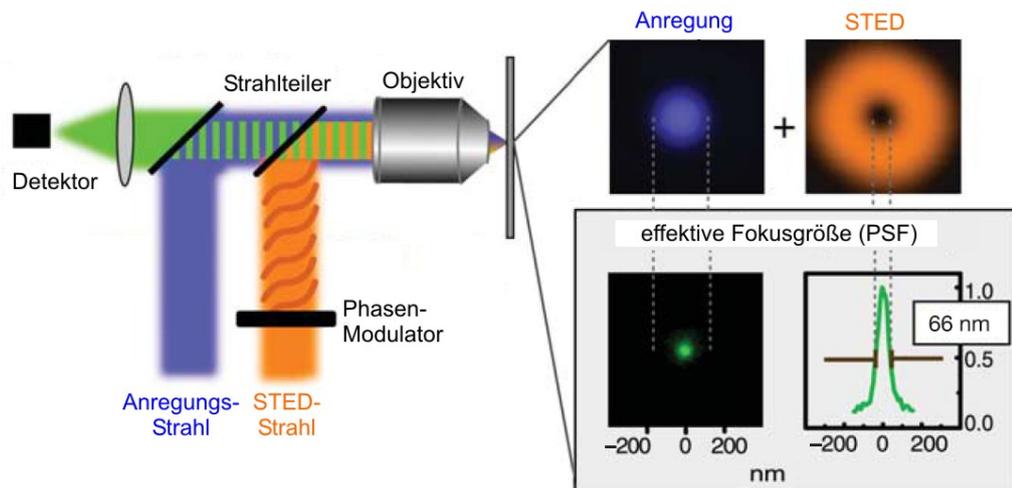
Die STED-Mikroskopie (Hell und Wichmann, 1994) ist das erste realisierte Beispiel (Klar *et al.*, 2000) aus der Gruppe der *Reversible-saturable-optical-Fluorescence-Transition* (RESOLFT)-Techniken, die Lichtmikroskopie mit nicht länger beugungslimitierter Auflösung in Aussicht stellen. Theoretische Grundlagen sind in (Hell *et al.*, 2004) näher erläutert und in Abbildung 11 und 12 kurz dargestellt.

Durch diese neuartige Mikroskopie-Technik konnten in letzter Zeit eine Reihe biologischer Fragen adressiert werden, die durch konventionelle Lichtmikroskopie mit beugungslimitierter Auflösung nur unzureichend beantwortet werden konnten (Fitzner *et al.*, 2006; Kittel *et al.*, 2006; Sieber *et al.*, 2006; Willig *et al.*, 2006; Kellner *et al.*, 2007). Durch die Zusammenarbeit mit *Prof. Dr. Stefan Hell* (Abteilung NanoBiophotonik, MPI für biophysikalische Chemie, Göttingen) wurde die STED-mikroskopische Untersuchung der *Syntaxin 1-Cluster* der PC12-Zellmembran im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit möglich.



**Abb. 11 Jablonski-Diagramm**

Es sind verschiedene Schwingungsniveaus des Grundzustands ( $S_0$ ) und des ersten angeregten Singulett-Zustands ( $S_1$ ) eines Fluorophors dargestellt. Durch Anregungslicht einer bestimmten Wellenlänge (blau) kann ein sich ursprünglich im  $S_0$ -Zustand befindendes Molekül in den ersten angeregten Singulett-Zustand überführt werden. Der Übergang zwischen den Schwingungsniveaus eines Zustands erfolgt strahlungslos durch innere Konversion. Die Rückkehr des angeregten Moleküls in den Grundzustand findet spontan unter Emission von Fluoreszenzlicht (grün) statt, kann allerdings auch durch Licht induziert werden (STED, orange). Auch in diesem Fall wird ein Photon emittiert. Dieses ist von dem den Übergang induzierenden Photon nicht zu unterscheiden. STED-Mikroskope sind so aufgebaut, dass das Fluoreszenzlicht detektiert wird, jedoch Licht der Wellenlänge des STED-Lasers den Detektor nicht erreicht. Die Abbildung ist Hell *et al.*, 2004 entnommen und wurde verändert.



**Abb. 12 STED-Mikroskopie**

Das Prinzip der STED-Mikroskopie ist schematisch dargestellt. Der Anregungsstrahl (blau) wird auf einen beugungslimitierten *Spot* fokussiert. Durch einen Phasen-Modulator wird der STED-Strahl, durch den die angeregten Moleküle wieder in den Grundzustand überführt werden können, so verändert, dass er in der fokalen Ebene Donut-Form aufweist. Durch die Überlagerung des Anregungs- mit dem STED-Fokus wird der Bereich, in dem die Emission von Fluoreszenzlicht möglich ist (grün), auf das Zentrum des Donuts beschränkt. Auf diese Weise werden effektive Fokusgrößen jenseits der beugungslimitierten Auflösung möglich. Die Abbildung stammt aus Willig *et al.*, 2006 und wurde verändert.

## 4 Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit sollten Organisation und Dynamik der Syntaxin 1-*Cluster* untersucht werden. Es stellten sich zunächst die Fragen, wie viele Syntaxin-Moleküle an der Bildung eines *Clusters* beteiligt sind und wie groß diese Struktur durchschnittlich ist. Außerdem sollte der molekulare Mechanismus untersucht werden, über den die *Cluster*-Bildung abläuft. Was sind die Wechselwirkungen, die einen *Cluster* bilden und zusammenhalten, reicht z.B. die Lipid-Umgebung alleine aus oder ist der Prozess von spezifischen Ko-Faktoren abhängig? Sind Protein-Protein-Interaktionen für das *Clustering* von Bedeutung und wenn ja, über welche Region des Proteins werden sie vermittelt?

Über diese Fragen hinaus sollte in der vorliegenden Arbeit die Mobilität von Syntaxin 1 näher charakterisiert werden. Es war zu klären, wie beweglich Syntaxin 1 in der Plasmamembran ist, und welche Interaktionen die Syntaxin-Mobilität bestimmen. In diesem Zusammenhang sollte auch ermittelt werden, ob Syntaxin 1-*Cluster* bewegliche oder stationäre Domänen der Plasmamembran darstellen, und ob zwischen den *Clustern* ein Austausch von Syntaxin-Molekülen stattfindet.

Insgesamt sollte am Beispiel von Syntaxin 1 bezüglich Organisation und Dynamik ein möglichst vollständiges Bild einer Membran-Domäne erarbeitet werden.

## 5 Materialien und Methoden

### 5.1 Materialien

#### 5.1.1 Verwendete Materialien, Lösungen und Chemikalien

Die Reagenzien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den folgenden in Deutschland ansässigen Firmen bezogen: *Sigma*, Steinheim; *Merck KGaA*, Darmstadt; *Roth*, Karlsruhe; *Serva*, Heidelberg; *Boehringer*, Ingelheim; *Fluka*, Buchs; *Gebru*, Gaiberg; *Applichem*, Darmstadt. Die Reinheit war analytischen Grades.

#### 5.1.2 PC12-Zellkultur-Medium

DMEM („*Dulbecco's modified eagle medium*“) mit 4,5 g/l Glukose (#BE12-733F, *Cambrex*, Verviers, Belgien) mit zugesetzten 10% (v/v) Pferdeserum (*Biochrom*, Berlin, Deutschland), 5% (v/v) fötalem Kälberserum (*PAA Laboratories*, Clöbe, Deutschland), 4 mM L-Glutamin (*Cambrex*, Verviers, Belgien) und 60 U/ml Penizillin und 60 µg/ml Streptomycin (*Cambrex*, Verviers, Belgien).

#### 5.1.3 BHK-Zellkultur-Medium

DMEM mit 4,5 g/l Glukose (#BE12-733F, *Cambrex*, Verviers, Belgien) mit hinzugefügten 10% (v/v) *Tryptose-Phosphate-Broth* (#3072976, *Gibco*, Paisley, UK), 2 mM L-Glutamin (*Cambrex*, Verviers, Belgien), 60 U/ml Penizillin und 60 µg/ml Streptomycin (*Cambrex*, Verviers, Belgien), außerdem war fötales Kälberserum (*PAA Laboratories*, Clöbe, Deutschland) zugesetzt [5% (v/v) zur Beschleunigung des Zellwachstums, ansonsten 1% (v/v)].

#### 5.1.4 Zytomix

120 mM KCl, 10 mM  $K_2HPO_4$ , 10 mM  $KH_2PO_4$ , 0,15 mM  $CaCl_2$ , 2 mM EGTA, 5 mM  $MgCl_2$ , 25 mM HEPES, pH 7,6.

ATP (Endkonzentration 2 mM) und Glutathion (Endkonzentration 5 mM) wurden vor der Verwendung frisch zugegeben und gelöst.

#### 5.1.5 Ringer-Lösung

130 mM NaCl, 4 mM KCl, 1 mM  $CaCl_2$ , 1 mM  $MgCl_2$ , 48 mM D(+)-Glukose, 10 mM HEPES, pH 7,4.

#### 5.1.6 PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung)

137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM  $Na_2HPO_4$ , pH 7,3.

#### 5.1.7 Sonifizierungspuffer

120 mM KGlutamat, 20 mM KAcetat, 20 mM HEPES und 2 bzw. 10 mM EGTA, pH 7,2.

#### 5.1.8 PFA-Lösung

10% (w/v) Paraformaldehyd (PFA) wurde unter Erhitzen in PBS gelöst, nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur (RT) auf pH 7,3 eingestellt und bei  $-20^\circ C$  gelagert. Falls erforderlich wurde die Lösung vor dem Gebrauch mit PBS auf 4% (w/v) verdünnt.

#### 5.1.9 Lysepuffer

150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% (w/v) Triton X-100, 0,5% (w/v) Nadesoxycholat, EDTA-freier Protease Inhibitoren Cocktail (*Roche*, Mannheim, Deutschland), 50 mM Tris, pH 7.4.

### 5.1.10 Rekombinantes Syntaxin 1A

Das als Standard für das quantitative *Western-Blot* verwendete rekombinante Syntaxin 1A wurde von *Dr. M. Holt* (Abteilung Neurobiologie, MPI für biophysikalische Chemie, Göttingen, Deutschland) zur Verfügung gestellt. In diesem Protein war ein N-terminales *myc-Tag* (GSHMKLATMEQKLISEEDLNS) mit den Aminosäuren 2-288 von Syntaxin 1A (*Rattus norvegicus*) fusioniert. Die erhaltene Proteinlösung wurde über Nacht bei 4° C gegen 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 20 mM Na-Cholat, 1 mM DTT, 20 mM HEPES, pH 7,4 dialysiert, anschließend die Absorption bei 280 nm photometrisch gemessen und die Konzentration anhand des Lambert-Beer'schen Gesetzes berechnet. Die Reinheit des rekombinanten Proteins wurde anhand eines 12%igen *Commassie-Blue*-gefärbten Natriumdodecylsulfat (SDS)-Gels überprüft.

### 5.1.11 Antikörper

- HPC-1, monoklonaler Mausantikörper gegen Syntaxin 1 (Barnstable et al., 1985)
- $\alpha$ myc, monoklonaler Mausantikörper (#CRL-1729, ATCC, USA)
- $\alpha$ Thy1, monoklonaler Mausantikörper (#MRC OX-7, Serotec, Oxford, UK)
- $\alpha$ Sx4, affinitätsgereinigtes Kaninchenserum (Lang et al., 2001)
- Ziege-anti-Maus-Meerrettich Peroxidase [HRP (#1858413, Pierce, Rockford, IL, USA)]
- Ziege-anti-Maus-Cy3 (#115-165-146, Dianova, Hamburg, Deutschland)
- Ziege-anti-Kaninchen-Cy5 (#111-175-144, Dianova, Hamburg, Deutschland)

- Schaf-anti-Maus-Atto532 bzw. -Atto647N

Beide Sekundärantikörper wurden von *Dr. Katrin Willig* (Abteilung NanoBiophotonik, MPI für biophysikalische Chemie, Göttingen, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Die Schaf-anti-Maus-Antikörper (#515-005-003, *Dianova*, Hamburg, Deutschland) waren mit den von *Prof. Dr. K.H. Drexhage* (Universität Siegen, Deutschland) erhaltenen Fluoreszenzfarbstoffen Atto532 bzw. Atto647N markiert.

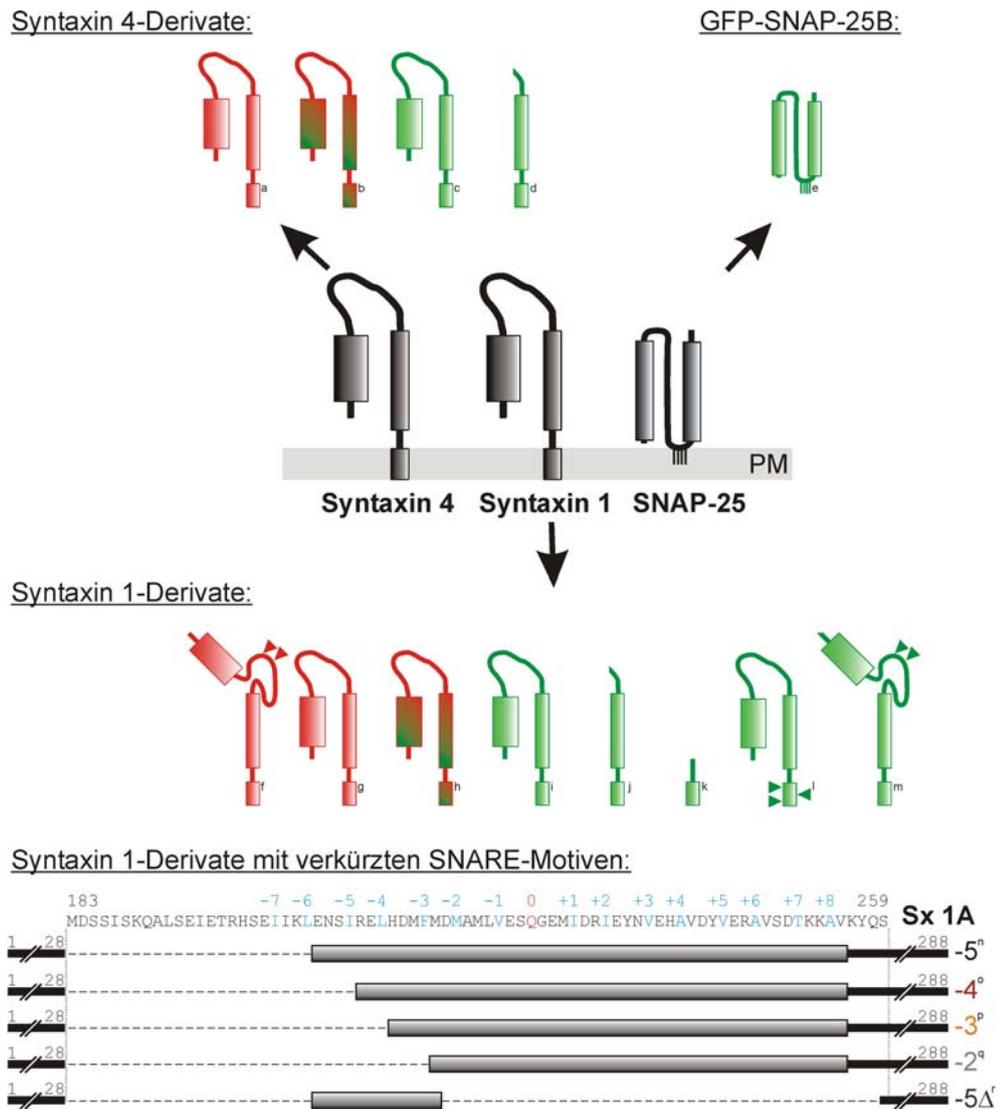
### **5.1.12 Enzyme**

Die bei den Klonierungsarbeiten eingesetzten Enzyme stammten von *New England Biolabs*, Ipswich, MA, USA; *Promega*, Madison, WI, USA; *USB*, Cleveland, OH, USA und *Fermentas*, St. Leon-Rot, Deutschland.

## 5.2 Methoden

### 5.2.1 Plasmide

Alle Plasmide dienen dem Zweck der transienten Überexpression von entsprechend markierten Proteinen in Säugerzellen. Die Expression des jeweiligen Fusionsproteins stand dabei unter der Kontrolle des Cytomegalovirus (CMV)-Promotors. Als *Tag* wurde monomeres grün-fluoreszierendes Protein (mEGFP), ein Abkömmling des *Enhanced-green-fluorescent-Proteins* mit der Mutation A206K, die die Dimerisierung von fluoreszierenden Proteinen verhindert (Zacharias et al., 2002), bzw. ein *myc-Tag* verwendet. Alle Klonierungsarbeiten wurden entsprechend molekularbiologischer Standardprotokolle (Sambrook, 2001) durchgeführt. Die benutzten Oligonukleotide wurden von MWG (Martinsried, Deutschland) bezogen. Abb. 13 zeigt die in dieser Arbeit für die Konstrukte verwendeten Piktogramme. Weitere Details sind in Tabelle 1 gegeben. Das Konstrukt GFP-SNAP-25B basiert auf dem Vektor pEGFP-C1 (*Clontech*, Mountain View, CA, USA) und kodiert ein mEGFP, das über fünf Aminosäuren (RSRAL) mit dem N-Terminus von SNAP-25B verbunden ist. Alle Plasmide, die Proteine kodieren, die kein N-terminales *Tag* besitzen, stammen von pEGFP-N1 ab (*Clontech*, Mountain View, CA, USA). Der C-Terminus des entsprechenden Proteins ist hier über 12 Aminosäuren (LVPRARDPPVAT) an mEGFP fusioniert. *Open Sx1A-GFP* [Zilly et al., 2006; dort als „*open syntaxin 1A-mGFP*“ bezeichnet] stellt eine Ausnahme dar, da sich hier zwischen dem Protein und dem C-terminalen *Tag* nur die Aminosäuren PPVAT befinden. pBob5.1 (Schutz et al., 2005) wurde als Ausgangskonstrukt für alle Plasmide verwendet, die Proteine mit einem N-terminalen *myc-Epitop-Tag* (MEQKLISEEDLNS) kodieren. Die für die Fusionsproteine kodierenden Bereiche aller Vektoren wurden sequenziert (*Seqlab*, Göttingen, Deutschland) und überprüft, dabei dienten die Rattensequenzen (*Rattus norvegicus*) von Syntaxin 1A und SNAP-25B bzw. die korrigierte Syntaxin 4-Sequenz (Pabst et al., 2000) als Referenz.



**Abb. 13 Konstrukte**

Die Abbildung zeigt die Piktogramme, die in dieser Arbeit für die benutzten Plasmide bzw. die kodierte überexprimierten Proteine verwendet wurden. Mittig sind schematisch die drei in dieser Arbeit untersuchten SNAREs der Plasmamembran dargestellt, von denen die entsprechend markierten Derivate abstammen. Die Syntaxin 1-Derivate mit verkürztem SNARE-Motiv sind mit mEGFP markiert. Bei allen übrigen Konstrukten lässt sich anhand der Farbe des Piktogramms ablesen, welche Tags diese tragen. mEGFP ist durch grüne, das myc-Tag durch rote Farbe des Piktogramms angezeigt. Im Ergebnisteil sind die Piktogramme in grau dargestellt. Die verwendeten Tags können dort der entsprechenden Abbildungslegende entnommen werden. Namen, Quellen und weitere Details zu den Konstrukte sind mit Hilfe des kleinen, neben dem entsprechenden Piktogramm angegebenen Buchstabens (a-r) Tab. 1 zu entnehmen.

Plasmid	Kürzel	Piktogramm	N-term. Tag	Protein (Aminosäuren)	C-term. Tag	Quelle
myc-Sx4	-	a	myc	Syntaxin 4 (2-298)	-	JS
myc-Sx4-GFP	-	b	myc	Syntaxin 4 (2-298)	mEGFP	JS
Sx4-GFP	-	c	-	Syntaxin 4 (1-298)	mEGFP	JS
Sx4, SNARE <i>motif</i> -TMR-GFP	-	d	-	Syntaxin 4 (1-37 + 191-298)	mEGFP	JS
GFP-SNAP25B	-	e	mEGFP	SNAP-25B (1-206)	-	JS
myc-Sx1Aopen	-	f	myc	Syntaxin 1 (2-288 mit L165A und E166A)	-	DS
myc-Sx1A	-	g	myc	Syntaxin 1 (2-288)	-	DS
myc-Sx1A-GFP	-	h	myc	Syntaxin 1 (2-288)	mEGFP	JS
Sx1A-GFP	-	i	-	Syntaxin 1 (1-288)	mEGFP	JS
Sx1A, SNARE <i>motif</i> -TMR-GFP	SNARE	j	-	Syntaxin 1 (1-28 + 183-288)	mEGFP	JS
Sx1A, TMR-GFP	TMR	k	-	Syntaxin 1 (1-28 + 259-288)	mEGFP	JS
Sx1AmutTMR-GFP	mut	l	-	Syntaxin 1 (1-288 mit M267A, C271A und I279A)	mEGFP	JS
<i>open</i> Sx1A-GFP	<i>open</i>	m	-	Syntaxin 1 (1-288 mit L165A und E166A)	mEGFP	FZ
-5	-	n	-	Syntaxin 1 (1-28 + 206-288)	mEGFP	CGR
-4	-	o	-	Syntaxin 1 (1-28 + 210-288)	mEGFP	CGR
-3	-	p	-	Syntaxin 1 (1-28 + 213-288)	mEGFP	CGR
-2	-	q	-	Syntaxin 1 (1-28 + 217-288)	mEGFP	CGR
-5A	-	r	-	Syntaxin 1 (1-28 + 206-217 + 259-288)	mEGFP	CGR

**Tab. 1 Informationen zu den Konstrukten**

Teile dieser Arbeit wurden bereits vorab veröffentlicht. Aus Gründen der Konsistenz wurde darauf verzichtet, die Konstruktnamen ins Deutsche zu übertragen. Es sind der Name, falls vorhanden das alternativ verwendete Kürzel, die kodierte Proteinsequenz und die entsprechenden *Tags* gelistet. Darüber hinaus kann der Tabelle die Quelle des jeweiligen Plasmids, sowie das zugehörige Piktogramm (a-r) in Abb. 13 entnommen werden. JS steht für *Jochen Sieber* bzw. selbst hergestellt, DS für *Dagmar Schütz*, FZ für *Felipe Zilly*, CGR für *Claas Gerding-Reimers*. Alle Genannten sind bzw. waren Mitarbeiter der Abteilung Neurobiologie des MPI für biophysikalische Chemie in Göttingen. Bei myc-Sx1Aopen und open Sx1A-GFP sind in die Syntaxin-Sequenz Mutationen eingeführt, die das Zurückfallen der N-terminalen Domäne auf das SNARE-Motiv und damit die geschlossene Konformation verhindern (Dulubova et al., 1999). Die drei Mutationen in der TMR des Konstrukts Sx1AmutTMR-GFP verhindern die Oligomerisierung der Syntaxine über diesen Bereich (Laage et al., 2000).

### 5.2.2 Beschichtung der Deckgläser mit Poly-L-Lysin

Es wurde steril gearbeitet. Die Deckgläser (Durchmesser 25 mm, Stärke 1) der Firma *Menzel* (Braunschweig, Deutschland) wurden mit Ethanol gewaschen, kurz abgeflammt und in *6-Well*-Platten platziert. Poly-L-Lysin-Hydrobromid (Molekulargewicht >300 kDa, #P-1524, *Sigma*, Steinheim, Deutschland) wurde in Milli-Q-Wasser (*Millipore*, Billerica, MA, USA) gelöst (100 µg/ml) und die Deckgläser mit je einem halben Milliliter überschichtet. Nach 30-minütiger Inkubation wurde die Lösung entfernt und die Deckgläser zweimal mit Milli-Q-Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen konnten die Deckgläser bei 4° C mehrere Wochen gelagert werden.

### 5.2.3 PC12-Zellkultur

Die Zellen wurden wie in Lang et al., 1997 beschrieben kultiviert. Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen ausgeführt. Ein Aliquot PC12-Zellen (Phaeochromozytom-Zellen) Klon 251 (Heumann et al., 1983) wurde dem Stickstofftank entnommen, im 37° C Wasserbad aufgetaut, in ein Zentrifugationsröhrchen mit 5 ml PC12-Zellkultur-Medium überführt und zentrifugiert (5 min, 238 g, RT). Die gesammelten Zellen wurden vorsichtig in 10 ml PC12-Zellkultur-Medium resuspendiert, in eine 25 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche (#430168, *Corning*, Corning, NY, USA) überführt und bei 37° C, 10% CO<sub>2</sub> und 90% Luftfeuchtigkeit im Inkubator gehalten. Nachdem in der Flasche 70 - 90% Konfluenz erreicht war, wurden die Zellen wie unten beschrieben geerntet und in eine 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche (#83.1813, *Sarstedt*, Numbrecht, Deutschland) überführt, in der die Zellen üblicherweise gehalten wurden. Zur Passage der PC12-Zellen wurde das alte Medium abgesaugt, die Zellen mit 10 ml sterilem PBS gewaschen und mit 3 ml Trypsin/EDTA (*Cambrex*, Verviers, Belgien) überschichtet. Sobald die Zellen sich vom Flaschenboden zu lösen begannen, wurden 7 ml PC12-Zellkultur-Medium zugegeben, die Zellen vom Flaschenboden gewaschen und in ein Zentrifugationsröhrchen überführt. Nach 5 Min. Zentrifugation (238 g, RT) wurde das Zellpellet in 6 ml PC12-Medium resuspendiert und die Zellen durch ca. 20-maliges Auf- und Abpipettieren vereinzelt, wobei die Pipette eng an den Boden des Zentrifugationsröhrchens gedrückt wurde. Die gewünschte Menge an Zellen wurde in eine neue 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche überführt, mit PC12-Zellkultur-Medium auf ein Volumen von 25 ml gebracht und die Flasche in den Inkubator gestellt. Es empfiehlt sich, nicht weniger als ein Viertel der geernteten Zellen pro neue Flasche auszusäen.

Für Experimente wurden Zellen der 5. - 20. Passage nach dem Auftauen verwendet. Die Zellen wurden wie oben beschrieben nach dem Erreichen von 70 – 90 % Konfluenz geerntet und typischerweise in 12 ml pro eingesetzter 75 cm<sup>2</sup>-Flasche resuspendiert und vereinzelt. Je ein halber Milliliter der Zellsuspension wurden auf Poly-L-Lysin-

beschichteten Deckgläsern in 6-Well-Platten ausplattiert, nach 10-minütigem Warten 4 ml PC12-Zellkultur-Medium zugegeben und die Zellen in den Inkubator überführt. Frühestens nach 18 Std. konnten die Zellen für Experimente eingesetzt werden.

#### **5.2.4 BHK-Zellkultur**

Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen ausgeführt. Ein Aliquot BHK-21-Zellen wurde dem Stickstofftank entnommen, im 37° C Wasserbad aufgetaut, in ein Zentrifugationsröhrchen mit 10 ml BHK-Zellkultur-Medium überführt und zentrifugiert (5 min, 238 g, RT). Die gesammelten Zellen wurden vorsichtig in BHK-Zellkultur-Medium resuspendiert, in eine Gewebskulturschale (14,5 cm Durchmesser, #639160, Greiner, Frickenhausen, Deutschland), in der die Zellen üblicherweise in 20 ml Medium gehalten wurden, überführt und bei 37° C, 5% CO<sub>2</sub> und 90% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die Zellen wurden jeweils passagiert, wenn mindestens 80% Konfluenz erreicht war. Zu diesem Zweck wurde das alte Medium abgesaugt, die Zellen mit 10 ml sterilem PBS gewaschen, 10 ml BHK-Zellkultur-Medium zugegeben, die Zellen mit einem Zellschaber (#83.1830, Sarstedt, Numbrecht, Deutschland) von der Zellkulturschale abgelöst und in ein Zentrifugationsröhrchen überführt. Nach Zentrifugation (5 min, 238 g, RT) wurden das erhaltene Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und die Zellen durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Die gewünschte Menge Zellsuspension wurde dann in Gewebskulturschalen mit frischem Medium gegeben und diese in den Inkubator überführt.

### 5.2.5 Transfektion

Die Plasmide wurden durch Elektroporation in die Zellen eingeschleust. Die Transfektion erfolgte grundsätzlich wie in Lang et al., 1997 veröffentlicht. Zellen wurden für die Elektroporation wie unter 5.2.3 beschrieben geerntet und das erhaltene Zellpellet in Zytomix resuspendiert. Üblicherweise wurden 2 ml Zytomix pro geernteter 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche PC12-Zellen bzw. 5 ml Zytomix pro Gewebeskulturschale BHK-Zellen eingesetzt. Je 400 µl der resuspendierten Zellen wurde in Elektroporationsküvetten (#165-2086, *Biorad*, München, Deutschland) gegeben, in denen bereits 20 - 50 µg des entsprechenden Plasmids vorgelegt waren, und der Küvetteninhalt durch Auf- und Abpipettieren durchmischt. Für die Elektroporation wurden am Genepulser II (*Biorad*, München, Deutschland) die Einstellungen 1,15 kV, 50 Ohm, 50 µF gewählt. Nach dem elektrischen Stoß wurde der Küvetteninhalt entnommen und mit 2,1 - 3,6 ml des entsprechenden Zellkulturmediums durchmischt. Je ein halber Milliliter der erhaltenen Zellsuspension wurde auf ein Poly-L-Lysin-beschichtetes Deckglas ausplattiert, nach 10 Min. 4 ml des entsprechenden Mediums zugesetzt und die Zellen in den jeweiligen Inkubator überführt. Die Experimente wurden 20 - 60 Std. nach der Transfektion durchgeführt.

### 5.2.6 SDS-PAGE- und quantitativer *Western-Blot*

PC12-Zellen wurden wie unter 5.2.3 beschrieben geerntet, das erhaltene Zellpellet in Ringer-Lösung resuspendiert und die Zellzahl/ml mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Anschließend wurde eine definierte Menge an Zellen erneut zentrifugiert (5 min, 238 g, RT), der Überstand abgenommen und die gesammelten Zellen mit 1 ml Lysepuffer pro 5 Millionen Zellen unter ständiger Umwälzung inkubiert (4°C, 30 min). Die erhaltene Lösung wurde zentrifugiert (8 min, 16000 g, 4°C) und der Überstand für Experimente eingesetzt. Die Lyse der Zellmembran war vollständig, da nur im Überstand aber nicht im

Pellet Syntaxin 1 nachgewiesen werden konnte (*Western-Blot*-Daten nicht gezeigt). Zur Bestimmung der Proteinkonzentration des Zelllysats wurde der *BCA<sup>TM</sup> Protein Assay Kit* (#23225, *Pierce*, Rockford, IL, USA) eingesetzt. Als Standard wurde Rinderserumalbumin (BSA) verwendet. Lysat von BHK-Zellen, die selbst kein Syntaxin 1 exprimieren, wurde auf die gleiche Weise wie PC12-Zelllysat gewonnen und war den Proben mit rekombinantem Syntaxin 1 zugesetzt worden. Auf diese Weise wurde sichergestellt, dass alle Bahnen auf der Membran des *Western-Blots* mit der gleichen Menge an Lysat (in µg) bedeckt waren, und so ein möglicher Effekt anderer Proteine auf das Syntaxin 1-Signal in allen Bahnen der gleiche war.

Für die 1970 erfundene SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese [SDS-PAGE (Laemmli, 1970)] wurde hier das *Bio-Rad Mini-Protean II Gel System* (*Bio-Rad*, Hercules, CA, USA) eingesetzt. Alle Proben wurden vor dem Laden des Gels (5%iges Sammel- und 12%iges Trenngel) in Probenpuffer [3% (w/v) SDS, 10% (w/v) Glycerin, 3% (v/v) β-Mercaptoethanol, 0,015% (w/v) Bromphenolblau, 62,5 mM Tris, pH 6,8 (Endkonzentrationen)] 5 Min. auf 100°C erhitzt. Die SDS-PAGE und die *Commassie-Blue*-Färbung des Gels, um den quantitativen Transfer der Proteine auf die Nitrozellulose-Membran zu überprüfen, wurde entsprechend den Protokollen des Herstellers (*Bio-Rad*, Hercules, CA, USA) durchgeführt. Um überflüssigen Farbstoff zu entfernen, wurde ein gefärbtes Gel zunächst mit Entfärber-Lösung 1 [50% (v/v) Ethanol, 10% (v/v) Essigsäure] dann Entfärber-Lösung 2 [10% (v/v) Ethanol, 5% (v/v) Essigsäure] behandelt. Die eingesetzten Lösungen wurden dabei mehrmals ausgetauscht.

Der *Western-Blot* wurde im Prinzip wie in Towbin et al., 1979 mit den von Kyhse-Andersen, 1984 eingeführten Modifikationen durchgeführt. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine mit einer Trockenblotapparatur (*Phase*, Lübeck, Deutschland) auf eine Nitrozellulosemembran (#10420480, *Whatman*, Dassel, Deutschland) übertragen. Der benutzte Transferpuffer enthielt 192 mM Glycin, 0,04% (w/v) SDS, 20% (v/v) Methanol und 25 mM Tris pH 8,4. Als

Primärantikörper wurde HPC-1 in einer Verdünnung von 1:1000 in Inkubationspuffer [5% (w/v) Trockenmilchpulver, 0,1% (v/v) Tween-20, 150 mM NaCl, 20 mM Tris pH 7.5] und als Sekundärantikörper Ziege-anti-Maus-HRP in einer Verdünnung von 1:500 in Inkubationspuffer eingesetzt. Nach 1 Std. Blocken der unspezifischen Bindungsstellen mit Inkubationspuffer erfolgte über Nacht bei 4°C die Behandlung mit dem Erstantikörper. Vor der zweistündigen Inkubation (RT) mit dem Sekundärantikörper wurde das *Blot* dreimal für mindestens 10 Min. mit Inkubationspuffer gewaschen. Nach der Behandlung mit Sekundärantikörper schlossen sich drei mindestens 10-minütige Waschschriffe mit Tris-gepufferter Salzlösung mit Tween an [TBS-T: 0,1% (v/v) Tween-20, 150 mM NaCl, 20 mM Tris pH 7.5]. Zur Detektion der Chemilumineszenz wurden das *SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate Kit* (#34075, Pierce, Rockford, IL, USA) und das LAS-1000-System (*Fuji Photo Film*, Tokyo, Japan) verwendet. Die Banden wurden mit Metamorph 4.1.7 (*Universal Imaging*, West Chester, PA, USA) densitometrisch ausgewertet und die erhaltenen Intensitätswerte für den Hintergrund korrigiert.

### 5.2.7 Generierung von *Membrane-Sheets*

*Membrane-Sheets* wurden im Prinzip wie in Avery et al., 2000 beschrieben hergestellt. Ein Deckglas, auf dem die Zellen 20 - 60 Stunden kultiviert worden waren, wurde auf dem Boden einer mit 200 ml eiskaltem Sonifizierungspuffer gefüllten Glasschale platziert. Das Ende einer Ultraschallspitze (Durchmesser 2,5 mm) wurde im Abstand von 1 cm über dem Deckglas zentriert, am Gerät (Sonifier 450, *Branson Ultrasonics Corp.*, Danbury, CT USA) die nötigen Einstellung vorgenommen (*Output-Control: 2 - 3, Duty: 10%, Duty-Cycle: hold*) und ein Ultraschallpuls ausgelöst. Sofort danach wurde das Deckglas mit den frisch hergestellten *Membrane-Sheets* aus der Glasschale herausgenommen und für weitere Behandlungen bzw. Untersuchungen eingesetzt.

Alternativ konnte die Ultraschallbehandlung auch direkt auf dem Fluoreszenzmikroskop unter Einsatz einer speziell angefertigten, mit 6 ml eiskaltem Sonifizierungspuffer gefüllten Kammer und eines anderen Ultraschallgeräts (Sonifier B12, *Branson Ultrasonics*, Danbury, CT, USA) vorgenommen werden. Diese Variante der *Membrane-Sheet*-Herstellung wurde von *Dr. Marcin Barszczewski* in unserem Labor etabliert und ist im Detail in seiner Doktorarbeit beschrieben (Barszczewski, 2005).

### 5.2.8 Antikörperfärbung von *Membrane-Sheets*

Die Antikörperfärbung wurde im Prinzip wie in Lang et al., 2001 beschrieben durchgeführt. Es wurden Deckgläser mit frisch hergestellten *Membrane-Sheets* mit 4%iger PFA-Lösung 1 - 1,5 Std. lang fixiert. Anschließend wurde das Fixativ entfernt und die Deckgläser zunächst zweimal schnell mit PBS mit 50 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  gewaschen und dann 20 Min. mit dieser Lösung inkubiert. Zwei schnellen Waschschritten mit PBS folgte dann eine 10-minütige Inkubation mit 3% BSA gelöst in PBS, bevor sich die Behandlung mit Erstantikörper anschloss. Es folgten drei 10-minütige Waschschrritte mit 3% BSA gelöst in PBS, die Zweitantikörperbehandlung und weitere drei 10-minütige Waschschrritte mit PBS. Sowohl Erst- als auch Zweitantikörper wurden vor Gebrauch 1:100 in PBS mit 3% BSA verdünnt. Je nach Experiment wurden für die Antikörperbehandlungen Inkubationszeiten von 1 - 2 Std. gewählt. Für mit STED-Mikroskopie zu untersuchende Proben wurden mit Atto-Farbstoffen gekoppelte Sekundärantikörper verwendet und die Deckgläser vor der Untersuchung in Mowiol [10% (w/v) Mowiol 4-88 (*Hoechst*, Frankfurt, Deutschland), 25% (w/v) Glycerin, 100 mM Tris, pH 7,2] auf Objektträgern aufgezogen. Vor diesem letzten Schritt schloss sich der Anfärbung bei mit Atto647N visualisierten Proben noch eine 15-minütige Fixation mit 10%iger PFA-Lösung gefolgt von vier 5-minütigen PBS-Waschschrritten an.

Bei den in Abb. 18 dargestellten Doppelanfärbungen waren wegen dem Antikörper gegen Syntaxin 4 Inkubationsschritte mit hohen

Salzkonzentrationen notwendig. Während der Erstantikörperinkubation, sowie dem Inkubationsschritt zuvor und den drei Waschschritten danach wurde PBS mit 3% BSA und einer auf 500 mM erhöhten NaCl-Konzentration verwendet. Syntaxin 4 wurde im Cy5-Kanal visualisiert, für Syntaxin 1 bzw. Thy 1 wurde hier der Cy3-Kanal gewählt.

Für alle übrigen Anfärbungen wurde als Sekundärantikörper Ziege-anti-Maus-Cy3 eingesetzt.

### 5.2.9 Fluoreszenzmikroskopie von *Membrane-Sheets*

Deckgläser mit *Membrane-Sheets* wurden zur mikroskopischen Untersuchung in eine speziell angefertigte Kammer eingespannt, die mit Sonifizierungspuffer (unfixierte Proben) bzw. PBS (fixierte Proben) gefüllt wurde. Durch Zugabe von 1-(4-Trimethyl-Ammoniumphenyl)-6-Phenyl-1,3,5-Hexatrien p-Toluolsulfonat (TMA-DPH; #T-204, *Molecular Probes*, Eugene, OR, USA) konnten Lipide der Membran angefärbt werden, was eine Beurteilung der Qualität der *Membrane-Sheets* ermöglichte. Ferner konnte durch Zugabe von in allen verwendeten Kanälen sichtbaren *TetraSpeck<sup>TM</sup> Microspheres* (0,2 µm Durchmesser, #T-7280, *Molecular Probes*, Eugene, OR, USA) der laterale Versatz zwischen den sequentiell aufgenommenen Kanälen bzw. dessen Korrektur überprüft werden. Es wurde ein inverses, mit einem 100x 1,4 NA plan-apochromatischem Öl-Objektiv ausgestattetes Zeiss Axiovert 100 TV Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Göttingen, Deutschland) eingesetzt. Angeregt wurde mit einer XBO 75 Xenon-Lampe. Bilder wurden mit einer *back-illuminated Charge-coupled-Device* (CCD)-Kamera (512 x 512-NTE Chip, Pixelgröße 24 x 24 µm; *Princeton Instruments*, Trenton, NJ, USA) unter Verwendung eines 2,5X Optovars aufgenommen. Für die Fluoreszenzanregung und Detektion wurden die entsprechenden Filtersätze benutzt (Zeiss, Göttingen, Deutschland; *AHF Analystechnik*, Tübingen, Deutschland): TMA-DPH [Anregungsfilter *Bandpass* (BP) 360/30-50, Strahlteiler *Longpass* (LP) 395-420, Emissionsfilter LP 420 bzw. BP 460/50], mEGFP (Anregungsfilter BP 480/40, Strahlteiler LP 505, Emissionsfilter 527/30)

und Cy3 (Anregungsfilter BP 565/30, Strahlteiler LP 595, Emissionsfilter BP 645/70). Für gleichzeitig mit Cy3 und Cy5 gefärbte Proben (vgl. Abb. 18) wurden folgende Filtersätze verwendet: TMA-DPH (Anregungsfilter BP 350/50, Strahlteiler LP 395, Emissionsfilter LP 420), Cy3 (Anregungsfilter BP 525/30, Strahlteiler LP 550, Emissionsfilter BP 575/30), Cy5 (Anregungsfilter BP 620/60, Strahlteiler LP 660, Emissionsfilter BP 700/75). Das Mikroskop und die Kamera wurden über das Programm Metamorph 5.1 gesteuert (*Universal Imaging*, Wester Chester, PA, USA).

### 5.2.10 Co-Clustering-Experimente

Von PC12-Zellen, die sowohl ein myc-markiertes als auch mEGFP-markiertes Protein ko-überexprimierten, wurden *Membrane-Sheets* hergestellt, fixiert, für das myc-Epitop angefärbt und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Sowohl die TMA-DPH-Lipidfärbung eines *Membrane-Sheets* als auch die Verteilung der markierten Proteine wurden dokumentiert. Die Ähnlichkeit der Anfärbung für das myc-Epitop (roter Kanal) und des mEGFP-Bildes (grüner Kanal) wurden mittels Korrelationsanalyse wie in 5.2.18 beschrieben ausgewertet. Die in der analysierten Region auf dem *Membrane-Sheet* gemessene Fluoreszenzintensität wurde um den lokalen Hintergrundwert korrigiert. Der erhaltene Wert diente als Maß für den Grad der transienten Überexpression des entsprechenden Proteins. In die Analyse gingen nur moderat überexprimierende *Membrane-Sheets* mit einem Nettosignal von 500 - 2500 *Counts/Pixel* (1 Sek. Belichtungszeit) im roten und von 200 - 1500 *Counts/Pixel* im grünen Kanal (4 Sek. Belichtungszeit) ein. Für jedes unabhängige Experiment wurden die für die einzelnen *Membrane-Sheets* berechneten Korrelationskoeffizienten gemittelt. Experimente, bei denen weniger als drei auswertbare *Membrane-Sheets* aufgenommen worden waren, wurden von der Analyse ausgeschlossen. Im Durchschnitt gingen 6,5 *Membrane-Sheets* in jedes unabhängige Experiment ein.

### 5.2.11 Beobachtung des Sx1A-GFP-Fluoreszenzmusters

Von Syntaxin 1A-GFP überexprimierenden PC12-Zellen wurden *Membrane-Sheets* frisch hergestellt und die Veränderung des Musters des grün-fluoreszierenden Proteins (GFPs) über 5 Min. hinweg (ca. 1 Bild/15 s) dokumentiert. Nach der Zeitreihe wurde außerdem ein Bild der TMA-DPH-angefärbten Membran aufgenommen. Während des Experiments wurden die *Membrane-Sheets* in Sonifizierungspuffer (RT) inkubiert. Das mEGFP-Muster blieb in allen Versuchen über den gesamten Beobachtungszeitraum beinahe unverändert. Als ein objektives Maß für die Ähnlichkeit des jeweils ersten und letzten Bildes einer Zeitreihe wurde der *Pearson*-Korrelationskoeffizient dieser Aufnahmen wie in 5.2.18 beschrieben berechnet. Aufgrund des schlechten Signal/Rausch-Verhältnisses gingen *Membrane-Sheets*, die das Protein nur sehr schwach überexprimierten (Nettosignal im grünen Kanal < 40 *Counts*/Pixel bei 1 Sek. Belichtung) nicht in die Analyse ein.

### 5.2.12 Konfokale Laser-Rastermikroskopie

Es wurde ein inverses mit einem 100x 1,4 NA plan-apochromatischem Öl-Objektiv ausgestattetes konfokales Laser-Rastermikroskop (TC-SP2, *Leica Microsystems*, Mannheim, Deutschland) eingesetzt. Die mEGFP-Fluoreszenz wurde mit der 488 nm-Linie des Argon-Ionen-Laser angeregt und bei 500 - 600 nm detektiert. Dabei waren die Einstellungen wie folgt: *Laser-Power* 3,5%, *Scan-Speed* 400 Hz, *Format* 256 x 256 Pixel, *Zoom-Factor* 4, *Pinhole* 182,04  $\mu\text{m}$  (1 Airy), *Gain* 700 V, *Offset* 0,5-0,7%. Aus diesen Einstellungen resultierte eine Pixelgröße von 146,5 x 146,5 nm. Für die Aufnahme von Transmissionsbildern wurden die Einstellungen *Gain* 480 V und *Offset* 0 % gewählt. Gesteuert wurde das Mikroskop über die *Leica Confocal Software Version 2.5 Build 1347* (*Leica Microsystems*, Mannheim, Deutschland).

### 5.2.13 Bestimmung des Durchmessers einer PC12-Zelle

Es sollte der PC12-Zelldurchmesser bestimmt werden. Zu diesem Zweck wurden PC12-Zellen wie in 5.2.3 beschrieben geerntet und das erhaltene Zellpellet in PBS resuspendiert. Die abgelösten PC12-Zellen nehmen Kugelform an und behalten diese auch nach Sedimentation auf die Oberfläche eines Deckglases für einige Minuten bei. Bevor sich die Zellen wieder flach ausbreiten und am Glas anheften konnten, wurden, mit einem konfokalen Laser-Rastermikroskop und den oben beschriebenen Einstellungen, mEGFP- und Transmissionsbilder verschiedener fokaler Ebenen (optische Schnitte) aufgenommen. Es wurde jeweils die äquatoriale Ebene einer Sx1A-GFP überexprimierenden Zelle gewählt, um dann im zugehörigen mEGFP-Bild mit Hilfe eines *Linescans* den Zelldurchmesser zu bestimmen. Insgesamt wurden 85 Zellen von vier unabhängigen Zellernten analysiert.

### 5.2.14 FRAP-Experimente mit intakten Zellen

*Fluorescence-Recovery-after-Photobleaching* (FRAP)-Experimente wurden bereits Mitte der 70er Jahre durchgeführt (Axelrod et al., 1976; Edidin et al., 1976) und ermöglichen die Untersuchung des Diffusionsverhaltens fluoreszenzmarkierter Membranproteine in lebenden Zellen.

In den hier beschriebenen Experimenten wurden mit transfizierten PC12-Zellen bewachsene Deckgläser in eine speziell angefertigte Mikroskopiekammer eingebaut, die mit Ringer-Lösung (RT) gefüllt wurde. Anschließend wurde auf die basale Plasmamembran fokussiert und der jeweilige Versuch gestartet. mEGFP-Bilder wurden mit den in 5.2.12 beschriebenen Einstellungen aufgenommen. Gesteuert durch das *FRAP-Wizard-Tool* der Software des Mikroskops wurden zunächst 10 Bilder mit größtmöglicher Geschwindigkeit (1.02 s/Bild) gemacht bevor eine 2,93  $\mu\text{m}$  x 2,93  $\mu\text{m}$  große Region der Zellmembran in zwei aufeinander folgenden Schritten (1,02 s/Schritt; *Laser-Power* 100%; *Zoom-in-Option* aktiviert) gebleicht wurde. Die Rückkehr der

Fluoreszenz wurde zunächst (10 Bilder) mit größtmöglicher Geschwindigkeit und dann über weitere 4 Min. mit 12 Bildern pro Minute beobachtet. Am Ende eines Experiments wurden dann nochmals 10 Bilder mit höchster Geschwindigkeit aufgenommen. Im *FRAP-Wizard* wurden anschließend die entsprechenden *Regions-of-Interest* (ROIs) platziert, die Daten exportiert und in Excel 2000 (*Microsoft*, Redmond, WA, USA) bzw. Origin (*Microcal Software*, Northampton, MA, USA) weiterverarbeitet.

Auf der Zeitskala wurde der erste Messpunkt nach dem Bleichen als 0 gesetzt ( $t = 0$  s). Für jeden Zeitpunkt ( $t$ ) einer Messung wurde das Netto-Fluoreszenzsignal der ROI entsprechend Formel (1) auf den Durchschnittswert der 10 Bilder vor dem Bleichen normalisiert, wodurch es möglich wurde, am selben Tag erhaltene Kurven mehrerer Zellen zu mitteln (vgl. Abb. 25B). Pro Experiment wurden die Ergebnisse von 4 - 10 Zellen gemittelt.

$$Signal_{ROI\ norm.}(t) = \frac{Signal_{ROI}(t)}{Signal_{ROI}(vor\ Bleichen)} \quad (1)$$

An die erhaltenen gemittelten Kurven wurden wie in Ficz et al., 2005 je eine hyperbolische Funktion mit *Offset* [siehe Formel (2)] angepasst:

$$Signal_{ROI\ norm.}(t) = a + b \times t / (t_{1/2} + t) \quad (2)$$

wobei  $t_{1/2}$  für die Halbwertszeit,  $b$  für die Amplitude und  $a$  für den *Offset* steht. Die Verwendung einer Formel mit *Offset* war notwendig, da in den Experimenten im ersten Bild nach dem Bleichen die ROI häufig eine höhere Fluoreszenzintensität als der Hintergrund aufwies. Da die zum Bleichen eingesetzte Laserstärke ausreichend gewesen sein sollte, ist der beobachtete *Offset* höchstwahrscheinlich auf zu langsames Scannen zurückzuführen. Dies würde auch erklären, warum der Effekt bei schnelleren Konstrukten stärker ausgeprägt ist. Versuche, bei denen sich die Fokusebene während der Zeitreihe verschob, konnten anhand des Intensitätsverlaufs einer ungebleichten Membranregion, deren Nettofluoreszenz während einer Messung wenig variieren und am Ende beinahe unverändert sein sollte, identifiziert werden. Es gingen nur Messungen in die Analyse ein, bei denen das

normalisierte Signal der Kontrollregion am Ende des Versuchs 85% - 105% des Wertes vor dem Bleichen betrug. Bei der Festlegung dieses Kriteriums wurde ein leichtes Bleichen während der Messung berücksichtigt.

### 5.2.15 FRAP-Experimente mit *Membrane-Sheets*

Es wurden *Membrane-Sheets* von transfizierten PC12-Zellen hergestellt und FRAP-Experimente in Sonifizierungspuffer (RT) wie in 5.2.14 beschrieben durchgeführt. Im Gegensatz zu intakten Zellen ist bei *Membrane-Sheets* die Gesamtfluoreszenz bekannt und ermöglicht, das erhaltene Signal vor der Normalisierung für z.B. Bleichen, Schwankungen der Laserleistung etc. zu korrigieren. Für jeden Zeitpunkt ( $t$ ) einer Messung wurde das Nettofluoreszenzsignal unter Verwendung folgender Formel korrigiert und normalisiert:

$$Signal_{ROI\ korr.\ norm.}(t) = \frac{Signal_{gesamt}(vor\ Bleichen)}{Signal_{gesamt}(t)} \times \frac{Signal_{ROI}(t)}{Signal_{ROI}(vor\ Bleichen)} \quad (3)$$

Die Korrektur ist nötig, da hier während des Bleichens im Vergleich mit intakten Zellen, bei denen die gebleichte Region nur 1/60 der Zelloberfläche ausmacht, ein viel größerer Teil der Gesamtfluoreszenz verloren geht. Die Korrektur wirkt sich nicht auf die ermittelten Halbwertszeiten aus, ermöglicht aber eine exakte Bestimmung des immobilen Anteils an gebleichten Molekülen. Bei ganzen Zellen ist die Gesamtfluoreszenz nicht bekannt und die Korrektur kann nicht vorgenommen werden. Unvollständige Rückkehr der Fluoreszenz im gebleichten Bereich könnte bei intakten Zellen teilweise auch aus einem Gleichgewicht zwischen Diffusion und Bleichen im Laufe der Messung resultieren. In jedem unabhängigen Experiment wurden die am selben Tag erhaltenen Daten von 8 - 10 *Membrane-Sheets* gemittelt.

### 5.2.16 STED-Mikroskopie

Zur STED-mikroskopischen Untersuchungen von mit Atto532 gefärbten Proben wurde hier derselbe Mikroskop-Aufbau wie in Willig et al., 2006 beschrieben eingesetzt.

Für das in Abb. 17 gezeigte Experiment wurde Atto647N-markierter Sekundärantikörper verwendet. Dieser Farbstoff wurde mit einer gepulsten Laserdiode bei 635 nm (~ 70 Pikosekunden Pulsbreite, *Picoquant*, Berlin, Deutschland) angeregt und die Fluoreszenz zwischen 660 - 700 nm mittels einer *Avalanche*-Photodiode detektiert. Das gepulste STED-Licht mit einer Wiederholungsrate von 76 MHz und einer Wellenlänge von 750 nm stammte von einem Titanium:Sapphire Laser (Coherent, Santa Clara, CA, USA), wobei Femtosekunden-Pulse mit einer optischen Faser aufgrund von Dispersion auf 500 Pikosekunden gestreckt wurden. Die Pulse der Anregungs-Laserdiode wurden durch die Pulse des STED-Lasers ausgelöst. Sowohl der Anregungs- als auch der STED-Strahl wurden in ein 100x 1,4 NA plan-apochromatisches Öl-Objektiv (*Leica Microsystems*, Mannheim, Deutschland) eingekoppelt, über das auch das emittierte Fluoreszenzlicht gesammelt wurde. Die durchschnittliche Anregungs- bzw. STED-Leistung der Fokusebene betrug 12  $\mu$ W bzw. 73 mW.

STED-Mikroskopie wurde von *Dr. Karin Willig* und *Benjamin Harke* (Abteilung NanoBiophotonik, MPI für biophysikalische Chemie, Göttingen, Deutschland) durchgeführt.

### 5.2.17 Analyse der Dichte der Syntaxin 1-Cluster

Um die Dichte der Syntaxin 1-Cluster auf von PC12-Zellen stammenden *Membrane-Sheets* zu bestimmen wurden diese zunächst mit HPC-1/Schaf-anti-Maus-Atto532 angefärbt und mittels STED-Mikroskopie untersucht. Die erhaltenen Bilder wurden wie unten näher beschrieben prozessiert, zentrale Ausschnitte gedruckt und die Zahl der Cluster auf diesen Ausdrucken von drei Personen unabhängig voneinander ausgezählt. Für jedes *Membrane-Sheets* wurde der

Mittelwert gebildet und auf die ausgezählte Fläche bezogen. Es wurden zwei Datensätze unabhängig voneinander ausgewertet.

Zum einen wurden Bilder von *Membrane-Sheets*, die von nicht transfizierten PC12-Zellen stammten, für die Analyse unter Verwendung der *blur* (10%) Option in Metamorph 4.1.7 Fast-Fourier-Transformations (FFT)-gefiltert und die jeweils zentralen  $2,25 \mu\text{m}^2$  mit festgelegter Skalierung zum Auszählen der *Cluster* gedruckt.

In einem anderen Experiment wurde zur Analyse von *Membrane-Sheets*, die von myc-Sx1A überexprimierenden PC12-Zellen stammten, zunächst eine  $2,4 \mu\text{m} \times 2,4 \mu\text{m}$  große Region jedes STED-Bildes in Metamorph *blur* (10%) und *Highpass* (30%) FFT-gefiltert. Die zentralen  $0,81 \mu\text{m}^2$  des erhaltenen Bildes wurden autoskaliert und ausgedruckt. Die in Abb. 21 gezeigten Aufnahmen von *Membrane-Sheets* wurden zur besseren Veranschaulichung der Strukturen *blur* (30%) FFT-gefiltert und von Hand skaliert.

### 5.2.18 Korrelationsanalyse

Die Berechnung des *Pearson*-Korrelationskoeffizienten stellt eine objektive Möglichkeit dar, die Ähnlichkeit zweier Bilder zu quantifizieren (Manders et al., 1992). Er spiegelt den Grad der linearen Beziehung zweier Variablen wieder (in diesem Fall der Pixel-Intensitäten an den entsprechend gleichen Stellen der zu vergleichenden Bilder) und kann zwischen  $-1$  (für ein Bild und sein Negativ) und  $1$  (für zwei identische Bilder) schwanken. Es wurde eine mit Hilfe von *Dr. Rainer Heintzmann* (King's College, London, UK) entworfene MATLAB 7.0.1.24704 (*MathWorks*, Natick, MA, USA) Routine verwendet, die einen eventuellen lateralen Versatz der beiden zu vergleichenden Bilder automatisch korrigierte und dem Benutzer ermöglichte, auf dem *Membrane-Sheet* eine zu analysierende ROI beliebiger Form zu wählen. Es wurde darauf geachtet, dass der analysierte Bereich weder die gelegentlich auftretenden Membranstülpungen an den Rändern der *Membrane-Sheets* noch offensichtliche Anfärbungsartefakte beinhaltete.

Der *Pearson*-Korrelationskoeffizienten ( $r$ ) als Maß für die Ähnlichkeit z.B. eines grünen und roten Bildes wurde wie folgt berechnet:

$$r = \frac{\sum_i (grün_i - grün_{mittel}) \times (rot_i - rot_{mittel})}{\sqrt{\sum_i (grün_i - grün_{mittel})^2 \times \sum_i (rot_i - rot_{mittel})^2}} \quad (4)$$

wobei  $i$  für den Intensitätswert einer individuellen Pixelposition und  $mittel$  für die durchschnittliche Pixelintensität des jeweiligen Bildes stehen.

### 5.2.19 Kolokalisationsanalyse

Auf ähnliche Weise wie in Lang et al., 2002 beschrieben wurde basierend auf morphologischen Kriterien der Anteil an Syntaxin 4-*Clustern* ermittelt, der mit Syntaxin 1- bzw. Thy1-Strukturen kolokalisiert. Es wurden dieselben um den lateralen Versatz korrigierten Bilder verwendet, mit denen auch die Korrelationsanalyse durchgeführt wurde. Im Syntaxin 4-Bild wurden Kreise um 15 - 21 hell fluoreszierende Strukturen (*Cluster*) gelegt und anschließend an identische Positionen im Syntaxin 1- bzw. Thy1-Bild übertragen. Wenn sich im Syntaxin 4- und Referenzkanal die visualisierte Struktur in ihrer Morphologie ähnelte und sich das Fluoreszenzmaximum im selben Quadranten des Kreises befand, wurde diese als positiv (kolokalisiert) gewertet. War dies nicht der Fall, wurde sie als negativ (nicht kolokalisiert) eingestuft. Konnte keine klare Entscheidung getroffen werden, wurde die Struktur als neutral bewertet und ging nicht weiter in die Analyse ein. Um für die zufällige Kolokalisation (Hintergrund-Kolokalisation) aufgrund der Dichte der Signale korrigieren zu können, wurden dieselben Kreise auch auf ein gespiegeltes Bild des Referenzkanals übertragen. Dabei wurde durch manuelle Positionskorrektur sichergestellt, dass sich alle bewerteten Kreise auch in dem gespiegelten Bild auf dem *Membrane-Sheet* befanden. Die Strukturen wurden dann wie oben beschrieben als positiv, negativ oder neutral eingestuft.

Das Vorgehen soll am Beispiel der Untersuchung der Kolokalisation von Syntaxin 4 und 1 im Detail erläutert werden. In drei unabhängigen

Experimenten wurden jeweils fünf bis sieben *Membrane-Sheets* hinsichtlich der Kolokalisation von Syntaxin 4- mit Syntaxin 1-Strukturen untersucht. Im Durchschnitt wurden 1,2 (6,2%) der Syntaxin 4-*Cluster* als mit Syntaxin 1-Strukturen kolokalisiert ( $Kolokalisation_{ermittelt}$ ), 18,11 (93,8%) als nicht kolokalisiert und 0,73 als neutral (nicht berücksichtigt bei der Bestimmung der prozentualen Anteile) eingestuft. Auf den gespiegelten Bildern wurden durchschnittlich 0,96 Kreise (5,3%) als positiv ( $Kolokalisation_{zufällig}$ ), 17,45 (94,7%) als negativ und 1,64 als neutral bewertet. Die Korrektur für die zufällige Kolokalisation wurde mit folgender Formel vorgenommen (Lang et al., 2002):

$$Kolokalisation = \frac{Kolokalisation_{ermittelt} - Kolokalisation_{zufällig}}{1 - Kolokalisation_{zufällig} / 100} \quad (5)$$

In drei unabhängigen Experimenten waren durchschnittlich nach Korrektur  $0,9\% \pm 1,5\%$  der Syntaxin 4-*Cluster* mit Syntaxin 1 kolokalisiert (Mittelwert  $\pm$  Standardfehler).

Die Kolokalisation von Syntaxin 4 mit Thy1 wurde auf dieselbe Weise untersucht. Es wurden  $n = 3$  unabhängigen Experimenten mit je fünf *Membrane-Sheets* ausgewertet.

## 6 Ergebnisse

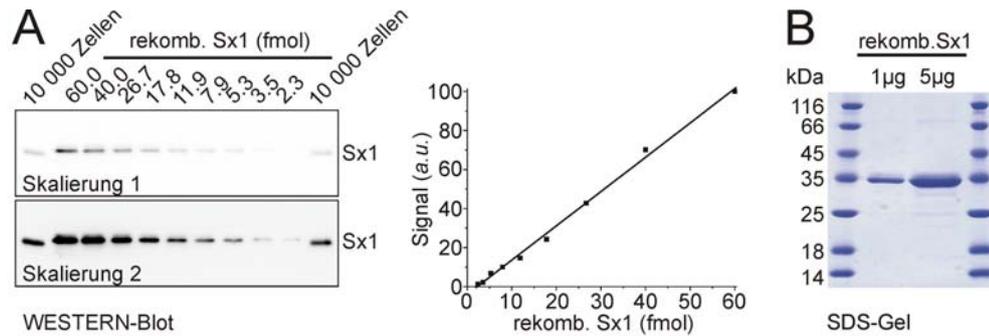
Syntaxin 1 ist sowohl in neuroendokrinen PC12-Zellen (Lang et al., 2001; Aoyagi et al., 2005) als auch in  $\beta$ -Zellen des Pankreas (Ohara-Imaizumi et al., 2004a) nicht uniform verteilt sondern bildet sogenannte *Cluster*. In der hier vorliegenden Arbeit wurden diese Strukturen näher charakterisiert. Es wurden Anzahl, Dichte, Größe und der molekulare Mechanismus der Bildung von Syntaxin 1-*Clustern* in der PC12-Zellmembran untersucht.

### 6.1 Verhältnis von Syntaxin 1-Molekülen zu *Clustern*

Um das Verhältnis von Molekülen zu *Clustern* ermitteln zu können, muss die Zahl sowohl der Syntaxin 1-Moleküle als auch der Syntaxin 1-*Cluster* pro Zelle bekannt sein. Der zweite Parameter lässt sich aus der Dichte der *Cluster* pro Flächeneinheit Zellmembran und der Oberfläche der Zelle berechnen.

#### 6.1.1 Anzahl der Syntaxin 1-Moleküle pro PC12-Zelle

Um die Anzahl der Syntaxin-Moleküle pro PC12-Zelle zu bestimmen, wurden quantitative *Western-Blot*-Analysen durchgeführt (Abb. 14A). Als Standard diente gereinigtes rekombinantes Syntaxin 1 (vgl. Abb. 14B). Über die erhaltene Eichgerade konnte die Syntaxin-Menge in 10 000 PC12-Zellen bestimmt und auf die Zellzahl bezogen werden. So wurde in sechs unabhängigen Experimenten bestimmt, dass sich in einer PC12-Zelle im Mittel  $8,3 \times 10^5$  Syntaxin 1-Moleküle befinden.



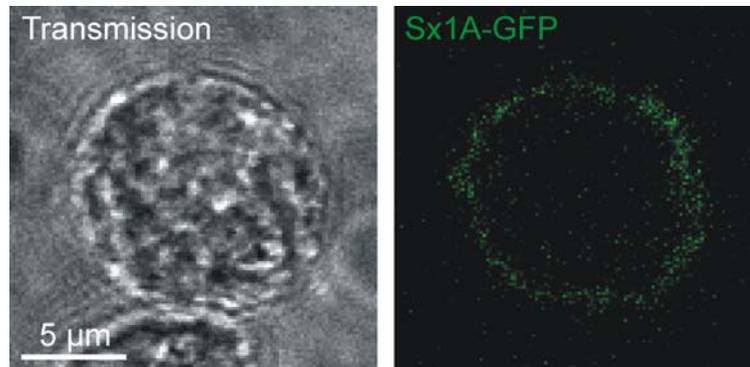
**Abb. 14**      **Quantitativer Western-Blot für Syntaxin 1**

Lysat von 10 000 PC12-Zellen und rekombinantes Syntaxin 1 wurden nach einer SDS-PAGE auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und Syntaxin 1 mit dem monoklonalen Antikörper HPC 1 über *Enhanced-Chemiluminescence* detektiert. Die erhaltenen Banden wurden densitometrisch ausgewertet. (A) Gezeigt sind ein beispielhafter quantitativer *Western-Blot* in zwei verschiedenen Intensitätsskalierungen (links) und die zugehörige Eichgerade (rechts), mit deren Hilfe die Syntaxinmenge bestimmt werden konnte. Es wurde ermittelt, dass sich in einer PC12-Zelle durchschnittlich  $8,3 \times 10^5 \pm 2,0 \times 10^5$  Syntaxin 1-Moleküle befinden (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung;  $n = 6$  unabhängige Experimente). (B) Die Reinheit des als Standard verwendeten rekombinanten Proteins wurde anhand eines *Commassie-Blue*-gefärbten SDS-Gels dokumentiert.

### 6.1.2 Bestimmung der PC12-Zelloberfläche

Zur Ermittlung der Gesamtfläche der Zellmembran wurde die Tatsache genutzt, dass abgelöste PC12-Zellen in PBS in nächster Nahrung eine Kugelform annehmen und diese auch nach Sedimentation auf die Oberfläche eines Deckglases für einige Minuten beibehalten. Von solchen kugelförmigen Zellen wurden mit einem konfokalen Laser-Rastermikroskop Bilder von mehreren fokalen Ebenen, sogenannte optische Schnitte in der z-Achse, aufgenommen um die äquatoriale Ebene der Zelle zu ermitteln (Abb. 15). Es wurden Sx1A-GFP überexprimierende PC12-Zellen verwendet, so dass die Plasmamembran fluoreszenzmarkiert vorlag. Anhand des Bildes des grün-fluoreszierenden Proteins (GFPs) der äquatorialen Ebene wurde ein durchschnittlicher PC12-Zelldurchmesser von  $12,1 \mu\text{m}$  ermittelt. Unter Annahme der Kugelform ließ sich die durchschnittliche Zelloberfläche aus dem Durchmesser errechnen. Der ermittelte Wert

von  $460 \mu\text{m}^2$  ist eine Untergrenze, da unter Umständen vorhandene kleinste Membraneinstülpungen (sogenannte „*ruffles*“) bei dieser Methode nicht berücksichtigt wurden.



**Abb. 15** Bestimmung des PC12-Zelldurchmessers

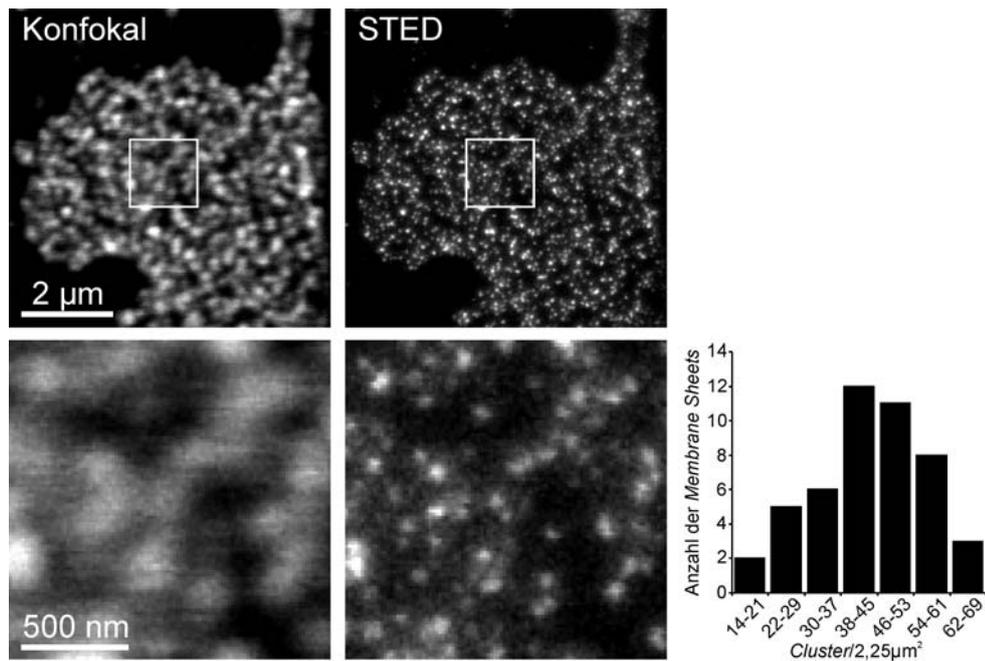
Kugelförmige PC12-Zellen, die Sx1A-GFP als Membranmarker überexprimierten, wurden mittels konfokaler Laser-Rastermikroskopie untersucht. Der Durchmesser der jeweiligen Zelle wurde in der äquatorialen Ebene gemessen. Links ist das Transmissions-, rechts das entsprechende für die Analyse verwendete Fluoreszenzbild einer repräsentativen PC12 Zelle gezeigt. Es wurde ein Durchmesser von  $12,1 \mu\text{m} \pm 1,5 \mu\text{m}$  ermittelt (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung,  $n = 85$  Zellen).

### 6.1.3 Bestimmung der Dichte der Syntaxin 1-Cluster

Zur Bestimmung der *Cluster*-Dichte in der PC12-Zellmembran wurden *Membrane-Sheets* hergestellt, auf diesen Syntaxin 1 immunozytochemisch angefärbt und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Verwendung von *Membrane-Sheets* macht den Einsatz von Detergenzien bei der Antikörperfärbung von Strukturen der Innenseite der Zellmembran überflüssig. Ihrer 2D-Morphologie und die damit verbundene Abwesenheit von Hintergrundfluoreszenz außerhalb der fokalen Ebene ist ein weiterer Vorteil der *Membrane-Sheet* Proben. Beugungslimitierte Auflösung reichte nicht aus, um alle Syntaxin-*Cluster* zu trennen, daher wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Stefan Hell die höher auflösende STED-Mikroskopie (Hell und Wichmann, 1994) eingesetzt (Abb. 16). Gerade in den vergrößerten Bildausschnitten von Abb. 16 (untere Zeile) wird deutlich, dass die in

diesem Fall 2,7<sup>2</sup>-fach verringerte *Focal-Spot-Size* der STED-Mikroskopie notwendig ist, um die *Cluster* im Bild trennen und so ihre Dichte bestimmen zu können. Details zur Ermittlung der erreichten Auflösung sind in Abb. 21 illustriert und im Anhang beschrieben. Im Mittel betrug die Dichte 19,6 *Cluster* pro  $\mu\text{m}^2$  Plasmamembran. Dieser Wert stellt möglicherweise eine Unterschätzung dar, da unter Umständen ein kleiner Teil der Syntaxin-*Cluster* trotz STED-Mikroskopie nicht aufgelöst und damit in der Analyse nicht erfasst wurde.

Aufgrund der beobachteten gleichmäßigen Verteilung der Sx1A-GFP-Fluoreszenz in der gesamten Zellmembran kann angenommen werden, dass die auf den *Membrane-Sheets* beobachtete *Cluster*-Dichte repräsentativ für die gesamte Plasmamembran ist. Daher lässt sich unter Verwendung dieses Wertes und der ermittelten Zelloberfläche berechnen, dass eine durchschnittliche PC12-Zelle etwa 9000 Syntaxin 1-*Cluster* besitzt. Die Anzahl der Syntaxin 1-Moleküle pro PC12-Zelle ist bekannt (830 000, Abb. 14), womit sich ein Syntaxin/*Cluster*-Verhältnis von ca. 90 ergibt. Dieser Wert ist als Obergrenze zu verstehen, da zwar Sx1A-GFP beinahe ausschließlich an der Plasmamembran lokalisiert ist, dieses aber über intrazellulären Transport dort hingelangt und so sicherlich ein kleiner Teil des endogenen Syntaxins auch intrazellulär lokalisiert vorkommt. Daher befinden sich nicht alle Moleküle in der Plasmamembran.



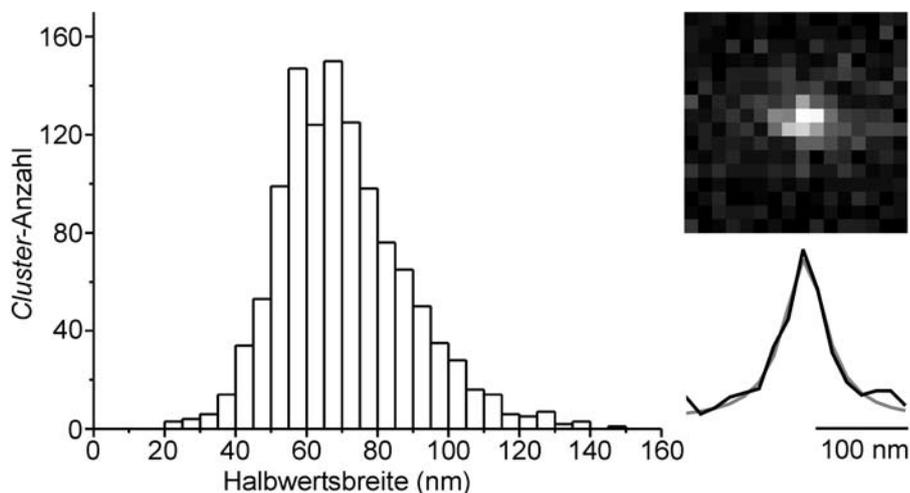
**Abb. 16** STED-Mikroskopie zur Bestimmung der Syntaxin 1-Cluster-Dichte

Es wurden *Membrane-Sheets* von PC12-Zellen hergestellt, fixiert, mit HPC-1/Schaf-anti-Maus-Atto532 für Syntaxin 1 angefärbt, mittels STED-Mikroskopie untersucht und die *Cluster*-Dichte analysiert. In der linken und der mittleren Spalte ist jeweils ein konfokal- und ein STED-mikroskopisches Bild desselben *Membrane-Sheets* dargestellt. Die vergrößerten Bildausschnitte in der jeweils unteren Reihe zeigen, dass im STED-Bild einzelne *Cluster* zum Vorschein kommen, die in der zugehörigen konfokalen Aufnahme nicht aufgelöst werden konnten. Es wurden für jedes von 47 *Membrane-Sheets* ein  $2,25\mu\text{m}^2$  großer Bildausschnitt analysiert (das Histogramm der erhaltenen Werte ist rechts gezeigt) und eine mittlere Dichte von  $19,6$  *Clustern* pro  $\mu\text{m}^2$  Zellmembran bestimmt. Die STED-Mikroskopie wurde von Dr. Katrin Willig (Abteilung NanoBiophotonik, MPI für biophysikalische Chemie) durchgeführt.

## 6.2 Bestimmung der Größe der Syntaxin 1-Cluster

Die Auflösung der in Abb. 16 und 21 gezeigten STED-Bilder reicht aus, um zuverlässig die Dichte der Syntaxin-*Cluster* zu bestimmen. Um allerdings auch die Größe dieser Strukturen zu ermitteln, darf die *Focal-Spot-Size* nicht größer sein als das zu untersuchende Objekt, was allerdings für die in Abb. 16 gezeigten Bilder der Fall war (Dr. Katrin Willig persönliche Mitteilung). Daher war es nötig für diesen Versuch den an Sekundärantikörper gekoppelten Farbstoff Atto647N für die Färbung der Proben zu verwenden und einen für dessen Detektion

optimierten STED-Aufbau einzusetzen, der zum Zeitpunkt der Bestimmung der *Cluster*-Dichte noch nicht zur Verfügung stand (Abb. 17). Unter Berücksichtigung sowohl der effektiven Fokusgröße des eingesetzten STED-Mikroskops (*Point-Spread-Function* = 53 nm) als auch der theoretischen Verteilung der fluoreszenzmarkierten Antikörper auf dem *Cluster* ließ sich anhand der gemessenen Halbwertsbreiten der von den Syntaxin-*Clustern* stammenden Signale (Median 68 nm, vgl. Abb. 17), die mittlere *Cluster*-Größe auf 50 - 60 nm abschätzen (persönliche Mitteilung von *Benjamin Harke* und *Dr. Katrin Willig*; Details siehe Anhang).



**Abb. 17 Bestimmung der Größe der Syntaxin 1-Cluster**

Von PC12-Zellen stammende *Membrane-Sheets* wurden mit HPC-1/Schaf-anti-Maus-Atto647N für Syntaxin 1 angefärbt und von *Benjamin Harke* und *Dr. Katrin Willig* STED-mikroskopisch untersucht und die erhaltenen Daten analysiert. Rechts ist beispielhaft eine *Linescan*-Analyse dargestellt, die für 1166 einzelne *Cluster* von 25 *Membrane-Sheets* durchgeführt wurde. Für jedes *Cluster*-Signal wurde aus dem *Lorentz-Fit* (graue Line) des erhaltenen *Linescans* (schwarze Line) die Halbwertsbreite bestimmt. Das resultierende Histogramm ist links dargestellt. Aus dem erhaltenen Median von 68 nm ließ sich die echte mittlere *Cluster*-Größe auf zwischen 50 und 60 nm abschätzen. Details zur Analyse sind im Anhang erläutert. Daten zur Verfügung gestellt von *Benjamin Harke* und *Dr. Katrin Willig* (Abteilung NanoBiophotonik, MPI für biophysikalische Chemie).

### 6.3 Spezifität des Syntaxin-Clusterings

Im Gegensatz zu Syntaxin 1, das ausschließlich im Nervensystem und neuroendokrinen Zellen detektierbar ist, wird Syntaxin 4 in vielen Geweben exprimiert [z.B. Herz, Lunge, Milz, Niere (Bennett et al., 1993)]. In der Zellmembran von Fibroblasten (BHK-Zellen) wurde es in *Clustern* organisiert gefunden (Lang et al., 2001). Beide Syntaxine sind vorwiegend an der Plasmamembran lokalisiert, sind gleich groß (Syntaxin 1: 288 Aminosäuren, Syntaxin 4: 298 Aminosäuren) und zeichnen sich durch gleichen Aufbau aus (N-terminale Domäne, *Linker-Region*, SNARE-Motiv, TMR). Wie sich diese strukturell so ähnlichen Proteine [65% Sequenz-Ähnlichkeit (Bennett et al., 1993)] relativ zueinander verteilen, wenn sie in derselben Membran vorkommen, war bislang nicht geklärt.

In PC12-Zellen sind beide Syntaxine vorhanden (*Western-Blot-Analyse*, Daten nicht gezeigt). Daher wurden, um diese Frage zu adressieren, von PC12-Zellen stammende *Membrane-Sheets* gleichzeitig für Syntaxin 1 und 4 angefärbt. Wie Syntaxin 1 ist auch Syntaxin 4 in der PC12-Zellmembran in *Clustern* konzentriert (Abb. 18A), ähnlich wie zuvor in Fibroblasten beobachtet (Lang et al., 2001).

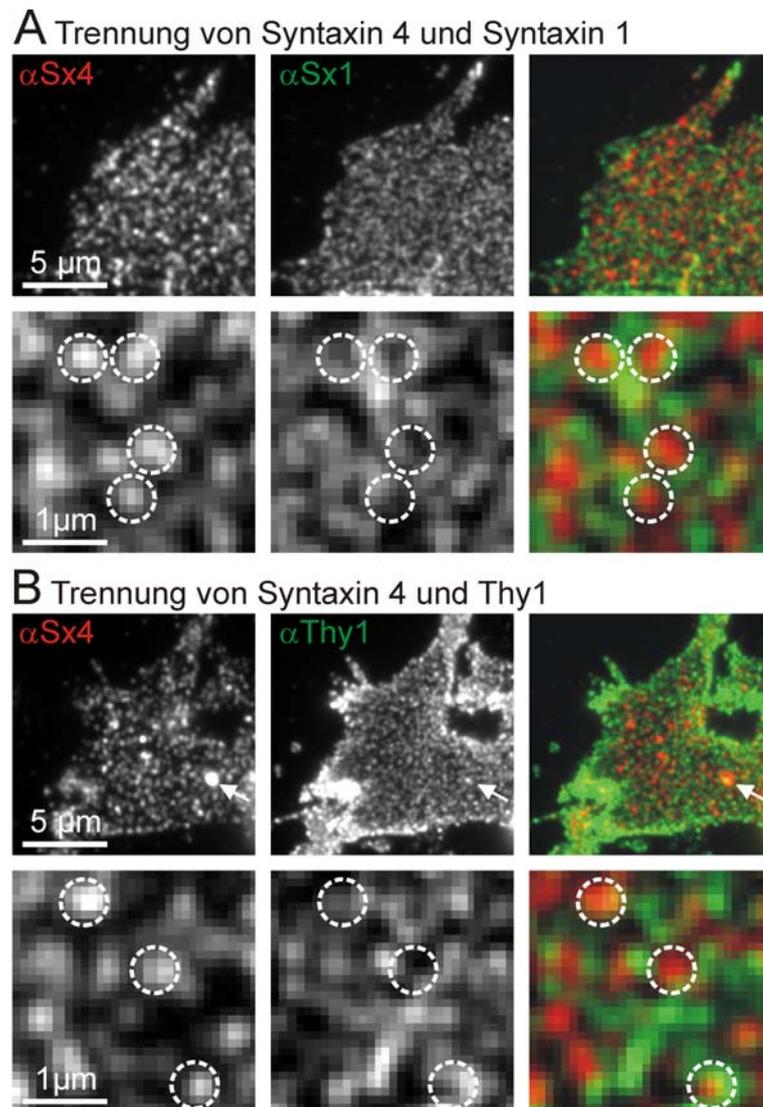
Die Bilder der Doppelanfärbungen wurden mit zwei im Methodenteil näher beschriebene Bildanalysetechniken untersucht, um die relativen Proteinverteilungen näher zu charakterisieren.

In der Kolokalisationsanalyse wird basierend auf morphologischen Kriterien bewertet, welcher Anteil der Strukturen in einem Bild äquivalente Signale im anderen Kanal aufweist, d.h. wie viele der in einem Kanal visualisierten Strukturen mit solchen im zweiten kolokalisieren. Die erhaltenen Prozentwerte wurden wie im Methodenteil unter 5.2.19 beschrieben für rein zufällige Kolokalisation, die von der Signaldichte abhängt, korrigiert.

In der Korrelationsanalyse wurde die Ähnlichkeit zweier Bilder durch die Berechnung des *Pearson*-Korrelationskoeffizienten quantifiziert. Dieser spiegelt den Grad der linearen Beziehung zweier Variablen wider (in diesem Fall der Pixel-Intensitäten an den entsprechend gleichen Stellen

der zu vergleichenden Bilder) und kann zwischen  $-1$  (für ein Bild und sein Negativ) und  $1$  (für zwei identische Bilder) schwanken. Sind die beiden Signale komplett unabhängig voneinander ergibt sich ein Wert von  $0$ .

Die für Syntaxin 4 und 1 erhaltenen  $0,9\% \pm 1,5\%$  Kolo­kalisierung sowie der *Pearson*-Korrelationskoeffizient von  $0,01 \pm 0,01$  zeigen deutlich, dass die beiden Proteine sich trotz ihrer hohen strukturellen Ähnlichkeit nicht in denselben *Clustern* mischen (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben;  $n = 3$ ). Da Syntaxin 1 in der PC12-Zellmembran vom *Raft*-Marker Thy1 getrennt vorkommt (Lang et al., 2001), wurde die Verteilung von Syntaxin 4 auch mit der dieses Proteins verglichen (Abb. 18B). Genau wie Syntaxin 1 kolo­kalisiert auch Syntaxin 4 in der PC12-Zellmembran nicht mit dem *Raft*-Marker (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler: Kolo­kalisierung:  $-0,2\% \pm 7,5\%$ ; *Pearson*-Korrelationskoeffizient:  $0,07 \pm 0,01$ ;  $n = 3$ ). Es liegen in dieser Membran also mindestens drei Typen von sich gegenseitig ausschließenden Membrandomänen vor: *Rafts* mit Thy1, Syntaxin 1- und Syntaxin 4-*Cluster*.



**Abb. 18 Die Konzentration von Syntaxinen in *Clustern* ist ein sehr spezifischer Prozess**

Nach Doppelanfärbungen fixierter, von PC12-Zellen stammender *Membrane-Sheets* wurde die relative Verteilung von Syntaxin 4 (links, rot im *Overlay*) zu Syntaxin 1 (A, Mitte, grün im *Overlay*) beziehungsweise zum *Raft*-Marker Thy1 (B, Mitte, grün im *Overlay*) fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Vergrößerte Bildausschnitte der jeweiligen Überblicksbilder sind in der entsprechenden Zeile darunter gezeigt. Keines der mittels Antikörper visualisierten Proteine zeigt eine uniforme Färbung. Aus den überlagerten Bildern (rechts) wird deutlich, dass das Syntaxin 4-Muster weder dem seines nahen Verwandten Syntaxin 1 noch dem des *Raft*-Markers entspricht. Als Orientierungshilfe wurden in den vergrößerten Syntaxin 4-Bildern jeweils einige stark fluoreszierende Strukturen mit Kreisen markiert und diese an identische Positionen des entsprechenden anderen Kanals sowie des überlagerten Bildes übertragen. Die Kolo-kalisation von Syntaxin 4 mit dem entsprechend Referenzprotein wurde auf zweierlei Art analysiert. Zunächst wurde basierend auf morphologischen Kriterien, der

Anteil an Syntaxin 4-*Clustern* ermittelt, der mit Syntaxin 1- bzw. Thy1-Strukturen kolokalisiert. In jeweils drei unabhängigen Experimenten mit je fünf bis sieben *Membrane-Sheets* konnte weder eine Kolokalisation des Proteins mit Syntaxin 1 ( $0,9\% \pm 1,5\%$ ) noch mit Thy1 ( $-0,2\% \pm 7,5\%$ ) festgestellt werden. Unabhängig davon wurden für dieselben *Membrane-Sheets* der jeweils rote und grüne Kanal mittels Korrelationsanalyse verglichen. Die errechneten *Pearson*-Korrelationskoeffizienten (Syx 4/Syx 1:  $-0,01 \pm 0,01$ ; Syx 4/Thy1:  $0,07 \pm 0,01$ ) zeigen ebenfalls, dass sich die visualisierten Proteinmuster stark unterscheiden. Es sind Mittelwerte und deren Standardfehler angegeben. Die Analysen sind im Methodenteil unter 5.2.18 und 5.2.19 im Detail beschrieben.

## 6.4 Syntaxin 1-*Clustering* ist unabhängig von Ko-Faktoren

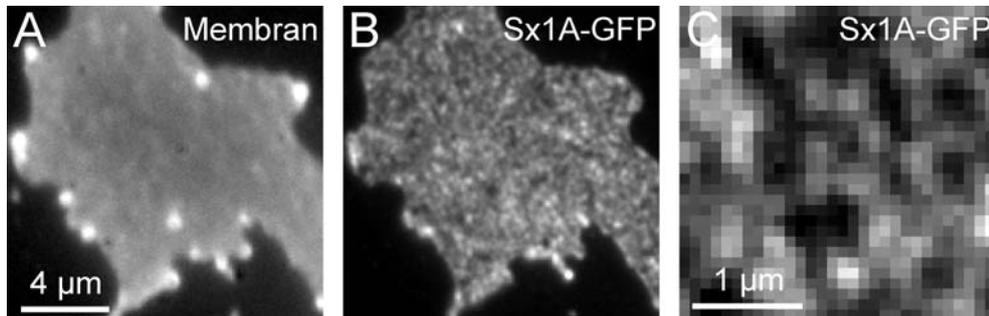
Es stellt sich die Frage, was dazu führt, dass Syntaxine überhaupt in *Clustern* organisiert vorkommen. Warum verteilen sie sich nicht gleichmäßig über die gesamte Membran und was bewirkt die Syntaxin-Akkumulation in diesen Strukturen innerhalb der Zellmembran? Welche Kräfte verhindern den Zerfall solcher Membrandomänen?

Hier wurde zunächst die Frage adressiert, ob das Bilden von Clustern eine intrinsische Eigenschaft der Syntaxin 1-Moleküle ist, oder ob zusätzliche Faktoren eine Rolle spielen.

### 6.4.1 Syntaxin 1A-GFP bildet auch in BHK-Zellen *Cluster*

Syntaxin 1 kommt in BHK-Zellen endogen nicht vor (*Western-Blot*-Analyse nicht gezeigt). Deshalb wurde getestet, wie sich eine mEGFP-markierte, ektopisch exprimierte Variante dieses Proteins (Sx1A-GFP) in diesen Zellen verhält. Es wurde in diesem Experiment sowie in der gesamten vorliegenden Arbeit die monomere Variante des fluoreszierenden Proteins eingesetzt, um sicherzugehen, dass keine Oligomerisierung über das eingeführte *Tag* erfolgt. In diesem Versuch wurden *Membrane-Sheets* verwendet, da bei fluoreszenzmikroskopischer Untersuchung dieser keine Hintergrundfluoreszenz das eigentliche Signal stört. Auf nicht fixierten *Membrane-Sheets* von BHK-Zellen, die das Fusionsprotein transient

überexprimierten, lag dieses stets in *Clustern* vor (Abb. 19). Der *Clustering*-Mechanismus funktioniert also auch in der Fibroblasten-Zelllinie. Exklusiv in neuroendokrinen Zellen vorkommende Faktoren können also keine Voraussetzung für die *Cluster*-Bildung sein.



**Abb. 19** Syntaxin 1A-GFP bildet auch in BHK-Zellen *Cluster*

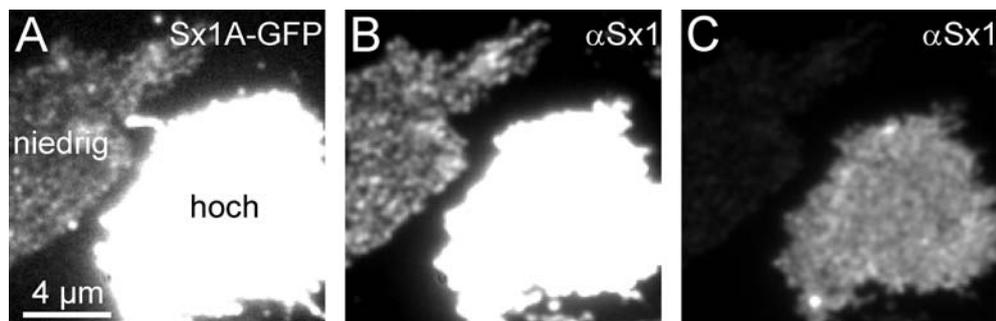
*Membrane-Sheets* von mit Sx1A-GFP transfizierten BHK-Zellen, die selbst kein endogenes Syntaxin 1 besitzen, wurden direkt auf dem Mikroskop generiert und so das Zeitfenster zwischen Herstellung und fluoreszenzmikroskopischer Untersuchung minimiert. Die Integrität der Membran wurde durch Anfärbung der Phospholipide mit TMA-DPH überprüft (A). Sx1A-GFP zeigt auch in der Zellmembran von BHK-Zellen keine uniforme Verteilung (B, vergrößerter Ausschnitt in C). Das erhaltene Muster ähnelt dem der endogenen Syntaxin 1-*Cluster* in der PC12-Zellmembran (vgl. Abb. 18A). Das in (A-C) dargestellte ist repräsentativ für insgesamt 19 *Membrane-Sheets*.

#### 6.4.2 Überexpression von Syntaxin 1A in PC12-Zellen

Als nächstes wurde die Frage adressiert, ob durch Erhöhung der Syntaxin-Konzentration in der PC12-Zellmembran ein putativer, für die *Cluster*-Bildung nötiger Ko-Faktor limitierend werden kann. Sollte das der Fall sein, würde bei starker Überexpression ein Teil des Syntaxins nicht länger in *Clustern* sondern uniform verteilt vorliegen. Bei schwacher Überexpression (Abb. 20, linkes *Membrane-Sheet*) liegt Syntaxin 1 eindeutig in *Clustern* vor. Ein stark erhöhtes Syntaxin-Level (Abb. 20, rechtes *Membrane-Sheet*) dagegen führt zu einem diffuseren - weniger "scharf" erscheinenden - Bild.

Die durch die starke Überexpression verursachte Depletierung eines potentiell für die *Cluster*-Bildung benötigten Ko-Faktors und die damit

einhergehende Bildung eines Hintergrunds an uniform verteiltem Syntaxin könnte diesen Effekt erklären. Alternativ könnte der Prozess der *Cluster*-Bildung völlig intakt und das diffuser erscheinende Bild durch die nicht mehr ausreichende beugungsbedingte Auflösung konventioneller Lichtmikroskopie bedingt sein.

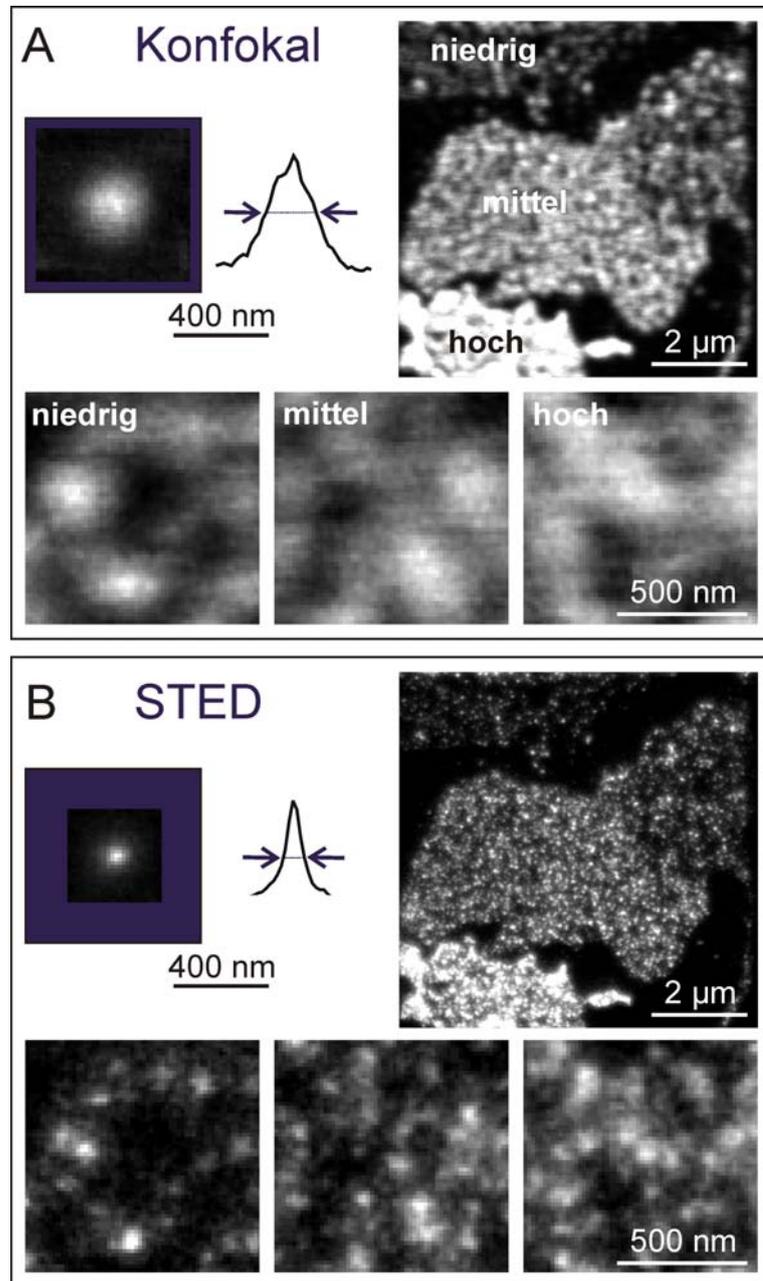


**Abb. 20** Überexpression von Syntaxin 1A-GFP in PC12-Zellen

*Membrane-Sheets* von Sx1A-GFP überexprimierenden PC12-Zellen wurden fixiert, mit einem Antikörper (HPC-1) angefärbt, der sowohl endogenes als auch überexprimiertes Syntaxin 1 erkennt (B, andere Skalierung siehe C) und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Wie anhand der GFP-Fluoreszenz (A) leicht zu erkennen ist, enthielt das linke *Membrane-Sheet* kaum Sx1A-GFP, weshalb die in (B) angefärbten *Cluster* zum größten Teil auf endogenes Syntaxin 1 zurückzuführen sind. Am rechten *Membrane-Sheet* wird deutlich, dass ein stark erhöhtes Syntaxin-Level ein diffuseres - weniger "scharf" erscheinendes - Bild der Syntaxin-Verteilung mit sich bringt (C).

Welche der beiden Möglichkeiten zutrifft, ließ sich durch STED-Mikroskopie klären. *Membrane-Sheets*, die von myc-Sx1A überexprimierenden PC12-Zellen stammten, wurden für Syntaxin 1 angefärbt und parallel mit herkömmlicher konfokaler Laser-Raster- und STED-Mikroskopie untersucht. Die jeweiligen *Point-Spread-Functions* (PSFs) wurden mit Hilfe von fluoreszierenden Punktquellen ermittelt (vgl. oben rechts in Abb. 21A und B; Details im Anhang). Durch den Einsatz der STED-Technik wurde hier eine  $2,7^2$ -fach geringere *Focal-Spot-Size* und die damit einhergehende Verbesserung der Auflösung erreicht. In Abb. 21 können im selben Bildausschnitt anhand der Intensität ihrer Anfärbung *Membrane-Sheets* mit stark variierendem Syntaxin-Level unterschieden werden. Auf den individuell skalierten,

vergrößerten Bildern lässt sich in den STED-Aufnahmen ein Zusammenhang zwischen der Expressionsstärke und der *Cluster*-Dichte erkennen, der mit herkömmlicher konfokaler Laser-Rastermikroskopie verborgen bleibt.



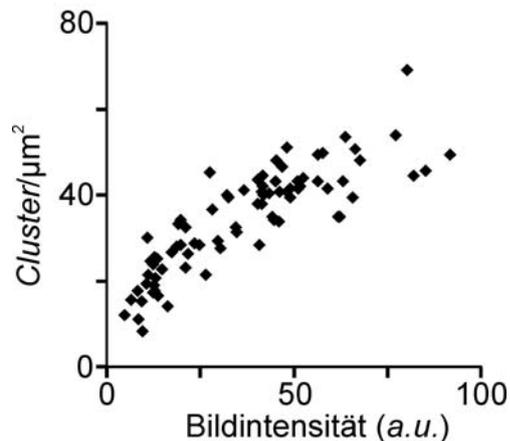
**Abb. 21** Überexpression von Syntaxin 1A in PC12-Zellen und Untersuchung mittels STED-Mikroskopie

Um die Frage zu klären, ob die Erhöhung der Syntaxin 1-Konzentration nach Überexpression zu einer veränderten Organisation des Proteins in der Plasmamembran führt, wurde STED-Mikroskopie eingesetzt. (A und B, oben links)

Experimentelle Bestimmung der *Focal-Spot-Size* konfokaler Laser-Raster- und STED-Mikroskopie. Zur anschaulicheren Darstellung wurden Signale von mehreren, einzelnen fluoreszierenden Punktquellen überlagert (12 für das konfokale und 29 für das STED-Bild) und *Linescans* durch das jeweilige Zentrum der Fluoreszenz gelegt. Die ermittelten Halbwertsbreiten (für Details siehe Anhang) sind durch Pfeile markiert und vermitteln einen Eindruck der durch die entsprechende Mikroskopie-Technik erreichten Auflösung. Eine Halbwertsbreite von 72 nm wurde für die mit STED-Mikroskopie detektierten Signale ermittelt, was verglichen mit der konfokalen Laser-Rastermikroskopie (Halbwertsbreite 192 nm) einer  $2,7^2$ -fach kleineren *Focal-Spot-Size* entspricht und die damit einhergehende verbesserte laterale Auflösung verdeutlicht. (A und B, oben rechts) Es wurden mit beiden Techniken Bilder von denselben *Membrane-Sheets* aufgenommen, die von myc-Sx1A überexprimierenden PC12-Zellen stammen. Der verwendete Primärantikörper (HPC-1) erkennt die N-terminale Domäne von Syntaxin 1 und erlaubt daher die Visualisierung sowohl der endogenen als auch der überexprimierten Moleküle. Auf den prozessierten Bildern (Details im Methodenteil) sind *Membrane-Sheets* mit unterschiedlichem Syntaxin-Expressions-Level zu erkennen. Die untere Reihe in (A) bzw. (B) zeigt vergrößerte Bildausschnitte von in (A) als schwach, mittel bzw. stark überexprimierend markierten *Membrane-Sheets*. Die Bilder wurden manuell so skaliert, dass die jeweiligen Strukturen am besten sichtbar sind. Die STED-Mikroskopie und die Analysen der durch den verwendeten Mikroskop-Aufbau erreichten Auflösungserhöhung wurde von Dr. Katrin Willig (Abteilung NanoBiophotonik, MPI für biophysikalische Chemie) durchgeführt.

Eine detaillierte Analyse (vgl. 5.2.17 im Methodenteil) ergab eine klare Korrelation von Syntaxin-Level und *Cluster*-Dichte (Abb. 22). Selbst bei einer Erhöhung der Syntaxin-Konzentration um einen Faktor 4 - 5 verglichen mit der endogenen, wurden weder eine uniforme Syntaxin-Verteilung noch sich von *Clustern* unterscheidende Strukturen vorgefunden. Auch konnte keine Größenzunahme beobachtet werden. Es ist festzuhalten, dass bei extremer Überexpression wahrscheinlich auch die mit dem verwendeten STED-Aufbau erreichte Auflösung nicht genügt, um alle *Cluster* aufzulösen, deshalb scheint eine leichte Saturierung der *Cluster*-Dichte in sehr stark überexprimierenden Zellen stattzufinden (vgl. Abb. 22). Dennoch lässt sich zusammenfassend schließen, dass Syntaxin 1, selbst wenn seine Konzentration dramatisch erhöht wird, immer noch in *Clustern* vorliegt. So scheinen

keine zusätzlichen Ko-Faktoren, außer vielleicht Lipiden, essentiell für die *Cluster*-Bildung zu sein. Des Weiteren ist festzuhalten, dass das System auf eine erhöhte Syntaxin-Konzentration mit einer proportional steigenden Anzahl der *Cluster* und nicht mit *Cluster*-Wachstum reagiert.



**Abb. 22** Korrelation von Syntaxin 1-Level und *Cluster*-Dichte

Anhand von STED-Aufnahmen wie den in Abb. 21B gezeigten wurde die Syntaxin 1 *Cluster*-Dichte für 80 *Membrane-Sheets* ermittelt und gegen die Bildintensität, die den Grad der Überexpression widerspiegelt, aufgetragen. Eine Korrelation zwischen dem Syntaxin 1-Level und der *Cluster*-Dichte wird deutlich.

## 6.5 Das SNARE-Motiv ist essentiell für korrektes *Co-Clustering*

Die Tatsache, dass keine durch Überexpression depletierbaren Ko-Faktoren für das *Clustering* von Syntaxin 1 benötigt werden, lässt vermuten, dass die Fähigkeit zur *Cluster*-Bildung eine intrinsische Eigenschaft des Proteins ist. Daher wurde geprüft, ob Protein-Protein-Interaktionen am *Clustering*-Prozess beteiligt sind. Zur Identifizierung der verantwortlichen Proteinbereiche, wurden *Co-Clustering*-Experimente entwickelt. In diesen Versuchen wurden je zwei Syntaxin-Populationen (Wildtyp-Syntaxin und ein Syntaxin-Konstrukt) bezüglich Ihrer Verteilung auf von PC12-Zellen stammenden *Membrane-Sheets* verglichen. Typischerweise sollte dabei untersucht werden, ob eine bestimmte Mutante in den gleichen Strukturen zu finden ist wie das entsprechende Wildtyp-Protein. Wie in Abb. 21 gezeigt, geht die

Fähigkeit, *Cluster* zu bilden, auch bei Erhöhung des Syntaxin-Levels nicht verloren. Daher konnten diese Versuche unter Überexpressionsbedingungen durchgeführt werden. Von PC12-Zellen, die sowohl myc-markiertes als auch mEGFP-markiertes Protein ko-überexprimierten, wurden *Membrane-Sheets* hergestellt und für das myc-Tag angefärbt. Die Verwendung des Epitop-Tags zur Visualisierung einer zweiten Proteinpopulation neben der mEGFP-markierten wurde nötig, da C-terminal mit monomerem rot-fluoreszierenden Protein markiertes Syntaxine nicht an die Plasmamembran sortiert wurden. Die in den beiden Kanälen erhaltenen Bilder eines *Membrane-Sheets* wurden über Korrelationsanalyse verglichen, und der *Pearson*-Korrelationskoeffizient als ein objektives Maß für die Ähnlichkeit der beiden Proteinverteilungen berechnet. In einem *Co-Clustering*-Versuch wurden die erhaltenen Korrelationskoeffizienten der gleichzeitig angefärbten *Membrane-Sheets* der untersuchten Proteinkombination gemittelt. In ein unabhängiges Experiment gingen dabei im Durchschnitt 6,5 *Membrane-Sheets* ein. Details sind im Methodenteil unter 5.2.10 beschrieben.

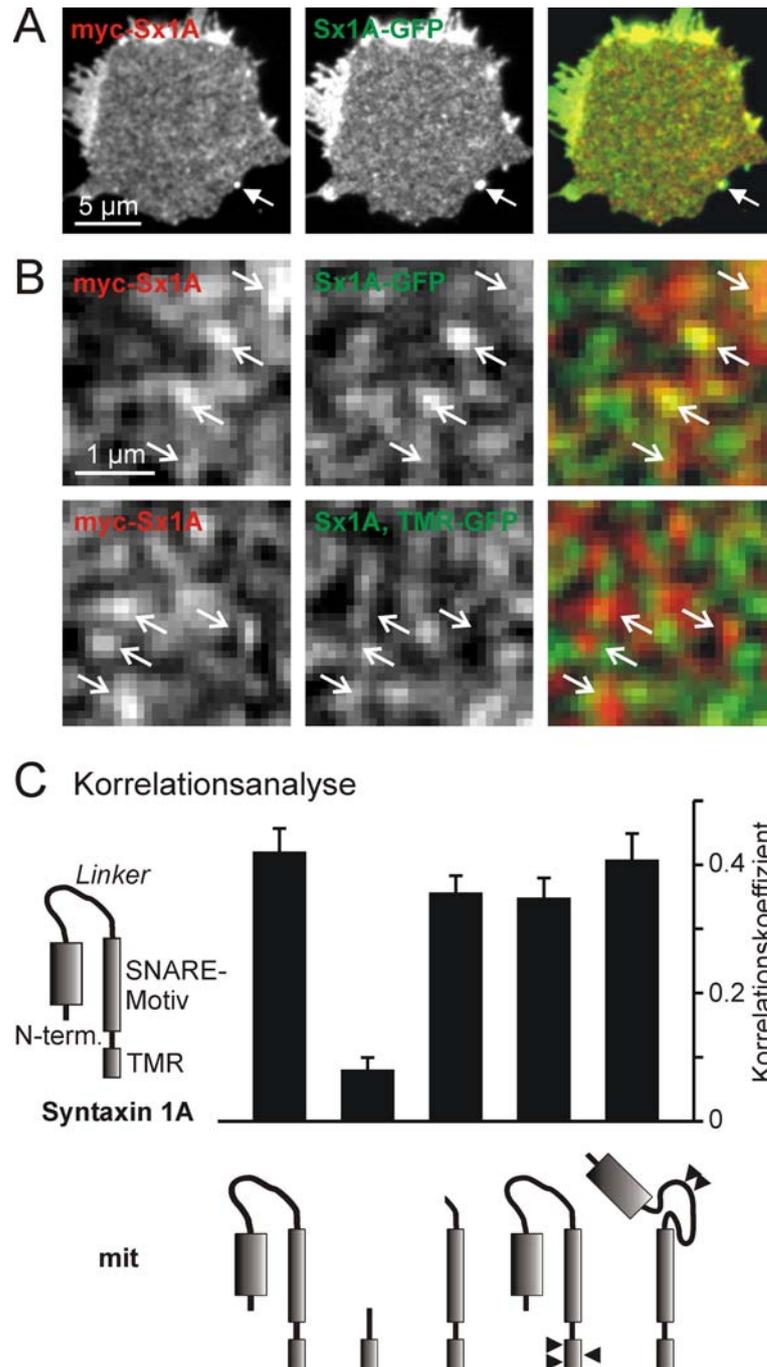
Zunächst wurde die technische Grenze der Methode ermittelt. Zu diesem Zweck wurde ein Versuch mit einem sowohl am N-Terminus durch ein myc-Tag als auch am C-Terminus durch mEGFP-markierten Syntaxin 1-Konstrukt durchgeführt. Die in beiden Kanälen erhaltenen Bilder waren sich zwar sehr ähnlich, allerdings nicht identisch. Der Grund hierfür ist wahrscheinlich nicht absolut perfekte Epitop-Zugänglichkeit. Ein durchschnittlicher Korrelationskoeffizient von 0,63 ( $n = 3$  unabhängige Experimente) wurde berechnet. Da hier die gleiche Proteinpopulation in beiden Kanälen visualisiert wurde, stellt dieser Wert das technisch erreichbare Maximum dieser Versuche dar. Eine weitere Kontrolle mit doppeltmarkiertem Syntaxin 4 führte zu einem ähnlichen Ergebnis (0,61;  $n = 3$ ).

### 6.5.1 *Co-Clustering*-Experimente der Syntaxin 1A-Reihe

Die Membranverteilung mehrerer Deletions- und Punktmutanten von Syntaxin 1A wurde mit der des Wildtyp-Proteins verglichen (Abb. 23).

Für die Kombination myc-Sx1A/Sx1A-GFP wurde ein Korrelationskoeffizient von 0,42 erhalten (Abb. 23C), der als Referenzwert für maximales *Co-Clustering* angesehen werden kann, da sich die beiden Proteinpopulationen bis auf die unterschiedlichen *Tags* gleichen und daher in denselben *Clustern* erscheinen sollten. Der Wert ist niedriger als das ermittelte technische Limit (0,63), was wahrscheinlich darauf zurückzuführen ist, dass die unterschiedlich markierten Proteine nicht immer im Verhältnis 1:1 vorliegen und sich auch mit nicht markiertem endogenem Syntaxin 1 mischen.

Das Konstrukt, dem die N-terminale Domäne, die *Linker*-Region und das SNARE-Motiv fehlen (Sx1A, TMR-GFP), ist nicht uniform verteilt, hat allerdings die Fähigkeit verloren, sich in Syntaxin 1-*Clustern* anzureichern (Abb. 23B). Wie der niedrige Korrelationskoeffizient von 0,08 zeigt, ist es nicht bevorzugt an denselben Stellen konzentriert wie myc-Sx1A (Abb. 23C). Im Gegensatz dazu verhalten sich die Deletionsmutante, der die N-terminale Domäne und der größte Teil der *Linker*-Region fehlen, eine Mutante, die nicht länger die geschlossene Konformation annehmen kann (Dulubova et al., 1999), sowie eine, die nicht mehr über die TMR oligomerisieren kann (Laage et al., 2000), wie das Wildtyp-Protein (Abb. 23C). Aus diesen Daten lässt sich schließen, dass die Fähigkeit, sich in Syntaxin 1-*Clustern* anzureichern, überwiegend durch Protein-Protein-Interaktionen zwischen den SNARE-Motiven vermittelt wird.



**Abb. 23 Co-Clustering-Experimente der Syntaxin 1A-Reihe**

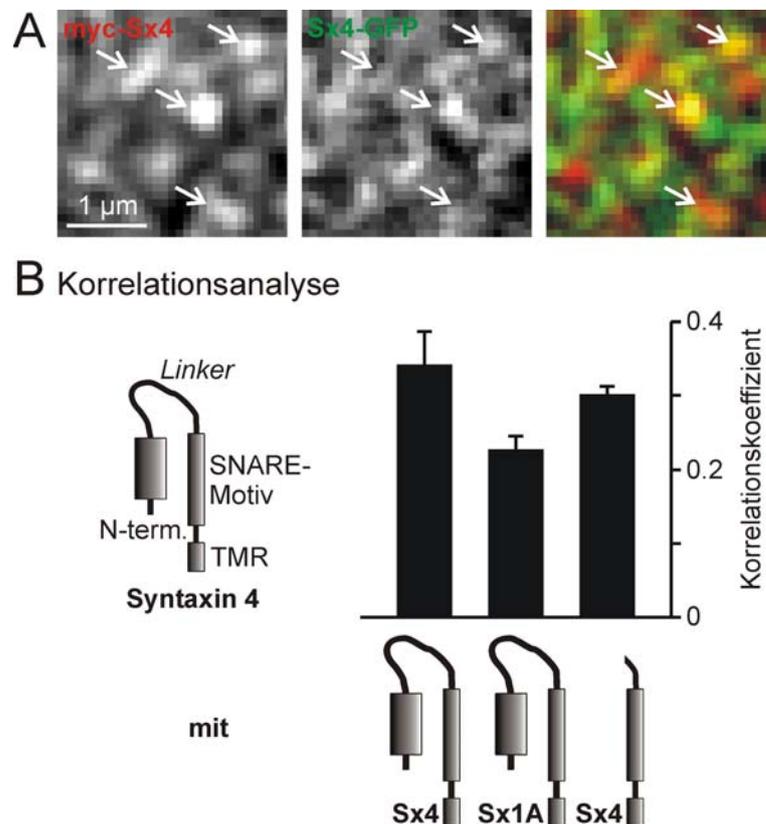
Von PC12-Zellen, die myc-markiertes Syntaxin 1A (links, roter Kanal) und Syntaxin 1A-GFP (Mitte, grüner Kanal) ko-überexprimierten, wurden *Membrane-Sheets* hergestellt, fixiert und für das myc-Tag angefärbt. Rechts ist ein *Overlay* des roten und des grünen Kanals dargestellt. Für den häufig beobachteten lateralen Versatz der beiden Kanäle wurde automatisch korrigiert, was anhand eines in beiden Kanälen sichtbaren, fluoreszierenden *TetraSpeck™ Microspheres* (Pfeil) nochmals überprüft werden konnte. (B) Es sind vergrößerte Bildausschnitte von (A) (obere Reihe) und einem Experiment gezeigt, bei dem anstelle von Syntaxin 1A-GFP ein Konstrukt (Sx1A, TMR-GFP) verwendet wurde, dem die N-terminale Domäne, die

*Linker*-Region und das SNARE-Motiv fehlen (untere Reihe). Als Bezugspunkte wurden jeweils einige stark fluoreszierende Strukturen im roten Kanal (links) mit Pfeilen markiert und diese an identische Positionen des entsprechenden anderen Kanals sowie des *Overlay* übertragen. (C) Für Experimente wie die in (A) und (B) gezeigten wurde die Ähnlichkeit des roten und grünen Kanals mittels Korrelationsanalyse ermittelt. Die Bilder von myc- bzw. mEGFP-markiertem Wildtyp-Syntaxin 1A wurden mit denen der jeweils ko-exprimierten schematisch dargestellten Syntaxin 1A-Variante korreliert, die das entsprechend andere *Tag* trug (vgl. 5.2.10 im Methodenteil). Die analysierten Konstrukte und erhaltenen Korrelationskoeffizienten von links nach rechts sind: Wildtyp-Syntaxin 1A-GFP (Sx1A-GFP:  $0,42 \pm 0,04$ ); eine Variante, der die N-terminale Domäne, die *Linker*-Region und das SNARE-Motiv fehlen (Sx1A, TMR-GFP:  $0,08 \pm 0,02$ ); Syntaxin 1A ohne N-terminale Domäne und *Linker*-Region (Sx1A, SNARE *motif*-TMR-GFP:  $0,36 \pm 0,03$ ); eine Mutante mit drei Punktmutationen, die die TMR-Oligomerisierung verhindern (Sx1A<sub>mut</sub>TMR-GFP:  $0,35 \pm 0,03$ ); ein Konstrukt, das Mutationen trägt, die die geschlossene Konformation von Syntaxin 1A verhindern (mycSx1A<sub>open</sub>:  $0,41 \pm 0,04$ ). Es wurden für jede Syntaxin-Variante vier bis fünf unabhängige Experimente durchgeführt. Die erhaltenen Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler sind gezeigt.

### 6.5.2 Co-Clustering-Experimente der Syntaxin 4-Reihe

Wie bereits in Abschnitt 6.3 gezeigt, bilden unterschiedliche Syntaxine verschiedene *Cluster*. Weitere *Co-Clustering*-Experimente sollten klären, ob der Mechanismus, der Syntaxin 4 spezifisch in den zugehörigen *Clustern* konzentriert, ebenfalls über dessen SNARE-Motiv vermittelt wird, also ob die Prinzipien des Syntaxin 1-*Clustering* auch für ein weiteres Syntaxin der Plasmamembran gelten. Bei diesen Experimenten war der für myx-Sx4/Sx4-GFP ermittelte Korrelationskoeffizient (0,34) der Referenzwert für maximales *Co-Clustering* (Abb. 24). In Analogie zum Syntaxin 1-*Clustering* konnte auch bei Syntaxin 4 die N-terminale Domäne und die *Linker*-Region deletiert werden, ohne die Fähigkeit, an den entsprechenden *Clustern* teilzunehmen, gegenüber dem Wildtyp-Protein wesentlich zu verringern (Abb. 24B, Korrelationskoeffizient 0,30). Welchen Effekt die zusätzliche Entfernung des SNARE-Motivs von Syntaxin 4 auf diese Eigenschaft hat, konnte nicht untersucht werden, da alle Konstrukte, denen diese Region fehlte, nicht an die Plasmamembran sortiert wurden.

Es wurde außerdem getestet, ob die Trennung von Syntaxin 1 und 4 auch nach Überexpression dieser Proteine in der PC12-Zellmembran erhalten bleibt. Der in den *Co-Clustering*-Experimenten mit myc-Sx4 erhaltene Wert für Sx1A-GFP (0,23) ist tatsächlich etwas geringer als der von Sx4-GFP (0,34). Allerdings ist die saubere Trennung, wie sie für die endogenen Proteine beobachtet wurde (vgl. Abb. 18A), unter Überexpressionsbedingungen sehr stark abgeschwächt. Eine Zunahme unspezifischer Interaktionen zwischen den Syntaxinen aufgrund der erhöhten Konzentrationen könnte diesen Effekt erklären. Ähnliche Beobachtungen wurden bei *Co-Clustering*-Experimenten von myc-Sx1A mit Sx4-GFP gemacht (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 24** *Co-Clustering*-Experimente der Syntaxin 4-Reihe

*Co-Clustering*-Experimente wie in Abb. 23 bereits beschrieben. (A) Es sind repräsentative, vergrößerte Bildausschnitte eines *Membrane-Sheets* gezeigt, das von einer PC12-Zelle stammt, die sowohl myc-markiertes Syntaxin 4 (links, roter Kanal) als auch Syntaxin 4-GFP (Mitte, grüner Kanal) überexprimierte. Als Bezugspunkte wurden jeweils einige stark fluoreszierende Strukturen im roten Kanal (links) mit Pfeilen markiert und diese an identische Positionen des grünen Kanals (Mitte) sowie

des *Overlay* (rechts) übertragen. (B) Korrelationsanalyse. Für Bilder wie die in (A) gezeigten wurde der *Pearson*-Korrelationskoeffizient des jeweils roten und grünen Kanals bestimmt. Es wurde die Verteilung von mEGFP-markierten Proteinen mit der von myc-Sx 4 verglichen. Die analysierten Konstrukte und erhaltenen Korrelationskoeffizienten von links nach rechts sind: Wildtyp-Syntaxin 4-GFP (Sx4-GFP:  $0,34 \pm 0,04$ ); Wildtyp-Syntaxin 1A-GFP (Sx1A-GFP:  $0,23 \pm 0,02$ ); Syntaxin 4 ohne N-terminale Domäne und *Linker*-Region (Sx4, SNARE *motif*-TMR-GFP:  $0,30 \pm 0,01$ ). Es wurden jeweils vier bis sechs unabhängige Experimente durchgeführt. Die erhaltenen Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler sind gezeigt.

## 6.6 Untersuchungen zur Mobilität von Syntaxin

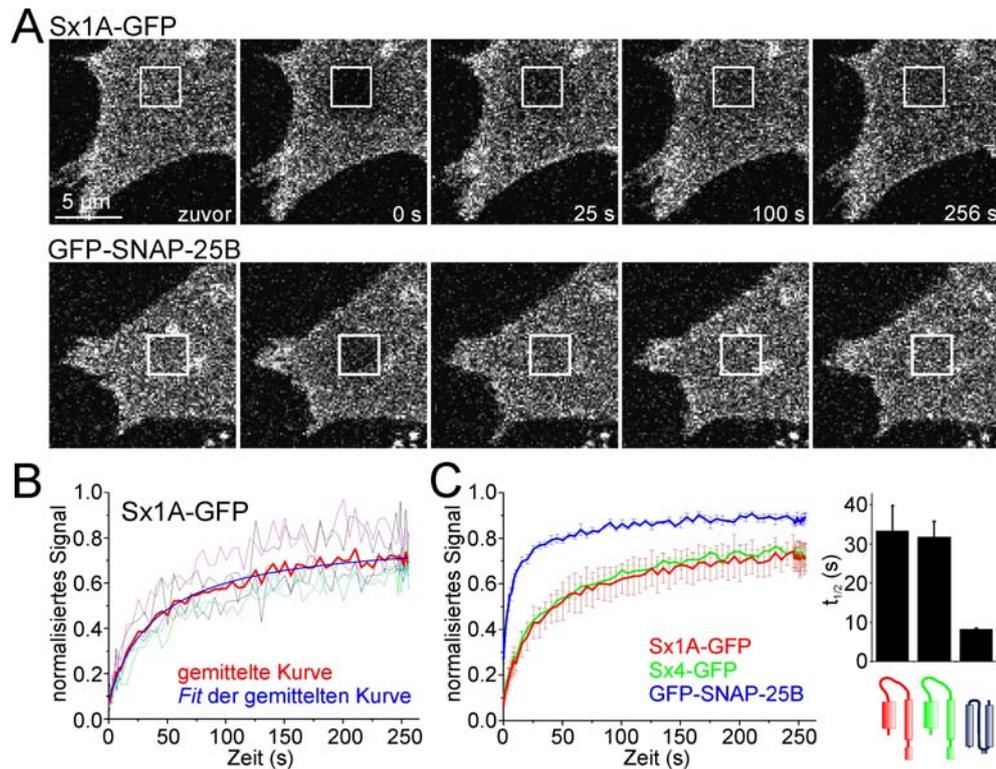
In den bisherigen Versuchen wurde die Syntaxin-Verteilung nicht dynamisch, sondern statisch betrachtet. Im Weiteren soll nun die Dynamik der Syntaxin-*Cluster* adressiert werden. Es ist zu klären, ob sich Syntaxin innerhalb der Membran bewegt. Sollte dies der Fall sein, ist zu untersuchen, ob die *Cluster* selbst mobil sind, oder ob sich Moleküle zwischen diesen austauschen können.

### 6.6.1 Die Syntaxin-Diffusion in der Zellmembran ist eingeschränkt

*Fluorescence-Recovery-after-Photobleaching* (FRAP)-Experimente wurden bereits Mitte der 70er-Jahre durchgeführt und ermöglichen die Untersuchung des Diffusionsverhaltens fluoreszenzmarkierter Membranproteine in lebenden Zellen (Axelrod et al., 1976; Edidin et al., 1976).

In den hier gezeigten Experimenten wurde zunächst die Rückkehr der Fluoreszenz von mEGFP-markiertem Syntaxin 1A in einen zuvor gebleichten Bereich der basalen PC12-Zellmembran mit einem konfokalen Laser-Rastermikroskop beobachtet (vgl. Abb. 25A). Als ein Maß für die Mobilität des untersuchten Fusionsproteins wurde die Halbwertszeit der erhaltenen Kurven wie in Abb. 25B illustriert und im Methodenteil unter 5.2.14 im Detail beschrieben ermittelt. Dieser Wert unterscheidet nicht zwischen der Diffusion einzelner und oligomerisierter Moleküle sondern spiegelt die Gesamtmobilität des untersuchten Proteins wider. In den verschiedenen Messreihen wurden

für Sx1A-GFP durchschnittliche Halbwertszeiten zwischen 30 und 60 Sek. ermittelt (Abb. 25 und 26). Die Mobilität von Syntaxin 1 ist demnach viel geringer als für ein frei diffundierendes Protein mit einer Transmembranhelix zu erwarten wäre (Kenworthy et al., 2004). Keine Unterschiede waren im Diffusionsverhalten von Syntaxin 1 und 4 zu erkennen (Abb. 25C). SNAP-25 jedoch zeigte im Vergleich zu den Syntaxinen eine mehr als vierfach schnellere Rückkehr der Fluoreszenz der gebleichten Region (Abb. 25C). Syntaxin 1 und 4 können sich also innerhalb der Zellmembran bewegen, ihre Mobilität ist allerdings eingeschränkt. Der Vergleich mit mEGFP-markiertem SNAP-25 zeigt, dass die Diffusion nicht linear von der Proteingröße abhängt, da Sx1A-GFP eine mehr als viermal langsamere Rückkehr der Fluoreszenz in den gebleichten Bereich aufweist als das lediglich 16% kleinere GFP-SNAP-25B. Weiter wird klar, dass diese eingeschränkte Mobilität keine gemeinsame Eigenschaft von Proteinen ist, die ein SNARE-Motiv besitzen. Da Syntaxin 1 und 4 dasselbe Verhalten zeigen, scheiden auch spezifisch mit Syntaxin 1 interagierende neuronale Proteinnetzwerke als Grund für die Verlangsamung der Syntaxin 1-Mobilität aus.



**Abb. 25 Die Syntaxin-Diffusion innerhalb der Zellmembran ist eingeschränkt**

(A) Gezeigt sind Bilder von FRAP-Experimenten mit PC12-Zellen, die mEGFP-markiertes Syntaxin 1A (obere Zeile) beziehungsweise SNAP-25B (untere Zeile) überexprimierten. Mit einem konfokalen Laser-Rastermikroskop wurde eine quadratische Region der basalen Zellmembran (eingezeichnetes Quadrat) gebleicht und die durch mobile Proteine bedingte Rückkehr der Fluoreszenz in diesem Membranbereich über die Zeit beobachtet. (B) Datenprozessierung beispielhaft anhand eines Experiments (siehe auch 5.2.14 im Methodenteil). Die normalisierten, am selben Tag gemessenen Kurven eines mEGFP-markierten Konstrukts sind als verschiedenfarbige dünne Linien dargestellt, von denen jede einer Einzel-Zell-Messung entspricht. Die Ergebnisse wurden gemittelt (dicke, rote Linie) und aus dem entsprechende *Fit* (blaue, glatte Linie) die zugehörige Halbwertszeit ( $t_{1/2}$ ) berechnet. (C) Es wurden an denselben Tagen FRAP-Experimente mit PC12-Zellen durchgeführt, die Syntaxin 1A-GFP, Syntaxin 4-GFP bzw. GFP-SNAP-25B überexprimierten. Die wie in (B) beschrieben erhaltenen gemittelten Kurven für das jeweilige Konstrukt wurden ihrerseits über die Messtage ( $n = 3$ ) gemittelt und außerdem die aus den Mittelwerten resultierende Kurve inklusive der jeweiligen Standardfehler dargestellt. Rechts sind die aus den zugehörigen *Fits* ermittelten Halbwertszeiten als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler gezeigt. Es waren keine Unterschiede im Diffusionsverhalten von Syntaxin 1 und 4 zu erkennen. Jedoch zeigte SNAP-25, verglichen mit den Syntaxinen, eine mehr als vierfach schnellere Erholung der Fluoreszenz der gebleichten Region.

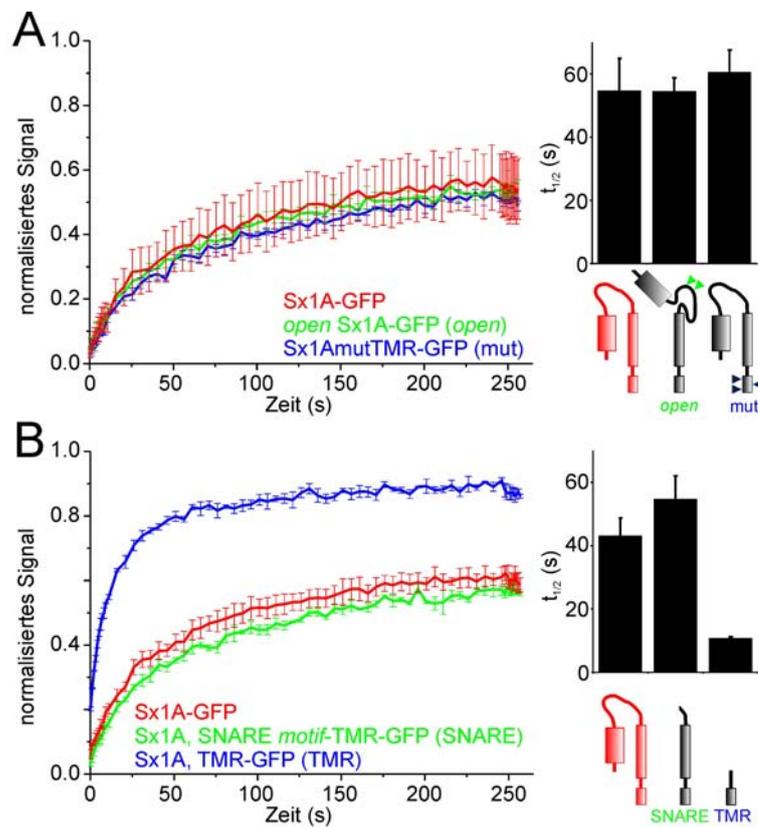
### **6.6.2 Die eingeschränkte Syntaxin-Diffusion wird durch den *Clustering-Mechanismus* vermittelt**

Um den Mechanismus zu klären, der sich hinter der eingeschränkten Mobilität von Syntaxin 1 verbirgt, wurden weitere FRAP-Studien durchgeführt. Es sind mehrere potentielle Gründe für das beobachtete Diffusionsverhalten vorstellbar. So sind die Syntaxine im Gegensatz zu SNAP-25, das über einen Palmitoyl-Anker mit der Plasmamembran assoziiert ist, über ihre Transmembranregionen in der Membran verankert. Auch könnte die Fähigkeit, über die TMR zu oligomerisieren (Laage et al., 2000), eine Veränderung der Syntaxin-Mobilität bewirken. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass die Syntaxine zusammen mit anderen Proteinen an Komplexen beteiligt sind, die ihr Diffusionsverhalten beeinflussen. Außerdem ist es wahrscheinlich, dass die Tendenz zur Aggregation in *Clustern* die Mobilität der Syntaxine einschränkt.

In FRAP-Experimenten mit Punkt- und Deletionsmutanten von Syntaxin 1A wurden diese verschiedenen Möglichkeiten systematisch getestet (Abb. 26). Bei diesen Experimenten wurden, verglichen mit den in Abb. 25 gezeigten, längere Halbwertszeiten gemessen. Dennoch kann klar festgestellt werden, dass Syntaxin-Mutanten, die ihre Fähigkeit verloren haben, über die TMR zu oligomerisieren bzw. die geschlossene Konformation anzunehmen, sich in ihrem Diffusionsverhalten nicht vom Wildtyp-Protein unterscheiden (Abb. 26A). Weder die TMR-Oligomerisierung noch die Teilnahme an Proteinkomplexen, die die geschlossene bzw. halbgeschlossene Konformation (Zilly et al., 2006) erfordern, sind also für die eingeschränkte Mobilität von Belang.

Im Gegensatz dazu führte die beinahe vollständige Deletion des zytoplasmatischen Teils von Syntaxin 1A zu einem dramatischen Anstieg der Diffusionsgeschwindigkeit (Abb. 26B). Dies macht klar, dass nicht Wechselwirkungen der TMR - gleich ob mit Lipiden oder Proteinen - sondern vielmehr die des zytoplasmatischen Teils des Proteins die Einschränkung der Syntaxin-Mobilität bewirkt. Die

Interaktionen sind dabei ausschließlich über das SNARE-Motiv vermittelt, da die Verlängerung des TMR-Konstrukts um diesen Teil des Proteins wieder zum Diffusionsverhalten von Wildtyp-Syntaxin führt (Abb. 26B). Weder die N-terminale Domäne noch die *Linker*-Region haben einen Einfluss auf die Mobilität von Syntaxin 1.



**Abb. 26 Clustering ist der Grund für die eingeschränkte Syntaxin-Diffusion**

In FRAP-Experimenten, wie den in Abb. 25 beschriebenen, wurde das Diffusionsverhalten von Wildtyp-Sx1A-GFP mit dem von Punkt- bzw. Deletionsmutanten (A und B) verglichen. Es ist zu beobachten, dass das Konstrukt, welches als einzige der untersuchten Mutanten nicht am Syntaxin 1-*Clustering* teilnehmen kann (Sx1A, TMR-GFP; vgl. Abb. 23), eine um das Vierfache beschleunigte Mobilität aufweist. Alle anderen Konstrukte unterscheiden sich in ihrem Verhalten nicht wesentlich von Wildtyp-Sx1A-GFP. Es sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler gezeigt (n = 3 Experimente).

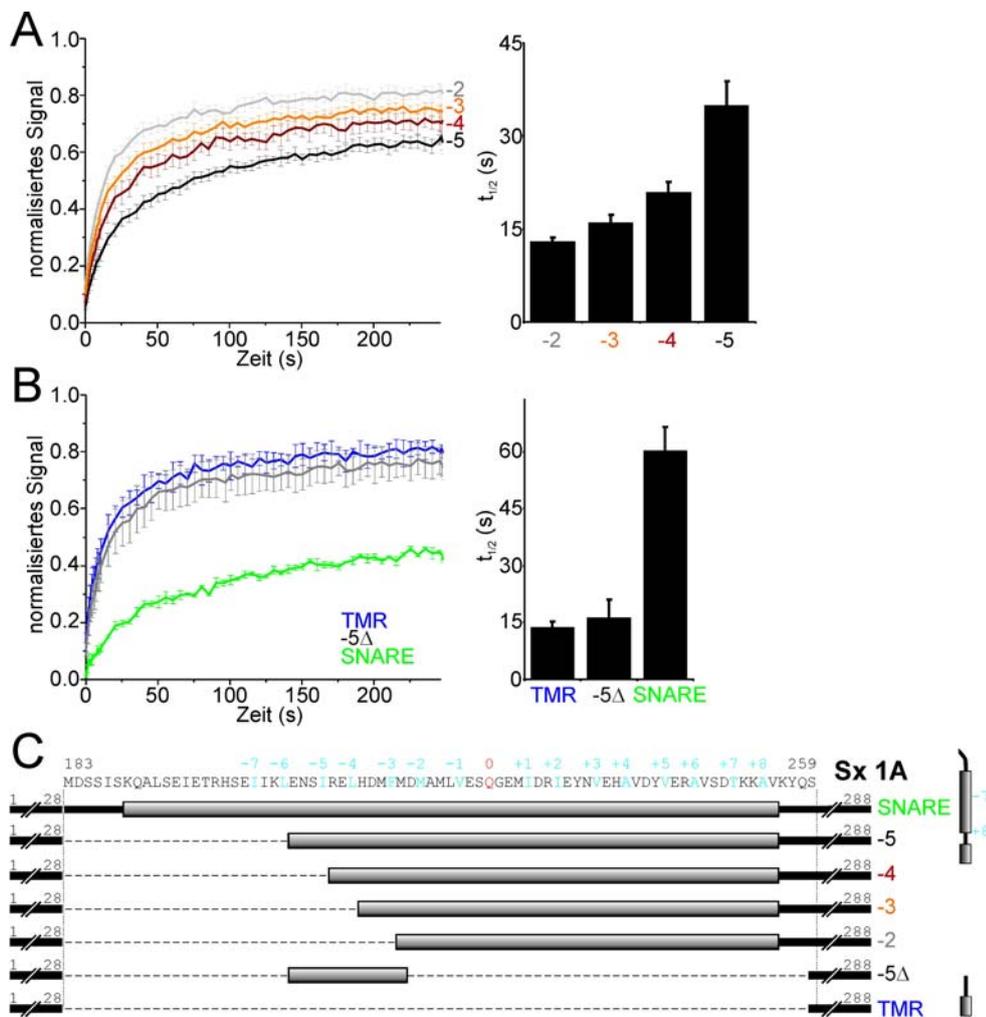
Interessant ist, dass nur das Konstrukt, welches als einziges nicht an Syntaxin 1-*Clustern* teilnehmen kann, da ihm das SNARE-Motiv fehlt (Sx1A, TMR-GFP), eine beschleunigte Diffusion aufweist. Alle anderen getesteten Mutanten unterscheiden sich weder in ihrer Fähigkeit, in den Syntaxin 1-*Cluster* sortiert zu werden, noch in ihrem Diffusionsverhalten vom Wildtyp-Protein (vgl. Abb. 23 und 26). Daher ist die wahrscheinlichste Interpretation der Daten, dass die beobachtete eingeschränkte Syntaxin-Diffusion auf die Tendenz dieser Proteine, sich in *Clustern* zu akkumulieren, zurückzuführen ist.

### 6.6.3 Ein großer Teil des SNARE-Motivs wird für die *Clustering-Reaktion* benötigt

Der für die Einschränkung der Mobilität bzw. für das *Clustering*, verantwortliche Bereich des SNARE-Motivs wurde in Zusammenarbeit mit *Claas Gerding-Reimers* im Rahmen seiner Diplomarbeit in unserer Arbeitsgruppe weiter eingegrenzt. Hierfür wurden zunächst vom N-Terminus des SNARE-Motivs ausgehend sukzessiv Aminosäuren deletiert, die an sogenannten *Layers* des SNARE-Komplexes teilnehmen würden (vgl. Abb. 27C). Die Entfernung der Aminosäuren aus dem SNARE-Motiv bis einschließlich derer, die Teil von *Layer* -6 und -7 sind, hatte verglichen mit dem SNARE-Konstrukt (Sx1A, SNARE-*motif*-TMR-GFP), das Wildtyp-Diffusionsverhalten zeigt, keinen Effekt (persönliche Mitteilung von *Claas Gerding-Reimers*). Nach schrittweiser Deletion weiterer Aminosäuren nahm die Diffusionsgeschwindigkeit graduell zu. Beinahe maximale Geschwindigkeit wurde bereits nach Entfernung der Aminosäuren erreicht, die an *Layer* -3 teilnehmen (Konstrukt -2; Abb. 27A).

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die Region von -5 bis -3 ausreicht, um das eingeschränkte Diffusionsverhalten des Wildtyps zu bewirken. Zu diesem Zweck wurde ein Konstrukt (-5 $\Delta$ ) verwendet, das diesen Bereich enthält, dem jedoch die sich C-terminal anschließenden Aminosäuren des SNARE-Motivs fehlen (vgl. Abb. 27C). Es wurde beobachtet, dass dieses Konstrukt eine schnelle FRAP-Kinetik aufweist (vgl. Abb. 27B). Auch das erneute Einfügen einiger Aminosäuren des

deletierten C-terminalen Bereichs des SNARE-Motivs bewirkte keine Verlangsamung (persönliche Mitteilung von *Claas Gerding-Reimers*). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die Region von -5 bis -3 alleine nicht zur Verlangsamung ausreicht, und lässt vermuten, dass zusätzlich der komplette C-terminale Rest des SNARE-Motivs benötigt wird, um die beobachtete Einschränkung der Syntaxin-Mobilität herbeizuführen.



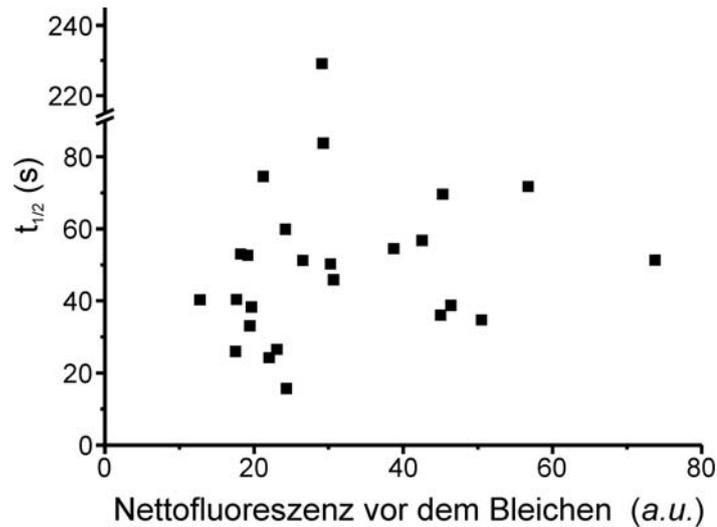
**Abb. 27 Der größte Teil des SNARE-Motivs wird für das *Clustering* benötigt**

(A+B) In FRAP-Experimenten, wie den in Abb. 25 beschriebenen, wurde der Mechanismus, über den das SNARE-Motiv die eingeschränkte Diffusion bewirkt, weiter im Detail untersucht. Die verwendeten Konstrukte sind in (C) schematisch dargestellt. Hierbei beziehen sich die Zahlen -7 bis +8 auf die jeweiligen Aminosäuren, die im neuronalen SNARE-Komplex Teil der entsprechenden „*layer of interaction*“ wären. Das SNARE-Motiv wurde ausgehend vom N-Terminus schrittweise verkürzt. (A) Keine Auswirkung auf das Diffusionsverhalten von Syntaxin 1A wurde nach der Entfernung der Aminosäuren des SNARE-Motivs bis einschließlich derer, die Teil von *Layer* -7 und -6 wären, beobachtet (persönliche Mitteilung von *Claas Gerding-*

*Reimers*). Weitere Verkürzungen bewirkten einen Anstieg der Diffusionsgeschwindigkeit, wobei eine Deletion von nur 11 weiteren Aminosäuren zu einer Verdreifachung führte (vergleiche die Halbwertszeiten der Konstrukte -2 und -5;  $n = 5$  Experimente). Konstrukt -4 unterscheidet sich signifikant von -2, -3, -5 ( $p < 0.05$ , gepaarter t-Test). (B) Mit dem Konstrukt -5 $\Delta$  wurde weiterhin untersucht, ob die Region (-5 bis -3) alleine ausreicht, um die beobachtete Einschränkung der Syntaxin-Mobilität zu bewirken ( $n = 3$  Experimente). Diese FRAP-Experimente wurden in Zusammenarbeit mit *Claas Geriding-Reimers* im Rahmen seiner Diplomarbeit in der Abteilung Neurobiologie des MPI für biophysikalische Chemie durchgeführt. Es sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler gezeigt.

Die Tatsache, dass -5 $\Delta$  als einziges der getesteten Konstrukte aufgrund der Verschiebung der Aminosäuren näher an die Zellmembran nicht mehr mit endogenem Syntaxin 1 interagieren kann, wirft die Frage auf, ob das überexprimierte mit dem endogenen Syntaxin interagieren muss, um ein verlangsamtes Diffusionsverhalten zu zeigen. Es wäre denkbar, dass dies der Fall ist, und in den FRAP-Experimenten bei stärkerer Überexpression eine schnellere Rückkehr der Fluoreszenz in den gebleichten Bereich stattfindet, da im Verhältnis zu dem überexprimierten Protein zu wenig endogenes vorhanden ist.

Um dies zu klären, wurden die in Abb. 25C für Sx1A-GFP gezeigten Daten unter diesem Aspekt verglichen. Aus der Kurve jeder einzelnen gemessenen Zelle wurde der jeweilige  $t_{1/2}$ -Wert ermittelt und gegen den Wert der Nettofluoreszenz vor dem Bleichen aufgetragen. Wie in Abb. 28 ersichtlich besteht kein Zusammenhang zwischen dem Grad der Überexpression und der Diffusionsgeschwindigkeit. Nimmt man an, dass die endogene Syntaxin 1-Konzentration in allen Zellen etwa gleich war, kann aus diesem Ergebnis geschlossen werden, dass die ermittelte Diffusionsgeschwindigkeit nicht vom Verhältnis von endogenem zu überexprimiertem Syntaxin abhängt. Die für -5 $\Delta$  erhaltenen Ergebnisse können demnach also mit denen der anderen Konstrukte verglichen werden.



**Abb. 28 Diffusionsgeschwindigkeit und Grad der Überexpression**

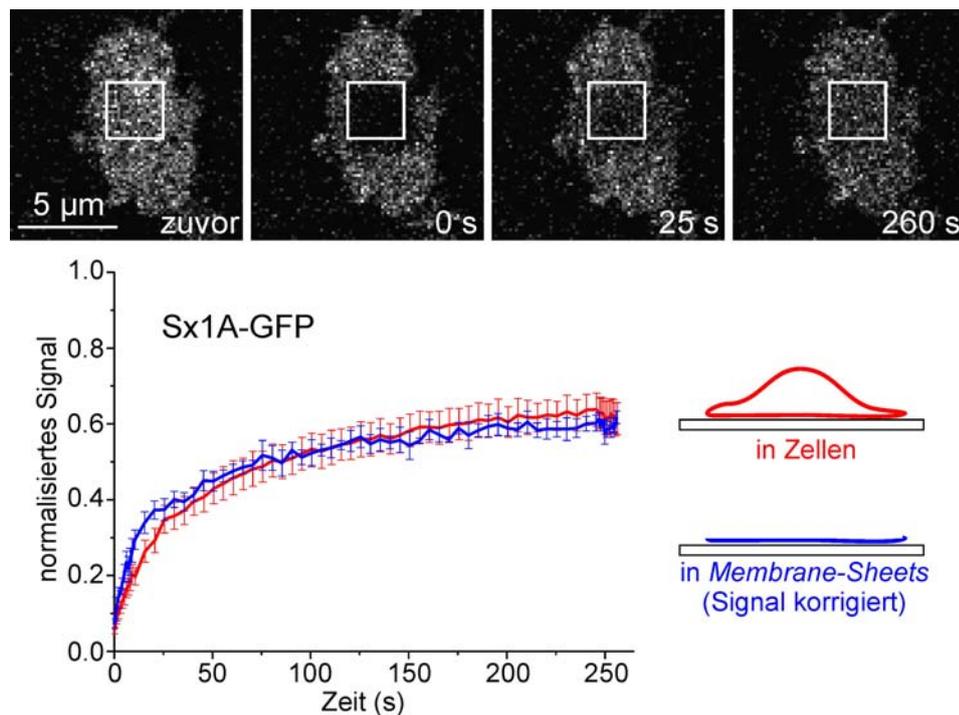
Die in Abb. 25C für Sx1A-GFP gezeigten Daten wurden unter einem anderen Aspekt analysiert. Für jede Zelle wurde der jeweilige  $t_{1/2}$ -Wert ermittelt und gegen den Wert der Nettofluoreszenz vor dem Bleichen aufgetragen. Es wurden 25 Zellen analysiert. Eine Zelle zeigte eine nur sehr langsame FRAP-Kinetik, aus diesem Grund wurde die Y-Achse im dargestellten Diagramm entsprechend unterbrochen.

#### 6.6.4 Syntaxin 1 zeigt das gleiche Diffusionsverhalten in intakten PC12-Zellen und *Membrane-Sheets*

In weiteren FRAP-Versuchen wurde das Diffusionsverhalten von Syntaxin 1 in *Membrane-Sheets* mit dem in Zellen verglichen. Bei *Membrane-Sheets* können im Gegensatz zu intakten Zellen keine Moleküle von außerhalb des optischen Schnitts in die basale Plasmamembran diffundieren, so dass hier die Zunahme der Fluoreszenz in der gebleichten Region von einer Abnahme außerhalb dieser begleitet wird (vgl. Abb. 29).

Außerdem geht bei *Membrane-Sheets* während des Bleichschritts ein sehr viel größerer Teil der Gesamtfluoreszenz verloren als bei FRAP-Experimenten mit intakten Zellen, bei denen der gebleichte Bereich lediglich ca. 1/60 der Plasmamembran ausmacht. Bei FRAP-Experimenten mit *Membrane-Sheets* ist es also nötig für den Fluoreszenzverlust zu korrigieren. Die Korrektur des Signals für den Fluoreszenzverlust im Versuchsverlauf wurde wie unter 5.2.15 beschrieben durchgeführt, und macht einen direkten Vergleich mit

Zellen möglich. Weiterhin wird durch diese eine exakte Bestimmung des immobilen Anteils der gebleichten Moleküle möglich. Bei ganzen Zellen ist die Gesamtfluoreszenz nicht bekannt und die Korrektur kann deshalb nicht vorgenommen werden. Unvollständige Rückkehr der Fluoreszenz im gebleichten Bereich könnte dort teilweise auch von einem Gleichgewicht zwischen Diffusion und Bleichen im Laufe der Messung herrühren.



**Abb. 29** Vergleich des Diffusionsverhaltens von Syntaxin 1 in intakten Zellen und *Membrane-Sheets*

Die Bilder zeigen Ausschnitte aus einem FRAP-Experiment mit von PC12-Zellen stammenden *Membrane-Sheets*. Die Fluoreszenz von mEGFP-markiertem Syntaxin 1A wurde gebleicht und ihre Rückkehr über die Zeit beobachtet. In diesen Experimenten können, im Gegensatz zu denen mit intakten Zellen (vgl. Abb. 25), keine ungebleichten Moleküle von außerhalb des optischen Schnitts in die basale Zellmembran diffundieren. Deshalb wird die Zunahme der Fluoreszenz in der gebleichten Region von einer Abnahme außerhalb dieser begleitet. Es sind die gemittelten Kurven aller mit intakten Zellen (rote Kurve, n = 9) bzw. *Membrane-Sheets* (blaue Kurve, n = 3) durchgeführten Experimente gezeigt. Um einen Vergleich der Kurven zu ermöglichen, wurde das Signal der *Membrane-Sheet* Experimente wie im Methodenteil beschrieben korrigiert. Es sind die aus den Mittelwerten resultierenden Kurven inklusive der jeweiligen Standardfehler dargestellt.

Abb. 29 zeigt, dass sich *Membrane-Sheets* nach Korrektur des Signals weder im Ausmaß noch in der Geschwindigkeit, mit der die Sx1A-GFP-Fluoreszenz in den gebleichten Bereich zurückkehrt, wesentlich von intakten Zellen unterscheiden. Die Beobachtung, dass während des Experiments die Fluoreszenz nicht vollständig in den gebleichten Bereich des *Membrane-Sheets* zurückkehrt, also das korrigierte und normalisierte Signal nicht wieder den Wert 1,0 erreicht, zeigt die Existenz eines im beobachteten Zeitrahmen immobilen Anteils des Gesamt-Syntaxins an.

#### 6.6.5 Syntaxin 1-Cluster sind stationär

Die Mobilitätsstudien zeigen, dass Syntaxin 1 innerhalb der Zellmembran über  $\mu\text{m}$ -Entfernungen diffundiert, ermöglichen aber keine Aussage darüber, ob sich ganze Syntaxin-Cluster bewegen oder einzelne Moleküle bzw. niedermolekulare Oligomere zwischen stationären Clustern ausgetauscht werden.

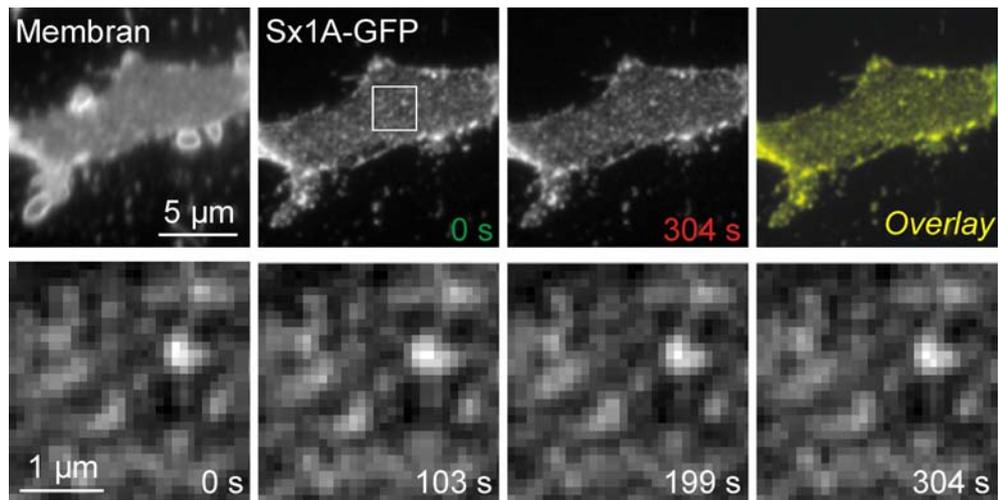
Es wurde versucht, die Verteilung von Sx1A-GFP in der gebleichten Region vor dem Bleichen und nach dem Ablauf des FRAP-Experiments miteinander zu vergleichen. Allerdings sind die bei konfokaler Laser-Rastermikroskopie als Detektoren eingesetzten *Photomultiplier* bezüglich ihres Signal/Rausch-Verhältnisses den bei Weitfeld-fluoreszenzmikroskopischen Studien verwendeten CCD-Kameras weit unterlegen (Goldman und Spector., 2005). Aus diesem Grund war der Vergleich der konfokalen Bilder vor dem Bleichen bzw. nach dem Ablauf des Experiments bezüglich der visualisierten Strukturen wenig aussagekräftig (Daten nicht gezeigt).

*Total-internal-Reflection-Fluorescence* (TIRF)-Mikroskopie ermöglichte die Aufnahme der selektiv angeregten Sx1A-GFP-Moleküle der basalen Plasmamembran mit einer CCD-Kamera. Bestimmte Strukturen der erhaltenen Bilder änderten sich kaum, an anderen Stellen variierten diese im Zeitverlauf (Daten nicht gezeigt). Die Interpretation dieser Daten ist nicht eindeutig, da Umorganisationen des Aktinkortex zu einer Bewegung der Plasmamembran führen und so Cluster-Mobilität

vortäuschen können. Beobachtete Veränderungen können also sowohl von Bewegungen der Membran selbst als auch von Diffusionsprozessen innerhalb dieser herrühren.

Um dieses Problem zu umgehen, wurde die Sx1A-Verteilung auf frisch hergestellten *Membrane-Sheets*, die sich bezüglich des Diffusionsverhaltens dieses Proteins nicht wesentlich von intakten Zellen unterscheiden (vgl. Abb. 29) und während der Experimente beinahe vollständig frei von Aktin sind (*Stress-Fibers* bleiben erhalten; persönliche Mitteilung von *Dr. Thorsten Lang*; siehe auch 7.3 im Diskussionsteil), fluoreszenzmikroskopisch unter Verwendung einer CCD-Kamera untersucht (Abb. 30). Bedingt durch die beugungslimitierte Auflösung und die Dichte der *Cluster* (vgl. auch Abb. 16) wurden nicht einzelne Nanodomänen, sondern Strukturen beobachtet, die durch die Verschmelzung der Signale mehrerer Einzel-*Cluster* entstehen. Sollten allerdings einzelne *Cluster* selbst mobil sein, müssten sich die visualisierten Strukturen umorganisieren, bewegen oder Intensitätsfluktuationen aufweisen.

Von dem jeweils untersuchten *Membrane-Sheet* wurde über 5 Min. hinweg etwa alle 15 Sek. ein Bild aufgenommen. In den Bildsequenzen war keine offensichtliche Bewegung zu erkennen. Für jede Zeitreihe wurden das erste und das letzte Bild durch Korrelationsanalyse miteinander verglichen (siehe Methodenteil). Der erhaltene Mittelwert von 0,82 für den *Pearson*-Korrelationskoeffizienten bestätigt den Eindruck, dass sich das GFP-Bild und somit die Positionen der Syntaxin 1-*Cluster* im Laufe des Experiments nicht bzw. nur sehr geringfügig verändern. Syntaxin 1-*Cluster* sind also stationär und die Rückkehr der Fluoreszenz in den FRAP-Versuchen spiegelt daher nicht die Mobilität der *Cluster*, sondern vielmehr den Austausch von kleineren Syntaxin-Einheiten (möglicherweise Einzelmolekülen) zwischen diesen wider. Bezüglich der Dynamik gibt es also zwei Populationen von Syntaxin - eine von freiem und eine von sich in *Clustern* befindendem - die im dynamischen Gleichgewicht miteinander stehen.



**Abb. 30** Syntaxin 1-Cluster sind stationär

Von Syntaxin 1A-GFP überexprimierenden PC12-Zellen wurden *Membrane-Sheets* hergestellt und die Veränderung des GFP-Musters über 5 Min. hinweg (ca. 1 Bild/15 s) mit einem Fluoreszenzmikroskop dokumentiert. Nach der Zeitreihe wurde außerdem ein Bild der durch TMA-DPH gefärbten Membran aufgenommen (obere Zeile, links), um deren Integrität zu überprüfen. Das erste und das letzte GFP-Bild der Zeitreihe und das entsprechende Farb-*Overlay* sind gezeigt (obere Zeile, Mitte und rechts). In der unteren ist der in der oberen Zeile durch einen weißen Kasten markierte Bildausschnitt zu den angegebenen Zeiten vergrößert dargestellt. Im Verlauf des Experiments wurde mehr als ein Drittel der Fluoreszenz gebleicht, weshalb die gezeigten Bilder autoskaliert wurden. Als ein objektives Maß für die Ähnlichkeit des jeweils ersten und letzten Bildes einer Zeitreihe wurde der *Pearson-Korrelationskoeffizient* dieser Aufnahmen berechnet. Es wurden  $n = 16$  *Membrane-Sheets* analysiert. Der erhaltene Durchschnittswert von  $0,82 \pm 0,11$  (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) bestätigt die Beobachtung, dass sich das GFP-Bild über 5 Min. hinweg nicht bzw. nur sehr geringfügig verändert.

## 7 Diskussion

Die Syntaxine der Zellmembran sind in *Clustern* organisiert (Lang et al., 2001; Ohara-Imaizumi et al., 2004a; Predescu et al., 2005; Low et al., 2006). In dieser Arbeit wurden die Organisation und Dynamik des zuerst 2001 beschriebenen Syntaxin 1-*Clusters* der PC12-Zellmembran näher charakterisiert.

Die aufgrund beugungslimitierter Auflösung ursprünglich auf 200 nm geschätzte *Cluster*-Größe (Lang et al., 2001) wurde mit Hilfe von STED-Mikroskopie auf 50 – 60 nm korrigiert. Syntaxin 1-*Cluster* können also als Nanodomänen bezeichnet werden. Weiter wurde in dieser Arbeit ermittelt, dass sich auf einem Quadratmikrometer PC12-Zellmembran etwa 20 dieser Strukturen befinden und das Syntaxin/*Cluster*-Verhältnis etwa 90 beträgt. Darüber hinaus wurden der Mechanismus des *Clusterings* und die Dynamik der Syntaxin 1-*Cluster* untersucht.

### 7.1 Homo-Oligomerisierung der SNARE-Motive ist essentiell für korrektes Syntaxin-*Clustering*

Der Befund, dass Syntaxin 1 auch in BHK-Zellen *Cluster* bilden kann, schließt Faktoren, die exklusiv in neuroendokrinen Zellen vorkommen, als Vermittler der *Cluster*-Bildung aus. Weiterhin ist in PC12-Zellmembranen nach Überexpression von Syntaxin lediglich eine proportional steigende *Cluster*-Zahl, jedoch keine uniforme Syntaxin-Verteilung zu beobachten. Selbst bei einer Steigerung der Syntaxin-Menge auf ein Vier- bis Fünffaches des endogenen *Levels* werden putative Ko-Faktoren für die *Cluster*-Bildung scheinbar nicht limitierend. Die Möglichkeit, dass sich diese Strukturen über Lipid-TMR-Wechselwirkungen bilden, nachdem ein Ko-Faktor limitierend geworden ist, lässt sich aufgrund der Ergebnisse der *Co-Clustering*-Experimente ausschließen, da dann überexprimiertes Syntaxin mit dem TMR-Konstrukt „co-clustern“ müsste. Dies war jedoch nicht der Fall.

Die Tatsache, dass sich das Muster von Sx1A-GFP auf *Membrane-Sheets* über 5 Min. hinweg nicht ändert, lässt weiter darauf schließen, dass zum Erhalt der *Cluster* zytosolische Faktoren (ATP, NSF etc.) nicht wichtig sein können, da diese bei der Herstellung des *Membrane-Sheets* entfernt werden. Zusammenfassend erscheinen Ko-Faktoren als Ursache der Bildung bzw. Erhaltung der *Cluster* unwahrscheinlich. Die Tendenz, *Cluster* zu bilden, scheint demnach eine intrinsische Eigenschaft des Syntaxin-Moleküls selbst zu sein.

In den *Co-Clustering*-Experimenten wurde ermittelt, dass das SNARE-Motiv essentiell für den *Clustering*-Prozess von Syntaxin 1 ist. Die Fähigkeit von Syntaxin 1 über das SNARE-Motiv zu oligomerisieren wurde zuvor in biochemischen Experimenten beobachtet. Mit löslichen Proteinen wurde gezeigt, dass der zytosolische Teil von Syntaxin 1 (Aminosäure 1 - 265) bei einer Konzentration von 2  $\mu$ M größtenteils als Dimer vorliegt und der Grad der Oligomerisation mit steigender Konzentration zunimmt (Lerman et al., 2000). Die Deletion einiger C-terminaler Aminosäuren führte in diesen Experimenten zu einer starken Reduktion der Oligomerisierungstendenz. Das entsprechende Syntaxin-Konstrukt (Aminosäure 1 - 253) lag bei einer Konzentration von 2  $\mu$ M als Monomer vor. Basierend auf den Ergebnissen limitierter Proteolyse wurde in derselben Veröffentlichung eine Oligomerisierung von Syntaxin 1 über dessen SNARE-Motiv vorgeschlagen. Im postulierten Oligomer sind die Syntaxine parallel zueinander angeordnet und liegen in der offenen Konformation vor. In einer weiteren Studie (Margittai et al., 2001) wurde anhand Elektronenspinresonanz-spektroskopischer Untersuchungen gezeigt, dass die SNARE-Motive von Syntaxin 1 Homo-Oligomere bilden, in denen sie zum größten Teil (mit Ausnahme ihrer C- und N-terminalen Enden)  $\alpha$ -helikale Struktur aufweisen. Zumindest ein Teil der Helices ist dabei parallel angeordnet. Im Gegensatz zu diesen Experimenten mit löslichen Proteinen sind die Syntaxine in der Zelle über ihre Transmembranregionen in der Membran verankert, was die Bildung von Oligomeren noch erleichtern sollte.

Die vorgestellten biochemischen Studien unterstützen ein Modell, in dem die *Cluster*-Bildung über homophile Interaktionen der SNARE-Motive erfolgt. In einem solchen Oligomer (*Cluster*) wären die SNARE-Motive parallel angeordnet und die Syntaxin-Moleküle würden in der offenen Konformation vorliegen. Die geschlossene Konformation könnte demnach also keine Voraussetzung für den richtig ablaufenden *Clustering*-Prozess sein. Konsistent mit diesem Modell ist die Beobachtung, dass die Variante des Proteins, die die geschlossene Konformation nicht mehr annehmen kann (Dulubova et al., 1999), im *Co-Clustering*-Experiment nicht vom Wildtyp zu unterscheiden ist. Dass die N-terminalen Domänen durch Bindung an SNARE-Motive intermolekulare „Brücken“ zwischen Syntaxinen bilden und damit eine Rolle beim *Clustering* spielen könnten, kann ebenfalls ausgeschlossen werden. Auch die beschriebene Homo-Oligomerisierung über die TMR (Laage et al., 2000) hat keinen Einfluss auf das *Clustering*, da sich in der hier vorliegenden Arbeit die entsprechend defiziente Syntaxin-Mutante nicht anders als das Wildtyp-Protein verhielt. Zusammenfassend lässt sich aus diesen Befunden folgern, dass die *Clustering*-Reaktion ausschließlich durch homophile Interaktionen des SNARE-Motivs vermittelt wird.

## **7.2 Syntaxin 1-Cluster sind stationäre, dynamische Strukturen**

In den Mobilitätsstudien wurde gezeigt, dass Syntaxin 1-*Cluster* über 5 Min. stationär sind, Syntaxin 1-Moleküle jedoch innerhalb der Zellmembran über  $\mu\text{m}$ -Entfernungen diffundieren können. Die Mehrheit der Syntaxin-Moleküle war im beobachteten Zeitraum mobil. Syntaxin 1-*Cluster* sind demnach stationäre Strukturen, die sich selbst nicht bewegen, jedoch einzelne Moleküle bzw. niedermolekulare Oligomere untereinander austauschen können. Es scheint also zwei Pools von Syntaxin zu geben - einen von freiem und einen von sich in *Clustern* befindlichem - die im dynamischen Gleichgewicht miteinander stehen.

### 7.3 Die Mobilität von Syntaxin wird durch den *Clustering*-Prozess bestimmt

In den FRAP-Experimenten ist die Rückkehr der Fluoreszenz von mEGFP-markiertem Syntaxin 1 langsamer als für ein frei diffundierendes Protein mit einer Transmembranhelix zu erwarten wäre (Kenworthy et al., 2004). Das SNARE-Motiv ist sowohl für das *Clustering* als auch für die eingeschränkte Mobilität essentiell. Für alle getesteten Konstrukte korrelierten die Ergebnisse der *Co-Clustering*- und der FRAP-Experimente stark. Die eingeschränkte Mobilität von Syntaxin 1 scheint demnach vom *Clustering*-Prozess bestimmt zu sein. Zusammen mit der Beobachtung, dass die *Cluster* sich nicht bewegen, ergibt sich aus diesen Befunden folgende Interpretation für das Gesamtbild: Sich außerhalb des *Clusters* frei bewegendes Syntaxin wird von stationären *Clustern* eingefangen und so temporär „immobilisiert“ (*Diffusional-Trapping*), was zu einer Verlangsamung der FRAP-Kinetik führt. Da die Zahl der Syntaxin 1-*Cluster* proportional mit der *Cluster*-Menge steigt, sollte in einem solchen Szenario die Diffusionsgeschwindigkeit in den FRAP-Experimenten unabhängig vom Grad der Überexpression sein. Wie eine detaillierte Analyse der FRAP-Daten zeigt, war genau dies der Fall (vgl. Abb. 28).

Der Mechanismus, der für die Einschränkung der Syntaxin-Mobilität verantwortlich ist, wurde weiter im Detail untersucht. Die N-terminale Domäne, die *Linker*-Region und die sich anschließenden 23 Aminosäuren (183 – 205) des SNARE-Motivs konnten deletiert werden, ohne dass eine Änderung im Diffusionsverhalten zu beobachten war. Jedoch führte eine zusätzliche Deletion von nur weiteren 11 Aminosäuren (206 - 216) in den FRAP-Experimenten zu einer Verringerung des  $t_{1/2}$ -Werts des entsprechenden Konstrukts um Faktor 3. Innerhalb des genannten Bereichs (Aminosäuren 206 – 216) wurde der Effekt nach Deletion von jeweils 3 – 4 weiteren Aminosäuren graduell immer schwächer, je näher man dem C-terminalen Ende kam. So bewirkte z.B. die Entfernung von nur 4 Aminosäuren (213 - 216) bereits eine Verringerung des  $t_{1/2}$ -Werts um das 1,7-Fache. Weiterhin

wurde herausgefunden, dass dieser Bereich alleine nicht ausreicht, um die beobachtete Verlangsamung des Diffusionsverhaltens zu bewirken. Es scheinen also auch die sich dieser Region C-terminal anschließenden Aminosäuren des SNARE-Motivs an der *Cluster*-Bildung beteiligt zu sein.

Alternativ wäre auch vorstellbar, dass es nicht wichtig ist, welcher Bereich des SNARE-Motivs interagieren kann, sondern dass lediglich die Anzahl der wechselwirkenden Aminosäuren eine Rolle spielt. Das erscheint jedoch eher unwahrscheinlich, da in diesem Fall ein langsamerer Übergang der Diffusionsgeschwindigkeiten mit fortschreitender Länge der Deletion zu erwarten gewesen wäre als beobachtet.

Ein weiterer Erklärungsversuch für die erhaltenen Ergebnisse alternativ zur spezifischen Homo-Oligomerisierung wäre die Interaktion mit Aktin- bzw. Aktin-verankerten Barrieren im Sinne des *Fence*- bzw. *Picket*-Modells. Durch die fortschreitende Deletion des Syntaxins könnte eine bestimmte kritische Länge des zytoplasmatischen Teils unterschritten worden sein, die für die Interaktion mit den Barrieren essentiell ist. Dies würde dazu führen, dass das entsprechende Konstrukt nicht länger in bestimmten Bereichen der Membran zurückgehalten werden könnte und so eine Beschleunigung der FRAP-Kinetik mit sich bringen. Aufgrund folgender Überlegungen kann diese Möglichkeit ausgeschlossen werden. Das Toxin Latrunculin (Spector et al., 1983) bindet an globuläres Aktin und verhindert dessen Polymerisation. Durch dieses Gift kann der Aktinkortex unterhalb der PC12-Plasmamembran in nur 2 Min. auf 1/10 der ursprünglichen Aktinmenge verringert werden (Lang et al., 2000). *Membrane-Sheets* sind ein offenes System. Bei ihrer Herstellung wird in Sekundenbruchteilen das gesamte globuläre Aktin entfernt. Demnach ist auf diesen Proben eine sogar noch schnellere Reduktion des verbleibenden Aktinkortex zu erwarten als bei Latrunculin-Behandlung der Zellen. Tatsächlich ist selbst bei sofortiger Fixation der *Membrane-Sheets* nach ihrer Herstellung Aktin bereits auf ähnliche dramatische Weise reduziert wie bei Zellen nach 2 Min. Inkubation mit Latrunculin. Lediglich einige *Stress-Fibers* sind der

Membran noch angeheftet (Holroyd, 2002). Da sich das Diffusionsverhalten von Syntaxin 1 auf *Membrane-Sheets* und in intakten Zellen während der 5 Min. des FRAP-Experiments nicht wesentlich unterscheidet und auch die *Cluster* über diesen Zeitraum erhalten bleiben, erscheint eine Rolle von Aktin als direkte oder indirekte Barriere und damit auch eine Domänenbildung entsprechend des *Fence-* bzw. *Picket-*Modells unwahrscheinlich.

Zusammenfassend lassen sich die Ergebnisse der durchgeführten Mobilitätsstudien am besten damit erklären, dass sich Syntaxin-Moleküle außerhalb der *Cluster* frei bewegen, jedoch über spezifische homophile Interaktionen mit den SNARE-Motiven der sich im *Cluster* befindenden Syntaxine wechselwirken und so vom *Cluster* temporär eingefangen werden können. Für diese spezifische Homo-Oligomerisierung werden die N-terminale Domäne, die *Linker-*Region und der N-terminale Teil des SNARE-Motivs bis einschließlich Aminosäure 205 nicht benötigt, Aminosäuren 206 - 216 und wahrscheinlich der größte Teil des sich C-terminal anschließenden Bereichs des SNARE-Motivs sind essentiell für diesen Prozess.

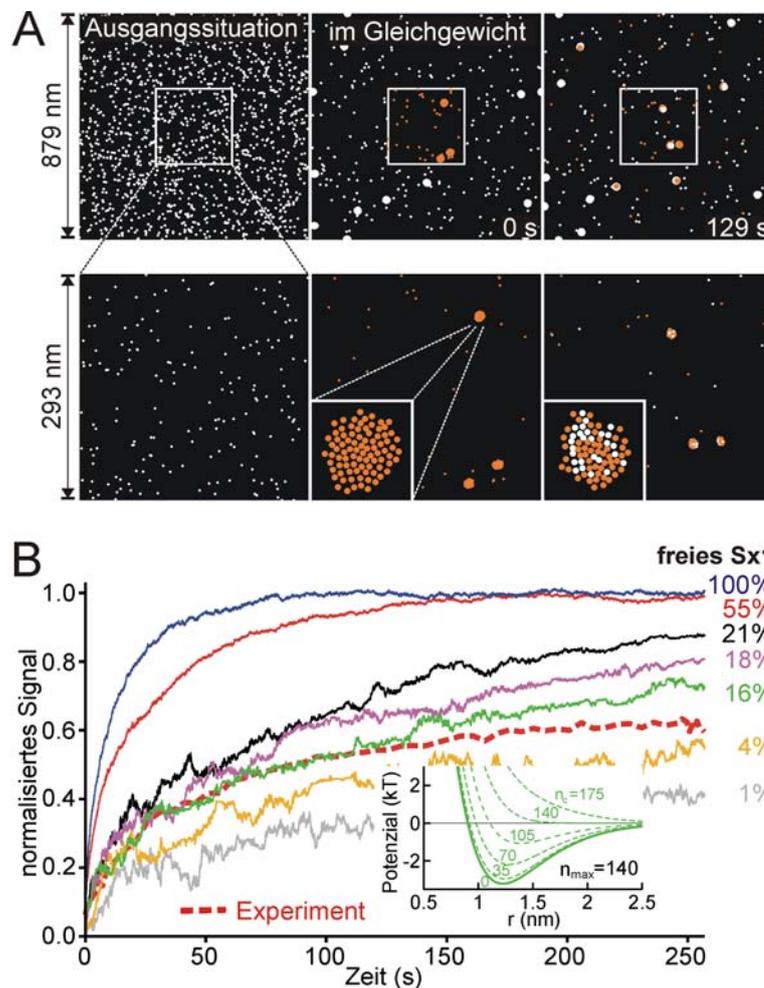
Diese Ergebnisse befinden sich in guter Übereinstimmung mit den proteinchemischen Arbeiten von Lerman et al., 2000 und Margittai et al., 2001.

## **7.4 Beschreibung des Syntaxin-Clusterings als selbstorganisierenden dynamischen Prozess**

Es stellte sich die Frage, ob die erhaltenen Ergebnisse durch ein einfaches physikalisches Modell eines selbstorganisierenden Systems erklärt werden können, das lediglich durch anziehende und abstoßende Kräfte zwischen Syntaxin-Molekülen definiert ist. Dies wurde basierend auf den in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Daten versucht in der Abteilung Theoretische und computergestützte Biophysik des MPI für biophysikalische Chemie (Göttingen) durch Computer-Simulation zu klären.

Ausgehend von einer zufälligen Verteilung der Moleküle wurde die laterale Diffusion von Syntaxin 1 durch Simulation der Brown'schen Molekularbewegung beschrieben (Ermak, 1978). Getrieben durch Wechselwirkungen zwischen den Syntaxin-Molekülen, die sich aus einem einfachen Interaktionspotential (vgl. kleines Diagramm in Abb. 31B, grüne durchgezogene Linie) ableiten, fand spontane *Cluster*-Bildung statt (Abb. 31A). Um das *Cluster*-Wachstum zu begrenzen und am Ende eine Übereinstimmung der *Cluster*-Dichte in Experiment und Simulation zu erreichen, wurde eine zusätzliche abstoßende Komponente eingeführt, die mit steigender *Cluster*-Größe ( $n_c$ ) zunimmt. Dies führt dazu, dass, sobald ein *Cluster* mehr als  $n_{max}$  Syntaxine enthält, die Interaktion abstoßend wird (vgl. kleines Diagramm in Abb. 31 B, grüne gestrichelte Linien). Es stellte sich ein dynamisches Gleichgewicht zwischen sich in *Clustern* befindendem und freiem Syntaxin ein (Abb. 31A). Sobald dieses erreicht war, wurde Bleichen simuliert und die Diffusion nicht gebleichter Moleküle in den betroffenen Bereich verfolgt (Abb. 31A). Für die Simulationen wurde die experimentell ermittelte Anzahl an Syntaxin-Molekülen pro  $\mu m^2$  PC12-Zellmembran benutzt und außerdem angenommen, dass die Diffusion von freiem Syntaxin 1 der des TMR-Konstrukts entspricht, das wie in Abb. 23 gezeigt nicht an *Clustern* teilnehmen kann. Details der Simulation sind im Anhang erläutert. Die zwei freien Parameter - die Tiefe des Interaktionspotential und  $n_{max}$  - wurden so lange variiert, bis die Simulation sowohl in der *Cluster*-Dichte als auch bezüglich der FRAP-Kinetik mit den experimentellen Daten übereinstimmte (Abb. 31B). Gerade in den ersten 100 s, in denen sich Bleicheffekte relativ wenig bemerkbar machen sollten, korreliert die experimentelle stark mit der simulierten FRAP-Kurve mit 16% freiem Syntaxin (grün in Abb. 31B). Die leichte Abweichung im weiteren Verlauf lässt sich dadurch erklären, dass während der Aufnahme der Bilder ein leichtes Bleichen stattfindet, das in der Simulation nicht berücksichtigt wurde. Unter den gewählten Bedingungen ergibt sich eine *Cluster*-Dichte, die mit der experimentell bestimmten Dichte von ca. 20 *Clustern*/ $\mu m^2$  übereinstimmt. In der Simulation befinden sich durchschnittlich 75

Syntaxin-Moleküle in einem *Cluster*, die restlichen etwa 300 Syntaxine/ $\mu\text{m}^2$  diffundieren meist als Einzelmoleküle zwischen diesen Nanodomänen (Abb. 31A, rechts). In Übereinstimmung mit dem Experiment (Abb. 30) sind die *Cluster* auch in der Simulation innerhalb der Dimension der beugungslimitierten Auflösung stationär und nur kleinere Syntaxin-Einheiten bzw. Einzelmoleküle können in dem durch die FRAP-Experimente vorgegebenen Zeitrahmen  $\mu\text{m}$ -Distanzen zurücklegen.



**Abb. 31 Computer-Simulation der lateralen Diffusion von Syntaxin 1**

Es wurde die durch Brown'sche Molekularbewegung getriebene laterale Diffusion von Syntaxin 1 simuliert. Details sind im Anhang beschrieben. Ausgehend von einer zufälligen Verteilung (A, links) und angetrieben durch ein einfaches Interaktions-Potential (vgl. B) findet spontane *Cluster*-Bildung statt, welche bis zur Einstellung des thermodynamischen Gleichgewichts verfolgt wurde. Anschließend wurde die Rückkehr der Fluoreszenz nach simuliertem Bleichen (A, rot dargestellt) der zentralen

Region (A, untere Zeile) gemessen und über mehrere Läufe gemittelt (B, durchgezogene Linien). Die Stärke der effektiven Syntaxin-Interaktion und eine abstoßende Komponente wurden so lange variiert, bis die Simulation sowohl bezüglich der FRAP-Kinetik als auch der *Cluster*-Dichte mit den experimentellen Daten übereinstimmte (B, gestrichelte Linie;  $n_c$  ist die jeweilige Größe des *Clusters*,  $n_{max}$  die *Cluster*-Größe, bei der die Wechselwirkung zwischen den Syntaxinen abstoßend wird). Die kleinen Bilder in der unteren Zeile von A (Kantenlänge 14.7 nm) zeigen die Wiederbevölkerung eines gebleichten *Clusters* (rot) mit ungebleichtem Syntaxin (weiß dargestellt). Die Abbildung wurde von *Dr. Carsten Kutzner* und *Prof. Dr. Helmut Grubmüller* (Abteilung Theoretische und computergestützte Biophysik, MPI für biophysikalische Chemie) zur Verfügung gestellt.

Entsprechend der durchgeführten Simulation sind die für Syntaxin 1 erhaltenen Daten also mit einem Modell vereinbar, in dem im Rahmen der beugungslimitierten Auflösung stationäre *Cluster*, die im Mittel 75 Syntaxine enthalten, Moleküle mit einem Pool an freiem Syntaxin austauschen. Es handelt sich dabei um ein thermodynamisches Gleichgewicht, bei dem etwa 1/6 der Syntaxine nicht in *Clustern* sondern als Einzelmoleküle oder kleinere Oligomere in der Membran vorkommen.

Die *Cluster*-Bildung und die Ergebnisse der Studien zur Mobilität von Syntaxin lassen sich durch einen selbstorganisierenden *Clustering*-Prozess erklären. In der Simulation genügen eine anziehende Syntaxin-Wechselwirkung und eine zusätzliche abstoßende Komponente, die mit der *Cluster*-Größe zunimmt, um dieses selbstorganisierende System in Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit vorgestellten experimentellen Daten zu beschreiben.

Die anziehenden Interaktionen zwischen Syntaxin-Molekülen kann durch die beobachteten homophilen Wechselwirkungen der SNARE-Motive erklärt werden und wurde bereits in 7.1 im Detail diskutiert.

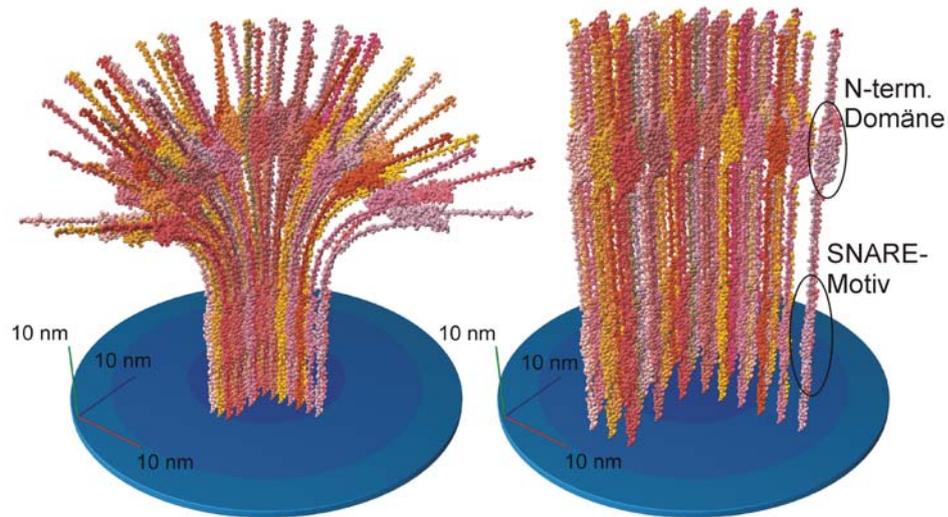
Die Grundlage der abstoßenden Komponente wird jedoch erst ersichtlich, wenn man *in silico* den Versuch unternimmt, 75 Syntaxin-Moleküle so anzuordnen, dass ihre SNARE-Motive eng assoziiert sind und eine möglichst geringe Gesamtfläche einnehmen. Links in Abb. 32 ist das erhaltene Modell gezeigt. Die sperrigen N-terminalen Domänen

bewirken hier ein Abknicken der sich in der Struktur außen befindlichen Moleküle, die so in eine halboffene Konformation gezwungen werden. Das erhaltene Modell für supramolekulares Syntaxin erinnert an einen Blumenstrauß. Mit der *Cluster*-Größe nimmt hier auch die sterische Hinderung zu, die einer Anlagerung weiterer Syntaxin-Moleküle entgegenwirkt. Dieser Effekt könnte eine Obergrenze für den Oligomerisierungsgrad definieren und die molekulare Erklärung für die mit der *Cluster*-Größe wachsende abstoßende Komponente in der Simulation sein.

Der experimentelle Befund, dass das System auf eine Erhöhung des Syntaxin-Spiegels nicht mit *Cluster*-Wachstum sondern mit einer proportionalen Steigerung der *Cluster*-Zahl reagiert, weist auf eine intrinsische Begrenzung der *Cluster*-Größe hin. Der „Blumenstrauß-Effekt“ würde dieses Ergebnis erklären. In Einklang mit der durch STED-Mikroskopie ermittelten durchschnittlichen *Cluster*-Größe, hat in dieser *in silico* Rekonstruktion die von den N-terminalen Domänen gebildete Struktur einen Durchmesser von ca. 50 nm. Dieses Modell liefert auch eine Erklärung für den Anteil der Syntaxin-Moleküle, der im Zeitrahmen eines FRAP-Experiments immobil erscheint. Syntaxine, die sich zum Zeitpunkt des Bleichens in der Mitte des *Clusters* befinden, würden lange benötigen, bis sie in eine Position gelangen, von der aus sie sich aus dem Homo-Oligomer lösen können.

Zum Vergleich wurde auch eine zweite *in silico* Rekonstruktion generiert, bei der die N-terminalen Domänen so eng wie möglich aneinander gelagert wurden (vgl. Abb. 32, rechts). Dieses Modell nimmt von oben betrachtete eine ähnliche Fläche ein, kann jedoch keine Erklärung für die intrinsische Begrenzung der *Cluster*-Größe bzw. der für die Simulation nötigen abstoßenden Komponente bieten. Außerdem liegen die SNARE-Motive hier nicht oligomerisiert vor.

Das „Blumenstrauß-Modell“ (vgl. Abb. 32, links) stellt als engstmögliche Packung von 75 über ihre SNARE-Motive interagierenden Syntaxin-Molekülen möglicherweise einen Extremfall dar, ist jedoch mit allen in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen konform und wird deshalb als spekulatives Modell vorgeschlagen.



**Abb. 32 Zwei alternative Modelle für supramolekulares Syntaxin**

Basierend auf existierenden Strukturinformationen wurde *in silico* eine gestreckte Variante von Syntaxin 1 generiert und anschließend 75 dieser Moleküle so gepackt, dass ihre SNARE-Motive eine möglichst geringe Gesamtfläche einnehmen (links). Zum Vergleich wurde eine zweite Struktur generiert, in der die N-terminalen Domänen so eng wie möglich aneinander gelagert wurden (rechts). Die *in silico* Rekonstruktionen wurden von der Firma *Scimotion* (Hamburg, Deutschland), wie im Anhang beschrieben, durchgeführt und die Abbildung von *Dr. Thorsten Lang* (Abteilung Neurobiologie, MPI für biophysikalische Chemie, Göttingen) zur Verfügung gestellt.

Syntaxin 1-*Clustering* kann demnach als Prozess betrachtet werden, bei dem ein Wechselspiel aus schwachen, homophilen Interaktionen und sterischer Hinderung die *Cluster*-Größe definiert, und bei dem sich ein dynamisches Gleichgewicht zwischen freien und sich in größeren stationären Homo-Oligomeren (*Clustern*) befindlichen Molekülen einstellt.

## 7.5 Physiologische Bedeutung des *Clusterings*

Das „Blumenstrauß-Modell“ (Abb. 32, links) soll an dieser Stelle als Diskussionsgrundlage dienen, um auf eine mögliche physiologische Rolle der *Cluster*-Bildung näher einzugehen.

Um einen Vesikel mit der Plasmamembran zu fusionieren, ist das Zusammenspiel von mehr als einem ternären SNARE-Komplex gebildet aus den SNARE-Motiven von Syntaxin 1, SNAP-25 und Synaptobrevin 2 nötig (Montecucco et al., 2005). Daher wurde zunächst vorgeschlagen, dass die *Cluster* die lokale Konzentration an reaktivem Syntaxin erhöhen und so helfen, die für die Fusion nötige Anzahl an SNARE-Komplexen zu erreichen (Lang et al., 2001; Jahn und Scheller, 2006; Low et al., 2006; Sieber et al., 2006). Nach Bestimmung der Anzahl der Syntaxine im *Cluster* und der Größe der Nanodomäne erscheint dies jedoch wenig wahrscheinlich. Wie im Modell deutlich wird, sind die SNARE-Motive der sich im *Cluster* befindenden Syntaxine durch die sperrigen N-terminalen Domänen gegenüber einem Vesikel-assoziierten Synaptobrevin-Molekül abgeschirmt. Ternäre SNARE-Komplexe müssten sich demnach entweder außerhalb oder am Rand des *Clusters* bilden. Dies scheint im Widerspruch mit dem Befund zu stehen, dass Granulae bevorzugt an diesen Strukturen docken und mit der Zellmembran fusionieren (Lang et al., 2001; Ohara-Imaizumi et al., 2004a), kann jedoch mit der beugungslimitierten Auflösung der verwendeten Mikroskope erklärt werden. Syntaxin 1-*Cluster* haben im Mittel lediglich einen Durchmesser von 50 - 60 nm, erscheinen mit konventioneller Fluoreszenzmikroskopie betrachtet jedoch als über 200 nm große Strukturen (Lang et al., 2001; Ohara-Imaizumi et al., 2004a). Die dokumentierte Kolo-kalisation von Syntaxin 1-*Clustern* und Granulae kann also auch lediglich als räumliche Nähe interpretiert werden. So könnten die Vesikel sich z.B. am Rand der Nanodomäne anlagern. In diesem Bereich der Struktur nehmen die Syntaxine im „Blumenstrauß-Modell“ eine halb-offene Konformation an. Der *Cluster*-Rand könnte demnach als eine Art reaktiver Oberfläche fungieren, an der kontrollierte SNARE-Komplex-Bildung ablaufen kann bzw.

bestimmte, ansonsten wenig stabile Komplexe, wie z.B. mit Munc18 (Zilly et al., 2006), stabilisiert werden könnten.

Darüber hinaus ist die Homo-Oligomerisierung der SNARE-Motive von einer Strukturänderung begleitet und verleiht zumindest teilweise Resistenz gegen Proteasen (Lerman et al., 2000). Außerdem stehen die SNARE-Motive aufgrund der engen Packung im *Cluster* für bestimmte Interaktionen nicht zur Verfügung. Auf diese Weise könnte z.B. die Bildung des unproduktiven 2:1 Komplex mit SNAP-25 (Fasshauer und Margittai, 2004) verhindert werden. Die vorgeschlagene Autoinhibition der Syntaxine wird durch den Befund gestützt, dass rekombinantes Syntaxin sehr effizient mit endogenem Syntaxin um SNAP-25 konkurriert (Lang et al., 2002). Ähnlich wie für SNAP-23-Tetramere vorgeschlagen, könnten die Syntaxin 1-Nanodomänen also auch eine Art Speicher darstellen, aus dem bei Bedarf Moleküle schnell rekrutiert werden können. Die auf *in vitro* Befunden basierende Schlussfolgerung, dass parallele Homo-Tetramere von Syntaxin 1 weit weniger stabil sind, als der bei der Membranfusion gebildete ternäre Komplex der SNARE-Motive von Syntaxin 1, SNAP-25 und Synaptobrevin 2 (Misura et al., 2001), lässt vermuten, dass nur wenig Energie nötig wäre, um Syntaxin aus der Nanodomäne (dem Speicher) zu lösen und in reaktiver Form bereitzustellen.

Syntaxin 4-*Cluster* wurden in dieser Arbeit nur ansatzweise untersucht. Es soll jedoch nicht unerwähnt bleiben, dass der *Clustering*-Prozess für dieses Protein scheinbar ähnlich abläuft. Da das TMR-Konstrukt von Syntaxin 4 nicht an die Plasmamembran sortiert wurde, konnte jedoch nicht abschließend geklärt werden, ob auch die TMR eine Rolle bei der Bildung des Syntaxin 4-*Clusters* spielt. In den FRAP-Experimenten zeigte Syntaxin 4 das gleiche Verhalten wie Syntaxin 1. Bei endogenen Konzentrationen liegen diese beiden SNAREs in PC12-Zellen in separaten *Clustern* vor. Auch wurden Syntaxin 2, 3 und 4 in nicht polarisierten *Madin-Darby-canine-Kidney* (MDCK)-Zellen in getrennten *Clustern* gefunden (Low et al., 2006). Syntaxin-*Clustering* ist also ein sehr spezifischer Prozess, der zwischen den verschiedenen Syntaxinen

der Plasmamembran unterscheidet. Mit der Möglichkeit, dass Syntaxine allgemein durch homophile Interaktionen ihrer SNARE-Motive *Cluster* bilden, wäre ein eleganter Mechanismus gefunden, der die räumliche Trennung dieser strukturell so ähnlichen Proteine (Bennett et al., 1993) in der Zellmembran erklären könnte. In der Zelle müssen Membranen mit unterschiedlicher SNARE-Ausstattung kontrolliert miteinander fusionieren. *In vitro* erfolgt die Bildung von SNARE-Komplexen aus löslichen rekombinanten Proteinen unspezifisch (Fasshauer et al., 1999; Yang et al., 1999) und in Proteoliposomen-Assays wurden unterschiedliche Ergebnisse bezüglich der Selektivität der SNARE-Paarung erhalten (McNew et al., 2000; Brandhorst et al., 2006; Shen et al., 2007). Die räumliche Trennung der Syntaxine in der Zellmembran könnte einer von wahrscheinlich mehreren Regulationsmechanismen sein, die *in vivo* die Spezifität im *Membrane-Trafficking* sicherstellen, und von denen viele wahrscheinlich bereits vor der SNARE-Komplex-Bildung ablaufen (Jahn und Scheller, 2006).

In Jurkat T-Zellen wurde gezeigt, dass durch *Diffusional-Trapping*, vermittelt über Protein-Protein-Wechselwirkungen, sich Mikrodomänen bilden können, in denen sich bestimmte Proteine der Zellmembran anreichern und von denen andere ausgeschlossen sind (Douglass und Vale, 2005). In Analogie dazu könnten auch die Syntaxin-*Cluster* als Plattformen dienen, von denen bestimmte Proteine (wie z.B. Syntaxin 4 und Thy 1) ausgeschlossen sind und an die sich andere, die für die an der Nanodomäne ablaufenden Prozesse von Bedeutung sind, temporär anlagern können. So könnten durch Protein-Protein-Interaktionen dynamische funktionelle Einheiten entstehen.

## 7.6 Syntaxin 1-*Clustering* und Cholesterol

Die Behandlung mit Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin bewirkt die Extraktion von Cholesterol aus der Plasmamembran und führt in MDCK-Zellen zum Zerfall der Syntaxin 3-*Cluster*, zeigte allerdings auf die Syntaxin 4-*Cluster* dieser Zellen wenig Wirkung (Low et al., 2006). In Jurkat T-Zellen jedoch bringt diese Behandlung eine deutliche Veränderung der Syntaxin 4-Verteilung mit sich (Predescu et al., 2005).

Durch Entfernung von Cholesterol kann auch der Zerfall der Syntaxin 1-*Cluster* herbeigeführt werden, was sowohl in PC12-Zellen (Lang et al., 2001) als auch in  $\beta$ -Zellen des Pankreas (Ohara-Imaizumi et al., 2004a) zur Verringerung der regulierten Exozytose führt. Dies weist darauf hin, dass die Integrität der Syntaxin 1-*Cluster* für die biologische Funktion von Bedeutung zu sein scheint. Neben der Abhängigkeit dieser Strukturen vom Cholesterol-Gehalt der Zellmembran, wurde auch die direkte räumliche Nähe von Syntaxin 1 und Cholesterol nachgewiesen (Lang et al., 2001).

Diese Ergebnisse suggerieren, dass Cholesterol mit den Syntaxin 1-*Clustern* assoziiert ist und diese stabilisiert. In Chamberlain et al., 2001 wurde postuliert, dass sich diese Strukturen entsprechend der in der *Lipid-Raft*-Hypothese vorgeschlagenen Mechanismen bilden. Interessanter Weise wurde Syntaxin 1 in *Giant-unilamellar-Vesicles* (GUVs) bevorzugt in der *liquid disordered* ( $l_d$ ) und nicht in der *liquid ordered* ( $l_o$ ) Phase vorgefunden (Bacia et al., 2004). Phasen-Präferenz für die  $l_o$  Phase im Sinne der *Lipid-Raft*-Hypothese kann also die *Cluster*-Bildung nicht erklären. In derselben Studie konnten mit Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie allerdings auch keine großen Homo-Oligomere von Syntaxin 1 festgestellt werden. Die in der hier vorliegenden Arbeit gezeigten Daten weisen jedoch auf Homo-Oligomerisierung als einen der grundlegenden Mechanismen des Syntaxin-*Clusterings* hin. Es zeigt sich auch hier, dass Modell-Membranen, obwohl sehr wertvolle Erkenntnisse mit ihnen erhalten werden können, scheinbar nicht immer die Komplexität des biologischen Systems widerspiegeln, und daher Vorsicht bei der

Übertragung der erhaltenen Ergebnisse auf die Situation in der Zelle geboten ist.

Die Tatsache, dass das Syntaxin 1-TMR-Konstrukt in den *Co-Clustering*-Experimenten nicht mehr an Syntaxin 1-*Clustern* teilnehmen kann und sich in den FRAP-Versuchen durch schnelle Diffusion auszeichnet, zeigt weiter, dass die TMR-Lipid-Wechselwirkungen und der eventuell bevorzugte Aufenthalt in einer Cholesterol-reichen Umgebung nicht für korrektes Syntaxin-*Clustering* in der Plasmamembran ausreichen. Interessant ist dabei, dass das getestete Konstrukt jedoch nicht uniform verteilt vorgefunden wird. Die TMR-Lipid-Wechselwirkung scheint also zum bevorzugten Aufenthalt des Proteins in bestimmten Regionen der Membran zu führen. Zusammen mit den Befunden, dass sowohl das SNARE-Motiv als auch Cholesterol essentiell für den korrekten *Clustering*-Prozess sind, weist dies darauf hin, dass ein Zusammenspiel von Protein-Protein- und Lipid-TMR-Wechselwirkungen stattfinden muss, damit sich die Syntaxin 1-Nanodomäne richtig formieren kann. Eine Möglichkeit wäre, dass Cholesterol sich in der Plasmamembran als Bestandteil einer Lipid-Hülle (*Lipid-Shell*; Anderson und Jacobson, 2002) um die Transmembranregionen von Syntaxin 1 anlagert und bei deren Packung im *Cluster* eine Rolle spielt, bzw. diesen zusätzlich zu den Protein-Protein-Interaktionen der SNARE-Motive stabilisiert.

## **7.7 Ist der Syntaxin 1-Cluster ist ein Membrane-Raft?**

In den letzten Jahren wurde die Bezeichnung *Raft* als Synonym für Membran-Domäne sehr freizügig benutzt. Es gab keinen Konsens darüber, welche Charakteristika bezüglich Größe, Dynamik, Zusammensetzung und biologischer Relevanz eine solche Struktur auszeichnen (Lai, 2003; Kusumi und Suzuki, 2005; Pike, 2006). Auf dem *Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function* wurde 2006 eine Formulierung gefunden, die als kleinster gemeinsamer Nenner im Feld angesehen werden kann.

*Membrane-Rafts* wurden als 10 - 200 nm kleine, heterogene, hoch dynamische Domänen definiert, die reich an Sterol- und Sphingolipiden sind und zelluläre Prozesse räumlich trennen (Pike, 2006).

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Syntaxin 1-Cluster der PC12-Plasmamembran im Mittel 50 – 60 nm große Strukturen sind. Sekretorische Vesikel verschmelzen an diesen mit der Plasmamembran (Lang et al., 2001). Wie unter 7.5 im Detail diskutiert lässt die strikte Trennung der Syntaxin 1-Nanodomänen von Syntaxin 4-Clustern, an denen in Endothelzellen Caveolae bevorzugt fusionieren (Predescu et al., 2005), weiter vermuten, dass unterschiedliche SNARE-vermittelte Membranfusions-Prozesse an verschiedenen Clustern der Plasmamembran ablaufen und Syntaxin-Cluster so zelluläre Prozesse räumlich trennen. Unter 7.3 und 7.6 wurde ausführlich auf die Dynamik des Syntaxin 1-Clusters und seine Abhängigkeit vom Cholesterolgehalt der Plasmamembran eingegangen. Weiter lässt die Vielzahl der Interaktionspartner dieses Proteins (Teng et al., 2001; Brunger, 2005; Hong, 2005) es durchaus möglich erscheinen, dass sich in der Membran-Domäne neben Syntaxin und Cholesterol noch weitere Proteine als zusätzliche Bestandteile aufhalten.

Demnach erfüllen Syntaxin 1-Cluster die meisten der oben genannten Kriterien und sind als *Membrane-Raft*-ähnliche Strukturen einzustufen.

## 7.8 *Membrane-Patterning* als ein Zusammenspiel von Lipid- und Protein-Interaktionen

Der Titel des Artikels von Donald M. Engelman „*Membranes are more mosaic than fluid*“ (Engelman, 2005) beschreibt mit einfachen Worten die aktuelle Sicht der Zellmembran. Die Menge der Proteine, die an bzw. in der Membran organisiert sind, sowie die Vielzahl der verschiedenen daran ablaufenden biologischen Prozesse macht eine Unterteilung in funktionelle Einheiten aus konzeptioneller Sicht sehr sinnvoll.

In dieser Arbeit wurde der Vorgang des Syntaxin 1-*Clusterings* näher untersucht und ein Modell vorgeschlagen, in dem dieser Prozess ein sich selbstorganisierendes System darstellt. Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Es stellt sich ein thermodynamisches Gleichgewicht zwischen freiem und sich in den *Clustern* befindendem Syntaxin ein. Dieses wird durch die homophilen Protein-Protein-Interaktionen der SNARE-Motive und die mit der Größe des *Clusters* zunehmende sterische Hinderung, die einer weiteren Anlagerung von Molekülen entgegenwirkt, bestimmt. Es sind typischerweise 75 Syntaxin-Moleküle in einer 50 – 60 nm großen Nanodomäne organisiert, etwa 1/6 der Syntaxin-Moleküle kommen in freier Form (einzeln oder als kleine Oligomere) vor. Der Vorgang des *Clusterings* ist dabei überwiegend von Protein-Protein-Wechselwirkungen des zytosolischen Syntaxin-Teils bestimmt. Wie oben erläutert, spielt der Aktinkortex bei diesem Prozess keine Rolle. Auch ein Mechanismus, der lediglich auf Wechselwirkungen zwischen Membranlipiden und TMR beruht, kann aufgrund der Datenlage ausgeschlossen werden. Dennoch hängt sowohl die Integrität als auch die Funktionalität der Syntaxin 1-Cluster kritisch vom Cholesterolgehalt der Membran ab (Lang et al., 2001; Ohara-Imaizumi et al., 2004a).

Es ist gut vorstellbar, dass die Mechanismen, die hier für den Syntaxin 1-*Cluster* beschrieben wurden, nicht nur auf andere Syntaxine sondern darüber hinaus auch auf weitere Proteine der Plasmamembran

übertragen werden können. Dabei müssen die Wechselwirkungen, die Größe und Natur der jeweiligen Membrandomäne bestimmen, nicht zwingend rein homophiler Natur sein. Auch die Interaktion mehrerer Proteine (Douglass und Vale, 2005) sowie TMR-Lipid-Wechselwirkungen und Packungseffekte können durchaus einen Einfluss haben.

Der Syntaxin 1-Cluster ist ein Beispiel dafür, dass ein Zusammenspiel von Protein-Protein- und Lipid-Protein-Wechselwirkungen für die richtige Strukturierung einer Membran-Domäne essentiell sein kann. Nur durch eine feine Abstimmung aller beteiligten Wechselwirkungen kann die dynamische Heterogenität der Membran zustande kommen, über welche die Vielzahl der dort ablaufenden biologischen Prozesse räumlich koordiniert und kontrolliert werden kann. Die Zellmembran sollte als ein dynamisch strukturiertes Mosaik (Vereb et al., 2003) verstanden werden, zu dessen Strukturierung sowohl Proteine als auch Lipide maßgeblich beitragen.

## 8 Literaturverzeichnis

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 2002. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, New York.
- Anderson, R.G., und K. Jacobson. 2002. A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains. *Science*. 296:1821-5.
- Antonin, W., D. Fasshauer, S. Becker, R. Jahn, und T.R. Schneider. 2002. Crystal structure of the endosomal SNARE complex reveals common structural principles of all SNAREs. *Nat Struct Biol*. 9:107-11.
- Aoyagi, K., T. Sugaya, M. Umeda, S. Yamamoto, S. Terakawa, und M. Takahashi. 2005. The activation of exocytotic sites by the formation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate microdomains at syntaxin clusters. *J Biol Chem*. 280:17346-52.
- Avery, J., D.J. Ellis, T. Lang, P. Holroyd, D. Riedel, R.M. Henderson, J.M. Edwardson, und R. Jahn. 2000. A cell-free system for regulated exocytosis in PC12 cells. *J Cell Biol*. 148:317-24.
- Axelrod, D., P. Ravdin, D.E. Koppel, J. Schlessinger, W.W. Webb, E.L. Elson, und T.R. Podleski. 1976. Lateral motion of fluorescently labeled acetylcholine receptors in membranes of developing muscle fibers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 73:4594-8.
- Bacia, K., C.G. Schuette, N. Kahya, R. Jahn, und P. Schuille. 2004. SNAREs prefer liquid-disordered over "raft" (liquid-ordered) domains when reconstituted into giant unilamellar vesicles. *J Biol Chem*. 279:37951-5.
- Barnstable, C.J., R. Hofstein, und K. Akagawa. 1985. A marker of early amacrine cell development in rat retina. *Brain Res*. 352:286-90.
- Barszczewski, M. 2005. The establishment and characterization of an improved cell-free assay for exocytosis in neuroendocrine PC12 cells. *In* Abteilung Neurobiologie. MPI für biophysikalische Chemie, Göttingen.
- Bennett, M.K., N. Calakos, und R.H. Scheller. 1992. Syntaxin: a synaptic protein implicated in docking of synaptic vesicles at presynaptic active zones. *Science*. 257:255-9.
- Bennett, M.K., J.E. Garcia-Araras, L.A. Elferink, K. Peterson, A.M. Fleming, C.D. Hazuka, und R.H. Scheller. 1993. The syntaxin family of vesicular transport receptors. *Cell*. 74:863-73.
- Benson, A.A. 1966. On the orientation of lipids in chloroplast and cell membranes. *J Am Oil Chem Soc*. 43:265-70.
- Bock, J.B., H.T. Matern, A.A. Peden, und R.H. Scheller. 2001. A genomic perspective on membrane compartment organization. *Nature*. 409:839-41.
- Brandhorst, D., D. Zwilling, S.O. Rizzoli, U. Lippert, T. Lang, und R. Jahn. 2006. Homotypic fusion of early endosomes: SNAREs do not determine fusion specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103:2701-6.
- Brunger, A.T. 2005. Structure and function of SNARE and SNARE-interacting proteins. *Q Rev Biophys*. 38:1-47.

- Chamberlain, L.H., R.D. Burgoyne, und G.W. Gould. 2001. SNARE proteins are highly enriched in lipid rafts in PC12 cells: implications for the spatial control of exocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:5619-24.
- Chamberlain, L.H., und G.W. Gould. 2002. The vesicle- and target-SNARE proteins that mediate Glut4 vesicle fusion are localized in detergent-insoluble lipid rafts present on distinct intracellular membranes. *J Biol Chem*. 277:49750-4.
- Clarke, M., G. Schatten, D. Mazia, und J.A. Spudich. 1975. Visualization of actin fibers associated with the cell membrane in amoebae of *Dictyostelium discoideum*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 72:1758-62.
- Daumas, F., N. Destainville, C. Millot, A. Lopez, D. Dean, und L. Salome. 2003. Confined diffusion without fences of a g-protein-coupled receptor as revealed by single particle tracking. *Biophys J*. 84:356-66.
- Davson, H., Danielli, J.F. 1952. The permeability of natural membranes. University Press, Cambridge.
- Dietrich, C., B. Yang, T. Fujiwara, A. Kusumi, und K. Jacobson. 2002. Relationship of lipid rafts to transient confinement zones detected by single particle tracking. *Biophys J*. 82:274-84.
- Douglass, A.D., und R.D. Vale. 2005. Single-molecule microscopy reveals plasma membrane microdomains created by protein-protein networks that exclude or trap signaling molecules in T cells. *Cell*. 121:937-50.
- Dulubova, I., S. Sugita, S. Hill, M. Hosaka, I. Fernandez, T.C. Sudhof, und J. Rizo. 1999. A conformational switch in syntaxin during exocytosis: role of munc18. *Embo J*. 18:4372-82.
- Edidin, M., Y. Zagyansky, und T.J. Lardner. 1976. Measurement of membrane protein lateral diffusion in single cells. *Science*. 191:466-8.
- Edidin, M. 2001. Shrinking patches and slippery rafts: scales of domains in the plasma membrane. *Trends Cell Biol*. 11:492-6.
- Engelman, D.M. 2005. Membranes are more mosaic than fluid. *Nature*. 438:578-80.
- Ermak, D., J.A. McCammon. 1978. Brownian dynamics with hydrodynamic interactions. *J. Chem. Phys*. 69:1352-1360.
- Fasshauer, D., H. Otto, W.K. Eliason, R. Jahn, und A.T. Brunger. 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., R.B. Sutton, A.T. Brunger, und R. Jahn. 1998. Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:15781-6.
- Fasshauer, D., W. Antonin, M. Margittai, S. Pabst, und R. Jahn. 1999. Mixed and non-cognate SNARE complexes. Characterization of assembly and biophysical properties. *J Biol Chem*. 274:15440-6.

- Fasshauer, D., W. Antonin, V. Subramaniam, und R. Jahn. 2002. SNARE assembly and disassembly exhibit a pronounced hysteresis. *Nat Struct Biol.* 9:144-51.
- Fasshauer, D., und M. Margittai. 2004. A transient N-terminal interaction of SNAP-25 and syntaxin nucleates SNARE assembly. *J Biol Chem.* 279:7613-21.
- Ficz, G., R. Heintzmann, und D.J. Arndt-Jovin. 2005. Polycomb group protein complexes exchange rapidly in living *Drosophila*. *Development.* 132:3963-76.
- Fitzner, D., A. Schneider, A. Kippert, W. Mobius, K.I. Willig, S.W. Hell, G. Bunt, K. Gaus, und M. Simons. 2006. Myelin basic protein-dependent plasma membrane reorganization in the formation of myelin. *Embo J.* 25:5037-48.
- Frye, L.D., und M. Edidin. 1970. The rapid intermixing of cell surface antigens after formation of mouse-human heterokaryons. *J Cell Sci.* 7:319-35.
- Fujimoto, T., K. Lee, S. Miwa, und K. Ogawa. 1991. Immunocytochemical localization of fodrin and ankyrin in bovine chromaffin cells in vitro. *J Histochem Cytochem.* 39:1485-93.
- Fujiwara, T., K. Ritchie, H. Murakoshi, K. Jacobson, und A. Kusumi. 2002. Phospholipids undergo hop diffusion in compartmentalized cell membrane. *J Cell Biol.* 157:1071-81.
- Goldman, D.A., und D.L. Spector. 2005. Live cell imaging - a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Guidotti, G. 1972. Membrane proteins. *Annu Rev Biochem.* 41:731-52.
- Hanson, P.I., J.E. Heuser, und R. Jahn. 1997. Neurotransmitter release - four years of SNARE complexes. *Curr Opin Neurobiol.* 7:310-5.
- Heerklotz, H. 2002. Triton promotes domain formation in lipid raft mixtures. *Biophys J.* 83:2693-701.
- Hell, S.W., und J. Wichmann. 1994. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated emission depletion microscopy. *Opt. Lett.* 19:780-782.
- Hell, S.W., M. Dyba, und S. Jakobs. 2004. Concepts for nanoscale resolution in fluorescence microscopy. *Curr Opin Neurobiol.* 14:599-609.
- Hering, H., C.C. Lin, und M. Sheng. 2003. Lipid rafts in the maintenance of synapses, dendritic spines, and surface AMPA receptor stability. *J Neurosci.* 23:3262-71.
- Heumann, R., V. Kachel, und H. Thoenen. 1983. Relationship between NGF-mediated volume increase and "priming effect" in fast and slow reacting clones of PC12 pheochromocytoma cells. Role of cAMP. *Exp Cell Res.* 145:179-90.
- Holroyd, P. 2002. Secretory Granule Exo-endocytosis Studied in the Neuroendocrine Cell Line PC12. In Abteilung Neurobiologie. MPI für biophysikalische Chemie, Göttingen.
- Holroyd, P., T. Lang, D. Wenzel, P. De Camilli, und R. Jahn. 2002. Imaging direct, dynamin-dependent recapture of fusing secretory granules on plasma membrane lawns from PC12 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:16806-11.

- Hong, W. 2005. SNAREs and traffic. *Biochim Biophys Acta*. 1744:120-44.
- Iino, R., I. Koyama, and A. Kusumi. 2001. Single molecule imaging of green fluorescent proteins in living cells: E-cadherin forms oligomers on the free cell surface. *Biophys J*. 80:2667-77.
- Jacobson, K., E.D. Sheets, and R. Simson. 1995. Revisiting the fluid mosaic model of membranes. *Science*. 268:1441-2.
- Jacobson, K., O.G. Mouritsen, and R.G. Anderson. 2007. Lipid rafts: at a crossroad between cell biology and physics. *Nat Cell Biol*. 9:7-14.
- Jahn, R., T. Lang, and T.C. Sudhof. 2003. Membrane fusion. *Cell*. 112:519-33.
- Jahn, R., and R.H. Scheller. 2006. SNAREs--engines for membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 7:631-43.
- Kay, J.G., R.Z. Murray, J.K. Pagan, and J.L. Stow. 2006. Cytokine secretion via cholesterol-rich lipid raft-associated SNAREs at the phagocytic cup. *J Biol Chem*. 281:11949-54.
- Kellner, R.R., C.J. Baier, K.I. Willig, S.W. Hell, and F.J. Barrantes. 2007. Nanoscale organization of nicotinic acetylcholine receptors revealed by stimulated emission depletion microscopy. *Neuroscience*. 144:135-43.
- Kenworthy, A.K., B.J. Nichols, C.L. Remmert, G.M. Hendrix, M. Kumar, J. Zimmerberg, and J. Lippincott-Schwartz. 2004. Dynamics of putative raft-associated proteins at the cell surface. *J Cell Biol*. 165:735-46.
- Kittel, R.J., C. Wichmann, T.M. Rasse, W. Fouquet, M. Schmidt, A. Schmid, D.A. Wagh, C. Pawlu, R.R. Kellner, K.I. Willig, S.W. Hell, E. Buchner, M. Heckmann, and S.J. Sigrist. 2006. Bruchpilot promotes active zone assembly, Ca<sup>2+</sup> channel clustering, and vesicle release. *Science*. 312:1051-4.
- Klar, T.A., S. Jakobs, M. Dyba, A. Egner, and S.W. Hell. 2000. Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:8206-10.
- Kroch, A.E., and K.G. Fleming. 2006. Alternate interfaces may mediate homomeric and heteromeric assembly in the transmembrane domains of SNARE proteins. *J Mol Biol*. 357:184-94.
- Kusumi, A., Y. Sako, and M. Yamamoto. 1993. Confined lateral diffusion of membrane receptors as studied by single particle tracking (nanovid microscopy). Effects of calcium-induced differentiation in cultured epithelial cells. *Biophys J*. 65:2021-40.
- Kusumi, A., C. Nakada, K. Ritchie, K. Murase, K. Suzuki, H. Murakoshi, R.S. Kasai, J. Kondo, and T. Fujiwara. 2005. Paradigm shift of the plasma membrane concept from the two-dimensional continuum fluid to the partitioned fluid: high-speed single-molecule tracking of membrane molecules. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 34:351-78.
- Kusumi, A., and K. Suzuki. 2005. Toward understanding the dynamics of membrane-raft-based molecular interactions. *Biochim Biophys Acta*. 1746:234-51.

- Kusumi, A., Murakoshi, H., Murase K., Fujiwara T. 2005. Single-Molecule Imaging of Diffusion, Recruitment, and Activation of Signaling Molecules in Living Cells. *In Biophysical Aspects of Transmembrane Signaling*. S. Damjanovich, editor. Springer-Verlag, Heidelberg.
- Kyhse-Andersen, J. 1984. Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods*. 10:203-9.
- Laage, R., J. Rohde, B. Brosig, und D. Langosch. 2000. A conserved membrane-spanning amino acid motif drives homomeric and supports heteromeric assembly of presynaptic SNARE proteins. *J Biol Chem*. 275:17481-7.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-5.
- Lai, E.C. 2003. Lipid rafts make for slippery platforms. *J Cell Biol*. 162:365-70.
- Lang, T., I. Wacker, J. Steyer, C. Kaether, I. Wunderlich, T. Soldati, H.H. Gerdes, und W. Almers. 1997. Ca<sup>2+</sup>-triggered peptide secretion in single cells imaged with green fluorescent protein and evanescent-wave microscopy. *Neuron*. 18:857-63.
- Lang, T., I. Wacker, I. Wunderlich, A. Rohrbach, G. Giese, T. Soldati, und W. Almers. 2000. Role of actin cortex in the subplasmalemmal transport of secretory granules in PC-12 cells. *Biophys J*. 78:2863-77.
- Lang, T., D. Bruns, D. Wenzel, D. Riedel, P. Holroyd, C. Thiele, und R. Jahn. 2001. SNAREs are concentrated in cholesterol-dependent clusters that define docking and fusion sites for exocytosis. *Embo J*. 20:2202-13.
- Lang, T., M. Margittai, H. Holzler, und R. Jahn. 2002. SNAREs in native plasma membranes are active and readily form core complexes with endogenous and exogenous SNAREs. *J Cell Biol*. 158:751-60.
- Lang, T. 2003. Imaging SNAREs at work in 'unroofed' cells--approaches that may be of general interest for functional studies on membrane proteins. *Biochem Soc Trans*. 31:861-4.
- Lenard, J., und S.J. Singer. 1966. Protein Conformation in Cell Membrane Preparations as Studied by Optical Rotatory Dispersion and Circular Dichroism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 56:1828-1835.
- Lerman, J.C., J. Robblee, R. Fairman, und F.M. Hughson. 2000. Structural analysis of the neuronal SNARE protein syntaxin-1A. *Biochemistry*. 39:8470-9.
- Lopez, I., D. Giner, A. Ruiz-Nuno, J. Fuentealba, S. Viniestra, A.G. Garcia, B. Davletov, und L.M. Gutierrez. 2006. Tight coupling of the t-SNARE and calcium channel microdomains in adrenomedullary slices and not in cultured chromaffin cells. *Cell Calcium*.
- Low, S.H., A. Vasanji, J. Nanduri, M. He, N. Sharma, M. Koo, J. Drazba, und T. Weimbs. 2006. Syntaxins 3 and 4 Are

- Concentrated in Separate Clusters on the Plasma Membrane prior to the Establishment of Cell Polarity. *Mol Biol Cell*. 17:977-89.
- Manders, E.M., J. Stap, G.J. Brakenhoff, R. van Driel, und J.A. Aten. 1992. Dynamics of three-dimensional replication patterns during the S-phase, analysed by double labelling of DNA and confocal microscopy. *J Cell Sci*. 103 ( Pt 3):857-62.
- Margittai, M., D. Fasshauer, S. Pabst, R. Jahn, und R. Langen. 2001. Homo- and heterooligomeric SNARE complexes studied by site-directed spin labeling. *J Biol Chem*. 276:13169-77.
- Margittai, M., D. Fasshauer, R. Jahn, und R. Langen. 2003. The Habc domain and the SNARE core complex are connected by a highly flexible linker. *Biochemistry*. 42:4009-14.
- Marguet, D., P.F. Lenne, H. Rigneault, und H.T. He. 2006. Dynamics in the plasma membrane: how to combine fluidity and order. *Embo J*. 25:3446-57.
- Mayor, S., und F.R. Maxfield. 1995. Insolubility and redistribution of GPI-anchored proteins at the cell surface after detergent treatment. *Mol Biol Cell*. 6:929-44.
- Mazia, D., G. Schatten, und W. Sale. 1975. Adhesion of cells to surfaces coated with polylysine. Applications to electron microscopy. *J Cell Biol*. 66:198-200.
- McNew, J.A., F. Parlati, R. Fukuda, R.J. Johnston, K. Paz, F. Paumet, T.H. Sollner, und J.E. Rothman. 2000. Compartmental specificity of cellular membrane fusion encoded in SNARE proteins. *Nature*. 407:153-9.
- Milosevic, I., J.B. Sorensen, T. Lang, M. Krauss, G. Nagy, V. Haucke, R. Jahn, und E. Neher. 2005. Plasmalemmal phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate level regulates the releasable vesicle pool size in chromaffin cells. *J Neurosci*. 25:2557-65.
- Misura, K.M., R.H. Scheller, und W.I. Weis. 2001. Self-association of the H3 region of syntaxin 1A. Implications for intermediates in SNARE complex assembly. *J Biol Chem*. 276:13273-82.
- Montecucco, C., G. Schiavo, und S. Pantano. 2005. SNARE complexes and neuroexocytosis: how many, how close? *Trends Biochem Sci*. 30:367-72.
- Munro, S. 2003. Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell*. 115:377-88.
- Ohara-Imaizumi, M., C. Nishiwaki, T. Kikuta, K. Kumakura, Y. Nakamichi, und S. Nagamatsu. 2004a. Site of docking and fusion of insulin secretory granules in live MIN6 beta cells analyzed by TAT-conjugated anti-syntaxin 1 antibody and total internal reflection fluorescence microscopy. *J Biol Chem*. 279:8403-8.
- Ohara-Imaizumi, M., C. Nishiwaki, Y. Nakamichi, T. Kikuta, S. Nagai, und S. Nagamatsu. 2004b. Correlation of syntaxin-1 and SNAP-25 clusters with docking and fusion of insulin granules analysed by total internal reflection fluorescence microscopy. *Diabetologia*. 47:2200-7.
- Pabst, S., J.W. Hazzard, W. Antonin, T.C. Sudhof, R. Jahn, J. Rizo, und D. Fasshauer. 2000. Selective interaction of complexin with the

- neuronal SNARE complex. Determination of the binding regions. *J Biol Chem.* 275:19808-18.
- Pike, L.J. 2006. Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *J Lipid Res.* 47:1597-8.
- Plattner, H., Hentschel J. 1997. Taschenlehrbuch Zellbiologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Predescu, S.A., D.N. Predescu, K. Shimizu, I.K. Klein, und A.B. Malik. 2005. Cholesterol-dependent syntaxin-4 and SNAP-23 clustering regulates caveolae fusion with the endothelial plasma membrane. *J Biol Chem.* 280:37130-8.
- Rickman, C., F.A. Meunier, T. Binz, und B. Davletov. 2004. High affinity interaction of syntaxin and SNAP-25 on the plasma membrane is abolished by botulinum toxin E. *J Biol Chem.* 279:644-51.
- Robertson, J.D. 1964. Unit Membranes: A review with recent new studies of experimental alterations and a new subunit structure in synaptic membranes. *In Cellular Membranes in Development.* M. Locke, editor. Academic Press, New York.
- Rutter, G., W. Bohn, H. Hohenberg, und K. Mannweiler. 1986. Preparation of apical plasma membranes from cells grown on coverslips. Electron microscopic investigations of the protoplasmic surface. *Eur J Cell Biol.* 39:443-8.
- Salaun, C., D.J. James, J. Greaves, und L.H. Chamberlain. 2004. Plasma membrane targeting of exocytic SNARE proteins. *Biochim Biophys Acta.* 1693:81-9.
- Sambrook, J., Russel, D.W. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Schutz, D., F. Zilly, T. Lang, R. Jahn, und D. Bruns. 2005. A dual function for Munc-18 in exocytosis of PC12 cells. *Eur J Neurosci.* 21:2419-32.
- Schwann, T. 1839. Mikroskopische Untersuchungen über die Übereinstimmung in der Struktur und dem Wachstum der Tiere und Pflanzen (1839). *In Klassische Schriften zur Zellenlehre* (2003). I. Jahn, editor. Wissenschaftlicher Verlag Harri Deutschland GmbH, Frankfurt am Main.
- Sheets, E.D., G.M. Lee, R. Simson, und K. Jacobson. 1997. Transient confinement of a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein in the plasma membrane. *Biochemistry.* 36:12449-58.
- Shen, J., D.C. Tareste, F. Paumet, J.E. Rothman, und T.J. Melia. 2007. Selective activation of cognate SNAREpins by Sec1/Munc18 proteins. *Cell.* 128:183-95.
- Sieber, J.J., K.I. Willig, R. Heintzmann, S.W. Hell, und T. Lang. 2006. The SNARE motif is essential for the formation of syntaxin clusters in the plasma membrane. *Biophys J.* 90:2843-51.
- Simons, K., und E. Ikonen. 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature.* 387:569-72.
- Simons, K., und W.L. Vaz. 2004. Model systems, lipid rafts, and cell membranes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 33:269-95.

- Singer, S.J. 1971. The molecular organization of biological membranes. *In* Structure and function of biological membranes. L.I. Rothfield, editor. 145-222.
- Singer, S.J., und G.L. Nicolson. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*. 175:720-31.
- Singer, S.J. 2004. Some early history of membrane molecular biology. *Annu Rev Physiol*. 66:1-27.
- Sollner, T., M.K. Bennett, S.W. Whiteheart, R.H. Scheller, und J.E. Rothman. 1993. A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell*. 75:409-18.
- Spector, I., N.R. Shochet, Y. Kashman, und A. Groweiss. 1983. Latrunculins: novel marine toxins that disrupt microfilament organization in cultured cells. *Science*. 219:493-5.
- Stryer, L., Tymoczko, J, Berg, J. 2001. Biochemistry. W.H. Freeman and Company, New York.
- Sutton, R.B., D. Fasshauer, R. Jahn, und A.T. Brunger. 1998. Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature*. 395:347-53.
- Takamori, S., M. Holt, K. Stenius, E.A. Lemke, M. Grønborg, D. Riedel, H. Urlaub, S. Schenck, B. Brügger, P. Ringler, S.A. Müller, B. Rammner, F. Gräter, J.S. Hub, B.L. De Groot, G. Mieskes, Y. Moriyama, J. Klingauf, H. Grubmüller, J. Heuser, F. Wieland, und R. Jahn. 2006. Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell*. 127:831-46.
- Taverna, E., E. Saba, A. Linetti, R. Longhi, A. Jeromin, M. Righi, F. Clementi, und P. Rosa. 2007. Localization of synaptic proteins involved in neurosecretion in different membrane microdomains. *J Neurochem*. 100:664-77.
- Teng, F.Y., Y. Wang, und B.L. Tang. 2001. The syntaxins. *Genome Biol*. 2:REVIEWS3012.
- Towbin, H., T. Staehelin, und J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 76:4350-4.
- Vacquier, V.D. 1975. The isolation of intact cortical granules from sea urchin eggs: calcium ions trigger granule discharge. *Dev Biol*. 43:62-74.
- Vereb, G., J. Szollosi, J. Matko, P. Nagy, T. Farkas, L. Vigh, L. Matyus, T.A. Waldmann, und S. Damjanovich. 2003. Dynamic, yet structured: The cell membrane three decades after the Singer-Nicolson model. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:8053-8.
- Vikman, J., X. Ma, G.H. Hockerman, P. Rorsman, und L. Eliasson. 2006. Antibody inhibition of synaptosomal protein of 25 kDa (SNAP-25) and syntaxin 1 reduces rapid exocytosis in insulin-secreting cells. *J Mol Endocrinol*. 36:503-15.
- Wallach, D.F., und P.H. Zahler. 1966. Protein conformations in cellular membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 56:1552-9.
- Wehner, R., Gehring, W. 1995. Zoologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

- Willig, K.I., S.O. Rizzoli, V. Westphal, R. Jahn, und S.W. Hell. 2006. STED microscopy reveals that synaptotagmin remains clustered after synaptic vesicle exocytosis. *Nature*. 440:935-9.
- Yang, B., L. Gonzalez, Jr., R. Prekeris, M. Steegmaier, R.J. Advani, und R.H. Scheller. 1999. SNARE interactions are not selective. Implications for membrane fusion specificity. *J Biol Chem*. 274:5649-53.
- Yang, X., P. Xu, Y. Xiao, X. Xiong, und T. Xu. 2006. Domain requirement for the membrane trafficking and targeting of syntaxin 1A. *J Biol Chem*. 281:15457-63.
- Zacharias, D.A., J.D. Violin, A.C. Newton, und R.Y. Tsien. 2002. Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells. *Science*. 296:913-6.
- Zilly, F.E., J.B. Sorensen, R. Jahn, und T. Lang. 2006. Munc18-Bound Syntaxin Readily Forms SNARE Complexes with Synaptobrevin in Native Plasma Membranes. *PLoS Biol*. 4:e330.
- Zurzolo, C., G. van Meer, und S. Mayor. 2003. The order of rafts. Conference on microdomains, lipid rafts and caveolae. *EMBO Rep*. 4:1117-21.
- Zwilling, D., A. Cypionka, W.H. Pohl, D. Fasshauer, P.J. Walla, M.C. Wahl, und R. Jahn. 2007. Early endosomal SNAREs form a structurally conserved SNARE complex and fuse liposomes with multiple topologies. *Embo J*. 26:9-18.

## 9 Anhang

An dieser Stelle sollen einige der von den Kollaborationspartnern eingesetzten Methoden im Detail erläutert werden.

### 9.1 Bestimmung der PSF

Von *Dr. Katrin Willig* (Abteilung NanoBiophotonik, MPI für biophysikalische Chemie) wurde für den jeweils benutzten STED-Aufbau die *Point-Spread-Function* (PSF) experimentell bestimmt. Als fluoreszierende Punktquellen dienten dabei Erstantikörper, die über dieselben Sekundärantikörper visualisiert wurden, die auch in den Experimenten eingesetzt wurden. Lorentz-Funktionen wurden den Intensitätsprofilen einzelner Punktquellen angepasst und die mittlere Halbwertsbreite als Maß für die PSF ermittelt. Zum Vergleich wurde für den Aufbau, mit dem der Farbstoff Atto532 detektiert wurde, auch die Halbwertsbreite der Signale von parallel aufgenommenen konfokalen Bildern bestimmt. Hierfür wurden Gauss-Funktionen den erhaltenen Signalen angepasst. Aufgrund der geringeren Auflösung konnten nicht alle im STED-Bild getrennten Signale auch im konfokalen Bild ausgewertet werden. Es wurden eine mittlere Halbwertsbreite für die konfokale Mikroskopie von 192 nm (50 analysierte Signale) und für STED-Mikroskopie von 72 nm (426 analysierte Signale) ermittelt. Mit dem Aufbau für Atto647N wurde für 113 ausgewertete, von fluoreszierenden Punktquellen stammende Signale eine mittlere Halbwertsbreite von 53 nm erhalten.

### 9.2 Bestimmung der *Cluster-Größe*

Die *Cluster-Größe* wurde von *Dr. Katrin Willig* und *Benjamin Harke* (Abteilung NanoBiophotonik, MPI für biophysikalische Chemie) ermittelt. Es wurden STED-Aufnahmen von mit HPC-1/Schaf-anti-Maus-Atto647N gefärbten, von PC12-Zellen stammende *Membrane-Sheets* gemacht. Die Antikörperfärbung war zuvor von Jochen Sieber wie im Methodenteil beschrieben durchgeführt worden. Die

Halbwertsbreite des von einem Syntaxin-*Cluster* stammenden Signals wurde mittels *Linescan*-Analyse wie in Willig et al., 2006 beschrieben und in Abb. 21 illustriert bestimmt. Unter Berücksichtigung sowohl der effektiven Fokusgröße (PSF) des verwendeten STED-Mikroskops (53 nm) als auch der theoretischen Verteilung der fluoreszenzmarkierten Antikörper auf dem *Cluster* ließ sich anhand der gemessenen Halbwertsbreiten der von den Syntaxin-*Clustern* stammenden Signale (Median 68 nm), die *Cluster*-Größe auf 50 - 60 nm abschätzen. Nicht zuletzt aufgrund der potentiell variierenden Verteilung der markierten Antikörper auf dem *Cluster* beträgt der statistische Fehler dieser Abschätzung 5 nm.

### 9.3 Computer-Simulation

Die Simulationsstudien wurden von *Dr. Carsten Kutzner* und *Prof. Dr. Helmut Grubmüller* (Abteilung Theoretische und computergestützte Biophysik, MPI für biophysikalische Chemie) basierend auf den in der vorliegenden Arbeit ermittelten Daten durchgeführt.

Die laterale Diffusion von Syntaxin 1 wurde durch Simulation der Brown'schen Molekularbewegung (Ermak, 1978) beschrieben. Zunächst wurden  $n = 1391$  Syntaxin-Moleküle auf einer Fläche von  $0,879 \times 0,879 \mu\text{m}^2$  an zufälligen, nicht überlappenden Positionen  $r_i = (x_i, y_i)$ ,  $i = 1 \dots n$  platziert (vgl. Abb. 31A links). Die gewählte Anzahl der Syntaxin-Moleküle basiert auf der experimentell bestimmten Menge an endogenem Syntaxin 1 pro Flächeneinheit Zellmembran. Der Syntaxin-Spiegel in den FRAP-Experimenten war durch transiente Überexpression erhöht, was einen proportionalen Anstieg der Syntaxin-*Cluster*-Zahl mit sich bringt (vgl. Abb. 22). Dennoch hängt das beobachtete Verhalten in den FRAP-Experimenten nicht vom Expressionsgrad ab (siehe Abb. 28), was darauf hindeutet, dass nicht die Gesamtmenge an Syntaxin, sondern vielmehr das Verhältnis von freiem zu sich in *Clustern* befindlichem Syntaxin für die Kinetik dieser Versuche ausschlaggebend ist. Aus diesem Grund kann die

experimentell bestimmte endogene Syntaxin-Konzentration in der Simulation verwendet werden.

Die Brown'sche Bewegung der Syntaxin-Moleküle wurde durch Zeitentwicklung der Syntaxin-Koordinaten simuliert. Es wird folgende Diffusionsgleichung für die Wahrscheinlichkeit  $p(\mathbf{r}_i, t)$ , ein Syntaxin-Molekül zur Zeit  $t$  am Ort  $\mathbf{r}_i$  vorzufinden, erfüllt:

$$\partial_t p(\mathbf{r}_i, t) = \nabla_i D [\nabla_i - \beta \mathbf{F}_i(\mathbf{r}_i)] p(\mathbf{r}_i, t) \quad (6)$$

Dabei ist  $\beta = 1/k_B T$  die reziproke thermale Energie bei Raumtemperatur,  $D$  die Diffusionskonstante und  $\mathbf{F}_i(\mathbf{r}_i) = -\nabla_i U(\mathbf{r}_1, \dots, \mathbf{r}_n)$  die Driftkraft, welche aus dem Interaktionspotential  $U$  abgeleitet wird.  $U$  setzt sich aus Paarwechselwirkungen der Syntaxine zusammen,

$$U = \sum_{i < j}^n V(r_{ij}) \quad (7)$$

mit

$$V(r_{ij}) = E_1 e^{-r^2/2\delta^2} - E_2 f_s e^{-r^2/2(2\delta)^2} \quad (8)$$

$r_{ij} = |\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j|$  ist der Abstand zwischen den Syntaxin-Molekülen  $i$  und  $j$ . Der erste Term von  $V$  beschreibt die gegenseitige Abstoßung der Stärke  $E_1$  und Reichweite  $\delta$ , die verhindert, dass sich Moleküle durchdringen (Pauli-Prinzip). Im zweiten Term wird eine effektive Anziehung der Stärke  $E_2$  und der Reichweite  $2\delta$  zwischen den Syntaxin-Molekülen beschrieben. Durch die Wahl eines effektiven radialsymmetrischen Potentials  $V(r_{ij})$ , wurde einer möglichen niedrig-molekularen Oligomerisierung im „*mean field*“-Sinne (also im örtlichen und zeitlichen Mittel) Rechnung getragen. Die Reichweite  $\delta$  wurde so gewählt, dass eine Syntaxin-Transmembranhelix etwa eine Fläche von  $1,5 \text{ nm}^2$  einnahm (Takamori et al., 2006), d.h. so, dass das Minimum von  $V$  sich bei  $\sqrt{1,5}$  nm befand. Die Stärke der anziehenden Interaktion zwischen den Syntaxin-Molekülen, d.h. die Tiefe des Minimums von  $V$  (vgl. Abb. 31B), war einer von zwei veränderlichen Parametern.

Um das *Cluster*-Wachstum zu begrenzen und am Ende eine Übereinstimmung der *Cluster*-Dichte in Experiment und Simulation zu

erreichen, wurde ein Skalierungsfaktor  $f_s = 1 - (n_c/n_{max})^2$  miteinbezogen. Dieser Faktor schwächt die effektive Anziehung mit steigender *Cluster*-Größe  $n_c$  ab. Für  $n_c \geq n_{max}$  wird die Interaktion abstoßend und verhindert so weiteres *Cluster*-Wachstum (vgl. Abb. 31B). Zwei Syntaxin-Moleküle wurden dem gleichen *Cluster* zugerechnet, wenn ihr gegenseitiger Abstand nicht mehr als 1,5 nm betrug.  $n_{max}$  wurde als zweiter veränderlicher Parameter verwendet.

Trajektorien, die der Diffusionsgleichung (6) genügen, wurden durch Zeitdiskretisierung und iterative Neuberechnung der Syntaxin-Positionen, erhalten:

$$\mathbf{r}_i(t+\Delta t) = \mathbf{r}_i(t) - D\Delta t \cdot \mathbf{F}_i(t) + \xi \sqrt{2D\Delta t} \quad (9)$$

wobei  $\xi$  eine zufällig gewählte Zahl einer (zwei-dimensionalen) Normalverteilung mit der Varianz 1 ist. Es wurden periodische Randbedingungen verwendet. Die Integrationsschrittweite von  $\Delta t = 16.9$  ns bietet größtmögliche Effizienz bei gleichzeitig sichergestellter numerischer Stabilität. Kürzere Integrationsschritte verlängern lediglich die Rechenzeit, die zum Erhalt der Trajektorien benötigt wird, verbessern aber nicht die Qualität der Ergebnisse. Um Konvergenz zu beschleunigen, wurde das Simulationssystem bei unveränderter Syntaxin-Dichte um einen Faktor 10 im Vergleich zum Experiment verkleinert, was zu einer  $10^2 = 100$  Mal schnelleren FRAP-Kinetik führt.

Zunächst wurde der zufällige Anfangszustand des Systems so lange in der Zeit entwickelt, bis sich ein thermodynamisches Gleichgewicht einstellte. Diese Phase dauerte je nach gewählten Parametern etwa 100 Sek. und ist von spontaner *Cluster*-Bildung und *Cluster*-Wachstum geprägt. Der Gleichgewichtszustand ist dadurch charakterisiert, dass eine durchschnittliche *Cluster*-Dichte und *Cluster*-Größe erreicht ist, die sich im weiteren Simulationsverlauf abgesehen von statistischen Schwankungen nicht mehr ändert. Die sich einstellende Dichte und Größe der *Cluster* ist dabei ausschließlich von den Eingabeparametern  $E_2$  und  $n_{max}$  abhängig.

Frühestens im Gleichgewichtszustand fand das simulierte Bleichen statt, bei dem die Moleküle im gebleichten Bereich als gebleicht (in der Abb. 31A, orange) und alle anderen als ungebleicht (in der Abb. 31A, weiß) markiert wurden. Ungebleichte Syntaxine, die im Verlauf der weiteren Simulation in den gebleichten Bereich hineindiffundierten, trugen zum simulierten FRAP-Signal bei. Um statistische Fluktuationen zu minimieren, wurden jeweils die Kurven von 36 verschiedenen Bleichregionen gemittelt.

Experimentelle Daten aus Abb. 25 sind auch in Abb. 31B gezeigt. Die Zeitachse der Simulationen wurde so angepasst, dass ein direkter Vergleich möglich ist. Alle Amplituden der FRAP-Kurven aus Abb. 25 wurden mit  $A_t/(A_t - A_b)$  skaliert, wobei  $A_t$  die Fläche der gesamten Zellmembran und  $A_b$  die gebleichte Fläche ist. In den Simulationen war  $A_b = A_t/9$ , was einem Skalierungsfaktor von  $9/8$  entspricht.

Der Diffusionskoeffizient einzelner Syntaxin-Moleküle wurde durch einen *Fit* der simulierten freien Diffusion ( $f_s = 0$ ) an die experimentelle Kurve des TMR-Konstrukts erhalten, von dem gezeigt worden war (Abb. 23), dass es nicht an Syntaxin 1-*Clustern* teilnehmen kann. Für den *Fit* wurden, um eine Verfälschung durch eine mögliche aber nicht charakteristische langsame Bewegungskomponente zu vermeiden, nur die ersten 100 Sek. der TMR-Kurve berücksichtigt und für die Amplitude ein Skalierungsfaktor (0,855) zugelassen. Da der Diffusionskoeffizient  $D$  von der Diffusion innerhalb der Membran und nicht innerhalb des Lösungsmittels dominiert wird, konnte der so ermittelte Wert für die Simulationen von Syntaxin 1 verwendet werden.

Durch Variation der beiden Eingabeparameter ( $n_{max}$  und  $E_2$ ) erhält man nach der anfänglichen Equilibrierungsphase eine Menge von Simulationen, die sich in der durchschnittlichen *Cluster*-Dichte und Größe unterscheiden. Aus dieser Menge wurden nur die ausgewählt und in Abb. 31B gezeigt, bei denen die durchschnittliche *Cluster*-Zahl mit dem gemessenen Wert von  $19,6/\mu\text{m}^2$  übereinstimmte. Die blaue Kurve mit 100% freiem Syntaxin stellt eine Ausnahme dar. Hier gibt es keine *Cluster*-Bildung und demzufolge auch keine *Cluster*-Dichte. Für die anderen Kurven außer der roten ( $n_{max} = 60$ ) bzw. der schwarzen

( $n_{max} = 120$ ) wurde  $n_{max} = 140$  verwendet. Aus Abb. 31B konnte dann leicht die simulierte FRAP-Kurve ermittelt werden, die am besten mit der experimentellen übereinstimmte.

## 9.4 *In silico* Rekonstruktion

Die *in silico* Rekonstruktionen supramolekularen Syntaxins wurden von der Firma *Scimotion* (Hamburg, Deutschland) durchgeführt. Zunächst wurde mit dem 3D-Program *Maya* (*Autodesk Inc.*, San Rafael, CA, USA) eine gestreckte Konformation von Syntaxin 1 mit geringstem Platzverbrauch in der lateralen Ebene generiert. Hierfür wurden strukturelle Daten der N-terminalen Domäne (PDB-Nummer: 1BRO) und des SNARE-Motivs (PDB-Nummer: 1HVV) von Syntaxin 1A verwendet. Die fehlenden Aminosäuren, die in den Strukturen nicht enthalten waren, wurden ergänzt. Anschließend wurden 75 Syntaxin-Moleküle so gepackt, dass ihre SNARE-Motive eine möglichst geringe Gesamtfläche einnahmen. Diese Packung führte zu einer Abwinklung der *Linker*-Region zwischen der N-terminalen Domäne und dem SNARE-Motiv, deren Ausprägung von der Position des jeweiligen Syntaxins innerhalb der resultierenden Struktur bestimmt wird. Zum Vergleich wurde eine zweite Struktur generiert, in der die N-terminalen Domänen so eng wie möglich gepackt wurden.

# Lebenslauf

## Jochen Josef Sieber

Diplom-Biochemiker

geboren am 24.10.1976 in Ochsenfurt

deutsch

Seit 10/2003

Dissertation in der Abteilung Neurobiologie  
am Max-Planck-Institut für biophysikalische  
Chemie, Göttingen

09/2002

Diplom (Biochemie), Universität Leipzig

10/1997 - 09/2002

Studium der Biochemie (Diplom), Universität  
Leipzig

20/1999 – 09/2000

ERASMUS-Jahr an der Universität Glasgow  
(3<sup>rd</sup> year Biochemistry)

06/1996

Abitur, Gymnasium Marktbreit

09/1987 – 06/1996

Gymnasium Marktbreit

09/1983 – 08/1987

Grundschule Ochsenfurt