



GEORG-AUGUST-UNIVERSITÄT
GÖTTINGEN

**Fluoreszenzmikroskopische Studien an
Plasmamembranen zur Untersuchung der
molekularen Mechanismen der neuronalen Exocytose**

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

vorgelegt von
Felipe Emilio Zilly
aus Mülheim an der Ruhr

Göttingen, der 29. Mai 2006

D 7

Referent: PROFESSOR DR. REINHARD JAHN

Korreferent: PROFESSOR DR. RÜDIGER HARDELAND

Tag der mündlichen Prüfung: 6. Juli 2006

Eidesstattliche Erklärung:

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass ich die vorliegende Arbeit:
“Fluoreszenzmikroskopische Studien an Plasmamembranen zur
Untersuchung der molekularen Mechanismen der neuronalen Exocytose“
selbständig verfasst ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe.

Göttingen, 29. Mai 2006

Felipe Emilio Zilly

Erklärung:

Teile dieser Arbeit wurden bereits vorab veröffentlicht.

Schutz, D., F. Zilly, et al. (2005). "A dual function for Munc-18 in exocytosis of PC12 cells." Eur J Neurosci **21**(9): 2419-32.

Ein weiteres Manuskript befindet sich gerade im Begutachtungsprozess.

Zilly, F.E., Sørensen, J.B., Jahn, R. and Lang, T. (2006). "Munc18 bound syntaxin readily forms SNARE-complexes with synaptobrevin in native plasma membranes" PlosBiology.

Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt Herrn *Professor Reinhard Jahn* für die herzliche Aufnahme in seine Abteilung, die Überlassung des interessanten Forschungsprojektes und seine motivierende Diskussionen.

Bei Herrn *Dr. Thorsten Lang* möchte ich mich herzlich für seine Betreuung und seine offene Bereitschaft zur Diskussion bedanken. Auch über die Doktorarbeit hinaus war er für mich ein wichtiger Ansprechpartner.

Bei Herrn *Professor Hardeland* bedanke ich mich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens, bei den Herren *Dr. Schwienhorst* und *Professor Wimmer* bedanke ich mich für ihre Bereitschaft, mir die Nebenfachprüfung abzunehmen.

Herzlich bedanke ich mich außerdem bei

Dr. Thorsten Lang, Claudia Barking e Ferrão, Jochen Sieber und *Alexander Stein* für die kritische Kommentierung der vorliegenden Arbeit,

Dr. Thorsten Lang und *Nagaraj D. Halemani* für die Bereitstellung von in dieser Arbeit diskutierten Daten,

Dr. Dirk Fasshauer, Dr. Dagmar Schütz, Jochen Sieber, Alexander Stein, Dr. Olga Vites und *Dr. Daniel Zwilling* für die Bereitstellung von einem Antikörper, rekombinanten Proteinen und Plasmid-DNS,

Herrn *Dr. Gottfried Mieskes* für die häufige Hilfe beim Lösen von technischen Problemen im Labor und bei Frau *Maria Druminski* für ihre exzellente Unterstützung bei der Klonierung der clostridialen Toxinen,

Herrn *Dr. Jakob Sørensen* für die Einweisung in die Entnahme von chromaffinen Zellen und die Bereitstellung von *snap25-Knockout-Mäusen*,

Frau *Ina Herfort* für die Präparation von *bovinen* chromaffinen Zellen und bei Herrn *Dr. Alexander Egner* für die Einweisung zur Nutzung des konfokalen Mikroskops,

meinen gegenwärtigen und ehemaligen „Mitreitern“ im Prof.-Jahn-Labor. Allen voran *Thorsten, Jochen, Matthew* und *Nikolai*, der Mannschaft meines Ecklabors, sowie *Doro, Olga* und *Undine*, die maßgeblich zu einer überaus angenehmen Arbeitsatmosphäre beigetragen haben.

Ich möchte diese Gelegenheit nutzen, um auch dem kürzlich verstorbenen Herrn *Professor Hans-Dieter Söling* zu gedenken. Ich danke ihm für seine Diskussionsbereitschaft, experimentellen Vorschläge, aber auch für die herzlichen Gespräche in der Kaffee-Ecke.

Bei meinen Eltern und Geschwistern möchte ich mich für die Unterstützung und das Vertrauen in meine Fähigkeiten ganz herzlich bedanken.

Meinem Schatz, *Claudia Barking e Ferrão*, danke ich von ganzem Herzen für ihre Hilfe, Rücksichtnahme und ihr Verständnis während meiner Doktorarbeit.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	II
1 Abstract	1
2 Kurzfassung	3
3 Einleitung	5
3.1 Die Biologie.....	5
3.2 Die Zell-Zell-Kommunikation.....	5
3.3 Die regulierte Exocytose	7
3.4 Die synaptische Transmission	8
3.5 Molekulare Ereignisse vor der Vesikelfusion an der Plasmamembran in der neuronalen Exocytose.....	10
3.6 Die SNARE-Proteinfamilie	13
3.7 Die SNARE-Komplexbildung.....	14
3.8 Die SNAREs in der neuronalen Exocytose	16
3.9 Die Organisation der SNAREs in der Plasmamembran	18
3.10 Die Sec1/Munc18-Proteinfamilie	18
3.11 Das Homolog der neuronalen Exocytose, Munc18-1.....	22
3.12 Der <i>Membrane-Sheet-Assay</i>	24
4 Zielsetzung.....	27
4.1 Charakterisierung der Bindung von Munc18-1 an seinen Plasmamembran-Akzeptor	27
4.2 Analyse des Zustands der SNARE-Domänen nach Erhöhung der Calciumkonzentration.....	27
5 Material und Methoden	29
5.1 Materialien.....	29
5.1.1 Verwendete Materialien, Lösungen und Chemikalien	29
5.1.2 Sonifizierungspuffer	29
5.1.3 Kalium-Glutamat-Reaktionspuffer	29
5.1.4 PFA-Stocklösung.....	29
5.1.5 PBS	29
5.1.6 Cytomix	29
5.1.7 PC12-Zellmedium	29
5.1.8 Hungermedium	30
5.1.9 Medium für chromaffine Zellen	30
5.1.10 Antikörper.....	30
5.1.11 Durch fremde Vorarbeiten erhaltene rekombinante Proteine	31
5.1.12 Durch fremde Vorarbeiten erhaltene DNS-Konstrukte	31
5.2 Methoden	32
5.2.1 Klonierte DNS-Konstrukte	32
5.2.2 SDS-Page- und Western-Blot:.....	33
5.2.3 Proteinaufreinigung:	33
5.2.4 <i>Labelling</i> von rekombinantem Synaptobrevin Protein.....	34
5.2.5 Dichtegradientenzentrifugation	34

5.2.6	Auftauen von PC12 Zellen	35
5.2.7	Passagierung und Plattierung von PC12-Zellen	35
5.2.8	Beschichtung der Deckgläser mit Poly-L-Lysin	36
5.2.9	Transfektion von PC12 Zellen.....	36
5.2.10	<i>Membrane-Sheet</i> Herstellung	37
5.2.11	Inkubation der <i>Membrane-Sheets</i>	37
5.2.12	Antikörperfärbung von <i>Membrane-Sheets</i>	38
5.2.13	Ionomycin-Behandlung von PC12 Zellen	38
5.2.14	Depolarisation von chromaffinen Zellen vom Rind	39
5.2.15	Isolierung und Kultur von chromaffinen Zellen von Maus	39
5.2.16	Bestimmung des <i>snap25</i> Genotyps.....	40
5.2.17	Isolierung und Kultur von chromaffinen Zellen vom Rind	40
5.2.18	Ganzzellanfärbung von chromaffinen Zellen vom Rind ..	40
5.2.19	Konfokales Mikroskop	41
5.2.20	Konfokale Analyse der Ganzzellfärbung <i>boviner</i> Zellen .	41
5.2.21	Epifluoreszenzmikroskop	42
5.2.22	Mikroskopie von <i>Membrane-Sheets</i>	43
5.2.23	Analyse von <i>Membrane-Sheets</i>	43
5.2.24	Analyse der Plasmamembranbindung von EGFP-Munc18-1	44
6	Ergebnisse.....	45
6.1	Charakterisierung der Bindung von Munc18-1 an seinen Plasmamembran-Akzeptor	45
6.1.1	Charakterisierung der Bindung von Munc18-1 an die Plasmamembran in ganzen Zellen.....	45
6.2	Charakterisierung von Plasmamembran gebundenem Munc18-1 im <i>Membrane-Sheet-Assay</i>	47
6.2.1	Die Konzentrierung von Munc18-1 in Mikrodomänen....	47
6.2.2	Stabilität der Munc18-1 Bindung an der Plasmamembran	49
6.2.3	Munc18-1 bindet über Syntaxin1A an die Plasmamembran.....	49
6.2.4	Gedockte Granula kolokalisieren mit Munc18-1-Domänen.....	50
6.2.5	Die offene Konformation von Syntaxin bindet nicht Munc18-1.....	52
6.2.6	Der Munc18-1-Akzeptorkomplex ist Synaptobrevin-sensitiv	53
6.2.7	Die durch Synaptobrevin2 induzierte Munc18-1- Verdrängung ist nicht auf PC12-Zellen beschränkt	57
6.2.8	Das rekombinante Synaptobrevin wirkt auf Syntaxin gebundenes Munc18-1.....	59
6.2.9	Die C-terminale Spaltung von plasmalemalem SNAP-25 zeigt keinen Einfluss auf den Synaptobrevin- induzierten Verlust von Munc18-1	60
6.2.10	SNAP-25 ist für den Synaptobrevin-induzierten Verlust von Munc18-1 essentiell.....	62

6.3	Analyse des Zustands der SNARE-Domänen nach Erhöhung der Calciumkonzentration.....	64
6.3.1	Nanomolares Calcium führt zu einer drastischen Änderung des Immunanfärbungsmusters von SNAREs ..	64
6.3.2	Die Depolarisation von <i>bovinen</i> chromaffinen Zellen führt zum Antigenitätsverlust der SNARE-Proteine	65
6.3.3	Nanomolares Calcium reduziert die SNARE-Immunanfärbung	66
6.3.4	Visualisierung von SNARE-Pools durch Immunanfärbung	70
6.3.5	Calcium reduziert den Einbau von rekombinantem Synaptobrevin2.....	74
6.3.6	Analyse des Calcium-Effektes auf Munc18-1 mit einer Dichtegradientenzentrifugation	75
7	Diskussion.....	78
7.1	Charakterisierung der Bindung von Munc18-1 an seinen Plasmamembran-Akzeptor	78
7.1.1	Der <i>Membrane-Sheet-Assay</i> zur Untersuchung der molekularen Mechanismen der neuronalen Exocytose	78
7.1.2	Studien zur Identifizierung des Bindungspartners von Munc18-1.....	79
7.1.3	Analyse der Syntaxin-Konformation im Munc18-1 Akzeptorkomplex	80
7.1.4	Der Mechanismus und die Kontrolle der Munc18-1-Freisetzung durch Synaptobrevin2	83
7.1.5	Die Beteiligung von SNAP-25 an der Munc18-1-Freisetzung durch Synaptobrevin	86
7.1.6	Die Funktion von Munc18-1 bei der SNARE-Komplexbildung	88
7.1.7	Schlussfolgerung	92
7.2	Analyse des Zustands der SNARE-Domänen nach Erhöhung der Calciumkonzentration.....	93
7.2.1	Wirkung von mikro- und nanomolarem Calcium auf die Antigenität von Membranproteinen.....	93
7.2.2	SNARE-spezifischer Calcium-Effekt bei nanomolarem Calcium.....	96
7.2.3	Calcium-Effekt auf Munc18-1.....	99
7.2.4	Schlussfolgerung	100
8	Literaturverzeichnis	101
9	Lebenslauf	112

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Schematische Darstellung einer synaptischen Verschaltung zweier Neurone ⁹	
Abb. 2	Synaptischer Vesikel Zyklus	10
Abb. 3	Modell der letzten molekularen Ereignisse zur der Vesikelfusion	13
Abb. 4	Kristallstruktur des neuronalen SNARE-Komplexes	15
Abb. 5	Übersicht über den Aufbau der humanen neuronalen SNAREs...	16
Abb. 6	Der neuronale SNARE-Zyklus	17
Abb. 7	Übersicht über die verschiedenen Bindungsmodi von SM-Proteinen an die SNAREs	21
Abb. 8	Übersicht zur <i>Membrane-Sheet</i> -Herstellung	26
Abb. 9	Expression von EGFP- markierten Varianten von Munc18-1, Syntaxin-EGFP und cytosolischem EGFP	46
Abb. 10	Charakterisierung von Munc18-1-Komplexen an der nativen Plasmamembran.....	48
Abb. 11	Docking von sekretorischen Granula an Munc18-1 angereicherte Plasmamembran-Domänen.....	51
Abb. 12	Zur Rekrutierung von Munc18-1 an die PM muss Syntaxin1A die geschlossene Konformation annehmen können.....	53
Abb. 13	Synaptobrevin setzt Munc18-1 von Syntaxin1A frei	55
Abb. 14	Trunkierte Varianten von Synaptobrevin2 setzen Munc18-1 nicht frei	56
Abb. 15	Der durch Synaptobrevin2 induzierte Verlust von Munc18-1 ist auch in <i>bovinen</i> chromaffinen Zellen zu beobachten	58
Abb. 16	Synaptobrevin und BoNT/C1 wirken auf den gleichen Munc18-1 Akzeptor	59
Abb. 17	Der Schnitt von SNAP-25 mit BoNT/E verhindert nicht die Synaptobrevin induzierte Munc18-1 Freisetzung.....	61
Abb. 18	SNAP-25 ist für die Synaptobrevin induzierte Munc18-1-Freisetzung notwendig.....	63
Abb. 19	Die Depolarisation von <i>bovinen</i> chromaffinen Zellen führt zur Abnahme der SNARE-Immunanfärbung	65
Abb. 20	Calcium reduziert die Immunanfärbung auf <i>Membrane-Sheets</i> ...	67
Abb. 21	Korrelation zwischen Immunanfärbung und EGFP-Fluoreszenz.	71
Abb. 22	Calcium reduziert den Einbau von rekombinantem Synaptobrevin in die PM	74
Abb. 23	Analyse eines Effektes von Calcium auf die Munc18-1 Lokalisation.....	76
Abb. 24	Modell über die Bindung von Munc18-1 an die neuronalen SNAREs.....	90

Abkürzungsverzeichnis

AA	Aminosäuren
AS	Aminosäure
BSA	Rinder-Serum-Albumin
BHK	<i>Baby Hamster Kidney</i>
BoNT	Botulinum Neurotoxin
CAPS	<i>Ca²⁺ - dependent activator protein secretion</i>
CCD	<i>charge coupled device</i>
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary</i>
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DPTA	1,3-Diamino-2-propanol-N,N,N',N'- tetraessigsäure
DTT	Dithiothreitol
E	Tag des embryonales Stadium
EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethylethyl)-tetraessigsäure
EYFP	<i>Enhanced Yellow Fluorescent Protein</i>
F-Aktin	filamentöses Aktin
FRET	Förster Resonanz Energie Transfer
g	Erdbeschleunigung
GDI	<i>guanine nucleotide dissociation inhibitor</i>
GTP	Guanosintriphosphat
HIT	hamster insulinoma tumor, beta-Zelllinie
HOPS	<i>homotypic fusion and vacuole protein sorting</i>
mEGFP	monomeres EGFP
Min6	mouse insulinoma 6, pankreatische beta-Zelllinie
Munc13	<i>mamalian Unc-13</i>
Munc18	<i>mamalian Unc-18</i>
N	Anzahl
NPY	Neuropeptid Y
PC12	Phaeochromocytoma
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PM	Plasmamembran
PIP2	Phosphatidyl-Inositol-Bis-Phosphat
Rab3	Protein der Ras-Superfamilie
rpm	Umdrehungen pro Minute
RIM	<i>Rab3-interacting molecule</i>
ROP	<i>Ras opposite gene</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sec1p	SECretory, Sekretionsmutante
Sly1p	<i>Suppressor of Loss of Ypt1</i>
SM-Familie	Sec1/Munc18-Familie
SNAP-25	<i>Synaptosome associated protein of 25 kDa</i>
SNARE	<i>Soluble N-ethylmaleimide Sensitive Factor (NSF) Attachment Protein Receptor</i>
Unc	<i>uncoordinated locomotion</i>
TeTx	Tetanus Neurotoxin
Vps45	<i>Vacuolar protein sorting-associated protein 45</i>
Vps33	<i>Vacuolar protein sorting-associated protein 33</i>
w/v	Gewicht zu Volumen
YPT1	<i>Yeast Protein Two 1</i>

1 Abstract

During regulated exocytosis from neurons and neuroendocrine cells a rise in intracellular calcium concentration leads to the formation of the so-called core-complex, between the plasmalemmal SNAREs syntaxin1A, SNAP-25 and the vesicular synaptobrevin2. As a result of this reaction the two opposing membranes are fused. Apart from the SNAREs, the protein Munc18-1, which belongs to the Sec1/Munc18 protein family, is also an essential factor in neuronal exocytosis. The knockout of Munc18-1 leads to the block of neuronal exocytosis. *In vitro* Munc18-1 forms a complex with syntaxin1, where syntaxin is kept in a closed conformation. In this complex syntaxin1 is not accessible for reactions with SNAP-25 and synaptobrevin2 and thus unable to form core-complexes. How this inhibition of core complex formation fits with the essential function of Munc18-1 is not yet understood.

In this work it is shown that Munc18-1 forms a complex with membrane bound syntaxin1 in intact plasma membrane preparations of PC12 cells, which retain exocytic competence. The addition of recombinant synaptobrevin2, which leads to core-complex formation with endogenous SNAREs, breaks this complex. However, in a parallel experiment, recombinant SNAP-25 or syntaxin1A, which do not form core complexes at the plasma membrane, did not affect the Munc18-1-syntaxin1 binding. As a further control this experiment was repeated using membranes from SNAP-25 deficient mice. Here, as an axiom no core-complex formation can occur, and as expected the addition of recombinant synaptobrevin2 did not show a release of Munc18-1. This supports the idea that in native membranes syntaxin1, even if complexed by Munc18-1, is available for core complex formation and that Munc18-1 leaves syntaxin1 after complex formation. From that it is concluded that Munc18-1 binding allows complex formation between syntaxin1 and SNAP-25, which forms an acceptor site for vesicular synaptobrevin and is an intermediate in exocytosis. Munc18-1-syntaxin binding could be a spatial and temporal regulator of this acceptor complex, hereby preventing unproductive SNARE-complex formation in the plasma membrane.

A further line of investigation was to see if the rise of the calcium concentration affects the state of the SNAREs in the plasma membrane. In the resting state these are uncomplexed and concentrated in protein microdomains.

It could be shown that after a rise in physiological calcium concentration the immunostaining intensity of SNAREs decreases. Furthermore, for syntaxin1 concentration of syntaxin in visible microdomains increased, concomitant with the loss of some microdomains in the membrane. For SNAP-25 a 90% decrease in immunostaining intensity was observed. Less recombinant synaptobrevin2 was incorporated into the plasma membrane.

This observations let us conclude:

Calcium induces a reorganisation of syntaxin1 domains. As the epitope for SNAP-25 immunostaining resides within the SNARE-motif of this protein, the loss of immunostaining intensity could reflect the incorporation of SNAP-25 in complexes with endogenous syntaxin1. This would be supported by the observation that upon treatment with calcium less recombinant synaptobrevin2 reacts with endogenous SNAREs.

2 Kurzfassung

Bei der regulierten Exocytose in Neuronen und neuroendokrinen Zellen führt ein intrazellulärer Anstieg der Calciumkonzentration zur *Core*-Komplexbildung zwischen den plasmamembranständigen SNAREs Syntaxin1A und SNAP-25 und dem vesikelassoziierten SNARE Synaptobrevin. Dadurch werden die gegenüberliegenden Membranen fusioniert. Neben den SNAREs ist auch Munc18-1, das zur Sec1/Munc18-Proteinfamilie gehört, ein essentielles Protein der neuronalen Exocytose. Der Munc18-1-*Knockout* führt zum Block der neuronalen Exocytose. *In vitro* bildet Munc18-1 mit Syntaxin1 einen Komplex, der Syntaxin1 in einer sogenannten geschlossenen Konformation hält. In diesem Komplex ist Syntaxin1 für Reaktionen mit SNAP-25 und Synaptobrevin2 unzugänglich, so dass keine *Core*-Komplexbildung mehr stattfinden kann. Wie diese Inhibition der *Core*-Komplexbildung mit der essentiellen Munc18-1-Funktion zusammenpasst ist bisher nicht verstanden.

In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass Munc18-1 in intakten und exocytosekompetenten Plasmamembranpräparationen von PC12-Zellen mit membrangebundenem Syntaxin1 einen Komplex bildet. Aus diesem Komplex heraus kann Munc18-1 durch Zugabe von rekombinantem Synaptobrevin2, welches *Core*-Komplexe mit den endogenen SNAREs bildet, gelöst werden. Wurde das Experiment unter gleichen Bedingungen, jedoch statt unter Zugabe von Synaptobrevin2 unter Zugabe von rekombinantem Syntaxin1A bzw. SNAP-25, die keine *Core*-Komplexe an der Membran bilden, durchgeführt, verblieb Munc18-1 an Syntaxin1 gebunden. Zur Kontrolle wurde dieses Experiment auch an Membranen von SNAP-25-defizienten Mäusen durchgeführt. Da hier grundsätzlich keine *Core*-Komplexbildung stattfindet, konnte, wie erwartet, keine Freisetzung von Munc18-1 durch Synaptobrevin2 beobachtet werden. Dies untermauert, dass in der nativen Membran Syntaxin1 trotz seiner Munc18-1-Bindung für die *Core*-Komplexbildung zur Verfügung steht und dass sich Munc18-1 nach dieser Komplexbildung von Syntaxin1 löst.

Daraus wird geschlossen, dass Munc18-1 die Bildung eines Komplexes zwischen Syntaxin1 und SNAP-25 erlaubt, der ein Akzeptor für vesikuläres

Synaptobrevin ist und somit ein Intermediat der Exocytose darstellt. Die Munc18-1-Syntaxin-Bindung könnte ein räumlicher und zeitlicher Regulator dieses Intermediates sein und die Bildung unproduktiver SNARE-Komplexe in der Plasmamembran verhindern.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde außerdem untersucht, ob sich eine Erhöhung der Calciumkonzentration auf den Zustand der SNAREs auswirkt, welche unter Ruhebedingungen unkomplexiert und in Mikrodomänen aufkonzentriert sind. Es konnte gezeigt werden, dass bei erhöhten physiologischen Calcium-Konzentrationen eine starke Abnahme der Antigenizität der SNAREs zu beobachten ist:

Für Syntaxin1 war bei gleichzeitiger Abnahme der Antigenizität eine gesteigerte Aufkonzentration in Domänen erkennbar. Für SNAP-25 wurde ein Abfall der Immunreaktivität um 90% beobachtet. Rekombinantes Synaptobrevin2 wurde deutlich schlechter in die Membran eingebaut.

Diese Erkenntnisse lassen folgende Interpretationen zu:

Durch Calcium kommt es zur Umorganisation von Syntaxin-Domänen.

Da das Epitop zur Anfärbung von SNAP-25 innerhalb dessen SNARE-Motivs liegt, könnte die starke Abnahme der Immunreaktivität den Einbau von SNAP-25 in Syntaxin-SNAP-25-Komplexe widerspiegeln. Dies wird dadurch untermauert, dass nach Calciumbehandlung weniger rekombinantes Synaptobrevin mit den endogenen SNAREs reagiert.

3 Einleitung

3.1 Die Biologie

Per Definition ist die Biologie (griechisch: bios = das Leben, logos = die Lehre) die Wissenschaft des Lebens. Basierend auf mikroskopischen Untersuchungen an Pflanzen und Tieren begründeten Matthias Schleiden und Theodor Schwann die Zelltheorie (Schleiden 1838; Schwann 1839). Sie besagt, dass die Zelle (lateinisch: cella = kleiner Raum) die kleinste, selbständige Einheit des Lebens ist und definiert, dass sie sowohl eine Struktur, als auch eine Funktionseinheit darstellt. Die Zelle ist der Baustein für Mehrzeller, Organe und ganze Organismen. Der menschliche Körper besteht aus etwa 10 Billionen (10^{13}) Zellen, die eine Vielzahl von Organen aufbauen. Die korrekte Abstimmung, Kommunikation, der Zellen innerhalb der Organe und die Abstimmung zwischen verschiedenen Organen ist für die Körperfunktion und damit für das Leben des Menschen essentiell.

3.2 Die Zell-Zell-Kommunikation

Das generelle Prinzip der Zell-Zell-Kommunikation ist, dass eine Zelle, die Senderzelle, ein Signal abgibt, die Zweite, die Empfängerzelle, dieses über einen Rezeptor empfängt und verarbeitet. Im Detail kann diese Kommunikation zwischen Zellen auf verschiedenen Weisen stattfinden.

Entweder findet die Signalleitung über einen direkten Zellkontakt, zum Beispiel über oberflächengebundene Signalmoleküle und Oberflächenrezeptoren, oder indirekt, durch Diffusion eines von der Senderzelle ausgeschütteten Botenstoffes und dessen Bindung an einen auf einer weiter entfernten Empfängerzelle lokalisierten Rezeptor, statt.

Der Vorgang der Botenstoffausschüttung wird Exocytose bezeichnet. Hierbei fusioniert ein intrazelluläres Organell mit der Plasmamembran und entleert seinen Inhalt. Signalmoleküle können dabei in sogenannten Vesikeln oder sekretorischen Granula gespeichert sein und freigesetzt werden.

Wenn die Diffusion des Botenstoffs nach der Exocytose nur lokal stattfindet, wird dieser Prozess Autokrin oder Parakrin genannt, je nachdem

ob die Sender und Empfängerzelle identisch sind oder unterschiedlichen Typus sind. Da diese Kommunikation für große und komplex aufgebaute Organismen wie dem Menschen nicht ausreicht, besitzen sie weitere Kommunikationswege. Zum Beispiel die neuroendokrine und die neuronale Signalleitung. In der neuroendokrinen Signalleitung werden die langen Strecken zwischen Sender- und Empfängerzelle durch den Botenstoff-Transport im Blutsystem überbrückt. Die Geschwindigkeit der Signalleitung ist nicht mehr diffusionsbeschränkt, sondern durch die Geschwindigkeit des Blutstroms bestimmt. Bei der zwischen Nervenzellen auftretenden neuronalen Signalleitung wird ein Großteil des Weges als elektrisches Signal in der Senderzelle beschränkt (siehe Abb. 1). Das Neuron besitzt ausgehend vom Zellsoma einen Fortsatz, Axon genannt, über den sich das elektrische Signal ausbreitet. Axone können im Menschen eine Länge von einem Metern erreichen. Im Axon wird das Signal, je nach Typ der Nervenfasern, mit einer Geschwindigkeit von zwischen 1-120 m/ Sek. fortgeleitet bis es die Synapse, die Nervenzellendigung erreicht (Nicholls, Martin et al. 1992). Dort wird das elektrische Signal in ein chemisches umgesetzt, was sich in der Exocytose von Botenstoffen in den synaptischen Spalt äußert. Der synaptische Spalt trennt zwei hintereinander geschaltete Nervenzellen. Der Botenstoff wird mit einer hohen Konzentration ausgeschüttet und die Distanz zur nachgeschalteten Membran ist gering, so dass selbst durch Diffusion im synaptischen Spalt das Signal innerhalb von weniger als einer Millisekunde den Rezeptor auf der Empfängerzelle erreicht. Die Nervenzellen können im Vergleich zu neuroendokrinen Zellen Signale schneller und präziser übermitteln, jedoch ist hierfür ihr Energiebedarf um ein Vielfaches höher.

3.3 Die regulierte Exocytose

Neben einer konstitutiven Exocytose, die für die Membranbiogenese oder den Aufbau der extrazellulären Matrix notwendig ist, existiert eine regulierte Exocytose, bei der erst auf ein Signal hin, zum Beispiel der Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration, der Botenstoff freigesetzt wird.

Lange Zeit galt es als sicher, dass neuroendokrine Zellen und Nervenzellen des sympathischen Systems, das die Organe des Körpers in Aktionsbereitschaft versetzen, von dem gleichen *Neural Crest* Zelltyp, somit vom gleichen Vorläufer abstammen. Dies scheint inzwischen als nicht mehr gesichert, da vermutlich unterschiedliche Subtypen von *Neural Crest* Zellen die entsprechenden Vorläufer darstellen (Unsicker, Huber et al. 2005). Auch wenn ihre Funktionen und eventuell Vorläuferzellen unterschiedlich sind, nutzen neuroendokrine Zellen und Neuronen teilweise die gleichen Proteine für die regulierte Exocytose (Scalettar 2006). Aus diesen Gründen werden häufig neuroendokrine Zellen zur Untersuchung neuronaler Prozesse bevorzugt, da von ihnen Zellkulturlinien, wie die in dieser Arbeit verwendete PC12-Zelllinie (Greene and Tischler 1976; Heumann, Kachel et al. 1983) existieren und sie einfacher in Kultur zu halten sind. Neben den genannten Gemeinsamkeiten gibt es jedoch auch Unterschiede zwischen der neuronalen Exocytose und der neuroendokrinen Exocytose. Zum Beispiel besitzen Neuronen für das Ausschütten von Botenstoffen hauptsächlich synaptische Vesikel, die einen Durchmesser von nur etwa 20-50 nm besitzen (Sudhof 2004). Im Gegensatz dazu besitzen neuroendokrine Zellen sekretorische Granula, im Durchmesser etwa 100 nm große Botenstoffspeicher (Morgan and Burgoyne 1997). Abgesehen von den unterschiedlichen Größen haben Granula und synaptische Vesikel unterschiedliche Lebenszyklen. Granula werden immer durch Abschnürung vom *trans*-Golgi-Netzwerk neu gebildet (Burgoyne and Morgan 2003), wogegen synaptische Vesikel das Produkt von verschiedenen Recyclingprozessen an der präsynaptischen Membran sind (Sudhof 2004) (siehe auch Abb. 2). Das lokale Recycling der synaptischen Vesikeln ist einleuchtend da die Vesikel sonst über die lange Distanz zwischen Zellsoma

und Synapse, dem Axon entlang, transportiert werden müssten. Der lange Transport würde den Nachschub mit Vesikeln verlangsamen, somit auch die synaptische Transmission beeinträchtigen. Ein weiterer Unterschied zwischen Granula und synaptischen Vesikeln betrifft ihren Inhalt. Synaptische Vesikel speichern nur kleine chemische Substanzen, Neurotransmitter, z.B. Acetylcholin oder Glutamat, wogegen Granula größere Neuropeptide, wie zum Beispiel Neuropeptid Y enthalten. Wie oben beschrieben, besitzen neuroendokrinen Zellen und Neuronen teilweise die gleichen Komponenten für die regulierte Exocytose. Bei Neuronen sind jedoch zusätzlich weitere Proteine mit zum Teil unbekanntem Funktionen involviert. Diese bilden zum Beispiel besondere Strukturen, *Active-Zones* genannt, an denen die synaptischen Vesikel mit der Plasmamembran fusionieren (Sudhof 2004). Möglicherweise ist die höhere Proteinorganisation in Neuronen auch der Grund, warum die Fusionsgeschwindigkeit der synaptischen Vesikel (~200 μ sek.) deutlich höher ist als die der Granula (im Millisekunden Bereich) (Morgan and Burgoyne 1997).

3.4 Die synaptische Transmission

Die neuronale Exocytose ist eine Zell-Zell-Kommunikation die über die Plasmamembran verläuft und stellt, wie oben beschrieben (Kap. 3.3, S. 7), einen Spezialfall der Exocytose dar. Sie dient der Übermittlung eines Signals zwischen zwei Nervenzellen, auch synaptische Transmission genannt (siehe Abb. 1 und Abb. 2). Am Soma einer Nervenzelle, im Axonhügel, werden die über Dendriten empfangenen Signale vorgeschalteter Nervenzellen, die auf das neuronale Membranpotential wirken, integriert. Nach dem Alles-oder-Nichts-Prinzip, wenn ein bestimmter Schwellenwert überschritten wird, entsteht ein Aktionspotential, das eine Umpolung des Ruhepotentials darstellt. Das Aktionspotential wird über das Axon zur präsynaptischen Membran weitergeleitet. Dort führt das Aktionspotential zu einer Öffnung spannungsabhängiger Calcium-Kanäle. Durch diese kommt es zum Calciumeinstrom, zur Erhöhung der freien Calciumkonzentration und dadurch zur Fusion der fusionskompetenten synaptischen Vesikel mit der Plasmamembran an der *Active-Zone*. Bei der

Fusion wird der Transmitter in den synaptischen Spalt ausgeschüttet. Das Vesikel kann anschließend über verschiedene Wege recycelt werden (siehe Abb. 2; (Sudhof 2004)). Der in den synaptischen Spalt freigesetzte Botenstoff erreicht die postsynaptische Plasmamembran. Dort bindet er an einen Rezeptor, der entweder ionotroph oder metabotroph ist, somit direkt oder indirekt für einen Ionenein- oder Ionenausstrom sorgt und das Membranpotential depolarisiert oder hyperpolarisiert.

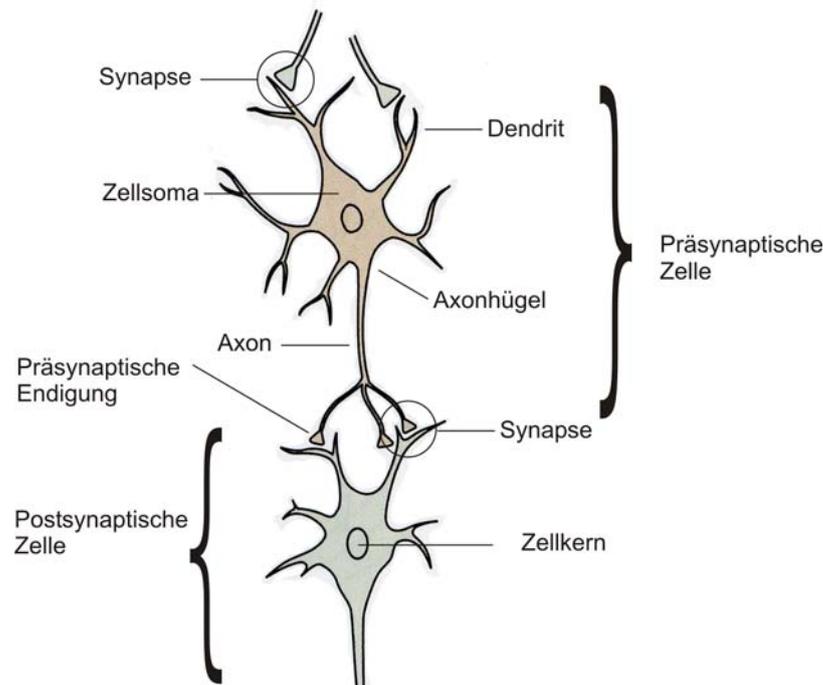


Abb. 1 Schematische Darstellung einer synaptischen Verschaltung zweier Neurone

Ein Neuron besitzt ein Zellsoma, in dem sich der Zellkern befindet. Reize von einer präsynaptischen Zelle werden an der Synapse mit der postsynaptischen Zelle übermittelt. Hier kommen die präsynaptische Endigung und der Dendrit einander nahe und werden nur noch durch den synaptischen Spalt von einander getrennt. Membranpotentialänderungen am Dendriten durch präsynaptischen Reiz werden am Axonhügel integriert. Bei Überschreiten eines Schwellwertes wird dort das Aktionspotential ausgelöst, das am Axon entlang wandert und an der synaptischen Endigung zur Ausschüttung von Botenstoffen führt. Abbildung modifiziert nach (Kandel, Schwartz et al. 2000).

Dieses Signal läuft in Richtung Soma, wo es am Ende des Axonhügels wieder integriert wird und sich somit der Kreislauf schließt. Der Botenstoff wird im synaptischen Spalt entweder hydrolysiert oder über Transporter wieder in die Präsynapse aufgenommen. In der Präsynapse wird der Transmitter über einen Transporter, der in der Membran des synaptischen Vesikels sitzt, in dem Vesikel gespeichert (siehe Abb. 2). Bevor die gefüllten Vesikel mit der Plasmamembran fusionieren können, müssen sie

nahe an der *Active-Zone* gedockt und dann im *Priming*-Schritt fusionsbereit gemacht werden. Bei Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration kommt es zur Ausschüttung des Neurotransmitters. Über die in Abb. 2 dargestellten Mechanismen werden die synaptischen Vesikel recycelt.

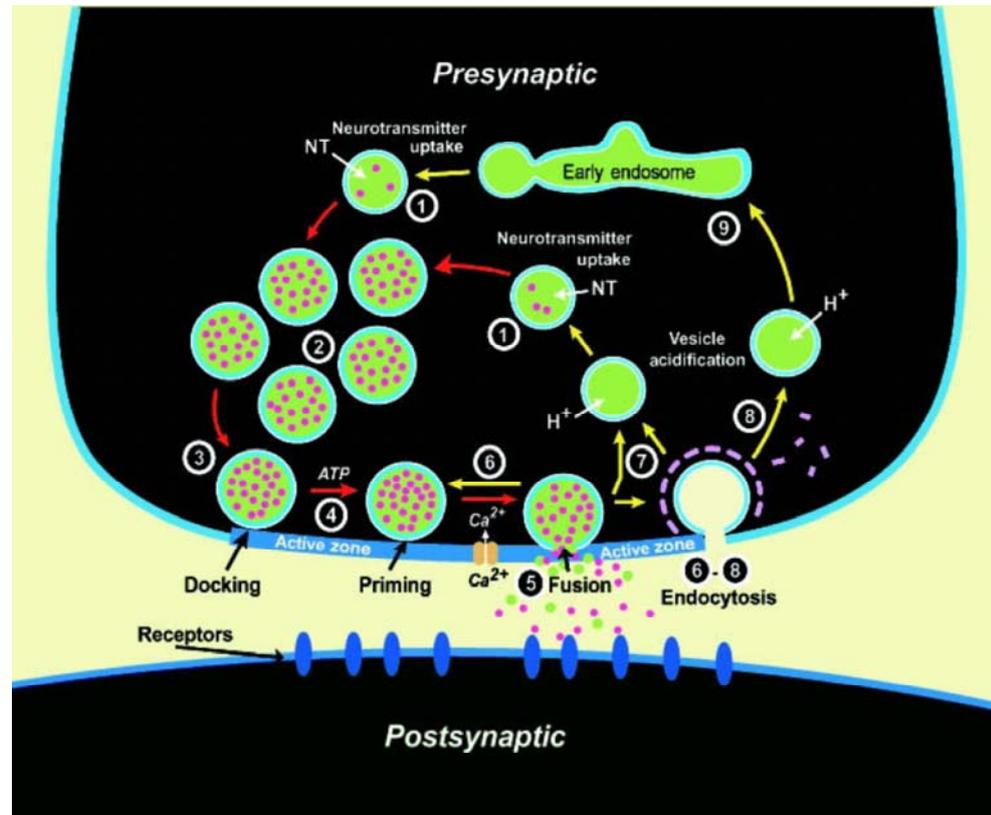


Abb. 2 Synaptischer Vesikel Zyklus

Die synaptischen Vesikel werden mit Neurotransmitter befüllt (1) und bilden ein Vesikel-Cluster, das möglicherweise einen Reservevorrat an Vesikeln darstellt (2). Gefüllte Vesikel können an der *Active-Zone* docken (3), wo sie durch die *Priming*-Reaktion (4) für die durch Calcium initiierte Bildung der Fusionspore (5), bei der der Neurotransmitter freigesetzt wird, vorbereitet werden. Nach der Öffnung der Fusionspore werden die Vesikel recycelt, wobei unterschiedliche Wege durchlaufen werden können: lokaler Wiedereinsatz (6), schnelles Recycling, ohne endosomale Beteiligung (7), Clathrin-vermittelte Endocytose (8) mit anschließendem Recycling über die Endosomen (9). Die Exocytoseschritte sind mit roten, die Endocytose und Recyclingschritte mit gelben Pfeilen markiert. Abbildung aus (Sudhof 2004).

3.5 Molekulare Ereignisse vor der Vesikelfusion an der Plasmamembran in der neuronalen Exocytose

Bevor es zur Fusion des synaptischen Vesikels mit der Plasmamembran kommen kann, muss das Vesikel zur *Active-Zone*, einer scheibenähnlichen Struktur an der präsynaptischen Membran (Akert, Moor et al. 1971), gelangen. Dort wird das Vesikel unter Beteiligung des Cytoskeletts gedockt (Hirokawa, Sobue et al. 1989; Harlow, Ress et al. 1998). Mit Hilfe eines

ATP-abhängigen *Priming*-Schritts, werden die Vesikel fusionskompetent (Rettig and Neher 2002; Martin 2003), so dass sie auf einen Calciumeinstrom hin fusionieren. Zur molekularen Erklärung des *Primings* existieren verschiedene Modelle. Eines wird hier vorgestellt.

Die Fusion der einander gegenüberstehenden Membranen, des Vesikels und der Plasmamembran ist energetisch ungünstig. Es bedarf der Beteiligung von Proteinen, um diese Energiebarriere zu überwinden. Diese Funktion wird den *Soluble N-ethylmaleimide Sensitive Factor (NSF) Attachment Protein Receptors* (SNAREs) zugeschrieben (Brunger 2005). Diese können unter einer exothermen Konformationsänderung energetisch stabile Komplexe bilden (Fasshauer, Bruns et al. 1997; Fasshauer, Antonin et al. 2002) und somit vermutlich die notwendige Energie aufbringen. Auf dem synaptischen Vesikel ist das SNARE Synaptobrevin2, auf der Plasmamembran sind die SNAREs SNAP-25 und Syntaxin1 lokalisiert. Anzunehmen ist, dass diese Proteine am Ende des *Primings* einen Komplex bilden, der das Vesikel nahe an die Plasmamembran zieht. Möglicherweise kommt es sogar schon zu einer beginnenden Fusion der Lipiddoppelmembranen (Jahn, Lang et al. 2003; Sudhof 2004). Vermutlich wird dieser SNARE-Komplex und das Intermediat der Lipid-Lipid-Fusion durch das Protein Complexin, das an den assemblierten SNARE-Komplex binden kann, stabilisiert (McMahon, Missler et al. 1995). Der Rezeptor für den Calciumeinstrom innerhalb der molekularen Maschinerie ist wahrscheinlich ein Protein der Synaptotagmin Familie, das zwei Calcium-Bindungsdomänen besitzt (Sudhof 2002). In Abwesenheit von Calcium kann es mit seinen Domänen vielleicht an das stabilisierte SNARE-Komplex-Intermediat binden. Nach einem Calciumeinstrom in die Zelle könnte sich Synaptotagmin vom Komplex lösen und calciumabhängig die Phospholipide der Plasmamembran binden. Dies könnte der Schritt sein, der das vorherige Intermediat destabilisiert und zur Fusion des Vesikels mit der Membran und zur Ausschüttung des Neurotransmitters führt (Sudhof 2004). Bevor es zur Bildung des Vesikels und des plasmamembranüberspannenden SNARE-Komplexes kommt, sind noch weitere Proteine am *Priming* des Vesikels beteiligt: zum Beispiel das kleine, vesikelgebundene, aktivierte GTPase-Protein Rab3a (Fischer von Mollard, Sudhof et al. 1991; Dobrunz

and Garner 2002) und sein großer (1553 AA lang), modular aufgebauter Bindungspartner RIM1 α (Wang, Okamoto et al. 1997). RIM könnte durch seine Interaktionen mit anderen Proteinen als Plattform für weitere *Priming*-Faktoren, wie zum Beispiel Munc13-1, dienen (Schoch, Castillo et al. 2002; Dulubova, Lou et al. 2005).

Munc18-1, nicht mit Munc13-1 zu verwechseln, ist ein essentielles Protein der neuronalen Exocytose, da sein Verlust zur Inhibition der Neurotransmitter-Ausschüttung führt (Verhage, Maia et al. 2000). Munc18-1 bindet an Syntaxin1 und scheint damit, zumindest *in vitro*, die Bildung des für das Vesikel-*Priming* notwendigen SNARE-Komplex zu inhibieren (Pevsner, Hsu et al. 1994; Yang, Steegmaier et al. 2000). Für eine Beteiligung von Munc18-1 im *Priming* spricht ebenfalls, dass in Neuronen der Munc18-1-Maus-*Knockout* die synaptischen Vesikel an der *Active-Zone* gedockt sind, jedoch nicht fusionieren können. (Für tiefer gehende Diskussion siehe Kap. 3.11, S. 22). Es wird in der Literatur häufig diskutiert, dass Munc18-1 vor Munc13-1 am Vesikel-*Priming* beteiligt ist. Als Beleg hierfür wird angeführt, dass Munc13-1 das Munc18-1 von dem Komplex mit Syntaxin1 verdrängen kann (Sassa, Harada et al. 1999) und selbst mit dem N-Terminus von Syntaxin einen Komplex bildet (Betz, Okamoto et al. 1997). Spekulationen besagen, dass dieser Munc13-1-Syntaxin1-Komplex die Bildung des für das *Priming* notwendigen SNARE-Komplex vereinfacht, da die bei genetischer Deletion des *C.elegans*-Homologs *unc-13* auftretenden Defekte durch die Überexpression von einer Syntaxin-Mutante verhindert werden können (Richmond, Weimer et al. 2001). Diese Mutante kann nicht mehr Munc18-1 binden und bildet effizienter SNARE-Komplexe (Dulubova, Sugita et al. 1999). Somit wäre nach diesem Modell die Aufgabe von Munc13-1, die SNARE-Komplexbildung zu vereinfachen, indem es Munc18-1 von Syntaxin entfernt.

Dieses vorgestellte Szenario ist nur eine Modell-Vorstellung, es muss bewusst bleiben, dass es derart vereinfacht Widersprüche hervorruft, zu dem existieren dem Modell widersprechende Veröffentlichungen.

Zum Beispiel erläutert das Modell nicht, warum Munc18-1 essentiell ist, wenn es *in vitro* die SNARE-Komplexbildung verhindert. Darüber hinaus

führt der Verlust von Munc18-1 in *murinen* chromaffinen Zellen zu einem Granula-Docking-, nicht *Priming*-Defekt (Voets, Toonen et al. 2001). Munc13-1 wird neuerdings nicht nur als *Docking*-Faktor, sondern auch als Faktor in der Vesikel-Fusion diskutiert (Madison, Nurrish et al. 2005) und seine Bindung an Syntaxin1 ist ebenfalls umstritten (Basu, Shen et al. 2005).

Im Folgenden sollen die Proteinfamilien der an der Vesikel-Fusion beteiligten SNARE-Proteine und von Munc18-1 vorgestellt und später im Detail auf die neuronalen Familienmitglieder zurückgekommen werden, da sie im Zentrum der vorliegenden Arbeit stehen.

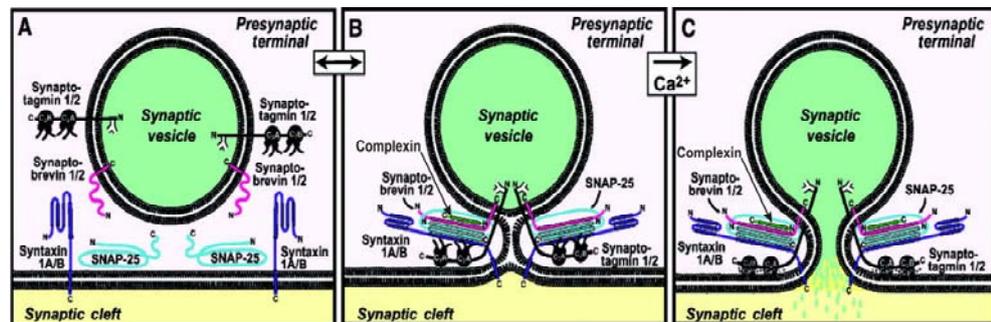


Abb. 3 Modell der letzten molekularen Ereignisse zur der Vesikelfusion

(A) Zustand des Vesikels nach dem *Docking*. Bisher sind die SNAREs, Syntaxin1A/B, SNAP-25 und Synaptobrevin noch nicht komplexiert. Synaptotagmin1/2 ist ebenfalls noch nicht an Interaktionen beteiligt. (B) In einem möglicherweise reversiblen Schritt bildet sich ein SNARE-Komplex, der eine Brücke zwischen dem Vesikel und der Plasmamembran schlägt, eventuell durch Complexin stabilisiert wird und an den Synaptotagmin bindet. Hierbei könnte schon eine teilweise Fusion der Membranen stattfinden. (C) Auf einen Calciumeinstrom hin, bindet Synaptotagmin an die Phospholipide der Plasmamembran, wodurch es zur mechanischen Destabilisierung des Zwischenzustandes kommt und er irreversibel in der vollständigen Fusion der beiden Membranen und der Neurotransmitterfreisetzung endet. Darstellung modifiziert nach (Sudhof 2004).

3.6 Die SNARE-Proteinfamilie

Einer Modellvorstellung nach, liefert die SNARE-Komplexbildung für viele intrazelluläre Membrantransportprozesse die notwendige Energie, die für die energetisch ungünstige Membran-Membran-Fusion notwendig ist (Jahn and Sudhof 1999). Daher sind die SNAREs im Zentrum vieler wissenschaftlicher Veröffentlichungen.

Die SNAREs bilden eine Proteinfamilie mit mindestens 37 Mitgliedern in Säugern (36 (Hong 2005), zuzüglich des kürzlich beschriebenen SNAREs SNAP-47 (Holt, Varoqueaux et al. 2006)) und mindestens 24 Mitgliedern in Hefe (Bock, Matern et al. 2001). Alle SNARE-Proteine besitzen mindestens

ein evolutionär konserviertes Motiv: das SNARE-Motiv. Dieses Motiv ist etwa 52 Aminosäuren lang (Hong 2005) und besteht aus einer achtfachen Wiederholung eines Motivs von sieben Aminosäuren, von denen die erste und die vierte Aminosäure hydrophob ist. Dieser Aufbau ist für 3-4 Helix *Coiled-Coil*-Komplexe charakteristisch (Burkhard, Stetefeld et al. 2001). Bei den SNAREs existiert eine Ausnahme dieser Regel, sie betrifft die vierte Wiederholung der Siebener-Sequenz. Hier ist die vierte Aminosäure nicht hydrophob, sondern polar. Je nachdem, ob sich hier ein Glutamin oder ein Arginin befindet, wird das SNARE-Protein als Q- (für Glutamin) oder R-(für Arginin) SNARE klassifiziert (Fasshauer, Sutton et al. 1998). Die meisten Säuger-SNAREs sind Transmembranproteine und mit einem C-terminalen Anker nahe dem SNARE-Motiv in die Lipiddoppelmembran integriert (betrifft 31 der 37 humanen SNAREs (Hong 2005)). Die verbleibenden SNAREs sind meistens über Prenylierung oder Palmitoylierung an die Membran gekoppelt und besitzen zwei SNARE-Motive (Hong 2005). Als Monomere sind lösliche SNARE-Motive unstrukturiert (Jahn, Lang et al. 2003).

3.7 Die SNARE-Komplexbildung

In den meisten intrazellulären Membranfusionsschritten, abgesehen von Peroxisomen- und Mitochondrienfusion (Jahn, Lang et al. 2003), sind SNAREs beteiligt und auf den beiden einander gegenüberliegenden Membranen anwesend. Ihre Komplexbildung ist vermutlich die treibende Kraft in der Membranfusion (Jahn and Sudhof 1999). Dabei bilden vier SNARE-Motive von SNARE-Proteinen, die auf einander gegenüberliegenden Membranen lokalisiert sind, ein Vierhelixbündel (siehe Abb. 4A und Abb. 6, Schritt 4-6). Evolutionär ist es so, dass immer drei Q-SNAREs und ein R-SNARE in der Komplexbildung involviert sind (Hong 2005). Die Positionen der Q- und R-SNARE-Motive im Komplex sind festgelegt und spiegeln sich auch in der Aminosäuresequenz wider, weshalb durch *Alignments* die Q-SNARE-Familie in drei Untergruppen, Qa, Qb und Qc geteilt wurde (Fasshauer, Sutton et al. 1998). Nach dem *Zippering*-Modell (Hanson, Heuser et al. 1997) ordnen sich die in der Komplexbildung

beteiligten vier SNARE-Motive zunächst vom N-Terminus ausgehend parallel zueinander an und verschnüren sich zum C-Terminus hin, wie ein Reißverschluss, wobei die Membranen zueinander gezogen werden (Hanson, Heuser et al. 1997; Sorensen, Wiederhold et al. 2006). Die konservierten Aminosäuren von je einem SNARE-Motiv formieren sich einander gegenüberstehend, in einer Ebene rechtwinklig zur Achse des SNARE-Komplexes (siehe Abb. 4B). So bilden sich 16 sogenannte *Layer* (von -7 bis +8 nummeriert) im SNARE-Komplex, wobei von jedem *Heptad-Repeat* zwei Aminosäuren zu je einem *Layer* beitragen. Die zentrale Ebene im Komplex, der sogenannte *Zero-Layer*, wird durch polare Aminosäuren gebildet, wohingegen die Übrigen aus hydrophoben Aminosäuren bestehen (Sutton, Fasshauer et al. 1998).

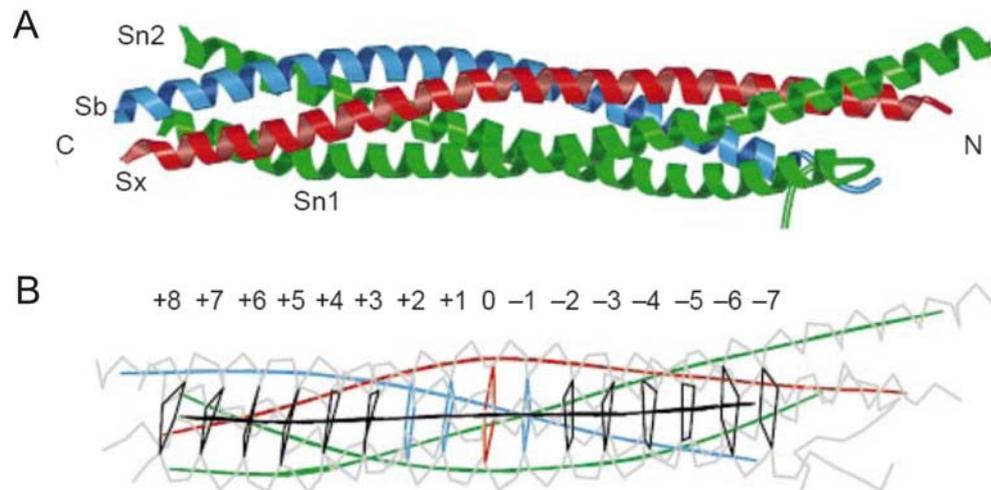


Abb. 4 Kristallstruktur des neuronalen SNARE-Komplexes

(A) Kristallstruktur des zuerst kristallisierten, neuronalen SNARE-Komplexes (Sutton, Fasshauer et al. 1998): Die Helizes von Synaptobrevin 2 (Sb, blau), Syntaxin 1A (Sx, rot), N-terminaler (Sn1, grün) und C-terminaler Hälfte von SNAP-25A (Sn2, grün) sind dargestellt. N bezeichnet den N-Terminus und C den C-Terminus der SNAREs. (B) Die *Layer*-Struktur des neuronalen SNARE-Komplexes: Die 15 hydrophoben *Layers* sind in blau und schwarz dargestellt, der hydrophile *Zero-Layer* ist in rot gezeigt. Die Zahlen bezeichnen die einzelnen Schichten.

Der anfangs zwei Membranen überspannende SNARE-Komplex wird *trans*-Komplex genannt. Nach Fusion der Membranen befinden sich die Transmembrandomänen und Palmitoyl-Anker aller SNAREs auf derselben Membran. Daher wird der Komplex nun *cis*-Komplex genannt. Der vollständig assemblierte SNARE-Komplex ist energetisch sehr stabil (Fasshauer, Antonin et al. 2002). Zum Zerlegen dieses Komplexes wird NSF und sein Co-Faktor α -SNAP benötigt (Sollner, Bennett et al. 1993).

Dies geschieht unter ATP-Verbrauch im NSF. Anschließend liegen die SNAREs wieder als Monomere vor.

3.8 Die SNAREs in der neuronalen Exocytose

In der neuronalen Exocytose ist Syntaxin1A das Qa-, Synaptobrevin das R- und SNAP-25 gleichzeitig Qb- und Qc-SNARE (es besitzt zwei SNARE-Motive). Deren Aufbau ist in Abb. 5 dargestellt. Dass sie in der neuronalen Exocytose essentiell sind, wird unter anderem dadurch deutlich, dass Neurotoxine, die sie spezifisch schneiden (siehe auch Abb. 5), zum Stillstand der neuronalen Exocytose führen (Schiavo, Benfenati et al. 1992; Blasi, Chapman et al. 1993; Sadoul, Lang et al. 1995; Schiavo, Matteoli et al. 2000).

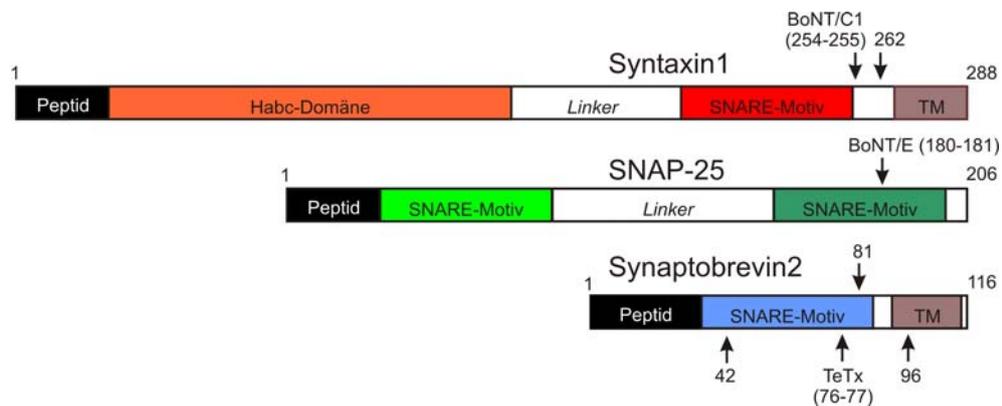


Abb. 5 Übersicht über den Aufbau der humanen neuronalen SNAREs

Syntaxin1A ist 288 Aminosäuren lang. Es besitzt ein *Sorting-Peptide* (AA1-28), gefolgt von einer Domäne, die ein drei-alpha-helikales Bündel bildet (AA 29-151). Dieses Bündel wird durch einen *Linker* mit dem SNARE-Motiv (AA 202-254), verbunden an dem sich die Transmembrandomäne anschließt. SNAP-25 besitzt ebenfalls ein kurzes *Sorting-Peptide* (AA 1-28), woran sich das erste SNARE-Motiv anschließt, gefolgt von dem *Linker* (AA 82-149), der die Palmitoylierungsstellen enthält. Abgeschlossen wird das Protein von dem zweiten SNARE-Motiv (AA 150-202) und vier weiteren Aminosäuren. Synaptobrevin besitzt neben dem SNARE-Motiv nur eine kurze, N-terminale Sequenz (AA 1-33), die vermutlich für die richtige Lokalisation in der Zelle sorgt (Hong 2005). Es folgen SNARE-Motiv und Transmembrandomäne (TM). Domäneneinteilung nach (Hong 2005). Die Zahlen über- oder unterhalb der SNAREs sollen Aminosäurepositionen markieren. Die Länge und die Struktur der in dieser Arbeit benutzten rekombinanten neuronalen SNAREs kann dadurch ersehen werden. Ebenso sind die Schnittstellen der clostridialen Neurotoxine Botulinum C1: BoNT/C1, Botulinum E: BoNT/E und Tetanus: TeTX eingezeichnet.

Diesen SNAREs wird daher in der Fusion der synaptischen Vesikel mit der Plasmamembran eine zentrale Rolle zugeschrieben. Nach dem *Docking* und *Priming* der synaptischen Vesikel an der Membran, kommt es in einem

nächsten Schritt zur Calcium-initiierten Fusion (siehe Kap. 3.5, S. 10). Dabei sind Syntaxin1A und SNAP-25 vor allem an der Plasmamembran und Synaptobrevin auf den synaptischen Vesikeln lokalisiert. Syntaxin1A und Synaptobrevin2 sind Transmembranproteine, die ein SNARE-Motiv beinhalten. SNAP-25 ist mit vier Palmitoyl-Ankern an der Plasmamembran verankert. Wenn die vier SNARE-Motive dieser drei Proteine zusammenfinden, strukturieren sie sich alpha-helikal und bilden unter Energiefreisetzung das oben beschriebene parallele Vierhelix-Bündel und ziehen dabei die einander gegenüber stehenden Membranen zusammen (siehe Abb. 6).

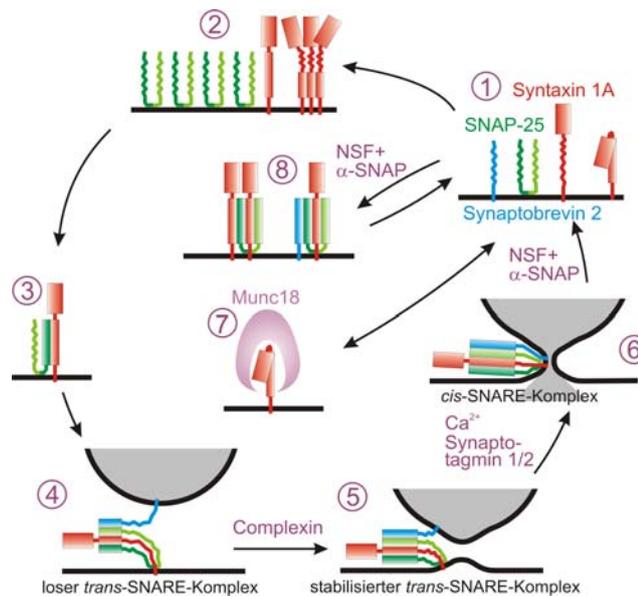


Abb. 6 Der neuronale SNARE-Zyklus

In der neuronalen Exocytose sind die SNAREs Syntaxin, SNAP-25 und Synaptobrevin beteiligt (1). Syntaxin kann zwischen einer offenen und geschlossenen Konformation wechseln. In der Plasmamembran liegen die SNAREs meist in Domänen vor (2), können aber auch unproduktive Komplexe bilden (8), bei denen ein SNAP-25 entweder mit zwei Syntaxinen (links) oder mit einem Syntaxin und einem Synaptobrevin reagiert (rechts). Diese Komplexbildung verläuft über ein reaktives Intermediat (3), das auch zur SNARE-Komplexbildung mit vesikulärem Synaptobrevin benötigt wird (4), bei der sich zunächst ein loser *trans*-SNARE-Komplex und später, eventuell mit Complexin, ein stabiler *trans*-Komplex bildet (5). Durch Calcium und Synaptotagmin1/2 kommt es zur *cis*-Komplexbildung, begleitet von der Fusion des Vesikels und der Transmitterfreisetzung (6). Die *cis*-SNARE-Komplexe, wie auch die unproduktiven Komplexe (8) müssen durch NSF und α -SNAP disassembliert werden, damit die SNAREs wieder wie in (1) vorliegen. Munc18 bindet an die geschlossene Konformation von Syntaxin (7). Für die Exocytose ist Munc18 essentiell, seine Rolle im Zyklus aber nicht verstanden. Abbildung in Anlehnung an (Jahn, Lang et al. 2003).

Die neuronalen SNAREs bilden einen besonders stabilen SNARE-Komplex, den *Core*-Komplex, der nicht durch SDS zerlegt werden kann. Hier ist eine

zusätzliche Erhitzung auf 90° C notwendig (Fasshauer, Bruns et al. 1997). *In vitro* kann sich nicht nur der *Core*-Komplex bilden. Hier kann sich auch ein 2:1 Komplex zwischen zwei Syntaxin Proteinen und einem SNAP-25 bilden (Fasshauer, Bruns et al. 1997; Fasshauer and Margittai 2004). Die Bildung dieses 2:1 Komplexes verlangsamt die *in vitro* beobachtete SNARE-Komplexbildung von löslichen SNAREs bzw. die SNARE-vermittelte Fusion von Liposomen, da sie der *Core*-Komplexbildung gegenläufig ist (Fasshauer and Margittai 2004).

3.9 Die Organisation der SNAREs in der Plasmamembran

Wie auch andere Proteine (Jacobson, Sheets et al. 1995), sind die SNAREs in der Plasmamembran in Mikrodomänen organisiert (Lang, Bruns et al. 2001; Chamberlain and Gould 2002; Ohara-Imaizumi, Nishiwaki et al. 2004; Predescu, Predescu et al. 2005; Low, Vasanthi et al. 2006; Yang, Xu et al. 2006). Die SNARE-Mikrodomänen liegen in einer zu hohen Dichte vor, um sie mit konventioneller Lichtmikroskopie aufzulösen (Sieber, Willig et al. 2006). In diesen Domänen scheinen die SNAREs meist nicht in *Core*-Komplexen vorzuliegen, da sie ohne Vorbehandlung mit NSF und α -SNAP mit rekombinanten SNAREs zu *Core*-Komplexe reagieren (Lang, Margittai et al. 2002). Syntaxin1A wird vermutlich über sein SNARE-Motiv in Mikrodomänen organisiert (Sieber, Willig et al. 2006). *In vitro* wurde auch eine Homo-Dimerisierung von Synaptobrevin und Syntaxin1A über die Transmembrandomäne beobachtet (Laage, Rohde et al. 2000; Kroch and Fleming 2006). In mehreren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass an den Granula-*Docking*-Stellen Granula mit Syntaxin- (Lang, Bruns et al. 2001), SNAP-25 (Ohara-Imaizumi, Nishiwaki et al. 2004) und Munc18-1 (Tsuboi and Fukuda 2006) kolokalisiert sind. SNAREs sind also an den exocytoseaktiven Stellen der Plasmamembran konzentriert.

3.10 Die Sec1/Munc18-Proteinfamilie

Die Mitglieder der Sec1-Munc18 (SM)-Proteinfamilie sind absolut essentielle Faktoren in Membranfusionsschritten, an denen Proteine der SNARE-Familie beteiligt sind. Jeder Membranfusionsschritt benötigt die

Anwesenheit eines bestimmten SM-Homologs. Bei Fehlen des entsprechenden SM-Homologs durch *Knockout* oder bei Mutation dieser Proteine, so dass sie ihre Funktion verlieren, ist der entsprechende Membranfusionsschritt absolut blockiert. Für den Organismus hat dies dramatische Konsequenzen. Der *Knockout* des neuronalen SM-Homologs Munc18-1 führt zu inaktiven Synapsen, die keine Transmitter mehr freisetzen können. Dadurch kommt es zur Degeneration des Gehirns, die zum Tode der homozygoten Maus-Embryonen nach ihrem Wurf führt (Verhage, Maia et al. 2000). Auch in anderen Organismen, wie zum Beispiel *C.elegans* (Brenner 1974), Hefe (Schekman and Brawley 1979) und *Drosophila* (Harrison, Broadie et al. 1994) inhibiert der Verlust des SM-Homologs die Membranfusion. Aber die genaue Funktion der SM-Proteine wurde noch nicht erfolgreich erforscht.

Die Proteine der SM-Familie sind alle zwischen 650 und 700 Aminosäuren lang (Jahn and Sudhof 1999) und scheinen in ihrer V-förmigen Struktur konserviert zu sein (Misura, Scheller et al. 2000).

Es wird angenommen, dass ihre Interaktion mit den SNAREs – meistens mit einem Qa-SNARE (Syntaxin-Homolog) – ihre essentielle Funktion ausmacht. Dies wird dadurch untermauert, dass zwischen SM-Proteinen und dem entsprechenden Syntaxin-Homolog eine genetische Interaktion zu existieren scheint. Denn bei der Reduktion des SM- oder SNARE-Protein-*Levels* wird auch der Expressionsspiegel des korrespondierenden Bindungspartners reduziert (Verhage, Maia et al. 2000; Bryant and James 2001; Voets, Toonen et al. 2001; Yang, Coker et al. 2001; Weimer, Richmond et al. 2003; Kanda, Tamori et al. 2005).

Da die Bindung zwischen den SM-Homologen und den SNAREs nicht einheitlich zu sein scheint und verschiedene Bindungsmodi postuliert wurden (siehe Abb. 7 und (Toonen and Verhage 2003)), ist es schwer möglich trotz struktureller Ähnlichkeit einen gemeinsamen Mechanismus in der SNARE-Komplexbindung anzunehmen.

Die Homologe Munc18-1,-2,-3, und Unc18 sind an der Exocytose beteiligt. Sie binden an die *Closed-Conformation* des Syntaxin-Homologs, dass dadurch in einer Lücke im Munc18-Protein zuliegen kommt. Hier ist die N-terminale Domäne von Syntaxin auf das SNARE-Motiv zurückgefaltet,

so dass es nicht mehr für Interaktionen mit den anderen SNARE zugänglich zu sein scheint (Misura, Scheller et al. 2000; Yang, Steegmaier et al. 2000). Diese Homologe können nicht an Syntaxin im assemblierten *Core*-Komplex binden (Yang, Steegmaier et al. 2000).

Auf der anderen Seite wurde für die Homologe Sly1p und Vps45p berichtet, dass sie nur an ein N-terminales Peptid des Syntaxin-Homologs binden (Bracher and Weissenhorn 2002; Yamaguchi, Dulubova et al. 2002). Mit dieser Bindung können die beiden SM-Homologe auch dann binden, wenn es im SNARE-Komplex vorliegt (Bryant and James 2003). Die Bindung von Sly1p und Vps45p scheint sogar die Spezifität und die Geschwindigkeit der SNARE-Komplexbildung zu erhöhen (Kosodo, Noda et al. 2002; Peng and Gallwitz 2002). Neuerdings wird jedoch diskutiert, ob diese N-terminale Bindung funktionell relevant ist, da Mutanten von Sly1p, die diese Bindung nicht mehr vermögen, trotzdem den *Knockout* von *sly1* retten (Peng and Gallwitz 2004). In dieser und einer weiteren Arbeit (Li, Gallwitz et al. 2005) konnten neue, schwache Interaktionen mit SNAP-25-Homologen gezeigt werden, die neue Aspekte einer SNARE-vermittelten Funktion eröffnen.

In einer dritten Gruppe von Studien wurde die Bindung von dem Hefe-Homolog Sec1p untersucht. Zunächst wurde nur eine Bindung von Sec1p an den voll assemblierten SNARE-Komplex beschrieben (Carr, Grote et al. 1999; Grote, Carr et al. 2000). Hier wurde eine Funktion nach der Komplexbildung postuliert. Eine neuere Arbeit zeigte jedoch (Scott, Van Komen et al. 2004), dass Sec1p, wenn auch schwach, an das monomere Syntaxin-Homolog und stark an einen 1:1 Komplex zwischen dem Syntaxin- und SNAP-25-Homolog binden kann. In derselben Arbeit wurde gezeigt, dass im Liposomenfusions-Assay, bei dem mit SNAREs rekonstituierte Liposomen zur Fusion gebracht werden, rekombinantes Sec1p die SNARE-vermittelte Fusion erhöht. Dies impliziert eine Funktion vor der SNARE-Komplexbildung.

Diese Gegenüberstellung von Veröffentlichungen zu verschiedenen SM-Homologen verdeutlicht, dass es trotz hoher Strukturhomologie keine einheitliche Bindung zu den SNARE-Proteinen und keine einheitliche SM-Proteinfunktion zu geben scheint.

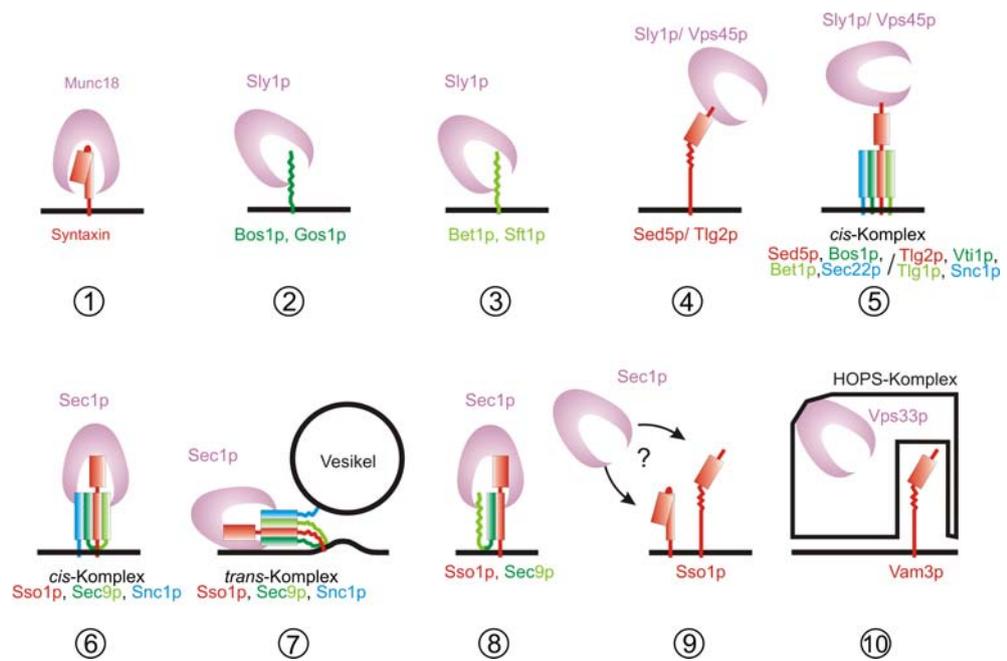


Abb. 7 Übersicht über die verschiedenen Bindungsmodi von SM-Proteinen an die SNAREs

Munc18 Homologe binden an die geschlossene Konformation von Syntaxin (1) (Misura, Scheller et al. 2000). Sly1p kann an das SNARE-Motiv von Qb- (2) und Qc- (3) SNAREs binden (Peng and Gallwitz 2004). Sly1p und Vps45p können an das N-terminale Peptid des Syntaxin-Homologs binden (4) (Dulubova, Yamaguchi et al. 2002; Yamaguchi, Dulubova et al. 2002). Diese Bindung erlaubt die SNARE-Komplexbildung (5) (Peng and Gallwitz 2002). Sec1p kann an den SNARE-Komplex binden (Carr, Grote et al. 1999). Es ist nicht geklärt, ob dies der *cis*- (6) oder *trans*-Komplex (7) ist. Sec1p kann ebenfalls an das Intermediat in der Reaktion zum SNARE-Komplex, dem 1:1 Komplex zwischen Syntaxin und SNAP-25 Homolog, binden (8) (Scott, Van Komen et al. 2004). Eine direkte Bindung des Qa-SNAREs wurde ebenfalls beschrieben (9) (Scott, Van Komen et al. 2004). Es ist nicht geklärt, ob dies wie in (1) oder (4) verläuft. In der Vakuolenfusion bindet das SM-Homolog nicht direkt, sondern als Teil des HOPS-Komplex an das Qa-Homolog (10) (Sato, Rehling et al. 2000). Wie der HOPS-Komplex Vam3p bindet, ist noch nicht bekannt. Die Proteine wurden wie in (Jahn, Lang et al. 2003) dargestellt. Die Farbkodierung ist ebenfalls identisch: rot: Qa-, dunkelgrün: Qb-, hellgrün: Qc- und blau: R-SNARE, violett: SM-Homolog. Sec9p besitzt sowohl ein Qb-, als auch ein Qc-SNARE-Motiv, daher ist sein Name in dunkel- und hellgrün dargestellt.

3.11 Das Homolog der neuronalen Exocytose, Munc18-1

Das SM-Homolog der neuronalen Exocytose, Munc18-1, ist das Mitglied der SM-Proteinfamilie, an dem besonders intensiv geforscht wurde. Jedoch ist seine Beteiligung in der neuronalen Exocytose nicht verstanden und die Interpretation der experimentellen Ergebnisse im Vergleich zu den anderen SM-Homologen am widersprüchlichsten (wie auch oben schon erwähnt, Kap. 3.5, S. 10).

Munc18-1 bindet neben dem neuronalen Qa-SNARE Syntaxin1A zusätzlich die Homologe der konstitutiven Exocytose Syntaxin2 und -3 (Tellam, McIntosh et al. 1995). Daneben interagiert es mit anderen Proteinen, wie zum Beispiel Mint (Okamoto and Sudhof 1997; Schutz, Zilly et al. 2005) oder Granuphilin (Coppola, Frantz et al. 2002), mit denen es eventuell am Transport von Granula oder deren Docking beteiligt ist (Butz, Okamoto et al. 1998; Setou, Nakagawa et al. 2000; Tsuboi and Fukuda 2006). Es scheint jedoch die Bindung zu Syntaxin1A zu sein, die für die Rolle von Munc18-1 in der neuronalen Exocytose von besonderer Bedeutung ist, da Munc18-1-Mutanten, die *in vitro* eine reduzierte Bindung zu Syntaxin1A zeigen, *in vivo* zu einem veränderten Exocytoseprofil führen (Harrison, Broadie et al. 1994; Schulze, Littleton et al. 1994; Wu, Littleton et al. 1998; Fisher, Pevsner et al. 2001; Graham, Barclay et al. 2004; Schutz, Zilly et al. 2005).

Munc18-1 bindet mit hoher Affinität (~6 nM) an den cytoplasmatischen Teil von Syntaxin1A (Pevsner, Hsu et al. 1994)). Trotz der starken Wechselwirkung und des 20fachen Überschusses von Syntaxin1A (Schutz, Zilly et al. 2005), dem potentiellen Bindungspartner an der Plasmamembran, ist Munc18-1 in der Zelle nicht vollständig an die Membran gebunden (Schutz, Zilly et al. 2005). Im Munc18-1-Syntaxin1A-Komplex interagieren die beide Proteine über Aminosäurereste, die über die beiden Moleküle verteilt sind. Kristallographisch wurde die Struktur dieses Syntaxin1A-Munc18-1 Komplexes gelöst (Misura, Scheller et al. 2000). Wie in Kap. 3.10 vorgestellt, scheint Munc18-1 das Syntaxin1A in einer Konformation zu umklammern, in der der Syntaxin N-Terminus auf das SNARE-Motiv zurückgefaltet ist. Diese sogenannte geschlossene Konformation des Syntaxins könnte den Befund erklären, dass *in vitro*

Munc18-1 die SNARE-Komplexbildung verhindert. Zum Beispiel verhindert rekombinantes Munc18-1 durch seine Bindung an Syntaxin1A *in vitro* die Core-Komplexbildung mit Synaptobrevin und SNAP-25 (Yang, Steegmaier et al. 2000) und die Zugabe von Munc18-1 reduziert die Menge an Syntaxin1A-SNAP-25 Komplexen (Pevsner, Hsu et al. 1994). *In vitro* konnte keine Munc18-1 Bindung an den Core-Complex nachgewiesen werden (Yang, Steegmaier et al. 2000), wie es für das Hefe-Homolog Sec1p der Fall ist (Carr, Grote et al. 1999). Für die SNARE-Komplexbildung muss das SNARE-Motiv von Syntaxin zugänglich sein. Dafür muss Syntaxin die offene Konformation annehmen. An diese offene Konformation von Syntaxin bindet Munc18-1 nicht (Dulubova, Sugita et al. 1999). Auf Grund dieser Befunde wurde dem SM-Homolog Munc18-1 in der Literatur während der Exocytose zunächst eine inhibierende Rolle zugeschrieben (Halachmi and Lev 1996).

Dieser Interpretation widerspricht jedoch die Tatsache, dass *in vivo* der Verlust von Munc18-1, ROP1 und Unc18 durch *Knockout* in der Maus, *Drosophila* und *C.elegans* zum kompletten Verlust der Botenstofffreisetzung führt (Hosono, Sassa et al. 1987; Harrison, Broadie et al. 1994; Verhage, Maia et al. 2000). Bei einer inhibitorischen Rolle von Munc18-1 wäre bei seinem Verlust ein Anstieg der Exocytose zu erwarten gewesen. Darüber hinaus reduziert die starke Überexpression von Munc18-1 in den meisten Fällen nicht die Exocytose (Graham, Sudlow et al. 1997; Fisher, Pevsner et al. 2001; Voets, Toonen et al. 2001; Tsuboi and Rutter 2003; Graham, Barclay et al. 2004) (Schutz, Zilly et al. 2005). Für eine Ausnahme siehe (Schulze, Littleton et al. 1994).

Die bisherigen Untersuchungen haben zu keinem einheitlichen Bild der Munc18-1-Funktion in der neuronalen Exocytose geführt. Dies liegt möglicherweise an der Wahl des experimentellen Ansatzes. Die meisten *in vitro* Experimente wurden mit den cytosolischen Teilen der SNAREs durchgeführt. Diese könnten sich anders zu Munc18-1 verhalten, als SNAREs, die in der Plasmamembran integriert sind und in ihrer natürlichen Organisation vorliegen. Auf der anderen Seite sind *in vivo* Experimente sehr komplex und schwer zu interpretieren. Manipulationen beeinflussen nicht nur die gewünschten Proteine, sondern auch deren Interaktions-Netzwerk.

Ein ideales System zur Untersuchung der SNAREs sowie an diesen assoziierter Proteine, ist der *Membrane-Sheet-Assay*. Er kombiniert Vorteile von *in vivo* und *in vitro* Ansätzen. Dieser *Assay* soll im Folgenden vorgestellt werden.

3.12 Der *Membrane-Sheet-Assay*

Beim *Membrane-Sheet-Assay* wird eine schnelle und reine Präparation der basalen Plasmamembran hergestellt (siehe Abb. 8, (Lang 2003). Dabei werden Zellen kurzzeitig mechanischen Scherkräften ausgesetzt. Diese werden entweder durch einen Ultraschallimpuls (Heuser and Reese 1981), wie auch in der hier vorgelegten Arbeit benutzt, durch einen Wasserstrahl (Vacquier 1975) oder durch mechanisches Aufreißen von zwischen zwei Deckgläsern klebenden Zellen erzeugt (Rutter, Bohn et al. 1986). Diese Techniken wurden schon in den siebziger Jahren entwickelt (Clarke, Schatten et al. 1975; Mazia, Schatten et al. 1975). So hergestellte *Membrane-Sheets* wurden hauptsächlich in elektronenmikroskopischen Untersuchungen verwendet. Erst seit Beginn der neunziger Jahre (Fujimoto, Lee et al. 1991), und verstärkt zum Ende dieser Dekade, mit Einführung von digitalen Kameras, wurden sie in der Fluoreszenzmikroskopie für quantitative Analysen verwendet.

Der Vorteil dieser Technik ist, dass sie einen schnellen und direkten Zugang zu Membranproteinen bietet, die in ihrer natürlichen Umgebung und Organisation verbleiben. Durch die annähernde Zweidimensionalität des Präparates können Untersuchungen mit der Epifluoreszenzmikroskopie erfolgen, ohne dass Strahlung von anderen Bildebenen mit aufgenommen wird, die die nachfolgende Bildanalyse stört. So ist eine quantitative Analyse der Fluoreszenzaufnahmen möglich.

Ein weiterer Vorteil ist, dass Membranproteine oder daran assoziierte Proteine, wie zum Beispiel Munc18-1 oder CAPS, die bei einer Ganzzellfärbung an der Membran schlecht nachweisbar sind (Grishanin, Klenchin et al. 2002; Martin and Grishanin 2003; Schütz 2003), mit dieser Technik repräsentativ dargestellt werden können.

Mit diesem System kann die Exocytose und die an ihr beteiligten Proteine untersucht werden. Es wurde gezeigt, dass an den *Membrane-Sheets* von PC12-Zellen Granula gedockt bleiben, die mit Calcium zur Fusion gebracht werden können (Avery, Ellis et al. 2000; Holroyd, Lang et al. 2002). Dieser Prozess kann *online* verfolgt werden, wenn die Granula zum Beispiel mit einem GFP-markierten Peptidhormon gefüllt sind.

Nach Fixierung der Membran kann immuncytochemisch die Verteilung von Membranproteinen oder von daran assoziierten Proteinen untersucht werden. Durch eine Behandlung der Membranen vor der Fixierung mit bestimmten Lösungen kann der Einfluss dieser Reaktionslösungen auf die Proteine untersucht werden.

Durch die Expression von EGFP-markierten Fusionsproteinen oder den Einsatz fluoreszenzmarkierter rekombinanter Proteine können molekulare Prozesse an der Membran untersucht und direkt verfolgt werden (Lang, Margittai et al. 2002; Lang 2003). Da kein Cytosol anwesend ist, können die Reaktionsbedingungen besser definiert werden, als zum Beispiel in elektrophysiologischen Ansätzen, bei denen über die *Patch*-Pipette Substanzen in die Zelle diffundieren müssen. Protein und Ionenkonzentrationen sind definierbarer, schneller tauschbar und müssen nicht erst zur Membran diffundieren, sondern wirken direkt nach Applikation des Reaktionsmixes.

Es wurde gezeigt, dass im *Membrane-Sheet-Assay* ein großer Pool der SNAREs konstitutiv reaktiv ist (Lang, Margittai et al. 2002) und kein NSF und α -SNAP für die Exocytose notwendig ist (Barszczewski 2005). In anderen Assays wurde die Notwendigkeit von α -SNAP und NSF vor der Fusion beschrieben (Klenchin and Martin 2000). Dieser Unterschied lässt sich damit erklären, dass im *Membrane-Sheet-Assay* die Zeit zwischen Präparation und Stimulation kürzer ist. Die SNAREs sind zugänglich bevor sie in der Membran mit sich selbst unproduktive Komplexe bilden können (Lang, Margittai et al. 2002). Dieser *Assay* scheint also den nativen Zustand der SNAREs und an ihnen gebundener Proteine besser zu reflektieren als andere Methoden. Daher soll er genutzt werden, um die Bindung von Munc18-1 an seinen Akzeptor in der Membran und der Zustand der SNAREs während der Exocytose zu untersuchen.

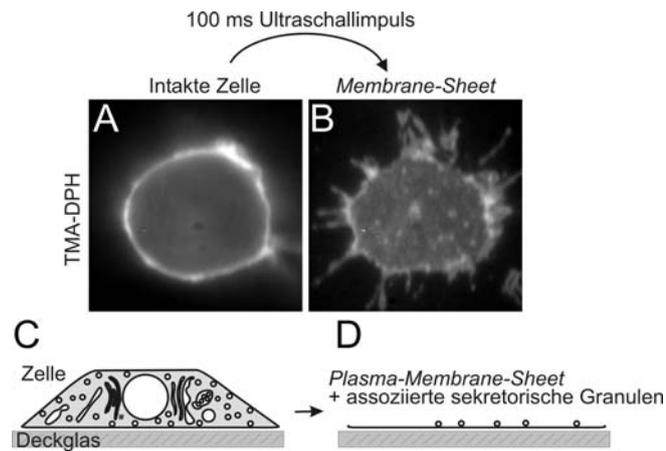


Abb. 8 Übersicht zur *Membrane-Sheet*-Herstellung

(A und C) Durch einen Ultraschallimpuls werden auf einem Deckglas kultivierte PC12-Zellen aufgerissen. (B und D) Bei dieser Behandlung bleibt häufig die basale Plasmamembran intakt. Diese kann nachfolgend mit rekombinanten Proteinen oder Antikörpern behandelt werden. Wenn die PC12-Zelle zum Beispiel mit für das Peptidhormon NPY, fusioniert an EGFP, kodierender DNS transfiziert wurde, können die NPY-EGFP gefüllten Granula visualisiert werden. Nach der Ultraschallbehandlung bleiben einige von ihnen an dem *Membrane-Sheet* und sind funktionell intakt. Sie können durch Zugabe von Calcium fusioniert werden. Abbildung teilweise aus (Lang 2003).

4 Zielsetzung

4.1 Charakterisierung der Bindung von Munc18-1 an seinen Plasmamembran-Akzeptor

Im ersten und umfangreicheren Teil der hier vorliegenden Arbeit soll die Bindung von Munc18-1 an seinen Akzeptor in der Plasmamembran untersucht werden, um die oben beschriebene Diskrepanz zwischen *in vitro* und *in vivo* Studien zu lösen (siehe Kap. 3.11, S.22). Bisher wurden die meisten Bindungsstudien *in vitro* mit cytoplasmatischen Teilen der SNAREs durchgeführt. In der hier vorliegenden Studie werden die SNAREs in ihrer natürlichen Umgebung, integriert in der Plasmamembran, belassen. Es wäre möglich, dass die SNAREs sich durch ihre Integration oder ihre Organisation in der Plasmamembran in bezug auf die Munc18-1-Bindung anders verhalten. Es gilt zu beachten, dass die SNAREs in der Plasmamembran in ihrem natürlichen stöchiometrischen Verhältnis vorliegen, was bei Reaktionen zwischen den SNAREs kritisch sein kann, da es die Bildung von unproduktiven Komplexen beeinflusst. Es könnten außerdem bestimmte Konformationszustände, die in Lösung instabil sind und abreagieren, stabilisiert sein. Die Analyse der Munc18-1 Bindung im *Membrane-Sheet-Assay*, der die dafür notwendigen Rahmenbedingungen bietet, soll Aufschluss über die Munc18-1-Funktion geben und die bisherigen Erkenntnisse sinnvoll integrieren.

4.2 Analyse des Zustands der SNARE-Domänen nach Erhöhung der Calciumkonzentration

Im zweiten Teil der Arbeit soll die Organisation von den neuronalen SNAREs nach Erhöhung der freien Calciumkonzentration, wie sie in der Zelle während der Exocytose stattfindet, untersucht werden. Die Proteine sollen in der nativen Membran, im *Membrane-Sheet-Assay*, untersucht werden. Dort bleiben die Proteine in ihrer nativen Organisation und haben die natürliche Umgebung der Plasmamembran. Dies bezieht sich sowohl auf die anderen anwesenden Proteine als auch auf die Zusammensetzung der Plasmamembran. Im Rahmen dieser Arbeit soll untersucht werden, ob es

während der Exocytose zu einer Umorganisation der SNARE-Mikrodomänen oder zur Änderungen der SNARE-Reaktivität kommt.

Dazu sollen die *Membrane-Sheets* mit Calcium behandelt werden und das Verhalten der SNARE-Proteine untersucht werden.

5 Material und Methoden

5.1 Materialien

5.1.1 Verwendete Materialien, Lösungen und Chemikalien

Soweit nicht anders deklariert, wurden die Standardchemikalien bei den Firmen *Biorad*, *Sigma*, *Merck KGaA*, *Roth*, *Serva*, *Boehringer* und *Fluka* bezogen. Die Reinheit war analytischen Grades.

5.1.2 Sonifizierungspuffer

120mM KGlu, 20mM KAc, 20 mM HEPES, 4 mM MgCl₂ und 2 mM Na₂ATP, 2 mM EGTA, pH 7.2.

5.1.3 Kalium-Glutamat-Reaktionspuffer

120mM KGlu, 20mM KAc, 20 mM HEPES, evtl. 4 mM MgCl₂ und 2 mM Na₂ATP, 3% BSA pH 7.2.

5.1.4 PFA-Stocklösung

10% (w/v) Paraformaldehyd in PBS, alkalische Hydrolyse, dann auf pH 7,2 eingestellt. Zum Gebrauch wurde die Lösung auf 4% verdünnt.

5.1.5 PBS

137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, pH 7,2

5.1.6 Cytomix

120 mM KCl, 10 mM KH₂PO₄, 10 mM K₂HPO₄, 0,15 mM CaCl₂, 2 mM EGTA, 5 mM MgCl₂ 25 mM HEPES, pH 7,69

5.1.7 PC12-Zellmedium

DMEM mit 4.5 g/l Glukose (*Cambrex*, New Jersey, USA)

10% Pferdeserum (*Biochrom*, Berlin, Deutschland)

5% Fötale fötales Kälberserum (*PAA Laboratories*, Cölbe, Deutschland)

4 mM L-Glutamin (*Cambrex*, New Jersey, USA)

60 µg/ml Penizillin und Streptomycin (*Cambrex*, New Jersey, USA)

5.1.8 Hungermedium

DMEM mit 4.5 g/l Glukose (*Cambrex*, New Jersey, USA)

4mM L-Glutamin (*Cambrex*, New Jersey, USA)

60 µg/ml Penizillin und Streptomycin (*Cambrex*, New Jersey, USA)

5.1.9 Medium für chromaffine Zellen

Angereichertes DMEM (*Linaris*, Wertheim-Bettingen, Deutschland), 2.2 g/l NaHCO₃, 4.5 g/l D-Glukose, 1.028 g/l, L-Glutamin, 10 ml/l Insulin-Transferrin-Selenium-X (*Invitrogen*, USA), Penizillin und Streptomycin (10,000 U/ml; *Invitrogen*, USA)

5.1.10 Antikörper

- αSyntaxin1 „HPC-1“, mausmonoklonal (Barnstable, Hofstein et al. 1985)
- αMunc18-1“Struppi“, kaninchenpolyklonal, erzeugt gegen volllänge Munc18-1, erkennt endogenes und rekombinantes Munc18-1 im Western-Blot und in der Immunanfärbung in PC12-Zellen. Minimale Immunanfärbung in BHK und CHO-Zellen. Von DIRK FASSHAUER und DAGMAR SCHÜTZ erzeugt. In den Experimenten Kap. 5.1 verwendet.
- αMunc18-1, kaninchenpolyklonal, erzeugt gegen ein Peptid (#116002, *SynapticSystems*, Göttingen, Deutschland). In den Experimenten Kap. 5.2 verwendet.
- αMunc18-1, mausmonoklonal, in der gezeigten Western-Blot-Analyse eingesetzt (#610336, *BD Biosciences*, USA)
- αSNAP-25 “71.1”, mausmonoklonal, erkennt AA20-40, (#111001, *SynapticSystems*, Göttingen, Deutschland)
- αSNAP-25, kanninchenpolyclonal, gegen AA195-206 erzeugt (#VAP-SV002, *Stressgen*, Canada)
- αSNAP-23, kanninchenpolyklonal, erzeugt gegen ein Peptid (#111202, *SynapticSystems*, Göttingen, Deutschland)
- αSynaptophysin, mausmonoklonal, Cl. 7.2 (#101001, *SynapticSystems*, Göttingen, Deutschland)
- αTransferinRezeptor(human), mausmonoklonal (#13-6800, *Zymed*, USA)

- α Myc, mausmonoklonal(#CRL-1729, ATCC, USA)
- Goat-anti-mouse/-rabbit-Cy3/Cy5 (*Dianova*, Hamburg, Deutschland)
- Goat-anti-mouse/-rabbit-HRP (*Pierce*, USA)

5.1.11 Durch fremde Vorarbeiten erhaltene rekombinante Proteine

Die folgenden Proteine wurden von Mitarbeitern erhalten:

ALEXANDER STEIN: Syb2 AA 1-96, Syb2 AA 42-96, Syb2 AA 1-81
(Fasshauer and Margittai 2004)

OLGA VITES: SNAP-25 AA 1-206 (ohne Cysteine), Syx1A AA 1-262
(Vites, Rhee et al. 2004)

DANIEL ZWILLING: Endobrevin AA 1-84, Vamp4 AA 1-117
(Brandhorst, Zwilling et al. 2006).

Alle Proteine waren durch Ionenaustauscherchromatographie aufgereinigt.

5.1.12 Durch fremde Vorarbeiten erhaltene DNS-Konstrukte

Folgende fremde DNS-Konstrukte wurden entweder direkt in Experimenten eingesetzt oder dienten als Ausgangspunkt für weitere Klonierungen:

- pEGFP-C1, pEGFP-N1 (beide von *Clontech*, USA)
- pET28a (*Novagen/ MerckBiosciences*, Darmstadt, Deutschland)
- pmEGFP-N1 (von EDWARD LEMKE erhalten, EGFP-A206K-Mutante, die EGFP-Dimerisierung verhindert (Zacharias, Violin et al. 2002))

Leichte Ketten der clostridialen Toxine:

- pQE3-BoNT/C1-WT, pQE3-BoNT/C1-Mut-E230A
- pQE3-BoNT/E-WT
- pQE3-TeTx

(alle Toxine wurden von HEINER NIEMANN und THOMAS BINZ erhalten)

- pPro-NPY-EGFP (erhalten von THORSTEN LANG, beschrieben in (Lang, Wacker et al. 1997))
- pBOB5.1-cMyc-Munc18-1 (von DAGMAR SCHÜTZ erhalten, beschrieben in (Schutz, Zilly et al. 2005))
- pBOB5.1-cMyc-Open-Syntaxin1A (L165A, E166A Syntaxin Mutante, von DAGMAR SCHÜTZ erhalten, beschrieben in (Sieber, Willig et al. 2006))

- pSyntaxin1A-mEGFP (von JOCHEN SIEBER erhalten, beschrieben in (Sieber, Willig et al. 2006))
- pEGFP-Munc18-1-D34N und pEGFP-Munc18-1-R39C (von DAGMAR SCHÜTZ erhalten, beschrieben in (Schutz, Zilly et al. 2005)).

Alle DNS-Konstrukte wurden durch Sequenzierung überprüft.

5.2 Methoden

5.2.1 Klonierte DNS-Konstrukte

Alle Klonierungsarbeiten wurden nach molekularbiologischen Standardprotokollen durchgeführt (SAMBROOK 2001).

Folgende Konstrukte wurden kloniert:

- pOpen-Syntaxin1A-mEGFP: Aus dem Plasmid pBOB5.1-cMyc-Open-Syntaxin1A wurde die Syntaxin-Mutante mittels PCR amplifiziert und über die Schnittstellen AgeI und NheI in den Vektor pmEGFP-N1 kloniert.
- pET28a-BoNT/C1-WT/-Mut(E230A): Aus dem Plasmid pQE3-BoNT/C1-WT/-Mut(E230A) wurde die leichte Toxin-Kette mittels PCR amplifiziert und über die Schnittstellen NdeI und EcoR1 in den Vektor pET28a kloniert.
- pET28a-BoNT/E-WT: Aus dem Plasmid pQE3-BoNT/E wurde die leichte Toxin-Kette mittels PCR amplifiziert und über die Schnittstellen NdeI und XhoI in den Vektor pET28a kloniert.
- pET28a-BoNT/E-Mut(E213Q): In den Plasmid pET28a-BoNT/E-WT wurden zwei Punktmutationen eingeführt, so dass es zu dem gewünschten Aminosäureaustausch und zur Deletion einer NsiI-Restriktionsstelle kam, so dass die positiven Klone mit einem DNS-Verdau identifiziert werden konnten.
- pEGFP-Munc18-1: Aus dem Plasmid pBOB5.1-cMyc-Munc18-1 wurde Munc18-1 mittels PCR amplifiziert und über die Schnittstellen EcoR1 und KpnI in den Vektor pEGFP-C1 kloniert.

Alle DNS-Konstrukte wurden durch Sequenzierung überprüft.

5.2.2 SDS-Page- und Western-Blot:

SDS-PAGE (12-15%ige Gele) und Western-Blot wurden wie beschrieben durchgeführt (Laemmli 1970; Towbin, Staehelin et al. 1979; Kyhse-Andersen 1984). Der SDS-Probenpuffer enthielt 62,5 mM Tris, pH 6,8, 3% (w/v) SDS, 10% (w/v) Glycerol, 5 mM DTT (Endkonzentrationen). Vor dem Gelauftrag wurden die Proben für 5 Min. auf 100° C erhitzt. HRP-markierte sekundäre Antikörper wurden durch verstärkte Chemilumineszenz (*Super Signal West Dura Substrate* (Pierce, USA) auf einem Fujifilm LAS-1000-System (*Fujifilm*, Japan) detektiert. Proteinkonzentrationen wurden üblicherweise mit dem Bradford-Assay bestimmt (Bradford 1976). Hierbei diente BSA als Proteinstandard. Zur genaueren Konzentrationsbestimmung wurde in einigen Fällen die Absorption bei 280 nm photometrisch gemessen und die Konzentration mit dem Lambert-Beer-Gesetz berechnet.

5.2.3 Proteinaufreinigung:

Die Proteine Synaptobrevin2-28C, BoNT/C-WT, BoNT/C-Mut, BoNT/E-WT, BoNT/E-Mut, TeTx-WT wurden als His₆- in *E. coli* BL21(DE3) oder M15 (für pQE3 Konstrukte), wie früher schon beschrieben (Fasshauer, Antonin et al. 1999), exprimiert und durch Affinitätschromatographie mit Ni-NTA-Agarose gereinigt (*Qiagen*, Erkrath, Deutschland). Die His-Tags wurden durch eine Spaltung mit Thrombin entfernt. Dies gilt jedoch nicht für Tetanus-Toxin, da das pQE3 Konstrukt keine solche Schnittstelle zwischen Toxin und His-Tag besitzt. Mit Ausnahme des Tetanus-Toxins wurden die Proteine durch ÄKTA-Ionen-Austauschchromatographie (ÄKTApurifier, *amersham pharmacia biotech*, Schweden) über eine Mono-S-Säule weiter aufgereinigt. Es wurde ein linearer Gradient von 0-1 M NaCl in 20 mM Tris-HCl 1 mM DTT zur Auftrennung verwendet. Die Elutionsfraktionen wurden mit einer SDS-Page und Coomassieanfärbung der Proteine untersucht. Die Fraktionen mit hoher Reinheit und Konzentration des gewünschten Proteins wurden gegen 120 mM KGlu, 20 mM KAc, 20 mM HEPES, pH 7,2 über Nacht dialysiert.

5.2.4 **Labelling von rekombinantem Synaptobrevin Protein**

Die Fluoreszenzmarkierung einer Cystein-Proteinmutante wurde, wie früher schon beschrieben wurde (Pabst, Margittai et al. 2002), durchgeführt. Mit einem Ionentauscher aufgereinigtes Synaptobrevin2-28Cys wurde mit 10 mM DTT versetzt und für 30 Min. bei Raumtemperatur belassen. Anschließend wurde das Protein auf ein Volumen von 2,5 ml gebracht und über eine PD10-Säule (*GE Healthcare*, Schweden) von dem überschüssigen DTT abgetrennt. Zur Elution wurde 120 mM KGlu, 20 mM HEPES, 20 mM KAc, pH 7,2 verwendet. Das Proteineluat wurde mit Alexamaleimid-594 (*Molecular Probes*, USA) vermischt (Molekulares Verhältnis 1:5) und für zwei Stunden bei Raumtemperatur rotiert. Überschüssiger Farbstoff wurde durch Zugabe von DTT (10 mM Endkonzentration) abreagiert. Das Protein wurde mittels Gelfiltration Sephadex G75*superfine* (*Amersham Biosciences*, Schweden) vom Farbstoff getrennt. Das Eluat wurde auf eine Konzentration von 140 μ M eingeeengt.

5.2.5 **Dichtegradientenzentrifugation**

Die Dichtegradientenzentrifugation wurde in ähnlicher Weise schon früher beschrieben (Lang, Bruns et al. 2001), daher hier nur in Kürze. Für die Dichtegradientenzentrifugation wurden PC12-Zellen auf 12 cm Kulturschalen gezüchtet. Als diese 90% der Konfluenz erreichten, wurde das Nährmedium gegen serumfreies Hungermedium getauscht, das mit 20 μ M Ionomycin und Calcium (Endkonzentration 5 mM) versetzt war. In Kontrollexperimenten wurde externes Calcium mit 10 mM EGTA chelatiert. Nach 5 Min. wurden die Zellen geerntet, zentrifugiert und in 0,5 ml Kalium-Glutamatpuffer resuspendiert, so dass eine Proteinkonzentration von 7-15 mg/ml erreicht wurde. Die freie Calciumkonzentration im Puffer wurde mit 25-fachen Stocklösungen auf 54 μ M oder 0 μ M eingestellt. Ein proteolytischer Verdau wurde durch Zusatz von einem Protease-Inhibitorcocktail verhindert (Mini, EDTA-free, *Roche*, Mannheim, Deutschland). Die Zellen wurden durch 20 Ultraschallimpulse, je 100 ms, aufgeschlossen. Das Zelllysat wurde mit 60% Optiprep (*AXIS-SHIELD*, Norwegen) gemischt, so dass sich eine 1,1 ml große, 40%ige Dichtestufe ergab. Diese wurde in ein TLS-55 Zentrifugenrohr geladen und mit 200 μ l

großen Gradientenstufen, 35-, 30-, 25-, 20- und 0%ig überschichtet. Die Gradientenstufen entstanden durch das Mischen von Kalium-Glutamatpuffer und Optiprep und enthielten 2mM EGTA und Protease-Inhibitor. Der Gradient wurde für 30 Min. in einer Tisch-Ultrazentrifuge (Optima TLX, *Beckmann*, Deutschland) im TLS-55 Rotor bei 4° C und 50000 Umdrehungen/ Min. zentrifugiert. Anschließend wurden die Gradientenstufen 0-30% und 35-40% kombiniert. Von diesen Fraktionen wurden 7% auf ein SDS-Gel aufgetragen und die Proteine mit einer Elektrophorese (*Bio-Rad Laboratories*, USA) aufgetrennt. Die Proteine wurden anschließend mittels *semi-dry* Western-Blot (Kyhse-Andersen 1984) auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Erstantikörper wurden mit HRP-gekoppelten Zweitantikörpern (*Pierce*, USA) und der Reaktionslösung *Super Signal West Dura Substrate* (*Pierce*, USA) detektiert.

5.2.6 Auftauen von PC12 Zellen

Ein Aliquot von PC12-Zellen-Klon 251 (Heumann, Kachel et al. 1983) wurde aus dem Stickstofftank entnommen und zur Kultivierung in eine 75 cm² Zellkulturflasche (#83.1813, *Sarstedt*, Numbrecht, Deutschland) überführt. Unter Zugabe von 30 ml Medium wurden die Zellen bei 37° C, 10% CO₂ und 90% Luftfeuchtigkeit im Inkubator gehalten. Für die Experimente wurden die Zellen zwischen Passagen 5 und 20 verwendet.

5.2.7 Passagierung und Plattierung von PC12-Zellen

Zur Passagierung von PC12-Zellen wurde das alte Zellkulturmedium angesaugt und die Zellen mit 10 ml sterilem PBS gewaschen. Anschließend wurden 3 ml Trypsin/EDTA (*Cambrex*, USA) hinzugegeben und die Flasche für 5 Min. in den Inkubator gestellt. Hierauf wurden die Zellen aus der Flaschen, in ein 50ml Falcon-Röhrchen (*Starstedt*, Numbrecht) überführt. Die nachfolgende Spülung mit 10ml Medium stellte sicher, dass auch verbliebene Zellen aus der Kulturfläche in das Falcon-Röhrchen überführt wurden. Es folgte eine Zentrifugation bei 20° C für 5 Min. bei 1000 rpm, ~235 g, in der Varifuge 3.0R (*Heraeus-Kendo*, Langenselbold). Anschließend wurde der Überstand entfernt und das Zellpellet mit 4ml

Medium 20mal resuspendiert. Dabei wurde die Spitze der verwendeten 10ml Pipette fest auf den Boden des Röhrchens gedrückt und die elektrische Pipettierhilfe auf maximale Leistung gesetzt, um eine optimale Vereinzelung der Zellen zu erreichen. Die Hälfte dieser Zellsuspension wurde in eine neue Kulturflasche überführt und mit Medium auf ein Volumen von 30 ml gebracht. Die verbleibende Suspension wurde mit weiteren 4 ml verdünnt und je ein halber Milliliter auf ein beschichtetes Deckglas gegeben. Nach 10minütigem Warten wurden je 2 ml Medium vorsichtig zu den Zellen gegeben, welche anschließend in den Inkubator gestellt wurden. Am Folgetag wurden sie für die Experimente verwendet.

5.2.8 Beschichtung der Deckgläser mit Poly-L-Lysin

Die Arbeiten fanden unter der Sterilbank statt. Die Deckgläser (Ø 25mm, Stärke 1 (*Menzel*, Braunschweig, Deutschland oder *Assistent*, Sondheim, Deutschland)) wurden zunächst mit 70% Ethanol gewaschen, dann kurz abgeflammt und in 6-Loch-Platten platziert. Dort wurden sie mit je einem halben Milliliter einer 100 µg/ml Poly-L-Lysin-Hydrobromid-Lösung beschichtet (Molekulargewicht >300 kDa, #P-1524, *Sigma*, USA). Nach 30min wurde die Lösung entfernt und die Deckgläser mit MilliQ-Wasser (*Millipore*, USA) gewaschen. Nach Entfernen des Wassers trockneten die Deckgläschen unter der Sterilbank.

5.2.9 Transfektion von PC12 Zellen

Zunächst wurden die PC12-Zellen wie oben beschrieben geerntet. Die Hälfte des Zellpellets wurde in 1,2 ml Cytomix resuspendiert. Von dieser Suspension wurden bis zu 400 µl in eine Elektroporationsküvette (2 mm Schlitz, *Biorad*) gegeben, die vorher mit der entsprechenden DNA (20-70 µg) gefüllt war. Nach kurzer Resuspension wurde die Elektroporation mit dem Genepulser II (*Biorad*, München) durchgeführt. Dabei wurden die Einstellungen 1.15 kV, 50 Ohm und 50 µF gewählt. Die Zeitkonstante betrug 1.4 bis 1.6 s. Nach 10minütigem Warten wurden die Zellen der Küvette entnommen, diese mit 700µl Medium gespült und noch ein weiterer Milliliter zur Suspension gegeben. Je ein halber Milliliter wurde auf ein Deckglas plattiert. Die weitere Behandlung erfolgte wie oben beschrieben.

5.2.10 *Membrane-Sheet* Herstellung

Zur Herstellung von *Membrane-Sheets*, wie früher schon beschrieben (Avery, Ellis et al. 2000), wurden für 24-28 Stunden PC12-Zellen, *bovine* chromaffine Zellen oder *murine* chromaffine Zellen auf Poly-L-Lysin beschichteten Glasdeckgläsern kultiviert. Ein Deckglas wurde in eiskalten Kalium-Glutamatpuffer getaucht, so dass sich über diesem eine etwa 2 cm hohe Puffer-Säule befand. Genau zentriert und im Abstand von 1 cm vom Deckgläschen wurde in diese Säule eine Ultraschallspitz mit einem Durchmesser von 2,0 mm montiert. Mit den Einstellungen *duty* 10%, *output control* 2 und *duty cycle* hold am Ultraschallgerät (Sonifier B12, *Branson Ultrasonics Corp.*, Danbury, USA) wurde der Ultraschallimpuls freigesetzt. Das Deckgläschen wurde sofort dem Bad entnommen und entweder in Fixativ (4% PFA) gelegt oder zur weiteren Behandlung verwendet.

5.2.11 Inkubation der *Membrane-Sheets*

Alle Inkubationen wurden bei 37° C in Kalium-Glutamatpuffer + 3% BSA durchgeführt, es sei anderes beschrieben. Falls keine bestimmte Calciumkonzentration eingestellt werden sollte, wurden 2 mM EGTA hinzugegeben. In manchen Experimenten wurden rekombinante Proteine hinzugegeben, die Konzentration ist in der entsprechenden Bildlegende aufgeführt. Zum Ausschließen von Calcium aus den Reaktionslösungen wurden 2 mM EGTA hinzugegeben. Zum Erreichen einer definierten Calciumkonzentration im Bereich zwischen 100-1350 nM, wurde ein Calcium/EGTA (Ethylenglykol-bis-(2-aminoethylethyl)-tetraessigsäure)-Puffersystem (K_D EGTA= 150nM, (Tsien and Pozzan 1989)) eingesetzt. Die freie Calciumkonzentration von 850 nM ergab sich durch Mischen von CaEGTA zu K_2 EGTA 8,5:1,5. Zum Erzielen von Konzentrationen zwischen 9-1500 μ M freiem Calcium, wurde ein Calcium/ DPTA (1,3-Diamino-2-propanol-N,N,N',N'-tetraessigsäure) -Puffersystem verwendet (K_D DPTA=81 μ M, (Heinemann, Chow et al. 1994)). Die freie Calciumkonzentration von 54 μ M ergab sich durch Mischen von CaDPTA zu K_2 DPTA 4:6.

Im Experiment wurde ein 100 oder 200 μ l großer Tropfen dieses Puffers auf eine Parafilmfolie gegeben, die sich in einer feuchten Reaktionskammer

befand bei 37° C befand. Auf diesen Tropfen wurden die Deckgläser mit der Oberseite nach unten gelegt. Nach vollendeter Reaktion wurden die Deckgläser kurz in eiskaltem Sonifizierungspuffer getaucht und dann fixiert.

5.2.12 Antikörperfärbung von *Membrane-Sheets*

Zur Antikörperanfärbung, wie früher schon beschrieben (Lang, Bruns et al. 2001), der Plasmamembranen wurden die Deckgläser unter Zusatz von 50 mM NH₄Cl für 20 Min. mit PBS behandelt. Anschließend wurden sie zweimal für 10 Min. mit PBS gewaschen. Es folgte eine einstündige Inkubation mit dem Erstantikörper. Anschließend wurden die Deckgläser einmal für 5min, darauf zweimal für 10 Min. mit PBS gewaschen. Bei der Anfärbung von *murinen* oder *bovinen* chromaffinen Zellen folgte vor der Zweitantikörperanfärbung eine weitere Erstantikörperfärbung für 30 Min., um auszuschließen, das *Sheets* von Fibroblasten mit in die Analyse einfließen, die in der Primärkultur vorhanden sind. Zur vereinfachten Detektion von *Membrane-Sheets* aus chromaffinen wurde mit dem Antikörper HPC1, der Syntaxin1A nachgewiesen. Es folgte ein Waschschrift, wie oben beschrieben, darauf die Anfärbung mit dem sekundären Antikörper für eine Stunde und ein abschließender Waschschrift.

5.2.13 Ionomycin-Behandlung von PC12 Zellen

Bei der Ionomycinbehandlung von PC12-Zellen wurden sie nach einem Tag Kultivierung auf Deckgläser zweimal mit Hungermedium gewaschen, dann in diesem für zwei Stunden kultiviert. Anschließend wurden die Deckgläser in der 6-Well-Schale aus dem Inkubator genommen und in einen Standard-Inkubator bei 37° C gelegt. Hier wurde zur Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration das Medium gegen 1,5 ml Hungermedium, 20 mM HEPES, 20 µM Ionomycin (*Calbiochem*, USA), 3,2 mM CaCl₂ (führt zu einer Endkonzentration von 5 mM), pH 7,2 getauscht. Kontrollbedingungen enthielten zusätzlich 10 mM EGTA. Die Lösungen ruhte für 5 Min. auf den Zellen. Darauf wurden die Deckgläser in eiskaltem Sonifizierungspuffer getaucht und mit einem Ultraschallimpuls behandelt. Es folgte die Fixierung der Probe mit 4% PFA.

5.2.14 Depolarisation von chromaffinen Zellen vom Rind

In diesen Experimenten lagen mit chromaffinen Zellen vom Rind bedeckte Deckgläser für 1-5 Min. in einer auf 37° C vorgewärmte hoch- oder niedrigkonzentrierten Kaliumlösung (Niedrig-Kalium: 130 mM NaCl, 4mM KCl, 10 mM HEPES, 1 mM MgCl₂, 5 mM CaCl₂, 44 mM Glukose, pH 7,4. Hoch-Kalium: 50 mM NaCl, 80 mM KCl, 10 mM HEPES, 1 mM MgCl₂, 5 mM CaCl₂, 44 mM Glukose, pH 7,4). Anschließend wurden die Deckgläser entnommen und in eiskalten Sonifizierungspuffer überführt. Dort wurden sie, wie oben beschrieben, mit Ultraschall behandelt und fixiert.

5.2.15 Isolierung und Kultur von chromaffinen Zellen von Maus

Die Isolierung und Kultivierung embryonaler *murinen* chromaffiner Zellen wurden nach dem Standard-Protokoll der Abteilung für Membranbiophysik (Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen, Direktor PROFESSOR E. NEHER) durchgeführt (Sorensen, Nagy et al. 2003). Hier noch mal in Kürze: Die Embryonen wurden mittels Kaiserschnitt dem Mutterleib entnommen und getötet. Ihnen wurden beide Nebennieren entfernt und enzymatisch behandelt. Beide Nebennieren wurden für 35 Min. in 200 µl Papain-Lösung inkubiert (DMEM mit 20-25 U Papain (*Worthington*, Lakewood, USA), äquilibriert durch CO₂). Zum Beenden der Enzymreaktion wurden 150 µl Inaktivierungsmix (250 ml DMEM, 25 ml fötales Kälberserum, 625 mg Albumin, 625mg Trypsininhibitor (*Sigma*, USA)) hinzugegeben und 5 Min. bei 37° C inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und 140 µl Medium für die Kultur chromaffiner Zellen hinzugegeben. Die Zellen der Nebenniere wurden durch Titurierung vereinzelt und auf zwei Deckgläschen plattiert. Nach 15 Min. wurden 2 ml Medium hinzugegeben und 37° C, 8% CO₂ und 90% Luftfeuchtigkeit im Inkubator gehalten.

5.2.16 Bestimmung des *snap25* Genotyps

Für alle Schritte wurden sterile Geräte und Materialien, die ausschließlich zur Genotypisierung benutzt werden, verwendet.

Der Genotyp der Embryonen wurde durch PCR bestimmt. Dazu wurde mit einer sterilen Schere ein Stück Schwanzspitze abgeschnitten und aus diesem die genomische DNS isoliert. Das Stück Schwanz wurde für ca. 3 Stunden bei 55° C mit 17 µg Proteinase K in 600 µl SNET-Puffer (10 mM Tris pH 8,0, 0,1 M EDTA, 0.5% SDS) verdaut. Mittels Phenol-Chloroform Extraktion und anschließender Isopropanolfällung wurde die DNA isoliert (Herrmann and Frischauf 1987) und in 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0 gelöst. Von dieser DNA-Lösung wurde 1 µl in den PCR-Reaktionen eingesetzt (25 µl Gesamtvolumen). Je Embryo wurden zwei PCR-Reaktionen durchgeführt. In der Ersten wurde die Anwesenheit des ExonV des *snap25* Gens, in der Zweiten die Anwesenheit der Neomycinkassette überprüft.

5.2.17 Isolierung und Kultur von chromaffinen Zellen vom Rind

Bovine chromaffine Zellen wurden auf Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläschen plattiert. Dies erfolgte nach dem Standardprotokoll der Abteilung für Membranbiophysik (Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen, Direktor PROFESSOR E. NEHER) (Nagy, Matti et al. 2002), durch Frau INA HERFORT. Die Zelldichte betrug 500000 Zellen/Deckgläschen für Konfokalanalysen und 3 Millionen/ Deckgläschen für die spätere Herstellung von *Membrane-Sheets*. Nach einem Tag wurden die Zellen für *Membrane-Sheet* Experimente verwendet, für Depolarisations-Experimente erst nach zwei Tagen.

5.2.18 Ganzzellanfärbung von chromaffinen Zellen vom Rind

Zur Ganzzell-Anfärbung von *bovinen* Zellen wurden diese nach einer Stunde Fixierung für 20 Min. in PBS mit 50 mM NH₄Cl gewaschen. Anschließend wurden die Zellen zweimal 10 Min. mit PBS gewaschen. Dann folgte eine fünfminütige Inkubation mit PBS + 0,2% Triton-X 100, die nach für 10 Min. mit zusätzlichen 3% BSA wiederholt wurde. In dem gleichen Puffer folgte dann eine einstündige Inkubation mit dem

Erstantikörper (1:200 Verdünnung). Nach drei Waschschrritten für je 10 Min. erfolgte die Zweitantikörperinkubation im gleichen Puffer für eine Stunde. An diese Inkubation schloss sich wieder 10minütiger Waschschrtritt, nun nur mit PBS an, der dreimal wiederholt wurde.

5.2.19 Konfokales Mikroskop

Zur konfokalen Mikroskopie wurde ein Leica TCS SP5 System verwendet (*Leica Microsystems*, Deutschland). Folgende Einstellungen wurden gewählt: Objektiv: HCX PLAPO CS 63x NA1.4; Laser: DPSS 561, *Bandpass*: 565-650 nm, *Pinhole*: 95,49 μm (Airy), *Scan speed*: 400 Hz (512x512 pixel), *Accumulaion* 1, 8 bit Image, *Lineaverage* 1, *Frameaverage* 4, *Zoomfactor*: 2,46 \sim 100,03 μm^2 , Aufnahme des Transmissionsbild: *Smart Gain*: 187 V, *Smart Offset*: 0,0%. Konfokale Aufnahme von Syntaxin: Laser-Leistung: 65%, *Smart Gain*: 905 V, *Smart Offset*: 0,0%. Konfokale Aufnahme von SNAP-25: Laser-Leistung: 100%, *Smart Gain*: 975 V, *Smart Offset*: 0,0%. Im Durchlichtmodus wurde zunächst eine Stelle mit chromaffinen Zellen im Sichtfeld zentriert. Im *Live*-Modus wurde anhand des Transmissionsbildes auf die äquatoriale Ebene der Zellen fokussiert. Dann wurde der konfokale *Scan* gestartet.

5.2.20 Konfokale Analyse der Ganzzellfärbung boviner Zellen

Im Transmissionsbild, um Bevorzugung bestimmter Zellen auszuschließen, wurde ein *Linescan* von 150 Pixeln Länge und 15 Pixeln Breite über die Aufnahme einer *bovinen* chromaffinen Zelle gelegt. Dabei war wichtig, dass der *Linescan* möglichst rechtwinklig über die Zelle verlief. Der *Linescan* wurde auf das Bild der konfokalen Aufnahme übertragen und dort die Pixelintensitäten entlang der Linie analysiert. Von den gemessenen Intensitäten wurde die mittlere Fluoreszenz außerhalb der Zelle als Hintergrundfluoreszenz abgezogen. Aus den beiden Fluoreszenz-Maxima an den Schnittpunkten mit der Plasmamembran wurde der Mittelwert berechnet. Dann wurde die mittlere intrazelluläre Fluoreszenz bestimmt. Dies erfolgte durch Legen eines ca. 10x15 Pixel großes Rechteck in die Zelle und Ermittlung der mittleren Intensität im Rechteck. Das selbe Rechteck wurde auch dazu benutzt um anschließend die extrazelluläre

Hintergrundfluoreszenz zu bestimmen. Von dem mittleren Maximum an der Plasmamembran wurde die korrigierte, intrazelluläre Fluoreszenz abgezogen und die netto Plasmamembranfluoreszenz bestimmt. Die netto Fluoreszenz von nicht depolarisierten Zellen galt als 100%.

5.2.21 Epifluoreszenzmikroskop

Die *Membrane-Sheets* wurden mit einem Zeiss Axiovert 100 TV Mikroskop mit einem 100x 1.4 NA plan-apochromatischen Objektiv untersucht. Zur Aufnahme von digitalen Bildern wurden zwei verschiedene Kameras und Optovare benutzt. Entweder eine *back-illuminated frame transfer CCD-Kamera* (2x 512 x 512-EEV chip, Pixel-Größe 13 x 13 μm ; *Princeton Instruments*, USA) mit einem 1,6x Optovar oder eine *back-illuminated CCD Kamera* (512 x 512-NTE Chip, Pixel Größe 24 x 24 μm ; *Princeton Instruments*, USA) mit einem 2.5x Optovar zur Vergrößerung. Folgende Filtersätze dienten der Fluoreszenzanalyse: Zur Untersuchung der TMA-DPH Fluoreszenz wurde der *Zeiss-Filtersatz 02* benutzt (Anregungsfilter D 365, Strahlenteiler 395 DLCP, und Emissionsfilter 420 LP) (*Carl Zeiss MicroImaging*, Göttingen, Deutschland). Zur Detektion der GFP Cy3, Alexa594 und Cy5 Fluoreszenz wurden folgende Filtersätze benutzt: GFP-Fluoreszenz, Anregungsfilter HQ 480/40, Strahlenteiler Q 505 LP und Emissionsfilter HQ 527/30, für Cy3/Alexa594 Fluoreszenz (wenn mit GFP coanalysiert), Anregungsfilter HQ 565/30, Strahlenteiler Q 595 LP und Emissionsfilter HQ 645/75, für Cy3 Fluoreszenz (wenn mit Cy5 coanalysiert), Anregungsfilter HQ 525/30, Strahlenteiler Q 550 LP und Emissionsfilter HQ 575/30, Cy5 Fluoreszenz, Anregungsfilter HQ 620/60, Strahlenteiler Q 660 LP und Emissionsfilter HQ 700/75 (alle Filtersätze von: *AHF Analystechnik AG*, Tübingen, Deutschland).

5.2.22 Mikroskopie von *Membrane-Sheets*

Membrane-Sheets wurden nach der Antikörperfärbung mikroskopiert. Dazu wurden anhand der TMA-DPH-Lipidanfärbung die *Sheets* gewählt. Somit wurde die Integrität der Membran geprüft und eine Bevorzugung bestimmter *Sheets* verhindert. Bei PC12- und *bovinen* chromaffinen Zellen wurde Regionen auf dem Deckglas gewählt, in denen mindestens 5 intakte *Membrane-Sheets* lagen. Da ihre Anzahl sehr gering war, wurde im Fall von chromaffinen Zellen von Maus, auch einzelne *Sheets* aufgenommen, wenn ihre Membran intakt war. Anschließend wurde die TMA-DPA-Anfärbung, dann die Cy3-/ Alexa594-Fluoreszenz aufgenommen. Bei Doppelfärbungen wurde erst die Cy3-, dann die Cy5-Fluoreszenz aufgenommen. Bei EGFP-transfizierten Zellen wurde erst die Cy3-, dann die EGFP-Fluoreszenz aufgenommen. Die Belichtungszeit betrug 1 Sek.. Nur bei der Analyse der EGFP- und EYFP-Fluoreszenzen zur Korrelationsanalyse wurde für die Belichtungszeit auf 4 Sek. erhöht.

5.2.23 Analyse von *Membrane-Sheets*

Mit dem Programm Metamorph 4.0 (*Universal Imaging*, USA) wurden die 16 bit digitalen Bilder untersucht. Dabei wurden zunächst im TMA-DPH-Bild ca. 5-10 μm^2 große Rechtecke auf fünf *Membrane-Sheets* (im Falle der *Sheets* von *murinen* chromaffinen Zellen auch weniger) gelegt. Dabei waren nur intakte *Membrane-Sheets* relevant. Die mittlere Immunfluoreszenz wurde an den korrespondierenden Stellen auf den Immunfluoreszenzbildern gemessen. Nach jeder Messung der Immunfluoreszenz wurde die Region in ausreichendem Abstand neben das *Sheet* geschoben, um die Hintergrundfluoreszenz auf dem Deckglas zu messen. Die erhaltenen Messwerte wurden über eine Softwareschnittstelle in Excel 2000 (*Microsoft*, USA) exportiert. Dort wurde von jedem Mittelwert der Immunfluoreszenz der Mittelwert des Hintergrundes abgezogen. Mit den dort entstandenen Netto-Fluoreszenzwerten wurden mit Hilfe von SigmaPlot 8.0 (*SPSS Science Software*, USA) der Mittelwert jeder Bedingung eines Versuchstages berechnet. Aus diesen Werten wurde nach Abschluss einer Versuchsreihe der endgültige Mittelwert, die Standardabweichung, der Standardfehler und der gepaarte und nicht gepaarte t-Test berechnet. Alle

Diagramme wurden mit dieser Software hergestellt. Das Munc18-1-Auswaschen von der Membran wurde mit der folgenden doppel-exponentiellen Formel gefittet: $f(x) = 101.09 \text{ AU} + 37.44 \text{ AU} \cdot e^{-(x \cdot \ln(2)/5 \text{ s})} + 235.88 \text{ AU} \cdot e^{-(x \cdot \ln(2)/1000 \text{ s})}$. Der Einbau von rekombinantem Synaptobrevin wurde mit folgender Formel gefittet: $f(x) = 43\% + 57\% \cdot \exp^{(-x \cdot \ln(2)/14)}$.

5.2.24 Analyse der Plasmamembranbindung von EGFP-Munc18-1

Zur Analyse der Munc18-1 Bindung an die Plasmamembran wurden, wie schon veröffentlicht (Schutz, Zilly et al. 2005), PC12-Zellen nach 48 Stunden untersucht, die mit EGFP-Munc18-1, EGFP-Munc18-1 (R39C), EGFP-Munc18-1 (D34N), Syntaxin-EGFP und cytosolischem EGFP transfiziert waren. Mit einer *Linescan*-Analyse wurde die Fluoreszenz an der Plasmamembran quantifiziert. Dazu wurde ein 6,9 μm langer und 1,6 μm breiter *Linescan* zu in die Zelle gelegt, so dass er rechtwinklig auf die Plasmamembran traf und zu 2/5 in die Zelle hineinragte. Dabei war wichtig, dass er nicht in der Nähe von Zell-Zellkontakten oder dem Zellkern lag, um innerhalb der Zelle ausschließlich die cytosolische Fluoreszenz zu messen und die Plasmamembranfluoreszenz nicht durch Zellkontakte zu überschätzen. Die gemessenen Intensitäten wurden hintergrundkorrigiert und auf das Maximum normalisiert. Für Syntaxin wurden 21 Zellen, cytosolisches EGFP 19 Zellen, Munc18-1-WT 33 Zellen, Munc18-1-R39C 36 Zellen und Munc18-1-D34N 36 Zellen analysiert. Parallel wurde für jede Zelle eine durch den Farbstoff TMA-DPH hervorgerufene unspezifische Lipidanfärbung der Plasmamembran analysiert. Diese diente dazu die Position der Plasmamembran zu bestimmen und die Lokalisation auf den entsprechenden EGFP-*Linescan* zu übertragen. Die auf den maximalen Pixelwert normalisierten *Linescans* wurden gemittelt, indem sie an dem Aufenthaltsort der Plasmamembran, definiert durch die TMA-DPH-Analyse, übereinander gelegt wurden.

6 Ergebnisse

6.1 Charakterisierung der Bindung von Munc18-1 an seinen Plasmamembran-Akzeptor

6.1.1 Charakterisierung der Bindung von Munc18-1 an die Plasmamembran in ganzen Zellen

Im Rahmen einer Zusammenarbeit mit Professor Dieter Bruns (Universität des Saarlandes, Physiologisches Institut, Homburg) wurde in intakten Zellen die Bindung von Munc18-1 an die Plasmamembran untersucht. Das Ziel war den Einfluss von Punktmutationen in Munc18-1, die *in vitro* zu einer reduzierten Syntaxin-Bindung führen (Schutz, Zilly et al. 2005), auf seine Lokalisation hin zu analysieren. Die entsprechenden Punktmutationen in Munc18-1, D34N oder R39C, liegen, wie die publizierte Munc18-1-Syntaxin1A-Kristallstruktur zeigt, in der Syntaxin-Bindungstasche (Misura, Scheller et al. 2000). Diese Mutanten wurden erstmals für das *Drosophila*-Homolog ROP beschrieben. Dort ist die homotypische Expression der Mutanten letal (Harrison, Brodie et al. 1994; Wu, Littleton et al. 1998).

Das Experiment wurde wie folgt durchgeführt. Es wurden EGFP-markierte Munc18-Konstrukte in PC12-Zellen überexprimiert und mittels Epifluoreszenzmikroskopie analysiert. Die Quantifizierung der intrazellulären Verteilung der markierten Proteine erfolgte durch eine *Linescan*-Analyse. Dabei wurde die EGFP-Fluoreszenz über eine Länge von 6,9 μm und mit einer Breite von 1,6 μm , von außen, über die Plasmamembran hinweg in das Zellinnere hinein zeigend gemessen (angedeutet in Abb. 9A). Die gemessenen Intensitätsprofile wurden auf den maximalen Pixel-Intensitätswert normalisiert. Als Referenzen dienten in diesem Experiment cytosolisches EGFP und Syntaxin1A-EGFP, das als Plasmamembranprotein nicht im Cytosol vorlag und ebenso keine Lokalisation auf intrazellulären Kompartimenten zeigte, gewählt. Um unter allen Bedingungen die Position der Plasmamembran zu bestimmen, wurde die Plasmamembran mit dem lipophilen Farbstoff TMA-DPA angefärbt. In den Abb. 9A-E ist ihre Position durch die gestrichelte vertikale Linie im Graphen dargestellt. Die mittels Elektroporation transfizierten PC12-Zellen wurden nach 48 Stunden auf die Expression und die Lokalisation der EGFP-

markierten Munc18-1-Varianten hin untersucht. Das Transmembranprotein Syntaxin1A zeigte im *Linescan*-Profil am Übergang zur Plasmamembran (siehe Abb. 9A), hervorgehoben durch die gestrichelte Linie im Graphen, ein Intensitätsmaximum. Cytolisches EGFP zeigte dort kein Maximum (siehe Abb. 9B), sichtbar durch Vergleich des Intensitätsprofils mit Syntaxin1 an der gestrichelten vertikalen Linie. Wildtyp-Munc18-1 (siehe Abb. 9C), das sowohl im Cytosol als auch an der Membran gebunden vorlag, zeigte ein Profil, das der Summe von cytosolischem und membranlokalisiertem Profil entsprach.

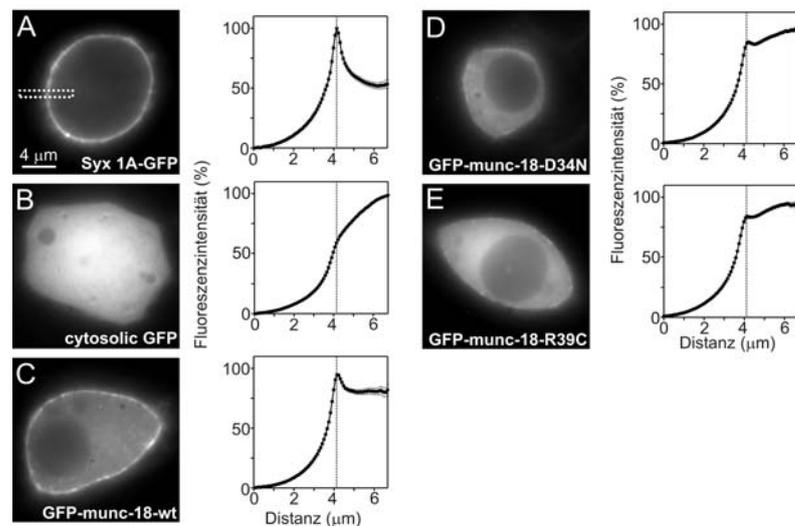


Abb. 9 Expression von EGFP- markierten Varianten von Munc18-1, Syntaxin-EGFP und cytosolischem EGFP

(A und B) Syntaxin1a-EGFP ist an der Plasmamembran konzentriert, wogegen EGFP allein im Cytosol und Zellkern zu finden ist. (C) Wildtyp-EGFP-Munc18-1 zeigt eine starke Anreicherung an der PM, ist aber auch im Cytosol zu finden. (D und E) Die Munc18-1-Mutanten sind weniger stark an der PM, sondern mehr im Cytosol konzentriert. Diagramme, rechts neben den Fluoreszenzbildern: Darstellung der unterschiedlichen räumlichen EGFP-Verteilungen, erhalten aus der Mittelung von *Linescans*. Die Position der PM ist in A-E durch die gestrichelte vertikale Linie angedeutet. Anzahl der in drei Versuchstagen analysierten Zellen: Syntaxin1a-EGFP: 21 Zellen, EGFP: 19 Zellen, Munc18-1-WT: 33 Zellen, Munc18-1-D34N: 37 Zellen, Munc18-1-R39C: 36 Zellen. Diese Daten wurden in der Zwischenzeit publiziert (Schutz, Zilly et al. 2005).

Das Maximum im gemittelten *Linescan*-Profil befand sich an der Plasmamembran. Die Munc18-1-Mutanten, die *in vitro* eine reduzierte Bindung an Syntaxin1A besitzen, zeigten am Übergang zur Plasmamembran keinen deutlichen *Peak* mehr. Das Fluoreszenzmaximum für diese Konstrukte befand sich innerhalb des Cytosols. Eine schwache Bindung an die Membran – entweder über Syntaxin1A oder über ein anderes Protein –

schien jedoch noch vorzuliegen, so dass die Profile nicht dem des cytosolischen EGFPs entsprachen. Diese Daten zeigten in Übereinstimmung mit anderen Veröffentlichungen (Gladycheva, Ho et al. 2004; Liu, Ernst et al. 2004), dass *in vivo* die Lokalisation von Munc18-1 an der Plasmamembran reduziert ist, wenn in Munc18-1 einzelne Aminosäuren der Syntaxin1A Kontaktstellen mutiert werden.

6.2 Charakterisierung von Plasmamembran gebundenem Munc18-1 im *Membrane-Sheet-Assay*

Der *Membrane-Sheet-Assay* erlaubt einen direkten Zugang zu den SNAREs und zu den an sie assoziierten Proteinen. Mit ihm soll im Folgenden eine biochemische Charakterisierung der Munc18-1 Bindung an die Plasmamembran stattfinden. Gegenüber den Experimenten mit intakten Zellen hat der *Assay* den Vorteil, dass kein Gleichgewicht mehr zwischen Plasmamembran und Cytosol lokalisiertem Munc18-1 besteht. Einmal gelöstes Munc18-1 wird durch ein großes Reaktionsvolumen stark verdünnt und kann deshalb nicht mehr zurückbinden.

6.2.1 Die Konzentrierung von Munc18-1 in Mikrodomänen

Munc18-1 bindet Syntaxin1 (Pevsner, Hsu et al. 1994). Syntaxin ist in Mikrodomänen organisiert (Lang, Bruns et al. 2001). Daher sollte untersucht werden, wie die Plasmamembranbindung von Munc18-1 räumlich organisiert ist.

Dafür wurden frisch hergestellte Membranpräparate für eine Stunde fixiert, anschließend mit einem gegen Munc18-1 gerichteten, polyklonalen Antikörper behandelt und mit einem Cy3-fluoreszenzmarkiertem, sekundären Antikörper behandelt. Auf diese Weise konnten die Munc18-1-Bindungsstellen an der Plasmamembran detektiert werden. In der fluoreszenzmikroskopischen Analyse wurde außerdem ein lipidmembranspezifischer Farbstoff eingesetzt, der im blauen Spektralbereich fluoresziert. Anhand seiner Membranmarkierung konnte unabhängig von der Immunfluoreszenz eine Auswahl intakter PC12-

Membranen stattfinden. Die Abb. 10A zeigt ein repräsentatives *Plasma-Membrane-Sheet* mit dazugehöriger Munc18-1-Anfärbung.

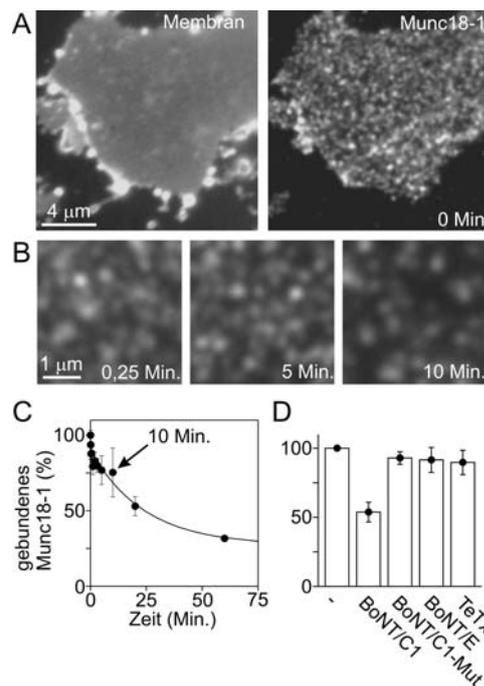


Abb. 10 Charakterisierung von Munc18-1-Komplexen an der nativen Plasmamembran

(A) Munc18-1 ist an Mikrodomänen der Plasmamembran von PC12-Zellen konzentriert. Die *Membrane-Sheets* wurden nach ihrer Herstellung direkt mit Paraformaldehyd fixiert und mit einem Munc18-1-Antikörper angefärbt (siehe rechts). Um die Integrität der Plasmamembran zu dokumentieren, wurde der lipophile Farbstoff TMA-DPH benutzt (links). (B und C) Zeitabhängige Dissoziation des Munc18-1 von der PM. Die Experimente wurden wie in (A) durchgeführt, jedoch zwischen *Membrane-Sheet*-Herstellung und Fixierung für verschiedene Zeitspannen inkubiert. Dies führte zu einer zeitabhängigen Abnahme der Munc18-1-Immunanfärbung (C). Die Immunanfärbung wurde auf direkt fixierte *Membrane-Sheets* normalisiert (N= 3-6 unabhängige Experimente für jeden Datenpunkt; die Daten sind als Mittelwert mit Standardfehler angegeben). (D) Sensitivität des Munc18-1-Akzeptorkomplexes gegenüber SNARE-spezifischen clostridialen Neurotoxinen. Die *Membrane-Sheets* wurden für 10 Min. (siehe in (C) mit einem Pfeil hervorgehobenen Zeitpunkt) in An- oder Abwesenheit von 10 μM des clostridialen Neurotoxins inkubiert. BoNT/C1 schneidet Syntaxin1A, eine BoNT/C1-Mutante wurde als Kontrolle verwendet, BoNT/E schneidet SNAP-25 und Synaptobrevin wird von TeTx geschnitten. Die Daten sind hier auf den Mittelwert der Munc18-1-Anfärbung nach 10 Min. Inkubation normalisiert worden. Der Fehler ist der Standardfehler des Mittelwertes. N= 8. Gepararter t-Test zwischen kein Protein:BoNT/C1 $p < 0.0005$.

Auffällig war, dass Munc18-1 nicht uniform, sondern in Domänen konzentriert an die Membran gebunden war. Dies war nicht überraschend, wenn man berücksichtigt, dass die Munc18-1-Bindung an die Membran über Syntaxin stattfinden sollte, und Syntaxin1A in Mikrodomänen organisiert ist (Lang, Bruns et al. 2001; Lang, Margittai et al. 2002; Ohara-Imaizumi, Nishiwaki et al. 2004).

6.2.2 Stabilität der Munc18-1 Bindung an der Plasmamembran

In einer weiteren Reihe von Experimenten wurde die Bindungsstabilität von Munc18-1 an die Plasmamembran untersucht. Dazu wurden frisch hergestellte Membranen für verschiedene Zeitspannen bei 37° C mit Kalium-Glutamatpuffer inkubiert, anschließend fixiert und das verbleibende Munc18-1 angefärbt. Die Analyse der Immunanfärbungsintensitäten ergab, dass sich Munc18-1 bei Inkubation vor der Fixierung von der Membran löst. Die Zusammenfassung dieses Experimentes ist in der Abb. 10B dargestellt. Nach einer Stunde Inkubation verblieb etwa noch ein Drittel Munc18-1 membrangebunden. Das abdissoziierte Munc18-1 hatte sich mit einer Halbwertszeit von 17 Min. von der Membran gelöst. Dies zeigte, dass die Munc18-1-Bindung auf *Sheets* nicht so stabil ist, wie man anhand der *in vitro* Charakterisierung annehmen würde (Pevsner, Hsu et al. 1994; Yang, Steegmaier et al. 2000).

6.2.3 Munc18-1 bindet über Syntaxin1A an die Plasmamembran

In zahlreichen Veröffentlichungen konnte *in vitro* eine Interaktion zwischen Syntaxin1 und Munc18-1 nachgewiesen werden (Hata, Slaughter et al. 1993; Pevsner, Hsu et al. 1994; Yang, Steegmaier et al. 2000). Auch eine Kristallstruktur dieses Komplexes (aus dem cytosolischen Teil von Syntaxin1A und Munc18-1) ist veröffentlicht (Misura, Scheller et al. 2000). In anderen Studien wurde in intakten Zellen über die Kollokalisierung von Munc18-1 mit Syntaxin1A oder über FRET Messungen die räumliche Nähe und Interaktion gezeigt (Rowe, Calegari et al. 2001; Gladysheva, Ho et al. 2004; Leguia and Wessel 2004; Liu, Ernst et al. 2004)). Um zu prüfen, ob auch in dem hier eingesetzten System eine Bindung über Syntaxin erfolgt, wurden frisch hergestellte Membranen für 10 Min. mit SNARE-spezifischen clostridialen Neurotoxinen behandelt.

Der intrinsische Verlust von Munc18-1 wurde in der experimentellen Gestaltung des Experimentes mit in Betracht gezogen. Daher wurde die Inkubationszeit auf 10 Min. beschränkt und die dort ermittelte Immunfluoreszenz als 100% Referenz gesetzt. Zu diesem Zeitpunkt war auf der einen Seite noch ein Großteil von Munc18-1 an der Membran (ca. 75%,

bezogen auf direkt fixierte Membranen) und auf der anderen Seite eine für die Wirkung von rekombinanten Proteinen ausreichend lange Inkubation möglich.

BoNT/C1 schneidet Syntaxin1A nahe der Transmembrandomäne, BoNT/E entfernt nahezu die Hälfte des zweiten SNARE-Motivs von SNAP-25 und TeTx schneidet Synaptobrevin ebenfalls nahe der Transmembrandomäne (für eine Übersicht siehe (Humeau, Doussau et al. 2000), für eine schematische Darstellung siehe Abb. 5, S. 16). Die Behandlung mit diesen Toxinen sollte bei der Spaltung einer Munc18-1-Bindungsstelle, zusätzlich zum Auswaschen, zu einem weiteren Verlust von Munc18-1 führen. Die Analyse der Immunfluoreszenzintensitäten ergab, dass nach der Herstellung der *Sheets*, sowie Behandlung, Fixierung und Anfärbung für Munc18-1, wie in Abb. 10C dargestellt, nur der Schnitt von plasmalemalen Syntaxin1A die Munc18-1 Anfärbung reduzierte. Eine katalytisch inaktive BoNT/C1-Mutante, die Syntaxin1A noch binden, aber nicht spalten konnte (Xu, Binz et al. 1998), zeigte keinen Einfluss auf die Munc18-1 Anfärbung. Dadurch konnte eine unspezifische Maskierung des Munc18-1-Epitops und eine damit reduzierte Immunanfärbung durch Wildtyp-BoNT/C1 ausgeschlossen werden. Somit war Syntaxin1A als ein Akzeptor von Munc18-1 an der Plasmamembran bestätigt.

6.2.4 Gedockte Granula kolokalisieren mit Munc18-1-Domänen

Aus früheren Arbeiten geht hervor, dass nach der Ultraschallbehandlung Exocytose-kompetente Granula an der Membran gedockt verbleiben (Avery, Ellis et al. 2000). Kürzlich wurde in unserem Labor gezeigt, dass in dem verwendeten System etwas mehr als die Hälfte der gedockten Granula mit Syntaxin1A kolokalisiert sind (Lang, Bruns et al. 2001). Munc18-1 kolokalisiert mit Syntaxin zwar stark, jedoch nicht ausschließlich (Daten nicht gezeigt). Daher wäre es möglich, dass Munc18-1 auf Syntaxin-Domänen sitzt, die keine Granula besitzen.

Um das Ausmaß der Kolokalisation von Munc18-1 mit Granula zu analysieren, wurden PC12-Zellen mit DNS transfiziert, die für das Peptid-Hormon NPY-EGFP kodiert. Von diesen Zellen wurden nach 48 Std.

Membrane-Sheets hergestellt. Diese Membranen wurden direkt nach ihrer Herstellung fixiert und für Munc18-1 angefärbt.

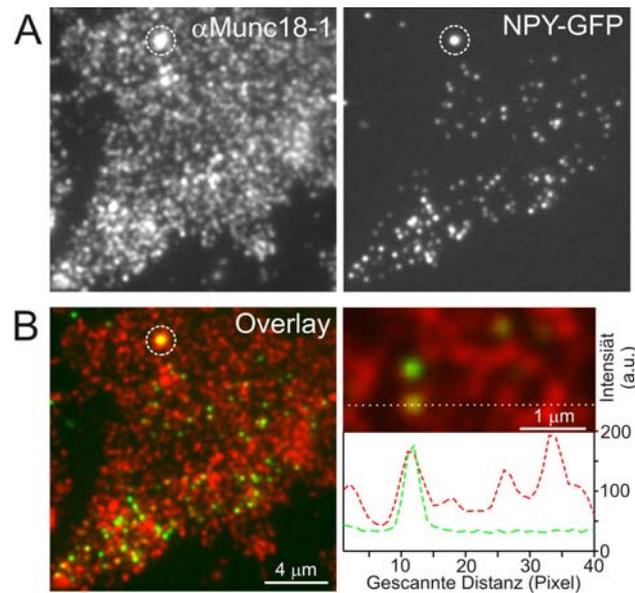


Abb. 11 Docking von sekretorischen Granula an Munc18-1 angereicherte Plasmamembran-Domänen

(A) *Membrane-Sheets* wurden aus NPY-EGFP exprimierenden PC12-Zellen hergestellt. Links ist die Immunanfärbung für Munc18-1 (roter Kanal), rechts sind die an der Membran gedockten EGFP gefüllten Granula (grüner Kanal) sichtbar. Der Kreis markiert die Position eines in beiden Kanälen fluoreszierenden Referenzkügelchens. Mit diesem wurde beim späteren Überlagern der Bilder der räumliche Versatz, der beim Filterwechsel auftritt, korrigiert. (B) Links ist die Überlagerung der beiden in (A) dargestellten Bilder dargestellt. Rechts ist ein vergrößerter Ausschnitt dargestellt. *Linescans* wurden über einzelne Granula zentriert gelegt, wie beispielhaft durch die gestrichelte Linie rechts oben angedeutet. Insgesamt wurden 174 Granula von 10 *Membrane-Sheets* analysiert. Granula wurden als mit Munc18-1 kolocalisierend gewertet, wenn die Maxima von beiden Kanälen einen maximalen Abstand von zwei Pixeln besaßen. Die zufällige Kolocalisation wurde durch Spiegelung der Bilder ermittelt und für die Berechnung der spezifischen Kolocalisation berücksichtigt ((Lang, Margittai et al. 2002)). Eine spezifische Kolocalisation von 70% der Granula mit Munc18-1-Domänen wurde berechnet.

Die Abb. 11A-D zeigen beispielhaft NPY-EGFP gefüllte Granula, die dazugehörige Munc18-1-Anfärbung und die *Linescan*-Analyse zur Bestimmung deren Kolocalisation. Wie in Abb. 11D erkennbar wird, kolocalisierten Granula zu 85% mit Munc18-1-*Clustern*. Mit der in unserem Labor angewandten Formel (Lang, Margittai et al. 2002) wurde für die zufällige Kolocalisation korrigiert und eine reale Kolocalisation von 70% ermittelt. Die Daten sind mit einer früheren Studie konsistent, die Evidenzen für die Kolocalisation von Munc18-1 mit NPY-EGFP gefüllten Granula in PC12-Zellen beschrieben hat (Tsuboi and Fukuda 2006).

6.2.5 Die offene Konformation von Syntaxin bindet nicht Munc18-1

Wie in der Einleitung diskutiert (Verweis zur Einleitung), ist in früheren Arbeiten gezeigt worden, dass Munc18-1 an die geschlossene Konformation von Syntaxin bindet (Misura, Scheller et al. 2000). Die offene Konformation kann Munc18-1 nicht mehr binden (Dulubova, Sugita et al. 1999). In den vorherigen Experimenten wurde Syntaxin1 als Akzeptor für Munc18-1 bestätigt. Um diese Bindung besser zu verstehen, wurde im nächsten Schritt die Konformation von Syntaxin1 in diesem Komplex untersucht.

Dafür wurde ein Coexpressions-Experiment durchgeführt. Hier wurden PC12-Zellen mit Plasmid-DNS, die für Myc-markiertes Munc18-1 und Syntaxin1A-mEGFP kodiert, cotransfiziert. Nach 48 Std. wurden von den doppelt-transfizierten Zellen *Membrane-Sheets* hergestellt und diese direkt fixiert. Mit einem *anti-Myc*-Antikörper wurde das überexprimierte membrangebundene Munc18-1 quantifiziert. Parallel dazu wurde die korrespondierende Syntaxin Plasmamembranlokalisation über die mEGFP-Fluoreszenz analysiert. Die Daten von zehn unabhängigen Experimenten sind in der Abb. 12B und D dargestellt. Die Regressionsgeraden durch die entsprechenden Datenpunkte zeigen anhand ihrer unterschiedliche Steigung, dass bei Expression von Wildtyp-Syntaxin1A deutlich mehr überexprimiertes Munc18-1 an die Membran rekrutiert wurde als bei Expression der offenen Syntaxin1A Mutante. Für die schwache Steigung bei Überexpression der offenen Mutante sorgte vermutlich das endogene Syntaxin1A, das nach und nach mit überexprimiertem Munc18-1 abgesättigt wurde. Dieses Experiment bestätigte einmal mehr, dass Syntaxin Bindungspartner von Munc18-1 an der Membran ist. Darüber hinaus demonstriert dieses Experiment, dass die Konformation von Syntaxin1A entscheidend für die Rekrutierung ist. Die Fähigkeit, die geschlossene Konformation anzunehmen, ist für eine effiziente Munc18-1 Bindung essentiell.

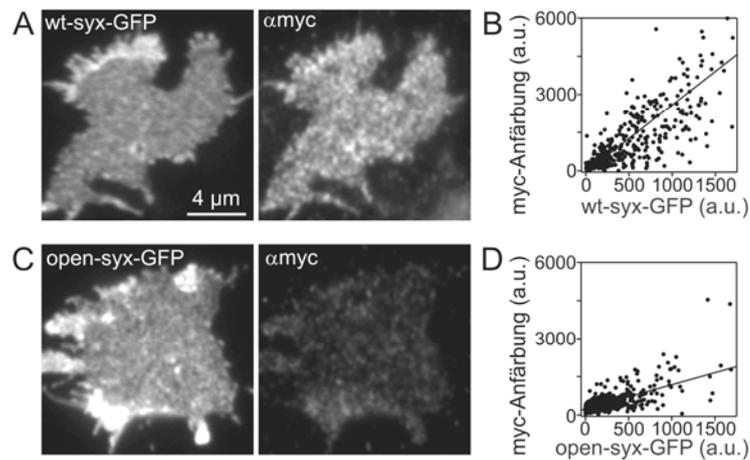


Abb. 12 Zur Rekrutierung von Munc18-1 an die PM muss Syntaxin1A die geschlossene Konformation annehmen können

Ko-Überexpression von Myc-markiertem Munc18-1 mit Syxtaxin1A-mEGFP (A und B) oder der Mutante Open-Syntaxin1A-mEGFP (C und D). Die Rekrutierung von überexprimiertem Munc18-1 zur Membran wurde mit einer Myc-Antikörperfärbung untersucht. Bei beiden Bedingungen wurde für jedes *Sheet* die Menge an überexprimierten Syntxin und rekrutiertem Munc18-1 bestimmt und gegeneinander aufgetragen (B und D). Eine Regressionsgerade wurde durch die Datenpunkte gelegt. Es wurden in 10 unabhängigen Experimenten 411 *Sheets* für Wildtyp und 417 *Sheets* für Open-Syntxin analysiert.

Die bisherigen Ergebnisse zeigten also, dass Munc18-1 über Syntaxin1A an die Membran bindet, und dass Syntaxin1A hierfür befähigt sein muss, die geschlossene Konformation anzunehmen. Diese Daten stimmten mit der oben genannten *in vitro* Studie, wie auch mit früheren *in vivo* Studien (Gladychewa, Ho et al. 2004; Liu, Ernst et al. 2004) überein. Des weiteren kolokalisiert Munc18-1 mit NPY-EGFP Granula, wofür Evidenzen in der Literatur beschrieben wurden (Tsuboi and Fukuda 2006). Somit wurde geschlossen, dass der *Membrane-Sheet-Assay*, in dem nativorganisierte Protein-Komplexe in der Membran enthalten sind, die Exocytose auslösen können (Lang, Bruns et al. 2001), geeignet ist, um die Munc18-1-Plasmamembranbindung zu untersuchen, da er die wesentlichen Befunde früherer Untersuchungen bestätigt.

6.2.6 Der Munc18-1-Akzeptorkomplex ist Synaptobrevin-sensitiv

Der *Membrane-Sheet-Assay* bietet besondere Rahmenbedingungen für die durchgeführten Experimente an. Die untersuchten Proteine liegen in ihrer natürlichen Konzentration, in ihren nativen stöchiometrischen Verhältnissen und Mikrodomänen-Organisation vor (Lang, Bruns et al. 2001). Reaktionen

sind eventuell beschleunigt, da nur eine laterale Diffusion möglich ist. Die bisherigen Ergebnisse deuten in diesem System auf eine schwächere Munc18-1-Syntaxin1-Bindung, als von *in vitro* Studien erwartet (Pevsner, Hsu et al. 1994). Daher ist fraglich, ob hier, wie *in vitro* beobachtet (Pevsner, Hsu et al. 1994; Yang, Steegmaier et al. 2000), die Munc18-1-Bindung die SNARE-Komplexbildung inhibiert.

In früheren Experimenten konnte gezeigt werden, dass im *Membrane-Sheet-Assay* die Zugabe von rekombinantem Synaptobrevin2 das endogene Syntaxin1A in *Core*-Komplexe treibt (Lang, Margittai et al. 2002). Wenn Munc18-1 an die geschlossene Konformation von Syntaxin1A bindet, in der Syntaxin1A für Interaktionen mit den anderen SNAREs unzugänglich ist, dann sollte dieses Syntaxin nicht zur Komplexbildung zur Verfügung stehen. Sollte jedoch Munc18-1 an eine Syntaxin-Konformation binden, die zwischen der offenen und geschlossenen Konformation liegt, wäre eine Interaktion mit Synaptobrevin2 möglich und das vormals Munc18-1 gebundene Syntaxin könnte ebenfalls in den SNARE-Komplex gelangen. Dabei müsste sich Munc18-1 von der Membran lösen, da Munc18-1 nicht an assemblierte SNARE-Komplexe binden kann (Yang, Puranam et al. 2000). Daher wurden Experimente angeschlossen, in denen überprüft wurde, ob Synaptobrevin2 Munc18-1 von der Membran löst. Dazu wurden frische PC12-Zell-Sheets mit 10 μ M rekombinantem Synaptobrevin2 für 10 Min. inkubiert, und die Membranen fixiert. Die verbliebene Menge an membrangebundenem Munc18-1 wurde durch eine Immunanfärbung untersucht. Die Auswertung der Immunfluoreszenz zeigte nach dieser Behandlung einen starken Verlust von Munc18-1. Im Vergleich zu 10 Min. ohne rekombinantem Protein kam es zu einer Abnahme von etwa 50% der Immunanfärbung (siehe Abb. 13A). Wenn man berücksichtigt, dass ein Drittel sich nicht von der Membran löst, ist fast das gesamte abdissoziierbare Munc18-1 verdrängt worden. Dieser Verlust von Munc18-1 wurde nicht bei Inkubation mit Syntaxin1A und SNAP-25 beobachtet. Zur genaueren Charakterisierung dieses Effektes wurde der Zeitverlauf des Munc18-1 Verlustes untersucht. Dazu wurden frisch hergestellte Membranen für 5, 10, 30 und 60 Min. mit 10 μ M Synaptobrevin inkubiert. Als Referenz diente Kalium-Glutamatpuffer ohne Zusatz von

rekombinantes Protein. Die relative Munc18-1 Immunfluoreszenz bezog sich hier auf direkt fixierte Membranen. Wie in Abb. 13B zu sehen, beschleunigte Synaptobrevin den intrinsischen Verlust des Munc18-1 von der Membran. Die Halbwertszeit, mit der das freisetzbare Munc18-1 die Membran verließ, wurde von 17 Min. auf 7 Min. reduziert.

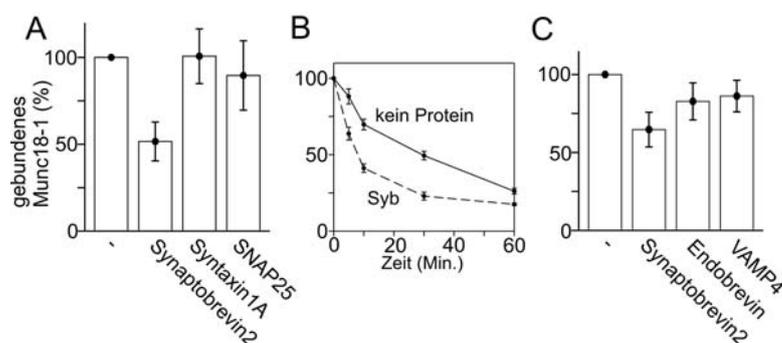


Abb. 13 Synaptobrevin setzt Munc18-1 von Syntaxin1A frei

(A) *Membrane-Sheets* wurden für 10 Min. in Abwesenheit von rekombinantes Protein (als 100% Wert gesetzt) oder Anwesenheit von 10 μ M rekombinantes SNARE-Protein inkubiert, anschließend fixiert und für Munc18-1 angefärbt. Die Munc18-1 Anfärbung wurde quantifiziert. Jedes Experiment wurde 6-7 Mal durchgeführt. Die Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt. Gepaarter t-Test kein Protein:Synaptobrevin2 $p < 0.00005$ (N=7). (B) Inkubation der *Membrane-Sheets* mit oder ohne 10 μ M Synaptobrevin2 für verschiedene Zeitspannen. Anschließend Fixierung und Munc18-1-Anfärbung, gefolgt von der Quantifizierung. Die Immunanfärbung direkt fixierter *Sheets* wurde als 100% gesetzt. Es sind Mittelwerte von 4-6 unabhängigen Experimenten mit dem Standardfehler angegeben. (C) Das Experiment wurde wie in (A) durchgeführt, hier wurden jedoch für 10 Min. 10 μ M verschiedener R-SNAREs zum Reaktionsmix gegeben. Es sind Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben. Gepaarter t-Test Synaptobrevin2:none $p < 0.00005$ (N= 10), Synaptobrevin2:Endobrevin $p < 0.0005$ (N= 10), nicht-gepaarter t-Test Synaptobrevin2:VAMP4 $p < 0.005$ (N= 10 und N= 6).

In weiteren Experimenten wurde untersucht, ob diese Reaktion für Synaptobrevin spezifisch war, oder ob andere R-SNAREs Synaptobrevin in der Freisetzungsreaktion ersetzen können. Frühere Studien zeigten, dass R-SNAREs, wie zum Beispiel Endobrevin, ähnlich stabile SNARE-Komplexe mit Syntaxin1A und SNAP-25 bilden können wie Synaptobrevin (Fasshauer, Antonin et al. 1999; Yang, Gonzalez et al. 1999). In Liposomenfusionsexperimenten mit neuronalen SNAREs können *non-cognate*-R-SNAREs die Fusion verhindern (Schuette, Hatsuzawa et al. 2004) und, integriert in Liposomen, ebenso effizient die Fusion herbeiführen (ALEXANDER STEIN, persönliche Mitteilung). Auf der anderen Seite deutet eine Studie am SM-Protein-Homolog Sly1p darauf hin (Peng and Gallwitz 2002), dass die Bindung des SM-Proteins die Spezifität der SNARE-

Komplexbildung erhöht. Dies bedeutet, dass Munc18 die Reaktion mit Synaptobrevin gegenüber anderen R-SNAREs begünstigen könnte.

In diesen Experimenten wurden frisch hergestellten *Sheets* mit Kalium-Glutamatpuffer, der mit 10 μ M der rekombinanten R-SNAREs Synaptobrevin, Endobrevin oder Vamp4 versetzt war, inkubiert, anschließend fixiert, für Munc18-1 angefärbt und die Immunanfärbung quantifiziert (Abb. 13C). Diese Experimentserie wurde, ein Jahr nach dem ursprünglichen Synaptobrevin-Befund, mit einer neuen Antikörpercharge durchgeführt, weshalb hier vermutlich etwas höhere Mittelwerte erhalten wurden. Durch die Zugabe von Synaptobrevin2 zeigten die Experimente wieder einen deutlichen Verlust von Munc18-1. Wie die t-Test Analyse zeigte, war dieser Effekt signifikant stärker als bei den anderen R-SNAREs. Die Mittelwerte von Endobrevin und Vamp4 unterschieden sich ebenfalls signifikant von der Kontrolle.

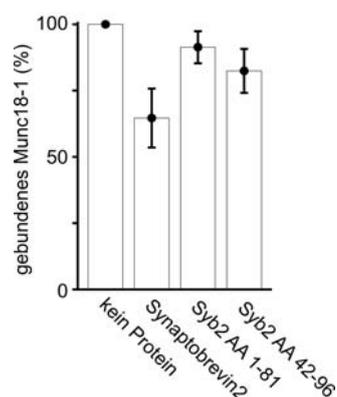


Abb. 14 Trunkierte Varianten von Synaptobrevin2 setzten Munc18-1 nicht frei

Das Experiment wurde parallel zu dem in Abb. 13C durchgeführt. Die *Membrane-Sheets* wurden für 10 Min. in Abwesenheit von rekombinantem Protein (als 100% Wert gesetzt) oder Anwesenheit von 10 μ M rekombinanten R-SNARE-Protein inkubiert, anschließend fixiert und für Munc18-1 angefärbt. Die Munc18-1 Anfärbung wurde quantifiziert. Jedes Experiment wurde 4 Mal durchgeführt. Als rekombinante Proteine wurden Synaptobrevin2 AA 1-96, AA 1-81, und AA 42-96 eingesetzt. Es sind Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben. N= 4, gepaarter t-Test Synaptobrevin:kein Prtotein $p < 0.005$.

Um einen mechanistischen Einblick in die Synaptobrevin induzierte Verdrängung von Munc18-1 zu erlangen, wurde ein Experiment angeschlossen, in dem verkürzte Varianten von Synaptobrevin auf ihren Einfluss auf die Munc18-1-Bindung hin untersucht wurden. Damit sollte geklärt werden, welcher Teil des Synaptobrevin2 für seinen Einfluss auf die Munc18-Bindung wichtig war, ob zunächst eine N-terminale oder C-

terminale Komplexbildung stattfand und welche Bereiche von Synaptobrevin eventuell für die Verdrängung genügten (vergleiche Abb. 5, S.16). Dazu wurde eine N-terminale (AA 42-96) und eine C-terminale (AA 1-81) Verkürzung von löslichem Synaptobrevin eingesetzt. Durch Deletion der ersten 41 AA fehlten dem Synaptobrevin der unstrukturierte N-terminale Bereich (Brunger 2005) und die drei ersten SNARE-Motiv-Schichten. Die Verkürzung um die letzten 15 Aminosäuren entfernte die beiden letzten SNARE-Motiv-Schichten (Fasshauer, Sutton et al. 1998).

Die frisch hergestellten *Membrane-Sheets* wurden für 10 Min. mit Synaptobrevin AA 1-96, AA 1-81 bzw. AA 42-96 inkubiert, anschließend fixiert und gegen Munc18-1 angefärbt. Die Ergebnisse der Immunanfärbungsanalyse sind in Abb. 14 dargestellt. Hier zeigte sich, dass von den drei verglichenen rekombinanten SNAREs einzig das Synaptobrevin2 AA 1-96 Munc18-1 signifikant von der Membran lösen konnte (gepaarter t-Test $p < 0.005$). Es schien, dass schon der Verlust der beiden letzten SNARE-Motiv-Schichten ausreichte um die Effizienz der Munc18-1-Freisetzung drastisch zu reduzieren. Es war nicht ganz klar, ob im Fall der Trunkierung AA 42-96 der Verlust der drei ersten SNARE-Layer, oder der nicht im SNARE-Motiv enthaltenen N-terminalen Domäne die Effizienz der Munc18-1-Freisetzung reduzierte. Zur Klärung wäre der Einsatz weiterer Synaptobrevin-Trunkierungen nötig. Mechanistisch scheinen sowohl der N-, als auch der C-Terminus von Synaptobrevin für die Freisetzung des Munc18-1 notwendig zu sein.

6.2.7 Die durch Synaptobrevin2 induzierte Munc18-1-Verdrängung ist nicht auf PC12-Zellen beschränkt

Um zu zeigen, dass die gefundene Freisetzung von Munc18-1 nicht nur PC12-Klon 251 spezifisch ist, sondern auch in anderen Zelltypen auftritt, wurden in dem nächsten Experiment *Membrane-Sheets* aus einer Primärkultur von *bovinen* chromaffinen Zellen hergestellt.

Diese wurden für 10 Min. mit $10 \mu\text{M}$ rekombinantem Synaptobrevin2 inkubiert und fixiert. Danach wurden sie für eine Stunde gegen Munc18-1 angefärbt. Da die Primärkultur neben chromaffinen Zellen auch Fibroblasten enthält, wurde anschließend für 30 Min. gegen Syntaxin1

angefärbt, was der Identifizierung der chromaffinen Zellen diente. Diese Detektion erfolgte in einem zweiten Schritt, um sterische Behinderungen des Munc18-1-Antikörpers durch den Syntaxin-Antikörper bei der Munc18-1-Anfärbung auszuschließen. Das Ergebnis der Quantifizierung ist in Abb. 15 dargestellt. Hier zeigte sich, dass auch in *bovinen* chromaffinen Zellen Synaptobrevin2 Munc18-1 von der Membran löste. Es konnte also ausgeschlossen werden, dass es sich um einen zelltypspezifischen Effekt handelte. Im Abschnitt 6.2.10 wurde dies ebenfalls für chromaffine Zellen von der Maus gezeigt.

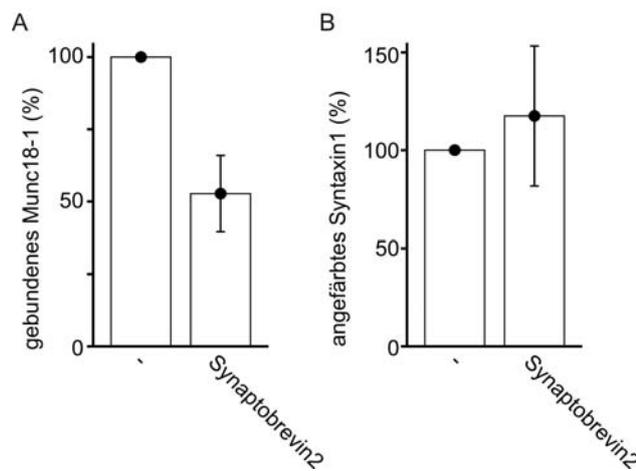


Abb. 15 Der durch Synaptobrevin2 induzierte Verlust von Munc18-1 ist auch in *bovinen* chromaffinen Zellen zu beobachten

Membrane-Sheets wurden aus *bovinen* chromaffinen Zellen hergestellt. Sie wurden für 10 Min. mit bzw. ohne 10 μ M Synaptobrevin inkubiert. Es folgte die Fixierung, Immunanfärbung für Munc18-1, anschließend für Syntaxin1 und die Quantifizierung (für Details siehe Material und Methoden, Kap. 5.2.12, S. 38). Die Ergebnisse der Munc18-1- (A) und Syntaxin-Quantifizierung (B) sind als Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt (N= 4). Für Munc18-1: gepaarter t-Test: Synaptobrevin2:kein Protein $p < 0.006$.

Die in Abb. 15B dargestellte Quantifizierung der Syntaxin-Anfärbung ergab, dass wie auch in PC12-Zellen (Daten nicht gezeigt), die Syntaxin1A-Anfärbung nicht durch Inkubation mit Synaptobrevin abnahm. Dies schloss zusätzlich eine Abnahme der Munc18-1-Anfärbung durch Synaptobrevin verursachtes Verkleben der Membran aus.

6.2.8 Das rekombinante Synaptobrevin wirkt auf Syntaxin gebundenes Munc18-1

Es wurde gezeigt, dass sowohl der Verdau von Syntaxin1 mit BoNT/C1 als auch die Inkubation mit Synaptobrevin die Menge an Plasmamembran gebundenem Munc18-1 reduziert. Dies könnte einen einzigen oder unterschiedliche Munc18-Pools, mit unterschiedlichen Membranbindungsmechanismen, involvieren. Wenn das Toxin und Synaptobrevin auf denselben Pool wirken, dürfte deren kombinierte Wirkung auf Munc18-1 nicht additiv sein. Ansonsten sollte ein stärkerer Verlust von Munc18-1 zu beobachten sein.

Um zu klären, ob unterschiedliche Munc18-1-Pools existieren, wurden Experimente in PC12-Zellen angeschlossen. In diesen wurden frische Plasmamembranpräparationen zunächst für 5 Min. mit dem Syntaxin1A spezifischen Toxin BoNT/C1, anschließend für 10 Min. mit einer Kombination aus Toxin und 10 μ M Synaptobrevin inkubiert. Nach Fixierung wurden die Membranen zunächst für eine Stunde gegen Munc18-1, dann für eine halbe Stunde gegen Syntaxin1A angefärbt, um die Toxin-Schnitteffizienz zu überprüfen.

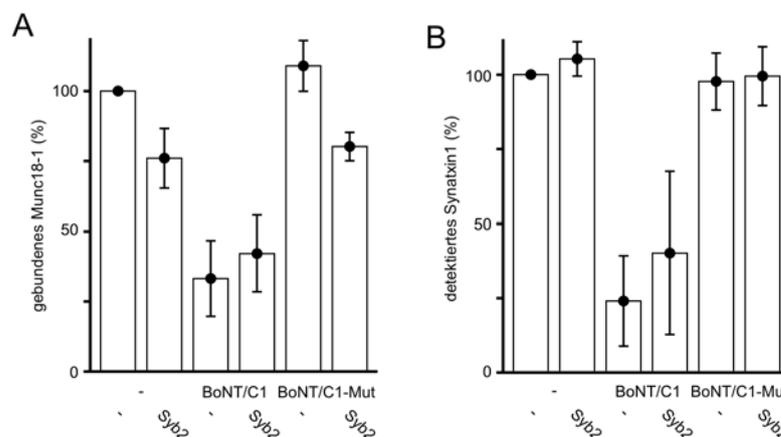


Abb. 16 Synaptobrevin und BoNT/C1 wirken auf den gleichen Munc18-1 Akzeptor

Membrane-Sheets von PC12-Zellen wurden für 5 Min. mit bzw. ohne Syntaxin1 spezifischer Protease BoNT/C1 behandelt. Als Kontrolle diente eine inaktive Mutante. Anschließend wurden die *Sheets* für 10 Min. mit einer neuen Reaktionslösung behandelt, die die gleichen Komponenten der ersten Lösung und, wenn angegeben, noch zusätzlich Synaptobrevin2 enthielt. Nach Fixierung wurden die *Sheets* zunächst für Munc18-1, in einem zweiten Schritt für Syntaxin angefärbt. Die Abbildung zeigt die Ergebnisse der Quantifizierung der Munc18-1- (A) und Syntaxin1- Immunfluoreszenzanalyse (B). Die Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben (N= 3-4).

Die Quantifizierung ergab, wie in Abb. 16A dargestellt, dass die Kombination von Synaptobrevin und BoNT/C1 nicht zu einem zusätzlichen Verlust von Munc18-1 führt. Die beiden einzelnen Effekte sind also nicht additiv, wirken also auf die gleiche Munc18-1-Bindungsstelle: auf Syntaxin1A. Somit ist das durch Synaptobrevin verdrängte Munc18-1 ebenfalls Syntaxin gebunden. Bei einer 15minütigen Inkubation wäre nach Abb. 13 zwischen Kontrollbedingung und Synaptobrevin eine Differenz von etwa 40% in der Immunanfärbung zu erwarten gewesen. Aus nicht geklärten Gründen war in diesem Experiment die durch Synaptobrevin induzierte Freisetzung etwas schwächer.

Die Auswertung der Syntaxin-Anfärbung in Abb. 16B zeigte durch die Immunfluoreszenzabnahme deutlich die Aktivität des eingesetzten Wildtyp-Toxins. Die Immunfluoreszenz war nach Behandlung mit der inaktiven BoNT/C1-Mutante nicht reduziert. Wie schon in Kap. 6.2.3, S. 49, diskutiert und in Abb. 10, S. 48, gezeigt, schließt dies aus, dass der für Wildtyp-BoNT/C1 beobachtete Immunfluoreszenzabfall durch ein Verkleben der Plasmamembran und dadurch verursachte Epitop-Unzugänglichkeit begründet ist.

6.2.9 Die C-terminale Spaltung von plasmalemalem SNAP-25 zeigt keinen Einfluss auf den Synaptobrevin-induzierten Verlust von Munc18-1

Wie von unserer Arbeitsgruppe in einer früheren Arbeit gezeigt wurde, wird rekombinantes Synaptobrevin₂ über die SNARE-Komplexbildung mit endogenen SNAREs in die Plasmamembran eingebaut (Lang, Margittai et al. 2002). Arbeiten anderer Gruppen haben gezeigt, dass mit dem Toxin BoNT/E behandeltes SNAP-25, das um 26 Aminosäuren C-terminal verkürzt ist (siehe Abb. 5) und somit fast die Hälfte seines zweiten SNARE-Motiv verliert, *in vitro* einen Komplex mit Syntaxin und Synaptobrevin₂ bilden kann. Dieser Komplex ist nicht mehr SDS-resistent (Hayashi, McMahon et al. 1994) und hat eine deutlich reduzierte thermische Stabilität (Fasshauer and Margittai 2004). Trotzdem bilden *in vitro* die cytosolischen Fragmente mit nahezu unverminderter Geschwindigkeit den SNARE-Komplex (Fasshauer and Margittai 2004). Dieser Komplex kann mit NSF

und α -SNAP unter Verbrauch von ATP gelöst werden (Hayashi, Yamasaki et al. 1995). Im Liposomenfusionsassay verhindert jedoch die Zugabe von BoNT/E die Fusion (Schuette, Hatsuzawa et al. 2004) und *in vivo*, z. B. in HIT-Zellen, einer β -Zell-Linie, verursacht der Schnitt von SNAP-25 eine Reduktion der stimulierten Insulinfreisetzung um 60% (Sadoul, Lang et al. 1995).

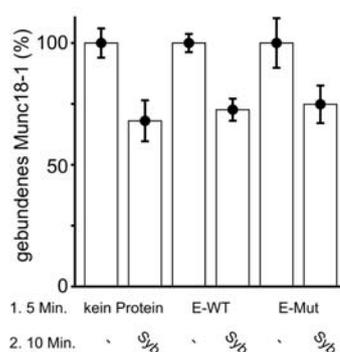


Abb. 17 Der Schnitt von SNAP-25 mit BoNT/E verhindert nicht die Synaptobrevin induzierte Munc18-1 Freisetzung

Ähnlich wie beim vorherigen Experiment (Abb. 16), wurden *Membrane-Sheets* von PC12-Zellen in zwei Phasen mit Reaktionspuffern inkubiert. Zunächst wurden die *Sheets* für 5 Min. mit oder ohne SNAP-25 spezifischem clostridialen Neurotoxin BoNT/E behandelt. Als Kontrolle diente eine inaktive Mutante. Darauf wurden die *Sheets* für 10 Min. mit einer Reaktionslösung behandelt, die in der Kontrollbedingung der Zusammensetzung der bisherigen Lösung entsprach und der bei Stimulationsbedingung noch 10 μ M Synaptobrevin2 beigefügt wurde. Nach der Fixierung wurden die *Sheets* für Munc18-1 angefärbt. Kontrollanfärbungen gegen den C-Terminus zeigten dass durch die Toxin-Behandlung 90% des anfärbaren SNAP-25 geschnitten wurde (Daten nicht gezeigt). Die Daten sind als Mittelwerte mit Standardfehler angegeben (N= 6).

In unserem experimentellen Ansatz reduziert BoNT/E den Einbau von rekombinantem Synaptobrevin2 in die Plasmamembran (Lang, Margittai et al. 2002). Wie oben, in Abbildung Abb. 10C gezeigt, hatte BoNT/E selbst keinen Einfluss auf die Stabilität von Munc18-1. Es kam jedoch die Frage auf, ob ein Schnitt mit BoNT/E die Synaptobrevin induzierte Lösung des Munc18-1-Syntaxin1A-Komplexes verhindert, da Synaptobrevin unter diesen Bedingungen nicht stabil eingebaut werden kann. Zur Beantwortung dieser Frage wurden frische PC12-Membranen mit BoNT/E für 5 Min. vorbehandelt. Anschließend wurden die Membranen mit einer Mischung aus BoNT/E und Synaptobrevin für 10 Min. inkubiert und fixiert. Als Kontrolle diente eine inaktive BoNT/E-Mutante, die SNAP-25 nicht mehr schneiden kann (Agarwal, Eswaramoorthy et al. 2004). Die Auswertung der

anschließend erfolgten Munc18-1 Immunanfärbung ist in Abb. 17 dargestellt. Hier wurde deutlich, dass trotz Behandlung mit BoNT/E die Zugabe von Synaptobrevin2 immer noch Munc18-1 von der Membran löste. Die Anfärbung mit einem gegen den C-Terminus von SNAP-25 gerichteten Antikörper zeigte in einem Kontrollexperiment, dass 90% des detektierbaren SNAP-25 innerhalb von 15 Min. gespalten wurden (Daten nicht gezeigt). In diesem Experiment schien der Schnitt von SNAP-25 keinen Einfluss auf die Freisetzung von Munc18-1 durch Synaptobrevin zu haben. Drei Szenarien sind denkbar:

- 1) Der SNAP-25 C-Terminus, der durch die Toxinbehandlung verloren geht, ist nicht an dem Synaptobrevin mediierten Munc18-1 Verlust beteiligt.
- 2) Es gibt ein Pool an protektiertem SNAP-25, das für das Toxin nicht zugänglich gewesen ist.
- 3) Da SNAP-25 im 40-fachen Überschuss vorhanden ist (Verhältnis Munc18-1:Syntaxin 1:20 (Schutz, Zilly et al. 2005); Syntaxin:SNAP-25 1:2 (THORSTEN LANG, persönliche Mitteilung)), wäre auch denkbar, dass ein Verbleib von ca. 10% ungeschnittenem SNAP-25 ausreicht, um zusammen mit Synaptobrevin Munc18-1 von der Membran zu verdrängen.

6.2.10 SNAP-25 ist für den Synaptobrevin-induzierten Verlust von Munc18-1 essentiell

Um eindeutig zu klären, inwiefern SNAP-25 an dem Verlust von Munc18-1 durch Synaptobrevin beteiligt ist, wurde dieser Vorgang in einem System untersucht, in dem kein SNAP-25 vorhanden ist. Dazu wurden Experimente an embryonalen, *murinen* chromaffinen Zellen durchgeführt. Diese wurden entweder aus Wildtyp oder homozygoten *snap25*-knockout Embryonen gewonnen (E16-18). Die chromaffinen Zellen wurden für 24 Stunden auf einem Deckglas kultiviert und dann zur Herstellung von Plasmamembranen benutzt. Diese wurden für 10 Min. mit 10 μ M Synaptobrevin inkubiert, anschließend fixiert und zunächst gegen Munc18-1 und dann gegen Syntaxin1A angefärbt, um die von neuroendokrinen Zellen generierten Membranen besser zu identifizieren (siehe auch Experimente mit *bovinen* Zellen, Kap. 6.2.7, S. 57).

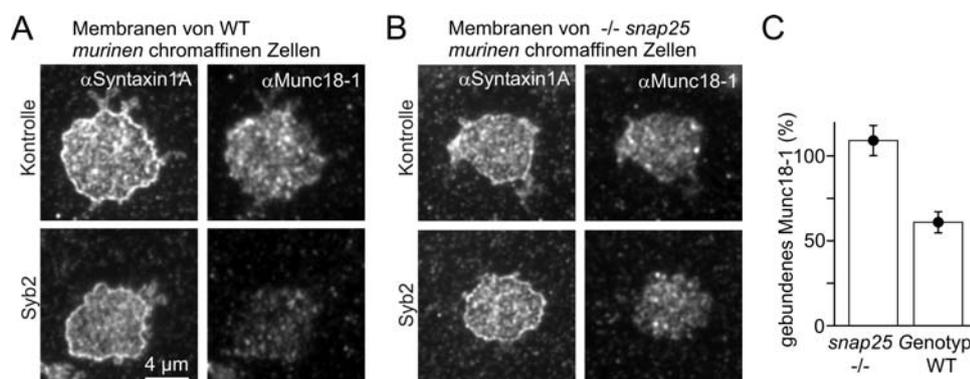


Abb. 18 SNAP-25 ist für die Synaptobrevin induzierte Munc18-1-Freisetzung notwendig

Membrane-Sheets wurden aus WT und *snap25-knockout murinen* chromaffinen Zellen hergestellt. Diese wurden für 10 Min. mit bzw. ohne 10 μ M Synaptobrevin2 inkubiert, anschließend fixiert, dann zunächst für Munc18-1, darauf für Syntaxin1 angefärbt. Syntaxin1 wurde ebenfalls angefärbt, um eine Analyse von Fibroblastenzellen auszuschließen, die sich ebenfalls in der Primärkultur befinden. (A) Repräsentative Syntaxin- und Munc18-1-Anfärbung von *Sheets* aus WT *murinen* chromaffinen Zellen, die mit bzw. ohne Synaptobrevin inkubiert wurden. (B) Wie (A), jedoch waren die Zellen von *snap25-knockout* Zellen. (C) Ergebnis der Quantifizierung der Munc18-1-Immunanfärbung. Es sind die Mittelwerte mit Standardfehler dargestellt. Die Normalisierung erfolgte je Genotyp auf die mittlere Immunanfärbung ohne Synaptobrevin2-Behandlung. Nur auf *Sheets* von Wildtyp-Zellen ist eine durch Synaptobrevin induzierte Abnahme der Munc18-1-Immunanfärbung zu beobachten. N= 7, gepaarter t-Test WT:KO p<0.005.

Die Abbildung Abb. 18A und B stellen beispielhaft die in einem solchen Experiment erhaltenen *Plamamembrane-Sheets* dar. Hier ist erkennbar, dass nur Membranen von Wildtyp-Tieren den Munc18-1-Verlust nach Behandlung mit Synaptobrevin zeigten (siehe auch Quantifizierung in Abb. 18C). Die Syntaxin1A-Menge an der Membran war nicht signifikant unterschiedlich, was Abb. 18A und B illustrieren. Die Menge an membrangebundenem Munc18-1 war bei beiden Genotypen gleich, sofern kein Synaptobrevin hinzugegeben wurde. Vorläufige Experimente bestätigten dies auch für direkt fixierte Membranen. Damit wurde gezeigt, dass SNAP-25 für den Synaptobrevin gesteuerten Munc18-1 Verlust notwendig war, aber offenbar nicht stabilisierend auf die Munc18-1-Bindung an Syntaxin1 wirkte.

6.3 Analyse des Zustands der SNARE-Domänen nach Erhöhung der Calciumkonzentration

6.3.1 Nanomolares Calcium führt zu einer drastischen Änderung des Immunanfärbungsmusters von SNAREs

Im vorherigen Teil der Arbeit wurde die Bindung von Munc18-1 an die Plasmamembran untersucht. Es wurde gezeigt, dass diese über Syntaxin1A stattfindet, in dessen Nähe sich ein SNAP-25 Molekül befinden musste. In diesem Teil der Arbeit soll untersucht werden, wie sich die SNAREs und Munc18-1 bei der Erhöhung der freien Calciumkonzentration, wie bei dem intrazellulären Anstieg während der Exocytose, verhalten.

Wie in früheren Arbeiten dokumentiert wurde, liegen die SNAREs in neuroendokrinen Zellen in Mikrodomänen konzentriert vor (Lang, Bruns et al. 2001; Lang, Margittai et al. 2002). Dies wurde auch in anderen Zelltypen und den nicht-neuronalen SNARE-Homologen beobachtet (BHK-Zellen:(Lang, Bruns et al. 2001), MIN6-Zellen: (Ohara-Imaizumi, Nishiwaki et al. 2004), beta-Zellen: (Ohara-Imaizumi, Nishiwaki et al. 2004)). Diese Mikrodomänen liegen in einer zu hohen Dichte vor, um sie mit konventioneller Lichtmikroskopie aufzulösen. In mehreren Arbeiten, wie auch in der hier vorliegenden, konnte gezeigt werden, dass Granula mit Syntaxin- (Lang, Bruns et al. 2001), SNAP-25 (Ohara-Imaizumi, Nishiwaki et al. 2004) und Munc18-1-Mikrodomänen ((Tsuboi and Fukuda 2006), diese Arbeit) an den Granula-Dockingstellen lokalisiert sind. Dies provozierte die Frage, ob die Erhöhung der Calciumkonzentration, eine Bedingung, unter der sonst Granula mit der Membran fusionieren, Umorganisationen der SNARE-Domänen, Komplexbildungen zwischen SNAREs oder Änderungen des SNARE-Aktivitätszustandes hervorruft. Daher wurde in den nächsten Experimenten die freie Calciumkonzentration auf verschiedene Weisen erhöht und der Einfluss auf die SNAREs untersucht.

Eine laterale Umorganisation der Mikrodomänen würde durch ein verändertes Anfärbemuster erkennbar sein. Ein stärkeres Clustering von Domänen, wie auch Konformationsänderungen oder Komplexbildungen von Proteinen würde zu einer generellen Abnahme der Immunanfärbung führen.

6.3.2 Die Depolarisation von *bovinen* chromaffinen Zellen führt zum Antigenizitätsverlust der SNARE-Proteine

Mit diesem Experiment wurde untersucht, ob die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration, wie sie während eines physiologischen Stimulus stattfindet, Einfluss auf die Antigenizität bzw. auf die Organisation der SNARE-Proteine hat. Es wurden *bovine* chromaffine Zellen gewählt, da diese im Vergleich zu PC12-Zellen mehr Calciumkanäle besitzen und so eine effizientere Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels nach Depolarisation zulassen. Die chromaffinen Zellen wurden für 1-5 Min. in hoch oder niedrig konzentriertem Kaliumpuffer gehalten, um so durch Depolarisation die intrazelluläre Calciumkonzentration zu manipulieren. Anschließend wurden die Zellen fixiert und eine Ganzzellanfärbung durchgeführt. Die darauf folgende Untersuchung bezog sich lediglich auf Syntaxin1A und SNAP-25, da bekannt war, dass plasmamembranständiges Munc18-1 in einer Ganzzellanfärbung nicht repräsentativ detektiert werden kann (Schütz 2003).

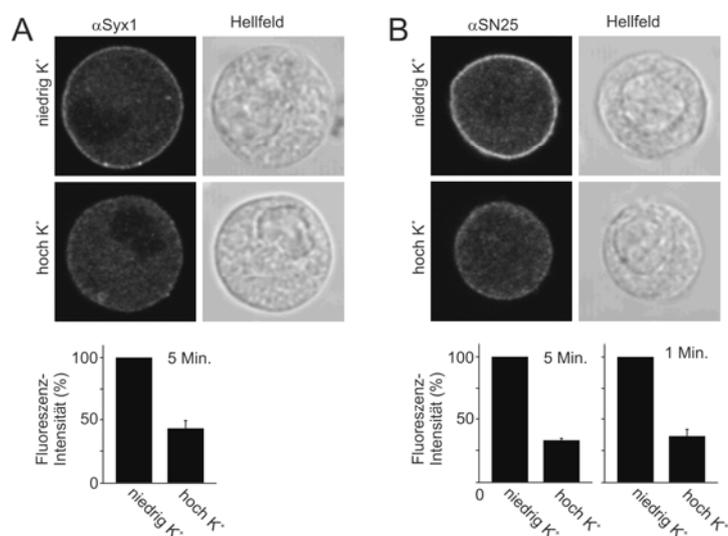


Abb. 19 Die Depolarisation von *bovinen* chromaffinen Zellen führt zur Abnahme der SNARE-Immunanfärbung

Bovine Zellen wurden für 1-5 Min. in hoch oder niedrig konzentriertem Kaliumpuffer inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und für Syntaxin1 oder SNAP-25 angefärbt. Die Auswahl der Zellen für die Analyse erfolgte anhand der Hellfeldaufnahme. Nur intakte und gesunde Zellen wurden gewählt. Oben: Repräsentative Bilder von Syntaxin1 (A) oder SNAP-25 (B) angefärbten *bovinen* Zellen. Bei niedrig konzentriertem Kaliumpuffer ist für beide Proteine eine deutliche Anfärbung der PM erkennbar. Diese wird nach Stimulation deutlich schwächer. (A-B) unten: Quantifizierung der Immunanfärbung an der Plasmamembran. Es sind Mittelwerte und deren Standardfehler angegeben (N= 3).

Die Immunanfärbung wurde mit konfokaler Mikroskopie untersucht. Dabei wurden die Zellen zufällig ausgewählt, im Transmissionsbild auf die äquatoriale Ebene fokussiert, wo ein Fluoreszenzscan aufgenommen wurde. Die Analyse der Immunfluoreszenz an der Plasmamembran ergab, wie in Abb. 19 erkennbar, dass nach Stimulation eine Abnahme der Immunfluoreszenz an der Plasmamembran zu beobachten war. Besonders bei SNAP-25 war erkennbar, dass die vorher ringartige Anfärbung unregelmäßig wurde, was auf eine Umorganisation deuten könnte. Bei beiden untersuchten Proteinen kam es innerhalb von 5 Min. zu einem Verlust von mindestens 50-70%. Die Untersuchung am SNAP-25 ergab, dass dieser Verlust mit dem gleichen Ausmaß schon nach einer Minute auftrat. Wegen des mangelnden Auflösungsvermögens der konfokalen Mikroskopie konnte nicht geklärt werden, ob der Antigenizitätsverlust auf einer veränderten Domänenstruktur oder auf einer Blockade des Epitops auf Proteinebene basierte. Es wäre auch denkbar, dass der Antigenizitätsverlust auf calciuminduzierte Proteasen zurückzuführen ist. Diese Interpretation ist aber als unwahrscheinlich anzusehen, da schon nach einer Minute mehr als 50% der SNAP-25 Immunfluoreszenz verloren wurde, was für einen proteolytischen Proteinabbau zu schnell ist. Weiter konnte ausgeschlossen werden, dass eine erhöhte Endocytoserate durch Depolarisation oder ein durch calciumblockiertes SNARE-Trafficking zur Membran mit resultierendem Verlust der SNARE-Proteinmenge an der Membran, die Immunfluoreszenz an der Plasmamembran reduzierte, da in depolarisierten Zellen die intrazelluläre Fluoreszenz nicht zunahm.

6.3.3 Nanomolares Calcium reduziert die SNARE-Immunanfärbung

In dem oben beschriebenen Experiment wurden intakte Zellen stimuliert und anschließend die Immunanfärbung der SNAREs Syntaxin1 und SNAP-25 untersucht. Zur genaueren Untersuchung von eventuellen Änderungen in der lateralen Organisation und zur Quantifizierung der Immunanfärbung wurden nun PC12-Membrane-Sheets hergestellt, die darauf mit unterschiedlichen Calciumkonzentrationen behandelt wurden. Die Herstellung von Membrane-Sheets hat den Vorteil, dass Proteine, wie zum Beispiel Munc18-1 oder CAPS, deren Plasmamembran-Lokalisation in

Ganzzellfärbungen nur schlecht nachweisbar sind (Martin and Grishanin 2003; Schütz 2003), hier besser zugänglich sind. Durch den Wechsel von primären, *bovinen* Zellen zu der Zellkulturlinie PC12 erübrigte sich die Referenzanfärbung gegen Syntaxin zur Identifizierung der *Sheets* aus chromaffinen Zellen (siehe auch Abschnitt 6.2.7 und 6.2.10), da sich einzig PC12-Zellen in der Kultur befanden.

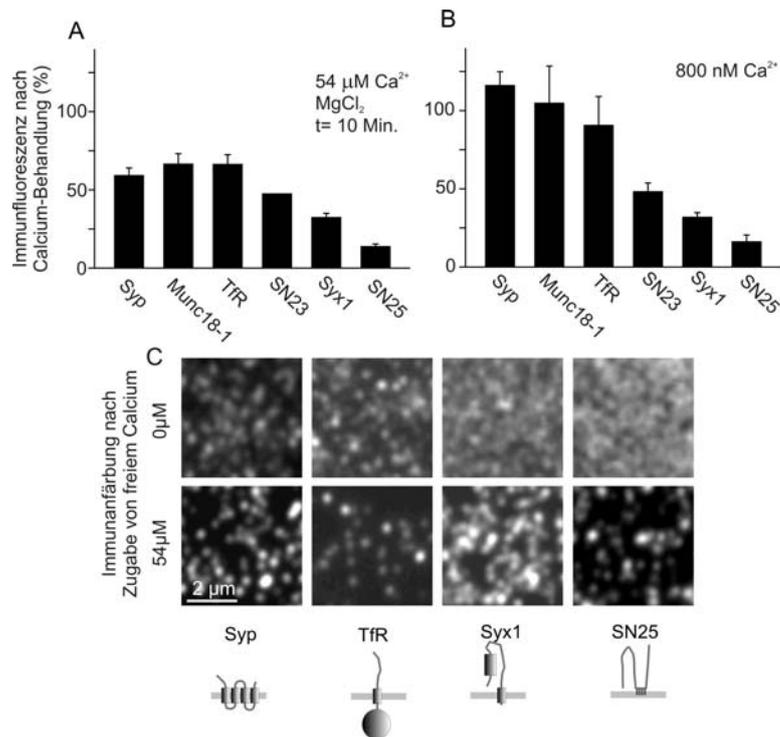


Abb. 20 Calcium reduziert die Immunanfärbung auf Membrane-Sheets

Aus PC12-Zellen wurden *Membrane-Sheets* hergestellt, diese wurden für 10 Min. mit Kalium-Glutamatpuffer und mit oder ohne freiem Calcium inkubiert. Anschließend wurden die *Sheets* fixiert und mit dem Antikörper behandelt, der gegen das angegebene Protein gerichtet ist. Die Immunfluoreszenz wurde quantifiziert. (A, C) Bei 54 μM freiem Calcium war die Immunfluoreszenz aller untersuchten Proteine, jedoch besonders die der SNAREs, reduziert. Die Mittelwerte der mit Calcium behandelten *Sheets* wurden auf die Kontrolle normalisiert. Sie sind mit Standardfehler dargestellt (N= 3). (B) Dieses Experiment wurde wie in (A) durchgeführt. Es wurde jedoch eine niedrigere, 850 nM, freie Calcium-Konzentration gewählt. Die Normalisierung erfolgte auf die ohne Calcium behandelten *Sheets*. Bei 850 nM freiem Calcium war nur für die untersuchten SNARE-Proteine eine Abnahme der Immunfluoreszenz zu beobachten. Es sind Mittelwerte mit Standardfehler angegeben (N= 3) (Die Daten von Experiment (B) und teilweise (A) wurden von NAGARAJ D. HALEMANI zur Verfügung gestellt). (C) Oben: Bildausschnitte zeigen Immunanfärbungen von Synaptophysin, Transferrin-Rezeptor, Syntaxin1 und SNAP-25 nach An- oder Abwesenheit von 54 μM Calcium. Unten: hier sind die entsprechenden Proteine schematisch skizziert.

Neben Syntaxin1A und SNAP-25 wurden auch nicht an der regulierten Exocytose beteiligte Membranproteine untersucht. Sie dienen als Referenz

der Immunanfärbung. Diese Kontrollproteine waren ein anderes SNARE-Protein, SNAP-23, das wie SNAP-25 palmitoyliert ist. Ebenso der Transferrin-Rezeptor (Einfach-Transmembranprotein) und Synaptophysin (besitzt vier Transmembrandomänen). Für eine schematische Übersicht der Proteine siehe Abb. 20C.

In diesem Experiment wurden *Membrane-Sheets* aus PC12-Zellen hergestellt und für 10 Min. mit Kalium-Glutamatpuffer inkubiert.

Um im Reaktionspuffer bei den Stimulationsbedingungen freies Calcium in Höhe von $54\ \mu\text{M}$ zu erreichen, wurde ein Calcium/DPTA-Puffersystem eingesetzt (Heinemann, Chow et al. 1994). Es waren auch $4\ \text{mM}$ Magnesiumchlorid anwesend, um unspezifische Wirkung von divalenten Ionen auszuschließen.

Um in weiter unten beschriebenen Experimenten eine freie Calciumkonzentration von $850\ \text{nM}$ zu erhalten (Tsien and Pozzan 1989), wurde ein Calcium/EGTA-Puffersystem eingesetzt.

Nach Behandlung mit dem Reaktionspuffer wurden die *Sheets* fixiert und gegen die oben genannten Proteine angefärbt und die Immunanfärbung quantifiziert.

Wie die Abb. 20A zeigt, führte die Calciumbehandlung mit $54\ \mu\text{M}$ freiem Calcium im Fall von SNAP-25 zu dem stärksten Antigenitätsverlust. Mehr als 80% der Immunfluoreszenz ging verloren. Für Syntaxin1A und SNAP-23 zeigte sich ein ähnliches, wenn auch nicht so ausgeprägtes, Bild. Allerdings zeigte sich auch für die anderen Proteine ein Verlust der Immunanfärbung.

Dieser Antigenitätsverlust wurde ebenfalls beobachtet, für SNAP-25 ebenfalls am stärksten, wenn schon vor der Herstellung der *Membrane-Sheets* die intrazelluläre Calciumkonzentration in PC12-Zellen durch Zugabe des Calcium-Ionophors Ionomycin erhöht wurde und die *Sheets* direkt fixiert wurden (Daten nicht gezeigt). Dies schließt eine durch *Sheet*-Herstellung hervorgerufene Calciumsensitivität der Protein-Epitope aus.

Bei $54\ \mu\text{M}$ freiem Calcium schien ein genereller Antigenitätsverlust neben einem möglicherweise SNARE-spezifischen Effekt vorzuliegen. Die Tatsache, dass Calcium auch ohne Cytosol wirkte, ließ darauf schließen, dass keine cytosolischen Faktoren für den beobachteten Effekt notwendig

oder verantwortlich waren. Cytosolische Proteasen konnten somit ausgeschlossen werden. Nach der Herstellung der *Plasmamembrane-Sheets* ist ein Proteintransport zur Membran nicht mehr möglich und durch Calcium aktivierte Endocytose ist unwahrscheinlich, da nur vereinzelt *Clathrin-Coated-Pits* an der Plasmamembran zu finden sind (Avery, Ellis et al. 2000). Damit konnte ein calciumreguliertes *Trafficking*, wie schon in Kapitel 6.3.2 diskutiert, endgültig ausgeschlossen werden. In weiteren Experimenten wurde untersucht, ob membranassoziierte Proteasen für den Antigenizitätsverlust verantwortlich waren. Durch die Zugaben eines EDTA-freien Proteaseinhibitor-Cocktails wurde deren potenzielle Aktivität während der 10minütigen Inkubation geblockt. Da diese Behandlung den Antigenizitätsverlust nicht verhinderte (Daten nicht gezeigt), konnte auch dieses Szenario ausgeschlossen werden. Fluorometrisch wurde nachgewiesen, dass es zu keiner Reduktion der freien Calciumkonzentration unter Zugabe des Proteaseinhibitor-Cocktails kam (Daten nicht gezeigt). Da bei den gezeigten Experimenten 3% BSA im Reaktionsmix vorhanden waren, wurde anschließend überprüft, ob Calcium BSA-Präzipitate erzeugte, die dann die *Membrane-Sheets* bedeckten und dadurch die Antikörpererkennung der Membranproteine verhinderte. Vorläufige Analysen zeigten, dass der Ausschluss von BSA aus dem Reaktionspuffer keine Veränderung der Immunfluoreszenzintensitäten verursachte, so dass Calcium auch ohne BSA die Antigenizität reduzierte (Daten nicht gezeigt). Um auszuschließen, dass Calcium nur bestimmte Epitope maskierte, wurden in Kontrollexperimenten weitere Antikörper, gegen andere Epitope der Proteine Syntaxin, SNAP-25, Munc18-1 gerichtet, verwendet (Daten nicht gezeigt). Diese zeigten einen ähnlichen, calciumabhängigen Abfall der Immunanfärbung, so dass ausgeschlossen werden konnte, dass Calcium selektiv Epitope dieser Proteine maskierte.

Die Inkubation der *Membrane-Sheets* mit 54 μM freiem Calcium ist nicht physiologisch, die Depolarisation von *bovinen* chromaffinen Zellen führt zu freien Calciumkonzentrationen, die um 1 μM liegen (Augustine and Neher 1992). Daher wurde in den nächsten Experimenten untersucht, ob eine physiologische Calciumkonzentration im Bereich um 1 μM ausreicht, um auf *Membrane-Sheets* einen SNARE-spezifischen Antigenizitätsverlust zu

beobachten. Dafür wurden, wie oben beschrieben, frische Plasmamembranen für 10 Min. mit 850 nM freiem Calcium inkubiert, fixiert und anhand der Immunanfärbung untersucht (Daten wurden von N.D. HALEMANI zur Verfügung gestellt). Die Analyse zeigte (Abb. 20B), dass nur die Antigenizität der getesteten SNARE-Proteine abnahm. Syntaxin1A, wie auch SNAP-23 verloren mindestens 50%, SNAP-25 sogar über 80% der Immunanfärbung. Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, dass bei Anwesenheit von freiem Calcium in Konzentrationen, bei denen in *bovinen* chromaffinen Zellen und PC12 Zellen die Exocytose stattfindet, nur die Antigenizität der SNARE-Proteine beeinflusst ist.

Im Fall der SNAREs könnten Umorganisationen dieser Proteine oder deren Domänen, die wahrscheinlich während der Exocytose stattfinden, zu Veränderungen der Epitopzugänglichkeit führen, die hier als Abnahme der Signaldichte und Signalstärke wahrgenommen wurden.

6.3.4 Visualisierung von SNARE-Pools durch Immunanfärbung

Die SNARE-Proteine sind in Mikrodomänen organisiert (Lang, Bruns et al. 2001; Lang, Margittai et al. 2002; Ohara-Imaizumi, Nishiwaki et al. 2004). Es ist daher vorstellbar, dass sie durch sterische Hinderung für Antikörper schwer zugänglich sind. Daher konnte mit den Immunanfärbungen nicht differenziert werden, ob makromolekulare Umorganisationen in diesen Domänen oder die SNARE-Komplexbildung für die Reduzierung der Epitopzugänglichkeit verantwortlich war. Ebenfalls könnte es möglich sein, dass selbst in Abwesenheit von Calcium nicht alle SNARE-Pools repräsentativ angefärbt wurden. Um hier ein tieferes Verständnis zu erlangen, wurden im nächsten Experiment die Antikörper auf ihre Immunanfärbekapazität hin untersucht. Dafür wurden PC12-Zellen mit Syntaxin1A-mEGFP bzw. mit SNAP-25-EYFP transfiziert. Von diesen wurden nach 48 Std. *Membrane-Sheets* hergestellt, die für 10 Min. mit Kalium-Glutamatpuffer mit bzw. ohne Calcium-Zusatz inkubiert, dann fixiert und gegen das entsprechend überexprimierte Protein angefärbt wurden. Die Abb. 21A zeigt exemplarisch die EGFP Fluoreszenz, die dazugehörige Immunanfärbung und eine Überlagerung dieser beiden Bilder.

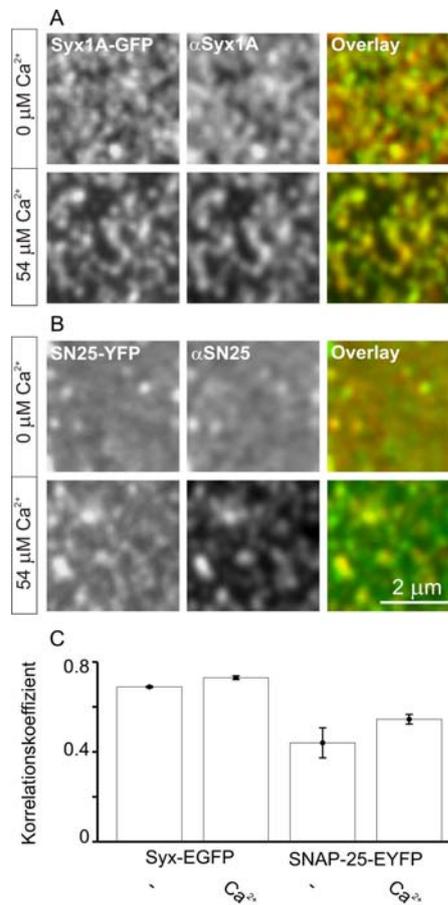


Abb. 21 Korrelation zwischen Immunanfärbung und EGFP-Fluoreszenz

Zur objektunabhängigen Analyse der Kolo­kalisierung wurde die pixelbasierte Korrelationsanalyse durchgeführt. Dort fließen subjektive Entscheidungen des Experimentators nur beim Übereinanderlegen der beiden Bilder und beim Wählen der zu analysierenden Regionen ein. Ein Korrelationskoeffizient von 1 bedeutet: vollkommene positive Korrelation, es liegen identische Bilder vor. Ein Wert von null bedeutet: keine Korrelation, die Bilder sind voneinander unabhängig. Ein Korrelationskoeffizient von -1 bedeutet: negative Korrelation, eines der Bilder stellen ein Negativbild des anderen dar. Bei der hier durchgeführten Korrelationsanalyse kann ein Wert von 1 nicht erreicht werden. Das technische Limit liegt bei 0,73 (JOCHEN SIEBER, persönliche Mitteilung), wenn ein primärer Antikörpern mit zwei unterschiedlichfarbigen sekundären Antikörpern detektiert wird.

Aus mit Syntaxin1A-mEGFP oder SNAP-25-EYFP transfizierten PC12-Zellen wurden *Membrane-Sheets* hergestellt. Diese wurden für 10 Min. mit bzw. ohne 54 μM freiem Calcium inkubiert, fixiert und für Syntaxin1 (A) oder SNAP-25 (B) ange­färbt. Die Korrelation zwischen der Immunanfärbungen und der EGFP-/EYFP-Fluoreszenz wurde berechnet. (C) Darstellung des Ergebnisses der Korrelationsanalyse. Für Syntaxin wurde eine hohe Korrelation ermittelt, die nach Zugabe von Calcium dem technischen Limit entsprach (0,73). Für SNAP-25 war der Korrelationskoeffizient niedriger und vermutlich durch die diffuse EYFP-Fluoreszenz überschätzt, die nicht vom Antikörper erkannt wurde und als un­iformer Hintergrund nicht in die Analyse einfluss. Der Mittelwert mit Standardabweichung ist gezeigt (N= 3). Dieses Experiment wurde vom Autor durch­geführt und von DR. THORSTEN LANG analysiert. Es wurde der Pearson-Korrelationskoeffizient berechnet. In der folgenden Formel wurde für rot die Immunanfärbung und für grün die EGFP-Fluoreszenz gewählt. Folgende Abkürzungen sind in der Formel enthalten: i = Intensität eines individuellen Pixels, av = mittlere Pixelintensität der Region, r = Korrelationskoeffizient. $r = \frac{\sum_i (\text{grün}_i - \text{grün}_{av}) * (\text{rot}_i - \text{rot}_{av})}{\{ \sum_i (\text{grün}_i - \text{grün}_{av})^2 * \sum_i (\text{rot}_i - \text{rot}_{av})^2 \}^{1/2}}$. Für weitere Details siehe (Manders, Stap et al. 1992).

In diesen Experimenten wurde ebenfalls eine calciumabhängige Abnahme der Immunanfärbung beobachtet. Die Überexpression von Syntaxin1A bzw. SNAP-25 führte also nicht zu einer Inhibition dieses Effektes. Wie in einer früheren Arbeit für Syntaxin1A gezeigt wurde (Sieber, Willig et al. 2006), führt die Überexpression zu einer erhöhten Anzahl an Mikrodomänen in der Plasmamembran. Es kann daher aus unserem Experiment geschlossen werden, dass die erhöhte Domänenzahl nicht limitierend auf die calciuminduzierte Abnahme der Antigenizität wirkte. Um zu überprüfen, ob die überexprimierten Proteine repräsentativ detektiert wurden, wurde von DR. THORSTEN LANG eine Korrelationsanalyse zwischen EGFP- und Immunfluoreszenzsignal durchgeführt. Im Fall des Syntaxins waren sowohl mit als auch ohne Calcium-Inkubation in der EGFP sowie in der Immunanfärbung Domänen zu erkennen. Zwischen ihnen waren freie Flächen ohne Signal erkennbar. Nach der Calcium-Behandlung waren die EGFP- und Immunsignale in weniger Punkten mit größeren Freiflächen konzentriert. Die Korrelationsanalyse zwischen Immunanfärbung und EGFP-Signal ergab in Abwesenheit von Calcium einen Wert von 0,69, der nahe dem technischen Limit bei dieser Art von Analysen liegt (technisches Limit: 0,73; JOCHEN SIEBER, persönliche Mitteilung). In Gegenwart von Calcium war dieser sogar noch erhöht, 0,73, so dass dort das absolute technische Limit erreicht wurde. Dies zeigte, dass der für die Analyse verwendete Syntaxin-Antikörper Syntaxin repräsentativ anfärbt. Die Tatsache, dass das EGFP-Signal nach Calcium-Behandlung ebenfalls in weniger Punkten konzentriert war, sprach für eine durch Calcium induzierte Umorganisation der Syntaxin-Domänen. Der eingesetzte Antikörper erkennt ein N-terminales Epitop von Syntaxin1A. Dieser Bereich ist nicht an der SNARE-Komplexbildung beteiligt. Daraus lässt sich schließen, dass das Sinken der Intensität der Immunanfärbung in den Mikrodomänen in einer Erhöhung der Dichte begründet ist, was aber nicht die Bildung 2:1 oder *Core*-Komplexe ausschließt. Bei der Untersuchung von SNAP-25 nach Behandlung ohne Calcium war es nicht möglich, einzelne Domänen vollständig aufzulösen (siehe Abb. 21B). Die Immunanfärbung und die EYFP-Fluoreszenz waren fast uniform verteilt, mit nur vereinzelt helleren Signalen, die möglicherweise Mikrodomänen repräsentierten. Nach

Calcium-Behandlung war es in der Immunanfärbung möglich, einzelne Signale zu identifizieren. Im Fall der EYFP-Fluoreszenz waren zwar andeutungsweise Stellen konzentrierter Fluoreszenz sichtbar, diese jedoch durch eine schwächere, uniforme Fluoreszenz miteinander verbunden. Die Korrelationsanalyse in Abwesenheit von Calcium ergab eine positive, aber deutlich niedriger Korrelation als im Fall von Syntaxin1A bei Anwesenheit und Abwesenheit von Calcium (siehe Abb. 21C). Bei Anwesenheit von Calcium stieg der SNAP-25 Korrelationswert leicht an, war jedoch noch immer niedriger als das technische Limit. Da in einer Korrelationsanalyse uniforme Fluoreszenz nicht mit einbezogen wird, liegt die echte Korrelation niedriger, da der Antikörper das uniform verteilte SNAP-EYFP nicht erkannte. Dies demonstriert, dass dieser Antikörper nicht das gesamte plasmamembranständige SNAP-25 repräsentativ darstellen konnte. Da dieser Antikörper ein Epitop erkennt, das sich im N-terminalen SNARE-Motiv von SNAP-25 befindet, wäre es möglich, dass die Abnahme der Immunanfärbung hier nicht alleine durch stärkere Konzentration des Proteins in Domänen, sondern auch durch die SNARE-Komplexbildung begründet war. Der im oben genannten Teil (Kap. 6.3.3, S. 66) als Kontrolle verwendete SNAP-25 Antikörper ist ebenfalls gegen das SNARE-Motiv gerichtet. Somit steht eine Kontrolle mit einem anderen Antikörper noch aus, dessen Epitop sich nicht im SNARE-Motiv befindet. Insgesamt schien Calcium bei niedrigen Dosen unter den getesteten Proteinen, spezifisch auf die SNARE-Proteine zu wirken. Es löste im Fall von Syntaxin eine Umorganisation der Domänen aus, wogegen dies für SNAP-25, womöglich bedingt durch die hohe Proteindichte, nicht erkennbar war. Für SNAP-25 wurde jedoch deutlich, dass der Immunfluoreszenzverlust nicht allein durch Domänen-Umorganisation begründet sein kann, sondern das auch Komplexbildungen, mit Beteiligung des SNARE-Motivs, die Ursache sein müssen.

6.3.5 Calcium reduziert den Einbau von rekombinantem Synaptobrevin2

Die vorigen Experimente zeigten einen Calcium-abhängigen Einfluss auf die SNARE-Proteine. Es wurde in Betracht gezogen, dass dieser Einfluss zu einer erhöhten SNARE-Komplexbildung führt, wobei sowohl 1:1 oder 2:1 Syntaxin1A-SNAP-25 Komplexe als auch *Core*-Komplexe diskutiert wurden. In diesem Experiment wurde untersucht, ob sich die Calcium-induzierte Veränderung der SNARE-Proteine auf deren Kapazität zur Rekrutierung von rekombinanten Synaptobrevin auswirkte. Eine frühere Arbeit (Lang, Margittai et al. 2002) konnte zeigen, dass rekombinantes Synaptobrevin in die Membran eingebaut und dort im SNARE-Komplex stabilisiert wird. Es wurden frische Plasmamembranen von PC12-Zellen hergestellt und diese für 5 Min. unter Verwendung von Calcium mit 10 μM Fluoreszenz-markiertem Synaptobrevin inkubiert. Die Fluoreszenz des eingebauten Synaptobrevin wurde nach Fixierung analysiert. Die Analyse ergab, dass dieser Einbau calciumabhängig reduziert wurde. Daraufhin wurde das Experiment wiederholt und verschiedene freie Calciumkonzentrationen auf ihre Effizienz hin geprüft.

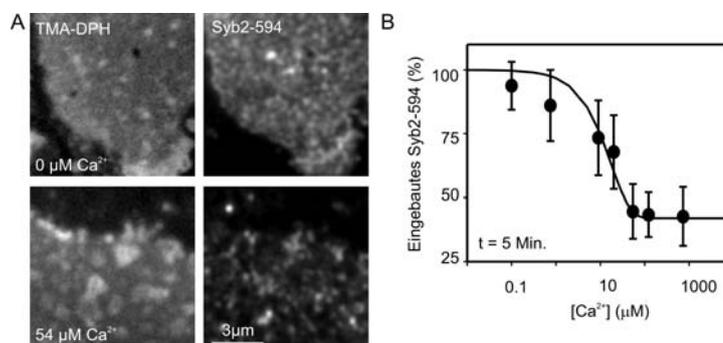


Abb. 22 Calcium reduziert den Einbau von rekombinantem Synaptobrevin in die PM

Auf frische PC12-Zell-Membrane-Sheets wurden für 5 Min. 10 μM rekombinantes Synaptobrevin2-Alexa594 gegeben. Zusätzlich wurden dem Reaktionsmix verschiedene Konzentrationen an freiem Calcium (100 nM- 1000 μM) hinzugegeben. Anschließend wurden die *Sheets* fixiert und die Menge an eingebautem Protein bestimmt. (A) Zeigt in den beiden Bildern links die PM-Anfärbung mit TMA-DPH, rechts den beobachteten Syb2-Alexa594 Einbau für 0 und 54 μM freiem Calcium. Die Ergebnisse der Analyse sind in (B) dargestellt. Hier ist ein Abfall der Einbau-effizienz mit zunehmender Calciumkonzentration erkennbar. Die Datenpunkte sind Mittelwerte mit Standardfehler (N= 4-5).

Wie in Abb. 22B dargestellt, sorgte die Zugabe von 20 μM freiem Calcium für einen halbmaximalen Verlust der Einbau-Effizienz in den ersten

5 Minuten. Eine Interpretation wäre, dass die nativen SNAREs durch Calcium in Komplexe getrieben wurden, in denen sie nicht mehr befähigt waren, exogenes Synaptobrevin zu inkorporieren. Die Diskrepanz zu der deutlich niedrigeren Calciumkonzentration, die für einen Antigenizitätsverlust von Syntaxin und SNAP-25 notwendig war, lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass der Einbau von Synaptobrevin schneller ist als die Wirkung von Calcium. Eine niedrigere Calciumdosis wäre vermutlich bei einer Vorbehandlung der Membranen ausreichend. Dafür sprechen vorläufige Befunde eines Experimentes zum calciumabhängigen Einbau von fluoreszenzmarkiertem Syntaxin-SNARE-Motiv. Bei einer 5minütigen Calciumvorbehandlung genügt eine freie Calciumkonzentration von 1350 μM , um den Einbau um 50% zu inhibieren (Persönliche Mitteilung von NAGARAJ D. HALEMANI und THORSTEN LANG).

6.3.6 Analyse des Calcium-Effektes auf Munc18-1 mit einer Dichtegradientenzentrifugation

In den bisher vorgestellten Experimenten konnte gezeigt werden, dass Calcium auf Proteine an der Plasmamembran wirkt. Bei hohen Calciumdosen schienen alle Proteine beeinflusst zu sein, unbeachtet der Eigenschaften wie Transmembranprotein, membranverankertes Protein oder membranassoziiertes Protein. Bei niedrigeren Konzentrationen schienen ausschließlich die SNARE-Proteine beeinflusst zu sein. Im Fall von Syntaxin1A veränderten sie sich sichtbar in ihrer Domänenverteilung, wogegen dies im Fall von SNAP-25 nicht deutlich wurde. Bei SNAP-25 schienen sich innerhalb dieser Domänen Komplexe zu bilden, wahrscheinlich SNARE-Komplexe. Wie Calcium in hohen Dosen auf die übrigen Proteine wirkte ist unklar. Speziell gilt dies für membranassoziierte Proteine. Für Munc18-1 war aus dem ersten experimentellen Teil dieser Doktorarbeit bekannt (Kap. 6.2.2, S. 49), dass es sich wegen seiner losen Bindung an die Membran nach Herstellung der Plasmamembran langsam löst. Es war von Interesse zu untersuchen, ob der calciuminduzierte Antigenizitätsverlust von Munc18-1 in diesem Fall durch Abdissoziation von Munc18-1 oder wie bei den anderen Membranproteinen durch Epitop-Maskierung verursacht wurde. Um dies zu klären, wurde eine

Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt, mit der PC12-Zelllysat in seine cytosolischen und seine Plasmamembran-Komponenten aufgetrennt wurde.

Vor der Auftrennung wurde das Lysat entweder mit EGTA behandelt, um das residuelle Calcium zu chelatieren oder ein Calcium/DPTA Gemisch hinzugegeben, um eine freie Calciumkonzentration von 54 μM zu erreichen. Proteolytische Aktivität wurde durch einen Proteaseinhibitor-Cocktail verhindert. Die Dichtestufen wurden mit dem Dichtegradientenmedium Optiprep (*Axis-shield*, Norwegen) hergestellt. Nach der Zentrifugation wurden jeweils die Dichtestufen 0-30% als Plasmamembran-Fractionen und die Fractionen 35-40% als cytosolische Fractionen vereint. Mittels Western-Blot Analyse wurde die Qualität der Auftrennung untersucht. Dabei dienten Syntaxin und GDI als Plasmamembran- und Cytosol-Marker. Des Weiteren wurde die Lokalisation und Verteilung von Munc18-1 analysiert. In manchen Experimenten war kein Unterschied zwischen Calcium und EGTA erkennbar, etwa 70% waren membrangebunden.

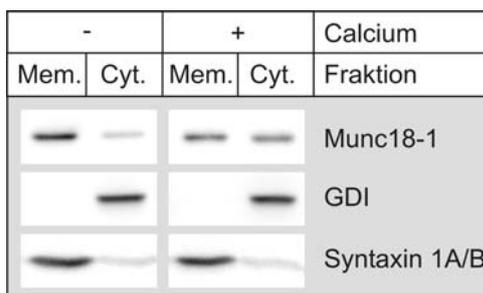


Abb. 23 Analyse eines Effektes von Calcium auf die Munc18-1 Lokalisation

PC12-Zellen wurden mit Ultraschall zerstört nachdem, rechts, der intrazelluläre Calciumspiegel erhöht wurde oder, links, die Zellen im Ruhezustand belassen wurden. Mit einer Dichtegradientenzentrifugation wurden die Membran- von der Cytosol-Fraktion abgetrennt. Die Fractionen wurden mittels Western-Blot auf die Munc18-1 und als Kontrolle auf die Syntaxin1 und GDI Lokalisation hin untersucht. In diesem Experiment war stimulierten Zellen ein Wechsel des Munc18-1 von der Membran in das Cytosol zu beobachten.

In mehreren Experimenten wurde jedoch ein schwacher prozentueller Wechsel (10-15%) von der Membran ins Cytosol bei Calciumanwesenheit beobachtet. Die Abb. 23 zeigt eines von zwei Experimenten, in denen durch Calcium 30% von Munc18-1 von der Membran gelöst wurde. Von einer calciumabhängigen Loslösung des Munc18-1 von der Membran wurde in der Literatur berichtet (Bhaskar, Shareef et al. 2004), jedoch wurde diese

Beobachtung nicht genauer untersucht. Wegen der variablen Ergebnisse war nicht abschließend zu klären, ob Munc18-1 tatsächlich durch Calcium von der Membran gelöst wurde oder ob es sich hier auch, wie bei anderen Membranproteinen beobachtet, um Epitop-Maskierung handelt. Möglicherweise war in diesem Experiment, im Gegensatz zum *Membrane-Sheet-Assay*, durch die hohe Proteinkonzentration im Lysat (7-15 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) eine Rückbindung des Munc18-1 möglich, so dass die Loslösung nicht zu beobachten war. Alternativ wäre denkbar, dass eventuell verlorenes Munc18-1 an intrazelluläre Membranen gebunden hat, die ebenfalls in der Plasmamembranfraktion angereichert wurden.

7 Diskussion

7.1 Charakterisierung der Bindung von Munc18-1 an seinen Plasmamembran-Akzeptor

7.1.1 Der *Membrane-Sheet-Assay* zur Untersuchung der molekularen Mechanismen der neuronalen Exocytose

Der *Membrane-Sheet-Assay* ist ein etabliertes System zur Untersuchung von molekularen Prozessen der neuronalen Exocytose. Dieses System ist exocytosekompetent, da nach Herstellung der *Membrane-Sheets* aus PC12-Zellen sekretorische Granula an der Membran gedockt bleiben, die mit Calcium zur Fusion gebracht werden können (Avery, Ellis et al. 2000; Lang, Bruns et al. 2001; Holroyd, Lang et al. 2002; Barszczewski 2005). Die molekularen Maschinen der Exocytose (Li and Chin 2003) – die SNAREs – sind in diesem System direkt zugänglich, manipulierbar und bereit für die SNARE-Komplexbildung (Lang, Margittai et al. 2002). In den *Sheets* verbleiben die SNAREs in ihrer natürlichen Umgebung sowie in ihren ursprünglichen stöchiometrischen Verhältnissen und ihrer Organisation. Die laterale Organisation kann mit diesem System besonders gut untersucht werden, da es mit hoher Auflösung durch Epifluoreszenzmikroskopie untersucht werden kann. Durch die annähernde Zweidimensionalität tritt nur eine geringe Störfluoreszenz auf, so dass eine akkurate Quantifizierung durchgeführt werden kann (Lang 2003).

Für die Untersuchung von Munc18-1 mit dem *Membrane-Sheet-Assay* ergeben sich zwei besondere Vorteile: Zum einen ist in diesem System wegen des großen Reaktionsvolumens keine Rückbindung möglich, so dass sich kein Gleichgewicht zwischen membrangebundenem und cytosolischem Munc18-1 bilden kann, was eine genauere Untersuchung der Bindung zur Plasmamembran zulässt. Zum anderen ist die Ganzzellanfärbung für Munc18-1 (Schütz 2003), wie auch zum Beispiel für CAPS (Martin and Grishanin 2003), nicht repräsentativ. Das membrangebundene Munc18-1 wird unterschätzt. Dies wird durch Einsatz des *Membrane-Sheet-Assays* umgangen. Mit diesem System konnten früher beschriebene Befunde bestätigt werden, was für seine Eignung zur Munc18-1-Untersuchung spricht. Zum Beispiel zeigte der Einsatz des für Syntaxin1 spezifischen

Toxins, wie vorher *in vitro* beschrieben (Hata, Slaughter et al. 1993; Pevsner, Hsu et al. 1994; Yang, Steegmaier et al. 2000), dass Munc18-1 über Syntaxin an die Membran bindet. Ebenso wurde bestätigt, dass die offene Syntaxin Konformation Munc18-1 nicht binden kann (Dulubova, Sugita et al. 1999; Liu, Ernst et al. 2004). Des Weiteren kolokalisierten Granula zu 70% mit Munc18-1, wofür es vorher Evidenzen gab (Tsuboi and Fukuda 2006). Somit konnte gezeigt werden, dass mit dem *Membrane-Sheet-Assay* ein verlässliches System vorliegt, das sich zur Untersuchung von Munc18-1 und von neuronalen SNAREs eignet.

7.1.2 Studien zur Identifizierung des Bindungspartners von Munc18-1

Wie bereits erwähnt, konnte durch Behandlung mit den SNARE-spezifischen Toxinen gezeigt werden, dass Munc18-1 an Syntaxin1A bindet. Der Einsatz von BoNT/E, das SNAP-25 schneidet, und TeTx, das Synaptobrevin2 schneidet, zeigte keinen Einfluss auf die Munc18-1 Bindung. Da BoNT/E C-terminal nur die letzten 26 Aminosäuren entfernt, war unklar, ob der verbleibende Teil von SNAP-25 noch Munc18-1 bindet. Die Analyse frischer Plasmamembranen aus *snap-25-Knockout*-Zellen zeigte, dass nach 10 Min. die gleiche Menge Munc18-1 gebunden war, wie in Wildtyp-Zellen. Vorläufige Untersuchungen bestätigten dies auch für direkt fixierte Membranen. Somit erscheint SNAP-25 als direkter Interaktionspartner von Munc18-1 unwahrscheinlich, da die Abwesenheit von SNAP-25 nicht die Menge an gebundenem Munc18-1 beeinflusste.

Überraschenderweise zeigte sich in diesen und weiteren Experimenten eine nur schwache Bindung von Munc18-1 an die Plasmamembran. Eine Inkubation der Membranen vor der Fixierung sorgte für einen Verlust von Munc18-1. Die schwache Bindung war einerseits unerwartet, da eine hochaffine Bindung zwischen Munc18-1 und dem cytosolischen Teil von Syntaxin1A beschrieben wurde (6 nM, (Pevsner, Hsu et al. 1994)). Andererseits erklärt dieser Befund die Beobachtung aus früheren Arbeiten (Garcia, McPherson et al. 1995; Liu, Ernst et al. 2004; Schutz, Zilly et al. 2005), dass *in vivo* Munc18-1 nicht vollständig membrangebunden, sondern auch cytosolisch vorlag, obwohl Syntaxin im 20fachen Überschuss vorhanden war (Schutz, Zilly et al. 2005). Hierzu passt ebenfalls die

Beobachtung, dass in Anwesenheit der Syntaxin-Transmembrandomäne die Affinität zu Munc18-1 reduziert zu sein schien (Lewis, Dong et al. 2001). Es wäre denkbar, dass die Organisation des Syntaxin1A in Proteinmikrodomänen (Lang, Bruns et al. 2001) eine andere, zu Munc18-1 weniger affine, Syntaxin-Konformation begünstigt oder, dass die Anwesenheit bestimmter Proteine oder Lipide eine starke Munc18-1-Bindung verhindert, wodurch Munc18-1 schwächer bindet. Möglicherweise liegt daher *in vivo* ein Gleichgewicht zwischen cytosolischem und membrangebundenem Pool vor. In dem hier vorliegenden Fall löste sich Munc18-1 nach Herstellung der *Sheets* von der Plasmamembran und wurde wegen des Überschusses an Reaktionspuffer unendlich verdünnt, so dass sich kein erneutes Gleichgewicht einstellen konnte. Somit ging Munc18-1 von der Membran verloren. Wie aus dem Auswaschexperiment zu erkennen ist, verblieben nach einer Stunde nur noch 27% Munc18-1 membrangebunden. Es ist noch nicht geklärt, ob dieses Munc18-1 an einen anderen Akzeptor band, an die geschlossene Syntaxin-Konformation oder, ob es sich hier um ein unspezifisches Signal des Antikörpers oder Kreuzreaktivität mit anderen Isoformen handelte.

7.1.3 Analyse der Syntaxin-Konformation im Munc18-1

Akzeptorkomplex

Es besteht für Munc18-1 eine Diskrepanz in der postulierten Funktion resultierend aus *in vitro* und *in vivo* Studien.

In *in vitro*-Studien wird Munc18-1 als Inhibitor diskutiert, da seine Bindung an Syntaxin1A das Syntaxin-SNARE-Motiv für die Bildung des *Core*-Komplexes unzugänglich macht (Pevsner, Hsu et al. 1994; Misura, Scheller et al. 2000; Yang, Steegmaier et al. 2000). *In vivo* Studien weisen jedoch in eine andere Richtung, da hier der Verlust des Munc18-1/*unc18-1* nicht, wie für einen Inhibitor angenommen, zu einer Erhöhung der Exocytose, sondern zu einem kompletten Verlust der Botenstofffreisetzung führte (Verhage, Maia et al. 2000; Weimer, Richmond et al. 2003). Ein weiterer in der Literatur zu findender Widerspruch ist, dass die Überexpression von Munc18-1 in PC12-Zellen, in *bovinen* und *murinen* chromaffinen Zellen nicht zur Blockade der Exocytose führte (Graham, Sudlow et al. 1997;

Fisher, Pevsner et al. 2001; Voets, Toonen et al. 2001; Schutz, Zilly et al. 2005).

Übereinstimmend sind *in vitro* und *in vivo* Arbeiten im Hinblick darauf, dass die offene Syntaxin Mutante (L165A E166A), die eine geschlossene Konformation nicht mehr annehmen kann, Munc18-1 nicht mehr effizient bindet (Dulubova, Sugita et al. 1999; Liu, Ernst et al. 2004). Diese Beobachtung wurde in der vorliegenden Arbeit ebenfalls gemacht (siehe Abb. 12, S. 53). Dies lässt die Interpretation zu, dass die offene Konformation für die Bildung des Akzeptorkomplexes nicht entscheidend ist. Der *Knockout* von *unc-18* in *C.elegans* konnte nicht durch Expression von offenem Syntaxin gerettet werden (Richmond, Weimer et al. 2001). Dies deutet darauf hin, dass es nicht die Aufgabe von Munc18-1 ist, aktiv Syntaxin zu öffnen und die SNARE-Komplexbildung zu erlauben. Diese Aufgabe wird für das Protein Munc-13 diskutiert, da sein *Knockout* in *C.elegans* durch Überexpression von offenem Syntaxin gerettet wurde (Richmond, Weimer et al. 2001). Wildtyp-Syntaxin1A kann *in vitro* im Millisekundenbereich zwischen der offenen und der geschlossenen Konformation flexibel wechseln (Margittai, Fasshauer et al. 2003). Somit lässt die Tatsache, dass die Überexpression von Wildtyp-Syntaxin ebenfalls nicht *unc-18* retten konnte (Richmond, Weimer et al. 2001), spekulieren, dass Munc18-1 Syntaxin1A nicht in eine bestimmte Konformation zwingt, sondern eher eine essentielle Konformation stabilisiert und diese eventuell räumlich und zeitlich koordiniert. Anhand der hier vorgestellten Daten kann es sich bei der durch Munc18-1 stabilisierten Syntaxin-Konformation nicht um die kristallographisch ermittelte (Misura, Scheller et al. 2000), geschlossene Konformation handeln, da von ihr gezeigt wurde, dass sie die SNARE-Komplexbildung verhindert (Yang, Steegmaier et al. 2000). Die präsentierten Daten zeigen jedoch, dass sich Munc18-1, initiiert durch Zugabe von rekombinantem Synaptobrevin, durch SNARE-Komplexbildung von der Membran löst. Dies ist nicht PC12-Zelllinienspezifisch, sondern konnte auch in *bovinen* und *murinen* chromaffinen Zellen beobachtet werden (siehe Abb. 15, S. 58 und Abb. 18, S. 63). Die Zugabe von Synaptobrevin verdrängte Munc18-1 von seiner Bindungsstelle, was den intrinsischen Verlust von Munc18-1 dreifach beschleunigte (siehe

Abb. 13, S. 55). Somit muss *in vivo* ein Großteil des Syntaxin1A, das hier als Bindungspartner von Munc18-1 im Akzeptorkomplex nachgewiesen wurde, für Synaptobrevin zugänglich sein, um *Core*-Komplexe bilden zu können. Dabei kann es sich nicht in der geschlossenen Konformation befinden. Somit können die geschlossene und die vollständig geöffnete Syntaxin1A-Konformation im synaptobrevin2sensitiven Munc18-1-Akzeptorkomplex ausgeschlossen werden. Da selbst nach einer Stunde Inkubation mit Synaptobrevin2 noch 27% des ursprünglich membrangebundenen Munc18-1-Pools an der Membran verblieben, könnte das verbleibende Munc18-1 entweder an geschlossenem Syntaxin1 oder an Syntaxin gebunden sein, das sich im Zentrum einer Mikrodomäne befindet und so für Synaptobrevin2 nicht zugänglich ist. Alternativ kann ein unspezifisches Antikörpersignal oder Kreuzreaktivität mit einer anderen Isoformen nicht ganz ausgeschlossen werden.

Es ist zu bemerken, dass die Munc18-1-Syntaxin1-Bindung keine Voraussetzung für den Einbau von Synaptobrevin und die Bildung von *Core*-Komplexen darstellen kann, da dies das stöchiometrische Verhältnis Munc18-1 zu Syntaxin1A von 1:20 ausschließt (Schutz, Zilly et al. 2005). Ebenso zeigen vorläufige Daten, dass die Expression oder exogene Zugabe von rekombinanten Munc18-1 den Einbau von rekombinantem Synaptobrevin nicht erhöht.

Im Weiteren soll die hier beschriebene Syntaxin-Konformation, die Munc18-1 binden kann und durch Synaptobrevin2 in SNARE-Komplexe getrieben werden kann, „halb-offen“ genannt werden, ohne dass es hierzu strukturelle Evidenzen gibt. Die Existenz einer solchen Konformation wurde bereits als Intermediat in der SNARE-Komplexbildung postuliert (Misura, Scheller et al. 2000), da sie eine Möglichkeit darstellt die *in vitro* Inhibition mit einer essentiellen Funktion *in vivo* zu kombinieren.

Durch die Tatsache, dass keine effiziente Rekrutierung von Munc18-1 bei der Expression von *open*-Syntaxin stattfand und in *Pull-Downs* keine Bindung nachweisbar war (Dulubova, Sugita et al. 1999), kann nicht ausgeschlossen werden, dass doch eine schwache transiente Bindung an *open*-Syntaxin möglich ist. Eventuell ist bei der Expression in PC12-Zellen nur das Gleichgewicht zum Cytosol hin verschoben und weniger Munc18-1

an der Membran zu finden. Dies könnte erklären, warum beim *Knockout* des Syntaxin1A-Homologs *unc-64* in *C.elegans*, was zur Paralyse führt, eine Rettung auch mit der offenen Mutante von Syntaxin1A möglich ist (Richmond, Weimer et al. 2001). Demnach müsste die offene Syntaxin-Mutante selbst zwischen verschiedenen Konformationen wechseln - zwischen einer im Vergleich zum Wildtyp niedriger affinen halb-offenen und einer vollständig offenen Konformation. In Hefe konnte ebenfalls gezeigt werden, dass eine offene Mutante des Syntaxin-Homologs, Sso1p, den beim genetischen Verlust auftretenden Defekt verhindern kann (Munson and Hughson 2002). Dies wurde begleitet von einer Erhöhung der SNARE-Komplexanzahl, da vermutlich das Gleichgewicht des regulierenden Munc18-1-Homologs in das Cytosol verschoben war und es nicht mehr ausreichend an der Plasmamembran zur Verfügung stand. Ebenfalls wurde kürzlich beobachtet, dass die starke Bindung des SM-Homologs Sly1p an das N-terminale Peptid des Syntaxin-Homologs Sed5p nicht von funktioneller Relevanz ist (Peng and Gallwitz 2004) und eine schwache Bindung des Sly1p für seine Funktion wichtig sein muss. Daher wäre es möglich, dass auch die funktionell relevante Interaktion von Munc18-1 und Syntaxin1A durch eine schwächere Bindung von Munc18-1 an die halb-offene Syntaxin1-Konformation beschrieben werden muss.

7.1.4 Der Mechanismus und die Kontrolle der Munc18-1-Freisetzung durch Synaptobrevin2

Munc18-1 wird durch Reaktion des löslichen R-SNAREs Synaptobrevin2 freigesetzt. Syntaxin1A und SNAP-25 zeigen keinen solchen Einfluss (siehe Abb. 13, S. 55). Syntaxin1 kann *in vitro* Munc18-1 binden (Pevsner, Hsu et al. 1994; Yang, Steegmaier et al. 2000), jedoch scheint es hier nicht mit dem endogenen Munc18-1-Akzeptor kompetieren zu können. Vermutlich bindet rekombinantes Syntaxin1 nur das schon intrinsisch verlorene, unendlich verdünnte Munc18-1, so dass kein zusätzlicher Einfluss auf die Munc18-1 Freisetzung beobachtet wurde.

Die Freisetzungsreaktion scheint auf der Ebene der R-SNAREs bis zu einem gewissen Grad reguliert zu sein. Denn obwohl in Lösung Endobrevin und VAMP4 mit den neuronalen SNAREs ähnlich schnell stabile Komplexe

bilden können (Fasshauer, Antonin et al. 1999; Yang, Gonzalez et al. 1999), ist in nativen Membranen von den getesteten R-SNAREs Synaptobrevin2 das deutlich potenteste in der Munc18-1-Freisetzung (gepaarter t-Test Synaptobrevin-Endobrevin $p < 0.0005$, siehe Abb. 13, S. 55). Munc18-1 scheint somit in gewissem Maße ein *Proof-Reading* durchzuführen, wie es auch für sein ER-Golgi-Homolog Sly1p in Hefe beschrieben wurde (Peng and Gallwitz 2002). Durch die hohe Dosis an rekombinanten R-SNAREs, wie im Fall von Endobrevin und VAMP4, wird vermutlich eine Schwelle überwunden, so dass, wenn auch schwächer, Munc18-1 danach freigesetzt wird.

In einem der gezeigten Experimente (Kap. 6.2.8, S.59) wurde untersucht, ob durch das Toxin BoNT/C1 freigesetztes Munc18-1 die gleiche Membranbindung besitzt wie durch Synaptobrevin freigesetztes Munc18-1. In dem einen Fall wird Munc18-1 durch Schneiden seines Akzeptors, im anderen Fall durch den Einbau von Synaptobrevin2 in ternäre Komplexe freigesetzt. Bei gleicher Pool-Zugehörigkeit und gleicher Bindung an die Membran, wurde keine additive Munc18-1-Freisetzung bei Kombination von BoNT/C1 und Synaptobrevin im Reaktionsmix erwartet. Wären Pools mit unterschiedlicher Munc18-1-Plasmamembranbindungen vorhanden, wäre ein additiver Effekt von BoNT/C1 und Synaptobrevin auf Munc18-1 erwartet worden, da nun zwei Munc18-1-Pools gleichzeitig freigesetzt würden. Anhand der experimentellen Analyse konnte kein additiver Verlust von Munc18-1 nachgewiesen werden, woraus zu schließen ist, dass beide Proteine auf den gleichen Akzeptor wirkten: auf Syntaxin1A.

Um zu klären, welcher Bereich des SNARE-Motivs für den Synaptobrevin2-Einbau relevant ist, wurden zwei trunkierte Synaptobrevin-Varianten eingesetzt (AA 1-81 und AA 42-96, zur Verdeutlichung siehe Abb. 5, S. 16). Keine der Varianten vermochte Munc18-1 freizusetzen. Im Fall des ersten Deletionskonstruktes genügte der Verlust der beiden letzten SNARE-Layer, um die Freisetzung von Munc18-1 zu verhindern. Dem zweiten Konstrukt fehlte die N-terminale Domäne und die ersten 4 Layer des SNARE-Motivs (Fasshauer, Sutton et al. 1998). Hier war ebenfalls die Wirkung auf Munc18-1 unterbunden. Es wurde nicht adressiert, ob der Verlust des nicht zum SNARE-Motiv gehörenden N-Terminus schon

genügen würde, damit das Protein seine Fähigkeit zur Munc18-1 Freisetzung verlöre. Es wurde jedoch deutlich, dass für die Wirkung des Synaptobrevins nicht nur der N-Terminus, sondern gleichzeitig auch der C-Terminus benötigt wird. *In vitro* kann Synaptobrevin nicht direkt an Syntaxin1A binden - die Anwesenheit von SNAP-25 ist notwendig (Hayashi, McMahon et al. 1994). Dieser Befund wurde auch für das Hefehomolog Snc1p publiziert (Rossi, Salminen et al. 1997). Die trunkeierten Varianten von Synaptobrevin (AA 2-80 wie auch AA37-116), ähnlich den hier verwendeten Deletionen, können keinen Synaptobrevin:SNAP-25-Komplex mehr bilden (Hayashi, McMahon et al. 1994). In Gegenwart von Syntaxin jedoch bilden SNAP-25 und Synaptobrevin AA2-80 einen ternären, SDS resistenten Komplex (Hayashi, McMahon et al. 1994). Trotz vermeintlich ähnlicher Eigenschaften der löslichen Synaptobrevin2-Varianten, unterscheiden sie sich, sobald sie in die Lipidmembran integriert sind. In einem Liposomenfusionsexperiment, bei dem membranverankertes Synaptobrevin AA 1-84 eingesetzt wurde, wurde im Vergleich zum Wildtyp-Synaptobrevin eine auf etwa die Hälfte reduzierte Fusionsrate beobachtet (OLGA VITES, persönliche Mitteilung). Des Weiteren zeigte dort die C-terminale trunkeierte Variante im Vergleich zum Wildtyp-Synaptobrevin2 eine deutliche Reduktion in der SNARE-Komplexbildung (OLGA VITES, persönliche Mitteilung). *In vivo* wurde ebenfalls gezeigt, dass die oben beschriebenen Bereiche, N- und C-terminal vom SNARE-Motiv, des Synaptobrevin2 für seine Funktion in der Exocytose wichtig sind. Ein Chimär aus dem Hefehomolog Snc1p und Säuger Synaptobrevin2, konnte den *Knockout* von *snc2* nur retten, wenn das Chimär sowohl N- als auch C-terminal der Snc1p Aminosäuresequenz entsprach. Dabei durfte die Synaptobrevin2 entsprechende Sequenz nur in den letzten 2/3 des SNARE-Motivs vorhanden sein (Gerst 1997). In einem kürzlich erschienen Artikel wurde anhand von SNAP-25 Mutanten gezeigt, dass das N-terminale Ende der SNAREs für das *Priming* von Vesikeln und das C-terminale Ende für das *Triggering* und die Fusion notwendig ist. Erst durch Zusammenschnüren der C-terminalen Enden der SNAREs zum *Core*-Komplex wird jene beträchtliche Energie frei, die vermutlich notwendig ist, um die

Lipiddoppelmembranen zu fusionieren (Sorensen, Wiederhold et al. 2006). Respektive dieser Befunde scheinen die hier vorgestellten Ergebnisse aus den Experimenten mit trunziertem Synaptobrevin darauf hinzudeuten, dass der N-Terminus zum anfänglichen Einfädeln in den SNARE-Komplex notwendig ist. Die Bildung dieses Komplexes reicht jedoch nicht aus, um Munc18-1 zu lösen. Erst wenn Synaptobrevin mit seinem C-Terminus voll in den SNARE-Komplex integriert wird, wobei, wie oben beschrieben, große Mengen an Energie freigesetzt werden, wird Munc18-1 von der Membran gelöst. Demnach müsste Munc18-1 auch während der *trans*-Komplexbildung an Syntaxin1A assoziiert bleiben und sich erst nach *cis*-Komplexbildung lösen.

7.1.5 Die Beteiligung von SNAP-25 an der Munc18-1-Freisetzung durch Synaptobrevin

SNAP-25 ist im Vergleich zu Munc18-1 im großen Überschuss vorhanden. Das molekulare Verhältnis beträgt etwa 40:1, wenn das Verhältnis Syntaxin zu Munc18-1 20:1 (Schutz, Zilly et al. 2005) und das Verhältnis SNAP-25 zu Syntaxin1A mindestens 2:1 (THORSTEN LANG, persönliche Mitteilung) beträgt. Für den effizienten Einbau von Synaptobrevin, der zur SNARE-Komplexbildung führt, ist intaktes SNAP-25 notwendig. Sein Schnitt mit dem Toxin BoNT/E reduziert den Einbau in der Plasmamembran (Lang, Margittai et al. 2002), wobei nicht klar ist, ob geschnittenes SNAP-25 unter diesen Bedingungen noch Komplexe mit geringerer Stabilität bilden kann. *In vitro* kann SNAP-25 AA 1-180 (Fragment, das nach Toxinbehandlung entsteht) SNARE-Komplexe bilden, die jedoch nicht SDS-resistent sind (Hayashi, McMahon et al. 1994; Hayashi, Yamasaki et al. 1995). Untermauert wird dies durch fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen, die ergaben, dass das geschnittene SNAP-25 ebenfalls, wenn auch langsamer als das intakte SNAP-25, fähig ist, einen SNARE-Komplex zu bilden (Fasshauer and Margittai 2004). Im Gegensatz hierzu, wenn in *in vitro Assays* lipidintegrierte SNAREs eingesetzt werden, ist durch den Toxin-Verdau von SNAP-25 die Liposomenfusion inhibiert (Schuette, Hatsuzawa et al. 2004). Ebenso können im Liposomen-*Docking-Assay*, bei Einsatz von SNAP-25 AA 1-180 und Wildtyp-Syntaxin1A, die

Synaptobrevin-Liposomen nicht mehr binden (OLGA VITES, persönliche Mitteilung). Es scheint also *in vitro* nur dann mit trunkiertem SNAP-25 (AA 1-180) eine Komplexbildung möglich zu sein, wenn nicht in die Membran integrierte oder an sie gekoppelte SNAREs eingesetzt werden.

Die Vorbehandlung der Plasmamembranen mit BoNT/E und der Schnitt von 90% des detektierbaren SNAP-25, verhinderten in den gezeigten Experimenten nicht die Synaptobrevin induzierte Munc18-1 Freisetzung (siehe Abb. 17, S. 61). Es gibt folgende Erklärungsmöglichkeiten, warum der damit einhergehend reduzierte Einbau von Synaptobrevin nicht die Munc18-1 Freisetzung inhibierte.

1) Es gibt einen SNAP-25 Pool, der sich in der Nähe von dem Munc18-1 gebundenen Syntaxin befindet. Dort ist SNAP-25 nicht für das Toxin zugänglich, kann daher beim Synaptobrevin-Einbau partizipieren. Da dieser Pool im Verhältnis zum gesamten SNAP-25 Pool klein ist und die Munc18-1-Syntaxin-Bindung keine Voraussetzung für den Synaptobrevin-Einbau ist, ist bei voll funktionstüchtiger Munc18-1 Freisetzung der Synaptobrevineinbau reduziert. Rechnerisch genügt es, wenn ein vierzigstel des SNAP-25-Pools protektiert ist, da das Verhältnis SNAP-25 zu Munc18-1 40:1 beträgt (Syntaxin:Munc18-1 20:1 (Schutz, Zilly et al. 2005); SNAP-25 zu Syntaxin1 mindestens 2:1 (THORSTEN LANG, persönliche Mitteilung).

2) Der Verdau von SNAP-25 ist nicht vollständig, und die verbleibenden 12% (aus vorläufigen Beobachtungen geschätzt) des ungeschnittenen SNAP-25 sind ausreichend. Unter der Annahme, dass die SNAP-25-Anfärbung repräsentativ war, ist nach dem Verdau das Verhältnis SNAP-25 zu Munc18-1 immer noch 4:1. Somit könnte die Funktion der Synaptobrevin-induzierten Munc18-1-Freisetzung gewährleistet gewesen sein.

3) Möglich wäre außerdem, dass das trunkierte SNAP-25 zusammen mit Syntaxin einen instabilen Komplex mit Synaptobrevin bildet, wie er *in vitro* beschrieben wurde (Hayashi, McMahon et al. 1994; Fasshauer and Margittai 2004). Der gebildete Komplex müsste fähig sein, Munc18-1 zu lösen, jedoch anschließend wieder zerfallen, so dass Synaptobrevin von der Plasmamembran dissoziiert und wieder ausgewaschen wird.

Mit diesem Experiment konnte also nicht eindeutig geklärt werden, ob beziehungsweise auf welche Weise SNAP-25 an der durch Synaptobrevin2 induzierten Munc18-1 Freisetzung beteiligt ist. Mit Untersuchungen an *snap-25-Knockout-Zellen* konnte jedoch zumindest eindeutig gezeigt werden, dass SNAP-25 für die Freisetzung essentiell ist. Hier war der Verlust von Munc18-1 durch Synaptobrevin nur in Gegenwart von SNAP-25 zu beobachten (siehe Abb. 18, S. 63). Dies untermauert ebenfalls, dass Munc18-1 gebundenes Syntaxin fähig ist, einen SNARE-Komplex zu bilden, wobei sich Munc18-1 löst.

Die Freisetzung von Munc18-1 von Syntaxin durch ein R-SNARE wurde schon früher beobachtet. Das Protein Tomosyn, das C-Terminal ein R-SNARE Motiv besitzt, kann *in vitro* und *in vivo* mit den neuronalen SNAREs Komplexe bilden (Hatsuzawa, Lang et al. 2003; Pobbati, Razeto et al. 2004). Für dieses Protein wurde beschrieben, dass es den Munc18-1-Syntaxin1A-Komplex aufbrechen kann und an das Syntaxin1A-SNARE-Motiv bindet (Fujita, Shirataki et al. 1998). Dies zeigt, dass auch *in vitro* trotz Anwesenheit von Munc18-1 Befunde für eine SNARE-SNARE-Interaktion zu finden sind. Vollständig übertragbar sind die Daten über Tomosyn jedoch nicht, da in der genannten Studie die Anwesenheit von SNAP-25 nicht erforderlich war.

7.1.6 Die Funktion von Munc18-1 bei der SNARE-Komplexbildung

Die hier gezeigten Daten sprechen dafür, dass Munc18-1 über Syntaxin1A an die Plasmamembran bindet. Dabei bindet es nicht an die geschlossene oder vollständig offene, sondern an eine halb-offene Konformation, so dass das gebundene Syntaxin SNARE-Komplexe bilden kann. Die Bindung an Syntaxin ist nicht sehr dauerhaft, es besteht möglicherweise ein Gleichgewicht zwischen cytosolischem und gebundenem Munc18-1. Daran könnten auch Proteine wie Mint1 beteiligt sein (Schutz, Zilly et al. 2005).

Während der SNARE-Komplexbildung, vermutlich erst beim Abschluss des *Zippering* der letzten SNARE-Layer (C-terminal trunkiertes Synaptobrevin kann Munc18-1 nicht lösen), löst sich Munc18-1 von Syntaxin1A. Nach Abschluss der Komplexbildung ist Syntaxin in der vollständig geöffneten Konformation, so dass Munc18-1 hier nicht mehr binden kann (siehe Abb. 24).

Das meiste Syntaxin in der Plasmamembran scheint in Mikrodomänen organisiert zu sein (Lang, Bruns et al. 2001). Dabei sorgt das SNARE-Motiv für die Organisation der Domänen (Sieber, Willig et al. 2006). Es ist denkbar, dass vereinzelt Syntaxine diese Domänen verlassen und mit SNAP-25 Komplexe bilden: entweder Syntaxin1 zu SNAP-25 1:1 oder 2:1, wie es *in vitro* beobachtet wurde (Fasshauer, Otto et al. 1997). Diese Komplexe können die Ursache dafür sein, dass sich *in vitro* die SNARE-Komplexe nur langsam und in einer Größenordnung von Minuten bilden (Fasshauer and Margittai 2004). Möglicherweise verhindert die Munc18-1-Syntaxin-Bindung *in vivo*, dass der Syntaxin zu SNAP-25 1:1 Komplex mit monomerem Syntaxin oder mit plasmamembranständigem Synaptobrevin2 unproduktive Komplexe bildet. Diese Komplexe hätten einen sinnlosen Energieaufwand zur Folge und würden eventuell die Exocytose verlangsamen, da weniger freie SNAREs zur Verfügung stehen würden. Für diese Argumentation spricht, dass in Munc18-1 *Knockout*-Zellen bei inhibierter Vesikelfusion die Menge an SNARE-Komplexen erhöht ist (Toonen, de Vries et al. 2005) und somit vermutlich durch plasmamembranständige SNAREs entstehen. In Hefe ist, wie auch hier in PC12-Zellen, das Syntaxin-Homolg Sso1p über die gesamte Plasmamembran verteilt (Brennwald, Kearns et al. 1994). Dagegen ist das Munc18-1-Homolog Sec1p nur an den *Budding*-Stellen konzentriert, an denen die Exocytose stattfindet (Carr, Grote et al. 1999; Grote, Carr et al. 2000).

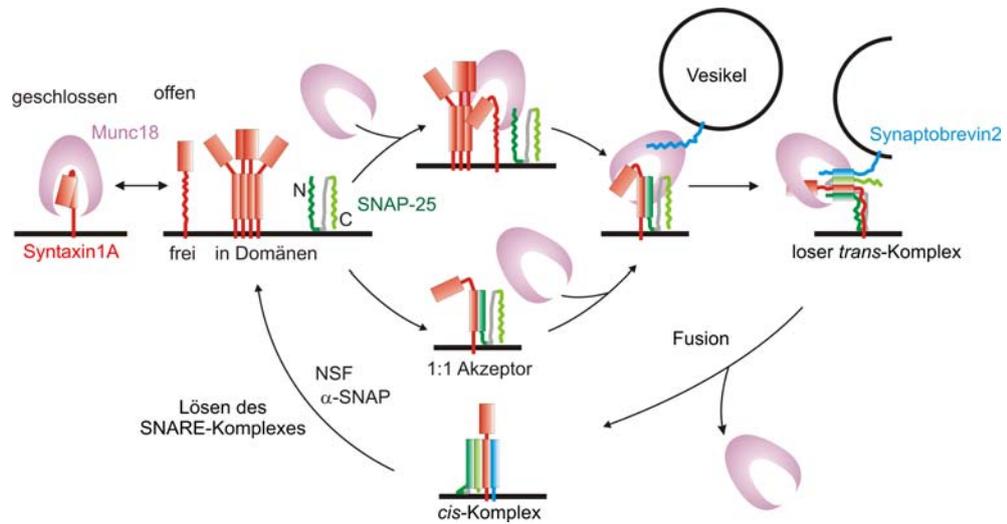


Abb. 24 Modell über die Bindung von Munc18-1 an die neuronalen SNAREs

Munc18-1 bindet entweder an halb-offenes Syntaxin, das in Mikrodomänen organisiert ist, oder an einen 1:1 Komplex aus Syntaxin und SNAP-25. Nach dem Docken von Granula kann Synaptobrevin mit einem Komplex aus Munc18, Syntaxin und SNAP-25 interagieren, ein loser *trans*-Komplex wird gebildet. In diesem bleibt Munc18 noch gebunden. Erst bei der vollständigen SNARE-Komplexbildung, beim vollständigen *Zippering*, löst sich Munc18-1 und es kommt zur Vesikelfusion. Die entstehenden *cis*-SNARE-Komplexe müssen mit NSF und α -SNAP gelöst werden, damit die SNAREs wieder ihren Ausgangszustand erreichen. Vielleicht gibt es zusätzlich noch Syntaxinmoleküle, die frei in der Membran diffundieren. An diese könnte Munc18-1 mit hoher Affinität binden, sie in der geschlossenen Konformation halten, so dass sie nicht mehr für die Bildung von SNARE-Komplexen zur Verfügung stehen. Die Darstellung der Proteine erfolgte wie in (Jahn, Lang et al. 2003).

In der vorliegenden Arbeit konnte eine Kollokalisierung von Granula mit Munc18-1 dokumentiert werden. Daher könnte Munc18-1 an potentiellen Stellen der Exocytose entweder monomeres Syntaxin für die SNARE-Komplexbildung mit SNAP-25 und vesikulärem Synaptobrevin oder direkt den Syntaxin zu SNAP-25 1:1 Komplex für vesikuläres Synaptobrevin bereithalten und die Exocytose beschleunigen. Die Untersuchungen mit Synaptobrevin2-Verkürzungen deuten daraufhin, dass Munc18-1 sogar noch in der *trans*-Konfiguration der SNAREs am Komplex assoziiert bleibt. Es ist nicht klar, ob es hier weiter regulativen Einfluss nimmt oder nur bis zur vollständigen Komplexbildung assoziiert bleibt. In einem kürzlich veröffentlichten Übersichtsartikel (Rizo, Chen et al. 2006) wird spekuliert, ohne dass dafür Beweise angeführt werden, dass ein großes Protein, wie zum Beispiel Munc18-1, am *trans*-SNARE-Komplex bis zur Membranfusion gebunden sein muss. Diese Spekulation erfolgt aus der Überlegung, dass die *trans*-SNARE-Komplexe sonst zu schnell diffundieren

könnten und sich dann mehrere Komplexe zentral unterhalb des zu fusionierenden Vesikels sammeln und so sterisch die Fusion verhindern könnten. Ein großes, gebundenes Protein, möglicherweise Munc18-1, würde die Diffusion der Komplexe verlangsamen und für eine erfolgreiche Fusion sorgen. Anders als für das Hefehomolog Sec1p (Carr, Grote et al. 1999), siehe auch Abb. 7, S.21), für das eine Bindung an *cis*- oder *trans*-Komplexe gezeigt werden konnte, wurden für Munc18-1 bisher keine Hinweise auf eine Bindung an den *trans*-Komplex gefunden. In einer Arbeit (Yang, Steegmaier et al. 2000) wurde die Frage nach *trans*- oder *cis*-Komplexbindung adressiert. Dort wurde detergenzbehandeltes Hirn-Membranlysat mit chemischem *Crosslinker* versetzt, um die Munc18-1-SNARE-Bindungen zu stabilisieren. Anschließend wurde das Lysat mit einer Western-Blot-Analyse auf Munc18-1-SNARE-Komplexe hin untersucht. Es wurden nur Munc18-Syntaxin-Komplexe detektiert. Vermutlich lag dies daran, dass zur Herstellung des Membranextraktes zu viel Zeit benötigt wurde. Allein der Zentrifugationsschritt dauerte eine Stunde. Anhand des hier vorgestellten intrinsischen Verlustes von Munc18-1, wäre während dieser Zeitspanne das an halb-offenem Syntaxin gebundene Munc18-1 schon von der Membran verloren gegangen. Nur das nicht auswaschbare Munc18-1, das eventuell an geschlossenem Syntaxin gebunden ist, wäre übrig geblieben. Selbst wenn das Versuchsprotokoll entsprechend angepasst werden würde, wäre das meiste detektierte Munc18-1 an halb-offenem Syntaxin, darüber eventuell mit SNAP-25 in einem Komplex, jedoch nicht am *trans*-Komplex gebunden, da dieser im Verhältnis zur SNARE-Menge an der Membran zu selten auftritt. Der Pool an *trans*-Komplex assoziiertem Munc18-1 könnte daher zu gering für einen Nachweis mit einer Western-Blot-Analyse sein. Da Munc18-1 gebundenes Syntaxin für die *Core*-Komplexbildung zugänglich ist und Munc18-1 nicht erst durch andere Proteine zu entfernen ist, muss ebenfalls die in der Einleitung dargestellte Funktion von Munc13-1 in der neuronalen Exocytose überdacht werden (Kap. 3.5, S.10), da ein aktives Entfernen von Munc18-1 nicht notwendig zu sein scheint. Dies ist in Übereinstimmung mit einer Arbeit, die keine Bindung von Munc13-1 an Syntaxin1 feststellen konnte (Basu, Shen et al. 2005).

7.1.7 Schlussfolgerung

Es ist schon lange ein Rätsel, mit welchem molekularen Mechanismus Munc18-1 an der neuronalen Exocytose beteiligt ist und seine essentielle Funktion ausübt. Durch gegensätzliche Interpretationen aus *in vitro* und *in vivo* Studien wurde dies untermauert (Toonen and Verhage 2003). Anhand von *in vitro* Studien scheint die Munc18-1-Syntaxin1-Bindung die SNARE-Komplexbildung zu verhindern (Yang, Steegmaier et al. 2000), wogegen *in vivo*, beim *Knockout* von Munc18-1 die SNARE-vermittelte Exocytose zum Erliegen kommt (Verhage, Maia et al. 2000).

In dieser Arbeit wurde der *Membrane-Sheet-Assay* eingesetzt, um die SNAREs und an sie gebundene Proteine in ihrer natürlichen Umgebung und Organisation zu belassen und die Bindung von Munc18-1 an die Plasmamembran zu untersuchen.

Anhand des Schnitts von plasmalemmalen Syntaxin und Einsatz von Munc18-1-Mutanten, konnte gezeigt werden, dass Syntaxin als Akzeptor für Munc18-1 in der Membran fungiert. Zur effizienten Rekrutierung muss dafür Syntaxin1 die geschlossene Konformation annehmen können.

In vitro kann die geschlossene Syntaxin-Konformation keine SNARE-Komplexe mit SNAP-25 und Synaptobrevin2 bilden.

Daher kann es nicht die geschlossene Konformation sein, die das meiste Munc18-1 bindet, da die Zugabe von rekombinantem Synaptobrevin2, die zur SNARE-Komplexbildung in der Membran führt (Lang, Margittai et al. 2002), Munc18-1 von gebundenem Syntaxin freisetzt. Munc18-1 gebundenes Syntaxin1 steht also für die SNARE-Komplexbildung zur Verfügung. Es wird daher spekuliert, dass eine Munc18-1-Bindung an eine halb-offene Konformation von Syntaxin existiert, die Syntaxin1 die SNARE-Komplexbildung erlaubt. Da auf *Sheets* von *snap25-Knockout* Zellen der synaptobrevin2induzierte Munc18-1-Verlust nicht zu beobachten ist, wird bestätigt, dass es die SNARE-Komplexbildung ist, die Munc18-1 verdrängt und gezeigt, dass SNAP-25 in diesem Prozess essentiell ist. Der Schnitt von SNAP-25 durch BoNT/E führt nicht zur Inhibition der synaptobrevin2induzierten Munc18-1-Freisetzung. Eine Erklärungsmöglichkeit hierfür ist, dass die Bindung von Munc18-1 an die offene Konformation von Syntaxin die Bildung von einem Syntaxin zu

SNAP-25 1:1 Komplex ermöglicht, in dem SNAP-25 vor dem Toxin protektiert ist. Da N- und C-terminale Verkürzungen von Synaptobrevin2 nicht Munc18-1 freisetzen, wird vermutet, dass zur Munc18-1-Freisetzung die gesamte Einschnürung des Synaptobrevin2 in den *Core*-Komplex notwendig ist. Daher wird hier spekuliert, dass eine schwache Munc18-1-Bindung an eine halb-offene Syntaxin-Konformation existiert, die spätestens mit Beendigung der SNARE-Komplexbildung, wenn sich Syntaxin vollständig öffnet, gelöst wird. Somit müsste Munc18-1 über die halb-offene Syntaxin-Konformation auch an den *trans*-SNARE-Komplex gebunden bleiben. Die Munc18-1-Bindung an die halb-offene Konformation könnte einen hochreaktiven Akzeptor für vesikuläres Synaptobrevin stabilisieren, der ansonsten unproduktive Komplexe mit plasmalemalen SNAREs bilden würde. Durch die Kolo-kalisation von Granula mit Munc18-1 würde dieser Akzeptor zusätzlich noch räumlich an exocytoserelevanten Stellen lokalisiert werden.

7.2 Analyse des Zustands der SNARE-Domänen nach Erhöhung der Calciumkonzentration

7.2.1 Wirkung von mikro- und nanomolarem Calcium auf die Antigenizität von Membranproteinen

In der hier vorgestellten Arbeit wurde der Einfluss von Calcium auf die Antigenizität von membrangebundenen und membranassoziierten Proteinen beobachtet. Bei höheren Calciumkonzentrationen ($>54\mu\text{M}$ freies Calcium) nahm die Antigenizität von allen untersuchten Membranproteinen ab. Dabei war es unerheblich, ob die erhöhte Calciumkonzentration in der Zelle oder direkt auf die Plasmamembran wirkte. Bei nanomolarem Calcium war nur die Antigenizität von den SNAREs beeinflusst. Der Antigenizitätsverlust war für das divalente Ion Calcium spezifisch, da Magnesium keinen Einfluss zeigte.

Durch Ausschluss von BSA in Kontrollexperimenten wurde bestätigt, dass es keine durch Calcium induzierte BSA-Präzipitate waren, die durch Verkleben der Plasmamembran zum Antigenizitätsverlust führten.

Calcium-aktivierte Proteasen, wie zum Beispiel Calpain, das auch Plasmamembranproteine degradiert (für eine Übersicht siehe (Liu, Van Vleet et al. 2004)), konnten ausgeschlossen werden, da auch in Abwesenheit von Cytosol die Reduktion der Antigenizität stattfand. Die Zugabe von einem Protease-Inhibitor konnte den Calcium-induzierten Verlust der Immunreaktivität auf *Membrane-Sheets* nicht stoppen, so dass membranverankerte Proteasen oder residuell-assoziierte Proteasen ebenfalls nicht für den dramatischen calciuminduzierten Verlust der Antigenizität verantwortlich sein konnten.

Über den Intra-Golgi-Membrantransport wurde berichtet, dass die Anwesenheit von physiologischen Calciumkonzentrationen für den Transport notwendig sei, dass jedoch bei Überschreiten von 100 nM freiem Calcium der Transport inhibiert werde (Porat and Elazar 2000). Eine solche oder ähnliche Umbalancierungen des Transport-Gleichgewichts konnten als Ursache der reduzierten Immunfluoreszenz ausgeschlossen werden, da auch nach der Herstellung von *Membrane-Sheets*, in Abwesenheit der intrazellulären Kompartimente und des Cytosols, der Verlust der Immunreaktivität zu beobachten war. Aus ähnlichen Gründen wurde die Endocytose ausgeschlossen, da *Clathrin-Coated-Pits* nur in geringer Anzahl auf den *Membrane-Sheets* vorhanden sind (Avery, Ellis et al. 2000) und bei fehlendem Cytosol die für die Endocytose notwendigen Faktoren nicht an die Membran rekrutiert werden können.

Somit konnten calciumaktivierte Proteasen, eine durch Calcium induzierte Maskierung der Membran und ein durch Calcium verändertes Membrantransport-Gleichgewicht ausgeschlossen werden. Bei hohen Calciumkonzentrationen scheinen daher andere Effekte auf die untersuchten Proteine Einfluss zu nehmen, die die Antikörperzugänglichkeit der Membranproteine reduzierten.

Über die Ursachen kann nur spekuliert werden. Im Folgenden sollen einige Erklärungsmöglichkeiten vorgestellt werden.

Zum Beispiel könnte durch Calcium ein *Clustering* von polaren Lipidkopfgruppen auftreten.

Für das negativ geladene Phosphatidylserin (Ito, Ohnishi et al. 1975; Roux and Bloom 1990) und das zwitterionische Phosphatidylcholin (Roux and

Bloom 1990; Sinn, Antonietti et al. 2005) wurde beschrieben, dass die Anwesenheit von Calcium zu einem *Clustering* der Lipidkopfgruppen und einer dichteren Packung der Kohlenwasserstoffketten führt. Dieses *Clustering* könnte in der Plasmamembran integrierte Proteine aggregieren, so dass sie nicht mehr für den entsprechenden Antikörper zugänglich wären. Allerdings ist in artifiziellen Membransystemen das *Clustering* der Lipidkopfgruppen zu Domänen erst im millimolaren Calcium-Bereichen zu beobachten (Ito, Ohnishi et al. 1975; Sinn, Antonietti et al. 2005).

Eine alternative Erklärungsmöglichkeit wäre durch Calcium induzierter lateraler Druck auf die Lipide, der auf elektrostatische Wechselwirkungen basiert (McLaughlin and Murray 2005).

Wie von Helmholtz beobachtet (Helmholtz 1879), sammeln sich Gegenionen an einer geladenen Oberfläche und bilden so eine elektrische Doppelschicht. Dies trifft auch für die luminale Oberfläche der Plasmamembran in Anwesenheit von Calcium (und natürlich allen anderen Kationen) zu. Hier üben unter anderem elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Ionen und polaren Lipidkopfgruppen Druck aus (McLaughlin 1989; Marsh 1996). In verschiedenen Arbeiten wurde beschrieben, dass besonders durch Cholesterol, der Anteil an ungesättigten Fettsäuren und durch Calcium, der laterale Druck in artifiziellen Membransystemen beeinflusst werden kann ((Schindler 1989) für eine Übersicht siehe (Marsh 1996)). Zum Beispiel liegt der in einer künstlichen Membran rekonstituierte Acetylcholin-Rezeptor bei einem lateralen Druck von $30\text{-}32\text{ mN m}^{-1}$ als Monomer vor. Er dimerisiert bei Erhöhung der Calciumkonzentration mit einhergehender Erhöhung des lateralen Drucks auf $\sim 35\text{ mN m}^{-1}$ und erhält hier seine Ionenkanalaktivität (Schindler and Quast 1980; Schindler, Spillecke et al. 1984). In ähnlicher Weise könnte auch hier Calcium in höheren Dosen, ab $54\mu\text{M}$, den lateralen Druck in der Membran erhöhen. Somit würde Calcium indirekt auf die Membranproteine wirken und sie aneinander drängen. Dadurch wären sie für Antikörper unzugänglicher, was in eine Abnahme der Immunanfärbung resultieren würde.

Eine dritte Erklärungsmöglichkeit wäre, dass calciumbindende Proteine, wie zum Beispiel Calmodulin oder Annexin, zur Membran rekrutiert werden, dort aggregieren und dadurch die Mikrodomänenstruktur anderer Proteine

beeinflussen. Annexine, zum Beispiel, können nicht nur calciumabhängig an die Plasmamembran binden (Gerke, Creutz et al. 2005), sondern auch dort mit einander oligomerisieren und durch die gleichzeitige Lipidbindung Proteinmikrodomänen umorganisieren (Babiychuk and Draeger 2000). Dadurch werden die in diesen Domänen enthaltenen Proteine eventuell schlechter für Antikörper zugänglich. Fraglich ist nur, ob Annexin, das an *Sheet* verbliebenem cortikalen F-Aktin (Chasserot-Golaz, Vitale et al. 2005) gebunden ist, ausreicht, um nach Rekrutierung an die Membran Mikrodomänen zu reorganisieren.

Als vierte Alternative könnte durch Calcium initiiertes *Crowding* der membrangebundenen Proteine diskutiert werden. Die Bindung von Calcium an die Lipidkopfgruppen könnte einen Akzeptor für negativ geladene Aminosäureseitenketten von Membranproteinen darstellen. Dieses könnte die Protein-Faltungen verändern und das Antikörper-Epitop unzugänglich machen.

Die genannten Erklärungsversuche sind jedoch ausschließlich Spekulation, für sie wurden bisher keine Belege gefunden.

7.2.2 SNARE-spezifischer Calcium-Effekt bei nanomolarem Calcium

Anhand der vorgestellten Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass unter den getesteten Proteinen Calciumkonzentrationen, bei denen auch die Exocytose in PC12- und in *bovinen* chromaffinen Zellen stattfindet (Burgoyne 1991; Shin, Rizo et al. 2002; Sugita, Shin et al. 2002), im nanomolaren Bereich (850 nM), ausschließlich bei den SNARE-Proteinen zu einer Abnahme der Antigenizität führen. Im Fall von Syntaxin1A und SNAP-25, für die eine Abnahme auch durch Depolarisation von chromaffinen Zellen demonstriert wurde, erfolgte eine weitergehende Untersuchung dieses Phänomens.

Überexpressionsexperimente zeigten, dass auch bei Erhöhung des SNARE-Spiegels der calciuminduzierte Antigenizitätsverlust zu beobachten war. Darüber hinaus wurde in einer Korrelationsanalyse ermittelt, dass der gegen Syntaxin1A eingesetzte Antikörper das Protein repräsentativ erkannte. Anhand der Veränderung des Syntaxin1A-EGFP-Musters nach Zugabe von Calcium wurde geschlossen, dass sich tatsächlich die Syntaxin-Proteine in weniger Mikrodomänen konzentrierten (siehe Abb. 21, S. 71). Im Fall von

SNAP-25 konnte der Antikörper den Protein-*Pool* nicht ganz repräsentativ erkennen und besaß einen niedrigeren Korrelationskoeffizienten als Syntaxin1. Nach einer Calcium-Behandlung gab es sogar Stellen auf der Membran mit schwacher, uniformer EYFP-Fluoreszenz (siehe Abb. 21, S. 71), die überhaupt nicht mehr vom SNAP-25-Antikörper erkannt wurden. Der Korrelationskoeffizient stieg durch die Calcium-Zugabe zwar leicht an, in der Analyse blieb allerdings das uniforme, schwach fluoreszierende SNAP-25-EYFP unbemerkt, so dass der Korrelationskoeffizient in diesem Fall eine Überschätzung darstellte und eigentlich hätte fallen müssen. Daher kommt es durch Calcium vermutlich zum größten Teil zur Maskierung von SNAP-25. Aufgrund der methodischen Schwierigkeiten kann bei SNAP-25 keine Aussage über eine eventuelle calciumabhängige Umorganisation gemacht werden. Der verwendete Syntaxin1A-Antikörper war gegen den N-Terminus gerichtet, er erkannte jedoch nicht das SNARE-Motiv. Die Abnahme der Immunreaktivität wurde daher vermutlich durch eine stärkere Domänen-Aggregation hervorgerufen. Im Fall von SNAP-25 war aus dem oben genannten Grund eine Aggregation nicht ableitbar. Aufgrund des starken Immunreaktivitätsverlustes ist es wahrscheinlich, dass nicht eine dichtere Packung von SNAP-25, sondern Konformationsänderungen oder Komplexierung für Abnahme der Antigenizität verantwortlich waren. Der für die dargestellten Experimente verwendete Antikörper erkannte das N-terminale SNARE-Motiv. Ein weiterer, in Kontrollexperimenten verwendeter Antikörper erkannte das C-terminale SNARE-Motiv. Es wäre denkbar, dass Konformationsänderungen, die die SNARE-Motive von SNAP-25 involvieren, durch Calcium induziert wurden und somit zur Abnahme der Immunanfärbung führten. Möglicherweise induziert Calcium die Bildung von 1:1 oder 2:1 Syntaxin zu SNAP-25 Komplexen, wodurch die Bindung des SNAP-25-, nicht jedoch des Syntaxin-Antikörpers, stark inhibiert wäre. Unterstützt wird eine solche Interpretation durch den Befund, dass Calcium ebenfalls den Einbau von Synaptobrevin und des Syntaxin-SNARE-Motivs inhibiert. Die potenziellen Akzeptoren in der Membran befänden sich demnach schon in 2:1 Komplexen, so dass beide rekombinante Proteine erst nach langsamem Lösen dieser Komplexe an die Membran binden können. Da die Reduktion des Synaptobrevin-Einbaus

ihren halbmaximalen Effekt bei einer Konzentration von 23 μM Calcium besaß, könnte die Inhibition auch teilweise durch eine unspezifische Protein-Aggregation ausgelöst worden sein. Alternativ wäre es auch denkbar, dass Synaptobrevin schneller als Calcium auf die SNAREs wirkt. Bei einer Vorbehandlung der *Membrane-Sheets* mit Calcium könnte eine geringere Konzentration ausreichend sein um den Proteineinbau zu inhibieren. Dies wurde in vorläufigen Experimenten mit dem Syntaxin-SNARE-Motiv bestätigt. Es genügte eine 5minütige Vorbehandlung mit 1350 nM Calcium um den Einbau um 50% zu reduzieren (NAGARAJ D. HALEMANI, persönliche Mitteilung).

Eine spezifische Wirkung von Calcium auf die SNARE-Komplexbildung wurde in der Literatur schon beschrieben (An and Almers 2004). Dort konnte gezeigt werden, dass es durch die Depolarisation von PC12-Zellen zu Konformationsänderungen im SNAP-25-Protein kommt. Vermutlich findet eine Komplexbildung mit Syntaxin1A statt, die einen Vorkomplex zum *Core*-Komplex darstellt (An and Almers 2004). Diese Daten würden mit der in dieser Arbeit beschriebenen Abnahme der Immunfluoreszenz nach Depolarisation direkt übereinstimmen. So dass eventuell auch hier die Bildung des Vorkomplexes beobachtet wurde.

Wie Calcium auf die SNAREs wirkt und ihre Konformation ändern kann, bleibt unklar. Der SNARE-Komplex selbst besitzt zwar Calcium-Bindungsstellen, diese sind jedoch nicht Calcium-spezifisch und haben eine niedrige Affinität, so dass diese Bindung in der Exocytose vermutlich nicht relevant ist (Chen, Tang et al. 2005). Möglicherweise ist eines der Mitglieder der Synaptotagmin-Familie für die Übertragung des Calcium-Signals auf die SNAREs verantwortlich. Es wurde in zwei Arbeiten gezeigt (Rickman and Davletov 2003; Rickman, Archer et al. 2004), dass Synaptotagmine, die potenziellen Calciumsensoren in der Exocytose (Koh and Bellen 2003; Sudhof 2004), an Dimere aus Syntaxin1A und SNAP-25 binden können. Kürzlich wurde beschrieben, dass Synaptotagmin1 Calcium-abhängig die Bildung dieser Syntaxin1 zu SNAP-25 1:1 Komplexe fördert und in Gegenwart von Synaptobrevin die Bildung des *Core*-Complexes induziert (Bhalla, Chicka et al. 2006). Synaptotagmin könnte also der Übermittler des Calciumsignals zu den SNAREs sein und für die Bildung

von Syntaxin1 zu SNAP-25 1:1 SNARE-Komplexen sorgen. Da Synaptotagmin1 vor allem auf Granula oder synaptischen Vesikeln lokalisiert ist (Sudhof and Jahn 1991; Brose, Petrenko et al. 1992), ist es unwahrscheinlich, dass es sich um jene Isoform handelt, die für die Umorganisation auf der Plasmamembran verantwortlich ist. Hier käme eher Synaptotagmin7 in Frage, da es an der Plasmamembran lokalisiert ist (Sugita, Han et al. 2001).

Es lässt sich schlussfolgern, dass der durch nanomolares Calcium induzierte, SNARE-spezifische Antigenitätsverlust höchstwahrscheinlich eine SNARE-Komplexbildung reflektiert. Über den molekularen Mechanismus kann jedoch nur spekuliert werden.

7.2.3 Calcium-Effekt auf Munc18-1

Munc18-1 war das einzig untersuchte membranassoziierte Protein. Auch für dieses Protein wurde eine Abnahme der Immunanfärbung durch Calcium (54 μM) beobachtet. Hierbei ist aber im Gegensatz zu den anderen Membranproteinen nicht auszuschließen, dass Munc18-1 von der Membran abdissoziiert. Eine Trennung der Plasmamembran vom Cytosol durch eine Dichtegradientenzentrifugation sollte klären, ob Munc18-1 tatsächlich freigesetzt wird. Konsistent mit einer früheren Arbeit (Bhaskar, Shareef et al. 2004) wurde ein schwacher, nicht immer reproduzierbarer Verlust des Munc18-1 von der Membranfraktion beobachtet. Wegen der unsteten Ergebnisse war nicht abschließend zu klären, ob Munc18-1 tatsächlich durch Calcium von der Membran gelöst wird oder ob Munc18-1 aggregiert und dadurch schlechter nachweisbar ist.

Es ist denkbar, dass in diesem Experiment, im Gegensatz zum *Membrane-Sheet-Assay*, durch die hohe Proteinkonzentration im Lysat (7-15 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) eine Rückbindung des Munc18-1 möglich ist, so dass die calciuminduzierte Freisetzung nicht zu beobachten war. Alternativ wäre denkbar, dass verlorenes Munc18-1 an andere intrazelluläre Membranen gebunden hat, die ebenfalls in der Plasmamembranfraktion angereichert wurden und Munc18-1 daher nicht effizient in der cytosolischen Fraktion angereichert wurde. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit wäre, dass während der Zeitspanne der Zentrifugation durch den intrinsischen Verlust von

Munc18-1 (in Kap. 6.2.2, S. 49 beschrieben) die Differenz zwischen Calcium und nicht behandelter Probe so gering ausfiel, dass kein Unterschied mehr wahrnehmbar war.

7.2.4 Schlussfolgerung

Mikromolares Calcium reduzierte die Antigenizität aller untersuchten Membranproteine. Dieser Effekt war calciumspezifisch und basierte nicht auf Degradation durch calciumaktivierte Proteasen, ein verändertes Membrantransport-Gleichgewicht, durch Endocytose oder die Membran verdeckende Präzipitate. Die Ursache hierfür konnte nicht geklärt werden.

Bei dem Einsatz von nanomolarem Calcium wurde ein SNARE-spezifischer Antigenizitätsverlust und eine Umorganisation der Syntaxin-Mikrodomänen beobachtet. Dieser Vorgang könnte die Bildung von SNARE-Komplexen reflektieren, da der Einbau von rekombinanten SNARE-Proteinen reduziert wurde. Darüber hinaus wurde das Antikörper-Epitop, das im N-terminalen SNARE-Motiv von SNAP-25 liegt, nach Calciumbehandlung nicht mehr erkannt. Dies könnte für eine calciuminduzierte Beteiligung des SNARE-Motivs in einer Komplexbildung sprechen, eventuell der Syntaxin1 zu SNAP-25 1:1 SNARE-Komplexbildung. Dieser Komplex ist die Vorstufe für den *Core*-Komplex, bildet aber auch schnell mit endogenem Syntaxin1 einen Syntaxin zu SNAP-25 2:1 Komplex, so dass dies eine Erklärung für den beobachteten reduzierten Einbau von rekombinantem Synaptobrevin wäre.

8 Literaturverzeichnis

- Agarwal, R., S. Eswaramoorthy, et al. (2004). "Structural analysis of botulinum neurotoxin type E catalytic domain and its mutant Glu212-->Gln reveals the pivotal role of the Glu212 carboxylate in the catalytic pathway." Biochemistry **43**(21): 6637-44.
- Akert, K., H. Moor, et al. (1971). "Synaptic fine structure." Adv Cytopharmacol **1**: 273-90.
- An, S. J. and W. Almers (2004). "Tracking SNARE complex formation in live endocrine cells." Science **306**(5698): 1042-6.
- Augustine, G. J. and E. Neher (1992). "Calcium requirements for secretion in bovine chromaffin cells." J Physiol **450**: 247-71.
- Avery, J., D. J. Ellis, et al. (2000). "A cell-free system for regulated exocytosis in PC12 cells." J Cell Biol **148**(2): 317-24.
- Babiychuk, E. B. and A. Draeger (2000). "Annexins in cell membrane dynamics. Ca(2+)-regulated association of lipid microdomains." J Cell Biol **150**(5): 1113-24.
- Barnstable, C. J., R. Hofstein, et al. (1985). "A marker of early amacrine cell development in rat retina." Brain Res **352**(2): 286-90.
- Barszczewski, M. M. (2005). The establishment and characterization of an improved cell-free assay for exocytosis in neuroendocrine PC12 cells. Neurobiologie, Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie. Göttingen, Georg-August-Universität Göttingen: 123.
- Basu, J., N. Shen, et al. (2005). "A minimal domain responsible for Munc13 activity." Nat Struct Mol Biol **12**(11): 1017-8.
- Betz, A., M. Okamoto, et al. (1997). "Direct interaction of the rat unc-13 homologue Munc13-1 with the N terminus of syntaxin." J Biol Chem **272**(4): 2520-6.
- Bhalla, A., M. C. Chicka, et al. (2006). "Ca(2+)-synaptotagmin directly regulates t-SNARE function during reconstituted membrane fusion." Nat Struct Mol Biol **13**(4): 323-330.
- Bhaskar, K., M. M. Shareef, et al. (2004). "Co-purification and localization of Munc18-1 (p67) and Cdk5 with neuronal cytoskeletal proteins." Neurochem Int **44**(1): 35-44.
- Blasi, J., E. R. Chapman, et al. (1993). "Botulinum neurotoxin A selectively cleaves the synaptic protein SNAP-25." Nature **365**(6442): 160-3.
- Bock, J. B., H. T. Matern, et al. (2001). "A genomic perspective on membrane compartment organization." Nature **409**(6822): 839-41.
- Bracher, A. and W. Weissenhorn (2002). "Structural basis for the Golgi membrane recruitment of Sly1p by Sed5p." Embo J **21**(22): 6114-24.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-54.
- Brandhorst, D., D. Zwilling, et al. (2006). "Homotypic fusion of early endosomes: SNAREs do not determine fusion specificity." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(8): 2701-6.
- Brenner, S. (1974). "The genetics of *Caenorhabditis elegans*." Genetics **77**(1): 71-94.

- Brennwald, P., B. Kearns, et al. (1994). "Sec9 is a SNAP-25-like component of a yeast SNARE complex that may be the effector of Sec4 function in exocytosis." *Cell* **79**(2): 245-58.
- Brose, N., A. G. Petrenko, et al. (1992). "Synaptotagmin: a calcium sensor on the synaptic vesicle surface." *Science* **256**(5059): 1021-5.
- Brunger, A. T. (2005). "Structure and function of SNARE and SNARE-interacting proteins." *Q Rev Biophys* **38**(1): 1-47.
- Bryant, N. J. and D. E. James (2001). "Vps45p stabilizes the syntaxin homologue Tlg2p and positively regulates SNARE complex formation." *Embo J* **20**(13): 3380-8.
- Bryant, N. J. and D. E. James (2003). "The Sec1p/Munc18 (SM) protein, Vps45p, cycles on and off membranes during vesicle transport." *J Cell Biol* **161**(4): 691-6.
- Burgoyne, R. D. (1991). "Control of exocytosis in adrenal chromaffin cells." *Biochim Biophys Acta* **1071**(2): 174-202.
- Burgoyne, R. D. and A. Morgan (2003). "Secretory granule exocytosis." *Physiol Rev* **83**(2): 581-632.
- Burkhard, P., J. Stetefeld, et al. (2001). "Coiled coils: a highly versatile protein folding motif." *Trends Cell Biol* **11**(2): 82-8.
- Butz, S., M. Okamoto, et al. (1998). "A tripartite protein complex with the potential to couple synaptic vesicle exocytosis to cell adhesion in brain." *Cell* **94**(6): 773-82.
- Carr, C. M., E. Grote, et al. (1999). "Sec1p binds to SNARE complexes and concentrates at sites of secretion." *J Cell Biol* **146**(2): 333-44.
- Chamberlain, L. H. and 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**(51): 49750-4.
- Chasserot-Golaz, S., N. Vitale, et al. (2005). "Annexin 2 promotes the formation of lipid microdomains required for calcium-regulated exocytosis of dense-core vesicles." *Mol Biol Cell* **16**(3): 1108-19.
- Chen, X., J. Tang, et al. (2005). "Are neuronal SNARE proteins Ca²⁺ sensors?" *J Mol Biol* **347**(1): 145-58.
- Clarke, M., G. Schatten, et al. (1975). "Visualization of actin fibers associated with the cell membrane in amoebae of Dictyostelium discoideum." *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**(5): 1758-62.
- Coppola, T., C. Frantz, et al. (2002). "Pancreatic beta-cell protein granophilin binds Rab3 and Munc-18 and controls exocytosis." *Mol Biol Cell* **13**(6): 1906-15.
- Dobrunz, L. E. and C. C. Garner (2002). "Priming plasticity." *Nature* **415**(6869): 277-8.
- Dulubova, I., X. Lou, et al. (2005). "A Munc13/RIM/Rab3 tripartite complex: from priming to plasticity?" *Embo J* **24**(16): 2839-50.
- Dulubova, I., S. Sugita, et al. (1999). "A conformational switch in syntaxin during exocytosis: role of munc18." *Embo J* **18**(16): 4372-82.
- Dulubova, I., T. Yamaguchi, et al. (2002). "How Tlg2p/syntaxin 16 'snares' Vps45." *Embo J* **21**(14): 3620-31.
- Fasshauer, D., W. Antonin, et al. (1999). "Mixed and non-cognate SNARE complexes. Characterization of assembly and biophysical properties." *J Biol Chem* **274**(22): 15440-6.

- Fasshauer, D., W. Antonin, et al. (2002). "SNARE assembly and disassembly exhibit a pronounced hysteresis." Nat Struct Biol **9**(2): 144-51.
- Fasshauer, D., D. Bruns, et al. (1997). "A structural change occurs upon binding of syntaxin to SNAP-25." J Biol Chem **272**(7): 4582-90.
- Fasshauer, D. and M. Margittai (2004). "A transient N-terminal interaction of SNAP-25 and syntaxin nucleates SNARE assembly." J Biol Chem **279**(9): 7613-21.
- Fasshauer, D., H. Otto, et al. (1997). "Structural changes are associated with soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptor complex formation." J Biol Chem **272**(44): 28036-41.
- Fasshauer, D., R. B. Sutton, et al. (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**(26): 15781-6.
- Fischer von Mollard, G., T. C. Sudhof, et al. (1991). "A small GTP-binding protein dissociates from synaptic vesicles during exocytosis." Nature **349**(6304): 79-81.
- Fisher, R. J., J. Pevsner, et al. (2001). "Control of fusion pore dynamics during exocytosis by Munc18." Science **291**(5505): 875-8.
- Fujimoto, T., K. Lee, et al. (1991). "Immunocytochemical localization of fodrin and ankyrin in bovine chromaffin cells in vitro." J Histochem Cytochem **39**(11): 1485-93.
- Fujita, Y., H. Shirataki, et al. (1998). "Tomosyn: a syntaxin-1-binding protein that forms a novel complex in the neurotransmitter release process." Neuron **20**(5): 905-15.
- Garcia, E. P., P. S. McPherson, et al. (1995). "rbSec1A and B colocalize with syntaxin 1 and SNAP-25 throughout the axon, but are not in a stable complex with syntaxin." J Cell Biol **129**(1): 105-20.
- Gerke, V., C. E. Creutz, et al. (2005). "Annexins: linking Ca²⁺ signalling to membrane dynamics." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(6): 449-61.
- Gerst, J. E. (1997). "Conserved alpha-helical segments on yeast homologs of the synaptobrevin/VAMP family of v-SNAREs mediate exocytic function." J Biol Chem **272**(26): 16591-8.
- Gladychева, S. E., C. S. Ho, et al. (2004). "Regulation of syntaxin1A-munc18 complex for SNARE pairing in HEK293 cells." J Physiol **558**(Pt 3): 857-71.
- Graham, M. E., J. W. Barclay, et al. (2004). "Syntaxin/Munc18 interactions in the late events during vesicle fusion and release in exocytosis." J Biol Chem **279**(31): 32751-60.
- Graham, M. E., A. W. Sudlow, et al. (1997). "Evidence against an acute inhibitory role of nSec-1 (munc-18) in late steps of regulated exocytosis in chromaffin and PC12 cells." J Neurochem **69**(6): 2369-77.
- Greene, L. A. and A. S. Tischler (1976). "Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor." Proc Natl Acad Sci U S A **73**(7): 2424-8.
- Grishanin, R. N., V. A. Klenchin, et al. (2002). "Membrane association domains in Ca²⁺-dependent activator protein for secretion mediate

- plasma membrane and dense-core vesicle binding required for Ca²⁺-dependent exocytosis." *J Biol Chem* **277**(24): 22025-34.
- Grote, E., C. M. Carr, et al. (2000). "Ordering the final events in yeast exocytosis." *J Cell Biol* **151**(2): 439-52.
- Halachmi, N. and Z. Lev (1996). "The Sec1 family: a novel family of proteins involved in synaptic transmission and general secretion." *J Neurochem* **66**(3): 889-97.
- Hanson, P. I., J. E. Heuser, et al. (1997). "Neurotransmitter release - four years of SNARE complexes." *Curr Opin Neurobiol* **7**(3): 310-5.
- Harlow, M., D. Ress, et al. (1998). "Dissection of active zones at the neuromuscular junction by EM tomography." *J Physiol Paris* **92**(2): 75-8.
- Harrison, S. D., K. Broadie, et al. (1994). "Mutations in the Drosophila Rop gene suggest a function in general secretion and synaptic transmission." *Neuron* **13**(3): 555-66.
- Hata, Y., C. A. Slaughter, et al. (1993). "Synaptic vesicle fusion complex contains unc-18 homologue bound to syntaxin." *Nature* **366**(6453): 347-51.
- Hatsuzawa, K., T. Lang, et al. (2003). "The R-SNARE motif of tomosyn forms SNARE core complexes with syntaxin 1 and SNAP-25 and down-regulates exocytosis." *J Biol Chem* **278**(33): 31159-66.
- Hayashi, T., H. McMahon, et al. (1994). "Synaptic vesicle membrane fusion complex: action of clostridial neurotoxins on assembly." *Embo J* **13**(21): 5051-61.
- Hayashi, T., S. Yamasaki, et al. (1995). "Disassembly of the reconstituted synaptic vesicle membrane fusion complex in vitro." *Embo J* **14**(10): 2317-25.
- Heinemann, C., R. H. Chow, et al. (1994). "Kinetics of the secretory response in bovine chromaffin cells following flash photolysis of caged Ca²⁺." *Biophys J* **67**(6): 2546-57.
- Helmholtz, H. (1879). "Studien über elektrische Grenzschichten." *Annalen der Physik und Chemie* **7**(7): 337-382.
- Herrmann, B. G. and A. M. Frischauf (1987). "Isolation of genomic DNA." *Methods Enzymol* **152**: 180-3.
- Heumann, R., V. Kachel, et al. (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**(1): 179-90.
- Heuser, J. E. and T. S. Reese (1981). "Structural changes after transmitter release at the frog neuromuscular junction." *J Cell Biol* **88**(3): 564-80.
- Hirokawa, N., K. Sobue, et al. (1989). "The cytoskeletal architecture of the presynaptic terminal and molecular structure of synapsin 1." *J Cell Biol* **108**(1): 111-26.
- Holroyd, P., T. Lang, et al. (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**(26): 16806-11.
- Holt, M., F. Varoqueaux, et al. (2006). "Identification of SNAP-47, a novel Qbc-SNARE with ubiquitous expression." *J Biol Chem*.

- Hong, W. (2005). "SNAREs and traffic." *Biochim Biophys Acta* **1744**(3): 493-517.
- Hosono, R., T. Sassa, et al. (1987). "Mutations affecting acetylcholine levels in the nematode *Caenorhabditis elegans*." *J Neurochem* **49**(6): 1820-3.
- Humeau, Y., F. Doussau, et al. (2000). "How botulinum and tetanus neurotoxins block neurotransmitter release." *Biochimie* **82**(5): 427-46.
- Ito, T., S. I. Ohnishi, et al. (1975). "Synthesis of a New Phosphatidylserine Spin-Label and Calcium-Induced Lateral Phase Separation in Phosphatidylserine-Phosphatidylcholine Membranes." *Biochemistry* **14**(14): 3064-3069.
- Jacobson, K., E. D. Sheets, et al. (1995). "Revisiting the fluid mosaic model of membranes." *Science* **268**(5216): 1441-2.
- Jahn, R., T. Lang, et al. (2003). "Membrane fusion." *Cell* **112**(4): 519-33.
- Jahn, R. and T. C. Sudhof (1999). "Membrane fusion and exocytosis." *Annu Rev Biochem* **68**: 863-911.
- Kanda, H., Y. Tamori, et al. (2005). "Adipocytes from Munc18c-null mice show increased sensitivity to insulin-stimulated GLUT4 externalization." *J Clin Invest* **115**(2): 291-301.
- Kandel, E. R., J. H. Schwartz, et al. (2000). *Principles of Neural Science*. New York.
- Klenchin, V. A. and T. F. Martin (2000). "Priming in exocytosis: attaining fusion-competence after vesicle docking." *Biochimie* **82**(5): 399-407.
- Koh, T. W. and H. J. Bellen (2003). "Synaptotagmin I, a Ca²⁺ sensor for neurotransmitter release." *Trends Neurosci* **26**(8): 413-22.
- Kosodo, Y., Y. Noda, et al. (2002). "Binding of Sly1 to Sed5 enhances formation of the yeast early Golgi SNARE complex." *J Cell Sci* **115**(Pt 18): 3683-91.
- 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**(1): 184-94.
- 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**(3-4): 203-9.
- Laage, R., J. Rohde, et al. (2000). "A conserved membrane-spanning amino acid motif drives homomeric and supports heteromeric assembly of presynaptic SNARE proteins." *J Biol Chem* **275**(23): 17481-7.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(5259): 680-5.
- 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**(Pt 4): 861-4.
- Lang, T., D. Bruns, et al. (2001). "SNAREs are concentrated in cholesterol-dependent clusters that define docking and fusion sites for exocytosis." *Embo J* **20**(9): 2202-13.

- Lang, T., M. Margittai, et al. (2002). "SNAREs in native plasma membranes are active and readily form core complexes with endogenous and exogenous SNAREs." *J Cell Biol* **158**(4): 751-60.
- Lang, T., I. Wacker, et al. (1997). "Ca²⁺-triggered peptide secretion in single cells imaged with green fluorescent protein and evanescent-wave microscopy." *Neuron* **18**(6): 857-63.
- Leguia, M. and G. M. Wessel (2004). "Selective expression of a sec1/munc18 member in sea urchin eggs and embryos." *Gene Expr Patterns* **4**(6): 645-57.
- Lewis, J. L., M. Dong, et al. (2001). "The transmembrane domain of syntaxin 1A is critical for cytoplasmic domain protein-protein interactions." *J Biol Chem* **276**(18): 15458-65.
- Li, L. and L. S. Chin (2003). "The molecular machinery of synaptic vesicle exocytosis." *Cell Mol Life Sci* **60**(5): 942-60.
- Li, Y., D. Gallwitz, et al. (2005). "Structure-based functional analysis reveals a role for the SM protein Sly1p in retrograde transport to the endoplasmic reticulum." *Mol Biol Cell* **16**(9): 3951-62.
- Liu, J., S. A. Ernst, et al. (2004). "Fluorescence resonance energy transfer reports properties of syntaxin1a interaction with Munc18-1 in vivo." *J Biol Chem* **279**(53): 55924-36.
- Liu, X., T. Van Vleet, et al. (2004). "The role of calpain in oncotic cell death." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **44**: 349-70.
- Low, S. H., A. Vasanthi, et al. (2006). "Syntaxins 3 and 4 are concentrated in separate clusters on the plasma membrane before the establishment of cell polarity." *Mol Biol Cell* **17**(2): 977-89.
- Madison, J. M., S. Nurrish, et al. (2005). "UNC-13 interaction with syntaxin is required for synaptic transmission." *Curr Biol* **15**(24): 2236-42.
- Manders, E. M., J. Stap, et al. (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, et al. (2003). "The Habc domain and the SNARE core complex are connected by a highly flexible linker." *Biochemistry* **42**(14): 4009-14.
- Marsh, D. (1996). "Lateral pressure in membranes." *Biochim Biophys Acta* **1286**(3): 183-223.
- Martin, T. F. (2003). "Tuning exocytosis for speed: fast and slow modes." *Biochim Biophys Acta* **1641**(2-3): 157-65.
- Martin, T. F. and R. N. Grishanin (2003). "PC12 cells as a model for studies of regulated secretion in neuronal and endocrine cells." *Methods Cell Biol* **71**: 267-86.
- Mazia, D., G. Schatten, et al. (1975). "Adhesion of cells to surfaces coated with polylysine. Applications to electron microscopy." *J Cell Biol* **66**(1): 198-200.
- McLaughlin, S. (1989). "The electrostatic properties of membranes." *Annu Rev Biophys Biophys Chem* **18**: 113-36.
- McLaughlin, S. and D. Murray (2005). "Plasma membrane phosphoinositide organization by protein electrostatics." *Nature* **438**(7068): 605-11.
- McMahon, H. T., M. Missler, et al. (1995). "Complexins: cytosolic proteins that regulate SNAP receptor function." *Cell* **83**(1): 111-9.

- Misura, K. M., R. H. Scheller, et al. (2000). "Three-dimensional structure of the neuronal-Sec1-syntaxin 1a complex." *Nature* **404**(6776): 355-62.
- Morgan, A. and R. D. Burgoyne (1997). "Common mechanisms for regulated exocytosis in the chromaffin cell and the synapse." *Semin Cell Dev Biol* **8**(2): 141-9.
- Munson, M. and F. M. Hughson (2002). "Conformational regulation of SNARE assembly and disassembly in vivo." *J Biol Chem* **277**(11): 9375-81.
- Nagy, G., U. Matti, et al. (2002). "Protein kinase C-dependent phosphorylation of synaptosome-associated protein of 25 kDa at Ser187 potentiates vesicle recruitment." *J Neurosci* **22**(21): 9278-86.
- Nicholls, J. G., A. R. Martin, et al. (1992). *From neuron to brain : a cellular and molecular approach to the function of the nervous system*. Sunderland, Mass., Sinauer Associates.
- Ohara-Imaizumi, M., C. Nishiwaki, et al. (2004). "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**(9): 8403-8.
- Ohara-Imaizumi, M., C. Nishiwaki, et al. (2004). "Correlation of syntaxin-1 and SNAP-25 clusters with docking and fusion of insulin granules analysed by total internal reflection fluorescence microscopy." *Diabetologia* **47**(12): 2200-7.
- Okamoto, M. and T. C. Sudhof (1997). "Mints, Munc18-interacting proteins in synaptic vesicle exocytosis." *J Biol Chem* **272**(50): 31459-64.
- Pabst, S., M. Margittai, et al. (2002). "Rapid and selective binding to the synaptic SNARE complex suggests a modulatory role of complexins in neuroexocytosis." *J Biol Chem* **277**(10): 7838-48.
- Peng, R. and D. Gallwitz (2002). "Sly1 protein bound to Golgi syntaxin Sed5p allows assembly and contributes to specificity of SNARE fusion complexes." *J Cell Biol* **157**(4): 645-55.
- Peng, R. and D. Gallwitz (2004). "Multiple SNARE interactions of an SM protein: Sed5p/Sly1p binding is dispensable for transport." *Embo J* **23**(20): 3939-49.
- Pevsner, J., S. C. Hsu, et al. (1994). "Specificity and regulation of a synaptic vesicle docking complex." *Neuron* **13**(2): 353-61.
- Pobbati, A. V., A. Razeto, et al. (2004). "Structural basis for the inhibitory role of tomosyn in exocytosis." *J Biol Chem* **279**(45): 47192-200.
- Porat, A. and Z. Elazar (2000). "Regulation of intra-Golgi membrane transport by calcium." *J Biol Chem* **275**(38): 29233-7.
- Predescu, S. A., D. N. Predescu, et al. (2005). "Cholesterol-dependent syntaxin-4 and SNAP-23 clustering regulates caveolar fusion with the endothelial plasma membrane." *J Biol Chem* **280**(44): 37130-8.
- Rettig, J. and E. Neher (2002). "Emerging roles of presynaptic proteins in Ca⁺⁺-triggered exocytosis." *Science* **298**(5594): 781-5.
- Richmond, J. E., R. M. Weimer, et al. (2001). "An open form of syntaxin bypasses the requirement for UNC-13 in vesicle priming." *Nature* **412**(6844): 338-41.
- Rickman, C., D. A. Archer, et al. (2004). "Synaptotagmin interaction with the syntaxin/SNAP-25 dimer is mediated by an evolutionarily

- conserved motif and is sensitive to inositol hexakisphosphate." J Biol Chem **279**(13): 12574-9.
- Rickman, C. and B. Davletov (2003). "Mechanism of calcium-independent synaptotagmin binding to target SNAREs." J Biol Chem **278**(8): 5501-4.
- Rizo, J., X. Chen, et al. (2006). "Unraveling the mechanisms of synaptotagmin and SNARE function in neurotransmitter release." Trends Cell Biol.
- Rossi, G., A. Salminen, et al. (1997). "Analysis of a yeast SNARE complex reveals remarkable similarity to the neuronal SNARE complex and a novel function for the C terminus of the SNAP-25 homolog, Sec9." J Biol Chem **272**(26): 16610-7.
- Roux, M. and M. Bloom (1990). "Ca²⁺, Mg²⁺, Li⁺, Na⁺, and K⁺ distributions in the headgroup region of binary membranes of phosphatidylcholine and phosphatidylserine as seen by deuterium NMR." Biochemistry **29**(30): 7077-89.
- Rowe, J., F. Calegari, et al. (2001). "Syntaxin 1A is delivered to the apical and basolateral domains of epithelial cells: the role of munc-18 proteins." J Cell Sci **114**(Pt 18): 3323-32.
- Rutter, G., W. Bohn, et al. (1986). "Preparation of apical plasma membranes from cells grown on coverslips. Electron microscopic investigations of the protoplasmic surface." Eur J Cell Biol **39**(2): 443-8.
- Sadoul, K., J. Lang, et al. (1995). "SNAP-25 is expressed in islets of Langerhans and is involved in insulin release." J Cell Biol **128**(6): 1019-28.
- Sambrook, J. u. R., DW (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3 Vol., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sassa, T., S. Harada, et al. (1999). "Regulation of the UNC-18-Caenorhabditis elegans syntaxin complex by UNC-13." J Neurosci **19**(12): 4772-7.
- Sato, T. K., P. Rehling, et al. (2000). "Class C Vps protein complex regulates vacuolar SNARE pairing and is required for vesicle docking/fusion." Mol Cell **6**(3): 661-71.
- Scalettar, B. A. (2006). "How neurosecretory vesicles release their cargo." Neuroscientist **12**(2): 164-76.
- Schekman, R. and V. Brawley (1979). "Localized deposition of chitin on the yeast cell surface in response to mating pheromone." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(2): 645-649.
- Schiavo, G., F. Benfenati, et al. (1992). "Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin." Nature **359**(6398): 832-5.
- Schiavo, G., M. Matteoli, et al. (2000). "Neurotoxins affecting neuroexocytosis." Physiol Rev **80**(2): 717-66.
- Schindler, H. (1989). "Planar lipid-protein membranes: strategies of formation and of detecting dependencies of ion transport functions on membrane conditions." Methods Enzymol **171**: 225-53.
- Schindler, H. and U. Quast (1980). "Functional acetylcholine receptor from *Torpedo marmorata* in planar membranes." Proc Natl Acad Sci U S A **77**(5): 3052-6.

- Schindler, H., F. Spillecke, et al. (1984). "Different channel properties of Torpedo acetylcholine receptor monomers and dimers reconstituted in planar membranes." Proc Natl Acad Sci U S A **81**(19): 6222-6.
- Schleiden, M. (1838). Beiträge zur Phylogenesis. Jena.
- Schoch, S., P. E. Castillo, et al. (2002). "RIM1alpha forms a protein scaffold for regulating neurotransmitter release at the active zone." Nature **415**(6869): 321-6.
- Schuette, C. G., K. Hatsuzawa, et al. (2004). "Determinants of liposome fusion mediated by synaptic SNARE proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(9): 2858-63.
- Schulze, K. L., J. T. Littleton, et al. (1994). "rop, a Drosophila homolog of yeast Sec1 and vertebrate n-Sec1/Munc-18 proteins, is a negative regulator of neurotransmitter release in vivo." Neuron **13**(5): 1099-108.
- Schütz, D. (2003). Die Funktion von Munc-18 in der Exocytose sekretorischer Granulen. Institut für Anatomie und Zellbiologie. Marburg, Philipps-Universität Marburg: 95.
- Schutz, D., F. Zilly, et al. (2005). "A dual function for Munc-18 in exocytosis of PC12 cells." Eur J Neurosci **21**(9): 2419-32.
- Schwann, T. (1839). Mikroskopische Untersuchungen über die übereinstimmung in der Struktur und dem Wachsthum der Thiere und Pflanzen. Berlin.
- Scott, B. L., J. S. Van Komen, et al. (2004). "Sec1p directly stimulates SNARE-mediated membrane fusion in vitro." J Cell Biol **167**(1): 75-85.
- Setou, M., T. Nakagawa, et al. (2000). "Kinesin superfamily motor protein KIF17 and mLin-10 in NMDA receptor-containing vesicle transport." Science **288**(5472): 1796-802.
- Shin, O. H., J. Rizo, et al. (2002). "Synaptotagmin function in dense core vesicle exocytosis studied in cracked PC12 cells." Nat Neurosci **5**(7): 649-56.
- Sieber, J. J., K. I. Willig, et al. (2006). "The SNARE motif is essential for the formation of syntaxin clusters in the plasma membrane." Biophys J **90**(8): 2843-51.
- Sinn, C. G., M. Antonietti, et al. (2005). "Binding of calcium to phosphatidylcholine-phosphatidylserine membranes." Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects **in press**: 1-10.
- Sollner, T., M. K. Bennett, et al. (1993). "A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion." Cell **75**(3): 409-18.
- Sorensen, J. B., G. Nagy, et al. (2003). "Differential control of the releasable vesicle pools by SNAP-25 splice variants and SNAP-23." Cell **114**(1): 75-86.
- Sorensen, J. B., K. Wiederhold, et al. (2006). "Sequential N- to C-terminal SNARE complex assembly drives priming and fusion of secretory vesicles." Embo J **25**(5): 955-66.
- Sudhof, T. C. (2002). "Synaptotagmins: why so many?" J Biol Chem **277**(10): 7629-32.
- Sudhof, T. C. (2004). "The synaptic vesicle cycle." Annu Rev Neurosci **27**: 509-47.

- Sudhof, T. C. and R. Jahn (1991). "Proteins of synaptic vesicles involved in exocytosis and membrane recycling." Neuron **6**(5): 665-77.
- Sugita, S., W. Han, et al. (2001). "Synaptotagmin VII as a plasma membrane Ca(2+) sensor in exocytosis." Neuron **30**(2): 459-73.
- Sugita, S., O. H. Shin, et al. (2002). "Synaptotagmins form a hierarchy of exocytotic Ca(2+) sensors with distinct Ca(2+) affinities." Embo J **21**(3): 270-80.
- Sutton, R. B., D. Fasshauer, et al. (1998). "Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution." Nature **395**(6700): 347-53.
- Tellam, J. T., S. McIntosh, et al. (1995). "Molecular identification of two novel Munc-18 isoforms expressed in non-neuronal tissues." J Biol Chem **270**(11): 5857-63.
- Toonen, R. F., K. J. de Vries, et al. (2005). "Munc18-1 stabilizes syntaxin 1, but is not essential for syntaxin 1 targeting and SNARE complex formation." J Neurochem **93**(6): 1393-400.
- Toonen, R. F. and M. Verhage (2003). "Vesicle trafficking: pleasure and pain from SM genes." Trends Cell Biol **13**(4): 177-86.
- Towbin, H., T. Staehelin, et al. (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(9): 4350-4.
- Tsien, R. and T. Pozzan (1989). "Measurement of cytosolic free Ca²⁺ with quin2." Methods Enzymol **172**: 230-62.
- Tsuboi, T. and M. Fukuda (2006). "The Slp4-a Linker Domain Controls Exocytosis through Interaction with Munc18-1 {middle dot}Syntaxin-1a Complex." Mol Biol Cell **17**(5): 2101-12.
- Tsuboi, T. and G. A. Rutter (2003). "Multiple forms of "kiss-and-run" exocytosis revealed by evanescent wave microscopy." Curr Biol **13**(7): 563-7.
- Unsicker, K., K. Huber, et al. (2005). "The chromaffin cell and its development." Neurochem Res **30**(6-7): 921-5.
- Vacquier, V. D. (1975). "The isolation of intact cortical granules from sea urchin eggs: calcium ions trigger granule discharge." Dev Biol **43**(1): 62-74.
- Verhage, M., A. S. Maia, et al. (2000). "Synaptic assembly of the brain in the absence of neurotransmitter secretion." Science **287**(5454): 864-9.
- Vites, O., J. S. Rhee, et al. (2004). "Reinvestigation of the role of snapin in neurotransmitter release." J Biol Chem **279**(25): 26251-6.
- Voets, T., R. F. Toonen, et al. (2001). "Munc18-1 promotes large dense-core vesicle docking." Neuron **31**(4): 581-91.
- Wang, Y., M. Okamoto, et al. (1997). "Rim is a putative Rab3 effector in regulating synaptic-vesicle fusion." Nature **388**(6642): 593-8.
- Weimer, R. M., J. E. Richmond, et al. (2003). "Defects in synaptic vesicle docking in unc-18 mutants." Nat Neurosci **6**(10): 1023-30.
- Wu, M. N., J. T. Littleton, et al. (1998). "ROP, the Drosophila Sec1 homolog, interacts with syntaxin and regulates neurotransmitter release in a dosage-dependent manner." Embo J **17**(1): 127-39.

- Xu, T., T. Binz, et al. (1998). "Multiple kinetic components of exocytosis distinguished by neurotoxin sensitivity." Nat Neurosci **1**(3): 192-200.
- Yamaguchi, T., I. Dulubova, et al. (2002). "Sly1 binds to Golgi and ER syntaxins via a conserved N-terminal peptide motif." Dev Cell **2**(3): 295-305.
- Yang, B., L. Gonzalez, Jr., et al. (1999). "SNARE interactions are not selective. Implications for membrane fusion specificity." J Biol Chem **274**(9): 5649-53.
- Yang, B., M. Steegmaier, et al. (2000). "nSec1 binds a closed conformation of syntaxin1A." J Cell Biol **148**(2): 247-52.
- Yang, C., K. J. Coker, et al. (2001). "Syntaxin 4 heterozygous knockout mice develop muscle insulin resistance." J Clin Invest **107**(10): 1311-8.
- Yang, R., R. S. Puranam, et al. (2000). "Autoimmunity to munc-18 in Rasmussen's encephalitis." Neuron **28**(2): 375-83.
- Yang, X., P. Xu, et al. (2006). "Domain requirement for the membrane trafficking and targeting of syntaxin 1A." J Biol Chem.
- Zacharias, D. A., J. D. Violin, et al. (2002). "Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells." Science **296**(5569): 913-6.

9 Lebenslauf

Felipe Emilio Zilly

Diplom-Biochemiker

geboren am 14.08.1977 in Mülheim an der Ruhr

Deutscher

ledig

Seit 9/2002 **Dissertation** in der Abteilung für Neurobiologie am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen

Seit 9/2002 **Zusatzstudium** der Wirtschaftswissenschaften, FernUni-Hagen

12/2001 – 6/2002 **Diplomarbeit** am Lehrstuhl für Molekulare Neurobiochemie, Ruhr-Uni-Bochum

10/1999 – 6/2002 **Hauptstudium** der Biochemie, Ruhr-Uni-Bochum

10/1997 – 9/1999 **Grundstudium** der Biochemie, Ruhr-Uni-Bochum

8/1996 – 8/1997 **Zivildienst** im St.Elisabeth-Krankenhaus, Oberhausen

8/1987 – 6/1996 **Abitur** am Heinrich-Heine-Gymnasium, Oberhausen

8/1983 – 6/1987 **Grundschule** an der Landwehr, Oberhausen

Göttingen, 29. Mai 2006